



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δομικός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της
απακετυλάσης πολυσακχαριτών BC2929,
του *Bacillus cereus*



Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας

Υπεύθυνος Καθηγητής: Κοκκινίδης Μιχάλης

Μαριάννα Γρινιεζάκη,

Ηράκλειο, 2018

Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας, του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Μιχάλη Κοκκινίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχθηκε στο Εργαστήριό του, για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Η απόλυτη υποστήριξή του και η υπομονή του καθώς και οι συμβουλές και η καθοδήγησή του, ήταν κρίσιμες σε όλη την πορεία της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά την Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Αθανασάκη και τον Κύριο Ερευνητή του IMBB (ITE) κ. Κυριάκο Πετράτο επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, όταν δέχθηκαν να γίνουν μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής καθώς και για την πολύτιμη συνεισφορά τους στη συγγραφή της διπλωματικής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας, γενικά, για τη βοήθειά τους και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν, και ειδικά την κα. Α. Κοτσιφάκη, τεχνικό του Εργαστηρίου, για την καθοδήγηση και υπομονή της, καθώς και την κα. Μ. Προβιδάκη, επίσης τεχνικό, για την καθοριστική συμβολή της στα πειράματα που σχετίζονταν κυρίως με Μοριακή Βιολογία. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας για την εξαιρετική συνεργασία, και ιδιαίτερω τη Dr. Ε. Μπαλωμένου. Εύχομαι σε όλους πάντα επιτυχίες. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για όλη τη στήριξη και αγάπη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Περίληψη..... | 6 |
| Abstract..... | 8 |
| 1.Εισαγωγή..... | 10 |
| 1.1. Πεπτιδογλυκάνη..... | 10 |
| 1.1.1. Δομή της πεπτιδογλυκάνης..... | 10 |
| 1.1.2. Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης..... | 12 |
| 1.1.3. Βιολογικός ρόλος της πεπτιδογλυκάνης στην παθογένεια..... | 14 |
| 1.1.4. Ενζυμική απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης και βιολογικός ρόλος..... | 15 |
| 1.2. Bacillus cereus και Bacillus anthracis..... | 16 |
| 1.3. Βιοϋμένια..... | 18 |
| 1.3.1. Γενικά..... | 18 |
| 1.3.2. Βήματα για το σχηματισμό του βιοϋμενίου..... | 21 |
| 1.3.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας βιοϋμενίων..... | 24 |
| 1.4. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών/πεπτιδογλυκάνης..... | 25 |
| 1.5. Δομή των απακετυλασών πολυσακχαριτών..... | 27 |
| 1.6. Η ασυνήθιστη υδροξυλίωσης του C _α της Pro και η ωρίμανση του ενεργού κέντρου των απακετυλασών πολυσακχαριτών..... | 29 |
| 1.7. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών του Bacillus cereus..... | 30 |
| Σκοπός..... | 32 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 33 |
| 2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου της bc2929 μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.. | 33 |
| 2.1.1. Κλωνοποίηση του ολόκληρου γονιδίου της BC2929..... | 33 |
| 2.1.2. Κλωνοποίηση του C-truncated γονιδίου της BC2929 καθώς και έλεγχος μετασχηματισμένων αποικιών..... | 34 |
| 2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Midipreps και Minipreps)..... | 35 |
| 2.3. Πέψη πλασμιδιακού φορέα και γονιδιακού προϊόντος PCR..... | 36 |
| 2.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 36 |
| 2.5. Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση κολώνας QIAquick..... | 37 |
| 2.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR με τη χρήση στήλης QIAquick..... | 37 |
| 2.7. Αντίδραση συγκόλλησης (ligation)..... | 37 |
| 2.8. Μετασχηματισμός του γονιδίου σε δεκτικά κύτταρα..... | 37 |
| 2.9. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης (glycerol stock) προς μακρά συντήρηση και χρήση..... | 38 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.10. | Υπερέκφραση της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης BC2929 σε κύτταρα <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | 38 |
| 2.11. | Έλεγχος υπερέκφρασης της BC2929 ή της C-truncated BC2929 και έλεγχος διαλυτότητας..... | 39 |
| 2.12. | Διάρρηξη κυττάρων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και υπό αποδιατακτικές συνθήκες | 41 |
| 2.13. | Απομόνωση της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης BC2929 μέσω της μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας (κολώνα Ni-NTA agarose) υπό αποδιατακτικές και μη, συνθήκες.... | 42 |
| 2.14. | Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE | 46 |
| 2.15. | Διαπίδωση (Dialysis) και Συγκέντρωση πρωτεΐνης | 47 |
| 2.16. | Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop | 47 |
| 2.17. | Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM)..... | 48 |
| 2.18. | Χρωματογραφία διαπερατότητας (gel filtration Sephacryl S200)..... | 48 |
| 2.19. | Κρυσταλλώσεις..... | 49 |
| 2.20. | Μελέτη με κυκλικό διχρωϊσμός (CD) και Multi-angle light scattering analysis (MALS) | 50 |
| 2.21. | Προετοιμασία δείγματος για ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας | 51 |
| 3. | Αποτελέσματα | 53 |
| 3.1. | Καθαρισμός της BC2929 με χρωματογραφία συγγένειας (κολώνα Ni-NTA agarose) παρουσία τσαπερονών (I) | 53 |
| 3.2. | Διαχωρισμός της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration Sephacryl S200)..... | 55 |
| 3.3. | Παρατήρηση των συσσωματωμάτων της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) μέσω της μικροσκοπίας TEM..... | 59 |
| 3.4. | Μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας απακετυλάσης των πληθυσμών της BC2929 (Activity assay) | 60 |
| 3.5. | Καθαρισμός της BC2929 με χρωματογραφία συγγένειας (κολώνα Ni-NTA agarose) παρουσία τσαπερονών (II) | 61 |
| 3.6. | Έλεγχος υπερέκφρασης της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) σε διαφορετικά στελέχη του <i>E. coli</i> | 63 |
| 3.7. | Έλεγχος διαλυτότητας της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) που εκφράζεται στα JM109..... | 66 |
| 3.8. | Καθαρισμός της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) που εκφράζεται στα κύτταρα JM109 | 68 |
| 3.9. | Επιλογή αμινοξέων για τη δημιουργία της C-truncated BC2929 | 70 |
| 3.10. | Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) | 71 |
| 3.11. | Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) για gel extraction..... | 73 |
| 3.12. | Ταυτοποίηση του C-truncated γονιδίου της BC2929..... | 74 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.13. | Έλεγχος ενσωμάτωσης του C-truncated γονιδίου της BC2929 στο φορέα pET26b(+) | 75 |
| 3.14. | Έλεγχος έκφρασης της C-truncated BC2929 (θερμοκρασία, χρόνος επαγωγής και διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG) (παρουσία τσαπερονών) σε κύτταρα BL21 DE3 | 76 |
| 3.15. | Καθαρισμός της C-truncated BC2929 (και μετά από επαναδιάλυση πελετών με κολώνα Ni-NTA agarose) | 81 |
| 3.16. | Κατάσταση της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών) παρουσία γλυκερόλης | 84 |
| 3.17. | Καθαρισμός της C-truncated BC2929 υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία ουρίας) | 85 |
| 3.18. | Παρατήρηση του ιζήματος της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών) με μικροσκοπία TEM | 87 |
| 3.19. | Επίδραση του pH στη συμπεριφορά της C-truncated BC2929 | 87 |
| 4. | Συζήτηση | 88 |
| 5. | Βιβλιογραφία | 93 |

Περίληψη

Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα μακρομόριο από μακριές αλυσίδες εναλλασόμενων μονάδων σακχάρων GlcNAc-MurNAc συνδεδεμένων μέσω β -1,4-N- γλυκοζιτικών δεσμών, που αποτελεί απαραίτητο συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Υπόκειται σε τροποποιήσεις της δομής της, όπως είναι η N-απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης από τις απακετυλάσες της N-ακετυλγλυκοζαμίνης, η οποία επηρεάζει την αναγνώριση του βακτηρίου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, ενώ επίσης το καθιστά ανθεκτικό στη δράση της λυσοζύμης. Οι απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης ανήκουν στην οικογένεια 4 των εστερασών υδατανθράκων (CE4), 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 οικογένειας εμφανίζουν σημαντική ομολογία μεταξύ τους και περιλαμβάνουν εκτός από την πολύ καλά συντηρημένη επικράτεια ομολογίας NodB, μια συντηρημένη τριάδα αμινοξικών καταλοίπων δέσμευσης μετάλλου (Asp, His, His), ένα συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο Asp στο ενεργό κέντρο, και μια συντηρημένη υδροξυλιωμένη Pro στο άτομο C α (2-Hyp), που εντοπίζονται στην επικράτεια NodB. Ο μέχρι σήμερα αποδεκτός καταλυτικός μηχανισμός αυτών των μεταλλο-εξαρτώμενων ενζύμων βασίζεται στο μηχανισμό αντίδρασης οξέος-βάσης. Τα γονιδιώματα του *Bacillus cereus* ATCC 14579 καθώς και του στενού συγγενή του *Bacillus anthracis* (90% ομολογία), περιέχουν από 11 γονίδια που κωδικοποιούν για απακετυλάσες πολυσακχαριτών, εκ των οποίων οι 6 φαίνεται να κωδικοποιούν πιθανές απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης που είναι υψηλά ομόλογες. Μεταξύ αυτών των 6 απακετυλάσων βρίσκεται και η BC2929 του *Bacillus cereus* πάνω στην οποία εκπονήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική διατριβή, και η οποία εμφανίζει 94% ομολογία με τη BA2944 του *Bacillus anthracis* και φέρει τα συντηρημένα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν, αλλά αντί για Pro φέρει Ser στο ενεργό κέντρο. Η BC2929 (χωρίς το σηματοδοτικό πεπτίδιο) μελετήθηκε με διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους με στόχο τη διερεύνηση των ιδιοτήτων και ειδικά το σχηματισμό ολιγομερισμού και τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Υπερεκφράστηκε σε κύτταρα BL21 DE3 (παρουσία πρωτεϊνών οδηγών-των τσαπερονών) καθώς και σε κύτταρα JM109 (χωρίς τσαπερόνες) όπου παρατηρήθηκε παρόμοιο επίπεδο μέτριας διαλυτότητας, ενώ η πρωτεΐνη ήταν ιδιαίτερα ασταθής. Οι κρυσταλλώσεις που

δοκιμάστηκαν, δεν έδωσαν αποτέλεσμα. Μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration) διαπιστώθηκε η παρουσία διαφορετικών πληθυσμών, με το δεύτερο από τα peaks που εμφανίστηκαν να παρουσιάζει ενεργότητα απακετυλάσης. Επίσης, κατά τη συμπύκνωση της πρωτεΐνης εμφανίζονταν συσσωματώματα, τα οποία παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία TEM. Η αποκοπή (truncation) του C-τελικού άκρου της BC2929 φαίνεται να μείωσε ακόμα περισσότερο τη διαλυτότητα και σταθερότητά της και να επηρέασε το σχηματισμό των συσσωματωμάτων ενώ η αποκοπή του N-τελικού άκρου επηρεάζει τον πολυμερισμό. Η ομόλογή της BA2944 βρέθηκε ότι εκκρίνεται στην επιφάνεια του κυττάρου, δρώντας στον ουδέτερο πολυσακχαρίτη, ενώ και η ίδια η BC2929 προβλέπεται, βάσει προγράμματος, να είναι περιπλασμική. Έτσι, υπάρχει μια υποψία ότι μπορεί να εμπλέκεται ενδεχομένως στη δημιουργία των βιοϋμενίων του *Bacillus cereus*. Τα αποτελέσματα λοιπόν έδειξαν ότι πρόκειται για μια ασταθή πρωτεΐνη που περνάει διάφορες καταστάσεις ολιγομερισμού ενώ απαιτούνται δομικές μελέτες και επιπλέον πειράματα, για διαλευκανθεί η λειτουργία της.

Abstract

Peptidoglycan is a macromolecule comprised of long chains of alternating saccharide units of GlcNAc-MurNAc, linked by β -1,4-N-glycoside bonds and it is an essential component of the bacterial cell wall. 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 and also confers resistance to lysozyme. GlucNAc deacetylases belong to the family 4 of carbohydrate esterases (CE4), which includes N-acetylglucosamine peptidoglycan deacetylases (EC 3.1.1.-), rhizobial NodB chitooligosaccharide deacetylases (EC 3.5.1.-), chitin deacetylases (EC 3.5.1.41), acetyl-xylan esterases (EC 3.1.1.72), and xylanases A, C, D and E (EC 3.2.1.8). Members of this family are composed apart from the highly conserved homology domain NodB, from a well conserved triad of metal binding aminoacid residues (Asp, His, His), a well-conserved catalytic residue of Asp and a well conserved hydroxyl-Pro (2-Hyp) in the Nodb domain. The currently accepted catalysis mechanism of these metal-dependant enzymes depends on an acid-basis reaction mechanism. Genomes of *Bacillus cereus* ATCC 14579 as well as its close relative *Bacillus anthracis* (90% homology), contain 11 genes which encode for polysaccharide deacetylases, 6 of which encode for putative N-acetylglucosamine deacetylases which are highly homologous. Among these 6 GlucNAc deacetylases, BC2929 of *Bacillus cereus* can be found, which is the subject of this master thesis, and which shares 94% homology with BA2944 of *Bacillus anthracis* and also carries the conserved residues aforementioned but has Ser in the place of Pro in the active site. BC2929 (without signal peptide) was studied using diverse physicochemical methods with the aim of examining its properties and especially the formation of oligomers and aggregates. BC2929 was overexpressed in BL21 DE3 cells (with the presence of chaperones) as well as in JM109 cells (without chaperones) and in both cases a relatively medium level of solubility was observed and the protein was significantly unstable. The crystallization screens tested did not give any results. After gel filtration was performed, the presence of a dimer population showing deacetylase activity was observed. In addition, during protein concentration, aggregates were formed and were observed by TEM microscopy. The truncation of C-terminus of BC2929 seems to have reduced even more protein solubility and stability and to have affected aggregates' formation. On the other hand, truncation of N-terminus affects polymerization. Its homologue BA2944 is found to be secreted to the cell surface, acting on neutral polysaccharide, while itself BC2929 is also predicted by a programme to be periplasmic. It is

therefore suspected that it may be implicated in biofilm formation of *Bacillus cereus*. Results showed that BC2929 is an unstable protein that passes through different stages of oligomerism, while structural analysis and further experiments are necessary to clarify its function.

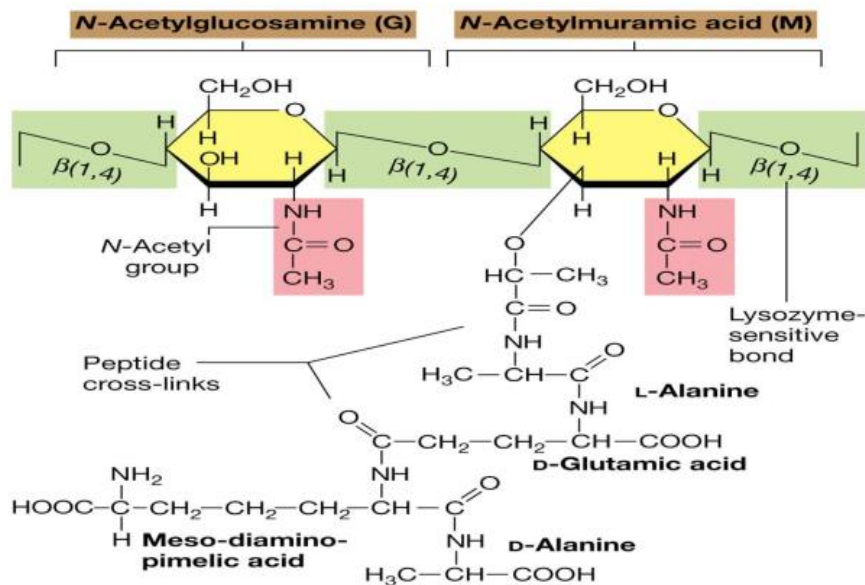
1.Εισαγωγή

1.1. Πεπτιδογλυκάνη

1.1.1. Δομή της πεπτιδογλυκάνης

Τα βακτήρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ευρέως σε θετικά κατά Gram και σε αρνητικά κατά Gram βάσει της παρουσίας μιας εξωτερικής μεμβράνης και του πάχους της στιβάδας της πεπτιδογλυκάνης. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, η στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης είναι πολύ παχύτερη ενώ στα αρνητικά είναι πιο λεπτή, αλλά στερούνται εξωτερικής μεμβράνης. Επιπλέον, στα θετικά κατά Gram βακτήρια έως και 90% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη (περιέχουν πολλές (έως 25) στιβάδες πεπτιδογλυκάνης), ενώ σε μικρές ποσότητες απαντούν επίσης τα τειχοϊκά οξέα (WTA) και λιποτειχοϊκά οξέα (LTA), που είναι πολυσακχαρίτες ομοιοπολικά προσδεδεμένοι στην πεπτιδογλυκάνη ή ενσωματωμένοι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αντιστοίχως [1]. Η πεπτιδογλυκάνη (PG) ή μουρεΐνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες σακχάρων και αποτελεί το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Η κύρια λειτουργία της είναι να διατηρεί την κυτταρική ακεραιότητα προστατεύοντας από την πίεση σπαραγής καθώς και να εξασφαλίζει τη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ συμβάλλει επίσης στη διαμόρφωση και τη διατήρηση ενός καθορισμένου κυτταρικού σχήματος λειτουργώντας ως σκαλωσιά για την αγκυροβόληση άλλων συστατικών όπως είναι πρωτεΐνες και τειχοϊκά οξέα. Εμπλέκεται μάλιστα και στις διαδικασίες της κυτταρικής αύξησης, της κυτταρικής διαίρεσης και της αυτόλυσης [2]. Το μονομερές της πεπτιδογλυκάνης δομείται από μια δισακχαριτική μονάδα που συνίσταται από δύο αμινοσάκχαρα, τη Ν-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (GlcNAc ή NAG) και το Ν-ακετυλ-μουραμικό οξύ (MurNAc ή NAM), που είναι συνδεδεμένα μέσω β-1,4-Ν- γλυκοζιτικών δεσμών. Εναλλασσόμενες μονάδες GlcNAc-MurNAc συνθέτουν τελικά τις μακριές αλυσίδες του μακρομορίου της πεπτιδογλυκάνης. Στη γαλακτική ομάδα του MurNAc συνδέεται ομοιοπολικά ένα πενταπεπτίδιο αποτελούμενο συνήθως από 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 [3], (Εικόνα 1). Το τελευταίο κατάλοιπο D-Ala χάνεται στο ώριμο μακρομόριο. Οι περισσότερες διαφοροποιήσεις στην πεπτιδογλυκάνη αφορούν τον τρόπο διασύνδεσης και τη σύσταση της πεπτιδικής γέφυρας. Συγκεκριμένα: Το πρώτο αμινοξύ του πενταπεπτιδίου που στα περισσότερα βακτήρια είναι L-Ala ή σπανίως Gly ή L-Ser, προστίθεται από τη λιγάση MurC. Το αμινοξύ στη δεύτερη θέση, που σε όλα τα είδη είναι D-Glu, προστίθεται από τη λιγάση MurD και συχνά εμφανίζεται υδροξυλιωμένο. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση εντοπίζεται στη θέση 3. Η προσθήκη του τρίτου αμινοξέος καταλύεται από τη λιγάση MurE. Αυτό το αμινοξύ είναι γενικά ένα διάμινο οξύ, είτε meso-A2pm (στα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, Mycobacteria, Bacilli) ή L-Lys (στα

περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια), σε ορισμένα είδη συναντώνται άλλα διαμινο οξέα (L-Orn, LL-A2pm, meso-λανθιονίνη, L-2,4-διαμινοβουτυρικό οξύ, D-Lys). Τα αμινοξέα στις θέσεις 4 και 5 προστίθενται ως διπεπτιδία στις περισσότερες περιπτώσεις D-Al-D-Ala, η D-Ala κυριαρχεί στη θέση 4 ενώ λίγες φορές μπορεί να βρεθεί Gly στη θέση 4 ή 5. Η σύνθεση του διπεπτιδίου πραγματοποιείται από το ένζυμο Ddl και η ενσωμάτωσή τους στο πενταπεπτιδίο στη θέση 4 καταλύεται από τη λιγάση MurF. Στα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια, η διασύνδεση γίνεται συνήθως με μικρές πεπτιδικές αλυσίδες, τις πεπτιδικές γέφυρες, από πρόσθετα αμινοξέα, οι τύποι και οι αριθμοί των οποίων ποικίλλουν με το είδος του οργανισμού και οι οποίες είναι απαραίτητες για να προσδώσουν σχετική ακαμψία προς όλες τις κατευθύνσεις. Εκτός από αμινοξέα, τα οποία απαντούν και στο πενταπεπτιδίο, η πεπτιδική γέφυρα μπορεί να περιέχει επίσης γλυκίνη, θρεονίνη, σερίνη ή ασπαρτικό οξύ. Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες διασύνδεσης, οι οποίες καταλύονται από την επικράτεια τρανσπεπτιδάσης των πρωτεϊνών που δεσμεύουν πενικιλίνη: στην πρώτη, που είναι και η συνηθέστερη, παρατηρείται διασύνδεση (3-4), όπου η διασύνδεση των γλυκανικών κλώνων συμβαίνει μεταξύ της καρβοξυλομάδας της D-Ala στη θέση 4 και της αμινο-ομάδας του διαμινο οξέος στη θέση 3, είτε άμεσα (στα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια) είτε μέσω μιας μικρής πεπτιδικής γέφυρας (στα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια). Στη δεύτερη ομάδα (διασύνδεση 2-4), η διασύνδεση πραγματοποιείται μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας της D-Glu στη θέση 2 της μιας πεπτιδικής υπομονάδας και της καρβοξυλικής ομάδας της D-Ala στη θέση 4 της άλλης, ενώ σε αυτές τις θέσεις θα πρέπει απαραίτητα να υπάρχει ένα διαμινο-οξύ (L- ή D-Lys, D-Orn, D-2,4-διαμινοβουτυρικό οξύ). Οι αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης των *Bacilli* (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* και *Bacillus cereus*) έχουν μέσο μήκος μεταξύ 50 και 250 δισακχαριτικών μονάδων [2].



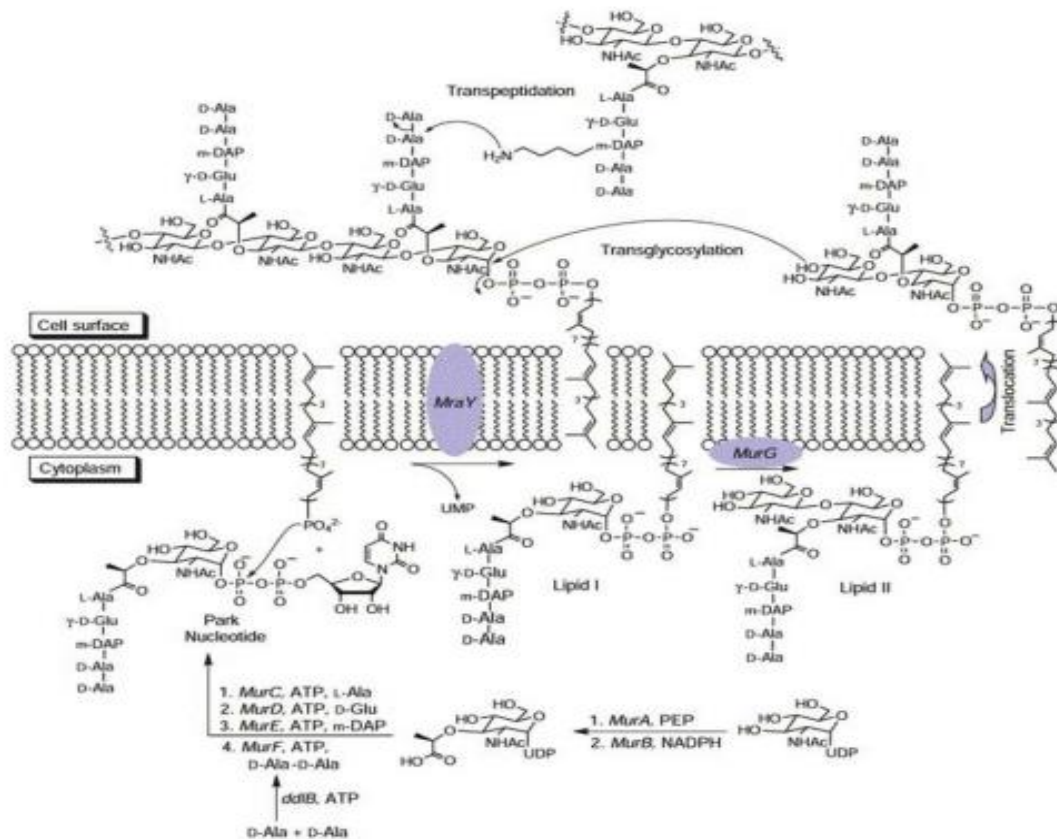
Εικόνα 1: Μονομέρες πεπτιδογλυκάνης που αποτελείται από τα δύο σάκχαρα (NAM, NAG) ενωμένα με το τετραπεπτιδίο (έχει αποκοπεί η τελευταία D-αλανίνη).

1.1.2. Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης

Κατά την αύξηση ενός κυττάρου πριν την κυτταρική διαίρεση, θα πρέπει να συντεθεί νέα πεπτιδογλυκάνη και αυτό το νέο υλικό, θα πρέπει να προστεθεί στο προϋπάρχον χωρίς να διαταραχθεί η δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Με αφετηρία λοιπόν τον δακτύλιο FtsZ δημιουργούνται μικρά ανοίγματα στο τοίχωμα από ένζυμα που ονομάζονται αυτολυσίνες ή υδρολάσες και βρίσκονται στο διαιρεσίσωμα, και το νέο υλικό -τα πρόδρομα της πεπτιδογλυκάνης- αποτίθενται κατά μήκος αυτών των ανοιγμάτων. Από την ένωση παλιάς και νέας πεπτιδογλυκάνης και πριν τη διάρρηξη των χημικών δεσμών στο εσωτερικό της παλιάς πεπτιδογλυκάνης, δημιουργείται μια αναδίπλωση στην επιφάνεια του κυττάρου των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ανάλογη μιας ουλής, χωρίς όμως να προκαλείται ρωγμή από την πίεση σπαργής [4].

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων που μπορεί όμως να χωριστεί σε τρία γενικά βήματα, που συμβαίνουν σε τρία διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα- το κυτταρόπλασμα, την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το περίπλασμα [5]: Οι υπομονάδες της πεπτιδογλυκάνης συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως πρόδρομα που ενεργοποιούνται από UDP, που έπειτα μετατοπίζονται ως ενώσεις συνδεδεμένες με λιπίδια κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τελικά ενσωματώνονται στην προϋπάρχουσα δομή της μουρείνης. Αναλυτικότερα [4-8, 10]: Τα πρόδρομα για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, διφωσφορική ουριδίνη-*N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc) και UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα από τα ένζυμα MurA-F. Το UDP-MurNAc παράγεται έπειτα από UDP-GlcNAc, ακολουθώντας δύο διαδοχικές ενζυμικές αντιδράσεις: τη σύνθεση του ενολοπυροσταφυλικού-UDP-GlcNAc και την επακόλουθη αναγωγή του, που καταλύεται από τις MurA και MurB. Έπειτα, το πρόδρομο UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο συσσωρεύεται σε μια σειρά διαδοχικών, εξαρτώμενων από ATP, ενζυμικών βημάτων που καταλύονται από λιγάσες Mur. Οι MurC και MurD καταλύουν την προσθήκη της L-Ala και D-Glu, αντιστοίχως, και η MurE αυτή της L-Lys ή του mDAP. Συγκεκριμένες ρακεμάσες μετατρέπουν το φυσικά σχηματιζόμενο L-στερεοϊσομερές της Ala και Glu στις D-μορφές που εντοπίζονται στην πεπτιδογλυκάνη [7]. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης περιλαμβάνει τη μεταφορά του ενολοπυροσταφυλικού από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό στη C3 υδροξυλομάδα της UDP-GlcNAc που καταλύεται από τη MurA, συνθέτοντας το ενολοπυροσταφυλικό-UDP-GlcNAc, το οποίο ακολούθως ανάγεται από τη MurB, οδηγώντας στο σχηματισμό του UDP-MurNAc. Η αλυσίδα του πενταπεπτιδίου συνδέεται έπειτα με σταδιακό τρόπο με MurC, MurD, MurE προσθέτοντας L-αλανίνη, D-γλουταμικό οξύ, και L-λυσίνη (ή m-DAP), αντιστοίχως. Χρησιμοποιώντας D-Ala που παράγεται από L-Ala μέσω της ρακεμάσης της D-αλανίνης (Alr), η D-Ala-D-Ala λιγάση (Ddl) κάνει το διπεπτίδιο, που αργότερα προστίθεται στο UDP-MurNAc-τριπεπτίδιο μέσω του MurF, ώστε προκύπτει το UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο. Το επόμενο στάδιο στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης ξεκινάει με τη μεταφορά του υδρόφιλου UDP-MurNAc-

πενταπεπτιδίο σε ένα λιπιδιακό μεταφορέα στη βακτηριακή μεμβράνη [8]. Για την εξαγωγή στο περίπλασμα, πρώτα το φωσφο-N-ακετυλομουραμικό-πενταπεπτιδίο (P-N-MurNAc-πενταπεπτιδίο) του κυτταροπλασματικού UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου αγκυροβολεί μέσω ενός πυροσφωφορικού στη βακτοπρενόλη (C55-undecaprenyl-phosphate). Αυτό το βήμα καταλύεται από τη μεμβρανική τρανσλοκάση MraY και παράγει το πρώτο ενδιάμεσο συνδεδεμένο με λιπίδιο, το Λιπίδιο I. Τελικά, η ομοιοπολική σύνδεση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης που καταλύεται από το MurG, στη βακτοπρενόλη, θα δώσει το Λιπίδιο II. Το Λιπίδιο II μεταφέρεται προς την εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω της MurJ, όπου το τμήμα GlcNAc-MurNAc-πενταπεπτιδίου του Λιπιδίου II γίνεται προσβάσιμο σε ένζυμα γλυκοζυλτρανσφεράσης (GT) και τρανσπεπτιδάσης (TP) που καταλύουν το γραμμικό πολυμερισμό των συντεθειμένων υπομονάδων, για το σχηματισμό του μακρομορίου και την πεπτιδική διασύνδεση αντίστοιχα. Η μεταφορά των προδρόμων του Λιπιδίου II φαίνεται να εξαρτάται από την τρέχουσα σύνθεση φωσφολιπιδίων και από την αλληλεπίδραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών RodA και FtsW, που είναι τρανσπεπτιδάσες με μεγάλο βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους και οι οποίες αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες συνθάσες μουρεΐνης, τις πρωτεΐνες 2 και 3 (PBP2 και PBP3) αντίστοιχα, μεταφέροντάς τους τα πρόδρομα, που στη συνέχεια ενσωματώνονται στην υπάρχουσα μουρεΐνη [4, 10]. Σε αυτό το στάδιο, δρουν οι αυτολυσίνες που υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς των υπομονάδων της παλιάς πεπτιδογλυκάνης στο σημείο που θα εισαχθεί το νέο υλικό. Έπειτα οι γλυκοζυλτρανσφεράσες που καταλύουν το σχηματισμό των β-1,4- N-γλυκοζιτικών δεσμών πολυμερίζοντας τις αλυσίδες, συνεργάζονται με τις τρανσπεπτιδάσες [9]. Έχουν αναφερθεί βέβαια και διλειτουργικά ένζυμα που εμφανίζουν ενεργότητα τρανσπεπτιδάσης και τρανσγλυκοσυλάσης μαζί (PBP1A, PBP1B, και PBP1C) [6]. Η αντίδραση της τρανσγλυκοσυλίωσης, πραγματοποιείται σε δύο βήματα όπου το τμήμα D-Ala-D-Ala του πρόδρομου πενταπεπτιδίου (δότης) πέπτεται με τη δράση μιας D,D-καρβοξυπεπτιδάσης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της τελικής D-Ala και την εξασφάλιση της απαιτούμενης ενέργειας για την αντίδραση. Δέκτης της αντίδρασης πρέπει να είναι μια ελεύθερη ε-αμινομάδα ενός καταλοίπου A2pm (DAP), που οδηγεί στο σχηματισμό ενός D,D-πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της προτελευταίας D-Ala και του m-A2pm. Ομοίως και αν στη θέση του DAP υπάρχει L-Lys, όπως συμβαίνει στα θετικά κατά Gram βακτήρια [10]. Τελικά, συντίθενται οι μακριές αλυσίδες εναλλασσομένων υπομονάδων N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, που συνδέονται μέσω β-1,4-N-γλυκοζιτικούς δεσμούς, που συνιστούν τη δομή της πεπτιδογλυκάνης.



Εικόνα 2: Μονοπάτι βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης

1.1.3. Βιολογικός ρόλος της πεπτιδογλυκάνης στην παθογένεια

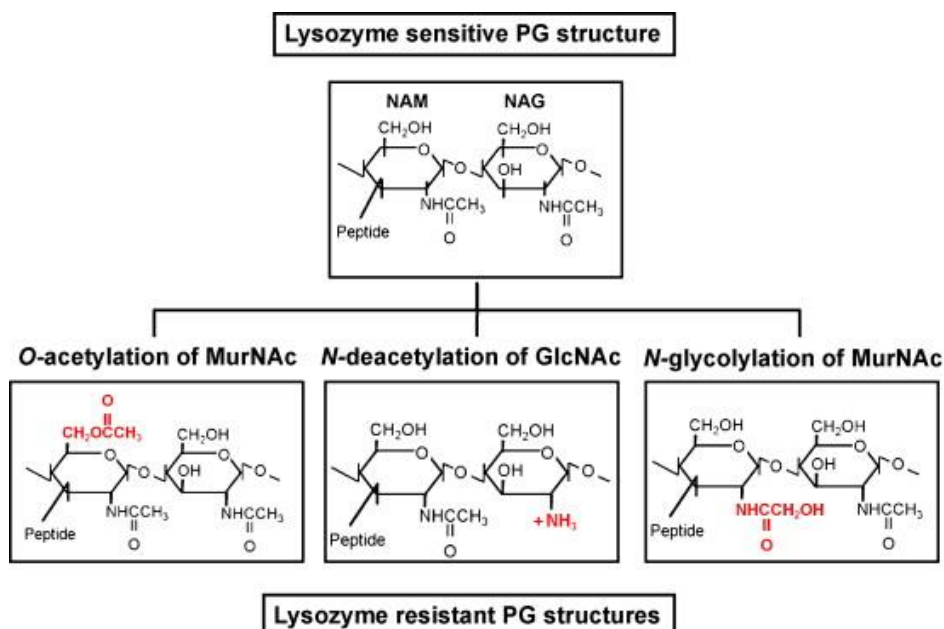
Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί ένα τελεστή που διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή οδηγώντας σε αποκρίσεις όπως είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων, η κυτταροτοξικότητα, η επαγωγή αρθρίτιδας κ.λ.π.. Αυτό συμβαίνει όταν το ανοσοποιητικό σύστημα «αντιληφθεί» την παρουσία τμημάτων της πεπτιδογλυκάνης, των μουροπεπτιδίων, τα οποία προκύπτουν από τη δράση των υδρολασών και των D-,D-καρβοξυπεπτιδασών, κατά τη διαδικασία ανακύκλωσης του κυτταρικού τοιχώματος. Τα μουροπεπτιδία του βακτηρίου που έχει εισβάλλει στον οργανισμό, αναγνωρίζονται από τους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς Nod1 και Nod2, που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων Nod με επικράτεια ολιγομερισμού που προσδένει νουκλεοτίδια (nucleotide-binding oligomerization domain), ενεργοποιείται το μονοπάτι NF-kB και έτσι επάγεται την ανοσοαπόκριση. Συγκεκριμένα, ο Nod1 υποδοχέας είναι αυτός που αναγνωρίζει το GlcNAc-MurNAc-L-alanine-γ-D-glutamate-mesoDAP (GMTriP_{DAP}) ενώ ο υποδοχέας Nod2 αναγνωρίζει το GlcNAcMurNAc-L-alanine-D-glutamate (GMDiP). Ωστόσο, το γεγονός ότι η ανίχνευση της πεπτιδογλυκάνης από τους Nod1,2 απαιτεί προηγουμένως την επεξεργασία της από υδρολάσες του βακτηρίου ή του ξενιστή, είναι ανησυχητικό, καθώς υποδηλώνει ότι οποιοσδήποτε μηχανισμός

εμποδίζει την απελευθέρωση των μωροπεπτιδίων των παθογόνων βακτηρίων, θα εμποδίσει και την αναγνώρισή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή [3].

1.1.4. Ενζυμική απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης και βιολογικός ρόλος

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 [11], (Εικόνα 3).

Η N-απακετυλίωση βρέθηκε από το 1971, όταν η μελέτη της σύστασης της πεπτιδογλυκάνης του ανθεκτικού στη λυσοζύμη, *Bacillus cereus*, ταυτοποίησε την παρουσία υψηλού ποσοστού μη ακετυλιωμένων καταλοίπων –κυρίως- γλυκοζαμίνης (GlcN): 77% (GlcN)/ 50% (MurN). Η απακετυλίωση αποτελεί χαρακτηριστικό αρκετών παθογόνων βακτηρίων αλλά το ποσοστό των απακετυλιωμένων καταλοίπων (GlcN ή/και MurN) ποικίλει ανάλογα με το είδος αλλά και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους [12]. 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. Κάποιες γνωστές απακετυλάσες έχουν μάλιστα ένα προβλεπόμενο εξωκυτταροπλασματικό εντοπισμό [11].



Εικόνα 3: Η O-ακετυλίωση (καταλοίπων MurNAc), η N-απακετυλίωση (καταλοίπων GlcNAc) και η N-γλυκοσυλίωση (καταλοίπων MurNAc) προσδίδουν στην πεπτιδογλυκάνη ανθεκτικότητα έναντι στη δράση της λυσοζύμης (Sukhithasri V. et al. 2013).

Η λυσοζύμη ή μουραμιδάση είναι μια υδρολάση που προέρχεται από τα μακροφάγα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα, και που στον άνθρωπο απαντά σε πολλούς ιστούς και σωματικά υγρά (αίμα, ούρα, ιδρώτα, δάκρυα, κ.λ.π). Είναι ένας σημαντικός παράγοντας του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος των ανθρώπων ενώ εκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες σε περιοχές βακτηριακής μόλυνσης. Έχει την ικανότητα να υδρολύει τους γλυκανικούς κλώνους της πεπτιδογλυκάνης μεταξύ του C1 του MurNAc και του C4 της GlcNAc, με αποτέλεσμα να σπάει το κυτταρικό τοίχωμα και να προκαλείται λύση των βακτηριακών κυττάρων. Η παρουσία όμως απακετυλιωμένων σακχάρων στην πεπτιδογλυκάνη μειώνει σημαντικά τη δράση της λυσοζύμης. Αυτό συμβαίνει διότι οι ακετυλο ομάδες των εξωσακχαριτών και τα αμινοξέα στη μεγάλη αύλακα του μορίου της λυσοζύμης είναι σημαντικά για τη δέσμευση του υποστρώματος, και έτσι η απακετυλιωμένη πεπτιδογλυκάνη καθίσταται πλέον ασθενές υπόστρωμα. Μόνο με χημική ακετυλίωση του υποστρώματος μπορεί να αποκατασταθεί η ενεργότητα της λυσοζύμης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η απακετυλίωση δεν είναι η μόνη τροποποίηση που επιδρά στην ενεργότητα της λυσοζύμης, καθώς και η Ο-ακετυλίωση του MurNAc και των ομοιοπολικών δεσμών πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος όπως του τειχοϊκού οξέος, επίσης οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα στη λυσοζύμη [11].

