



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Κλωνοποίηση του γονιδίου BC1534, έκφραση,
απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός του
αντίστοιχου ενζύμου LmbE-1534 (απακετυλάση Ν-
ακετυλυλυκοζαμίνης) απ' τον οργανισμό *Bacillus cereus*.*

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΑΣΙΛΗΣ ΜΠΟΥΡΙΩΤΗΣ
ΔΕΛΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2004

Πρόλογος

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Βασίλη Μπουριώτη, με τον οποίο είχαμε άφογη συνεργασία καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της και τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τις ευκαιρίες που μου έδωσε σε επιστημονικό και ερευνητικό επίπεδο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Μανώλη Ψυλινάκη και το Δημήτρη Κουτσιούλη για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου πρόσφεραν τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Οι 2 αυτοί supervisors με μύησαν πραγματικά στον κόσμο της Βιοτεχνολογίας. Ευχαριστώ επίσης τη Μαίρη Τζανοδασκαλάκη και τη Χρύσα Τσανάκα για τις ευχάριστες στιγμές στον εργασιακό χώρο.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στις Βαρβάρα, Δάφνη, Κατερίνα, Τερέζα, Γεωργία, Βάσω για τις στιγμές ξενοιασιάς που μου χάρισαν καθώς και για τη φιλία που μου έδειξαν.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αδερφική μου φίλη Δέσποινα όχι μόνο για την αμέριστη φιλία και τη συμπαράστασή της αλλά και για τις στιγμές χαράς που μου πρόσφερε τόσο η ίδια όσο και η μικρή της κορούλα, Άννα που κατέχει ιδιαίτερη θέση στην καρδιά μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ για την πραγματικά ανιδιοτελή στήριξη και αγάπη της οικογένειάς μου που εκτός απ'τους γονείς μου, απαρτίζεται απ'τα καταπληκτικά αδέρφια Ηλία, Κυριάκο, Μιχάλη και Κατερίνα.

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και επικεντρώθηκε στη μελέτη μιας απακετυλάσης χιτοολιγομερών από τον οργανισμό *Bacillus cereus*. Ο τελευταίος είναι συγγενικός προς τον *Bacillus anthracis* με τον οποίο εμφανίζει ομοιότητες σε πολλά πρωτεϊνικά μόρια. Το ένζυμο με το οποίο ασχοληθήκαμε ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών LmbE οι οποίες δεν έχουν καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και ο όσο το δυνατόν καλύτερος λειτουργικός χαρακτηρισμός αυτού του ενζύμου, προκειμένου να αποκτήσουμε πληροφορίες τόσο για το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει όσο και για τη βιολογία του *Bacillus anthracis*. Με τον τρόπο αυτό αφενός επιτυγχάνουμε την κατανόηση της βιολογίας του οργανισμού αυτού που έχει χρησιμοποιηθεί ακόμη και ως βιολογικό όπλο (με απώτερο στόχο ίσως και την καταπολέμησή του) και αφετέρου ανακαλύπτουμε ενζυμικούς τρόπους μαζικής παραγωγής γλυκοζαμίνης για διάφορες εφαρμογές.

Abstract

The current project took place in the Enzyme Biotechnology laboratory of the University of Crete. This thesis is focused on a novel *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) deacetylase in *Bacillus cereus*. This organism contains two proteins of the LmbE family which are highly identical (99%) to two proteins of *Bacillus anthracis*. We dealt with one of these two proteins (LmbE-1534) which deacetylates GlcNAc and (GlcNAc)₂ with high specificity. The study of this enzyme will contribute towards understanding of the biology of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In addition an alternative enzymatic process for the production of GlcN can be considered, which finds applications in many areas such as Medicine, Food Industry and Agriculture.

Περιεχόμενα

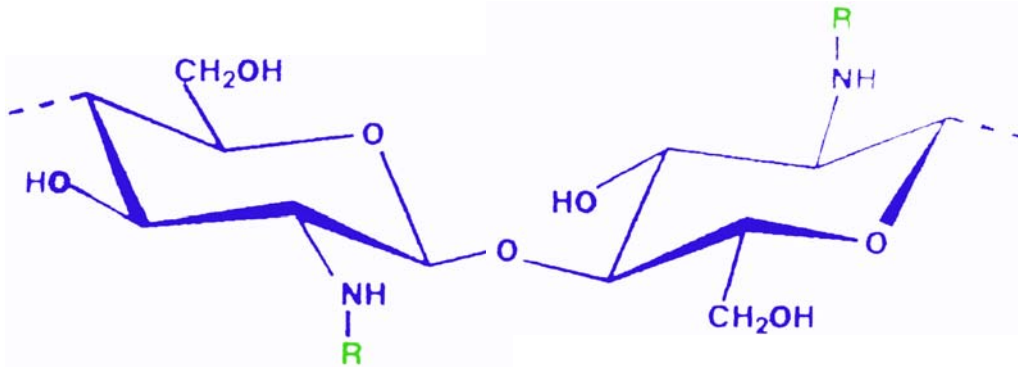
Περίληψη.....	1
1.Εισαγωγή	
1.1 Απακετυλάσες της χιτίνης.....	3
1.2 Μονοπάτι καταβολισμού χιτίνης σε ευκαρυώτες και βακτήρια.....	4
1.3 Μονοπάτι καταβολισμού χιτίνης σε αρχαία.....	5
1.4 LmbE-like πρωτεΐνες.....	7
Σκοπός της εργασίας.....	9
2. Υλικά και Μέθοδοι	
2.1 Υλικά.....	10
2.2 Μέθοδοι	
2.2.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου BC1534.....	10
2.2.2 Υπερέκφραση της ανασυν. πρωτεΐνης LmbE-1534 σε κύτταρα <i>E. coli</i>	10
2.2.3 Απομόνωση της πρωτεΐνης LmbE-1534.....	11
2.2.4 Μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας απακετυλάσης χιτίνης.....	11
2.2.5 Υδρόλυση DNA με περιοριστικά ένζυμα.....	12
2.2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> από πλασμιδιακό φορέα με τη χημική μέθοδο.....	12
2.2.7 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> από πλασμιδιακό φορέα μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης.....	13
2.2.8 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	13
2.2.9 Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση κολώνας QIAquick.....	13
2.2.10 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.....	14
2.2.11 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting).....	14
3. Αποτελέσματα	
3.1 <i>In silico</i> εύρεση της αλληλουχίας BC1534.....	15
3.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης LmbE-1534 σε κύτταρα <i>E. coli</i>	15
3.3 Απομόνωση της LmbE-1534.....	16
3.4 Μελέτη ενζυμικής ενεργότητας της LmbE-1534.....	20
4.Συζήτηση --Προοπτικές.....	23
5. Βιβλιογραφία.....	25

1. Εισαγωγή

1.1 Απακετυλάσες της χιτίνης.

Από τους πιο διαδεδομένους δομικούς πολυσακχαρίτες είναι η κυτταρίνη που συμμετέχει στην κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων των ανώτερων φυτών, η χιτίνη στο σκελετικό υλικό των οστρακόδερμων και οι πεπτιδογλυκάνες στα βακτηριακά κύτταρα και τους συνδετικούς ιστούς των ζώων (1). Οι φυσικοί πολυσακχαρίτες βρίσκουν ήδη σημαντικές εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως η βιοτεχνολογία, η ιατρική, η φαρμακευτική και η βιομηχανία, ενώ παράλληλα συνεχίζεται η έρευνα για την εύρεση νέων ιδιοτήτων και εφαρμογών.

Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες χιτίνης και χιτοζάνης. Η χιτίνη είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές *N*-ακετυλογλυκοζαμινών συνδεδεμένων μεταξύ τους με β(1 → 4) γλυκοσιδικούς δεσμούς, ενώ η χιτοζάνη είναι γραμμικό ομοπολυμερές της γλυκοζαμίνης και αποτελεί την απακετυλιωμένη μορφή της χιτίνης (εικ. 1). Ωστόσο, ο βαθμός ακετυλίωσης της χιτοζάνης, δηλαδή η επιμέρους σύσταση των αλυσίδων σε *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη και γλυκοζαμίνη, έχει βρεθεί ότι ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων παρασκευασμάτων και γι' αυτό έχει προταθεί ο ορισμός της ως προς τη διαλυτότητα αυτής σε διάλυμα οξικού οξέος 0.1M (2).



Εικόνα 1. Δομή χιτίνης (R=COCH₃ και χιτοζάνης R=H ή COCH₃).

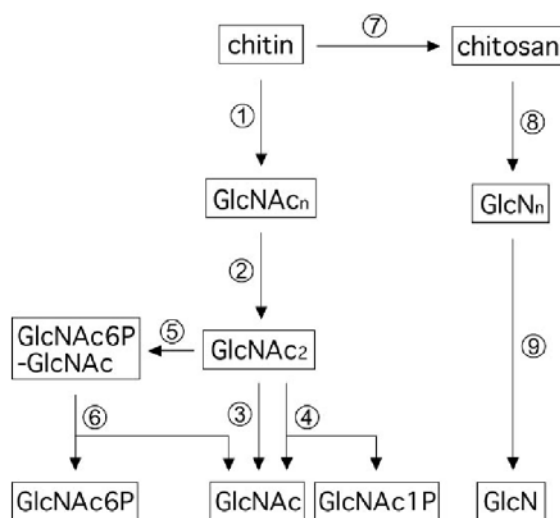
Διάδοση της χιτίνης και της χιτοζάνης στη φύση. Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιολογικό μόριο μετά την κυτταρίνη. Η ευρύτερη διάδοση της χιτίνης θα πρέπει να αποδοθεί αφ' ενός στην τάση των αλυσίδων της να συνδέονται με υδρογονικούς δεσμούς και να σχηματίζουν έτσι πυκνές κρυσταλλικές δομές και αφ' ετέρου στην ποικιλία των μορφών της. Η απακετυλιωμένη μορφή της χιτίνης, η χιτοζάνη, δεν βρίσκεται στην φύση στην ίδια έκταση όπως η χιτίνη. Η ύπαρξη των ελεύθερων αμινομάδων κατά μήκος του πολυμερούς προσδίδει στο μόριο νέες, εντελώς διαφορετικές ιδιότητες. Η χιτίνη, εξαιτίας της υψηλής της κρυσταλλικότητας, είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα και οργανικούς διαλύτες (3). Η χιτοζάνη είναι ένα κατιονικό βιοπολυμερές που υπάρχει φυσιολογικά ή το αποκτούμε απ' την *N*-απακετυλίωση της χιτίνης. Είναι βιοαποικοδομήσιμη, μη-τοξική σε ζώα, διαλυτή σε όξινα διαλύματα, διαθέσιμη σε ποικίλες φυσικές μορφές και πιο ελκυστική απ' την χιτίνη (3, 4). Τα oligομερή χιτίνης και χιτοζάνης αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής επειδή παρουσιάζουν συγκεκριμένες φυσιολογικές δραστηριότητες μεγάλου ενδιαφέροντος (αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δραστηριότητα και ενίσχυση του αμυντικού συστήματος των φυτών) (5, 6).

