



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

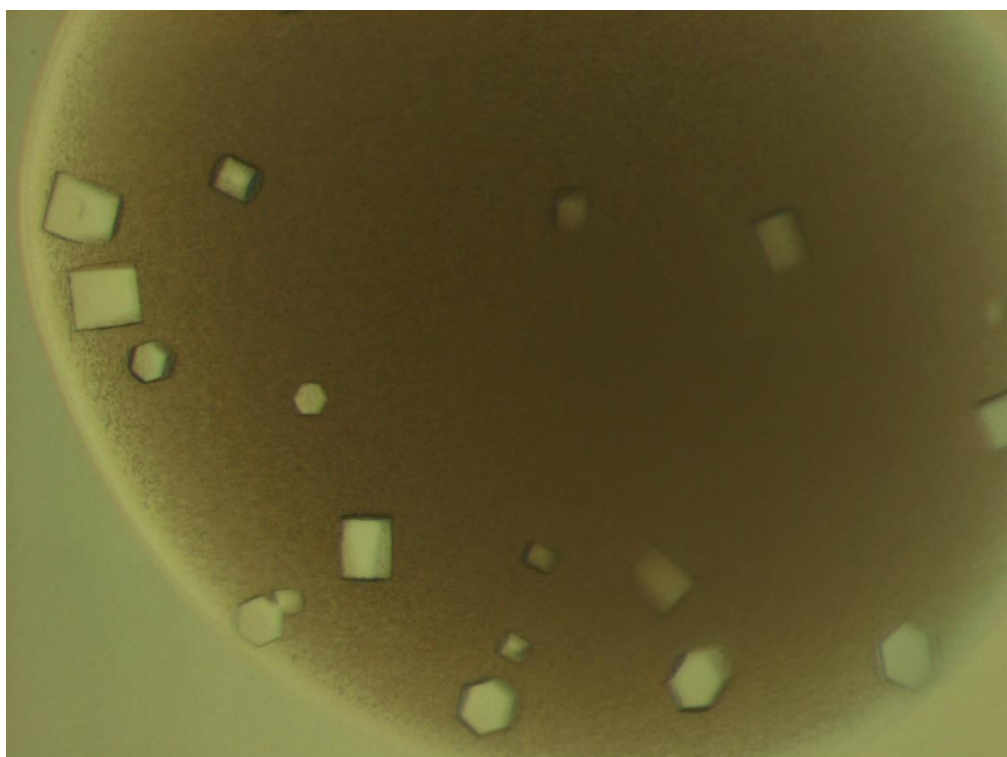
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Κ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ
ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *RODOSPORA ANSERINA***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ε. ΤΟΠΑΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Κ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ
ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *RODOSPORA ANSERINA***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ε. ΤΟΠΑΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ

ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΩ ΣΙΤΗΔΑ ΜΟΥ

ΣΕ ΟΛΑ ΟΣΑ ΕΞΗΣΑ ΑΥΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΑ ΣΤΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί αποτέλεσμα δουλειάς ενός ακαδημαϊκού έτους. Περιλαμβάνει μια μικρή απόπειρα ενασχόλησης με τον τομέα της Βιοτεχνολογίας και επιχειρεί να προσθέσει ένα χρήσιμο λιθαράκι στις γνώσεις γύρω από το αντικείμενο της ενζυμικής αποικοδόμησης της φυτικής βιομάζας. Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Δρ. Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε κατά την ανάθεση του θέματος, αλλά και τη διαρκή καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Παύλο Χριστακόπουλο, που πάνω από καθηγητής υπήρξε για εμένα δάσκαλος και με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τον τομέα της Βιοτεχνολογίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω από καρδιάς την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Μαρία Δημαρόγκωνα για τις ατελείωτες ώρες βοήθειας που μου παρείχε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Η συμβολή της ήταν, εξάλλου, καθοριστική στα πειράματα που διεξήχθησαν στο σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο Αμβούργο.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Ερευνήτρια Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, τόσο για τις αμέτρητες γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε, όσο και για τη φιλοξενία στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω ακόμη στα μέλη της τριμελούς επιτροπής και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, για την άρτια συνεργασία που είχαμε, αλλά και τις χρήσιμες υποδείξεις και τη βοήθεια που μου παρείχαν.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Jean-Guy Berrin και το Εργαστήριο Biotechnologie des Champignons Filamenteux – Polytech Marseille στη Γαλλία για την παροχή των κλωνοποιημένων βακτηρίων. Συνάμα, όλο το προσωπικό της πηγής συγχροτρονικής ακτινοβολίας Petra III, σταθμός P14, EMBL στο Αμβούργο για τη φιλοξενία στο σταθμό και τη χρήση της πηγής συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αυγή Μαμαλάκη από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ για την συνεισφορά στον ακριβή προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια, τους φίλους και κυρίως τους ανθρώπους που έχω δίπλα μου, για τη συμπαράστασή τους όλον αυτόν τον καιρό και να εκφράσω τη βεβαιότητά μου για τη στήριξη τους στη δύσκολη πορεία ενός διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού που ξεκινάω.

Αθανασίου Δημήτρης

Αθήνα, Ιούλιος 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων αποτελούν την πιο πλούσια πηγή άνθρακα στη γη και η αξιοποίησή τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές έχει προσελκύσει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Ειδικότερα, οι ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων ετών έχουν στραφεί στη μείωση του ενζυμικού φορτίου και κατά συνέπεια του κόστους που απαιτείται για την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και την οικονομικά συμφέρουσα παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανικό επίπεδο. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μια εστεράση που καταλύει το δεσμό εστέρα μεταξύ του *D*-γλυκουρονικού ή 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και των αλκοολών της λιγνίνης, οδηγώντας στη δημιουργία μιας νέας οικογένειας υδατανθρακικών εστερασών στη βάση δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database), αυτής των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος (CE15). Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη πρωτεϊνών αυτής της νέας οικογένειας.

Αρχικά γίνεται μια ανασκόπηση της σύστασης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και των ενζύμων που συμβάλλουν στην αποικοδόμησή του. Στη συνέχεια γίνεται μια εισαγωγή στις υδατανθρακικές εστεράσες και ανάλυση των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια CE15 της CAZy. Αναλύεται επίσης η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ως εργαλείο για τη δομική μελέτη των μακρομορίων.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών *Pa*CE15A και *Pa*CE15B, αμφότερες από τις οποίες ανήκουν στην οικογένεια CE15 της CAZy και προέρχονται από το μύκητα *Podospora anserina*. Η κλωνοποίηση και η έκφραση πραγματοποιήθηκαν μέσω της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris*. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η ανάπτυξη κατάλληλων κρυστάλλων (φύση, μέγεθος, σχήμα, περίθλαση ακτίνων Χ) ώστε να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών. Βρέθηκε ότι κρυστάλλοι της πρωτεΐνης *Pa*CE15B αναπτύσσονται παρου-

σία οξικού νατρίου και θειικού αμμωνίου, σε τιμή pH ίση με 4,6. Οι κρύσταλλοι εκτέθηκαν σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων X στο Αμβούργο (SRS at EMBL-Hamburg Unit/DESY) και ακολούθησε προκαταρκτικός χαρακτηρισμός αυτών. Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Plant cell walls are the most abundant source of organic carbon on the planet and their exploitation in biotechnological applications has attracted significant research interest. Recent research efforts have focused on the reduction of protein load required for the breakdown of lignocellulose to fermentable sugars, as the enzymic cost is currently the main obstacle of bioethanol production at industrial scale. Recently an esterase hydrolyzing the ester bond between 4-*O*-methyl-*D*-glucuronic acid residues of glucuronoxylans and aromatic alcohols of lignin was reported, leading to the emergence of a new family (CE15) of carbohydrate esterase on the continuously updated CAZy database (Carbohydrate-Active enZYmes Database), the family of glucuronoyl esterases. The aim of the present work was to explore this new family.

In the first part, the plant cell wall composition as well as the enzymes involved in its degradation are described. An introduction to the carbohydrate esterases is being made and the properties and characteristics of enzymes that belong to the CE15 family of CAZy database are presented in more detail. The basic principles of X-ray crystallography, employed for the structural study of macromolecules, are also outlined.

The aim of the present work was the heterologous expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, of the proteins *PaCE15A* and *PaCE15B*, both of which are *Podospora anserine* CE15. Crystallization trials of the two proteins were performed, in order to proceed to structural characterization. Monocrystals of *PaCE15B* with satisfactory quality (size, shape and X-ray diffraction potency) were obtained in the presence of sodium acetate and ammonium sulphate salts, at pH 4.6. The crystals were exposed to X-rays, using the synchrotron radiation source at EMBL Hamburg and preliminary characterization followed. The 3D structural determination is currently in progress.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	iii
Abstract.....	v
Περιεχόμενα	1
Ευρετήριο Πινάκων.....	3
Συντμήσεις.....	4
1. Θεωρητικό Μέρος.....	5
1.1. Η Ενζυμική Αποικοδόμηση Του Φυτικού Κυτταρικού Τοιχώματος	5
1.1.1. Σύσταση, Ιδιότητες Και Δομή Του Φυτικού Κυτταρικού Τοιχώματος.....	6
1.1.2. Ενζυμική Υδρόλυση Κυτταρικού Τοιχώματος.....	8
1.2. Οι Υδατανθρακικές Εστεράσες	10
1.2.1. Οι Εστεράσες Του Γλυκουρονικού Οξέος	12
1.2.2. Γνωστές Δομές Εστερασών Του Γλυκουρονικού Οξέος.....	17
1.3. Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών	21
1.3.1. Η φύση Των Πρωτεϊνικών Κρυστάλλων	22
1.3.2. Στάδια Κρυστάλλωσης.....	24
1.3.3. Διάγραμμα Φάσεων Κρυστάλλωσης.....	25
1.3.4. Διαλογή Και Βελτιστοποίηση	27
1.3.5. Δημιουργία Κατάστασης Υπερκορεσμού.....	28
1.3.6. Πειραματική Διάταξη Κρυσταλλώσεων.....	29
1.3.7. Βασικές Αρχές Της Μεθόδου Συλλογής Δεδομένων Από Πρωτεϊνικούς Κρυστάλλους Με Χρήση Ακτίνων Χ	31
2. Υλικά Και Μέθοδοι.....	37
2.1. Έκφραση Και Καθαρισμός Πρωτεϊνών.....	37
2.1.1. Όργανα.....	37
2.1.2. Χημικά Σκευάσματα.....	38
2.1.3. Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας	39

2.1.4. Έκφραση Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνών Από Μετασχηματισμένα Κύτταρα <i>P. pastoris</i>	40
2.1.5. Καθαρισμός	43
2.1.6. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών Σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	44
2.1.7. Ποιοτικός Και Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεΐνης.....	46
2.2. Κρυσταλλογραφικές Μελέτες	48
2.2.1. Όργανα.....	48
2.2.2. Χημικά Σκευάσματα.....	49
2.2.3. Εύρεση Συνθηκών Κρυστάλλωσης	50
2.2.4. Συλλογή Δεδομένων Περίθλασης Ακτίνων Χ	51
3. Αποτελέσματα	53
3.1. Κρυσταλλογραφικές Μελέτες Της Γλυκουρονικής Εστεράσης <i>RaCE15A</i>	53
3.1.1. Βασικά Χαρακτηριστικά Του Γονιδίου Της <i>RaCE15A</i>	53
3.1.2. Παραγωγή Και Καθαρισμός Της <i>RaCE15A</i>	54
3.1.3. Προσδιορισμός Συνθηκών Κρυστάλλωσης.....	56
3.2. Κρυσταλλογραφικές Μελέτες Της Γλυκουρονικής Εστεράσης <i>RaCE15B</i>	57
3.2.1. Βασικά Χαρακτηριστικά Του Γονιδίου Της <i>RaCE15B</i>	57
3.2.2. Παραγωγή Και Καθαρισμός Της <i>RaCE15B</i>	58
3.2.3. Προσδιορισμός Αρχικών Συνθηκών Κρυστάλλωσης	60
3.2.4. Βελτιστοποίηση Κρυστάλλων.....	62
3.2.5. Συλλογή Δεδομένων Περίθλασης	72
4. Συμπεράσματα – Μελλοντικές Προοπτικές.....	75
5. Βιβλιογραφία	77
Παράρτημα	84

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος δεν υδρολύει υποστρώματα άλλων υδατανθρακικών εστερασών.	15
Πίνακας 2: Μέθοδοι για τη δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού.	29
Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικών μέσων.	39
Πίνακας 4: Σύσταση πηκτής επιστοίβασης και πηκτής διαχωρισμού.	45
Πίνακας 5: Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του μοριακού βάρους των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών.	46
Πίνακας 6: Βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου <i>PaCE15A</i>	53
Πίνακας 7: Αποτελέσματα μέτρησης OD προκαλλιέργειας, κατά τον καθαρισμό της <i>PaCE15A</i>	55
Πίνακας 8: Βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου <i>PaCE15B</i>	57
Πίνακας 9: Αποτελέσματα μέτρησης OD προκαλλιέργειας, κατά τον καθαρισμό της <i>PaCE15B</i>	59
Πίνακας 10: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά την πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της <i>PaCE15B</i> και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν.	64
Πίνακας 11: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά τη δεύτερη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της <i>PaCE15B</i> και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν.	66
Πίνακας 12: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά την τρίτη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της <i>PaCE15B</i> και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν.	68
Πίνακας 13: Η κρυσταλλοπροστατευτική ουσία και η συγκέντρωσή της στην αρχική συνθήκη που φάνηκε ικανή να εμποδίσει το σχηματισμό πάγου στον κρύσταλλο <i>PaCE15B</i> κατά την ακτινοβόλησή του.	69
Πίνακας 14: Συνθήκες στις οποίες επιτεύχθηκε η δημιουργία κρυστάλλων της πρωτεΐνης <i>PaCE15B</i>	70
Πίνακας 15: Στατιστικά στοιχεία που αφορούν στη συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έκθεση μονοκρυστάλλου της <i>PaCE15B</i> σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων Χ.	74
Πίνακας 16: Οι συνθήκες του εμπορικού σκευάσματος κρυστάλλωσης PEG Suite της εταιρίας Qiagen.	84
Πίνακας 17: Οι συνθήκες του εμπορικού σκευάσματος κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen της εταιρίας Molecular Dimensions.	90

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

IBΦXB	Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών
APS	Υπερθεικό Αμμώνιο (Ammonium Persulfate)
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes Database
CBM	Τομέας Πρόσδεσης Πολυσακχαρίτη (Carbohydrate Binding Module)
CE	Carbohydrate Esterases, Εστεράσες Πολυσακχαριτών
Coomassie	Τρι-φαιnyλο-μεθάνιο (Triphenylmethane)
dH ₂ O	Υπερκάθαρο Νερό
GH	Γλυκοζιδική Υδρολάση (Glycoside Hydrolase)
GT	Γλυκοζυλ-τρασφεράση (GlycosylTransferase)
HEPES	Ρυθμιστικό Διάλυμα C ₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
OD ₆₀₀	Οπτική Πυκνότητα στα 600 nm (Optical Density)
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτική Πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PDB	Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank)
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη (PolyEthyleneGlycol)
pI	Ισοηλεκτρικό Σημείο (Isoelectric Point)
PL	Λυάση Πολυσακχαριτών (Polysaccharide Lyase)
SDS	Θειικό Δωδεκυλικό Νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate)
TEMED	Τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (Tetramethylethylenediamine)
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
YNB	Αζωτούχος Βάση Ζύμης (Yeast Nitrogen Base)
YPD	Εκχύλισμα Ζύμης, Πεπτόνη, Δεξτρόζη (Yeast Extract, Peptone, Dextrose)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

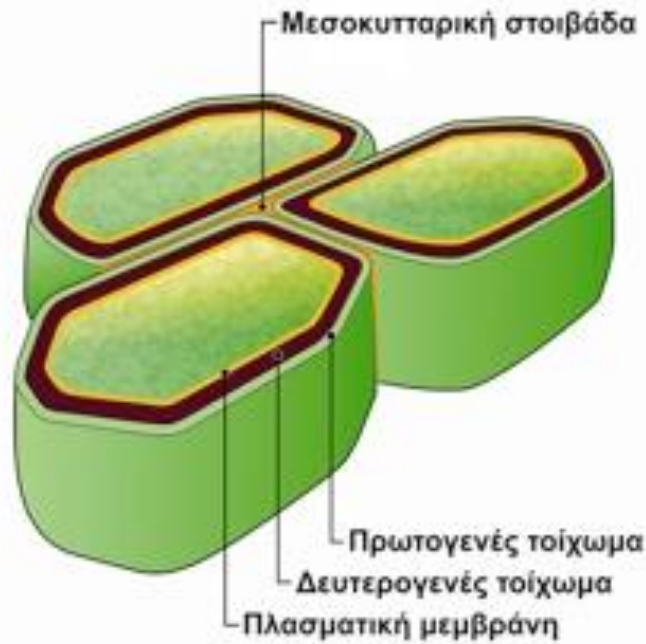
1.1. Η ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Το πρόβλημα της αξιοποίησης της ενέργειας που βρίσκεται αποθηκευμένη στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών απασχολεί εδώ και χρόνια τους επιστήμονες. Διάφορες διεργασίες για το σκοπό αυτόν έχουν επινοηθεί και σήμερα η πρόκληση βρίσκεται στην αξιοποίησή της στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Η ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, λόγω της σύνθετης φύσης του και της περίπλοκης δομής του, απαιτεί τη συνεργατική δράση ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτών που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση και το μηχανισμό δράσης τους. Τα ένζυμα που διασπούν, τροποποιούν ή σχηματίζουν γλυκοζιδικούς δεσμούς έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία σε μια διαρκώς αναπτυσσόμενη βάση δεδομένων, την CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database – www.cazy.org – Cantarel et al., 2009). Η CAZy διαθέτει σήμερα 128 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases – GHs), 94 οικογένειες γλυκοζυλ-τρασφερασών (GlycosylTransferases – GTs), 22 οικογένειες λυσών (Polysaccharide Lyases – PLs), 16 οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών και 64 οικογένειες πρωτεϊνών πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (Carbohydrate Binding Modules – CBMs). Μόνο το 3% των ενζύμων που ανήκουν στην CAZy έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά, ενώ η τρισδιάστατη δομή μόλις του 0,3% αυτών έχει προσδιοριστεί (Gilbert, 2010). Τα παραπάνω ποσοστά αναδεικνύουν την τεράστια προσπάθεια που πρέπει να καταβληθεί ακόμα ώστε να διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός αποικοδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.

1.1.1. ΣΥΣΤΑΣΗ, ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την αξιοποίηση της φυτικής βιομάζας ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιοκαυσίμων με σκοπό τη μερική αντικατάσταση του πετρελαίου από την ανανεώσιμη αυτή πηγή ενέργειας. Η διαδικασία της παραγωγής βιοαιθανόλης περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος σε μονοσακχαρίτες και εν συνεχεία τη μετατροπή τους μέσω ζύμωσης σε αιθανόλη. Ένα από τα βασικότερα προβλήματα κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων σε μεγάλη κλίμακα είναι το υψηλό κόστος του απαιτούμενου ενζυμικού φορτίου που οφείλεται στις εξαιρετικά ανθεκτικές στην αποικοδόμηση δομές των φυτικών τοιχωμάτων.

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί βασικό δομικό και λειτουργικό στοιχείο των φυτικών κυττάρων. Επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών όπως τη διαμόρφωση του σχήματος των κυττάρων που δομούν τους φυτικούς ιστούς και όργανα, την άμυνα απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς, τη διακυτταρική επικοινωνία και την αποθήκευση θρεπτικών ουσιών (Brett et al., 1990). Δύο γειτονικά νεαρά φυτικά κύτταρα δημιουργούν πρώτα λεπτά και σχετικά ευλύγιστα τοιχώματα, τα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα που αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ένας άλλος πολυσακχαρίτης, η πηκτίνη, ως κολλώδης ουσία, συγκολλά και συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Ορισμένα, όμως, κύτταρα δημιουργούν ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που ισχυροποιεί επιπρόσθετα τη μηχανική υποστήριξη του φυτού (Εικόνα 1). Μετά τη νέκρωση των πιο πάνω κυττάρων δημιουργείται ο ξυλώδης κορμός των δένδρων.



Εικόνα 1: Η δομή των φυτικών κυττάρων.

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και ονομάστηκε έτσι από τον Anselme Payen (19ος αιώνας) που τον όρισε σαν τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων και έτσι τον ονόμασε cellulose (cell = κύτταρο). Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων *D*-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.

Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2 – 20 nm και μήκος 100 – 40000 nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και

μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες, κρυσταλλικές περιοχές. Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών.

Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές που συμβάλλει στη σκλήρυνση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Η υψηλή της χημική περιπλοκότητα και ετερογένεια καθιστά εξαιρετικά δύσκολη τόσο την απομόνωσή της όσο και την ακριβή περιγραφή της δομής και της χημικής της σύστασης. Τα βασικά συστατικά από την αφυδρογόνωση των οποίων προκύπτει το σύνθετο δίκτυο της λιγνίνης είναι οι υδροξυκινναμικές αλκοόλες: κωνιφερυλική, σιναιπυλική και π-κουμαριλική αλκοόλη. Συνδέεται με ομοιοπολικούς και μη δεσμούς με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (lignin-carbohydrate complexes, LCCs), ενώ αλληλεπιδρά και με τις πρωτεΐνες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Achyuthan et al., 2010). Αποτελεί ένα από τα βασικότερα εμπόδια κατά την ενζυμική υδρόλυση της φυτικής βιομάζας, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την απόδοση βιοδιεργασιών όπως η παραγωγή βιοκαυσίμων από λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες (Δημαρόγωνα, 2012).

1.1.2. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι βασικές από τις ενζυμικές δράσεις που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα με βάση το υπόστρωμα που υδρολύουν χωρίς ωστόσο να αποτελούν πλήρη εικόνα της εργαλειοθήκης που διαθέτουν οι κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί για τη διάσπαση της βιομάζας.

- Κυτταρίνη. Υδρολύεται από τη συνεργιστική δράση ενδο-β-1,4-γλυκανασών (μέλη των οικογενειών GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61, 74 και 124), κελλοβιοϋδρολασών (GH 6, 7, 9, 48 και 74) και β-γλυκοζιδασών (GH 1, 3, 9, 30 και 116). Οι ενδο-β-1,4-γλυκανάσες

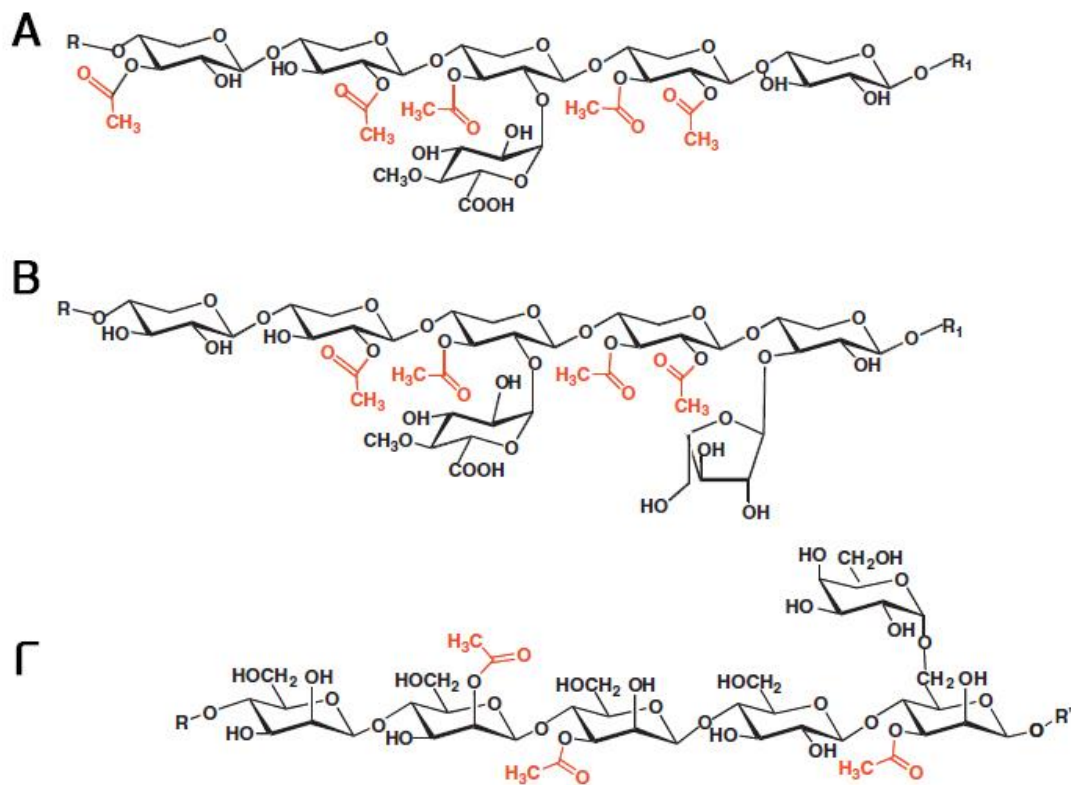
υδρολύουν την αλυσίδα της κυτταρίνης σε τυχαία σημεία, οι κελλοβιοϋδρολάσες απελευθερώνουν κελλοολιγοσακχαρίτες από τα άκρα των αλυσίδων ενώ η β-γλυκοζιδάση υδρολύει τους ολιγοσακχαρίτες σε μονάδες γλυκόζης (Kubicek, 1992).