Η απακετυλίωση εισάγει πρόσθετο θετικό φορτίο στο κυτταρικό τοίχωμα που μπορεί είτε να επηρεάζει την πρόσδεση ειδικών πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος και άλλων ενώσεων, όπως του πολυσακχαρίτη της κάψας, είτε να αυξάνει την ανθεκτικότητα του βακτηρίου στα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια, που είναι σημαντικά στοιχεία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι επίσης πιθανόν να προκαλεί αναγνώριση του παθογόνου μέσω διαφορετικών υποδοχέων του ξενιστή. Τέλος, κάποιες βακτηριακές υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης (αυτολυσίνες), όπως είναι αυτές που κόβουν τους γλυκανικούς κλώνους (γλυκοζαμινιδάσες και μουραμιδάσες) ή το διάφραγμα πριν τη διαίρεση ή που απαιτούνται για την ανακύκλωση της πεπτιδογλυκάνης, μπορεί να έχουν διαφορετικές ενεργότητες απέναντι στην πλήρως ακετυλιωμένη ή απακετυλιωμένη πεπτιδογλυκάνη. Υπάρχουν βέβαια και κάποια βακτήρια θηρευτές, όπως το *Bdellovibrio bacteriovorus*, που ζουν εις βάρος αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (π.χ. *E. coli*): μετά από την εισβολή στο περίπλασμα απακετυλιώνει την πεπτιδογλυκάνη του θηράματος για να εμποδίσει την περαιτέρω υδρόλυσή της από τις αυτολυσίνες (π.χ. της *E. coli*) [11].

1.2. **Bacillus cereus και Bacillus anthracis**

Ο *Bacillus cereus* είναι ένας οργανισμός που ανήκει στα θετικά κατά Gram, ραβδόμορφα, αερόβια και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια, ενώ επίσης χαρακτηρίζεται ως κινητός βάκιλλος (Εικόνα 4). Συναντάται ευρέως στο περιβάλλον και ειδικά στο έδαφος και το φαγητό [13,14]. Ως βακτήριο του εδάφους, έχει την ικανότητα να εξαπλώνεται εύκολα σε πολλούς τύπους τροφίμων ενώ είναι γνωστό ότι ευθύνεται για το 2-5% των πεπτικών διαταραχών στον άνθρωπο [15]. Η παθογένεια του *B. cereus* σχετίζεται με την παραγωγή τοξινών: εκκρίνει τέσσερις αιμολυσίνες, τρεις διακριτές φωσφολιπάσες, μια

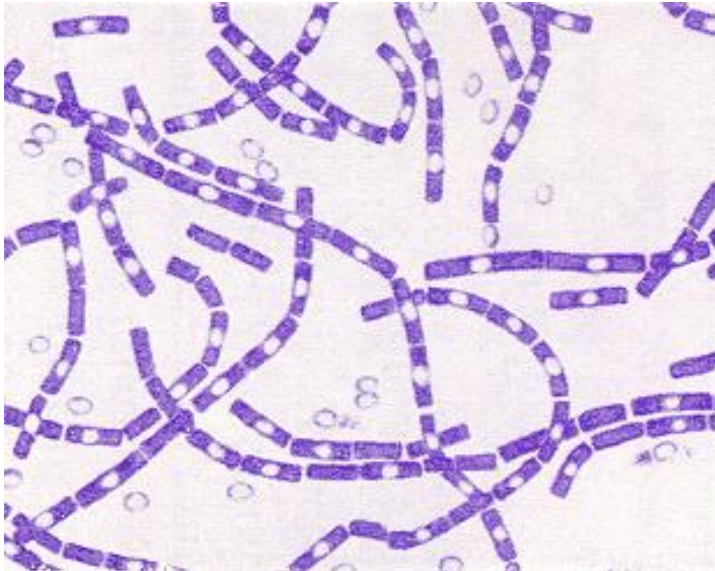
εμετική τοξίνη, και τρεις εντεροτοξίνες: την αιμολυσίνη BL (HBL), τη μη αιμολυτική εντεροτοξίνη (NHE), και την κυτταροτοξίνη K [16]. Ο *Bacillus cereus* έχει συσχετιστεί κυρίως με την πρόκληση δύο συνδρόμων [16-18]: του εμετικού συνδρόμου και του διαρροϊκού συνδρόμου. Το διαρροϊκό σύνδρομο, εκδηλώνεται 8-16 ώρες μετά την κατανάλωση μολυσμένου φαγητού και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κυρίως κοιλιακό άλγος και διάρροια. Προκαλείται από τρεις διαφορετικές θερμοευαίσθητες εντεροτοξίνες (HBL, NHE, κυτταροτοξίνη K), οι οποίες ενεργοποιούν μια εντερική αδενυλική κυκλάση και προκαλούν εντερική έκκριση υγρών. Από την άλλη, η εμετική τοξίνη (cereulide), είναι ένα θερμοανθεκτικό πεπτίδιο μοριακού βάρους περίπου 1,2 kDa, της οποίας η δομή είναι ένας πεπτιδικός δακτύλιος αποτελούμενος από τρεις επαναλήψεις τεσσάρων αμινοξέων: [D-O-Leu-D-Ala-O-Val-L-Val]3 [17]. Το εμετικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από ναυτία και έμετο, 1 με 6 ώρες μετά την κατανάλωση του μολυσμένου φαγητού. Η ανάρρωση, δε, επέρχεται μέσα σε 24 ώρες [18]. Εκτός από τροφικές δηλητηριάσεις, έχει συνδεθεί με ευρύ φάσμα άλλων μολύνσεων που περιλαμβάνουν βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα και εγκεφαλικά αποστήματα, ενδοφθαλμίτιδα, πνευμονία και άλλα [16]. Επιπλέον, ο *Bacillus cereus* μπορεί να προκαλέσει πολλά προβλήματα (σε βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων, σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις κ.λ.π.) λόγω της ικανότητάς του να παράγει βιοϋμένια σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων [19].



Εικόνα 4: Η μορφολογία του *Bacillus cereus*

Τα είδη της ομάδας του *B. cereus* στην οποία ανήκει ο *B. cereus*, παρουσιάζουν εντυπωσιακή ομοιότητα στην κυτταρική δομή, στη φυσιολογία και στο γενετικό σύστημα, όμως παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς την παθογένεια. Στενός του συγγενής είναι ο *Bacillus anthracis*, το 75-80% των γονιδίων τους είναι συντηρημένα [20]. Ο *Bacillus anthracis* (Εικόνα 5) είναι επίσης ένα θετικό κατά Gram ραβδόμορφο βακτήριο που σχηματίζει ενδοσπόρια, τα οποία μάλιστα έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιολογικό όπλο, ενώ είναι ευρέως γνωστός γιατί ευθύνεται για τη νόσο του άνθρακα. Η εισαγωγή ενδοσπορίων του *B. anthracis* μπορεί να συμβεί μέσω του δέρματος, της αναπνευστικής και της εντερικής οδού και να προκαλέσει έτσι τις τρεις αντίστοιχες μορφές της νόσου (οι δύο τελευταίες είναι

συνήθως θανάσιμες). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν δερματικές φουσκάλες που συνοδεύονται από οίδημα, πυρετό, πόνο στο θώρακα, δυσκολία αναπνοής, ναυτία, εμετό, διάρροια ή κοιλιακό άλγος. Τελικά προκαλείται νέκρωση και θάνατος [21]. Ο παθογόνος παράγοντας που διαχωρίζει τον *B. anthracis* από το στενό συγγενή του *B. cereus* κωδικοποιείται σε δύο πλασμίδια, το pXO1 που περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν μια θανατηφόρο τοξίνη, την τοξίνη του άνθρακα, και το pXO2 που κωδικοποιεί τα γονίδια της κάψας (το πολυ-D-γλουταμικό οξύ της κάψας) [22].



Εικόνα 5: *Bacillus anthracis* μετά από χρώση κατά Gram. Τα κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά τετράγωνα άκρα ενώ τα ενδοσπόρια έχουν ελλειψοειδές σχήμα και βρίσκονται κεντρικά στο σποράγγειο. Τα σπόρια διαθλούν έντονα το φως ενώ αντιστέκονται σε χρώση.

1.3. Βιοϋμένια

1.3.1. Γενικά

Οι μικροοργανισμοί έχουν παραδοσιακά μελετηθεί, χαρακτηριστεί και ταυτοποιηθεί ως πλαγκτονικοί και μονοκύτταροι. Στο περιβάλλον όμως τα βακτήρια μπορούν να βρεθούν είτε σε πλαγκτονική κατάσταση (planktonic state) είτε σε προσκολλημένη κατάσταση (sessile state), μέσα στα βιοϋμένια [23]. Παρόλα αυτά, λεπτομερείς μελέτες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η πλαγκτονική μικροβιακή ανάπτυξη σπάνια υπάρχει στη φύση. Ο όρος «βιοϋμένιο» εφευρέθηκε και περιγράφηκε το 1978, μετά από έρευνα του Antonie van Leeuwenhoek για τα μικροβιακά συσσωματώματα που παρατήρησε στην πλάκα των δοντιών του [24]. Ο Costerton βέβαια ήταν αυτός που εισήγαγε την ανάπτυξη του «βιοϋμενίου» στην ιατρική μικροβιολογία το 1985, και που έδειξε την αυξημένη αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα του αναπτυσσόμενου βιοϋμενίου, σε σχέση με τα πλαγκτονικά αναπτυσσόμενα βακτήρια [25]. Η ταυτοποίησή τους δε, σε απολιθώματα άνω των 3 δισεκατομμυρίων χρόνων,

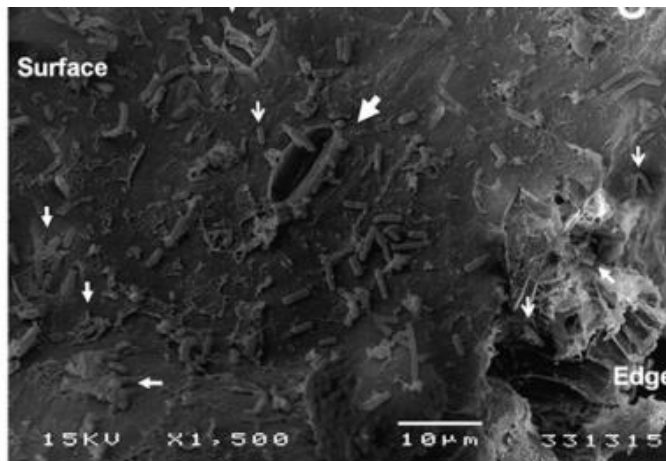
υποδηλώνει ότι η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων είναι ένα αρχαίο, κρίσιμης σημασίας χαρακτηριστικό των προκαρυωτών, που από εξελικτικής και προσαρμοστικής πλευράς ίσως να παρείχε ομοιόσταση στα πλαίσια κυμαινόμενων και σκληρών συνθηκών [26]. Τα βιοϋμένια έχουν προσδιοριστεί ως ένα ετερογενές υψηλά οργανωμένο συσσωμάτωμα πολλών ειδών (έως και εκατομμυρίων) μικροοργανισμών, που ζουν εντός μιας αυτο-παραγόμενης μήτρας εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS), και που προσκολλώνται μη αντιστρεπτά σε στατικές αβιοτικές ή ζωντανές επιφάνειες, καθώς και/ή μεταξύ τους [27, 28]. Τα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν βιοϋμένια σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών επιφανειών, όπως είναι τα φυσικά υδάτινα και χερσαία περιβάλλοντα, οι ζωντανοί ιστοί, οι ιατρικές συσκευές ή τα συστήματα σωληνώσεων πόσιμου νερού, και μάλιστα μπορεί να είναι είτε ωφέλιμα (αποικοδόμηση αποβλήτων, βιομηχανία τροφίμων κ.λ.π.) είτε επιβλαβή (σωλήνες νερού, ζωντανοί ιστοί, ιατρικές συσκευές, επιφάνειες δοντιών, κ.λ.π.) ανάλογα με το περιβάλλον όπου συμβαίνουν [24]. Έχει εκτιμηθεί ότι στον άνθρωπο, το ποσοστό των βακτηριακών μολύνσεων που σχετίζεται με τα βιοϋμένια, ανέρχεται στο 80%, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται πάνω από το 90% όλων των «δύστροπων» χρόνιων μολύνσεων και τραυμάτων. Συντελούν επίσης, στην αύξηση κατά τρεις τάξεις μεγέθους της αντιβιοτικής ανθεκτικότητας λόγω φυσικής αντίστασης και ενζυμικής απενεργοποίησης των φαρμάκων [26, 29]. Είναι συχνά δύσκολο να διαγνωστούν και οι κοινές μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους, περιλαμβάνουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και probes του 16S ριβοσώματος [30].

Ο σχηματισμός και η διαμόρφωση της δομής του βιοϋμενίου, είναι μια δυναμική διεργασία που είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας αρκετών φυσικών (μεταφορά υποστρώματος, αποκόλληση, κ.λ.π.) και βιοχημικών παραγόντων (μικροβιακή ανάπτυξη, μετατροπή υποστρώματος, κ.λ.π.) [28]. Προτιμώνται από τους προκαρυώτες γιατί: 1) οι επιφάνειες στις οποίες προσκολλώνται παρέχουν ένα βαθμό σταθερότητας στο περιβάλλον ανάπτυξης και ενδεχομένως να εξυπηρετούν καταλυτικές λειτουργίες μέσω περιορισμού των κυττάρων σε κοντινή απόσταση, 2) παρέχουν προστασία από ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών προκλήσεων, όπως είναι η έκθεση σε UV, σε οξέα, στη μεταλλοτοξικότητα, στην αφυδάτωση και την αλατότητα, στη φαγοκυττάρωση και σε αρκετούς αντιβιοτικούς και αντιμικροβιακούς παράγοντες [26]. Έως τώρα έχουν περιγραφεί τέσσερις, πιθανώς συνδεδεμένοι, ρυθμιστικοί μηχανισμοί για το σχηματισμό του βιοϋμενίου και τη διασπορά: α) quorum-sensing (QS) -γονιδιακή ρύθμιση που εξαρτάται από την πληθυσμιακή πυκνότητα, β) σηματοδοτικά μονοπάτια της bis-(3'-5')-κυκλική μονοφωσφορική διγουανωσίνη (c-di-GMP) και της (p)ppGpp - υψηλό επίπεδο c-di-GMP προωθεί το σχηματισμό βιοϋμενίου μέσω θετικής ρύθμισης της βιοσύνθεσης των προσκολλητινών (adhesins) και των πολυσακχαριτών της μήτρας και αναστέλλει διάφορους τύπους κινητικότητας, ενώ χαμηλό επίπεδο c-di-GMP οδηγεί σε διασπορά του βιοϋμενίου-, και το μονοπάτι του μικρού ρυθμιστικού RNA [31]. Τυπικά, μόλις το 5-35% του όγκου του βιοϋμενίου συνίσταται από κύτταρα μικροοργανισμών ενώ το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας που απομένει, καταλαμβάνεται από την εξωκυτταρική μήτρα. Η μήτρα είναι ένας ενδιάμεσος χώρος, μεταξύ του βιοϋμενίου και του περιβάλλοντος, που προσδιορίζει τις διαδικασίες εντός του βιοϋμενίου και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βακτηρίων εντός αυτής με τον εξωκυτταρικό κόσμο. Παρέχει δομικά και λειτουργικά οφέλη όπως είναι η

ενυδάτωση, η δέσμευση πηγών, η ικανότητα πέψης και προστασίας από αντιμικροβιακά χάρη στη διευκόλυνση των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και της περιορισμένης διάχυσης, την έντονη ενίσχυση της υδροβοφικότητας του βιοϋμενίου, την ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση καθώς η υψηλή ποσότητα πολυμερών στη μήτρα των EPS που δρα ως υδρογέλη, συγκρατεί νερό και εμποδίζει την εξάτμιση [27]. Το ποσοστό των EPS μπορεί να συνιστά σχεδόν το 50-90% της συνολικής οργανικής ύλης. Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των βιοϋμενίων είναι ο ιξωδοελαστικός τους χαρακτήρας [32]. Συχνά η σύνθεση και η ποσότητα των EPS θα ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο των μικροοργανισμών, την ηλικία των βιοϋμενίων και τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες κάτω από τις οποίες υπάρχουν τα βιοϋμενία (διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου και αζώτου, έκταση αφυδάτωσης, θερμοκρασία, pH, διαθεσιμότητα θρεπτικών) [26]. Το κύριο συστατικό της μήτρας των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών είναι το νερό (έως 97%), ενώ περιέχει ακόμη δομικά και λειτουργικά συστατικά: πρωτεΐνες (>2%), διαλυτοί πολυσακχαρίτες που σχηματίζουν gel (1-2%), μόρια DNA και eDNA (<1%), RNA (<1%), καθώς και αδιάλυτα συστατικά όπως είναι τα αμυλοειδή, η κυτταρίνη, οι φίμπριες, οι κροσσοί και τα μαστίγια, ιόντα (δεσμευμένα και ελεύθερα), βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, χουμικές ενώσεις, πρωτεϊνικά νημάτια και νανοκαλώδια, που είναι ικανά για ηλεκτρονιακή μεταφορά [27]. Οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) μπορεί να είναι ουδέτερα μακρομόρια, αλλά κυρίως είναι πολυανιόνικα λόγω της παρουσίας είτε ουρονικών οξέων είτε του πυροσταφυλικού που είναι συζευγμένο με κετάλη, ή ανόργανων καταλοίπων (φωσφορικών ή σπάνια θειικών), ενώ πολύ λίγα μπορεί να είναι πολυκατιόνικα. Μπορεί να υπάρχει παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων πολυσακχαριτών ως μέρος της απόκρισης στο stress. Πολλοί από τους πολυσακχαρίτες είναι σχετικά διαλυτοί και επειδή κατέχουν μεγάλη μοριακή μάζα, παράγουν υδατικά διαλύματα με υψηλά ιξώδη που κάνουν τα βιοϋμενία να αποκτούν δομές που μοιάζουν με γέλη. Ακόμη, κάποια κατιόντα ίσως αλληλεπιδράσουν ειδικά με εκτεθειμένες ομάδες καρβοξυλικού οξέος στη μήτρα των EPS για να παράγουν δίκτυα μακρομορίων που δείχνουν αυξημένο ιξώδες ή ακόμα και ζελατινοποίηση με ιξωδοελαστικές ιδιότητες. Οι βακτηριακοί πολυσακχαρίτες ακετυλιώνονται και οι ακετυλο ομάδες αναστέλλουν ισχυρά την αλληλεπίδραση μεταξύ αλυσίδων πολυμερών και κατιόντων και του επακόλουθου σχηματισμού της γέλης. Από την άλλη, η απακετυλίωση μερικών πολυσακχαριτών ίσως οδηγεί στην απώλεια οποιασδήποτε οργανωμένης διαμόρφωσης ενώ άλλοι πολυσακχαρίτες μπορούν εύκολα να σχηματίσουν gels όταν απελευθερωθούν από τους ακυλικούς υποκαταστάτες. Ένας μικρός αριθμός των EPS, λόγω της σύστασής τους και της τεταρτοταγούς δομής, ίσως στην πραγματικότητα να είναι υδρόφοβος. Άλλες πάλι κατέχουν εντοπισμένες υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές. [33]. Όσον αφορά το eDNA: α) αποτελεί δομικό συστατικό εντός του βιοϋμενίου που παρέχει σταθερότητα σε ολόκληρη τη δομή καθώς μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, β) είναι παράγοντας που προωθεί το σχηματισμό βιοϋμενίου και την παραγωγή εξωκυτταρικής μήτρας, γ) έχει ρόλο στη γονιδιακή μεταφορά μέσω μετασχηματισμού των ανταγωνιστικών αδελφών βακτηρίων, δ) χρησιμοποιείται ως πηγή θρεπτικών, ε) εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (HGT), στ) παίζει ρόλο στη διασπορά του βιοϋμενίου, ζ) παίζει προστατευτικό ρόλο μειώνοντας τη μεταφορά αντιμικροβιακών ουσιών διαμέσου της μήτρας ή μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα συστατικά της μήτρας ή κατακρημνίζοντας κατιόντα ή μέσω οξίνισης. Στο *Bacillus cereus* ο μηχανισμός απελευθέρωσης και ρύθμισης του eDNA είναι άγνωστος, ενώ ο ρόλος του

φαίνεται να εμπλέκεται στη μήτρα του βιοϋμενίου. Στο *Bacillus cereus*, το eDNA που παράγεται από μια πλαγκτονική καλλιέργεια, σχετίζεται με την κυτταρική επιφάνεια ενώ μεσολαβεί επίσης στην προσκόλληση με το υπόστρωμα, ξεκινώντας το σχηματισμό του βιοϋμενίου και δρώντας ως προστατευτική ασπίδα ενάντια σε κάποιες αντιμικροβιακές ουσίες [34].

Τα βιοϋμένια που σχηματίζονται από το *B. cereus* έχουν υψηλή κυτταρική πυκνότητα παρουσία ενδοσπορίων, καθιστώντας τα ανθεκτικά στη θερμότητα, την παστερίωση και την κονσερβοποίηση. Έχει δειχθεί ότι η πηγή απομόνωσης του *B. cereus* μπορεί να επηρεάσει τη θέση προσκόλλησης του υποστρώματος και το σχηματισμό του βιοϋμενίου [35].



Εικόνα 6: Σχηματισμός μεγάλων αποικιών και στιβάδας βιοϋμενίου από το *Bacillus cereus* (CEM). Με τα μικρά βέλη απεικονίζονται μονά κύτταρα, με τα έντονα βέλη απεικονίζονται κυτταρικά συσσωματώματα και η εξωκυτταρική μήτρα.

1.3.2. Βήματα για το σχηματισμό του βιοϋμενίου

Γενετικές μελέτες και πρωτεομική ανάλυση έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός του βιοϋμενίου πραγματοποιείται ως μια ρυθμισμένη αναπτυξιακή αλληλουχία, που αποτελείται από τέσσερα συντηρημένα στάδια που περιλαμβάνουν:

- α) την αρχική επαφή/προσκόλληση στην επιφάνεια,
- β) τον επακόλουθο σχηματισμό μικρο-αποικιών,
- γ) την ωρίμανση και τη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου και τελικά,
- δ) την αποκόλληση/διασπορά του βιοϋμενίου

Παράλληλα φαίνεται να είναι απαραίτητος τόσο ένας ειδικός τύπος σηματοδότησης, γνωστός ως quorum sensing, για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων των μικροοργανισμών, όσο και η μεταγραφή διαφορετικών ομάδων γονιδίων σε σχέση με εκείνα των πλαγκτονικών

μορφών, των ίδιων μικροβιακών οργανισμών [37]. Αναλυτικά τα βήματα περιγράφονται ακολούθως (**Εικόνα 7**).

A) Αρχική επαφή/προσκόλληση στην επιφάνεια

Σε αυτό το βήμα, τα μικροβιακά κύτταρα που μεταφέρονται στην επιφάνεια μέσω διάχυσης ή ενεργούς κίνησης, προσκολλώνται αντιστρεπτά σε μια βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια μέσω των αποφύσεων τους, όπως είναι οι κροσσοί, τα μαστίγια και οι φίμπριες, που ενισχύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας προσκόλλησης ή μέσω άλλων φυσικών δυνάμεων όπως οι δυνάμεις van der Waals, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις οξέος-βάσης, και οι δυνάμεις Brownian motion κ.λ.π.. Οι οργανισμοί έλκονται ή απωθούνται από την επιφάνεια, ανάλογα με το αποτέλεσμα των διαφορετικών μη ειδικών δυνάμεων αλληλεπίδρασης. Οι ιδιότητες της επιφάνειας καθώς και το τελείωμά της επηρεάζουν την έκταση και το ρυθμό βακτηριακής προσκόλλησης (προτιμώνται σκληρές, υδροφοβικές και μη πολικές επιφάνειες, επειδή μειώνεται η απωστική δύναμη μεταξύ αυτών και της επιφάνειας) αλλά και η ύπαρξη διεπιφάνειας στερεού-υγρού πιθανόν να ευνοεί την προσκόλληση και ανάπτυξη μικροοργανισμών [30,37]. Συγκεκριμένες προσκολλητίνες της εξωτερικής μεμβράνης απαιτούνται για σταθερή προσκόλληση και σχηματισμό βιοϋμενίων [38].

B) Σχηματισμός μικρο-αποικιών

Αφού πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των μικροοργανισμών σε μια βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια και η σταθεροποίηση αυτής, τα βακτηριακά κύτταρα αρχίζουν να παράγουν τη μήτρα των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS). Εντός της EPS ξεκινά μέσω ειδικής χημικής σηματοδότησης μια διαδικασία πολλαπλασιασμού και διαίρεσης των μικροβιακών κυττάρων, που καταλήγει στη δημιουργία μικρο-αποικιών. Οι βακτηριακές αυτές μικρο-αποικίες συνήθως συνίστανται από πολλούς τύπους μικρο-κοινοτήτων που συντονίζονται μεταξύ τους για διεργασίες όπως η ανταλλαγή υποστρώματος, η κατανομή σημαντικών μεταβολικών προϊόντων και η αποβολή των τελικών μεταβολικών προϊόντων. Η εξωκυτταρική μήτρα είναι ένα προσδιορισμένο χαρακτηριστικό του βιοϋμενίου και δρα ως μια δομική σκαλωσιά, που συγκρατεί μαζί το βιοϋμένιο [27, 30, 37].

Γ) Ωρίμανση και διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου

Τα βακτήρια που ζουν εντός των βιοϋμενίων μπορεί να θεωρηθεί ότι ζουν μαζί σε σύμπλοκες, αλληλοεξαρτώμενες κοινότητες. Σε αυτό το στάδιο τα μικροβιακά κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας εκκρινόμενα χημικά σήματα και κατά τη διάρκεια αυτής της επικοινωνίας, τα βακτήρια μπορούν να «αισθανθούν» και να αποκριθούν φαινοτυπικά σε περιβαλλοντικές συνθήκες και σε επίπεδα πληθυσμιακής πυκνότητας, μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως “quorum sensing”. Αποκτάται μέσω της επικοινωνίας η απαιτούμενη μικροβιακή κυτταρική πυκνότητα, που οδηγεί στην έκκριση σηματοδοτικών μορίων, γνωστών ως αυτοεπαγωγείς, οι οποίοι διευκολύνουν το quorum sensing [37]. Καθώς η πληθυσμιακή πυκνότητα αυξάνεται, αυξάνει επίσης η συγκέντρωση των μορίων του αυτοεπαγωγέα (AI). Τα μόρια των αυτοεπαγωγέων ανιχνεύονται από τα βακτήρια από αισθητήριες κινάσες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, ενεργοποιώντας στη συνέχεια

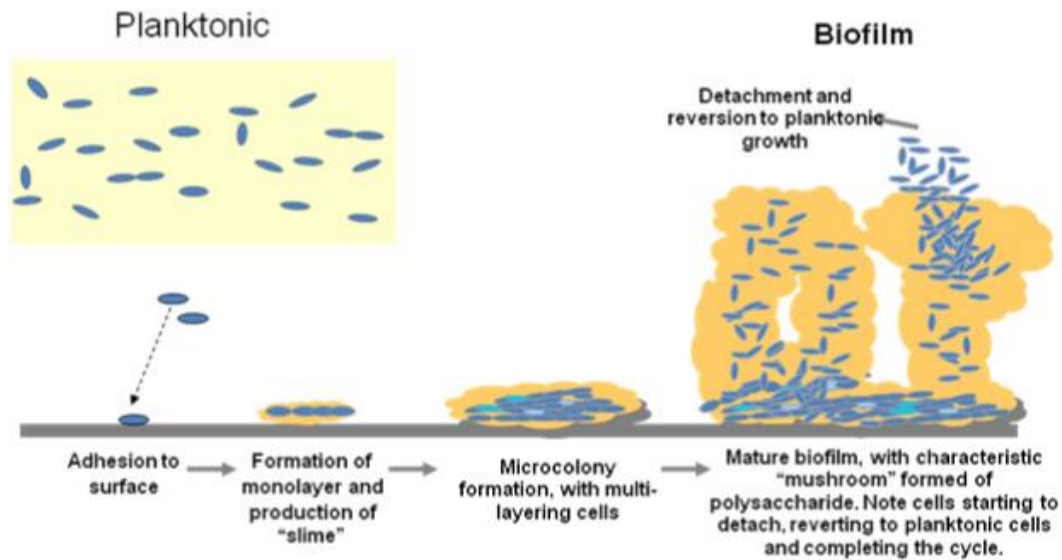
συγγενικούς ρυθμιστές απόκρισης μέσω φωσφορυλίωσης, που αποκρίνονται έπειτα σε αλλαγές στην πληθυσμιακή πυκνότητα, αλλάζοντας τη γονιδιακή έκφραση. Αποτέλεσμα αυτού είναι φαινοτυπικές αλλαγές που επηρεάζουν παράγοντες που περιλαμβάνουν την παραγωγή εξωκυτταρικών προϊόντων, την κυτταρική προσκόλληση, την κινητικότητα και το μεταβολισμό καθώς και την έκφραση γονιδίων στόχων [30,39]. Η γονιδιακή έκφραση των βακτηριακών κυττάρων που αναπτύσσονται σε ένα βιοϋμένιο είναι διαφορετική από αυτή των πλαγκτονικών βακτηρίων. Υπάρχουν στοιχεία ότι σε κάποια βακτηριακά είδη το quorum sensing παίζει ρόλο στη ρύθμιση του σχηματισμού του βιοϋμενίου και είναι σημαντικό για διεργασίες όπως είναι η προσκόλληση στη βακτηριακή επιφάνεια, η ωρίμανση του βιοϋμενίου και η διασπορά των κυττάρων από το βιοϋμένιο [30].

Καθώς το βιοϋμένιο ωριμάζει, οι πολλαπλές στιβάδες κυττάρων «χτίζουν» την επιφάνεια και παράγεται περισσότερη μήτρα. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μιας πολύπλοκης και ετερογενούς τρισδιάστατης δομής. Σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης εκφράζονται συγκεκριμένα γονιδιακά προϊόντα, που θεωρούνται σημαντικά για το σχηματισμό των EPS, που είναι τα κύριο υλικά του βιοϋμενίου. Η επιφανειοδραστική ουσία (surfactin), που είναι το σήμα για τη διαφοροποίηση του υποπληθυσμού που παράγει τη μήτρα, πυροδοτεί την παραγωγή της «κανιβαλιστικής» τοξίνης, που αποτελεί ένα μηχανισμό εξάλειψης των κυτταρικών τύπων που μπορεί να μην απαιτούνται πια για την ανάπτυξη της κοινότητας σε αντίθεση με αυτούς που παράγουν τη μήτρα [39]. Έπειτα παράγονται ενδιάμεσα κενά-κανάλια στη μήτρα, τα οποία γεμίζουν με νερό και δρουν ως κυκλοφορικό σύστημα, που χρησιμοποιείται για την κατανομή σημαντικών θρεπτικών και την απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων από τις κοινότητες των μικρο-αποικιών του βιοϋμενίου [27,30].

Δ) Αποκόλληση / διασπορά του βιοϋμενίου

Σε αυτή τη φάση, τα μικροβιακά κύτταρα εντός του βιοϋμενίου πολλαπλασιάζονται γρήγορα και διασπείρονται προκειμένου να μεταβούν από την προσκολλημένη (sessile) μορφή, στην κινητή (motile). Η αποκόλληση συμβαίνει κατά φυσικό τρόπο, αν και σε κάποιους τύπους βακτηρίων που δεν παράγουν εξωκυτταρικό πολυσακχαρίτη, τα βακτηριακά κύτταρα διασπείρονται άμεσα στο περιβάλλον, πιθανόν κάποιες φορές με την επίδραση μηχανικού stress [37]. Η αποκόλληση μπορεί να προκληθεί μετά από πληθώρα περιβαλλοντικών και βιολογικών σημάτων, που περιλαμβάνουν: την αυξημένη διάτμηση ρευστού, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, αλλαγές στη συγκέντρωση οξυγόνου, ειδικές αισθητήριες πρωτεΐνες σημάτων, που με μεταγωγή τους μέσω πολύπλοκων ρυθμιστικών δικτύων σε τελικούς τελεστές, επιτρέπουν την απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων και/ή πολυκύτταρων συσσωματωμάτων. Κατά τη διαδικασία της αποκόλλησης οι μικροβιακές κοινότητες εντός του βιοϋμενίου παράγουν διαφορετικά σακχαρολυτικά ένζυμα που βοηθούν να απελευθερωθεί η επιφάνεια των μικροβίων σε μια νέα περιοχή προς αποικισμό ενώ ρυθμίζουν θετικά και την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το σχηματισμό μαστιγίων, για να επιτρέψουν στα βακτήρια να μετακινηθούν προς τη νέα περιοχή. Η αποκόλληση των μικροβιακών κυττάρων σε συνδυασμό με τη μεταφορά σε μια νέα περιοχή, βοηθά στην εξάπλωση των μολύνσεων. Τα βακτήρια που διασπείρονται έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες, ειδικά όσον αφορά την παθογονικότητα, που περιλαμβάνουν την αυξημένη έκφραση

παραγόντων προσκόλλησης και μολυσματικότητας, συγκριτικά με εκείνες των πλαγκτονικών και προσκολλημένων ακίνητων μορφών [26,37].



Εικόνα 7: Η πορεία που ακολουθείται για το σχηματισμό και την αποκόλληση του βιοϋμενίου.

1.3.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας βιοϋμενίων

Τα μικρόβια των βιοϋμενίων διαφέρουν από τους πλαγκτονικούς τους συγγενείς όσον αφορά τα γονίδια που μεταγράφονται. Εντός του βιοϋμενίου, γενετικά ταυτόσημα κύτταρα, εκφράζουν διαφορετικά γονίδια και παράγουν υποπληθυσμούς λειτουργικά διακριτών κυτταρικών τύπων που συνυπάρχουν. Η παρουσία και θέση των διαφορετικών κυτταρικών τύπων είναι δυναμική, και φαίνεται να υπάρχει μια οργανωμένη σειρά διαφοροποίησης, ώστε αυτά τα κινητά κύτταρα να γίνονται κύτταρα που παράγουν μήτρα, που προχωρούν στο να γίνουν ενδοσπόρια, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες [40]. Οι μολύνσεις από βιοϋμενιο συχνά υποτροπιάζουν μετά από παρατεταμένες περιόδους κλινικής αδράνειας. Αυτό δεν οφείλεται αρχικά λόγω γενετικής ανθεκτικότητας που προκύπτει λόγω μετάλλαξης, παρόλο που η αυξημένη μικροβιακή κυτταρική πυκνότητα ίσως να ευνοεί τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας [41]. Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη γενική ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων στους βιοκτόνους παράγοντες, η συμβολή του καθενός από τους οποίους ποικίλει ανάλογα με το είδος του βιοϋμενίου και τη φύση του περιβαλλοντικού στρες. Ο πρώτος, είναι οι ιδιότητες φραγμού της μήτρας όπου αντιδραστήρια (απορρυπαντικό ή υπεροξειδία), φορτισμένοι (μέταλλα) ή μεγάλοι (ανοσοσφαιρίνη) αντιμικροβιακοί παράγοντες εξουδετερώνονται ή δεσμεύονται στη μήτρα των EPS και «αραιώνονται» αποτελεσματικά σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις πριν να μπορέσουν να φθάσουν όλα τα βακτηριακά κύτταρα μέσα στο βιοϋμένιο. Ο δεύτερος μηχανισμός, θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών του βιοϋμενίου με τη δημιουργία πεινασμένων, στατικών φάσεων ανενεργών ζωνών, που προστατεύουν τα κύτταρα. Υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν την παρουσία μεταβολικών κλίσεων εντός

των βιοϋμενίων που είναι προσκολλημένοι στη στερεή επιφάνεια, μια διαστρωμάτωση που σχετίζεται με την περιορισμένη διάχυση θρεπτικών, οξυγόνου και μεταβολιτών διαμέσου της κοινότητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τις μη-ομοιόμορφες κατανομές στο εξωκυτταρικό pH και την οξειδοαναγωγική ισορροπία και επίσης περιορίζει τους ρυθμούς μικροβιακής ανάπτυξης σε ορισμένα τμήματα του βιοϋμενίου; οι μικροοργανισμοί του βιοϋμενίου μπορούν επομένως να έχουν διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις, ακόμα και όταν διαχωρίζονται για μόλις 10μm, προσδίδοντας μεταβολική ετερογένεια. Παρόλο που πολλά αντιβιοτικά μπορούν να διεισδύσουν ελεύθερα την EPS, τα στατικά κύτταρα προστατεύονται και αυτό συμβαίνει γιατί όλα τα αντιβιοτικά απαιτούν τουλάχιστον κάποιο βαθμό κυτταρικής δραστηριότητας για να είναι αποτελεσματικά, επειδή ο μηχανισμός δράσης των περισσότερων αντιβιοτικών εμπλέκει τη διατάραξη κάποιας μικροβιακής διεργασίας. Ένας τρίτος μηχανισμός προστασίας, θα μπορούσε να είναι η παρουσία υποπληθυσμών ανθεκτικών φαινοτύπων στο βιοϋμένιο, οι οποίοι αναφέρονται ως “persisters” και δε διαιρούνται. Τα κύτταρα “persisters” έχουν προταθεί ότι προστατεύονται από τη δράση των αντιβιοτικών επειδή εκφράζουν συστήματα τοξινών-αντιτοξινών όπου ο στόχος των αντιβιοτικών μπλοκάρεται από τοξικές ουσίες [39]. Τα μικροβιακά βιοϋμένια παράγουν κύτταρα persisters σε μια συχνότητα που είναι 100 με 10.000 φορές ψηλότερη από εκείνη που έχει αναφερθεί για τους εκθετικά αναπτυσσόμενους πλαγκτονικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Ακολουθώντας τη διακοπή της αντιβιοτικής θεραπείας, μικροί αριθμοί των persisters που επιβίωσαν μπορούν να ξαναρχίσουν να αναπτύσσονται, επαναποικίζοντας το βιοϋμένιο και οδηγώντας σε υποτροπή της μόλυνσης [30].

Κατά τη μόλυνση με βιοϋμένιο υπάρχει ταυτόχρονη ενεργοποίηση του έμφυτου όσο και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Κανένα από αυτά δεν είναι ικανό να εξαλείψει το παθογόνο του βιοϋμενίου, αλλά αντιθέτως επιταχύνουν την παράπλευρη καταστροφή του ιστού [42].