Παραγωγή χιτοζάνης. Σήμερα, η χιτοζάνη παράγεται απ'τη χιτίνη μέσω μιας σκληρής θερμοχημικής διαδικασίας, η οποία διαθέτει όλα τα μειονεκτήματα μιας χημικής διαδικασίας: είναι επιβλαβής για το περιβάλλον και δεν ελέγχεται εύκολα οδηγώντας σ'ένα μεγάλο και ετερογενές φάσμα προϊόντων (7). Ομοίως, τα ολιγομερή χιτοζάνης παρασκευάζονται από μερική όξινη υδρόλυση των πολυμερών χιτοζάνης. Η χρησιμοποίηση της απακετυλάσης της χιτίνης για την παρασκευή πολυμερών και ολιγομερών χιτοζάνης, προσφέρει την πιθανότητα ανάπτυξης μιας ενζυμικής διαδικασίας που θα μπορούσε δυνητικά να προσπεράσει τα περισσότερα απ'αυτά τα μειονεκτήματα.

Απακετυλάσες της χιτίνης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από αρκετούς μύκητες. Τα πιο καλά μελετημένα ένζυμα είναι αυτά από τους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* (8), *Mucor rouxii* (9-11), *Absidia coerulea* (12), *Aspergillus nidulans* (13) και από δυο στελέχη του *Colletotrichum lindemuthianum* (14, 15). Έχουν προταθεί δυο διαφορετικοί βιολογικοί ρόλοι για τις απακετυλάσες της χιτίνης (Chitin Deacetylases, CDAs) των μυκήτων: η συμμετοχή τους στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και σε αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Όλες οι CDAs που έχουν ταυτοποιηθεί, είναι γλυκοπρωτεΐνες και εκκρίνονται είτε στην περιπλαστική περιοχή είτε στο θρεπτικό μέσο. Επιπλέον, τα περισσότερα ένζυμα παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα στην θερμοκρασία των 50°C και μια προτίμηση για β-(1,4) πολυμερή *N*-ακετυλο-γλυκοζαμίνης.

1.2 Μονοπάτι καταβολισμού χιτίνης σε ευκαρυώτες και βακτήρια.

Η χιτίνη είναι το γραμμικό ομοπολυμερές της β-1,4-*N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης (GlcNAc) και η βιολογική της παραγωγή είναι η πιο άφθονη μετά την κυτταρίνη. Η αποικοδόμηση της χιτίνης στους ευκαρυώτες και τα βακτήρια έχει μελετηθεί πολύ καλά και τα καταβολικά μονοπάτια χιτίνης φαίνονται περιληπτικά στην εικ. 2. Η χιτίνη αποικοδομείται σε διακετυλχιτοβιόζη (GlcNAc)₂ απ'τον συνδυασμό χιτινασών ενδο- και εξω- τύπου (αντιδράσεις 1 και 2) και ακολουθεί επεξεργασία του διμερούς με β-*N*-ακετυλγλυκοσαμινιδάση (GlcNAcase, αντίδραση 3) (16), φωσφορυλάση του (GlcNAc)₂ (αντίδραση 4), ή με το σύστημα φωσφοτρανσφεράσης του (GlcNAc)₂ (αντίδραση 5) και την 6-φωσφο-β-γλυκοσαμινιδάση (αντίδραση 6) (16-19).

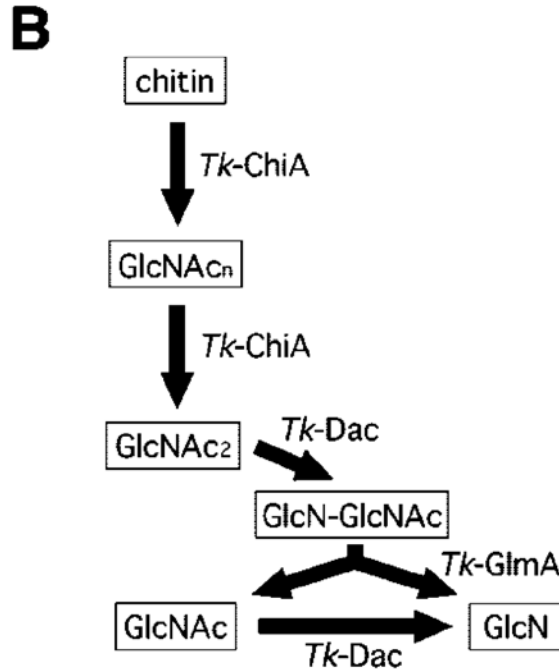
A

Εικόνα 2. Απεικονίζονται γνωστά καταβολικά μονοπάτια χιτίνης. Τα ένζυμα που συμμετέχουν, αναπαριστώνται ως 1: ενδοχιτινάση, 2: εξωχιτινάση, 3: GlcNAcase, 4: φωσφορυλίωση του GlcNAc₂, 5: σύστημα φωσφοτρανσφεράσης του GlcNAc₂, 6: 6-φωσφο-β-γλυκοσαμινιδάση, 7: απακετυλάση χιτίνης, 8: χιτοζανάση και 9: GlcNάση.

Σ'αυτά τα μονοπάτια, η απομάκρυνση της *N*-ακετυλομάδας από το αρχικό μόριο χιτίνης, συμβαίνει μετά την αποικοδόμηση σε μονομερή. Αυτό το βήμα καταλύεται από την απακετυλάση του GlcNAc-6-phosphate (GlcNAc6P), η οποία απακετυλιώνει το GlcNAc6P που παράγεται από το κόψιμο του GlcNAc6P- GlcNAc (αντίδραση 6) ή απ'τη φωσφορυλίωση του GlcNAc. Προτείνεται ένα εναλλακτικό μονοπάτι για την αποικοδόμηση της χιτίνης, το οποίο ξεκινάει με απακετυλίωσή της μέσω μιας απακετυλάσης της χιτίνης (αντίδραση 7). Η προκύπτουσα χιτοζάνη αποικοδομείται στη συνέχεια σε γλυκοζαμίνη (GlcN) απ'τη χιτοζανάση (ένζυμο ενδο-τύπου, αντίδραση 8) σε συνεργασία με την εξω-β-D-γλυκοσαμινιδάση (GlcNase, αντίδραση 9) (16).

1.3 Μονοπάτι καταβολισμού χιτίνης σε αρχαία.

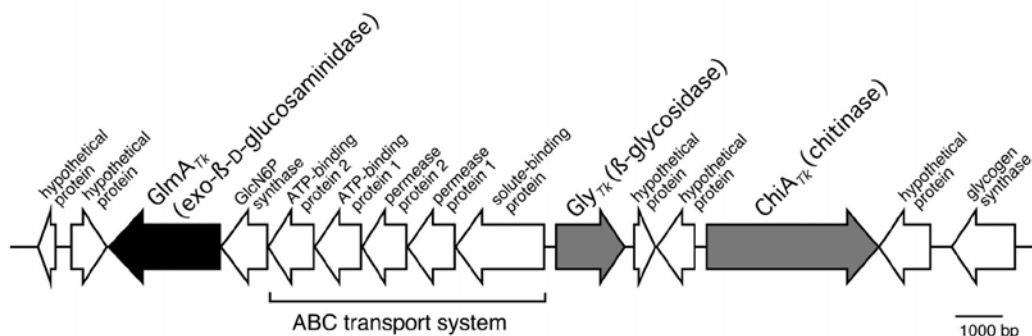
Σε αντίθεση με τους ευκαρυώτες και τα βακτήρια, υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες όσον αφορά την χιτινόλυση στα αρχαία. Ο πρώτος χαρακτηρισμός μιας θερμοσταθερής χιτινάσης έγινε στο υπερθερμόφιλο αρχαίο *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (20, 21). Η χιτινάση *Tk-ChiA* έχει μια μοναδική δομή που συντίθεται από διπλές καταλυτικές περιοχές και τριπλές περιοχές πρόσδεσης της χιτίνης. Πρόσφατα, έχει ταυτοποιηθεί άλλο ένα χιτινολυτικό ένζυμο, μια GlcNάση (*Tk-GlmA*) στο *T. kodakaraensis* (22), η οποία υδρολύει χιτοβιόζη (GlcN₂) προς GlcN και επάγεται από (GlcNAc)₂, το τελικό προϊόν της χιτίνης από την *Tk-ChiA*. Η δράση αυτών των ενζύμων καθώς και της *Tk-Dac* (απακετυλάση χιτοολιγοσακχαριτών) προτείνουν ένα καινούριο καταβολικό μονοπάτι της χιτίνης για τα αρχαία (εικ. 3).



Εικόνα 3. Ένα καινούριο καταβολικό μονοπάτι χιτίνης που προτείνεται στο υπερθερμόφιλο αρχαίο *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. Τα ενδιάμεσα μόρια είναι τα ακόλουθα GlcNAc_n: *N*-ακετυλχιτοολιγοσακχαρίτης, GlcN_n: χιτοολιγοσακχαρίτης, GlcNAc1P: GlcNAc-1-φωσφορικό, GlcNAc6P- GlcNAc: GlcNAc-6-φωσφορικό- GlcNAc και GlcNAc6P: GlcNAc-6-φωσφορικό.

Το *T. kodakaraensis* διαθέτει χιτινάση (*Tk-ChiA*) και εξω-β-D-γλυκοζαμινιδάση (*Tk-GlmA*) για την αποικοδόμηση της χιτίνης. Η πρώτη παράγει διακετυλ-χιτοβιόζη (GlcNAc)₂ απ'τη χιτίνη και η τελευταία υδρολύει χιτοβιόζη (GlcN₂) προς γλυκοζαμίνη (GlcN). Το ένζυμο που συνδέει φυσιολογικά αυτές τις δυο δραστηριότητες είναι μια απακετυλάση που παρέχει το υπόστρωμα για την *Tk-GlmA* απ'την (GlcNAc)₂. Το αντίστοιχο γονίδιο (*Tk-dac*) ταυτοποιήθηκε στο γονιδίωμα του *Thermococcus kodakaraensis*.

