



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
ανάπτυξη στην κοινωνία της γνώσης  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

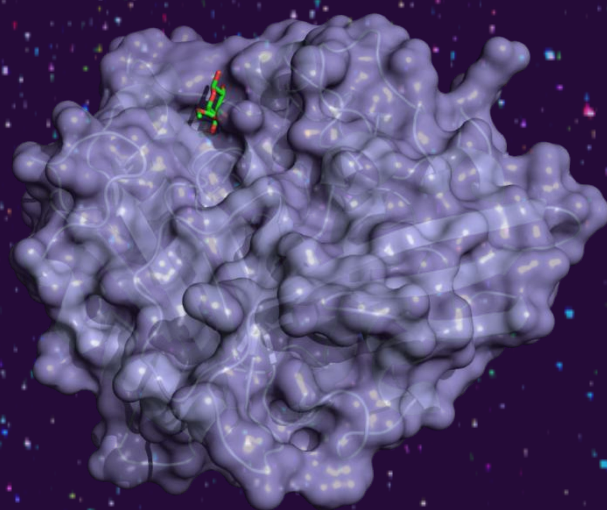


ΕΣΠΑ  
2007-2013  
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Μοριακή, δομική και καταλυτική μελέτη  
καινοτόμων βιοκαταλυτών (ημικυτταρινάσες)  
που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της  
φυτικής βιομάζας



Διδακτορική Διατριβή  
Μαρία-Δέσποινα Α. Χαραυγή

Επιβλέπων Καθηγητής: Παύλος Χριστακόπουλος

Αθήνα 2015



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**Μοριακή, δομική και καταλυτική μελέτη  
καινοτόμων βιοκαταλυτών (ημικυτταρινάσες)  
που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της  
φυτικής βιομάζας**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Μαρία-Δέσποινα Α. Χαραυγή**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Π. Χριστακόπουλος**

**Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

**Αθήνα 2015**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).*

*Στους πολυαγαπημένους μου γονείς,  
Θανάση & Ελένη*



## Εξεταστική Επιτροπή

<b>Χριστακόπουλος Παύλος</b> <i>σ. Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.</i>	Επιβλέπων Καθηγητής
<b>Κυριακίδης Δημήτριος</b> <i>Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Α.Π.Θ.</i>	Μέλος συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
<b>Τόπακας Ευάγγελος</b> <i>Επίκουρος Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.</i>	Μέλος συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
<b>Κέκος Δημήτριος</b> <i>Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.</i>	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
<b>Κολίσης Φραγκίσκος</b> <i>Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.</i>	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
<b>Μπεθάνης Κωνσταντίνος</b> <i>Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α.</i>	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
<b>Χατζηνικολάου Δημήτριος</b> <i>Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.</i>	Μέλος εξεταστικής επιτροπής

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθ. Παύλο Χριστακόπουλο για την ανάθεση αυτής της διδακτορικής διατριβής, την καθοδήγηση, την ιδιαίτερη βοήθεια και υποστήριξη καθώς και τις δυνατότητες εκπαίδευσης που μου παρείχε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του ΕΜΠ. Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθ. Δημήτριο Κυριακίδη και Επ. Καθ. Ευάγγελο Τόπακα για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη κατά την εξέλιξη της διδακτορικής διατριβής καθώς και την καλλιέργεια της επιστημονικής μου σκέψης μέσα από γόνιμες συμβουλές και παρατηρήσεις. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, υπό την επίβλεψη της οποίας έλαβαν χώρα οι κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων Χ στο ΙΒΦΧΒ/ΕΙΕ, για την πειραματική καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε απλόχερα σε κάθε βήμα πραγματοποίησης της εργασίας μου, για την πρόσβαση και εκπαίδευση στη συμβατική πηγή ακτίνων Χ του ΙΒΦΧΒ/ΕΙΕ καθώς στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας του EMBL (Αμβούργο) αλλά και για τη σημαντική ευκαιρία να συνεχίσω να ασχολούμαι ενεργά με το πεδίο της έρευνας. Επίσης, τη Δρ. Μαρία Δημαρόγκωνα για τη βοήθεια και την προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις της μαζί μου κατά τα πρώτα στάδια της παρούσας εργασίας.