1.4. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών/πεπτιδογλυκάνης

Σύμφωνα με την ταξινόμηση Henrissat οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών (όπως πεπτιδογλυκάνης, χιτίνης, παράγοντα σχηματισμού ροζιδίων-NodB) ανήκουν στην οικογένεια 4 των Εστερασών Υδατανθράκων (CE-4), από τις συνολικά 16 οικογένειες- CE1 έως CE16- βάσει της αλληλουχιακής τους ομολογίας, η οποία περιλαμβάνει: τις απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) 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) [11]. Μέλη αυτής της οικογένειας καταλύουν την υδρόλυση είτε άζωτο (N) -συνδεδεμένων ακετυλο-ομάδων από κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης, GlcNAc, (απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης, απακετυλάσες των χιτοολιγοσακχαριτών της NodB των ριζόβιων, απακετυλάσες χιτίνης) είτε οξυγόνο (O)-συνδεδεμένων ακετυλο-ομάδων από τα κατάλοιπα O-ακετυλοξυλόζης (εστεράσες ακετυλοξυλάνης και ξυλανάσες A, C, D και E) των υποστρωμάτων τους [43]. Τα

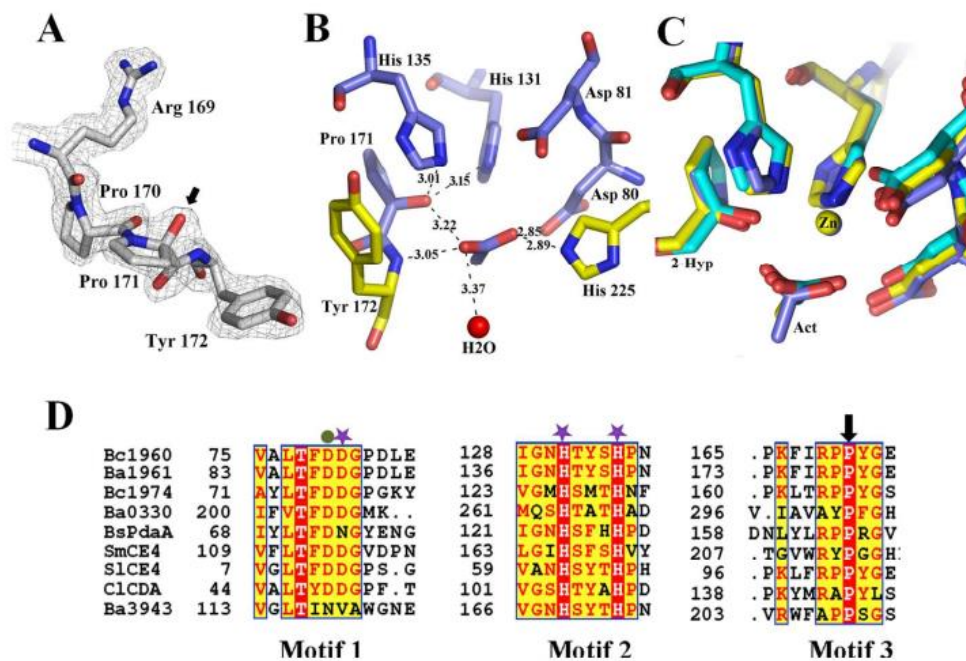
υποστρώματά τους έχουν το κοινό στοιχείο ότι βασίζονται σε ένα backbone καταλοίπων GlcNAc που συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 δεσμούς (το MurNAc στην πεπτιδογλυκάνη είναι ο 3-λακτυλ αιθέρας της GlcNAc) [11]. Σε όλα αυτά τα ένζυμα, υπάρχει μια συντηρημένη επικράτεια ομολογίας υπεύθυνη για την απακετυλίωση πολυσακχαριτών, η NodB, λόγω της ομοιότητας με τις πρωτεΐνες NodB. Αυτό συμβαίνει διότι η απακετυλάση των χιτο-ολιγοσακχαριτών της NodB των ριζόβιων, είναι το πρώτο ένζυμο από αυτή την οικογένεια που περιγράφηκε εκτενώς, ενώ ρόλος της είναι η απακετυλίωση καταλοίπων GlcNAc με σκοπό τη σύνθεση παραγόντων NodB, που συνιστούν τα βακτηριακά σήματα για τη δημιουργία των ροζιδίων, που ελέγχουν τη συμβιωτική σχέση με τα ψυχανθή φυτά [44].

Έχουν διεξαχθεί διάφορες βιοχημικές μελέτες πολλών μελών των απακετυλασών πολυσακχαριτών (PDAs), όσον αφορά την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που τυχόν εμφανίζουν και τα όρια δράσης τους, παρέχοντας χρήσιμα συμπεράσματα για τα μέλη της CE4. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα, όπως η PdaC του *Bacillus subtilis* βρέθηκε ότι παρουσιάζει τόσο ενεργότητα απακετυλάσης της N-ακετυλγλυκοζαμίνης (GlcNAc) προς ολιγομερή GlucNAc, αλλά και απακετυλάσης του N-ακετυλομουραμικού οξέος ως προς την πεπτιδογλυκάνη του *Bacillus subtilis* [45]. Οι PDAs BC1960 και BC3618 (οι οποίες παρουσιάζουν 36% ομολογία και 57% ομοιότητα) απακετυλιώνουν την πεπτιδογλυκάνη (GlcNAc) από τα θετικά κατά Gram, *Bacillus cereus* και *Bacillus subtilis* αλλά και από το αρνητικό κατά Gram, *Helicobacter pylori*, καθώς επίσης και διαλυτά υποστρώματα χιτίνης και N-ακετυλοχιτοολιγομερών (προτιμώμενο υπόστρωμα το GlcNAc₄) [46]. Επίσης, η PdaA του *Bacillus subtilis* καταλύει τόσο την απακετυλίωση όσο και το σχηματισμό του δακτυλίου της λακτάμης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το προϊόν της ενεργότητας του CwID [47]. Τέλος, η απακετυλάση χιτίνης του *M. rouxii* (AxeA) και η εστεράση της ακετυλοξυλάνης του *S. lividans* (CDA), μέλη της οικογένειας των CE4, είναι ενεργές τόσο σε διαλυτά υποστρώματα χιτίνης όσο και σε υποστρώματα ακετυλοξυλάνης (αλλά όχι πεπτιδογλυκάνης) [43]. Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που εστιάζουν σε πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών που δε δρουν στην πεπτιδογλυκάνη, αλλά τα υποστρώματά τους δεν έχουν ταυτοποιηθεί (π.χ. PgdA από *Streptococcus mutans* [48], Pdi από *Streptococcus iniae* [49] και IcaB από *Staphylococcus epidermis* [50], BA0330 και BA0331 από *Bacillus anthracis* [51]). Οι απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης μπορεί να έχουν ως εν δυνάμει υπόστρωμα τόσο τη N-ακετυλογλυκοζαμίνη όσο και το N-ακετυλομουραμικό οξύ [46, 52, 53]. Συγκεκριμένα, δρουν αφαιρώντας την ακετυλο ομάδα (CH₃CO⁻) από το άζωτο στη θέση του άνθρακα 2 του υδατανθρακικού καταλοίπου [54]. Το pgdA από τον *Streptococcus pneumoniae* ήταν το πρώτο γονίδιο που βρέθηκε να κωδικοποιεί μια απακετυλάση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) της πεπτιδογλυκάνης [11]. Μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορους οργανισμούς όπως είναι: η PgdA από τον *S.pneumoniae* (SpPgdA)[52], οι BC1960 [46], BC3618 [46], BC0361 [55] και BC1974 [56] από το *Bacillus cereus*, οι BA0330 [51], BA0331[51] και BA0150 [57] από το *Bacillus anthracis*, η PdaA από το *Bacillus subtilis* [47], PgdA από το *Lactococcus lactis* [58], η PdaA από το *Streptococcus suis* [59], η PgdA from *Shigella flexneri* [60], η PdaC από το *Bacillus subtilis* [45], η PdaA από το *Enterococcus faecalis* [61], η PgdA από το *Listeria monocytogenes* [62], η PgdA από το *Helicobacter pylori* (HpPgdA) [63], η Rv1096 από το *Mycobacterium tuberculosis* [64], η Pdi από το *Streptococcus iniae* [49] και Bd3279 από το

Bdellovibrio predator [65]. Από αυτές έχουν καταχωρηθεί στην Protein Data Bank (PDB) οι δομές για τις SpPgdA, PdaA (*Bacillus subtilis*), BC1960, BC0361 και BC1974 (*Bacillus cereus*), HpPgdA, BA0330 (*Bacillus anthracis*) και Bd3279 (*Bdellovibrio predator*). Οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών (PDAs) της CE4 οικογένειας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε λειτουργίες του βακτηριακού κυττάρου όπως: η διαίρεση/επιμήκυνση του κυττάρου, η διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, ο σχηματισμός βιοϋμενίων, η πρόσδεση και μόλυνση σε κύτταρα-ξενιστές, η ανθεκτικότητα σε συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (λυσοζύμη, μακροφάγα, AMPs) [49,66].

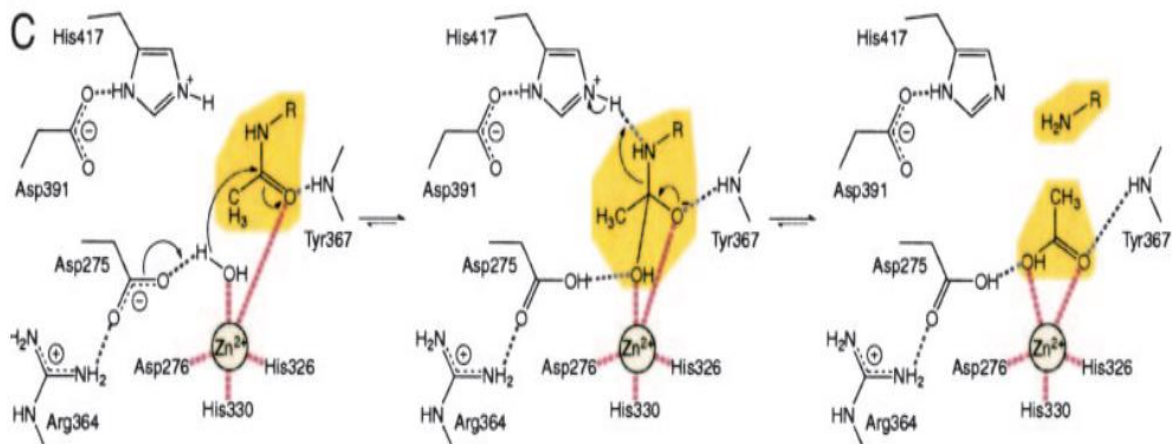
1.5. Δομή των απακετυλασών πολυσακχαριτών

Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια CE4 είναι η ομολογία που εμφανίζουν ως προς τη συντηρημένη επικράτεια ομολογίας NodB, που υιοθετεί μια αναδίπλωση $(\alpha/\beta)_8$ βαρελιού. Οι περισσότερες δομές απαιτούν ένα δισθενές ιόν στο ενεργό τους κέντρο που συντονίζεται από μια καλά συντηρημένη τριάδα δέσμευσης μετάλλου, τη His-His-Asp, που αποτελείται από δύο κατάλοιπα ιστιδινών (His) και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού (Asp) [51] (Εικόνα 8). 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. Επομένως, για παράδειγμα, η PgdA από το *S. pneumoniae* είναι περισσότερο ενεργό με κοβάλτιο, ενώ, η απακετυλάση της χιτίνης από το *Mucor rouxii*, που είναι ένα μέλος της οικογένειας απακετυλασών των πολυσακχαριτών, δείχνει αυξημένη δραστηριότητα παρουσία του κοβαλτίου για ορισμένες τάξεις υποστρώματος, αλλά όχι για άλλες [54]. Παρόλο που πολλές απακετυλάσες έχουν δειχθεί να είναι μεταλλο-εξαρτώμενες και πράγματι έχουν κρυσταλλωθεί ως σύμπλοκα με σχετικά δισθενή κατιόντα, υπάρχουν επίσης παραδείγματα μεταλλο-ανεξάρτητων ενζύμων [47].



Εικόνα 8: A) 2Fo-Fc χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της BC1960 στα 2.5σ που δείχνει την 2-Hyp 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. C) Superposition των ενεργών κέντρων των BC1960, BC0361 και BC0330. D) Συντηρημένα αλληλουχιακά μοτίβα 1-3 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) [67].

Ο καταλυτικός μηχανισμός βασίζεται σε ένα κατάλοιπο ασπαρτικού και σε ένα κατάλοιπο ιστιδίνης που δρουν ως η καταλυτική βάση και το καταλυτικό οξύ αντίστοιχα. Πέντε συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας απαιτούνται για την ενεργότητα της επικράτειας NodB των μελών της CE4. Το πρώτο κατάλοιπο Asp του μοτίβου 1 (TFDD) θεωρείται ότι δρα ως μια καταλυτική βάση, που ενεργοποιεί το καταλυτικό μόριο νερού, και το δεύτερο Asp συντονίζει το μεταλλικό ιόν. Το μοτίβο 2 (H(S/T)XXH) συνεισφέρει τα δύο κατάλοιπα His, που προσδέουν το μέταλλο. Το μοτίβο 3 (RpPXXG) συνεισφέρει ένα συντηρημένο κατάλοιπο Arg που διατηρεί την καταλυτική βάση Asp στην ενεργή της μορφή ($\beta\text{-COO}^-$) και ένα αυστηρά συντηρημένο κατάλοιπο Pro. Το καταλυτικό οξύ είναι ένα κατάλοιπο His, που βρίσκεται στο μοτίβο 5 και διατηρείται στην πρωτονιομένη του κατάσταση (Imidazolium) από ένα κατάλοιπο Asp που παρέχεται από το μοτίβο 4 [51]. Συγκεκριμένα, ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης έχει προταθεί για τις μεταλλο-εξαρτώμενες απακετυλάσες, με μοντέλο την SpPgdA, που καταλύει την απομάκρυνση της N-ακετυλο ομάδας με το να δεσμεύει ένα μόριο νερού στο σταθερά δεσμευμένο ψευδάργυρο. Η καταλυτική βάση (Asp-275), αποσπά ένα πρωτόνιο από το μόριο νερού, δημιουργώντας ένα νουκλεόφιλο που θα επιτεθεί στον άνθρακα του καρβονυλίου του υποστρώματος (οξικού) για να παράγει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο οξυανιόν. Η His-417 έπειτα πρωτονιώνει το ενδιάμεσο στο άτομο αζώτου, παράγοντας μια ελεύθερη αμίνη και απελευθερώνοντας το προϊόν οξικού [11].



Εικόνα 9: Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός για τις απακετυλάσες της οικογένειας CE4, βάσει της SpPgdA.

Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στο γεγονός 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 C α προλίνη (Pro) στο ενεργό κέντρο, που εμφανίζεται υδροξυλιωμένη (ως α-υδροξυ-L-προλίνη ή 2-Hyp) [51].

1.6. Η ασυνήθιστη υδροξυλίωση του C α της Pro και η ωρίμανση του ενεργού κέντρου των απακετυλασών πολυσακχαριτών

Στους ευκαρυώτες, η μετα-μεταφραστική υδροξυλίωση των πλευρικών αλυσίδων της προλίνης (Pro) από τις προλυλ υδρολάσες παράγει υδροξυπρολίνη (Hyp), που συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα του κολλαγόνου. Η Hyp παίζει επίσης ρόλο κλειδί στην αρχιτεκτονική του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, σε διαδικασίες σηματοδότησης που συνδέονται με την απόκριση σε υποξία και φυσιολογικά μονοπάτια που συνδέονται με ασθένειες όπως ο καρκίνος. Ωστόσο, στα βακτήρια η υδροξυλίωση της Pro δεν είχε μελετηθεί καθώς υδροξυλίωση είχε παρατηρηθεί μόνο σε ελεύθερη προλίνη.

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά σε κάποια μέλη της οικογένειας των απακετυλασών πολυσακχαριτών, (BC0361 (*Bacillus cereus*), BA0330 (*Bacillus anthracis*), BC1960 (*Bacillus cereus*)) μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση (PTM) που αντιπροσωπεύει ένα νέο τύπο υδροξυλίωσης της προλίνης, που στοχεύει την κύρια αλυσίδα των πρωτεϊνικών μορίων, τροποποιώντας το άτομο του C α των καταλοίπων Pro για να παράγει 2-υδροξυπρολίνη (2-Hyp) (Εικόνα 8). Φαίνεται ότι η μετατροπή του καλά συντηρημένου καταλοίπου της προλίνης Pro του ενεργού κέντρου σε 2-Hyp, συμβαίνει ευρέως σε PDAs της οικογένειας CE4, με το μηχανισμό της νέας υδροξυλίωσης της Pro να είναι πιθανόν αυτοκαταλυτικός και να μοιράζεται τουλάχιστον ένα καταλυτικό κατάλοιπο του ενεργού

κέντρου με την αντίδραση της απακετυλίωσης. Η προέλευση της υδροξυλομάδας μάλιστα, αποδείχτηκε πως είναι το μοριακό οξυγόνο. Πρόκειται για μια ασυνήθιστη διαδικασία ωρίμανσης των PDAs, που συμπλέκει τις αντιδράσεις της υδροξυλίωσης και της απακετυλίωσης, μέσω της οποίας η ενεργότητα απακετυλάσης ενισχύεται κατά μια τάξη μεγέθους για την PDA BC1960. Η ενίσχυση της ενεργότητας απακετυλάσης, γίνεται μέσω ωρίμανσης του ενεργού κέντρου με τροποποίηση της κύριας πρωτεϊνικής αλυσίδας, ενώ όλες οι γνωστές μεταμεταφραστικές διαδικασίες ωρίμανσης σε άλλα ένζυμα εμπλέκουν τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας. Περιπτώσεις ενεργών κέντρων που μοιράζονται δύο ενεργότητες, όπως βρέθηκε για τις PDAs η υδροξυλίωση και η απακετυλίωση, είναι πολύ σπάνιες και περιλαμβάνουν το πολυλειτουργικό ένζυμο Pk-Rec όπου οι ενεργότητες ATPase και δεοξυριβονουκλεάσης μοιράζονται το ίδιο κέντρο και η τρανσφεράση N-ακετυλογλυκοζαμίνης που είναι συνδεδεμένη με οξυγόνο (O-GlcNAc), στον άνθρωπο, όπου οι ενεργότητες της γλυκοσυλίωσης πρωτεϊνών και της πέψης του παράγοντα-1 του κυττάρου του ξενιστή (HCF-1) το μοιράζονται επίσης. Η υδροξυλίωση του C_α της Pro παράγει σταθερά τροποποιημένες πρωτεΐνες, που μπορεί να διατηρούν πολύ υψηλά επίπεδα υδροξυλίωσης, ακόμα και μετά από αποθήκευση για περίοδο ενός χρόνου στους 40°C [67].

1.7. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών του *Bacillus cereus*

Στο γονιδίωμα του *Bacillus cereus* ATCC 14579 και του *Bacillus anthracis* str. Ames που εμφανίζουν ομολογία μεγαλύτερη από 90%, έχουν ταυτοποιηθεί στο καθένα 11 γονίδια που κωδικοποιούν για απακετυλάσες πολυσακχαριτών, από τα οποία τα 6 φαίνεται να κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης (PGNG-dacs) (Πίνακας 1). Οι απακετυλάσες αυτές, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (άνω του 90%) ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία, που υποδηλώνει ότι πιθανόν έχουν παρόμοιο λειτουργικό ρόλο στα δύο βακτήρια. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι υπάρχουν ασυνήθιστα πολλές απακετυλάσες πολυσακχαριτών στα δύο βακτήρια, που ίσως σημαίνει ότι αυτές έχουν διαφορετικούς ρόλους σε κυτταρικό ή αναπτυξιακό επίπεδο.

Από αυτές, η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε πάνω στην απακετυλάση πολυσακχαριτών BC2929, του *Bacillus cereus*. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 275 αμινοξέων, που έχει προβλεφθεί ότι φέρει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο στο N-τελικό άκρο της (θέσεις 1-37), για την έκκριση της μέσω του μονοπατιού Sec (SPI) στο περίπλασμα. Η BC2929 φέρει τη συντηρημένη επικράτεια ομολογίας NodB, τα τρία συντηρημένα κατάλοιπα δέσμησης του μετάλλου (Asp, His, His) και το καταλυτικό κατάλοιπο του ασπαρτικού (Asp). Εντούτοις, αντί για το συντηρημένο κατάλοιπο της Pro, έχει σερίνη (Ser). Στην **Εικόνα 10**, απεικονίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα στη BC2929, μετά από σύγκριση της αμινοξικής της αλληλουχίας με τη BC1960, μέσω BLAST. Σε βιοχημικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η BC2929 παρουσιάζει ενεργότητα απακετυλάσης στην πεπτιδογλυκάνη, σε ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη, σε N-ακετυλο χιτοολογοσακχαρίτες και στο Λιπίδιο II. Σε ανάλογες μελέτες, παρατηρήθηκε ότι η BC2929 απακετυλιώνει την πεπτιδογλυκάνη. Μάλιστα, μετά από

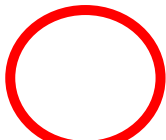
σήμανση με GFP, ο κυτταρικός εντοπισμός της BA2944 βρέθηκε να είναι στην κυτταρική επιφάνεια προτείνοντας ότι το φυσικό υπόστρωμά της είναι κάποιος άλλος πολυσακχαρίτης, και όχι η πεπτιδογλυκάνη, ενώ πιθανολογείται ότι δρα στον ουδέτερο πολυσακχαρίτη, τροποποιώντας τον [66].

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps |
|---------------|--|------------------------------|-------------|--------------|-------------|
| 110 bits(275) | 2e-33 | Compositional matrix adjust. | 69/187(37%) | 101/187(54%) | 21/187(11%) |
| Query 75 | LTFDGPG-KYTAELLDMLKKENAKATFFLIGSNVKAFPDLVKREDAEGHYVGHSMTHI | | | | 133 |
| Sbjct 85 | LTFDGPDLEFTPKILDKLGHNVKATFFLLGENAEKFPNIVKRIANEGHVIGNHTYSHP | | | | 144 |
| Query 134 | YKKLYTEGHYVDEMKEQGLIAGVLGKSPVLTRESGMPGLNEALRNKV---VENGLKV | | | | 190 |
| Sbjct 145 | NLAKVNEDEYRNQIIKTEEILNRLAGYAPKFIRPPYG-----EILENQLKWATEQNFMI | | | | 198 |
| Query 191 | WDWTIDSLDWKYNKMQVDAASAKIVENVLHGATNPTEVILMHDI---HPQ-SVKAVPGII | | | | 246 |
| Sbjct 199 | VQMSVDTVDWK-----GVSADTITNNVLGMSFPGSVILQHSTPGGHLQGSVDALDKII | | | | 251 |
| Query 247 | KGLKEKG 253 | | | | |
| Sbjct 252 | PQLKTKG 258 | | | | |

Εικόνα 10: Σύγκριση μέσω BLAST της BC2929 (πάνω) σε σχέση με τη BC1960 (κάτω). Κυκλώνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα των μελών της οικογένειας CE4 στη BC2929, καθώς και η Ser.

Πίνακας 1: Πηγή: Balomenou et al. (2013)

| PDAs του <i>B. cereus</i> ATCC 14579 | PDAs του <i>B. anthracis</i> str. Ames | Ποσοστό ομολογίας | Πιθανός ρόλος των PDAs του <i>B. anthracis</i> str. Ames |
|--------------------------------------|--|-------------------|--|
| BC1974 | BC1977 | 98% | Πλευρική σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, Ανθεκτικότητα στη λυσοζύμη |
| BC1960 | BC1961 | 94% | Βιογένεση της πεπτιδογλυκάνης (επιμήκυνση, κυτταρική διαίρεση) |
| BC3618 | BA3679 | 97% | Βιογένεση της |



| | | | |
|---------------|---------------|------------|---|
| | | | πεπτιδογλυκάνης (επιμήκυνση, κυτταρική διαίρεση) |
| BC2929 | BA2944 | 94% | Τροποποίηση του ουδέτερου πολυσακχαρίτη |
| BC5204 | BA5436 | 93% | Αγκυροβόληση των πρωτεϊνών της S- στοιβάδας και πρόσδεση στην πεπτιδογλυκάνη |
| BC0361 | BA0330 | 91% | Δομικές αλληλεπιδράσεις με την πεπτιδογλυκάνη |
| - | BA0331 | - | Διατήρηση του κυτταρικού σχήματος |
| BC0171 | BA0150 | 95% | Ελαττώματα στα σπόρια |

Η μεγάλη συγγένεια των δύο οργανισμών δίνει τη δυνατότητα χρήσης των ενζύμων του *B. cereus* ως μοντέλα για τη μελέτη των αντίστοιχων πρωτεϊνών του *B. anthracis* [46].

Σκοπός

Η BC2929 είναι μια απακετυλάση πολυσακχαριτών (πιθανή απακετυλάση της πεπτιδογλυκάνης) του *Bacillus cereus* και αποτελεί μέλος της οικογένειας 4 των Εστερασών Υδατανθράκων (CE4). Παρά τις μεγάλες ομοιότητες που παρουσιάζει με τα υπόλοιπα μέλη (συντηρημένη επικράτεια ομολογίας NodB, συντηρημένα κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, και συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο Asp), εμφανίζει και κάποιες ενδιαφέρουσες ιδιαιτερότητες. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η BC2929 στη θέση της συντηρημένης προλίνης (Pro) του ενεργού κέντρου, φέρει σερίνη (Ser). Επιπλέον, παρουσιάζει ιδιότητες ολιγομερισμού (ή υψηλότερης τάξης πολυμερών) στον οποίο ενδεχομένως οφείλεται η εμφάνιση ινιδίων που έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις, με γυμνό μάτι και μέσω μικροσκοπίας TEM, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες απακετυλάσες του *B. cereus* και του *B. anthracis* που έχουν μελετηθεί. Το γεγονός ότι η ομολογή της στο *B. anthracis* εντοπίζεται στον ουδέτερο πολυσακχαρίτη και μάλλον τον τροποποιεί, ενώ και η ίδια εικάζεται ότι είναι περιπλαστική, δημιουργεί την υποψία ότι ίσως να εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στη βιοσύνθεση ή τη διατήρηση της δομής των βιοϋμενίων. Σκοπός λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής ήταν ο βιοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός της εν λόγω απακετυλάσης, προκειμένου να διαλευκανθούν: α) οι ιδιότητες της BC2929 και ειδικά ο σχηματισμός ολιγομερισμού και η δημιουργία συσσωματωμάτων και β) μέσα από τη δομή, τις αλλαγές που προκαλεί στο ενεργό κέντρο η ύπαρξη της Ser αντί για την Pro και γ) ο συσχετισμός της

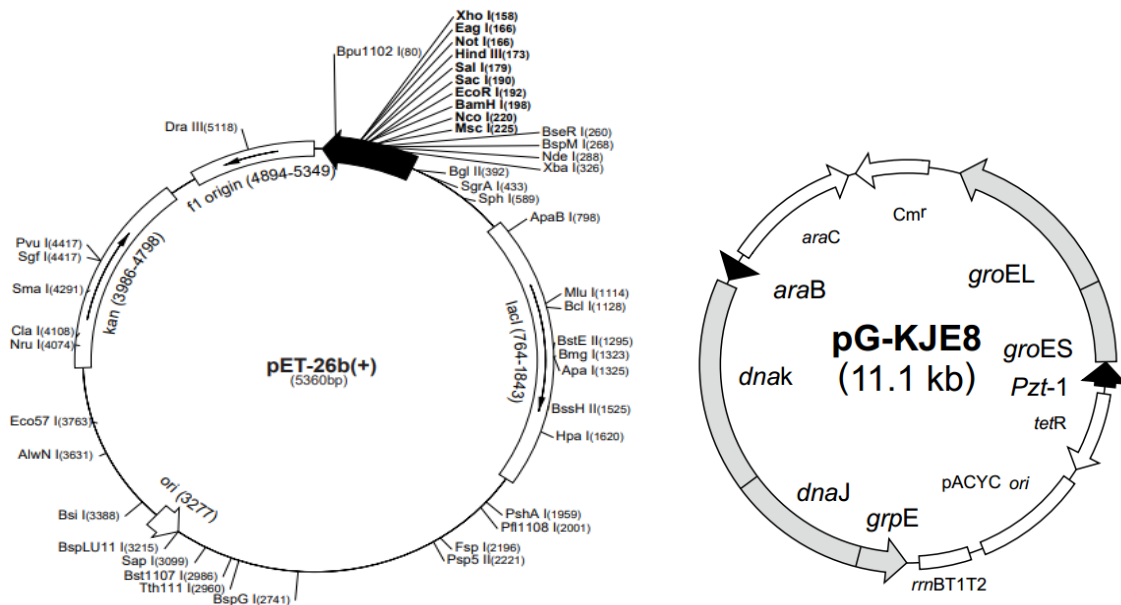
ενεργότητας με διάφορες μορφές ολιγομερισμού. Αυτές οι πληροφορίες θα έδιναν σημαντικά στοιχεία για τον τρόπο δράσης των απακετυλασών πολυσακχαριτών της οικογένειας CE4, θα βοηθούσαν στην κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της ίδιας της πρωτεΐνης αλλά και της ομόλογής της, BA2944, αλλά και στην περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού της υδροξυλίωσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου της *bc2929* μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

2.1.1. Κλωνοποίηση του ολόκληρου γονιδίου της *BC2929*

Το γονίδιο απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του οργανισμού *Bacillus cereus* ATCC 14579 με PCR, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές *bc2929-Frw* (5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAG TAC AGA GGA TGA AGG A-3' με ενσωματωμένη την περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση *NdeI*) και *bc2929-Rev* (5'-CCG CTC GAG CAT ACG ATT ATC ATG-3') (με ενσωματωμένη την περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση *XhoI*). Πέρα από την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου, σκοπός ήταν να απουσιάζει η αλληλουχία του πεπτιδίου σινιάλου. Μετά από υδρόλυση με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα τόσο των προϊόντων της PCR όσο και του **πλασμιδιακού φορέα *pET26b*** (Novagen) (**Εικόνα 11**), δημιουργήθηκαν δύο προεξέχοντα άκρα (*NdeI-XhoI*), καθιστώντας δυνατή την ενσωμάτωση του γονιδίου στο φορέα μετά από αντίδραση συγκόλλησης (**ligation**). Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα ακολούθησε ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* του στελέχους ***BL21 (DE3)*** με την πλασμιδιακή κατασκευή ***pET26b/bc2929***. Το εν λόγω στέλεχος υποστηρίζει την ταυτόχρονη έκφραση και δεύτερου πλασμιδιακού φορέα; ακολούθησε και δεύτερος μετασχηματισμός με τον **πλασμιδιακό φορέα *pG-KJE8*** (Takara) (**Εικόνα 12**), που φέρει τις τσαπερόνες ***dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL***. Να σημειωθεί ότι το construct που προέκυψε μέσα από αυτή τη διαδικασία, το προμηθευτήκαμε από το εργαστήριο Ενζυμική Βιοτεχνολογίας, του καθηγητή κυρίου Μπουριώτη.



Εικόνα 11, 12: Ο πλασμιδιακός φορέας pET26b(+) (Novagen) με τις θέσεις περιορισμού του NdeI και XhoI (αριστερά) και ο πλασμιδιακός φορέας pG-KJE8

2.1.2. Κλωνοποίηση του C-truncated γονιδίου της BC2929 καθώς και έλεγχος μετασηματισμένων αποικιών

Με την αντίδραση PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί πολλές φορές ενώ ένας πλήρης κύκλος PCR περιλαμβάνει την αποδιάταξη του DNA, την προσαρμογή των εκκινητών στο DNA καθώς και την επιμήκυνση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γονίδιο της BC2929 χωρίς το σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) και ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια που φαίνονται στην **Εικόνα 13**, στους οποίους έχει ενσωματωθεί η περιοριστική θέση για την XhoI και την NdeI ενδονουκλεάση, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR ώστε να πολλαπλασιαστεί και να απομονωθεί το γονίδιο της C-truncated BC2929. Τελικό αποτέλεσμα ήταν η εξάλειψη των τελευταίων 23 αμινοξέων από το C-τελικό του γονιδίου της BC2929. Η θερμοκρασία για την αρχική αποδιάταξη εξαρτάται από το μήκος του γονιδίου, που σε αυτή την περίπτωση είναι 717 bp (<1 kb), οπότε αρκούν 2 min. Υπολογίζουμε το T_m βάσει προγράμματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, φυλάω τα προϊόντα στους -20°C . Το προϊόν της PCR, τρέχει σε gel αγαρόζης για να διαπιστωθεί αν θα εμφανιστεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος και επίσης να ελεγχθεί αν υπάρχουν παραπροϊόντα.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποικιών (PCR colony) χρησιμεύει για να ελεγχθεί ποια από τα μετασηματισμένα κύτταρα έχουν λάβει το επιθυμητό ένθεμα (insert). Για το σκοπό αυτό, επιλέγονται μονές αποικίες μετά από την επίστρωση των μετασηματισμένων κυττάρων σε τριβλίο. Πραγματοποιείται αντίδραση PCR κατά τον ίδιο τρόπο. Ακολουθείται απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων (*Παράγραφος 2.2. : mini-prep*) με το σωστό ένθεμα

και αποστολή για νουκλεοτιδική αλληλούχιση ώστε να διαπιστωθεί η ένθεση των σωστών γονιδίων στο σωστό σημείο, ώστε η μεταγραφή και η μετάφραση να γίνεται σύμφωνα με το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

Name: 2929CTfor
Number: 1707
Date: 24/11/2016
Sequence: 5'- GGG AATGGC ATATGAGTACAGAGGATGAAGCAAAATC -3'
Scale: 0,20
μgr: 330,00
Mol. Weight: 11557,40
O.D.: 10,00
HPLC:
NanoMoles: 28,55
Concentration(200μL): 142,77 pmole/μL

Name: 2929CTrev
Number: 1708
Date: 24/11/2016
Sequence: 5'- GGCGCCGGCTCGAGTTTTTCTTTCAGTCCTTTAATAATTCC -3'
Scale: 0,20
μgr: 386,10
Mol. Weight: 12492,20
O.D.: 11,70
HPLC:
NanoMoles: 30,91
Concentration(200μL): 154,54 pmole/μL

Εικόνα 13: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της C-truncated BC2929.

2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Midipreps και Minipreps)

Από glycerol stock κυττάρων E. coli BL21 (DE3) μετασηματισμένων με τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), έγινε επίστρωση σε τριβλίο με LB agar/ καναμυκίνη. Έπειτα έγινε εμβολιασμός μονής αποικίας σε υγρή καλλιέργεια LB/καναμυκίνη και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 3300 rpm, RT και χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο «Low-copy plasmid purification (Midi)» για την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pET-26b(+) από το kit «Plasmid DNA Purification» της εταιρίας Macherey-Nagel. Ο φορέας αποθηκεύτηκε σε διάλυμα αποστειρωμένου νερού στους -20°C, προς μελλοντική χρήση.

Αντιθέτως, για την απομόνωση πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό προϊόν της C-truncated BC2929 που αποκτήθηκε με PCR, χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο για Mini prep. Για το σκοπό αυτό, δύο καλλιέργειες με τα κύτταρα DH5α που φέρουν το φορέα μετά από μετασηματισμό (Παράγραφος 2.8.) φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στις 3300 rpm, για 20 min και 1,5 ml μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο eppendorf. Κρατήθηκε το ίζημα και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση με άλλα 1,5ml καλλιέργειας. Στη συνέχεια,

ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο από το «Mini-prep spin kit» της QIAGEN. Ο φορέας και πάλι εκλούστηκε σε διάλυμα αποστειρωμένου νερού.

2.3. Πέψη πλασμιδιακού φορέα και γονιδιακού προϊόντος PCR

Με βάση το χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+), επιλέγουμε τα περιοριστικά ένζυμα με τα οποία θα τον κόψουμε ώστε να δημιουργηθούν κολλώδη άκρα. Επιλέχθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI με θέσεις περιορισμού στις θέσεις 288 και 158, αντίστοιχα. Σε μείγμα πέψης συνολικού όγκου 100 μl προστίθονται περίπου 10 μg πλασμιδιακού DNA, τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI (stock 20 U/μl), για τα οποία ισχύει: θεωρητικά 1 μg DNA κόβονται από 5 Units ενζύμου/ 1h στους 37°C, το buffer του κάθε ενζύμου, αν δεν υπάρχει κάποιο κοινό (οι NdeI και XhoI έχουν κοινό buffer το NEB4 (10x) αλλά η XhoI χρειάζεται και BSA, οπότε θα τα προσθέσουμε μαζί) και τέλος συμπληρώνουμε με νερό έως τον τελικό όγκο της αντίδρασης. Να σημειωθεί ότι ο όγκος της αντίδρασης πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το 1/10 του όγκου των ενζύμων που προσθέτουμε. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3h. Έπειτα τρέχουμε gel αγαρόζης για να ελεγχθεί αν κόπηκε στις κατάλληλες θέσεις ο φορέας, στα 110 V για 1h. Το γονίδιο που πρόκειται να ενσωματωθεί, θα κοπεί επίσης από τα ίδια περιοριστικά ένζυμα ώστε να δημιουργηθούν τα ίδια άκρα. Η αντίδραση της πέψης (digestion) για το γονίδιο πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 4h.

2.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ταυτοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη BC2929, του προϊόντος πέψης του πλασμιδιακού φορέα και πέψης του ενθέματος-επιθυμητού γονιδίου της C-truncated BC2929, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συγκεκριμένη τεχνική τα μόρια DNA ή RNA απομονώνονται βάσει του μεγέθους τους μέσω της εφαρμογής ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούμενα από το αρνητικό (καθώς είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων) προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Το δυναμικό που χρησιμοποιείται συνήθως είναι στα 100-200 Volts (χρησιμοποιήθηκαν τα 100 V). Το πήκτωμα αγαρόζης είναι μια τρισδιάστατη μήτρα που σχηματίζεται από ελικοειδή μόρια αγαρόζης οργανωμένα σε υπερελικοειδείς δέσμες, δημιουργώντας μια δομή με κανάλια και πόρους από τους οποίους διέρχονται τα μόρια DNA/RNA κατά την ηλεκτροφόρηση. Η περιεκτικότητα της αγαρόζης που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται από το μέγεθος του βιομορίου που πρόκειται να παρατηρηθεί, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη διακριτική ικανότητα. Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως πήκτωμα 1% w/v αγαρόζης, τα οποία περιείχαν 1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο μπορεί να προσδεθεί στο DNA, προκειμένου να παραχθεί φθορίζον σήμα πορτοκαλί χρώματος κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία καθιστώντας δυνατή την παρατήρηση των ζωνών DNA διαφορετικού μεγέθους. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ο λBstEII και ο 100 bp (NEB).

2.5. Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση κολώνας QIAquick

Αφού φορτώσουμε όλη τη διαθέσιμη ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα σε ένα gel αγαρόζης (σε αυτή την περίπτωση 1.3%) και το τρέξουμε για επαρκή χρόνο, κάνουμε εκχύλιση του φορέα χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο «QIAquick Gel Extraction» του kit της QIAGEN.

2.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR με τη χρήση στήλης QIAquick.

Το προϊόν ακριβώς μετά την PCR όπως και το προϊόν μετά από την αντίδραση πέψης καθαρίζεται μέσω του “PCR purification kit using a microcentrifuge” της QIAGEN. Η κατακρήμνιση γίνεται σε H₂O.

2.7. Αντίδραση συγκόλλησης (ligation)

Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιείται για τη συνένωση του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) με το προϊόν της PCR, δηλαδή τη C-truncated μορφή του γονιδίου της BC2929. Αυτό συμβαίνει γιατί και στα δύο έχουν δημιουργηθεί τα ίδια άκρα μέσω πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI. Συνήθως η επιθυμητή αναλογία φορέα: ενθέματος είναι 1:1 αλλά για σιγουριά η προτεινόμενη αναλογία που χρησιμοποιήθηκε είναι 1:5. Απαιτούνται 50-100 ng φορέα (χρησιμοποιήθηκαν 90 ng) ενώ η ποσότητα του ενθέματος, καθορίζεται από την αναλογία μορίων φορέα/ενθέματος. Η T4 DNA λιγάση που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας ROCHE ενώ απαιτείται επίσης το DNA dilution buffer (παρέχεται από το kit) καθώς και το T4 DNA ligation buffer (δηλαδή το buffer που χρειάζεται η λιγάση για να δράσει και το οποίο επίσης παρέχεται). Η επώαση πραγματοποιείται στους 18 °C για τουλάχιστον 5 min (εδώ στους 16 °C για 15 min).

2.8. Μετασηματισμός του γονιδίου σε δεκτικά κύτταρα

Ο μετασηματισμός σε δεκτικά κύτταρα (DH5α- κύτταρα κλωνοποίησης και BL21 DE3- κύτταρα έκφρασης) περιλαμβάνει: επώαση των δεκτικών κυττάρων (100 μl) με το πλασμίδιο pET26b(+) που φέρει το γονίδιο της C-truncated BC2929 (στην περίπτωση των BL21 DE3, αυτά φέρουν ήδη και τον πλασμιδιακό φορέα pG-KJE8 (με τις τσαπερόνες) αρχικά στον πάγο για 30 min και έπειτα στους 42° C, στο υδατόλουτρο, για 1,5 ώρα για να ανοίξουν οι πόροι του κυττάρου και μετά επώαση και πάλι στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί προσθήκη 400 μl LB, επώαση στους 37°C για 1 h περίπου, φυγοκέντρηση για 1 min με απόρριψη του μισού περίπου μέρους (200 μl) και τελικά επίστρωση του υπόλοιπου μέρους σε τριβλία LB agar/ καναμυκίνη/χλωραμφενικόλη (επώαση στους 37°C O/N).

