



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



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

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ (M.S.)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΤΗΣ ΑΠΑΚΕΤΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ ΧΙΤΙΝΗΣ
D25 ΑΠΟ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *Cryptococcus*
***neoformans*.**

ΑΡΝΑΟΥΤΕΛΗ ΣΟΦΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΟΥΡΙΩΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Χιτίνη και χιτοζάνη.....	9
1.1.1 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες χιτίνης και χιτοζάνης.	9
1.1.2 Σύνθεση χιτίνης.....	11
1.1.3 Διάδοση χιτίνης και χιτοζάνης.....	12
1.1.4 Παρακσκευή χιτοζάνης.....	13
1.1.5 Εφαρμογές χιτίνης και χιτοζάνης.....	14
1.2 Οικογένεια 4 εστερασών υδατανθράκων.	15
1.2.1 Βιολογικός ρόλος των απακετυλασών της χιτίνης.	17
1.2.2 Τρόπος δράσης απακετυλασών χιτίνης.	18
1.3 Ο παθογόνος μύκητας <i>Cryptococcus neoformans</i>	20
1.3.1 Χιτίνη και χιτοζάνη στον <i>Cryptococcus neoformans</i>	21
1.3.2 Ανοσοενεργές απακετυλάσες της χιτίνης στον <i>Cryptococcus neoformans</i>	22
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Υλικά.....	24
2.2 Μέθοδοι.	25
2.2.1 Ανάκτηση μετασχηματισμένων κυττάρων.	26

2.2.2 Ανάπτυξη των κυττάρων για ανίχνευση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης	26
2.2.3. Υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης D25 σε κύτταρα <i>K.lactis</i>	27
2.2.4 Απομόνωση της απακετυλάσης χιτίνης D25.....	27
2.2.5 Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης χιτίνης D25.....	29
2.2.6 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.....	31
2.2.7 Έλεγχος προτύπου γλυκοζιλίωσης	31
2.2.8. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών	32
2.2.9 Προσδιορισμός μοριακού βάρους της D25	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1 <i>In silico</i> εύρεση της αλληλουχίας D25 του <i>Cryptococcus neoformans</i> και σύγκριση της με άλλες απακετυλάσες χιτίνης.	33
3.2 Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου <i>d25</i> και παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα <i>K. lactis</i>	33
3.3 Απομόνωση της απακετυλάσης χιτίνης D25	35
3.4 Χαρακτηρισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της D25	38
3.4.1 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.	38
3.4.2 Βέλτιστο pH δράσης.....	39
3.4.3 Θερμοσταθερότητα της D25.....	39
3.4.4 Επίδραση του οξικού οξέος στη δραστηριότητα της D25.....	40
3.4.5 Επίδραση μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της D25...	41
3.4.6 Επίδραση του EDTA στη δραστηριότητα της D25.....	42
3.5 Έλεγχος προτύπου γλυκοζιλίωσης.....	42
3.6 Ενζυμική απακετυλίωση υποστρωμάτων χιτίνης του ενζύμου D25..	43
3.7 Κινητική ανάλυση.....	44

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	46
4.1 Συζήτηση.....	46
4.2 Προοπτικές.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Cryptococcus neoformans* είναι ένα κοινό ευκαιριακό παθογόνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Στο κυτταρικό τοίχωμα του *C. neoformans* εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό η χιτίνη, μέρος της οποίας είναι απακετυλιωμένο σε χιτοζάνη. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση της χιτίνης και της χιτοζάνης αποτελούν πολύ καλούς στόχους για μελλοντικά αντιμυκητιακά φάρμακα λόγω της σημασίας τους για την ακεραιότητα του κυττάρου και την απουσία τους στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί από τον *C. neoformans* τρεις απακετυλάσες πολυσακχαριτών (οι οποίες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ομολογίας με απακετυλάσες της χιτίνης), ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν ανοσολογικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, η ανοσοποίηση με τις απακετυλάσες MP98, MP84 και D25 έχει προστατευτικές για τον ξενιστή δράσεις και έτσι αποτελούν υποψήφιους αντιγονικούς επιτόπους για την ανάπτυξη εμβολίου για την κρυπτοκοκκίωση.

Η χιτίνη είναι ο δεύτερος πιο διαδεδομένος δομικός πολυσακχαρίτης στη φύση μετά την κυτταρίνη. Η χιτοζάνη (απακετυλιωμένη μορφή χιτίνης) δεν απαντάται στην φύση τόσο συχνά όσο η χιτίνη, όμως οι ελεύθερες αμινομάδες κατά μήκος του πολυμερούς προσδίδουν καινούργιες και εντελώς διαφορετικές ιδιότητες στο μόριο αυτό. Σε κάποια είδη μυκήτων η χιτοζάνη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι απακετυλάσες της χιτίνης στους μύκητες συμμετέχουν στη δημιουργία του κυτταρικού τους τοιχώματος και έχει προταθεί ότι παίζουν κάποιο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου.

Σε προηγούμενη μελέτη το γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 25 kDa κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli*. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μπορούσε να επάγει καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας (DTH) αλλά και ανοσολογικές αποκρίσεις παρόμοιες με αυτές της ενδογενούς πρωτεΐνης. Στην παρούσα μελέτη το ανασυνδυασμένο ένζυμο, το οποίο έχει κλωνοποιηθεί και εκφραστεί στον μύκητα *Kluyveromyces lactis*, απομονώθηκε σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης, χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και υπολογίστηκαν οι κινητικές του

παράμετροι. Το ένζυμο ήταν σε θέση να απακετυλιώσει την γλυκολ-χιτίνη, *N*-ακετυλ-χιτοολιγομερή καθώς και τα τροποποιημένα κατάλοιπα *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό (GlcNAc-1P) και *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό (GlcNAc-6P), ενώ δεν ήταν σε θέση να απακετυλιώσει το μονομερές κατάλοιπο GlcNAc. Όσον αφορά την εξειδίκευσή του, η κινητική ανάλυση της ενζυμικής αντίδρασης με τα χιτοολιγομερή GlcNAc₄₋₅, έδειξε ότι η D25 έχει σαν βέλτιστο υπόστρωμά της το χιτοολιγομερές GlcNAc₄.

ABSTRACT

The fungus *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast with worldwide distribution in nature. Although Cryptococcosis is rare in people with intact immune systems, it occurs at greatly increased frequency in persons with impaired cell mediated immunity, particularly those with AIDS. Conventional antifungal therapy has major limitations because fungi are eukaryotes and share many biochemical processes with animals. Therefore there is a need to develop alternative strategies to control Cryptococcosis. Identification of immunoprotective protein antigens may be critical for development of an effective cryptococcal vaccine. The *C. neoformans* cell wall is important for viability and it is also associated with a variety of known virulence factors. The major virulence factor is the polysaccharide capsule, whose attachment to the outer portion of the cell wall requires α -(1,3)-glucan. An essential component of the fungal cell wall that contributes to its strength and integrity is chitin. Chitin is a linear polymer of β -(1, 4)-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) which is one of the most abundant biopolymers found in nature. It is found in a diverse group of organisms, ranging from fungal species to insects and crustaceans . Chitosan, the deacetylated version of chitin, is produced enzymatically by chitin deacetylases (EC 3.5.1.41) and is also an important constituent of the cell wall at various times during the life cycle of some fungi species, including *C. neoformans*. The genome of *Cryptococcus neoformans* contains 4 polysaccharide deacetylase homologues. All of these homologues have been proposed to be chitin deacetylases. Polysaccharide deacetylases belong to Carbohydrate Esterase family 4 (CE4) which includes chitin deacetylases, acetyl-xylan esterases, xylanases, rhizobial NodB chitooligosaccharide deacetylases and peptidoglycan deacetylases. All these enzymes share a universal conserved region called polysaccharide deacetylase domain (according to the Henrissat classification). In a previous study, a 25-kDa protein from cryptococcal culture supernatant was purified and the corresponding gene cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was able to produce not only delayed-type hypersensitivity (DHT) reactions but also protective immunity responses that were similar in extend to those produced by the natural protein. This protein showed also significant homology to chitin deacetylases from other fungi. In his study *d25* was cloned and expressed in *Klyuveromyces lactis*. The recombinant enzyme was purified to homogeneity employing ion exchange and gel filtration chromatography steps and was further characterized. The enzyme was active on several chitin substrates and *N*-acetyl chitooligomers. It required at least two *N*-acetylglucosamine residues (chitobiose) for catalysis and kinetic analysis towards GlcNAc₄₋₅ revealed that GlcNAc₄ was the favourable substrate for the enzyme.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Tris: τρις(υδροξυμεθυλ)μεθυλαμίνη, **Mes:** 2-(N-μορφολινο)αιθυλενοθειικό οξύ, **SDS:** δωδεκυλθειικό νάτριο, **EDTA:** αιθυλένο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ, **cpm:** κρούσεις ανά λεπτό (για σπινθηρομετρία), **PDA :** απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης, **CDA:** απακετυλάση χιτίνης, **GlcN :** γλυκοζαμίνη, **GlcNAc:** N-ακετυλγλυκοζαμίνη, **(GlcNAc)₂:** διακετυλχιτοβιόζη, **(GlcNAc)₃:** τρι-N-ακετυλχιτοτριόζη, **(GlcNAc)₄:** τετρα-N-ακετυλχιτοτετραόζη, **(GlcNAc)₅:** πεντα-N-ακετυλχιτοπενταόζη, **(GlcNAc)₆:** εξα-N-ακετυλχιτοεξαόζη, **GlcNAc-6P:** N-ακετυλγλυκοζαμίνη-6-φωσφορικό, **GlcNAc-1P:** N-ακετυλγλυκοζαμίνη-1-φωσφορικό, **MurNAc:** N-ακετυλμουραμικό οξύ, **GalNAc:** N-ακετυλγαλακτοζαμίνη, **ManNAc:** N-ακετυλμανοζαμίνη.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

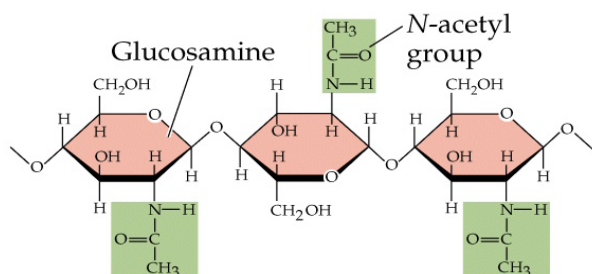
1.1 Χιτίνη και χιτοζάνη.

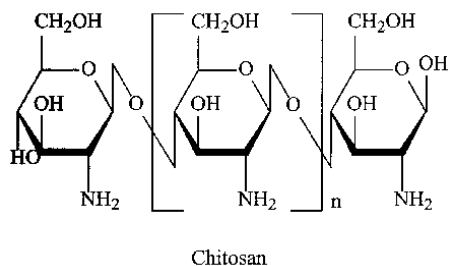
Οι πιο διαδεδομένοι δομικοί πολυσακχαρίτες είναι α) η κυτταρίνη που συμμετέχει στην κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων των ανώτερων φυτών, β) η χιτίνη στο σκελετικό υλικό των οστρακόδερμων και γ) οι πεπτιδογλυκάνες στα βακτηριακά κύτταρα και τους συνδετικούς ιστούς των ζώων (Brant, 1976). Η κυτταρίνη και η χιτίνη στην κρυσταλλική τους μορφή προσδίδουν αντοχή και ακαμψία σε δομικά στοιχεία και προσφέρουν μηχανική στήριξη. Παρέχουν επίσης προστασία στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, φυκών και μυκήτων και στον εξωσκελετό των αρθροπόδων. Η χιτίνη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα ασπόνδυλα, κυρίως τα αρθρόποδα (έντομα και καρκινοειδή) ενώ σε μικρότερες ποσότητες από τα μαλάκια, τους δακτυλιοσκόληκες και τους νηματώδεις. Απαντάται στο κυτταρικό τοίχωμα όλων των μυκήτων (εκτός από τους Ωομύκητες/Oomycetes) (Cohen, 2001) σε ποσοστό από 22 έως 44% του ξηρού τους βάρους. Η χιτίνη είναι σημαντική για την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος στους μύκητες καθώς προσδίδει αντοχή μέσω των υδρογονικών δεσμών μεταξύ πολλών αλυσίδων χιτίνης που οργανώνονται σε μικροϊνίδια (Minke, 1978).

Η χιτοζάνη είναι ένα πολυκατιονικό βιοπολυμερές που προκύπτει από την απακετυλίωση της χιτίνης. Σε κάποια είδη μυκήτων η χιτοζάνη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού τους κύκλου (Christodoulidou, 1996 & Cid, 1995). Η χιτοζάνη δεν συντίθεται άμεσα. Αντ' αυτού οι απακετυλάσες της χιτίνης, που αποτελούν εκρινόμενα ένζυμα, θεωρείται ότι βρίσκονται κοντά στις περιοχές όπου η χιτίνη διαπερνά τη πλασματική μεμβράνη (Banks, 2005). Καθώς συντίθεται η χιτίνη, οι απακετυλάσες μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά και να παράγουν χιτοζάνη (Gao, 1995 & Davis, 1984).