Το επιστημονικό προσωπικό των εγκαταστάσεων συγχροτρονικής ακτινοβολίας SRS, EMBL Hamburg outstation - σταθμός X13 (Αμβούργο, Γερμανία) για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Τον Dr Hampus Sunner (Chalmers University of Technology, Göteborg, Σουηδία) και τον Dr Peter Biely, Institute of Chemistry of the Slovak Academy of Sciences (Μπρατισλάβα, Σλοβακία) για την ευγενική προσφορά υποστρωμάτων και τον Dr Jean-Guy Berrin (INRA, Aix Marseille Université, Marseille, France) για την παροχή στελέχους που χρησιμοποιήθηκε για την πρωτεϊνική έφραση.

Παράλληλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες σε όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και ειδικότερα τις φίλες και συναδέλφους Α. Καρναούρη, Μ. Σαββίδου αλλά και τη φίλη και συνάδελφο στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΕΙΕ Β. Τσιρκώνη, για την άψογη συνεργασία, τη στήριξη, τις γόνιμες επιστημονικές συζητήσεις καθώς και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που μου προσέφεραν.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου χάρις στη στήριξη των οποίων, την αδιάκοπη συμπαράσταση τους αλλά και τις θυσίες τους είχα τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις σπουδές που επιθυμούσα.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Μαρία-Δέσποινα Α. Χαραυγή,

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Δημοσίευση με τίτλο “The crystal structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights on its role as a potential biocatalyst.” **Charavgi M.D.**, Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.D., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 69, 63-73 (2013) (*impact factor: 12.6*).
- Δημοσίευση με τίτλο “Glucuronoyl esterase screening and characterization assays utilizing commercially available benzyl glucuronic acid ester.” Sunner H., **Charavgi M.D.**, Olsson L., Topakas E., Christakopoulos P., *Molecules*, 20(10), 17807-17817(2015).
- Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο «Κρυσταλλογραφικές μελέτες της εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος από *Sporotrichum thermophile* – ένας καινοτόμος βιοκαταλύτης για την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας», **Μ.-Δ. Χαραυγή**, Μ. Δημαρόγκωνα, Μ. Μουκούλη, Ε. Τόπακας, Π. Χριστακόπουλος, Ε. Δ. Χρυσίνα, 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συμπόσιο Κατάλυσης, 22-23 Οκτωβρίου 2010, Αθήνα.
- Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο «The 3D structure of a novel Glucuronoyl Esterase from *Sporotrichum thermophile* (StGE) at 1.55 Å», **Charavgi M.D.**, Dimarogona M., Moukouli M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.D., και συμμετοχή στο 62<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 9-11 Δεκεμβρίου 2011, Αθήνα.
- Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο «The crystal structure of a novel Glucuronoyl Esterase from *Sporotrichum thermophile* gives new insights on its role as a potential biocatalyst», **Charavgi M.D.**, Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.D., και συμμετοχή στο Διεθνές Συμπόσιο “Plant and Seaweed Polysaccharides Symposium 2012”, 17-20 Ιουλίου 2012, La Cité, Nantes Events Center, Νάντη, Γαλλία.
- Προφορική παρουσίαση με τίτλο «The crystal structures of a novel Glucuronoyl Esterase and its S213A mutant from *Myceliophthora Thermophila* in the apo-forms and in complex with a substrate analogue give new insights on its role as a potential biocatalyst» **Charavgi M.D.**, Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysinia E.D., και

συμμετοχή στο 6ο Διεθνές Συνέδριο της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρείας, Αθήνα 28-29 Σεπτεμβρίου 2012, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο «A glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* and its multidisciplinary assessment as a potential biocatalyst» **Charavgi M.D.**, Chrysina E.D., Christakopoulos P., Topakas E., και συμμετοχή στο Διεθνές Συνέδριο “10<sup>th</sup> Carbohydrate Meeting”, 21-24 Απριλίου 2013, Πράγα, Τσεχία.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