- Ξυλογλουκάνη. Τα ένζυμα που υδρολύουν το σκελετό της ξυλογλουκάνης σε μη υποκατεστημένες μονάδες γλυκόζης (ενδο-ξυλογλουκανάσες ή ενδο-υδρολάσες της ξυλογλουκάνης) έχουν κατηγοριοποιηθεί στις οικογένειες GH 5, 7, 12, 16, 44 και 74. (Gilbert, et al., 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ένζυμα της οικογένειας 16, λόγω της ικανότητάς τους όχι μόνο να υδρολύουν την ξυλογλουκάνη αλλά και να αλλάζουν τη δομή της μέσω αντιδράσεων μεταγλυκοζυλίωσης (Eklof et al., 2010).
- Μαννάνες. Η υδρόλυση των πολυσακχαριτών αυτών λαμβάνει χώρα με τη συνδυαστική δράση ενδο-β-1,4-μαννανασών (GH 5 και 26), έξω-β-1,4-μαννοζιδασών (GH 2 και 5), β-1,4-γλυκοζιδασών, α-γαλακτοζιδασών (GH 4, 27, 36, 57 και 110) και ακετυλ-μαννανεστερασών (Centeno et al., 2006).
- Ξυλάνη. Ο σκελετός της ξυλάνης υδρολύεται κατά κύριο λόγο από ξυλανάσες των οικογενειών GH 5, 8, 10, 11 και 30 ενώ οι πλευρικές αλυσίδες αραβινόζης απομακρύνονται μέσω των αραβινοφουρανοζιδασών των οικογενειών GH 43, 51, 54 και 62 και τα ουρονικά οξέα μέσω των α-γλυκουρονιδασών των οικογενειών GH 67 και 115 (Gilbert, 2010).
- Πηκτίνη. Η αποδόμηση του σύνθετου αυτού πολυσακχαρίτη πραγματοποιείται μέσω ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτών μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται πηκτινάσες, εξω-πολυγαλακτουρονάσες και ραμνογαλακτουρονάσες (GH 28), εξω-ηλύσες του πολυγαλακτουρονικού (PL 2 και 9) καθώς και πηκτινικές ηλύσες (PL 1, 2, 3, 9 και 10), μεθυλεστεράσες (CE 8) και εστεράσες του οξικού οξέος 12 και 13 – Solbak et al., 2005).

1.2. ΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΕΣ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ

Οι υδατανθρακικές εστεράσες (Carbohydrate Esterases – CEs) είναι ένζυμα που καταλύουν την Ο ή Ν-απακυλίωση υποκατεστημένων σακχαριτών, δηλαδή υδρολύουν εστέρες ή αμίδια στα οποία τα σάκχαρα παίζουν το ρόλο της αλκοόλης και της αμίνης. Ως υδατανθρακικές εστεράσες θεωρούμε επίσης τα ένζυμα που υδρολύουν εστέρες στους οποίους τα σάκχαρα παίζουν το ρόλο του οξέος. Τα οξέα – σάκχαρα που εμπλέκονται σε τέτοιους εστέρες είναι ουρονικά οξέα. Η ύπαρξη εστέρων αλδονικών οξέων δεν έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί, τουλάχιστον όχι στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Οι υδατανθρακικές εστεράσες χρησιμοποιούνται ως ισχυροί βιοκαταλύτες για τη μείωση του φορτίου πρωτεΐνης που απαιτείται για τη διάσπαση της λιγνοκυτταρίνης σε σάκχαρα και τη λιγότερο δαπανηρή αξιοποίησης της ενέργειας που βρίσκεται αποθηκευμένη στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών (Charanji et al., 2013).

Αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στην εξειδίκευση στο υπόστρωμα. Για αυτόν το λόγο έχει καθιερωθεί η κατηγοριοποίησή τους σε 16 κύριες οικογένειες (Cantarel et al., 2009). Πολλά ένζυμα, κυρίως οι εστεράσες του φερουλικού οξέος, δεν εντάσσονται στις καθιερωμένες οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών και έχουν ταξινομηθεί χωριστά με βάση τις ομοιότητες της αλληλουχίας των πρωτεϊνών τους (Gupta et al., 2011). Από την άποψη της εξειδίκευσης του υποστρώματος οι 16 οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών περιλαμβάνουν ακετυλεστεράσες της ξυλάνης (acetylxytan esterases – AcXEs), εστεράσες οξικού οξέος (acetyl esterases – AcE), αποακετυλάσες χιτίνης (chitin deacetylases), αποακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (peptidoglycan deacetylases), εστεράσες του φερουλικού οξέος, ακετυλεστεράσες της πηκτίνης (pectin acetyl esterases), μεθυλεστεράσες της πηκτίνης (pectin methylesterases), γλυκουρονικές εστεράσες και ένζυμα που καταλύουν τη Ν-απακυλίωση αμινο-παράγωγων σακχάρου χαμηλού μοριακού βάρους.



Σχήμα 1: Η ακετυλίωση: Α. γλυκουρονικής ξυλάνσης από σκληρά φυλλοβόλα δέντρα, Β. μονοετούς φυτού γλυκουρονο-αραβινο-ξυλάνη (arabinoglucuronoxylan) και Γ. γαλακτογλυκομαννάνη από αειθαλή φυτά (Biely, 2012).

Μια μεγάλη κατηγορία είναι αυτή των εστερασών που εμπλέκονται στην αποδόμηση των ακετυλιωμένων φυτικών ημικυτταρινών (Σχήμα 1). Οι εστεράσες δρουν σε αυτούς τους πολυσακχαρίτες κατατάσσονται στις οικογένειες οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών CE 1–7 και CE16. Μια νέα οικογένεια, ίσως η δέκατη έβδομη, CE17, αναμένεται να εισαχθεί βασιζόμενη στην πρόσφατα χαρακτηρισμένη ακετυλο-εστεράση από το *Geobacillus stearothermophilus* που δε δείχνει καμία ομολογία με τις υπάρχουσες οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών (Alalouf et al., 2011).

Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι τα απακυλιωμένα ένζυμα από πολυσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροβιακή αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων. Για τους επιστήμονες, αποτελούν χρήσιμα βιοκαταλυτικά εργαλεία, σημαντικά για τη βιομετατροπή της φυτικής βιομά-

ζας και τη σακχαροποίηση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού, χωρίς να έχουν περάσει από μια αλκαλική προκατεργασία, η οποία θα κατέστρεφε του δεσμούς των εστέρων (Biely, 2012).

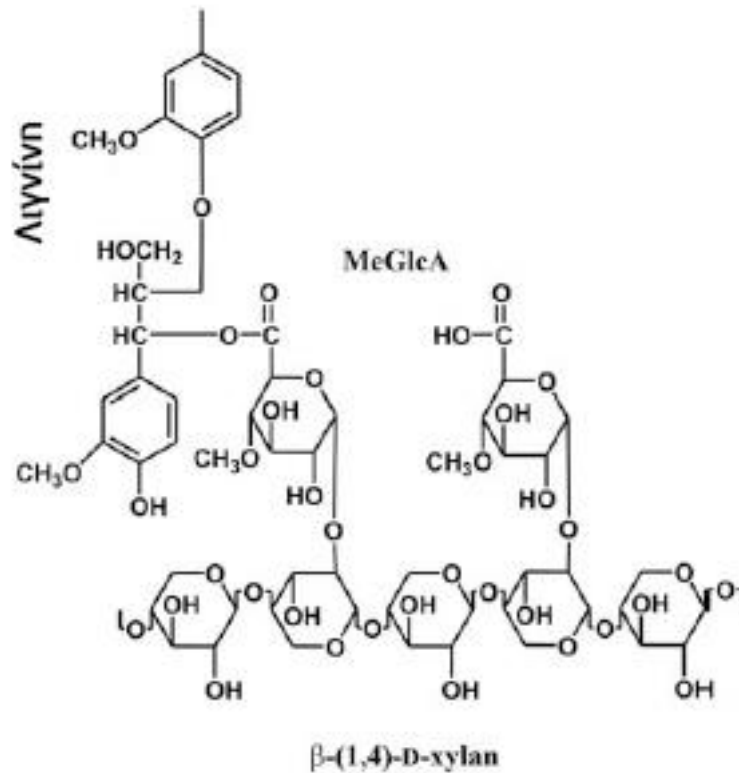
1.2.1. ΟΙ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα, μια άφθονη και ανανεώσιμη πηγή άνθρακα, έχει τη δυνατότητα να συμπληρώσει το άμυλο ως πρώτη ύλη για την παραγωγή καυσίμου αιθανόλης. Οι πιο κοινές μορφές άνθρακα που βρίσκονται στη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι η κυτταρίνη, ένα βιοπολυμερές της γλυκόζης, και η ημικυτταρίνη, ένα ετερογενές βιοπολυμερές από εξόζες και πεντόζες όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη. Οι σχετικές αναλογίες όλων αυτών ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι ένα μέρος της λιγνίνης δεν αποτίθεται απλά στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, αλλά συνδέεται ομοιοπολικά με τις ημικυτταρίνες (Jeffries, 1990). Η λιγνίνη και τα άλλα αρωματικά συνδέονται ομοιοπολικά με υδατάνθρακες και έτσι τους προστατεύουν έναντι μιας ενζυμικής αντίδρασης. Συνεπώς, προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης υδρόλυση της βιομάζας των φυτών, απαιτείται μια σύνθεση που να αποτελείται από τα κύρια και τα βοηθητικά ένζυμα που είναι σε θέση να υδρολύουν το σύνολο των δεσμών που βρέθηκαν ότι υπάρχουν (Akin, 2007, Vafiadi et al., 2009).

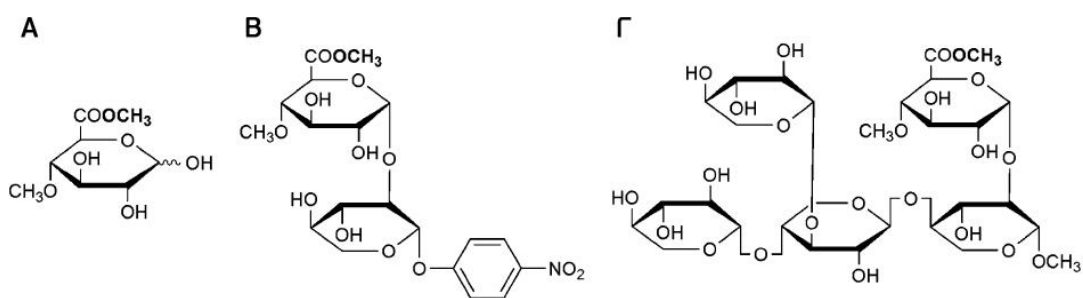
Διάφορες διεργασίες, από την απλή καύση έως και τους προηγμένους βιομετατροπείς, έχουν εφαρμοστεί για την πρόσβαση στην ενέργεια που αποθηκεύεται στα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων. Μία από τις προκλήσεις που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ερευνητές είναι να κάνουν αυτή τη διαδικασία οικονομικά βιώσιμη στην αγορά βιοκαυσίμων (Himmel et al., 2007). Αυτή η προσπάθεια γίνεται ακόμα πιο απαιτητική λόγω της πολύπλοκης δομής του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, οδηγώντας έτσι σε μια αύξηση του κόστους της λιγνοκυτταρινικής μετατροπής (Weng et al., 2008).

Η ανάπτυξη αποτελεσματικής ενζυματικής υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, σημαντική πρόκληση της μελλοντικής έρευνας, ώστε να ανοίξει ο δρόμος για την ορθολογική και φιλική προς το περιβάλλον αξιοποίηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Η πρόοδος στον τομέα αυτό εξαρτάται από τη γνώση των ενζύμων που συμμετέχουν στην αποδόμηση του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων. Ο αριθμός των ομοιοπολικών δεσμών στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα είναι ασφαλώς μεγαλύτερος από τον αριθμό των μέχρι σήμερα γνωστών υδρολυτικών ενζύμων (Li et al., 2007). Η κατάσταση γίνεται ακόμη χειρότερη, από το γεγονός ότι η αλκαλική επεξεργασία του ξύλου ή τα γεωργικά παραπροϊόντα φαίνεται να είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την καταστροφή της ακεραιότητας των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων και για τη βελτίωση της πεπτικότητας τους από τα ένζυμα. Μια τέτοια επεξεργασία δε διαταράσσει μόνο τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων πολυμερών, αλλά επίσης διασπά ένα αριθμό γνωστών ή άγνωστων ομοιοπολικών δεσμών ευαίσθητων σε αλκαλικές συνθήκες, όπως δεσμούς εστέρα.

Ένας τέτοιος δεσμός έχει βρεθεί ότι συνδέει την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη, με δεσμό εστέρα μεταξύ του *D*-γλυκουρονικού ή 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος (4-*O*-methyl-*D*-glucuronic acid – MeGlcA) της γλυκουρονοξυλάνης (glucuronoxylan) και των αλκοολών της λιγνίνης (Σχήμα 2). Ο δεσμός έχει μέχρι στιγμής αποδειχθεί μόνο έμμεσα, είτε με αναγωγή του MeGlcA σε 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκόζη, είτε με οξείδωση της 2,3-δихλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνης (Li et al., 2007). Το ένζυμο, το οποίο υδρολύει αυτούς τους δεσμούς, θα μπορούσε να παίξει σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή πέψη των φυτικών ιστών και θα μπορούσε να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας.



Σχήμα 2: Εστερικός δεσμός μεταξύ υπολειμμάτων 4-Ο-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης που βρίσκονται στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων (Spanikova et al., 2006).



Σχήμα 3: Συνθετικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα της γλυκουρονικής εστεράσης. Α. Ο-μεθυλ-*α-D*-γλυκουρονικό οξύ, Β. 4-νιτροφαινυλ 2-Ο-(μεθυλ-4-Ο-μεθυλ-*α-D*-γλυκουρονική)-*β-D* ξυλοπυρανόζη και Γ. μεθυλ *β-D*-ξυλοπυρανόζη-1,4-(3-Ο-*β-D*-ξυλοπυρανόζη-*β-D*-ξυλοπυρανόζη-1,4-[2-Ο-(μεθυλ-*α-D*-γλυκουρονικό)]-*β-D*-ξυλοπυρανόζη (Vafiadi et al., 2009).

Μία εστεράση που μπορεί να έχει αυτή την καταλυτική δραστηριότητα ανακαλύφθηκε πρόσφατα στο κυτταρινολυτικό σύστημα του μύκητα *Schizophyllum commune* (Spanikova et al., 2006). Το ένζυμο ονομάστηκε εστεράση του γλυκουρονικού οξέος, λόγω της ικανότητάς του να υδρολύει αλκυλ- και αρυθαλκυλ- εστέρες του *D*-γλυκουρονικού οξέος και του MeGlcA. Τα υποστρώματα της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος (Σχήμα 3) δεν υδρολύθηκαν από άλλες υδατανθρακικές εστεράσες όπως από ακετυλεστεράσες της ξυλάνης, από εστεράσες του φερουλικού οξέος και από μεθυλεστεράσες της πηκτίνης (Li et al., 2007). Αντίστοιχα, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1**, η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος δεν υδρολύει τα υποστρώματα των άλλων υδατανθρακικών εστερασών.

Πίνακας 1: Η εστεράση του γλυκουρονικού οξέος δεν υδρολύει υποστρώματα άλλων υδατανθρακικών εστερασών. Από την άλλη πλευρά, καμία από τις εξεταζόμενες ακετυλεστεράσες της ξυλάνης, εστεράσες του φερουλικού οξέος και μεθυλεστεράσες της πηκτίνης δεν υδρόλυσε τα υποστρώματα της γλυκουρονικής εστεράσης. Συνοτομογραφίες: Me-MeGlcA = μεθυλ 4-*O*-μεθυλ-*D*-γλυκουρονικό οξύ, NPhXylMe-MeGlcA = 4-νιτροφαινυλ 2-*O* (μεθυλ 4-*O*-μεθυλ- α -*D*-γλυκουρονική)- β -*D*-ξυλοπυρανόζη, NPhAc = οξικός π-νιτροφαινυλεστερας, FeE = εστεράση του φερουλικού οξέος; AcXE = ακετυλεστεράσες της ξυλάνης, O = δε δοκιμάστηκε (Spanikova et al., 2006).

Εστεράση	Πρωτεΐνη (mg/mL)	Me-MeGlcA (5 mM)	NPhXylMe-MeGlcA (2 mM)	Μεθυλ / αιθυλεστεράσες φερουλικού οξέος (2 mM)	NPhAc (2 mM)	Πηκτίνη	Πηγή
Γλυκουρονική Εστεράση <i>Schizophyllum commune</i> [1000 U·mg ⁻¹]	0,25	+	+	-	-	-	Spanikova et al., 2006
FeE <i>Aspergillus niger</i>	0,01	-	-	+	+	0	Juge et al., 2001
FeE <i>Aspergillus oryzae</i>	0,17	-	-	+	+	0	Tenkanen et al., 1991

FeE Aureo-basidium pullulans	0,1	-	-	+	+	0	Rumbold et al., 2003
FeE Talaromyces stipitatus	0,08	-	-	+	+	0	Garcia-Conesa et al., 2004
AcXE Streptomyces lividans	0,2	-	-	-	-	0	Dupont et al., 1996
AcXE Trichoderma reesei	0,15	-	-	-	+	0	Sundberg et al., 1991
AcXE Schizophyllum commune	0,17	-	-	-	+	0	Biely et al., 1996
Μεθυλεστεράση πηκτινικής από ντομάτα	16,5	-	-	-	+	+	Markovic, O.
Pectinex® Ultra SP-L	6,35	-	-	+	+	+	Novozymes, Δαυία

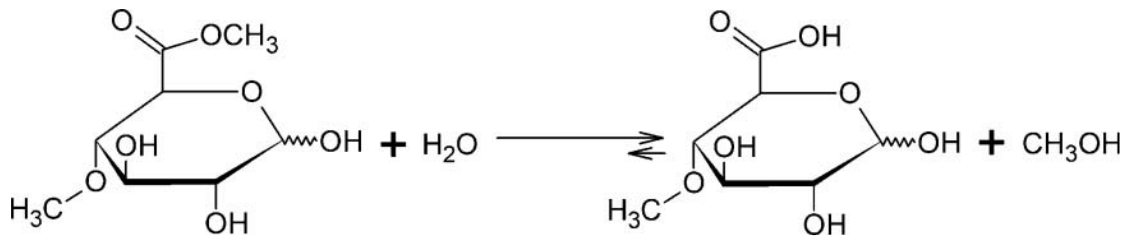
Η αλληλουχία αμινοξέων της γλυκουρονικής εστεράσης από το μύκητα *Hydrocrea jecorina* (Li et al., 2007) χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση ομόλογων γονιδίων σε διάφορους νηματοειδείς μύκητες και βακτήρια, γεγονός το οποίο οδήγησε στη δημιουργία μιας νέας οικογένειας υδατανθρακικών εστερασών (CE15) στη βάση δεδομένων CAZy (Cantarel et al., 2009). Παραδόξως, δεν περιλαμβάνουν όλοι οι μύκητες ομόλογες αλληλουχίες γλυκουρονικής εστεράσης και η εμφάνισή τους δεν είναι χαρακτηριστικό μιας κατηγορίας ή υποκατηγορίας μυκήτων. (Duranova et al., 2009). Ωστόσο, είναι επίσης δυνατόν να υπάρχει μια δεύτερη κατηγορία γλυκουρονικών εστερασών που δεν έχει καμία ομολογία με τις μέχρι σήμερα γνωστές εστεράσες. Καθώς η φυσιολογική λειτουργία των γλυκουρονικών εστερασών δεν είναι διακριτή και δεν υπάρχει άμεση απόδειξη εάν αυτό το ένζυμο διασπά τον εστέρα μεταξύ ουρονικού οξέος και αλκοόλης (και τα δύο είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος), η τρισδιάστατη δομή είναι εξαιρετικά σημαντική για να κατανοήσουμε τις

δραστηριότητες και τη λειτουργία αυτών των ενζύμων που ανήκουν στη νέα οικογένεια CE15 (Vafiadi et al., 2009).

Η πρώτη γλυκουρονική εστεράση από το μύκητα *H. jecorina* κρυσταλλώθηκε σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η δομή της, καθώς έχει σημαντική ενζυματική δραστηριότητα για την έρευνα στον τομέα των βιοκαυσίμων (Wood et al., 2008). Η ανάλυση της αλληλουχίας των γνωστών και χαρακτηρισμένων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος αποκάλυψε ότι ορισμένα από αυτά έχουν μια δομή που αποτελείται από ένα καταλυτικό τομέα, ένα πεπτίδιο σύνδεσης (linker peptide) και έναν τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτη (carbohydrate-binding module – CBM – Cantarel et al., 2009). Με βάση τις δομικές και λειτουργικές τους ομοιότητες τα μέλη της οικογένειας CBM1 ανήκουν στις τύπου A CBM που προσδέονται στην αδιάλυτη, κρυσταλλική κυτταρίνη και/ή τη χιτίνη (Boraston et al., 2004, Vafiadi et al., 2009).

1.2.2. ΓΝΩΣΤΕΣ ΔΟΜΕΣ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

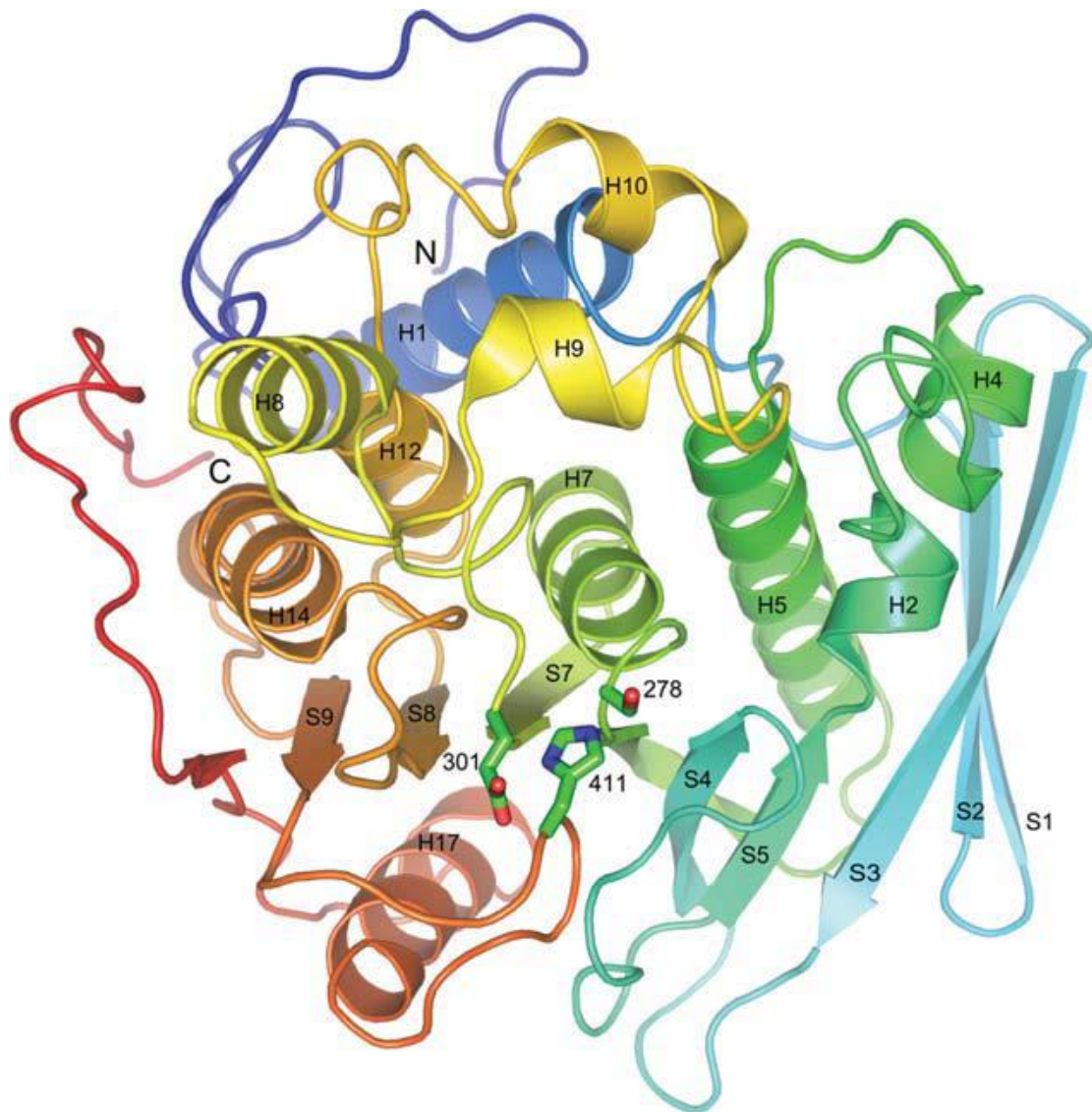
Μέχρι σήμερα, έξι μέλη αυτής της οικογένειας έχουν καθαρισθεί και χαρακτηρισθεί χρησιμοποιώντας μία σειρά από νέα συνθετικά υποστρώματα που περιλαμβάνουν μεθυλεστέρες ουρονικού οξέος και των γλυκοζιτών του. Τα δεδομένα που έχουν ληφθεί δείχνουν ότι ο μεθυλεστέρας του 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος υδρολύεται πιο αποτελεσματικά από όλες τις γλυκουρονικές εστεράσες που έχουν εξεταστεί, σε σχέση με τον αντίστοιχο εστέρα χωρίς την 4-Ο-μεθυλο ομάδα (Σχήμα 4). Το εύρημα αυτό ενισχύει περαιτέρω την πιθανή σημασία της μεθοξυ-ομάδας στην αναγνώριση του υποστρώματος.



Σχήμα 4: Η υδρόλυση του MeGlcA που καταλύεται από την StGE2.

