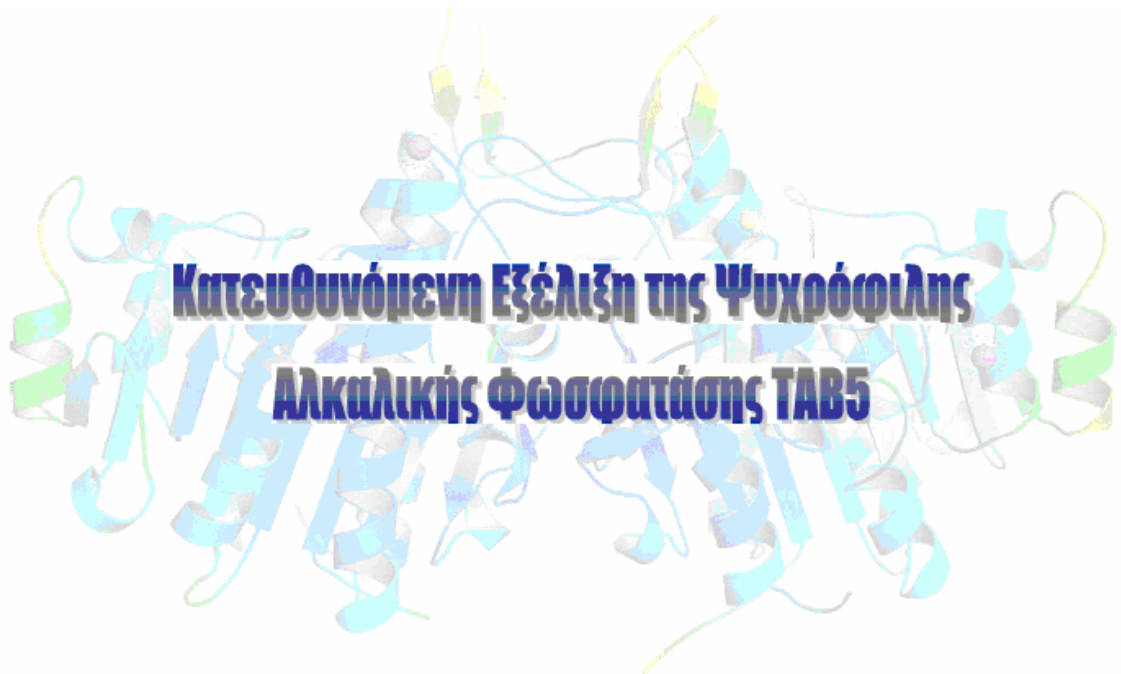


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΚΟΥΤΣΙΟΥΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Β. ΜΠΟΥΡΙΩΤΗΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2006

Περιεχόμενα

<i>Περιεχόμενα</i>	01
<i>Πίνακας σχημάτων και πινάκων</i>	04
<i>Ευχαριστίες</i>	08
<i>Summary</i>	09
<i>Περίληψη</i>	11
<i>Εισαγωγή</i>	13
Ψυχρόφιλα ένζυμα	14
Η ζωή σε χαμηλές θερμοκρασίες	14
Ένζυμα προσαρμοσμένα σε χαμηλές θερμοκρασίες (cold adapted enzymes)	15
Θερμοδυναμικές παράμετροι των ψυχρόφιλων ενζύμων	16
Δομική σταθερότητα ψυχρόφιλων ενζύμων	20
Συσχέτιση της σταθερότητας με δομικούς-μοριακούς παράγοντες	23
Διερευνώντας τα εξελικτικά μονοπάτια προσαρμογής των ενζύμων	26
Κατευθυνόμενη Εξέλιξη	31
Πρωτεϊνική μηχανική	31
Τεχνικές δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας	32
Δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας καθ' όλο το μήκος του γονιδίου	33
Δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας σε περιορισμένες περιοχές του γονιδίου	34
Τεχνικές <i>in vitro</i> ανασυνδυασμού	34
Τεχνικές ανάλυσης τροποποιημένων ενζυμικών ιδιοτήτων	39
Τροποποίηση ενζυμικών ιδιοτήτων μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης	42
Αλκαλική Φωσφατάση	44
Από τα βακτήρια στα θηλαστικά	44
Μηχανισμός κατάλυσης της αλκαλικής φωσφατάσης	46
Εφαρμογές της αλκαλικής φωσφατάσης	48

Αλκαλική φωσφατάση από το ανταρκτικό στέλεχος TAB5	49
Σκοπός της εργασίας	50
Υλικά και μέθοδοι	52
Υλικά	53
Μέθοδοι	54
Κλωνοποίηση του γονιδίου TAB5AP	54
Δημιουργία βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων κλώνων αλκαλικής φωσφατάσης	54
Εισαγωγή σχεδιασμένων μεταλλαγών (Site Directed Mutagenesis)	56
Υπερέκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (αγρίου ή μεταλλαγμένου τύπου) σε κύτταρα <i>E. coli</i>	58
Απομόνωση πρωτεϊνών	58
Σάρωση της μεταλλαγμένης βιβλιοθήκης	59
Φασματοφωτομετρική μέθοδος ανίχνευσης-μέτρησης ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης	60
Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών	60
Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	61
Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis)	61
Μετρήσεις κινητικών παραμέτρων	61
Σταθερότητα πρωτεϊνών	62
Ανάλυση της δομής της ψυχρόφιλης TAB5AP	63
Αποτελέσματα	65
Κλωνοποίηση – απομόνωση	66
Πειραματική στρατηγική της κατευθυνόμενης εξέλιξης της ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης TAB5AP	68
Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της	71
Κινητικές παράμετροι των ενζύμων	75
Ενέργεια ενεργοποίησης και θερμοδυναμικοί παράμετροι των ενζύμων	77
Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)	79

Ανάλυση της δομής της TAB5AP. Τρισδιάστατη ταυτοποίηση των μεταλλαγών	81
Συζήτηση	84
Συζήτηση	85
Ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες	85
Δομική σταθερότητα	87
Δομική ανάλυση των μεταλλαγών	89
Ανάλυση της δομής της ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης TAB5	97
Δομική ανάλυση του ενεργού κέντρου της TAB5AP και σύγκριση με τις ήδη γνωστές αλκαλικές φωσφατάσες	99
Δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης μετάλλων στην TAB5AP	102
Δομικοί παράγοντες καθορισμού του ψυχρόφιλου χαρακτήρα της TAB5AP	105
Συμπεράσματα	108
Βιβλιογραφία	111

Πίνακας σχημάτων και πινάκων

Σχήμα 1.	Θερμική αποδιάταξη διαφόρων α-αμυλασών και καταγραφή τους μέσω DSC.....	21
Σχήμα 2.	DSC θερμογράφημα της χιτοβιάσης από το ψυχρόφιλο στέλεχος <i>Arthrobacter sp.</i> TAD20.....	22
Σχήμα 3.	Η θερμική αποδιάταξη της ψυχρόφιλης PGK (p) εμφανίζει μια θερμοασταθή και μια θερμοσταθερή περιοχή συγκρινόμενη με το μεσόφιλο ένζυμο από το σακχαρομήκυτα (m).....	23
Σχήμα 4.	Υποθετικό φυλογενετικό δέντρο ομόλογων ενζύμων με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες.....	27
Σχήμα 5.	Υποθετικό φυλογενετικό δέντρο ενός ενζύμου και μεταλλαγμένων κλώνων του που φέρουν τις επιθυμητές τροποποιημένες βιοχημικές ιδιότητες.....	29
Σχήμα 6.	Πρωτεϊνικό γράφημα (protein landscape) για μια επιθυμητή ιδιότητα.....	30
Σχήμα 7.	Γενικό σχήμα κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών.....	32
Σχήμα 8.	Σύνοψη των τεχνικών δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας.....	32
Σχήμα 9.	Μέσω της τεχνικής Stemmer DNA Shuffling καταλήγουμε από γονίδιο ή γονίδια αγρίου τύπου στην επιλογή κλώνων με συσσώρευση ωφέλιμων μεταλλαγών (•) και στην απόρριψη των επιβλαβών (•).....	36
Σχήμα 10.	Random priming <i>in vitro</i> recombination (RPR).....	37
Σχήμα 11.	Staggered extension process (StEP).....	37
Σχήμα 12.	ITCHY (Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes).....	38
Σχήμα 13.	Μέθοδοι φυσικής σύνδεσης.....	40
Σχήμα 14.	Μέθοδοι διαμερισματοποίησης.....	41
Σχήμα 15.	Μέθοδοι χωροταξικής σύνδεσης.....	41
Σχήμα 16.	Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας της αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, με τις δύο πιθανές κατευθύνσεις της αντίδρασης.....	44
Σχήμα 17.	Αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αλκαλικής φωσφατάσης από το βακτήριο <i>Escherichia coli</i>	45
Σχήμα 18.	Μηχανισμός κατάλυσης της αλκαλικής φωσφατάσης.....	47
Σχήμα 19.	Στοιχίση της αμινοξικής αλληλουχίας της TAB5AP με άλλες αλκαλικές φωσφατάσες από τα βακτήρια <i>E.coli</i> και <i>B.subtilis</i> , το	

	σακχαρομήκυτα (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), την ανθρώπινη εντερική και από το θερμόφιλο στέλεχος <i>Thermotoga maritima</i>	50
Σχήμα 20.	Γενική δομή της πλασμιδιακής κατασκευής pRsetA AP.....	66
Σχήμα 21.	Χρωματογραφήματα καθαρισμού της αλκαλικής φωσφατάσης.....	67
Σχήμα 22.	Σάρωση των βιβλιοθηκών κατευθυνόμενης εξέλιξης.....	69
Σχήμα 23.	Η γενεαλογία των μεταλλαγμένων ενζύμων από την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου (AP wt).....	70
Σχήμα 24.	Γραφική αναπαράσταση της εναπομένουσας ενεργότητας των αλκαλικών φωσφατασών στους 55°C.....	73
Σχήμα 25.	Γραφική αναπαράσταση της εναπομένουσας ενεργότητας των αλκαλικών φωσφατασών στους 60°C.....	74
Σχήμα 26.	Ο αριθμός μετατροπής k_{cat} για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C.....	75
Σχήμα 27.	Η κινητική παράμετρος K_m για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C.....	76
Σχήμα 28.	Η φυσιολογική αποδοτικότητα k_{ef} για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C.....	77
Σχήμα 29.	Διαγράμματα Arrhenius για τον υπολογισμό της E_a της APwt και των μεταλλαγμένων μορφών αυτής.....	78
Σχήμα 30.	Διαγράμματα διαφορικής θερμιδομετρίας για την APwt και τα μεταλλαγμένα ένζυμα.....	80
Σχήμα 31.	Τρισδιάστατη δομή της ομοδιμερούς ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης TAB5.....	82
Σχήμα 32.	Σχηματική αναπαράσταση της παραμέτρου $\Delta(\Delta S^\ddagger)$	86
Σχήμα 33.	Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας για την αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου.....	87
Σχήμα 34.	Μη αντιστρεπτή και αντιστρεπτή αποδιάταξη πρωτεϊνών.....	88
Σχήμα 35.	Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών S338T, S42G και H135E στην δομή της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5.....	91
Σχήμα 36.	Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών G149D, S86A και G87A στην δομή της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5.....	93

Σχήμα 37.	Στοιχίση της αμινοξικής αλληλουχίας της TAB5AP με άλλες αλκαλικές φωσφατάσες μεσόφιλης ή θερμόφιλης προέλευσης.....	94
Σχήμα 38.	Αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αλκαλικής φωσφατάσης από το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> (ECAP), την αρκτική γαρίδα <i>Pandalus borealis</i> (SAP), ανθρώπινο πλακούντα (PLAP) και το ανταρκτικό βακτηριακό στέλεχος TAB5.....	98
Σχήμα 39.	Το ενεργό κέντρο της TAB5AP.....	100
Σχήμα 40.	Οι δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης μετάλλων στην TAB5AP.....	102
Σχήμα 41.	Η M ₄ θέση πρόσδεσης Mg ²⁺ στην TAB5AP.....	103
Σχήμα 42.	Η M ₅ θέση πρόσδεσης Mg ²⁺ στην TAB5AP.....	104
Σχήμα 43.	Χρωματική απεικόνιση του φορτιού της εξωτερικής επιφάνειας των κρυσταλλογραφικά αναλυμένων αλκαλικών φωσφατασών.....	106
Εικόνα 1.	Πηκτή ακρυλαμίδης.....	67
Πίνακας 1.	Φυσικοχημικοί παράμετροι της ενεργότητας διαφόρων ψυχρόφιλων και μεσόφιλων ενζύμων.....	18
Πίνακας 2.	Δομικοί παράγοντες που πιθανόν εμπλέκονται στην σταθερότητα α-αμυλασών όπως έχουν καθοριστεί από τη σύγκριση των τρισδιάστατων δομών τους.....	26
Πίνακας 3.	Διάφορες τεχνικές ανασυνδυασμού με τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	35
Πίνακας 4.	Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της στους 55°C.....	72
Πίνακας 5.	Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της στους 60°C.....	72
Πίνακας 6.	Ενέργεια ενεργοποίησης και θερμοδυναμικοί παράμετροι των ενζύμων.....	78
Πίνακας 7.	Θερμιδομετρικές παράμετροι της δομικής σταθερότητας της APwt και των μεταλλαγμένων ενζύμων.....	81
Πίνακας 8.	Αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση των μετάλλων του ενεργού κέντρου.....	99

Πίνακας 9.	Στοίχιση των αντίστοιχων αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου της TAB5AP με της ECAP.....	101
Πίνακας 10.	Δομική ανάλυση των σταθεροποιητικών δεσμών στις κρυσταλλογραφικά αναλυμένες δομές αλκαλικών φωσφατασών....	105

Ευχαριστίες

Στο τέλος αυτής της πολύχρονης προσπάθειας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που άμεσα ή έμμεσα βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Βασίλη Μπουριώτη, ο οποίος όχι μόνο με εμπιστεύτηκε στο να φέρω εις πέρας την παρούσα εργασία, αλλά παράλληλα με στήριξε, τόσο ηθικά όσο και επιστημονικά κατά τα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Πολύ σημαντική υπήρξε και η βοήθεια των καθηγητών Τάσου Οικονόμου και Μιχάλη Κοκκινίδη μέσω των πολύτιμων συμβουλών και των χρήσιμων παρατηρήσεων που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής για το ενδιαφέρον, το σεβασμό και την εκτίμηση που έδειξαν στην ερευνητική μου προσπάθεια, τους καθηγητές Ιωσήφ Παπαματθαίακη, Νικόλαο Πανόπουλο, Κωνσταντίνο Τοκατλίδη και Δέσποινα Αλεξανδράκη.

Σημαντική υπήρξε και η βοήθεια των εργαστηρίων των καθηγητών Georges Feller, Edward Hough και Pirrko Heikinheimo.

Ακολουθως θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους, αλλά πάνω απ' όλα φίλους, από το εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, με τους οποίους περάσαμε υπέροχες και αξέχαστες στιγμές διασκεδάζοντας στον πάγκο ή δουλεύοντας στο στίβο ή σε κάποια παραλία. Μαίρη (το δεξί μου χέρι), Αλεξάνδρα (η διάδοχος), Μαρία, Γιούλη, Θάνια, Νίκος, Δήμητρα αλλά και παλιότερα μέλη του εργαστηρίου ή του ορόφου Ιάσωνας, Κώστας, Μανώλης, Αγγελική, Χρύσα, Γιάννης και Αλέξανδρος. Σας ευχαριστώ...

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να δώσω στους φίλους που απέκτησα τα 11 χρόνια παραμονής μου στο Ηράκλειο. Καθένας με τον τρόπο του βοήθησε να περάσω αυτήν την υπέροχη και δημιουργική περίοδο της ζωής μου. Μιχάλη (ο ψηλότερος ποδοσφαιριστής, τεννίστας, γατούλης αλλά πάνω απ' όλα φίλος), Σάνυ, Βασίλη, Σταμάτη, Μανώλη, Νικολάκη, Φίλιππε, Mike... δε θα χαθούμε.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον αδελφικό μου φίλο και κουμπάρο Λάμπρο. Πάντα αποτελούσε και αποτελεί το κίνητρο μου για το καλύτερο...

Στους γονείς μου και τον υπέροχο αδερφό μου θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και την αγάπη μου για την ανιδιοτελή τους βοήθεια, ηθική και υλική όλα αυτά τα χρόνια.

Όσο για την γυναίκα μου ότι κι αν πω είναι λίγο. Με έμαθε να ζω, να αισθάνομαι, να αγαπώ. *Λιάκι, έρχομαι...*

Summary

Psychrophilic alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5 is a typical cold adapted enzyme exhibiting higher catalytic efficiencies at low and moderate temperatures, along with remarkable thermolability. In an effort to investigate the evolutionary process and the molecular basis of cold adaptation, we have used directed evolution to engineer the cold adapted enzyme. A round of error-prone PCR and screening 13000 clones yielded three thermostable and three thermolabile mutants. Three libraries were produced by *in vitro* recombination of the selected mutations in different combinations. After screening, three thermolabile double mutants were selected. The combination of mutations S86A and G87A was achieved through site-directed mutagenesis in order to see if there was any additive effect concerning thermostability.

Selected mutants exhibiting different temperature adaptations than the wt were characterized by the calculation of activation parameters. Destabilized mutants H135E and H135E/G149D exhibited increased k_{cat} values at 30°C by 2 and 3 fold respectively when compared to native enzyme. Mutants S42G, S338T, S42G/S338T and S42G/H135E were also destabilized but appeared less active. This observation demonstrates that several structural constraints should be satisfied to maintain optimal activity. All stabilized variants (S86A, G87A, S86A/G87A and G149D) appeared less active compared to wt protein.

As demonstrated by differential scanning calorimetry the engineered mutations exhibited a complete disappearance of unfolding transitions and large shifts of the T_m values. Stabilized mutants were characterized by increased T_{m1} and T_{m2} as compared to that of the wild type AP. On the contrary, destabilized mutants appeared to have completely lost the unfolding intermediates around 60 °C. Except from S86A/G87A the rest of the mutants with higher T_{m1} and T_{m2} have no significant variation of ΔH_{cat} . This value is drastically decreased for the mutants with lower T_m values.

Comparison of the mutated and the wild type enzyme revealed the delicate balance that exists between activity and stability. Similarly to previous studies we have observed that low temperature activity and thermostability can be improved simultaneously when comparing mutant H135E/G149D to H135E.

In this work the structure of the wild type TAB5 AP and its comparison with other AP structures are also presented. The functional and temperature adaptive consequences of the mutations were studied by modelling the changes into the crystal structure of the TAB5 AP. All selected mutations were located close to the active site, explaining their effects on enzyme activity. Remarkably, three out of six of the selected mutations involve a change in a glycine residue (two removals, one addition), highlighting the unique properties of this amino acid in defining the psychrophilic adaptation of the enzyme.

Περίληψη

Η αλκαλική φωσφατάση από το στέλεχος TAB5 (TAB5 AP) παρουσιάζει χαρακτηριστικά ψυχρόφιλου ενζύμου, δηλαδή υψηλή καταλυτική ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αξιοσημείωτη θερμοευαισθησία. Στην προσπάθεια μας να μελετήσουμε την εξελικτική διαδικασία και την μοριακή βάση της προσαρμογής των ενζύμων σε χαμηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιήσαμε τεχνικές κατευθυνόμενης εξέλιξης για την τροποποίηση της TAB5 AP. Σε ένα πρώτο κύκλο δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων κλώνων με τη χρήση του error prone PCR. Ο έλεγχος 13000 κλώνων οδήγησε στην επιλογή τριών θερμοσταθερών και τριών θερμοασταθών ενζύμων. Τρεις βιβλιοθήκες δημιουργήθηκαν μέσω *in vitro* ανασυνδυασμού των επιλεγμένων μεταλλαγών σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Από την σάρωση τους επιλέχθηκαν τρεις θερμοασταθείς κλώνοι. Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε πιθανό αθροιστικό αποτέλεσμα στην θερμοσταθερότητα λόγω της συνύπαρξης των μεταλλαγών S86A και G87A, σχεδιάσαμε το ένζυμο που φέρει την διπλή μεταλλαγή S86A/G87A μέσω κατάλληλων τεχνικών PCR.

Τα επιλεγμένα ένζυμα χαρακτηρίστηκαν με τον προσδιορισμό των κινητικών και θερμοδυναμικών τους παραμέτρων. Ο αριθμός μετατροπής (k_{cat}) των θερμοασταθών ενζύμων με τις μεταλλαγές H135E και H135E/G149D στους 30 °C ήταν υψηλότερος κατά 2 και 3 φορές αντίστοιχα, σε σχέση με του φυσικού ενζύμου. Τα ένζυμα με τις αμινοξικές αντικαταστάσεις S42G, S338T, S42G/S338T και S42G/H135E, αν και θερμοασταθή εμφανίζουν μικρότερη ενεργότητα. Αυτή η παρατήρηση μας επισημαίνει ότι μια σειρά δομικών απαιτήσεων πρέπει να πληρείται για την διατήρηση της βέλτιστης ενεργότητας. Τέλος, όλα τα θερμοσταθερά ένζυμα (S86A, G87A, S86A/G87A και G149D) εμφανίζονται λιγότερο ενεργά συγκρινόμενα με το φυσικό ένζυμο.

Μέσω πειραμάτων διαφορικής θερμιδομετρίας γίνεται εμφανής η πλήρης έλλειψη αποδιατακτικών μεταβολών και οι μεγάλες αλλαγές στις τιμές των T_m των επιλεγμένων μεταλλαγών. Τα θερμοσταθερά ένζυμα χαρακτηρίζονται από αύξηση των T_{m1} και T_{m2} συγκρινόμενα με το φυσικό ένζυμο. Αντιθέτως τα θερμοασταθή ένζυμα φαίνονται να έχουν χάσει τελείως τις ενδιάμεσες αποδιατακτικές μορφές γύρω από τους 60°C. Εκτός του διπλά μεταλλαγμένου

ενζύμου S86A/G87A, τα υπόλοιπα ένζυμα με υψηλότερα T_{m1} και T_{m2} δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες μεταβολές της θερμοδομετρικής ενθαλπίας (ΔH_{cat}). Ωστόσο, οι τιμές της ΔH_{cat} έχουν δραστικά μειωθεί για τα μεταλλαγμένα ένζυμα με χαμηλότερα T_m .

Η σύγκριση των μεταλλαγμένων ενζύμων με του αγρίου τύπου αποκάλυψε την λεπτή ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην ενζυμική ενεργότητα και την δομική σταθερότητα. Σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες παρατηρήσαμε ότι η ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και η θερμοσταθερότητα μπορούν να βελτιωθούν ταυτόχρονα. Αυτή η παρατήρηση προέκυψε όταν συγκρίναμε το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο H135E/G149D με το ένζυμο που φέρει την μεταλλαγή H135E.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η δομή της αγρίου τύπου TAB5 AP καθώς και σύγκριση αυτής με άλλες δομές αλκαλικών φωσφατασών. Οι επιπτώσεις των επιλεγμένων μεταλλαγών στην θερμοσταθερότητα και την ενεργότητα μελετήθηκαν σε μοριακό επίπεδο κάνοντας χρήση αυτών των δομικών στοιχείων. Όλες οι επιλεγμένες μεταλλαγές εντοπίζονται γύρω από το ενεργό κέντρο, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο την επίδραση τους στην ενεργότητα του ενζύμου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τρεις από τις έξι μεταλλαγές αφορούν αλλαγή καταλοίπου γλυκίνης (δύο αφαιρέσεις, μια προσθήκη), τονίζοντας την σημασία του συγκεκριμένου καταλοίπου στους μηχανισμούς προσαρμογής των ψυχρόφιλων ενζύμων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγή

Ψυχρόφιλα ένζυμα

Η ζωή σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η βιόσφαιρα της γης είναι στο κυριότερο της τμήμα ψυχρή. Πάνω από το 85% υφίσταται θερμοκρασίες χαμηλότερες από 5°C κατά τη διάρκεια του χρόνου [1], ενώ το 75% είναι διαρκώς σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 5°C.

Πληθώρα διάφορων μικροβίων έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορα ψυχρά περιβάλλοντα με αντιπροσώπους από τα Βακτήρια, τα Ευκάρυα, και τα Αρχαία [2]. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από ψυχρές περιοχές είναι είτε ψυχρότροφοι (ψυχροαυτοθεκτικοί), είτε ψυχρόφιλοι. Οι ψυχρότροφοι οργανισμοί αναπτύσσονται με ανεκτούς ρυθμούς κοντά στο σημείο πήξης του νερού, αλλά αναπτύσσονται πιο γρήγορα σε θερμοκρασίες πάνω από 20°C. Ωστόσο οι ψυχρόφιλοι έχουν ανώτερο όριο ανάπτυξης από τους 15°C και κάτω, ενώ θερμοκρασίες πάνω από τους 20°C είναι απαγορευτικές για την επιβίωση τους. Ανεξάρτητα από το πώς ορίζονται, οι 'ψύχρο-μικροοργανισμοί' είναι προσαρμοσμένοι σε ψυχρές συνθήκες και εμφανίζουν ιδιότητες πολύ διαφορετικές από τους οργανισμούς που αναπτύσσονται σε πιο θερμές συνθήκες (μεσόφιλοι και θερμόφιλοι οργανισμοί).

Στην προσπάθεια να ξεπεράσουν τις ανεπιθύμητες και επιβλαβείς συνέπειες που επιφέρουν οι χαμηλές θερμοκρασίες στο σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών, οι ψυχρόφιλοι οργανισμοί ανέπτυξαν μια μεγάλη ποικιλία προσαρμοστικών στρατηγικών από το μοριακό έως το κυτταρικό επίπεδο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της ψυχρόφιλης προσαρμογής είναι η διαφορετική ρύθμιση της μεμβρανικής ρευστότητας [3], η σύνθεση ειδικών μορίων γνωστών ως cold-shock πρωτεΐνες [4], κρυοπροστατευτικών και αντιπαγωτικών μορίων [5], η ρύθμιση της διαπερατότητας των διαμεμβρανικών καναλιών ιόντων, του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και κυριότερο απ' όλα η τροποποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων και ειδικότερα των ενζύμων που τις ελέγχουν.

Ένζυμα προσαρμοσμένα σε χαμηλές θερμοκρασίες (cold adapted enzymes)

Στα διαρκώς ψυχρά περιβάλλοντα, οι χαμηλές θερμοκρασίες ανάγκασαν τους ψυχρόφιλους οργανισμούς να αναπτύξουν τροποποιημένες ενζυμικές ιδιότητες που καθιστούν εφικτή την επιβίωση και την ανάπτυξή τους υπό φυσιολογικούς ρυθμούς. Αυτός ο στόχος θα μπορούσε να επιτευχθεί με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμων ώστε να αναπληρώσουν τους χαμηλούς ρυθμούς της αντίδρασης που επιτελούν. Ωστόσο μια τέτοια στρατηγική θα ήταν πολυδάπανη και ασύμφορη ενεργειακά για τον εκάστοτε οργανισμό, με αποτέλεσμα να έχει χρησιμοποιηθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις όπως κατά τον εγκλιματισμό των εξώθερμων οργανισμών [6, 7]. Μια άλλη στρατηγική θα μπορούσε να είναι η έκφραση ειδικών ενζυμικών ισομορφών, κινητικά προσαρμοσμένων σε διαφορετικές συνθήκες [8, 9]. Αυτού του είδους η προσαρμογή είναι εφικτή όταν είναι διαθέσιμα πολλαπλά αντίγραφα των συγκεκριμένων γονιδίων και είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις οργανισμών που φέρουν μηχανισμούς προσαρμογής για διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, όπως μερικά ψάρια [10] και στους νηματώδεις [11].

Μια ακόμη εναλλακτική προσαρμογή θα ήταν η ύπαρξη ενζύμων που η ενεργότητα τους θα ήταν ανεξάρτητη από την θερμοκρασία. Σύμφωνα με την βασική εξίσωση του Arrhenius και όπως αυτή τροποποιείται από την θεωρία των συγκρούσεων (collision theory) (Εξίσωση 1),

$$k_{cat} = Zpe^{-E_a/RT} \quad \text{(Εξίσωση 1)}$$

όπου k_{cat} είναι ο αριθμός μετατροπής του ενζύμου, Z είναι η συχνότητα των συγκρούσεων των μορίων, p είναι μια παράμετρος, που σχετίζεται με παράγοντες χώρου και την συχνότητα των συγκρούσεων των μορίων, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 kJ/mol), και T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin. Αναλύοντας την εξίσωση αυτή όταν η E_a τείνει στο μηδέν τότε ο εκθετικός παράγοντας E_a/RT τείνει στο 1, οδηγώντας σε μια αντίδραση ουσιαστικά ανεξάρτητη από την θερμοκρασία. Τέτοιου είδους ένζυμα είναι πολύ σπάνια. Γνωστά παραδείγματα είναι η καρβονική ανυδράση των

ερυθροκυττάρων, οι καταλάσες από διάφορα είδη και η ισομεράση της φωσφορικής τριόζης από το *Vibrio marinus*. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, οι περισσότεροι οργανισμοί που ζουν σε ψυχρά περιβάλλοντα έχουν προσαρμόσει τους μεταβολικούς τους ρυθμούς μέσω της αύξησης του καταλυτικού ρυθμού των ενζύμων τους.

Τρία βασικά χαρακτηριστικά προκύπτουν από την ανάλυση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των ψυχρόφιλων και των μεσόφιλων ενζύμων:

- Πρώτον, ο υψηλότερος αριθμός μετατροπής των ενζύμων αυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με ένζυμα προσαρμοσμένα σε μέσες θερμοκρασίες. Αυτή είναι και η κύρια προσαρμογή σε χαμηλές θερμοκρασίες μιας και αναιρεί το αρνητικό αποτέλεσμα που επιφέρουν αυτές οι συνθήκες στο ρυθμό της αντίδρασης.
- Δεύτερον, η μετατόπιση της βέλτιστης θερμοκρασίας (T_{optimum}) σε πιο χαμηλές τιμές από τα αντίστοιχα ένζυμα που προέρχονται από μεσόφιλους οργανισμούς, που αντικατοπτρίζει και την ελαττωμένη ανθεκτικότητα στη θερμοκρασία με αποτέλεσμα τα ψυχρόφιλα ένζυμα να αποδιατάσσονται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες.
- Τρίτον, η προσαρμογή δεν είναι πλήρης μιας και ο αριθμός μετατροπής σε θερμοκρασίες κοντά στους 0°C (πού είναι και η θερμοκρασία δράσης τους), δεν είναι τόσο υψηλός όσο των αντίστοιχων ενζύμων από μεσόφιλους οργανισμούς στις θερμοκρασίες που αυτά συνήθως δρουν ($\sim 40^{\circ}\text{C}$).

Θερμοδυναμικές παράμετροι των ψυχρόφιλων ενζύμων

Μια πιο αντιπροσωπευτική παράμετρος για να εκτιμήσουμε την ενεργότητα ενός ενζύμου είναι η φυσιολογική αποδοτικότητα $k_{ef}=k_{cat}/K_m$. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να λάβουμε υπόψη το περιβάλλον που λειτουργεί ένα ένζυμο. Αν ένα ένζυμο καλείται να λειτουργήσει σε ένα περιβάλλον πλούσιο στο υποστρώμα του δεν χρειάζεται να βελτιστοποιήσει τον μηχανισμό αναγνώρισης και πρόσδεσης του υποστρώματος, γεγονός που ανακλάται στην τιμή της παραμέτρου K_m , αλλά το k_{cat} . Ένα ένζυμο που βρίσκεται σε περιβάλλον με πενία υποστρώματος η αντίστροφη προσαρμογή θα ήταν η επιθυμητή [12, 13].

Σε γενικές γραμμές τα ψυχρόφιλα ένζυμα μπορούν να βελτιστοποιήσουν την παράμετρο k_{ef} με αύξηση της k_{cat} , μείωση της K_m ή με ταυτόχρονη αλλαγή και των δύο παραμέτρων. Εξετάζοντας όλα τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τις κινητικές παραμέτρους αυτών των ενζύμων εμφανίζονται δύο προσαρμοστικές τάσεις: τα ψυχρόφιλα ένζυμα που βελτιστοποιούν την k_{cat} σε βάρος της K_m (αύξηση των τιμών για k_{cat} και K_m) και εκείνα που συνολικά βελτιστοποιούν τον παράγοντα k_{ef} (αύξηση της k_{cat} και μείωση της K_m) [14, 15].

Οι υψηλές τιμές της k_{cat} που παρουσιάζουν τα ψυχρόφιλα ένζυμα συνδέεται κυρίως με την μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης των αντιδράσεων που καταλύουν [16]. Η καταλυτική σταθερά k_{cat} αντιστοιχεί στο μέγιστο αριθμό μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά ενεργό κέντρο ανά μονάδα χρόνου. Σύμφωνα με τη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης (transition state) η ενζυμική αντίδραση προχωράει με τη δημιουργία ενός σταθερού ενεργοποιημένου συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος (ES^\ddagger) σύμφωνα με την παρακάτω ισορροπία



και η επίδραση της θερμοκρασίας στο αριθμό μετατροπής δίνεται από την εξίσωση 2, σε πλήρη συσχέτιση με την εξίσωση Arrhenius,

$$k_{cat} = \kappa (k_B T/h) e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

όπου κ είναι ο συντελεστής διάδοσης και τείνει συνήθως στη μονάδα, k_B είναι η σταθερά Boltzman ($1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), h η σταθερά Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$) και ΔG^\ddagger η ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης.

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω μπορούμε να υπολογίσουμε τις τιμές για τις παραμέτρους ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις [17],

$$\Delta G^\ddagger = RT (\ln(k_B T/h) - \ln k_{cat}) \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

$$\Delta H^\# = E_\alpha - RT \quad (\text{Εξίσωση 4})$$

$$\Delta S^\# = (\Delta H^\# - \Delta G^\#)/T \quad (\text{Εξίσωση 5})$$

Η μέτρηση της k_{cat} σε διάφορες θερμοκρασίες χρησιμοποιείται για να υπολογίσουμε την ενέργεια ενεργοποίησης από την κλίση της ευθείας που προκύπτει από την γραφική παράσταση $\ln k_{cat}$ προς $1/T$ (Arrhenius plot).

Στην προσπάθεια κατανόησης του τρόπου προσαρμογής των ψυχρόφιλων ενζύμων (p) σε χαμηλές θερμοκρασίες η σύγκριση των θερμοδυναμικών τους παραμέτρων (δηλαδή η $\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$, η $\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$ και η $\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$) με τις αντίστοιχες των μεσόφιλων ενζύμων (m) αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται μια σειρά τέτοιων συγκρίσεων για διάφορα ένζυμα [17].

Η $\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$ αντικατοπτρίζει τη διαφορά των k_{cat} μεταξύ των δυο ενζύμων. Η αρνητική τιμή της $\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$ αποκαλύπτει, όπως αναμενόταν, ότι τα ψυχρόφιλα ένζυμα είναι πιο ενεργά από τα ομόλογα μεσόφιλα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Από την εξίσωση 2 διαπιστώνουμε ότι ακόμα και μεγάλες αλλαγές στην τιμή της k_{cat} οφείλονται σε μικρές αλλαγές της $\Delta G^\#$. Ωστόσο αυτές οι μικρές αλλαγές προκύπτουν από μεγάλες διαφορές στην ενθαλπική ($\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$) και εντροπική συμβολή ($\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$) μεταξύ των ψυχρόφιλων και των μεσόφιλων ενζύμων που μελετήθηκαν.

ΕΝΖΥΜΟ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	T (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta H^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$ (kJ mol ⁻¹)
Αμυλάση	<i>Alicomonas_p</i>	15	495.2	55.6	73.6	18.0	-4.1	-26.0	-21.9
	<i>Bacillus_m</i>		90.5	59.7	99.6	39.9			
Χιτινάση Α	<i>Arthrobacter_p</i>	15	1.7	69.2	60.2	-9.0	2.0	-14.1	-16.1
	<i>S. marcescens_m</i>		3.9	67.2	74.3	7.1			
Χιτοβιάση	<i>Arthrobacter_p</i>	15	98.0	59.5	44.7	-14.8	-4.0	-26.8	-22.8
	<i>S. marcescens_m</i>		18.0	63.5	71.5	8.0			
Αφυδρογονάση της 6-φοσφορικής γλυκόζης	<i>Antarctic fish_p</i>	0	106.5	56.1	36.8	-19.3	-2.1	-15.1	-13.0
	<i>Human_m</i>		42.4	58.2	51.9	-6.3			
Γλουταμική αφυδρογονάση	<i>Antarctic fish_p</i>	5	3.8	64.8	33.4	-31.4	-3.3	-25.6	-22.3
	<i>Bovine_m</i>		0.9	68.1	59.0	-9.1			
Σαμπτιλοσίνη	<i>Bacillus TA41_p</i>	15	25.4	62.7	36.0	-26.7	-3.7	-10.0	-6.3
	<i>B. subtilis_m</i>		5.4	66.4	46.0	-20.4			
Τρυψίνη	<i>Greenland cod_p</i>	5	82.0	57.7	33.0	-24.5	-2.5	-20.9	-18.3
	<i>Bovine_m</i>		27.7	60.2	53.9	-6.2			
Τρυψίνη	<i>Antarctic cod_p</i>	15	0.97	70.5	40.6	-29.9	-0.9	-42.0	-41.2
	<i>Bovine_m</i>		0.68	71.4	82.6	11.3			
Ξυλανάση	<i>Antarctic yeast_p</i>	5	14.8	61.7	45.4	-16.3	-2.6	-4.5	-1.9
	<i>Yeast_m</i>		4.9	64.3	49.9	-14.4			

Πίνακας 1. Φυσικοχημικοί παράμετροι της ενεργότητας διαφόρων ψυχρόφιλων και μεσόφιλων ενζύμων [17].

Στο σύνολο των ψυχρόφιλων ενζύμων που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, έχει διαπιστωθεί μείωση της ΔH^\ddagger . Σύμφωνα με την εξίσωση 6,

$$k_{cat} = \kappa (k_B T / h) e^{-(\Delta H^\ddagger / RT - \Delta S^\ddagger / R)} \quad (\text{Εξίσωση 6})$$

μείωση της ΔH^\ddagger και αύξηση της ΔS^\ddagger οδηγούν σε αύξηση της τιμής του αριθμού μετατροπής. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του Πίνακα 1 και την εξίσωση 6, διαπιστώνουμε ότι η ΔG^\ddagger των ψυχρόφιλων ενζύμων και κατ' επέκταση η k_{cat} δεν εμφανίζουν τις τιμές που θα αναμένονταν με βάση τη μείωση της ΔH^\ddagger . Αυτό οφείλεται στην αρνητική επίδραση που έχει η μείωση της ΔS^\ddagger . Αυτός είναι και ο λόγος που η $\Delta(\Delta S^\ddagger)_{p-m}$ έχει πάντα αρνητική τιμή. Συνεπώς σε μια ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από ψυχρόφιλα ένζυμα, η κύρια προσαρμοστική παράμετρος είναι η μείωση της ΔH^\ddagger . Επομένως, η επακόλουθη μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης επιτυγχάνεται δομικά με την μείωση των ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων που πρέπει να σπάσουν στην πορεία σχηματισμού του ES^\ddagger , υποδηλώνοντας την μειωμένη σταθερότητα αλλά και την αυξημένη ευκαμψία μέσα ή κοντά στο καταλυτικό κέντρο των ψυχρόφιλων ενζύμων [18].

Αυτή η αυξημένη ευκαμψία με τη σειρά της οδηγεί στην ύπαρξη πολλών πιθανών διαμορφώσεων του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος (ES) και κατά συνέπεια σε αυξημένη εντροπία του συμπλόκου ES στο προσαρμοσμένο στη χαμηλή θερμοκρασία ένζυμο έναντι του προσαρμοσμένου σε μέσες θερμοκρασίες, άρα και στην αρνητική τιμή της $\Delta(\Delta S^\ddagger)_{p-m}$. Οι περισσότερες πιθανές διαμορφώσεις του συμπλόκου ES συνοδεύονται σε αρκετές περιπτώσεις με μείωση της συγγένειας πρόσδεσης του υποστρώματος (δηλαδή αύξηση του K_m), εάν η αύξηση της k_{cat} οφείλεται σε αυξημένη ευκαμψία του ενεργού κέντρου.

Ωστόσο, μερικά ψυχρόφιλα ένζυμα αντιστέκονται στην τάση για αύξηση της K_m και εμφανίζουν παρόμοια ή και αυξημένη συγγένεια για το υπόστρωμα. Αυτή η στρατηγική είναι καθοριστικής σημασίας για ένζυμα που λειτουργούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (ενδοκυτταρικά ένζυμα) και επομένως η K_m αντικατοπτρίζει την ρυθμιστική παράμετρο της αντίδρασης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ψυχρόφιλων ενζύμων με αυξημένη k_{cat} και μειωμένη K_m είναι η κινάση

του φωσφογλυκερικού από την *Pseudomonas sp.* TACΠ18 [19], η β-γαλακτοσιδάση από την *Pseudomonas haloplanktis* [20] και η χιτοβιάση από το *Arthrobacter sp.* TAD20 [21].