MB	MW	Μοριακό Βάρος
P.Δ.		Ρυθμιστικό Διάλυμα
G-6-P Na	D-Glucose 6-phosphate sodium salt	Άλας νατρίου της 6-φωσφορικής γλυκόζης
ATP	Adenosine triphosphate	Αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ
ADP	Adenosine diphosphate	Αδενοσινο-διφωσφορικό οξύ
APS	Ammonium Persulfate	Υπερθειϊκό Αμμώνιο
AXE	Acetyl Xylan Esterase	Εστεράσες του οξικού της ξυλάνης
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη
BMMG	Buffered Methanol-complex Medium	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη
BnGlcA	Benzyl D-Glucuronic Acid ester	Βενζυλικός εστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος
β-NADP-Na	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt	Φωσφορικό άλας νατρίου του β-νικοτιναμιδοαδενινοδινουκλεοτίδιου
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes Database	Βάση δεδομένων ενζύμων ενεργών ως προς υδατάνθρακες
CBM	Carbohydrate Binding Module	Τομέας πρόσδεσης υδατανθράκων
CE	Carbohydrate Esterases	Εστεράσες των Υδατανθράκων
Cip2 GE	Catalytic domain of <i>Hypocrea jecorina</i> Glucuronoyl Esterase	Καταλυτική περιοχή της Γλυκουρονικής Εστεράσης του <i>H. jecorina</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNS	3,5-DiNitroSalicylic acid	3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ
EC no	Enzyme Commission number	Κατηγοριοποίηση ενζύμων σύμφωνα με την αντίδραση που καταλύουν
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid	Αιθυλενοδιάμινο-τετραοξικό οξύ
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	
EtBr	Ethidium Bromide	Βρωμιούχο αιθίδιο

FT-IR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy	Φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
GE	Glucuronoyl Esterase	Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος
GH	Glycoside Hydrolase family	Οικογένεια Γλυκοσιδικών Υδρολασών
GlcA	D-Glucuronic Acid	D-γλυκουρονικό οξύ
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography	Χρωματογραφία Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου
LCCs	Lignin Carbohydrate Complexes	Λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα
(LS) LB	(Low Salt) Luria-Bertani medium	(Χαμηλής Αλατότητας) Θρεπτικό μέσο Luria-Bertani
MCU		4-Ο-μεθυλο-D-γλυκοκυρανουρονικός μεθυλεστέρας
MD	Medium Dexrose	Θρεπτικό υλικό δεξτρόζης
MM	Medium Methanol	Θρεπτικό υλικό μεθανόλης
MS	Mass Spectrometry	Φασματοσκοπία μάζας
O.D. <sub>600nm</sub>	Optical Density	Οπτική πυκνότητα στα 600 nm
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου
<i>PaGE1</i>	<i>Podospora anserine</i> Glucuronoyl Esterase recombinant	Ανασυνδυσμένη Γλυκουρονική Εστεράση του <i>P. anserina</i>
PDB	Protein Data Bank	Πρωτεϊνική βάση δεδομένων
PEG	PolyEthyleneGlycol	Πολυαιθυλενογλυκόλη
pI	Isoelectric Point	Ισοηλεκτρικό σημείο
rpm	rounds per minute	Στροφές ανά λεπτό
TBA	Tert-butanol	Τριτοταγής βουτανόλη
TBE	Buffer solution containing Tris-base, boric acid and EDTA	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει Tris-βάση, βορικό οξύ και EDTA
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Τετρα- μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
<i>StGE2</i>	<i>Spototrichum thermophile</i>	Ανασυνδυσμένη Γλυκουρονική