1.1.1 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες χιτίνης και χιτοζάνης

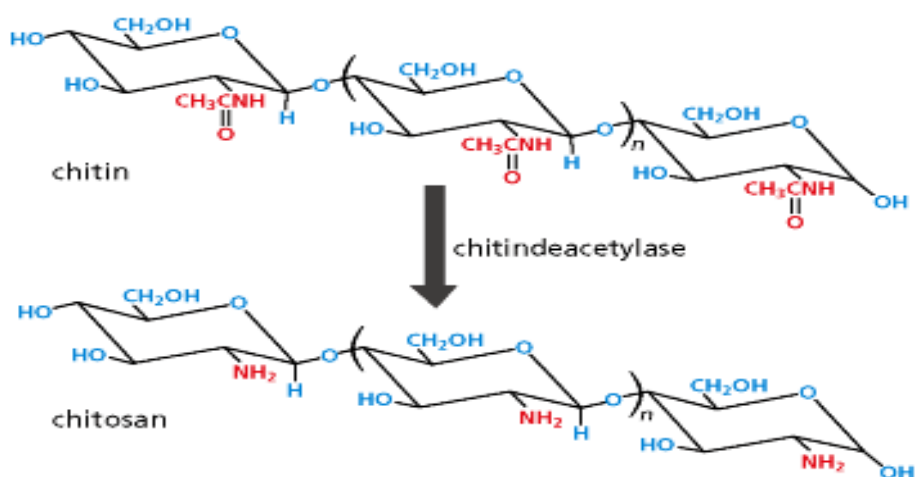
Η χιτίνη είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές της N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης στο οποίο η σύνδεση των μονομερών γίνεται με β(1-4) γλυκοσιδικούς δεσμούς,





ενώ η χιτοζάνη η οποία είναι γραμμικό ομοπολυμερές της γλυκοζαμίνης, αποτελεί την απακετυλιωμένη της μορφή. Ο βαθμός ακετυλίωσης της χιτοζάνης, δηλαδή η

επιμέρους σύσταση των αλυσίδων σε N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη και γλυκοζαμίνη, έχει βρεθεί ότι ποικίλει σε διάφορα παρασκευάσματα, ώστε η διάκριση ανάμεσα στη χιτίνη και τη χιτοζάνη να είναι ασαφής και να βασίζεται κυρίως στη φυσικοχημική τους συμπεριφορά παρά στο χημικό τους τύπο. Γι' αυτό έχει προταθεί ο ορισμός της ως προς τη διαλυτότητα αυτής σε διάλυμα οξικού οξέος 0.1M (Roberts, 1993).



Εικόνα 1. Η απακετυλίωση της χιτίνης από την απακετυλάση της χιτίνης οδηγεί στη δημιουργία χιτοζάνης και οξικού οξέος.

Η διαμόρφωση του γλυκοσιδικού δεσμού οδηγεί στην ευθύγραμμη διάταξη των αλυσίδων της χιτίνης κατά παράλληλο ή αντιπαράλληλο τρόπο, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη πυκνών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων σε όλο το μήκος τους. Η κύρια μορφή αλληλεπίδρασης είναι οι υδρογονικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινομάδων της μιας αλυσίδας και των καρβονυλομάδων της παράπλευρης της αλυσίδας. Οι εκτεταμένες αυτές αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν στα μόρια της χιτίνης να συγκρατούνται ισχυρά μεταξύ τους, σχηματίζοντας πυκνές κρυσταλλικές δομές με εξαιρετικές μηχανικές και φυσικοχημικές ιδιότητες.

Λόγω αυτής ακριβώς της πυκνής, κρυσταλλικής της δομής, η χιτίνη είναι ένα εξαιρετικά αδρανές πολυμερές. Είναι αδιάλυτη στο νερό καθώς και σε αραιά

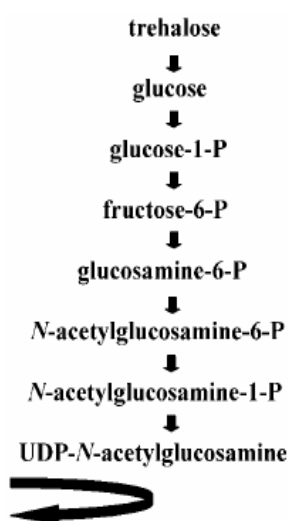
διαλύματα οξέος και βάσης, αλλά και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Διαλύεται μόνο κάτω από ισχυρά όξινες συνθήκες (π.χ. φορμικό οξύ), με ταυτόχρονη όμως σημαντική αποικοδόμησή της (Hirano, 1989).

Αντίθετα, η χιτοζάνη παρουσιάζει αρκετές, εξαιρετικά χρήσιμες φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στον κατιονικό της χαρακτήρα. Έτσι, η πρωτονίωση των ελεύθερων αμινομάδων της χιτοζάνης σε χαμηλές τιμές pH, καθιστά το πολυμερές διαλυτό σε αραιά διαλύματα οργανικών και ανόργανων οξέων. Η διαλυτότητα της χιτοζάνης σε υδατικά διαλύματα και σε τιμές pH μεγαλύτερες από 6,5 εξαρτάται από τον βαθμό N-ακετυλίωσης της (Sannan, 1976), ενώ έχει διαπιστωθεί ότι και η κατανομή των δύο μονομερών κατά μήκος των δύο αλυσίδων επηρεάζει τη διαλυτότητά της (Kurita, 1977). Λόγω της διαλυτότητάς της, η χιτοζάνη μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μορφές, όπως διαλύματα διαφορετικού ιξώδους, πηκτώματα, μεμβράνες και ίνες.

1.1.2 Σύνθεση χιτίνης

Ο σχηματισμός και η εναπόθεση της χιτίνης είναι μία περίπλοκη διαδικασία βιοχημικών γεγονότων που ξεκινάει ενδοκυτταρικά και ολοκληρώνεται με την έγκλειση της χιτίνης σε εξωτερικές υπερ-μακρομοριακές δομές (εφυμενίδα, περιτροφικές μεμβράνες, κυτταρικό τοίχωμα).

Η σειρά των γεγονότων για τη σύνθεση και εναπόθεση της χιτίνης περιλαμβάνει:



α) Διαδοχικές βιομετατροπές σακχάρων ώστε να σχηματιστεί το υπόστρωμα UDP-N-ακετυλ-γλουκοζαμίνη.

β) Σύνθεση των μονάδων συνθάσης χιτίνης (CS), μεταφορά τους, σωστή ένθεση τους στις πλασματικές

Εικόνα 2: Σχηματισμός υποστρώματος.

μεμβράνες και ενεργοποίηση τους.

γ) Ενζυμική κατάλυση και προσανατολισμός των πολυμερών χιτίνης κατά μήκος της μεμβράνης.

δ) Μετατόπιση των πολυμερών κατά μήκος της μεμβράνης.

ε) Κρυσταλλοποίηση και σχηματισμός μικροϊνιδίων με εσωτερικούς υδρογονικούς δεσμούς.

στ) Σύνδεση με πρωτεΐνες της εφυμενίδας στα αρθρόποδα ή με υδατάνθρακες στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. (Cohen, 2001)

1.1.3 Διάδοση χιτίνης και χιτοζάνης

Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιολογικό μόριο, μετά την κυτταρίνη. Εκτός από το τοίχωμα των μυκήτων και την εφυμενίδα των αρθρόποδων, όπου αποτελεί το κυριότερο συστατικό, η χιτίνη είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε πολλές άλλες ταξινομικές ομάδες, από τα πρωτόζωα μέχρι τα χορδοτά. Η ευρύτατη διάδοση της χιτίνης θα πρέπει να αποδοθεί αφ' ενός στην τάση των αλυσίδων της να συνδέονται με υδρογονικούς δεσμούς και να σχηματίζουν έτσι πυκνές κρυσταλλικές δομές και αφ' ετέρου στην ποικιλία των μορφών της. Η χιτίνη έχει βρεθεί σε καθαρή μορφή μόνο στις εξωκυτταρικές κατασκευές ορισμένων διατόμων. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις βρίσκεται κατά κανόνα συνδεδεμένη με πρωτεΐνες ή άλλους πολυσακχαρίτες.

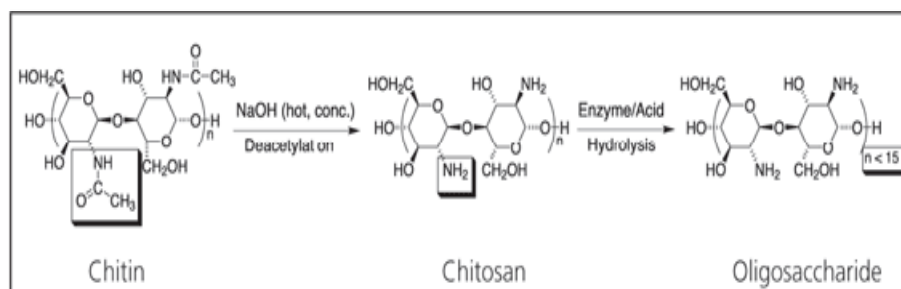
Σε αντίθεση όμως με την κυτταρίνη, η οποία παράγεται κυρίως στη ξηρά και είναι ευπρόσιτη, η χιτίνη παράγεται κατά το μεγαλύτερο μέρος της από θαλάσσιους, ευρύτατα διάσπαρτους οργανισμούς. Αυτή η σημαντική διαφορά στην κατανομή των δύο παλυσακχαριτών, εξηγεί πιθανόν τους λόγους για τους οποίους η χιτίνη, ενώ παρουσιάζει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα δομής και κατά συνέπεια περισσότερες δυνατότητες για αξιοποίηση, υπολείπεται σημαντικά από τη κυτταρίνη στον τομέα των εφαρμογών.

Η απακετυλιωμένη μορφή της χιτίνης, η χιτοζάνη, δεν βρίσκεται στη φύση στην ίδια έκταση όπως η χιτίνη. Οι ελεύθερες αμινομάδες κατά μήκος του πολυμερούς προσδίδουν καινούργιες και εντελώς διαφορετικές ιδιότητες στο μόριο. Σε κάποια είδη μυκήτων η χιτοζάνη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του

κυτταρικού τοιχώματος σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού τους κύκλου (Christodoulidou, 1996 & Cid, 1995).

1.1.4 Παρασκευή χιτοζάνης

Σήμερα, η χιτοζάνη παράγεται από τη χιτίνη με μία θερμοχημική διαδικασία. Η απακετυλίωση επιτυγχάνεται έπειτα από κατεργασία της με πυκνά διαλύματα NaOH σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι συνθήκες στις οποίες γίνεται η απακετυλίωση ποικίλουν ευρύτατα και οι μέθοδοι διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Τα προϊόντα και των δύο μεθόδων είναι μίγματα από τυχαία απακετυλιωμένα ολιγομερή χιτοζάνης με ποικίλους βαθμούς πολυμερισμού. Τα ολιγομερή χιτοζάνης παρασκευάζονται με μερική όξινη υδρόλυση των πολυμερών χιτοζάνης.



Η διαδικασία παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, καθώς απαιτείται η κατανάλωση σημαντικού ποσού ενέργειας, είναι επιβλαβής για το περιβάλλον και δεν ελέγχεται εύκολα οδηγώντας έτσι σ' ένα μεγάλο και ετερογενές φάσμα προϊόντων (Chang, 1997). Η μέθοδος αυτή προκαλεί ανεξέλεγκτη διάσπαση του πολυμερούς και αποδίδει προϊόντα με σημαντική ετερογένεια χαρακτηριστικών (μοριακό βάρος, βαθμός και κατανομή απακετυλίωσης) και μικρή αξία. Ως εκ τούτου, μια εναλλακτική ή συμπληρωματική ενζυμική προσέγγιση (χρήση απακετυλασών χιτίνης) στην παραγωγή χιτοζάνης με ήπιο, ελεγχόμενο, αξιόπιστο και περιβαλλοντικά φιλικό τρόπο έχει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρασκευή νέων πολυμερών και ολιγομερών χιτοζάνης.

1.1.5 Εφαρμογές χιτίνης και χιτοζάνης

Η χιτίνη και η χιτοζάνη βρίσκουν πλείστες εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα της βιομηχανίας. Η χιτοζάνη λόγω του ότι είναι ένα πολυμερές βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό στα ζώα, διαλυτό σε όξινα διαλύματα, διαθέσιμο σε πολλές φυσικές μορφές αποτελεί και πιο εύκολο υλικό στη χρήση από την χιτίνη.

Πιο συγκεκριμένα οι κλάδοι στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή η χιτίνη και η χιτοζάνη είναι οι εξής:

- ✓ Επεξεργασία νερού (κατακράτηση μεταλλικών ιόντων, απομάκρυνση φαινολών και πρωτεϊνών)
- ✓ Γεωργία (επικάλυψη σπόρων και καρπών, λιπάσματα και μυκητοκτόνα)
- ✓ Βιοιατρική-Φαρμακοβιομηχανία (συνθετικό δέρμα, φακοί επαφής, χειρουργικά ράμματα)
- ✓ Βιομηχανία καλλυντικών (προϊόντα περιποίησης μαλλιών και δέρματος)
- ✓ Βιοτεχνολογία (χρωματογραφικά υλικά, ακινητοποίηση ενζύμων)
- ✓ Χαρτοβιομηχανία

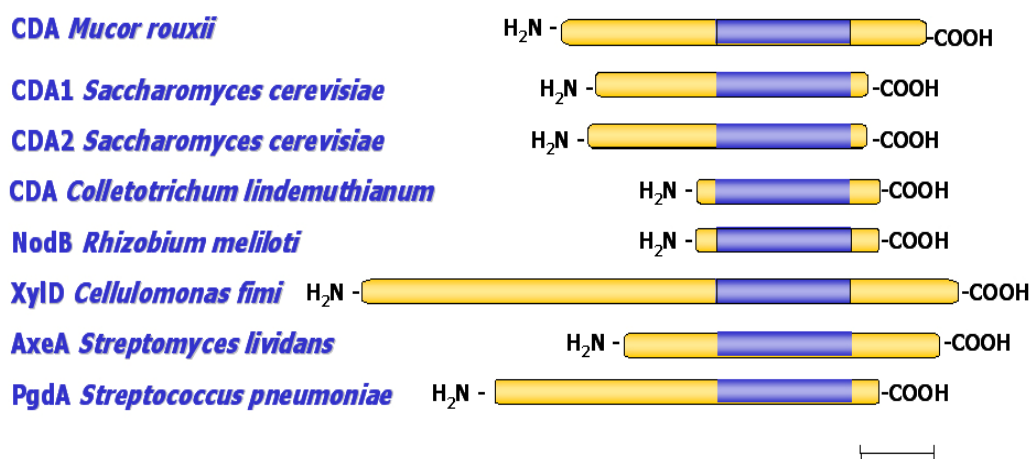
Επίσης ολιγομερή χιτίνης και χιτοζάνης εμφανίζουν κάποιες ενδιαφέρουσες φυσιολογικές δράσεις (αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές) (Shahidi, 1999 & Shigemasa, 1996).