Δομική σταθερότητα ψυχρόφιλων ενζύμων

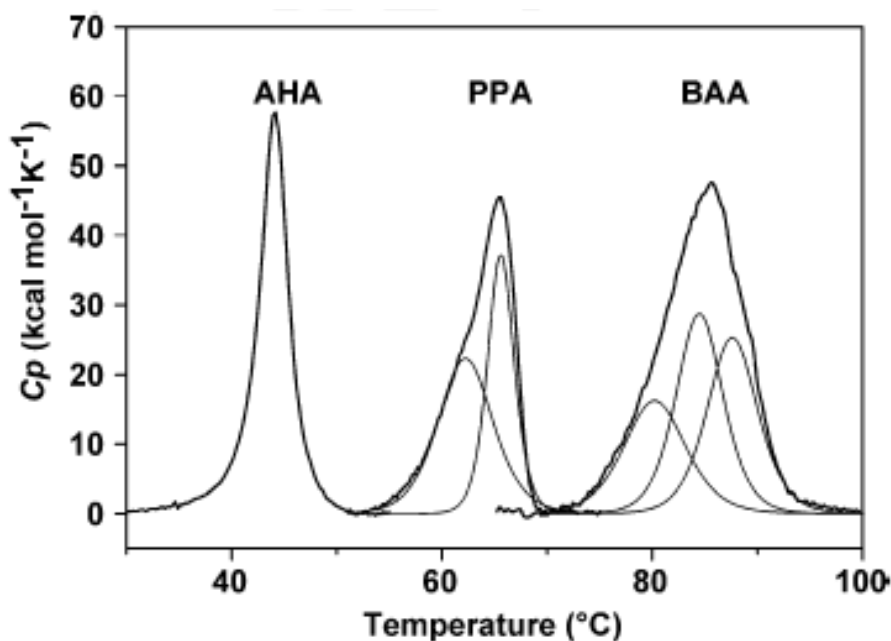
Λόγω της χαμηλής τους σταθερότητας, τα ψυχρόφιλα ένζυμα είναι πολύ χρήσιμα μοντέλα για δομικές μελέτες μέσω εξεζητημένων τεχνικών. Ανάμεσα σε αυτές, η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC, Differential Scanning Calorimetry) προσφέρει ένα ουσιαστικό πλεονέκτημα. Μια σειρά θερμοδυναμικών παραμέτρων που σχετίζονται με την δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης καταγράφονται απευθείας και δεν υπολογίζονται έμμεσα. Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι θερμιδομετρικές καταγραφές (ή θερμογραφήματα) κατά την θερμική αποδιάταξη μιας ψυχρόφιλης, μιας μεσόφιλης και μιας θερμόφιλης α-αμυλάσης [22]. Πολλές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις προκύπτουν από αυτά τα δεδομένα:

(1) Η αποδιάταξη του ψυχρόφιλου ενζύμου πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως υποδεικνύεται και από την τιμή της T_m που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία ημίσειας αποδιάταξης του ενζύμου και υπολογίζεται από την κορυφή της μεταβολής.

(2) Η πρωτεϊνική αποδιάταξη είναι μια ενδόθερμη διαδικασία. Η περιοχή κάτω από τις καμπύλες αποτελεί το συνολικό ποσό της ενέργειας που απορροφήθηκε κατά την διάρκεια της αποδιάταξης και δίνεται από την θερμιδομετρική ενθαλπία, ΔH_{cal} . Αυτή η παράμετρος αντιστοιχεί σε όλες τις ενθαλπικές διεργασίες που συμμετέχουν στην διατήρηση μιας συμπαγούς λειτουργικής δομής και εμφανίζει χαμηλότερη τιμή για το ψυχρόφιλο ένζυμο. Επιπρόσθετα, υπάρχει μια εμφανής αύξηση της ΔH_{cal} που ακολουθεί την εξής σειρά ψυχρόφιλο < μεσόφιλο < θερμόφιλο ένζυμο.

(3) Η μεταβολή για το ψυχρόφιλο ένζυμο είναι απότομη και συμμετρική, ενώ τα άλλα ένζυμα χαρακτηρίζονται από πιο πεπλατυσμένα θερμογραφήματα. Αυτό είναι ενδεικτικό στοιχείο ύπαρξης συνεργατικότητας κατά την αποδιάταξη του ψυχρόφιλου ενζύμου. Η δομή του σταθεροποιείται από λιγότερες πιο ασθενείς

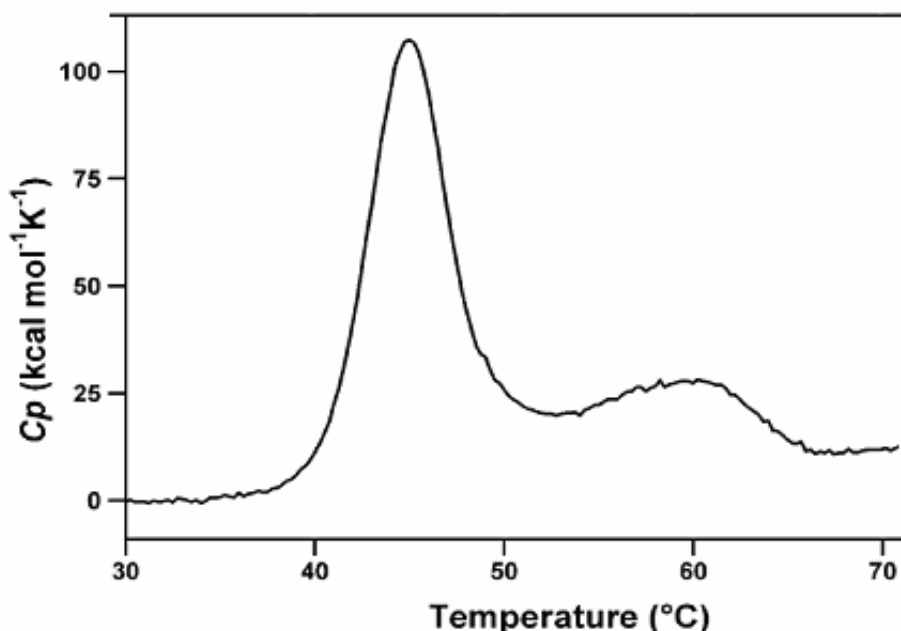
αλληλεπιδράσεις και η διάσπαση μερικών από αυτών επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την συνολική δομική συνοχή του μορίου και προωθεί με γοργούς ρυθμούς στην αποδιάταξη του.



Σχήμα 1. Θερμική αποδιάταξη διαφόρων α -αμυλασών και καταγραφή τους μέσω DSC. Συγκρίνοντας την ψυχρόφιλη α -αμυλάση AHA (*P. haloplanktis*), με τα πιο θερμοσταθερά ένζυμα PPA (πάγκρεας γουρουνιού) και BAA (*Bacillus amyloliquefaciens*) συμπεραίνουμε ότι τα τελευταία χαρακτηρίζονται από υψηλότερες τιμές της T_m (κορυφή μεταβολής) και της ΔH_{cal} (περιοχή κάτω από την μεταβολή) και πιο πεπλατυσμένες μεταβολές λόγω της ύπαρξης ενδιάμεσων θερμομετρικών περιοχών (λεπτές γραμμές) [22].

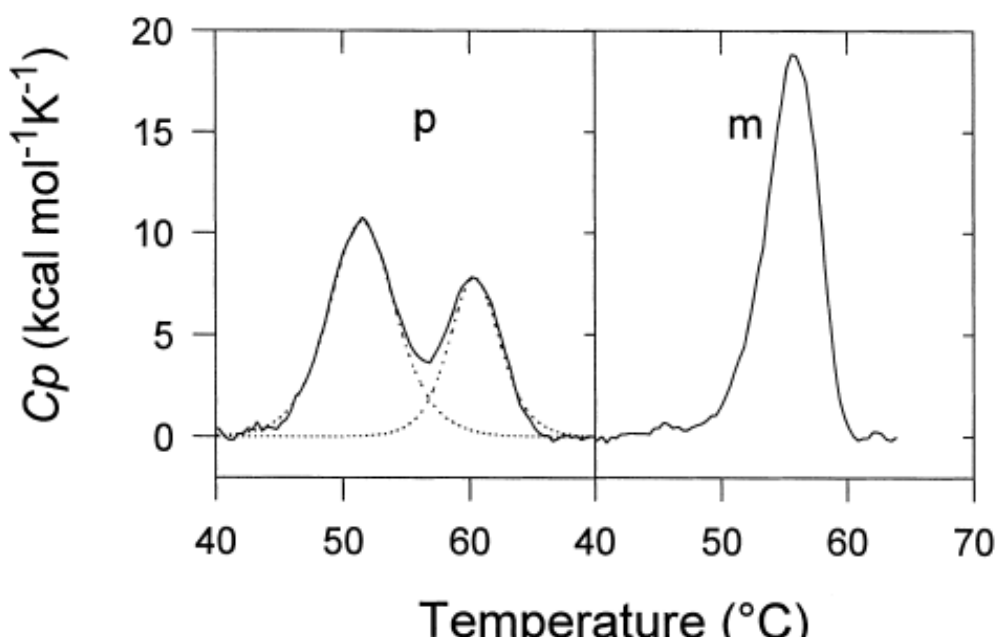
(4) Το ψυχρόφιλο ένζυμο αποδιατάσσεται σε μια διαδικασία ενός ενδιάμεσου βήματος, φανερώνοντας την συνολική χαμηλή σταθερότητα του μορίου. Αντίθετα, τα ομόλογα πιο θερμοσταθερά ένζυμα εμφανίζουν περισσότερα ενδιάμεσα βήματα (είτε άμεσα εμφανή, είτε έμμεσα μέσω ανάλυσης του θερμογραφήματος). Επομένως αυτά τα ένζυμα αποτελούνται από δομικές περιοχές διαφορετικής σταθερότητας που χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ρυθμούς αποδιάταξης.

Από την παραπάνω θερμοδομετρική μελέτη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ψυχρόφιλη α -αμυλάση αποτελείται από μια ομοιόμορφα ασταθή δομή που σταθεροποιείται μέσω λιγότερων και πιο ασθενών δεσμών σε σχέση με τις αντίστοιχες δομές των πιο θερμοσταθερών ομόλογων ενζύμων [22, 23]. Εναλλακτικά, μόνο μια περιοχή της πρωτεΐνης μπορεί να εμφανίζει αυξημένη ευκαμψία, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας ξεχωριστής θερμοασταθούς περιοχής. Αυτή η περίπτωση εισήγαγε την έννοια της τοπικής ευκαμψίας ως μιας προσαρμοστικής στρατηγικής των ψυχρόφιλων ενζύμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χιτοβιάση από το ψυχρόφιλο στέλεχος *Arthrobacter sp.* TAD20 που εμφανίζει τρεις δομικές υπομονάδες: το ενεργό κέντρο, την περιοχή πρόσδεσης γαλακτόζης και την περιοχή ομοιότητας με ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulin-like domain). Οι δύο τελευταίες περιοχές πιθανόν συμμετέχουν στην πρόσδεση στον χιτινώδη εξωσκελετό των οστρακόδερμων. Το DSC θερμογράφημα αυτού του ψυχρόφιλου ενζύμου αποκαλύπτει την ύπαρξη μιας θερμοασταθούς περιοχής, που αντιστοιχεί στην καταλυτική περιοχή και μιας θερμοσταθερής περιοχής που αντιστοιχεί στις περιοχές πρόσδεσης στο υπόστρωμα (Σχήμα 2) [21].



Σχήμα 2. DSC θερμογράφημα της χιτοβιάσης από το ψυχρόφιλο στέλεχος *Arthrobacter sp.* TAD20 [21].

Αξιοσημείωτο παράδειγμα τοπικής ευκαμψίας αποτελεί και η ψυχρόφιλη κινάση του φωσφογλυκερικού (PGK) από την *Pseudomonas* TACII 18. Πρόκειται για ένα ένζυμο που αποτελείται από δύο περιοχές. Κατά την διάρκεια της κατάλυσης αυτές οι περιοχές αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν στο ενδιάμεσο τους το ενεργό κέντρο. Η μια περιοχή είναι θερμοασταθής, ενώ η δεύτερη εμφανίζει τη σταθερότητα αντίστοιχης περιοχής μεσόφιλης PGK (Σχήμα 3). Η θερμοασταθής περιοχή φαίνεται να παρέχει την ευκαμψία γύρω από το ενεργό κέντρο ενισχύοντας τον ρυθμό της αντίδρασης, ενώ η θερμοσταθερή περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποστρώματος (αυξημένη K_m) [19].



Σχήμα 3. Η θερμική αποδιάταξη της ψυχρόφιλης PGK (p) εμφανίζει μια θερμοασταθή και μια θερμοσταθερή περιοχή συγκρινόμενη με το ομόλογο μεσόφιλο ένζυμο από το σακχαρομήκυτα (m).

Συσχέτιση της σταθερότητας με δομικούς-μοριακούς παράγοντες

Πολυάριθμες μελέτες δομικών μοντέλων ψυχρόφιλων πρωτεϊνών σχεδιασμένων βάσει ομόλογων κρυσταλλογραφικών δομών, αναλύσεις των

αλληλουχιών των προσαρμοσμένων στη χαμηλή θερμοκρασία ενζύμων και σύγκριση τους με αντίστοιχα ένζυμα από μεσόφιλους ή και θερμοφίλους οργανισμούς και κυρίως οι προσφάτως κατατεθειμένες δομές ενζύμων από ψυχρόφιλους οργανισμούς έχουν βοηθήσει στην προσπάθεια αποκρυπτογράφησης της μοριακής βάσης της μειωμένης σταθερότητας που χαρακτηρίζει αυτά τα μόρια. Όλοι οι δομικοί παράγοντες που ευθύνονται για την σταθεροποίηση μιας πρωτεϊνικής δομής εμφανίζονται εξασθενημένοι σε ισχύ αλλά και σε ποσότητα στα ψυχρόφιλα ένζυμα [14, 24, 25]. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες από τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες σε σχέση με τους μοριακούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των προσαρμοσμένων σε χαμηλές θερμοκρασίες ενζύμων.

(1) Αύξηση του αριθμού και εμφάνιση συναθροίσεων καταλοίπων γλυκίνης. Τα κατάλοιπα γλυκίνης έχουν τη δυνατότητα να εμφανιστούν με διεδρη γωνία που δεν επιτρέπεται σε άλλα κατάλοιπα, αυξάνοντας τις δυνατότητες στροφής της περιοχής με συνέπεια αύξηση της τοπικής ευκαμψίας [26, 27]. Τα κατάλοιπα γλυκίνης οδηγούν σε αύξηση της εντροπίας της αποδιαταγμένης μορφής της πρωτεΐνης.

(2) Μείωση του αριθμού των καταλοίπων προλίνης ιδιαίτερα στις περιοχές ελεύθερης δομής. Τα κατάλοιπα προλίνης παρουσιάζουν περιορισμένο εύρος τιμών διεδρης γωνίας και η απουσία τους συνδυάζεται με αυξημένη ευκαμψία ανάμεσα στις δευτεροταγείς δομές [28].

(3) Μείωση του αριθμού των καταλοίπων αργινίνης. Τα κατάλοιπα αργινίνης είναι ικανά για σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου και άλατος με αποτέλεσμα μείωση του αριθμού τους να συνεπάγεται μείωση αυτών των αλληλεπιδράσεων και αύξηση της εντροπίας της αποδιαταγμένης μορφής της πρωτεΐνης [29].

(4) Ελάττωση των δεσμών άλατος [30]. Οι ιοντικοί δεσμοί σχηματίζονται εξώθερμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες παρουσιάζονται ισχυρότεροι. Οι δεσμοί αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση των θερμοφίλων ενζύμων σχηματίζοντας δίκτυα που σταθεροποιούν την πρωτεΐνη, τα οποία δεν παρουσιάζουν την ίδια έκταση στα ψυχρόφιλα ένζυμα [29].

(5) Ελάττωση των δεσμών υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται εξώθερμα και εμφανίζονται ισχυρότεροι σε χαμηλές θερμοκρασίες [24].

(6) Μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης ιόντων. Η πρόσδεση σταθεροποιητικών ιόντων, όπως το ασβέστιο, εμφανίζεται πολύ εξασθενημένη στα ψυχρόφιλα ένζυμα και οι σταθερές πρόσδεσης αυτών διαφέρουν κατά πολύ με των αντίστοιχων μεσόφιλων [31].

(7) Τροποποιημένα N- και C- άκρα των α -ελίκων που οδηγούν σε αποσταθεροποίηση τους [23, 32].

(8) Ελάττωση των επαφών μεταξύ των αρωματικών καταλοίπων.

(9) Αύξηση των επιφανειακών υδρόφοβων καταλοίπων [33] και ελάττωση των επιφανειακών φορτισμένων καταλοίπων [34].

(10) Εισαγωγή ή έλλειψη περιοχών υπεύθυνων για συγκεκριμένες λειτουργίες όπως την αυξημένη αλληλεπίδραση με το περιβάλλον διάλυμα (εισαγωγή) ή την μειωμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων της πρωτεΐνης (έλλειψη).

(11) Ελάττωση των δισουλφιδικών δεσμών και επακόλουθη αποσταθεροποίηση της δομής.

(12) Μείωση του μεγέθους και της υδροφοβικότητας των μη φορτισμένων καταλοίπων στον πυρήνα του μορίου οδηγώντας σε λιγότερο καλό πακετάρισμα του και δημιουργία κενών [35].

Αναφορικά με τον καταλυτικό πυρήνα των ψυχρόφιλων ενζύμων, τα περισσότερα εάν όχι όλα τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου είναι συντηρημένα. Αυτό υποδηλώνει ότι ο καταλυτικός μηχανισμός και το μονοπάτι της αντίδρασης παραμένει ανεπηρέαστο στα ψυχρόφιλα ένζυμα. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις η καταλυτική κοιλότητα εμφανίζει μεγαλύτερες διαστάσεις και προσβασιμότητα στο υπόστρωμα. Κάτι τέτοιο πιθανόν να διευκολύνει την ταχύτερη απελευθέρωση των παραγόμενων προϊόντων με άμεσο αντίκτυπο στο ρυθμό της αντίδρασης. Αρκετά από τα ψυχρόφιλα ένζυμα που εμφανίζουν αυτή την προσαρμογή στις διαστάσεις του καταλυτικού τους κέντρου παρουσιάζουν εκτός από αυξημένη k_{cat} και αυξημένη K_m (δηλαδή μικρότερη συγγένεια για το υπόστρωμα) και μεγαλύτερο φάσμα υποστρωμάτων.

Ασφαλώς όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία δεν εμφανίζονται σε κάθε ψυχρόφιλο ένζυμο. Καθένα έχει υιοθετήσει την δική του στρατηγική χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς δομικών παραγόντων που θα οδηγήσουν σε αύξηση της συνολικής ή της τοπικής του ευκαμψίας (Πίνακας 2) [25].

α-αμυλάση	Ψυχρόφιλη	Μεσόφιλη
Κατάλοιπα Προλίνης	13	21
Δεσμοί άλατος	18	26
Κατάλοιπα Αργινίνης	13	28
Δεσμοί άλατος μέσω Arg	8	17
Αμινο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις μέσω Arg	2	13
Δεσμοί υδρογόνου μέσω Arg	20	42
Δισουλφιδικοί δεσμοί	4	5
Υδροφοβικότητα του πυρήνα του ενζύμου (Σ H _i)	47	103
Κατάλοιπα με μεγάλο βαθμό ελευθερίας στο C άκρο	6	0
Αρωματικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις	19	20
Αμινο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις	2	13
Οξυγόνο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις	24	19
Θείο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις	2	5
Δίπολο α-έλικας (-) στο Na	2	4
(+) στο Ca	3	6
Σταθερά πρόσδεσης Ca ⁻² (M ⁻¹)	5.0 x 10 ⁷	2.0 x 10 ¹¹
Σταθερά πρόσδεσης Cl ⁻¹ (M ⁻¹)	1.6 x 10 ²	3.5 x 10 ³

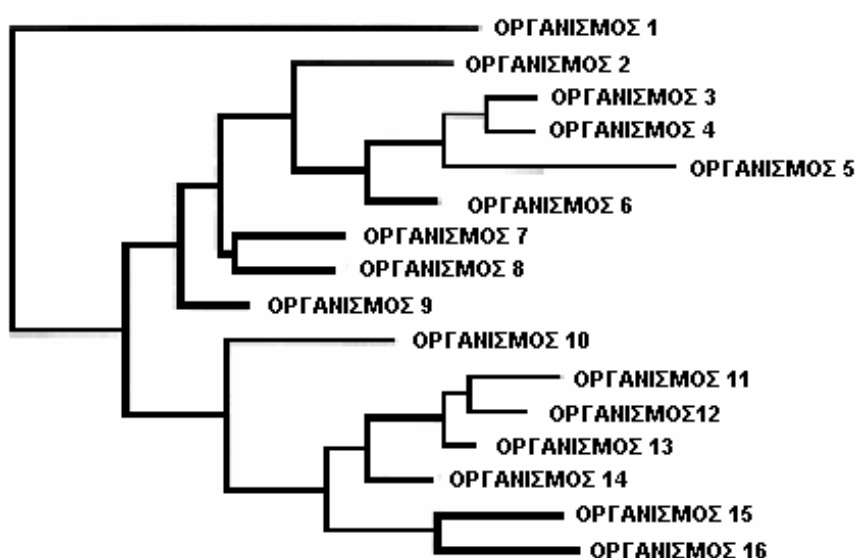
Πίνακας 2. Δομικοί παράγοντες που πιθανόν εμπλέκονται στην σταθερότητα α-αμυλασών όπως έχουν καθοριστεί από τη σύγκριση των τρισδιάστατων δομών τους [31, 36, 37].

Διερευνώντας τα εξελικτικά μονοπάτια προσαρμογής των ενζύμων

Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί τόσο προσαρμοστικοί μηχανισμοί για την ενεργότητα των ενζύμων σε χαμηλές θερμοκρασίες με σχεδόν όσες ψυχρόφιλες πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί. Μια πιθανότητα είναι αυτό το γεγονός να είναι αληθές και να υπάρχουν αναρίθμητοι ανεξάρτητοι μηχανισμοί προσαρμογής της ενζυμικής ενεργότητας σε ψυχρά περιβάλλοντα. Ωστόσο, αυτός ο μεγάλος αριθμός μπορεί να είναι αποτέλεσμα των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των δομικών αλλαγών ανάμεσα στα ψυχρόφιλα, τα μεσόφιλα, και τα θερμόφιλα ένζυμα. Διερευνώντας την τακτική που ακολουθείται σε αυτές τις συγκρίσεις γίνεται εμφανές ότι οι αλληλουχίες ή οι δομές που χρησιμοποιούνται προέρχονται από οργανισμούς που αποκλίνουν εξελικτικά σε πολύ μεγάλο βαθμό και

μπορεί να ανήκουν σε τελείως διαφορετικές περιοχές του δέντρου της ζωής (Σχήμα 4).

Οι επιδράσεις της γενετικής παρέκκλισης και των ποικίλων εξελικτικών πιέσεων που έχουν επηρεάσει κάθε ένζυμο στην διάρκεια της ιστορίας του, αφενός απεικονίζονται στην νουκλεοτιδική-αμινοξική του αλληλουχία, αφετέρου εισάγουν πολλά ερωτηματικά και ανακρίβειες στα αποτελέσματα των συγκριτικών μελετών διαφόρων αλληλουχιών. Οι ανακρίβειες που προκύπτουν δεν εντοπίζονται μόνο στις



Σχήμα 4. Υποθετικό φυλογενετικό δέντρο ομόλογων ενζύμων με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες. Τα ένζυμα καταχωρούνται με βάση τον οργανισμό. Στο σχήμα παρουσιάζονται αντιπρόσωποι από τα Αρχαία (οργανισμός 1), τα Ευβακτήρια (οργανισμοί 2-9) και τα Ευκάρυα (οργανισμοί 10-16). Γίνεται εμφανής η μεγάλη διαφορά στις αλληλουχίες όταν τα συγκρινόμενα ένζυμα είναι γενεαλογικά απομακρυσμένα.

ταυτοποιημένες διαφορές, που θεωρούνται και άμεσα πληροφοριακές, αλλά και στις ομοιότητες μεταξύ των συγκρινόμενων ενζύμων. Ομοιότητες θα μπορούσαν να προκύψουν και από διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις ή από συνδυασμό της φυσικής επιλογής και της γενετικής παρέκκλισης στην περιοχή της ομοιότητας.

Συγκρίσεις ενζύμων από φυλογενετικά συγγενείς οργανισμούς δίνουν πληροφορίες για ‘πρόσφατες’ αλλαγές στις αλληλουχίες τους, αλλά δεν μπορούν να

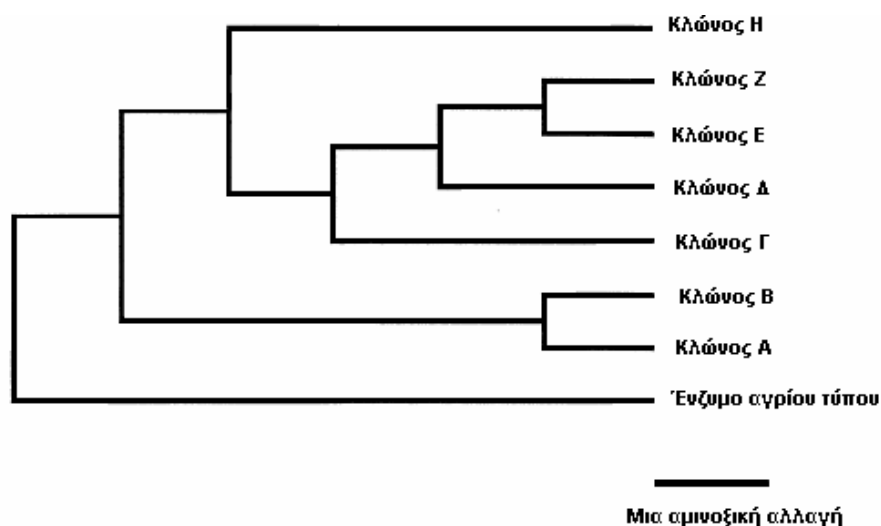
μας δώσουν μια ξεκάθαρη εικόνα για την μοριακή προσαρμογή μιας ιδιότητας όπως η ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη και άλλων εξελικτικών πιέσεων στην ιστορία ενός οργανισμού, ανεξάρτητων με την θερμοκρασία, που έχουν συνεισφέρει τις δικές τους αλλαγές στην πρωτεΐνη. Αν και η ανακατασκευή του πλήρους εξελικτικού μονοπατιού ενός ενζύμου είναι σχεδόν αδύνατη, μπορούμε μέσω τεχνικών της πρωτεϊνικής μηχανικής, όπως η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση (site-directed mutagenesis) και η κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution), να εξετάσουμε διάφορους εναλλακτικούς τρόπους τροποποίησης μιας ενζυμικής ιδιότητας, όπως για παράδειγμα της θερμοσταθερότητας ή της βέλτιστης θερμοκρασίας κατάλυσης.

Τα περισσότερα ένζυμα λειτουργούν σε ένα περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε φυσικοχημικούς περιορισμούς που αποτρέπουν ένα ένζυμο να είναι ενεργό σε μεγαλύτερη θερμοκρασιακή κλίμακα ή μπορεί απλά τα ένζυμα να έχουν προσαρμοστεί στο εύρος των συνθηκών που αναπτύσσεται ο οργανισμός φορέας. Αρκετά ψυχρόφιλα ένζυμα είναι ενεργά σε θερμοκρασία 0°C αλλά είναι αρκετά θερμοασταθή και απενεργοποιούνται σε θερμοκρασίες πάνω από 45°C. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η ενεργότητα και η θερμοσταθερότητα είναι άμεσα συνδεδεμένες και επομένως δομικοί παράγοντες που απαιτούνται για την ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες να αποτρέπουν τη δράση του ενζύμου σε πιο υψηλές θερμοκρασίες. Εναλλακτικά, λόγω του ότι οι ψυχρόφιλοι οργανισμοί αναπτύσσονται σε ψυχρά περιβάλλοντα, δεν συναντούν υψηλές θερμοκρασίες εξαλείφοντας την εξελικτική πίεση για διατήρηση της θερμοσταθερότητας. Επομένως, η θερμοσταθερότητα και η ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά να φαίνονται συνδεδεμένες λόγω της μη συχνής συνύπαρξης των δύο εξελικτικών πιέσεων (δηλαδή έλλειψη πίεσης για θερμοσταθερά ένζυμα σε χαμηλές θερμοκρασίες).

Στην προσπάθεια διερεύνησης αυτού του προβλήματος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τροποποίηση της ενεργότητας και της θερμοσταθερότητας ενζύμων προσαρμοσμένων σε διάφορες συνθήκες. Σε μερικές περιπτώσεις προέκυψαν ένζυμα με αυξημένη σταθερότητα και ενεργότητα και σε άλλες αύξηση της σταθερότητας συνοδεύονταν από μείωση της ενεργότητας. Έχουν αναφερθεί μεταλλαγές που οδήγησαν σε αύξηση της θερμοσταθερότητας σε μεσόφιλα ένζυμα [38, 39], σε μείωση της θερμοσταθερότητας σε θερμόφιλα ένζυμα [40, 41] καθώς και στη

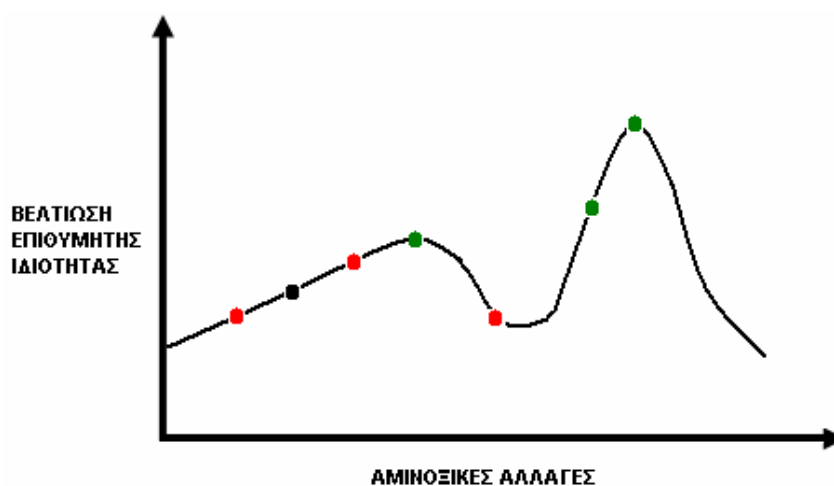
δημιουργία πιο θερμοσταθερών ψυχρόφιλων ενζύμων [42, 43]. Αν και έχουν προκύψει πολύ ενδιαφέρουσες πληροφορίες μέσω της τεχνικής της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, παραμένει μια τεχνική περιορισμένης κλίμακας μιας και μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρό αριθμό καταλοίπων και η εφαρμογή της εξαρτάται από την ύπαρξη δομικών πληροφοριών για το ένζυμο-στόχο.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε η τεχνική της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Μολονότι ούτε αυτή η τεχνική μπορεί να αποκρυπτογραφήσει το πολυδιάστατο εξελικτικό μονοπάτι ενός ενζύμου, μπορεί ωστόσο να οδηγήσει στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων με την επιθυμητή ιδιότητα από ένα και μόνο πρόγονο (Σχήμα 5). Συγκρίνοντας αυτά τα ένζυμα μπορούμε να ταυτοποιήσουμε αλλαγές που οδηγούν στην τροποποιημένη ιδιότητα. Ένα πλεονέκτημα της κατευθυνόμενης εξέλιξης έναντι της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης είναι ότι δεν απαιτείται σχεδιασμός των μεταλλαγών μιας και βασίζεται στην τυχαία εισαγωγή μεταλλάξεων σε οποιαδήποτε περιοχή της πρωτεΐνης.



Σχήμα 5. Υποθετικό φυλογενετικό δέντρο ενός ενζύμου και μεταλλαγμένων κλώνων του που φέρουν τις επιθυμητές τροποποιημένες βιοχημικές ιδιότητες. Οι μεταλλαγμένοι κλώνοι έχουν προκύψει μέσω τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης.

Η προσαρμογή μιας ενζυμικής ιδιότητας μπορεί να απεικονιστεί σε ένα 'πρωτεϊνικό γράφημα' (protein landscape) (Σχήμα 6) [44]. Οι κορυφές αυτού του γραφήματος απεικονίζουν μορφές του ενζύμου προσαρμοσμένες με τον καλύτερο τρόπο στις συγκεκριμένες συνθήκες. Αμινοξικές αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλότερη κορυφή, άρα και σε καλύτερη ή βελτιστοποιημένη ιδιότητα. Μπορούν όμως να επιφέρουν και αρνητικές επιπτώσεις (χαμηλότερα σημεία του γραφήματος). Στην κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση, μια μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει την πρωτεΐνη σε υψηλότερο ή σε χαμηλότερο σημείο του γραφήματος και το αποτέλεσμα αυτό είναι τυχαίο. Στην κατευθυνόμενη εξέλιξη γίνεται επιλογή μόνο των μεταλλαγών που στο γράφημα βρίσκονται σε ψηλότερα σημεία και ταυτόχρονη περιφρόνηση-απόρριψη εκείνων που οδηγούν χαμηλότερα (Σχήμα 6). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι η δημιουργία πολύ μεγάλου αριθμού μεταλλαγμένων μορφών της αρχικής πρωτεΐνης και επομένως ο ταυτόχρονος έλεγχος πολλών εναλλακτικών και ανεξάρτητων οδών που οδηγούν στην επιθυμητή προσαρμογή.



Σχήμα 6. Πρωτεϊνικό γράφημα (protein landscape) για μια επιθυμητή ιδιότητα. Μεταλλαγές μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (●) μπορεί να έχουν θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα στην ιδιότητα στόχο. Όλες οι μεταλλαγές που επιλέγονται από ένα πείραμα κατευθυνόμενης εξέλιξης (●) έχουν βελτιστοποιημένη την επιθυμητή ιδιότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο (●).

Κατευθυνόμενη Εξέλιξη

Πρωτεϊνική μηχανική

Η πρωτεϊνική μηχανική αποτελεί ένα ουσιώδες εργαλείο της βιοχημείας και της βιοτεχνολογίας. Χρησιμοποιείται στην προσπάθεια διερεύνησης των παραγόντων που καθορίζουν την δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία τροποποιημένων ενζύμων με μεγαλύτερο εύρος βιομηχανικών εφαρμογών. Υπάρχουν δύο βασικές στρατηγικές πρωτεϊνικής μηχανικής: η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και η κατευθυνόμενη εξέλιξη.

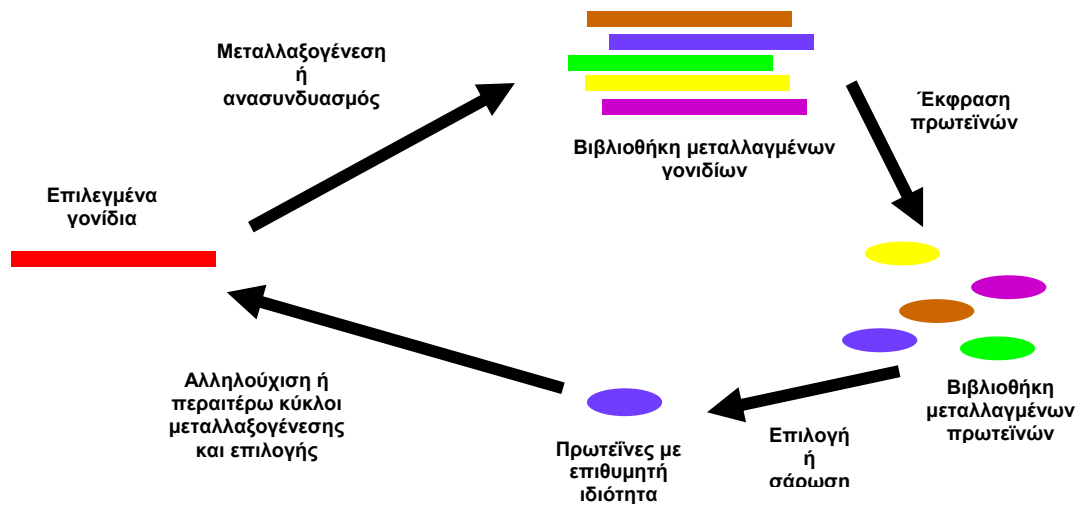
Η πρώτη στρατηγική στηριζόμενη σε πληροφορίες σχετικές με τη δομή, τη λειτουργία και το μηχανισμό δράσης μιας πρωτεΐνης, προβλέπει και εισάγει αμινοξικές αλλαγές που πιθανόν να οδηγήσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Ωστόσο, αυτή η τεχνική είναι εφικτή μόνο αν υπάρχουν οι παραπάνω πληροφορίες. Επιπλέον, πολλές προσπάθειες για τροποποίηση ενζυμικών ιδιοτήτων μέσω αυτής της οδού έχουν αποτύχει λόγω των μη προβλέψιμων επιπτώσεων που επέφεραν οι αμινοξικές αντικαταστάσεις στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης-στόχου.

Από την άλλη, η κατευθυνόμενη εξέλιξη δεν προαπαιτεί την ύπαρξη δεδομένων που συσχετίζουν τη δομή με την λειτουργία ενός ενζύμου. Η εφαρμογή της μιμείται τις αρχές της Δαρβινικής Εξέλιξης σε μια διαδικασία επαναλαμβανόμενων κύκλων δημιουργίας μεταλλαγών και εύρεσης εκείνων με τις επιθυμητές ιδιότητες (Σχήμα 7). Τα βήματα ενός *in vitro* πειράματος εξέλιξης σε γενικές γραμμές είναι:

(1) Δημιουργία μιας βιβλιοθήκης αρχικής ποικιλομορφίας (χρήση φυσικών αλληλομόρφων ή μεταλλαγμένων που προέκυψαν μέσω κατευθυνόμενης ή τυχαίας μεταλλαξογένεσης).

(2) Ανασυνδυασμός όλων ή κάποιων προεπιλεγμένων γονιδίων της αρχικής βιβλιοθήκης.

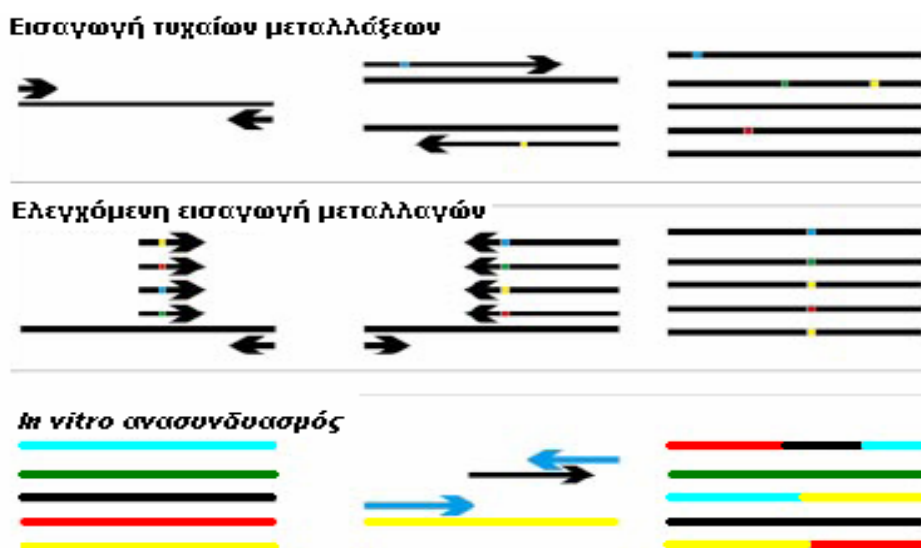
(3) Εφαρμογή εξελικτικής πίεσης (*in vivo* σάρωση/επιλογή) ή χρήση τεχνικών σάρωσης μεγάλης κλίμακας για την εύρεση των τροποποιημένων ενζύμων με τις επιθυμητές ιδιότητες. Αυτά τα βήματα επαναλαμβάνονται μέχρι την απόκτηση ενζύμων που συγκεντρώνουν τα τελικά επιθυμητά χαρακτηριστικά.



Σχήμα 7. Γενικό σχήμα κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών.

Τεχνικές δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας

Υπάρχουν πολλοί και διαφορετικοί τρόποι για την *in vitro* δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας [45, 46]. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες (Σχήμα 8) :



Σχήμα 8. Σύνοψη των τεχνικών δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας.

(1) Εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων (καθώς και ελλείψεις ή προσθήκες ολιγονουκλεοτιδίων) καθ' όλο το μήκος του γονιδίου.

(2) Ελεγχόμενη εισαγωγή μεταλλαγών σε περιορισμένες περιοχές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-στόχου.

(3) *In vitro* ανασυνδυασμός των φυσικών ή μεταλλαγμένων αλληλομόρφων που προέκυψαν από τις προηγούμενες τεχνικές [47].

Λεπτομέρειες για την καθεμιά από αυτές τις κατηγορίες παρατίθενται στη συνέχεια.

Δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας καθ' όλο το μήκος του γονιδίου

Δημιουργία μεταλλαγών μπορεί να επιτευχθεί με απευθείας βλάβη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέσω χημικών και φυσικών παραγόντων. Χαρακτηριστικά, με χρήση UV ακτινοβολίας και αλκυλικών παραγόντων δημιουργούνται βλάβες στην αλληλουχία του DNA που διορθώνονται ή αντιγράφονται λανθασμένα, οδηγώντας στην εισαγωγή μεταλλάξεων. Μεταλλαγές σε όλο το γονίδιο μπορούν να προκύψουν και με τη χρήση ειδικών μεταλλαξογόνων βακτηριακών στελεχών [48]. Αυτά τα στελέχη εμφανίζουν προβλήματα σε ένα ή περισσότερους από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA με άμεσο αποτέλεσμα το υψηλό ποσοστό μεταλλαξογένεσης.

Τεχνικές τυχαίας εισαγωγής και αφαίρεσης νουκλεοτιδίων από γονίδια στόχους έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια [49-52]. Μια πιο εκλεπτυσμένη μέθοδος αυτού του τύπου είναι και η RID (Random Insertion/Deletion mutagenesis) που επιτρέπει την αφαίρεση και την επακόλουθη προσθήκη αυθαίρετου αριθμού νουκλεοτιδίων σε οποιαδήποτε περιοχή του γονιδίου [49].

Σήμερα η προτιμότερη μέθοδος της κατηγορίας και το εναρκτήριο βήμα των περισσότερων ερευνητικών προσπαθειών κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι η error-prone PCR [53, 54]. Ένα κρίσιμο σημείο αυτής της μεθόδου είναι η προσεκτική ρύθμιση της συχνότητας των μεταλλαγών. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται σε αυτή της PCR με τη διαφορά όμως ότι εισάγει τυχαίες μεταλλαγές κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με αλλαγές στην συγκέντρωση των

ιόντων Mn^{2+} και των dNTPs και με τροποποίηση της χρονικής διάρκειας των διαφόρων σταδίων της τεχνικής.

Δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας σε περιορισμένες περιοχές του γονιδίου

Οι τεχνικές αυτής της κατηγορίας στην πιο απλουστευμένη τους μορφή εισάγουν μεταλλάξεις σε ένα μόνο σημείο του γονιδίου-στόχου. Η αρχή λειτουργίας τους είναι η ενσωμάτωση τυχαίων συνθετικών αλληλουχιών DNA σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου. Οι διαφορές μεταξύ των τεχνικών αυτής της κατηγορίας αποδίδονται σε δύο παράγοντες: (Α) τον τρόπο σύνθεσης και τον ρυθμό των αλλαγών στα συνθετικά κομμάτια DNA και (Β) την μεθοδολογία εισαγωγής των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Τα παραγόμενα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μπορεί να αποτελούνται από ένα ή μερικά κωδικόνια και ο ρυθμός μεταλλαγής μπορεί να κυμαίνεται από υψηλά έως πολύ χαμηλά επίπεδα [55-58]. Για την ενσωμάτωση τους στην αλληλουχία του γονιδίου διάφορες τεχνικές βασισμένες σε αντίστοιχες της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης έχουν εφαρμοστεί. Τεχνικές που στηρίζονται στο PCR, όπως η SOE (Strand Overlap Extension) και η MEGAPRIMER έχουν προτιμηθεί στις περισσότερες περιπτώσεις [59-61].

Τεχνικές in vitro ανασυνδυασμού

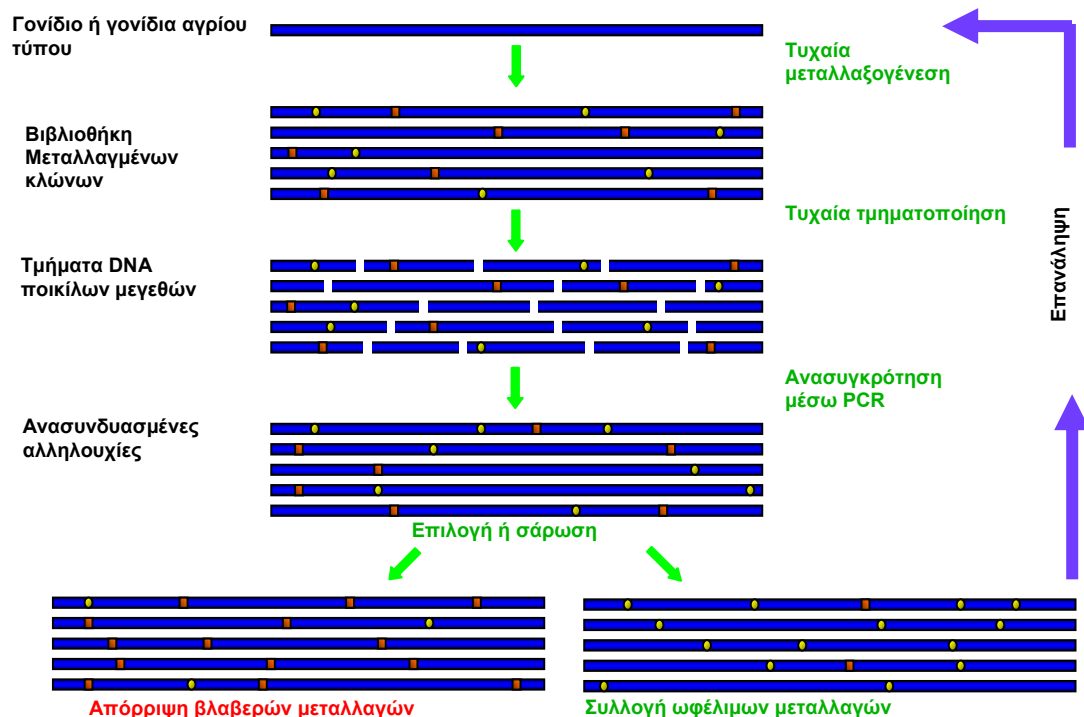
Η πρώτη τεχνική αυτής της μορφής αναπτύχθηκε από τον Stemmer [62], αποτελώντας ένα σημαντικό επίτευγμα στη προσπάθεια για μίμηση των φυσικών μηχανισμών εξέλιξης σε εργαστηριακό επίπεδο. Μέσω αυτών των τεχνικών δημιουργούνται βιβλιοθήκες γονιδίων προερχόμενες από τον ανασυνδυασμό μιας ομάδας ομόλογων φυσικών αλληλουχιών ή προεπιλεγμένων τεχνητών σημειακών μεταλλάξεων. Η χρήση του ανασυνδυασμού επιτρέπει την ταχύτερη συσσώρευση των ωφέλιμων μεταλλαγών και την ταυτόχρονη απομάκρυνση των επιβλαβών. Τα

τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες εναλλακτικές τεχνικές ανασυνδυασμού (Πίνακας 3) [63]. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι:

Stemmer DNA Shuffling-Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, μέσω της ενζυμικής πέψης μητρικών γονιδίων, δημιουργείται μια πληθώρα μικρότερων τμημάτων DNA [62]. Αυτά τα τμήματα μπορούν να συναρμολογηθούν μέσω διαδοχικών κύκλων PCR απουσία εκκινητών. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί ένα μείγμα προϊόντων όσον αφορά στο μήκος της αλληλουχίας και στον συνδυασμό των μητρικών αλληλουχιών. Μόνο οι αλληλουχίες πλήρους μήκους πολλαπλασιάζονται μέσω μιας δεύτερης αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Ένας χαμηλός και ελεγχόμενος ρυθμός εισαγωγής μεταλλάξεων συνοδεύει την διαδικασία του ανασυνδυασμού (Σχήμα 9).

Όμαδα	Λογική της Τεχνικής	Μέλη
<u><i>Shuffling</i></u>	Ανασυνδυασμός μικρών κομματιών DNA βασισμένος στην ομολογία των αλληλουχιών που φέρουν μεταλλαγές που έχουν προκύψει από οποιαδήποτε τεχνική μεταλλαξογένεσης ή αλληλουχιών που ανήκουν σε διαφορετικά μέλη της ίδιας οικογένειας γονιδίων. Μεγάλη συχνότητα ανασυνδυασμού, αλλά δύσκολος ο διαχωρισμός κοντινών μεταλλαγών.	Shuffling Family shuffling RE cut shuffling ssDNA shuffling Mn ²⁺ DNase cut Endonuclease V cut RPR RETT SCRATCHY
<u><i>Full length parent shuffling</i></u>	Ανασυνδυασμός μικρών κομματιών DNA διαφορετικής προέλευσης χρησιμοποιώντας μια ή περισσότερες από τις μητρικές αλυσίδες πλήρους μήκους. Πολύ υψηλή συχνότητα ανασυνδυασμού, αλλά μεγαλύτερη πολυπλοκότητα.	StEP RACHITT
<u><i>Single cross-over</i></u>	Ανασυνδυασμός μη-ομόλογων γονιδίων με συγκόλληση του εμπρός και πίσω άκρου των δύο διαφορετικών γονιδίων και επιλογή τους με βάση το μέγεθος. Πιθανός ο ανασυνδυασμός μεταξύ γονιδίων χαμηλής ή μηδενικής ομολογίας, αλλά μόνο ένα το σημείο ανασυνδυασμού τους.	(THIO)ITCHY SHIPREC SCRATCHY
<u><i>Domain swapping</i></u>	Ανασυνδυασμός δομικών, λειτουργικών ή χαμηλής ομολογίας περιοχών μεταξύ διαφορετικών γονιδίων. Πιο ενεργά ένζυμα, μικρός αριθμός των σημείων ανασυνδυασμού και δύσκολος ο εντοπισμός αυτών των σημείων.	Exon shuffling DOGS SISDC YLBS SCOPE
<u><i>In vivo recombination</i></u>	Ανασυνδυασμός με τη χρήση του συστήματος επιδιόρθωσης χασμάτων (gap repair system) από το σακχαρομήκυτα ή του συστήματος recE/recT από την <i>E. coli</i> . Υψηλό ποσοστό ανασυνδυασμού, αλλά απαιτούνται πολύ ειδικές πλασμιδικές κατασκευές και πολλαπλά βήματα.	CLERY ET-recombination
<u><i>Synthetic shuffling</i></u>	Ανασυνδυασμός γνωστών ή μη μεταλλαγών που περιέχονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Πιθανός ο ανασυνδυασμός κοντινών μεταλλαγών, αλλά απαιτείται η χρήση πολύ εκλεπτυσμένων και ακριβών τεχνικών επιλογής.	Single step shuffling DHR Synthetic shuffling ADO

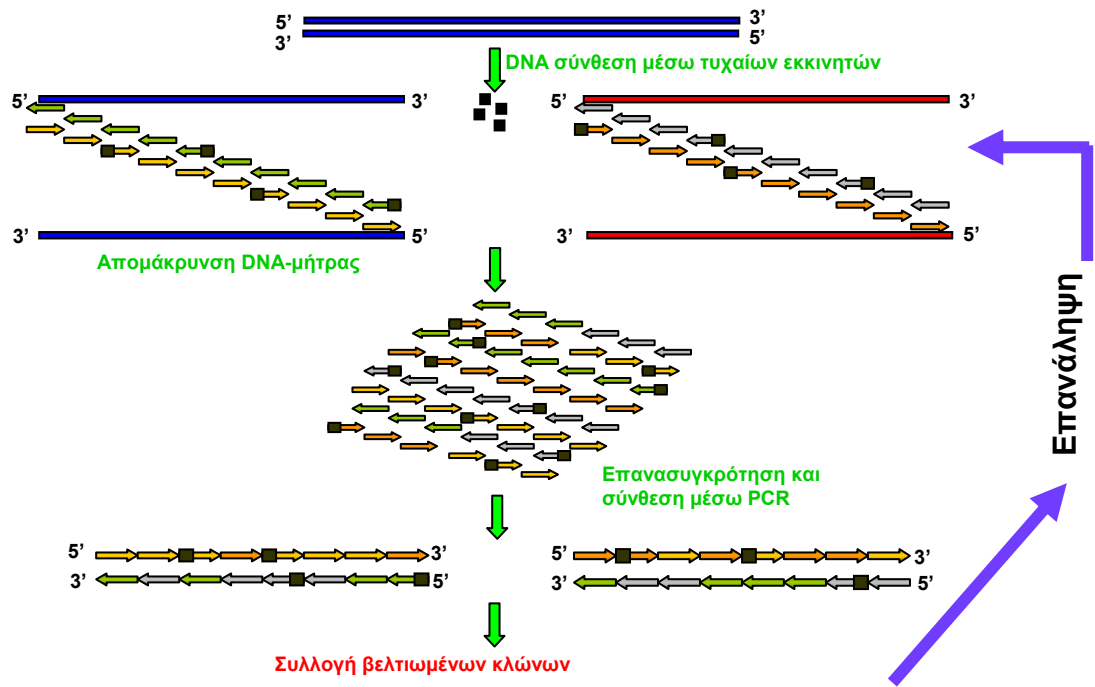
Πίνακας 3. Διάφορες τεχνικές ανασυνδυασμού με τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.



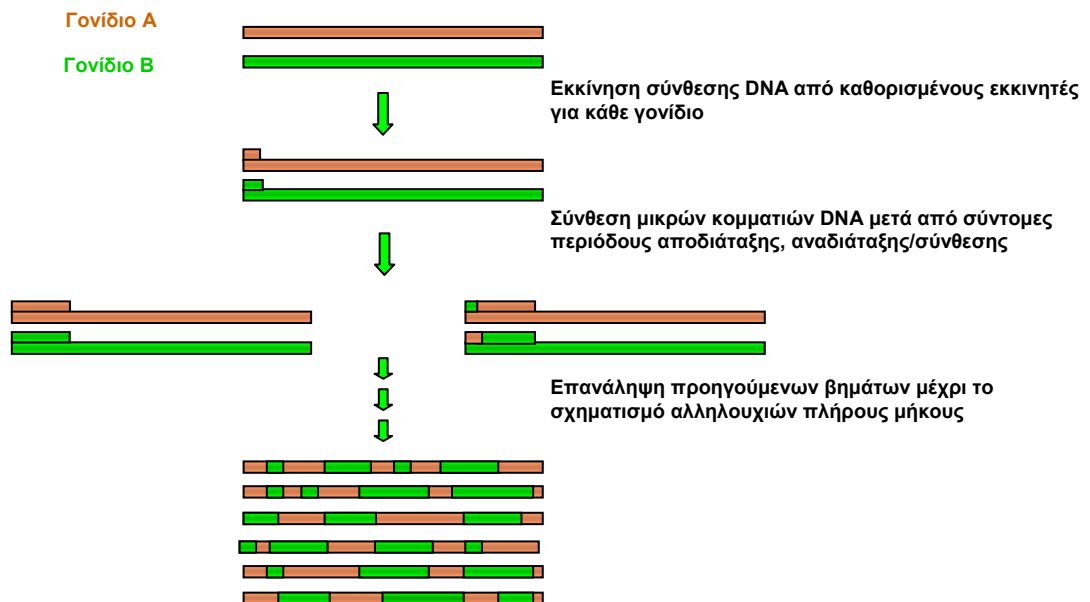
Σχήμα 9. Μέσω της τεχνικής Stemmer DNA Shuffling καταλήγουμε από γονίδιο ή γονίδια αγρίου τύπου στην επιλογή κλώνων με συσσώρευση ωφέλιμων μεταλλαγών (•) και στην απόρριψη των επιβλαβών (•).

Random Priming in vitro Recombination (RPR)-Αυτή η μέθοδος αφορά την τυχαία εκκίνηση σύνθεσης πάνω σε πολυνουκλεοτιδική μήτρα μέσω εκκινητών τυχαίας αλληλουχίας [64]. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ένας μεγάλος αριθμός μικρών τμημάτων DNA που περιέχουν σημειακές μεταλλαγές υπό ελεγχόμενο ρυθμό. Αυτά τα τμήματα επανασυνδέονται κατά τη διάρκεια κύκλων αποδιάταξης, επαναδιάταξης και DNA πολυμερισμού, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας βιβλιοθήκης αλληλουχιών πλήρους μήκους (Σχήμα 10).

Staggered Extension Process (StEP)-Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μια αντίδραση PCR όπου η εκκίνηση σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην DNA-μήτρα ακολουθείται από κύκλους αποδιάταξης και πολύ σύντομες περιόδους επαναδιάταξης/επέκτασης [65]. Άμεσο αποτέλεσμα είναι ότι σε κάθε κύκλο τα νεοσυντιθέμενα τμήματα επαναδιατάσσονται σε διαφορετικές μήτρες όπου και επεκτείνονται περαιτέρω. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τη δημιουργία αλληλουχιών πλήρους μήκους (Σχήμα 11).

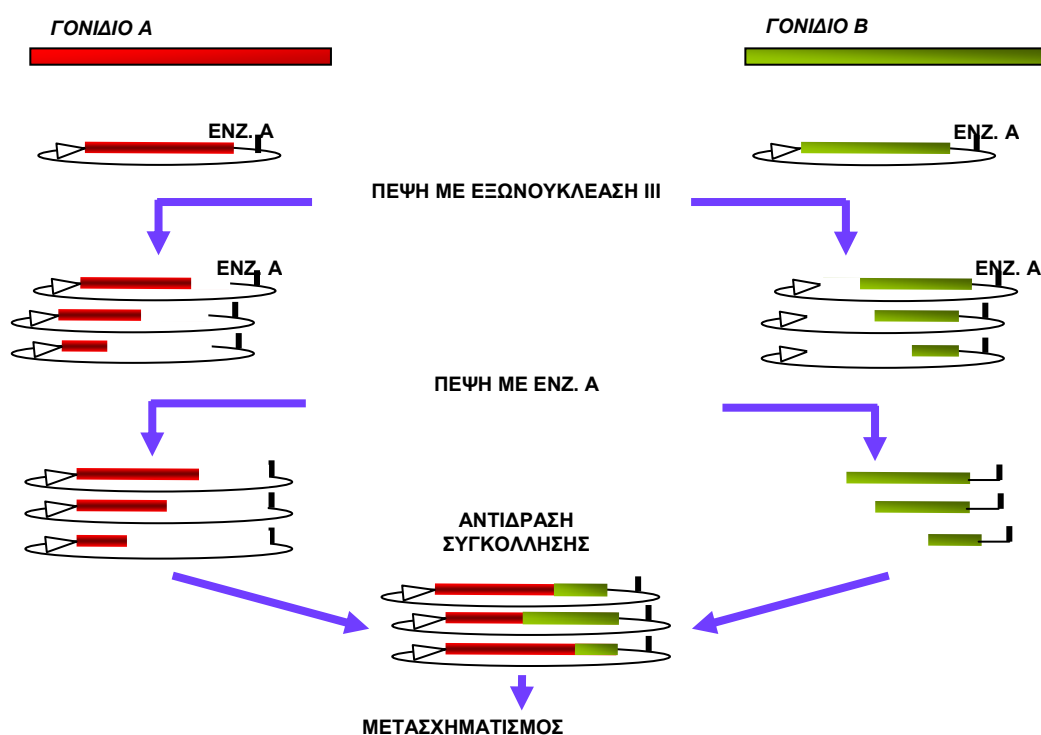


Σχήμα 10. Random priming *in vitro* recombination (RPR). Τα μικρά μαύρα τετράγωνα συμβολίζουν νεοεισαχθείσες μεταλλάξεις.



Σχήμα 11. Staggered extension process (StEP).

Σταδιακή τμηματοποίηση και επανασυγκόλληση γονιδίων για την δημιουργία χμιαϊκών ενζύμων (ITCHY, *I*ncremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes)-Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην απευθείας συγκόλληση κομματιών DNA που έχουν προκύψει από την τμηματοποίηση δύο μητρικών αλληλουχιών [67]. Πρόκειται για την πρώτη τεχνική που δίνει τη δυνατότητα ανασυνδυασμού δύο μη ομόλογων γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται εφικτός ο συνδυασμός δύο ενζυμικών ιδιοτήτων σε ένα πρωτεϊνικό μόριο. Αυτή η τεχνική πέψης και επανασύνδεσης ενζύμων έχει πολλές εφαρμογές στην διερεύνηση νέων καταλυτικών ενεργοτήτων μέσω συνδυασμού διαφόρων πρωτεϊνικών μοτίβων, στην χημική σύνθεση τροποποιημένων πεπτιδίων και στην μελέτη της δομής λειτουργικών βιοκαταλυτών (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. ITCHY (Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes). Το στάδιο κλειδί αυτής της τεχνικής είναι η πέψη των μητρικών γονιδίων (A και B) με την εξωνουκλεάση III. Με το πέρας αυτού του βήματος δημιουργείται μια μεγάλη ποικιλία τμημάτων των δύο γονιδίων. Ακολουθεί πέψη των τμημάτων με το περιοριστικό ένζυμο A (Ενζ. A) και αντίδραση συγκόλλησης. Τελικό αποτέλεσμα είναι μια βιβλιοθήκη χμιαϊκών γονιδίων.

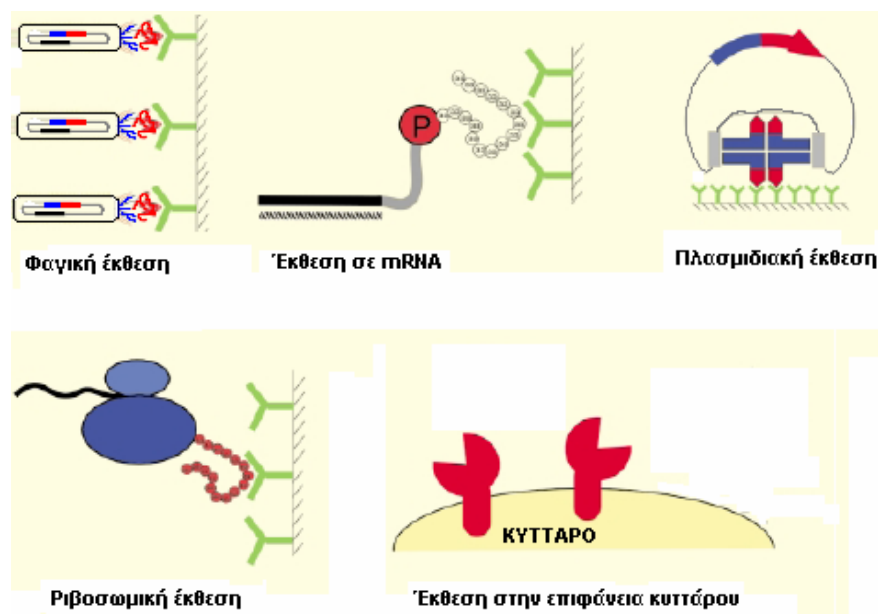
In vitro δημιουργία ετεροδιμερούς μορίου DNA και *in vivo* διόρθωση-Κατά την διαδικασία αυτή ένα ετεροδιμερές μόριο DNA δημιουργείται *in vitro* και χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων [66]. Στο εσωτερικό των κυττάρων παρατηρείται διόρθωση των περιοχών του ετεροδιμερούς μορίου DNA με μηδενική ομοιότητα, δημιουργώντας μια βιβλιοθήκη νέων, ανασυνδυασμένων αλληλουχιών με στοιχεία από τα μητρικά μόρια. Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ανασυνδυασμό μεγάλων γονιδίων ή ακόμη και ολόκληρων οπερονίων .

Τεχνικές ανάλυσης τροποποιημένων ενζυμικών ιδιοτήτων

Αν και η παραγωγή μιας εκτεταμένης και αμερόληπτης (unbiased) βιβλιοθήκης είναι πολύ σημαντική, η επιτυχία ενός πειράματος κατευθυνόμενης εξέλιξης εξαρτάται από την μέθοδο εύρεσης των μεταλλαγμένων ενζύμων με τις επιθυμητές ιδιότητες. Καθώς το μέγεθος της βιβλιοθήκης των μεταλλαγμένων κλώνων είναι συνήθως τεράστιο, είναι απαραίτητη προϋπόθεση ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη μιας μεγάλης κλίμακας τεχνικής σάρωσης ή επιλογής των επιθυμητών ενζυμικών ιδιοτήτων. Η βάση λειτουργίας όλων αυτών των τεχνικών είναι η σύνδεση του κάθε γονιδίου με το ένζυμο που κωδικοποιεί και κατ' επέκταση με το προϊόν της ενεργότητας αυτού του ενζύμου. Η διαφορά μεταξύ των τεχνικών σάρωσης και επιλογής είναι ότι η σάρωση γίνεται ξεχωριστά σε κάθε γονίδιο ή κλώνο και απαιτεί μια καλά σχεδιασμένη χωροταξική οργάνωση των υπό έλεγχο ποικιλόμορφων σε πιάτα με άγαρ, σε μικροπλάκες, σε συστοιχίες (arrays) ή σε chips ενώ η επιλογή εφαρμόζεται ταυτόχρονα στο σύνολο των γονιδίων. Το πλεονέκτημα των τεχνικών σάρωσης είναι ότι μπορεί για κάθε κλώνο άμεσα ή έμμεσα να ταυτοποιηθεί η διαφορά στην υπό έλεγχο ιδιότητα. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα τέτοιων μεθόδων [68] που μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

(1) Μέθοδοι φυσικής σύνδεσης (Physical Linkage). Η αρχή λειτουργίας αυτών των μεθόδων είναι η ύπαρξη φυσικής σύνδεσης μεταξύ της πρωτεΐνης και του DNA που την κωδικοποιεί. Αυτή η σύνδεση μπορεί να είναι άμεση (μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης γονιδίου πρωτεΐνης) όπως στη ριβοσωμική έκθεση (ribosome display) [69, 70], στην έκθεση σε mRNA (mRNA display) [71] και στην πλασμιδιακή έκθεση

(peptide on plasmid display) [72, 73], αλλά και έμμεση όπως στην φαγική έκθεση (phage display) [74-76] και στην έκθεση στην επιφάνεια κυττάρου (cell-surface display) [77-79] (Σχήμα 13).

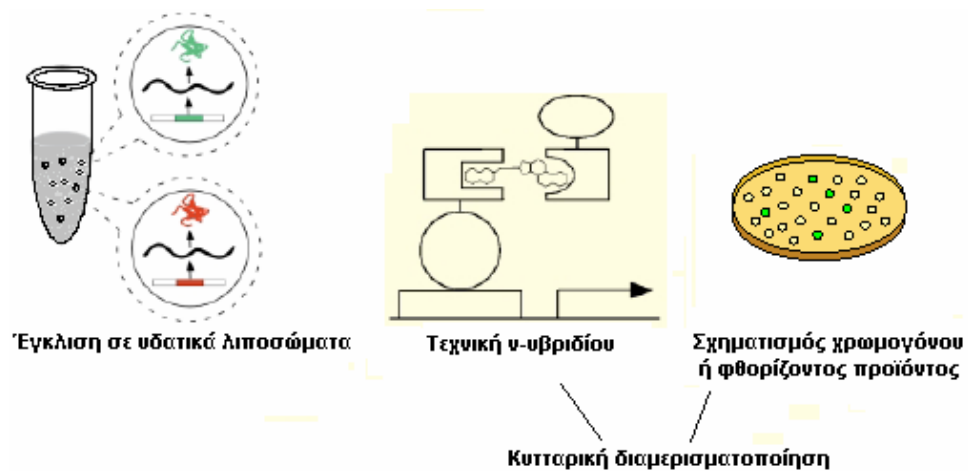


Σχήμα 13. Μέθοδοι φυσικής σύνδεσης.

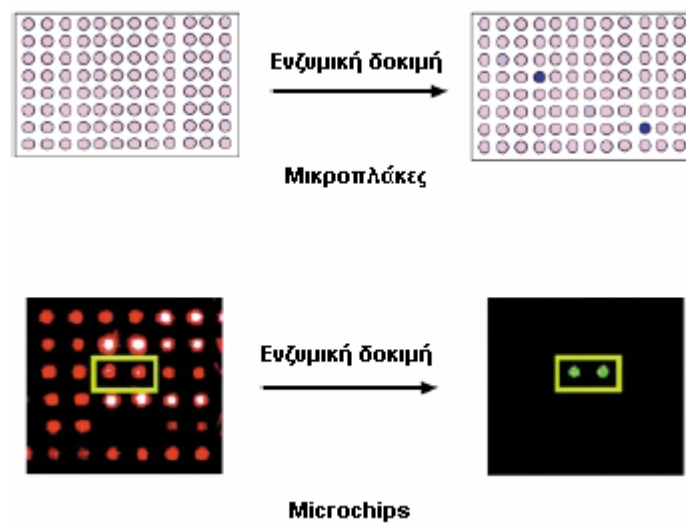
(2) Μέθοδοι διαμερισματοποίησης (Compartmentalization Methods). Σε αυτές τις μεθόδους κάθε πρωτεΐνη και η αντίστοιχη αλληλουχία DNA που την κωδικοποιεί περιορίζονται σε ένα ξεχωριστό 'διαμέρισμα'. Αυτή η διαμερισματοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με τον μετασχηματισμό κυττάρων με πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια ή με την έγκλιση σε υδατικά σωματίδια μέσα σε λάδι (water-in-oil emulsions) [80]. Στην κυτταρική διαμερισματοποίηση η σάρωση μπορεί να επιτευχθεί με το σχηματισμό κάποιου χρωμογόνου ή φοριζόντος προϊόντος ή μέσω τεχνικών διπλού και τριπλού υβριδίου (two, three hybrid assays) [81-83] (Σχήμα 14).

(3) Μέθοδοι χωροταξικής σύνδεσης (Spatially Addressable Methods) [84-87]. Σε αυτές τις μεθόδους η ταυτότητα του πεπτιδίου ή της πρωτεΐνης συνδέεται με ένα συγκεκριμένο χώρο όπως το πηγαδάκι μιας μικροπλάκας. Με αυτό τον τρόπο

εκατοντάδες πρωτεϊνικά δείγματα, υπό μορφή κυτταροκαλλιιεργειών, κυτταρικών εκχυλισμάτων ή καθαρών πρωτεϊνικών δειγμάτων διαχωρίζονται στα πηγαδάκια μικροπλακών. Κατάλληλη επεξεργασία και βιοχημικές δοκιμές ακολουθούν για κάθε δείγμα στην προσπάθεια εύρεσης πρωτεϊνών με τις επιθυμητές ιδιότητες. Στα πλαίσια αυτής της λογικής έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί πρόσφατα πρωτεϊνικά microchips (Σχήμα 15).



Σχήμα 14. Μέθοδοι διαμερισματοποίησης.



Σχήμα 15. Μέθοδοι χωροταξικής σύνδεσης.

Οι τεχνικές επιλογής μιμούνται την στρατηγική της επιβίωσης των κλώνων με την καλύτερη προσαρμογή που συναντάμε στη φύση. Η επιλογή στηρίζεται στο πλεονέκτημα που δίνει η επιθυμητή ενζυμική ιδιότητα των μεταλλαγμένων κλώνων στο κύτταρο φορέα έναντι των βακτηρίων με τα ένζυμα αγρίου τύπου. Δυστυχώς, αυτή η προσέγγιση δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις ενζυμικές ενεργότητες μιας και οι περισσότερες δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση του βακτηρίου. Σε μερικές περιπτώσεις αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τη σύνδεση της ενεργότητας-στόχου με μια απαραίτητη για την επιβίωση του βακτηρίου λειτουργία. Τεχνική επιλογής χρησιμοποιήθηκε στην προσπάθεια τροποποίησης ενός ενζύμου από το βακτήριο *Escherichia coli* που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη [88]. Οι κλώνοι εκείνοι που εμφάνιζαν αυξημένη ενεργότητα προσέδιδαν επιλεκτικό πλεονέκτημα στα κύτταρα ξενιστές τους, τα οποία και αναπτύσσονταν με ταχύτερους ρυθμούς, οδηγώντας στην επιλογή τους.

Τροποποίηση ενζυμικών ιδιοτήτων μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης

Το ενδιαφέρον για την τροποποίηση ενζύμων μέσω τεχνικών τυχαίας μεταλλαξογένεσης και ανασυνδυασμού έχει αυξηθεί αισθητά τα τελευταία χρόνια.

Τροποποίηση της θερμοσταθερότητας. Η βελτίωση της θερμοσταθερότητας ενός βιοκαταλύτη αποτελεί σημαντικό ερευνητικό στόχο. Στις διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες η χρήση υψηλών θερμοκρασιών συνεπάγεται μια σειρά πλεονεκτημάτων, όπως αυξημένη διαλυτότητα του υποστρώματος, μείωση του ιξώδους του θρεπτικού μέσου, μικρότερος κίνδυνος μικροβιακής μόλυνσης. Κάθε ένζυμο εμφανίζει μια συγκεκριμένη ενεργότητα σε ένα χαρακτηριστικό εύρος θερμοκρασιών. Αυξάνοντας ή μειώνοντας τη θερμοκρασία πέρα αυτού του εύρους παρατηρείται πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου. Η βέλτιστη θερμοκρασία μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να τροποποιηθεί μέσω της εξέλιξης είτε αυτή πραγματοποιείται στη φύση είτε μέσα σε ένα ερευνητικό εργαστήριο.

Με χρήση τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης επιτεύχθηκε μια σημαντική αύξηση στην ενεργότητα της subtilisin E από τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*, σε ένα ευρύτερο φάσμα θερμοκρασιών και ταυτόχρονα αύξηση της ημίσειας ζωής

του ενζύμου στους 65°C κατά περισσότερο από 200 φορές [89]. Το αξιοσημείωτο αυτού του πειράματος είναι ότι το τροποποιημένο ένζυμο παρουσίαζε παρόμοια θερμοσταθερότητα με τη θερμοφιλή θερμιτάση από τον ακτινομύκητα *Thermoactinomyces vulgaris*.

Τροποποίηση της εναντιοεκλεκτικότητας. Με την αναστροφή της εναντιοεκλεκτικότητας ενός ενζύμου-κλειδί σε ένα πολυενζυμικό μονοπάτι, βελτιώθηκε η διαδικασία παραγωγής L-μεθειονίνης σε κύτταρα *Escherichia coli* [90]. Μέσω τεχνικών τυχαίας μεταλλαξογένεσης, η εναντιοεκλεκτικότητα του ενζύμου D-hydantoinase αναστράφηκε και η συνολική του ενεργότητα αυξήθηκε 5 φορές. Η εισαγωγή της εξελιγμένης L-hydantoinase σε κατάλληλα βακτηριακά στελέχη οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή L-μεθειονίνης και σε μειωμένη συγκέντρωση ενός ανεπιθύμητου ενδιάμεσου προϊόντος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το συγκεκριμένο τροποποιημένο ένζυμο προέκυψε από μόνο μια αμινοξική αντικατάσταση.

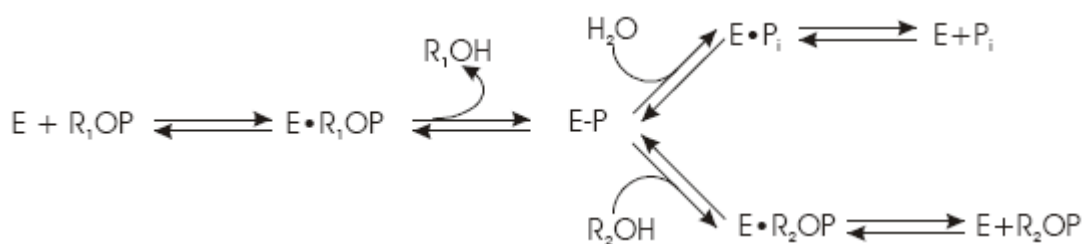
Τροποποίηση της εξειδίκευσης σε υποστρώματα. Η διεύρυνση του φάσματος των υποστρωμάτων διαφόρων ενζύμων αποτελεί ένα από τους πρωταρχικούς στόχους για βιοκαταλύτες με εφαρμογές στη βιομηχανία. Μέσω τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης επιτεύχθηκε η τροποποίηση της β-γαλακτοσιδάσης από *E. coli* σε β-γλουκοσιδάση [91], η μετατροπή της β-γλουκορουσιδάσης από *E. coli* σε β-γαλακτοσιδάση [92], η εισαγωγή ενεργότητας φωσφολιπάσης στην λιπάση από *Staphylococcus aureus* [93] και η εξέλιξη μιας αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού σε αμινοτρανσφεράση υποστρωμάτων με β-αλυσίδες [94].

Τροποποίηση της σταθερότητας ή της ενεργότητας ενζύμων σε τεχνητές συνθήκες. Η χρήση οργανικών διαλυτών μπορεί να διευκολύνει την διαλυτοποίηση ενός υποστρώματος ή να ευνοήσει την ολοκλήρωση μιας αντίδρασης έναντι κάποιας άλλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις ωστόσο, τα ένζυμα αγρίου τύπου χάνουν την ενεργότητα τους παρουσία οργανικών διαλυτών, ακόμη και αν η δομή τους παραμένει αμετάβλητη. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της παρανιτροβενζυλεστεράσης όπου μέσω τυχαίας μεταλλαξογένεσης και *in vitro* ανασυνδυασμού, πραγματοποιήθηκε αύξηση της συνολικής ενεργότητας σε διάλυμα με 30% διμεθυλφορμαμίδιο κατά περίπου 100 φορές [95].

Αλκαλική Φωσφατάση

Από τα βακτήρια στα θηλαστικά

Οι αλκαλικές φωσφατάσες (EC 3.1.3.1) είναι ομοδιμερείς, μη ειδικές φωσφομονοεστεράσες. Καταλύουν την υδρόλυση και την τρανσφωσφορυλίωση (παρουσία δέκτη φωσφορικού) μιας ευρείας ποικιλίας φωσφορικών μονοεστέρων. Η ενζυμική αντίδραση προχωράει με την φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου του ενεργού κέντρου (κατάλοιπο σερίνης) δίνοντας ένα ενδιάμεσο προϊόν υποστρώματος ομοιοπολικά συνδεδεμένου με το ένζυμο (E-P), που στη συνέχεια υδρολύεται δίνοντας ένα σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος μη ομοιοπολικά συνδεδεμένου (E•P_i). Παρουσία ενός δέκτη φωσφορικών όπως το Tris ή η Αιθανολαμίνη, το ένζυμο παρουσιάζει δράση τρανσφωσφορυλάσης μεταφέροντας το φωσφορικό στη αλκοόλη σχηματίζοντας ένα νέο φωσφομονοεστέρα (Σχήμα 16) [96, 97]. Στα υποστρώματα των ενζύμων αυτών συγκαταλέγονται πρωτεΐνες, DNA και μικρά οργανικά μόρια.

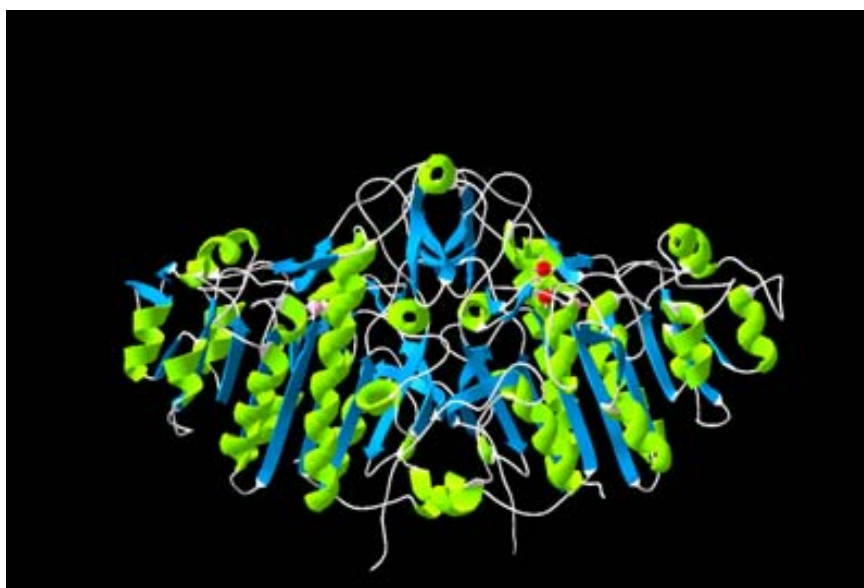


Σχήμα 16. Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας της αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, με τις δύο πιθανές κατευθύνσεις της αντίδρασης.

Συναντώνται σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών από τα βακτήρια έως τα θηλαστικά [98]. Στα ευκαρυωτικά είδη εμφανίζονται σε διάφορες ισομορφές, όπως στον άνθρωπο, όπου εκφράζονται ιστοειδικά (πλακούντα, έντερο, σπέρμα) και μη ιστοειδικά γονίδια αλκαλικής φωσφατάσης. Αν και η φυσιολογική τους λειτουργία δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη, φαίνεται να εμπλέκεται στην διαδικασία της οστεοποίησης στα θηλαστικά, ενώ στην *E. coli* συμμετέχει στην προσρόφηση φωσφόρου.

Υπάρχει μια μακρόχρονη ιστορία βιοχημικών και βιοφυσικών μελετών πάνω στις αλκαλικές φωσφατάσες, οι οποίες επικεντρώνονται κατά κύριο λόγο στο αντίστοιχο ένζυμο από την *E. coli* (ECAP). Το καταλυτικό κέντρο κάθε μονομερούς περιέχει τρεις θέσεις πρόσδεσης μετάλλων, οι οποίες καταλαμβάνονται συνήθως από δύο ιόντα ψευδαργύρου και ένα μαγνησίου [99]. Τα ιόντα των μετάλλων αυτών σχηματίζουν μια καταλυτική τριάδα, παρόμοια με της φωσφολιπάσης C από τον *Bacillus cereus* [100] και της νουκλεάσης P1 από το *Penicillium citrinum* [101].