2.9. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης (glycerol stock) προς μακρά συντήρηση και χρήση

Η δημιουργία glycerol stock επιτρέπει την επανειλημμένη χρήση για καλλιέργειες των μετασχηματισμένων, με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, βακτηριακών κυττάρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το glycerol stock (2) αποκτήθηκε μετά από εμβολιασμό από προϋπάρχον glycerol stock (1). Το glycerol stock (1) είχε αποκτηθεί μετά από συλλογή μοναδιαίων αποικιών από στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που ακολούθησε το μετασχηματισμό και τον εμβολιασμό αυτών, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/ καναμυκίνης (30 μg/ml) και χλωραμφενικόλης (34 μg/ml). Ακολούθησε ολονύκτια υγρή καλλιέργεια στους 37°C υπό ανάδευση και προσθήκη την επόμενη ημέρα σε μικρή ποσότητα καλλιέργειας, διαλύματος αποστείρωμένης γλυκερόλης 35%, με αποθήκευση 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. Ακολούθησε έλεγχος έκφρασης ώστε να επιλεγθούν τα glycerol stocks (1) με κύτταρα που εξέφραζαν το επιθυμητό γονίδιο της BC2929, από όπου κρατήθηκαν τα τελικά glycerol stocks. Μετά από αντίστοιχη ολονύκτια καλλιέργεια, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών προέκυψαν και τα τελικά glycerol stocks (2).

2.10. Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BC2929 σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3)

Για την υπερέκφραση της ολόκληρης ανασυνδυασμένη πρωτεΐνης BC2929, έγινε εμβολιασμός από το glycerol stock σε υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των 200 ml LB (προκαλλιέργεια)/καναμυκίνης (30 μg/ml) και χλωραμφενικόλης (34 μg/ml) και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Ακολούθησε αραιώση 1/25 της αρχικής καλλιέργειας σε 4L (μεγάλη κλιμακα) υγρού θρεπτικού μέσου LB/καναμυκίνης (30 μg/ml), χλωραμφενικόλης (34 μg/ml), L-αραβινόζης (0,5 mg/ml) και τετρακυκλίνης (5 ng/ml) και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C, μέχρις ότου η Οπτική Πυκνότητα που μετρήθηκε από το φασματοφωτόμετρο στα 600 nm να κυμανθεί να είναι 0,4-0,6 (περίπου 0,4). Να σημειωθεί εδώ ότι η καναμυκίνη και η χλωραμφενικόλη είναι τα αντιβιοτικά επιλογής για το πλασμίδιο που φέρει την πρωτεΐνη ενώ η L-αραβινόζη και η τετρακυκλίνη είναι τα αντιβιοτικά που απαιτούνται για την επαγωγή των τσαπερονών. Έπειτα οι καλλιέργειες μπήκαν στους 16°C για 30 min και στην πορεία προστέθηκε 0,2 mM IPTG (IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside) ώστε να επαχθεί η έκφραση, μετά από ολονύκτια επώαση στους 16°C. Πριν καθώς και μετά την προσθήκη IPTG συλλέχθηκε δείγμα πελέτας που προέκυψε από φυγοκέντρηση σε microcentrifuge ενός mL υγρής καλλιέργειας στους 6°C, στις 6000 rpm για 15 min, προκειμένου να αναλυθεί αν όντως έγινε επαγωγή κατά την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης. Η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε την επόμενη ημέρα, στη φυγόκεντρο Megafuge 40R (Thermo Scientific) στους 6°C, στις 4.300 rpm για 30 min για να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο και έπειτα η πελέτα ξεπλύθηκε σε 40 ml Buffer: 20mM Tris pH=8, 100 mM NaCl και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στη φυγόκεντρο JOUAN στους 6°C,

στις 6.000 rpm, για 15 min, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα σε μορφή ιζήματος (πάστα) και να αποθηκευτούν στους -20°C .

Η εν λόγω διαδικασία επαναλήφθηκε κάθε φορά που επιδιώχθηκε παραγωγή και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε αποδιατακτικές και μη συνθήκες. Για τον καθαρισμό σε μη αποδιατακτικές συνθήκες εφαρμόστηκε παρόμοιο πρωτόκολλο έκφρασης, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια 2L.

2.11. Έλεγχος υπερέκφρασης της BC2929 ή της C-truncated BC2929 και έλεγχος διαλυτότητας

α) Η δοκιμή υπερέκφρασης περιλαμβάνει την έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21 DE3 (**C-truncated BC2929**) ή σε διαφορετικά στελέχη (star pLys και JM109 για την **ολόκληρη BC2929**) 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 όπως και πριν τον εμβολιασμό από glycerol stock σε καλλιέργειες πολύ μικρής κλίμακας (συνήθως 5 ml) LB/καναμυκίνη/χλωραμφενικόλη και ολονύκτια επώαση στους 37°C , υπό ανάδευση.

Έπειτα, για τη **C-truncated BC2929**:

Ο αρχικός εμβολιασμός έγινε από glycerol stock με τους 3 κλώνους που είχαν επιλεγεί. Έγινε εμβολιασμός 1:20 σε 8 ml LB/ καναμυκίνη/χλωραμφενικόλη/ L-αραβινόζη/ τετρακυκλίνη και επώαση έως ότου η οπτική απορρόφηση να φθάσει 0,4-0,6. Δοκιμάστηκαν αρχικά οι θερμοκρασίες 16°C και 28°C και η επαγωγή με 0,2 mM IPTG στις 4h και ολονύκτια (O/N). Σε κάθε περίπτωση κρατήθηκε 1 ml δείγματος (πριν την επαγωγή, μετά από 4h και O/N), τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 rpm, 6°C , για 15 min (microcentrifuge). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν O/N και την επόμενη ημέρα φυγοκεντρήθηκαν επίσης 6000 rpm, 6°C , για 15 min (JOUAN). Δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS/PAGE και επιλέχθηκε ο κλώνος 1 για να δοκιμαστεί σε 50 ml καλλιέργεια με εμβολιασμό 1:20 από προκαλλιέργεια 7 ml, με την ίδια διαδικασία παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, και σε συνθήκες 28°C με 4h επαγωγή με 0,3 mM IPTG και 16°C με O/N επαγωγή με 0,3 mM IPTG. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για την επαναδιάλυση των πελετών (*Lysis buffer*) είναι 2ml: 20 mM Tris/HCl pH 7.6 + 200 mM NaCl. Ακολούθησε η διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους για να ελεγχθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης (αν εντοπίζεται στο υπερκείμενο ή την πελέτα), 2x30'' (30'' διάλειμμα) με τη μικρή κεφαλή και φυγοκέντρωση στις 12.500 rpm, 6°C , για 1h (microcentrifuge). Έπειτα, για να βελτιωθεί η διαλυτότητα ελέγχθηκε και η έκφραση σε καλλιέργεια 20 ml που προέκυψαν από μια αρχική καλλιέργεια 200 ml (εμβολιασμός 1:20 από προκαλλιέργεια 50 ml), αφού «έπιασε την κατάλληλη οπτική πυκνότητα», στις εξής συνθήκες:

- 25 °C, επαγωγή στις 2h με 0,3 mM IPTG
- 25 °C, επαγωγή στις 4h με 0,1 και 0,2 mM IPTG
- 25 °C, επαγωγή O/N με 0,1 και 0,2 mM IPTG

Ομοίως ακολούθησε φυγοκέντρηση στη JOUAN, επαναδιάλυση σε 2ml Lysis Buffer και διάρρηξη των κυττάρων (2x30'', διάλειμμα 30'' με τη μικρή φυγόκεντρο). Τελικά η συνθήκη που επιλέχθηκε είναι οι 25 °C, με επαγωγή O/N με 0,2 mM IPTG. Η διαδικασία που ακολούθηθηκε στην πορεία είναι η ίδια που περιγράφηκε στην *Παράγραφο 2.10.*

Για την **ολόκληρη BC2929**, διερευνήθηκαν οι συνθήκες έκφρασης σε δύο διαφορετικά στελέχη του *E. coli*, τα star pLys και τα JM109. Συνολικά ελέγχθηκαν 5 αποικίες για τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pET26b(+) star pLys και 3 για τα JM109. Από προκαλλιέργειες των 5 ml LB/καναμυκίνη/χλωραμφενικόλη όπου είχε γίνει εμβολιασμός από τα glycerol stocks αυτών των αποικιών (ολονύκτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση), έγινε εμβολιασμός 1:25 σε καλλιέργειες των 50 ml LB/ καναμυκίνη/ χλωραμφενικόλη και επώαση στους 37°C, έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή οπτική απορρόφηση. Έπειτα οι καλλιέργειες χωρίστηκαν ανά 10 ml σε σωληνάκια και δοκιμάστηκαν οι εξής συνθήκες:

- | | | |
|--|---|-------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • 16°C, επαγωγή 4h • 16°C, επαγωγή O/N • 25°C, επαγωγή 4h • 25°C, επαγωγή O/N | } | + 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mM IPTG |
|--|---|-------------------------------|

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους κλώνους και των δύο στελεχών. Τελικά επιλέχθηκαν 2 κλώνοι από τα JM109, με καλύτερες συνθήκες αυτές της O/N επαγωγής με 0,2 mM στους 16°C και 0,1 mM στους 25°C IPTG, οι οποίες επαναδοκιμάστηκαν όπως περιγράφεται ακολούθως, και αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5%. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκφραση μεγάλης κλίμακας (2L) (με αραιώση 1:25) και για τους δύο κλώνους με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην *Παράγραφο 2.10.* και για τις δύο προαναφερθείσες συνθήκες και ακολουθεί καθαρισμός και στις 2 περιπτώσεις για κάθε κλώνο. Τελικά επιλέχθηκε ο κλώνος JM109 2 με συνθήκες O/N επαγωγής με 0,2 mM στους 16°C, για την επίτευξη της καλύτερης διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Οι καθαρισμοί που ακολούθησαν βασίστηκαν σε αυτές τις συνθήκες, ακολουθώντας και πάλι τη διαδικασία που θα περιγραφεί στην *Παράγραφο 2.13.*

β) Μετά από εμβολιασμό σε 50 ml καλλιέργεια LB/καναμυκίνη/ χλωραμφενικόλη x 2 για τον κάθε κλώνο (με αραιώση 1:25 από προκαλλιέργεια των 6 ml), καθώς και σε μια καλλιέργεια control των 5 ml, επώαση στους 37°C και αφού τα κύτταρα έφτασαν θεωρητικά στην εκθετική φάση ανάπτυξης, εφαρμόστηκαν οι επιλεγμένες συνθήκες (O/N επαγωγής με 0,2 mM στους 16°C και 0,1 mM IPTG στους 25°C) για τον κάθε κλώνο καθώς και για τις καλλιέργειες control. Οι καλλιέργειες ισομοιράστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν (6000 rpm, 6°C, 15 min). Ο ένας κλώνος αξιοποιήθηκε για τη **δομική ελέγχου διαλυτότητας**. Έγινε επαναδιάλυση των πελετών με 1 ml από το καθένα από τα διαλύματα που αναφέρονται παρακάτω:

- 25 mM Tris pH=7.6 , 200 mM NaCl
- 25 mM Tris pH=7.6 , 200 mM KCl
- Glycerol 5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- Glycerol 10%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- Tween-20 0,5 % , 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- Triton X-100 0,5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- CHAPS 0,5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl

Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους (2x30'' και 30'' διάλειμμα), φυγοκέντρηση (12.500 rpm, 6°C, 1 h) και σύγκριση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης μέσω ανάλυσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5%.

2.12. Διάρρηξη κυττάρων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και υπό αποδιατακτικές συνθήκες

α) Για τη διάσπαση των κυττάρων που αντιστοιχούσαν σε 4L υγρής καλλιέργειας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση της κυτταρικής πάστας (ομογενοποίηση) υπό ανάδευση σε 100 ml *Lysis buffer*: 25mM Tris/HCl pH 7.6, 200mM NaCl. Η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων εργαστηριακά πραγματοποιείται συνήθως με την χρήση συσκευής υπερήχων (sonication), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη δημιουργία ηχητικών ωστικών κυμάτων συχνότητας περίπου 20 kHz, τα οποία απελευθερώνονται από το άκρο μιας μεταλλικής ράβδου στο κυτταρικό εναιώρημα. Οι δονήσεις της μεταλλικής ράβδου προκαλούν συνθήκες υποπίεσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροφυσαλίδων, ενώ η αποκατάσταση της πίεσης διαρρηγνύει τις φυσαλίδες και οι δυνάμεις ωστικού κύματος με τη σειρά τους, διαρρηγνύουν τα κυτταρικά τοιχώματα. Το δοχείο με το κυτταρικό εναιώρημα θα πρέπει να τοποθετείται σε πάγο καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας, καθώς λόγω της ενέργειας που απελευθερώνεται από τη μεταλλική ράβδο, υπάρχει ο κίνδυνος αύξησης της θερμοκρασίας του διαλύματος και μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Για τον ίδιο λόγο, θα πρέπει να διακόπτεται η διαδικασία ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η διάρρηξη όμως συνοδεύεται και από την απελευθέρωση διαφόρων υδρολυτικών ενζύμων, όπως των πρωτεασών, οπότε πριν από τη χρήση υπερήχων θα πρέπει να προστίθενται ειδικοί αναστολείς στο ομογενοποιημένο διάλυμα. Πριν την εφαρμογή των υπερήχων προστέθηκαν λοιπόν αναστολείς πρωτεασών (Benzamidine 150μg/ml, Leupeptin 20μ/ml, PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride] 1mM) στην ομογενοποιημένη κυτταρική πάστα. Η διάρρηξη μέσω υπερήχων έγινε για 10 επαναλήψεις των 30 sec και ενδιάμεσα διαλείμματα των 30 sec (συνολική διάρκεια 10 min), με τη μικρή κεφαλή (διότι η μεγάλη δημιουργούσε ίζημα). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στη φυγόκεντρο JOUAN στους 4°C, στις 12.500 rpm, για 1 h. Το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες, συλλέγεται και φορτώνεται σε

χρωματογραφική στήλη συγγενείας Ni-NTA agarose, αφού κρατηθούν 20μl δείγματος για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

β) Στην περίπτωση της διάρρηξης των κυττάρων υπό αποδιατακτικές συνθήκες, η κυτταρική πάστα 2L, που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, ομογενοποιήθηκε με O/N ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, σε 80 mL διαλύματος λύσης των κυττάρων (*Lysis buffer*): 20 mM Tris pH=7,6, 200 mM NaCl, 8M Urea και 5 mM Imidazole. Προκειμένου να διαλυθεί η ουρία στο διάλυμα, απαιτείται ωστόσο ανάδευση στους 50°C για μερικά λεπτά. Πριν τη διάρρηξη προστέθηκαν οι αναστολείς: αναστολέας των πρωτεασών PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 mM) καθώς και η Leupeptin (1x) και Benzodiazepine (1x). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν υπέρηχοι για 2x30'' (διάλειμμα για 30'') με τη μεγάλη κεφαλή που συνοδεύτηκε από φυγοκέντρηση στις 12500 rpm, στους 25°C, για 1h. λεπτά. Το υπερκείμενο (όπως και οι πελέτες που προκύπτουν) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας.

2.13. Απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης BC2929 μέσω της μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγενείας (κολώνα Ni-NTA agarose) υπό αποδιατακτικές και μη, συνθήκες.

α) Υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες: Για τον καθαρισμό της ανασυνδυσμένη πρωτεΐνης BC2929 χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Ni-NTA agarose (Qiagen). Σε αυτή τη στήλη τα ιόντα Ni²⁺ σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με τη χηλικοποιητική ένωση NTA (Nitrilotriacetic acid), μέσω δεσμών συναρμογής στους οποίους συμμετέχουν τα καρβοξυτελικά οξυγόνα και το άζωτο, συγκρατώντας ισχυρά τα μεταλλοκατιόντα. Οι υπόλοιπες θέσεις του μεταλλοκατιόντος καταλαμβάνονται προσωρινά από μόρια νερού. Η ένωση NTA με τη σειρά της είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με σφαιρίδια αγαρόζης (χρωματογραφικό υλικό). Το Ni²⁺ από το στρώμα Ni-NTA εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον ιμιδαζολικό δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί τμήμα της δομής των ιστιδινών. Έτσι, αμινοξικά κατάλοιπα (His) στην επιφάνεια πρωτεϊνών δρουν ως δότες ηλεκτρονίων σε δισθενή μεταλλοκατιόντα-δέκτες (Ni²⁺), με αποτέλεσμα την προσρόφηση του ενζύμου. Η μεταλλοχηλική χρωματογραφία συγγενείας είναι μια πολύ αποδοτική μέθοδος για την απομόνωση πρωτεϊνών που τροποποιήθηκαν ώστε να φέρουν μια ουρά (6) ιστιδινών, την 6xHis tag, σε κάποιο άκρο τους. Η ουρά 6xHis tag που παρέχεται από τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), και έχει προστεθεί στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης BC2929, προδένεται συνεπώς στα ακινητοποιημένα ιόντα Ni²⁺ μέσω αλληλεπίδρασης αυτού με τους δακτυλίους του ιμιδαζολίου. Έκλυση του ενζύμου μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ιμιδαζολίου (ή EDTA), το οποίο έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το Ni²⁺ από τις ιστιδίνες, με τις οποίες συναγωνίζεται για τις θέσεις πρόσδεσης στο μεταλλοκατιόν. Το υπερκείμενο που φορτώνεται, ρέει δια μέσου της στήλης χάρη στη βαρύτητα και τα δείγματα (elutions) που εξέρχονται συλλέγονται. Κατά τον καθαρισμό, τα διαλύματα πλύσεων (Wash), περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που δεν έχουν

προσδεθεί ισχυρά ή και καθόλου στο μεταλλοκατιόν. Στα διαλύματα έκλουσης η αυξανόμενη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου οδηγεί στην αποδέσμευση της επιθυμητής πρωτεΐνης από την κολώνα (η οποία θεωρητικά είναι ισχυρά δεσμευμένη) και έτσι στην έκλουσή της, εξασφαλίζοντας ιδανικά την καθαρότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος.

Αρχικά έγινε εξισορρόπηση των 10 ml χρωματογραφικού υλικού με 150 ml *Equilibration buffer* (25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazole). Στη συνέχεια, από την κολώνα πέρασε το πρωτεϊνικό διάλυμα-υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρωση (Sample). Αρχικά συλλέχθηκε το διάλυμα που διαπέρασε το υλικό (*Flow through*), το οποίο περιέχει πρωτεΐνες και άλλα συστατικά που δεν προσδένονται στα ιόντα Ni²⁺ λόγω χαμηλής ή καθόλου συγγένειας, και κατόπιν φορτώθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα πλύσης *Wash 1-Wash 3* και τελικά τα διαλύματα έκλουσης *Elution 1- Elution 12* με συλλογή σε κλάσματα των 10 περίπου ml. Η όλη διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιείται σε ψυχώμενο περιβάλλον, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα αποδιάταξης της πρωτεΐνης και η δράση των πρωτεασών. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό της BC2929 περιγράφονται στον **Πίνακα 2**:

| Διάλυμα | Tris/HCl pH 7.6 | NaCl | Imidazole | Όγκος |
|-------------------|--------------------|--------|-----------|--------|
| Wash 1 | 25 mM | 200 mM | 10 mM | 100 ml |
| Wash 2 | 25 mM | 200 mM | 20 mM | 100 ml |
| Wash 3 | 25 mM | 200 mM | 50 mM | 50 ml |
| Elution 1 | 25 mM | 200 mM | 100 mM | 10 ml |
| Elution 2 | 25 mM | 200 mM | 100 mM | 10 ml |
| Elution 3 | 25 mM | 200 mM | 200 mM | 10 ml |
| Elution 4 | 25 mM | 200 mM | 200 mM | 10 ml |
| Elution 5 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 6 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 7 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 8 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 9 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 10 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |

| | | | | |
|-------------------|-------|--------|--------|-------|
| Elution 11 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |
| Elution 12 | 25 mM | 200 mM | 500 mM | 10 ml |

Πίνακας 2: Η σύσταση των διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση της BC2929 και της C-truncated BC2929, από την κολώνα Ni-NTA αραρόζης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Τα elutions ενώνονταν και ακολουθούσε dialysis και συμπύκνωση μέχρι τα 2ml όπου συνήθως εμφανίζονταν τα ινίδια, ορατά με γυμνό μάτι στο υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα. Στον πρώτο καθαρισμό, μετρήθηκε η συγκέντρωση του δείγματος στο Nanodrop στα 4.5 mg/ml (M.B.= 27.79 kDa, extinction coefficient= 38.39), αν και λόγω πιθανής παρουσίας τσαπερονών αυτή η τιμή δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτική. Δόθηκε έπειτα μια πολύ μικρή ποσότητα για παρατήρηση μέσω της μικροσκοπίας TEM (1), όμως το κύριο μέρος του δείγματος γρήγορα θόλωσε και έτσι φυγοκεντρήθηκε στους 4°C, στις 12.500 rpm, για 15 min. Το ίζημα που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρωση, δόθηκε και αυτό για παρατήρηση μέσω TEM (δεν μπορούσε να επαναδιαλυθεί στο νερό).

β) Υπό αποδιατακτικές συνθήκες: Σκοπός είναι να γίνει αποδιάταξη της πρωτεΐνης παρουσία ουρίας και στη συνέχεια, καθώς η ουρία απομακρύνεται σταδιακά, μέσω μείωσής της στα διαλύματα, να πραγματοποιηθεί αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding) πάνω στην κολώνα, σε υδατικό διάλυμα. Αρχικά έγινε εξισορρόπηση του χρωματογραφικού υλικού (10 ml) με 150 mL Lysis buffer (20 mM Tris pH=7,6, 200 mM NaCl, 8M Urea και 5 mM Imidazole) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, από την κολώνα πέρασε το υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρωση που διαδέχθηκε τη διάρρηξη μέσω υπερήχων υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Συλλέχθηκε αρχικά το Flow through και έπειτα φορτώθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα πλύσης Wash 1- Wash 8 και τελικά τα διαλύματα έκλυσης Elution1- Elution 10. Η σύσταση των συγκεκριμένων διαλυμάτων περιγράφεται στον **Πίνακα 3**. Υπενθυμίζεται ότι τα διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση ουρίας (κυρίως) απαιτούν ανάδευση στους 50°C για να διαλυθούν. Η παραπάνω διαδικασία του καθαρισμού έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη συλλογή του Wash 5, καθώς όλα τα προηγούμενα διαλύματα περιέχουν (μειούμενη) ποσότητα ουρίας, η οποία δημιουργεί δομή κρυστάλλων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα επόμενα διαλύματα (Wash 6-Elution 10), συλλέχθηκαν υπό ψυχόμενες συνθήκες, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα αποδιάταξης της πρωτεΐνης. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5% και έπειτα τρέχθηκε πήκτωμα keratin-free ώστε να δοθεί για πρωτεομική ανάλυση και ταυτοποίηση συγκεκριμένης μπάντας στις εγκαταστάσεις Πρωτεομικής (Profi), στο Ιτε.

| Διάλυμα | Tris/HCl pH 7.6 | NaCl | Imidazole | Urea | Όγκος |
|-------------------|--------------------|--------|-----------|-------|--------|
| Wash 1 | 20 mM | 200 mM | 5 mM | 6 M | 100 ml |
| Wash 2 | 20 mM | 200 mM | 5 mM | 4 M | 100 ml |
| Wash 3 | 20 mM | 200 mM | 5 mM | 2 M | 100 ml |
| Wash 4 | 20 mM | 200 mM | 5 mM | 1 M | 100 ml |
| Wash 5 | 20 mM | 200 mM | 5 mM | 0,5 M | 100 ml |
| Wash 6 | 20 mM | 200 mM | 10 mM | - | 200 ml |
| Wash 7 | 20 mM | 200 mM | 20 mM | - | 50 ml |
| Wash 8 | 20 mM | 200 mM | 50 mM | - | 50 ml |
| Elution 1 | 20 mM | 200 mM | 100 mM | - | 10 ml |
| Elution 2 | 20 mM | 200 mM | 100 mM | - | 10 ml |
| Elution 3 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 4 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 5 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 6 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 7 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 8 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 9 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |
| Elution 10 | 20 mM | 200 mM | 300 mM | - | 10 ml |

Πίνακας 3: Η σύσταση των διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση της C-truncated BC2929 από την κολώνα Ni-NTA αгарόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

2.14. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE

Τα elutions που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide), μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους. Η τεχνική βασίζεται στο ότι το ανιοντικό απορρυπαντικό SDS είναι ένας αποδιατακτικός παράγοντας για τα πρωτεϊνικά μόρια, που τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, ώστε να μετακινηθούν μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται, με κατεύθυνση από το αρνητικά προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Η ταχύτητα δε με την οποία ένα μόριο κινείται μέσα στην πηκτή εξαρτάται από την πυκνότητα της πολυακρυλαμίδης και την μοριακή του μάζα. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ένας πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, οπότε και εξάγονται συμπεράσματα σε σχέση με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, γίνεται μια ποιοτική και ποσοτική εκτίμησή της καθώς και ελέγχεται η καθαρότητα του δείγματος.

Τα δείγματα λοιπόν που συλλέχθηκαν πριν και μετά τον καθαρισμό της BC2929, αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με συγκέντρωση 12,5% w/v, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπήρχε επαγωγή/υπερέκφραση, διαλυτό κλάσμα μετά τη διάρρηξη και επιλογή των elutions στα οποία έγινε έκλυση της πρωτεΐνης. Οι πελλέτες που είχαν προκύψει από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύθηκαν σε ανάλογο όγκο Lysis buffer ενώ όλα τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 min, στους 100°C πριν το φόρτωμα. Οι πελέτες που αντιστοιχούν στα δείγματα πριν την επαγωγή, 2h μετά την επαγωγή, 4h μετά την επαγωγή και O/N μετά την επαγωγή, επαναδιαλύθηκαν με 25 μl, 30 μl, 40 μl και 80 μl sample buffer 1x. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα (Amersham Biosciences) που βασίζεται σε πρωτεΐνες μάρτυρες με γνωστά μοριακά βάρη : 97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa, 20.1kDa και 14.4kDa. Η συνταγή για το πήκτωμα πήκτωμα επιστοίβασης (Stacking) και το πήκτωμα διαχωρισμού (Running) του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12,5% είναι η ακόλουθη:

| | Running | Stacking |
|-----------------------------|-----------------|----------------|
| 3M Tris/HCl pH 8.9 | 2.5ml (1.25ml) | - |
| 1M Tris/HCl pH 6.8 | - | 1ml (0,5ml) |
| 30% Acr. + 0.8% Bis. | 8.35ml (4.18ml) | 2.5ml (1.25ml) |
| H₂O | 9ml (4.5ml) | 15ml (7.5ml) |
| 20% SDS | 100μl (50μl) | 75μl (38μl) |
| 10% APS | 100μl (50μl) | 150μl (75μl) |
| Temed | 40μl (20μl) | 20μl (10μl) |

Πίνακας 4: Συνταγή για την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12,5%

Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250 σε διάλυμα χρώσης (50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 15 min και αποχρωματισμός με κατάλληλα διαλύματα (10% Acetic Acid, 5% Methanol) για την απομάκρυνση της μπλε χρωστικής από τις μη πρωτεϊνικές ζώνες, ώστε να παραμείνουν μόνο οι μπλε πρωτεϊνικές μπάντες.

2.15. Διαπίδυση (Dialysis) και Συγκέντρωση πρωτεΐνης

Μετά την ηλεκτροφόρηση, επιλέγονται τα κλάσματα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης, ενοποιούνται και υπόκεινται σε ολονύκτια διαπίδυση σε ψυχόμενο περιβάλλον. Η μέθοδος της διαπίδυσης βασίζεται στην ωσμωτική διαφορά που δημιουργείται εκατέρωθεν μιας ημιπερατής μεμβράνης υπερδιηθήσεως, με σκοπό την αλλαγή του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς μόρια μεγάλου μοριακού βάρους (όπως είναι οι πρωτεΐνες) δεν μπορούν να διαπεράσουν τους πόρους της μεμβράνης ενώ μικρότερα μόρια (όπως μόρια και ιόντα του διαλύματος), μετακινούνται ελεύθερα μέχρι να επέλθει ισορροπία στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων εντός και εκτός της μεμβράνης. Τα κλάσματα που περιείχαν τη BC2929, τοποθετήθηκαν εντός μιας ημιπερατής μεμβράνης με πόρους μεγέθους 6-8 kDa και χωρητικότητα 5 ml/cm, η οποία τοποθετείται σε *Dialysis buffer* 2L: 25mM Tris/HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, με σκοπό να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο από το περιβάλλον της πρωτεΐνης ώστε αυτή να αξιοποιηθεί σε επόμενο στάδιο καθαρισμού. Η διαδικασία πραγματοποιείται με ολονύκτια ήπια ανάδευση, σε ψυχόμενο περιβάλλον.

Μετά την ολονύκτια διαπίδυση το πρωτεϊνικό δείγμα συγκεντρώθηκε σε ειδικό falcon με μεμβράνη πόρων (Amicon ultra 15 ml Centrifugal filters Ultracel, cut-off 10kDa) με συνεχείς φυγοκεντρώσεις στους 4°C, στις 3.100 rpm για κυμαινόμενο χρόνο, στη φυγόκεντρο Kubota, μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Μετά από κάθε φυγοκέντρωση το διάλυμα της πρωτεΐνης που διαπερνούσε τους πόρους του Amicon ultra 15 (flowthrough) και θεωρητικά περιείχε μόνο το *Dialysis buffer*, αποθηκευόταν ξεχωριστά και ελεγχόταν για τυχόν απώλεια πρωτεΐνης.

2.16. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης έγινε με μέτρηση οπτικής απορρόφησης στο φωτόμετρο Nanodrop, που στηρίζεται στην απορρόφηση του υπεριώδους φωτός. Οι πρωτεΐνες απορροφούν φως σε δύο περιοχές του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας, κυρίως στα 280 και 200nm. Η απορρόφηση οφείλεται στην πρόσληψη ενός φωτονίου από ένα ηλεκτρόνιο και έτσι τα ηλεκτρόνια που διεγείρονται στα 280 nm εντοπίζονται στους αρωματικούς δακτυλίους των αμινοξέων που τους φέρουν (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και τυροσίνη).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε το NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, το οποίο μετράει απορρόφηση φάσματος 220-750 nm για δείγματα όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες και χρωστικές. Ο προσδιορισμός έγινε βάσει των παραμέτρων που είναι ειδικά για την πρωτεΐνη BC2929, όπως αυτά καθορίστηκαν από το πρόγραμμα ExPASy με βάση την πεπτιδική της αλληλουχία, δηλαδή μοριακό βάρος (27,79 kDa) και molar extinction coefficient ($38,39 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Για τη μέτρηση απαιτείται ελάχιστη ποσότητα δείγματος, της τάξης των 2 μl που συγκρατείται μέσω επιφανειακής τάσης και συμπιέζεται ελαφρώς από το βραχίονα και τη βάση του μηχανήματος. Επιτυγχάνεται έτσι η επιθυμητή

απόσταση του 1mm για τη μέτρηση, με βάση την οποία γίνεται και η αντίστοιχη ποσοτικοποίηση του δείγματος.

2.17. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM)

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από ένα νήμα βολφραμίου, που πυρακτώνεται κατά τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος, εκπέμποντας τελικά ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται χάρη στην εφαρμογή μιας διαφοράς δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV), μεταξύ του νήματος (κάθοδος) και της ανόδου. Οι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί διαπερνώνται από ηλεκτρικό ρεύμα και έτσι αλλάζοντας την ένταση αυτού του ρεύματος (εστιακή απόσταση), είναι δυνατή η ρύθμιση της πορείας των ηλεκτρονίων και κατ'επέκταση ο εστιασμός της δέσμης ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα. Τα ηλεκτρόνια διαπερνούν το παρασκεύασμα και διεγείρουν τη φθορίζουσα ουσία που επικαλύπτει την οθόνη, στην οποία γίνεται η παρατήρηση της εικόνας. Τα σημεία του παρασκευάσματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια, δίνουν σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιακά πυκνές) ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή) δίνουν φωτεινές περιοχές. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην εκλεκτική «χρώση» του παρασκευάσματος. Ωστόσο, για να μπορέσει να παρατηρηθεί ένα παρασκεύασμα με TEM, θα πρέπει να: α) αντέχει σε υψηλό κενό, β) να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, γ) να είναι αρκετά λεπτό ώστε να είναι διαπερατό από τα ηλεκτρόνια και δ) να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων. Έτσι, μπορούν να παρατηρηθούν μόνο μονιμοποιημένα δείγματα, αφυδατωμένα, κομμένα σε πολύ λεπτές τομές (πάχους 50-100 nm) και «χρωματισμένα» με χρωστικές που περιέχουν βαριά μέταλλα.

Για την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης BC2929 στην επιφάνεια του υμενίου TiO_2 , χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα πλακίδια με πυρακτωμένα υμένια TiO_2 , τα οποία κόβονται ώστε οι διαστάσεις του υμενίου να είναι 1x1 cm. Στη συνέχεια βυθίζονται σε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα διαλύοντας μια ποσότητα αποξηραμένης BC2929, σε ένα φυαλίδιο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS buffer, pH 7).

2.18. Χρωματογραφία διαπερατότητας (gel filtration Sephacryl S200)

Κατά την χρωματογραφία διαπερατότητας το ένζυμο δεν αλληλεπιδρά με το χρωματογραφικό υλικό της στήλης που αποτελείται από πορώδη σφαιρίδια αλλά ο διαχωρισμός γίνεται βάσει του μοριακού του βάρους. Μόρια μεγάλου μοριακού βάρους διατρέχουν τη στήλη μεταξύ των σφαιριδίων και εκλούνται πρώτα, ενώ μόρια μικρού μοριακού βάρους εισέρχονται στους πόρους των σφαιριδίων με αποτέλεσμα να διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή και έτσι να εκλούνται αργότερα. Ο χρόνος έκλουσης λοιπόν του ενζύμου εξαρτάται από το μοριακό του βάρος. Τα σφαιρίδια μπορεί να φέρουν πόρους διαφορετικών διαμέτρων που επιτρέπουν πιο εκτενή διαχωρισμό του πρωτεϊνικού δείγματος που φορτώθηκε στην κολώνα. Τελικά, στο χρωματογράφημα απεικονίζονται κορυφές

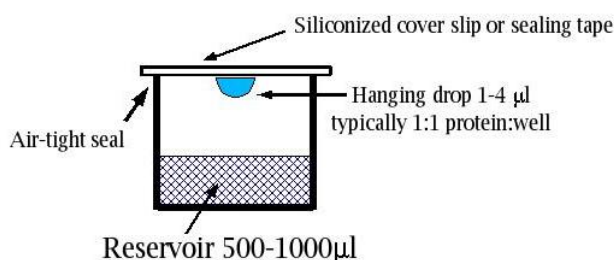
απορρόφησης ανάλογα με το είδος του μορίου, συνεπώς εφόσον μιλάμε για πρωτεΐνες η απορρόφηση βγαίνει στα 280 nm. Παράλληλα, η μέθοδος χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί η κατάσταση πολυμερισμού της πρωτεΐνης, με τον αριθμό των κορυφών που προκύπτουν στο χρωματογράφημα να υποδηλώνει τον αριθμό των πρωτεϊνών ή των πρωτεϊνικών υπομονάδων του μορίου, τα οποία εκκλύονται. Η στήλη gel filtration Sephacryl S200 του εργαστηρίου, έχει καλιμπραριστεί φορτώνοντας πρωτεϊνικούς μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή και έτσι να συμπεραίνεται ο βαθμός πολυμερισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης. Πριν να φορτωθεί στην κολώνα το εκάστοτε δείγμα, απαιτείται συμπύκνωσή του σε όγκο 2ml και έχει προηγηθεί εξισορρόπηση κολώνας με 1 όγκο κολώνας με *gel filtration buffer*: 25 mM Tris/HCl pH 7.6, 200 mM NaCl. Το εκλούόμενο διάλυμα διαχωρίζεται σε κλάσμα των 5ml, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5%.

Στη gel filtration που πραγματοποιήθηκε βρέθηκαν τρεις πληθυσμοί (μια κορυφή που αντιστοιχεί σε μεγαλομοριακό πληθυσμό, μια δεύτερη κορυφή που υπερισχύει και μια τρίτη κορυφή που αντιστοιχεί σε ένα μάλλον μονομερή πληθυσμό). Δόθηκαν 50 μl από το καθένα για έλεγχο ενεργότητας (αραιά και πυκνά δείγματα μετά από συμπύκνωση) και το υπόλοιπο μέρος (της δεύτερης και τρίτης κορυφής και όχι του μεγαλομοριακού που περιέχει και όποιες τσαπερόνες είχαν μείνει) στάλθηκε για ανάλυση μέσω CD στις εγκαταστάσεις του SOLEIL (Παρίσι). Η διαθέσιμη ποσότητα ήταν πολύ μικρή (350 μl για τη δεύτερη κορυφή και 150 μl για την τρίτη κορυφή) και τα δείγματα κάπως θολά (παρά τη φυγοκέντρηση) για να δοκιμαστούν κρυσταλλώσεις.

2.19. Κρυσταλλώσεις

Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής πρωτεϊνικών μορίων είναι εφικτός μέσω της κρυσταλλογραφίας με τη χρήση ακτίνων X. Ο κρύσταλλος προκύπτει από την περιοδική διάταξη πρωτεϊνών στο χώρο, με την επαναλαμβανόμενη μονάδα που σχηματίζει τον κρύσταλλο να ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα, η οποία μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα μόρια πρωτεΐνης. Δέσμη ακτίνων X προσπίπτει πάνω στον κρύσταλλο και το μεγαλύτερο μέρος της τον διαπερνά ενώ ένα μέρος αυτής αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια του μορίου της πρωτεΐνης και περιθλάται με τις περιθλωμένες αυτές ακτίνες να ανιχνεύονται από ηλεκτρονικούς ανιχνευτές που καταγράφουν το περιθλασίγραμμα. Η εξαγωγή της πληροφορίας από τα πειράματα περίθλασης ακτίνων X οδηγεί στο σχηματισμό του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ασύμμετρης περιοχής της στοιχειώδους κυψελίδας. Η ποιότητα του χάρτη εξαρτάται από την διακριτικότητα (resolution) των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν, η οποία με την σειρά της εξαρτάται από την τακτική οργάνωση των πρωτεϊνών στο χώρο. Για τον σχηματισμό κρυστάλλων είναι απαραίτητη η ρύθμιση συνθηκών όπως το pH, η θερμοκρασία, η πρωτεϊνική συγκέντρωση, η φύση του διαλύτη και του κατακρημνιστή καθώς και η παρουσία πρόσθετων ιόντων ή προσδεμάτων (υπόστρωμα). Το πρωτεϊνικό διάλυμα θα πρέπει να είναι πολύ υψηλής καθαρότητας, ομοιογένειας και σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης.

Η πιο συχνή διαδικασία για την παραγωγή πρωτεϊνικών κρυστάλλων είναι η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας. Η σταγόνα πρωτεϊνικού διαλύματος έρχεται σταδιακά σε κατάσταση υπερκορεσμού μέσω της απώλειας νερού – από τη σταγόνα προς μια μεγαλύτερη δεξαμενή – η οποία περιέχει διάλυμα άλατος ή πολυαιθυλενογλυκόλης. Κατά τη μέθοδο αυτή μια σταγόνα πρωτεϊνικού διαλύματος, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και κατακρημνιστή, τοποθετούνται σε μια γυάλινη καλυπτρίδα που τοποθετείται ανάποδα και σφραγίζεται αεροστεγώς πάνω από μια μικρή δεξαμενή. Η εξάτμιση του νερού από την σταγόνα προς τη δεξαμενή και η επικείμενη αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στη σταγόνα, μέχρι το σημείο κορεσμού της, έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό κρυστάλλων καθώς τα μόρια της πρωτεΐνης δεν μπορούν να παραμείνουν σε διαλυτή μορφή.