1.2 Οικογένεια 4 εστερασών υδατανθράκων (CE-4 family)

Στην οικογένεια CE-4 (σύμφωνα με την ταξινόμηση Henrissat) ανήκουν οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών, οι οποίες περιλαμβάνουν τις:

- ✚ απακετυλάσες χιτίνης
- ✚ εστεράσες ακετυλ-ξυλάνης
- ✚ ξυλανάσες A, C, D και E
- ✚ απακετυλάσες χιτοολιγοσακχαριτών των ριζοβίων NodB
- ✚ απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης

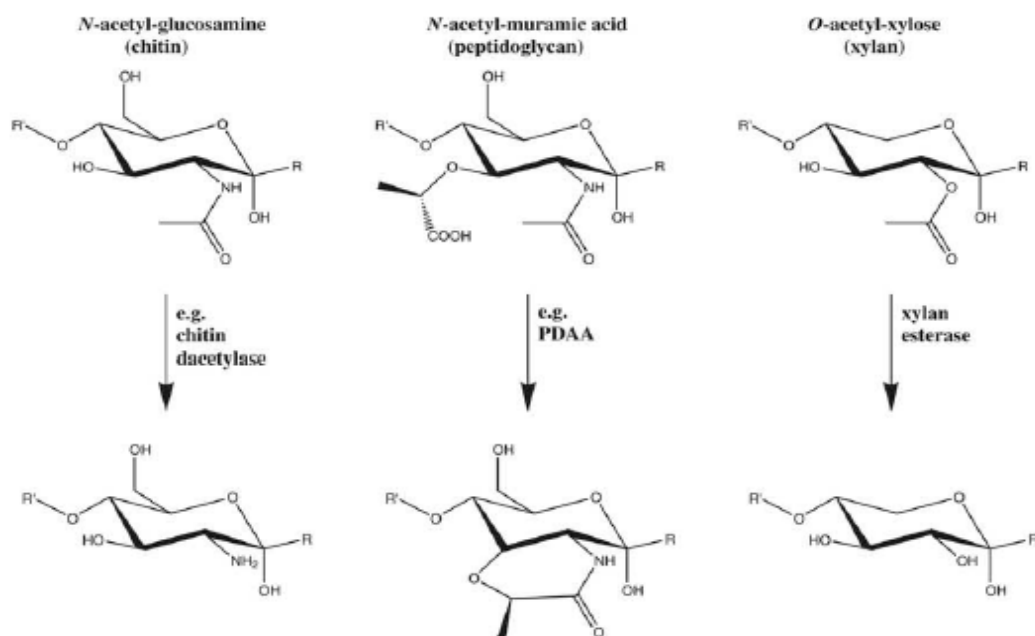
Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν από κοινού μια γενική συντηρημένη περιοχή που αποκαλείται περιοχή απακετυλίωσης πολυσακχαριτών ή NodB περιοχή (Kafetzopoulos, 1993).



Εικόνα 3: Σύγκριση ενζύμων της οικογένειας CE 4. Η συντηρημένη NodB περιοχή εμφανίζεται με μπλε χρώμα.

Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας ενζύμων καταλύουν την υδρόλυση είτε αζωτο-συνδεδεμένων ακετυλομάδων από κατάλοιπα N-ακετυλγλυκοζαμίνης (απακετυλάσες χιτίνης, NodB και απακετυλάσες N-ακετυλγλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης), ή οξυγονο-συνδεδεμένων ακετυλομάδων από κατάλοιπα O-

ακετυλξυλόζης (εστεράσες ακετυλ-ξυλόζης και ξυλανάσες). Εμφανίζουν ιδιαίτερη θερμική σταθερότητα στη βέλτιστη θερμοκρασία και μία αυστηρή ειδικότητα για υδατοδιαλυτά πολυμερή β -(1,4)-συνδεδεμένα *N*-ακετυλ-*D*-γλουκοζαμίνης (ανασκόπηση Tsigos, 2000).



Εικόνα 4: Υποστρώματα που αναγνωρίζουν οι εστεράσες της CE4 και οι αντιδράσεις που καταλύουν.

Η απακετυλάση χιτοολιγοσακχαριτών των ριζοβίων NodB, το πρώτο ένζυμο της οικογένειας που περιγράφηκε λεπτομερώς, απακετυλιώνει κατάλοιπα *N*-ακετυλ-γλουκοζαμίνης με σκοπό τη σύνθεση των παραγόντων NodB, δηλαδή των βακτηριακών σημάτων δημιουργίας ροζιδίων που ελέγχουν τη συμβιωτική σχέση με τα ψυχανθή φυτά (John, 1993). Ακολούθησε η διαπίστωση ότι οι απακετυλάσες χιτίνης (CDAs) περιέχουν επίσης μια περιοχή ομολογίας NodB (Kafetzopoulos, 1993). Οι CDAs έχουν χαρακτηριστεί σε διάφορους μύκητες και έντομα και αποτελούν τα ένζυμα τροποποίησης της χιτίνης σε χιτοζάνη (Martinou, 2003). Οι απακετυλάσες της χιτίνης (EC 3.5.1.41) καταλύουν την υδρόλυση *N*-ακεταμιδο δεσμών στην χιτίνη κι έτσι παράγεται η χιτοζάνη και απελευθερώνεται οξικό οξύ. Η παραγωγή χιτοζάνης μέσω ενζυμικής κατάλυσης αναμένεται ότι θα ξεπερνά τα προβλήματα της χημικής διαδικασίας και θα οδηγήσει σε ένα προϊόν με τεράστια πλεονεκτήματα και εφαρμογές. Οι εστεράσες ακετυλ-ξυλόζης και οι ξυλανάσες

αποτελούν τροποποιητικά ένζυμα της ξυλάνης που εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και υδρολύουν την ακετυλομάδα και τον γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ καταλοίπων Ο-ακετυλξυλόζης, αντίστοιχα. Τέλος, οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης αποτελούν τα πιο πρόσφατα βιοχημικά χαρακτηρισμένα ένζυμα της οικογένειας και απακετυλιώνουν κατάλοιπα Ν-ακετυλγλυκοζαμίνης και Ν-ακετυλμουραμικού στην πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού τοιχώματος (Vollmer, 2000, Fukushima, 2002 & Psylinakis, 2005).

Ωστόσο, μελέτες σχετικά με την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα ή μη χρήσης των ενζύμων αυτών σε διάφορα υποστρώματα της οικογένειας, δίνοντας τη δυνατότητα για χρήσιμα συμπεράσματα σε ότι αφορά την εξειδίκευση σε υποστρώματα των συγκεκριμένων ενζύμων. Έτσι, έχει παρατηρηθεί η ικανότητα απακετυλασών χιτίνης να δράσουν σε ξυλάνη καθώς και η απακετυλίωση υποστρωμάτων χιτίνης από εστεράσες ακετυλο-ξυλάνης (Caufrier, 2003 & Morley, 2006). Επίσης, οι απακετυλάσες Ν-ακετυλγλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης αναγνωρίζουν διαλυτά υποστρώματα χιτίνης καθώς και χιτοολιγομερή.

Πολλά ένζυμα της οικογένειας 4 των εστερασών υδατανθράκων εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα παρουσία δισθενών μεταλλικών κατιόντων (συνήθως Co^{2+} και Zn^{2+}) (Blair, 2005 & Psylinakis, 2005). Δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή ομολογίας NodB σχηματίζει δομή $(\beta/\alpha)_8$ βαρελιού και το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών περιλαμβάνει συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδινών και ασπαρτικών οξέων που συμμετέχουν στην κατάλυση. Το μεταλλικό ιόν στο ενεργό κέντρο διαφέρει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας και συντονίζεται από διαφορετικά κατάλοιπα (Blair, 2004 & Blair, 2005).

1.2.1 Βιολογικός ρόλος των απακετυλασών της χιτίνης.

Απακετυλάσες της χιτίνης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μύκητες (*Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*) (ανασκόπηση Tsigos, 2000).

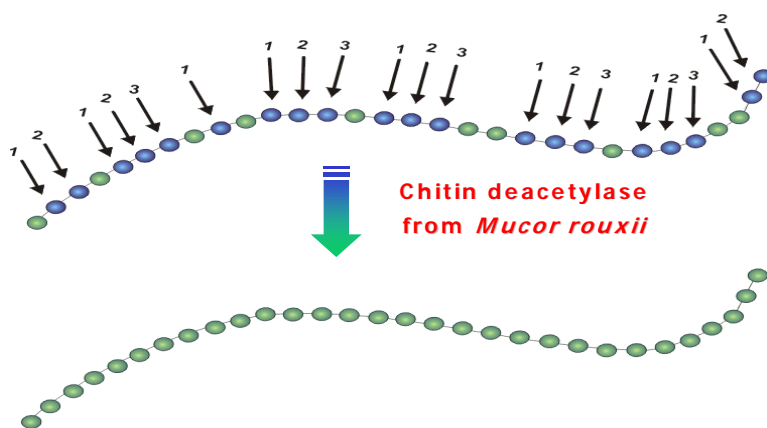
Οι απακετυλάσες της χιτίνης στους μύκητες συμμετέχουν στη δημιουργία του κυτταρικού τους τοιχώματος και φαίνεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου.

1) Στην περίπτωση του μύκητα *M. rouxii* και του *A. coerulea*, έχειδειχθεί ότι η συνθάση της χιτίνης δρα διαδοχικά με την απακετυλάση της χιτίνης για τον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος κατά την βλαστική φάση ανάπτυξης (Gao, 1995 & Davis, 1984). Στον *S. cerevisiae* οι απακετυλάσες της χιτίνης χρειάζονται για την σωστή δημιουργία του τοιχώματος του ασκοσπορίου κατά την φάση της σπορίωσης (Christodoulidou, 1996).

2) Στον μύκητα *C. lindemuthianum*, η απακετυλάση της χιτίνης βρίσκεται εξωκυτταρικά και δρα σε ολιγομερή χιτίνης τα οποία όταν απακετυλιωθούν χάνουν την ικανότητα τους να προάγουν αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού (Vander, 1998). Επιπλέον, έχει προταθεί ένας ρόλος των απακετυλασών χιτίνης στη διαδικασία εισβολής των υφών του μύκητα σε ιστούς του φυτού. Η ενζυματική απακετυλίωση μπορεί να προστατεύει τις υφές, αφού μειωμένα επίπεδα ακετυλίωσης έχουν ως αποτέλεσμα τη λιγότερο αποτελεσματική υδρόλυση της χιτίνης από τις φυτικές ενδοχιτινάσες (Mendgen, 1996 & El Gueddari, 2002).

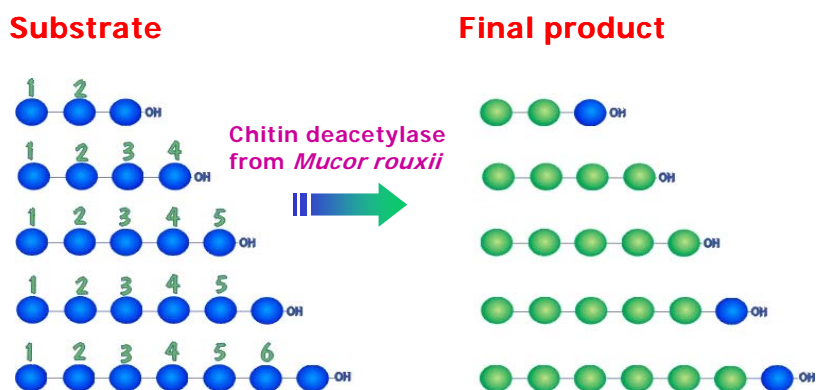
1.2.2 Τρόπος δράσης απακετυλασών χιτίνης.

Ο τρόπος δράσης (mode of action) απακετυλασών της χιτίνης έχει μελετηθεί σε ολιγομερή χιτίνης και σε πολυμερή χιτοζάνης (Tokuyasu, 1997 & Tsigos, 1999). Για το ένζυμο από το *Mucor rouxii* έχειδειχθεί ότι απακετυλιώνει μερικώς απακετυλιωμένα πολυμερή χιτοζάνης με το μηχανισμό πολλαπλής δράσης (Multiple attack). Κατά αυτό το μηχανισμό το ένζυμο υδρολύει τρεις ακετυλομάδες στη σειρά και στη συνέχεια αποσυνδέεται από το υπόστρωμα (Martinou, 1993).



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης της απακετυλάσης της χιτίνης από *Mucor rouxii* σε μερικώς απακετυλιωμένες χιτοζάνες.

Επίσης βρέθηκε ότι το ίδιο ένζυμο απακετυλιώνει χιτοολιγομερή με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο του δύο, αφαιρώντας αρχικά την ακετυλομάδα από το μη ανάγον άκρο και στη συνέχεια τις υπόλοιπες με σειριακό μηχανισμό (Tsigos, 1999).



Εικόνα 6: Τρόπος δράσης της απακετυλάσης της χιτίνης από τον *Mucor rouxii* σε χιτοολιγοσακχαρίτες. Με πράσινο χρώμα δείχνονται οι θέσεις απακετυλίωσης.

Ολιγομερή υποστρώματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την διαλεύκανση του τρόπου δράσης της απακετυλάσης της χιτίνης από το *C. lindemuthianum* (ATCC 56676) για την οποία βρέθηκε ότι απακετυλιώνει ακολουθώντας το μηχανισμό πολλαπλής αλυσίδας (Multiple chain). Κατά το μηχανισμό αυτό το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση μόνο μιας ακετυλομάδας σε κάθε σύνδεση του με το υπόστρωμα (Hekmat 2002, Tokuyasu, 1997 & Tokuyasu, 2000). Ο διαφορετικός τρόπος απακετυλίωσης έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει το διαφορετικό βιολογικό ρόλο της απακετυλάσης της χιτίνης στους μύκητες *M. rouxii* και *C. lindemuthianum*.