Μέχρι σήμερα έχουν αναλυθεί οι δομές τριών αλκαλικών φωσφατάσων. Η εκτενώς μελετημένη ECAP επιλύθηκε στα 7.7Å το 1973 [99] και επαναπροσδιορίστηκε σε υψηλότερη διακριτική ικανότητα (2.0 Å) σε μεταγενέστερες μελέτες (PDB entry code: 1ALK) [102, 103] (Σχήμα 17). Μια σειρά μεταλλαγών της ECAP και συμπλόκων της με διάφορα υποστρώματα έχουν αναλυθεί δομικά και έχουν καταχωρηθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων RCSB (RCSB Protein Data Bank). Οι άλλες δύο δομές προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς: η αλκαλική φωσφατάση από πλακούντα ανθρώπου (PDB entry code: 1EW2) [104] και η θερμοευαίσθητη μη ιστοειδική αλκαλική φωσφατάση από την αρκτική γαρίδα *Pandalus borealis* (PDB entry code: 1K7H) [105]. Οι δομές αυτές έχουν αποκαλύψει μια δομή ενζύμου α/β τοπολογίας με β πεδία στο κέντρο του που περιβάλλονται από έλικες διαφόρων μεγεθών. Κάθε μονομερές επομένως αποτελείται από μια βασική δομική μονάδα η οποία περιέχει τρία ιόντα (δύο Zn^{2+} και ένα Mg^{2+}).



Σχήμα 17. Αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αλκαλικής φωσφατάσης από το βακτήριο *Escherichia coli*.

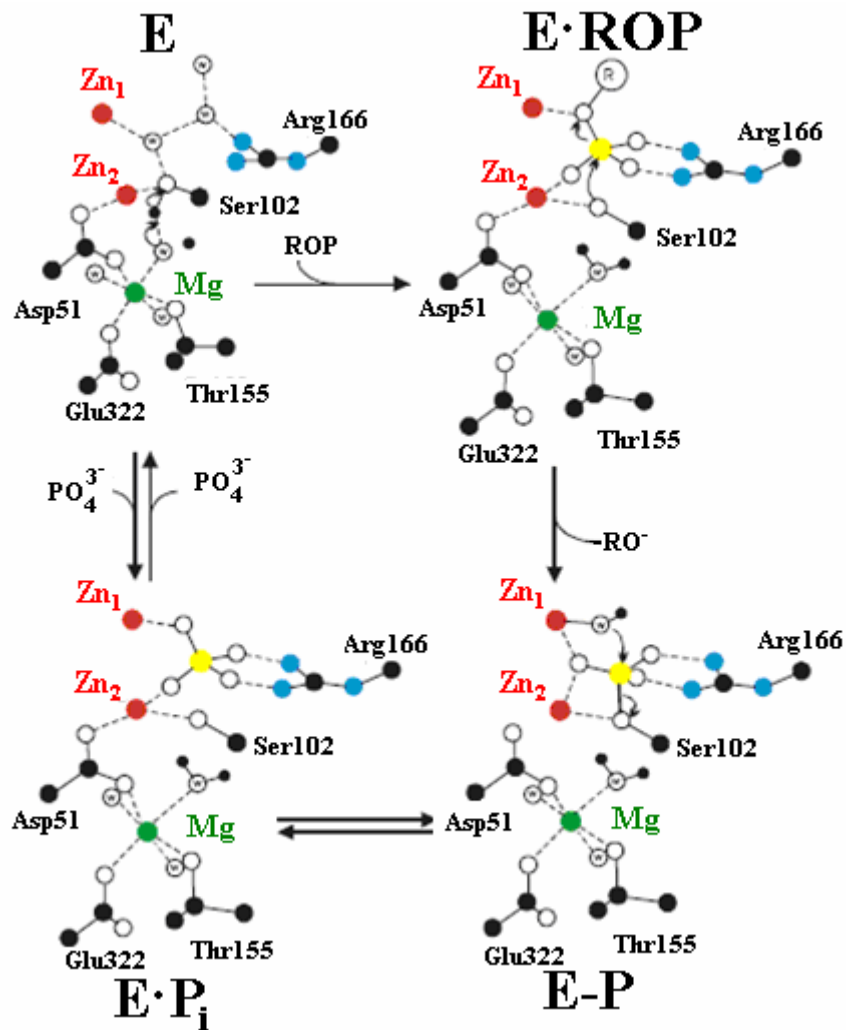
Μετά από συσχέτιση αλληλουχιών διαφόρων αλκαλικών φωσφατάσων και σε συνδυασμό με δομικές πληροφορίες έγινε εμφανές ότι οι λειτουργικά σημαντικές περιοχές είναι συντηρημένες [106-109]. Αν και οι αμινοξικές αλληλουχίες από αλκαλικές φωσφατάσες βακτηρίων και θηλαστικών εμφανίζονται συντηρημένες σε ένα ποσοστό 25-30%, υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Τα βακτηριακά ένζυμα εμφανίζουν υψηλότερη θερμοσταθερότητα, ενώ τα ένζυμα από θηλαστικά παρουσιάζουν 20-30 φορές υψηλότερη καταλυτική ενεργότητα και υψηλότερο βέλτιστο pH [110].

Επίσης, δύο σημαντικές διαφορές υπάρχουν στην περιοχή κοντά στο ενεργό κέντρο. Στην ECAP δύο από τα καταλυτικά κατάλοιπα (153 και 328) είναι ασπαρτικό (Asp) και λυσίνη (Lys), ενώ τα αντίστοιχα αμινοξέα σε ένζυμα θηλαστικών είναι ιστιδίνες (His). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αμινοξική αντικατάσταση Asp→His στη θέση 153 στην ECAP, που καταλήγει σε μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη με τυπικές ιδιότητες αλκαλικής φωσφατάσης θηλαστικού, δηλαδή υψηλότερο βέλτιστο pH, χαμηλή ενεργότητα απουσία ιόντων μαγνησίου, χρονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση παρουσία ιόντων μαγνησίου και μείωση της ενεργότητας παρουσία ιόντων ψευδαργύρου [111, 112].

Μηχανισμός κατάλυσης της αλκαλικής φωσφατάσης

Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την υδρόλυση ενός μεγάλου αριθμού φωσφορικών μονοεστέρων με παρόμοιους ρυθμούς, ενώ η αντίδραση προχωράει μέσω ενός ενδιάμεσου φωσφο-ενζύμου. Το βήμα που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από το pH. Σε όξινο pH το καθοριστικό βήμα είναι η υδρόλυση του ομοιοπολικά συνδεδεμένου συμπλόκου E-P, ενώ σε αλκαλικές συνθήκες είναι η απελευθέρωση του φωσφόρου από το μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο σύμπλοκο E•P_i.

Ο μηχανισμός κατάλυσης που αναφέρεται παρακάτω βασίζεται σε αυτόν που προτάθηκε αρχικά από τους Kim & Wyckoff [96] με κάποιες προσθήκες από τους Stec et al [113] (Σχήμα 18). Στο ελεύθερο ένζυμο (E) τρία μόρια νερού βρίσκονται στην περιοχή του ενεργού κέντρου και η υδροξυλομάδα της Ser102 συμμετέχει στο σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου με το ιόν υδροξυλίου που αλληλεπιδρά με το



Σχήμα 18. Μηχανισμός κατάλυσης της αλκαλικής φωσφατάσης [113]. Από τα άτομα υδρογόνου αποτυπώνονται μόνο εκείνα που εντοπίζονται στις καταλυτικές περιοχές.

μαγνήσιο. Ο σχηματισμός του συμπλόκου E•ROP περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του εστερικού οξυγόνου του υποστρώματος με το ψευδάργυρο Zn₁ και αλληλεπιδράσεις των υπολοίπων ατόμων οξυγόνου του υποστρώματος με το ψευδάργυρο Zn₂ και την πλευρική ομάδα της Arg166. Κατά την πρόσδεση του φωσφορικού μονοεστέρα (ROP) το Oγ της Ser102 αποπρωτονιώνεται πλήρως, προετοιμάζοντας το για πυρηνόφιλη προσθήκη στο άτομο φωσφόρου. Παράλληλα γίνεται μεταφορά του πρωτονίου στην υδροξυλομάδα που αλληλεπιδρά με το μαγνήσιο, σχηματίζοντας ένα μόριο νερού. Ο ψευδάργυρος στη θέση Zn₂ σταθεροποιεί το Oγ της Ser102 στην πυρηνόφιλη κατάσταση. Ακολουθεί η προσβολή

της ενεργοποιημένης υδροξυλομάδας της Ser102 στο φωσφορικό κέντρο του υποστρώματος στο σύμπλοκο E•ROP σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο σερίνης-φωσφόρου (E-P). Ο σχηματισμός αυτού του ενδιάμεσου συμπλόκου (E-P) έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή του φωσφορικού κέντρου και την απώλεια της ομάδας RO-. Ένα πυρηνόφιλο ιόν υδροξυλίου που ελέγχεται από το ψευδάργυρο Zn₁, προσβάλλει το ενδιάμεσο ομοιοπολικό σύμπλοκο E-P σχηματίζοντας το μη-ομοιοπολικό σύμπλοκο E•Pi. Άμεσο αποτέλεσμα είναι μια δεύτερη αναστροφή της στερεοδιάταξης του φωσφορικού κέντρου και δράση του μορίου νερού, που σχηματίστηκε προηγουμένως και αλληλεπιδρά με το μαγνήσιο, ως γενικευμένου οξέος, δίνοντας ένα πρωτόνιο στο Oγ της Ser102 ή εναλλακτικά ενός ανόργανου φωσφόρου. Τέλος, η απομάκρυνση του φωσφόρου από το σύμπλοκο E•Pi που καταλήγει στη δημιουργία του ελεύθερου ένζυμου (E) διευκολύνεται από την αυξημένη κινητικότητα της πλευρικής αλυσίδας της Arg166.

Εφαρμογές της αλκαλικής φωσφατάσης.

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο με πολύ σημαντικό λειτουργικό ρόλο για τα θηλαστικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η θνησιγόνος γενετική ασθένεια του ανθρώπου υποφωσφατασία, που οφείλεται στην έλλειψη ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης στα οστά [114, 115]. Στην επιστήμη της ιατρικής, τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης στον ανθρώπινο ορό είναι πολύ σημαντικά για την διάγνωση φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων άμεσα συσχετιζόμενων με το σκελετό, το ηπατοχοληφόρο σύστημα και τον πλακούντα [116-119]. Αξιοσημείωτο είναι άλλωστε ότι τα τεστ για αλκαλική φωσφατάση αποτελούν περισσότερο από το 1/4 των συνολικά χρησιμοποιούμενων τεστ για ανίχνευση ενζυμικών ενεργοτήτων σε κλινικά εργαστήρια.

Επίσης, η αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιδραστήριο σε μια σειρά τεχνικών μοριακής βιολογίας. Η απομάκρυνση φωσφόρου από τα άκρα DNA και RNA τμημάτων, η δημιουργία υβριδικών πρωτεϊνών για την μελέτη της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, η σύνδεση του ενζύμου σε αντισώματα για χρήση σε ενζυμικές ανοσοπροσροφητικές δοκιμές (ELISA), η χρήση του ενζύμου για ενεργοποίηση φθορίζόντων υποστρωμάτων στη διαδικασία μη ραδιενεργής

ανίχνευσης DNA και RNA μορίων είναι ορισμένες μόνο από τις εφαρμογές του ενζύμου σε ένα σύγχρονο εργαστήριο μοριακής βιολογίας.

Αλκαλική φωσφατάση από το ανταρκτικό στέλεχος TAB5

Γενικά, υψηλότερη καταλυτική ενεργότητα σε χαμηλές και μεσαίες θερμοκρασίες σε συνδυασμό με αυξημένη θερμοαστάθεια είναι χαρακτηριστικά ψυχρόφιλων ενζύμων [33]. Ένζυμα από ψυχρόφιλους οργανισμούς που εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα αφενός παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και αφετέρου αποτελούν πηγή πληροφοριών σχετικά με τις προσαρμογές των ψυχρόφιλων πρωτεϊνών. Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε από το ανταρκτικό στέλεχος TAB5 ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης [120]. Η αλκαλική φωσφατάση TAB5 (TAB5AP) εκφράστηκε σε βακτηριακά στελέχη *E. coli*. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει χαρακτηριστικά ψυχρόφιλου ενζύμου, δηλαδή υψηλή καταλυτική ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αξιοσημείωτη θερμοευαισθησία. Απαιτεί την παρουσία δισθενών ιόντων Zn^{2+} και Mg^{2+} για την λειτουργία της και το βέλτιστο pH δράσης είναι μεταξύ 8.5 και 10.

Συγκρίνοντας την αλληλουχία της TAB5AP με τις ήδη γνωστές και χαρακτηρισμένες αλκαλικές φωσφατάσες, διαπιστώθηκε η σχεδόν πλήρης διατήρηση των καταλοίπων του πυρήνα και του ενεργού κέντρου (Σχήμα 19). Με βάση τη δομή της ECAP κατασκευάστηκε το μοριακό μοντέλο της TAB5AP [120]. Χρησιμοποιώντας το μοντέλο αυτό και πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχιών (Σχήμα 19) σχεδιάστηκαν μεταλλαγές στην προσπάθεια διερεύνησης των μηχανισμών προσαρμογής του ενζύμου σε χαμηλές θερμοκρασίες [121, 122]. Σε μια πρώτη προσπάθεια [121] μελετήθηκε η επίδραση της τοπικής ευκαμψίας στην προσαρμογή του ενζύμου σε χαμηλές θερμοκρασίες στοχεύοντας δύο κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (Trp260 και Ala219) και ένα κατάλοιπο του σημείου πρόσδεσης του Mg^{2+} (His135). Σε μια δεύτερη προσπάθεια [122] διερευνήθηκε ο ρόλος στον ψυχρόφιλο χαρακτήρα του ενζύμου ενός ζεύγους καταλοίπων γλυκίνης εντοπισμένου κοντά στο ενεργό κέντρο.

TAB5	:	-----MKLKKIVFTLIALGLFSCKTTSVLVK-----NEPQLK-----TKNVLLIS GCAGLSQISSTF -YFK-----EGTPNYTQFKN	:	68
<i>T.maritima</i>	:	-----MKRLFTLILISLVALAFSQ-----VKNVYIT GCAGLSQISSTF -YFK-----MLEGRPLSFMKTPY	:	55
<i>E.coli</i>	:	MKQSTIALALLPLLEFVTRKARTPEMP-VLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDS-LSDKPAKNIIL GCAGLSQISSTF -YFK-----MLEGRPLSFMKTPY	:	108
Human	:	-----MISP---FLVLAIG---TCLTNSLVPEKEKDPKWRDQAQETLKYALELQK-LNTNVAKVN GCAGLSQISSTF -YFK-----ILKQGLHHPGEEETRLMDKFPF	:	94
<i>B.subtilis</i>	:	-----MKKFPKLLPIAVLSSITAFSSSLASGSVPEASAQEKK-GNQDEIDK GCAGLSQISSTF -YFK-----YLNKDKKT-KVVEPTAFDQYLVG	:	85
Yeast	:	MMHTLPSQTRLVPGSDSSSRPKRRISKRKISVTVVVICIGLLLVLVQLAFSSPALRSASHKRN GCAGLSQISSTF -YFK-----SFNQHVNDLPIDDLTLDEHFIG	:	109
TAB5	:	IGLIVTSSSRELV DS SAAGTALAS FC KNNGMDN-----VADDSTAVK SIVE IPALNNIK GV VATSS TD HA PS AFY FE ALN GL EBE-----I-AM D Y ES	:	161
<i>T.maritima</i>	:	IGLIVTSSSRELV DS SAAGTALAS FC KNNGMDN-----VADDSTAVK SIVE IPALNNIK GV VATSS TD HA PS AFY FE ALN GL EBE-----I-AM D Y ES	:	148
<i>E.coli</i>	:	YALN KT GKPDY VD SAAS TA WSTGV K YNGALG-----VDIHEKDH ET ILEM AA GL AT GV ST AE LD DA PA ALV EV TS EC KY GS ATS Q K CP GN A LE K	:	208
Human	:	VALS CT YNTKA Q VD S ACT AT AVLC GV KAN EG TV GV SA AT ERS RC NT TQ GNE VS IT IR W AD CA CK SV GI V TT RV NE AT PS AA Y PS AL ED W YSD-----NEM P EA S Q	:	200
<i>B.subtilis</i>	:	QQT Y PD D PE Q VD S AA AT MS A CI K Y NA DA-----VDNDG SE AK TV LE AE AK E K CA IG VA SE LD HA PS FG S HD S R K NM NS ---IAD D Y FE V NG	:	182
Yeast	:	SSRT S ---SDSL V DS A AG ATA FA CA L K SY NG ALG-----VDP HR PC CT V LE PA RL AG YL IG LV V TR I DA PS S FS S EV D Y EW Q ED L---IATH Q L GE Y PL G	:	204
TAB5	:	-----D DE FA GG CL NY TK-----RKDK D V L AIL FG Q FT INT TG ---L TF SS IA SN R K MG FL AD -----EAM P TM E -----K	:	225
<i>T.maritima</i>	:	-----ETVD V MG GG WAN L PK D L GG K R DD N L N L EL AK E GY I Y K T RE E---LS K IS AD SD K IL A FP S -----H---L D P AS -----R	:	220
<i>E.coli</i>	:	GK-G S IT E Q LL NA R AD VT LG GC AK T AE T -AT A GE W Q K T L RE QA CA R C Y Q L VD SA AS-L NS V T EA N Q Q K PL L G PA D GN MP V R W L G PK AT Y H GN ID K PA V T CT P N Q R N	:	315
Human	:	CKD I AY Q LM H NI R D VD MG GC R K Y MP K N K T D VE Y ES DE K AR G T RL EL GL D L DT W KS FK PR H K H SH F I W NR TE L T LD-----PH N V D Y L L GL FP EG M Q Y EL NR NN	:	303
<i>B.subtilis</i>	:	K H K D V L GG CK SN DR -----K D R N L I KE PK KA C Y SS VD R K D -ML K N K D S ---Q V L G L PD G-----G L PK K ID-----R T	:	246
Yeast	:	R-V VD L GG CR SH Y P Q-----G E K AS P Y GH G AR K CR EL DE A Q S ---N G W Y V G DR R N F D S L K SH G -----E N VT LF FG L FA D ND IP FE DR DE	:	290
TAB5	:	GR G NE S AA T DL A Q E TS K EN-----S A FF TS IG S Q LD W CG AN AS Y L SE IN DE DA IG T AL A FA K K D -G N T L V IV TA D ET GG FT LA AK K NR-----E D G S E	:	321
<i>T.maritima</i>	:	KE Q ML Y EM VE K AL ED SK D-----E P FF LM V GC S LD W EA DN I Y GV W EV VE KA V Q VA D F AL K R -G E T L V IV TA D ET GG GL SS G D Y R VD V D K IR N FK T	:	322
<i>E.coli</i>	:	DS V TL A Q MT DK A EL TS K E -----K G FP L Q VG AS LD K Q EA N PC G Q IG ET VD L EA V Q RA LE PA KE -G N T L V IV TA D EA H AS Q IV AP DT K AP-----G L T Q AL	:	412
Human	:	V T D S LS E M V V V AT Q LP K IP-----K G FP LL V GC GR LD H G EG K A Q A EA V E M EA IG Q GS L T S ---E P TL V V TA D ESH V TF FG Y T PR GN S --I F GL A PL M L	:	402
<i>B.subtilis</i>	:	K D IS SL K D MT N T A IK K NI K -----D G FP LM V GC Q LD W AG DN I IV GA SE ME D FE Q Y KA LD F A K K D-K H T L V IV TA D ET GG Y S IG AD GI YN -----W F SE P I	:	343
Yeast	:	KE Y SL E K Q V K VA L GA E AS N ED-K D SN GF LM V GC RL D H AG ON PA S Q VE V LA E EP Q Y VE FA EN SD TE T V IV TA D ET GG GL V TS R Q V TA S Y P Q Y V W Y Q VL	:	399
TAB5	:	YS-----DY T RE IG PT-----FS GG S AT LD VF AY GE G SE EF I Y EN NE	:	362
<i>T.maritima</i>	:	TD W -----I M AN Y PR D RE K FK A IE Y F L GL T LS-----D ED -L N R I S M S K N P K I EL GR IL GE K V SV GW TT TS CT PR FP AF GP GA EN FT FL DN TE	:	410
<i>E.coli</i>	:	NT-----K D GA V M Y MS Y GN SE E-----D Q EB AG Q LF HA Y CG HA AN V CL T Q TD	:	459
Human	:	SD T -----D K K P FT AI LY GN GP Y K V V-----G GER ENV-S M V D Y A H N NY QA Q SA V PL R H ET GG ED V VE S KG MA HL L H VE H Q NY	:	479
<i>B.subtilis</i>	:	KA-----A K RT PD FA M AK I AD G AD VE K T L K Y ID Q K L AL T KA RI Q SV RE AA K SE V L-D ID NA I EN I F N K R S H T GW T GG ET GE D V V Y AY GE S SE T F A Q ID N TE	:	444
Yeast	:	AN A TH S GE FL K R KL V DF V HE H K G ASS K IE N FI K HE I LE K DL GI Y D T SD LE T L I HL DD N A NI Q DK L ND M V S FR A Q I GW T H G SA V D V NY AY AN K KA T W S Y VL N L L Q	:	509
TAB5	:	F H K L K V T K W N Q-----	:	375
<i>T.maritima</i>	:	P R I M K L T G Y S L Q Y PL L K EP V T K -----	:	434
<i>E.coli</i>	:	F Y T K A L GL K -----	:	471
Human	:	P H V Y A Y A C I G AN L GH CA PA SS ---A G SL A AG P ---L L L A L A L Y PL S V L F-----	:	524
<i>B.subtilis</i>	:	A K N FK AL Q Y N I K IN K -----	:	462
Yeast	:	GN H EN TE V G Q E LN F LE L N L NE V T D L IR D T K H T S D F DA TE IA SE V Q H Y DE Y Y HE L T N	:	566

Σχήμα 19. Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας της TAB5AP με άλλες αλκαλικές φωσφατάσες από τα βακτήρια *E.coli* και *B.subtilis*, το σακχαρομήκυτα (*Saccharomyces cerevisiae*), την ανθρώπινη εντερική και από το θερμοφίλο στέλεχος *Thermotoga maritima* [120]. Με μαύρο χρώμα σημειώνονται τα όμοια αμινοξέα, ενώ με γκρι οι περιοχές που η συντήρηση δεν είναι πλήρης. Με πράσινο εμφανίζονται τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη δέσμευση των μετάλλων, με κόκκινο η καταλυτική Ser και με μπλε τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην κατάλυση.

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία ασχολείται με τη μελέτη των πιθανών προσαρμογών της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5AP στη λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες μέσω τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης. Μετά την εφαρμογή μιας *in vitro* εξελικτικής διαδικασίας πάνω στο αγρίου τύπου ψυχρόφιλο ένζυμο, επιλέχθηκαν οι πρωτεΐνες με τις πιο ενδιαφέρουσες προσαρμογές (αισθητά αυξημένη ή μειωμένη θερμοσταθερότητα, αυξημένη ενεργότητα). Τα επιλεγμένα ένζυμα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με τον προσδιορισμό των κινητικών και θερμοδυναμικών τους

παραμέτρων. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια ανάλυσης της πολυπλοκότητας που ενώνει την ενεργότητα με την θερμοσταθερότητα στη ψυχρόφιλη φωσφατάση, συγκρίνοντας τη θερμική σταθερότητα της και την θερμοεξαρτώμενη ενεργότητα της με τις αντίστοιχες των εξελιγμένων ενζύμων.

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία και στα πλαίσια συνεργασίας με τα πανεπιστήμια του Τρόμσο και του Ελσίνκι αναλύθηκε η τρισδιάστατη δομή της TAB5AP. Κάνοντας χρήση αυτών των δομικών στοιχείων αναλύθηκαν οι επιπτώσεις των επιλεγμένων μεταλλαγών σε μοριακό επίπεδο.

**ΥΛΙΚΑ
ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ**

Υλικά και μέθοδοι

Υλικά

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

Ο πλασμιδιακός φορέας pRsetA, όπου κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης ήταν της εταιρείας Invitrogen Corporation.

Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν από τις εταιρείες Difco Laboratories και Merck. Τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Sambrook et al. [123]. 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 (Q Sepharose fast flow, Sephacryl S300 HR) έγινε από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH. Από την ίδια εταιρεία ήταν επίσης και οι πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.

Η συσκευή FLUOSTAR Galaxy προμηθεύτηκε από την εταιρεία BMG Labtechnologies GmbH. Οι συσκευές Mastercycler gradient και Ellectroporator 2510 ήταν από την εταιρεία Eppendorf Netheler-Hinz GmbH.

Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA (100bp-10kb) μετά από PCR αντίδραση καθώς και για την εκχύλιση τμημάτων DNA (70bp-10kb) από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν στήλες QIAquick (QIAGEN).

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

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων και τα αντίστοιχα διαλύματα δράσης τους ήταν από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology, New England Biolabs GmbH, Promega Corporation και Stratagene GmbH. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR παραγγέλθηκαν και παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας (IMBB, ITE).

Μέθοδοι

Κλωνοποίηση του γονιδίου TAB5AP

Το γονίδιο TAB5AP ήταν ήδη κλωνοποιημένο στην πλασμιδιακή κατασκευή pN1 [120]. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα την προηγούμενη πλασμιδιακή κατασκευή και εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια PhoNFor (5'-CAA AAC ACA TAT GGT TTT AGT AAA AAA TGA GC-3' με NdeI περιοριστική θέση ενσωματωμένη) και PhoRev (5'-TTG AAT TCG TTT ATT GAT TCC ACT TTG-3' με EcoRI περιοριστική θέση ενσωματωμένη) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR. Τελικό αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή γονιδίου από το οποίο απουσίαζε η περιοχή που κωδικοποιεί τα 22 πρώτα αμινοξέα. Για την ενσωμάτωση του TAB5AP γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pRsetA πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του φορέα και του γονιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και EcoRI και ακολούθησε η αντίστοιχη αντίδραση συγκόλλησης. Η πλασμιδιακή κατασκευή στάλθηκε για νουκλεοτιδική αλληλούχηση, όπου διαπιστώθηκε η ένθεση του σωστού γονιδίου. Η τελευταία κατασκευή ονομάστηκε pRSETWT.

Δημιουργία βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων κλώνων αλκαλικής φωσφατάσης

A.) *Error Prone PCR (EP PCR)*. Μια από τις ευρύτετα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων σε μία αλληλουχία DNA είναι η EP PCR (Error Prone Polymerase Chain Reaction) [124]. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται σε αυτή της PCR που αφορά την δυνατότητα πολλαπλασιασμού οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA *in vitro* με τη χρήση κατάλληλης μήτρας και δύο ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών (primers) που υβριδοποιούν εκατέρωθεν της αλληλουχίας του DNA που μας ενδιαφέρει. Η διαφορά της EP PCR όμως είναι ότι εισάγει τυχαίες μεταλλαγές κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με αλλαγές στην συγκέντρωση των ιόντων Mn^{2+} και των dNTPs και με τροποποίηση της χρονικής διάρκειας των διαφόρων σταδίων της τεχνικής. Τροποποιώντας αυτούς τους παράγοντες ρυθμίζεται και η συχνότητα των μεταλλαγών. Το μείγμα κάθε αντίδρασης περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

- 5-20 ng DNA μήτρα.

- 40 pmoles PhoNFor.
- 40 pmoles PhoRev.
- EP PCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1% Triton X-100, 7mM MgCl₂).
- dNTPs mix (1mM dCTP, 1mM dTTP, 0.2mM dATP, 0.2mM dGTP).
- ddH₂O μέχρι συνολικό όγκο 100 μl.

Τα βήματα που εκτελέστηκαν σε κατάλληλη PCR συσκευή (Mastercycler gradient, Eppendorf) είναι:

1. Θέρμανση στους 94°C, 5 min (αποδιάταξη).
2. 15 sec, 72°C.
3. Προσθήκη 9units από Taq DNA Polymerase.
4. 10 sec, 94°C (αποδιάταξη).
5. 30 sec, 42°C (υβριδοποίηση των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας).
6. 60 sec, 72°C (επιμήκυνση των νέων αλυσίδων).
7. Επανάληψη βημάτων 4-6 για 30 φορές.
8. 5 min, 72°C.
9. Διατήρηση στους 4°C.

Ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο ο ρυθμός εισαγωγής νουκλεοτιδικών αλλαγών καθορίστηκε σε 2-3/kb. Με την προσθήκη στο αρχικό μείγμα MnCl₂ σε τελική συγκέντρωση 0.2mM, ο ρυθμός αυτός αυξήθηκε σε 5-6/kb.

Τα μεταλλαγμένα γονίδια-προϊόντα EP PCR υπόκεινται σε διπλή πέψη NdeI – EcoRI, απομονώνονται και κλωνοποιούνται σε φορέα pRsetA που έχει κοπεί με τα αντίστοιχα ένζυμα. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων κλώνων αλκαλικής φωσφατάσης.

B.) Staggered Extension Process (StEP). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μια αντίδραση PCR όπου η εκκίνηση σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην DNA-μήτρα ακολουθείται από κύκλους αποδιάταξης και πολύ σύντομες περιόδους επαναδιάταξης-επέκτασης [65]. Άμεσο αποτέλεσμα είναι ότι σε κάθε κύκλο τα νεοσυντιθέμενα τμήματα επαναδιατάσσονται σε διαφορετικές μήτρες όπου και

επεκτείνονται περαιτέρω. Αυτό συνεχίζεται μέχρι τη δημιουργία αλληλουχιών πλήρους μήκους. Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής:

- 25 pmol PhoNFor.
- 25 pmol PhoRev.
- 0.2 mM dNTPs.
- 0.37 pmol από κάθε DNA μήτρα.
- 5 µl Taq 10X buffer.
- 1 unit Taq πολυμέραση.
- ddH₂O μέχρι συνολικό όγκο 50 µl.

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

1. 94°C, 5 min.
2. 30 sec, 94°C.
3. 10 sec, 50°C
4. Επανάληψη βημάτων 2-3 για 99 φορές.
5. 7 min, 72°C.
6. Διατήρηση στους 4°C.

Τα μεταλλαγμένα γονίδια-προϊόντα που προέκυψαν από την τεχνική StEP υπόκεινται σε διπλή πέψη NdeI – EcoRI, απομονώνονται και κλωνοποιούνται σε φορέα pRsetA που έχει κοπή με τα αντίστοιχα ένζυμα.. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων αλκαλικής φωσφατάσης με ποικίλους συνδυασμούς των αρχικών μεταλλαγών που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες.

Εισαγωγή σχεδιασμένων μεταλλαγών (Site Directed Mutagenesis)

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

(1)PhoNFor

5'-CAAAACACATATGGTTTTAGTAAAAAATGAGC-3'

(2) PhoRev

5'-TTGAATTCGTTTATTGATTCCACTTTG-3'

(3)APMUTG87As86aFOR.

5'-GATTCAGCCGCTGCCGCTACTGCTTTTTTCCTGT-3'

(4)APMUTG87As86Arev

5'AAAAGCAGTAGCGGCAGCGGCTGAATCAGTTAC-3'

Η εισαγωγή της μεταλλαγής πραγματοποιήθηκε σε δύο κύκλους PCR [125]. Στον πρώτο κύκλο πολλαπλασιάζονται τμήματα από την αρχή του γονιδίου ως το σημείο της μετάλλαξης (εκκινητές (1)-(4)) και από το σημείο της μετάλλαξης ως το τέλος του γονιδίου (εκκινητές (2)-(3)). Στο δεύτερο κύκλο χρησιμοποιούνται ως μήτρες τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου και οι εξωτερικοί εκκινητές ((1) και (2)) ώστε το τελικό προϊόν να αντιστοιχεί στο γονίδιο πλήρους μήκους με την επιθυμητή μεταλλαγή. Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής:

- 25 pmol primer forward.
- 25 pmol primer reverse.
- 0.2 mM dNTPs.
- 30 ng DNA μήτρα
- 5 μl Deep Vent 10X buffer.
- 1 unit Deep Vent πολυμεράση.
- ddH₂O μέχρι συνολικό όγκο 50 μl

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

1. 94°C, 3 min.
2. 60 sec, 94°C.
3. 60 sec, 47°C.
4. 60 sec, 72°C.
5. Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 φορές.
6. 7 min, 72°C.
7. Διατήρηση στους 4°C.

Υπερέκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (αγρίου ή μεταλλαγμένου τύπου) σε κύτταρα *E. coli*.

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε BL21 DE3 pLys *E. coli* κύτταρα με το κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (pRsetA (APWT ή μεταλλαγή)). Από ένα φρέσκο πιάτο συλλέγεται μια μοναδική αποικία με την οποία μολύνεται υγρή καλλιέργεια 50 ml LB/αμπικιλίνη/χλωραμφενικόλη (για 1 lt διαλύματος Luria Bertani Medium : 10 gr bacto-tryptone, 5 gr yeast-extract, 10gr NaCl, σε αυτό προσθέτουμε 1ml διαλύματος αμπικιλίνης 150 mg/ml και 1 ml διαλύματος χλωραμφενικόλης 34 mg/ml). Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30°C υπό ανάδευση. Την άλλη μέρα γίνεται προσθήκη σε αναλογία 1/50 της προκαλλιέργειας σε 1000 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB/αμπικιλίνης/χλωραμφενικόλης που περιέχει επιπλέον 10 mM MgSO₄, 0.4 mM ZnSO₄, 10 mM KCl και επώαζεται στους 25°C έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600nm να είναι 0.6-0.7. Ακολουθεί προσθήκη IPTG (IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM και επώαση για άλλες 12-14 ώρες στους 20°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (10 min, 7.500 rpm, 4°C), και αποθηκεύονται στους -20°C.

Απομόνωση πρωτεϊνών

A.) *Διάρρηξη κυτταρικής πάστας.* Η διαδικασία καθαρισμού γίνεται σε θερμοκρασία 8°C. Η παγωμένη πάστα κυττάρων ξεπαγώνεται και επαναδιαλύεται σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (1g πάστας σε 3 ml διαλύματος) 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.3 mg/ml λυσοζύμη. Ακολουθεί επώαση στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 2.5 ώρες. Ανά 30 min προσθέτουμε PMSF σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Μετά από 45 min επαναπροσθέτουμε λυσοζύμη τόση ώστε να διπλασιαστεί η αρχική συγκέντρωσή της στο διάλυμα. Μετά από επώαση 1.5 ώρας στον πάγο γίνεται προσθήκη Dnase (τελική συγκέντρωση 10 µg/ml) και MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 10 mM). Μετά από μια ώρα επώασης το διάλυμα φυγοκεντρείται στους 4°C για 20 min στις 10.000 x g ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα. Συλλέγουμε το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα.

B.) Χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow. Το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο αραιώθηκε (1/3) στο διάλυμα A (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂) και φορτώθηκε σε προσροφητή Q sepharose fast flow εξισορροπημένο με το διάλυμα A. Ο προσροφητής εκπλύθηκε με το ίδιο διάλυμα μέχρι που η απορρόφηση ήταν μηδενική. Οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με γραμμική κλίση συγκέντρωσης φωσφορικού νατρίου στο διάλυμα A (10 όγκοι στήλης, 0-100 mM K₂HPO₄ – KH₂PO₄, pH 6.0), ενδιάμεση έκπλυση με το διάλυμα A (4 όγκοι στήλης) και γραμμική κλίση συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου στο διάλυμα A (20 όγκοι στήλης, 0-0.6 M NaCl). Τα κλάσματα που περιέχουν την ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης αντιστοιχούν στα ~ 0.1-0.18 M NaCl συλλέχθηκαν και συμμείχθηκαν.

Γ.) Χρωματογραφία σε προσροφητή Sephacryl S200 HR. Το δείγμα από το προηγούμενο στάδιο συγκεντρώθηκε σε centricon (MILLIPORE) σε τελικό όγκο 3 ml και φορτώθηκε σε προσροφητή Sephacryl S200 HR εξισορροπημένο με το διάλυμα B (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 200 mM NaCl). Ακολουθεί έκλυση των πρωτεϊνών με το διάλυμα B (1 όγκος στήλης). Τα κλάσματα που φέρουν ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης ελέγχονται σε πηκτή ακρυλαμίδης, συγκεντρώνονται και υπόκεινται σε διαπύηση σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % γλυκερόλη. Τα καθαρά πρωτεϊνικά παρασκευάσματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Σάρωση της μεταλλαγμένης βιβλιοθήκης

A.) Μικρής κλίμακας υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TAB5AP σε κύτταρα *E. coli*. Πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε B121 DE3 *E. coli* κύτταρα με μέρος της μεταλλαγμένης βιβλιοθήκης. Από ένα φρέσκο πιάτο συλλέγονται μοναδιαίες αποικίες. Κάθε μια χρησιμοποιείται για να μολύνει 200 μl υγρής καλλιέργειας LB/αμπικιλίνη που βρίσκεται σε πηγαδάκι πλάκας COSTAR 96 Well Flat Bottom. Επωάζουμε για 16 ώρες στους 30°C υπό ανάδευση. Η φύλαξη των καλλιιεργειών έγινε στους 4°C.

B.) Έλεγχος εναπομένουσας δραστηριότητας. Για κάθε COSTAR πλάκα (μητρική) δημιουργείται το αντίγραφο της με μεταφορά 60 μl καλλιέργειας στο αντίστοιχο πηγαδάκι καινούργιας πλάκας. Η πλάκα-αντίγραφο επωάζεται στους 50°C για 45min και τοποθετείται στους 4°C για 15min. Ακολουθεί έλεγχος ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης. Από την μητρική πλάκα υπολογίζεται η αρχική δραστηριότητα για κάθε πηγαδάκι και από το αντίγραφο της η εναπομένουσα δραστηριότητα μετά την θερμική επεξεργασία.

Φασματοφωτομετρική μέθοδος ανίχνευσης-μέτρησης ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης

Το άχρωμο υπόστρωμα p-νιτροφαινυλφωσφορικό (p-nitrophenyl phosphate, pNPP) παρουσία ενζύμου με ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης υδρολύεται σε p-νιτροφαινόλη (κίτρινη απόχρωση), το οποίο και ανιχνεύεται στα 405nm. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πηγαδάκια πλάκας COSTAR 96 Well Flat Bottom στους 15°C και παρακολουθείται από τη συσκευή FLUOSTAR GALAXY. Κάθε πηγαδάκι περιέχει:

- 100 μl AP Buffer (1 M Διαιθανολαμίνη-HCl pH 10, 10 % glycerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂)
- 20 μl pNPP συγκέντρωσης 5mM.
- 10 μl δείγμα.

Λόγω της ευαισθησίας της, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την σάρωση των βιβλιοθηκών με τους μεταλλαγμένους κλώνους αλκαλικής φωσφατάσης.

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 [126]. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μέσω χρώσης με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης γίνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (BIORAD) με βαθμονομημένη καμπύλη με bovine serum albumin [127].

Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis)

Εφαρμόστηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης του DNA μέσω της ενσωμάτωσης διδεόξυ-αναλόγων. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και η ταυτοποίηση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένη συσκευή νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (PE-AB1377) στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εντομολογίας (IMBB, ITE). Για την αλληλούχιση της εκάστοτε κατασκευής χρησιμοποιήθηκαν οι συνήθεις εκκινητές για το πλασμίδιο pRsetA (T7 promoter και T7 terminator). Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με την χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων (CLUSTAL X, VECTOR NTI, BLAST).

Μετρήσεις κινητικών παραμέτρων

Οι κινητικές παράμετροι των ενζύμων μετρήθηκαν σε εύρος θερμοκρασιών 10°C–30°C. Το πρόγραμμα Hyper.exe (v 1.01) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των παραμέτρων V_{max} και K_m . Οι τιμές k_{cat} της αλκαλικής φωσφατάσης υπολογίστηκαν από τις τιμές της V_{max} χρησιμοποιώντας σαν μοριακό βάρος την τιμή 35.861 (τιμή που αντιστοιχεί στο μονομερές). Όλες οι τιμές μετρήθηκαν εις τριπλούν και οι αποκλίσεις δεν υπερβαίνουν το 5 %.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας σαν διάλυμα το AP Buffer. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση του μηχανήματος FLUOSTAR (BMG LABORATORIES)

Σταθερότητα πρωτεϊνών

Για να μετρηθεί η θερμική σταθερότητα της TAB5AP και των μεταλλάξεων αυτής, δείγματα 0.5 μg των καθαρών πρωτεϊνών επωάστηκαν στους 55°C και 60°C σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 200 mM NaCl για διαφορετικές χρονικές περιόδους (55°C : 5 min, 10 min, 20 min, 60 min, 120 min / 60°C : 5 min, 10 min, 20 min, 60 min) και κατόπιν επωάστηκαν σε πάγο για 15 min. Η εναπομένουσα ενεργότητα μετρήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος FLUOSTAR GALAXY (BMG LABORATORIES), στις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω. Οι τιμές που αναφέρονται αποτελούν το μέσο όρο 3 μετρήσεων και οι αποκλίσεις δεν υπερβαίνουν το 5 %.