Εικόνα 14: Διάταξη πηγαδιού και διαλυμάτων για την μέθοδο κρυστάλλωσης της κρεμαστής σταγόνας

Οι συνθήκες των κρυσταλώσεων που δοκιμάστηκαν για δείγματα που αποκτήθηκαν μετά από χρωματογραφική στήλη Ni-NTA και διαπίδυση, βασίζονται σε έτοιμα screens ποικίλων συνθηκών (Jena Bioscience και Hampton Research). Θεωρητικά, αν σε κάποια συνθήκη παρατηρηθούν έστω και πολύ μικροί κρύσταλλοι ή προοπτική δημιουργίας κρυστάλλων («καλό» ίζημα), αυτή η συνθήκη μπορεί να τροποποιηθεί μερικώς ώστε να βελτιωθεί το αποτέλεσμα. Δοκιμάστηκαν τα εξής: *Structure Screen 1 (1-48)*, *Structure Screen 2 (1-48)*, *Grid Screen MPD*, *Grid Screen PEG-6000*, *Grid Screen Ammonium Sulfate*, *JB Screen Classic 3*, *JB Screen Classic 6*, *JB Screen 7*, *JB Screen 8*.

2.20. Μελέτη με κυκλικό διχρωϊσμός (CD) και Multi-angle light scattering analysis (MALS)

Ο κυκλικός διχρωϊσμός είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην αλληλεπίδραση μιας κυκλικά πολωμένης ακτινοβολίας με ένα οπτικά ενεργό δείγμα που απορροφά ακτινοβολία. Αυτή η οπτικά ενεργή ουσία απορροφά διαφορετικά τη δεξιά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία από την αριστερά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία και λόγω αυτής της άνισης απορρόφησης των δύο συνιστώντων διανισμάτων, το συνιστάμενο διάνυσμα εμφανίζεται ως ελλειπτικά

πολωμένο (ιχνογραφεί μια έλλειψη). Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού καταγράφουν τη διαφορά απορρόφησης της δεξιάς και της αριστερά πολωμένης ακτινοβολίας ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Η μέτρηση πραγματοποιείται σε ένα φασματοπωλοσίμετρο και οι χημικές ομάδες που είναι απαραίτητες για την εμφάνιση σήματος CD είναι οι πεπτιδικοί δεσμοί (180-250 nm), τα αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές ομάδες (260-320 nm) και οι δισουλφιδικοί δεσμοί (260 nm). Σημαντικό ρόλο παίζει η σύσταση του διαλύτη (buffer) της πρωτεΐνης, καθώς κάποιες ενώσεις επηρεάζουν την απορρόφηση και βγάζουν τη μέτρηση μη έγκυρη λόγω υπερβολικού θορύβου. Με τον κυκλικό διχρωϊσμό μπορούν να διερευνηθούν προβλήματα που αφορούν: α) στοιχεία δευτεροταγούς δομής, β) αλλαγές στη διαμόρφωση που οφείλονται σε μεταβολές pH, θερμοκρασίας, πρόσδεσης υποκαταστατών, μεταλλάξεις, γ) σταθερότητα στην επίδραση αποδιατακτικών παραγόντων/ θερμοκρασίας, δ) μηχανισμός πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και ε) μεμβρανικές πρωτεΐνες. Στην περίπτωση της BC2929 δείγμα από το δεύτερο peak είχε αποσταλεί για μέτρηση μέσω κυκλικού διχρωϊσμού, στις εγκαταστάσεις του Synchrotron Soleil, στο Παρίσι, από τη Dr. Φαδούλογλου Β. και την υποψήφια διδάκτορα Κεφαλά Κ. Σκοπός ήταν να γίνει ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής (α-έλικα, β-πτυχωτή επιφάνεια, τυχαίο σπείραμα (random coil)) καθώς και να μελετηθεί η σταθερότητά της, υπό την επίδραση της θερμοκρασίας.

Η Multi-angle light scattering analysis (MALS) περιγράφει μια τεχνική για τη μέτρηση του φωτός που σκεδάζεται από ένα δείγμα σε μια πληθώρα γωνιών. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό τόσο της απόλυτης μοριακής μάζας όσο και του μέσου μεγέθους των μορίων σε διάλυμα, ανιχνεύοντας τον τρόπο που σκεδάζουν το φως. Σε ένα τυπικό πείραμα σκέδασης φωτός, χρησιμοποιείται μία καλά ευθυγραμμισμένη, απλής συχνότητας, δέσμη πολωμένου φωτός (π.χ., από λέιζερ) για να φωτίσει ένα διάλυμα που περιέχει ένα εναιώρημα των μακρομορίων ή νανοσωματιδίων ενδιαφέροντος. Το ηλεκτρικό πεδίο της δέσμης πολωμένου φωτός παράγεται κατά προτίμηση κάθετα προς το επίπεδο στο οποίο πρόκειται να μετρηθεί η ένταση και η γωνιακή εξάρτηση του μεταγενέστερου σκεδασμένου φωτός (κατά σύμβαση, η κατεύθυνση πόλωσης υποδηλώνεται «κάθετη» και το επίπεδο μέτρησης «οριζόντιο»). Η συνολική ένταση φέρει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα, ενώ η γωνιακή εξάρτηση στο οριζόντιο επίπεδο φέρει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του μακρομορίου. Όταν υπάρχουν πολλά μακρομόρια στο διάλυμα, κάθε μακρομόριο διασκορπίζει το φως μέσω του επαγόμενου διπολικού μηχανισμού. Ως εκ τούτου, η ένταση του διάσπαρτου φωτός είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των μακρομορίων στο διάλυμα.

Δείγμα από τη BC2929 που προέκυψε από τον καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες δόθηκε για ανάλυση MALS, από τον ειδικό τεχνικό επιστήμονα, κύριο Ποζίδη Χ. (I.T.E).

2.21. Προετοιμασία δείγματος για ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η τεχνική MS παρέχει πληροφορίες σχετικά με: α) τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος, β) τη δομή ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων, γ) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων, δ) τη δομή και τη σύσταση επιφανειών και ε) την αναλογία

ισότοπων στοιχείων. Η προετοιμασία της αποδιατακτικής πηκτής 12.5% πολυακρυλαμίδης χωρίς κερατίνες είναι όμοια με την κανονική διαδικασία προετοιμασίας της αποδιατακτικής πηκτής αλλά με την χρήση H₂O χωρίς κερατίνες και την εφαρμογή συνθηκών ώστε να αποφευχθεί η επαφή όλων των αντικειμένων και αντιδραστηρίων με δέρμα, τρίχες/μαλλιά, που φέρουν κερατίνες καθώς και επιφάνειες και αντικείμενο που δεν είναι επαρκώς καθαρά. Αυτό συμβαίνει διότι οι κερατίνες επηρεάζουν τη μέτρηση.

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο για την μονιμοποίηση και χρώση της πηκτής.

Blue Silver Χρώση

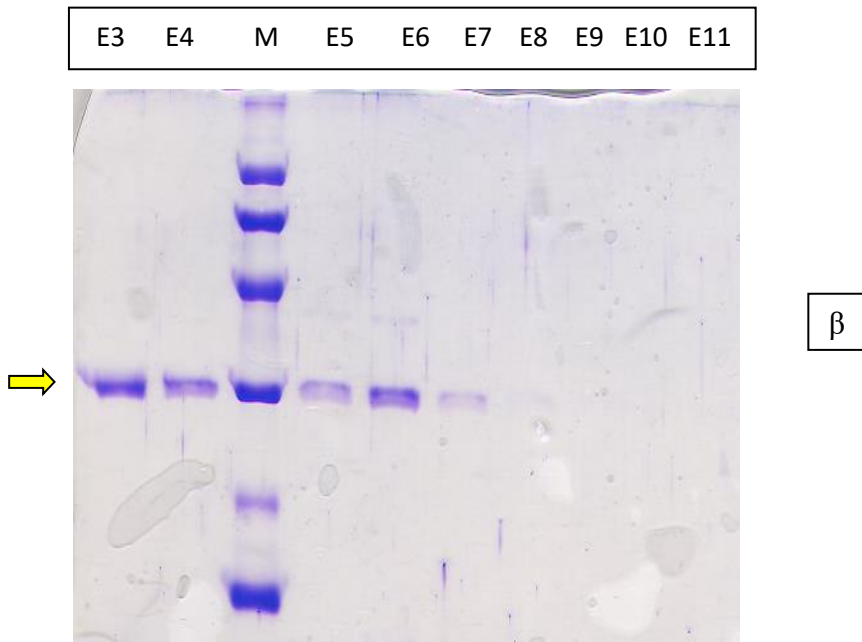
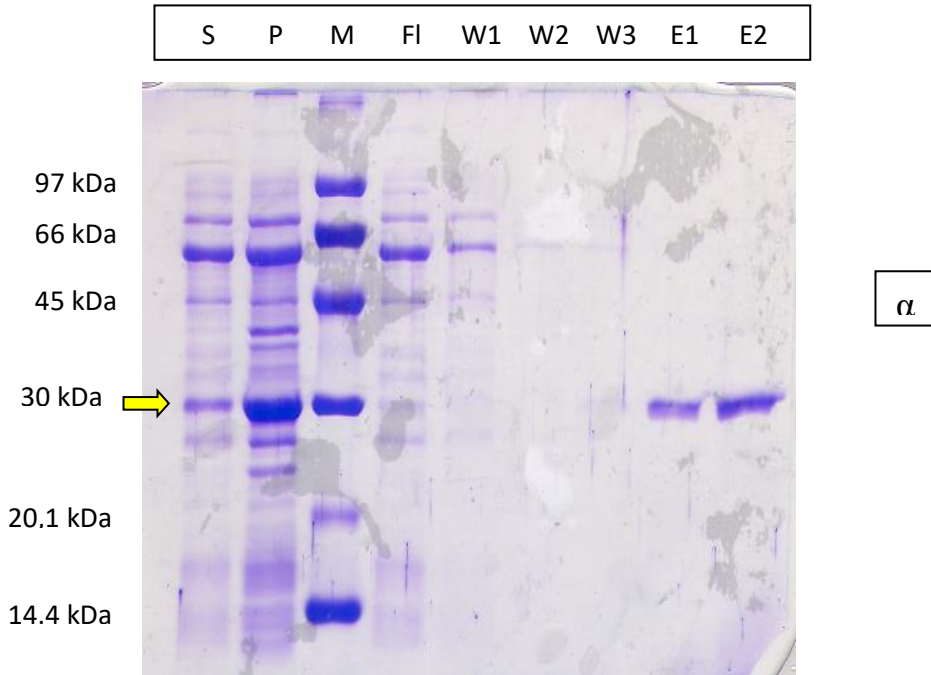
- Μονιμοποίηση: 30% μεθανόλη + 10% οξικό οξύ για 1 ώρα πλύσεις 4 x 15 λεπτά με H₂O χωρίς κερατίνες
- Χρώση: 20% μεθανόλη + 10% φωσφορικό οξύ + 10% θειικό αμμώνιο + 0.12% χρωστική (Coomassie Blue G-250) και O/N ανακίνηση τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο
- Αποχρωματισμός: πλύσεις 3-4 x 15 λεπτά με H₂O χωρίς κερατίνες

Ακολουθεί το διήμερο πρωτόκολλο πέψης των πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή μετά τη χρώση με Coomassie Blue Silver. Την 1^η ημέρα το πρωτόκολλο περιλαμβάνει συνοπτικά: α) το κόψιμο με νυστέρι της μπάντας ενδιαφέροντος σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία τοποθετούνται σε erppendorf στο οποίο προστίθεται 50% ACN και 50mM ABS, μέχρις ότου επιτευχθεί πλήρης αποχρωματισμός των κομματιών, β) την προσθήκη θρυψίνη-ABS στο erppendorf και επώαση O/N στους 37°C υπό ανάδευση ώστε να πραγματοποιηθεί η πέψη. Τη 2^η ημέρα το πρωτόκολλο περιλαμβάνει: α) μεταφορά του υπερκείμενου από την αντίδραση πέψης σε νέα erppendorf LowBind, β) προσθήκη H₂O, 50% ACN και 0.1% TFA/50% ACN διαδοχικά και μεταφορά μετά από κάθε προσθήκη και ανακίνηση του υπερκείμενου στα LowBind. Τα LowBind μπήκαν στο Speedvac μέχρι να εξατμιστεί το νερό και αποθηκεύτηκαν σε ψυχόμενο περιβάλλον μέχρι τη στιγμή που θα αναλυθούν στο φασματόμετρο.

Δείγμα από το Elution 4 με τη μεγαλύτερη ποσότητα της C-truncated BC2929, το οποίο προέκυψε από καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία ουρίας, τρέχθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12,5% χωρίς κερατίνες. Αυτό δόθηκε για ταυτοποίηση της άγνωστης μπάντας που συνόδευε την C-truncated μορφή της πρωτεΐνης BC2929 μέσω της τεχνικής της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας (tandem mass spectrometry, MS/MS). Η ανάλυση των δεδομένων φασματομετρίας μάζας του δείγματος πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις Πρωτεομικής του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας από τον Dr. M. Aivaliotis.

3. Αποτελέσματα

3.1. Καθαρισμός της BC2929 με χρωματογραφία συγγένειας (κολώνα Ni-NTA agarose) παρουσία τσαπερονών (I)



Εικόνα 15 (α,β) : Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) από κολώνα Ni-NTA αραρόζης.

S (Sample): δείγμα-υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα μετά τη φυγοκέντρηση

P (Pellet): δείγμα από επαναδιαλυμένη πελέτα (μετά τη φυγοκέντρηση) σε ανάλογο όγκο Lysis buffer (100 ml)

M (Marker): πρωτεϊνικός μάρτυρας (Amersham Biosciences)

Fl (Flowthrough): δείγμα από το διάλυμα που συλλέχθηκε μετά το πέρασμα του Sample

W1-W3 (Washes): δείγμα από τα διαλύματα των πλύσεων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

E1-E11 (Elutions): δείγμα από τα διαλύματα έκλυσης που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

Το βελάκι αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της BC2929, στα 27.787 Da

Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας που εμφάνιζε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη BC229, κατά το μετασχηματισμό, πέρα από το πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της BC2929, χρησιμοποιήθηκε και ένας δεύτερος πλασμιδιακός φορέας που φέρει 5 τσαπερόνες, οι οποίες θεωρητικά θα βοηθούσαν στη σωστή αναδίπλωσή της. Έτσι, θα παίρναμε πιο διαλυτή και άρα και περισσότερη πρωτεΐνη. Στην **Εικόνα 15 (α,β)** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του καθαρισμού της BC2929 (παρουσία τσαπερονών) μετά από κολώνα Ni-NTA agarose, όπου τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12,5%). Αρχικά παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης (στα 28 kDa περίπου) εντοπίζεται στην πελέτα (P), που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων μέσω υπερήχων. Αυτή η κατακρήμνιση ως ίζημα οφείλεται σε aggregation. Η πρωτεΐνη που φέρει το *6xHis-tag* στο C-τελικό άκρο, παρουσιάζει ικανοποιητική συγγένεια για το χρωματογραφικό υλικό, μιας και παραμένει προσδεσμένη στα ιόντα Ni²⁺, μέχρι να εκλουστεί. Ελάχιστη ποσότητα φαίνεται να μην προσδέεται στα ιόντα Ni²⁺ και να απομακρύνεται στο Flowthrough (Fl), ενώ δεν υπάρχουν απώλειες κατά το πέρασμα των διαλυμάτων πλύσης (Wash 1-Wash 3). Βέλτιστη έκλυση παρατηρείται μεταξύ των διαλυμάτων έκλυσης 1-3 (Elutions 1-3) στα 100-200 mM Ιμιδαζολίου. Συγκεκριμένα, η έκλυση ξεκινά στα 100 mM Ιμιδαζολίου από το διάλυμα έκλυσης 1 (Elution 1), αυξάνεται στο διάλυμα έκλυσης 2 (Elution 2), επίσης στα 100 mM Ιμιδαζολίου, και από το διάλυμα έκλυσης 3 (Elution 3) στα 200 mM Ιμιδαζολίου (όπου βέβαια είναι ακόμα έντονη η έκλυση) αρχίζει και μειώνεται σταδιακά στα διαλύματα 4 (200 mM Ιμιδαζολίου) και 5 (500 mM Ιμιδαζολίου) (Elution 4-5). Εντούτοις, αν και θα περιμένε κανείς να μειωνόταν ακόμα περισσότερο η έκλυση στα διαλύματα έκλυσης που ακολουθούν, σημειώνεται εκ νέου μια μικρή αύξηση στο διάλυμα έκλυσης 6 (Elution 6), στα 500 mM Ιμιδαζολίου, που ακολουθείται από μείωση στο διάλυμα έκλυσης 7 (Elution 7), επίσης στα 500 mM Ιμιδαζολίου. Το γεγονός θεωρήθηκε αρχικά τυχαίο. Έπειτα, στα επόμενα διαλύματα έκλυσης (8-11) δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη στο gel. Τέλος, αν και αρχικά στο Sample εμφανίζονται μπάντες που αντιστοιχούν σε όλες τις τσαπερόνες του πλασμιδιακού φορέα pG-KJE8: DNA K (70 kDa), GroEL (60 kDa), DNA J (40 kDa), GrpE (22 kDa) και GroES (10 kDa), στην πορεία, πέρα από τα Elutions 5 και 6, όπου αγνοφάινεται μια μπάντα που

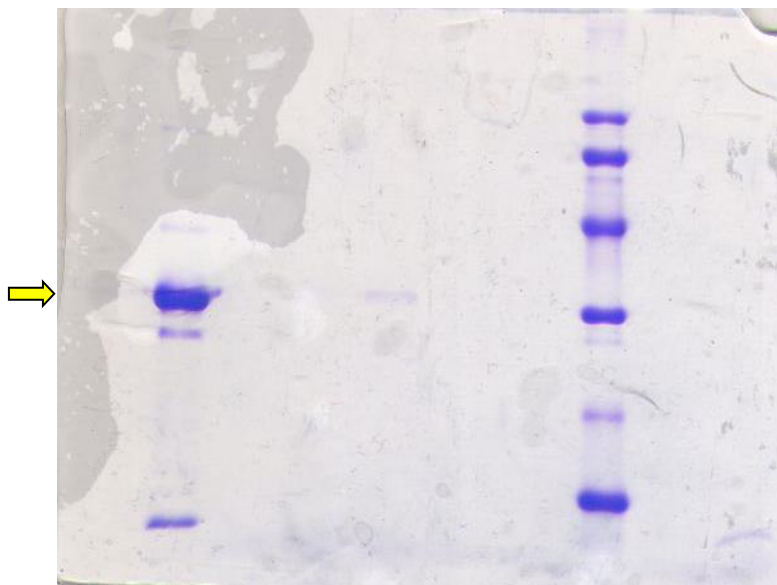
μάλλον αντιστοιχεί στην DNAJ, οι υπόλοιπες χάνονται (στο Wash 1 και στο Flowthrough διακρίνονται μπάντες που αντιστοιχούν στη DNA K, GroEL, GpE ενώ στα Washes 2 και 3 διακρίνεται μια μπάντα που αντιστοιχεί μάλλον στη GroEL). Αυτό σημαίνει ότι μάλλον καθαρίστηκε καλά η πρωτεΐνη.

Με βάση το gel, επιλέγονται τα Elutions 1-7, παρόλο στα διαλύματα 5 και 6 διακρίνονται και άλλες 2 αγνές μπάντες και έτσι δεν έχουμε τελείως καθαρό (μόνο με την πρωτεΐνη μας) δείγμα. Αυτό συμβαίνει γιατί δε φαίνεται να έχουμε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης και χρειαζόμαστε όλη την ποσότητα. Τα elutions ενώθηκαν και ακολούθησε dialysis και συμπύκνωση μέχρι τα 2ml όπου συνήθως εμφανίζονταν τα ινίδια, ορατά με γυμνό μάτι στο υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα. Η κύρια ποσότητα (2 ml) του πρωτεϊνικού υδατικού διαλύματος φορτώθηκε στη συνέχεια στη στήλη gel filtration *Sephacryl S200*, ως ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού και διαχωρισμού τυχόν πληθυσμών.

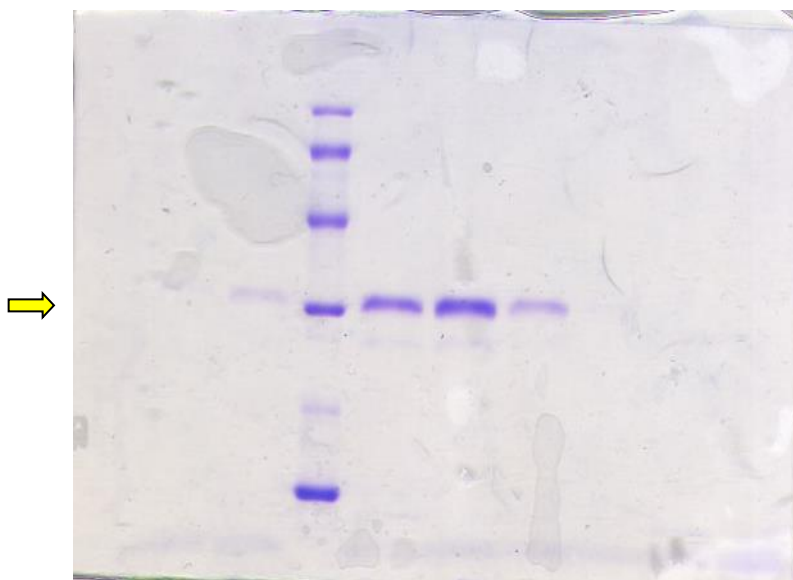
3.2. Διαχωρισμός της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration *Sephacryl S200*)

Με βάση τις κορυφές (peaks) στο χρωματογράφημα που προέκυψε μετά την καλιμπραρισμένη gel filtration, είναι πιθανόν να εμφανίζονται τρεις πληθυσμοί: στο πρώτο peak (α') βγαίνει το Void (νεκρός όγκος) που περιλαμβάνει όλους τους μεγαλομοριακούς πληθυσμούς και τα πολυμερή, στο δεύτερο peak (β') βγαίνει ένας άλλος ολιγομερής πληθυσμός και στο τρίτο peak (γ') βγαίνει ένας μικρότερος πληθυσμός. Συλλέγονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτών των πληθυσμών, δηλαδή για το α' peak τα κλάσματα 22-26, για το β' peak τα κλάσματα 33-38 και για το γ' peak τα κλάσματα 39-42. Δείγματα από αυτά τα κλάσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5%.

S 22 23 24 25 26 M 39 40



33 34 M 35 36 37 38 41 42



Εικόνα 16 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) από κολώνα gel filtration Sephacryl S200.

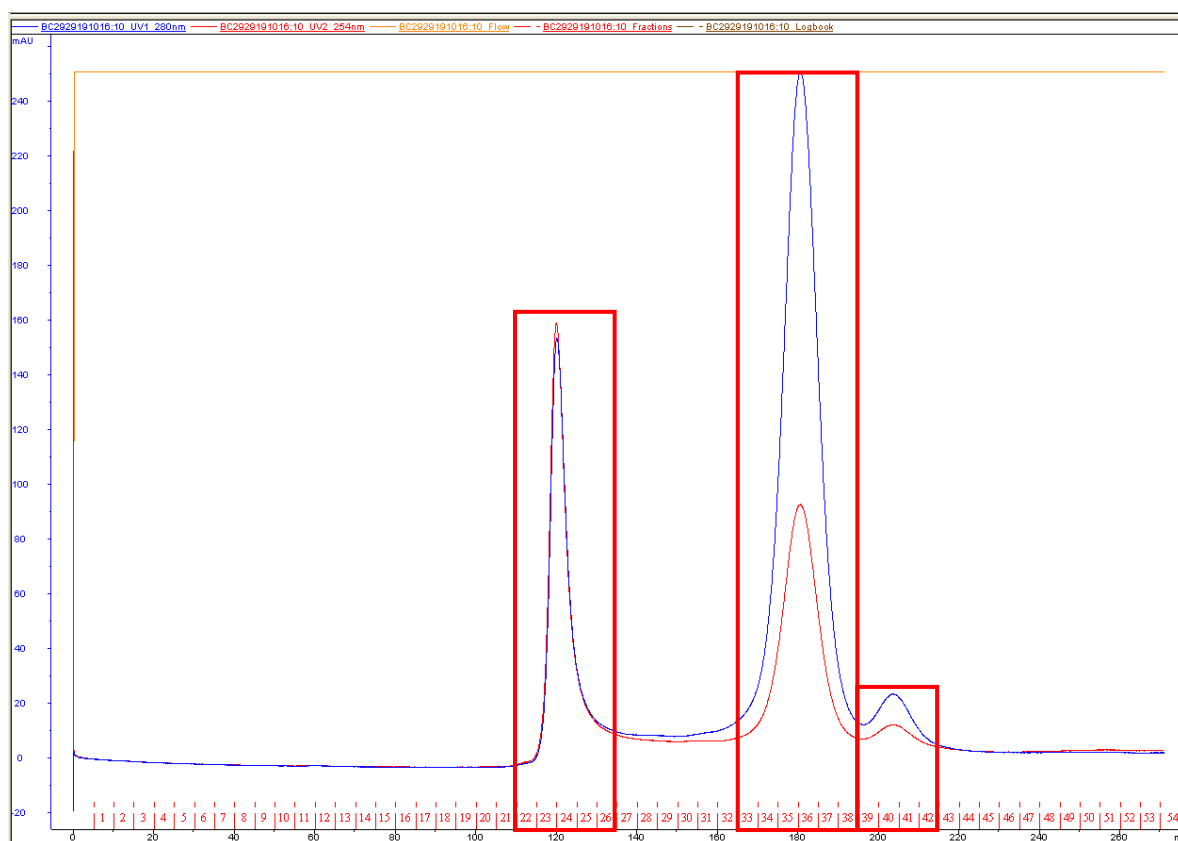
S (Sample): πρωτεϊνικό υδατικό διάλυμα που συμπυκνώθηκε στα 2 ml

M (Marker): πρωτεϊνικός μάρτυρας (Amersham Biosciences)

Τα κλάσματα 22-26 αντιστοιχούν στο α' peak ή Void (πολυμερή, μεγαλομοριακές ενώσεις), τα κλάσματα 33-38 αντιστοιχούν στο β' peak και τα κλάσματα 39-42 αντιστοιχούν στο γ' peak

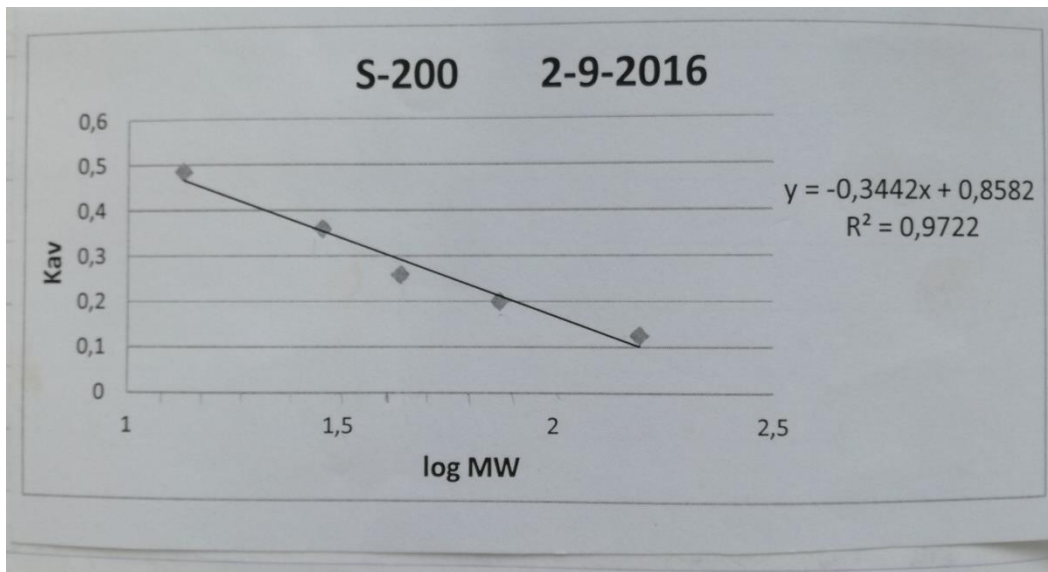
Το βελάκι αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της BC2929, στα 27.787 Da

Στις **Εικόνες 16 (α,β)** που προέκυψαν μετά από ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5%, του πρωτεϊνικού υδατικού διαλύματος που αποκτήθηκε μετά από dialysis, συμπίκνωση και gel filtration, παρατηρείται ότι πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στα κλάσματα 33 (αχνοφαινόταν η μπάντα στο gel αλλά δε φαίνεται στην Εικόνα), 34 (όπου αχνοφαιίνεται η μπάντα στην Εικόνα) καθώς και 35-37, που αντιστοιχούν στο β' peak, όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα (**Εικόνα 16 γ**). Επίσης αχνοφαιίνεται μια μπάντα που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη στο κλάσμα 24 του Void. Στα κλάσματα 35 και 36, διακρίνεται αμυδρά και μια μπάντα που αντιστοιχεί μάλλον στην τσαπερόνη GrpE. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι στο δείγμα που φορτώθηκε στην αρχή (Sample), εμφανίζονται δύο μπάντες που δε φαίνεται να υπήρχαν μετά τον καθαρισμό από την κολώνα Ni-NTA, που πιθανώς να αντιστοιχούν είτε σε πρωτεόλυση είτε σε τσαπερόνες. Το πιο πιθανό βέβαια είναι να οφείλονται σε πολύ χαμηλό επίπεδο πρωτεόλυσης.



Εικόνα 16 (γ): Το χρωματογράφημα που προέκυψε μετά τη gel filtration για την ολόκληρη BC2929 (παρουσία τσαπερονών). Σημειώνονται: τα κλάσματα 22-26 που αντιστοιχούν στο α' peak ή Void (πολυμερή, μεγαλομοριακές ενώσεις), τα κλάσματα 33-38 αντιστοιχούν στο β' peak και τα κλάσματα 39-42 αντιστοιχούν στο γ' peak.

Η κολώνα για τη gel filtration είναι βαθμονομημένη και έτσι μπορούν να υπολογιστούν και τα μοριακά βάρη που αντιστοιχούν στις κορυφές του χρωματογραφήματος.



Με βάση τον τύπο: $K_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_c - V_o}$, όπου V_E : ο όγκος που αντιστοιχεί στην εκάστοτε κορυφή του χρωματογραφήματος, V_o : ο όγκος που αντιστοιχεί στο Void της στήλης και V_c : ο όγκος που αντιστοιχεί στο συνολικό όγκο της κολώνας (total bed volume)

και την εξίσωση $y = -0,3442x + 0,8582$ που προκύπτει από το διάγραμμα, εκτός από την πρώτη κορυφή που δε μπορεί να υπολογιστεί γιατί ξεπερνά το διαχωριστικό όριο της κολώνας, για τις άλλες δύο κορυφές ισχύει:

$$\beta' \text{ peak: } K_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_c - V_o} = \frac{180,4 - 121,2}{314,1 - 121,2} = 0,307 \text{ και}$$

$$y = -0,3442x + 0,8582 \quad 0,307 = -0,3442x + 0,8582 \quad x \Rightarrow 1,601 = \log MW \quad \rightarrow$$

$$MW = 39,902 \text{ kDa}$$

$$\gamma' \text{ peak: } K_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_c - V_o} = \frac{203,5 - 121,2}{314,1 - 121,2} = 0,427 \text{ και}$$

$$y = -0,3442x + 0,8582 \quad 0,427 = -0,3442x + 0,8582 \quad x \Rightarrow 1,253 = \log MW \quad \rightarrow$$

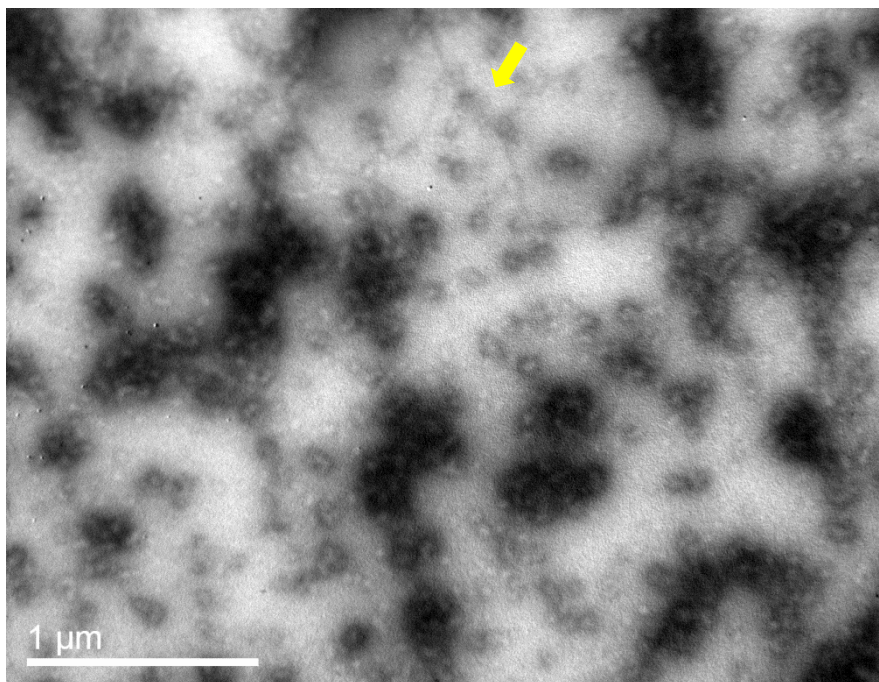
$$MW = 17,91 \text{ kDa}$$

Η πρωτεΐνη δηλαδή, όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα (**Εικόνα 16 γ**) υφίσταται σε διαφορετικούς πληθυσμούς λόγω διαφορετικών καταστάσεων ολιγομερισμού και δε μπορούμε να πούμε σε ποια κατάσταση (μονομερή, διμερή κλπ) βρίσκεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Τελικά, συλλέχθηκαν τα κλάσματα 33-37 για το β' peak και τα 39-42 για το γ' peak, ενοποιήθηκαν ξεχωριστά και μετρήθηκε η συγκέντρωση των διαλυμάτων στο Nanodrop. Βρέθηκε 0.04 mg/ml (περίπου 25 ml) για το β' peak και 0.01 mg/ml (περίπου 20 ml) για το γ' peak. Έπειτα, δόθηκαν 50 μ l από το καθένα (αραιά δείγματα), για έλεγχο ενεργότητας απακετυλάσης (activity assay). Η συγκέντρωση του τελευταίου πληθυσμού δε μετρήθηκε για ευνόητους λόγους. Στη συνέχεια, τα διαλύματα συμπυκνώθηκαν ξεχωριστά, έως ότου να

φτάσουν συγκέντρωση 4.13 mg/ml (400 μ l) και 0.41 mg/ml (200 μ l) αντίστοιχα, ενώ το διάλυμα με το μεγαλομοριακό πληθυσμό συμπυκνώθηκε μέχρι τα 0,5 ml (ενδεικτική συγκέντρωση 0.48 mg/ml).

3.3. Παρατήρηση των συσσωματωμάτων της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) μέσω της μικροσκοπίας TEM



Εικόνα 17: Παρατήρηση των συσσωματωμάτων της ολόκληρης BC2929 (παρουσία τσαπερονών) μέσω TEM. Με το βέλος απεικονίζονται οι πιθανές δομές ινιδίων.

Στην **Εικόνα 17** φαίνονται τα συσσωματώματα μέσα στα οποία διακρίνονται πιθανές δομές ινιδίων που απεικονίζονται ως γραμμικές συστοιχίες από σφαίρες, που μοιάζουν με «χάντρες κομπολογιού».

Στο δείγμα που δόθηκε για παρατήρηση μέσω TEM πριν να θολώσει το διάλυμα, παρατηρήθηκαν κάποια πολύ μικρά συσσωματώματα (aggregates) αλλά ουσιαστικά στο δείγμα που προερχόταν από την πελέτα (μετά τη φυγοκέντρωση που πραγματοποιήθηκε όταν θόλωσε το δείγμα) παρατηρήθηκαν κάποιες δομές που έμοιαζαν με ινίδια.

3.4. Μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας απακετυλάσης των πληθυσμών της BC2929 (Activity assay)

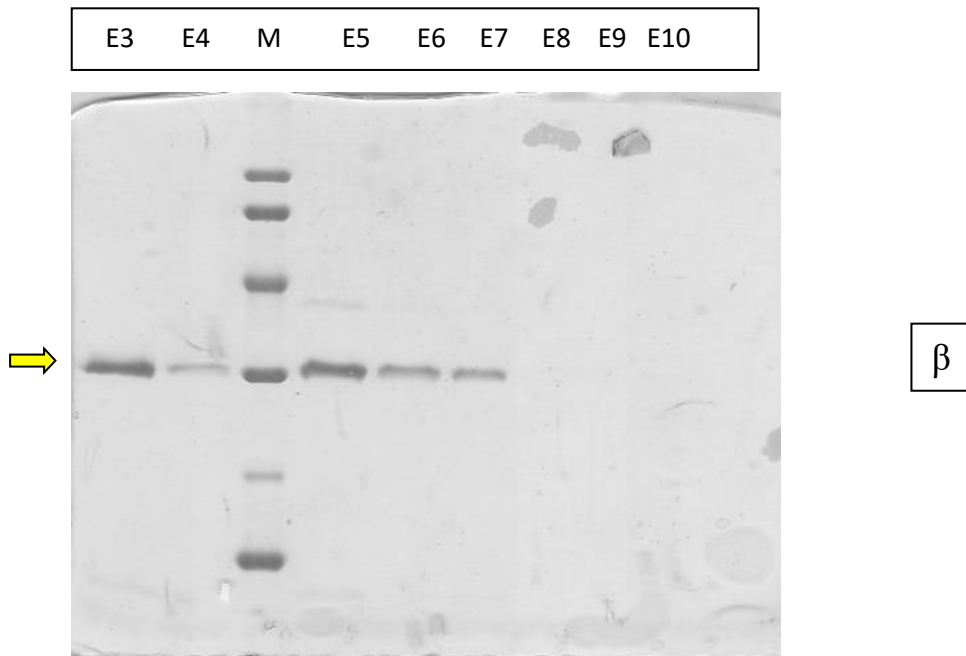
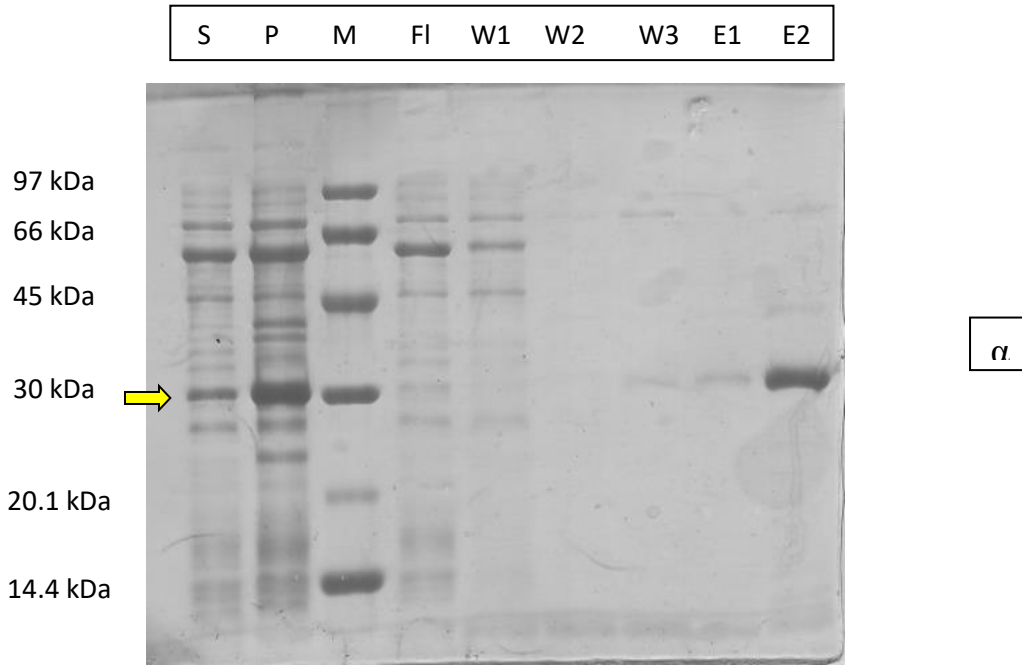
Η ενεργότητα του ενζύμου καθορίζεται από την μέτρηση των ραδιοσημασμένων μορίων οξικού με βάση τις κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute, CPM), σε σχέση με ένα αρνητικό control.