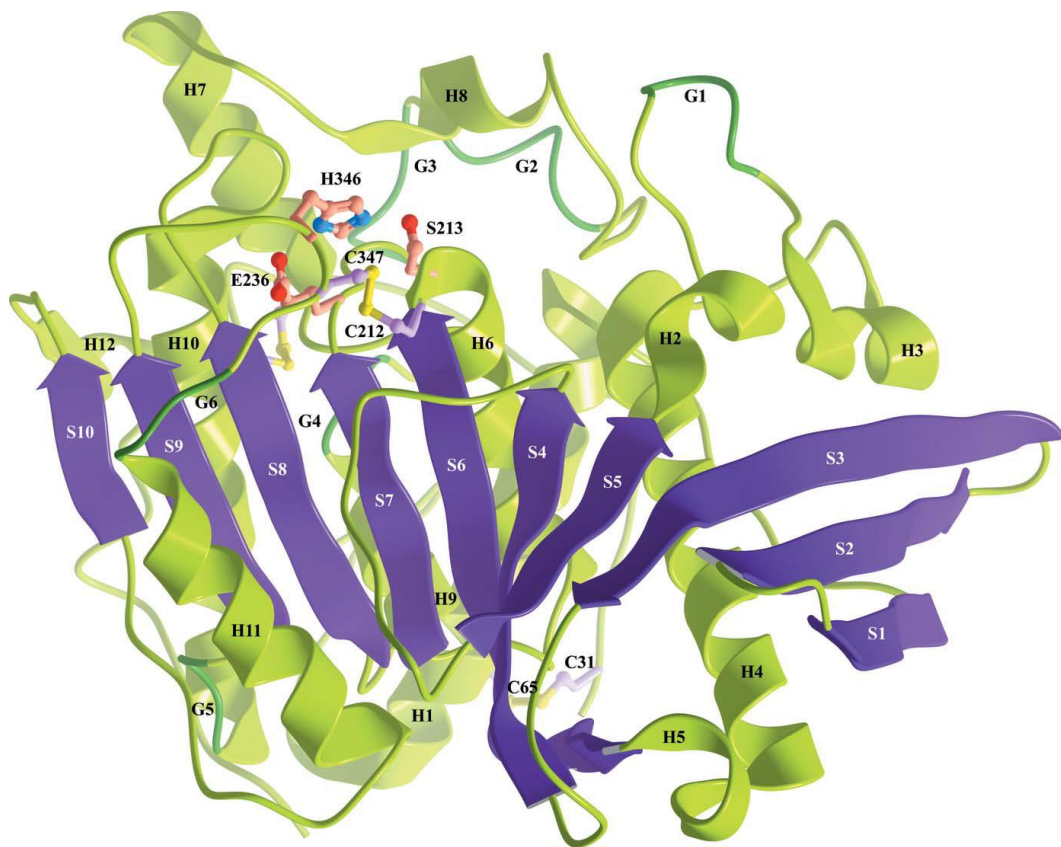
Μέχρι σήμερα, δύο μόνο τρισδιάστατες δομές της οικογένειας CE15 είναι διαθέσιμες. Πρόκειται για τη δομή της Cip2_GE (Pokkuluri et al., 2011) και τη δομή της StGE2 (Charavgi et al., 2013).

Η τρισδιάστατη δομή της Cip2_GE από το μύκητα *Hygrocrea jecorina* φαίνεται στο Σχήμα 5. Προσδιορίστηκε με περίθλαση ακτίνων Χ σε ανάλυση 1,9Å και έχει κατατεθεί στην Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank – <http://www.pdb.org>) με τον κωδικό 3PIC.



Σχήμα 5: Η τρισδιάστατη δομή της Cip2_GE. Η πρωτεϊνική αλυσίδα είναι χρωματισμένη στο χρωματικό φάσμα από μπλε (N-άκρο) σε κόκκινο (C-άκρο). Τα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας παρουσιάζονται με με σφαίρες και ράβδους και φαίνεται η θέση τους στην αμινοξική ακολουθία (Pokkuluri et al., 2011).

Η τρισδιάστατη δομή της StGE2 (Σχήμα 6) από το μύκητα *Myceliophthora thermophila* (ή *Sporotrichum thermophila*) παρουσιάζεται στο Σχήμα 6. Προσδιορίστηκε με περίθλαση ακτίνων X σε ανάλυση 1,55Å και έχει κατατεθεί στην Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων με τον κωδικό 4G4G.

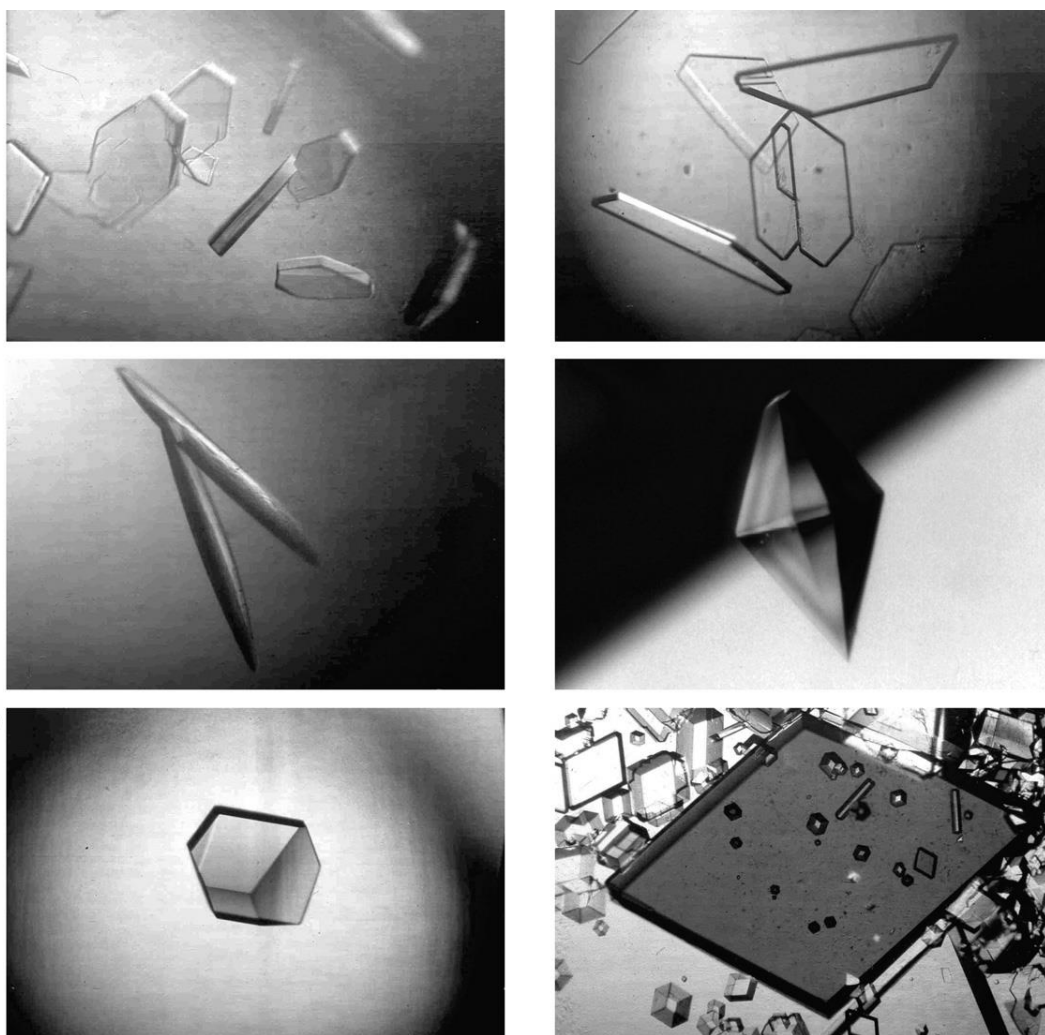


Σχήμα 6: Η τρισδιάστατη δομή της StGE2 προσδιορισμένη σε ανάλυση 1,55Å (Charavgi et al., 2013). Τα β-πτυχωτά ελάσματα (που φαίνονται με μωβ χρώμα και επισημαίνονται με το γράμμα S) έχει πακεταρισθεί μεταξύ δύο ομάδων α-έλικων (που φαίνονται με πράσινο χρώμα και επισημαίνονται με το γράμμα H) και 3_{10} -έλικων (που φαίνονται με σκούρο πράσινο χρώμα και επισημαίνονται με το γράμμα G). Τα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας παρουσιάζονται με σφαίρες και ράβδους και υποδεικνύονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται. Η εικόνα αυτή δημιουργήθηκε με το λογισμικό MolSoft (Raush et al., 2009).

Τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν 56% ταυτότητα αμινοξικής ακολουθίας. Η σύγκριση των δομών των StGE2 και Cip2_GE αποκαλύπτει τους βιοχημικούς και δομικούς παράγοντες που αναδεικνύουν την StGE2 ως πιο σημαντική για μελέτη για χρήση σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε σύγκριση με την Cip2_GE. Κάτι τέτοιο συμβαίνει λόγω του ότι η StGE2 είναι θερμόφιλη, λόγω της προσβασιμότητας της τριάδας των καταλυτικών υπολειμμάτων και λόγω της διαμόρφωσης του ενεργού κέντρου για την αναγνώριση του υποστρώματος, καθώς επίσης και του γεγονότος ότι είναι μονομερές (Charavgi et al., 2013).

1.3. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Το επιστημονικό πεδίο που αφορά στη συστηματική μελέτη της κατανομής, τροποποίησης και αλληλεπίδρασης των γονιδιακών προϊόντων (συνήθως πρωτεϊνών) είναι ευρέως γνωστό ως Λειτουργική Γενομική (Functional Genomics) και σημαντικός κλάδος της είναι η Δομική Γενομική (Structural Genomics). Η τελευταία έχει ως αντικείμενο το συστηματικό προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών για την κατανόηση της φυσιολογίας των κυττάρων σε μοριακό επίπεδο (Heinemann et al., 2001). Μία από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών σε υψηλή διακριτική ικανότητα είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Το 87% των κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων Protein Data Bank, PDB έχει προσδιοριστεί με αυτή τη μέθοδο. Στη ραγδαία εξέλιξη της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας συνέβαλλαν η χρήση της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις αρχές της δεκαετίας του '80, η συλλογή δεδομένων υπό κρυογενείς συνθήκες, η εφαρμογή της μεθόδου της ανώμαλης σκέδασης για τον προσδιορισμό των φάσεων (τεχνική MAD: Multiwavelength Anomalous Dispersion – αρχές δεκαετίας '90) και φυσικά η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ανθρώπου (2001) καθώς και πολλών άλλων οργανισμών σε συνδυασμό με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας που οδήγησαν σε μία έκρηξη του διαθέσιμου προς έρευνα υλικού (Jaskolski, 2010). Τα κρυσταλλογραφικά μοντέλα μακρομορίων υψηλής διακριτικής ικανότητας συμβάλλουν στη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης των ενζύμων καθώς και τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων ή άλλων βιοδραστικών ενώσεων.

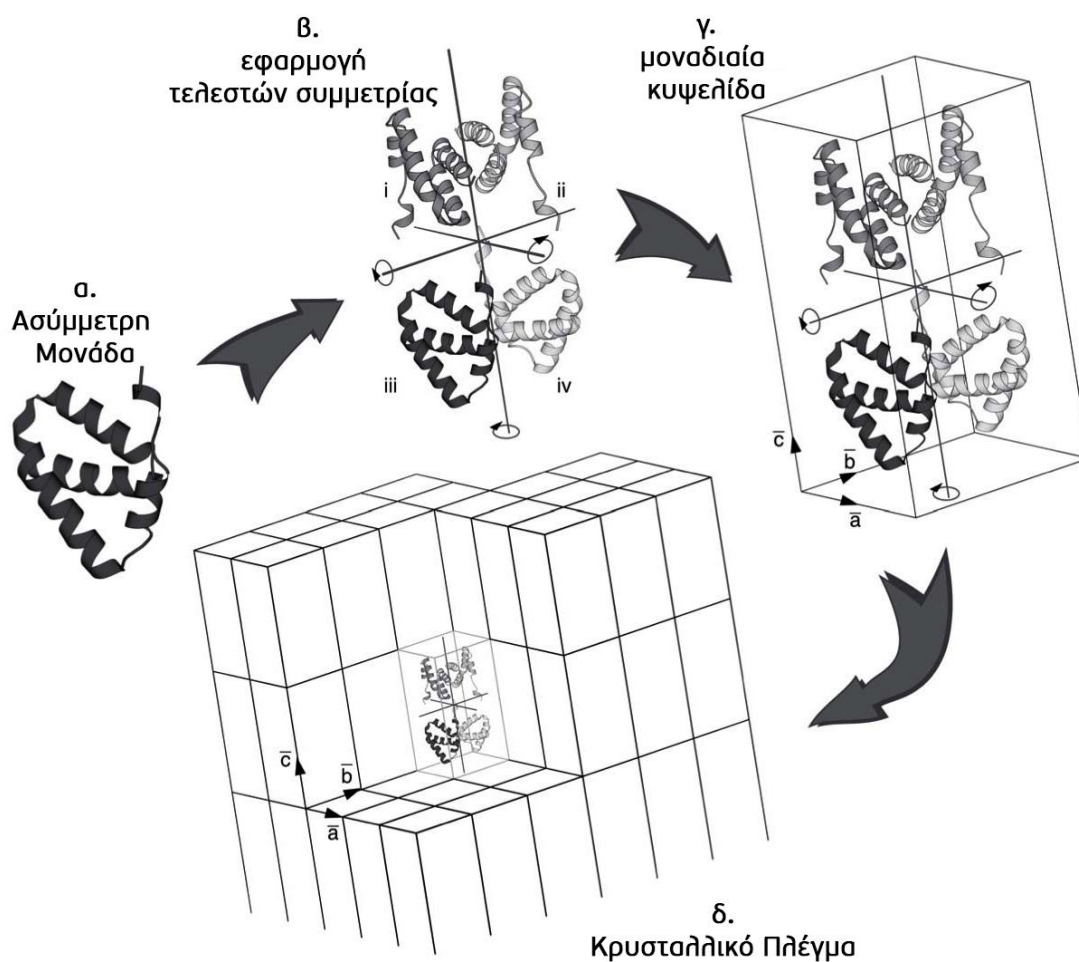


Εικόνα 2: Διάφοροι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι και κρύσταλλοι ιών (McPherson, 2004).

1.3.1. Η ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης απαιτείται η ανάπτυξη κρυστάλλων (Εικόνα 2), περιοδικών δηλαδή πλεγμάτων από στοιχειώδεις δομικές μονάδες (μοναδιαίες κυψελίδες) οι οποίες περιλαμβάνουν το υπό μελέτη βιομόριο. Η κρυστάλλωση είναι απαραίτητη καθώς η μέθοδος στηρίζεται στην περίθλαση των ακτίνων Χ. Οι ακτίνες Χ από ένα μόνο μόριο θα

ήταν εξαιρετικά ασθενείς και μη ανιχνεύσιμες. Οι κρύσταλλοι δηλαδή λειτουργούν ως ενισχυτές του σήματος περίθλασης. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται από τρεις ακμές a , b , c και τρεις γωνίες α , β , γ και μπορεί να ανακατασκευασθεί από μικρότερα τμήματα, ασύμμετρες μονάδες το πλήθος των οποίων είναι πεπερασμένο και υπαγορεύεται από την ομάδα χορού συμμετρίας του κρυστάλλου για κάθε πλέγμα. Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει όλες τις πληροφορίες που απαιτούνται για την ανακατασκευή της μοναδιαίας κυψελίδας με την εφαρμογή των κατάλληλων τελεστών συμμετρίας (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας, από την οποία με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας προκύπτει η μοναδιαία κυψελίδα. Από την επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας σε διατεταγμένη μορφή σχηματίζεται ο κρύσταλλος. Πηγή: A. McPherson, 2008, EMBO PEPC6 Course.

Οι μακρομοριακοί κρύσταλλοι αποτελούνται από περίπου 50% διαλυτή (ποσοστό ωστόσο που μπορεί να κυμαίνεται από 25 έως 90% ανάλογα με τη φύση του μακρομορίου) ο οποίος κατανέμεται σε «κανάλια» μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (γέφυρες άλατος, υδρογόνου και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις) είναι πολύ λιγότερες από αυτές που συναντώνται σε κρυστάλλους κοινών μορίων. Για το λόγο αυτό οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι συνήθως πιο μικρού μεγέθους, πιο εύθραυστοι ενώ περιθλούν τις ακτίνες Χ πολύ πιο ασθενώς. Είναι ευαίσθητοι στη θερμοκρασία και καταστρέφονται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ακτινοβολία λόγω σχηματισμού ελεύθερων ριζών και καταστροφής του κρυσταλλικού πλέγματος (Garman, 1999). Η παρουσία υψηλών ποσοστών διαλυτή, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξασθένησης του σήματος περίθλασης, συμβάλλει ταυτόχρονα και στη διατήρηση των δομικών και βιολογικών ιδιοτήτων των μακρομορίων που εισέρχονται στον κρύσταλλο, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη τους με τη διάχυση υποστρωμάτων, συνενζύμων, παρεμποδιστών, προσδετών ή ιόντων μέσα και έξω από το πλέγμα (Rupp, 2009).

1.3.2. ΣΤΑΔΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Η κρυστάλλωση ενός μορίου και γενικότερα οποιασδήποτε χημικής ουσίας συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικά ωστόσο αλληλοεξαρτώμενα στάδια: α) την πυρήνωση και β) την ανάπτυξη του κρυστάλλου. Η πυρήνωση είναι ένα φαινόμενο δύσκολο να προσεγγιστεί τόσο θεωρητικά όσο και πειραματικά καθότι πρόκειται για αλλαγή φάσης πρώτης τάξης κατά την οποία τα μόρια μεταβαίνουν από μία τελείως τυχαία σε μία οργανωμένη διάταξη. Είναι πιθανό αυτό να συμβαίνει μέσω του σχηματισμού μερικώς δομημένων ή παρακρυσταλλικών ενδιάμεσων – σε αυτή την περίπτωση πρωτεϊνικών συσσωμάτων – τα οποία τελικά μετατρέπονται σε μικρές οργανωμένες δομές, τους «κρίσιμους πυρήνες» (McPherson, 2004). Αναγκαία προ-

Υπόθεση για την κρυστάλλωση των μακρομορίων είναι η δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού. Πρόκειται για μία θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση κατά την οποία η μακρομοριακή ουσία βρίσκεται σε διαλυμένη μορφή ενώ οι φυσικοχημικές συνθήκες του διαλύματος βρίσκονται εκτός του ορίου διαλυτότητας της. Η ισορροπία αποκαθίσταται με το σχηματισμό στερεής φάσης όπως είναι οι κρύσταλλοι μέχρι να αποκατασταθεί η κατάσταση κορεσμού. Ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται με αλλαγή των ιδιοτήτων ενός ακόρεστου διαλύματος του βιομορίου έτσι ώστε να μειωθεί η διαλυτότητά του ή να αυξηθούν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των διαλυμένων μορίων. Αυτό γίνεται με διάφορους τρόπους όπως α) αλλαγή της ιοντικής ισχύος (προσθήκη άλατος), β) αλλαγή των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (αλλαγή pH, προσθήκη ιόντων που υποβοηθούν τη σύζευξη των μορίων), γ) αλλαγή της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και του διαλύτη (προσθήκη πολυμερών ή ιόντων) και δ) αλλαγή θερμοκρασίας (Δημαρόγωνα, 2012).

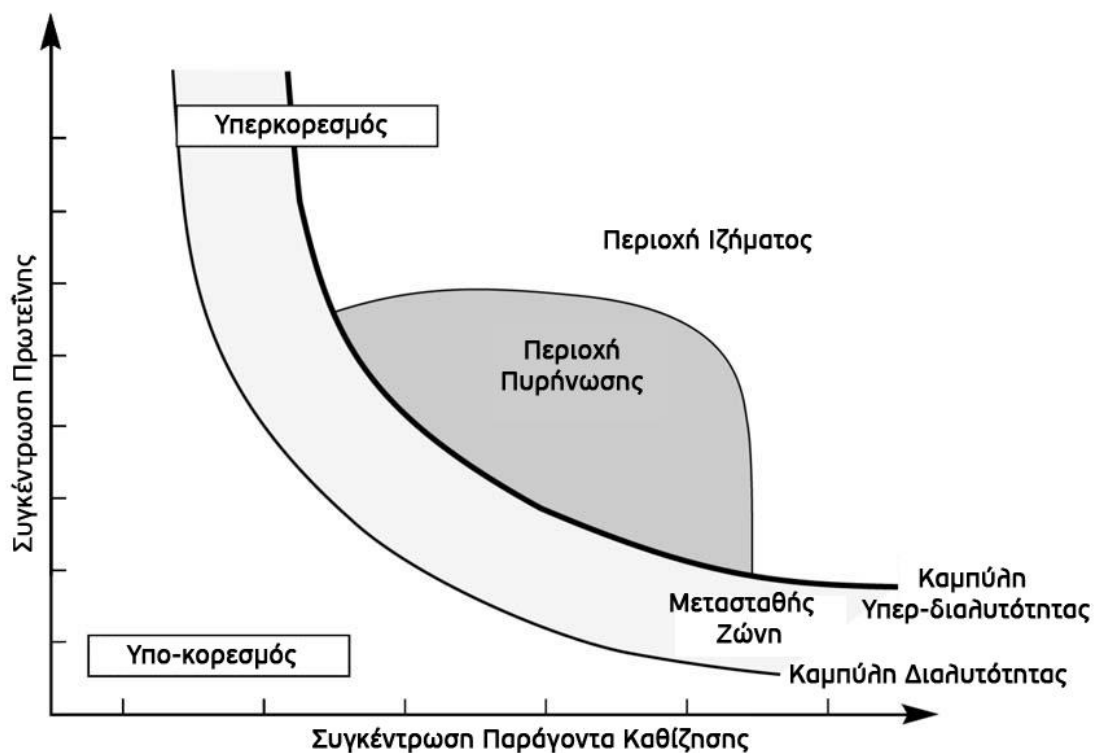
1.3.3. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Η διαδικασία κρυστάλλωσης μπορεί να απεικονιστεί σε ένα διάγραμμα φάσεων που δείχνει ποια κατάσταση (υγρό, κρυσταλλικό ή άμορφο στερεό ίζημα) είναι σταθερή κάτω από διάφορες παραμέτρους κρυστάλλωσης. Παρέχει ένα μέσο για την ποσοτικοποίηση της επιρροής των παραμέτρων στην παραγωγή των κρυστάλλων. Ως εκ τούτου, τα διαγράμματα φάσεων αποτελούν τη βάση για το σχεδιασμό των συνθηκών ανάπτυξης των κρυστάλλων (Ducruix et al., 1992 – McPherson, 1999 – Chayen et al., 1996).

Το Σχήμα 8 αποτελεί ένα παράδειγμα ενός τυπικού διαγράμματος φάσεων κρυστάλλωσης. Σχηματικά απεικονίζονται τέσσερις περιοχές: α) μια περιοχή πολύ υψηλού υπερκορεσμού, όπου η πρωτεΐνη θα καθιζάνει, β) μια περιοχή μέτριου υπερκορεσμού όπου θα πραγματοποιηθεί αυθόρμητη πυρήνωση, γ)

μια περιοχή υπερκορεσμού κάτω ακριβώς κάτω από την περιοχή πυρήνωσης, όπου οι κρύσταλλοι είναι σταθεροί και μπορεί να αυξηθούν, αλλά δε θα λάβει χώρα περαιτέρω πυρήνωση (αυτή η περιοχή αναφέρεται ως μετασταθής ζώνη η οποία πιστεύεται ότι περιέχει τις καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη μεγάλων και καλά οργανωμένων κρυστάλλων) και δ) μια περιοχή υπο-κορεσμού όπου η πρωτεΐνη έχει διαλυθεί πλήρως και ποτέ δε θα κρυσταλλωθεί (Chayen et al., 1996).

Σε ένα ιδανικό πείραμα, αφού έχουν σχηματιστεί πυρήνες, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα θα μειωθεί, οδηγώντας έτσι φυσικά το σύστημα στη μετασταθή ζώνη, όπου η ανάπτυξη θα συμβεί, χωρίς το σχηματισμό περαιτέρω πυρήνων (Ducruix και Giege, 1992, McPherson, 1999, Bergfors, 1999). Ωστόσο, ένα ιδανικό πείραμα δε συμβαίνει συχνά και τις περισσότερες φορές προκαλείται περίσσεια πυρήνωσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών χαμηλής ποιότητας κρυστάλλων. Ο στόχος είναι ως εκ τούτου να επινοηθούν μέθοδοι που θα επιτρέψουν τον ερευνητή να οδηγήσει το πείραμα από την πυρήνωση στην ανάπτυξη ώστε να εξασφαλιστούν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Chayen, 2005).



Σχήμα 8: Το διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης (Chayen, 2005).

1.3.4. ΔΙΑΛΟΓΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ

Στην πραγματικότητα υπάρχουν δύο φάσεις κατά τη δημιουργία των πρωτεϊνικών κρυστάλλων: α) ο προσδιορισμός των χημικών, βιοχημικών, και φυσικών συνθηκών που αποφέρουν κάποιο κρυσταλλικό αποτέλεσμα, ακόμα και ανεπαρκές και β) η συστηματική τροποποίηση των αρχικών αυτών συνθηκών με αυξητικές ποσότητες για να επιτευχθούν τα βέλτιστα δείγματα για ανάλυση. Η πρώτη φάση εμπεριέχει το μεγαλύτερο κίνδυνο, καθώς ορισμένες πρωτεΐνες απλώς αρνούνται να σχηματίσουν κρυστάλλους, ενώ επίσης απουσιάζουν κάποιες ενδείξεις ως προς το γιατί. Η δεύτερη φάση, όμως, αποδεικνύεται συχνά πιο απαιτητική, χρονοβόρα και επίπονη.