Η σταθερότητα της TAB5AP και των μεταλλάξεων αυτής μετρήθηκαν με διαφορική θερμιδομετρία (DSC) στο εργαστήριο Βιοχημείας του Ινστιτούτου Χημείας του Πανεπιστημίου της Λιέγης σε συνεργασία με τον Dr Georges Feller. Η επαγόμενη από τη θερμοκρασία αποδιάταξη των πρωτεϊνών μετρήθηκε και καταγράφηκε σε συσκευή MicroCal MSC-DSC σε ρυθμό σάρωσης 90 K h⁻¹ σε ατμόσφαιρα αζώτου με πίεση 2 Atm. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για διαπήδηση στο ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM MOPS, pH 7.5 για 16 ώρες. Το ίδιο ρυθμιστικό χρησιμοποιήθηκε στην κυψελίδα αναφοράς και για τον προσδιορισμό της βασικής γραμμής του ρυθμιστικού διαλύματος. Οι καμπύλες αποδιάταξης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MicroCal Origin v 2.9.

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων υπολογίστηκε μέσω ειδικού αντιδραστηρίου (bicinchoninic acid protein assay reagent, PIERCE) μετά την διαπήδηση και εξισορροπήθηκε στα ~4 mg/ml για το καθένα. Η θερμιδομετρική ενθαλπία (ΔH_{cal}) υπολογίστηκε από την επιφάνεια κάτω από την μεταβολή του θερμογραφήματος και μετά από κανονικοποίηση με την ακριβή πρωτεϊνική συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος. Τα σημεία του θερμογραφήματος πάνω από τους 70°C αποκλείστηκαν λόγω ύπαρξης εξωθερμικού σήματος πρωτεϊνικής συσσώρευσης (exothermic signal drift of aggregation).

Ανάλυση της δομής της ψυχρόφιλης TAB5AP

Κρυστάλλωση της TAB5AP. Για τα πειράματα κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκε καθαρό πρωτεϊνικό δείγμα TAB5APWT το οποίο αποκτήθηκε σύμφωνα με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Πριν την κρυστάλλωση η πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε με την χρήση centricon (Mw cutoff 10 kDa, Millipore) και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂ και 0.01 mM ZnCl₂. Μέσω αυτής της διαδικασίας η συγκέντρωση της γλυκερόλης μέσα στο δείγμα ελαττώθηκε από 50% (αρχική) σε 1% (τελική). Οι κρύσταλλοι αποκτήθηκαν μέσω της τεχνικής hanging-drop vapor diffusion στους 4°C και στις συνθήκες που ακολουθούν: 17 mg / ml TAB5APWT αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 με διάλυμα 23 % PEG 3350, 0.2 M NaAc·H₂O, 0.01 M φωσφονοοξικό οξύ και 0.1 M διάλυμα κακοδυλικού, pH 6.5 και εξισορροπήθηκαν μέσω διάχυσης ατμών. Κρύσταλλοι με σχήμα λεπτών, διαφανών πλακών, ποικίλων μεγεθών, αποκτήθηκαν μετά από 2-3 εβδομάδες. Το παραπάνω διάλυμα, με την προσθήκη 10% γλυκερόλης, χρησιμοποιήθηκε σαν κρυοπροστατευτικό (cryo-protectant) για την συλλογή δεδομένων.

Συλλογή δεδομένων. Η συλλογή των δεδομένων έγινε στις εγκαταστάσεις του ESRF (European Synchrotron Radiation Facilities) στο ID14-EH2, χρησιμοποιώντας ADSC Q4R CCD-ανιχνευτή. Ο κρύσταλλος ψύχθηκε με ήλιο στους 40 K και συλλέχθηκαν δεδομένα σε διακριτικό όριο 1.95 Å με μήκος κύματος 0.933 Å. Τα στοιχεία που προέκυψαν αναλύθηκαν με τα προγράμματα Mosflm και SCALA, TRUNCATE (CCP4 suite).

Ανάλυση και βελτιστοποίηση της δομής. Η μοριακή αντικατάσταση (Molecular replacement) πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Molrep (CCP4 suite) χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες ενός τροποποιημένου μονομερούς αλκαλικής φωσφατάσης από *E.coli* (pdb, 1ED9) χωρίς κανένα δεσμευτή.

Δομική ανάλυση των μεταλλαγών. Οι δομικές συνέπειες των επιλεγμένων μεταλλαγών αναλύθηκαν μέσω μοντελοποίησης στη δομή της TAB5AP. Οι

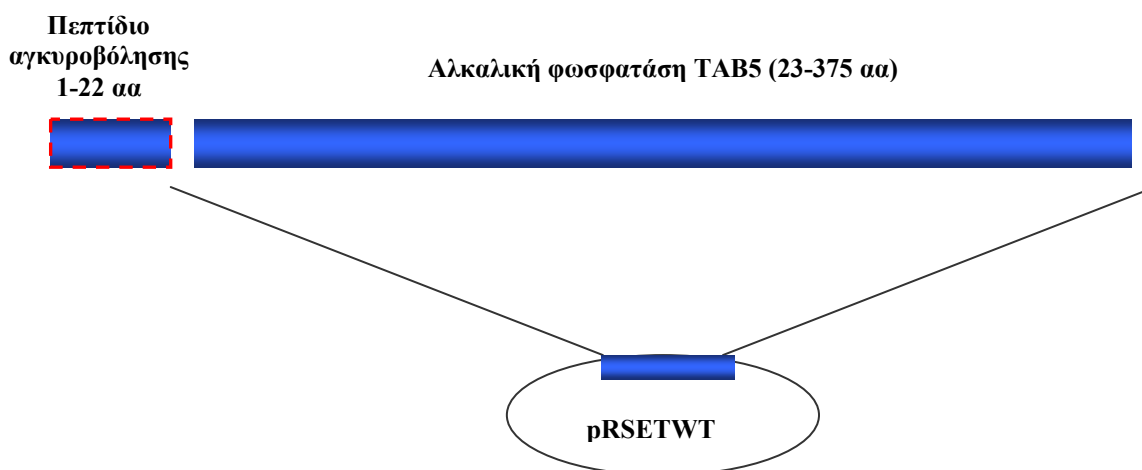
μεταλλαγές σχεδιάστηκαν στο πρόγραμμα Coot [128] και οι αντίστοιχες δομικές απεικονίσεις προετοιμάστηκαν με το λογισμικό PyMOL [129] και βελτιστοποιήθηκαν στα προγράμματα Photoshop και Corel Draw.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

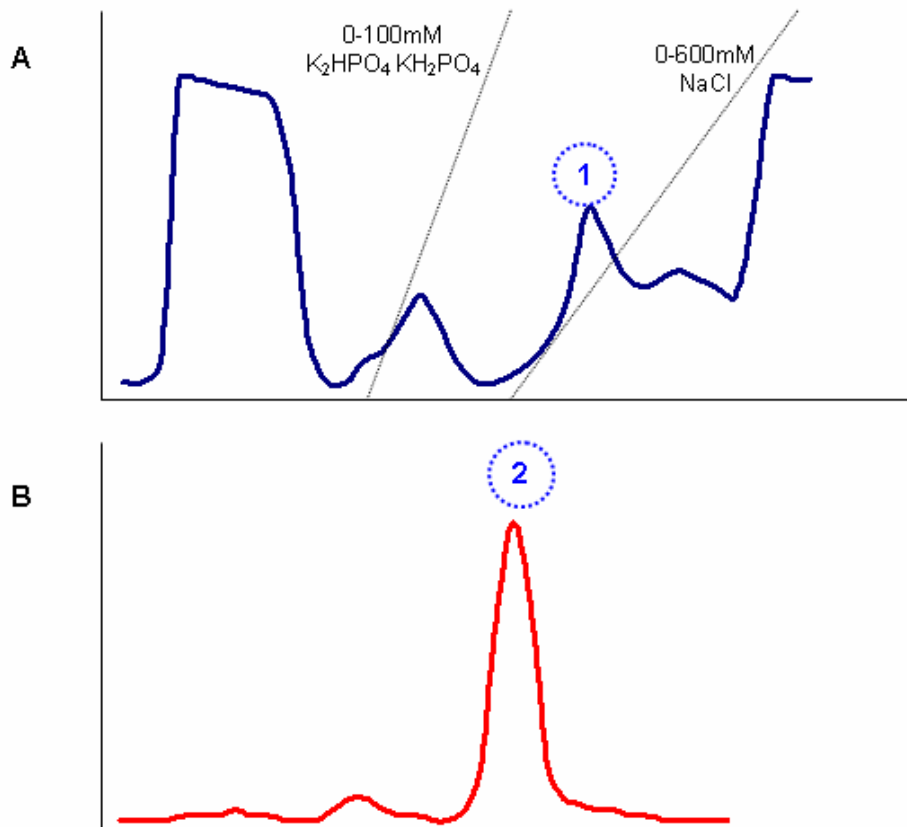
Κλωνοποίηση – απομόνωση

Η TAB5AP αγρίου τύπου (AP wt) καθώς και όλοι οι μεταλλαγμένοι κλώνοι υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα pRsetA με τη χρήση PCR, σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ. Από τα υπερεκφρασμένα ένζυμα απουσίαζαν τα 22 πρώτα αμινοξέα (Σχήμα 20). Πρόκειται για ένα πεπτίδιο αγκυροβόλησης στο εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Απουσία του δεν απαιτείται η προσθήκη απορρυπαντικών για την απομόνωση της πρωτεΐνης από τα μεμβρανικά κλάσματα όπου και εντοπίζονταν [121].

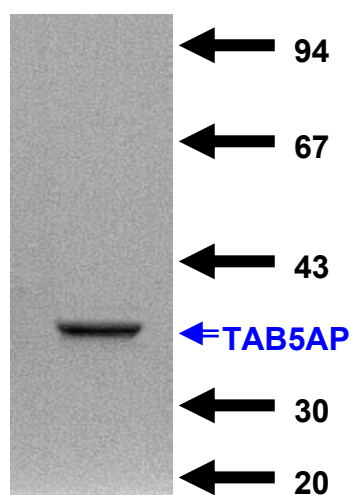


Σχήμα 20. Γενική δομή της πλασμιδιακής κατασκευής pRSETWT.

Τα ένζυμα (μεταλλαγμένου ή αγρίου τύπου) καθαρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο (Σχήμα 21), σε επίπεδα καθαρότητας 95% (Εικόνα 1). Το τελικό παρασκεύασμα της αλκαλικής φωσφατάσης εμφανίζει μια πρωτεϊνική ζώνη πιο έντονη σε σχέση με τις υπόλοιπες, η οποία εντοπίζεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε θέση που αντιστοιχεί σε σχετικό μοριακό βάρος ~36 kDa (Εικόνα 1).



Σχήμα 21. Χρωματογραφήματα καθαρισμού της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5AP. (A) Q Sepharose fast flow, (B) Sephacryl S200 HR. Τα κλάσματα με ενεργότητα φωσφατάσης (1) φορτώνονται στην κολώνα Sephacryl S200 HR και τα κλάσματα με ενεργότητα φωσφατάσης (2) συλλέγονται.



Εικόνα 1. Πηκτή ακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (T=12%). Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue R. Διακρίνεται δείγμα TAB5AP μετά το τελικό στάδιο καθαρισμού. Δεξιά αναφέρονται οι αντίστοιχες τιμές των δεικτών μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την πηκτή.

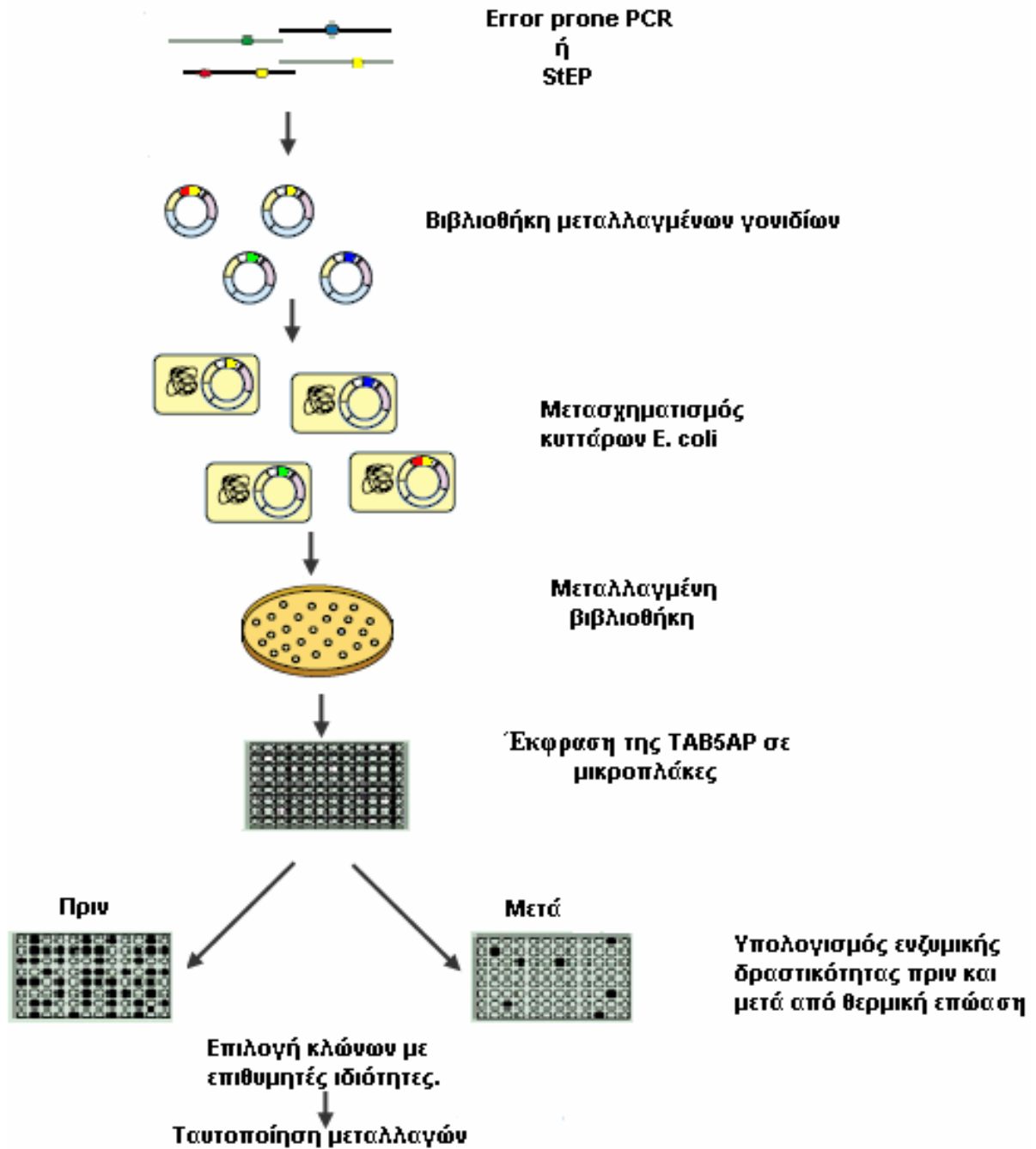
Πειραματική στρατηγική της κατευθυνόμενης εξέλιξης της ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης TAB5AP

Βασικό στοιχείο ενός πειράματος κατευθυνόμενης εξέλιξης αποτελεί η ανάπτυξη μιας γρήγορης τεχνικής σάρωσης αρκετά ευαίσθητης ώστε να ανιχνεύει μικρές αλλαγές στην θερμοσταθερότητα οι οποίες οφείλονται ακόμη και σε μοναδικές αμινοξικές αντικαταστάσεις [130]. Η τεχνική σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία βασίζεται στην διατήρηση ή μη της ενεργότητας μετά από θερμική επώαση [131] και δεν έχει την δυνατότητα διαχωρισμού των ποικίλων μηχανισμών που επιφέρουν τις παρατηρούμενες αλλαγές. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες των οποίων η αναλογία εναπομένουσα/αρχική ενεργότητα στους 15°C εμφανίζεται τροποποιημένη σημαντικά (αυξημένη ή μειωμένη) συγκρινόμενη με του φυσικού ενζύμου, συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση (Σχήμα 22).

Η βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων κλώνων πρώτης γενιάς δημιουργήθηκε με τη χρήση του Error Prone PCR [124]. Οι γονιδιακές βιβλιοθήκες προέκυψαν μέσω αυτού του μεταλλαξογόνου τύπου PCR σε συνθήκες κατάλληλα ρυθμισμένες για την εισαγωγή ~1-2 αμινοξικών αλλαγών ανά 1000 νουκλεοτίδια. Αυτός ο ρυθμός μεταλλαξογένεσης θεωρείται από τους καταλληλότερους για την τροποποίηση ενζυμικών ιδιοτήτων [132].

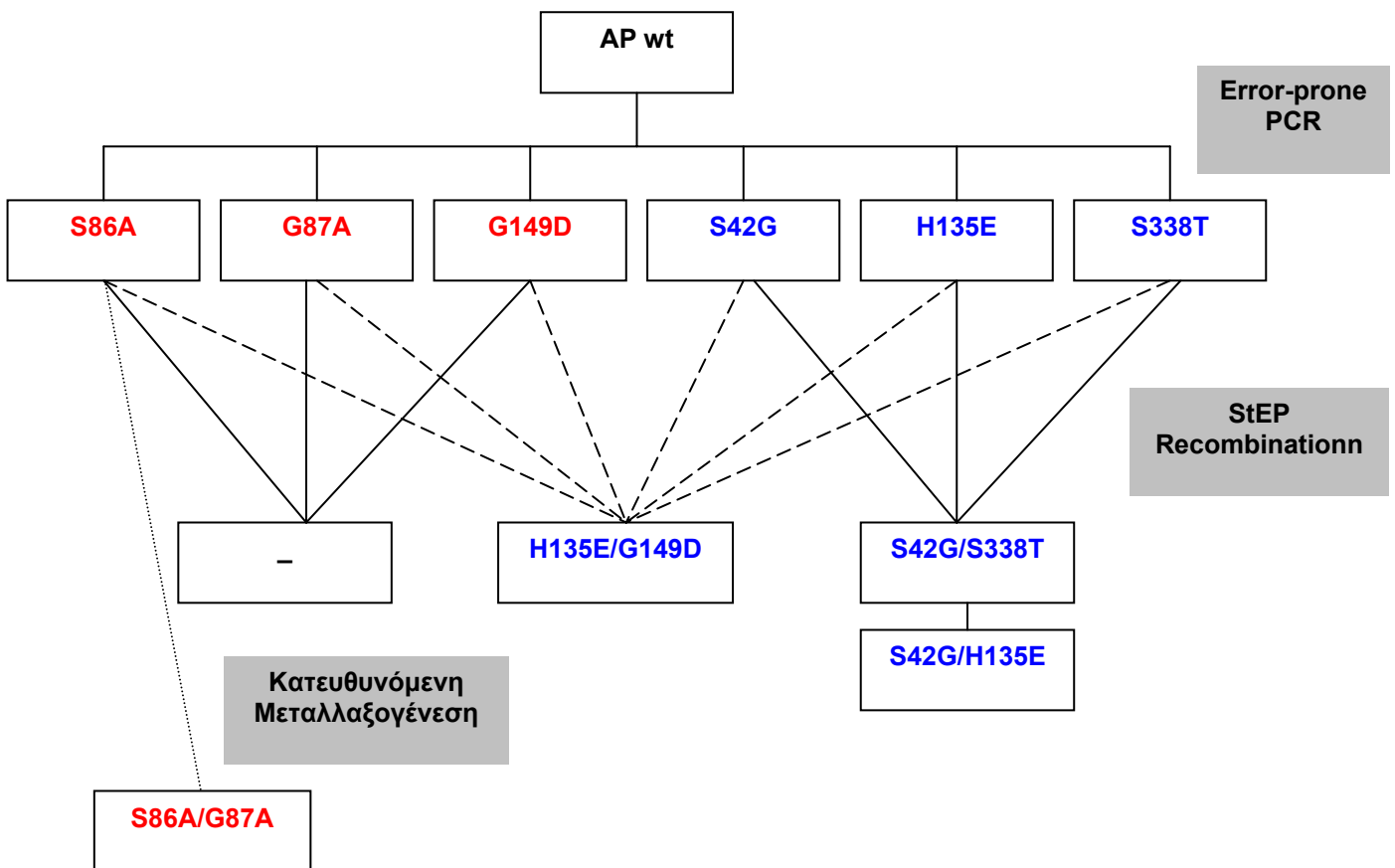
Περίπου 13000 κλώνοι ελέγχθηκαν για την ενεργότητα και την θερμοσταθερότητα τους μετά από επώαση στους 50°C. Από τους κλώνους που έφεραν τροποποιημένες τις ιδιότητες στόχους επιλέχθηκαν τρεις θερμοσταθεροί και τρεις θερμοασταθείς κλώνοι με τις μεγαλύτερες μεταβολές μετά από σύγκριση των ενεργοτήτων τους πριν και μετά την θερμική επώαση. Το καθένα από τα επιλεγμένα ένζυμα έφερε μόνο μια αμινοξική αλλαγή.

Οι μεταλλαγές που επιλέχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από την πρώτη γενιά, ανασυνδυάστηκαν μέσω της μεθόδου StEP [65]. Τελικό αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία τριών διαφορετικών βιβλιοθηκών 'ανασυνδυασμένων' κλώνων. Το πρώτο πείραμα *in vitro* ανασυνδυασμού αφορούσε τις μεταλλαγές στα αμινοξέα 86, 87 και 149 (θερμοσταθερές μεταλλαγές). Στο δεύτερο πραγματοποιήθηκε ανασυνδυασμός των μεταλλαγών στα αμινοξέα 42, 135 και 338 (θερμοασταθείς μεταλλαγές) και στο τρίτο ανασυνδυάστηκαν και οι έξι μεταλλαγές.



Σχήμα 22. Σάρωση των βιβλιοθηκών κατευθυνόμενης εξέλιξης. Τα μεταλλαγμένα γονίδια που έχουν προκύψει μέσω Error prone PCR ή μέσω StEP εισάγονται σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης, οι οποίοι και μετασχηματίζονται σε κύτταρα *E. coli*. Οι πρωτεϊνικές βιβλιοθήκες εκφράζονται και ελέγχονται σε μικροπλάκες. Οι κλώνοι με τις επιθυμητές ιδιότητες συλλέγονται, ταυτοποιούνται και χαρακτηρίζονται.

Από κάθε βιβλιοθήκη ελέγχθηκαν κατά προσέγγιση 1000 κλώνοι για την ενεργότητά τους πριν και μετά από επώαση στους 50°C. Η σάρωση της πρώτης βιβλιοθήκης δεν αποκάλυψε καμία νέα μεταλλαγή ή συνδυασμό των αρχικών που να ικανοποιούσε τα κριτήρια της επιλογής. Από τις άλλες δύο βιβλιοθήκες επιλέχθηκαν τρεις κλώνοι με διπλές μεταλλαγές στον καθένα: ο S42G/H135E, ο S42G/S338T και ο H135E/G149D. Οι επιλεγμένοι κλώνοι αλκαλικής φωσφατάσης και η στρατηγική της κατευθυνόμενης εξέλιξης που ακολουθήθηκε, παρουσιάζονται συνοπτικά στο Σχήμα 23.



Σχήμα 23. Η γενεαλογία των μεταλλαγμένων ενζύμων από την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου (AP wt). Οι μεταλλαγές της πρώτης γενιάς δημιουργήθηκαν μέσω error-prone PCR. Οι έξι ‘καλύτεροι’ κλώνοι που επιλέχθηκαν από την πρώτη γενιά ανασυνδυάστηκαν μέσω της τεχνικής StEP σε τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς. Το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο S86A/G87A προέκυψε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης. Στο σχήμα παρουσιάζονται μόνο οι μη συνώνυμες μεταλλαγές.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο StEP ή οποιαδήποτε άλλη τεχνική *in vitro* DNA ανασυνδυασμού υπήρχαν ελάχιστες έως μηδαμινές πιθανότητες να σχηματιστεί ένα ένζυμο με την διπλή μετάλλαξη S86A/G87A. Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε πιθανό αθροιστικό αποτέλεσμα στην θερμοσταθερότητα λόγω της συνύπαρξης των δύο αυτών μεταλλαγών, σχεδιάσαμε αυτό το ένζυμο μέσω κατάλληλων τεχνικών PCR [125].

Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της

Με στόχο την διερεύνηση των επιδράσεων που έχουν οι διάφορες μεταλλαγές στην σταθερότητα-διατήρηση της ενεργότητας της ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης μετά από θερμική επώαση, τα διάφορα ένζυμα (υπό την μορφή καθαρών πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων) επώαστηκαν στους 55°C και στους 60°C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε υπολογισμός της εναπομένουσας ενεργότητας. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5 συμπεραίνουμε ότι οι μεταλλαγές S86A, G87A και G149D επιφέρουν ένα σταθεροποιητικό αποτέλεσμα στην διατήρηση της ενεργότητας. Ο συνδυασμός των μεταλλαγών στις θέσεις 86 και 87 έχει ως επακόλουθο ένα ιδιαίτερα σταθερό ένζυμο. Μετά από δίωρη επώαση στους 60°C, το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο S86A/G87A διατηρεί το 33% της ενεργότητας του, περίπου 66 φορές περισσότερο από του αγρίου τύπου ένζυμο.

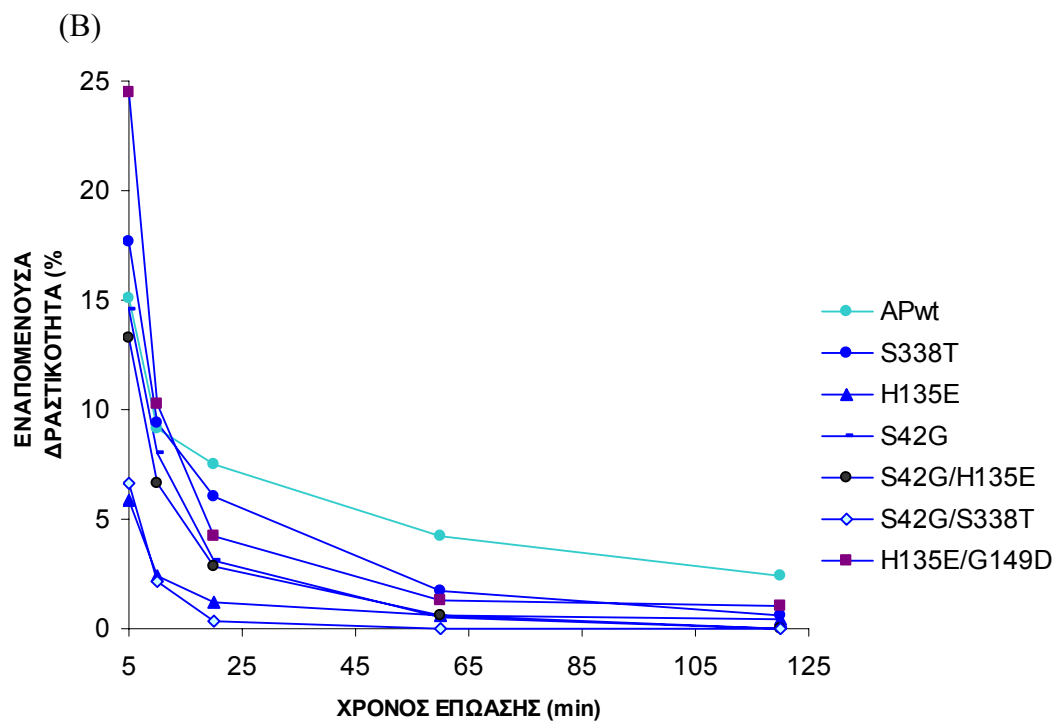
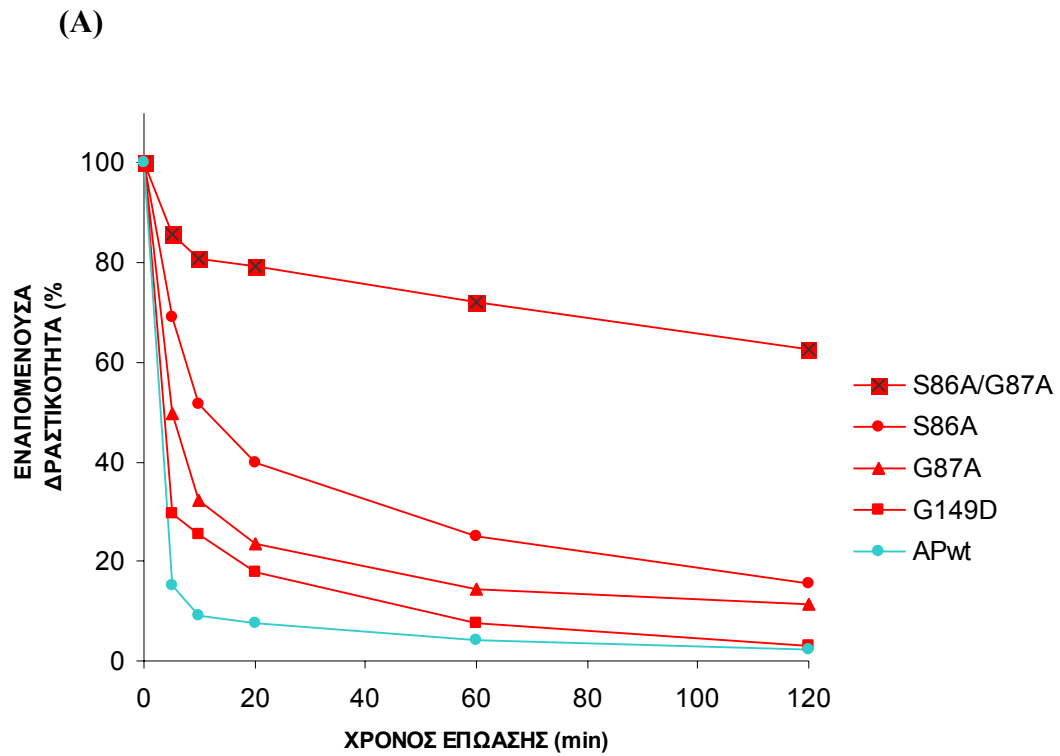
Οι μεταλλαγές S42G, H135E και S338T οδήγησαν σε ένζυμο με μειωμένη εναπομένουσα ενεργότητα. Μετά από πεντάλεπτη επώαση στους 60°C, το ένζυμο με την μεταλλαγή H135E και το διπλά μεταλλαγμένο S42G/S338T διατηρούν μόλις το 0,6 και 0,9% αντίστοιχα των αρχικών τους ενεργοτήτων, περίπου 10 και 7 φορές λιγότερο από του αγρίου τύπου ένζυμο.

<i>Ένζυμο</i>	<i>Αρχική Ενεργότητα (%)</i>	<i>Εναπομένουσα Ενεργότητα (55°C) (%)</i>				
<i>Χρόνος Επώασης (min)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>20</i>	<i>60</i>	<i>120</i>
WT	100	15	9	7.5	4.2	2.4
S86A	100	69.2	51.4	39.9	25	15.6
G87A	100	49.5	32.4	23.3	14.3	11.4
G149D	100	29.6	25.4	17.9	7.5	2.8
S86A/G87A	100	54	51	49.8	45.4	39.4
H135E/G149D	100	24.5	10.3	4.2	1.3	1
S42G	100	14.5	8	3.1	0.4	0
H135E	100	5.8	2.4	1.2	0.6	0.4
S338T	100	17.7	9.4	6	1.7	0.6
S42G/H135E	100	13.3	6.6	2.8	0.6	0
S42G/S338T	100	6.7	2.1	0.4	0	0

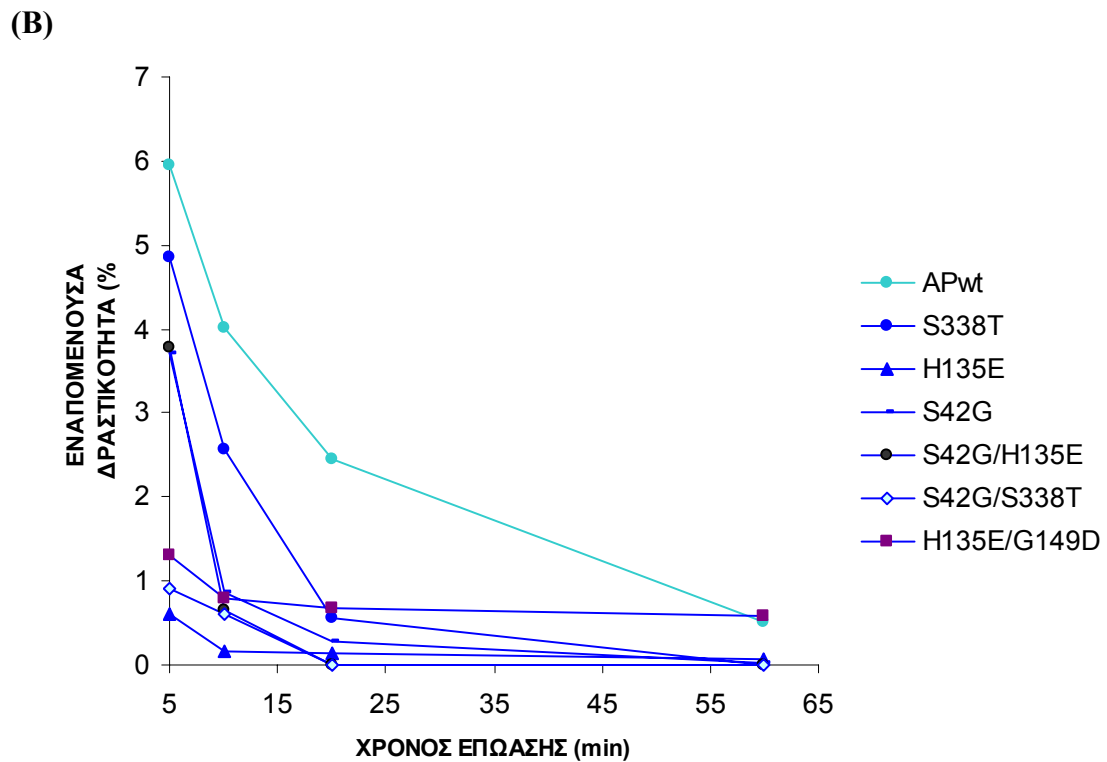
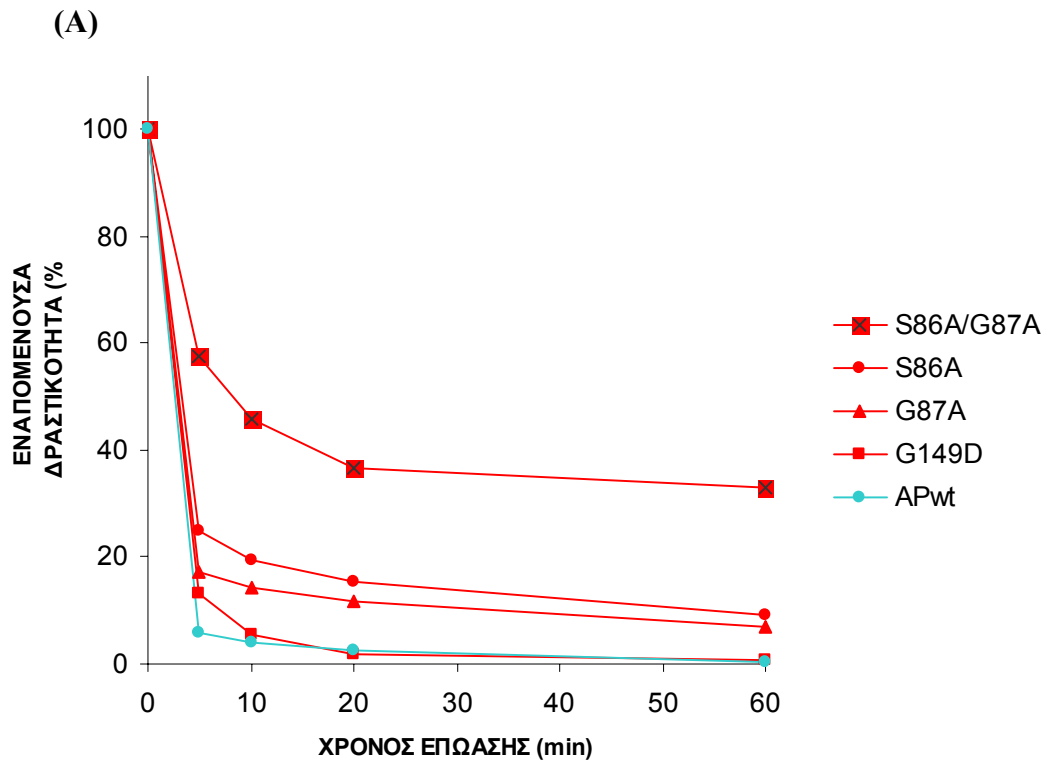
Πίνακας 4. Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της στους 55°C. Τα ένζυμα επωάστηκαν στους 55°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM MgCl₂, 200mM NaCl για διαφορετικές χρονικές περιόδους και κατόπιν επωάστηκαν σε πάγο για 15 min. Η εναπομένουσα ενεργότητα υπολογίστηκε στους 15°C. Οι τιμές που αναφέρονται αποτελούν το μέσο όρο 3 μετρήσεων και οι αποκλίσεις δεν υπερβαίνουν το 5 %.

<i>Ένζυμο</i>	<i>Αρχική Ενεργότητα (%)</i>	<i>Εναπομένουσα Ενεργότητα (60°C) (%)</i>			
<i>Χρόνος Επώασης (min)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>20</i>	<i>60</i>
WT	100	6	4	2.4	0.5
S86A	100	25	19.3	15.6	9
G87A	100	17.1	14.3	12	7.1
G149D	100	13.2	5.4	1.8	0.7
S86A/G87A	100	57.5	45.8	36.7	33
H135E/G149D	100	1.3	0.8	0.7	0.6
S42G	100	3.7	0.8	0.3	0
H135E	100	0.6	0.2	0.1	0
S338T	100	4.8	2.6	0.6	0
S42G/H135E	100	3.8	0.7	0	0
S42G/S338T	100	0.9	0.6	0	0

Πίνακας 5. Θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της στους 60°C. Τα ένζυμα επωάστηκαν στους 60°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM MgCl₂, 200mM NaCl για διαφορετικές χρονικές περιόδους και κατόπιν επωάστηκαν σε πάγο για 15 min. Η εναπομένουσα ενεργότητα υπολογίστηκε στους 15°C. Οι τιμές που αναφέρονται αποτελούν το μέσο όρο 3 μετρήσεων και οι αποκλίσεις δεν υπερβαίνουν το 5 %.



Σχήμα 24. Γραφική αναπαράσταση της εναπομένουσας ενεργότητας των αλκαλικών φωσφατάσων στους 55°C. Με - απεικονίζονται οι θερμοσταθερές πρωτεΐνες (A), με - οι θερμοασταθείς (B) και με - το φυσικό ένζυμο.

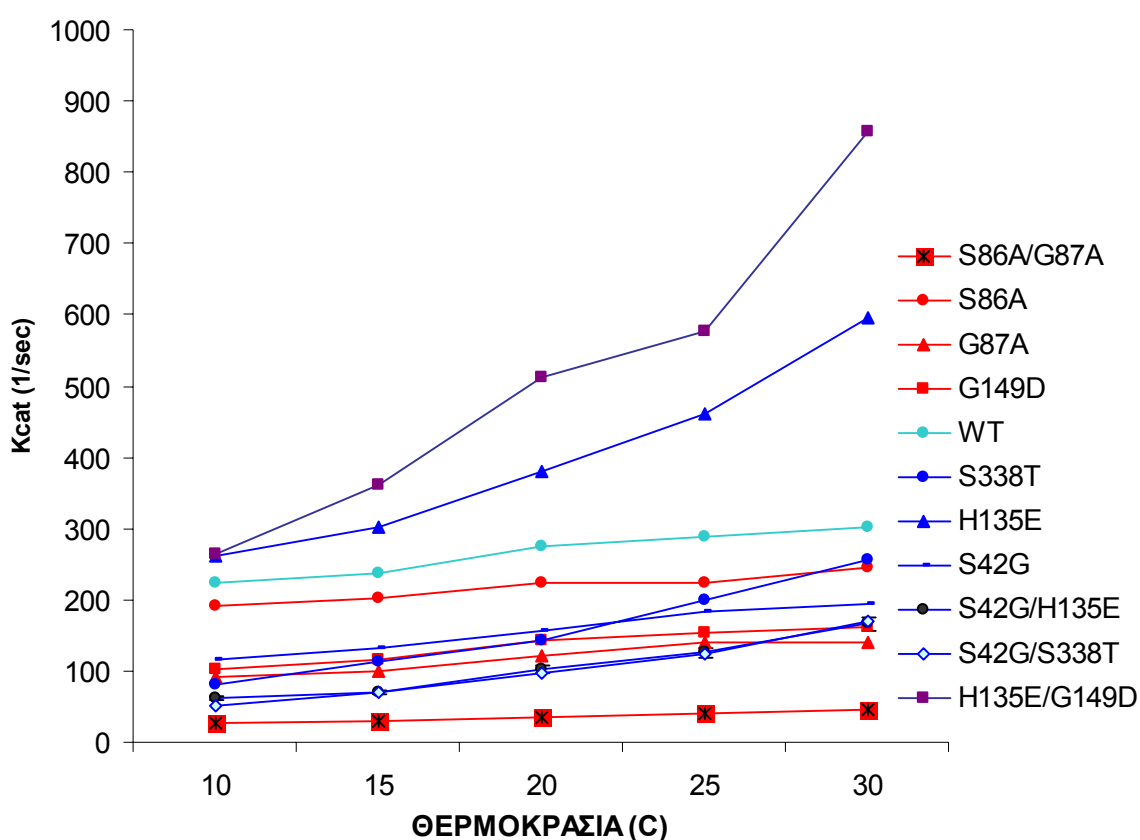


Σχήμα 25. Γραφική αναπαράσταση της εναπομένουσας ενεργότητας των αλκαλικών φωσφατάσων στους 60°C. Με - απεικονίζονται οι θερμοσταθερές πρωτεΐνες (A), με - οι θερμοασταθείς (B) και με - το φυσικό ένζυμο.