O/N, 37°C, + 1mM CoCl₂-25 mM Tris/HCl pH=7.6

| | CPM |
|---------------------------------|------------|
| Void (α') | 66.00 |
| Peak β' 0.01mg/ml (αραιό) | 182.00 |
| Peak γ' (αραιό) | 64.00 |
| Peak β' 4.13mg/ml (πυκνό) | 546.00 |
| Peak γ' 0.41mg/ml (πυκνό) | 312.00 |
| Negative control | 42.00 |

Μεγαλύτερη ενεργότητα λοιπόν από όλα φαίνεται να παρουσιάζει το πυκνό δείγμα (4.13 mg/ml) του πληθυσμού της δεύτερης κορυφής ενώ μια στοιχειώδη ενεργότητα παρουσιάζει και ο πληθυσμός της τρίτης κορυφής.

3.5. Καθαρισμός της BC2929 με χρωματογραφία συγγένειας (κολώνα Ni-NTA agarose) παρουσία τσαπερονών (II)



Εικόνα 18 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της BC2929 (παρουσία τσαπερονών) από κολώνα Ni-NTA αгарόζης.

S (Sample): δείγμα-υπερκεείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα μετά τη φυγοκέντρηση

P (Pellet): δείγμα από επαναδιαλυμένη πελέτα (μετά τη φυγοκέντρηση) σε ανάλογο όγκο Lysis buffer (100 ml)

M (Marker): πρωτεϊνικός μάρτυρας (Amersham Biosciences)

Fl (Flowthrough): δείγμα από το διάλυμα που συλλέχθηκε μετά το πέρασμα του Sample

W1-W3 (Washes): δείγμα από τα διαλύματα των πλύσεων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

E1-E11 (Elutions): δείγμα από τα διαλύματα έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

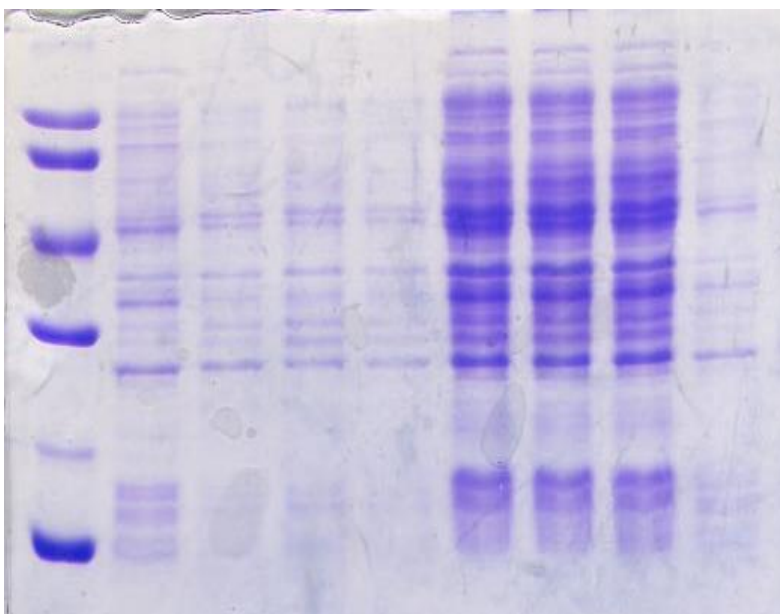
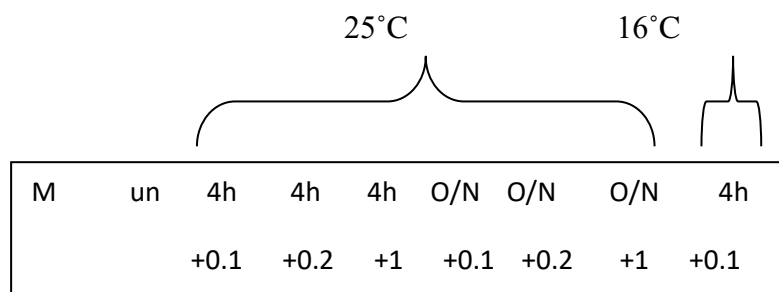
Το βελάκι αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της BC2929, στα 27.787 Da

Η **Εικόνα 18 (α,β)** του καθαρισμού είναι ίδια σχεδόν με αυτή που παρατηρήθηκε στην **Παράγραφο 3.1**, και πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της παρουσίας των δύο πληθυσμών στο gel. Η μόνη διαφορά ήταν ότι αυτή τη φορά στα Wash 2 και 3 φαίνεται μια μπάντα που αντιστοιχεί στην τσαπερόνη DNA K και όχι στη GroEL. Ενώ όπως είναι αναμενόμενο η έκλυση αυξάνεται από το Elution 1 στο Elution 2 (παρουσία 100 mM Ιμιδαζολίου και στα δύο) και έπειτα μειώνεται σταδιακά από το Elution 3 στο Elution 4 (παρουσία 200 mM Ιμιδαζολίου), σημειώνεται αυτή τη φορά και πάλι μια (πιο έντονη με την προηγούμενη φορά) αύξηση της έκλουσης στο Elution 5 (όπου μάλιστα παρατηρείται και μια μπάντα που ίσως αντιστοιχεί στην τσαπερόνη DNA J). Αυτή ακολουθείται από σταδιακή μείωση της έκλουσης της πρωτεΐνης στα Elutions 6 και 7 (στα Elutions 5-7 υπάρχει 500 mM Ιμιδαζόλιο). Μετά παύει να διακρίνεται μπάντα που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη BC2929. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι ίσως το γεγονός δεν είναι τυχαίο τελικά αλλά υπάρχουν δύο πληθυσμοί: (α) ένας που πραγματοποιεί ασθενή πρόσδεση (Elutions 1-4) γιατί λόγω της διαμόρφωσης που παίρνει εντός της κολώνας, δεν εκτίθενται όλες οι ιστιδίνες από το 6xHis-tag (ίσως αντιστοιχεί στον πληθυσμό της δεύτερης κορυφής του χρωματογραφήματος) και (β) ένας που πραγματοποιεί ισχυρή σύνδεση (ίσως πρόκειται για τον πληθυσμό της τρίτης κορυφής), το 6x-His-tag είναι πλήρως εκτεθειμένο και εκλύεται αργότερα (Elutions 5-7).

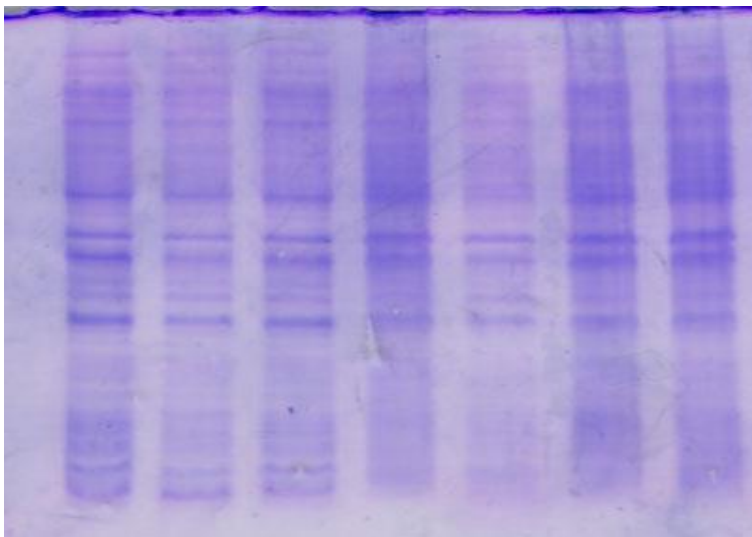
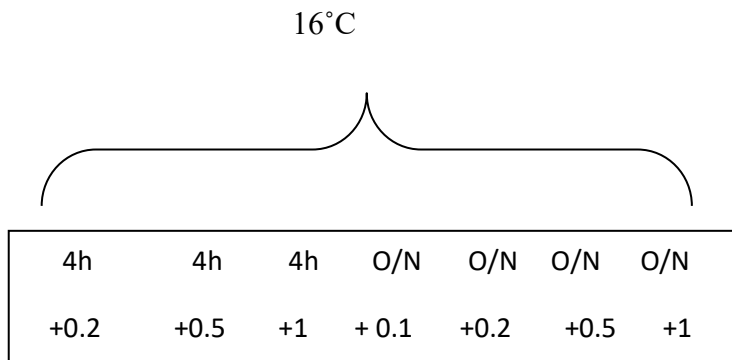
Συλλέχθηκαν λοιπόν και ενοποιήθηκαν τα Elutions 2 και 3 για τον (α) πληθυσμό και τα Elutions 5-7 για το (β) πληθυσμό και ακολούθησε dialysis, ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό. Μετά από συμπύκνωση του πληθυσμού (α) στη συγκέντρωση 6,21 mg/ml (530 μl) και του πληθυσμού (β) στη συγκέντρωση 5,22 mg/ml, μπήκαν κρυσταλλώσεις από έτοιμα screens (αναφέρονται αναλυτικά τα screens που χρησιμοποιήθηκαν στην Ενότητα **Υλικά και Μέθοδοι**), με 800 μl reservoir, 2 μl πρωτεΐνης + 2 μl reservoir. Όποτε θόλωναν τα δείγματα, φυγοκεντρούνταν ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεΐνη που είχε «πέσει». Έπειτα κρυσταλλώσεις έμπαιναν από το υπερκεείμενο, αφού γινόταν και πάλι μέτρηση της συγκέντρωσης. Παρατηρήθηκε ένας κρύσταλλος στη θέση A3 του JB screen classic 8 (50% w/v MPD, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM Ammonium dihydrogen phosphate) που στάλθηκε επίσης για συλλογή δεδομένων περίθλασης με ακτίνες X στις εγκαταστάσεις του Synchrotron Soleil (Παρίσι). Ωστόσο τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πρόκειται για κρύσταλλο άλατος.

3.6. Έλεγχος υπερέκφρασης της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) σε διαφορετικά στελέχη του *E. coli*

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του γονιδίου της BC2929 (σε πλασμιαδικό φορέα pET26b+), στα στελέχη *E. coli* star pLys και JM109. Πέντε αποικίες συλλέχθηκαν για τα star pLys και 3 για τα JM109 και αυτές ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα και τις συνθήκες υπερέκφρασης της BC2929. Αρχικά ελέγχθηκαν οι 5 αποικίες από τα star pLys ως προς την υπερέκφραση της BC2929 στους 16 °C και στους 25 °C, με επαγωγή στις 4h και O/N, με προσθήκη 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mM IPTG. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τις 3 αποικίες του JM109. Παρατίθενται ενδεικτικά οι παρακάτω αναλύσεις σε πήκτωμα 12,5% πολυακρυλαμίδης:



α



β

Εικόνα 19 (α,β) : Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του ελέγχου υπερέκφρασης της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) σε κύτταρα star pLys.

M: πρωτεϊνικός μάρτυρας

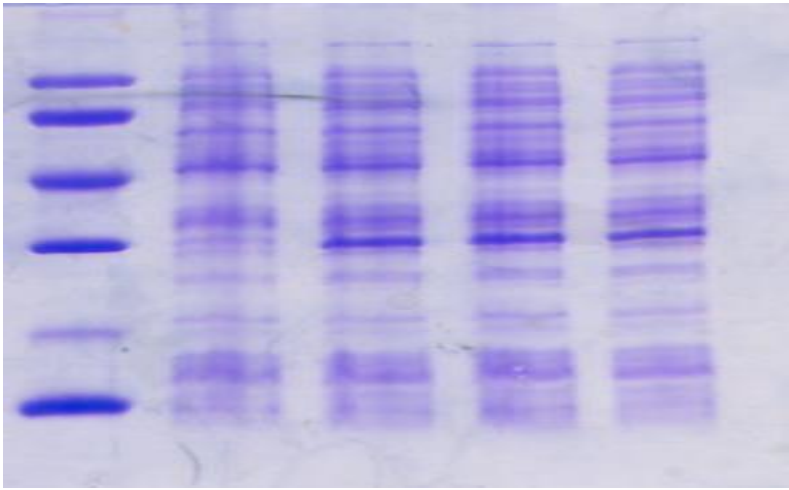
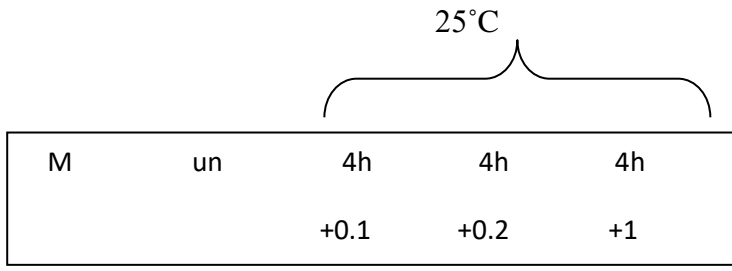
un (uninduced): το δείγμα που συλλέχθηκε πριν να γίνει επαγωγή με x mM IPTG

4h: το δείγμα που συλλέχθηκε μετά από 4h επαγωγής με x mM IPTG στους 16°C και στους 25°C

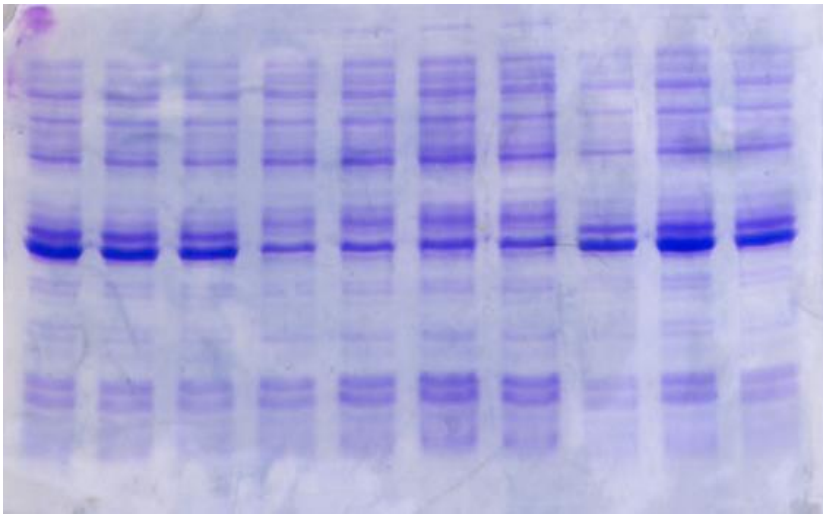
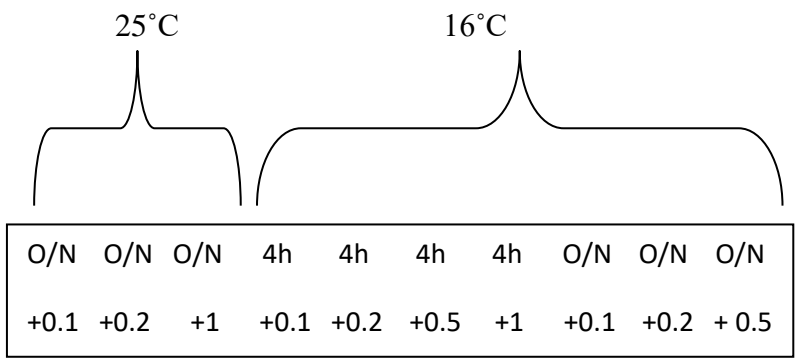
O/N: το δείγμα που συλλέχθηκε μετά από O/N επαγωγή με x mM IPTG στους 16°C και στους 25°C

IPTG: 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mM

Παρατηρείται από τις **Εικόνες 19 (α,β)** ότι επικρατεί το ίδιο πρότυπο σε όλες τις συνθήκες και δεν υπάρχει κάποια ουσιαστική διαφοροποίηση της έκφρασης, ώστε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όντως τα star pLys εκφράζουν τη BC2929. Μετά την επαγωγή δεν εντοπίζεται κάποια έντονη αλλαγή, μάλιστα ακόμα και πριν την επαγωγή διακρίνεται μια μικρή έκφραση (ίσως πρόκειται για promoter leakage) η οποία αυξάνεται όσο περνάει η ώρα (δηλαδή από τις 4h σε σχέση με την ολονύκτια επαγωγή) και έτσι δεν είναι ξεκάθαρη η έκφραση.



α



β

Εικόνα 20 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του ελέγχου υπερέκφρασης της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) σε κύτταρα JM109.

Για τους συμβολισμούς ισχύει ο,τι περιγράφηκε στην προηγούμενη εικόνα.

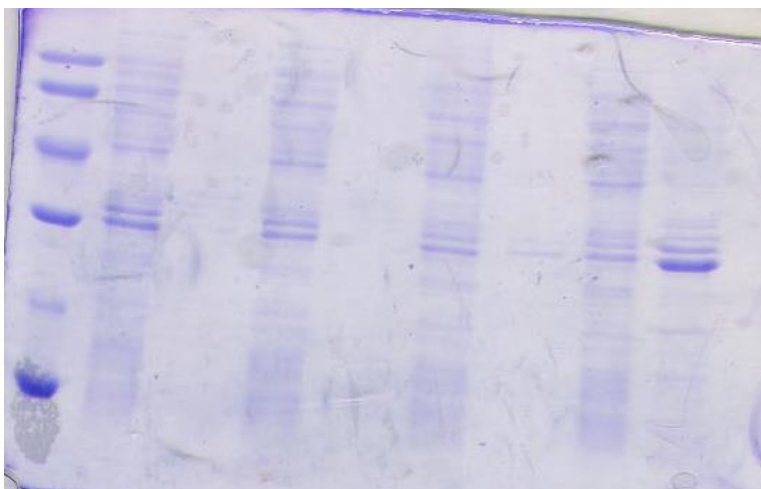
Υπερέκφραση στους 25° C και 16° C, με επαγωγή στις 4h και O/N, με 0.1, 0.2, 0.5 και 1 mM IPTG.

Από τις **Εικόνες 20 (α,β)**, φαίνεται ότι στα κύτταρα JM109 υπάρχει υπερέκφραση της BC2929 και μάλιστα υπάρχει επαγωγή και στις 4h και O/N σε σχέση με το uninduced δείγμα. Συγκεκριμένα, στους 25°C στις 4h υπάρχει επαγωγή και μάλιστα παράγεται πρωτεΐνη σε παρόμοια επίπεδα και με τις 3 συγκεντρώσεις IPTG (0.1, 0.2, 1 mM) ενώ η παραγωγή της BC2929 αυξάνεται μετά την O/N επαγωγή. Στους 16°C, 4h μετά την επαγωγή παρατηρείται παρόμοια εικόνα με την επαγωγή μετά από 4h στους 25°C. Και στους 16°C μετά την O/N επαγωγή παρατηρείται επίσης αύξηση σε σχέση με τις 4h και αντίστοιχα είναι παρόμοια η εικόνα με την O/N επαγωγή στους 25°C. Η O/N επαγωγή στους 16°C με 0.2 mM IPTG είναι ίσως η συνθήκη όπου επιτυγχάνεται ελαφρώς καλύτερη έκφραση.

3.7. Έλεγχος διαλυτότητας της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) που εκφράζεται στα JM109

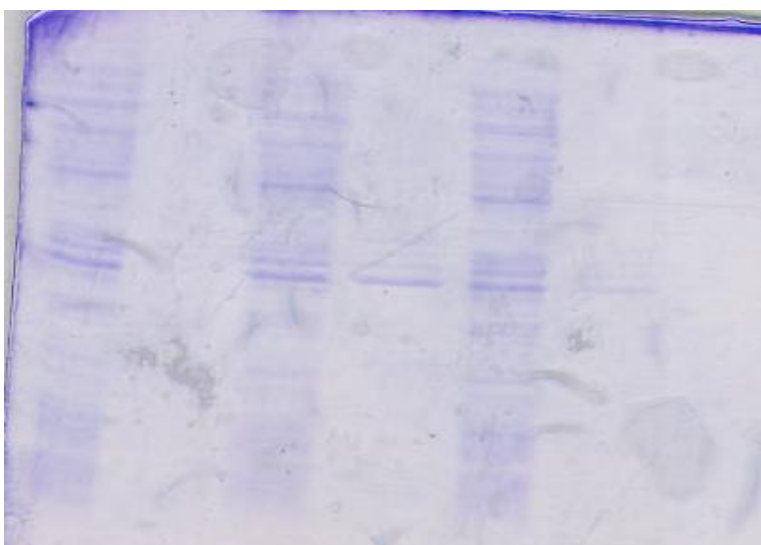
Μετά από υπερέκφραση στα JM109, επαγωγή με 0.2 mM IPTG O/N και φυγοκέντρηση της καλλιέργειας, έγινε επαναδιάλυση των πελετών με διαφορετικά διαλύματα πριν τη διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους.

| | | | | | | | | |
|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|
| M | Sup | P | Sup | P | Sup | P | Sup | P |
| | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 |



α

| | | | | | |
|-----|---|-----|---|-----|---|
| Sup | P | Sup | P | Sup | P |
| 5 | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 |



β

Εικόνα 21 (α,β) : Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του ελέγχου διαλυτότητας της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) σε κύτταρα JM109.

M: πρωτεϊνικός μάρτυρας

Sup (Supernatant): δείγμα από το υπερκείμενο που προέκυψε μετά από τη φυγοκέντρηση που διαδέχθηκε τη διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους

P (Pellet): δείγμα από το υπερκείμενο που προέκυψε μετά από τη φυγοκέντρηση που διαδέχθηκε τη διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους.

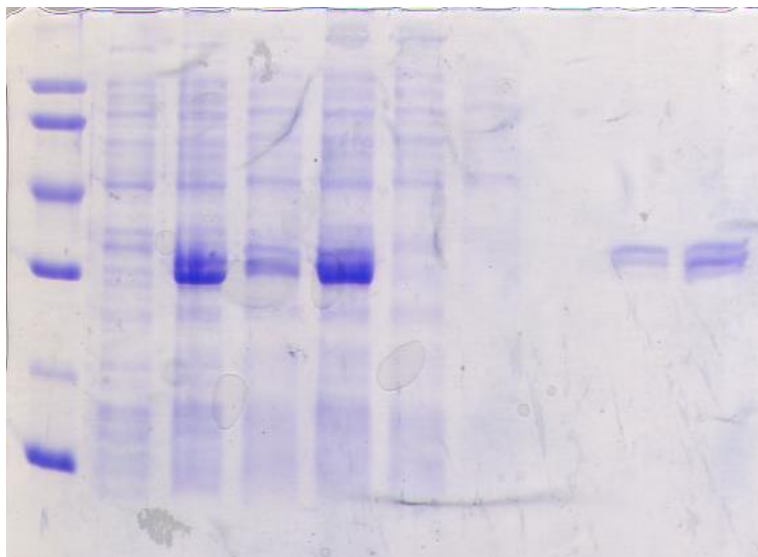
- 1) 25 mM Tris pH=7.6 , 200 mM NaCl
- 2) 25 mM Tris pH=7.6 , 200 mM KCl
- 3) CHAPS 0,5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 M NaCl
- 4) Glycerol 5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- 5) Glycerol 10%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- 6) Tween-20 0,5 % , 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl
- 7) Triton X-100 0,5%, 25 mM Tris pH=7.6, 200 mM NaCl

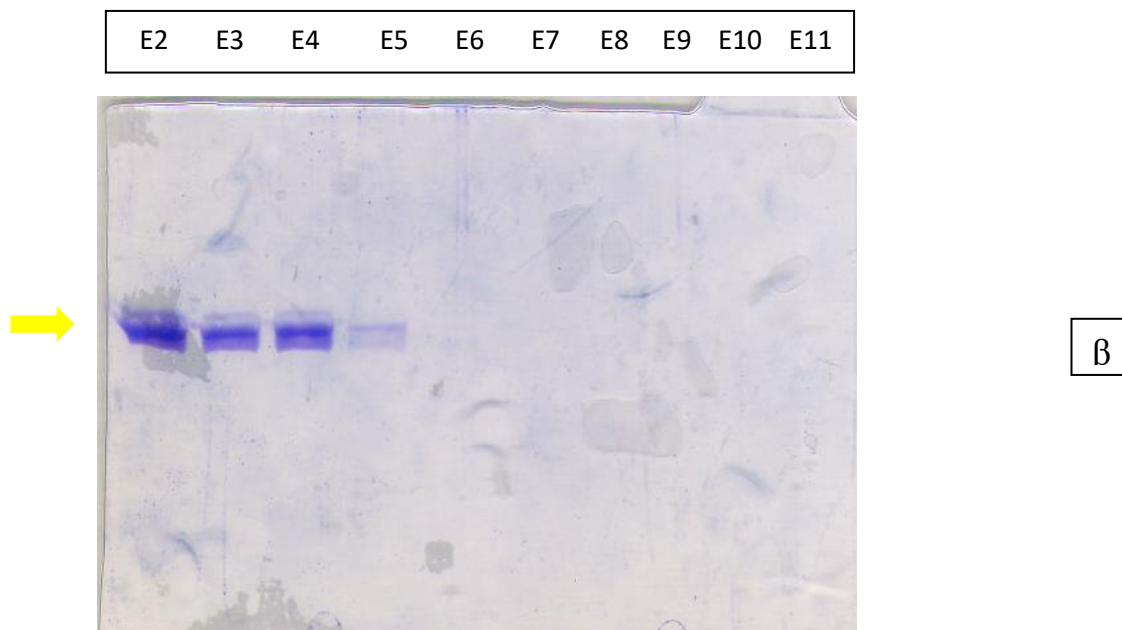
Από τις **Εικόνες 21 (α,β)** φαίνεται ότι στα διαλύματα που περιέχουν CHAPS 0.5%, γλυκερόλη 5%, Tween 0.5% και Triton 0.5% μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται στην πελέτα. Συγκεκριμένα, με CHAPS και Triton λιγότερη πρωτεΐνη εντοπίζεται στην πελέτα σε σχέση με το υπερκείμενο, με γλυκερόλη 5% η μεγαλύτερη ποσότητα εντοπίζεται στην πελέτα ενώ με Tween η κατανομή φαίνεται ισόποση σε υπερκείμενο και πελέτα. Στα διαλύματα που περιέχουν μόνο Tris και αλάτι, πρωτεΐνη παρατηρείται να υπάρχει μόνο στο υπερκείμενο και μάλιστα η καλύτερη συνθήκη είναι αυτή που χρησιμοποιούνταν ως τώρα, με 25 mM Tris pH=7.6 , 200 mM NaCl.

3.8. Καθαρισμός της BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) που εκφράζεται στα κύτταρα JM109

Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού που χρησιμοποιούνταν για τη BC2929 που εκφραζόταν στα BL21 DE3.

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|---|---|----|----|----|----|----|
| M | un | in | S | P | Fl | W1 | W2 | W3 | E1 |
|---|----|----|---|---|----|----|----|----|----|





Εικόνα 22 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της ολόκληρης BC2929 (χωρίς τσαπερόνες) από κολώνα Ni-NTA αγαρόζης.

M (Marker): πρωτεϊνικός μάρτυρας (Amersham Biosciences)

un (uninduced): το δείγμα που συλλέχθηκε πριν να γίνει επαγωγή με 0.2 mM IPTG

in (inducted): το δείγμα που συλλέχθηκε αφού έγινε η O/N επαγωγή με 0.2 mM IPTG

S (Sample): δείγμα-υπερκεείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα μετά τη φυγοκέντρηση

P (Pellet): δείγμα από επαναδιαλυμένη πελέτα (μετά τη φυγοκέντρηση) σε ανάλογο όγκο Lysis buffer (100 ml)

FI (Flowthrough): δείγμα από το διάλυμα που συλλέχθηκε μετά το πέρασμα του Sample

W1-W3 (Washes): δείγμα από τα διαλύματα των πλύσεων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

E1-E11 (Elutions): δείγμα από τα διαλύματα έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

Το βελάκι αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της BC2929, στα 27.787 Da

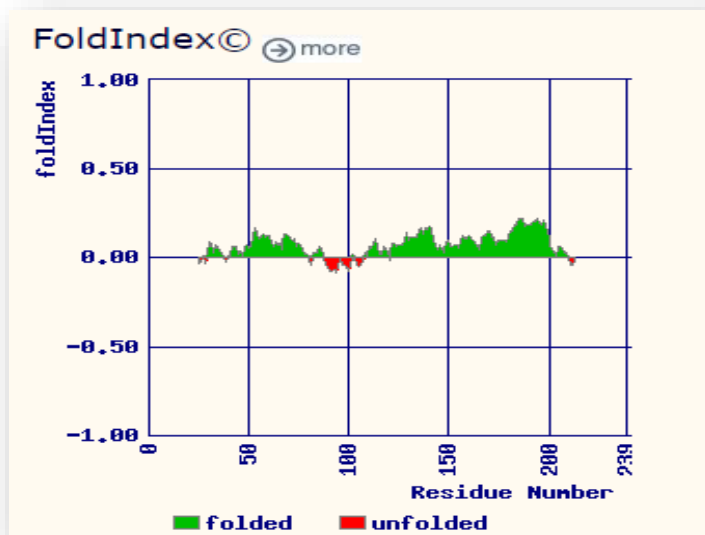
Στις **Εικόνες 22 (α,β)** παρατηρείται αρχικά σύγκριση του δείγματος πριν και μετά την O/N επαγωγή με 0.2 mM IPTG. Μετά τη διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται στην πελέτα αλλά υπάρχει και ένα σχετικά ικανοποιητικό μέρος της στο υπερκεείμενο. Δε φαίνεται να υπάρχουν απώλειες στο Flowthrough ή τα διαλύματα πλύσης. Τελικά, η BC2929 εκλύεται στα διαλύματα έκλουσης 1-5 (Elutions 1-5). Η εικόνα που εμφανίζει ως προς τη διαλυτότητα, είναι παρόμοια με αυτή που παρουσίαζε στα κύτταρα BL21 DE3 που έφεραν και τις τσαπερόνες. Μετά από dialysis, δείγμα δόθηκε για activity assay και πάλι δε βρέθηκε ενεργότητα απακετυλάσης.

3.9. Επιλογή αμινοξέων για τη δημιουργία της C-truncated BC2929

Η αρχική υπόθεση βάσει βιβλιογραφίας και παρατηρήσεων μέσω TEM ήταν ότι το αμινοτελικό άκρο και το καρβοξυτελικό άκρο της BC2929 είναι αυτά που εμπλέκονται στον πολυμερισμό και στο σχηματισμό των ινιδίων αντίστοιχα, συνεπώς μετά από αποκοπή του καθενός ξεχωριστά θα έβγαιναν χρήσιμα συμπεράσματα. Παρατίθεται παρακάτω η πλήρης αμινοξική αλληλουχία της BC2929. Μέσω του προγράμματος Signal IP, είχε προβλεφθεί ότι στις θέσεις 1-37 (κόκκινο χρώμα) του αμινοτελικού άκρου (N-τελικό άκρο) υπάρχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide), το οποίο και απουσιάζει πλέον από το διαθέσιμο γονίδιο της BC2929. Επομένως η αμινοξική αλληλουχία ξεκινά από μια μεθειονίνη (γκρι χρώμα), καθώς έχει προστεθεί ένα κωδικόνιο ATG, και συνεχίζει από τη θέση 38 έως τέλους. Η επικράτεια NodB της BC2929 προβλέπεται βάσει Protein Blast ότι αντιστοιχεί στις θέσεις 71-258 (ως προς την αρχική αλληλουχία).

```
1 mhngirmttl vkramlvcag vlftyevafg svhtalamste deaksvqlvs eiqtslapke  
61 apkhyngqvr kvaylftddg pgkytaelld mlkkenalakat fflignsvka fpdlvkreda  
121 eghyvgmhsm thnykklyte ghyvdemked qgliagvlgk spvltrpsyg smpglnealr  
181 nkvnenglkn wdwtdslldw kynkmqvdaa sakivenvlh gatnptevil mhdihpqsvk  
241 avrgiikglk ekgyealyn enehfplnfw hdnrm
```

Η αλληλουχία της BC2929 με σημείο εκκίνησης τη m (γκρι χρώμα) έως τέλους, αναλύθηκε μέσω του προγράμματος **FoldIndex** (<https://fold.weizmann.ac.il/fldbin/findex>), προκειμένου να διαπιστωθεί ποια τμήματα της BC2929 προβλέπονται ως “disordered”, εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη ευελιξία κίνησης.



Εικόνα 23: Η ανάλυση που προέκυψε από το **FoldIndex**, όπου με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα αναδιπλωμένα τμήματα και με κόκκινο τα μη αναδιπλωμένα.

```

Summary:
Number Disordered Regions: 4
Longest Disordered Region: 30
Number Disordered Residues: 75
Predicted disorder segment: [ 1]-[ 26] length: 26 score: -0.03 ± 0.01
Predicted disorder segment: [ 88]-[101] length: 14 score: -0.06 ± 0.02
Predicted disorder segment: [103]-[107] length: 5 score: -0.03 ± 0.02
Predicted disorder segment: [210]-[239] length: 30 score: -0.03 ± 0.02

1  MSTEDEAKSV QLVSEIQTSL APKEAPKHYN GQVRKVAYLT FDDGPGKYTA
51  ELLDMLKKEN AKATFFLIGS NVKAFDVLK REDAEGHYVG MHSMTHNYKK
101 LYTEGHYVDE MKEDQGLIAG VLGKSPVLTR PSYGSMPGLN EALRNKVVEN
151 GLKVWDWID SLDWKYNKMQ VDAASAKIVE NVLHGATNPT EVILMHDIH
201 QSVKAVPGII KGLKEKGYEL EAYNEHEFP LNFWDNRM

( Predicted disordered segment )

```

Εικόνα 24: Με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται τα “disordered” τμήματα της BC2929.

Παρατηρείται λοιπόν ότι για το N-τελικό άκρο αυτό αντιστοιχεί στις θέσεις 1-26 ενώ για το C-τελικό άκρο που μας απασχόλησε αντιστοιχεί στις θέσεις 210-239. Επίσης υπάρχει και μια ευέλικτη περιοχή εντός της επικράτειας NodB, που προκαλεί ενδιαφέρον. Έτσι από το C-τελικό άκρο «κόπηκε» το τμήμα από το αμινοξύ G217 έως τέλος. Δηλαδή η αμινοξική αλληλουχία της C-truncated BC2929 (όπου έχουν απομακρυνθεί 23 αμινοξικά κατάλοιπα) είναι η ακόλουθη:

```

1  mste deaksvqlvs eiqtslapke apkhyngqvr kvayltfddg
45  pgkytaelld mlkkenakat ffligsnvka fpdlvkreda eghyvgmhsm
95  thnykklyte ghyvdemked qgliagvlgk spvltrpsyg smpglnealr
145 nkvvenglkv wdwtidslw kynkmaqvdad sakivenvlh gatnptevil
195 mhdihpqsvk avpgiikglkek hhhhhh

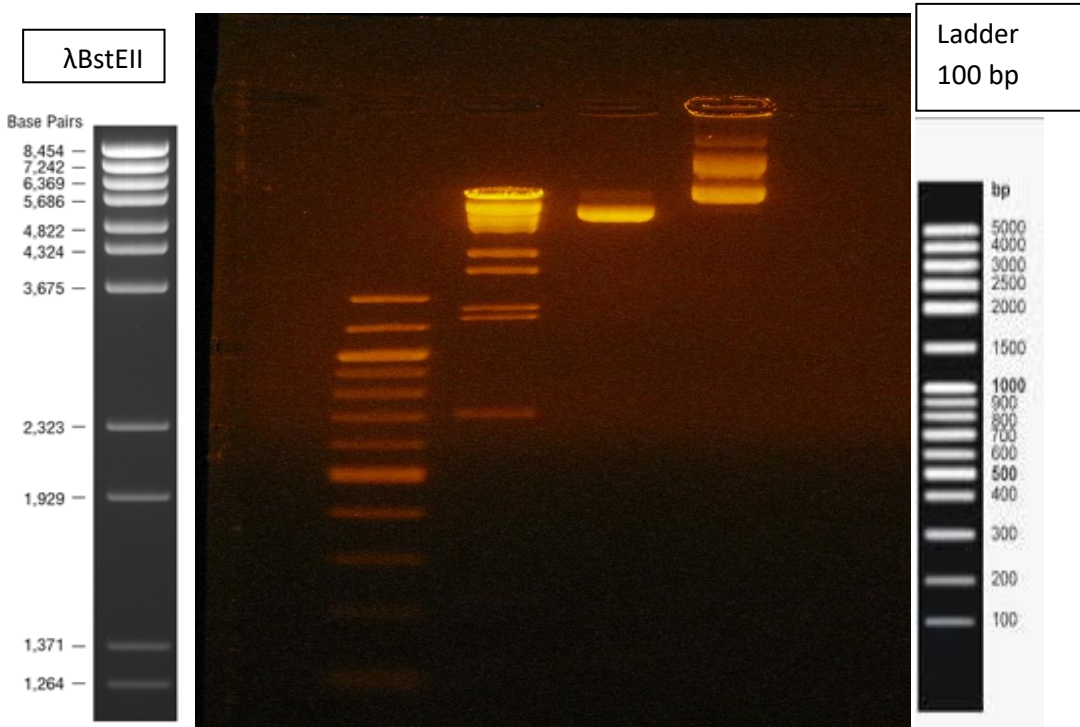
```

Mw.: 24878,37 και Ext. coefficient: 29.910

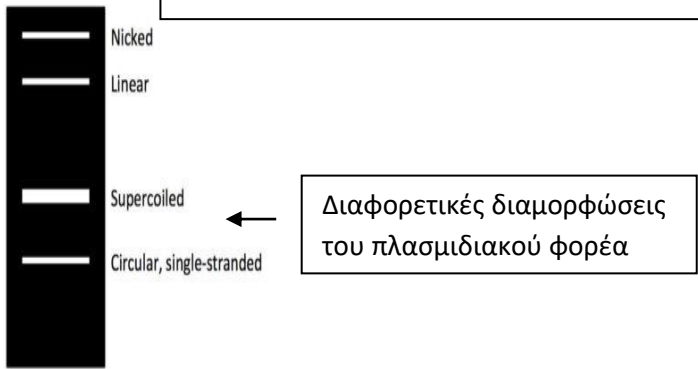
3.10. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+)

Τρέχθηκε δείγμα σε gel αγαρόζης 1,3% για 2h για να διαπιστωθεί αν έγινε πέψη στις θέσεις που έπρεπε.

| | | | |
|--------|---------|-----------------|--------|
| Ladder | Ladder | Κομμένος Άκοπος | |
| 100 bp | λBstEII | Vector | Vector |



Εικόνα 25: Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) με τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI* και *XhoI* σε gel αγαρόζης 1,3%, αφού τρέχθηκε για 4h.