Υπάρχουν βασικά δύο προσεγγίσεις της μεθόδου επιλογής των συνθηκών κρυστάλλωσης. Η πρώτη περιλαμβάνει μια συστηματική παραλλαγή του ό-

ποιου πιστεύεται ότι είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας καταβύθισης. Η δεύτερη περιλαμβάνει χρήση διαφόρων εμπορικών πακέτων διαλυμάτων κρυστάλλων, που διατίθενται σήμερα στην αγορά από πολλές εταιρίες. Αυτά τα διαλύματα καλύπτουν τις συνηθέστερες συνθήκες ή συνθήκες στις οποίες έχει παρατηρηθεί συχνά σχηματισμός κρυστάλλων από άλλους επιστήμονες.

Μόλις μερικοί κρύσταλλοι ή ακόμη και ένας μόνο μικροκρύσταλλος παρατηρηθεί και αποδειχθεί ότι είναι πρωτεΐνης προέλευσης (και όχι κρύσταλλος άλατος), τότε ξεκινάει η διαδικασία της βελτιστοποίησης. Κάθε συστατικό στοιχείο στο διάλυμα που απέδωσε κρυστάλλους, πρέπει να σημειωθεί και να θεωρηθεί ότι θα μπορούσε να έχει αντίκτυπο στην ποιότητα των αποτελεσμάτων. Κάθε μία από τις παραμέτρους ή παράγοντες στη συνέχεια προσεκτικά επαυξάνεται ή μειώνεται διαδοχικά και δοκιμάζεται για το εάν αποδίδει καλύτερους κρυστάλλους. Επειδή το πρόβλημα είναι μη γραμμικό, και η μία μεταβλητή μπορεί να συνδέεται την άλλη, αυτή η διαδικασία είναι συχνά πιο πολύπλοκη και δύσκολη από ό, τι θα περίμενε κανείς (McPherson, 2004).

1.3.5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΥΠΕΡΚΟΡΕΣΜΟΥ

Στην πράξη, ο ερευνητής αρχίζει με ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει κάποια συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάτω από το όριο διαλυτότητας της ή εναλλακτικά στη μέγιστη διαλυτότητά της. Ο στόχος είναι να μεταβληθούν στη συνέχεια οι παράγοντες, έτσι ώστε η διαλυτότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα να μειωθεί, καθιστώντας έτσι το διάλυμα υπερκορεσμένο. Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους: α) με τροποποίηση της ίδιας της πρωτεΐνης (π.χ. αλλαγή του pH το οποίο μεταβάλλει την κατάσταση ιονισμού των επιφανειακών υπολειμμάτων αμινοξέων), β) με τροποποίηση της χημικής δραστηριότητας του ύδατος (π.χ. με προσθήκη κάποιου άλατος), γ) με μεταβολή του βαθμού της έλξης ενός μορίου πρωτεΐνης με ένα άλλο (π.χ. αλλαγή pH, προσθήκη ιόντων γεφύρωσης) και δ) μεταβάλλοντας τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων

της πρωτεΐνης και του διαλύτη (π.χ. προσθήκη πολυμερών ή ιόντων). Στον Πίνακα 2 περιλαμβάνονται οι σημαντικότερες μέθοδοι βάσει των οποίων μπορεί να αναπτυχθούν στρατηγικές για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης (McPherson, 2004).

Πίνακας 2: Μέθοδοι για τη δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού (McPherson, 2004).

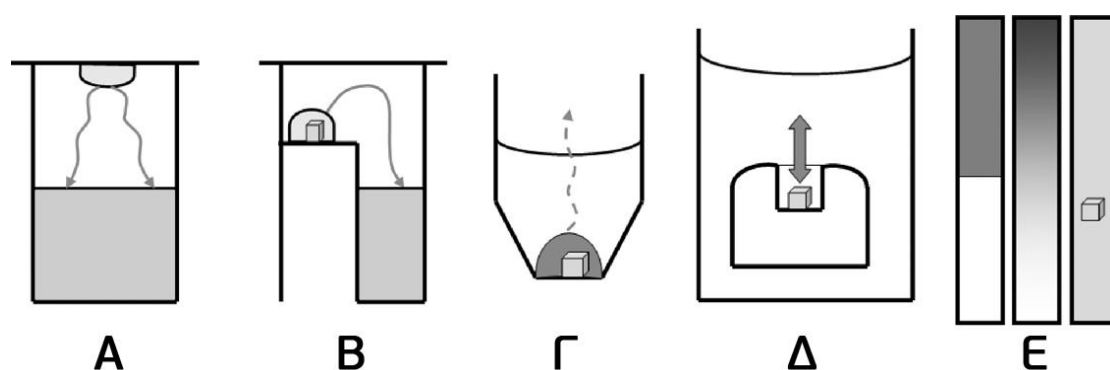
1	Άμεση ανάμιξη για την άμεση δημιουργία μια υπερκορεσμένης κατάστασης (Μέθοδος Batch).
2	Τροποποίηση της θερμοκρασίας.
3	Τροποποίηση της συγκέντρωσης του άλατος.
4	Τροποποίηση του pH.
5	Προσθήκη ενός υποκαταστάτη που να αλλάζει τη διαλυτότητα του μακρομορίου.
6	Τροποποίηση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου.
7	Απευθείας απομάκρυνση του νερού (εξάτμιση).
8	Προσθήκη ενός πολυμερούς που να αυξάνει τον όγκο.
9	Προσθήκη ενός σταυρωτού παράγοντα γεφύρωσης.
10	Συμπύκνωση του μακρομορίου.
11	Απομάκρυνση ενός παράγοντα διαλυτοποίησης.

1.3.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΩΝ

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι σχετικά απλή. Σε γενικές γραμμές, η πρωτεΐνη διαλυτοποιείται σε ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα, αναμιγνύεται με το διάλυμα κρυστάλλωσης μέσα σε ένα κλειστό σύστημα και το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας μέχρι εκεί που επιτρέπει η κινητική του συστήματος. Διάφορες τεχνικές κρυστάλλωσης με παραλλαγές ως προς τον τρόπο ανάμιξης και εξισορρόπησης έχουν αναπτυχθεί, όπως είναι η τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης (Batch), η τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapour diffusion), η διαπίδωση (Dialysis) και η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας

(Free-interface diffusion). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η τεχνική διάχυσης των ατμών με κρεμάμενη (Hanging Drop Varour Diffusion – HDVD) ή καθήμενη σταγόνα (Sitting Drop Varour Diffusion – SDVD – Σχήμα 9). Η διάταξη περιλαμβάνει κλειστό σύστημα το οποίο αποτελείται από ένα βοθρίο που φέρει τη σταγόνα (μίγμα πρωτεΐνης και διαλύματος κρυστάλλωσης) και μία δεξαμενή με διάλυμα κρυστάλλωσης. Το διάλυμα της δεξαμενής απορροφά ατμούς ύδατος από τη σταγόνα λόγω της διαφοράς στη συγκέντρωση των επιμέρους συστατικών του. Η δε πρωτεΐνη που βρίσκεται στη σταγόνα οδηγείται με τον τρόπο αυτό σε κατάσταση υπερκορεσμού και κατ' επέκταση σε ανάπτυξη κρυστάλλων.

Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την κρυστάλλωση όπου το προ κρυστάλλωση διάλυμα τοποθετείται σε ελαιώδες περιβάλλον και αφήνεται μέχρι να σχηματιστούν κρύσταλλοι (microbatch under oil). Η μέθοδος ευνοεί τη διαχείριση μικρών όγκων, αν και η συγκομιδή είναι δυσκολότερη. Η μικροδιαπίδυση (microdialysis) αυτοματοποιείται δύσκολα, ενώ η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (free interface diffusion) χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο, αλλά η αυτοματοποίηση και η συγκομιδή είναι στοιχεία που χρήζουν βελτίωσης. Οι μέθοδοι διασχίζουν το διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης με μια διαφορετική διαδρομή και δεν παράγουν αναγκαστικά τα ίδια αποτελέσματα στις ίδιες συνθήκες (Rupp et al., 2004).

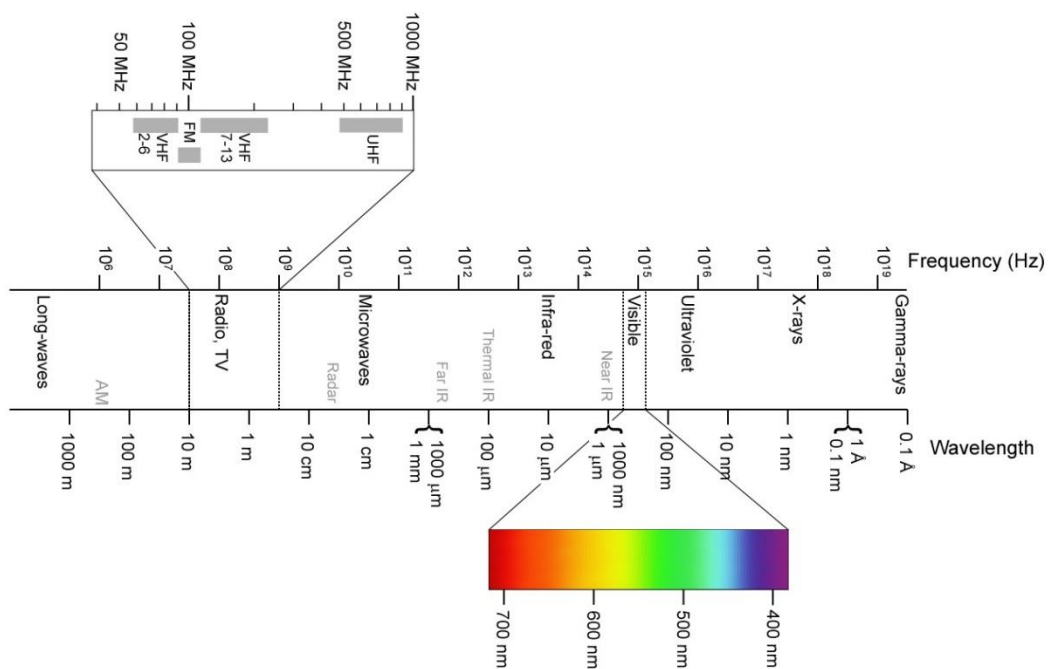


Σχήμα 9: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης των κυριότερων τεχνικών διάχυσης: Α. Με κρεμάμενη σταγόνα, Β. Με καθήμενη σταγόνα, Γ. Τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης υπό έλαιο, Δ. Μικροδιαπίδυση, Ε. Διάχυση ελεύθερης επιφάνειας. Οι τεχνικές της κρεμάμενης και της καθήμενης σταγόνας είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες σήμερα (Rupp et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας κρυστάλλωσης με τη χρήση ρομπότ τόσο για την παρασκευή των διαλυμάτων όσο και για την πραγματοποίηση και παρακολούθηση των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Για παράδειγμα, ρομπότ κατασκευασμένο στο Ινστιτούτο Hauptman–Woodward των Η.Π.Α. μπορεί να εκτελέσει 9200 πειράματα την ώρα ενώ πολλά εμπορικά διαθέσιμα μηχανήματα είναι πλέον στη διάθεση και μικρότερων εργαστηρίων δομικής βιολογίας σε όλο τον κόσμο (Sharff et al., 2003). Εκτός από τη μείωση του πειραματικού χρόνου και τη δυνατότητα σάρωσης μεγαλύτερου πλήθους αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης, η αυτοματοποίηση συνέβαλλε και στη μείωση της απαιτούμενης ποσότητας πρωτεΐνης χάρη στη δυνατότητα χειρισμού πολύ μικρών όγκων διαλυμάτων (της τάξης ακόμα και μερικών nL) (Chayen 2009). Όλα τα παραπάνω συνέβαλλαν σημαντικά στην αύξηση του ποσοστού επιτυχίας των προσπαθειών κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών–στόχων ταχύτερα, χωρίς ωστόσο να είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την εμπειρία του πειραματιστή και να καταστήσουν την κρυστάλλωση μία διαδικασία ρουτίνας.

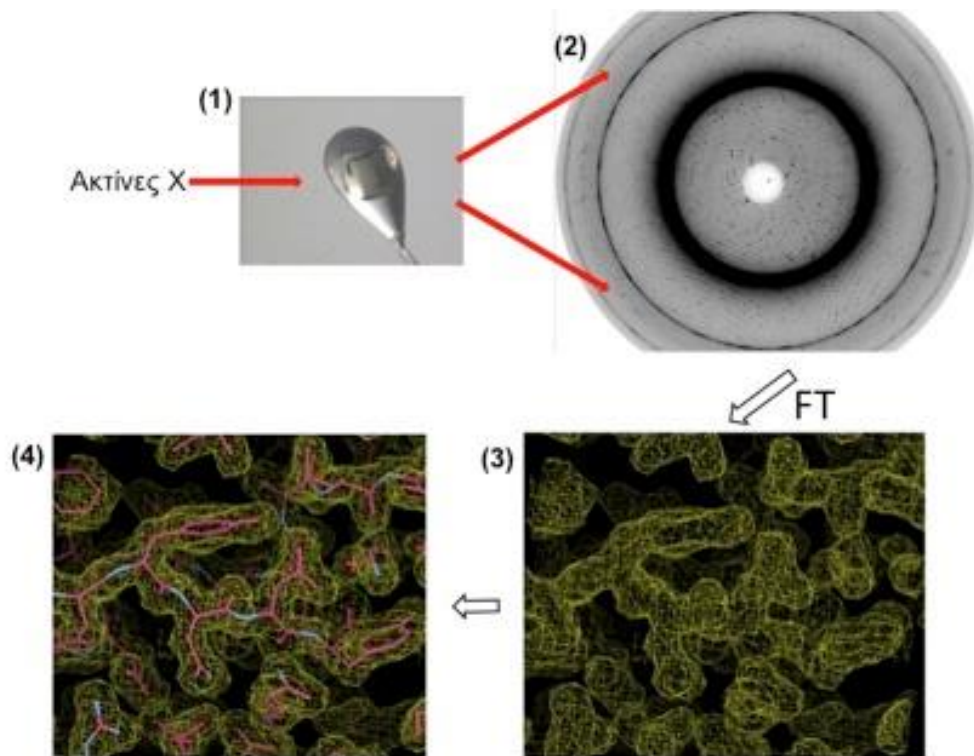
1.3.7. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΥΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

Η βασική αρχή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ στηρίζεται, όπως αναφέρθηκε, στην περίθλαση των ακτίνων Χ από έναν κρύσταλλο του μακρομορίου. Οι ακτίνες Χ διακρίνονται σε «μαλακές» με μήκος κύματος μεταξύ 10–0,1 nm και «σκληρές», με μήκος κύματος μεταξύ 0,1–0,01 nm (Σχήμα 10). Η χρήση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας είναι αυτή που επιτρέπει τη συλλογή δομικών πληροφοριών σε ατομική διακριτική ικανότητα (10–10 m), καθώς σε όλες τις τεχνικές μικροσκοπίας η διακριτική ικανότητα καθορίζεται από το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας.



Σχήμα 10: Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Πηγή: www.iappsofts.com.

Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει την τοποθέτηση του κρυστάλλου σε γωνιοστάτη και την έκθεσή του σε ευθυγραμμισμένη δέσμη ακτίνων X μήκους κύματος περίπου 0,6 με 2,3 Å καθώς περιστρέφεται διαδοχικά κατά μικρή κάθε φορά γωνία. Τα αντίστοιχα περιθλασιγράμματα, καταγράφονται από ανιχνευτή. Ο κρυσταλλογράφος χρησιμοποιεί τα πειραματικά αυτά δεδομένα για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μακρομορίου και την κατασκευή του μοριακού μοντέλου για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθείται για τον προσδιορισμό της κρυσταλλογραφικής δομής ενός μακρομορίου: 1. Ο κρύσταλλος εκτίθεται στις ακτίνες X, 2. Καταγράφονται τα αντίστοιχα περιθλασιγράμματα από τον ανιχνευτή, 3. Τα δεδομένα επεξεργάζονται με ειδικό λογισμικό και εν συνεχεία προσδιορίζεται η ηλεκτρονική πυκνότητα, 4. Κατασκευάζεται το μοριακό μοντέλο μέσα στην ηλεκτρονική πυκνότητα. Πηγή εικόνας κρυστάλλου: UCDavis/ChemWiki.

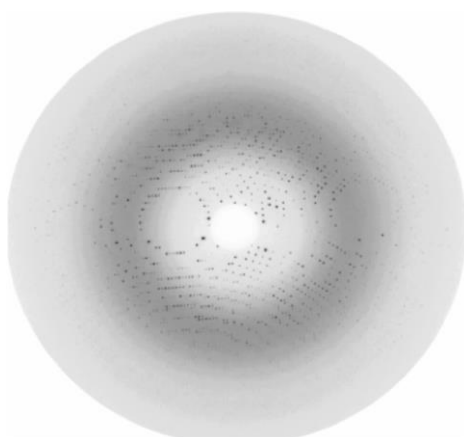
Για την παραγωγή ακτίνων X χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικοί τύποι πηγών: οι συμβατικές πηγές ακτίνων X, τα σύγχροτρον και οι πηγές Compton. Οι συμβατικές πηγές ακτίνων X απαντώνται συνήθως σε ερευνητικά εργαστήρια και διακρίνονται σε λυχνίες και περιστρεφόμενες ανόδους. Οι ακτίνες X παράγονται από επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια τα οποία εκπέμπονται από μία πηγή υψηλής τάσης και προσπίπτουν σε ένα μεταλλικό στόχο (π.χ. Cu). Με τον τρόπο αυτό προσδίδουν ενέργεια η οποία διεγείρει τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων του στόχου. Κατά το στάδιο της αποδιέγερσης τα ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακά στοιβάδων καταλαμβάνουν χαμηλότερες ενεργειακά θέσεις παράγοντας ακτινοβολία X με ενέργεια της τάξης των κίλο-ηλεκτρονιοβόλτ (keV). Υψηλότερης ενέργειας ακτίνες X παράγονται στις

συγχροτρονικές εγκαταστάσεις (Εικόνα 3). Αυτές περιλαμβάνουν τεράστιους δακτυλίους και ισχυρούς ηλεκτρομαγνήτες οι οποίοι διασφαλίζουν την καμπύλη τροχιά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (της τάξης των γιγα-ηλεκτρονιοβόλτ (GeV)). Μετά από την αρχική τους επιτάχυνση, τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο δακτύλιο όπου διατηρούν σταθερή ενέργεια αλλά υφίστανται γωνιακή επιτάχυνση στο εσωτερικό των μαγνητών κάμψης (bending magnets) με αποτέλεσμα την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας διαφόρων μηκών κύματος από την περιοχή των μικροκυμάτων μέχρι τις «σκληρές» ακτίνες Χ (Dauter et al., 2010). Επιπρόσθετα, συστήματα που εφάπτονται στο δακτύλιο αποθήκευσης όπως κάτοπτρα εστίασης και μονοχρωμάτορες, παρέχουν τελικά μονοχρωματική δέσμη ακτίνων Χ επιθυμητού μήκους κύματος για διάφορες εφαρμογές (Rhodes, 1999). Οι πηγές Compton, τέλος, που αποτελούν πεδίο υπό ανάπτυξη, χρησιμοποιούν ειδικά λέιζερ για να διεγείρουν δέσμη ηλεκτρονίων και να προκαλέσουν με τον τρόπο αυτό την εκπομπή ακτίνων Χ (Δημαρόγωνα, 2012).



Εικόνα 3: Η πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Diamond που βρίσκεται στην Αγγλία. Πηγή: www.webbaviation.co.uk.

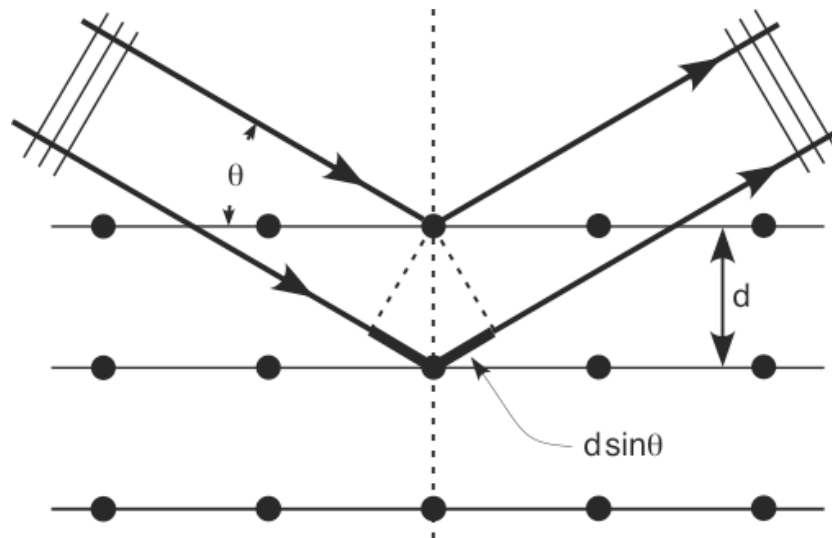
Κατά την έκθεση του κρυστάλλου σε ακτίνες Χ καταγράφονται τα περιθλασιγράμματα που προκύπτουν από τη σκέδαση των ακτίνων από τα ηλεκτρόνια των ατόμων του κρυσταλλικού πλέγματος, φαινόμενο που περιγράφηκε πρώτα από τον Lawrence Bragg το 1913 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Περιθλασίγραμμα ενός κρυστάλλου φωσφορυλάσης b του γλυκονόου από σκελετικούς μύς κουνελιού εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

Σύμφωνα με το νόμο του Bragg (Σχήμα 12), η περίθλαση μπορεί να περιγράψει ως ανάκλαση σε ένα σύνολο επιπέδων του πλέγματος που ισαπέχουν μεταξύ τους. Η εξίσωση του Bragg παρέχει ένα ποσοτικό συσχετισμό μεταξύ των αποστάσεων των περιθλαστικών επιπέδων (d_{hkl}) και της γωνίας περίθλασης 2θ :

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin\theta$$



Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση του νόμου του Bragg.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Στην παρούσα εργασία εκφράστηκαν ετερόλογα στη ζύμη *P. pastoris* και καθαρίστηκαν δύο πρωτεΐνες της οικογένειας CE15 των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος. Συγκεκριμένα, η PαCE15A και η PαCE15B, αμφότερες οι οποίες προέρχονται από το μύκητα *P. anserina*. Όλα τα στάδια πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Λέκτορα Δρ. Ε. Τόπακα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία αυτή.

2.1.1. ΟΡΓΑΝΑ

Κατά την ετερόλογη έκφραση και τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Πεχάμετρο 537 (WTW – Γερμανία).
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθολου νερού Milli-Q (Millipore – Η.Π.Α.).
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302 (Labequip – Καναδάς).
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave (Sanyo).
- Θερμοστατούμενα υδρόλουτρα και επωαστήρες.
- Συσκευή διήθησης υπό κενό.
- Συσκευή συμπύκνωσης Amicon Chamber 8400 με μεμβράνη MP-30 με μέγεθος αποκλεισμού 30kDa (Millipore – Η.Π.Α.).
- Στήλη υλικού Talon™ (Clontech Laboratories Inc. – Η.Π.Α.)
- Συλλέκτης κλάσμάτων (Waters – Millipore – Η.Π.Α.).

- Μονάδα ηλεκτροφόρισης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-Protean 3 (Biorad – Η.Π.Α.).
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Confort (Eppendorf – Γερμανία).
- Μembrάνη Dialysis (Sigma – Η.Π.Α.).
- Φίλτρα διήθησης υπό κενό με διάμετρο πόρων 0,2μm και 0,8μm (Pall Filters).
- Συσκευή μέτρησης συγκέντρωσης NanoDrop (Thermo Fisher Scientific – Η.Π.Α.)

2.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), η πεπτόνη (peptone), το ιμιδαζόλιο (imidazole), το νατραζίδιο (sodium azide), η αζωτούχος βάση ζύμης (Yeast Nitrogen Base – YNB), η μεθανόλη (methanol), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το υδροχλωρικό οξύ (HCl) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Η γλυκερόλη (glycerol) και η αιθανόλη (ethanol) αγοράστηκαν από την εταιρία AppliChem (Γερμανία), ενώ το τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane – Tris) ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία). Η ζεοσίνη (zeocin) αγοράστηκε από την εταιρία Invivogen (Γαλλία), Η τετραμεθυλενδιαμίνη (Tetramethylethylenediamine – TEMED), το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate – APS) και το ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide) ήταν της εταιρίας Biorad Laboratories (Η.Π.Α.), ενώ τέλος το οξικό οξύ (CH₃COOH) προμηθεύτηκε από την εταιρία Panreac (Ισπανία).