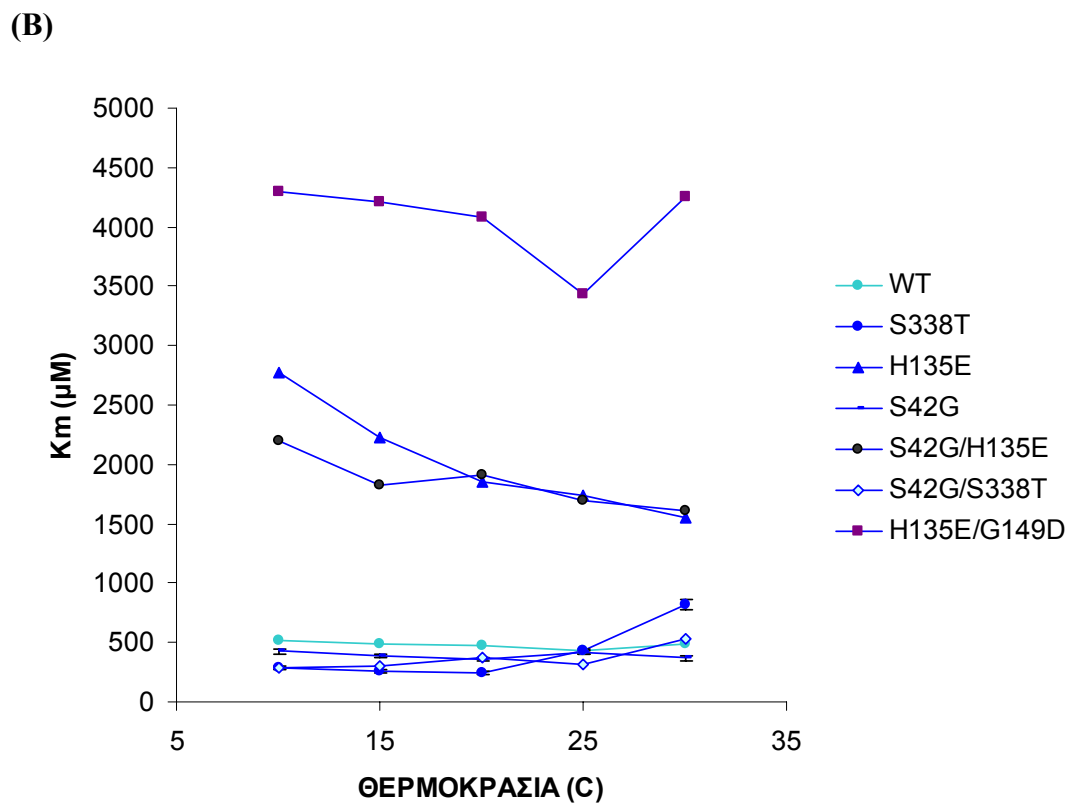
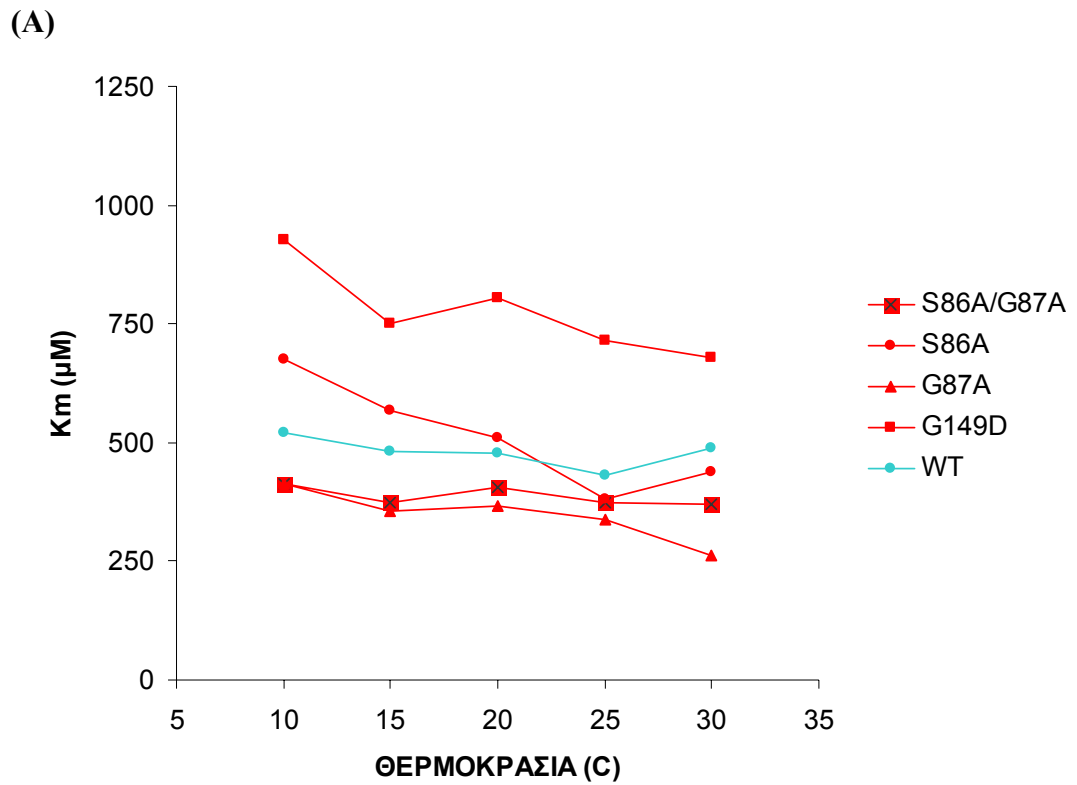
Κινητικές παράμετροι των ενζύμων

Οι κινητικές παράμετροι των μεταλλαγμένων ενζύμων αλλά και του αγρίου τύπου υπολογίστηκαν για εύρος θερμοκρασιών (10–30°C) όπου η APwt παρουσιάζεται σταθερή. Τα ένζυμα H135E και H135E/G149D είναι τα πιο ενεργά απ' όλα και σε όλες τις θερμοκρασίες. Ο αριθμός μετατροπής (k_{cat}) στους 30°C ήταν υψηλότερος κατά 2 και 3 φορές αντίστοιχα, σε σχέση με του φυσικού ενζύμου (Σχήμα 26). Ωστόσο οι τιμές της K_m αυτών των ενζύμων είναι αισθητά μειωμένες (Σχήμα 27), οδηγώντας τελικά σε μικρότερη φυσιολογική αποδοτικότητα (k_{cat}/K_m) σε σχέση με την APwt, σε οποιαδήποτε θερμοκρασία (Σχήμα 28).

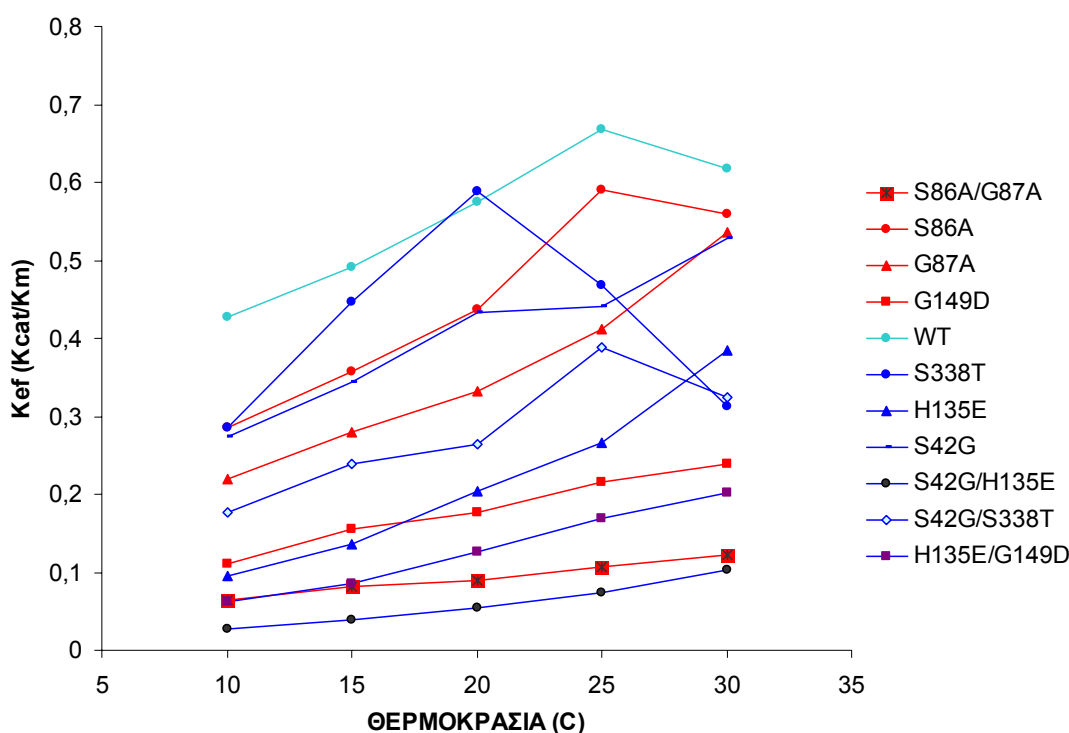
Τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα ένζυμα εμφανίζονται λιγότερο ενεργά συγκρινόμενα με το φυσικό ένζυμο, σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών. Το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο S86A/G87A παρουσιάζει την χαμηλότερη ενεργότητα, περίπου 7 φορές μικρότερη από του φυσικού ενζύμου στους 30°C (Σχήμα 26).



Σχήμα 26. Ο αριθμός μετατροπής k_{cat} για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C.



Σχήμα 27. Η κινητική παράμετρος K_m για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C. (A) Θερμοσταθερά ένζυμο, (B) θερμοασταθή ένζυμο.



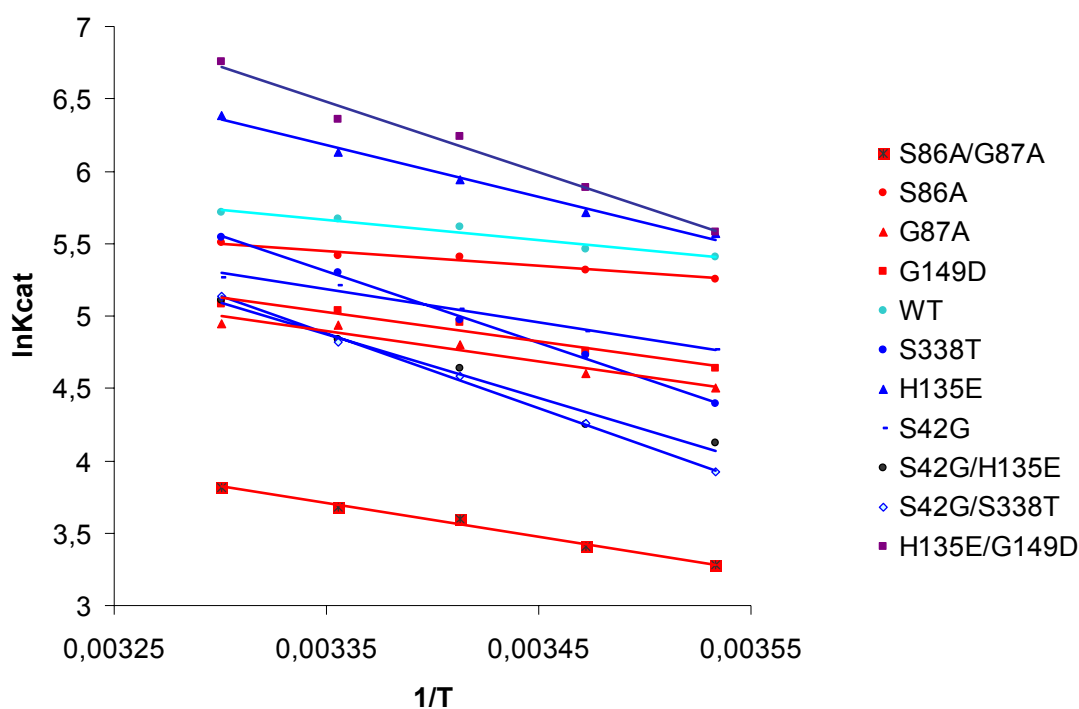
Σχήμα 28. Η φυσιολογική αποδοτικότητα k_{ef} για την ψυχρόφιλη αλκαλική φωσφατάση και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις θερμοκρασίες 10-30°C.

Ενέργεια ενεργοποίησης και θερμοδυναμικές παράμετροι των ενζύμων

Στην προσπάθεια να εξακριβώσουμε την επίδραση που επιφέρουν οι μεταλλαγές στην προσαρμογή της ενζυμικής αντίδρασης σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπολογίστηκαν η ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) καθώς και οι θερμοδυναμικές παράμετροι της αντίδρασης για το φυσικό ένζυμο και τους μεταλλαγμένους κλώνους (Πίνακας 6). Στο Σχήμα 29 παρουσιάζονται τα διαγράμματα Arrhenius για το εύρος θερμοκρασιών 10–30°C. Οι τιμές της E_a που υπολογίστηκαν μέσω αυτών των διαγραμμάτων αποκάλυψαν ότι όλα τα μεταλλαγμένα ένζυμα, εκτός αυτού με την μεταλλαγή S86A έχουν υψηλότερες E_a σε σχέση με το φυσικό ένζυμο (Πίνακας 6). Ειδικότερα τα ένζυμα με τις μεταλλαγές S338T, H135E/G149D και S42G/S338T εμφανίζουν E_a περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από το ένζυμο αγρίου τύπου.

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	E_a (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta G^\ddagger)_{wt-mut}$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta H^\ddagger)_{wt-mut}$ (kJ/mol)	$T\Delta(\Delta S^\ddagger)_{wt-mut}$ (kJ/mol)
WT	236	11,6	57,4	9,2	-48,2			
S86A	203	8,5	57,7	6,1	-51,6	-0,3	3.1	3.4
G87A	100	17,2	59,4	14,8	-44,6	-2	-5.6	-3.6
G149D	117	16,8	59	14,4	-44,6	-1,6	-5.2	-3.6
S86A/G87A	30	19,1	62,3	16,7	-45,6	-4,9	-7.5	-2.6
H135E/G149D	361	40,1	56,3	37,7	-18,6	1,1	-28.5	-29.6
S42G	133	18,9	58,7	16,5	-42,2	-1,3	-7.3	-6
H135E	303	29,4	56,8	27	-29,8	0,6	-17.8	-18.4
S338T	114	40,9	59,1	38,5	-20,6	-1,7	-29.3	-27.6
S42G/H135E	70	36,5	60,3	34,1	-26,2	-2,9	-24.9	-22
S42G/S338T	71	42,6	60,2	40,2	-20	-2,8	-31	-28.2

Πίνακας 6. Ενέργεια ενεργοποίησης και θερμοδυναμικοί παράμετροι των ενζύμων. Οι αναφερόμενες τιμές για την k_{cat} και τις θερμοδυναμικές παραμέτρους υπολογίστηκαν στους 15°C. Η E_a κάθε ενζύμου υπολογίστηκε από την κλίση του αντίστοιχου διαγράμματος Arrhenius για τις θερμοκρασίες 10–30°C. Οι θερμοδυναμικοί παράμετροι ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , $T\Delta S^\ddagger$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες [17].



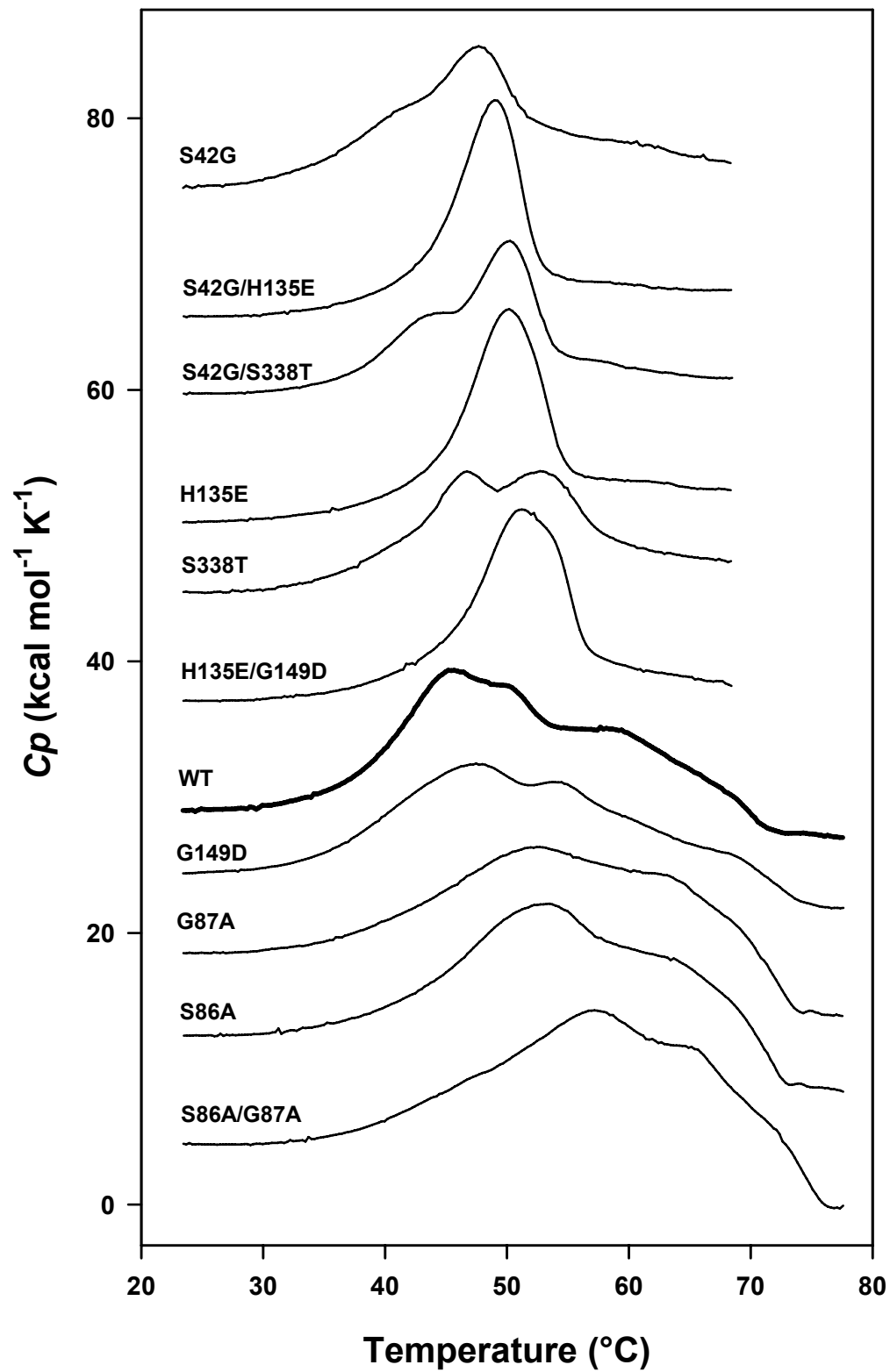
Σχήμα 29. Διαγράμματα Arrhenius για τον υπολογισμό της E_a της APwt και των μεταλλαγμένων μορφών αυτής.

Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

Το φυσικό ένζυμο (APwt) εμφανίζει ένα πολύπλοκο πρότυπο θερμικά επαγόμενης αποδιάταξης όπως αυτή καταγράφεται μέσω διαφορικής θερμιδομετρίας. Αυτό γίνεται εμφανές στο Σχήμα 30 (έντονη γραμμή) όπου δομικές αλλαγές ανιχνεύονται σε αρκετά χαμηλή θερμοκρασία (35°C) και ακολουθούνται από μία κύρια μεταβολή η οποία επικεντρώνεται περίπου στους 45°C. Ωστόσο δύο καλά διακριτές αποδιατακτικές μεταβολές γίνονται ανάμεσα στους 50°C και στους 65°C, πριν την διατάραξη του θερμιδομετρικού σήματος λόγω πρωτεϊνικής συσσώρευσης (aggregation). Στο Σχήμα 30 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των μεταλλαγμένων ενζύμων αλλά και του αγρίου τύπου κατά σειρά αύξησης της ανθεκτικότητας έναντι της θερμικής απενεργοποίησης από πάνω προς τα κάτω.

Στον Πίνακα 7 παρατηρούμε τις θερμιδομετρικές παραμέτρους δομικής σταθερότητας όλων των ενζύμων. Τα ένζυμα με τις μεταλλαγές S86A, G87A, G149D και S86A/G87A χαρακτηρίζονται από αύξηση των T_{m1} και T_{m2} συγκρινόμενα με το φυσικό ένζυμο. Αντιθέτως τα ένζυμα με τις μεταλλαγές S42G, H135E, S338T, S42G/H135E, S42G/S338T και H135E/G149D φαίνονται να έχουν χάσει τελείως τις ενδιάμεσες αποδιατακτικές μορφές γύρω από τους 60°C.

Εκτός του διπλά μεταλλαγμένου ενζύμου S86A/G87A, τα υπόλοιπα ένζυμα με υψηλότερα T_{m1} και T_{m2} δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες μεταβολές της θερμιδομετρικής ενθαλπίας (ΔH_{cal}). Ωστόσο, οι τιμές της ΔH_{cal} έχουν δραστικά μειωθεί για τα μεταλλαγμένα ένζυμα με χαμηλότερα T_m .



Σχήμα 30. Διαγράμματα διαφορικής θερμιδομετρίας για την APwt και τα μεταλλαγμένα ένζυμα.

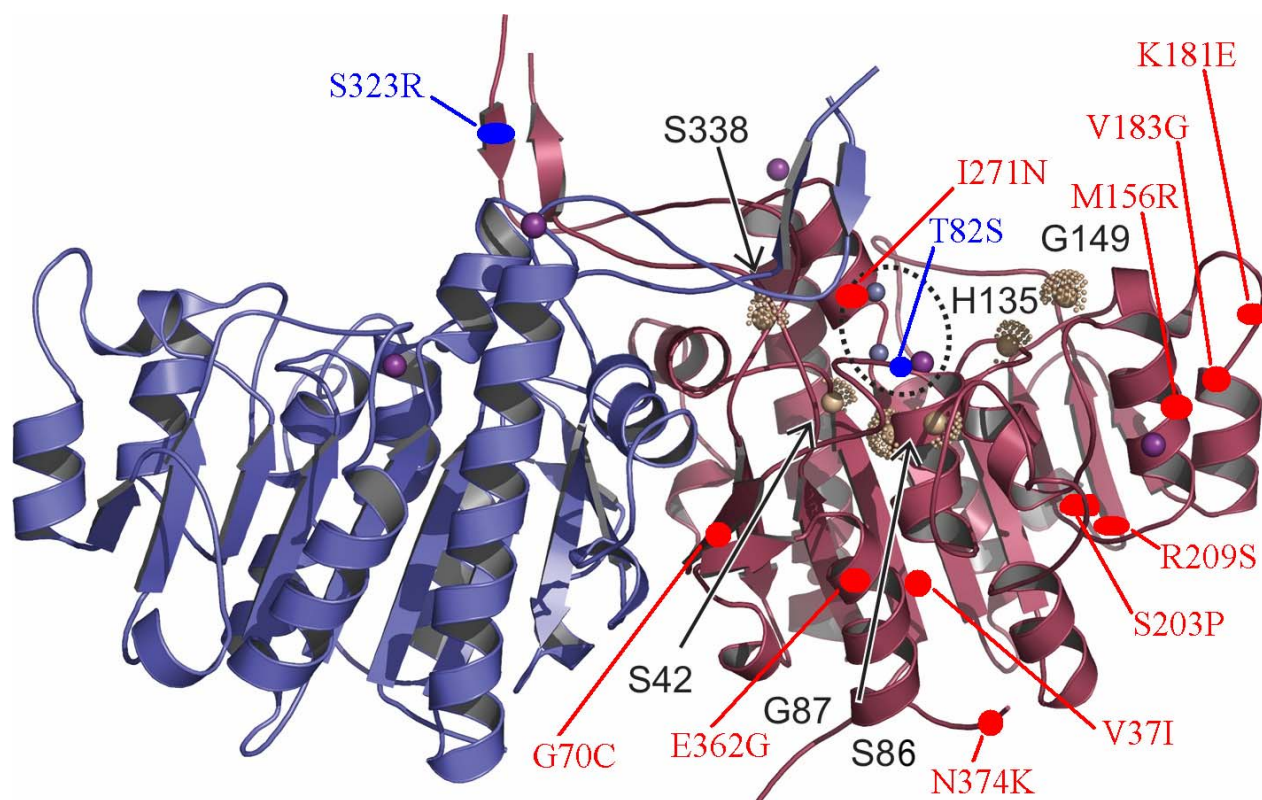
	T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	ΔH_{cal}
	°C	°C	°C	kcal/mol
S42G	41.7	47.7		78
S42G/H135E	49.0			91
S42G/S338T	44.8	50.3		72
H135E	50.2			98
S338T	46.5	52.7		97
H135E/G149D	51.2			109
APwt	45.4	49.7	58.4	163
G149D	47.5	54.0		155
G87A	52.4	62.6		157
S86A	53.5	62.7		173
S86A/G87A	57.2	64.4		196

Πίνακας 7. Θερμιδομετρικές παράμετροι της δομικής σταθερότητας της APwt και των μεταλλαγμένων ενζύμων.

Ανάλυση της δομής της TAB5AP και δομική επεξήγηση των μεταλλαγών

Η δομή της TAB5AP λύθηκε σε συνεργασία με την διδακτορική φοιτήτρια Ellen Wang μέλους της ερευνητικής ομάδας του Dr. Edward Hough στο Πανεπιστήμιο του Tromsø και της ερευνητικής ομάδας της Dr. Pirkko Heikinheimo στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι. Οι λεπτομέρειες των πειραμάτων κρυστάλλωσης και της διαδικασίας συλλογής των δεδομένων αναφέρονται στο κεφάλαιο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ. Η δομή επιλύθηκε σε διακριτικό όριο 1.95 Å.

Οι επιπτώσεις των επιλεγμένων μεταλλαγών στην θερμοσταθερότητα και την ενεργότητα μελετήθηκαν σε μοριακό επίπεδο χρησιμοποιώντας την κρυσταλλογραφική δομή της TAB5AP. Όλες οι επιλεγμένες μεταλλαγές εντοπίζονται γύρω από το ενεργό κέντρο, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο την επίδρασή τους στην ενεργότητα του ενζύμου (Σχήμα 31). Στο ίδιο σχήμα απεικονίζονται και οι υπόλοιπες μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν κατά την διαδικασία σάρωσης των μεταλλαγμένων βιβλιοθηκών. Ωστόσο, η περαιτέρω ανάλυσή τους ή χρήση τους στα επόμενα στάδια *in vitro* DNA ανασυνδυασμού απορρίφθηκε λόγω των χαμηλών μεταβολών που επέφεραν στις υπό έλεγχο ιδιότητες. Οι τιμές για την αρχική ή την εναπομένουσα ενεργότητα μετά από θερμική επώαση, διέφεραν λιγότερο από 10% σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του ενζύμου αγρίου τύπου.



Σχήμα 31. Τρισδιάστατη δομή της ομοδιμερούς ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης TAB5. Οι μεταλλαγές εντοπίζονται γύρω από το ενεργό κέντρο. Τα μονομερή της TAB5AP για λόγους ευκρίνειας παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα (μπλε και μωβ). Ο διακεκομμένος κύκλος οριοθετεί το ενεργό κέντρο του ενός μονομερούς, οι γκρι-μπλε σφαίρες αντιστοιχούν σε ιόντα Zn^{2+} , οι μωβ σε ιόντα Mg^{2+} και οι καφέ στα μεταλλαγμένα κατάλοιπα. Με κόκκινο (θερμοσταθερές) ή μπλε (θερμοασταθείς) χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν αλλά δεν μελετήθηκαν περαιτέρω λόγω των μικρών μεταβολών που επέφεραν στις υπό έλεγχο ενζυμικές ιδιότητες

Το αμινοξικό κατάλοιπο στη θέση 42 βρίσκεται σε μια μικρή στροφή που συνδέεται με τη β-πτυχωτή επιφάνεια του ενεργού κέντρου. Τα αμινοξέα S86 και G87 τοποθετούνται μέσα σε μια μικρή α-έλικα (κατάλοιπα 84-93) που συμμετέχει μέσω των καταλοίπου S84 και του ζευγαριού D83-R148 στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Το κατάλοιπο H135 ανήκει στην σφαίρα συντονισμού του καταλυτικής σημασίας ιόντος Mg^{2+} και αποτέλεσε στόχο προηγούμενης μελέτης κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης της TAB5AP [121]. Το αμινοξύ G149 βρίσκεται μέσα σε μια στροφή που γειτονεύει με το υπεύθυνο για την πρόσδεση του υποστρώματος R148. Τέλος, το κατάλοιπο S338 βρίσκεται στην περιοχή διμερισμού και δίπλα στο αμινοξύ H337 που συμμετέχει στο συντονισμό του ιόντος Zn^{2+} .

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τρεις από τις έξι μεταλλαγές αφορούν αλλαγή καταλοίπου γλυκίνης (S42G, G87A και G149D), τονίζοντας την σημασία του συγκεκριμένου καταλοίπου στους μηχανισμούς προσαρμογής των ψυχρόφιλων ενζύμων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε μια εξελικτική στρατηγική αποτελούμενη από διαδικασίες τυχαίας μεταλλαξογένεσης, σάρωσης των τροποποιημένων ενζύμων και ανασυνδυασμού των επιλεγμένων μεταλλαγών. Σε ένα πρώτο κύκλο δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων κλώνων με τη χρήση του error prone PCR. Ο έλεγχος 13000 κλώνων οδήγησε στην επιλογή τριών θερμοσταθερών και τριών θερμοασταθών ενζύμων. Τρεις βιβλιοθήκες δημιουργήθηκαν μέσω *in vitro* ανασυνδυασμού των επιλεγμένων μεταλλαγών σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Από την σάρωση τους επιλέχθηκαν τρεις επιπλέον θερμοασταθείς κλώνοι. Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε πιθανό αθροιστικό αποτέλεσμα στην θερμοσταθερότητα λόγω της συνύπαρξης των μεταλλαγών S86A και G87A, σχεδιάσαμε το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο S86A/G87A μέσω κατάλληλων τεχνικών PCR.

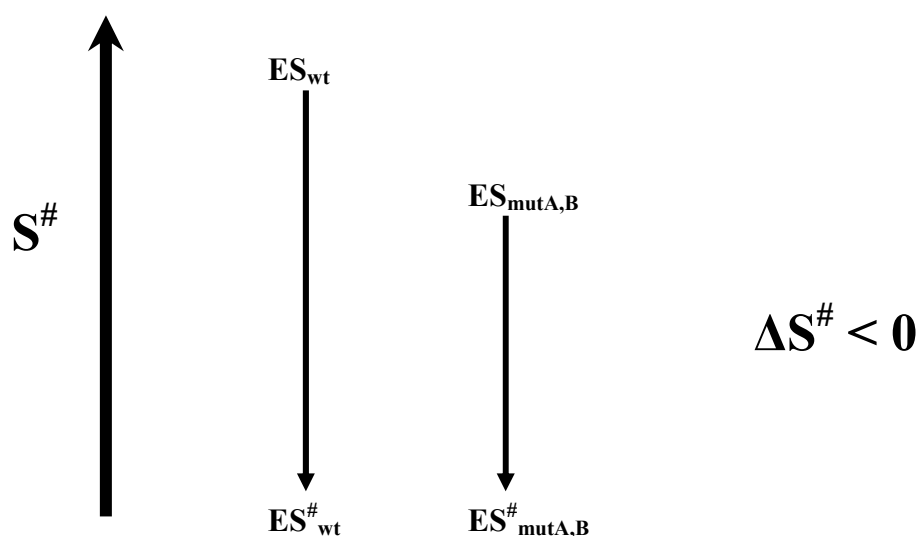
Ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η συνεισφορά της εντροπίας (ΔS^\ddagger) και της ενθαλπίας (ΔH^\ddagger) στην ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης (ΔG^\ddagger) υπολογίστηκαν για την αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες μορφές της (Πίνακας 6). Από την εξίσωση 2 διαπιστώνουμε τη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην παράμετρο k_{cat} και την ΔG^\ddagger και επομένως η παράμετρος $\Delta(\Delta G^\ddagger)_{wt-mut}$ αντικατοπτρίζει τη διαφορά των k_{cat} μεταξύ των συγκρινόμενων ενζύμων. Η αρνητική τιμή της $\Delta(\Delta G^\ddagger)_{wt-mut}$ αποκαλύπτει ότι το αγρίου τύπου ψυχρόφιλο ένζυμο είναι πιο ενεργό από τα περισσότερα τροποποιημένα ένζυμα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα ένζυμα H135E και H135E/G149D είναι οι μοναδικές περιπτώσεις που εμφανίζουν θετική τιμή για την παράμετρο $\Delta(\Delta G^\ddagger)_{wt-mut}$ άρα χαρακτηρίζονται και από υψηλότερες τιμές k_{cat} σε σχέση με το φυσικό ένζυμο.

Σύμφωνα με την εξίσωση 6, αύξηση της τιμής της k_{cat} μπορεί να επιτευχθεί ενθαλπικά μέσω μείωσης της ΔH^\ddagger και εντροπικά μέσω αύξησης της ΔS^\ddagger . Ο προσαρμοστικός μηχανισμός που συναντάται ως επί το πλείστον στα ψυχρόφιλα ένζυμα στην προσπάθεια για υψηλή ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες, πραγματοποιείται μέσω μείωσης της ΔH^\ddagger και κατ' επέκταση της ενέργειας

ενεργοποίησης (E_a). Ωστόσο το ένζυμο S86A αν και εμφανίζεται σταθεροποιημένο (υψηλότερες τιμές T_m) είναι το μοναδικό που όχι μόνο διατηρεί αλλά και ενισχύει τον ψυχροφιλικό χαρακτήρα της αντίδρασης (μείωση της ΔH^\ddagger και της E_a). Η χαμηλότερη ενεργότητα του σε σχέση με του αγρίου τύπου ένζυμου οφείλεται στην αύξηση της εντροπίας. Τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα ένζυμα (θερμοσταθερά και θερμοασταθή) εμφανίζονται να χάνουν τον ψυχροφιλικό τους χαρακτήρα. (αύξηση της ΔH^\ddagger και της E_a).

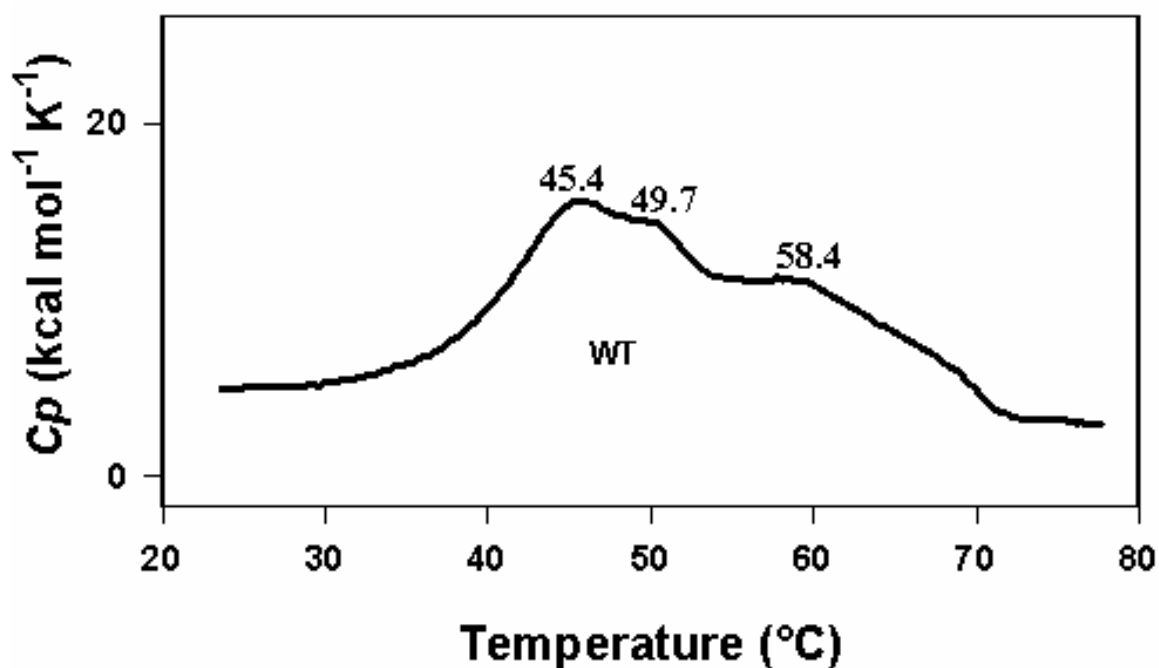
Οι αρνητικές τιμές της εντροπίας για το φυσικό ένζυμο και τις μεταλλαγμένες μορφές του υποδηλώνουν ότι το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ES^\ddagger της μεταβατικής κατάστασης είναι περισσότερο οργανωμένο σε σχέση με το αντίστοιχο σύμπλοκο της αρχικής κατάστασης (ground state) (Σχήμα 32). Τα ένζυμα με τις μεταλλαγές H135E και H135E/G149D αν και παρουσιάζουν αυξημένες τιμές της ΔH^\ddagger εμφανίζουν μεγαλύτερη ενεργότητα έναντι του φυσικού ενζύμου. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της ΔS^\ddagger . Υψηλότερη ΔS^\ddagger συνεπάγεται μείωση του αριθμού των διαμορφώσεων του συμπλόκου της αρχικής κατάστασης και μείωση της αρνητικής συνεισφοράς της παραμέτρου $\Delta(\Delta S^\ddagger)$ στον καθορισμό της k_{cat} .



Σχήμα 32. Σχηματική αναπαράσταση της παραμέτρου $\Delta(\Delta S^\ddagger)$. Στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5 (μεταλλαγμένου ή αγρίου τύπου), η μετάβαση από το σύμπλοκο ES στο σύμπλοκο ES^\ddagger γίνεται μέσω μείωσης της εντροπίας S^\ddagger και επομένως η παράμετρος ΔS^\ddagger έχει πάντοτε αρνητική τιμή. Τα ένζυμα με τις μεταλλαγές H135E και H135E/G149D (mutA, B) παρουσιάζουν αυξημένη τιμή της ΔS^\ddagger που συνεπάγεται μείωση του αριθμού των διαμορφώσεων του συμπλόκου ES και αύξηση της k_{cat} .

Δομική σταθερότητα

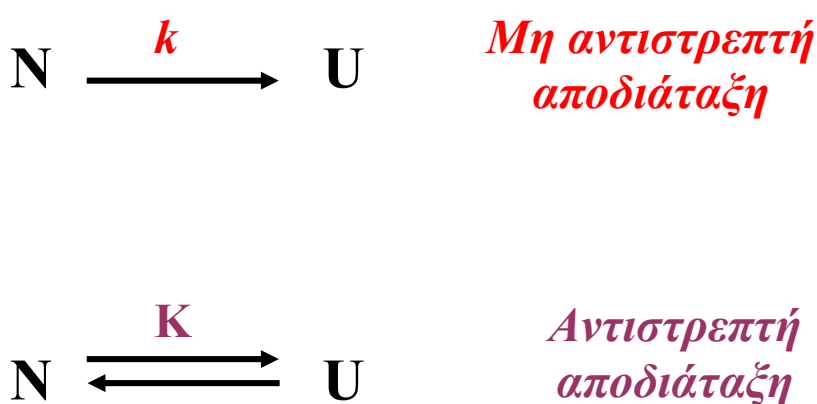
Η αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου εμφανίζει ένα πολύπλοκο θερμογράφημα όπως καταγράφεται κατά την θερμική της αποδιάταξη μέσω διαφορικής θερμιδομετρίας (Σχήμα 33). Η διαδικασία της αποδιάταξης ξεκινάει γύρω στους 35°C. Μία κύρια αποδιατακτική μεταβολή καταγράφεται στους 45.4°C και ακολουθείται από δύο καλά διακριτές μεταβολές που γίνονται στους 49.7°C και στους 58.4°C. Από την μέτρηση αυτή συμπεραίνουμε ότι αυτή η πρωτεΐνη περιέχει τουλάχιστον τρεις δομικές περιοχές που διαφέρουν ως προς την εσωτερική τους σταθερότητα.