Το γονίδιο *Tk-dac* ομαδοποιείται σε μια περιοχή 23.7Kbp του γονιδιώματος του *T. kodakaraensis* με τα *Tk-glmA* και *Tk-chiA* καθώς και με γονίδια για δυνητικά συστατικά του μεταφορέα ABC (εικ. 4).



Εικόνα 4. Γονιδιακή οργάνωση σε μια περιοχή 23.7Kbp του γονιδιώματος του *T. kodakaraensis*, στην οποία περιλαμβάνεται το *Tk-dac*. Τα βέλη υποδεικνύουν τα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος (ORFs). Μαύρο βέλος: *Tk-Dac*, γκρι βέλη: *Tk-GlmA* (22), *Tk-Gly* (23) και *Tk-ChiA* (20, 21), λευκά βέλη: μη χαρακτηρισμένα ORFs.

Η απακετυλίωση των *N*-ακετυλχιτοολιγοσακχαριτών (GlcNAc)₂₋₅ απ' το ένζυμο *Tk-Dac* συμβαίνει στο μη ανάγων άκρο. Το (GlcNAc)₂ φάνηκε να είναι καλύτερο υπόστρωμα απ' το (GlcNAc)₃ για την *Tk-Dac* και επιπλέον αυτό το ένζυμο μπορούσε να απακετυλιώσει τον μονοσακχαρίτη GlcNAc. Αυτές οι καταλυτικές ιδιότητες υποδεικνύουν ένα μοναδικό μονοπάτι καταβολισμού χιτίνης στον *T. kodakaraensis*. Σ' αυτό το μονοπάτι (εικ. 2), το (GlcNAc)₂ παράγεται απ' τη χιτίνη μέσω της δράσης της εξωκυτταρικής *Tk-ChiA* και πιθανόν να εισάγεται στα κύτταρα απ' τον ABC μεταφορέα που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που ανήκει στη γονιδιακή συνάθροιση της εικ. 4 (γονιδιακό cluster). Μέσα στα κύτταρα το GlcNAc₂ απακετυλιώνεται ειδικά στο μη ανάγων κατάλοιπο GlcNAc από την *Tk-Dac*. Ο μερικώς απακετυλιωμένος δισακχαρίτης, GlcN-GlcNAc υδρολύεται στη συνέχεια προς μονομερή GlcN και GlcNAc απ' την *Tk-GlmA*. Τελικά, το GlcNAc απακετυλιώνεται απ' τη δεύτερη δράση της *Tk-Dac*, οδηγώντας σε πλήρη μετατροπή της χιτίνης σε μονομερή GlcN. Η κοινή μεταγραφική ρύθμιση που παρατηρείται για τα ομαδοποιημένα γονίδια υπό συνθήκες αποικοδόμησης της χιτίνης και ο εντοπισμός κάθε ενζύμου υποστηρίζουν την προτεινόμενη *in vivo* λειτουργία αυτής της ομάδας γονιδίων (γονιδιακό cluster).

1.4 LmbE-like πρωτεΐνες.

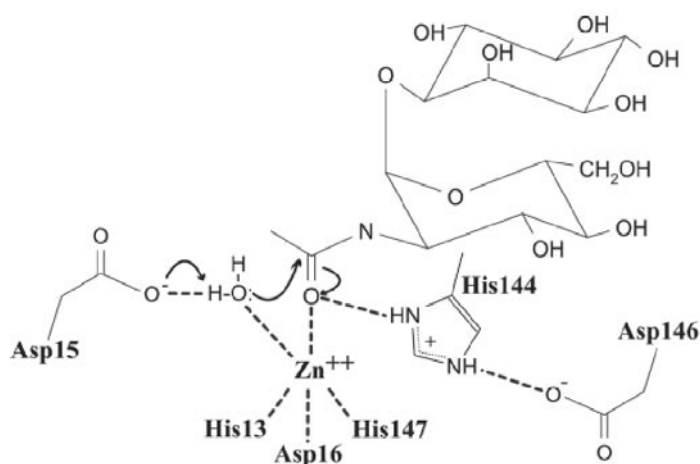
Μέχρι τώρα, οι απακετυλάσες χιτίνης από μύκητες και έντομα, η απακετυλάση χιτοολιγοσακχαριτών (NodB) απ' το *Rhizobium* και η βακτηριακή απακετυλάση του GlcNAc6P είναι γνωστές σαν καταλυτικά παρόμοιες απακετυλάσες, που εμπλέκονται στην απακετυλίωση μονάδων GlcNAc χιτίνης και παρόμοιων σακχάρων. Η απακετυλάση της χιτίνης έχει την ικανότητα να απομακρύνει τυχαία *N*-ακετυλ ομάδες από αλυσίδες χιτίνης (24). Η NodB, που εμπλέκεται στο σινιάλο σύνθεσης του nodulation, απακετυλιώνει το μη ανάγων κατάλοιπο GlcNAc των *N*-ακετυλχιτοολιγοσακχαριτών όπως και η *Tk-Dac* (25). Παρ' όλα αυτά δεν μπορεί να δράσει σε μονομερή GlcNAc. Η *Tk-Dac* απακετυλιώνει το μονομερές GlcNAc καθώς επίσης και ολιγομερή αλλά δεν έχει καμία ικανότητα να δεχτεί το μονομερές GlcNAc6P ως υπόστρωμα. Επιπλέον, η πρωτοταγής δομή της *Tk-Dac* δεν έχει καμία σχέση με κάποια απ' τις παραπάνω απακετυλάσες. Προφανώς, η *Tk-Dac* είναι ένα καινούριο ένζυμο με καταλυτικές ιδιότητες και πρωτοταγή δομή διαφορετικές από εκείνες των γνωστών απακετυλασών.

Η *Tk-Dac* ταξινομείται στη μη χαρακτηρισμένη οικογένεια των LmbE-like πρωτεϊνών (Pfam02585 καθώς και COG2120), όπου η LmbE είχε αρχικά αποδοθεί σε μια υποθετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται σε ένα γονιδιακό cluster για τη βιοσύνθεση λινκομυκίνης (lincomycin) του *Streptomyces lincolnensis*. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τις *N*-acetylphosphatidylinositol de-*N*-acetylases απ' τα θηλαστικά (26), τον σακχαρομύκητα (27) και τα πρωτόζωα (28) και την 1-*D*-myo-inosityl-2-acetamido-2-deoxy- α -*D*-glucopyranoside deacetylase απ' το μυκοβακτήριο

(29), που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της άγκυρας γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης και μυκοθειόλης αντίστοιχα. Παρ'όλο που η *Tk-Dac* έχει μόνο μικρές ομοιότητες με τα παραπάνω ένζυμα, ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό είναι η λειτουργία σαν απακετυλάση προς την μονάδα της *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης.

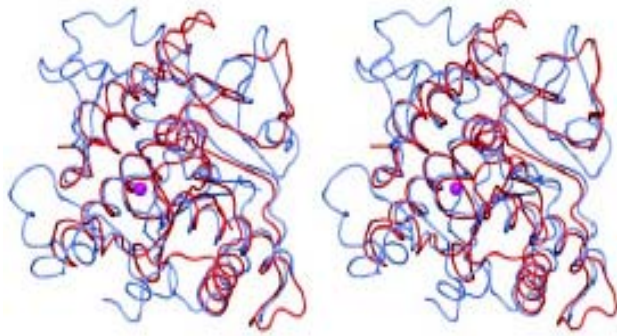
Πρόσφατα, καθορίστηκε η κρυσταλλική δομή μιας LmbE-like πρωτεΐνης (TT1542) με άγνωστη λειτουργία στα πλαίσια δομικής γενετικής του *Thermus thermophilus* (30). Στην τρισδιάστατη δομή, υψηλά συντηρημένα αμινοξέα ομαδοποιούνταν σε μια περιοχή με τις πλευρικές τους αλυσίδες να συνθέτουν την επιφάνεια μιας υδρόφιλης κοιλότητας. Αυτή η περιοχή προτάθηκε να είναι ένα δυνητικό ενεργό κέντρο, και η υπολογιστική ανάλυση προέβλεψε την καταλυτική σημασία εφτά καταλοίπων στο cluster.

Η απακετυλάση MshB (απακετυλιώνει το GlcNAc-Ins συμμετέχοντας έτσι στο μονοπάτι σύνθεσης της μυκοθειόλης: 1-D-*myo*-inosityl-2-(Nacetyl-L-cysteinyl)amido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside, MSH) αντιστοιχεί στην Rv1170 του *Mycobacterium tuberculosis* με μοριακό βάρος 33.400Da. Η MshB είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη Zn^{2+} και η ενεργότητα απακετυλάσης εξαρτάται πλήρως απ'την παρουσία του δισθενούς μεταλλικού κατιόντος. Καθορίστηκε η κρυσταλλική δομή της MshB, όπου η περιοχή πρόσδεσης του ψευδαργύρου είναι στην αμινοτελική περιοχή (εικ. 5).



Εικόνα 5. Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της MshB, όπου είναι ευδιάκριτα τα κατάλοιπα που συντηρούνται μεταξύ απακετυλασών όπως η TT1542 (απακετυλάσες που κατηγοριοποιούνται στις LmbE-like πρωτεΐνες).

Η MshB και η TT1542 απ'τον *Thermus thermophilus* μοιράζονται ταυτότητα 33% ή ισχυρή αλληλουχική ομοιότητα, παρ'όλο που η TT1542 είναι 80 κατάλοιπα μικρότερη σε μήκος. Ο ρόλος της TT1542 είναι άγνωστος και το υποτιθέμενο ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν περιέχει άτομο μετάλλου. Τα ένζυμα έχουν παρόμοια αναδίπλωση και κατάλοιπα ενεργού κέντρου και γι'αυτό είναι πιθανό η TT1542 να έχει παρόμοιο ρόλο ως αμινοϋδρολάση ψευδαργύρου (zinc aminohydrolase), παρ'όλο που το φυσικό υπόστρωμα παραμένει άγνωστο (εικ. 6).



Εικόνα 6. Στοίχιση (alignment) της MshB (γαλάζιο) με μια σχετιζόμενη πρωτεΐνη απ' τον *Thermus thermophilus* (TT1542) (κόκκινο). Και οι 2 πρωτεΐνες δείχνουν παρόμοιες αναδιπλώσεις Rossmann με κοινές περιοχές πρόσδεσης του ψευδαργύρου. Ο καταλυτικός ψευδάργυρος φαίνεται σαν σφαίρα.