2.1.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

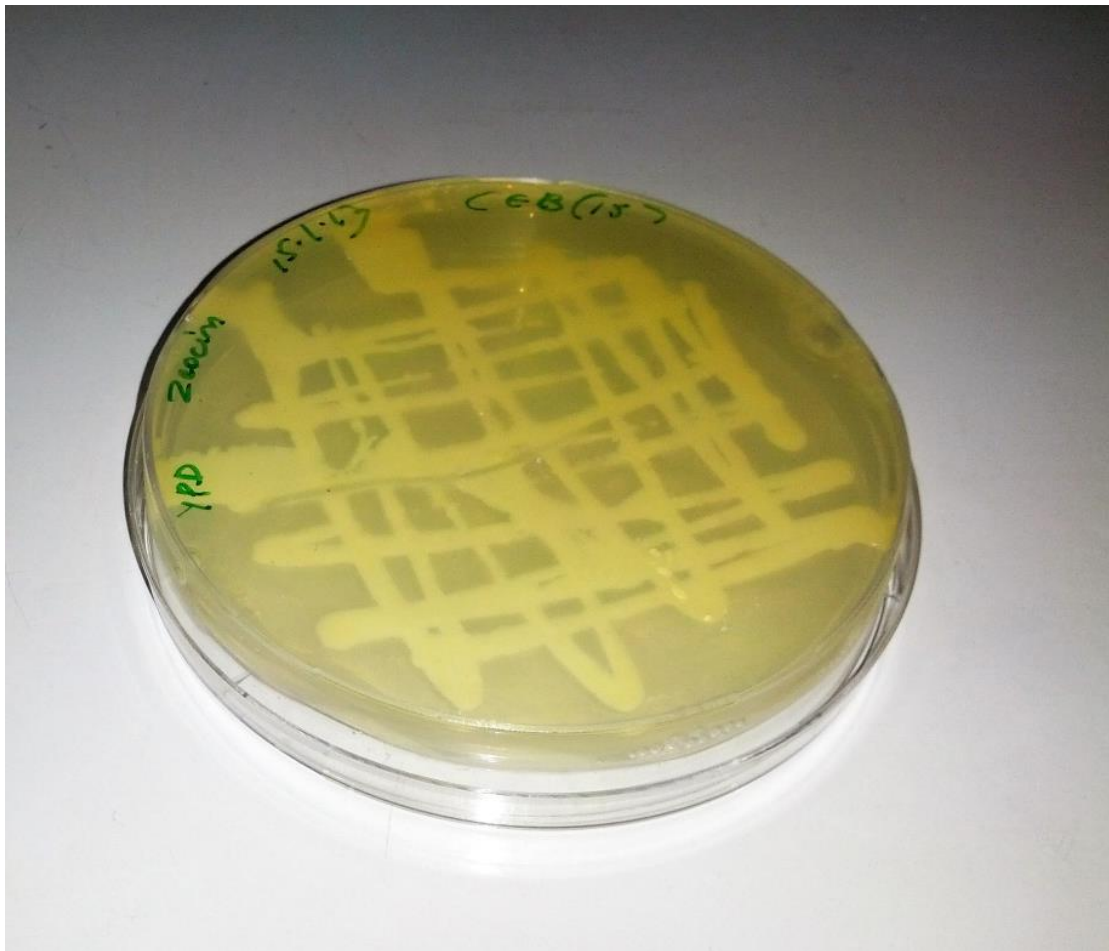
Όλα τα όργανα και τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15min και υπό πίεση 0,1 Μρα. Η βιοτίνη και η μεθανόλη δεν αποστειρώθηκαν, λόγω αλλοίωσης και πιθανής έκρηξης που θα συνέβαινε αντίστοιχα. Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν YPD, BMGY και BMMY και η σύστασή τους φαίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικών μέσων.

YPD	1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη
BMGY	1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH = 6, 1,34% w/v διάλυμα YNB (3,4g YNB και 10g θειικό αμώνιο ανά 100mL διαλύματος YNB), $4 \cdot 10^{-5}$ w/v βιοτίνη, 1 w/v γλυκερόλη.
BMMY	1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH = 6, 1,34% w/v διάλυμα YNB (3,4g YNB και 10g θειικό αμώνιο ανά 100mL διαλύματος YNB), $4 \cdot 10^{-5}$ w/v βιοτίνη, 1 w/v μεθανόλη.

2.1.4. ΈΚΦΡΑΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *P. PASTORIS*

Δημιουργήθηκε στερεή ανακαλλιέργεια σε τρυβλία, χρησιμοποιώντας YPD–zeocin ως θρεπτικό μέσο (Εικόνα 5). Εμβολιάστηκε με τους μικροοργανισμούς, δηλαδή ανασυνδυασμένη *P. pastoris*. Η έκφραση της πρωτεΐνης επαγόταν με προσθήκη μεθανόλης. Στο καρβοξυτελικό άκρο κάθε πρωτεΐνης είχαν προστεθεί 6 ιστιδίνες, ώστε να δεσμεύεται από ιόντα κοβαλτίου και να είναι εφικτή η απομόνωσή της. Τα τρυβλία φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C.



Εικόνα 5: Το τρυβλίο YPD–zeocin με την ανασυνδυασμένη *P. pastoris*.

Τοποθετήθηκε θρεπτικό μέσο BMMY σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που έφεραν εσοχές στον πυθμένα για να επιτευχθεί καλύτερος αερισμός. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν από 50mL σε 6 κωνικές φιάλες και στη συνέχεια, κάθε κωνική φιάλη εμβολιάστηκε με το μικροοργανισμό από τα τρυβλία ανακαλλιέργειας, δηλαδή με ανασυνδισμένη *P. pastoris*. Τέλος, ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση σε 180rpm και θερμοκρασία 30°C περίπου για 16h.

Δείγμα από κάθε κωνική φιάλη αραιώθηκε σε αναλογία 1:10 με H₂O. Μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) αυτού στα 600nm, μηδενίζοντας με τυφλό διάλυμα που περιέχει υπερκείμενο. Το υπερκείμενο λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση ενός από τα δείγματα που ελήφθησαν. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο όγκος προκαλλιέργειας που απαιτείται να φυγοκεντρηθεί ώστε όταν επαναιωρηθούν τα κύτταρα σε 250mL να έχουν OD=1 στα 600nm.



Εικόνα 6: Κωνικές φιάλες με καλλιέργειας *P. Pastoris* σε θρεπτικό μέσο BMMY.

Επιλέχθηκαν οι προκαλλιέργειες ώστε να ληφθεί ο απαιτούμενος όγκος και να φυγοκεντρηθεί για 10min σε (1500-3000)·g rpm. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο BMMY σε 4 κωνικές φιάλες του 1L και τελικό όγκο διαλύματος ανά φιάλη 250mL (Εικόνα 6).

Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση σε 180rpm και θερμοκρασία 30°C για 7 ημέρες. Κάθε μέρα προστίθενταν υπό στείρες συνθήκες, 1,25mL μεθανόλης σε κάθε κωνική φιάλη, ώστε η τελική συγκέντρωση να παραμένει 0,5% v/v.

Το 1L καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε για 10min σε 12000rpm στους 4°C. Ακολούθησε διήθηση του υπερκείμενου με απλό διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές διηθήσεις υπό κενό, χρησιμοποιώντας πρώτα φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,8μm και στη συνέχεια φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,2μm.

Το διάλυμα συμπυκνώθηκε με συσκευή Amicon, χρησιμοποιώντας μεμβράνη πολυαιθερσουλφόνης (polyethersulphone) που επέτρεπε τη δίοδο μακρομορίων μικρότερων από 30kDa (αφού ήταν γνωστό ότι και οι δύο πρωτεΐνες έχουν μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 30kDa) και πίεση 50bar, μέχρι περίπου τα 50mL. Ο καθαρισμός της μεμβράνης γινόταν πριν και μετά τη χρησιμοποίησή της, με διάλυμα NaOH 0,1M και H₂O. Το διάλυμα πρωτεΐνης διατηρούταν συνεχώς σε χαμηλή θερμοκρασία με χρήση πάγου.

Το διάλυμα πρωτεΐνης τοποθετήθηκε σε μια μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis membrane), η οποία είχε αφεθεί σε βραστό H₂O για περίπου 30min ώστε να μαλακώσει. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε για 16h σε 4L διάλυμα talon (50mM Tris, 0,3M NaCl pH=8, ρυθμισμένο με υδροχλωρικό οξύ), υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.

2.1.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ

Ο καθαρισμός στηρίχθηκε στην παρουσία των 6 ιστιδινών που είχαν προστεθεί στο άκρο των ανασυνδισμένων πρωτεϊνών και οι οποίες έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με ιόντα κοβαλτίου ακινητοποιημένα σε στήλες ρητίνης.

Χρησιμοποιήθηκε στήλη talon (χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, της εταιρίας Clontech – εσωτερική διάμετρος 1cm και μήκος 15cm – Εικόνα 7), ανιχνευτής UV στα 280nm, συλλέκτης κλασμάτων και το λογισμικό H/Y Clarity Version 2.3.3.124 (της εταιρίας DataApex). Η στήλη εξισορροπήθηκε σε διάλυμα talon και η αντλία σπασερώθηκε περνώντας dH_2O από τις σωληνώσεις.



Εικόνα 7: Η στήλη talon (χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου), της εταιρίας Clontech.

Το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάστηκε στη στήλη και συλλέχθηκε από την έξοδο το διάλυμα που εξέρχεται (διάλυμα flow-through), το οποίο αποθηκεύτηκε για έλεγχο παρουσίας πρωτεΐνης. Ακολούθησε έκλουση του πρωτεϊνικού διαλύματος με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0 – 100mM). Η κορυφή που εμφανιζόταν στο γράφημα του λογισμικού στον Η/Υ αντιστοιχούσε στα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Για επιβεβαίωση γινόταν ποιοτική εφαρμογή της μεθόδου Bradford.

Η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε μια μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε, όπως και προηγουμένως, αφεθεί σε βραστό H₂O για περίπου 30min. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε για 24h σε 4L διάλυμα 20mM Tris HCl pH=8 (0,02% αζίδιο) υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.

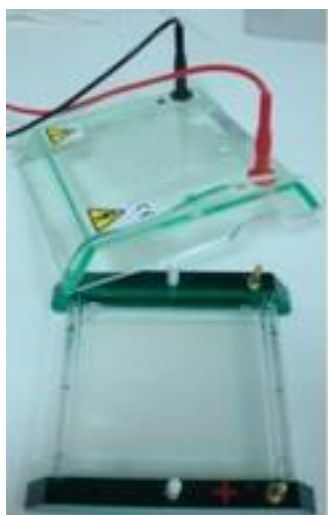
2.1.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροεστίαση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού και προσδιορισμού των μορίων με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, δηλαδή την τιμή pH στην οποία το πρωτεϊνικό μόριο είναι ουδέτερα φορτισμένο. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι μια πρωτεΐνη, σε τιμές pH χαμηλότερες του ισοηλεκτρικού της σημείου είναι θετικά φορτισμένη κι έτσι κινείται σε ηλεκτρικό πεδίο με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην ηλεκτρική, με τη χρήση τεχνικών αμφολυτών δημιουργείται μια γραμμικά μεταβαλλόμενη κλίση. Έτσι λοιπόν κάθε μόριο πρωτεΐνης κινείται προς τη θέση εκείνη η οποία ανταποκρίνεται στο ισοηλεκτρικό του σημείο, όπου και παραμένει καθώς πλέον δεν ασκείται πάνω του καμία δύναμη. Με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων γραμμικά μεταβαλλόμενων κλίσεων επιτυγχάνονται ακριβείς διαχωρισμοί, ενώ συγχρόνως υπολογίζεται και το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (Καρναούρη, 2010).

Η ηλεκτρική ηλεκτροφόρηση αποτελείται από δύο μέρη: την ηλεκτρική επιστοίβαση (stacking gel) και την ηλεκτρική διαχωρισμού (resolving gel). Οι δύο ηλεκτρικές παρασκευάστηκαν, σύμφωνα με τη σύσταση που φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτής επιστοίβασης και πηκτής διαχωρισμού.

Πηκτή Επιστοίβασης (Stacking Gel)		Πηκτή Διαχωρισμού (Resolving Gel)	
Ουσία	Όγκος	Ουσία	Όγκος
dH ₂ O	1,5mL	dH ₂ O	1,75mL
0,25M Tris/SDS 0,2% pH=6,8	1,9mL	0,75M Tris/SDS 0,2% w/v pH=8,8	4,7mL
40% ακρυλαμίδιο	0,38mL	40% ακρυλαμίδιο	2,9mL
TEMED	10μL	TEMED	15μL
10% w/v APS	30μL	10% w/v APS	90μL



Εικόνα 8: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε.

Η διάταξη (Εικόνα 8) συναρμολογήθηκε, γεμίσθηκε με πηκτή διαχωρισμού ανάμεσα στις 2 πλάκες και συμπληρώθηκε dH₂O. Ακολούθησε αναμονή περίπου 30min ώστε να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της πηκτής και στη συνέχεια προστέθηκε πηκτή επιστοίβασης και τέλος τοποθετήθηκε ειδικό εξάρτημα για το σχηματισμό των οπών τοποθέτησης των δειγμάτων. Τέλος, η διάταξη γεμίσθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS running buffer – 30,3 g/L Tris, 144 g/L γλυκίνη, 1%^{w/v} SDS, pH=8,3).

Ακολούθως, έγινε προετοιμασία των δειγμάτων. Τα δείγματα πρωτεΐνης περιείχαν 7μL loading buffer, 5μL δείγμα και 5μL H₂O, τοποθετήθηκαν σε βραστό H₂O για 5min και τέλος φυγοκεντρήθηκαν για 2min. Διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, της εταιρίας Fermentas – Πίνακας 5) τοποθετήθηκε στην πρώτη οπή και στις υπόλοιπες τοποθετήθηκαν τα δείγματα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με ρεύ-

μα 35mA για περίπου 1h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτική απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε για περίπου 20min υπό ήπια ανάδευση στο διάλυμα χρωματισμού (staining solution – 40% ν/ν μεθανόλη, 10% ν/ν οξικό οξύ, 0,4% w/ν Coomassie G-250). Τέλος, εκτελέστηκε αποχρωματισμός και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution – 40% ν/ν μεθανόλη, 10% ν/ν οξικό οξύ).

Πίνακας 5: Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του μοριακού βάρους των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών.

MW (kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116,0	β-γαλακτοζιδάση	<i>Escherichia coli</i>
66,2	Αλουμίνη ορού βοδινού	Πλάσμα βοδινού αίματος
45,0	Ωαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού κότας
35,0	Γαλακτική αφυδρογονάση	Μύες χοίρων
25,0	REase Bsp98I	<i>Escherichia coli</i>
18,4	β-γαλακτογλοβουλίνη	Γάλα αγελάδος
14,4	Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού κότας

2.1.7. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Ο ποιοτικός προσδιορισμός γινόταν για να επιβεβαιωθεί η παρουσία πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια του καθαρισμού. Συγκεκριμένα, γινόταν ποιοτική εκτέλεση της μεθόδου Bradford, δηλαδή προσθήκη περίπου 30μL δείγματος σε περίπου 0,5mL διαλύματος Bradford (1L διαλύματος Bradford περιέχει 100mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50mL αιθανόλη και 100mL φωσφο-

ρικό οξύ) και παρατήρηση αλλαγής του χρώματος σε μπλε στο δείγμα που περιείχε πρωτεΐνη.

Ο ποσοτικό προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης εκτελέστηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ) με τη χρήση της συσκευής NanoDrop. Συγκεκριμένα, 1μL πρωτεϊνικού διαλύματος τοποθετήθηκε στη συσκευή και με χρήση σχετικής καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί ως προς το γεγονός ότι απαιτείται εξαιρετικά μικρός όγκος διαλύματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης.

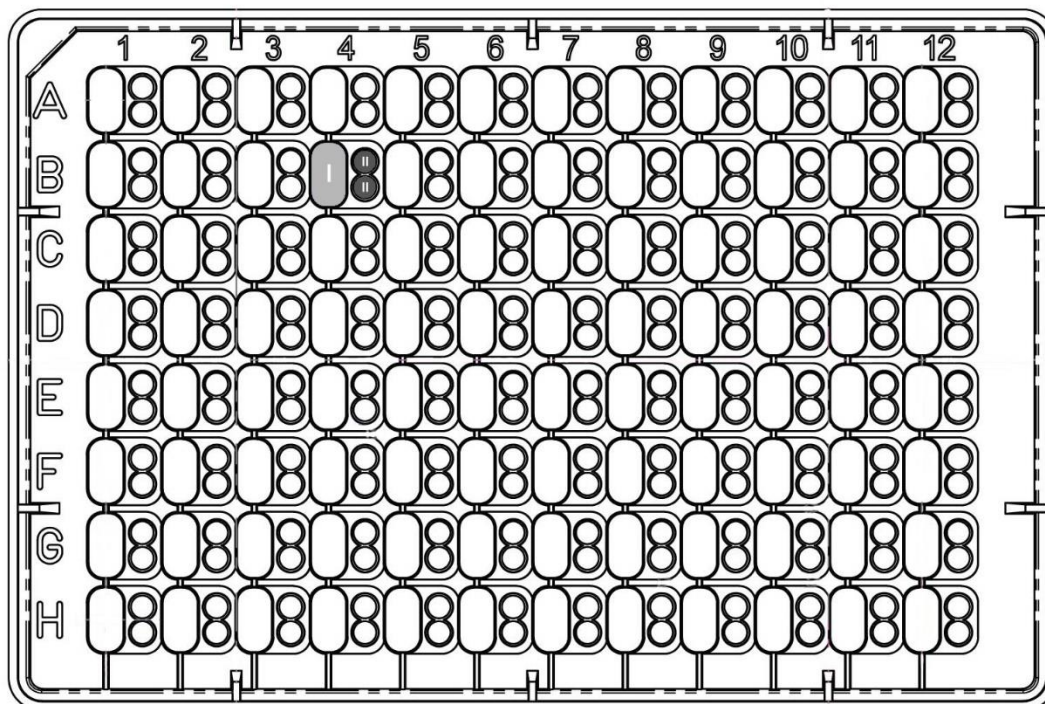
2.2. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης για τις εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος PaCE15A και PaCE15B. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (IBΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Ε. Χρυσίνα.

2.2.1. ΟΡΓΑΝΑ

Κατά τις κρυσταλλογραφικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments – Αγγλία – Εικόνα 9).
- Πιάτα κρυστάλλωσης 96 θέσεων (MRC Crystallization plates – Molecular Dimensions – Αγγλία – Σχήμα 13).
- Φυγόκεντρος (Centurion Scientific – Αγγλία).
- Στερεοσκόπιο Ceti (Medline Scientific – Αγγλία).
- Πεχάμετρο 744 (Metrohm – Ελβετία).
- Φίλτρα 0,2 μ m (Millipore – Η.Π.Α.).
- Συμβατική πηγή ακτίνων X SuperNova diffractometer ($\lambda = 1,5415 \text{ \AA}$ – Oxford Diffraction Agilent Technologies – IBΦΧΒ – Εικόνα 10).
- Πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Petra III, σταθμός P14, EMBL–Hamburg (Γερμανία)



Σχήμα 13: Σχηματική αναπαράσταση ενός πιάτου κρυστάλλωσης 96 θέσεων MRC Crystallization plates της εταιρίας Molecular Dimensions. Με ανοιχτό (I) και σκούρο γκρι (II) υποδεικνύονται τα βοηθία όπου τοποθετείται το διάλυμα κρυστάλλωσης (μητρικό διάλυμα) και η σταγόνα που περιέχει το αναμιγμένο από το ρομπότ διάλυμα κρυστάλλωσης με το πρωτεϊνικό διάλυμα αντίστοιχα. Η κρυστάλλωση γίνεται με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας. Πηγή: www2.mrc-lmb.cam.ac.uk.

2.2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Για τον προσδιορισμό των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα. Πρόκειται για το PEG Suite από την εταιρία Qiagen (Γερμανία – Πίνακας 16 Παράρτημα) και για το JCSG-plus Screen από την εταιρία Molecular Dimensions (Αγγλία – Πίνακας 17 Παράρτημα). Το υπερκάθαρο νερό (dH₂O) ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία), ενώ το

αζίδιο (sodium azide), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το υδροχλωρικό οξύ (HCl) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

2.2.3. ΕΥΡΕΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθήμενη σταγόνα. Το διάλυμα πρωτεΐνης φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε 10000 rpm και σε θερμοκρασία 4°C. Στη συνέχεια αναμίχθηκε με το μητρικό διάλυμα, δηλαδή το διάλυμα κρυστάλλωσης, με τη χρήση του ρομπότ κρυστάλλωση, ενώ ο χώρος τέλος κλείστηκε αεροστεγώς. Κατά την εύρεση της αρχικής συνθήκης κρυστάλλωσης, η τελική σταγόνα είχε όγκο 0,3 μ L και τα ποσοστά ανάμιξης πρωτεΐνης από το ρομπότ που δοκιμάστηκαν ήταν 50%, 66,67% και 80%. Η θερμοκρασία στην οποία φυλάσσονταν τα πιάτα κρυσταλλώσεων ήταν 16°C.



Εικόνα 9: Το ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano.

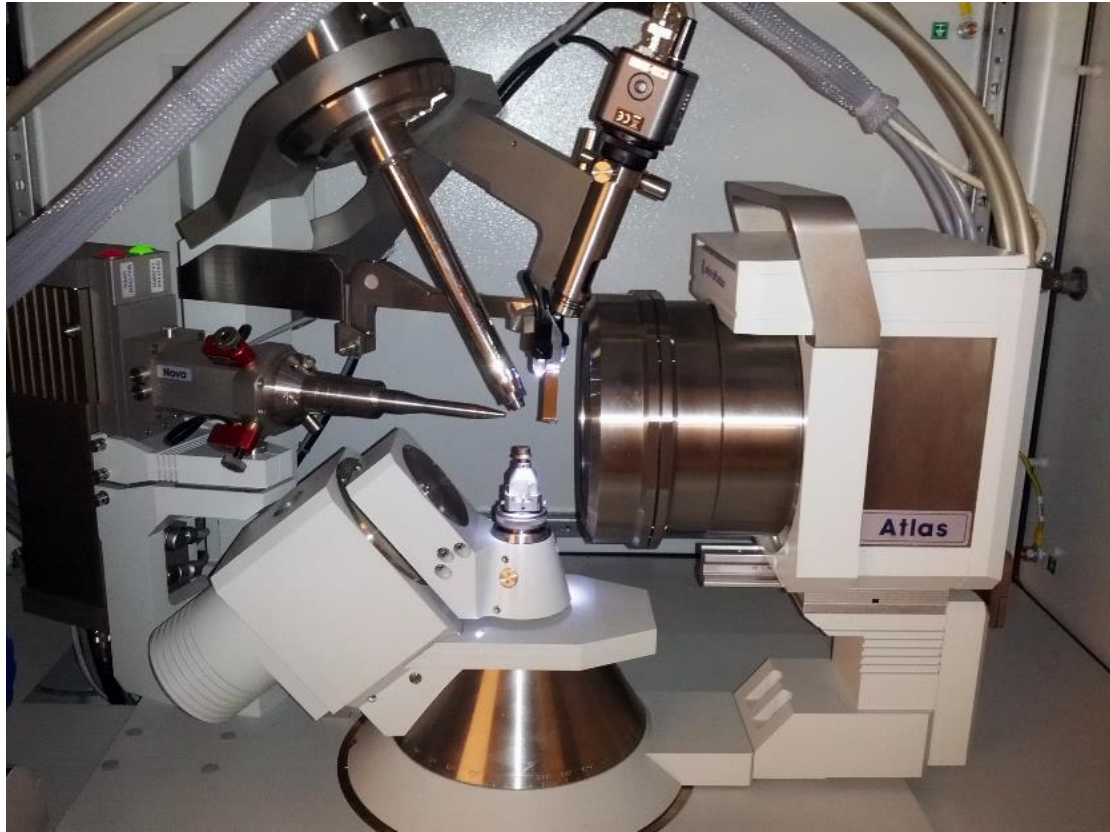
Κατά τη διαδικασία τροποποίησης των αρχικών συνθηκών προκειμένου να αναπτυχθούν καλύτεροι κρύσταλλοι, δοκιμάστηκε αραίωση του πρωτεϊνικού διαλύματος και εκ νέου παρασκευή των διαλυμάτων που περιλαμβάνονται στα εμπορικά σκευάσματα κρυστάλλωσης, στις συνθήκες που παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι. Ακόμη, δοκιμάστηκε τροποποίηση ενός κάθε φορά παράγοντα κρυστάλλωσης και αντικατάσταση κάποιου εκ των συστατικών του διαλύματος κρυστάλλωσης από μια χημικά παρεμφερή ουσία. Επιχειρήθηκε ακόμη, η χρήση προσμίξεων που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη δημιουργία καλύτερων κρυστάλλων. Για τη δημιουργία των κρυστάλλων, χρειαζόταν αναμονή ορισμένου χρόνου (από μία εβδομάδα έως και μερικούς μήνες), ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν καταγραφή της εικόνας της σταγόνας με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και σύγκριση της εικόνας αυτής με προγενέστερες.

Τα περισσότερα από τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης των κρυστάλλων παράχθηκαν στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας υπερκάθαρο H_2O . Η ρύθμιση του pH γινόταν στην περίπτωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος ή υδροξειδίου του νατρίου, ανάλογα με το εάν ήταν αναγκαία η μείωση ή η αύξηση του pH αντίστοιχα. Ακόμη, γινόταν φιλτράρισμα του διαλύματος με φίλτρα διαμέτρου $0,2\mu m$ και προσθήκη $0,02\% w/v$ αζίδιου.

2.2.4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

Η ακτινοβόληση των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε υπό κρυογενείς συνθήκες (100K). Προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου και κατά συνέπεια η καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος κατά τη μεταφορά στο υγρό άζωτο, οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κρυστάλλωσης εμπλουτισμένο με κάποιο κρυοπροστατευτικό μέσο, όπως η γλυκερόλη και η πολυαιθυλενογλυκόλη. Η ακτινοβόληση των κρυστάλλων έγινε στη συμβατική

πηγή ακτίνων Χ του ΙΒΦΧΒ (SuperNova diffractometer) και στην πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Petra III στο Αμβούργο, ενώ η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα XDS (Kabsch, 2010).



Εικόνα 10: Η πηγή ακτίνων Χ SuperNova diffractometer, που βρίσκεται εγκατεστημένη στο ΙΒΦΧΒ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ *PaCE15A*

3.1.1. ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ *PaCE15A*

Τα βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου της *PaCE15A* φαίνονται στον Πίνακα 6. Ο κωδικός του γονιδίου προσδιορίστηκε από το δικτυακό τόπο του γονιδιώματος του *Podospora anserina* Genome Project (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/blast.php>). Το θεωρητικό μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) προσδιορίστηκαν με την εφαρμογή ProtParam ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi), ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τις εφαρμογές NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> – Gupta, 2004) και NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc> – Julenius et al., 2005).

Πίνακας 6: Βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου *PaCE15A*.