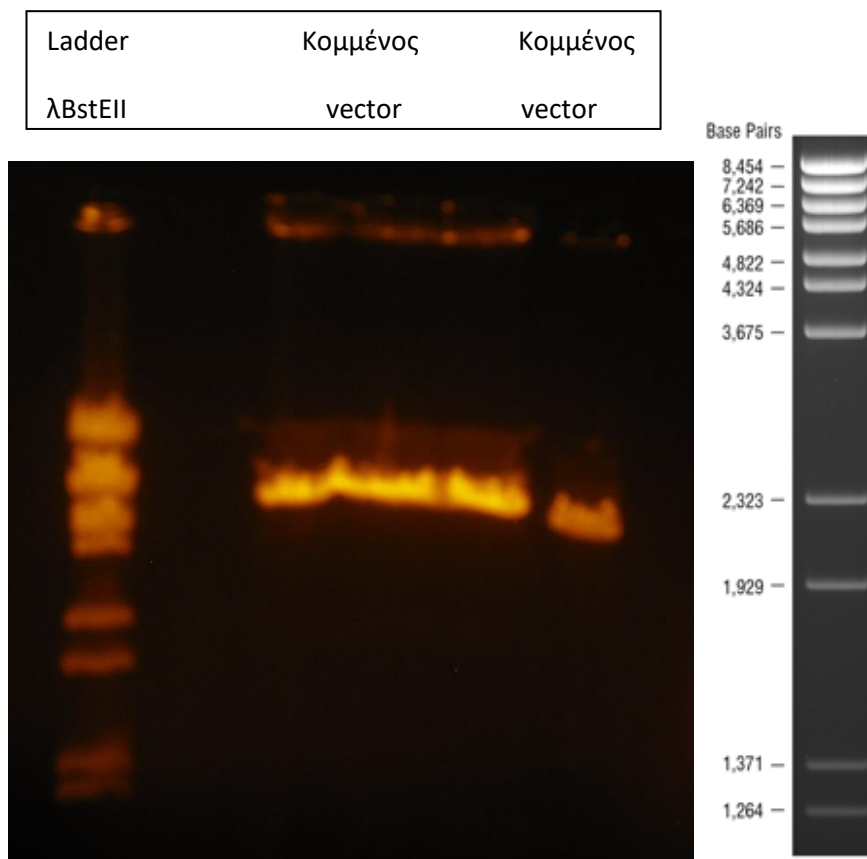


Στο gel αγαρόζης 1.3% έχουν τρεχθεί δύο μάρτυρες, ένας 100 bp εύρους χαμηλών μοριακών βαρών, για να προσδιοριστεί η μικρή μπάντα (που αντιστοιχεί στο τμήμα που κόβεται μεταξύ του σημείου δράσης των περιοριστικών ενζύμων) που θα προκύψει με το κόψιμο και ένας ακόμα, ο λBstEII για να προσδιοριστεί η μεγάλη μπάντα (που περιλαμβάνει όλο το υπόλοιπο πλασμίδιο). Φυσικά έχει τρεχθεί και δείγμα από τον κομμένο πλασμιδιακό φορέα σε σύγκριση με τον άκοπο φορέα. Στην Εικόνα φαίνεται ότι ο κομμένος πλασμιδιακός φορέας έχει τρέξει πιο κάτω σε σχέση με τον άκοπο, αφού πλέον είναι μικρότερος και γραμμικός. Παρόλα αυτά δε φαίνεται ακόμα η μικρή μπάντα και η παρουσία μιας άλλης αχνής πάντας

στο δείγμα του άκοπου, υποδηλώνει ότι ο φορέας δεν έχει κοπεί στο 100%. Οι τρεις μπάντες που εμφανίζονται στον άκοπο φορέα αντιπροσωπεύουν τις τρεις διαμορφώσεις που παίρνει (κυκλική (circular), γραμμική (linear) και “nicked” (κομμένος στη μια αλυσίδα και κυκλικός στην άλλη), που τρέχουν σύμφωνα με την εικόνα στα δεξιά.

3.11. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) για gel extraction

Μπήκε πάλι αντίδραση πέψης όπου προστέθηκε λίγη ακόμα ποσότητα ενζύμων και έγινε επώαση για επιπλέον 1h. Τρέχθηκε και πάλι gel αгарόζης 1,3% για 2h, παρουσία του μάρτυρα λBstEII. Έπειτα όλη η ποσότητα της αντίδραση πέψης φορτώθηκε στο gel (σε 2 πηγαδάκια γιατί δε χωρούσε όλη σε ένα), με τον εν δυνάμει κομμένο πλασμιδιακό φορέα.

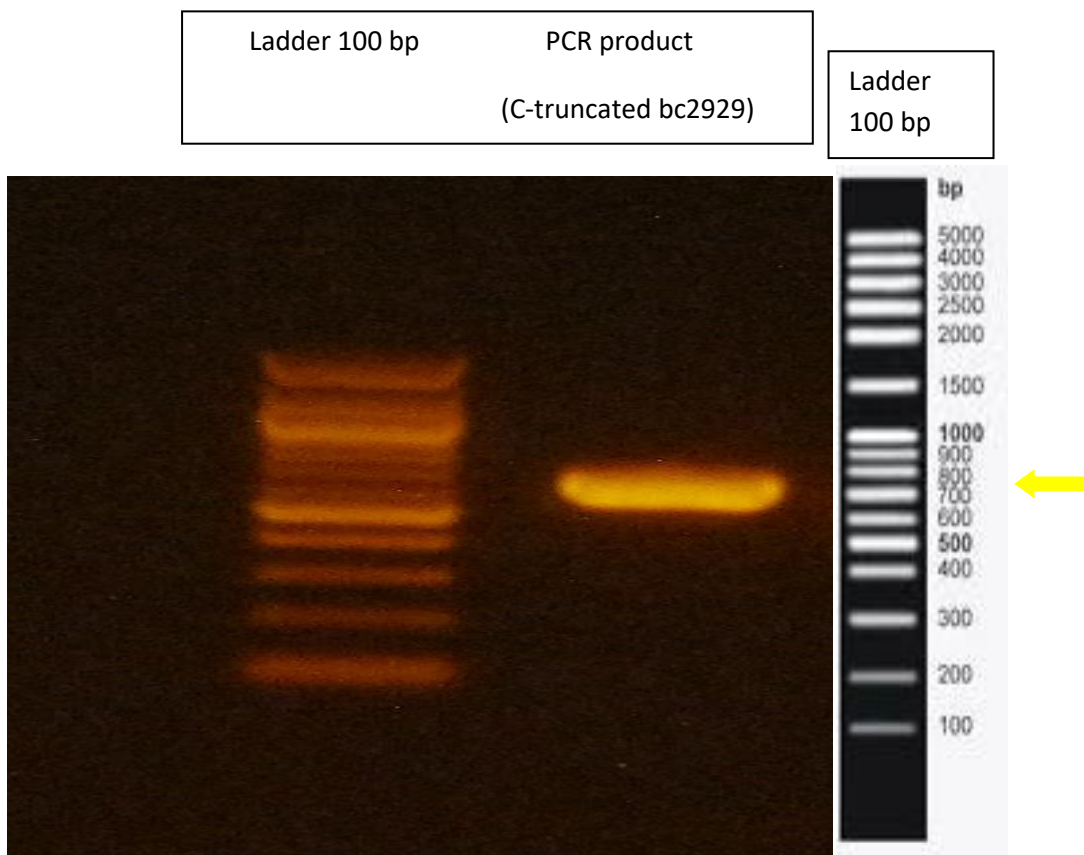


Εικόνα 26: Gel αгарόζης 1,3% αφού τρέχθηκε για 1h με πρόσθετη ποσότητα περιοριστικών ενζύμων για να γίνει gel extraction.

Στην **Εικόνα 26** παρατηρείται μια έντονη μπάντα πολύ χαμηλά που αντιστοιχεί στην αναμενόμενη μικρή μπάντα και μια μεγαλύτερη, πολύ υψηλότερα, οπότε συμπεραίνουμε ότι ο πλασμιδιακός φορέας pET26b(+), μεγέθους περίπου 5.360 bp έχει κοπεί σωστά.

3.12. Ταυτοποίηση του C-truncated γονιδίου της BC2929

Πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές που είχαμε παραγγείλει προκειμένου να αποκοπεί τμήμα του C-τελικού άκρου και το προϊόν της αντίδρασης PCR τρέχθηκε σε gel αγαρόζης 1% για να ταυτοποιηθεί το C-truncated γονίδιο.



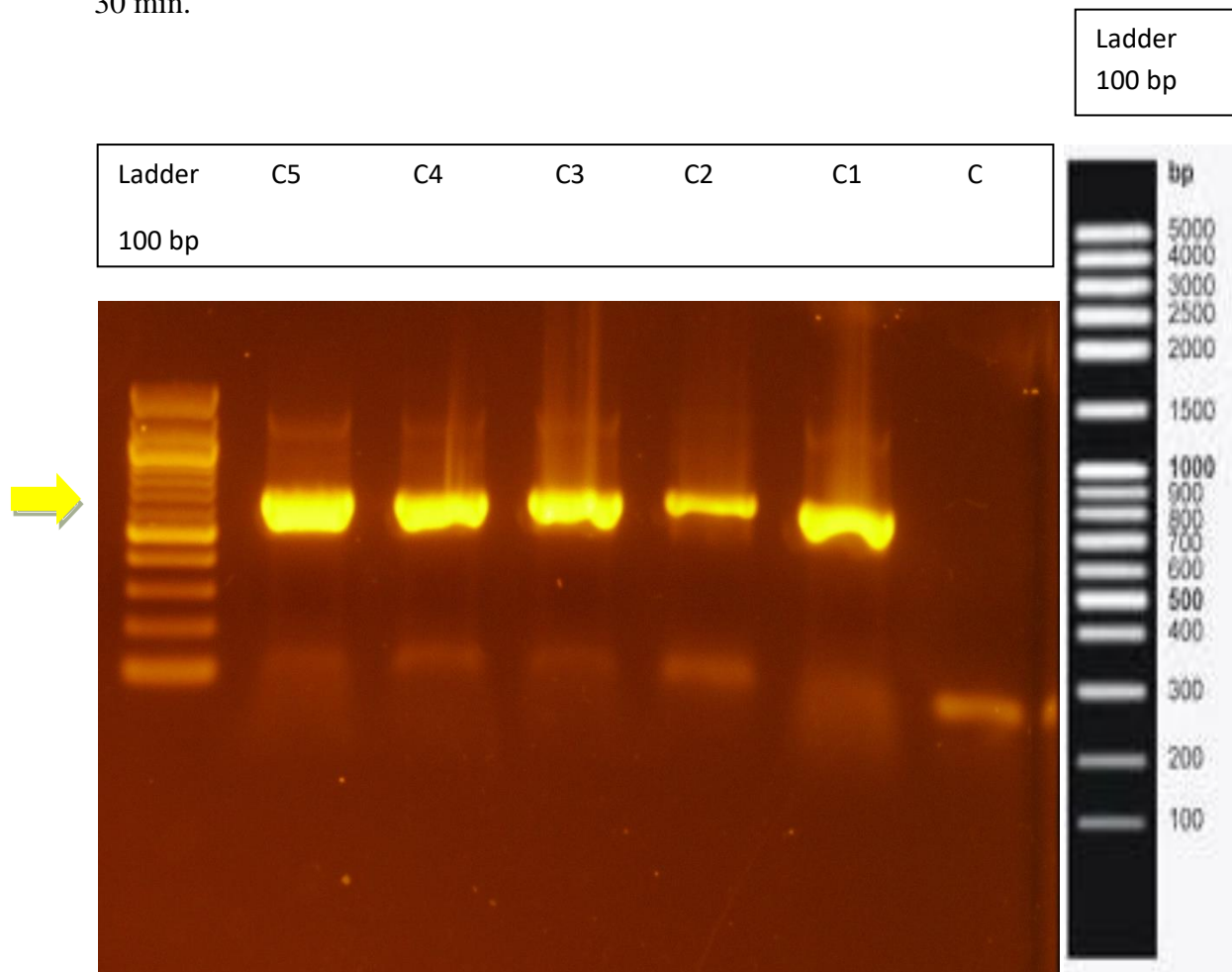
Εικόνα 27: Gel αγαρόζης 1% για την ταυτοποίηση του C-truncated γονιδίου της BC2929 μετά από αντίδραση PCR.

Στην **Εικόνα 27** φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης PCR παρουσία ενός μάρτυρα 100 bp, όπου διακρίνεται μία μόνο μπάντα, και άρα δεν υπάρχουν παραπροϊόντα. Μάλιστα αυτή η μπάντα βγαίνει γύρω στις 700 bp, όπου αναμενόταν καθώς το C-truncated γονίδιο θα έχει μέγεθος 717 bp. Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της PCR και αντίδραση ligation

μεταξύ του πλασμιδιακού φορέα και του «νέου» γονιδίου, στις θέσεις που είχαν κόψει και στους δύο τα περιοριστικά ένζυμα (NdeI και XhoI).

3.13. Έλεγχος ενσωμάτωσης του C-truncated γονιδίου της BC2929 στο φορέα pET26b(+)

Αρχικά γίνεται μετασχηματισμός του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε κύτταρα κλωνοποίησης DH5α και επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τριβλία με LB agar/καναμυκίνη για ολονύκτια επώαση στους 37 °C. Έπειτα επιλέχθηκαν 5 αποικίες οι οποίες ελέγχθηκαν με αντίδραση PCR για τη σωστή ενσωμάτωση του insert δηλαδή του C-truncated γονιδίου. Τα πέντε προϊόντα της PCR (C1-C5) τρέχθηκαν σε gel αγαρόζης 1% για 30 min.



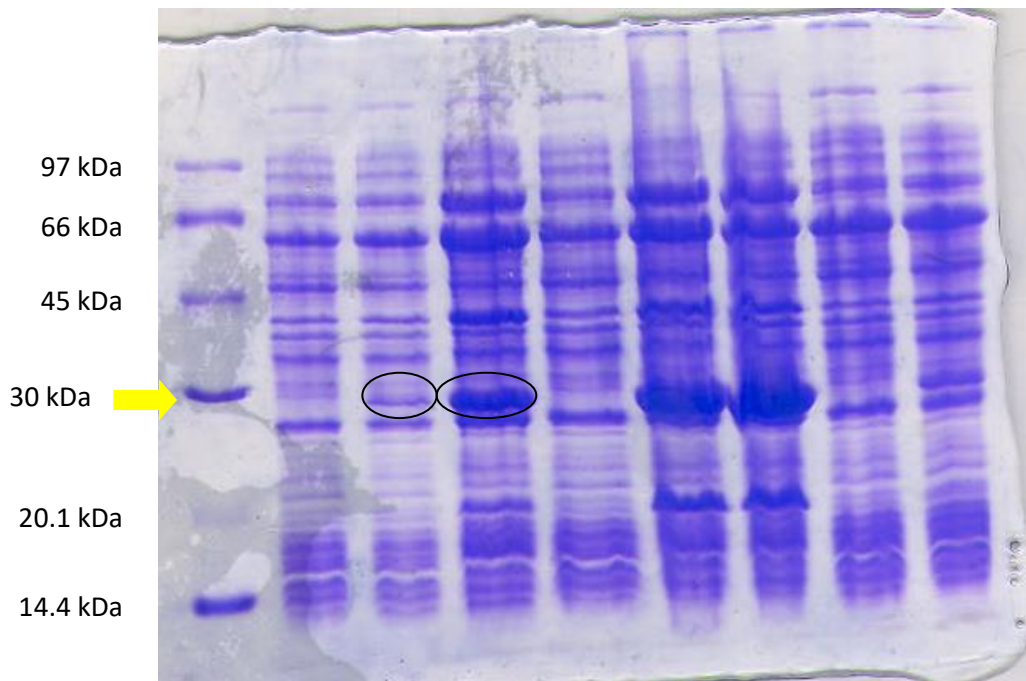
Εικόνα 28: Παρουσιάζεται το PCR colony screening σε gel αγαρόζης 1%, όπου με C1-C5 συμβολίζονται οι 5 αποικίες (που συλλέχθηκαν για έλεγχο ενσωμάτωσης) και με C συμβολίζεται το negative control (με H₂O).

Στην **Εικόνα 28** φαίνεται ότι όλοι οι κλώνοι έχουν δεχθεί το insert που έχει μέγεθος 717 bp και υποδεικνύονται με το βέλος.

3.14. Έλεγχος έκφρασης της C-truncated BC2929 (θερμοκρασία, χρόνος επαγωγής και διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG) (παρουσία τσαπερονών) σε κύτταρα BL21 DE3

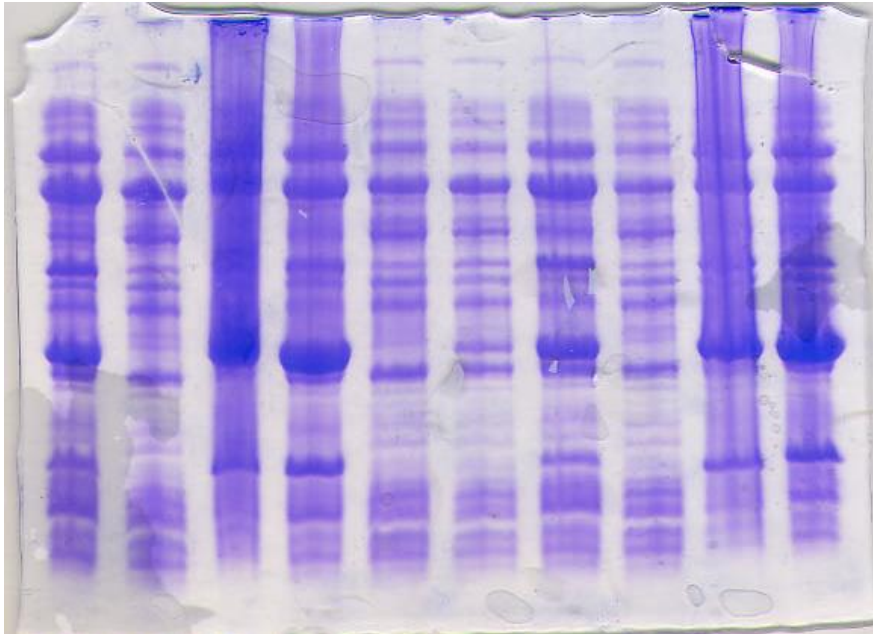
Με επώαση στους 16°C και στους 28°C και επαγωγή με 0.2 mM IPTG στις 4h και overnight, ελέγχθηκε η επίδραση παραγόντων όπως είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος επαγωγής στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση κρατήθηκαν δείγματα πριν την επαγωγή και μετά από την κάθε επαγωγή.

| | | | | | | | | |
|---|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| M | C1 un | C1 4h | C1 O/N | C1 un | C1 4h | C1 O/N | C2 un | C2 4h |
| | 16°C | 16°C | 16°C | 28°C | 28°C | 28°C | 16°C | 16°C |



α

| | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| C2 O/N | C2 un | C2 4h | C2 O/N | C3 un | C3 4h | C3 O/N | C3 un | C3 4h | C3 O/N |
| 16°C | 28°C | 28°C | 28°C | 16°C | 16°C | 28°C | 28°C | 28°C | 28°C |



Εικόνα 29 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) της έκφρασης της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών), υπό διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους επαγωγής.

C1-C3: οι κλώνοι που θα ελεγχθούν για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης στους 16°C και 28°C, μετά από 4h επαγωγής ή ολονύκτια επαγωγή (O/N)

C1-C3 Un (uninduced): το δείγμα που συλλέχθηκε για τον κάθε κλώνο πριν να γίνει επαγωγή με 0,2 mM IPTG, στους 16°C και στους 28°C

C1-C3 4h: το δείγμα που συλλέχθηκε για τον κάθε κλώνο μετά από 4h επαγωγής στους 16°C και στους 28°C

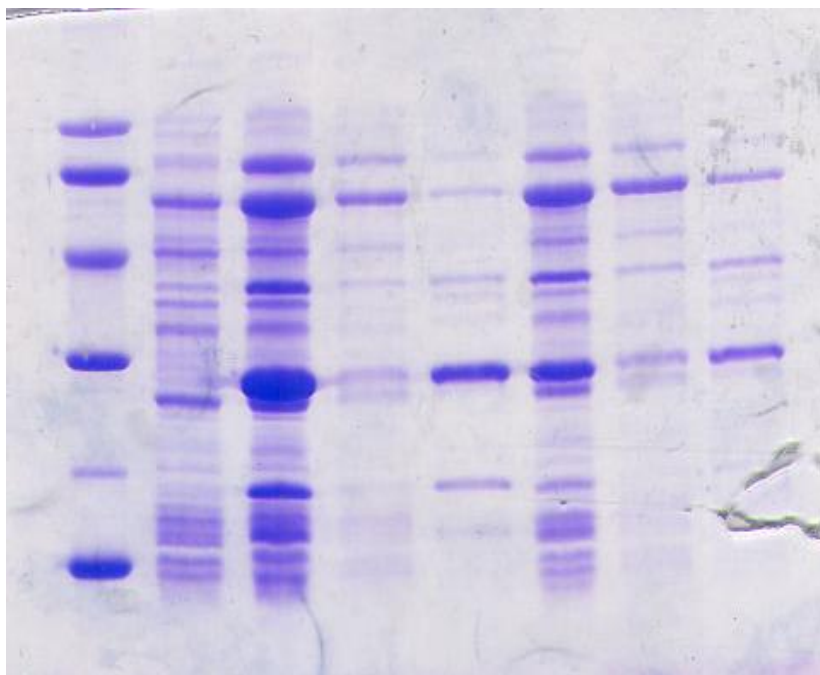
C1-C3 O/N: το δείγμα που συλλέχθηκε για τον κάθε κλώνο μετά από O/N επαγωγή στους 16°C και στους 28°C

Στις **Εικόνες 29 (α,β)** απεικονίζεται η έκφραση της C-truncated BC2929 σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (16°C και 28°C) αλλά και σε δύο διαφορετικούς χρόνους επαγωγής (4h και O/N). Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει επαγωγή πριν την προσθήκη του IPTG (0.2 mM) ενώ μεγαλύτερη επαγωγή σε όλους τους κλώνους επιτυγχάνεται μετά από την O/N επαγωγή, αν και η επαγωγή μετά από 4h είναι ικανοποιητική. Ωστόσο, επειδή η

πρωτεΐνη είναι γενικά ασταθής, αποκλείστηκε η επώαση O/N στους 28°C, διότι η παρατεταμένη επώαση σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία, αυξάνει την κίνδυνο κατακρήμνισης-συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης. Βάσει της εικόνας διαπιστώνεται ότι προτιμότερος είναι ο κλώνος 1 (σημειώνεται με κύκλο).

Ο έλεγχος της υπερέκφρασης του κλώνου 1 της C-truncated BC2929 πραγματοποιήθηκε και σε μια ακόμη θερμοκρασία (25°C) αλλά και στις ήδη δοκιμασμένες, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG (0.1, 0.2 και 0.3 mM IPTG). Αυτή τη φορά όμως ελέγχθηκε και η διαλυτότητα της πρωτεΐνης μετά από διάρρηξη των κυττάρων μέσω υπερήχων (sonication).

| M | un | 4h | Sup 4h | P 4h | O/N | Sup O/N | P O/N |
|---|----|------|--------|------|------|---------|-------|
| | | 28°C | 28°C | 28°C | 16°C | 16°C | 16°C |

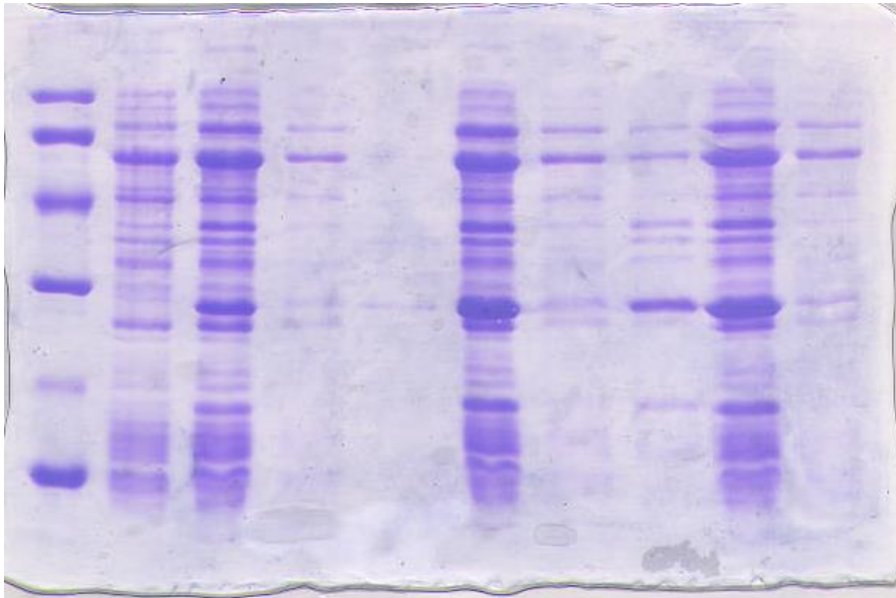


+ 0,3mM
IPTG,
16°C και
28°C

Εικόνα 30: Ανάλυση σε SDS-PAGE 12,5% όπου απεικονίζεται η επαγωγή του κλώνου 1 στους 16°C και στους 28°C, με προσθήκη 0,3 mM IPTG στις 4h και O/N καθώς και το υπερκείμενο και η πελέτα μετά από sonication.

Παρατηρείται ότι στους 28°C εμφανίζεται και πάλι η μεγαλύτερη επαγωγή και με προσθήκη 0,3 mM IPTG. Ωστόσο η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης και πάλι εμφανίζεται στην πελέτα και στις 2 θερμοκρασίες (παρόμοια εικόνα χαμηλής διαλυτότητας και στα 2). Για να βελτιωθεί λοιπόν τη διαλυτότητα, δοκιμάστηκε και μια ακόμη θερμοκρασία, στους 25°C και 2 ακόμη συγκεντρώσεις IPTG (0.1 και 0.2 mM). Ίσως σε αυξημένη θερμοκρασία και συγκέντρωση IPTG να είναι πιο εύκολο για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη να κατακρημνιστεί.

| | | | | | | | | | |
|---|----|------|--------|------|------|--------|------|------|--------|
| M | un | 2h | Sup 2h | P 2h | 4h | Sup 4h | P 4h | 4h | Sup 4h |
| | | +0.3 | +0.3 | +0.3 | +0.1 | +0.1 | +0.1 | +0.2 | +0.2 |



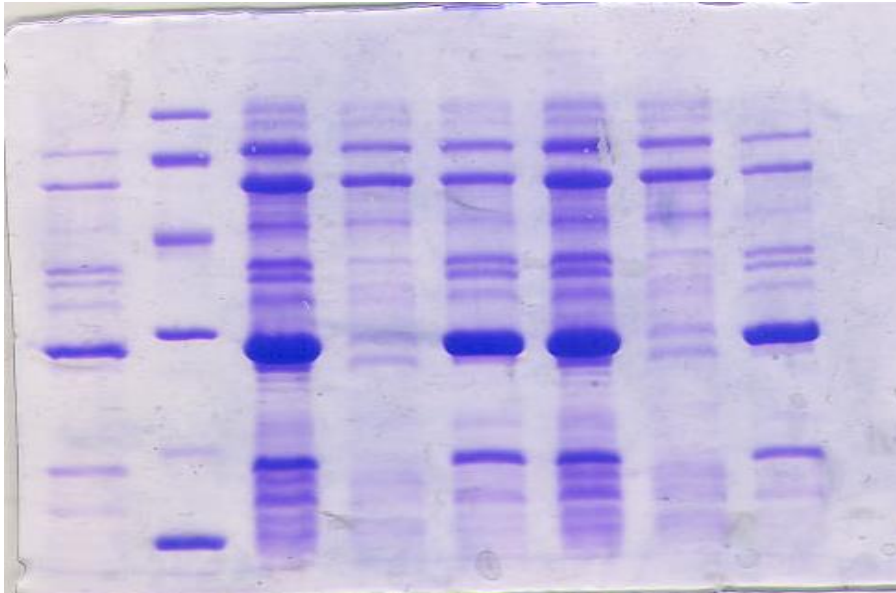
2h: Προσθήκη
0.3 mM IPTG

4h: Προσθήκη
0.1 και 0.2 mM
IPTG

25°C

Εικόνα 31: Ανάλυση σε SDS-PAGE 12,5% όπου απεικονίζεται η επαγωγή του κλώνου 1 στους 25°C με προσθήκη IPTG σε συγκέντρωση 0.3 mM (2h), 0.1 και 0.2 mM (4h και O/N) καθώς και το υπερκείμενο και η πελέτα μετά από sonication.

| | | | | | | | |
|------|---|------|---------|-------|------|---------|-------|
| P 4h | M | O/N | Sup O/N | P O/N | O/N | Sup O/N | P O/N |
| +0.2 | | +0.1 | +0.1 | +0.1 | +0.2 | +0.2 | +0.2 |



O/N:
 Προσθήκη
 0.1 και 0.2
 mM IPTG
 25°C

Εικόνα 32: Ανάλυση σε SDS-PAGE 12,5% όπου απεικονίζεται η επαγωγή του κλώνου 1 στους 25°C με προσθήκη IPTG σε συγκέντρωση 0.1 και 0.2 mM (O/N).

Εικόνες 30, 31, 32: Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) της έκφρασης της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών), υπό διαφορετικές θερμοκρασίες, χρόνους επαγωγής και συγκεντρώσεις IPTG.

Un (uninduced): το δείγμα που συλλέχθηκε πριν να γίνει επαγωγή με x mM IPTG, στους 16°C, στους 28°C και στους 25°C.

2h/4h: το δείγμα που συλλέχθηκε μετά από 2h/4h επαγωγής με x mM IPTG στους 16°C, στους 28°C και στους 25°C.

O/N: το δείγμα που συλλέχθηκε μετά από O/N επαγωγή με x mM IPTG στους 16°C, στους 28°C και στους 25°C.

Sup (supernatant): Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά από τη φυγοκέντρηση που ακολουθεί τη διάρρηξη των κυττάρων με sonication

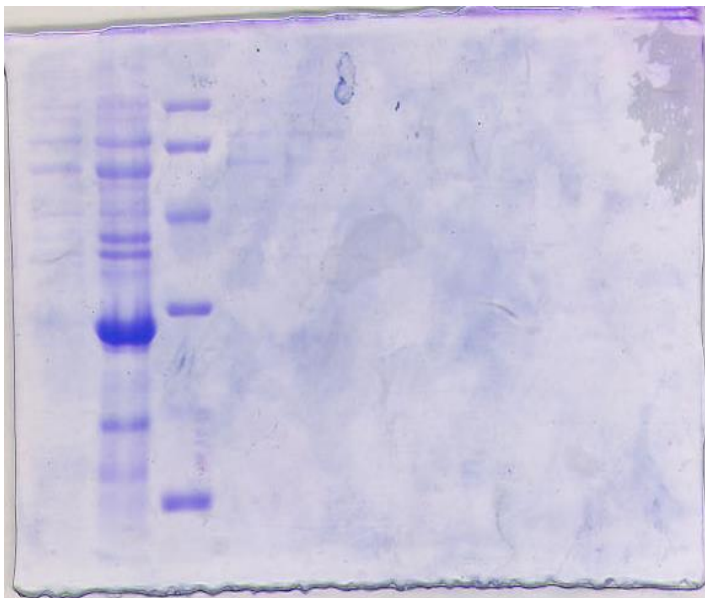
P (pellet): Η πελέτα που προκύπτει μετά από τη φυγοκέντρηση που ακολουθεί τη διάρρηξη των κυττάρων με sonication

Παρατηρείται αρχικά ότι καλύτερη επαγωγή επιτυγχάνεται O/N. Στις 2h έχει γίνει επαγωγή αλλά η μπάνα της πρωτεΐνης μετά βίας ανιχνεύεται στο υπερκείμενο ή την πελέτα (ίδια εικόνα σε αυτά τα δύο). Στις 4h επαγωγής με 0.1 mM IPTG εμφανίζεται πολύ λίγη διαλυτή πρωτεΐνη, με την περισσότερη να πέφτει στην πελέτα (αλλά και πάλι και εκεί δεν υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα). Παρόμοια εικόνα και για την επαγωγή στις 4h με 0.2 mM IPTG, με λίγη διαλυτότητα και ακόμα περισσότερη ποσότητα στην πελέτα. Τέλος, στην O/N επαγωγή σημειώνεται μάλλον περισσότερη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης (αλλά και πάλι όχι ιδιαίτερα ικανοποιητικής), με το μεγαλύτερο μέρος να κατακρημνίζεται στην πελέτα. Βλέπουμε δηλαδή ότι όσο περισσότερη πρωτεΐνη παράγεται, αναλογικά όλο και περισσότερη κατακρημνίζεται.

Τελικά από όλες τις συνθήκες, επιλέχθηκε η ανάπτυξη στους 25°C με O/N επαγωγή με 0.2 mM IPTG.

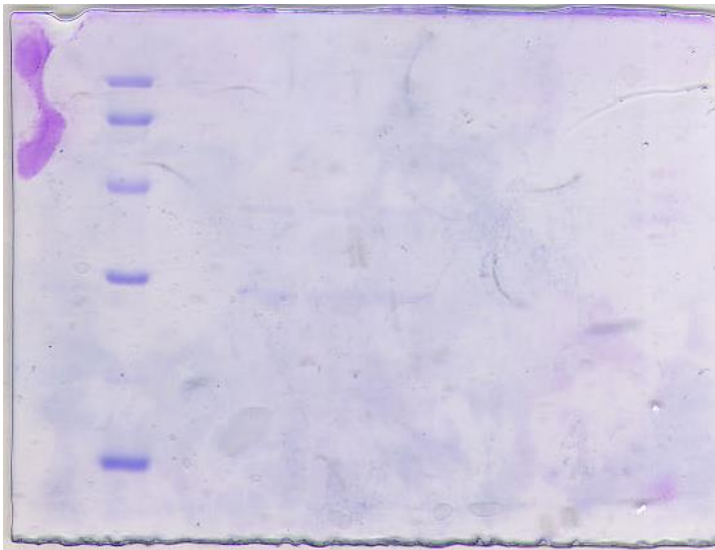
3.15. Καθαρισμός της C-truncated BC2929 (και μετά από επαναδιάλυση πελετών με κολώνα Ni-NTA agarose)

| | | | | | | | | |
|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| S | P | M | FI | W1 | W2 | W3 | E1 | E2 |
|---|---|---|----|----|----|----|----|----|



| |
|---|
| α |
|---|

E3 M E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11



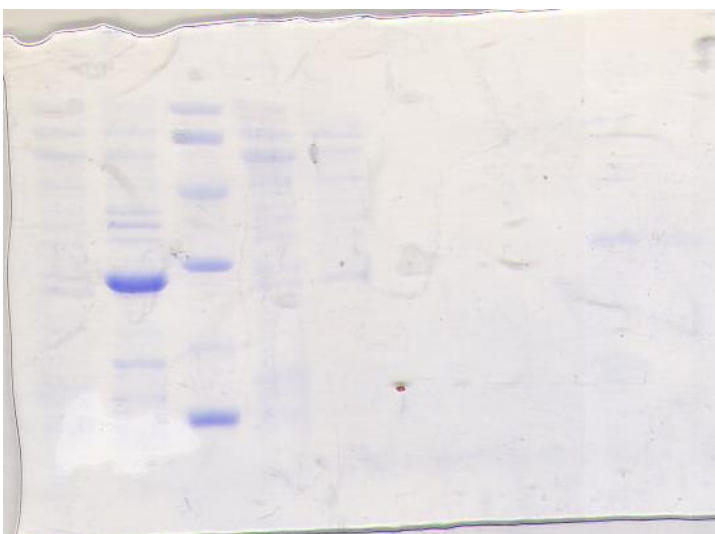
β

Εικόνα 33 (α,β): Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών) από κολώνα Ni-NTA αгарόζης (1^{ος} καθαρισμός).

Οι συμβολισμοί είναι οι ίδιοι με αυτούς που περιγράφηκαν νωρίτερα.

Στην **Εικόνα 33 (α,β)** αχγοφάνεται ότι η C-truncated BC2929 εκλούεται στα διαλύματα έκλουσης 5-7 (E5-E7), αλλά η ποσότητα είναι υπερβολικά μικρή, πιθανόν της τάξεως των ng. Φαίνεται ότι όλη η πρωτεΐνη έχει καρακρημνιστεί στην πελέτα, οπότε δοκιμάστηκε να επαναδιαλυθούν οι 3 πελέτες που είχαν μείνει, σε 75ml Lysis Buffer, και μετά από sonication να ξαναγίνει καθαρισμός σε κολώνα Ni-NTA agarose.

S P M FI W1 W2 W3 E1 E2 E3



α

M E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11



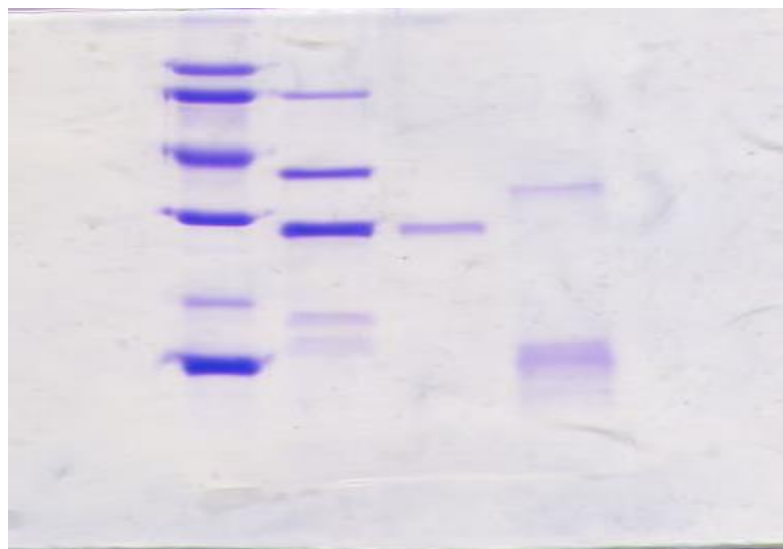
β

Εικόνα 34 (α,β) : Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της C-truncated BC2929 από κολώνα Ni-NTA αγαρόζης, μετά από επαναδιάλυση πελετών και εκ νέου sonication (2^{ος} καθαρισμός).
Οι συμβολισμοί είναι οι ίδιοι με αυτούς που περιγράφηκαν νωρίτερα.

Ίδια εικόνα παρουσίασε ο καθαρισμός και σε αυτή την περίπτωση, με απειροελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης να διακρίνεται. Τελικά συλλέχθηκαν τα Elutions 5-7 από τον 1^ο καθαρισμό και τα Elutions 5-6 από το 2^ο καθαρισμό, ενοποιήθηκαν και πέρασαν από dialysis. Κατά τη συμπύκνωση του διαλύματος γύρω στα 4ml, αυτό θόλωσε καθώς μάλλον κατακρημνίστηκε η πρωτεΐνη, συνεπώς προστέθηκε 10% γλυκερόλη, και έμεινε υπό ανάδευση O/N, σε ψυχόμενες συνθήκες.

3.16. Κατάσταση της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερονών) παρουσία γλυκερόλης

| | | | |
|---|---|-----------|--------|
| M | Δ | β' κορυφή | BC2929 |
|---|---|-----------|--------|



Εικόνα 35: Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) της κατάστασης της C-truncated BC2929 μετά την προσθήκη 10% γλυκερόλης.