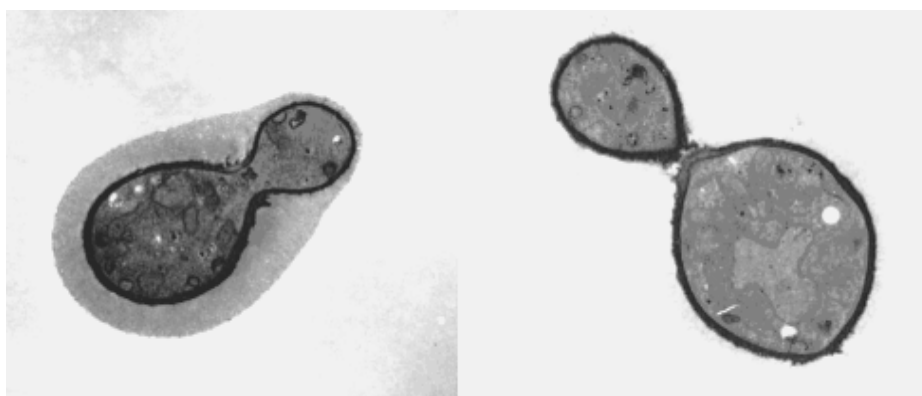
1.3 Ο παθογόνος μύκητας *Cryptococcus neoformans*.

Ο *Cryptococcus neoformans* είναι ένα κοινό ευκαιριακό παθογόνο διαδεδομένο σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρόλο που ο *C. neoformans* σπάνια μολύνει άτομα με υγιές ανοσοποιητικό σύστημα, προσβάλλει με πολύ μεγάλη συχνότητα άτομα με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για παράδειγμα ασθενείς που πάσχουν από AIDS (Levitz, 2001). Ο *C. neoformans* έχει την ικανότητα είτε απλώς να αποικεί στο αναπνευστικό σύστημα του ξενιστή του χωρίς να εκδηλώνεται ασθένεια ή ακόμα και να εισβάλλει στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στην πραγματικότητα μπορεί να διασπαρεί από μία τοπική μόλυνση και να μολύνει κάθε όργανο του ανθρώπινου οργανισμού (Perfect, 2005). Σε σοβαρές καταστάσεις η μόλυνση του πνεύμονα από τον *C. neoformans* εξελίσσεται σε μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, που είναι θανατηφόρα αν δεν θεραπευτεί εγκαίρως (Bose, 2003).

Κύριοι παράγοντες μολυσματικότητας του *C. neoformans* είναι:

- ❖ η πολυσακχαρική του κάψα
- ❖ η εναπόθεση μελανίνης στο κυτταρικό του τοίχωμα
- ❖ η ικανότητα του να αναπτύσσεται στους 37°C.

1) Η πολυσακχαρική κάψα περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα και αποτελείται από γλουκουρονοξυλομαννάνη (GXM) (90%) και γαλακτοξυλομαννάνη (GalXM) (7%) (Vaishnav, 1998 & Bhattacharjee, 1984). Αυτή η δομή αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο στην φαγοκυττάρωση του μύκητα, εμποδίζει την παραγωγή προφλεγμονοδών κυτοκινών, τη δράση του συμπληρώματος (Buchanan, 1998), επιδεινώνει το εγκεφαλικό οίδημα και παρεμβαίνει στην αντιγονοπαρουσίαση (Collins, 1991).



Εικόνα 7: Φωτογραφία από μικροσκόπιο ηλεκτρονικής διέλευσης του *C. neoformans* που απεικονίζει τη χαρακτηριστική πολυσακχαρική κάψα.

2) Ο *C. neoformans*, παρουσία των κατάλληλων υποστρωμάτων, παράγει τη μελανίνη η οποία εναποτίθεται στο κυτταρικό του τοίχωμα. Κατά τη διάρκεια μόλυνσης η παραγωγή μελανίνης εμποδίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή (Huffnagle, 1995), προστατεύει τα κύτταρα του μύκητα από αντιοξειδωτικές ουσίες και από την φαγοκυττάρωση (Casadevall & Perfect, 1998), επιτρέποντας στο παθογόνο να είναι πιο μολυσματικό σε σχέση με στελέχη που δεν παράγουν μελανίνη (Barluzzi, 2000). Επιπλέον, τα μελανοκύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα στις αντιμυκητιακές επιδράσεις φαρμάκων (van Duin, 2002). Έτσι, η μελανίνη αυξάνει τη μολυσματικότητα του *C. neoformans* προστατεύοντας τον από αντιμικροβιακούς αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. (Polacheck, 1982).

3) Η ικανότητα του *C. neoformans* να αναπτύσσεται στους 37°C είναι ένας κοινός φαινότυπος για ενδοκυτταρικά παθογόνα θηλαστικών. Αυτό το χαρακτηριστικό του επιτρέπει να επιβιώνει και να αναπτύσσεται στον ξενιστή του.

Μέχρι σήμερα δυστυχώς οι συμβατικές αντιμυκητιακές θεραπείες έχουν αποδειχτεί ανεπαρκείς, με συνέπεια να υπάρχει αυξημένη ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών στρατηγικών για τον περιορισμό και την αντιμετώπιση του *C. neoformans*. Έχει προταθεί ότι το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα μπορεί να αποτελέσει άριστο στόχο για ανάπτυξη τέτοιου είδους στρατηγικών.

1.3.1 Χιτίνη και χιτοζάνη στον *Cryptococcus neoformans*.

Στον *C. neoformans* έχει βρεθεί ότι η χιτίνη και η χιτοζάνη υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα κυττάρων που μεγαλώνουν βλαστικά ενώ τα επίπεδα και των δύο πολυμερών ανεβαίνουν εντυπωσιακά καθώς αυξάνεται η πυκνότητα των κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια.

Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *C. neoformans* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φάση της ανάπτυξης. Όταν τα κύτταρα διαιρούνται ενεργά, υπάρχει μικρή αλλαγή στην ποσότητα της χιτίνης και της χιτοζάνης στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά, καθώς τα κύτταρα περνούν από το τέλος της λογαριθμικής στην σταθερή φάση τα δύο πολυμερή αυξάνονται (Banks, 2005).

1.3.2 Ανοσοενεργές απακετυλάσες της χιτίνης στον *Cryptococcus neoformans*.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις απακετυλάσες πολύσακχαριτών στον *C. neoformans*, τρεις από τις οποίες παρουσιάζουν ανοσολογικό ενδιαφέρον. Όλες εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με απακετυλάσες της χιτίνης που έχουν απομονωθεί από άλλους μύκητες.

Η MP98 είναι μία ανοσοενεργή μαννοπρωτεΐνη του *C. neoformans*. Οι μαννοπρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί ως κύρια αντιγόνα που ενεργοποιούν απόκριση T λεμφοκυττάρων στον *C. neoformans*. (Levitz, 2001). Η MP84 είναι μία μαννοπρωτεΐνη που αντιδρά πιο έντονα σε σχέση με τα άλλα εξωκυτταρικά προϊόντα με συστατικά του ορού από ασθενείς και πειραματικά ζώα (Biondo, 2005). Η D25 είναι μία πρωτεΐνη που επάγει καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας (DTH) και ενεργοποιεί τα CD4+ T κύτταρα τα οποία αναπτύσσουν μία προστατευτική απόκριση που σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής IL-2 και IFN-γ. Ανοσοποίηση με την φυσική ή την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα την παράταση επιβίωσης και τη μείωση μυκητιακού φορτίου στα ποντίκια που είχαν προκληθεί από ένα στέλεχος του *C. neoformans*. (Biondo, 2003 & Biondo, 2002).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο μύκητας *Cryptococcus neoformans* είναι ένα κοινό ευκαιριακό παθογόνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Στο κυτταρικό τοίχωμα του *C. neoformans* εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό η χιτίνη, μέρος της οποίας είναι απακετυλιωμένο σε χιτοζάνη. Τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στα μονοπάτια σύνθεσης της χιτίνης και της χιτοζάνης αποτελούν πολύ καλούς στόχους για μελλοντικά αντιμυκητιακά φάρμακα λόγω της σημασίας τους για την ακεραιότητα του κυττάρου και της απουσίας τους στον άνθρωπο.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε μια απακετυλάση πολυσακχαριτών, η D25, από τον μύκητα *Cryptococcus neoformans*. Σε προηγούμενη μελέτη η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από *E.coli* είχε βρεθεί ότι μπορούσε να παράγει καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας (DHT) αλλά και ανοσολογικές αποκρίσεις.

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι το ένζυμο D25 είναι απακετυλάση χιτίνης. Το γονίδιο *d25* κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στον μύκητα *Kluyveromyces lactis* και το ανασυνδυασμένο ένζυμο απομονώθηκε σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης, χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και υπολογίστηκαν οι κινητικές του παράμετροι. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου και η ανάπτυξη αναστολέων του ενζύμου και η παραγωγή εμβολίων κατά της κρυπτοκοκκίωσης.

2.ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

- Το πλήρες *K. lactis* Protein Expression Kit (Recombinant Protein Expression in Yeast) προσφέρθηκε από την εταιρεία New England Biolabs.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB).
- Τα κύτταρα *Escherichia coli* DH5a που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρεία Novagen.
- Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων καθώς και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα δράσης τους είναι από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology και New England Biolabs.
- Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των μυκήτων ήταν της εταιρείας Difco Laboratories και Merck.
- Η προμήθεια των χρωματογραφικών υλικών S Sepharose fast flow, Q Sepharose fast flow και Sephacryl S200 HR έγινε από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH. Από την Pharmacia ήταν επίσης και οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.
- Η φλουορεσκαμίνη (fluorescamine), που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινών, προμηθεύτηκε από την εταιρεία Biochemica. Η προμήθεια N-ακετυλοχιτοολιγοσακχαριτών έγινε από την εταιρεία Sigma Chemicals και την Seikagaku Corporation.

- Τα φίλτρα υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν (YM10) ήταν από την Amicon. Ο [H³] οξικός ανυδρίτης προμηθεύτηκε από την New England Nuclear.
- Η συσκευή FLUOstar Galaxy προμηθεύτηκε από την εταιρεία BMG Labtechnologies GmbH

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης D25 χρησιμοποιήθηκε το *K. lactis* Protein Expression Kit, το οποίο επιτρέπει την κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει στον μύκητα *Klueyveromyces lactis*.

Για το συγκεκριμένο γονίδιο εφαρμόστηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο του *K. lactis* Protein Expression Kit η στρατηγική κλωνοποίησης I κατά την οποία προβλέπεται φυσικό αμινοτελικό άκρο στην παραγόμενη πρωτεΐνη (*K. lactis* Protein Expression Kit Instruction Manual).

Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά οι διαδικασίες που οδήγησαν στην κατασκευή των μετασχηματισμένων κυττάρων *K.lactis* GG799 με το γονίδιο *d25* (Nikiforaki, MSc thesis).

- ✚ Απομόνωση του γονιδίου από προϋπάρχουσες κατασκευές DNA χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές με PCR.

Εκκινητές	Αλληλουχία ^b
d25FWXhoI	5' CCG CTCGAG AAAAGAATGGCGACCGTCGAAACTATC 3'
d25RVBglII	5' GGA AAGATCT TTTAGCATTGCCAAGAGCTATCCCTC 3'

^b: με έντονα πλάγια γράμματα υποδεικνύονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων

- ✚ Πέψη των PCR fragments και του pKLAC1 φορέα με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.
- ✚ Ακολουθεί η αντίδραση συγκόλλησης (ligation).
- ✚ Η πλασμιδιακή κατασκευή pKLAC1 χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό χημικά επιδεκτικών κυττάρων DH5a .
- ✚ Οι αποικίες που φέρουν την πλασμιδιακή κατασκευή αναγνωρίζονται με PCR και ακολούθως με διπλή πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.
- ✚ Ευθυγράμμιση της πλασμιδιακής κατασκευής pKLAC1.
- ✚ Μετασχηματισμός των κυττάρων *K. lactis* GG799.
- ✚ Συντήρηση μετασχηματισμένων κυττάρων *K. Lactis* που περιέχουν την κασέτα έκφρασης με αποθήκευση στους -70°C σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v) αποστειρωμένης γλυκερόλης.

2.2.1 Ανάκτηση μετασχηματισμένων κυττάρων

Για την ανάκτηση των κυττάρων, απαιτείται streaking σε ένα πιάτο με YCB (Yeast Carbon Base) θρεπτικό υλικό με 5 mM ακεταμίδιο. Μετά από αυτή την αρχική ανάπτυξη των ανακτημένων κυττάρων σε πιάτο με θρεπτικό υλικό επιλογής τα κύτταρα μπορούν να μεγαλώνουν σε πλούσιο θρεπτικό υλικό (π.χ YPGal).

2.2.2 Ανάπτυξη των κυττάρων για ανίχνευση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης

Συλλέγονται κύτταρα από μία περιοχή $\sim 2\text{mm}^2$ με ένα αποστειρωμένο tip και επαναδιαλύονται σε 2ml YPGal θρεπτικό υλικό. Οι καλλιέργειες επωάζονται με ανάδευση (~ 250 r.p.m.) στους 30°C . Η διάρκεια ανάπτυξης ποικίλει ανάλογα την εκκρινόμενη πρωτεΐνη. Γενικά, οι καλλιέργειες αναπτύσσονται τουλάχιστον τρεις ημέρες. Από την ημέρα αυτή και έπειτα αναλύεται το υπερκείμενο των καλλιεργειών ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη διάρκεια ανάπτυξης κατά την οποία επιτυγχάνεται μέγιστη έκκριση της πρωτεΐνης. Μία μικρή ποσότητα καλλιέργειας συλλέγεται, φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο μαζεύεται σε ένα νέο δοκιμαστικό σωλήνα και αποθηκεύεται στους 4°C .