Σκοπός της εργασίας

Ανάλυση των γενωμάτων από *B. cereus* απεκάλυψε την ύπαρξη δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της LmbE οικογένειας των οποίων ο ρόλος παραμένει άγνωστος (Integrated Genomics, Chicago, US). Επίσης στο γένομα του *B. anthracis* (που έχει χρησιμοποιηθεί ως βιολογικό όπλο) υπάρχουν αντίστοιχα γονίδια τα οποία εμφανίζουν υψηλή ομολογία με αυτά του *B. cereus*. Οι μεγάλες αυτές ομολογίες υποδεικνύουν και τη παρόμοια λειτουργία αυτών των ενζύμων στους δύο βακίλους οι οποίοι παρουσιάζουν εκτενείς ομοιότητες στο γένομά τους. Για αυτό το βακτήριο *B. cereus* μπορεί να αποτελέσει μοντέλο για τη μελέτη γονιδίων που υπάρχουν στο *B. anthracis*.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η κλωνοποίηση του γονιδίου BC1534 (η πρωτεΐνη για την οποία κωδικοποιεί, φαίνεται να κατατάσσεται στην οικογένεια των LmbE-like πρωτεϊνών) απ' το *Bacillus cereus* και η μελέτη της αντίστοιχης πρωτεϊνικής λειτουργίας (βιοχημικός χαρακτηρισμός και διαλεύκανση ενζυμικού μηχανισμού).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

Τα στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν BL21 DE3, BL21 pLYS και DH5α.

Ο πλασμιδιακός φορέας pET26b, όπου κλωνοποιήθηκε το γονίδιο BC1534 ήταν της εταιρείας Invitrogen Corporation.

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

Η προμήθεια των χρωματογραφικών υλικών Ni-NTA agarose, έγινε από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH. Από την ίδια εταιρεία ήταν επίσης και οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων και τα αντίστοιχα διαλύματα δράσης τους είναι από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology, New England Biolabs GmbH, Promega Corporation και Stratagene GmbH. Το μείγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών ήταν από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου BC1534.

Το γονίδιο BC1534 απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του *B. cereus*. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA και εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια LmbE-For (5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAG TGG ATT ACA TAT ATT A-3' με NdeI περιοριστική θέση ενσωματωμένη) και LmbE-Rev (5'-CCG CTC GAG TTT ACA TCC CCC TAA TAA ATC-3' με XhoI περιοριστική θέση ενσωματωμένη) πραγματοποιήθηκε PCR για την παραγωγή του συγκεκριμένου γονιδίου. Για την ενσωμάτωση του CDA2 γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pET26b πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του φορέα και του γονιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI και ακολούθησε η αντίστοιχη αντίδραση συγκόλλησης. Η πλασμιδιακή κατασκευή στάλθηκε για νουκλεοτιδική αλληλούχηση, όπου διαπιστώθηκε η ένθεση του σωστού γονιδίου. Με τον τρόπο αυτό επετεύχθη η ενσωμάτωση 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο C' άκρο της πρωτεΐνης Η τελευταία κατασκευή για το μετασχηματισμό *E. coli* BL21 DE3 και pLYS βακτηριακών κυττάρων.

2.2.2 Υπερέκφραση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης LmbE-1534 σε κύτταρα *E. coli*.

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε BL21 DE3 και pLYS *E. coli* κύτταρα με τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Από ένα φρέσκο πιάτο συλλέγεται μια μοναδική αποικία με την οποία μολύνεται υγρή καλλιέργεια LB/καναμυκίνη για τα DE3 κύτταρα (για 1lt διαλύματος Luria Bertani Medium : 10gr bacto-tryptone, 5gr bacto-yeast-extract, 10gr NaCl σε αυτό προσθέτουμε 1ml διαλύματος καναμυκίνης 30mg/ml) και LB/καναμυκίνη/χλωραμφαινικόλη για τα pLYS (το stock

χλωραμφαινικόλης που διαθέτουμε είναι συμπυκνωμένο 1000 φορές). Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30°C υπό ανάδευση. Την άλλη μέρα γίνεται προσθήκη 1ml της προκαλλιέργειας σε 50ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB/καναμυκίνη για DE3 και LB/καναμυκίνη/χλωραμφαινικόλη για pLys και επωάζεται στους 30°C έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600nm να είναι 0.6-0.7. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η προκαλλιέργεια δεν πρέπει να έχει οπτική απορρόφηση στα 600nm μεγαλύτερη του 1. Ακολουθεί προσθήκη IPTG (IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 1mM και ολονύκτια επώαση Έπεται εναπόθεση της καλλιέργειας σε πάγο (4°C) για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 3000rpm στους 4°C, συλλογή της βακτηριακής πελέτας και αποθήκευση στους -20°C.

2.2.3 Απομόνωση της πρωτεΐνης LmbE-1534.

Απομόνωση από συνολικό κύτταρικό εκχύλισμα.

Η πελέτα συλλέγεται και επαναδιαλύεται σε 25mM Bis-Tris pH 8.0, 300mM NaCl (διάλυμα A). Τα κύτταρα λύνονται με υπέρηχους για χρονικά διαστήματα 6 x 30sec με ενδιάμεσα διαλείμματα των 30sec σε πάγο. Μετά από αυτή την κατεργασία το δείγμα πρέπει να είναι σχεδόν διαφανές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 14.000rpm στους 4°C.

Χρωματογραφία σε προσροφητή Ni-NTA agarose.

Το υπερκείμενο από την προηγούμενη διαδικασία φορτώθηκε σε προσροφητή Ni-NTA agarose εξισορροπημένο με το διάλυμα A. Ο προσροφητής εκπλύθηκε με το ίδιο διάλυμα (10 όγκοι στήλης) και με διάλυμα A στο οποίο προσθέταμε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (30, 40 και 50mM, 3-4 όγκοι απ' το καθένα) και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες εκλούστηκαν με 5-7 όγκους διαλύματος A στο οποίο είχαν προστεθεί 250mM imidazole. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης (μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης) υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση με το διάλυμα A στους 4°C.

Χρωματογραφία σε προσροφητή μοριακής διήθησης (gel filtration).

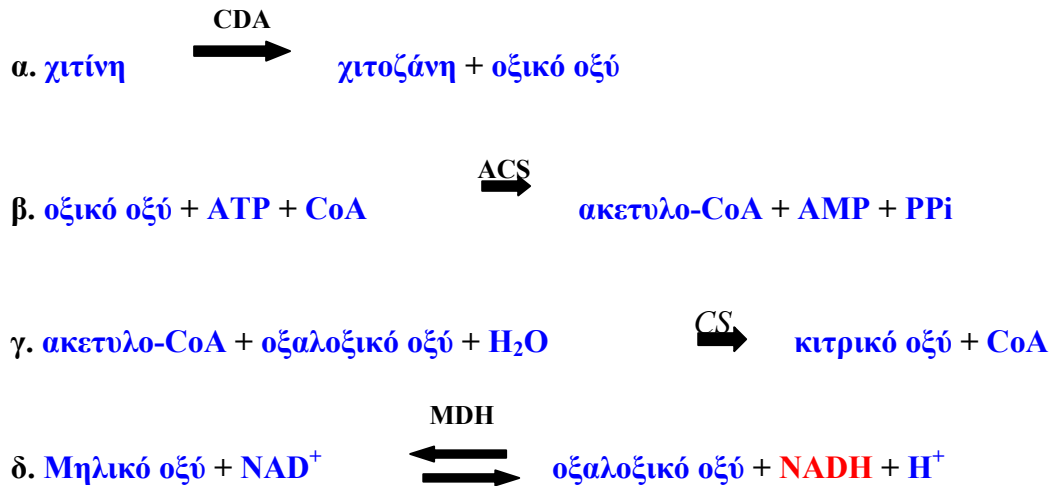
Σ' αυτή τη χρωματογραφική μέθοδο καταφύγαμε προκειμένου να διαπιστώσουμε σε τι κατάσταση πολυμερισμού βρίσκεται η πρωτεΐνη μας. Αφού η κολώνα εξισορροπηθεί με το διάλυμα A, φορτώνουμε σ' αυτήν ποσότητα πρωτεΐνης ίση με ~8mg. Με τον τρόπο αυτό συλλέγουμε εκλουόμενα κλάσματα ένα από τα οποία αντιστοιχεί στο peak που σχηματίζεται στο αντίστοιχο γράφημα. Αφού επαναληφθεί η διαδικασία φορτώνοντας αυτή τη φορά στην κολώνα διάφορους πρωτεϊνικούς μάρτυρες μοριακών βαρών κοντά στο αναμενόμενο (της δικής μας πρωτεΐνης), μπορούμε να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε κάθε peak και άρα να συμπεράνουμε το βαθμό πολυμερισμού της προς μελέτη πρωτεΐνης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση (πρωτεΐνη LmbE-1534), παίρνουμε μόνο ένα peak που αντιστοιχεί σε μονομερές.

2.2.4 Μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας απακετυλάσης χιτίνης.

Φασματοφωτομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας.

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας απακετυλάσης της χιτίνης σε φυσικά, μη ραδιοσημασμένα υποστρώματα (31). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υποστρώματα όπως είναι το GlcNAc, το (GlcNAc)₂ έως (GlcNAc)₆, GlcNAc6P, GlcNAc1P, GlcNAc-6-sulfate, διμερές GlcNAc(1-6)GlcNAc, GalNAc (N-acetylgalactosamine) και ManNAc (N-acetylmannosamine).

Μέτρο της ενζυμικής απακετυλίωσης της χιτίνης αποτελεί η απελευθέρωση οξικού οξέος το οποίο υπολογίζεται μέσω μιας σειράς συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων (32) (εικ. 7). Ο προσδιορισμός της ποσότητας του παραγόμενου οξικού οξέος βασίζεται στο σχηματισμό του NADH, το οποίο και μετράται με την αύξηση της τιμής της απορρόφησης στα 340 nm.



Εικόνα 7. Φασματοφωτομετρικός υπολογισμός του παραγόμενου οξικού οξέος με τη μέθοδο των συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων. Το οξικό οξύ που παράγεται από την ενζυμική απακετυλίωση της χιτίνης (αντίδραση α) μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο Α (αντίδραση β) το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση κιτρικού οξέος από οξαλοξικό οξύ (αντίδραση γ). Το αποτέλεσμα της κατανάλωσης του οξαλοξικού οξέος είναι η αναγωγή του NAD^+ σε NADH (αντίδραση δ), η οποία και παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά από τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm. CDA: απακετυλάση της χιτίνης, ACS: συνθετάση του ακέτυλο-CoA, CS: συνθετάση του κιτρικού οξέος, MDH: αφυδρογονάση του μηλικού οξέος.