Κωδικός <i>Podospora anserina</i> Genome Project	PODANSg148
Μήκος γονιδίου (συμπεριλαμβάνονται τα εσόνια)	1446
Αριθμός αμινοξέων	481
Θεωρητικό μοριακό βάρος	50941,85 Da
Θεωρητικό pI	8,51
Περιοχές γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: 0
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: 22

3.1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡαCE15A

Το στάδιο της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Biotechnologie des Champignons Filamenteux – Polytech Marseille, στη Γαλλία, από την ομάδα του Jean-Guy Berrin. Οι κλώνοι ήταν *P. pastoris* ανασυνδυασμένη ώστε να παράξει ΡαCE15A. Από τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPD–zeocin, εμβολιάστηκε υγρή προκαλλιέργεια και στη συνέχεια αναπτύχθηκε καλλιέργεια (από 50mL BMGY σε 6 κωνικές φιάλες για την ανάπτυξη της βιομάζας και από 250mL BMMY σε 4 κωνικές φιάλες για την έκφραση της ΡαCE15A). Συγκεκριμένα, για την καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της προκαλλιέργειας και επιλέχθηκαν 4 από τις 6 προκαλλιέργειες (Πίνακας 7) ώστε όταν επαναιωρηθούν τα κύτταρα σε 250mL BMMY να έχουν OD=1 στα 600nm. Οι υπόλοιπες προκαλλιέργειες απορρίφθηκαν, καθώς χρησίμευαν μόνο για την περίπτωση όπου σε κάποια η ανάπτυξη των κυττάρων δεν εξελισσόταν ομαλά. Η ανασυνδυασμένη ΡαCE15A απομονώθηκε από 1L υγρής καλλιέργειας BMMY διάρκειας 7 ημερών, κατά τις οποίες γινόταν καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0,5% v/v και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου.

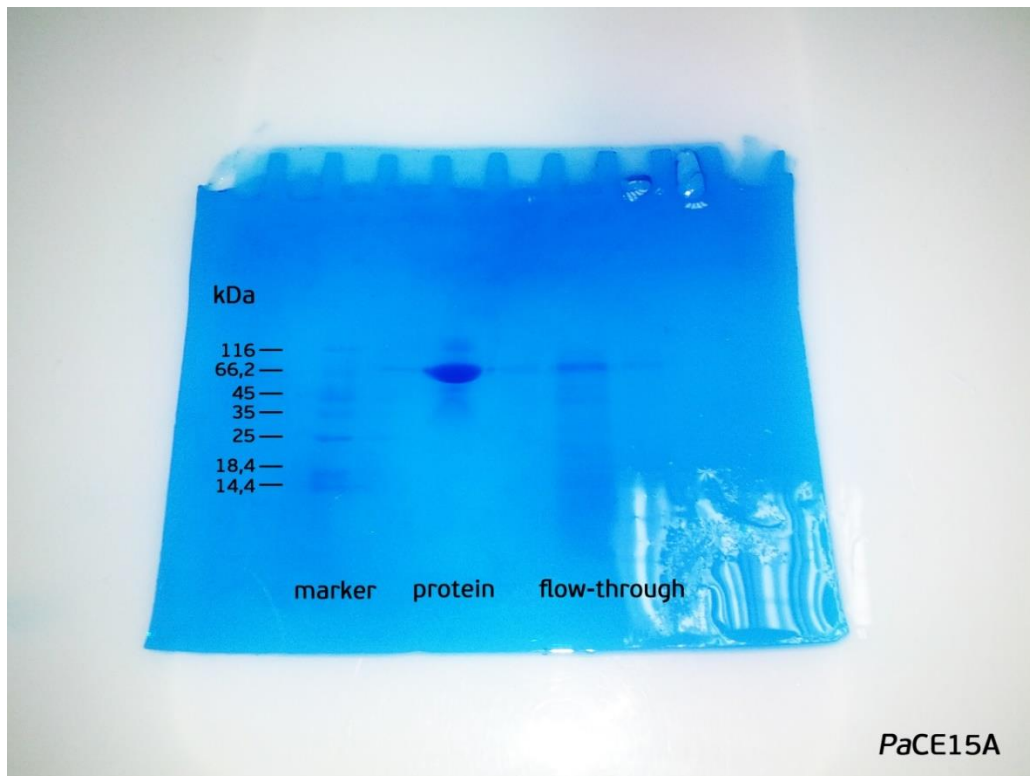
Η καθαρότητά της εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση ηλεκτρικής πολυακρυλαμιδίου και το καθαρό ένζυμο που ανακτήθηκε είχε τελικό μοριακό βάρος περίπου 66,2 kDa (Εικόνα 11). Η σημαντική διαφορά ανάμεσα στο πειραματικό και στο θεωρητικά υπολογιζόμενο (~51 kDa) μοριακό βάρος οφείλεται κατά κύριο λόγο στο φαινόμενο υπεργλυκοζυλίωσης από την *P. Pastoris* (Conde et al., 2004). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6, υπάρχουν 22 πιθανές θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης.

Στο διάλυμα flow-through κανονικά δεν έπρεπε να ανιχνευτεί ΡαCE15A. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε ότι συμβαίνει, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στη χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας ρητίνης και στη μη συγκράτηση όλης της πρωτεΐνης από τα ιόντα ή στο ότι η διάταξή είχε κάποιο πρόβλημα. Το διάλυμα flow-through καθαρίστηκε εκ νέου και παράχθηκε επιπλέον ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα που παράχθηκε προσδιορίστηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ) και βρέθηκε ίση με 36,27 mg/mL. Δεδομένου ότι ο όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος που συλλέχθηκε από 1L καλλιέργειας ήταν περίπου 0,35mL, η απόδοση υπολογίζεται σε $12,7 \cdot 10^{-3}$ g καθαρής πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας. Το πρωτεϊνικό διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε εν συνεχεία σε κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μέτρησης OD προκαλλιέργειας, κατά τον καθαρισμό της ΡαCE15Α. Ο απαιτούμενος όγκος είναι ο αναγκαίος ώστε όταν επαναιωρηθούν τα κύτταρα σε 250mL BMMY να έχουν OD=1 στα 600nm. Με γκρι χρώμα είναι σημειωμένες οι προκαλλιέργειες που επιλέχθηκαν για καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Προκαλλιέργεια ΡαCE15Α	OD₆₀₀	Απαιτούμενος Όγκος (mL)
1	7,12	35,1
2	9,66	25,9
3	9,00	27,8
4	7,83	32,0
5	6,21	40,3
6	9,39	26,6



Εικόνα 11: Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, μετά τον καθαρισμό της *PaCE15A*. Η λωρίδα *marker* αφορά το πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, η λωρίδα *protein* αφορά την καθαρή πρωτεΐνη, ενώ η λωρίδα *flow-through* αφορά το κλάσμα που δε δεσμεύτηκε στη ρητίνη.

3.1.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε σάρωση πλήθους συνθηκών με τη χρήση ρομπότ. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε το εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen της εταιρίας Molecular Dimensions (Πίνακας 17). Το μητρικό διάλυμα είχε όγκο 50μL. Ορίσθηκε όγκος σταγόνας 0,3μL και ποσοστά πρωτεΐνης από το ρομπότ 50% $\frac{v}{v}$ και 66,67% $\frac{v}{v}$, ενώ η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυστάλλωσης ήταν 16°C. Παρά το μεγάλο αριθμό των διαλυμάτων που δοκιμάστηκαν, δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα δυνατή η παρατήρηση ανάπτυξης κρυστάλλων ή έστω ιζήματος κρυσταλλικής φύσης. Έτσι, οι προσπάθειες δημιουργίας κρυστάλλων της *PaCE15A* ικανών να δώσουν περίθλαση ακτίνων X συνεχίζονται.

3.2. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ PaCE15B

3.2.1. ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ PaCE15B

Τα βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου της PaCE15B φαίνονται στον Πίνακα 8. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τον υπολογισμό ήταν όμοια με αυτήν που ακολουθήθηκε για την PaCE15A (§ 3.1.1). Η στοίχιση των αλληλουχιών αποκαλύπτει ότι, όπως φαίνεται στο Σχήμα 14, η PaCE15B παρουσιάζει 70,7% ταυτότητα αμινοξικής ακολουθίας με τη γλυκουρονική εστεράση StGE2 από το μύκητα *M. thermophile*, της οποίας η τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί (§ 1.2.2).

Πίνακας 8: Βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου PaCE15B.

Κωδικός <i>Podospora anserina</i> Genome Project	PODANSg2754
Μήκος γονιδίου (συμπεριλαμβάνονται τα εσόνια)	1188
Αριθμός αμινοξέων	395
Θεωρητικό μοριακό βάρος	41766,89 Da
Θεωρητικό pI	8,69
Περιοχές γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: 1
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: 4

1	-----MVHLASALLVASAAFAVAAPANEIFERQ-TCSVQANYPTQNNSKLP	45	PaCE15B
1	SMAPMNIHFERQDTMVHLTSALLVAGAAFAAAAAPMNIHFERQDTCSVSDNYPTVNSAKLP	60	StGE2
	****.*****.*****.***.*****.*****.*****.***.***		
46	DPFTSASGQKITTKADFEQRQEEISKIMQQYEFVGYFPDPDSVTGTMSGNNIQVRVTVGS	105	PaCE15B
61	DPFTTASGEKVTITKQDFECRRAEINKILQQYELGEYPPDPDSVEASLSGNSITVRVTVGS	120	StGE2
	****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***		
106	KSITFSAGIRKPSGSGPFPFAIIGVGGASIPISNVATITFGNDAFGAQSGMGSRGRGQFY	165	PaCE15B
121	KSISFASASIRKPSGAGPFPFAIIGIGGASIPISNVATITFNNDFFGAQMGSGSRGQKGFY	180	StGE2
	..*****.*****.*****.*****.***.***.***.***.***.***		
166	DLFGSSHSAGSLTAWAWGIDRLIDALEKT--PAAGIDTTRLGVTGCSRNGKGAFFVAGAFV	223	PaCE15B
181	DLFGRDHSAGSLTAWAWGVDRLLIDGLEQVGAQASGIDTKRLGVTGCSRNGKGAFITGALV	240	StGE2
	****.*****.*****.***.***.*****.*****.*****.***.***		
224	KRIALTIPQESGAGGAACWRISDQQKSSGANIQTASQIIGEQPWFSKNFDAHVRISITNIP	283	PaCE15B
241	DRIALTIPQESGAGGAACWRISDQQKAAGANIQTAAQIITENPWFSRNFDPHVNSITSVP	300	StGE2
	.*****.*****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***		
284	QDHHFLAAMIVPRGLAVFENNIDWLGVPVSTIGCMRAGRQIYKAYGVPNNMGFSLIGGHNH	343	PaCE15B
301	QDHHLLAALIVPRGLAVFENNIDWLGVPVSTIGCMAAGRLIYKAYGVPNNMGFSLVGGHNH	360	StGE2
	****.***.*****.*****.*****.***.***.*****.*****.***.***		
344	CQFPSSQNSLNQYINYFLLKSGTAPGSVERSTSNANIDAWYPWAASAPTLS-----	395	PaCE15B
361	CQFPSSQNDLNSYINYFLLGQGSF-SGVEHSDVNVNVAEWAPWGAGAPILALEQKLISE	419	StGE2
	****.***.***.*****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***		
396	-----	395	PaCE15B
420	EDLNSAVDHHHHHH	433	StGE2

Σχήμα 14: Στοίχιση των αλληλουχιών των ενζύμων PaCE15B και StGE2. Με σκούρο γκρι παρουσιάζονται τα όμοια αμινοξέα των δύο ενζύμων. Η ανάλυση έγινε με την εφαρμογή UniProt (<http://www.uniprot.org/align>) και η ταυτότητα αμινοξικής ακολουθίας που παρατηρείται είναι 70,7%.

3.2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PaCE15B

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την παραγωγή και τον καθαρισμό της PaCE15B ήταν όμοια με αυτήν που ακολουθήθηκε για την PaCE15A (§ 3.1.2). Οι προκαλλιέργειες που επιλέχθηκαν για καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας φαίνονται στον Πίνακα 9.

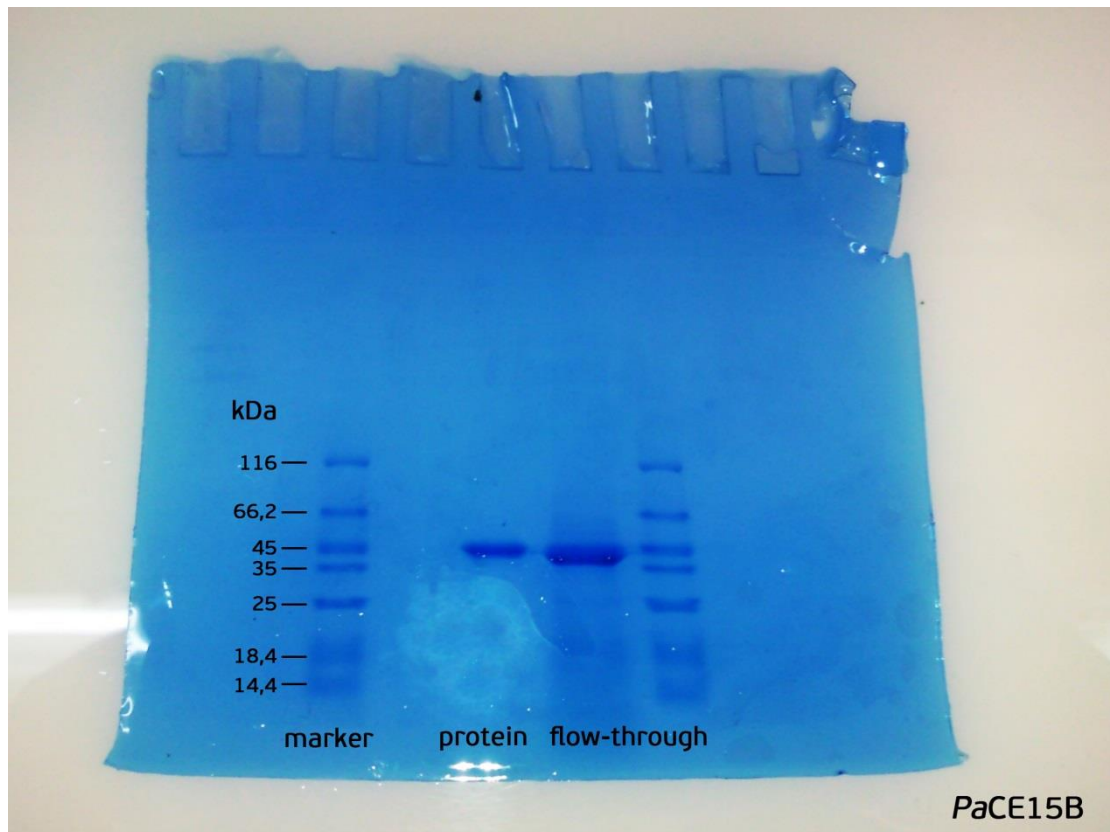
Η καθαρότητά της εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμίδου και το καθαρό ένζυμο που ανακτήθηκε είχε τελικά μοριακό βάρος περίπου 44 kDa (Εικόνα 12). Παρατηρείται ότι η τιμή του πειραματικού είναι πολύ κοντά στην τιμή του θεωρητικά υπολογιζόμενου (~41,8 kDa) μοριακό βάρος, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεν είναι

γλυκοζυλιωμένη. Στο διάλυμα flow-through παρατηρείται πρωτεΐνη ΡαCE15B, για τον ίδιο λόγο που είχε συμβεί και στην περίπτωση του καθαρισμού της ΡαCE15A. Το διάλυμα αυτό καθαρίστηκε εκ νέου και παράχθηκε επιπλέον ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα που παράχθηκε προσδιορίστηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ) και βρέθηκε ίση με 49,05 mg/mL. Δεδομένου ότι ο όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος που συλλέχθηκε από 1L καλλιέργειας ήταν περίπου 0,2mL, η απόδοση υπολογίζεται σε $8,8 \cdot 10^{-3}$ g καθαρής πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας. Το πρωτεϊνικό διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε εν συνεχεία σε κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα μέτρησης OD προκαλλιέργειας, κατά τον καθαρισμό της ΡαCE15B. Ο απαιτούμενος όγκος είναι ο αναγκαίος ώστε όταν επαναιωρηθούν τα κύτταρα σε 250mL BMMY να έχουν OD=1 στα 600nm. Με γκρι χρώμα είναι σημειωμένες οι προκαλλιέργειες που επιλέχθηκαν για καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Προκαλλιέργεια ΡαCE15B	OD₆₀₀	απαιτούμενος όγκος (mL)
1	9,980	25,1
2	12,70	19,7
3	14,70	17,0
4	14,20	17,6
5	16,03	15,6
6	11,10	22,5



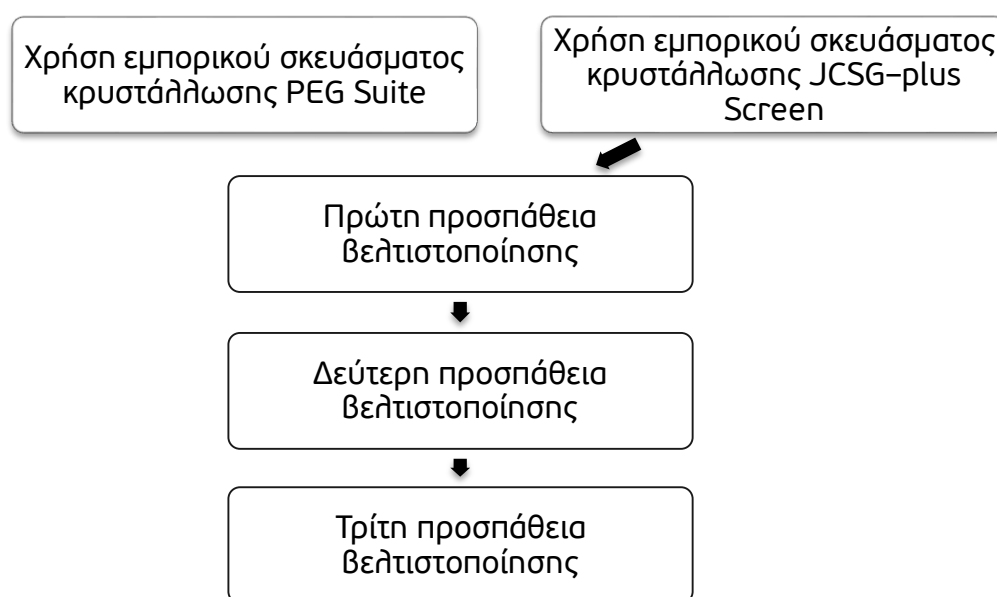
Εικόνα 12: Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, μετά τον καθαρισμό της PaCE15B. Η λωρίδα marker αφορά το πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, η λωρίδα protein αφορά την καθαρή πρωτεΐνη, ενώ η λωρίδα flow-through αφορά το κλάσμα που δε δεσμεύτηκε στη ρητίνη.

3.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με αυτήν που ακολουθήθηκε για την PaCE15A (§ 3.1.3). Στο διάγραμμα ροής του Σχήμα 15 φαίνεται η πορεία που ακολουθήθηκε κατά την προσπάθεια ανάπτυξης κρυστάλλων. Συγκεκριμένα, αρχικά δοκιμάστηκε το εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης PEG Suite της εταιρίας Qiagen (Πίνακας 16). Σε σύντομο χρονικό διάστημα δεν έγινε δυνατή η ανάπτυξη κρυστάλλων ή έστω ιζήματος κρυσταλλικής φύσης. Παρόλα αυτά, μετά από σχεδόν τέσσερις μήνες παραμονής δημιουργήθηκε ένας κρύ-

σταλλος μετρίου μεγέθους στη συνθήκη D4 (0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 25% w/v PEG 8000) στη σταγόνα με ποσοστό ανάμειξης πρωτεΐνης 66,67% v/v.

Λόγω του ότι δεν κατέστη δυνατή η παραγωγή κρυστάλλου σε σύντομο χρονικό διάστημα, έγινε επίσης δοκιμή του εμπορικού σκευάσματος κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen της εταιρίας Molecular Dimensions (Πίνακας 17). Το μητρικό διάλυμα είχε όγκο 50μL. Ορίσθηκε όγκος σταγόνας 0,3μL και ποσοστά ανάμειξης πρωτεΐνης από το ρομπότ 66,67% και 80%, ενώ η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C. Μετά από περίπου τρεις εβδομάδες, αναπτύχθηκαν κρυστάλλων στη συνθήκη C11 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1 M Οξικό νάτριο, pH=4,6) στη σταγόνα με ποσοστό ανάμειξης πρωτεΐνης από το ρομπότ 80% v/v. Όλες οι συνθήκες στις οποίες επιτεύχθηκε η δημιουργία κρυστάλλων φαίνονται στον Πίνακα 14, ενώ οι κρύσταλλοι που παρουσίασαν τη βέλτιστη μορφολογία φαίνονται στην Εικόνα 13.



Σχήμα 15: Διάγραμμα ροής της πορείας που ακολουθήθηκε κατά την προσπάθεια ανάπτυξης κρυστάλλων της PαCE15B.

3.2.4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

Κατά την πρώτη προσπάθεια για βελτίωση της μορφολογίας και του μεγέθους των κρυστάλλων, έγινε βελτιστοποίηση των κρυστάλλων που παράχθηκαν στη συνθήκη C11 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1 M Οξικό νάτριο, pH=4,6). Στην πρώτη απόπειρα βελτιστοποίησης, δοκιμάστηκε τροποποίηση κάθε φορά μιας εκ των παραγόντων κρυστάλλωσης, αλλά και επανάληψη της συνθήκης στην οποία δημιουργήθηκαν προηγουμένως κρύσταλλοι. Όλα τα διαλύματα παρήχθησαν στο εργαστήριο. Το μητρικό διάλυμα είχε όγκο 50μL. Δοκιμάστηκαν όγκοι σταγόνας 0,3μL και 0,5μL και η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C. Το ποσοστό ανάμειξης πρωτεΐνης από το ρομπότ ήταν 80% ν/ν . Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν είναι αυτές που φαίνονται στον Πίνακα 10. Μετά από περίπου τρεις εβδομάδες παρατηρήθηκαν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 14 κρύσταλλοι στις συνθήκες D1 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο) και A8 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, $V_{\text{σταγόνας}}=0,5\mu\text{L}$). Οι κρύσταλλοι είχαν παρόμοια μορφολογία με αυτούς που είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως, αλλά ήταν λιγότεροι και σημαντικά μικρότεροι.

Η δεύτερη απόπειρα βελτιστοποίησης οδήγησε σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη φορά και τους κρυστάλλους που είχαν αναπτυχθεί στη συνθήκη D4 (0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 25% w/ν PEG 8000), δοκιμάστηκαν οι συνθήκες που φαίνονται στον Πίνακα 11. Όλα τα διαλύματα παρήχθησαν στο εργαστήριο, εκτός αυτά των κελιών A10, A11 και A12, όπου δοκιμάστηκε η εκ νέου χρήση του διαλύματος που περιέχεται στο εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen. Το μητρικό διάλυμα είχε ξανά όγκο 50μL. Σε ορισμένες συνθήκες δοκιμάστηκε ακόμη η αραίωση της πρωτεΐνης, με το τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει πρωτεΐνη σε ποσοστό 40% ν/ν , 60% ν/ν και 80% ν/ν . Η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C. Μετά από δύο έως τρεις εβδομάδες, σε αρκετές συνθήκες παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι βελτιωμένης μορφολογίας. Συγκεκριμένα, τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις συνθήκες D8 (1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6), D10, D11 (όμοια

με D8, αλλά αραίωση πρωτεΐνης σε ποσοστό 80% v/v). Σχετικά καλά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν ακόμη στις συνθήκες A10, A11, A12 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, $\text{pH}=4,6$, με διάλυμα από το εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen), D7, D9 (όμοια με D8) και B7, B8, B9 (όμοια με A10, αλλά με διαλύματα που παρήχθησαν στο εργαστήριο). Όλες οι παραπάνω συνθήκες είχαν ποσοστό ανάμειξης πρωτεΐνης από το ρομπότ 80% v/v . Στις συνθήκες στις οποίες επιχειρήθηκε βελτίωση των αποτελεσμάτων της συνθήκης D4 (0,1M Sodium HEPES, $\text{pH}=7,5$, 25% w/v PEG 8000) δεν έχει μέχρι σήμερα παρατηρηθεί κάποιο αξιόλογο αποτέλεσμα, ενδεχομένως λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που απαιτείται για το σχηματισμό κρυστάλλου υπό αυτές τις συνθήκες (περίπου τέσσερις μήνες).

Κατά την τρίτη και τελευταία απόπειρα βελτιστοποίησης, δοκιμάστηκαν οι συνθήκες που φαίνονται στον Πίνακα 12. Πιο αναλυτικά, επιχειρήθηκε αύξηση του όγκου της σταγόνας σε 0,3 μL , 0,5 μL και 1 μL και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποίηση των κρυστοπροστατευτικών διαλυμάτων (βλ. παρακάτω) ως μητρικά διαλύματα, ώστε να αξιοποιηθεί η παρουσία γλυκερόλης που σε αρκετές περιπτώσεις ευνοεί το σχηματισμό μεγάλων κρυστάλλων. Ο όγκος του μητρικού διαλύματος ήταν και πάλι 50 μL . Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν εκ νέου στο εργαστήριο, για να επαληθευτεί ότι η δημιουργία κρυστάλλων δεν οφείλεται σε κάποια αστοχία κατά την παρασκευή τους. Το ποσοστό ανάμειξης πρωτεΐνης από το ρομπότ ήταν 80% v/v και η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυστάλλωσης ήταν 16°C. Μετά από δυο περίπου εβδομάδες παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι ακόμα πιο βελτιωμένης μορφολογίας. Ειδικότερα, τα σημαντικότερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις συνθήκες A2, A3, A4, A5 (0,1M Οξικό νάτριο, $\text{pH}=4,6$, 1,8M Θειικό αμμώνιο, $V_{\text{σταγόνας}}=0,3\mu\text{L}$) και C1, C3, C4, C5 (0,1M Οξικό νάτριο, $\text{pH}=4,6$, 1,8M Θειικό αμμώνιο, $V_{\text{σταγόνας}}=1\mu\text{L}$).