Για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη ο χρόνος ανάπτυξης στο στερεό θρεπτικό μέσο καθορίστηκε στις 3 ημέρες και η βέλτιστη διάρκεια ανάπτυξης στο υγρό θρεπτικό μέσο στις 4 ημέρες.

Μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες (≥ 1 L) μπορούν να γίνουν και να ακολουθήσει καθαρισμός της πρωτεΐνης. Το θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με 1:100 αραιώση από μία φρέσκια κορεσμένη καλλιέργεια.

2.2.3 Υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης D25 σε κύτταρα *K.lactis*

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται αρχικά streaking των μετασχηματισμένων *K.lactis* κυττάρων από το glycerol stock σε YCB θρεπτικό μέσο και αφήνεται να αναπτυχθεί στους 30°C για 3 ημέρες, όπου και εμφανίζονται αποικίες του μύκητα. Στη συνέχεια από το τρυβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα συλλέγονται αποικίες με τις οποίες μολύνεται υγρή καλλιέργεια YPGal και ακολουθεί επώαση στους 30°C υπό ανάδευση μέχρι κορεσμού της καλλιέργειας, διαδικασία που διαρκεί 3 ημέρες. Έπειτα, προστίθενται 10 ml της προκαλλιέργειας σε 1lt φρέσκου θρεπτικού μέσου YPGal (αραιώση 1/100) και ακολουθεί επώαση στους 30°C για 4 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται (15 λεπτά στις 3.200rpm, στους 4°C), συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο και συγκεντρώνεται με συσκευή AMICON και αέριο άζωτο.

2.2.4 Απομόνωση της απακετυλάσης χιτίνης D25

Χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow:

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το προηγούμενο στάδιο φορτώθηκε σε προσροφητή SP Sepharose fast flow, ο οποίος αρχικά εξισορροπήθηκε με 50mM Tris-HCl pH 5.5 (διάλυμα A). Ο προσροφητής εκπλύθηκε με το διάλυμα A και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε κλάσματα όγκου 10ml με σταδιακή διαβάθμιση NaCl (0M-1M). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη δεν εκλούστηκε σε κάποιο από τα κλάσματα, αλλά στον νεκρό όγκο και στο wash της στήλης χρωματογραφίας (αρνητική χρωματογραφία). Στη συνέχεια τα τελευταία ενώθηκαν και υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση σε διάλυμα B (25mM Tris-HCl pH 8.0).

Χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το προηγούμενο βήμα φορτώθηκε εκ νέου σε προσροφητή Q Sepharose fast flow, ο οποίος εξισορροπήθηκε με διάλυμα B και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε κλάσματα όγκου 10ml με σταδιακή διαβάθμιση NaCl (0M-1M). Τα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα και ποσότητα πρωτεΐνης αναμίχθηκαν και υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση σε διάλυμα 25mM Tris-HCl pH 7.6 / 200mM NaCl.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε προσροφητή Sephacryl S200 HR :

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος αποτέλεσε το τελευταίο στάδιο καθαρισμού του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους συλλέγονται γρηγορότερα μιας και δεν περνούν μέσα από τους πόρους του υλικού της στήλης ενώ οι μικρότερου μοριακού βάρους καθυστερούν στο εσωτερικό των πόρων. Αφού η στήλη χρωματογραφίας εξισορροπηθεί με διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.6 / 200mM NaCl, φορτώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα, ακολουθεί έκλυση με το διάλυμα εξισορρόπησης (2 όγκοι στήλης) και συλλέγονται τα εκλούόμενα κλάσματα. Τα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα και ενεργότητα απακετυλάσης της χιτίνης ελέγχονται σε πηκτή ακρυλαμίδης καθώς και με τη ραδιομετρική μέθοδο μέτρησης της ενεργότητας, συγκεντρώνονται και διατηρούνται σε 50% γλυκερόλη στους -20 °C.

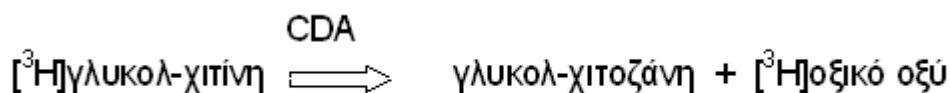
Παράλληλα, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται και για να διαπιστώσουμε την κατάσταση πολυμερισμού της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, επαναλαμβάνεται η διαδικασία φορτώνοντας στην κολώνα διάφορους πρωτεϊνικούς μάρτυρες μοριακών βαρών, ώστε να υπολογιστεί το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή. Από τη διαδικασία αυτή και από την εικόνα που προκύπτει μετά την ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συμπεραίνεται ο βαθμός πολυμερισμού της προς μελέτη πρωτεΐνης.

2.2.5 Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης χιτίνης D25

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της D25 χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές μέθοδοι που κάθε μια παρείχε διαφορετικά πλεονεκτήματα ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας στην οποία χρησιμοποιήθηκαν:

A. Ραδιομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης.

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε γλυκολ-χιτίνη (υδατοδιαλυτό παράγωγο της χιτίνης) με τις τροποποιήσεις και τις βελτιώσεις που περιγράφονται σε άλλη εργασία (Araki, 1980). Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί η ποσότητα ραδιοσημασμένου οξικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την ενζυμική απακετυλίωση της ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Αντίδραση παραγωγής ραδιοσημασμένου οξικού οξέος από ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη.

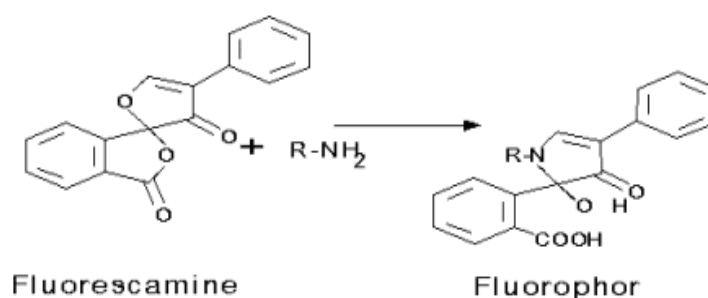
Ραδιομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου οξικού οξέος.

Η αντίδραση απακετυλίωσης για την D25 διεξάγεται σε 50μl τελικό όγκο, με ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM MES pH 6.0, 1mM CoCl₂, 5μl ραδιοσημασμένου υποστρώματος και 27.5μl υπερκείμενο καλλιέργειας. Ο χρόνος επώασης είναι 1h σε θερμοκρασία 50°C. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 100μl διαλύματος 20mM HCl / 50mM CH₃COOH. Στη συνέχεια, το οξικό οξύ εκχυλίζεται από την υδατική φάση με 500μl οξικού αιθυλεστέρα και μετριέται με σπινθηρομετρία.

Σημαντικό πλεονέκτημα της ραδιομετρικής μεθόδου είναι η ταχύτητα, γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης στα υπερκείμενα των καλλιεργειών.

B. Μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε χιτοολιγομερή, μέσω σήμανσης των πρωτοταγών αμινών που προκύπτουν από την αντίδραση.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα μόριο που ονομάζεται φλουορασκαμίνη και έχει την ικανότητα να προσδένεται σε πρωτοταγείς αμίνες δημιουργώντας ένα ιδιαίτερα σταθερό φθορίζον σύμπλοκο. Οι πρωτοταγείς αμίνες παράγονται από την αντίδραση απακετυλίωσης των χιτοολιγομερών. Η παραγωγή πρωτοταγών αμινών ποσοτικοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης που έχει δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκοζαμίνης.



Εικόνα 2. Αντίδραση της fluorescamine με πρωτοταγής αμινομάδες.

Προσδιορισμός του παραγόμενου οξικού οξέος μέσω φθορισμού.

Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί ο φθορισμός που παράγεται με την ένωση της fluorescamine με τις πρωτοταγής αμίνες των χιτοολιγομερών που προέκυψαν από την αντίδραση. Η αντίδραση απακετυλίωσης διεξάγεται σε 50μl

τελικό όγκο, με ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Tris-HCl, pH 6.0, 1mM CoCl₂, 453nmol υποστρώματος και 6,3μg ενζύμου. Ο χρόνος επώασης είναι 1h σε θερμοκρασία 50°C.

Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 50μl διαλύματος βορικού οξέος pH 8.5. Στη συνέχεια, προστίθενται 20μl φλουορεσκεμίνης σε DMF σε συγκέντρωση 2mg/ml και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σήμανσης διακόπτεται με προσθήκη 150μl DMF/H₂O (1:1). Ο φθορισμός ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με την χρήση του Fluostar Galaxy (BMG laboratories).



2.2.6 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών

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

2.2.7 Έλεγχος προτύπου γλυκοζυλίωσης

Για τον έλεγχο του προτύπου γλυκοζυλίωσης της D25 χρησιμοποιήθηκαν οι γλυκοσιδάσες Endo H, PNGase F (για *N*-συνδεδεμένα σάκχαρα) και EFO (για *O*-συνδεδεμένα σάκχαρα) οι οποίες επώαστηκαν με το ένζυμο σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου της New England Biolabs.

2.2.8 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πρόσδεσης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα BSA. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε λόγω της ταχύτητας στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και χρησιμοποιήθηκε σε σύνθετα και καθαρά παρασκευάσματα της απακετυλάσης της χιτίνης D25.

2.2.9 Προσδιορισμός μοριακού βάρους της D25

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους της απακετυλάσης της χιτίνης D25 χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S200 HR.
- Ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 *In silico* εύρεση της αλληλουχίας D25 του *Cryptococcus neoformans* και σύγκριση της με άλλες απακετυλάσες χιτίνης.

Στον *C. neoformans* έχει βρεθεί ότι η χιτίνη και η χιτοζάνη υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα κυττάρων που μεγαλώνουν βλαστικά. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις απακετυλάσες πολύσακχαριτών στον *C. neoformans*, τρεις από τις οποίες παρουσιάζουν ανοσολογικό ενδιαφέρον. Όλες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ομολογίας με απακετυλάσες της χιτίνης που έχουν απομονωθεί από άλλους μύκητες.

(170)	170	180	190	200	210	220	236			
CDA2 yeast (122)	QTFDDG	PSASTTKLLDRLKHN--S---	TFENLGVNI	VQH---	EDIYQRMQKE	GHLLIGSHTW	SHVYLP			
CDA M. rouxii (161)	LTYYDDGP	NCSHNAFYDYLQEQKLLK--	ASMEFYIG	SNVVDW---	PYGAMRGVVD	GHIIASHTW	SHPQMT			
MP84 (128)	LSFDGDP	TDVSPALYDYLQANNISSA	THFMIGGNI	ITS---	PQSVLIAIEA	GGHLAVHTW	SHPYMT			
MP98 (162)	LGFDGDP	NCSHNALYNLLSEN	NQK--	ATMFFIG	SNVMDW---	PLQAMRAHDE	GHQICVHTW	SHQYMT		
D25 (43)	LTFDGDP	PNYEAQVASALDGGK---	GTFFLNGAN	YVCIYDKADE	IRALYDGC	HHTLGSHTW	SHADLT			
Consensus(170)	LTFDGDP	S ALYD L N	AT F IGSNIV	P	MRA DEGH	IASHTW	SH YMT			
(237)	237	250	260	270	280	290	303			
CDA2 yeast (181)	NVSN----	EKIIAQI	EWSIWAMNATGN-H	TPKWF	RPPYGGIDN	VRAITR-Q	FGLQAVLWD	HDTFDW		
CDA M. rouxii (223)	TKTN----	QEVLA	EYYTQKAIK	LATG-L	TPRYWR	PPYGDID	DRVRIAS-Q	LGLTAVIWN	LDTDDW	
MP84 (192)	TITN----	EQVVA	EELGWTMQAL	SDLNCGRI	PLYWR	PPYGDVD	NRVRAIAK	GVFGLVTVL	WSDTNDW	
MP98 (224)	ALSN----	EVVFA	EYTYQKAIK	AVLG-V	TPQCWR	PPYGDVD	NRVRMIAQ	ALNLT	TTI	WSDDTDDW
D25 (106)	QLDESGINE	ALFVELSK	VEDAFVKI	ILG-V	KPRYER	PPYGNINDN	VNLNVL	SERGYTK	VFLW	SDDTGD
Consensus(237)	LSN	E VIAEL	WT AI I G	VTPRYWR	PPYGDID	NRVR IA	GL VLW	DT DW		

Πίνακας 1: Πολλαπλή στοίχιση των απακετυλασών χιτίνης του *C. neoformans* με τις χαρακτηρισμένες απακετυλάσες χιτίνης από τους μύκητες *S. cerevisiae* και *M. rouxii*. Οι μαύρες περιοχές υποδεικνύουν ταυτόσημα κατάλοιπα σε όλες τις αλληλουχίες ενώ οι σκιασμένες τα αμινοξέα που είναι ίδια σε τουλάχιστον 3 αλληλουχίες.

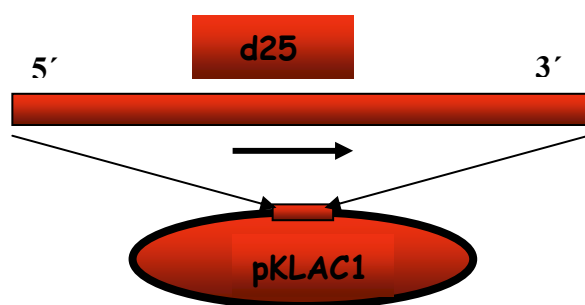
3.2 Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου d25 και παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα *K. lactis*.