2.2.5 Υδρόλυση DNA με περιοριστικά ένζυμα.

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

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

- Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων από τους -80°C , όπου φυλάσσονταν, στον πάγο.
- Προσθήκη του DNA στα κύτταρα (όχι περισσότερο από 200ng).
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.

- Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42⁰ C για 90 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 900μl LB και επώαση για 50 λεπτά στους 37⁰ C.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων.
- Άπλωμα των κυττάρων σε τριβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε.
- Επώαση των κυττάρων στους 37⁰ C για 16-20 ώρες.

2.2.7 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* από πλασμιδιακό φορέα μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης.

- Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων από τους -80⁰C, όπου φυλάσσονταν, στον πάγο.
- Προσθήκη του DNA στα κύτταρα.
- Προσθήκη των κυττάρων στην ειδική κυβέτα, που φυλάσσονταν στους -20⁰C. Με τη βοήθεια ειδικής συσκευής τα κύτταρα υποβάλλονται στιγμιαία σε ηλεκτρικό πεδίο 1800Volt.
- Προσθήκη 900μl παγωμένου LB και επώαση για 90-120 λεπτά στους 37⁰C.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000 rpm.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων.
- Άπλωμα των κυττάρων σε τριβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε.
- Επώαση των κυττάρων στους 37⁰ C για 16-20 ώρες.

2.2.8 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα.

Για να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα, γίνεται αντίδραση σύνδεσης (ligation) στους 16⁰C για 12-16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής :

- 50-100ng φορέα
- ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπόψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για λεία άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 5-10 :1
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x :0.5 M Tris, pH 7.4, 0.1M MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM spermidine, 10mM ATP, 1mg/ml BSA)
- 0.75μl BSA (Bovine Serum Albumin 10mg/ml)
- 0.75μl rATP (20mM)
- 1μl T4 DNA λιγάση (3-5 units)
- H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 20μl.

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

Για την εκχύλιση τμημάτων DNA (70bp-10kb) από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε κολώνα QIAquick. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

- Με τη βοήθεια καθαρού νυστεριού συλλέγεται το επιθυμητό κομμάτι DNA από το πήκτωμα αγαρόζης.
- Ζύγισμα του κομματίου που αφαιρέθηκε προηγουμένως.

- Προσθήκη του δείγματος (ένας όγκος) και τριών όγκων διαλύματος QG σε 2ml eppendorf tube
- Επώαση για 10 λεπτά στους 50⁰C.
- Αν το χρώμα του διαλύματος δεν είναι κίτρινο τότε προστίθενται 10μl οξικό νάτριο 3M.
- Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης.
- Τοποθέτηση μιας στήλης QIAquick σε 2ml eppendorf tube.
- Προσθήκη του δείγματος στην στήλη QIAquick. Φυγοκέντρηση για 60sec.
- Πλύσιμο της στήλης με 0.75ml διάλυμα PE. Φυγοκέντρηση για 60sec.
- Τοποθέτηση της στήλης QIAquick σε καθαρό 1.5ml eppendorf tube.
- Έκλυση του DNA με προσθήκη 30 ή 50μl διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH=8.5) ή νερό. Φυγοκέντρηση για 60sec.

2.2.10 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση και ο προσδιορισμός των σχετικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), με ασυνεχή συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων (33), καθώς και σε native πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου όπου οι πρωτεΐνες δεν υφίστανται αποικοδόμηση. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μέσω χρώσης με Coomassie Brilliant Blue R.

2.2.11 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting).

Μετά την ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, πραγματοποιούμε ολονύκτια μεταφορά (transfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran) σε διάλυμα που περιέχει 1x electrophoresis buffer, methanol (200ml σε 1l διαλύματος). Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην protran γίνεται στους 4⁰C σε τάση 30V και ένταση 110mA .

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε blocking buffer (200mM Tris-Cl pH 7.6, 1.37M NaCl, 0.1%Tween-20, 5% γάλα) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων ώστε να αυξήσουμε τις πιθανότητες να δεσμεύσει το αντίσωμα ειδικά πρωτεϊνικά μόρια (ελαχιστοποίηση background). Στη συνέχεια, γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα (ολονύκτια στους 4⁰C).

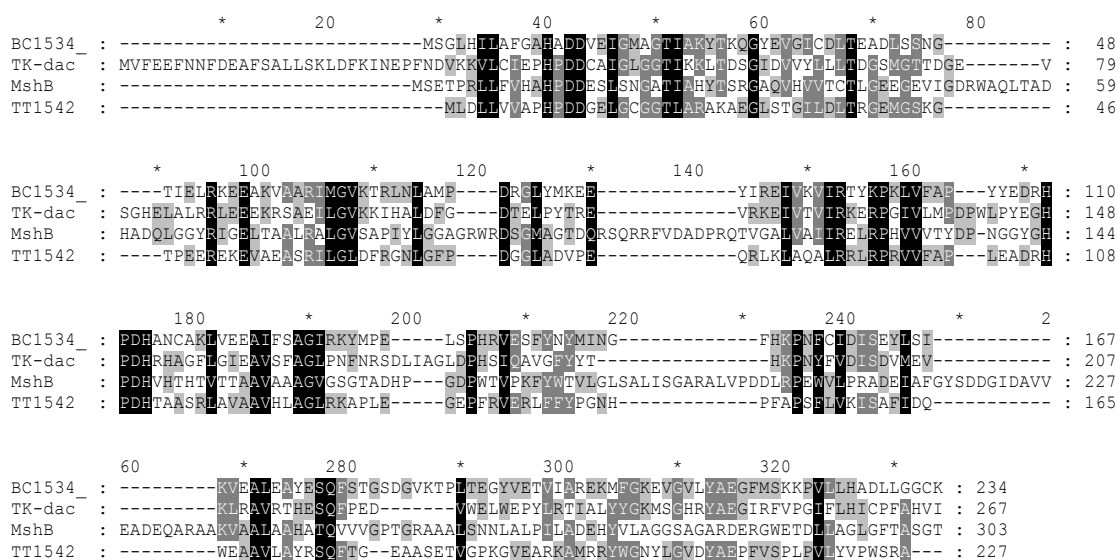
Πραγματοποιούνται 3 15λεπτα πλυσίματα με διάλυμα που έχει την ίδια σύσταση με το blocking buffer, απουσιάζει όμως το γάλα και στη συνέχεια επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναλαμβάνονται τα πλυσίματα και εμφανίζουμε φιλμ.

3. Αποτελέσματα

3.1 *In silico* εύρεση της αλληλουχίας BC1534

Ανάλυση των γενωμάτων από *B. cereus* απεκάλυψε την ύπαρξη δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της LmbE οικογένειας των οποίων ο ρόλος παραμένει άγνωστος (Integrated Genomics, Chicago, US). Στην εικ. 8 φαίνεται η στοίχιση διαφόρων πρωτεϊνών που ανήκουν στην LmbE οικογένεια καθώς και η ύπαρξη συντηρημένων καταλοίπων.

Όπως φαίνεται, συντηρούνται τα κατάλοιπα His13, Asp15, Asp16, His144, Asp146 και His147 που πιθανότατα σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του ένζυμου. Στο σχηματισμό αυτού του ενεργού κέντρου πιθανότατα συμμετέχουν μέταλλα (π.χ. Zn^{2+} για την MshB όπως φαίνεται και στην εικ. 5). Ενδεικτικά, η LmbE-1534 εμφανίζει 39% ομολογία με την TT1542 και με την MshB. Αυτή η ομολογία μεταξύ της LmbE-1534 και αντίστοιχων πρωτεϊνών από άλλους οργανισμούς μας οδηγεί στην υπόθεση ότι το ένζυμο που μελετάμε ανήκει στην ίδια οικογένεια και αποτελεί βοηθητικό και μάλιστα κατευθυντήριο γεγονός για την έναρξη της παρούσας εργασίας.



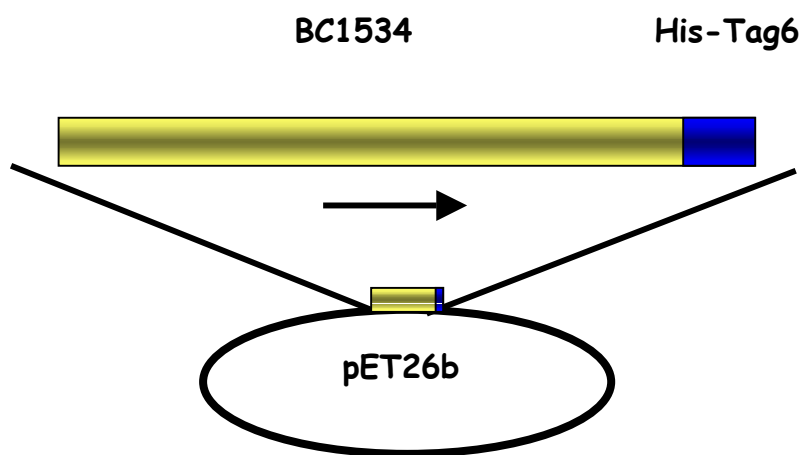
Εικόνα 8. Απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των LmbE-1534 απ'τον *B. cereus*, η Tk-Dac απ'τον *Thermococcus kodakaraensis*, η MshB απ'το *Mycobacterium tuberculosis* και η TT1542 απ'το *Thermus thermophilus*.

3.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης LmbE-1534 σε κύτταρα *E. coli*

Μια από τις βασικές προϋποθέσεις για τη μελέτη της λειτουργίας και της δομής μιας πρωτεΐνης, είναι η έκφρασή της σε ικανοποιητικά επίπεδα. Προκειμένου να αυξήσουμε τις πιθανότητες υπερέκφρασης της LmbE-1534, επιχειρήσαμε την κλωνοποίηση του γονιδίου BC1534 σε κύτταρα *E. coli* δεδομένου ότι αποτελεί δοκιμασμένο σύστημα υπερέκφρασης πρωτεϊνών, αφού προηγουμένως απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *Bacillus cereus* με τη μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR) και χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το γενωμικό DNA του βακίλλου.

Το γονίδιο BC1534 ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET26b (εικ. 9) επιτυγχάνοντας την ενσωμάτωση της αλληλουχίας His-Tag6 στο 3'

άκρο του γονιδίου (C'άκρο της πρωτεΐνης), η οποία κωδικοποιεί 6 κατάλοιπα ιστιδίνης για πρόσδεση της πρωτεΐνης σε προσροφητή με ακινητοποιημένα μόρια νικελίου. Η πλασμιδιακή κατασκευή που προκύπτει, ονομάστηκε BC1534- pET26b.