Σχήμα 33. Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας για την αλκαλική φωσφατάση αγρίου τύπου.

Η διαδικασία αποδιάταξης ενός πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή (Σχήμα 34). Στην μη αντιστρεπτή αποδιάταξη η όλη διαδικασία χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό αποδιάταξης k και γι' αυτό η διαδικασία αυτή ονομάζεται και κινητικά ελεγχόμενη (kinetically driven). Στην αντιστρεπτή αποδιάταξη υπάρχει μια θερμοδυναμική ισορροπία ανάμεσα στην αποδιαταγμένη και

την μη αποδιαταγμένη μορφή του μορίου, που χαρακτηρίζεται από την αντίστοιχη σταθερά ισορροπίας K . Στη περίπτωση της APwt η διαδικασία αποδιάταξης είναι μη αντιστρεπτή και επομένως κινητικά καθοδηγούμενη. Το θερμογράφημα της APwt υποδηλώνει επομένως ότι το αποδιατακτικό μονοπάτι ανάμεσα στην μη αποδιαταγμένη και στην αποδιαταγμένη μορφή της περιλαμβάνει τρία ενδιάμεσα βήματα τα οποία διαφέρουν ως προς την κινητική της αποδιάταξης τους και την ανθεκτικότητά τους στην θερμική αποδιάταξη.



Σχήμα 34. Μη αντιστρεπτή και αντιστρεπτή αποδιάταξη πρωτεϊνών. Όπου N η μη αποδιαταγμένη, λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης (N, Native), U η αποδιαταγμένη μορφή (U, Unfolded), k ο ρυθμός αποδιάταξης και K η σταθερά ισορροπίας αποδιάταξης.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κάθε μεταλλαγή ή συνδυασμός τους χαρακτηρίζεται από διαφορετικό προφίλ αποδιάταξης (Σχήμα 30). Τα ένζυμα που εμφανίζονται με αυξημένη θερμοανθεκτικότητα της ενεργότητας χαρακτηρίζονται μέσω του DSC από αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης της πρώτης μεταβολής και εμφάνιση της δεύτερης μεταβολής σε ακόμη υψηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα, τα ένζυμα με μειωμένη θερμοανθεκτικότητα της ενεργότητας φαίνονται να έχουν χάσει τελείως τις ενδιάμεσες αποδιατακτικές μορφές γύρω από τους 60°C. Επιπλέον, τα θερμοσταθερά ένζυμα αποδιατάσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών με αποτέλεσμα την εμφάνιση πεπλατυσμένων μεταβολών και την

μειωμένη συνεργατικότητα της αποδιάταξης (αποδιάταξη με χαμηλούς ρυθμούς), ενώ τα θερμοασταθή ένζυμα παρουσιάζουν απότομες αποδιατακτικές μεταβολές που χαρακτηρίζονται από αυξημένη συνεργατικότητα της αποδιάταξης (αποδιάταξη με γοργούς ρυθμούς). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τις προσαρμογές των αποδιατακτικών διαδικασιών σύμφωνα με τις οποίες η σταθερότητα των θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών επέρχεται μέσω ενδιάμεσων αποδιατακτικών μεταβολών που μειώνουν τον ρυθμό αποδιάταξης (μειωμένη συνεργατικότητα της αποδιάταξης). Από την άλλη μεριά, οι θερμοασταθείς πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από πιο ομοιόμορφες αποδιατακτικές μεταβολές με αυξημένο ρυθμό αποδιάταξης (αυξημένη συνεργατικότητα της αποδιάταξης) [133].

Η θερμιδομετρική ενθαλπία (ΔH_{cal}) προκύπτει από την κανονικοποίηση της περιοχής κάτω από την μεταβολή του θερμογραφήματος και αντιστοιχεί στο σύνολο των ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων που διασπώνται κατά την θερμική αποδιάταξη. Τα θερμοσταθερά ένζυμα S86A, G87A και G149D δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες μεταβολές της θερμιδομετρικής ενθαλπίας (Πίνακας 7) και επομένως η σταθεροποίηση τους οφείλεται σε βελτίωση της κινητικής σταθερότητας (μείωση του ρυθμού αποδιάταξης) και όχι σε ενίσχυση της ενθαλπικής σταθερότητας. Ωστόσο, στη περίπτωση του μεταλλαγμένου ενζύμου S86A/G87A οι ενθαλπικές αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν στην ενίσχυση της σταθερότητας (αύξηση της ΔH_{cal}). Τέλος, όλα τα θερμοασταθή ένζυμα παρουσιάζουν μείωση της θερμιδομετρικής ενθαλπίας, επισημαίνοντας ότι στην περίπτωση τους ο κύριος παράγοντας της αποσταθεροποίησης τους είναι η ενθαλπική αποδυνάμωση των δομών τους.

Δομική ανάλυση των μεταλλαγών

Οι επιδράσεις των μεταλλαγών στην δομική σταθερότητα και στην ενεργότητα μπορούν να επιβεβαιωθούν με την δομική ανάλυση των μεταλλαγών χρησιμοποιώντας τις πολύτιμες πληροφορίες που μας προσφέρει η προσφάτως αναλυμένη τρισδιάστατη δομή της TAB5 AP αγρίου τύπου (Σχήμα 31).

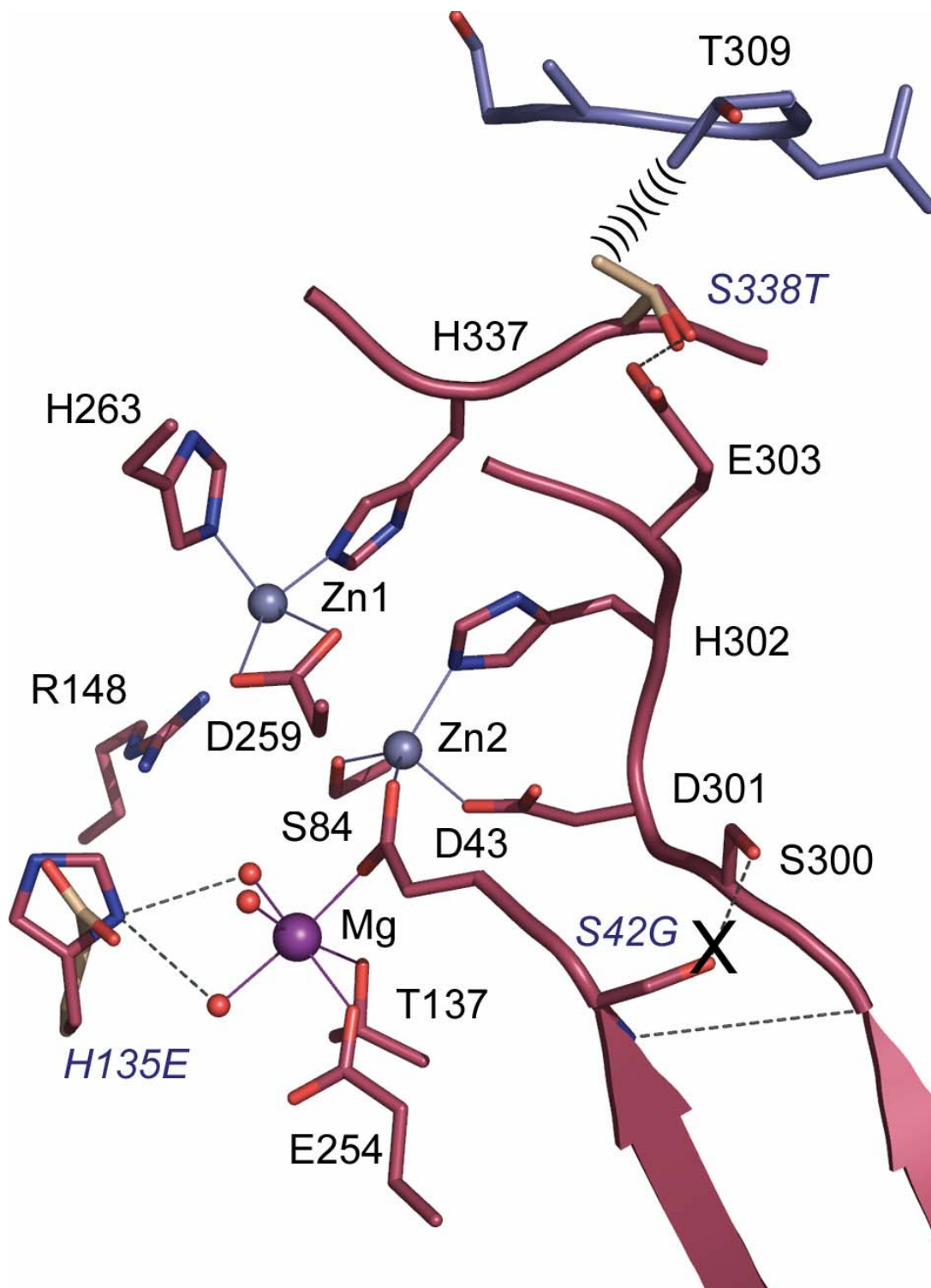
S42G – Στο ένζυμο αγρίου τύπου, το κατάλοιπο S42 προηγείται του D43 το οποίο (α) συμμετέχει στον συντονισμό του Mg^{2+} (M_3) και του Zn^{2+} (M_2) και (β)

εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο απέναντι από την καταλυτική σερίνη (S84) (Σχήμα 35). Η S42 σταθεροποιεί το άκρο ενός β κλώνου (β strand) μέσω αλληλεπίδρασης της πλευρικής της ομάδας με την S300 στον γειτονικό κλώνο, σταθεροποιώντας τις θέσεις των D43 και D301 που συμμετέχουν στον συντονισμό των μετάλλων του ενεργού κέντρου. Η μεταλλαγή S42G έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αυτής της αλληλεπίδρασης επηρεάζοντας την σταθερότητα πρόσδεσης των ιόντων Mg^{2+} (M_3) και Zn^{2+} (M_2). Η μείωση της ενεργότητας (Σχήμα 26), πιθανόν να αντικατοπτρίζει και τις επιμέρους επιδράσεις στην ενεργοποίηση της S84.

Η μεταλλαγή S42G οδηγεί σε ένα λιγότερο σταθερό ένζυμο σε σύγκριση με του αγρίου τύπου και στο DSC θερμογράφημα καταγράφονται μόνο δύο αποδιατακτικές μεταβολές εντοπισμένες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Σχήμα 30). Αυτή η αλλαγή μπορεί να απεικονίζει διαφορές στο σχηματισμό της κεντρικής β πτυχωτής επιφάνειας του ενζύμου. Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στον μεγάλο βαθμό ελευθερίας διαμορφώσεων της γλυκίνης αλλά και στην απώλεια του σταθεροποιητικού δεσμού υδρογόνου. Επιπλέον, η αποσταθεροποίηση του μεταλλαγμένου ενζύμου μπορεί να έχει προκύψει από την αποσταθεροποίηση της πρόσδεσης των μετάλλων του ενεργού κέντρου.

S338T – Η S338 εντοπίζεται στην επιφάνεια διμερισμού των δυο μονομερών που απαρτίζουν το λειτουργικό μόριο της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5 (Σχήμα 35). Η μεταλλαγή S338T πιθανόν να μην επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται στο φυσικό ένζυμο. Ωστόσο, η μετακίνηση της διακλαδωμένης πλευρικής αλυσίδας στην καλά πακεταρισμένη περιοχή διμερισμού, πιθανόν να αποσταθεροποιεί την H337 που συμμετέχει στον συντονισμό του Zn^{2+} (M_1). Αυτή η μεταβολή αντικατοπτρίζεται στην μειωμένη ΔH_{cal} του τροποποιημένου μορίου (Πίνακας 7). Επίσης η ενέργεια ενεργοποίησης έχει αυξηθεί περίπου 4 φορές, αποτέλεσμα που πιθανόν να προέρχεται από τις αλλαγές στον Zn^{2+} (M_2).

S42G/S338T – Στο ένζυμο S42G/S338T συνδυάστηκαν δυο αποσταθεροποιητικές μεταλλαγές με αποτέλεσμα να προκύψει ένας κλώνος με την χαμηλότερη ΔH_{cal} από τα ένζυμα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (Πίνακας 7). Παρόμοια με τις πρωτεΐνες S42G και S338T, το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο παρουσιάζει μειωμένη ενεργότητα και αυξημένη ενέργεια ενεργοποίησης συγκρινόμενο με το φυσικό (Πίνακας 6). Αυτό το παράδειγμα σε συνδυασμό με τα



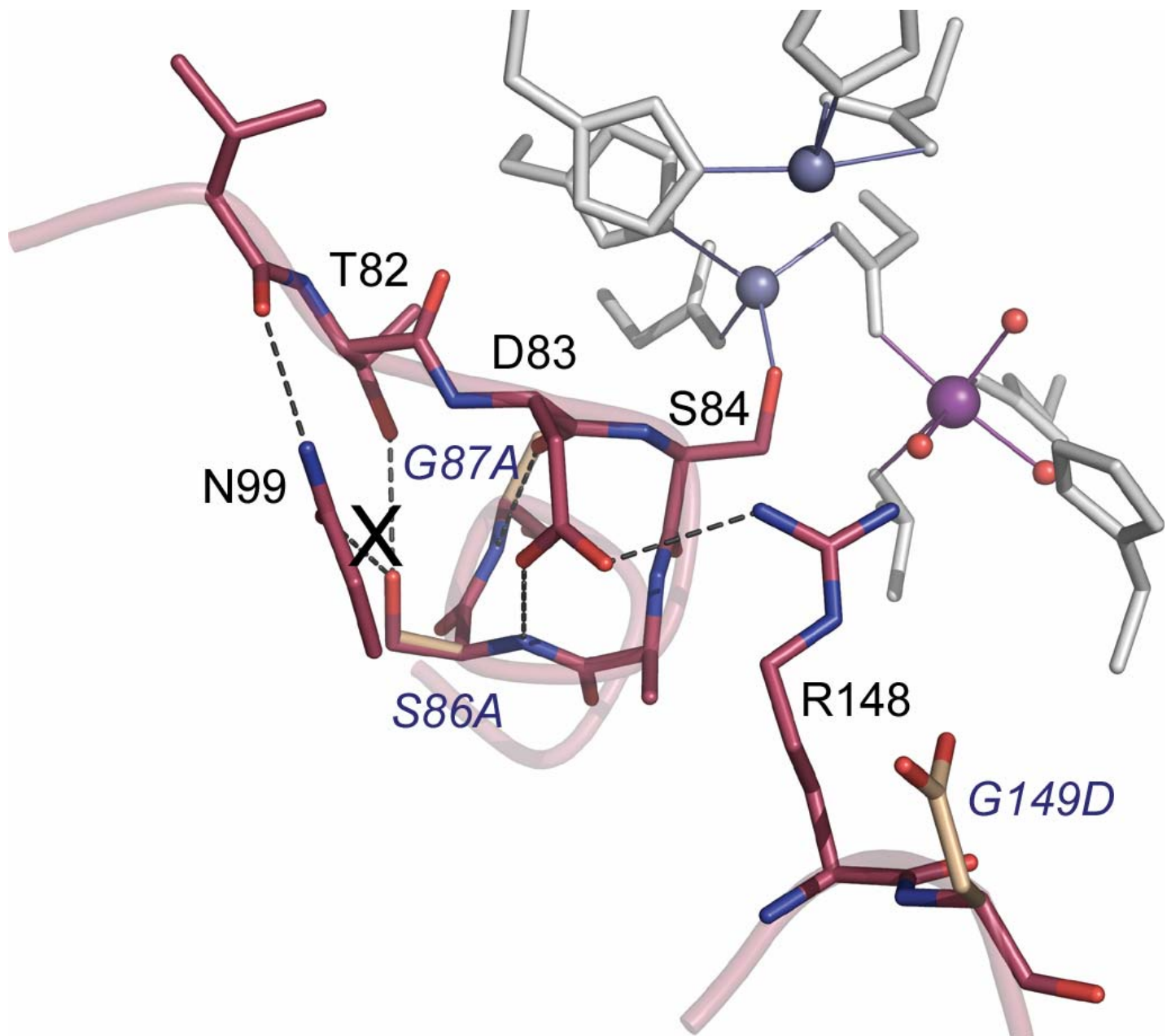
Σχήμα 35. Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών S338T, S42G και H135E στην δομή της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5. Τα χρώματα των μονομερών αντιστοιχούν σε εκείνα του Σχήματος 31. Τα άτομα αζώτου και οξυγόνου εμφανίζονται σε μπλε και κόκκινο, ενώ τα ιόντα Mg^{2+} και Zn^{2+} σε μοβ και γαλάζιο αντίστοιχα. Τέλος, οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τους δεσμούς υδρογόνου και οι ακέραιες τον συντονισμό των μετάλλων.

ένζυμα S42G, S338T και S42G/H135E μας επισημαίνει ότι η αποσταθεροποίηση μιας πρωτεΐνης δεν οδηγεί απαραίτητα σε ενίσχυση της ενεργότητας. Μια σειρά δομικών απαιτήσεων πρέπει να ικανοποιούνται για την διατήρηση υψηλής ενεργότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες.

S86A, G87A και S86A/G87A – Η πυρηνόφιλη S84 του ενεργού κέντρου προηγείται μιας α -έλικας που περιλαμβάνει τα αμινοξέα S86 και G87 (Σχήμα 36). Οι επιπτώσεις αυτών των μεταλλαγών μπορούν να θεωρηθούν αποτέλεσμα της διαφορετικής χωροταξικής θέσης που λαμβάνει σε κάθε περίπτωση η καταλυτική S84. Η πλευρική ομάδα της S86 συγκρατεί την στροφή που περιέχει την καταλυτική σερίνη μέσω αλληλεπιδράσεων με την T82 και την N99. Επιπλέον, λόγω της αλληλεπίδρασης της G87 με το D83 πιθανόν να επηρεάζεται η ευκαμψία ενός ακόμη πολύ βασικού καταλοίπου του ενεργού κέντρου, μιας και η πλευρική αλυσίδα του D83 σταθεροποιεί την R148, η οποία αλληλεπιδρά με τον φώσφορο κατά την διάρκεια της κατάλυσης (Σχήμα 35).

Τα ένζυμα με τις μεταλλαγές S86A, G87A και S86A/G87A είναι πιο σταθερά από του αγρίου τύπου, ενώ το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο είναι το πιο θερμοσταθερό απ' όλα τα ένζυμα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι δύο αντικαταστάσεις σε αλανίνη εξασθενούν τις αλληλεπιδράσεις της πλευρικής αλυσίδας της S86 και επηρεάζουν την ευκαμψία της G87. Και οι δύο μεταλλαγές εφαρμόζουν στην δομή χωρίς καμία δομική παρεμπόδιση. Η μεταλλαγή S86A εισάγει ένα ελαφρώς περισσότερο υδρόφοβο κατάλοιπο και η πλευρική αλυσίδα στην μεταλλαγή G87A είναι πιθανόν να εφαρμόζεται στη δομή μέσω αντικατάστασης γειτονικών μορίων νερού. Η μεταλλαγή G87A μέσω σταθεροποίησης της βέλτιστης γεωμετρίας της στροφής της α -έλικας συνεισφέρει στην δομική σταθεροποίηση του ενζύμου.

Οι τιμές της E_a για τα ένζυμα G87A και S86A/G87A είναι υψηλότερες από του φυσικού ενζύμου (Πίνακας 6). Επίσης η δομική σταθερότητα και η ενζυμική ενεργότητα τους έχουν περισσότερο μεσοφιλικό χαρακτήρα. Αντίθετα το ένζυμο S86A φέρεται να διατηρεί τον ψυχροφιλικό του χαρακτήρα όπως παρουσιάζεται από την μειωμένη τιμή της E_a (Πίνακας 6). Επιπρόσθετα, το ένζυμο S86A είναι πιο ενεργό από τα ένζυμα G87A και S86A/G87A και εμφανίζει παραπλήσιες τιμές της k_{cat} με του αγρίου τύπου (Σχήμα 26). Η μεταλλαγή S86A είναι ένα ενδιαφέρον παράδειγμα σημειακής μεταλλαγής που επιφέρει αύξηση της σταθερότητας και παράλληλη διατήρηση του ψυχροφιλικού χαρακτήρα της πρωτεΐνης.



Σχήμα 36. Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών G149D, S86A και G87A στην δομή της αλκαλικής φωσφατάσης TAB5. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε εκείνα του Σχήματος 35. Το ενεργό κέντρο εμφανίζεται λευκό.

Αν και η μεταλλαγή G87A εφαρμόζει στην δομή χωρίς καμία δομική παρεμπόδιση, η σταθεροποίηση της στροφής της α -έλικας οδηγεί σε μείωση της καταλυτικής ενεργότητας. (Σχήμα 26). Το αμινοξύ G87 πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή της ενζυμικής ενεργότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σύγκριση της αλληλουχίας της TAB5AP με ομόλογα ένζυμα μεσόφιλης ή θερμόφιλης προέλευσης ενισχύει την παραπάνω υπόθεση (Σχήμα 37). Αξιοσημείωτο είναι ότι το αντίστοιχο κατάλοιπο G87 σε μια σειρά θερμόφιλων αλκαλικών φωσφατάσων (*Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi*) είναι αλανίνη.

Tab5	70	GLIKTSSSREDVTD	SASG	ATAFSCG	IKTYNA	AAI
<i>Escherichia coli</i>	88	ALNKKKTGKPDYVTD	SAA	SATAMST	GVKTYNG	AL
Human placental (Homo sapiens)	78	ALSKTYNVDKHVPD	S	GATATAYLC	GVKGNFQ	TI
<i>Thermotoga maritima</i>	57	GLVKTHSANSWVTD	S	AAAAGTALAS	GFKTNNG	MI
<i>Thermus thermophilus</i>	81	GLINTYSLTSYVTE	S	AAAGNAFSC	GVKTYVNG	GL
<i>Pyrococcus furiosus</i>	65	GFELTESLSGEVTD	S	AAAAGTATAT	GVKTYNRM	I
<i>Pyrococcus abyssi</i>	65	GIELTDSLSGEVTD	S	AAAAGTATAT	GVKTYNRM	I

Σχήμα 37. Στοιχίση της αμινοξικής αλληλουχίας της TAB5AP με άλλες αλκαλικές φωσφατάσες μεσόφιλης ή θερμόφιλης προέλευσης. Με μαύρο χρώμα σημειώνονται τα όμοια αμινοξέα, ενώ με γκρι οι περιοχές που η συντήρηση δεν είναι πλήρης. Με κόκκινο εμφανίζεται η καταλυτική Ser και με μπλε το κατάλοιπο G87 της TAB5AP.

H135E – Η H135 εμπλέκεται στην πρόσδεση του Mg^{2+} στο ενεργό κέντρο της ψυχρόφιλης φωσφατάσης TAB5 (Σχήμα 35). Αυτό το αμινοξύ παρουσιάζει τις περισσότερες μεταβολές σε σχέση με τα υπόλοιπα συντηρημένα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου των διαφόρων φωσφατάσων. Στην ECAP είναι ασπαρτικό (D153), ενώ στα θηλαστικά και σε διάφορα βακτήρια είναι ιστιδίνη. Αν και η H135 δεν συμμετέχει άμεσα στον συντονισμό του Mg^{2+} στη δομή της TAB5AP, έχει προταθεί η συμμετοχή της στον καθορισμό του τύπου του μεταλλικού ιόντος στη θέση M_3 . Σε προγενέστερη εργασία η μεταλλαγή H135D στην TAB5AP είχε ως αποτέλεσμα ένα ένζυμο με μειωμένη ενεργότητα και αυξημένη θερμοσταθερότητα [121]. Ωστόσο μεταλλαγή του συγκεκριμένου καταλοίπου στο πιο επιμηκυμένο γλουταμικό,

αποσταθεροποιεί το ένζυμο και ενισχύει την ενεργότητά του. Η μεταλλαγή D153E στην ECAP ενίσχυσε την καταλυτική του ενεργότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+} αλλά μείωσε την συγγένεια ως προς το συγκεκριμένο ιόν [134]. Στην ψυχρόφιλη φωσφατάση η μεταλλαγή H135E επιφέρει παρόμοιες συνέπειες: διαφοροποίηση της δομής της θέσης πρόσδεσης μετάλλου M_3 και ασθενέστερη πρόσδεση του ιόντος Mg^{2+} οδηγώντας σε αύξηση της K_m (Σχήμα 27) και της k_{cat} (Σχήμα 26).

Το ένζυμο με την μεταλλαγή H135E εμφανίζεται ενθαλπικά αποσταθεροποιημένο με μειωμένη ΔH_{cal} και με μια μόνο αποδιατακτική μεταβολή στο DSC θερμογράφημα του, ενώ το φυσικό ένζυμο εμφανίζει τρεις (Σχήμα 30). Αν και το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει αυξημένες τιμές της k_{cat} σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που μελετήθηκε, η ενέργεια ενεργοποίησης παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένη παρουσιάζοντας περισσότερο μεσόφιλο χαρακτήρα (Πίνακας 6). Επομένως, το κατάλοιπο αυτό φαίνεται να επηρεάζει την συγγένεια της θέσης M_3 για μεταλλικά ιόντα και παράλληλα τον ψυχροφιλικό χαρακτήρα της κατάλυσης.

G149D – Η G149 επηρεάζει την ευκαμψία της R148 και ενδεχομένως να επηρεάζει την σταθερότητα της στερεοδιαμόρφωσης του υποστρώματος κατά την διάρκεια της κατάλυσης (Σχήμα 36). Στο ένζυμο με την μεταλλαγή G149D παρατηρείται αύξηση της ενέργειας ενεργοποίησης, της δομικής σταθερότητας και της θερμοανθεκτικότητας της ενεργότητας. Το κατάλοιπο στη θέση 149 εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης και επομένως το μεταλλαγμένο ασπαρτικό δεν αντιμετωπίζει καμία δομική παρεμπόδιση. Η μεταλλαγή G149D περιορίζει τις κινήσεις της στροφής που περιλαμβάνει την R148, έτσι ώστε η R148 να μην μπορεί να προσαρμόζεται στις δομικές αλλαγές του ενεργού κέντρου κατά την διάρκεια της κατάλυσης καταλήγοντας σε ένα σε λιγότερο ενεργό ένζυμο.

H135E/G149D – Το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο H135E/G149D παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές για τις παραμέτρους k_{cat} και K_m (Σχήματα 26 και 27). Σε αυτό το ένζυμο η επίδραση της μεταλλαγής G149D στην R148 αντιστρέφεται και το ενεργό κέντρο προσαρμόζεται πλέον σε διαμορφώσεις κατάλληλες για την σχηματισμό των ενδιάμεσων της κατάλυσης. Αυτή η μεταβολή πιθανόν να ευθύνεται και για την αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου H135E/G149D έναντι του ενζύμου H135E.

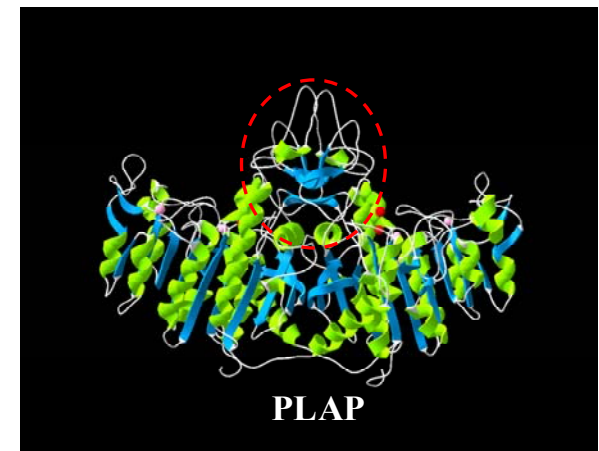
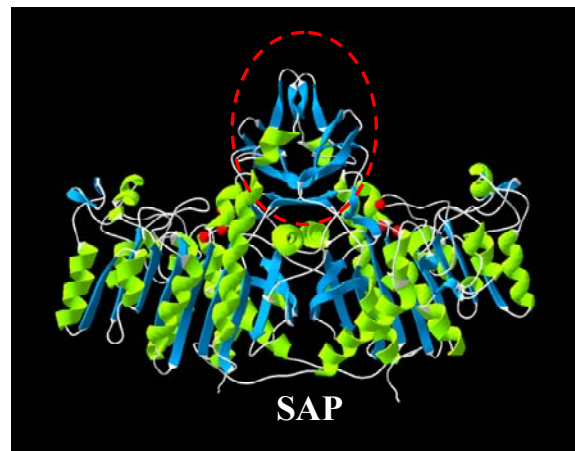
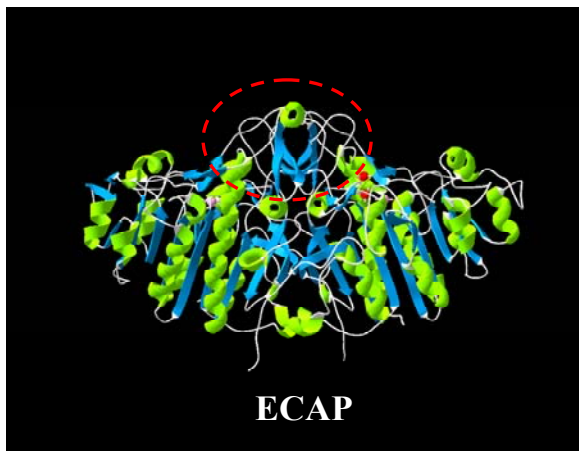
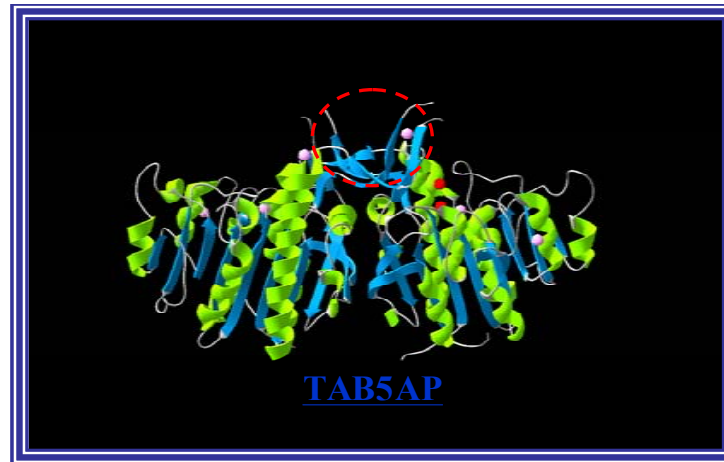
Συγκρίνοντας τα ένζυμα H135E/G149D και H135E με του αγρίου τύπου, συμπεραίνουμε ότι η σχέση ενζυμικής ενεργότητας-δομικής σταθερότητας είναι αντιστρόφως ανάλογη (αύξηση της ενεργότητας, μείωση της σταθερότητας). Ωστόσο, σύγκριση των δύο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών μεταξύ τους αποκαλύπτει ότι η εισαγωγή της σταθεροποιητικής μεταλλαγής G149D στο ένζυμο H135E οδηγεί σε ταυτόχρονη αύξηση της σταθερότητας (Πίνακας 7) και της ενεργότητας (Σχήμα 26). Αυτή η παρατήρηση μας επισημαίνει ότι η σχέση μεταξύ αυτών των δύο ιδιοτήτων μπορεί να τροποποιηθεί με μικρές αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία. Επίσης, έρχεται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες [27, 135], όπου αποδεικνύεται ότι η ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και η θερμοσταθερότητα μπορούν να βελτιωθούν παράλληλα σε αντίθεση με τα ένζυμα που έχουν προκύψει μέσω των διαδικασιών της φυσικής εξέλιξης. Επομένως η κατευθυνόμενη εξέλιξη καθίσταται μια πανίσχυρη τεχνική για την ανακάλυψη των φυσικοχημικών ορίων των διαφόρων πρωτεϊνικών δομών δίχως να λαμβάνει υπόψη τις βιολογικές και περιβαλλοντικές επιρροές.

S42G/H135E – Το ένζυμο S42G/H135E εμφανίζει πανομοιότυπο DSC θερμογράφημα με το ένζυμο H135E με την T_m να είναι μετατοπισμένη σε χαμηλότερη θερμοκρασία και παράλληλα μειωμένη ΔH_{cal} (Πίνακας 7 και Σχήμα 30). Και οι δύο μεταλλαγές επηρεάζουν έμμεσα τον συντονισμό των μετάλλων του ενεργού κέντρου (Σχήμα 35). Ωστόσο η k_{cat} εμφανίζεται ιδιαίτερα μειωμένη σε σύγκριση με τα άλλα δύο ένζυμα που φέρουν την μεταλλαγή H135E, κάνοντας εμφανή τον σημαντικό ρόλο που έχει η σταθεροποίηση του ενεργού κέντρου από τα μεταλλικά ιόντα στη διαδικασία της κατάλυσης.

Ανάλυση της δομής της ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης

TAB5

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και σε συνεργασία με την διδακτορική φοιτήτρια Ellen Wang μέλος της ερευνητικής ομάδας του Dr. Edward Hough στο Πανεπιστήμιο του Tromsø και της ερευνητικής ομάδας της Dr. Pirkko Heikinheimo στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι, λύθηκε η δομή της TAB5AP. Αυτή είναι η πρώτη δομή ψυχρόφιλης αλκαλικής φωσφατάσης βακτηριακής προέλευσης. Αν και το διμερές της TAB5AP αποτελείται από περίπου 200 αμινοξέα λιγότερα σε σχέση με την αντίστοιχη από ανθρώπινο πλακούντα (PLAP) [104], διατηρεί τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν η PLAP, η SAP (αρκτική γαρίδα) [105] και η ECAP. 18 παράλληλα και αντιπαράλληλα β-πεδία στο κέντρο της TAB5AP περιβάλλονται από α-έλικες διαφόρων μεγεθών. Η κύρια διαφορά της TAB5AP με τις άλλες AP δομές είναι η σχεδόν πλήρης έλλειψη της δομής στέμματος (crown domain) (Σχήμα 38). Στην περίπτωση της TAB5AP η δομή στέμματος σχηματίζεται από μια μικρή εύκαμπτη λούπα (αμινοξέα 305-335) από το κάθε μονομερές. Επίσης, η TAB5AP παρουσιάζει δύο επιπλέον ιόντα Mg^{2+} ανά μονομερές εντοπισμένα εκτός της περιοχής του ενεργού κέντρου (Σχήμα 38).



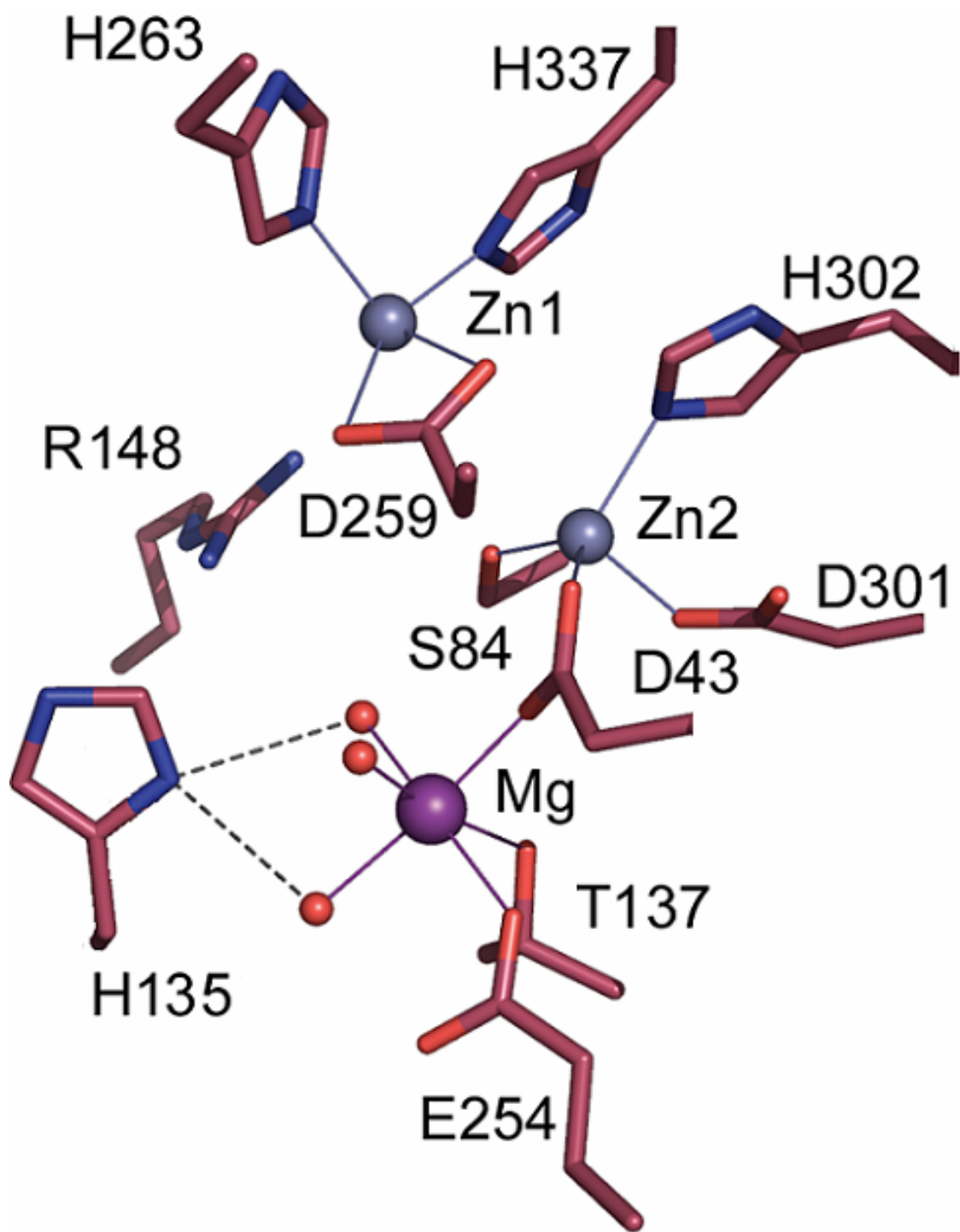
Σχήμα 38. Αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της αλκαλικής φωσφατάσης από το βακτήριο *Escherichia coli* (ECAP), την αρκτική γαρίδα *Pandalus borealis* (SAP), ανθρώπινο πλακούντα (PLAP) και το ανταρκτικό βακτηριακό στέλεχος TAB5. Ο διακεκομμένος κύκλος οριοθετεί τη δομή στέμματος, οι κόκκινες σφαίρες αντιστοιχούν σε ιόντα Zn^{2+} και οι ροζ σε ιόντα Mg^{2+} .

Δομική ανάλυση του ενεργού κέντρου της TAB5AP και σύγκριση με τις ήδη γνωστές αλκαλικές φωσφατάσες

Η γεωμετρία του ενεργού κέντρου της TAB5AP καθώς και η αμινοξική του σύσταση είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό συντηρημένη (Πίνακας 8 και 9). Στον Πίνακα 9 γίνεται εμφανής αυτή η ομοιότητα με την στοίχιση των αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου της TAB5AP και του ρόλου που παίζουν με τα αντίστοιχα της εκτεταμένα μελετημένης ECAP. Το ενεργό κέντρο κάθε μονομερούς περιέχει τρεις θέσεις πρόσδεσης μετάλλων M₁, M₂ και M₃ (Σχήμα 39).

Θέση πρόσδεσης μετάλλου	TAB5AP	SAP	PLAP	ECAP
M₁ (Zn²⁺)	Asp259 His263 His337	Asp315 His319 His432	Asp316 His320 His432	Asp327 His331 His412
M₂ (Zn²⁺)	Asp43 Ser84 Asp301 His302	Asp37 Ser86 Asp356 His357	Asp42 Ser92 Asp357 His358	Asp51 Ser102 Asp369 His370
M₃ (Mg²⁺/Zn²⁺)	Asp43 <u>His135</u> <u>Thr137</u> Glu254	Asp37 <u>His149</u> <u>Thr151</u> Glu310	Asp42 <u>His153</u> <u>Ser155</u> Glu311	Asp51 <u>Asp153</u> <u>Thr155</u> Glu322

Πίνακας 8. Αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση των μετάλλων του ενεργού κέντρου. Υπογραμμισμένα εμφανίζονται τα αμινοξέα όπου παρατηρούνται διαφορές.



Σχήμα 39. Το ενεργό κέντρο της TAB5AP.