Μια από τις βασικές προϋποθέσεις για τη μελέτη της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης είναι η παραγωγή της σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά στα οποία παράγεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου *d25* στον πλασμιαδικό φορέα pKLAC1 και η έκφρασή του

σε κύτταρα *K.lactis*, τα οποία αποτελούν ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Δεδομένου ότι η D25 είναι ευκαρυωτική εκκρινόμενη πρωτεΐνη το σύστημα *K. lactis* Protein Expression Kit θεωρείται πιο κατάλληλο, καθώς με το σύστημα αυτό εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν σε υψηλά επίπεδα (10-15 mg/L) και επιπλέον, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται αφενός εκκρίνονται στο θρεπτικό υλικό και αφετέρου μπορούν εν δυνάμει να φέρουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μία ευκαρυωτική πρωτεΐνη μπορεί να χρειάζεται.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου *d25* στον φορέα έκφρασης pKLAC1 εφαρμόστηκε η στρατηγική κλωνοποίησης I με φυσικό αμινοτελικό άκρο στην παραγόμενη πρωτεΐνη (*K. lactis* Protein Expression Kit Instruction Manual). Αρχικά σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές και ακολούθως έγινε ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου με PCR, πέψη των κομματιών και του φορέα έκφρασης, αντίδραση συγκόλλησης, μετασχηματισμός σε κατάλληλα επιδεκτικά κύτταρα και αναγνώριση των θετικών αποικιών.

Κατόπιν, ο φορέας pKLAC1 που περιέχει τα επιθυμητά γονίδια έγινε ευθύγραμμος για να μπορεί να εντεθεί στο γένωμα του *K. lactis* στο *LAC4* locus. Για το λόγο αυτό γίνεται πέψη των κατασκευών με SacII ώστε να δημιουργηθεί μία «κασέτα έκφρασης». Η εισαγωγή της κασέτας έκφρασης γίνεται με χημικό μετασχηματισμό στα κύτταρα *K. lactis* χρησιμοποιώντας τα *K. lactis* επιδεκτικά κύτταρα GG799 και το αντιδραστήριο NEB Yeast Transformation (*K. lactis* Protein Expression Kit Instruction Manual).



Εικόνα 1: Πλασμιδιακή κατασκευή pKALC1/d25

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ανάπτυξη τους στο Yeast Carbon Base (YCB) Agar θρεπτικό υλικό που περιέχει 5mM ακεταμίδιο. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα ελέγχονται με PCR για την σωστή ένθεση της κασέτας έκφρασης. Μετά από αυτό το στάδιο γίνεται ανάπτυξη των κυττάρων (διαγνωστική σε 2ml YPGal θρεπτικό υλικό) για ανίχνευση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης με ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών από το υπερκείμενο των καλλιιεργειών και μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης, ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη διάρκεια ανάπτυξης για να επιτευχθεί μέγιστη έκκριση της πρωτεΐνης. Τελικά βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες υπερπαραγωγή για την D25 είναι 30⁰C και 4 ημέρες επώασης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη στρατηγική κλωνοποίησης του γονιδίου *d25* σε κύτταρα *K.lactis*, συγκρινόμενη με την κλωνοποίηση σε κύτταρα *E.coli* απέφερε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την τελική ποσότητα της πρωτεΐνης που παρήχθη αλλά και της ενεργότητας της.

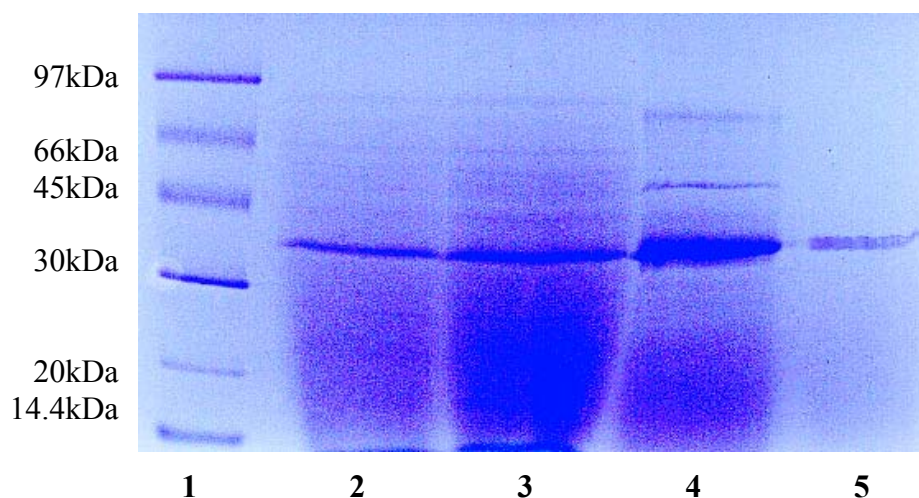
3.3 Απομόνωση της απακετυλάσης χιτίνης D25.

Το σχήμα απομόνωσης της απακετυλάσης της χιτίνης D25 από τον οργανισμό *Cryptococcus neoformans*, ήταν το αποτέλεσμα μιας σειράς πειραμάτων, που είχαν ως στόχο την πλήρη διερεύνηση και κατανόηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του ενζύμου. Έτσι, δοκιμάστηκαν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα με εύρος pH 4.0-8.0, διάφοροι προσροφητές (SP Sepharose fast flow και Q Sepharose fast flow) και στήλη μοριακής διήθησης (Sephacryl S-200 HR) για την τελική απομόνωση καθαρού πρωτεϊνικού παρασκευάσματος.

Τα στάδια και τα αποτελέσματα του σχήματος απομόνωσης της D25 παρουσιάζονται στον πίνακα 1 καθώς και στην εικόνα 2, όπου απεικονίζεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών στα διάφορα στάδια του σχήματος καθαρισμού.

Τύπος Χρωματογραφίας	Column	Buffer A
Ιοντοανταλλαγή	SP Sepharose Fast flow	50mM Formic-Na pH5.5
Ιοντοανταλλαγή	Q Sepharose Fast flow	25mM Tris-Cl pH 8.0
Μοριακή Διήθηση	Sephacryl S-200 HR	20mM Tris-Cl pH7.6 200mM NaCl

Πίνακας2: Χρωματογραφικό σχήμα που ακολουθήθηκε για την απομόνωση της D25



Εικόνα 2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών των σταδίων απομόνωσης στα διάφορα στάδια απομόνωσης της D25.

Στήλη 1: μάρτυρας χαμηλών μοριακών βαρών, Στήλη 2: παρασκεύασμα μετά από προσροφητή S fast flow Sepharose, Στήλη 3: παρασκεύασμα μετά από προσροφητή Q fast flow Sepharose, Στήλη 4: παρασκεύασμα πριν από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, Στήλη 5: υψηλής καθαρότητας ενζυμικό παρασκεύασμα μετά από Sephadex S200.

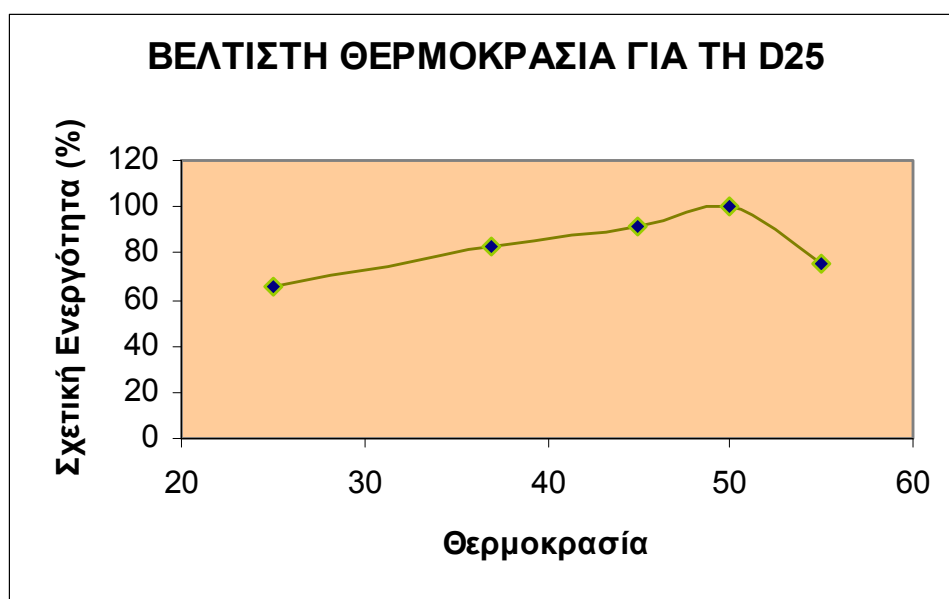
Το εκτιμώμενο μοριακό βάρος του ενζύμου βάση της αμινοξικής του αλληλουχίας είναι 25 kDa. Χρησιμοποιώντας τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης για την εκτίμηση του μοριακού του βάρους, υπολογίστηκε 27,53 kDa, κάτι που συνάδει με το προβλεπόμενο μοριακό του βάρος. Δυστυχώς όπως φαίνεται και παραπάνω, μετά την ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος μας φαίνεται να είναι κοντά στα 35 kDa, κάτι το οποίο είναι αξιοσημείωτο και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.4 Χαρακτηρισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της D25

Για τον χαρακτηρισμό της δραστηριότητας της D25 και την απόκτηση πληροφοριών για την ενζυμική απακετυλίωση συγκεκριμένων υποστρωμάτων, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη σαν υπόστρωμα. Στις μετρήσεις που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκε καθαρό ενζυμικό παρασκεύασμα της D25 και ο χρόνος επώασης ορίστηκε στη 1 ώρα. Τα αποτελέσματα για την δραστηριότητα του ενζύμου είναι τα ακόλουθα:

3.4.1 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης

Πραγματοποιήθηκαν επώσεις σε εύρος θερμοκρασιών 25°C - 55°C με υπόστρωμα την ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη. Η θερμοκρασία, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα για το ένζυμο ήταν οι 50°C (Εικόνα 3).

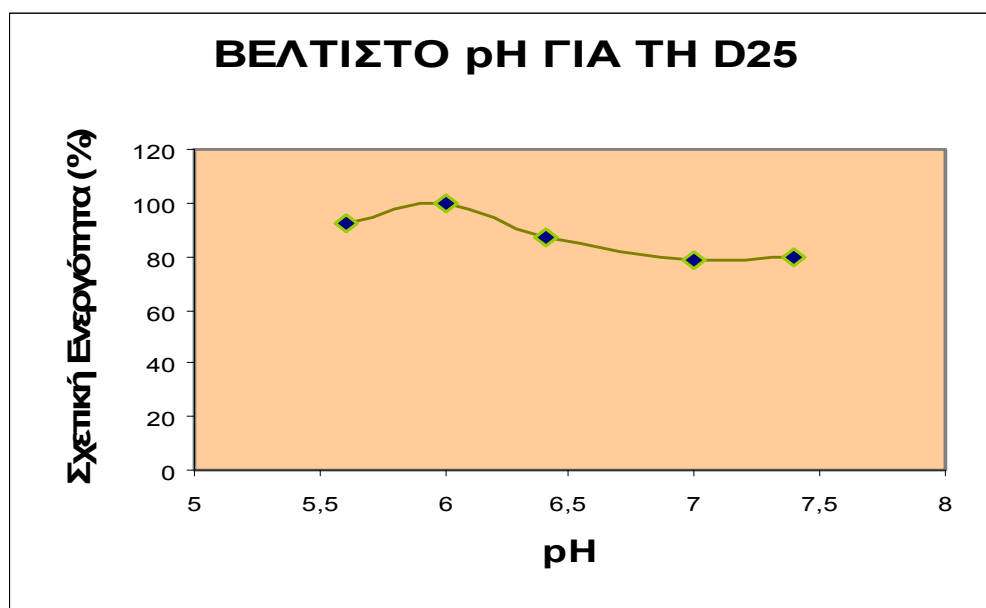


Εικόνα 3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της D25.

Η δραστηριότητα της D25 μετρήθηκε σε διάφορες θερμοκρασίες με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη ως υπόστρωμα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM MES pH 6.0 και χρόνο επώασης 1h.

3.4.2 Βέλτιστο pH δράσης

Πραγματοποιήθηκαν επώσεις σε εύρος pH 5.5-7.5 με υποστρώμα ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη. Το pH, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα για το ένζυμο D25 ήταν το pH 6.0 (Εικόνα 4).



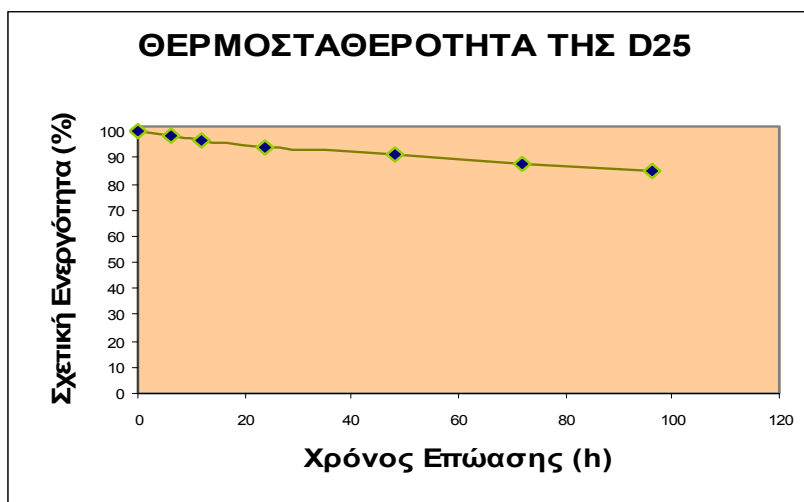
Εικόνα 4. Επίδραση της τιμής του pH στη δραστηριότητα της D25.

Η δραστηριότητα της D25 μετρήθηκε σε διάφορες τιμές pH με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM MES και για χρόνο επώασης 1h, στους 50°C.

3.4.3 Θερμοσταθερότητα της D25

Η μελέτη της θερμοσταθερότητας των ενζύμων αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την κατανόηση του χρονικού εύρους μέσα στο οποίο τα ένζυμα εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και δίνει πληροφορίες σχετικά με το αν κάποιο ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενζυμική απακετυλίωση διαφόρων υποστρωμάτων χιτίνης για παρατεταμένους χρόνους επώασης.