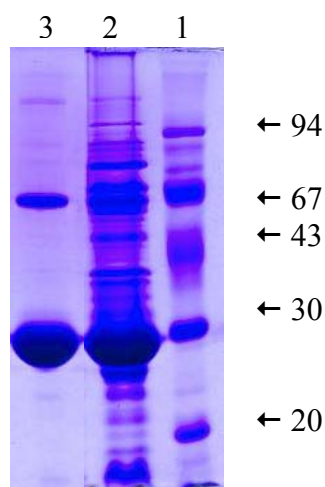


Εικόνα 9. Γενική δομή της πλασμιδιακής κατασκευής BC1534- pET26b.

Ακολούθησε μετασχηματισμός της πλασμιδιακής κατασκευής στα βακτηριακά στελέχη *E. coli* B121 DE3 και pLYS. Η επαγωγή της υπερέκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης (LmbE-1534) επιτυγχάνεται με την προσθήκη IPTG (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

3.3 Απομόνωση της LmbE-1534

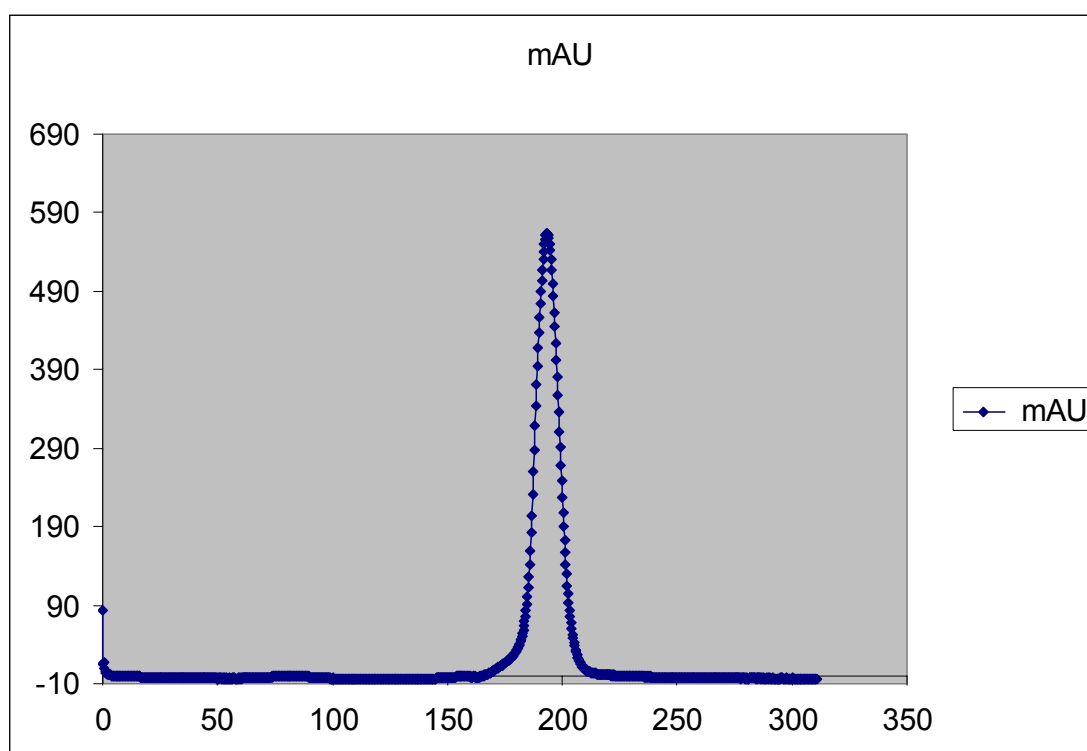
Για την απομόνωση της πρωτεΐνης LmbE-1534 σε όσο το δυνατόν καθαρότερη μορφή, ακολουθήσαμε τη χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Ni-NTA agarose. Στην εικ. 10 φαίνεται ο βαθμός καθαρισμού της πρωτεΐνης μετά από μια κολώνα νικελίου.



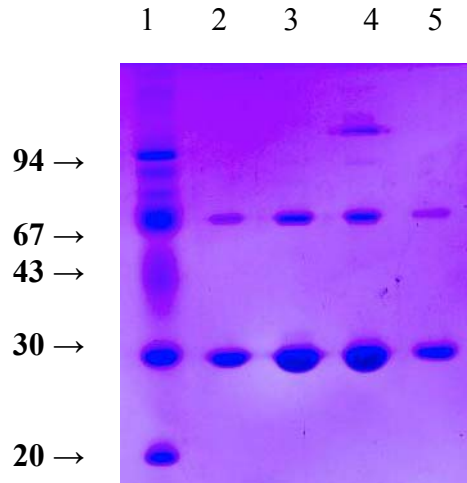
Εικόνα 10. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12.5%, όπου φαίνεται στην πρώτη λωρίδα ο πρωτεϊνικός μάρτυρας, στη δεύτερη,

το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα (crude) που φορτώθηκε στην κολώνα νικελίου και στην τρίτη η εκλούμενη πρωτεΐνη LmbE-1534 σε μοριακό βάρος (αναμενόμενο) ~30KDa.

Παρατηρούμε ότι εκτός από την ζώνη των ~30 KDa στην οποία θεωρούμε ότι αντιστοιχεί η LmbE-1534, εκλούεται από την στήλη νικελίου και μια πρωτεΐνη σε περίπου διπλάσιο μοριακό βάρος. Πραγματοποιούμε επομένως χρωματογραφία μοριακής διήθησης, με στόχο να εξακριβώσουμε αν πρόκειται για διμερισμό της πρωτεΐνης μας (η πρωτεΐνη που φορτώνουμε στην στήλη είναι περίπου 8mg από εκείνη που απομονώνεται από την χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου). Από την όλη διαδικασία της χρωματογραφίας, έχουμε μόνο ένα peak (εικ. 11), το οποίο αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του μονομερούς. Παρ'όλα αυτά μετά την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης το κλάσμα που αντιστοιχεί σε αυτό το peak δίνει 2 ζώνες (εικ. 12).

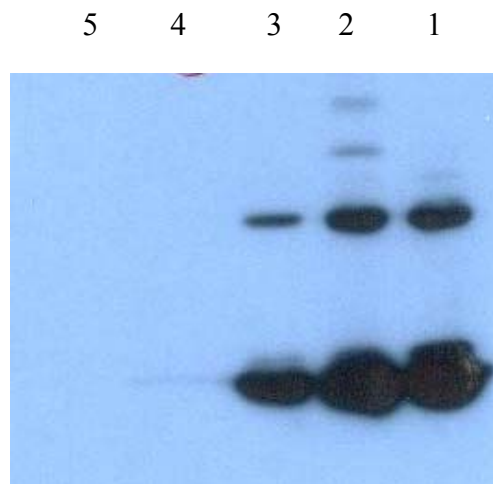


Εικόνα 11. Γράφημα που προκύπτει από την κολώνα μοριακής διήθησης. Το peak αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου 30KDa.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12.5%. Οι λωρίδες 2-4 αντιστοιχούν σε διάφορες ποσότητες LmbE-1534 μετά την χρωματογραφία συγγένειας σε κολώνα νικελίου. Η λωρίδα 5 αποτελεί το εκλουόμενο κλάσμα από κολώνα μοριακής διήθησης και αντιστοιχεί στο peak. Παρατηρούμε ότι και μετά απ' αυτή τη χρωματογραφία συνεχίζουμε να έχουμε 2 ζώνες παρ'όλο που το γράφημα δείχνει ότι πρόκειται για μονομερές.

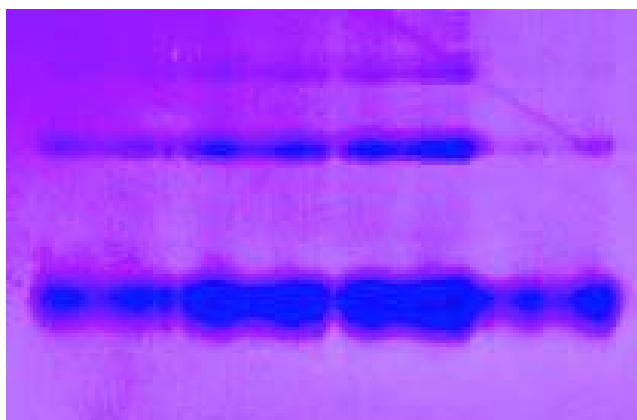
Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η πρωτεΐνη που απομονώνουμε, είναι αυτή που μας ενδιαφέρει (LmbE-1534), πραγματοποιούμε Western blotting χρησιμοποιώντας ως αντίσωμα το anti-His (μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το His-tag). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικ. 13.



Εικόνα 13. Western blotting μετά την ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5%. Στις λωρίδες 1-3 φαίνεται η πρωτεΐνη LmbE-1534 μετά την απομόνωσή της από κολώνα νικελίου, σε διάφορες ποσότητες. Στη λωρίδα 4, φαίνεται η πρωτεΐνη LmbE-1534 μετά την πραγματοποίηση κολώνας μοριακής διήθησης (gel filtration). Στη συγκεκριμένη λωρίδα φαίνεται πως η ποσότητα που φορτώσαμε στο πήκτωμα, ήταν μικρή. Στη λωρίδα 5 βρίσκεται ως αρνητικό control μια πρωτεΐνη που δε διαθέτει His-tag (όπως αναμενόταν, το αντίσωμα δεν δεσμεύτηκε στην πρωτεΐνη).

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, το αντίσωμα ανιχνεύει την πρωτεΐνη μας, παρ'όλα αυτά όμως δεσμεύει και την ζώνη των ~60KDa. Είναι επομένως παράδοξο το γεγονός ότι ενώ πρόκειται για μονομερές, όπως προκύπτει από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης, σε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εξακολουθούμε να έχουμε 2 ζώνες. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ανίχνευση αυτής της ζώνης και από το αντίσωμα για το His-tag, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανότατα αυτό που βλέπουμε στο πήκτωμα αποτελεί ένα artifact, το οποίο συμβαίνει κατόπιν κάποιων συγκεκριμένων διαδικασιών που υφίσταται η πρωτεΐνη στην ηλεκτροφόρηση. Πιο συγκεκριμένα, υποθέτουμε ότι λόγω της ύπαρξης καταλοίπων κυστεΐνης στο μόριο της LmbE-1534 η απουσία μερκαπτοαιθανόλης (απ'το διάλυμα της χρωστικής κατά την προετοιμασία των δειγμάτων) πιθανότατα οδηγεί σε δημιουργία διμερούς μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών. Για να αποκλείσουμε ή να επιβεβαιώσουμε ένα τέτοιο ενδεχόμενο, πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης χωρίς να προηγηθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων (native gel electrophoresis). Όπως φαίνεται όμως και στην παρακάτω εικόνα, έχουμε πάλι 2 ζώνες, κάτι που δεν εξηγεί την υπόθεση του διμερισμού.