	Glucuronoyl Esterase recombinant	Εστεράση του <i>S. thermophile</i>
S213A <i>S</i> tGE2	S213A (Serine213 mutation to Alanine) point mutation of <i>Sporotrichum thermophile</i> Glucuronoyl Esterase recombinant	Σημειακή μετάλλαξη S213A (Σερίνη213 μετάλλαξη σε Αλανίνη) της ανασυνδυασμένης Γλυκουρονικής Εστεράσης του <i>S. thermophile</i>
U	Unit	Μονάδα ενζυμικής ενεργότητας
v/v	volume/volume	Συγκέντρωση κατ' όγκο (mL διαλυμένης ουσίας ανά mL δ/τη)
w/v	weight/volume	Συγκέντρωση κατά βάρος (g διαλυμένης ουσίας ανά mL δ/τη)
Xyn11	endo-β-1,4-xylanase GH11	ενδο-β-1,4 ξυλανάση της οικογένειας γλυκοσιδικών υδρολασών 11
YNB	Yeast Nitrogen Base	Αζωτούχος βάση ζύμης
YPD(S)	Yeast extract, Peptone, dextrose, (Sorbitol)	Εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, δεξτρόζη, (σορβιτόλη)

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας με τη χρήση ημικυτταρινασών παραμένει ένα από τα προαπαιτούμενα για την αποδοτική παραγωγή βιοκαυσίμων από ζυμώσιμα σάκχαρα, ενώ σύμφωνα με οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 10% των συμβατικών καυσίμων θα πρέπει να έχει αντικατασταθεί με βιοκαύσιμα μέχρι το 2020. Προς αυτήν την κατεύθυνση, τα θερμοσταθερά ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοκατάλυση λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών, αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο λόγω της πληθώρας των βιοτεχνολογικών εφαρμογών τους ακόμα και κάτω από έντονες συνθήκες βιομετατροπών βιομηχανικής κλίμακας αλλά και του μειωμένου οικονομικού κόστους. Οι γλυκουρονικές εστεράσες (Glucuronoyl Esterases, GEs), ανήκουν σε μια πρόσφατα ανακαλυφθείσα οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών (Carbohydrate Esterases, CEs), την οικογένεια CE-15 (CAZy database), των οποίων η δράση διαφαίνεται να εντοπίζεται στην υδρόλυση του εστερικού δεσμού μεταξύ των πλευρικών ομάδων του 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης. Ο συγκεκριμένος δεσμός θεωρείται ότι εκπροσωπεί ένα από τα δυσκολότερα στάδια που απαντώνται κατά την πλήρη αποδέσμευση της λιγνίνης από τους υδατάνθρακες που συνθέτουν την ημικυτταρίνη. Καθώς ο φυσιολογικός ρόλος και μηχανισμός δράσης των GEs δεν είναι πλήρως γνωστός, στην παρούσα διδακτορική διατριβή δόθηκε έμφαση στην εστεράση του γλυκουρονικού οξέος αλλά και μεταλλάγματός της από το θερμόφιλο μύκητα *Myceliophthora thermophila* (συνώνυμο *Sporotrichum thermophile*, StGE2 και S213A StGE2, αντίστοιχα), και στην εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από το μεσόφιλο μικροοργανισμό *Podospira anserina* (PaGE1).

Πιο αναλυτικά, στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκαν μελέτες τόσο της StGE2 όσο και της PaGE1 ως προς την υδρόλυση εμπορικά διαθέσιμου συνθετικού υποστρώματος. Στόχο αποτέλεσε η δημιουργία ενός καινοτόμου και εύχρηστου πρωτοκόλλου μελέτης του ενζύμου που προάγει την αποσαφήνιση της δράσης αυτού αλλά και περισσότερων ενζύμων της ίδιας

οικογενείας των GEs. Πέραν της μεγάλης βιοτεχνολογικής της εφαρμογής, η πειραματική μεθοδολογία τριών σταδίων που αναπτύχθηκε αποτελεί έναυσμα για την ανακάλυψη και περαιτέρω μελέτη νέων GEs μέσω εκτενούς σάρωσης της ετερόλογης έκφρασης Γενομικών και Μεταγενομικών βιβλιοθηκών.