Τα πειράματα θερμοσταθερότητας έδειξαν ότι μετά από προεπώαση του ενζύμου στους 50°C για 96 ώρες, εξακολουθεί να διατηρεί το 85% της ενεργότητας του (Εικόνα 5). Συμπεραίνεται ότι το ένζυμο επιδεικνύει σημαντική θερμοσταθερότητα στην θερμοκρασία αυτή και άρα μπορεί να διατεθεί για χρήση σε παρατεταμένες επώσεις με τα υποστρώματα που αναγνωρίζει.

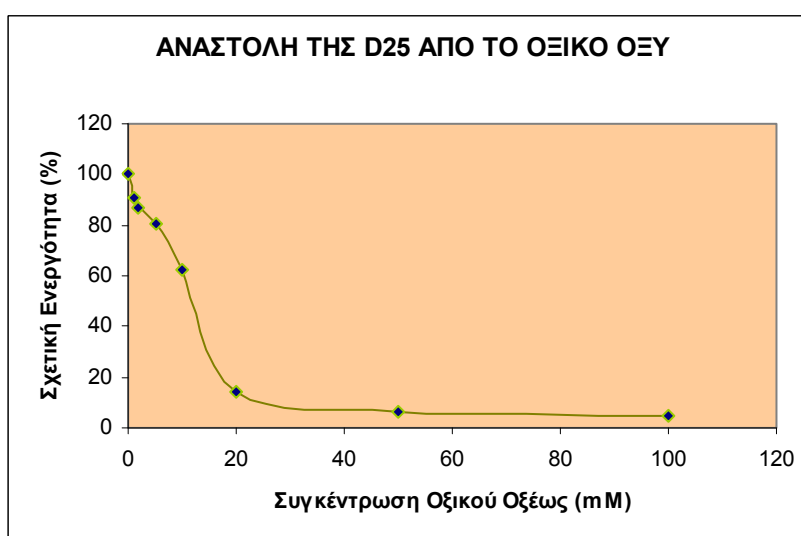


Εικόνα 5. Θερμοσταθερότητα της D25 στους 50°C.

Η θερμοσταθερότητα του ενζύμου εξετάστηκε με προεπάση καθαρού παρασκευάσματος για διάφορα χρονικά διαστήματα στους 50°C. Ακολούθησε η αντίδραση απακετυλίωσης με υπόστρωμα ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα: 25mM MES pH 6.0, στους 50°C.

3.4.4 Επίδραση του οξικού οξέος στη δραστηριότητα της D25

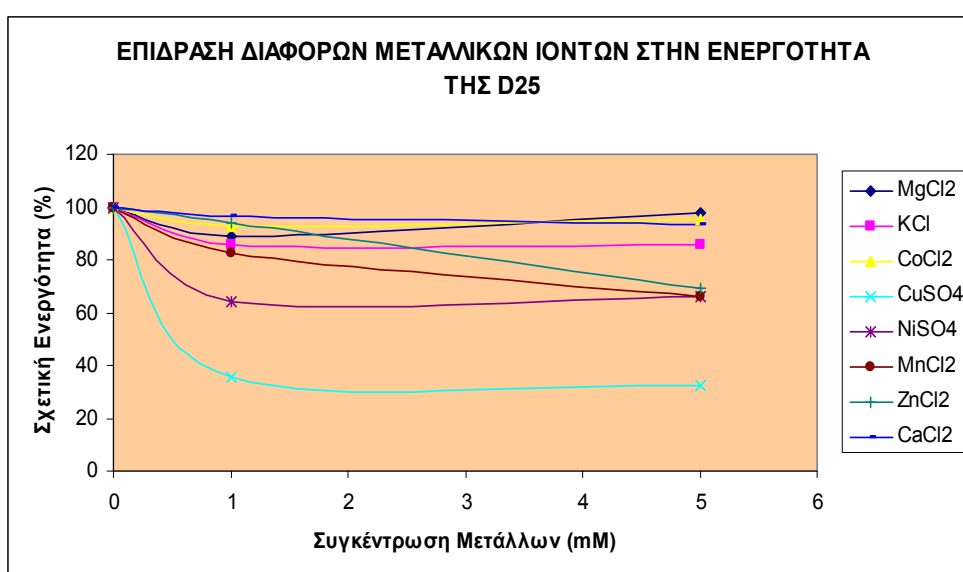
Το οξικό οξύ αποτελεί προϊόν της ενζυμικής απακετυλίωσης, γι' αυτό και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων οξικού οξέος στη δραστηριότητα της D25. Παρατηρήθηκε το ένζυμο αναστέλλεται από το προϊόν ακόμη και σε συγκεντρώσεις 5mM οξικού οξέος (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Επίδραση του οξικού οξέος στη δραστηριότητα της D25.

3.4.5 Επίδραση μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της D25.

Το γεγονός ότι τα ένζυμα, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών CE4 θεωρούνται μεταλλοένζυμα, οδήγησε στη μελέτη της επίδρασης μονοσθενών και δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της D25 (Εικόνα 7). Η μελέτη βασίστηκε σε προηγούμενη αναφορά και χρησιμοποιήθηκαν μέταλλα με τη μορφή χλωριούχων και θειϊκών αλάτων.



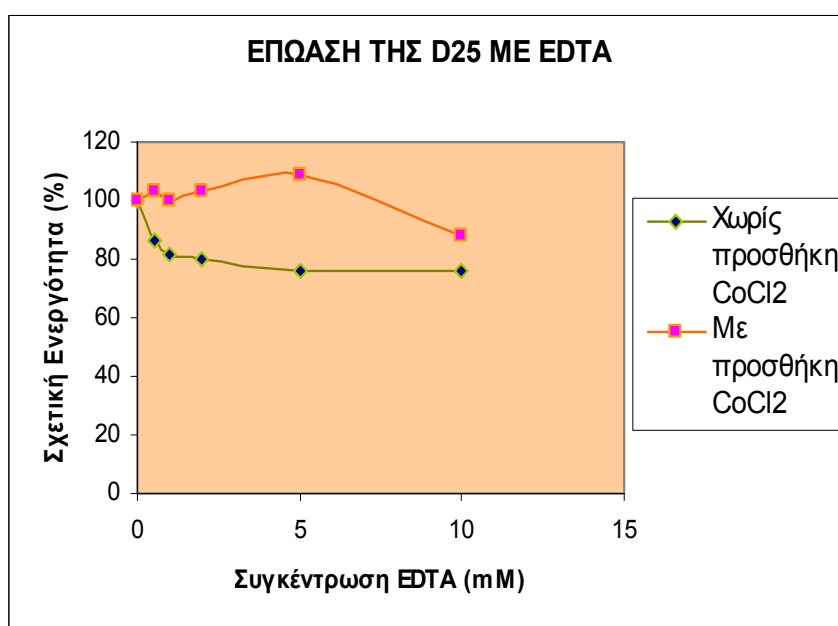
Εικόνα 7. Επίδραση μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της D25.

Η δραστηριότητα της D25 μετρήθηκε με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM MES, pH 6.0, στους 50°C και για χρόνο επώασης 1h, παρουσία διαφόρων μεταλλικών ιόντων.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η D25 αναστέλλεται από την παρουσία μικρών συγκεντρώσεων (1mM) Ni^{2+} και Cu^{2+} , ενώ τα υπόλοιπα μέταλλα φαίνεται να μην επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου.

3.4.6 Επίδραση του EDTA στη δραστικότητα της D25.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση του CoCl_2 στην ενεργότητα της D25, το ένζυμο επώαστηκε με διάφορες συγκεντρώσεις του χηλικού παράγοντα EDTA και στη συνέχεια προστέθηκε εξωγενώς CoCl_2 . Παρατηρήθηκε ότι η δραστικότητα της D25 αυξήθηκε ελαφρώς (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Επίδραση EDTA στη δραστικότητα της D25.

3.5 Έλεγχος του προτύπου γλυκοζυλίωσης του ενζύμου D25.

Μετά την επώαση του ενζύμου με τις γλυκοσιδάσες δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο αποδατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η D25 είτε δεν είναι γλυκοζυλιομένη είτε είναι γλυκοζυλιομένη σε πολύ μικρό ποσοστό.

3.6 Ενζυμική απακετυλίωση υποστρωμάτων χιτίνης του ενζύμου D25.

Για την μελέτη των υποστρωμάτων στα οποία δρα το ένζυμο D25, εκτός από τη γλυκολ-χιτίνη, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* αντιδράσεις απακετυλίωσης με υποστρώματα διάφορα ολιγομερή χιτίνης. Είναι γνωστό ότι τα απακετυλιωμένα N-ακετυλοχιτοολιγομερή παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, χρήσιμες σε πολλές εφαρμογές. Η μελέτη της δράσης του ενζύμου σε χιτοολιγομερή έγινε με επώσεις του με τα υποστρώματα αυτά για διάφορα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε ο υπολογισμός των παραγόμενων ελεύθερων πρωτοταγών αμινών με τη μέθοδο φθορισμού μέσω του χημικής ουσίας φλουορεσκαμίνης (fluorescamine).

Παρατηρείται ότι το ένζυμο απακετυλιώνει σε μεγαλύτερο ποσοστό το χιτοολιγομερές τέτρα-N-ακετυλοχιτοτετραόζη [(GlcNAc)₄], συγκριτικά με τα υπόλοιπα N-ακετυλοχιτοολιγομερή. Επιπλέον, η D25 δεν απακετυλιώνει το μονομερές N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης και απαιτεί τουλάχιστον δύο κατάλοιπα N-ακέτυλ-γλυκοζαμίνης για την κατάλυση.

Εκτός των N-ακετυλοχιτοολιγομερών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και με τα τροποποιημένα κατάλοιπα N-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό (GlcNAc-1P) και N-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό (GlcNAc-6P), καθώς και με τα N-ακετυλγαλακτοζαμίνη (GalNAc) και N-ακετυλμανοζαμίνη (ManNAc). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ενεργότητα της D25 στα τροποποιημένα GlcNAc-1P και GlcNAc-6P ενώ στα GalNAc και ManNAc δεν προέκυψε ενεργότητα. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Substrate	Substrate concentration (mM)	Acetic acid released (nmol)	Relative activity (%)
GlcNAc	2,25	0	0
(GlcNAc) ₂	1,12	18.14	18
(GlcNAc) ₃	0,75	49.28	48.8
(GlcNAc) ₄	0,56	100.8	100
(GlcNAc) ₅	0,45	76.17	75.56
(GlcNAc) ₆	0,38	41	40,67
GlcNAc-1P	2,25	62,3	61,8
(GlcNAc)-6P	1,12	18,85	18,7
GalNAc	0,75	0	0
ManNAc	0,56	0	0

Πίνακας 2. Ενζυμική απακευλίωση *N*-ακετυλοχιτοολιγοσακχαριτών και τροποποιημένων *N*-ακετυλοχιτοολιγοσακχαριτών μετά από 1ώρα επώαση.

Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων προσαρμόστηκε βάση της περιεκτικότητάς τους σε κατάλοιπα *N*-ακετυλομάδων. Η επώαση έγινε στους 50°C για 1h. *GlcNAc*, *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη; *GlcNAc-1P*, *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό; *GlcNAc-6P*, *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό; *GalNAc*, *N*-ακετυλγαλακτοζαμίνη; *ManNAc*, *N*-ακετυλμανοζαμίνη;

3.7 Κινητική ανάλυση.

Για την μελέτη της εξειδίκευσης του ενζύμου καθώς και για τον υπολογισμό των κινητικών της παραμέτρων υπάρχουν τρεις προσεγγίσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- ✚ υπόστρωμα με ραδιοσημασμένες τις ακετυλομάδες του,
- ✚ άμεση φασματοφωτομετρική ανίχνευση του οξικού οξέος,
- ✚ ανίχνευση του οξικού οξέος μέσω εμπορικά διαθέσιμου συζευγμένης ενζυμικής δοκιμής που περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές αντιδράσεις.

Καμία από τις παραπάνω μεθόδους δεν είναι κατάλληλη για ευρείς ελέγχους πολλών διαφορετικών συνθηκών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια εναλλακτική μέθοδος σήμανσης μέσω φθορισμού των ελεύθερων αμινών που παράγονται από την ενζυμική αντίδραση.

Εξετάστηκε η εξειδίκευση του ενζύμου σε διάφορα *N*-ακετυλχιτοολιγομερή καθώς και υπολογίστηκαν οι κινητικές του παράμετροι, οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 4.

	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{sec}$)	K_m (μM)	K_{cat} (sec^{-1})	K_{ef} ($\mu\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)
GlcNAc4	6.4	4	2.9×10^{-3}	7.2×10^{-4}
GlcNAc5	8.03	5	3.6×10^{-3}	4.4×10^{-4}

Πίνακας 4: Κινητικές παράμετροι για την D25.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μύκητας *Cryptococcus neoformans* είναι ένα κοινό ευκαιριακό παθογόνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Ένας από τους κύριους παράγοντες μολυσματικότητας του είναι και η πολυσακχαρική του κάψα, που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα. Η βιογένεση και η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος είναι σημαντικά στοιχεία για την ανάπτυξη, επιβίωση και παθογένεια του *C. neoformans* και συνιστούν ελκυστικούς στόχους αντιμυκητιακής θεραπείας (Reese, 2003 & Fromtling, 1982).

Στο κυτταρικό τοίχωμα του *C. neoformans* εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό η χιτίνη, μέρος της οποίας είναι απακετυλιωμένο σε χιτοζάνη (Banks, 2005). Στον *C. neoformans*, υπάρχουν απακετυλάσες πολυσακχαριτών οι οποίες προάγουν προστατευτικές ανοσολογικές αποκρίσεις στον ξενιστή του μύκητα και επιπλέον εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με απακετυλάσες της χιτίνης από άλλους μύκητες, (Biondo, 2002, Biondo, 2003 Biondo, 2005 & Levitz, 2001).