1 2 3 4



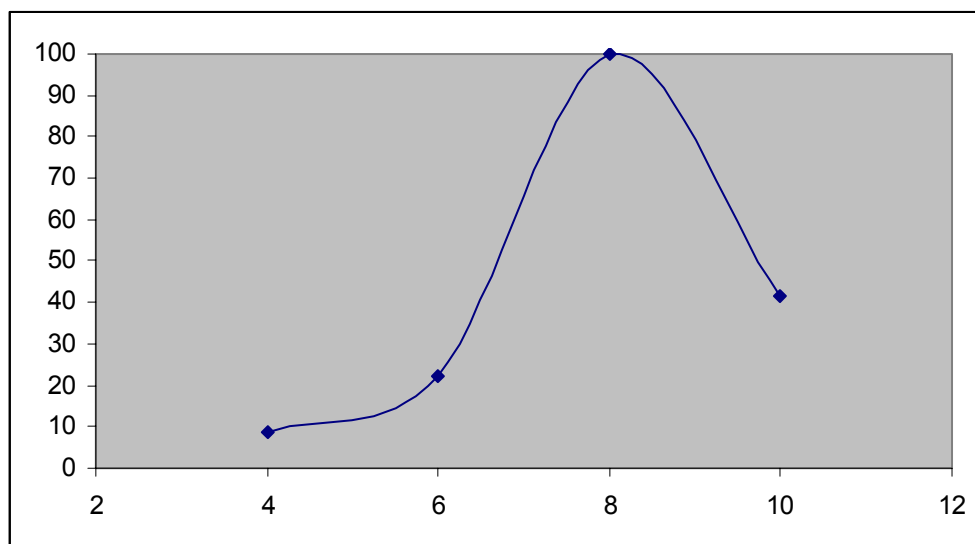
Εικόνα 14. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε μια αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (native gel electrophoresis). Στις 3 πρώτες λωρίδες βρίσκεται η LmbE-1534 σε διάφορες ποσότητες και στην λωρίδα 4, έχει ηλεκτροφορηθεί το κλάσμα από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης που αντιστοιχεί στο peak. Παρατηρούνται σε όλες τις λωρίδες οι 2 ζώνες, πράγμα που δε στηρίζει την παραπάνω υπόθεση.

Υποθέσαμε στη συνέχεια, ότι η ζώνη των ~60KDa οφείλεται πιθανότατα στην ύπαρξη κάποιου μετάλλου το οποίο υπό κάποιες συνθήκες στην προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση, προσδένεται στο His-tag και οδηγεί σε διμερισμό. Για να εξακριβώσουμε κατά πόσο ευσταθεί αυτή η υπόθεση, πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πριν και μετά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης στα οποία προσθέσαμε 1mM EDTA (για δέσμευση του ενδεχόμενου μετάλλου) και τα οποία υποβλήθηκαν σε πιο ισχυρές συνθήκες αποικοδόμησης (μεγαλύτερη τελική

συγκέντρωση β-μερκαπτοαιθανόλης και μεγαλύτερος χρόνος βρασμού των δειγμάτων). Παρ'όλα αυτά η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποκάλυψε και πάλι την ύπαρξη 2 ζωνών.

3.4 Μελέτη ενζυμικής ενεργότητας της LmbE-1534

Σύμφωνα με το alignment της LmbE-1534 με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας LmbE, θεωρήσαμε σκόπιμο να ερευνήσουμε κατά πόσο το ένζυμο αυτό που απομονώσαμε από τον *Bacillus cereus*, συμμετέχει στην απακετυλίωση χιτοολιγομερών. Για το σκοπό αυτό δοκιμάσαμε διάφορα υποστρώματα και σε διάφορες συνθήκες. Η μέθοδος που ακολουθήσαμε προκειμένου να διαπιστώσουμε την ποσότητα του οξικού οξέος που παράγεται, είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου NADH μέσω μιας σειράς συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων (32). Έχοντας σαν υπόστρωμα το μονομερές GlcNAc, δοκιμάσαμε διάφορες τιμές pH πραγματοποιώντας ολονύκτια ενζυμική δοκιμή στους 37⁰C. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 15. Παρατηρούμε ότι η μέγιστη δράση απακετυλάσης του GlcNAc πραγματοποιείται σε pH 8.0, το οποίο θεωρούμε στη συνέχεια ως το ιδανικό για τις ενζυμικές δοκιμές μας.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο υπόστρωμα και έχοντας υπ'όψιν ότι πολλές LmbE-like πρωτεΐνες έχουν Zn²⁺ στο ενεργό τους κέντρο, πραγματοποιήσαμε ολονύκτιες ενζυμικές δοκιμές σε pH 8.0 και σε θερμοκρασία 37⁰C, δοκιμάζοντας διάφορα δισθενή μεταλλικά κατιόντα. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1, το Co²⁺ ενεργοποιεί τη δράση του ενζύμου.

Μέταλλο	Οξικό οξύ που απελευθερώνεται (nmoles)	Σχετική δράση απακετυλάσης (%)
Control (χωρίς μέταλλο)	408.35	27.04
Co ²⁺	1510	100
Zn ²⁺	6.5	0.43
Ni ²⁺	137.2	9.08
Mn ²⁺	202.12	13.38
Mg ²⁺	322.7	21.37
Ca ²⁺	204.02	13.51
Cu ²⁺	8.42	0.56
EDTA	0	0

Πίνακας 1. Δοκιμάστηκαν διάφορα δισθενή κατιόντα από τα οποία μόνο το Co²⁺ φαίνεται να ενεργοποιεί και μάλιστα σημαντικά τη δράση του ενζύμου. Δοκιμάσαμε επίσης και EDTA για να διαπιστώσουμε τι γίνεται σε περίπτωση που δεσμεύεται απ' αυτό ένα ενδεχόμενο μέταλλο.

Παράλληλα, δοκιμάζουμε διάφορες θερμοκρασίες για να διαπιστώσουμε ποια είναι η βέλτιστη για την συγκεκριμένη ενζυμική δράση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιούμε είναι το μονομερές GlcNAc και η επώαση είναι ολονύκτια.

Θερμοκρασία (°C)	Οξικό οξύ που απελευθερώνεται (nmoles)	Σχετική δράση απακετυλάσης (%)
20	233.85	79.22
37	295.2	100
50	248.32	84.12

Πίνακας 2. Από τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν, η βέλτιστη φαίνεται να είναι των 37°C. Στο εξής οι ενζυμικές δοκιμές γίνονται σε θερμοκρασία 37°C, παρουσία Co²⁺.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η δράση του ενζύμου είναι εξειδικευμένη ως προς το μονομερές, πραγματοποιούμε ενζυμικές δοκιμές με διάφορα χιτοολιγομερή (GlcNAc)₁₋₆ καθώς και το διμερές GlcNAc(1-6)GlcNAc. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα, όπου φαίνεται πως η LmbE-1534 δρα σε μονομερές και διμερές όχι όμως στο GlcNAc(1-6)GlcNAc στο οποίο αλλάζει μόνο το είδος του γλυκοζιδικού δεσμού.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση υποστρώματος (mM)	Οξικό οξύ που απελευθερώνεται (nmoles)	Σχετική δράση απακετυλάσης (%)
GlcNAc	5.00	186.42	100
(GlcNAc) ₂	2.50	167.45	89.82
(GlcNAc) ₃	1.67	19.6	10.51
(GlcNAc) ₄	1.25	10.27	5.51
(GlcNAc) ₅	1.00	22.72	12.19
(GlcNAc) ₆	0.83	7.33	3.93
GlcNAc(1-6)GlcNAc	2.50	0.6	0.32

Πίνακας 3. Μετά τη δοκιμή διαφόρων υποστρωμάτων, διαπιστώνουμε την προτίμηση του ενζύμου σε μονομερές και διμερές *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης.

Τέλος, αφού διαπιστώθηκε η εξειδίκευση του LmbE-1534 σε GlcNAc, δοκιμάζουμε και άλλα δομικά παρόμοια μόρια *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης (*N*-ακετυλγαλακτοζαμίνη και *N*-ακετυλμαννοζαμίνη) καθώς και τροποποιημένα κατάλοιπα *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης (*N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό, *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό και *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6θειικό) των οποίων τα αποτελέσματα φαίνονται στους 2 ακόλουθους πίνακες.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση υποστρώματος (mM)	Οξικό οξύ που απελευθερώνεται (nmoles)	Σχετική δράση απακετυλάσης (%)
GlcNAc	5.00	295.2	100
GalNAc	5.00	0	0
ManNAc	5.00	0	0

Πίνακας 4. Όπως φαίνεται, το ένζυμο LmbE-1534 έχει εξειδικευμένη δράση σε *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη και όχι σε γαλακτοζαμίνη ή μαννοζαμίνη.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση υποστρώματος (mM)	Οξικό οξύ που απελευθερώνεται (nmoles)	Σχετική δράση απακετυλάσης (%)
GlcNAc	5.00	295.2	100
GlcNAc-1P	5.00	0	0
GlcNAc-6P	5.00	0	0
GlcNAc-6S	5.00	0	0

Πίνακας 5. Το ένζυμο LmbE-1534 φαίνεται να έχει εξειδικευμένη δράση απακετυλάσης σε GlcNAc και όχι σε τροποποιημένα μόρια.

4. Συζήτηση-Προοπτικές

Η πρόσφατη αλληλούχηση των γονιδιωμάτων του *Bacillus cereus* (34) και του *Bacillus anthracis* (35) αποκάλυψε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δυο οργανισμών. Στα πλαίσια αυτής της ομοιότητας, έχουν βρεθεί στον *Bacillus cereus* δυο πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια LmbE των οποίων η λειτουργία είναι άγνωστη (DUF158: Domain of Unknown Function). Οι τελευταίες παρουσιάζουν 99% ταυτότητα με αντίστοιχες πρωτεΐνες στον *Bacillus anthracis*. Ο οργανισμός αυτός, ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί και ως βιολογικό όπλο, μπορεί επομένως να μελετηθεί ως ένα βαθμό, μέσω του *Bacillus cereus*, λόγω της μεγάλης συγγένειας που φαίνεται να έχουν.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, απομονώθηκε και μελετήθηκε η πρωτεΐνη LmbE-1534 απ' τον *B. cereus*. Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες, πράγμα που καθιστά πιο εύκολη τη μελέτη τόσο της δομής όσο και της λειτουργίας της. Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα, η απομόνωση της πρωτεΐνης από το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα δεν δίνει μια και μόνο ζώνη (~30KDa) όπως θα περιμέναμε, αλλά η τελευταία συνοδεύεται πάντα από μια επιπλέον πρωτεϊνική ζώνη, η οποία εμφανίζεται ακόμη και σε ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (native gel electrophoresis). Οι πιθανές εξηγήσεις που προσπαθήσαμε να δώσουμε, δεν επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα που πήραμε, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μια αλληλούχηση της πρωτεϊνικής ζώνης των ~60KDa, ίσως δώσει την απάντηση.