ECAP	TAB5AP	ΡΟΛΟΣ
ASP51	ASP43	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Αλληλεπίδραση με M ₃ και M ₂
SER102	SER84	Καταλυτική σερίνη
ASP153	HIS135	Αλληλεπίδραση με φωσφορικό και Mg
THR155	THR137	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Αλληλεπίδραση με M ₃
ARG166	ARG148	Αλληλεπίδραση με φωσφορικό
GLU322	GLU254	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Αλληλεπίδραση με M ₃
ASP327	ASP259	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Συντονισμός του M ₁
LYS328	TRP260	Αλληλεπίδραση με φωσφορικό μέσω ενός μορίου νερού.
HIS331	HIS263	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Συντονισμός του M ₁
ASP369	ASP301	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Συντονισμός του M ₂
HIS370	HIS302	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Συντονισμός του M ₂
HIS412	HIS337	Συμμετέχει στη δέσμευση των μετάλλων. Συντονισμός του M ₁

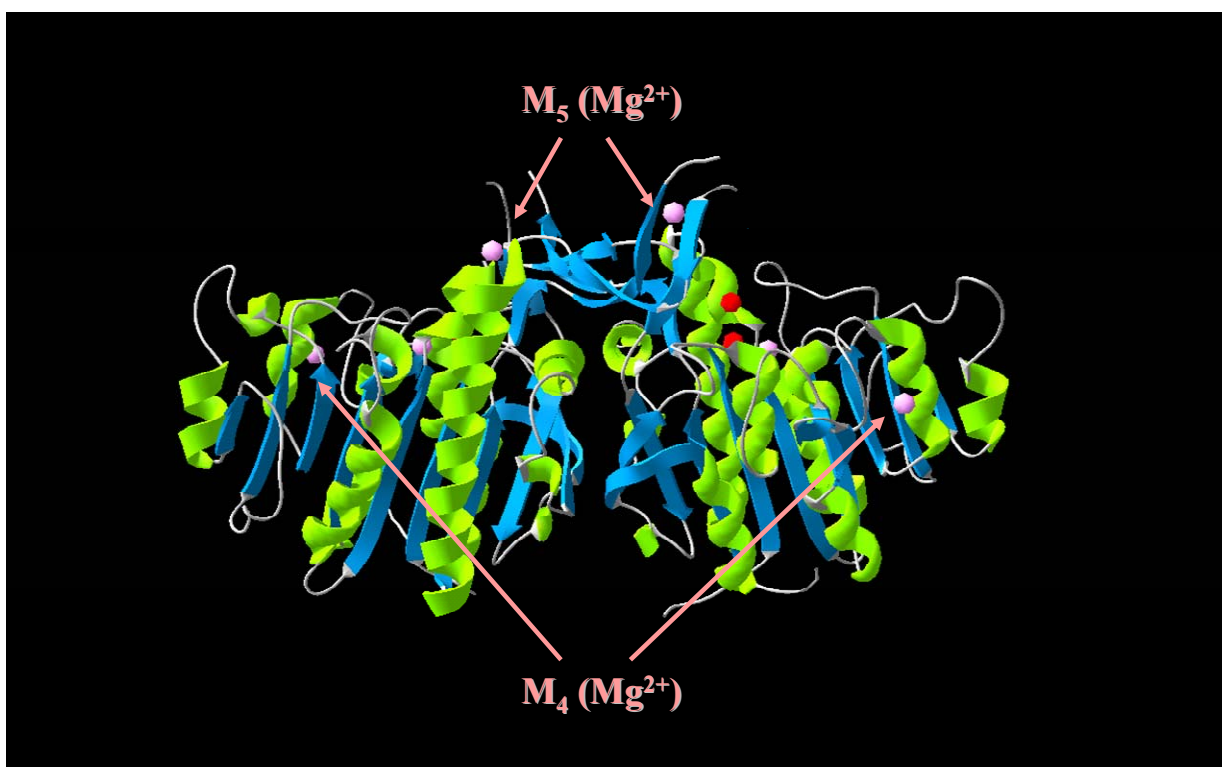
Πίνακας 9. Στοιχίση των αντίστοιχων αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου της TAB5AP με της ECAP.

Τα κατάλοιπα His263, His337 Asp259 παίζουν ρόλο στον συντονισμό του Zn²⁺ στη θέση M₁. Τα κατάλοιπα His302, Asp43, Asp301, Ser84 συντονίζουν το ιόν Zn²⁺ στη θέση M₂ ενώ τέλος τα κατάλοιπα Asp43, Glu254, Thr137 σε συνδυασμό με τρία μόρια νερού σχηματίζουν τη σφαίρα συντονισμού στη θέση M₃ που καταλαμβάνεται από το ιόν Mg²⁺ (Σχήμα 38).

Παρόμοια με την PLAP και την SAP, η TAB5AP έχει His στη θέση 135. Στην ECAP αυτή η θέση καταλαμβάνεται από Asp (D153). Στην TAB5AP η H135 απέχει 2.9Å από τα δύο μόρια νερού που συμμετέχουν στη σφαίρα συντονισμού του ιόντος Mg²⁺ και στρέφεται ταυτόχρονα προς την Arg148. Το δεύτερο αμινοξικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου που συνήθως διαφέρει μεταξύ των αλκαλικών φωσφατασών

είναι η Trp260 (Lys328 στην ECAP). Μέσω ενός μορίου νερού η Trp260 αλληλεπιδρά: α) με το φώσφορο του εκάστοτε υποστρώματος και β) με τα μόρια νερού που συμμετέχουν στη σφαίρα συντονισμού του ιόντος Mg^{2+} .

Τέλος, η Arg148 στρέφεται και αλληλεπιδρά με το φώσφορο του υποστρώματος. Η θέση της Arg148 σταθεροποιείται από την Asp83 (Σχήμα 39).

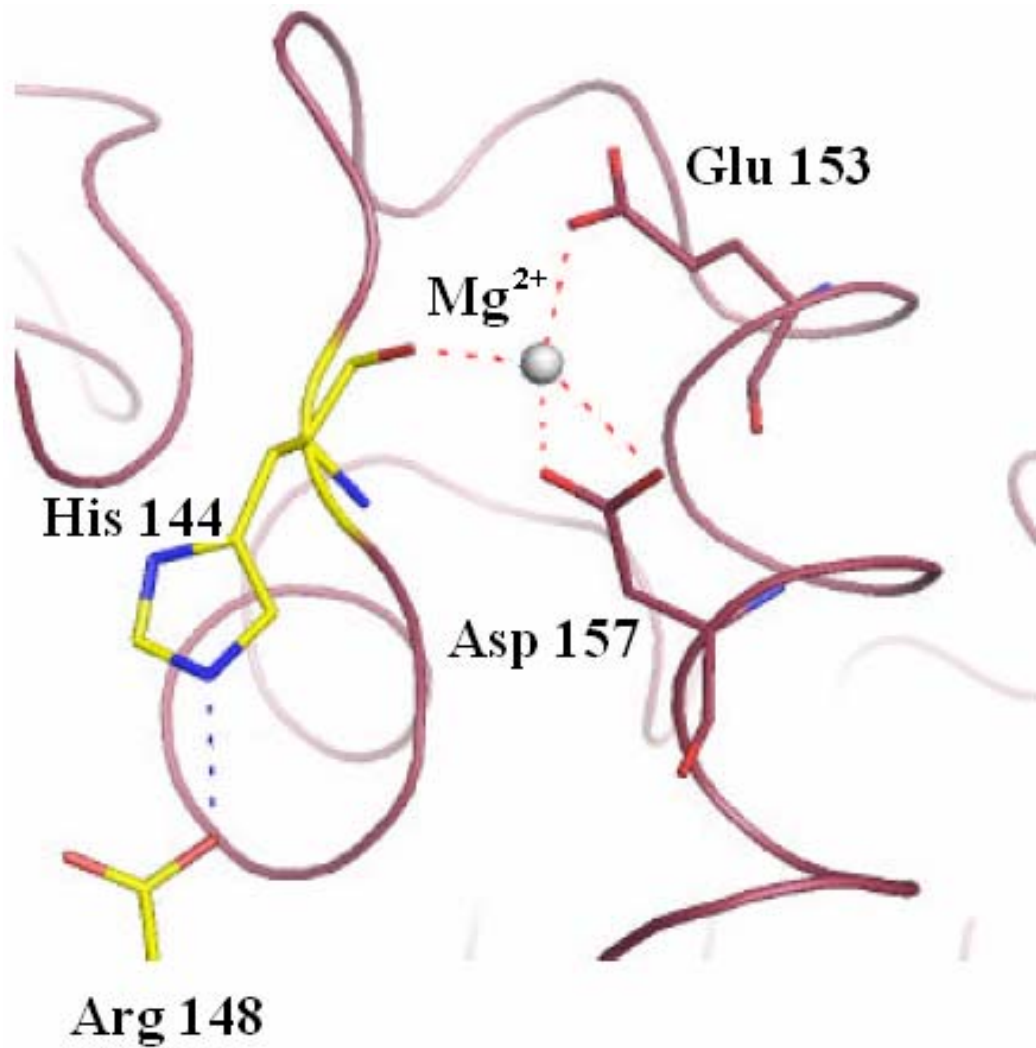


Σχήμα 40. Οι δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης μετάλλων στην TAB5AP.

Δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης μετάλλων στην TAB5AP

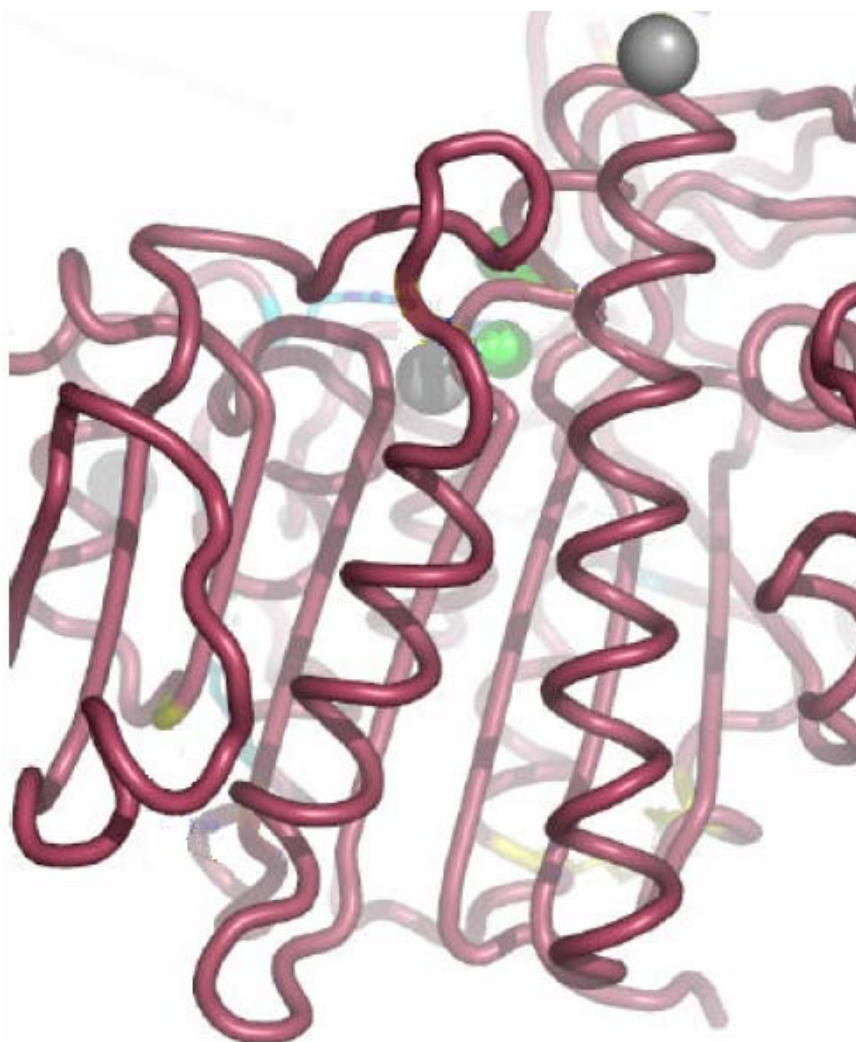
Κάθε μονομερές της TAB5AP εμφανίζει δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης μετάλλων (M₄ και M₅). Παρατηρώντας την δομή οι θέσεις αυτές εντοπίζονται στις περιοχές των α -ελικών που περιβάλλουν τα κεντρικά τοποθετημένα β -πεδία (Σχήμα 40). Τα κατάλοιπα His144, Glu153, Asp157 και τρία μόρια νερού συντονίζουν το ιόν

Mg^{2+} στη θέση M_4 . Ο πιθανός ρόλος της θέσης M_4 είναι η σταθεροποίηση της α -έλικας 151-160 και της Arg148 (Σχήμα 41).



Σχήμα 41. Η M_4 θέση πρόσδεσης Mg^{2+} στην TAB5AP.

Η θέση πρόσδεσης M_5 σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Ser268 και Asn266 και κατάλληλα γεωμετρικά διατεταγμένα μόρια νερού (Σχήμα 42). Αυτή η θέση πρόσδεσης εντοπίζεται στο θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο μίας α -έλικας. Αυτή η έλικα συμμετέχει στο σχηματισμό ενός μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα με μια δεύτερη α -έλικα που περιέχει αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για την πρόσδεση των μετάλλων του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Glu254, Asp259 και His263) και τα κατάλοιπα Trp260, Gly261 και Gly262 που αποτέλεσαν στόχο μεταλλαξογένεσης σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες [121, 122]. Η ύπαρξη της θέσης M_5 πιθανόν να συνδέεται με την σταθεροποίηση της συγκεκριμένης αυτής περιοχής και την διατήρηση του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα.



Σχήμα 42. Η M_5 θέση πρόσδεσης Mg^{2+} στην TAB5AP.

Δομικοί παράγοντες καθορισμού του ψυχρόφιλου χαρακτήρα της TAB5AP

Στην προσπάθεια ταυτοποίησης των δομικών στοιχείων που επηρεάζουν την ψυχροφιλικότητα της TAB5AP μελετήσαμε την επίδραση της επιφάνειας διμερισμού, της προσβασιμότητας και του φορτίου της εξωτερικής επιφάνειας και των σταθεροποιητικών αλληλεπιδράσεων στη δομή της TAB5AP συγκρίνοντας παράλληλα με τις άλλες δομές αλκαλικών φωσφατασών.

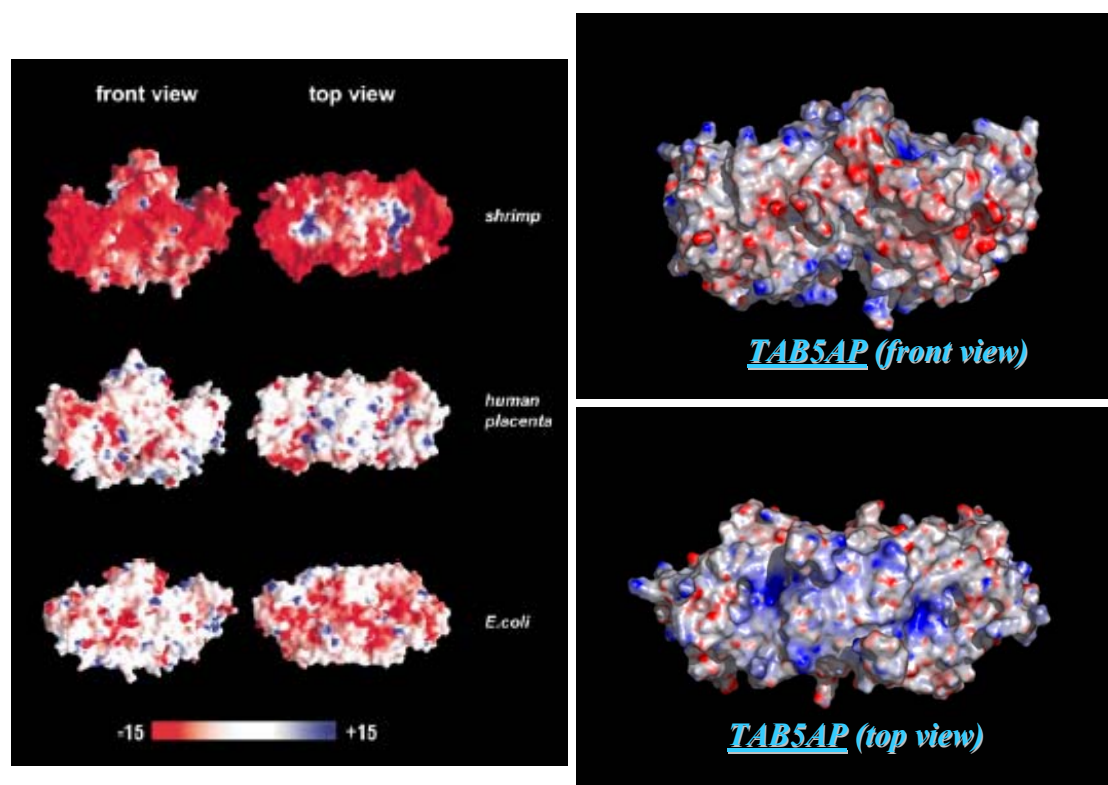
Επιφάνεια διμερισμού-Η επιφάνεια διμερισμού στην TAB5AP είναι η μικρότερη σε σύγκριση με τις άλλες τρεις δομές. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην έλλειψη της δομής στέμματος. Εκτός από μικρότερη εμφανίζεται λιγότερο σταθεροποιημένη και με μεγαλύτερους ενδιάμεσους κενούς χώρους μιας και στην συγκρότηση της συμμετέχουν μόνο δεσμοί υδρογόνου, ενώ απουσιάζει οποιοδήποτε άλλο είδος σταθεροποιητικής αλληλεπίδρασης που εντοπίζεται στις υπόλοιπες αλκαλικές φωσφατάσες. Η αποσταθεροποιημένη επιφάνεια διμερισμού της TAB5AP είναι ένας πιθανός παράγοντας αύξησης της ευκαμψίας του ενζύμου και ένας από τους μηχανισμούς που καθορίζει την προσαρμογή του σε χαμηλές θερμοκρασίες (Πίνακας 10).

Ανάλυση του διμερούς	TAB5AP	ECAP	PLAP	SAP
Αριθμός αμινοξέων	689	898	962	952
Ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις	18	38	44	44
Ανάλυση της επιφάνειας διμερισμού				
Αμινοξικά κατάλοιπα επιφάνειας διμερισμού /Μονομερές	51	103	121	120
Δεσμοί άλατος	0	8	6	8
Δεσμοί υδρογόνου (μεταξύ πλευρικών αλυσίδων)	26 (6)	58 (24)	30 (10)	54 (17)

Πίνακας 10. Δομική ανάλυση των σταθεροποιητικών δεσμών στις κρυσταλλογραφικά αναλυμένες δομές αλκαλικών φωσφατασών.

Εξωτερική επιφάνεια-Η προσβάσιμη επιφάνεια της TAB5AP είναι μικρότερη σε σύγκριση με της ECAP. Ωστόσο αυτό οφείλεται στο ότι η TAB5AP είναι μικρότερη ως πρωτεΐνη από την ECAP. Αν υπολογίσουμε όμως την αναλογία "προσβάσιμη επιφάνεια/επιφάνεια ατόμου" τότε διαπιστώνουμε ότι η TAB5AP κατά μέσο όρο εμφανίζεται πιο προσβάσιμη στο υδατοδιαλυτό της περιβάλλον. Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται με το γεγονός ότι η TAB5AP είναι λιγότερο ισχυρά πακεταρισμένη από την ECAP, που αποτελεί ένα ακόμη στοιχείο του ψυχρόφιλου χαρακτήρα της.

Στην περίπτωση της SAP η ιδιαίτερα αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της προτάθηκε ως ένας πιθανός μηχανισμός της προσαρμογής της σε χαμηλές θερμοκρασίες [105]. Αν και η TAB5AP είναι και αυτή ψυχρόφιλη εμφανίζει μια σχεδόν ουδέτερα φορτισμένη επιφάνεια. Ωστόσο παρουσία των μετάλλων, τα ενεργά κέντρα φορτίζονται θετικά ώστε να μπορούν να προσδέσουν με μεγαλύτερη ευκολία τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των υποστρωμάτων (Σχήμα 43).



Σχήμα 43. Χρωματική απεικόνιση του φορτιού της εξωτερικής επιφάνειας των κρυσταλλογραφικά αναλυμένων αλκαλικών φωσφατασών.

Σταθεροποιητικές αλληλεπιδράσεις-Μια συχνή διαφορά ανάμεσα στις ψυχρόφιλες και τις μεσόφιλες πρωτεΐνες είναι στον αριθμό των συνολικών σταθεροποιητικών αλληλεπιδράσεων. Αυτό φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της TAB5AP. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην μεσόφιλη ECAP παρατηρούνται 15 ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις ανά μονομερές και 8 επιπλέον στην επιφάνεια διμερισμού, δηλαδή 38 ανά διμερές του συγκεκριμένου ενζύμου. Από την άλλη η ψυχρόφιλη TAB5AP εμφανίζει συνολικά μόλις 18 ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 10).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπεράσματα

Μέσω τεχνικών της πρωτεϊνικής μηχανικής, όπως η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχουν προκύψει σημαντικές πληροφορίες στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών προσαρμογής των ψυχρόφιλων ενζύμων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στην παρούσα εργασία μέσω τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης έγινε προσπάθεια ανίχνευσης αμινοξικών καταλοίπων υπεύθυνων για τις ιδιότητες της αλκαλικής φωσφατάσης από το ψυχρόφιλο στέλεχος TAB5 (υψηλή καταλυτική ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αξιοσημείωτη θερμοευαισθησία). Οι μεταλλαγές με το μεγαλύτερο αντίκτυπο στην σταθερότητα και την ενεργότητα του ενζύμου εντοπίστηκαν γύρω από το ενεργό κέντρο. Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να είχε προκύψει λόγω της τεχνικής σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο το γεγονός ότι πολλές από τις μεταλλαγές που συλλέχθηκαν ήταν διασκορπισμένες σε διάφορες περιοχές του ενζύμου (Σχήμα 31), ενισχύει την υπόθεση μας ότι στο συγκεκριμένο ένζυμο το ενεργό κέντρο έχει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή της πρωτεΐνης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τρεις από τις έξι μεταλλαγές αφορούν αλλαγή καταλοίπου γλυκίνης, τονίζοντας την σημασία του συγκεκριμένου καταλοίπου στους μηχανισμούς προσαρμογής των ψυχρόφιλων ενζύμων.

Αξιοσημείωτη είναι και η παρατήρηση ότι σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή του ενεργού κέντρου επηρεάζουν δραστικά το αποδιατακτικό μονοπάτι του ενζύμου. Κατά συνέπεια, τα τροποποιημένα ένζυμα που μελετήθηκαν χαρακτηρίζονται από πλήρη έλλειψη αποδιατακτικών μεταβολών και μεγάλες αλλαγές στις τιμές των T_m .

Σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες παρατηρήσαμε ότι η ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και η θερμοσταθερότητα μπορούν να βελτιωθούν ταυτόχρονα. Αυτή η παρατήρηση προέκυψε όταν συγκρίναμε το ένζυμο H135E/G149D με το H135E. Ωστόσο, στη σύγκριση των θερμοσταθερών ενζύμων με το φυσικό, εμφανίζουν χαμηλότερη ενεργότητα και τα θερμοασταθή ένζυμα H135E/G149D και H135E χαρακτηρίζονται από υψηλότερες τιμές της k_{cat} . Επομένως, η σχέση αυτών των ενζυμικών ιδιοτήτων μπορεί να αλλάξει προς οποιαδήποτε κατεύθυνση ακόμη και με μικρές αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία, υπογραμμίζοντας την λεπτή

ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην ενζυμική ενεργότητα και την δομική σταθερότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

1. Baross, J.A. and Morita, R.Y. (1978) Microbial life at low temperatures: ecological aspects. In: *Microbial Life in Extreme Environments* (Kushner, D.J., Ed.), pp. 9-71. Academic press, New York.
2. Cavicchioli, R. and Thomas T. (2000) Extremophiles. In: *Encyclopedia of Microbiology*, (Lederberg, J., Alexander, M., Bloom, B.R., Hopwood, D., Hull, R., Iglewski, B.H., Laskin, A.I., Oliver, S.G., Schaechter, M. and Summers, W.C., Eds), pp. 317-337. Academic Press Inc, San Diego.
3. Margesin, R., Feller, G., Gerday, C. and Russell, N. (2002) Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. In: *The Encyclopedia of Environmental Microbiology* (Bitton, G., Ed.), pp. 871–885. John Wiley & Sons, 1117 New York.
4. Phadtare, S., Alsina, J. and Inouye, M. (1999) Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 175– 180.
5. Barrett, J. (2001) Thermal hysteresis proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 105–117.
6. Crawford, D.L. and Powers, D.A. (1989) Molecular basis of evolutionary adaptation at the lactate dehydrogenase-B locus in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9365–9369.
7. Crawford, D.L. and Powers, D.A. (1992) Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Mol. Biol. Evol.* 9, 806–813.
8. Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (1984) Temperature adaptation. In: *Biochemical Adaptations* (Hochacka, P.W. and Somero, G.N., Eds.), pp. 355–449. Princeton University Press, Princeton.
9. Somero, G.N. (1995) Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 43–68.
10. Baldwin, J. and Hochachka, P.W. (1970) Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization. Acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem. J.* 116, 883–887.
11. Jagdale, G.B. and Gordon, R. (1997) Effect of temperature on the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in entomopathogenic

- nematodes (*Nematoda Steinernematidae*). 1230 *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 118, 1151–1156.
12. Feller, G. (2003): Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell Mol Life Sci.* 60, 648-662.
 13. Somero, G. N. (1975) Temperature as a selective factor in protein evolution: the adaptational strategy of "compromise", *J Exp Zool.* 194, 175-188.
 14. Smalas, A.O., Leiros, H.K., Os, V. and Willassen, N.P. (2000) Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6, 1–57.
 15. Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D. and Sowers, K.R. (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 253–261.
 16. Low, P.S., Bada, J.L. and Somero, G.N. (1973) Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 430–432.
 17. Lonhienne, T., Gerday, C. & Feller, G. (2000) Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim Biophys Acta.* 1543, 1-10.
 18. Fields, P.A. and Somero, G.N. (1998) Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A(4) orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11476–11481.
 19. Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P. and Gerday, C. (2000) Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. *J. Biol. Chem.* 275, 11147–11153.
 20. Hoyoux, A. et al. (2001) Cold-Adapted b-Galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1529–1535.
 21. Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C.E., Feller, G., Gerday, C. and Bouriotis, V. (2001) Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* 310, 291–297.
 22. D'Amico S., Gerday C. and Feller G. (2001) Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. *J. Biol. Chem.* 276, 25791–25796.

23. Feller G., d'Amico D. and Gerday C. (1999) Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry* 38, 4613–4619.
24. Russell N. J. (2000) Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* 4, 83–90.
25. Gianese G., Bossa F. and Pascarella S. (2002) Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes. *Proteins* 47, 236–249.
26. Branden, C. and Tooze, J. (1999) Introduction to protein structure, Garland publ., New York.
27. Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G. & Eijsink, V. G. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 2056-2060.
28. Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K. & Suzuki, Y. (1991) Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6- glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006, *J Biol Chem.* 266, 24287-24294.
29. Kumar, S., Tsai, C. J. & Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability, *Protein Eng.* 13, 179-191.
30. Galkin, A., Kulakova, L., Ashida, H., Sawa, Y. & Esaki, N. (1999) Cold-adapted alanine dehydrogenases from two antarctic bacterial strains: gene cloning, protein characterization, and comparison with mesophilic and thermophilic counterparts, *Appl Environ Microbiol.* 65, 4014-4020.
31. Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M., Haser, R. and Gerday, C. (1994) Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23, *Eur J Biochem.* 222, 441-447.
32. Facchiano, A. M., Colonna, G. & Ragone, R. (1998) Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study, *Protein Eng.* 11, 753-760.
33. Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., Baise, E., Chessa, J. P., Garsoux, G., Petrescu, I. and Feller, G. (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge, *Biochim Biophys Acta.* 1342, 119-131.
34. Serrano, L., Horovitz, A., Avron, B., Bycroft, M. and Fersht, A. R. (1990) Estimating the contribution of engineered surface electrostatic interactions to protein stability by using double-mutant cycles, *Biochemistry.* 29, 9343-9352.

35. Vlassi, M., Cesareni, G. and Kokkinidis, M. (1999) A correlation between the loss of hydrophobic core packing interactions and protein stability, *J Mol Biol.* 285, 817-827.
36. Aghajari N., Feller G., Gerday C. and Haser R. (1998) Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* 6, 1503–1516.
37. Qian M., Haser R., Buisson G., Duee E. and Payan F. (1994) The active center of a mammalian α -amylase: structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å resolution. *Biochemistry* 33, 6284–6294.
38. Declerck, N., Joyet, P., Trosset, J.Y., Garnier, J. and Gaillardin, C. (1995) Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling, *Protein Eng.* 8, 1029-1037.
39. Zhu, G.P., Xu, C., Teng, M.K., Tao, L.M., Zhu, X.Y., Wu, C.J., Hang, J., Niu, L.W. and Wang Y.Z. (1999) Increasing the thermostability of D-xylose isomerase by introduction of a proline into the turn of a random coil, *Protein Eng.* 12, 635-638.
40. Pappenberger, G., Schurig, H. and Jaenicke, R. (1997) Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *J. Mol. Biol.* 274, 676-683.
41. Shinoda, H., Hattori, M., Shimizu, A., Samejima, T. and Satoh, T. (1999) Hydrophobic interactions of Val75 are critical for oligomeric thermostability of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus*, *J. Biochem.* 125, 58-63.
42. Alvarez, J.M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. and Maes, D. (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*, *J. Biol. Chem.* 273, 2199-2206.
43. Taguchi, S., Ozaki, A. and Momose, H. (1998) Engineering of a cold adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 492-495.
44. Stemmer, W.P.C. (1995) Searching sequence space, *Biotechnology* 13, 549-552.

45. Arnold, F.H. and Georgiou, G. (eds) (2003) Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols. Humana Press, Clifton, NJ.
46. Neylon, C. (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution, *Nucleic Acids Res.* 32, 1448–59.
47. Stemmer, W.P.C. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389-391.
48. Nguyen, A.W. and Daugherty, P.S. (2003) Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains. *Methods Mol. Biol.*, 231, 39-44.
49. Murakami, H., Hohsaka, T. and Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.*, 20, 76-81.
50. Murakami, H., Hohsaka, T. and Sisido, M. (2003) Random insertion and deletion mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 231, 53-64.
51. Hayes, F. and Hallet, B. (2000) Pentapeptide scanning mutagenesis: encouraging old proteins to execute unusual tricks. *Trends Microbiol.*, 8, 571-577.
52. Pikkemaat, M.G. and Janssen, D.B. (2002) Generating segmental mutations in haloalkane dehalogenase: a novel part in the directed evolution toolbox. *Nucleic Acids Res.*, 30, e35.
53. Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. (1994) Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.*, 3, S136-S40.
54. Cirino, P.C., Mayer, K.M. and Umeno, D. (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.*, 231, 3-9.
55. Kayushin, A., Korosteleva, M., Miroshnikov, A., Zubov, D., Kosch, W. and Piel, N. (1996) A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites-synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res.*, 24, 3748-3755.
56. Kayushin, A., Korosteleva, M. and Miroshnikov, A. (2000) Large-scale solid-phase preparation of 3'-unprotected trinucleotide phosphotriesters precursors for synthesis of trinucleotide phosphoramidites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 19, 1967-1976.
57. Gaytan, P., Yanez, J., Sanchez, F. and Soberon, X. (2001) Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method

- useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols. *Nucleic Acids Res.*, 29, e9.
58. Gaytan, P., Yanez, J., Sanchez, F., Mackie, H. and Soberon, X. (1998) Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method. *Chem. Biol.*, 5, 519-527.
 59. Juillerat, A., Gronemeyer, T., Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2003) Directed evolution of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labelling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Chem. Biol.*, 10, 313-317.
 60. Sio, C.F., Riemens, A.M., van der Laan, J.M., Verhaert, R.M. and Quax, W.J. (2002) Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur. J. Biochem.*, 269, 4495-4504.
 61. Georgescu, R., Bandara, G. and Sun, L. (2003) Saturation mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 231, 75-83.
 62. Stemmer, W.P.C. (1993) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10747-10751.
 63. Otten, L.G. and Quax, W.J. (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts, *Biomol. Eng*, 22, 1-9.
 64. Shao, Z., Zhao, H., Giver, L. and Arnold, F.H. (1998) Random-priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Research*. 26, 2, 681-683.
 65. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.* 16, 3, 258-261.
 66. Volkov, A.A., Shao, Z. and Arnold, F.H. (1999) Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. *Nucleic Acids Research*. 27, 18, e18, i-vi.
 67. Ostermeier, M., Nixon, A.E., Shim, J.H. and Benkovic, S.J. (1999) Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3562-3567.

68. Lin, H., Cornish, V.W., (2002) Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 4402–4425.
69. Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994) An *in vitro* Polysome Display System for Identifying Ligands from very Large Peptide Libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022-9026.
70. Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997) *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4937-4942.
71. Liu, R., Barrick, J. E., Szostak, J.W. and Roberts, R.W. (2000) Optimized synthesis of RNA-protein fusions for *in vitro* protein selection, *Methods Enzymol.* 318, 268-293.
72. Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992) Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 1865-1869.
73. Gates, C.M., Stemmer, W.P.C., Kaptein, R. and Schatz, P.J. (1996) Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor "headpiece dimer", *J. Mol. Biol.* 255, 373-386.
74. Sidhu, S.S. (2000) Phage display in pharmaceutical biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 610-616.
75. Rodi, D.J. and Makowski, L. (1999) Phage-display technology: finding a needle in a vast molecular haystack, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93.
76. Forrer, P., Jung, S. and Pluckthun, A. (1999) Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 514-520.
77. Francisco, J.A., Earhart, C.F. and Georgiou, G. (1992) Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2713-2717.
78. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nat. Biotechnol.* 15, 553-557.
79. Ernst, W., Grabherr, R., Wegner, D., Borth, N., Grassauer, A. and Katinger, H. (1998) Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library, *Nucleic Acids Res.* 26, 1718-1723.

80. Tawfik, D.S. and Griffiths, A.D. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution, *Nat. Biotechnol.* 16, 652-656.
81. [Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M.](#) (2000) Comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, 403, 623-627.
82. Licitra, E.J. and Liu, J.O. (1996) A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 12817-12821.
83. Griffith, E.C., Licitra, E.J. and Liu, J.O. (2000) Yeast three-hybrid system for detecting ligand-receptor interactions. *Methods Enzymol.* 328, 89-103.
84. Emili, A.Q. and Cagney, G. (2000) Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays, *Nat. Biotechnol.* 18, 393-397.
85. [Walter, G., Bussow, K., Cahill, D., Lueking, A. and Lehrach, H.](#) (2000) Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening, *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 298-302.
86. Grayhack, E.J. and Phizicky, E.M. (2001) Genomic analysis of biochemical function, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 34-39.
87. Zhu, H. and Snyder, M. (2001) Protein arrays and microarrays, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 40-45.
88. Yano, T. and Kagamiyama, H. (2001) Directed evolution of ampicillin-resistant activity from a functionally unrelated DNA fragment: a laboratory model of molecular evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3, 903-907.
89. Zhao, H. and Arnold, F.H. (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase, *Pr. Eng.* 12, 1, 47-53.
90. May, O., Nguyen, P.T. and Arnold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine, *Nat. Biotech.* 18, 317-320.
91. Stefan, A., Radeghieri, A., Gonzalez, Vara y Rodriguez, A. and Hochkoeppler A. (2001) Directed evolution of β -galactosidase from *Escherichia coli* by mutator strains defective in the 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerase III. *FEBS Lett.* 493, 139-143.

92. Matsumura, I. and A.D. (2001) *In vitro* evolution of β -glucuronidase into a β -galactosidase proceeds through non-specific intermediates, *J Mol Biol.* 305, 331-339.
93. van Kampen, M. and Egmond, M. (2001) Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase, *Eur J Lipid Sci Technol.* 102, 717-726.
94. Yano, T., Oue, S. and Kagamiyama, H. (1998) Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 5511-5515.
95. Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of a paranitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents, *Nat. Biotech.* 14, 4, 458-467.
96. Kim, E. E. and Wyckoff, H. W. (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis, *J Mol Biol.* 218, 449-464.
97. Holtz, K. M. and Kantrowitz, E. R. (1999) The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis, *FEBS Lett.* 462, 7-11.
98. Moss, D. W. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem.* 38, 2486-2492.
99. Knox, J. R. and Wyckoff, H. W. (1973). A crystallographic study of alkaline phosphatase at 7-7Å resolution. *J. Mol. Biol.* 74, 533-545.
100. Hough, E., Hansen, L. K., Birknes, B., Jynge, K., Hansen, S., Hordvik, A. et al. (1989). High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature*, 338, 357-360.
101. Volbeda, A., Lahm, A., Sakiyama, F. and Suck, D. (1991). Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution. *EMBO J.* 10, 1607-1618.
102. Sowadski J.M, Handschumacher M.D., Murphy H.M., Foster B.A. and Wyckoff H.W. (1985) Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 186, 417-433.
103. Kim E.E. and Wyckoff H.W. (1989) Structure of alkaline phosphatases. *Clin. Chim. Acta* 186, 175-188.
104. Le Du, M. H., Stigbrand, T., Taussig, M. J., Menez, A. and Stura, E. A. (2001). Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8

- Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 9158–9165.
105. de Backer, M., McSweeney, S., Rasmussen, H.B., Riise, B.W., Lindley, P. and Hough, E. (2002) The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *J. Mol. Biol.* 318, 1265–1274.
106. Kaneko, Y., Hayashi, N., Toh, E.A., Banno, I. and Ohima, Y. (1987) Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 58, 137-148.
107. Kim, E.E., Peterson, T., Bee, G. and Hulett, F.M. (1998) *Bacillus licheniformis* MC14 alkaline phosphatase I gene with an extended COOH-terminus. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 47-58.
108. Hulett, F.M., Kim, E.E., Bookstein, C., Kapp, N.V., Edward, C.W. and Wyckoff, H.W. (1991) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase III and IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure, *J. Biol. Chem.* 266, 1077-1084.
109. Wojciechowski, C.L., Cardia, J.P., and Kantrowitz, E.R. (2002) Alkaline phosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* requires cobalt for activity, *Protein Sci.* 11, 903-911.
110. Murphy, J.E., Xu, X. and Kantrowitz, E.R. (1994) Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases? *Mol. Microbiol.* 12, 3, 351-357.
111. Murphy, J.E., Xu, X. and Kantrowitz, E.R. (1993) Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by a single amino acid substitution in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268, 29, 21497-21500.
112. Janeway, C.M., Xu, X., Murphy, J.E., Chaidaroglou, A. and Kantrowitz, E.R. (1993) Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* 32, 1601-1609.
113. Stec, B., Holtz, K.M. and Kantrowitz, E.R. (2000) A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.* 299, 1303-1311.

114. Henthorn, P.S. and Whyte, M.P. (1992) Missense mutations of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in hypophosphatasia. *Clin. Chem.* 38, 2501–2505.
115. Mornet, E. (2000) Hypophosphatasia: the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Hum. Mutat.* 15, 309–315.
116. Burlina, A., Rubin, D., Secchiero, S., Sciacovelli, L., Zaninotto, M. and Plebani, M. (1994) Monitoring skeletal cancer metastases with the bone isoenzyme of tissue unspecific alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta*, 226, 151–158.
117. Demers, L.M., Costa, L. and Lipton, A. (2000) Biochemical markers and skeletal metastases. *Cancer*, 88, 2919–2926.
118. Millan, J.L. (1992) Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation. *Clin. Chim. Acta*, 209, 123–129.
119. Narayanan, S. (1991) Serum alkaline phosphatase isoenzymes as markers of liver disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 21, 12–18.
120. Rina, M., Pozidis, C., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Kokkinidis, M. and Bouriotis, V. (2000) Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. *Eur. J. Biochem.* 267, 1230–1238.
121. Tsigos, I., Mavromatis, K., Tzanodaskalaki, M., Pozidis, C., Kokkinidis, M. and Bouriotis, V. (2001) Engineering the properties of a cold active enzyme through rational redesign of the active site. *Eur. J. Biochem.* 268, 5074–5080.
122. Mavromatis, K., Tsigos, I., Tzanodaskalaki, M., Kokkinidis, M. and Bouriotis, V. (2002) Exploring the role of a glycine cluster in cold adaptation of an alkaline phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 269, 2330–2335.
123. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
124. Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.O. and Arnold, F.H. (1998) Directed evolution of a thermostable esterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12809–12813.
125. Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N. and Pease, L.R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction, *Biotechniques.* 8, 528–535.

126. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680-685.
127. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
128. Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* D60, 2126-2132
129. <http://pymol.sourceforge.net>
130. Zhao, H., and Arnold, F. H. (1997) Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 480–485.
131. Bryan, P. N., Rollence, M. L., Pantoliano, M. W., Wood, J., Finzel, B. C., Gilliland, G. L., Howard, A. J., and Poulos, T. L. (1986) Proteases of enhanced stability: characterization of a thermostable variant of subtilisin. *Proteins.* 1, 326–334.
132. Arnold, F. H., and Moore, J. C. (1997) Optimizing industrial enzymes for directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58, 1–14.
133. D’Amico S., Marx JC., Gerday C. and Feller G. (2003) Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *J. Biol. Chem.* 278, 7891–7896.
134. Wojciechowski C.L., Kantrowitz E.R. (2003) Glutamic acid residues as metal ligands in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta.* 1649, 68-73.
135. Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N., and Arnold, F. H. (2000) Directed Evolution Study of Temperature Adaptation in a Psychrophilic Enzyme. *J. Mol. Biol.* 297, 1015-1026.