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση της χιτίνης και της χιτοζάνης αποτελούν πολύ καλούς στόχους για μελλοντικά αντιμυκητιακά φάρμακα λόγω της σημασίας τους για την ακεραιότητα του κυττάρου και της απουσία τους στον άνθρωπο. Επιπλέον, στις ίδιες εργασίες έχει βρεθεί ότι η ανοσοποίηση με τις απακετυλάσες MP98, MP84 και D25 έχει προστατευτικές για τον ξενιστή δράσεις και έτσι οι απακετυλάσες αυτές αποτελούν υποψήφιους αντιγονικούς επιτόπους για την ανάπτυξη εμβολίου για την κρυπτοκοκκίωση.

Έχει βρεθεί ότι η χιτοζάνη διατηρεί την κυτταρική ακεραιότητα και βοηθάει στον διαχωρισμό των εκβλαστημάτων. Επιπλέον διατηρεί το φυσιολογικό μέγεθος της κάψας και η έλλειψη της οδηγεί σε αδυναμία εναπόθεσης της μελανίνης (Baker, 2007). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι Cda1 (TIGR ID: CNF01800), MP98 και η MP84 είναι οι απακετυλάσες που συμμετέχουν στη δημιουργία της χιτοζάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα ενώ η D25 δεν εμπλέκεται τουλάχιστον απευθείας σε αυτή τη διαδικασία κατά την βλαστική φάση ανάπτυξης. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η D25 έχει δράση απακετυλάσης της χιτίνης όταν αυτή απομονώθηκε από κύτταρα *E.coli* (Κουτσιούλης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην προσπάθεια μας να εξακριβώσουμε το ρόλο της συγκεκριμένης απακετυλάσης, στην παρούσα εργασία έγινε υπερέκφραση του γονιδίου *d25* σε

κύτταρα *K.lactis*. Επιπλέον, το ανασυνδυασμένο ένζυμο απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και υπολογίστηκαν οι κινητικές του παράμετροι.

Η D25 έχει απομονωθεί από την *E.coli*, που αποτελεί προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, αλλά δεδομένου ότι πρόκειται για ευκαρυωτική εκκρινόμενη πρωτεΐνη, η απομόνωση της από τον μύκητα *Kluyveromyces lactis* θεωρείται πιο κατάλληλη. Με το ευκαρυωτικό αυτό σύστημα εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εκφραστούν σε υψηλά επίπεδα (10-15 mg/L). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται αφενός εκκρίνονται στο θρεπτικό υλικό και αφετέρου μπορούν εν δυνάμει να φέρουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μία ευκαρυωτική πρωτεΐνη μπορεί να χρειάζεται. Μετά την έκφραση της D25 με τη βοήθεια του *K. lactis* Protein Expression Kit διαπιστώθηκε ότι πρωτεΐνη που παράγεται στον μύκητα είναι πιο ενεργή σε σχέση με αυτή που παράγεται σε κύτταρα *E.coli* (Κουτσιούλης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στη συνέχεια η βιοχημική μελέτη του ενζύμου έδειξε ότι εμφανίζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με ήδη χαρακτηρισμένες απακετυλάσες χιτίνης από άλλους οργανισμούς (*Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*), όπως για παράδειγμα βέλτιστη θερμοκρασία 50°C, παρεμπόδιση της δραστηριότητάς της μετά από προσθήκη οξικού οξέος και εξαιρετική θερμοσταθερότητα (Tsigos 2000).

Κρυσταλλογραφικές μελέτες ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια CE4 έδειξαν την παρουσία ενός συμπλόκου τριών καταλοίπων (δύο ιστιδινών και ενός ασπαρτικού οξέος) με ένα ιόν ψευδαργύρου. Η πλειοψηφία όμως των βιοχημικών μελετών για τα ίδια ένζυμα έφερε στο φως την εντυπωσιακή αύξηση της ενεργότητας αυτών, με την προσθήκη κοβαλτίου στην ενζυμική αντίδραση. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η πλειοψηφία των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια CE4 είναι μεταλλο-εξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία εξαιτίας της βιοδιαθεσιμότητας περιορίζονται στην χρήση ιόντων ψευδαργύρου, ενώ *in vitro* δείχνουν προτίμηση σε πιο σπάνια - στη φύση- μέταλλα όπως το κοβάλτιο ακόμα και το νικέλιο. Για τη D25 κάτι τέτοιο φαίνεται να μην ισχύει, καθώς η προσθήκη διαφόρων μετάλλων δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητά της, εκτός από την παρουσία ακόμα και μικρών συγκεντρώσεων νικελίου και χαλκού που την αναστέλλουν. Διερευνήθηκε επίσης η επίδραση του κοβαλτίου στη δραστηριότητα της D25, όπου διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη του μετάλλου αύξησε ελαφρά την ενεργότητα του ενζύμου, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται η μεγάλη αύξηση η οποία έχει ταυτοποιηθεί σε άλλα ένζυμα της ομάδας CE4.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες μιας απακετυλάσης της χιτίνης από τον μύκητα *Colletotricum lindemuthianum*, η οποία παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ομολογίας με την D25, έδειξαν την παρουσία του ίδιου συμπλόκου τριών καταλοίπων με ένα ιόν ψευδαργύρου, όπως επίσης και την παρουσία της χαρακτηριστικής για τα μέλη της CE4 οικογένειας (β/α)₈ δομής, οπότε κάτι αντίστοιχο θα περιμέναμε να ισχύει και για την D25 (Blair, 2006).

Παράλληλα μετά τον έλεγχο του προτύπου γλυκοζυλίωσης διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο είτε δεν είναι γλυκοζυλιωμένο είτε είναι γλυκοζυλιωμένο σε πολύ μικρό ποσοστό. Μελέτες άλλωστε με βιοπληροφορικά προγράμματα έχουν δείξει ότι η D25 δεν έχει θέση αναγνώρισης για *N*-γλυκοζυλίωση (Biondo, 2002).

Ως προς την εξειδίκευση του σε υποστρώματα, το ένζυμο ήταν σε θέση να απακετυλιώσει την γλυκολ-χιτίνη, *N*-ακετυλ-χιτοολιγομερή καθώς και τα τροποποιημένα κατάλοιπα *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό (GlcNAc-1P) και *N*-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό (GlcNAc-6P), ενώ δεν ήταν σε θέση να απακετυλιώσει το μονομερές κατάλοιπο GlcNAc. Η κινητική ανάλυση της ενζυμικής αντίδρασης με τα χιτοολιγομερή GlcNAc₄₋₅, έδειξε ότι η D25 έχει σαν βέλτιστο υπόστρωμά της το χιτοολιγομερές GlcNAc₄.

4.2 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Για τη περαιτέρω μελέτη του ενζύμου μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η κρυστάλλωση και λύση της δομής της D25, καθώς θα έδινε απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου και θα αποτελούσε εργαλείο μελέτης του καταλυτικού πυρήνα NodB. Κάτι τέτοιο θα έφερνε στο φως τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο, το ρόλο των μεταλλικών ιόντων στην κατάλυση και θα επέτρεπε τη σύγκριση με τη δομή και κατ' επέκταση, το ρόλο άλλων γνωστών απακετυλασών. Επίσης θα μπορούσε να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου σε ολιγομερή υποστρώματα χιτίνης και πολυμερή χιτοζάνης χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) που επιτρέπει την εξακρίβωση του βαθμού απακετυλίωσης από την δράση του ενζύμου πάνω σε υποστρώματα χιτίνης. Επιπλέον θα μπορούσε να διευκρινισθεί εάν το ένζυμο απακετυλιώνει τα υποστρώματα χιτίνης σειριακά ή σε τυχαίες θέσεις.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Banks IR, Specht CA, Donlin MJ, Gerik KJ, Levitz SM, Lodge JK: **A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryot Cell* 2005, **4**:1902-1912.
- Barluzzi R, Brozzetti A, Mariucci G, Tantucci M, Neglia RG, Bistoni F, Blasi E: **Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain.** *J Neuroimmunol* 2000, **109**:75-86.
- Bhattacharjee AK, Bennett JE, Glaudemans CP: **Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*.** *Rev Infect Dis* 1984, **6**:619-624.
- Biondo C, Beninati C, Bombaci M, Messina L, Mancuso G, Midiri A, Galbo R, Teti G: **Induction of T helper type 1 responses by a polysaccharide deacetylase from *Cryptococcus neoformans*.** *Infect Immun* 2003, **71**:5412-5417.
- Biondo C, Beninati C, Delfino D, Oggioni M, Mancuso G, Midiri A, Bombaci M, Tomaselli G, Teti G: **Identification and cloning of a cryptococcal deacetylase that produces protective immune responses.** *Infect Immun* 2002, **70**:2383-2391.
- Biondo C, Messina L, Bombaci M, Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Cusumano V, Gerace E, Papasergi S, Teti G: **Characterization of two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera.** *Infect Immun* 2005, **73**:7348-7355.
- Blair DE, Schuttelkopf AW, MacRae JI, van Aalten DM: **Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:15429-15434.
- Blair DE, van Aalten DM: **Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine.** *FEBS Lett* 2004, **570**:13-19.
- Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL: **A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryot Cell* 2003, **2**:655-663.
- Brant DA: **Conformational theory applied to polysaccharide structure.** *Q Rev*

- Biophys* 1976, **9**:527-596.
- Buchanan KL, Murphy JW: **What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?** *Emerg Infect Dis* 1998, **4**:71-83.
- Casadevall A, Perfect JR: ***Cryptococcus neoformans***. ASM Press 1998, Washington, D.C.
- Caufrier F, Martinou A, Dupont C, Bouriotis V: **Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity.** *Carbohydr Res* 2003, **338**:687-692.
- Chang KL: **Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution.** *Carbohydr. Res* 1997, **303**:327-332.
- Christodoulidou A, Bouriotis V, Thireos G: **Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 1996, **271**:31420-31425.
- Cid VJ, Duran A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M: **Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol Rev* 1995, **59**:345-386.
- Cohen E: **Chitin synthesis and inhibition: a revisit.** *Pest Manag Sci* 2001, **57**:946-950.
- Collins HL, Bancroft GJ: **Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses.** *Infect Immun* 1991, **59**:3883-3888.
- Davis LL, Bartnicki-Garcia S: **The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*.** *J Gen Microbiol* 1984, **130**:2095-2102.
- El Gueddari DE, Rauchhaus U, Moerschbacher B, Deising HB: **Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi.** *New Phytologist* 2002, **156 (1)**:103-112.
- Fromtling RA, Shadomy HJ, Jacobson ES: **Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *cryptococcus neoformans*.** *Mycopathologia* 1982, **79**:23-29.
- Fukushima T, Yamamoto H, Atrih A, Foster SJ, Sekiguchi J: **A polysaccharide deacetylase gene (pdaA) is required for germination and for production of muramic delta-lactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2002, **184**:6007-6015.
- Gao XD, Katsumoto T, Onodera K: **Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*.** *J Biochem (Tokyo)* 1995, **117**:257-263.
- Hekmat O, Tokuyasu K, Withers G: **Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: an**

- investigation using steady-state kinetic analysis and MS.** *Biochem J* 2002, **374**:369-380.
- Hirano S: **Production of chitin and chitosan in Japan.** *Elsevier Essex*. 1989 pp. 37-43.
- Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford TJ, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, Toews GB: **The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection.** *J Immunol* 1995, **155**:4790-4797.
- John M, Rohrig H, Schmidt J, Wieneke U, Schell J: **Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chito oligosaccharide deacetylase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:625-629.
- Kurita K, Sannan T, Iwakura Y: **Studies on chitin 4. Evidence of formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolases.** *Macromol. Chem.* 1977, **178**:3197-202.
- Levitz SM, Nong S, Mansour MK, Huang C, Specht CA: **Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10422-10427.
- Martinou A, Koutsioulis D, and Bouriotis V: **Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. Purification and characterisation of the cobalt-dependent recombinant enzyme.** *Enz. Micr. Technology* 2003, **32**: 757-763.
- Martinou A: **Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography.** *J. Chromatogr* 1993, **644**:35-41.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H: **Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi.** *Annu Rev Phytopathol* 1996, **34**:367-386.
- Minke R, Blackwell J: **The structure of alpha-chitin.** *J Mol Biol* 1978, **120**:167-181.
- Morley KL, Chauve G, Kazlauskas R, Dupont C, Shareck F, Marchessault, RH: **Acetyl xylan esterase-catalysed deacetylation of chitin and chitosan.** *Carbohydrate Polymers* 2006, **63**: 310-315.
- Perfect JR: ***Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, **45**:395-404.
- Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ: **Biochemical studies of phenoloxidase**

- and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*.** *J Bacteriol* 1982, **150**:1212-1220.
- Psylinakis E, Boneca IG, Mavromatis K, Deli A, Hayhurst E, Foster SJ, Varum KM, Bouriotis V: **Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*.** *J Biol Chem* 2005, **280**:30856-30863.
- Reese AJ, Doering TL: **Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:1401-1409.
- Roberts GAF: **Proposals for a standard nomenclature for chitin and chitosan.** *European Chitin Society Newsletter* 1993, **no 1**.
- Sannan T, Kurita K, Iwakura Y: **Studies on chitin 2. Effect of deacetylation on solubility.** *Macromol. Chem.* 1976, **177**:3589-3600.
- Tokuyasu K, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K, Mori Y: **Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*.** *Carbohydr Res* 1997, **303**:353-358.
- Tokuyasu K, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K, Mori Y: **Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*.** *Carbohydr Res* 1997, **303**:353-358.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V: **Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology.** *Trends Biotechnol* 2000, **18**:305-312.
- Tsigos I, Zydowicz N, Martinou A, Domard A, Bouriotis V: **Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides.** *Eur J Biochem* 1999, **261**:698-705.
- Vaishnav VV, Bacon BE, O'Neill M, Cherniak R: **Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67.** *Carbohydr Res* 1998, **306**:315-330.
- van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD: **Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:3394-3400.
- Vander P, KM Vr, Domard A, Eddine El Gueddari N, Moerschbacher BM: **Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves.** *Plant Physiol* 1998, **118**:1353-1359.

Vollmer W, Tomasz A: **The pgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2000, **275**: 20496-20501.**