Πίνακας 10: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά την πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της PaCE15B και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Ο παράγοντας βελτιστοποίησης αναφέρεται στον παράγοντα της αρχικής συνθήκης που επιδιώκεται να βελτιστοποιηθεί. Η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C, η αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 49,05 mg/mL και το ποσοστό πρωτεΐνης κατά την ανάμειξη με το μητρικό διάλυμα από το ρομπότ ήταν 80% ν/ν . $V_d = V_{\text{σταγόνας}}$ (όπου δεν αναφέρεται είναι $V_d = 0,3\mu\text{L}$).

Θέσεις	Συνθήκη	Παράγοντας Βελτιστοποίησης	Αποτίμηση
A1–A3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Διαυγής σταγόνα ή σχηματισμός ιζήματος
A4–A6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, 10% ν/ν γλυκερόλη	Προσθήκη γλυκερόλης	Διαυγής σταγόνα ή σχηματισμός ιζήματος
A7–A12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, $V_d=0,5\mu\text{L}$	Αύξηση όγκου σταγόνας	Σχηματισμός ιζήματος, εκτός από την A8 όπου σχηματίστηκε κρύσταλλος
B1–B3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,0, 2M Θειικό αμμώνιο	Τροποποίηση pH	Σχηματισμός ιζήματος
B4–B6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=5,0, 2M Θειικό αμμώνιο	Τροποποίηση pH	Διαυγής σταγόνα
B7–B9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=5,47, 2M Θειικό αμμώνιο	Τροποποίηση pH	Σχηματισμός ιζήματος
B10–B12	0,1M Κιτρικό νάτριο pH=5,6, 2M Θειικό αμμώνιο	Αντικατάσταση ρυθμιστικού διαλύματος και τροποποίηση pH	Σχηματισμός ιζήματος
C1–C3	0,1M Κιτρικό οξύ, pH=4,0, 2M Θειικό αμμώνιο	Αντικατάσταση ρυθμιστικού διαλύματος και τροποποίηση pH	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
C4–C6	0,1M Κιτρικό οξύ, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο	Αντικατάσταση ρυθμιστικού διαλύματος και τροποποίηση pH	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
C7–C9	0,1M Κιτρικό οξύ, pH=5,0, 2M Θειικό αμμώνιο	Αντικατάσταση ρυθμιστικού διαλύματος και τροποποίηση pH	Διαυγής σταγόνα
C10–C12	0,1M Κιτρικό οξύ, pH=5,8, 2M Θειικό αμμώνιο	Αντικατάσταση ρυθμιστικού διαλύματος και τροποποίηση pH	Διαυγής σταγόνα

D1-D3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο	Αλλαγή συγκέντρωσης άλατος	Διαυγής σταγόνα, εκτός από την D1 όπου σχηματίστηκε κρύσταλλος
D4-D6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, 10% γ/γ γλυκερόλη	Αλλαγή συγκέντρωσης άλατος και προσθήκη γλυκερόλης	Σχηματισμός ιζήματος
D7-D9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2,2M Θειικό αμμώνιο	Αλλαγή συγκέντρωσης άλατος	Διαυγής σταγόνα
D10-D12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Διαυγής σταγόνα
E1-E3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 0,8M Θειικό λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
E4-E6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,2M Θειικό λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
E7-E9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,5M Θειικό λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
F1-F3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 0,8M Κιτρικό νάτριο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
F4-F6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,1M Κιτρικό νάτριο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
F7-F9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,3M Κιτρικό νάτριο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
G1-G3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 0,8M Χλωριούχο λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
G4-G6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,2M Χλωριούχο λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
G7-G9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,5M Χλωριούχο λίθιο	Αλλαγή άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
H1-H3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 0,5M Θειικό αμμώνιο, 1M Θειικό λίθιο	Προσθήκη άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
H4-H6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,2M Θειικό αμμώνιο, 0,2M Θειικό λίθιο	Προσθήκη άλατος	Σχηματισμός ιζήματος
H7-H12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, 10% γ/γ γλυκερόλη, V _d =0,5μL	Προσθήκη γλυκερόλης και αύξηση όγκου σταγόνας	Σχηματισμός ιζήματος

Πίνακας 11: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά τη δεύτερη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της PaCE15B και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Ο παράγοντας βελτιστοποίησης αναφέρεται στον παράγοντα της αρχικής συνθήκης που επιδιώκεται να βελτιστοποιηθεί. Η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C, η αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 49,05 mg/mL και ο όγκος της σταγόνας ήταν 0,3μL. Το ποσοστό πρωτεΐνης κατά την ανάμειξη με το μητρικό διάλυμα από το ρομπότ για τις συνθήκες στις σειρές A έως και E ήταν 80% $\frac{v}{v}$, ενώ για τις συνθήκες στις σειρές F και G ήταν 66,67% $\frac{v}{v}$. Αρ/ση = $\frac{v}{v}$ αραιώση πρωτεΐνης.

Θέσεις	Συνθήκη	Παράγοντας Βελτιστοποίησης	Αποτίμηση
A10-A12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, με διάλυμα από το εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen, Αρ/ση: 100%	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Ανάπτυξη κρυστάλλων
B7-B9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 100%	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Σχηματισμός ιζήματος
B10-B12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%	Αραίωση πρωτεΐνης	Σχηματισμός ιζήματος
C7-C9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 60%	Αραίωση πρωτεΐνης	Σχηματισμός ιζήματος
C10-C12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 40%	Αραίωση πρωτεΐνης	Σχηματισμός ιζήματος
D7-D9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 100%	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Ανάπτυξη κρυστάλλων
D10-D12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%	Αραίωση πρωτεΐνης	Ανάπτυξη κρυστάλλων
E7-E9	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 60%	Αραίωση πρωτεΐνης	Διαυγής σταγόνα ή σχηματισμός ιζήματος
E10-E12	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 40%	Αραίωση πρωτεΐνης	Διαυγής σταγόνα ή σχηματισμός ιζήματος

F1-F3	0,1M HEPES, pH = 7,5, 25% w/v PEG8000, Αρ/ση: 60%	Αραίωση πρωτεΐ- νης	Σχηματισμός ιζήμα- τος
F4-F6	0,1M HEPES, pH = 7,5, 30% w/v PEG8000, Αρ/ση: 60%	Αύξηση συγκέ- ντρωσης PEG και αραίωση πρωτεΐ- νης	Σχηματισμός διαφο- ράς φάσης
F7-F9	0,1M HEPES, pH = 7,5, 25% w/v PEG8000, Αρ/ση: 40%	Αραίωση πρωτεΐ- νης	Διαυγής σταγόνα
F10-F12	0,1M HEPES, pH = 7,5, 30% w/v PEG8000, Αραίω- ση: 40%	Αύξηση συγκέ- ντρωσης PEG και αραίωση πρωτεΐ- νης	Σχηματισμός ιζήμα- τος
G1-G3	0,1M HEPES, pH = 7,5, 25% w/v PEG8000, Αρ/ση: 100%	Επανάληψη αρχι- κής συνθήκης	Σχηματισμός ιζήμα- τος
G4-G6	0,1M HEPES, pH = 7,5, 30% w/v PEG8000, Αρ/ση: 100%	Αύξηση συγκέ- ντρωσης PEG	Σχηματισμός ιζήμα- τος
G7-G9	0,1M HEPES, pH = 7,5, 25% w/v PEG8000, Αρ/ση: 80%	Αραίωση πρωτεΐ- νης	Σχηματισμός ιζήμα- τος
G10-G12	0,1M HEPES, pH = 7,5, 30% w/v PEG8000, Αρ/ση: 80%	Αύξηση συγκέ- ντρωσης PEG και αραίωση πρωτεΐ- νης	Σχηματισμός διαφο- ράς φάσης

Πίνακας 12: Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά την τρίτη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων της ΡαCE15B και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Ο παράγοντας βελτιστοποίησης αναφέρεται στον παράγοντα της αρχικής συνθήκης που επιδιώκεται να βελτιστοποιηθεί. Η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C, η αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 49,05 mg/mL και το ποσοστό πρωτεΐνης κατά την ανάμιξη με το μητρικό διάλυμα από το ρομπότ ήταν 80% $\frac{v}{v}$. $V_d = V_{\text{σταγόνας}}$, $Αρ/ση = \frac{v}{v}$ αραίωση πρωτεΐνης.

Θέσεις	Συνθήκη	Παράγοντας Βελτιστοποίησης	Αποτίμηση
A1-A6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 100%, $V_d=0,3\mu\text{L}$	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Ανάπτυξη κρυστάλλων
B1-B6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 100%, $V_d=0,5\mu\text{L}$	Αύξηση όγκου σταγόνας	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
C1-C6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 100%, $V_d=1\mu\text{L}$	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Ανάπτυξη κρυστάλλων
D1-D6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, 30% $\frac{v}{v}$ Glycerol, Αρ/ση: 100%, $V_d=0,3\mu\text{L}$	Προσθήκη γλυκερόλης	Σχηματισμός ιζήματος
E1-E3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, $V_d=0,3\mu\text{L}$	Αραίωση πρωτεΐνης	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
E4-E6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, $V_d=0,5\mu\text{L}$	Αραίωση πρωτεΐνης και αύξηση όγκου σταγόνας	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
F1-F3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, $V_d=1\mu\text{L}$	Αραίωση πρωτεΐνης και αύξηση όγκου σταγόνας	Διαυγής σταγόνα
F4-F6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, 30% $\frac{v}{v}$ Glycerol, Αρ/ση: 80%, $V_d=0,3\mu\text{L}$	Αραίωση πρωτεΐνης και προσθήκη γλυκερόλης	Σχηματισμός ιζήματος

G1-G3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, V _d =0,3μL	Επανάληψη αρχικής συνθήκης	Σχηματισμός μικροκρυστάλλων
G4-G6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, V _d =0,5μL	Αύξηση όγκου σταγόνας	Διαυγής σταγόνα
H1-H3	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, Αρ/ση: 80%, V _d =1μL	Αύξηση όγκου σταγόνας	Διαυγής σταγόνα
H4-H6	0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, 30% ^{v/v} Glycerol, Αρ/ση: 80%, V _d =1μL	Προσθήκη γλυκερόλης	Σχηματισμός ιζήματος

Τα διαλύματα με κρυσταλλοπροστατευτικό μέσο που χρειάστηκαν παρήχθησαν στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν δεκάδες διαλύματα για κάθε συνθήκη στην οποία παρατηρήθηκαν κρυστάλλοι ή παρατηρούταν ενδεχόμενο σχηματισμού κρυστάλλου. Κάθε φορά γινόταν ακτινοβολήση σε ακτίνες Χ και παρατήρηση του περιθλασιγράμματος που προέκυπτε. Τα κρυσταλλοπροστατευτικά διαλύματα που χαρακτηρίστηκαν ως κατάλληλα φαίνονται στον Πίνακα 13.

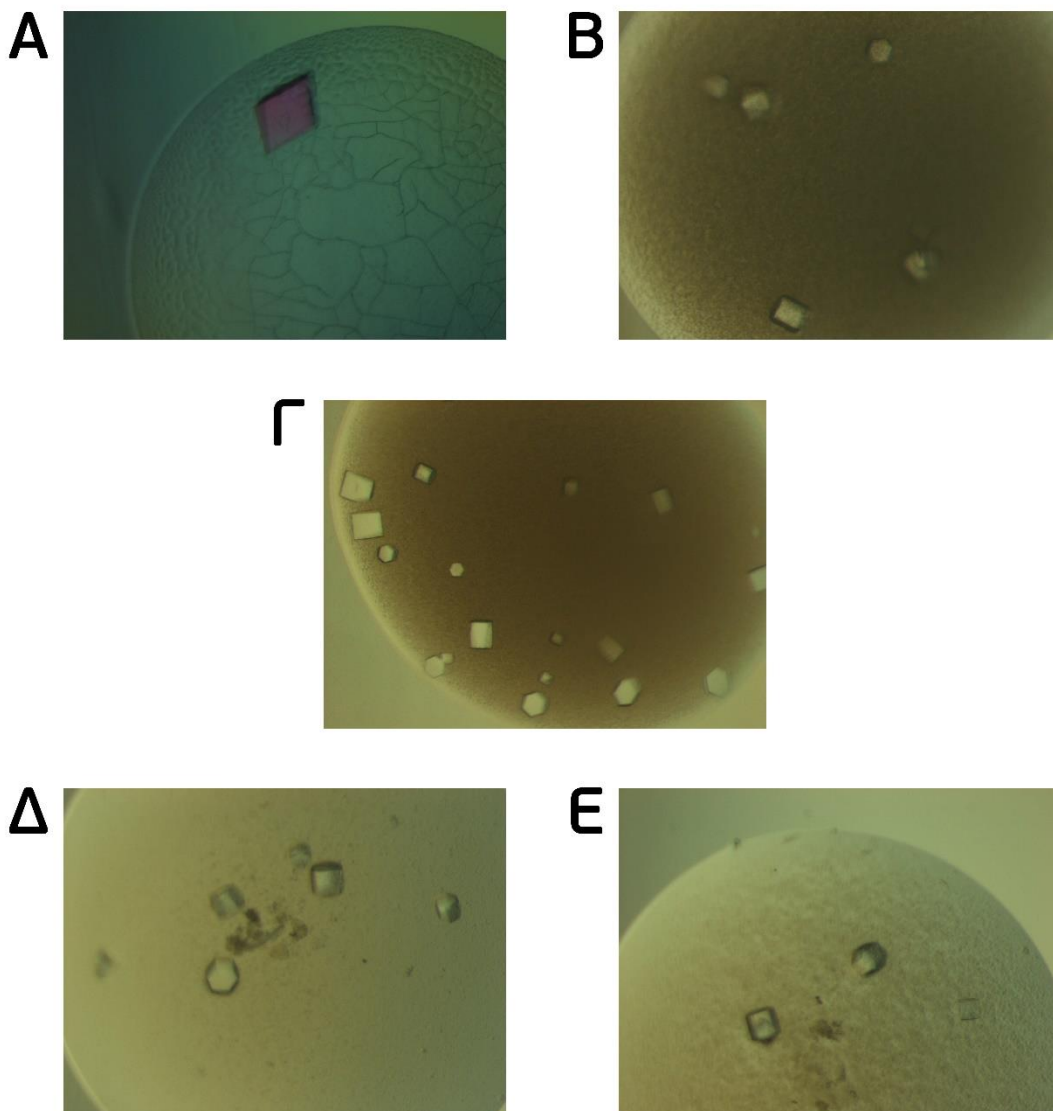
Πίνακας 13: Η κρυσταλλοπροστατευτική ουσία και η συγκέντρωσή της στην αρχική συνθήκη που φάνηκε ικανή να εμποδίσει το σχηματισμό πάγου στον κρυστάλλο PαCE15B κατά την ακτινοβολήσή του.

Αρχική συνθήκη	Συγκέντρωση και φύση κρυσταλλοπροστατευτικής ουσίας
2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6	30% ^{v/v} Γλυκερόλη
1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6	30% ^{v/v} Γλυκερόλη
0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 25% ^{w/v} PEG 8000	30% ^{v/v} Γλυκερόλη
	25% ^{v/v} PEG 400
0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 30% ^{w/v} PEG 8000	20% ^{v/v} Γλυκερόλη

Πίνακας 14: Συνθήκες στις οποίες επιτεύχθηκε η δημιουργία κρυστάλλων της πρωτεΐνης PαCE15B. Βελτ/ση = Προσπάθεια βελτιστοποίησης, $V_d = V_{σταγόνας}$, Av/ξη = Το ποσοστό πρωτεΐνης κατά την ανάμειξη με το μητρικό διάλυμα από το ρομπότ, Αρ/ση = αραίωση πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris HCl pH=8 (όπου δεν αναφέρεται, δεν έχει υπάρξει αραίωση), ++ = εξαιρετική μορφολογία κρυστάλλων, + = καλή μορφολογία κρυστάλλων, - = μέτρια μορφολογία κρυστάλλων. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία στην οποία φυλάχθηκε το πιάτο κρυσταλλώσεων ήταν 16°C, ενώ η αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 49,05 mg/mL.

Προσπάθεια	Συνθήκη	Χρόνος	Αξιολόγηση
PEG Suite	D4 (0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 25% w/v PEG 8000, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 66,67% v/v)	4 μήνες	++
JCSG-plus Screen	C11 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	+
1 ^η Βελτ/ση	D1 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	-
1 ^η Βελτ/ση	A8 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 2M Θειικό αμμώνιο, $V_d=0,5\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	-
2 ^η Βελτ/ση	D8 (1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	++
2 ^η Βελτ/ση	D10, D11 (1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Αρ/ση: 80% v/v, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	++
2 ^η Βελτ/ση	A10, A11, A12 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, με διάλυμα από το εμπορικό σκεύασμα κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	2 εβδομάδες	+
2 ^η Βελτ/ση	D7, D8, D9 (1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, $V_d=0,3\mu\text{L}$, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	+

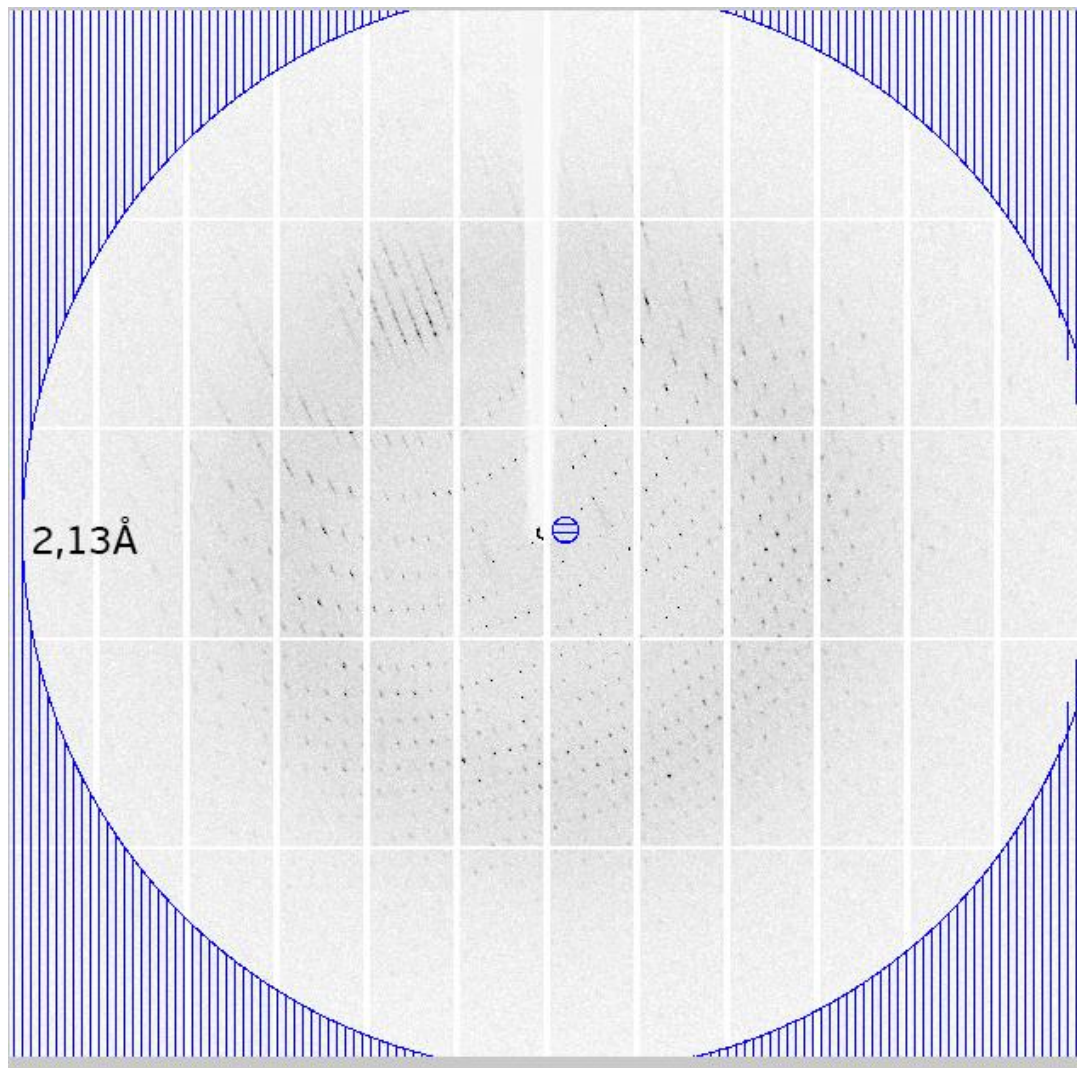
2 ^η Βελτ/ση	B7, B8, B9 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, V _d =0,3μL, Av/ξη: 80% v/v)	3 εβδομάδες	+
3 ^η Βελτ/ση	A2, A3, A4, A5 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, V _d =0,3μL)	2 εβδομάδες	++
3 ^η Βελτ/ση	C1, C3, C4, C5 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο, V _d =1μL)	2 εβδομάδες	++



Εικόνα 13: Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν στις ακόλουθες συνθήκες: Α: D4 (0,1M Sodium HEPES, pH=7,5, 25% w/v PEG 8000), Β: C11 (2M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6), Γ: D7 (1,8M Θειικό αμμώνιο, 0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6), Δ: A2 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο) και Ε: A3 (0,1M Οξικό νάτριο, pH=4,6, 1,8M Θειικό αμμώνιο).

3.2.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ

Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης έγινε στους 100K στο σταθμό P14 ($\lambda = 1.24 \text{ \AA}$) του EMBL (Αμβούργο, Γερμανία). Χρησιμοποιήθηκε κρύσταλλος που είχε αναπτυχθεί στη θέση A4 της τελευταίας προσπάθειας βελτιστοποίησης (Πίνακας 12) μετά από εμφύσηση σε μητρικό διάλυμα εμπλουτισμένο με 30% γλυκερόλη. Ο κρύσταλλος βρέθηκε ότι περιθλά τις ακτίνες X σε ανάλυση 2 \AA . Συνολικά συλλέχθηκαν 1800 περιθλασιγράμματα με εύρος ταλάντωσης $0,1^\circ$ και χρόνο έκθεσης σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων X $0,1 \text{ sec}$. Ενδεικτικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 14 ένα από τα περιθλασιγράμματα που προέκυψαν. Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τα λογισμικά XDS (Kabsch, 2010) και AIMLESS (Evans, 2011). Η ομάδα χώρου συμμετρίας ήταν $C2$ με διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας $a=113,6$, $b=77,19$, $c=384,6 \text{ \AA}$ και $\beta=98,1^\circ$ και 10 μόρια ανά ασύμμετρη μονάδα. Στον Πίνακα 15 συνοψίζονται τα στατιστικά αποτελέσματα που αφορούν στην επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης.



Εικόνα 14: Περιθλασίγραμμα που προέκυψε κατά την ακτινοβολήση του κρυστάλλου PaCE15B στο σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας P14 του EMBL (Αμβούργο, Γερμανία).

Πίνακας 15: Στατιστικά στοιχεία που αφορούν στη συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έκθεση μονοκρυστάλλου της PaCE15B σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων Χ.

Σταθμός	P14, PETRA III, EMBL – Hamburg outstation
Μήκος κύματος (Å)	1,24
Πλήθος περιθλασιγραμμάτων (εύρος ταλάντωσης)	1800 (0,1°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	C2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=113,6, b=77,19, c=384,6 Å β=98,1°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	10
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	535685
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	186244
Ευκρίνεια (Å)	126,92 – 2,2
Πληρότης δεδομένων (εξωτερική στοιβάδα) (%)	94,6 (87,4)
¹ R _{merge} (εξωτερική στοιβάδα)	0,115 (0,376)
< I / σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	6,6 (2,5)
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2,24 – 2,2
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	2,9 (2,3)

¹ Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $\sum_i \sum_h |<I_h> - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$ όπου <I_h> και I_h είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ο κυριότερος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν βελτίωση της ήδη υπάρχουσας γνώσης γύρω από την οικογένεια CE15 της βάσης δεδομένων CAZy. Με αυτόν τον τρόπο επιδιώχθηκε η συνεισφορά στην προσπάθεια για μείωση του ενζυμικού φορτίου και κατά συνέπεια του κόστους που απαιτείται για την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και την οικονομικά συμφέρουσα παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανικό επίπεδο. Κατά την περίοδο έναρξης των πειραμάτων, μόνο δύο τρισδιάστατες δομές της οικογένειας CE15 ήταν γνωστές και οι γνωστές πληροφορίες γύρω από τις γλυκουρονικές εστεράσες ήταν ιδιαίτερος περιορισμένες.

Συνολικά δύο γλυκουρονικές εστεράσες από το μύκητα *Podospora anserina*, οι PaCE15A και PaCE15B, εκφράστηκαν ετερόλογα, καθαρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κρυστάλλωσης με σκοπό τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής τους. Η απόδοση της καλλιέργειας ήταν $12,7 \cdot 10^{-3} \text{g}$ καθαρής πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας για την PaCE15A και $8,8 \cdot 10^{-3} \text{g}$ καθαρής πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας για την PaCE15B. Κατά τον καθαρισμό, ποσότητα πρωτεΐνης εντοπιζόταν στο διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη καθαρισμού, κατά τη φόρτωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Κάτι τέτοιο ενδεχομένως οφείλεται στη χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας ρητίνης και στη μη συγκράτηση όλης της πρωτεΐνης από τα ιόντα ή στο ότι η διάταξη είχε κάποιο πρόβλημα. Η καθαρότητα των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η σημαντική διαφορά ανάμεσα στο πειραματικό και στο θεωρητικά υπολογιζόμενο μοριακό βάρος της PaCE15A οφείλεται κατά κύριο λόγο στο φαινόμενο υπεργλυκοζυλίωσης από την *P. Pastoris*. Αντίθετα, το θεωρητικά υπολογιζόμενο μοριακό βάρος της PaCE15B είχε ελάχιστη διαφορά από το πειραματικό, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεν ήταν γλυκοζυλιωμένη.

Παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες, δεν κατέστη δυνατή η ανάπτυξη κρυστάλλων της *PαCE15A*. Η δυσκολία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είναι γλυκοζυλιωμένη και από την παρουσία δύο τομέων ενωμένων μέσω του πεπτιδίου σύνδεσης που καθιστά την πρωτεΐνη λιγότερο συμπαγή. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εστιαστεί στη δοκιμή ανάπτυξης κρυστάλλων σε ακόμα περισσότερες συνθήκες, σε διαφορετική θερμοκρασία και ενδεχομένως παρουσία πρόσθετων ουσιών. Θα μπορούσε παράλληλα να δοκιμασθεί η απογλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική πιθανότητα να παρατηρηθεί ανάπτυξη κρυστάλλων στις συνθήκες που δοκιμάστηκαν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Κατά συνέπεια χρειάζεται διαρκής αποτίμηση της κατάστασης των σταγόνων των δοκιμών κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν.

Όσον αφορά την *PαCE15B*, κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε διάφορες συνθήκες και βελτιώθηκαν με προσθήκη διαφόρων συστατικών και τροποποίηση της συγκέντρωσής τους. Δοκιμάστηκε επίσης η αραίωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα πλέον βέλτιστα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν παρουσία οξικού νατρίου και θειικού αμμωνίου, σε τιμή pH ίση με 4,6. Μετά από την έκθεση των κρυστάλλων στην πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Petra III στο Αμβούργο, βρέθηκε ότι περιθλούν τις ακτίνες X σε ανάλυση 2 Å και είναι κατάλληλοι για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της *PαCE15B*. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων. Κατά συνέπεια, οι μελλοντικές προσπάθειες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην αξιοποίηση των δεδομένων που προήλθαν από την ακτινοβολήση των κρυστάλλων ώστε να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής. Η διαδικασία αυτή δύναται να πραγματοποιηθεί με την τεχνική της μοριακής αντικατάστασης, κατασκευάζοντας ένα αρχικό μοντέλο με βάση τη δομή της εστεράσης *StGE2*, με την οποία παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ταυτότητα αμινοξικής ακολουθίας. Πάνω σε αυτόν το σκοπό εντείνονται πλέον οι προσπάθειες της ερευνητικής μας ομάδας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achyuthan, K.E., A.M. Achyuthan, P.D Adams, S.M. Dirk, J.C. Harper, B.A. Simmons, A.K. Singh (2010). "Supramolecular self-assembled chaos: Polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels." *Molecules* 15(12): 8641–8688.
- Akin, D. (2007). "Grass lignocelluloses: strategies to overcome recalcitrance." *Appl Biochem Biotech* 136–140: 3–15.
- Alalouf, O., Y. Balazs, M. Volkinshtein, Y. Grimpel, G. Shoham, Y. Shoham (2011). "A new family of carbohydrate esterases is represented by a GDSE hydrolase/acetylxyln esterase from *Geobacillus stearothermophilus*." *J Biol Chem* 286(49): 41993–2001.
- Bergfors, T.M. (1999). "Protein Crystallization, Techniques, Strategies and Tips." International University Line, La Jolla.
- Biely, P., G.L. Cote, L. Kremnický, D. Weisleder, R.V. Greene (1996). "Substrate specificity of acetylxyln esterase from *Schizophyllum commune*: mode of action on acetylated carbohydrates." *Biochim. Biophys. Acta* 1298: 209–222.
- Biely, P. (2012). "Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides." *Biotechnology Advances* 30: 1575–1588.
- Boraston, A.B., D.N. Bolam, H.J. Gilbert, G.J. Davies (2004) "Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition." *Biochem J* 382: 769–781.
- Brett, C.T., K.W. Waldron (1990). "Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls." Unwin Hyman London.
- Cantarel, B.L., P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an ex-

- pert resource for Glycogenomics." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D233–238.
- Centeno, M.S., C.I.P.D. Guerreiro, F.M.V.Dias, C. Morland, L.E. Tailford, A.Goyal, J.A.M.Prates, L.M.A. Ferreira, R.M.H. Caldeira, E.F. Mongodin, K.E Nelson, H.J Gilbert, C.M.G.A. Fontes (2006). "Galactomannan hydrolysis and mannose metabolism in *Cellvibrio mixtus*." *FEMS Microbiol Lett* 261(1): 123–132.
- Charavgi, M.–D., M. Dimarogona, E. Topakas, P. Christakopoulos, E. D. Chrysinina (2013). "The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst." *Acta Cryst. D*69: 63–73.
- Chayen, N.E. (2009). "High-throughput protein crystallization." *Adv Protein Chem Struct Biol* 77: 1–22.
- Chayen, N.E., T.J. Boggon, A. Cassetta, A. Deacon, T. Gleichmann, J. Habash, S.J. Harrop, J.R. Helliwell, Y.P. Nieh, M.R. Peterson, J. Raftery, E.H. Snell, A. Hadener, A.C. Niemann, D.P. Siddons, V. Stojanoff, A.W. Thompson, T. Ursby, M. Wulff (1996). "Trends and challenges in experimental macromolecular crystallography." *Quart. Rev. Biophys.* 29(3): 227–278.
- Chayen, N.E. (2005). "Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88: 329–337.
- Conde, R., R. Cueva, G. Pablo, J. Polaina, G. Larriba. (2004). "A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins." *J Biol Chem* 279(42): 43789–43798.
- Δημαρόγκωνα, Μ. (2012). "Διδακτορική Διατριβή: Μοριακές και δομικές μελέτες βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης." Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών.

- Dauter, Z., M. Jaskolski, A. Wlodawer (2010). "Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: a personal view." *J Synchrotron Radiat* 17(4): 433–444.
- Ducruix, A., R. Giege (Ed.) (1992). "Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach." Oxford University Press, Oxford.
- Dupont, C., N. Daigneault, F. Shareck, R. Morosoli, D. Kluepfel (1996). "Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 319: 881–886.
- Duranova, M., J. Hirsch, K. Kolenova, P. Biely (2009). "Fungal Glucuronoyl Esterases and Substrate Uronic Acid Recognition." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (11): 2483–2487.
- Duranova, M., S. Spanikova, H.A.B. Wosten, P. Biely, R.P. de Vries (2009). "Two glucuronoyl esterases of *Phanerochaete chrysosporium*." *Arch Microbiol* 191: 133–140.
- Eklof, J.M., H. Brumer (2010). "The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling." *Plant Physiol* 153(2): 456–466.
- Evans, P.R. (2011). "An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics." *Acta Cryst. D* 67: 282–292.
- Garcia-Conesa, M.T., V.F. Crepin, A.J. Goldson, G. Williamson, N.J. Cummings, I.F. Connerton, C.B. Faulds, P.A. Kroon (2004). "The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsFaeC, with a broad substrate specificity." *J. Biotechnol.* 108: 227–241.
- Garman, E. (1999). "Cool data: quantity and quality." *Acta Cryst. D Biol Crystallogr* 55(Pt 10): 1641–1653.
- Gilbert, H.J. (2010). "The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction." *Plant Physiol* 153(2): 444–455.

- Gilbert, H.J., H. Stalbrand, H. Brumer (2008). "How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation." *Curr Opin Plant Biol* 11(3): 338–348.
- Gupta, U., I. Kouskoumvekaki, L. Olsson, G. Panagiotou (2011). "The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases." *Biotechnol Adv* 29: 94–110.
- Gupta R., E. Jung, S. Brunak (2004). "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins." In preparation.
- Heinemann, U., G. Illing, H. Oschkinat (2001). "High-throughput three-dimensional protein structure determination." *Curr Opin Biotechnol* 12(4): 348–354.
- Himmel, M.E., S.-Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, T.D. Foust (2007). "Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production." *Science* 315: 804–807.
- Jaskolski, M. (2010). "Personal remarks on the future of protein crystallography and structural biology." *Acta Biochim Pol* 57(3): 261–264.
- Jeffries, T. (1990). "Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes." *Biodegradation* 1: 163–176.
- Juge, N., G. Williamson, A. Puigserver, N.J. Cummings, I.F. Connerton, C.B. Faulds (2001). "High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *FEMS Yeast Res.* 1: 127–132.
- Julenius, K., A. Molgaard, R. Gupta, S. Brunak (2005). "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites." *Glycobiology* 15(2): 153–164.
- Καρναούρη, Α. (2010). "Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία: Ετερόλογη υπερέκφραση και καταλυτικός χαρακτηρισμός μιας θερμόφιλης ενδονουκλε-

- άσης της οικογένειας GH7 από το μύκητα *Sporotrichum thermophile*." Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας.
- Kabsch W. (2010). "XDS" *Acta Cryst.* D66: 125–132.
- Kubicek, C.P. (1992). "The Cellulase Proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 45: 1–27.
- Li, X.–L., S. Spanikova, R.P. de Vries, P. Biely (2007). "Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases." *FEBS Lett.* 581: 4029–4035.
- McPherson, A. (1999). "Crystallization of Biological Macromolecules." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- McPherson, A. (2004). "Introduction to protein crystallization." *Methods* 34(3): 254–265.
- Pokkuluri, P.R., N.E.C. Duke, S.J. Wood, M.A. Cotta, X.–L. Li, P. Biely, M. Schiffer (2011). "Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorina*." *Proteins* 79: 2588–2592.
- Raush, E., M. Totrov, B.D. Marsden, R. Abagyan (2009). "A new method for publishing three-dimensional content." *PLoS One*, 4, e7394.
- Rhodes, G. (1999). "Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models." Academic Press.
- Rumbold, K., P. Biely, M. Mastihubova, M. Gudelj, G. Gubitz, K.H. Robra, B.A. Prior, B.A. (2003). "Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aureobasidium pullulans*." *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5622–5626.
- Rupp, B., J. Wang (2004). "Predictive models for protein crystallization." *Methods* 34: 390–407.
- Rupp, B. (2009). "Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology." Garland Science.

- Sharff, A., H. Jhoti (2003). "High-throughput crystallography to enhance drug discovery." *Curr Opin Chem Biol* 7(3): 340–345.
- Solbak, A.I., T.H. Richardson, R.T. McCann, K.A. Kline, F. Bartnek, G. Tomlinson, X. Tan, L. Parra-Gessert, G.J. Frey, M. Podar, P. Luginbuhl, K.A. Gray, E.J. Mathur, D.E. Robertson, M.J. Burk, G.P. Hazlewood, J.M. Short, J. Kerovuo (2005). "Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric." *J Biol Chem* 280(10): 9431–9438.
- Spanikova, S., P. Biely (2006). "Glucuronoyl esterase – Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*." *FEBS Lett.* 580: 4597–4601.
- Spanikova, S., M. Polakova, D. Joniak, J. Hirsch, P. Biely (2007). "Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*." *Arch Microbiol* 188: 185–189.
- Sundberg, M., K. Poutanen (1991). "Purification and properties of two acetylxylan esterases of *Trichoderma reesei*." *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13: 1–11.
- Tenkanen, M., J. Schuseil, J. Puls, K. Poutanen (1991). "Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics." *J. Biotechnol.* 18: 69–84.
- Topakas E., M. Moukouli, M. Dimarogona, C. Vafiadi, P. Christakopoulos (2010). "Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: Identification of the nucleophilic serine." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 1765-1772.
- Vafiadi, C., E. Topakas, P. Biely, P. Christakopoulos (2009). "Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*." *FEMS Microbiol Lett* 296: 178–184.

- Weng, J.-K., X. Li, N.D. Bonawitz, C. Chapple (2008). "Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production." *Curr. Opin. Biotechnol* 19: 166–172.
- Wong, D.W.S., V.J. Chan, A.A. McCormack, J. Hirsch, P. Biely. (2012) "Functional Cloning and Expression of the *Schizophyllum commune* Glucuronoyl Esterase Gene and Characterization of the Recombinant Enzyme." *Biotechnology Research International: Volume 2012*.
- Wood, S.J., X.-L. Li, M.A. Cotta, P. Biely, N.E.C. Duke, M. Schiffer, P.R. Pokkuluri (2008). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the glucuronoyl esterase catalytic domain from *Hypocrea jecorina*." *Acta Cryst. F64*: 255–257.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στο σημείο αυτό παρουσιάζονται οι συνθήκες των εμπορικών σκευασμάτων κρυστάλλωσης PEG Suite της εταιρίας Qiagen και JCSG-plus Screen της εταιρίας Molecular Dimensions, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τις προσπάθειες προσδιορισμού των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης.

Πίνακας 16: Οι συνθήκες του εμπορικού σκευάσματος κρυστάλλωσης PEG Suite της εταιρίας Qiagen.

Αριθμός	Θέση (πίατο 96 θέ- σεων)	Άλας	Ρυθμιστικό Διάλυμα	Καταβυθιστικό
1	A1	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	40 %(v/v) PEG 200
2	A2	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30 %(v/v) PEG 300
3	A3	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30 %(v/v) PEG 400
4	A4	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(v/v) PEG 550 MME
5	A5	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 1000
6	A6	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 2000 MME
7	A7	-	0.1 M MES pH 6.5	40 %(v/v) PEG 200
8	A8	-	0.1 M MES pH 6.5	30 %(v/v) PEG 300
9	A9	-	0.1 M MES pH 6.5	30 %(v/v) PEG 400
10	A10	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
11	A11	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 1000
12	A12	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME

13	B1	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	40 %(v/v) PEG 200
14	B2	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	30 %(v/v) PEG 300
15	B3	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	30 %(v/v) PEG 400
16	B4	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
17	B5	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 1000
18	B6	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME
19	B7	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	40 %(v/v) PEG 200
20	B8	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(v/v) PEG 300
21	B9	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(v/v) PEG 400
22	B10	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
23	B11	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 1000
24	B12	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME
25	C1	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 3000
26	C2	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 4000
27	C3	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 6000
28	C4	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 8000
29	C5	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	20 %(w/v) PEG 10000
30	C6	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	15 %(w/v) PEG 20000
31	C7	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 3000
32	C8	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 4000
33	C9	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 6000
34	C10	-	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 8000

35	C11	-	0.1 M MES pH 6.5	20 %(w/v) PEG 10000
36	C12	-	0.1 M MES pH 6.5	15 %(w/v) PEG 20000
37	D1	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 3000
38	D2	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 4000
39	D3	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 6000
40	D4	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 8000
41	D5	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 10000
42	D6	-	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	15 %(w/v) PEG 20000
43	D7	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 3000
44	D8	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 4000
45	D9	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 6000
46	D10	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 8000
47	D11	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	20 %(w/v) PEG 10000
48	D12	-	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(w/v) PEG 20000
49	E1	0.2 M Sodium fluoride	-	20 %(w/v) PEG 3350
50	E2	0.2 M Potassium fluoride	-	20 %(w/v) PEG 3350
51	E3	0.2 M Ammonium fluoride	-	20 %(w/v) PEG 3350
52	E4	0.2 M Lithium chloride	-	20 %(w/v) PEG 3350
53	E5	0.2 M Magnesium chloride	-	20 %(w/v) PEG 3350

54	E6	0.2 M Sodium chloride	–	20 %(w/v) PEG 3350
55	E7	0.2 M Calcium chloride	–	20 %(w/v) PEG 3350
56	E8	0.2 M Potassium chloride	–	20 %(w/v) PEG 3350
57	E9	0.2 M Ammonium chloride	–	20 %(w/v) PEG 3350
58	E10	0.2 M Sodium iodide	–	20 %(w/v) PEG 3350
59	E11	0.2 M Potassium iodide	–	20 %(w/v) PEG 3350
60	E12	0.2 M Ammonium iodide	–	20 %(w/v) PEG 3350
61	F1	0.2 M Sodium thiocyanate	–	20 %(w/v) PEG 3350
62	F2	0.2 M Potassium thiocyanate	–	20 %(w/v) PEG 3350
63	F3	0.2 M Lithium nitrate	–	20 %(w/v) PEG 3350
64	F4	0.2 M Magnesium nitrate	–	20 %(w/v) PEG 3350
65	F5	0.2 M Sodium nitrate	–	20 %(w/v) PEG 3350
66	F6	0.2 M Potassium nitrate	–	20 %(w/v) PEG 3350
67	F7	0.2 M Ammonium nitrate	–	20 %(w/v) PEG 3350
68	F8	0.2 M Magnesium formate	–	20 %(w/v) PEG 3350

69	F9	0.2 M Sodium formate	–	20 %(w/v) PEG 3350
70	F10	0.2 M Potassium formate	–	20 %(w/v) PEG 3350
71	F11	0.2 M Ammonium formate	–	20 %(w/v) PEG 3350
72	F12	0.2 M Lithium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
73	G1	0.2 M Magnesium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
74	G2	0.2 M Zinc acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
75	G3	0.2 M Sodium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
76	G4	0.2 M Calcium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
77	G5	0.2 M Potassium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
78	G6	0.2 M Ammonium acetate	–	20 %(w/v) PEG 3350
79	G7	0.2 M Lithium sulfate	–	20 %(w/v) PEG 3350
80	G8	0.2 M Magnesium sulfate	–	20 %(w/v) PEG 3350
81	G9	0.2 M Sodium sulfate	–	20 %(w/v) PEG 3350
82	G10	0.2 M Potassium sulfate	–	20 %(w/v) PEG 3350
83	G11	0.2 M Ammonium sulfate	–	20 %(w/v) PEG 3350

84	G12	0.2 M di-Sodium tartrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
85	H1	0.2 M K/Na tartrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
86	H2	0.2 M di-Ammonium tartrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
87	H3	0.2 M Sodium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
88	H4	0.2 M di-Sodium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
89	H5	0.2 M Potassium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
90	H6	0.2 M di-Potassium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
91	H7	0.2 M Ammonium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
92	H8	0.2 M di-Ammonium phosphate	-	20 %(w/v) PEG 3350
93	H9	0.2 M tri-Lithium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
94	H10	0.2 M tri-Sodium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
95	H11	0.2 M tri-Potassium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
96	H12	0.18 M tri-Ammonium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350

Πίνακας 17: Οι συνθήκες του εμπορικού σκευάσματος κρυστάλλωσης JCSG-plus Screen της εταιρίας Molecular Dimensions.

Αριθ- μός	Θέση (πίατο 96 θέ- σεων)	Άλας	Ρυθμιστικό Διάλυμα	Καταβυθιστικό
1	A1	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	50 %(v/v) PEG 400
2	A2	-	0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.5	20 %(w/v) PEG 3000
3	A3	0.18 M tri-Ammonium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
4	A4	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30 %(v/v) MPD
5	A5	0.2 M Magnesium formate		20 %(w/v) PEG 3350
6	A6	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20 %(w/v) PEG 1000
7	A7	-	0.1 M CHES pH 9.5	20 %(w/v) PEG 8000
8	A8	0.2 M Ammonium formate	-	20 %(w/v) PEG 3350
9	A9	0.2 M Ammonium chloride	-	20 %(w/v) PEG 3350
10	A10	0.2 M Potassium formate	-	20 %(w/v) PEG 3350
11	A11	0.2 M Ammonium phosphate	0.1 M TRIS pH 8.5	50 %(v/v) MPD

12	A12	0.2 M Potassium nitrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
13	B1	0.8 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 4.0	-
14	B2	0.2 M Sodium thiocyanate		20 %(w/v) PEG 3350
15	B3	-	0.1 M BICINE pH 9.0	20 %(w/v) PEG 6000
16	B4	-	0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 8000, 8 %(v/v) Ethylene glycol
17	B5	-	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40 %(v/v) MPD, 5 %(w/v) PEG 8000
18	B6	-	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40 %(v/v) Ethanol, 5 %(w/v) PEG 1000
19	B7	-	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	8 %(w/v) PEG 4000
20	B8	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M TRIS pH 7.0	10 %(w/v) PEG 8000
21	B9		0.1 M Citric acid pH 5.0	20 %(w/v) PEG 6000
22	B10	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	50 %(v/v) PEG 200
23	B11	-	1.6 M tri-Sodium citrate pH 6.5	-
24	B12	0.2 M tri-Potassium citrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
25	C1	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20 %(w/v) PEG 8000
26	C2	1 M Lithium chloride	0.1 M Citric acid pH 4.0	20 %(w/v) PEG 6000

27	C3	0.2 M Ammonium nitrate	-	20 %(w/v) PEG 3350
28	C4	-	0.1 M HEPES pH 7.0	10 %(w/v) PEG 6000
29	C5	0.8 M Sodium phosphate, 0.8 M Potassium phosphate	0.1 M HEPES pH 7.5	-
30	C6	-	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40 %(v/v) PEG 300
31	C7	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	10 %(w/v) PEG 3000
32	C8	-	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(v/v) Ethanol
33	C9	-	0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	25 %(v/v) 1,2 propanediol, 10 %(v/v) Glycerol
34	C10	-	0.1 M BICINE pH 9.0	10 %(w/v) PEG 20000, 2 %(v/v) 1,4-Dioxane
35	C11	2 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	-
36	C12	-	-	10 %(w/v) PEG 1000, 10% (w/v) PEG 8000
37	D1	-	-	24 %(w/v) PEG 1500, 20% (w/v) Glycerol
38	D2	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30 %(v/v) PEG 400
39	D3	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	50 %(v/v) PEG 200
40	D4	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	30 %(w/v) PEG 8000
41	D5	-	0.1 M HEPES pH 7.5	70 %(v/v) MPD

42	D6	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG 8000
43	D7	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	40 %(v/v) PEG 400
44	D8	-	0.1 M TRIS pH 8.0	40 %(v/v) MPD
45	D9	0.17 M Ammonium sulfate	-	25,5 %(w/v) PEG 4000, 15 %(v/v) Glycerol
46	D10	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40 %(v/v) PEG 300
47	D11	0.14 M Calcium chloride	0.07 M Sodium acetate pH 4.6	14 %(v/v) Isopropanol, 30 %(v/v) Glycerol
48	D12	0.04 M Potassium phosphate	-	16 %(w/v) PEG 8000, 20 %(v/v) Glycerol
49	E1	1 M tri-Sodium citrate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	-
50	E2	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	2 M Ammonium sulfate
51	E3	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(v/v) Isopropanol
52	E4	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	1,26 M Ammonium sulfate
53	E5	-	0.1 M CAPS pH 10.5	40 %(v/v) MPD
54	E6	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Imidazole pH 8.0	20 %(w/v) PEG 3000
55	E7	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	10 %(v/v) Isopropanol

56	E8	1 M di-Ammonium phosphate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	-
57	E9	1.6 M Magnesium sulfate	0.1 M MES pH 6.5	-
58	E10	-	0.1 M BICINE pH 9.0	10 %(w/v) PEG 6000
59	E11	0.16 M Calcium acetate	0.08 M Sodium cacodylate pH 6.5	14,4 %(w/v) PEG 8000, 20 %(v/v) Glycerol
60	E12	-	0.1 M Imidazole pH 8.0	10 %(w/v) PEG 8000
61	F1	0.05 M Cesium chloride	0.1 M MES pH 6.5	30%(v/v) Jeffamine M-600
62	F2	3.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 5.0	
63	F3	-	0.1 M TRIS pH 8.0	20 %(v/v) MPD
64	F4	-	0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(v/v) Jeffamine M-600
65	F5	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	50 %(v/v) Ethylene glycol
66	F6		0.1 M BICINE pH 9.0	10 %(v/v) MPD
67	F7	0.8 M Succinic acid pH 7.0	-	-
68	F8	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0	-	-
69	F9	2.4 M Sodium malonate pH 7.0	-	-
70	F10	1.1 M Sodium malonate	0.1 M HEPES pH 7.0	0,5 %(v/v) Jeffamine ED-2001
71	F11	1 M Succinic acid	0.1 M HEPES pH 7.0	1 %(w/v) PEG MME 2000
72	F12	-	0.1 M HEPES pH 7.0	30 %(v/v) Jeffamine M-600
73	G1	-	0.1 M HEPES pH 7.0	30 %(v/v) Jeffamine ED-2001

74	G2	0.02 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	22 %(w/v) Polyacrylic acid 5100 sodium salt
75	G3	0.01 M Cobalt chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) Polyvinylpyrrolidone K15
76	G4	0.2 M Trimethylamine N-oxide	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG MME 2000
77	G5	0.005 M Cobalt chloride, 0.005 M Cadmium chloride, 0.005 M Magnesium chloride, 0.005 M Nickel chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	12 %(w/v) PEG 3350
78	G6	0.24 M Sodium malonate pH 7.0	-	20 %(w/v) PEG 3350
79	G7	0.1 M Succinic acid pH 7.0	-	15 %(w/v) PEG 3350
80	G8	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	-	20 %(w/v) PEG 3350
81	G9	0.1 M Potassium thiocyanate	-	30 %(w/v) PEG MME 2000
82	G10	0.15 M Potassium bromide	-	30 %(w/v) PEG MME 2000
83	G11	2 M Ammonium sulfate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	-
84	G12	3 M Sodium chloride	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	-
85	H1	0.3 M Magnesium formate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	-
86	H2	1 M Ammonium sulfate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	1 %(w/v) PEG 3350
87	H3	0.1 M tri-Sodium acetate pH 4.5	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350

88	H4	0.2 M Calcium chloride	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	45 %(v/v) MPD
89	H5	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	45 %(v/v) MPD
90	H6	0.1 M Ammonium acetate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	17 %(w/v) PEG 10,000
91	H7	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350
92	H8	0.2 M Sodium chloride	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350
93	H9	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350
94	H10	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350
95	H11	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	25 %(w/v) PEG 3350
96	H12	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	45 %(v/v) MPD