M: Μάρτυρας

Δ: Δείγμα από το διάλυμα πρωτεΐνης με γλυκερόλη

β' κορυφή: Δείγμα από παλαιότερα απομονωμένο πληθυσμό

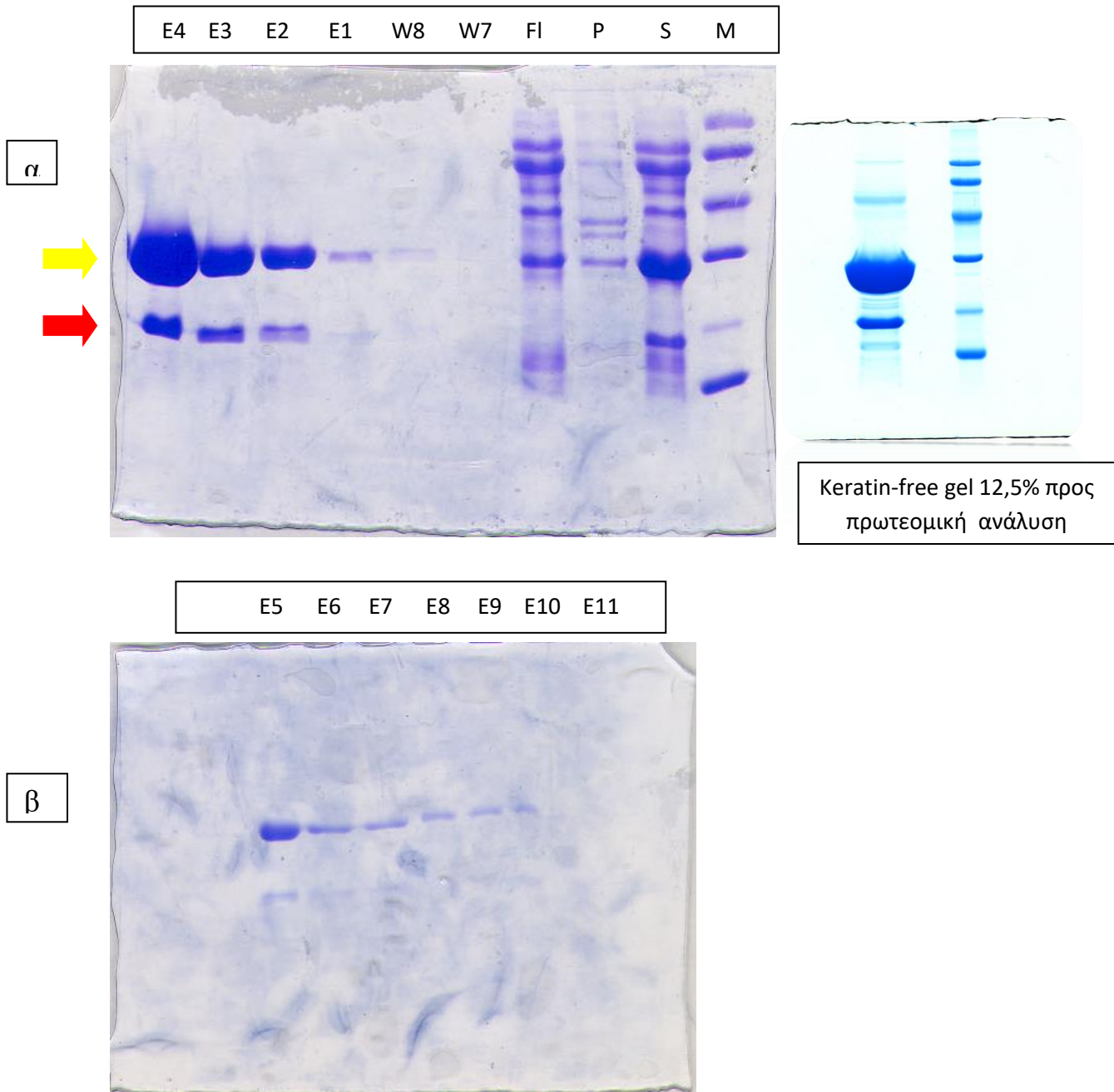
BC2929: Δείγμα από παλαιότερα καθαρισμένη C22929 μετά από κολώνα Ni-Nta agarose

Ενώ το δείγμα φαινόταν θολό και με τη γλυκερόλη, μετά από ανάδευση έγινε σχετικά διαυγές, καθώς η γλυκερόλη δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας για πολλές πρωτεΐνες. Παρατηρείται η μπάντα που αντιστοιχεί στη C-truncated BC2929 (λίγο πιο κάτω από αυτή της ολόκληρης BC2929), σε ικανοποιητική ποσότητα. Ωστόσο, φαίνονται καθαρά και οι τσαπερόνες που τη συνοδεύουν, και συγκεκριμένα οι GroEL, DNAJ και GroES. Δείγμα αυτής μετά από dialysis (διότι η γλυκερόλη επηρεάζει την ενζυμική ενεργότητα), σε συγκέντρωση 0,52 mg/ml, δόθηκε για activity assay.

Δε βρέθηκε ενεργότητα καθώς η C-truncated BC2929 φέρει το N-τελικό άκρο το οποίο μετά από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, εικάζεται ότι εμπλέκεται στον

πολυμερισμό. Έχει δειχθεί επίσης ότι οι μεγαλομοριακές ενώσεις και τα πολυμερή, δεν παρουσιάζουν ενεργότητα.

3.17. Καθαρισμός της C-truncated BC2929 υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία ουρίας)



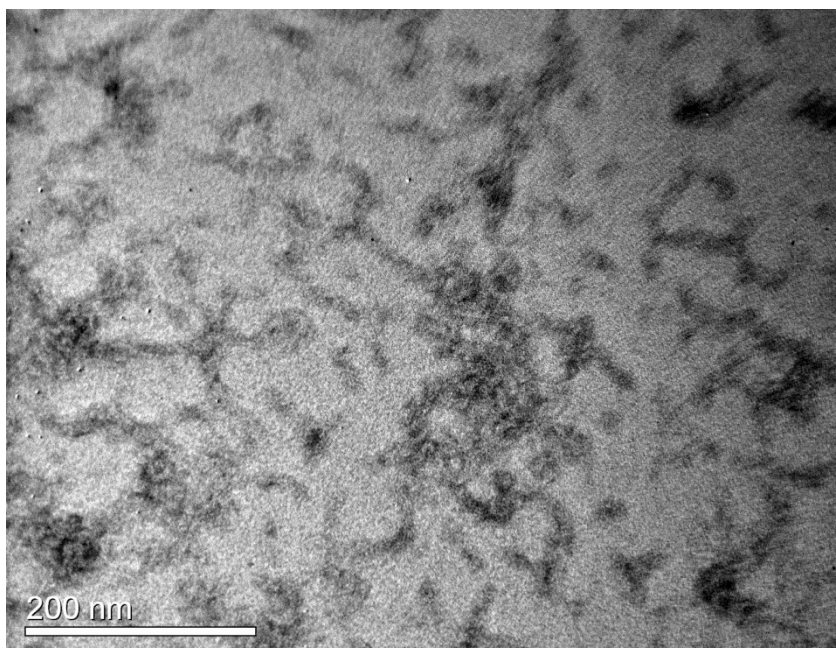
Εικόνα 36 (α,β) : Ανάλυση σε SDS-PAGE (12,5%) του καθαρισμού της C-truncated BC2929 υπό αποδιατακτικές συνθήκες από κολώνα Ni-NTA αгарόζης.

Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με σταδιακά μειούμενη συγκέντρωση ουρίας και refolding πάνω στην κολώνα. Οι συμβολισμοί έχουν περιγραφεί παραπάνω. Με κίτρινο βελάκι επισημαίνεται η C-truncated BC2929 ενώ με κόκκινο βελάκι επισημαίνεται η μάντα που μάλλον αντιστοιχεί σε πρωτεόλυση της πρωτεΐνης.

Στόχος του καθαρισμού υπό αποδιατακτικές συνθήκες ήταν να γίνει σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης πάνω στην κολώνα Ni-NTA agarose, μετά την αποδιάταξη, καθώς και η απομάκρυνση των τσαπερονών. Μετά από επεξεργασία και διάρρηξη των κυττάρων με υπερήχους, παρουσία ουρίας, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης (Sample) εμφανίζεται ως διαλυτό, σε πολύ ικανοποιητική ποσότητα ενώ ένα μικρό μόνο μέρος της C-truncated BC2929 εντοπίζεται στην πελέτα. Παρατηρείται κάποια απώλεια πρωτεΐνης καθώς απομακρύνεται με το Flowthrough ένα μέρος της που δεν προσδένεται και ένα μικρό μέρος με το Wash 8, λόγω σχετικά ασθενούς πρόσδεσης παρουσία 50 mM Ιμιδαζολίου σε αυτό. Είναι αξιοσημείωτη η πάρα πολύ μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης που εκλύεται, ειδικά στα διαλύματα έκλυσης 2-4 (E2-E4), με κορύφωση στο Elution 4. Φυσιολογικά, όπως βλέπουμε, η έκλυση σταδιακά αυξάνεται και έπειτα μειώνεται. Συνολικά η πρωτεΐνη εκλύεται στα Elutions 1-Elution 10. Ωστόσο, το γεγονός ότι κάτω από τη μπάντα της πρωτεΐνης εκλουόταν και άλλη μια μπάντα μας έβαλε σε σκέψεις. Το γεγονός ότι αυξανόταν εκθετικά η μπάντα, υποψιάζει ότι πρόκειται για πρωτεόλυση. Για να ταυτοποιηθεί αυτή η μπάντα, τρέχθηκε δείγμα από το Elution 4 σε gel 12,5% keratin-free και δόθηκε για πρωτεομική ανάλυση στις εγκαταστάσεις Πρωτεομικής (Profi), I.T.E. Μάλιστα, με την πιο αναλυτική χρώση με Silver staining, ή ίσως λόγω αυξανόμενης πρωτεόλυσης, εμφανίστηκαν επιπλέον μπάντες, που όμως δε θα ταυτοποιηθούν. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν έχουν γνωστοποιηθεί ακόμα. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι ειδικά τα Elutions 3 και 4, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεΐνης εμφάνισαν μια έντονα ιξώδη μορφή, που θύμιζε υδρογέλη. Επιπλέον, δόθηκε δείγμα μετά από dialysis του Elution 2 για activity assay (συγκέντρωση 2,83 mg/ml) αλλά πάλι δεν υπήρχε ενεργότητα. Το Elution 2 μετά από το dialysis, συμπυκνώθηκε έως τα 7,5 mg/ml (1,4 ml) και αν και ήταν θολό και κάπως πηκτό, δείγμα δόθηκε για παρατήρηση με TEM.

Η έκφραση επαναλήφθηκε και δείγμα δόθηκε για ανάλυση MALS αλλά δεν ήταν δυνατόν να γίνει μέτρηση επειδή κυριαρχούσαν τα aggregates.

3.18. Παρατήρηση του ιζήματος της C-truncated BC2929 (παρουσία τσαπερών) με μικροσκοπία TEM



Εικόνα 37: Παρατήρηση του ιζήματος της C-truncated BC2929.

Η παρατήρηση με τη μικροσκοπία TEM έδειξε δομές όχι τόσο καλά οργανωμένων όπως την προηγούμενη φορά, όπου διακρίνονταν πιθανές δομές ινιδίων με υπομονάδες σα χάντρες. Τώρα έμοιαζε σαν άμορφη μάζα. Αυτό σημαίνει ότι το C-τελικό άκρο ίσως επηρεάζει το σχηματισμό των πιθανών ινιδίων.

3.19. Επίδραση του pH στη συμπεριφορά της C-truncated BC2929

Το elution 5 υποβλήθηκε σε dialysis υπό διαφορετικές συνθήκες pH: α) 20 mM Mes, 200 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH 6.7, β) 20 mM Acetate, 200 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH=4 και γ) 20 mM glycine, 200 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH=9. Παρατηρήθηκε ότι όσο πιο μικρό είναι το pH (δηλαδή στο pH=4), τόσο πιο θολό είναι το δείγμα, στο pH= 6,7 είναι λιγότερο θολό και pH=9 γενικά διαυγές. Δεν παρατηρήθηκε λοιπόν κάποια ιδιαίτερη βελτίωση βάσει του pH οπότε διατηρήθηκε η ρύθμιση του pH στο 7,6, όπως πριν.

4. Συζήτηση

Σύμφωνα με την ταξινόμηση Henrissat, οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών όπως είναι η πεπτιδογλυκάνη, η χιτίνη, και ο παράγοντας σχηματισμού ροζιδίων (NodB) ανήκουν στην οικογένεια 4 των Εστερασών Υδρογονανθράκων (CE-4), από τις συνολικά 16 οικογένειες-CE1 έως CE16- βάσει της αλληλουχιακής τους ομολογίας. Η οικογένεια CE-4 περιλαμβάνει: τις απακετυλάσες της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) 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). Το γονιδίωμα του *Bacillus cereus* έχει βρεθεί ότι περιέχει ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό απακετυλιωμένων καταλοίπων Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης. Πράγματι, το γονιδίωμα του *Bacillus cereus* ATCC 14579, καθώς και το γονιδίωμα του στενού του συγγενή *Bacillus anthracis str. Ames* (ομολογία γύρω στο 90%), περιέχει 11 απακετυλάσες πολυσακχαριτών (BC0171, BC0361, BC0467, BC1768, BC1960, BC1974, BC2929, BC3146, BC3618, BC3804 και BC5204), εκ των οποίων οι έξι είναι πιθανές απακετυλάσες Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης (BC1960, BC1974, BC2929, BC3146, BC3618 και BC5204). Δεν είναι ακόμα γνωστό και κατανοητό, γιατί περιέχει τόσο μεγάλο αριθμό απακετυλασών καθώς ο φυσιολογικός τους ρόλος βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση, αλλά πιθανόν να οφείλεται στο ότι υπάρχει μια αλληλοσυμπλήρωση μεταξύ των λειτουργιών τους. Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε βασισμένη στη BC2929, λόγω της ιδιαιτερότητας που εμφανίζει σε σχέση με τις υπόλοιπες απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης (ειδικά του *Bacillus cereus*). Αυτές οι ιδιαιτερότητες περιλαμβάνουν: την πειραματική παρατήρηση ότι εμφανίζει μια τάση ολιγομερισμού, το γεγονός ότι φέρει ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser) (που φέρει μια υδροξυλομάδα στη δομή της) στο ενεργό κέντρο αντί για την υψηλά συντηρημένη (υδοξυλιωμένη) προλίνη (Pro), όπως προκύπτει μετά από σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας με άλλες καλά μελετημένες απακετυλάσες πολυσακχαριτών, και την πιθανή εμπλοκή της στη δημιουργία των βιοϋμενίων (εφόσον η κατά 94% ομόλογή της, BA2944 από το *Bacillus anthracis*, βρέθηκε ότι εκκρίνεται και εντοπίζεται στον ουδέτερο πολυσακχαρίτη όπου πιθανόν τον τροποποιεί). Πραγματοποιήθηκε λοιπόν υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης BC2929 στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3) παρουσία πλασμιδίου που έφερε ένα «μπαλέτο» τσαπερονών και στο στέλεχος JM109 υπό native συνθήκες (χωρίς τις τσαπερόνες), όπου παρατηρήθηκε ότι η διαλυτότητα της πρωτεΐνης ήταν παρόμοια και κυμαινόταν σε μέτριο επίπεδο. Ωστόσο προτιμήθηκε το στέλεχος JM109 διότι έτσι και αλλιώς στην πορεία απαιτείται η απομάκρυνση των τσαπερονών, ειδικά για την

πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων. Στην πρώτη περίπτωση όπου το δείγμα ήταν και πιο αραιό, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία διαπερατότητας (gel filtration) σε στήλη Sephacryl S200, που ήταν ήδη βαθμονομημένη με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους, οπότε και υποτέθηκε ότι προέκυπταν διαφορετικοί πληθυσμοί (μεγαλομοριακά σύμπλοκα στο void και δύο ακόμη πληθυσμοί με διαφορετικές καταστάσεις ολιγομερισμού). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι δε μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια το η κατάσταση του ολιγομερισμού, π.χ. το αν υπάρχουν διμερείς και μονομερείς πληθυσμοί, λόγω του τρόπου έκλουσης από την κολώνα. Μάλιστα μετά από καθαρισμούς που πραγματοποιήθηκαν για παράλληλα πειράματα από άλλα μέλη, διαπιστώθηκε ότι η BC2929 είναι ασταθής και δεν τρέχει σε σφαιρική πρωτεΐνη καθώς δεν παρουσιάζει μια συγκεκριμένη συμπεριφορά: κάθε φορά εμφανίζει μεν παρόμοια εικόνα με τρεις κορυφές, ωστόσο όσον αφορά τη δεύτερη και τρίτη κορυφή βγαίνουν σε διαφορετικά μοριακά βάρη σε κάθε πείραμα, που δεν αντιστοιχούν υπολογιστικά πάντοτε σε διμερή και μονομερή. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι δε μπόρεσε να γίνει μέτρηση ούτε με MALS σε δείγμα που είχε αποδιαταχθεί και επαναδιαταχθεί, διότι εμφάνιζε έντονο aggregation. Ωστόσο, σε μετέπειτα πειράματα από το εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας με τη BC2929 που έφερε μια σημειακή μετάλλαξη, μετρήθηκαν με MALS οι δύο κορυφές και δείχθηκε η παρουσία μιγμάτων διμερών και τριμερών καθώς και μονομερών πληθυσμών. Έπειτα, δείγμα από τις κορυφές β' και γ', δόθηκε για μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας και διαπιστώθηκε ότι ουσιαστική ενεργότητα επεδείκνυαν μόνο οι πληθυσμοί που εκλούονταν ως β' κορυφή. Αυτό ίσως να οφείλεται είτε στο ότι το ενεργό κέντρο μένει ελεύθερο και είναι πιο εύκολα προσβάσιμο για το υπόστρωμα σε αυτή την κατάσταση ολιγομερισμού είτε γιατί σχετίζεται με το uptake του μετάλλου, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει βρεθεί χαμηλή συγκέντρωση μετάλλου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε κάθε άλλη περίπτωση που πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας της ανασυνδυασμένης BC2929, βέβαια χωρίς να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός πληθυσμών με gel filtration λόγω της έντονης συσσωμάτωσης (aggregation) και κατακρήμνισης που παρουσίαζε η πρωτεΐνη, δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα απακετυλάσης. Αυτό βέβαια ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι στο δείγμα της καθαρισμένης μετά από κολώνα Ni-NTA agarose, BC292, υπερίσχυε ο μεγαλομοριακός πληθυσμός που δεν είναι ενεργός και ίσως επικάλυπτε την όποια ενεργότητα θα μπορούσε να παρατηρηθεί σε τυχόν πληθυσμό της β' κορυφής.

Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι τα άκρα μιας πρωτεΐνης πιθανόν να εμπλέκονται στην εμφάνιση ολιγομερισμού. Επίσης, η εκτίμηση ότι (τα N- και) C- τελικά άκρα είναι

ιδιαίτερα ευέλικτα σε συνδυασμό με παρατηρήσεις των πιθανών δομών ινιδίων με TEM, οδήγησαν στην υπόθεση ότι το C-τελικό άκρο ίσως να εμπλέκεται στη δημιουργία των πιθανών ινιδίων. Έτσι δημιουργήθηκαν δύο νέα construct: ένα με το τροποποιημένο ανασυνδυασμένο γονίδιο της BC2929, από όπου απουσίαζε το C-τελικό άκρο (C-truncated BC2929) και ένα όπου απουσίαζε το N-τελικό άκρο (N-truncated BC2929). Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήθηκε η C-truncated BC2929 όπου παρατηρήθηκε ακόμα μικρότερη διαλυτότητα της πρωτεΐνης με ενδείξεις πρωτεόλυσης, σε αντίθεση με την ολόκληρη BC2929 (με και χωρίς τσαπερόνες) όπου δεν παρατηρήθηκε πρωτεόλυση και επίσης με τη N-truncated BC2929, όπου η διαλυτότητα αυξήθηκε. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι η αλληλουχία στο N-τελικό άκρο ευνοεί τη δημιουργία του πολυμερισμού μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων ενώ το C-τελικό άκρο ίσως να εμπλέκεται στη δημιουργία των δομών που μοιάζουν με ινίδια. Αρχικά οι παρατηρούμενες δομές που ενδεχομένως να αντιστοιχούν σε ινίδια, της ολόκληρης ανασυνδυασμένης BC2929, που σε πολλά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν ορατά ακόμα και με γυμνό μάτι, παρουσιάζονταν με παρατήρηση μέσω TEM ως μια οργανωμένη δομή αποτελούμενη από μικρές σφαίρες, σα «χάντρες κομπολογιού». Στη C-truncated BC2929 όμως, παρατηρήθηκε μια άμορφη, λιγότερο καλά οργανωμένη δομή, που σημαίνει ότι είχε επηρεαστεί η δομή των πιθανών ινιδίων και ότι το C-τελικό άκρο ίσως να εμπλέκεται στο σχηματισμό αυτών. Ωστόσο, να σημειωθεί πως εκκρεμούν πειράματα από ειδικούς για να διαπιστωθεί αν όντως πρόκειται για ινίδια. Από την άλλη, στη N-truncated BC2929 παρατηρήθηκαν παρόμοια εικόνα μετά τη gel filtration όπου εμφανίστηκαν οι τρεις κορυφές, όμως αυτή τη φορά υπερίσχυε μερικώς ο πληθυσμός της τρίτης κορυφής, ο οποίος εμφάνιζε ενεργότητα απακετυλάσης.

Υπάρχουν αρκετές έρευνες που υποστηρίζουν ότι απακετυλάσες πολυσακχαριτών εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στο σχηματισμό βιοϋμενίων. Για παράδειγμα, η κυτταροπλασματική απακετυλάση HfsH του *Caulobacter crescentus*, εικάζεται ότι απακετυλιώνει μια πολυσακχαριτική προσκολλητίνη του εξωπολυσακχαρίτη “holdfast” (ο οποίος πιθανώς αποτελείται από β-1,4 συνδεδεμένα κατάλοιπα GlcNAc), δρώντας στο επίπεδο των προδρόμων πολυσακχαριτών, επηρεάζοντας έτσι τις προσκολλητικές και συνεκτικές ιδιότητες του εξωπολυσακχαρίτη ως προς τις επιφάνειες [68]. Στον *Actinomyces oris* K20 πιθανολογείται ότι μια απακετυλάση πολυσακχαριτών επηρεάζει το ηλεκτρικό φορτίο της κυτταρικής επιφάνειας, συνεισφέροντας στη διατήρηση των δικτυωτών δομών που σχηματίζονται στην επιφάνεια του μικροοργανισμού (που αποτελούνται από εξωπολυσακχαρίτη) και έτσι σχετίζεται με το σχηματισμό της πλούσιας σε μαννόζη

βιοϋμενίου [69]. Στη *Pseudomonas aeruginosa*, η πολυσακχαρική απακετυλάση PelA, είναι μάλλον μια περιπλασματική πρωτεΐνη που απακετυλιώνει κάποιες μορφές της πολυ-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (PNAG) και σχετίζεται με τη βιοσύνθεση ενός από τους τρεις εξωσακχαρίτες της, του Pel, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό των βιοϋμενίων [70]. Στη *Bordetella bronchiseptica*, η απακετυλάση BpsB είναι επίσης μια περιπλασμική πρωτεΐνη που απακετυλιώνει την πολυ-β-1,6-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη και εμπλέκεται και αυτή με τη σειρά της στη βιοσύνθεση ενός εξωπολυσακχαρίτη, του Bps, και συνεπώς έχει και αυτή σχέση με τα βιοϋμενία [50]. Ακόμα και απακετυλάσες ιστονών έχει βρεθεί ότι ευθύνονται για τη διασπορά του βιοϋμενίου στη *Candida albicans* και την ανθεκτικότητα σε φάρμακα [71]. Στο *Staphylococcus epidermidis*, η προσκολλημένη στην κυτταρική μεμβράνη, πρωτεΐνη IcaB, είναι υπεύθυνη για την απακετυλίωση της πολυσακχαρικής ενδοκυτταρικής προσκολλητίνης (PIA) σε τυχαίες θέσεις (η οποία παράγεται υπό τη μορφή ινωδών κλώνων στην κυτταρική επιφάνεια και είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για το σχηματισμό των βιοϋμενίων) και με αυτό τον τρόπο την εξασφάλιση του εντοπισμού της προσκολλητίνης στην επιφάνεια [72]. Γενικά, στο *Staphylococcus epidermidis*, η απακετυλίωση των εξωπολυσακχαριτών έχειδειχθεί να είναι κρίσιμη για το σχηματισμό βιοϋμενίων, τον αποικισμό επιφανειών, την ανθεκτικότητα στη φαγοκυττάρωση από ουδετερόφιλα, και την ανθεκτικότητα σε κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτιδία (AMPs) [66]. Τα γονίδια της οικογένειας HmsF στη *Yersinia pestis*, κωδικοποιούν μια επικράτεια απακετυλίωσης πολυσακχαριτών, που φαίνεται να εμπλέκεται στη σύνθεση και την τροποποίηση των EPS των βιοϋμενίων [73]. Από την άλλη, ο σχηματισμός βιοϋμενίων στο *Bacillus subtilis* βασίζεται στη συσσωμάτωση μιας ινώδους σκαλωσιάς που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη TasA. Αυτή πολυμερίζεται σε υψηλά σταθερές ίνες (πλούσιες σε b-sheets και με υψηλή ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση ή τη μετουσίωση) με τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά λειτουργικών αμυλοειδών, μέσω της βοήθειας της βοηθητικής πρωτεΐνης TapA, που φέρει μια αλληλουχία 8 κρίσιμων αμινοξικών καταλοίπων στο N-τελικό άκρο (χάρη σε αυτά επιτυγχάνεται πιθανόν είτε η αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων TapA είτε μεταξύ μορίων TapA και TasA). Οι ίνες της TasA χρησιμοποιούνται από το *B. subtilis* για να φτιαχτεί ένα δίκτυο που συνδέει κύτταρα και ίσως οργανώνει τα υπόλοιπα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας [74].

Η σύγκριση ωστόσο μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών αυτών των απακετυλασών με τη BC2929 δε φαίνεται να έδωσε σημαντικές πληροφορίες, ενώ υπήρχε σχετικά μικρό ποσοστό ομολογίας μεταξύ αυτών.

Λειτουργικές ίνες που μοιάζουν με αμυλοειδή έχουν βρεθεί σε πολλά βακτηριακά είδη όπως *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces coelicolor*, και *Staphylococcus aureus*, και μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων, στην προσκόλληση σε επιφάνειες ξενιστών, στο σχηματισμό βιοϋμενίων ή στη δημιουργία αέριων δομών [74]. Για να πολυμεριστούν και να σχηματιστούν τα αμυλοειδή, περνούν από μια κοινή προοδευτική διαδικασία που περιλαμβάνει αρχικά τη σύνθεση της πρωτεΐνης ως διαλυτά πολυμερή και έπειτα τη συσσωμάτωση αυτών των μονομερών μέσα από διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης. Τελικά παράγονται οργανωμένες σταθερές ίνες [74].

Με βάση όλα τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η απακετυλάση της πολυσακχαριτών BC2929: α) εμφανίζει ινώδεις μορφές, η εμφάνιση των οποίων οφείλεται ενδεχομένως στις ιδιότητες ολιγομερισμού ή υψηλότερης τάξης πολυμερών, β) ο εντοπισμός της ομόλογης της BA2944 στον ουδέτερο πολυσακχαρίτη όπου και φαίνεται να τον τροποποιεί, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι και αυτή εικάζεται να είναι μια εκκρινόμενη στο περίπλασμα πρωτεΐνη, ενισχύει την άποψη ότι πιθανώς να δρα σε κάποιο πολυσακχαρίτη (πέραν της πεπτιδογλυκάνης), όπως και οι προαναφερθείσες περιπλασματικές απακετυλάσες εξωπολυσακχαριτών. Αδημοσίευτα αποτελέσματα από πειράματα ανοσοφθορισμού έχουν δείξει ότι το C-truncation επηρεάζει τα βιοϋμένια, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη εμπλέκεται άμεσα σε αυτά, ωστόσο αν αποδειχθεί ότι συμμετέχει άμεσα στα βιοϋμένια, θα εμπλέκεται στο σχηματισμό τους, και γ) εφόσον υπάρχουν διαφορετικά στάδια ολιγομερισμού, ίσως αυτά να είναι απαραίτητα για την εκδήλωση της ενεργότητας απακετυλάσης.

Για την καλύτερη κατανόηση των παραπάνω χαρακτηριστικών, σημαντικό ρόλο θα παίξει η επίλυση της δομής της BC2929 μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X, ώστε να υπάρχει μια ξεκάθαρη εικόνα της διάταξης του μορίου στο χώρο και των πιθανών κρίσιμων αμινοξικών καταλοίπων, η εμπλοκή των οποίων θα μπορέσει να επιβεβαιωθεί μέσω μεταλλάξεων. Φυσικά απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει αυτό, είναι να βελτιωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης και έτσι να δοκιμαστούν και άλλες πιθανές συνθήκες κρυστάλλωσης. Ίσως επίσης η πρόσφατα λυμένη δομή (2017) της BC1974, με την οποία εμφανίζει 67% ομολογία, να δώσει μια εικόνα για την πιθανή δομή της BC2929, ώστε να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μεταλλάξεις για να αυξηθεί η σταθερότητα του μορίου. Σκοπός λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής ήταν ο βιοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός της εν λόγω απακετυλάσης, προκειμένου να διαλευκανθούν: α) οι ιδιότητες της BC2929 και ειδικά ο σχηματισμός ολιγομερισμού και η δημιουργία συσσωματωμάτων και β) μέσα από τη δομή, τις αλλαγές

που προκαλεί στο ενεργό κέντρο η ύπαρξη της Ser αντί για την Pro και γ) ο συσχετισμός της ενεργότητας με διάφορες μορφές ολιγομερισμού. Αυτές οι πληροφορίες θα έδιναν σημαντικά στοιχεία για τον τρόπο δράσης των απακετυλασών πολυσακχαριτών της οικογένειας CE4, θα βοηθούσαν στην κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της ίδιας της πρωτεΐνης αλλά και της ομόλογής της, BA2944, αλλά και στην περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού της υδροξυλίωσης.

5. Βιβλιογραφία

1. Auer GK, Weibel DB. Current Topic / Perspective Bacterial cell mechanics Department of Biochemistry 440 Henry Mall. 2017. doi:10.1021/acs.biochem.7b00346.
2. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):149-167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x. micb. 2017.01264.
3. Boneca IG. The role of peptidoglycan in pathogenesis. 2005:46-53. doi:10.1016/j.mib.2004.12.008. Dajkovic A, Tesson B, Chauhan S, et al. Hydrolysis of Peptidoglycan is Modulated by Amidation of *meso*-Diaminopimelic Acid and Mg²⁺ in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2017;0:1-17. doi:10.1111/mmi.13673.
4. van Teeseling MCF, de Pedro MA, Cava F. Determinants of bacterial morphology: From fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL):1-18. doi:10.3389/fmicb.2017.01264.
5. Liu Y, Breukink E. The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. Vollmer W, ed. *Antibiotics.* 2016;5(3):28. doi:10.3390/antibiotics5030028.
6. Rajagopal M, Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;404:1-44. doi:10.1007/82_2015_5021.
7. Chapot-Chartier M-P, Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact.* 2014;13(Suppl 1):S9. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
8. Muchová K, Wilkinson AJ, Barák I. Changes of lipid domains in *Bacillus subtilis* cells with disrupted cell wall peptidoglycan. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;325(1):92-98. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02417.x.

9. Kim S. J., Chang J. SM. Peptidoglycan Architecture of Gram-positive Bacteria by Solid State NMR. *Biochim Biophys Acta*. 2015 January ; 1848(0): 350–362. doi:10.1016/j.bbamem.2014.05.031.
10. Holtje J V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(1):181-203. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9529891&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/BD8E9261-9BAE-4B12-BB40-30AC47E4473E>.
11. Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):287-306. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00088.x.
12. Araki, Y., Fukuoka, S., Oba, S., and Ito, E. (1971) Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in peptidoglycan of *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem Biophys Res Commun.*, 45:751758.
13. Ryan KJ; Ray CG, eds. (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
14. Dimitris Charalampopoulos; Robert A. Rastall (12 August 2009). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science & Business Media. pp. 627–. ISBN 978-0-387-79057-2.
15. “*Bacillus cereus*.” United States Food and Drug Administration, Center for food safety and applied nutrition (FDA). Accessed August 18, 2007.
16. 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
17. 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.
18. 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.
19. Wijman J. G. E., de Leeuw P. P. L. A., Moezelaar R., Zwietering M. H. , Abee T.. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* March 2007 vol. 73 no. 5 1481-1488
20. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., ture 423: 87-91. *Mol. Biol.* In press.the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, D.S.D., Overbeek, R. and Kyrpides, N. (2003)

- Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423:87-91
21. Dixon, T.C., et al., Anthrax. *N Engl J Med*, 1999. 341(11): p. 815-26.
 22. Rubin AL. Microbial Pest Control Agents: Use Patterns, Registration Requirements, and Mammalian Toxicity. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. ; 2010:441-461. doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00013-6.
 23. Gomes IB, Meireles A, Gonçalves AL, et al. Standardized reactors for the study of medical biofilms: a review of the principles and latest modifications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;0(0):1-14. doi:10.1080/07388551.2017.1380601.
 24. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. 2009:2535-2554. doi:10.3390/molecules14072535.
 25. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. 2017;(6):272-275. doi:10.1111/apm.12686.
 26. Hall-stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. BACTERIAL BIOFILMS : FROM. 2004;2(February). doi:10.1038/nrmicro821.
 27. Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA. TH RE Biofilms : an emergent form of bacterial life. *Nat Publ Gr*. 2016;14(9):563-575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.
 28. Mattei MR, Pechaud Y. Mathematical Biology Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure : a review. 2017. doi:10.1007/s00285-017-1165-y.
 29. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. 2017. doi:10.3390/microorganisms5020015.
 30. Dr Rowson C., Dr Townsend R.. Control D. Biofilms: prevention and treatment. *British Journal of Hospital Medicine*. 2016;77(12):699-703.
 31. Guillhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol Microbiol*. 2017 Jul;105(2):188-210. doi: 10.1111/mmi.13698.
 32. Tallawi M, Lieleg O. Biomaterials Science Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges. 2017. doi:10.1039/c6bm00832a.
 33. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001 Jan;147(Pt 1):3-9.
 34. Aldecoa ALI De, Zafra O, González-pastor JE. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. 2017;8(July):1-19. doi:10.3389/fmicb.2017.01390.
 35. Hussain M, Oh DH. Impact of the Isolation Source on the Biofilm Formation Characteristics of *Bacillus cereus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2018 Jan 28;28(1):77-86. doi: 10.4014/jmb.1707.07023.
 36. Jamal M, et al., Bacterial biofilm and associated infections, *Journal of the Chinese Medical Association* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
 37. Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods Enzymol*. 1999;310:523-34.

38. Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Dec;2(6):598-603.
39. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jul;2(7):a000398. doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
40. Vlamakis H, Chai Y, Beaugregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Mar;11(3):157-68. doi: 10.1038/nrmicro2960.
41. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Dec;15(12):740-755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
42. Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, et al. Biofilms and host response – helpful or harmful. 2017:320-338. doi:10.1111/apm.12674.
43. Caufrier F, Martinou A, Dupont C. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. 2003;338:687-692.
44. John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J. Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90: 625-629.
45. Kobayashi K., Sudiarta I P., Kodama T, Fukushima T., Ara K., Ozaki K., Sekiguchi J. Identification and Characterization of a Novel Polysaccharide Deacetylase C (PdaC) from *Bacillus subtilis*. 2012;287(13):9765-9776. doi:10.1074/jbc.M111.329490.
46. Psylinakis E, Boneca IG, Mavromatis K, et al. Peptidoglycan N -Acetylglucosamine Deacetylases from *Bacillus cereus*, Highly Conserved Proteins in *Bacillus anthracis* *. 2005;280(35):30856-30863. doi:10.1074/jbc.M407426200.
47. Blair DE, Aalten DMF Van. Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine. 2004;570:13-19. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.013.
48. Deng DM, Urch JE, ten Cate JM, Rao VA, van Aalten DMF, Crielgaard W. *Streptococcus mutans* SMU.623c codes for a functional, metal-dependent polysaccharide deacetylase that modulates interactions with salivary agglutinin. *J Bacteriol* 2009;191:394-402.
49. Milani CJE, Aziz RK, Locke JB, Dahesh S, Nizet V, Buchanan JT. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae* Printed in Great Britain. 2010:543-554. doi:10.1099/mic.0.028365-0.
50. Little DJ, Bamford NC, Pokrovskaya V, Robinson H, Nitz M, Howell PL. Structural Basis for the De-N-acetylation of Poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine in Gram-positive Bacteria. 2014;289(52):35907-35917. doi:10.1074/jbc.M114.611400.
51. Arnaouteli S, Giastas P, Andreou A, et al. Two Putative Polysaccharide Deacetylases Are Required for Osmotic Stability and Cell Shape Maintenance in *Bacillus*. 2015;290(21):13465-13478. doi:10.1074/jbc.M115.640029.
52. Vollmer W, Tomasz A. The *pgdA* Gene Encodes for a Peptidoglycan N -Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. 2000;275(27):20:20496-20501. doi:10.1074/jbc.M910189199.

53. Fukushima T, Tanabe T, Yamamoto H, et al. Characterization of a Polysaccharide Deacetylase Gene Homologue (pdaB) on Sporulation of *Bacillus subtilis*. 2004;291(3):283-291. doi:10.1093/jb/mvh151.
54. Shaik M, Bhattacharjee N, Bhattacharjee A, Field MJ, Zanotti G. calculations. 2013;(December):1311-1318. doi:10.1002/prot.24497.
55. Fadouloglou VE, Kapanidou M, Nicholas M. research papers Structure determination through homology modelling and torsion-angle simulated annealing : application to a polysaccharide deacetylase from *Bacillus cereus* research papers. 2013:276-283. doi:10.1107/S0907444912045829.
56. Giastas P, Andreou A, Papakyriakou A, Koutsioulis D, Balomenou S, Tzartos SJ, Bouriotis V, Eliopoulos EE. Structures of the Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase Bc1974 and Its Complexes with Zinc Metalloenzyme Inhibitors. *Biochemistry*. 2018 Feb 6;57(5):753-763. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00919.
57. Strunk RJ, Katrina M, Natasha M, Cole KE. Structure determination of BA0150, a putative polysaccharide deacetylase from *Bacillus anthracis*. 2014;(December 2013):156-159. doi:10.1107/S2053230X13034262.
58. Meyrand M, Boughammoura A, Courtin P, Mezange C, Guillot A, ChapotChartier MP: Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 2007, 153(Pt 10):3275–3285.
59. Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., de la Cruz Domínguez-Punaro, M., Harel, J., Bui, N. K., Vollmer, W., and Gottschalk, M. (2008) Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol. Microbiol.* 70, 1120–1135
60. Bernardini M. Characterization of SfPgdA, a *Shigella flexneri* peptidoglycan deacetylase required for bacterial persistence within polymorphonuclear neutrophils. 2012;14:619-627. doi:10.1016/j.micinf.2012.01.009.
61. Benachour, A., Ladjouzi, R., Le Jeune, A., Hébert, L., Thorpe, S., Courtin, P., Chapot-Chartier, M. P., Prajsnar, T. K., Foster, S. J., and Mesnage, S. (2012) The lysozyme-induced peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase PgdA (EF1843) is required for *Enterococcus faecalis* virulence. *J. Bacteriol.* 194, 6066– 6073.
62. Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., et al. (2007) A critical role for peptidoglycan *N*-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 997–1002.
63. G. Wang, A. Olczak, L.S. Forsberg, R.J. Maier, Oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6790e6800.
64. Yang S, Zhang F, Kang J, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1096 protein : gene cloning , protein expression, and peptidoglycan deacetylase activity. 2014;14(1):1-9. doi:10.1186/1471-2180-14-174.
65. Lambert C, Lerner TR, Bui NK, et al. Interrupting peptidoglycan deacetylation during *Bdellovibrio* predator-prey interaction prevents ultimate destruction of prey wall , liberating bacterial-ghosts. *Nat Publ Gr.* 2016;(May):1-19. doi:10.1038/srep26010.

66. Balomenou S, Fouet A, Tzanodaskalaki M, Couture-tosi E, Bouriotis V, Boneca IG. Distinct functions of polysaccharide deacetylases in cell shape, neutral polysaccharide synthesis and virulence of *Bacillus anthracis*. 2013;87(January):867-883. doi:10.1111/mmi.12137.
67. Fadouloglou VE, Balomenou S, Aivaliotis M, et al. An unusual α -carbon hydroxylation of proline promotes active-site maturation. 2017.
68. Wan Z., Brown P. J.B., Elliott E. N., Yves V. Brun. The adhesive and cohesive properties of a bacterial polysaccharide adhesin are modulated by a deacetylase *Mol Microbiol*. 2013 May;88(3): 486–500. doi:10.1111/mmi.12199.
69. Mashimo C, Kamitani H, Nambu T. Identification of the Genes Involved in the Biofilm-like Structures on *Actinomyces oris* K20 , a Clinical Isolate from an Apical Lesion. *J Endod*.2013;39(1):44-48.doi:10.1016/j.joen.2012.08.009.
- 70.Colvin KM, Alnabelseya N, Baker P, Whitney JC, Howell PL, Parsek R. PelA Deacetylase Activity Is Required for Pel Polysaccharide Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.2013;195(10):2329-2339.doi:10.1128/JB.02150-12.
71. Nobile CJ, Fox EP, Hartooni N, et al. A Histone Deacetylase Complex Mediates Biofilm Dispersal and Drug Resistance in *Candida albicans*. 2014;5(3):1-13. doi:10.1128/mBio.01201-14.Editor.
- 72.Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R., and Otto, M. (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279, 54881–54886.
73. Abu Khweek, A., Fetherston, J. D., and Perry, R. D. (2010) Analysis of HmsH and its role in plague biofilm formation. *Microbiology* 156, 1424–1438.
74. Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Functional Analysis of the Accessory Protein TapA in *Bacillus subtilis*. 2014;196(8):1505-1513. doi:10.1128/JB.01363-13.