Όσον αφορά τη λειτουργία της LmbE-1534, πραγματοποιήσαμε μια σειρά ενζυμικών δοκιμών, με τις οποίες επιχειρήσαμε να εξακριβώσουμε κατ' αρχήν ποιο είναι το υπόστρωμά της και στη συνέχεια ποιες είναι οι συνθήκες βέλτιστης δράσης της. Έχοντας σαν οδηγό την *Tk-Dac* απ' το αρχαίο *Thermococcus kodakaraensis*, η οποία απακετυλιώνει μονομερή *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης, δοκιμάσαμε διάφορα χιτοολιγομερή σαν πιθανά υποστρώματα προκειμένου να διαπιστώσουμε κάποια πιθανή δράση απακετυλάσης της LmbE-1534. Στον πίνακα 3 είναι εμφανής η προτίμηση του ενζύμου σε μονομερές και διμερές, ενώ αυτή η εξειδίκευση φαίνεται να είναι αρκετά ισχυρή αν σκεφτούμε ότι δεν υπάρχει δράση σε υποστρώματα όπως η *N*-ακετυλγαλακτοζαμίνη και η *N*-ακετυλμαννοζαμίνη (βλέπε Πίνακα 4), που έχουν πολύ μεγάλη δομική ομοιότητα με το GlcNAc. Η αυστηρότητα της εξειδίκευσης ενισχύεται επιπλέον από την παρατήρηση της μηδενικής σχεδόν δράσης του ενζύμου σε διμερές *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης, στο οποίο όμως ο γλυκοσιδικός δεσμός είναι 1-6 κι όχι 1-4 (βλέπε Πίνακα 3).

Στην επιδίωξή μας να διαπιστώσουμε αν υπάρχει παράλληλη δράση του ενζύμου σε κατάλοιπα *N*-ακετυλγλυκοζαμίνης στα οποία υπάρχει άτομο φωσφόρου (*N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό, *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό), για τα οποία έχουν βρεθεί απακετυλάσες σε άλλους οργανισμούς (*Thermus caldophilus*, *Vibrio cholerae*) (36, 37), πραγματοποιήσαμε ενζυμικές δοκιμές με τέτοια υποστρώματα, οι οποίες όμως δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα.

Καθίσταται σαφής επίσης, η ενεργοποίηση του ενζύμου παρουσία του δισθενούς μετάλλου Co^{2+} , σε αντίθεση με άλλα ένζυμα της οικογένειας, όπως η MshB που φαίνεται να εξαρτώνται πλήρως απ' την παρουσία Zn^{2+} (εικ. 5). Μάλιστα, η παρουσία Zn^{2+} φαίνεται να ασκεί από ελάχιστη έως αρνητική επίδραση στη δράση του ενζύμου. Πλήρως ανασταλτική επίσης είναι η παρουσία EDTA στο διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης, πράγμα που σημαίνει ότι είναι απαραίτητο το μέταλλο που δεσμεύεται για την βέλτιστη δράση της LmbE-1534.

Πρόκειται επομένως για μια πρωτεΐνη, της οποίας η περαιτέρω μελέτη-τόσο σε επίπεδο δομής όσο και σε επίπεδο λειτουργίας-θα ρίξει φως στο μονοπάτι καταβολισμού της χιτίνης, ενώ είναι πολύ πιθανή και η αποκάλυψη νέων. Προς την κατεύθυνση αυτή επομένως είναι σκόπιμο να δοκιμαστεί η δράση αυτής της απακετυλάσης σε συνδυασμό με ένζυμα όπως χιτινάσες, χιτοζανάσες, GlcNάσες κλπ. ώστε να διαπιστώσουμε αν αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια συνεργάζονται και σε ποιο βαθμό. Παρακάτω παραθέτουμε επιπλέον λόγους, για τους οποίους η μελέτη αυτού του ενζύμου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον μια και τα προϊόντα απακετυλίωσης των oligομερών χιτίνης (και της ίδιας της χιτίνης) έχουν σημαντικές εφαρμογές σε πολλούς τομείς:

- ✓ Η παραγωγή β-*N*-ακετυλγλυκοζαμίνης (GlcNAc) βασίζεται κυρίως στη χημική κατεργασία της χιτίνης. Η χημική αυτή κατεργασία πραγματοποιείται και σε μεγαλύτερη κλίμακα για τη βιομηχανική πλέον παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μονομερούς της χιτίνης. Όπως γίνεται κατανοητό, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μια σειρά προβλημάτων που ξεκινούν κατά πρώτον από το υψηλό κόστος παραγωγής, καθότι είναι μια κατεργασία που απαιτεί μια σειρά χημικών αντιδραστηρίων σε μεγάλες ποσότητες, καθώς και συγκεκριμένες απαιτήσεις των χώρων διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών. Κατά δεύτερον, το τελικό προϊόν εμφανίζει όξινες προσμίξεις, λόγω της χρήσης πυκνών διαλυμάτων ισχυρών οξέων, καθότι η πλήρης απομάκρυνση αυτών δεν είναι δυνατή (38) .
- ✓ Η GlcN αποτελεί την βασική μονάδα σε πολλά και σημαντικά βιολογικά μακρομόρια όπως είναι οι oligοσακχαρίτες, οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Αποτελεί, επίσης τον δομικό λίθο του συνδετικού ιστού και των γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs), ώστε να συγκρατούνται τα κύτταρα συνδεδεμένα και συμμετέχει στην αναδόμηση των ιστών (39). Λόγω των παραπάνω τα τελευταία χρόνια πολλά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ως διατροφικά συμπληρώματα περιέχουν την γλυκοζαμίνη.

5. Βιβλιογραφία

1. Brant, D.A. (1976). Conformational theory applied to polysaccharide structure. *Q. Rev. Biophys.*, **9** 527-596.
2. Roberts G.A.F., (1993). Proposals for a standard nomenclature for chitin and chitosan . *European Chitin Society Newsletter*, no.1, ed. R.A.A Muzzarelli.
3. Hirano, S. (1996) Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**, 237-258.
4. Dodanc, V. and Vilivalam, V. (1998) Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Today* **1**, 246-253.
5. Shahidi, F. *et al.* (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 37-51.
6. Shigemasa, Y. and Minami, S. (1996) Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 383-420.
7. Chang, K. L. *et al.* (1997) Heterogeneous *N*-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* **303**, 327-332.
8. Christodoulidou, A. *et al.* (1996) Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 31420-31425.
9. Araki, Y. and Ito, E. (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* **189**, 249-253.
10. Kafetzopoulos, D. *et al.* (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2564-2568.
11. Martinou, A. *et al.* (1993) Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.* **644**, 35-41.
12. Gao, X. *et al.* (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.* **117**, 257-263.
13. Alfonso, C. *et al.* (1995) Purification of a heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* **30**, 49-54.
14. Tsigos, I. and Bouriotis, V. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **270**, 26286-26291.

15. Tokuyasu, K. *et al.* (1996) Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1598-1603.
16. Gooday, G. W. (1994) in *Biochemistry of Microbial Degradation* (Ratledge, C., ed) pp. 279–312, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
17. Park, J. K., Keyhani, N. O., and Roseman, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33077–33083.
18. Keyhani, N. O., and Roseman, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14367–14371.
19. Keyhani, N. O., Wang, L. X., Lee, Y. C., and Roseman, S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 33084–33090.
20. Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M., and Imanaka, T. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5338–5344.
21. Tanaka, T., Fukui, T., and Imanaka, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35629–35635.
22. Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 5175–5181.
23. Ezaki, S., Miyaoku, K., Nishi, K., Tanaka, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Atomi, H., and Imanaka, T. (1999) *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 130–135.
24. Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., and Bouriotis, V. (2000) *Trends Biotechnol.* **18**, 305–312.
25. John, M., Roehrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 625–629.
26. Nakamura, N., Inoue, N., Watanabe, R., Takahashi, M., Takeda, J., Stevens, V. L., and Kinoshita, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15834–15840.
27. Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., and Kinoshita, T. (1999) *Biochem. J.* **339**, 185–192.
28. Chang, T., Milne, K. G., Guether, M. L. S., Smith, T. K., and Ferguson, M. A. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 50176–50182.
29. Newton, G. L., Av-Gay, Y., and Fahey, R. C. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 6958–6963.
30. Handa, N., Terada, T., Kamewari, Y., Hamana, H., Tame, J. R. H., Park, S. Y., Kinoshita, K., Ota, M., Nakamura, H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2003) *Protein Sci.* **12**, 1621–1632.

31. Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V., (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes . *Carbohydr. Res.*, **273**, 235-242.
32. Bergmeyer, H.U., (1974). (Ed), *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed., Vol. **1**, Verlag Chemie, Weinheim, pp 112-117.
33. Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
34. Read, T., Peterson, S., Tourasse, N. et al. (2003). *Nature* **423**, 81-86.
35. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N. et al. (2003). *Nature* **423**, 87-91.
36. Hyun-Jae, S., et al. (1999) *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 319-322
37. Yamano, N., Matsushita, Y., Kamada, Y., Fujishima, S. and Arita, M. (1996). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **8**, 1320-1323
38. Howrowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal, H. J. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5046-49
39. Vidal y Plana, R. R. and K. Karzel (1980). *Fortschr Med* **98(21)**: 801-6.
40. Maynes, J. T., Garen, C. et al. (2003). The crystal structure of 1-D-myo-Inosityl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside deacetylase (MshB) from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a zinc hydrolase with a lactate dehydrogenase fold. *J. Biol. Chem.*, **278**, 47166-47170.
41. McCarthy, A. A., Peterson, N. A., Knijff, R. and Baker, E. N. (2004). Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. *J. Mol. Biol.*, **335**, 1131-1141.
42. Psylinakis, E., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S. J. and Bouriotis, V. (2004). Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. Submitted