Παράλληλα, εξετάστηκε η *SzGE2* ως προς το συνθετικό δυναμικό μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε μη συμβατικά συστήματα. Η αξιολόγηση της συνθετικής ενεργότητας του ενζύμου περιελάμβανε επίσης την ακινητοποίησή του μέσω παρασκευής ενζυμικών συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών (CLEAs). Στην ελεύθερη μορφή του το ένζυμο εμφάνισε ενδείξεις βιοκαταλυτικής σύνθεσης γλυκουρονικών εστέρων στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η φυσιολογική δράση του ενζύμου μέσω δοκιμών απομόνωσης λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων (Lignin-Carbohydrate Complexes, LCCs) ως φυσικών υποστρωμάτων δυνάμει εμπλουτισμένα σε εστερικούς δεσμούς-στόχο για τις GEs. Η ανάλυση των προϊόντων απομόνωσης αλλά και των προϊόντων μετά από υδρόλυση παρουσία τόσο της *SzGE2* όσο και άλλων ημικυτταρινασών, έγινε με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed spectroscopy, FT-IR). Η καταλυτική ενεργότητα της *SzGE2* αλλά και άλλων ημικυτταρινασών έναντι του αρχικού δείγματος ελάτης αλλά και των LCCs, αποτελεί ένα βήμα προς τη διαλεύκανση του φυσικού ρόλου των GEs.

Τέλος, μεγάλο μέρος της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτέλεσαν οι κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X με πρωτεϊνικούς στόχους τόσο την *SzGE2* όσο και τη σημειακά μεταλλαγμένη S213A *SzGE2*, η οποία αποτελεί την καταλυτικά ανενεργή μορφή του ενζύμου ως προς την υδρόλυση του μεθυλεστέρα του 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA). Μετά την επιτυχή κρυστάλλωση των υπό εξέταση πρωτεϊνών, συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης ακτίνων X που οδήγησαν στην επίλυση και βελτιστοποίηση των τρισδιάστατων δομών τους σε υψηλή ευκρίνεια 1.55 Å και 1.9 Å, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, έλαβαν χώρα δομικές μελέτες πρόσδεσης συνθετικών υποστρωμάτων και κατέστη επιτυχής ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου S213A – MeGlcA σε ευκρίνεια 2.35 Å. Οι συγκεκριμένες δομές

αποτελούν τις πρώτες δομές θερμοάντοχης GE της CE-15 οικογενείας, που φέρει σημειακή μετάλλαξη σε καταλυτικό αμινοξύ ενώ αυτή του συμπλόκου S213A - MeGlcA αποτέλεσε την πρώτη δομή GE ως συμπλόκου με κάποιο ανάλογο υποστρώματος.

Οι κινητικές μελέτες, το πιθανό συνθετικό δυναμικό του ενζύμου καθώς και η υδρολυτική του δράση έναντι απομονωμένου φυσικού υποστρώματος, σκιαγραφούν έναν ελκυστικό ερευνητικό στόχο, ενώ οι πρωτεϊνικές δομές που προσδιορίστηκαν αποκάλυψαν για πρώτη φορά το «αποτύπωμα» της πρόσδεσης ενός υποστρώματος σε μια GE. Η μοριακή, δομική και καταλυτική μελέτη των GEs στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής διανοίγει νέες προοπτικές για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση αλλά και για τη βιομηχανική εκμετάλλευσή τους σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα του ημικυτταρινολυτικού συμπλέγματος.

---

## *ABSTRACT*

Plant biomass degradation by hemicellulases remains one of the prerequisites for the efficient production of the so-called second generation biofuels from fermentable sugars, while according to the European Union Community framework, biofuels should replace a minimum of 10% of the conventional fuels by 2020. To this end, thermostable enzymes, implicated in lignocellulosic materials' biocatalysis, are promising targets due to their wide range of biotechnological applications even under harsh industrial conditions during bioconversion but also in view of their low cost. Glucuronoyl Esterases, GEs, belong to a recently discovered family of Carbohydrate Esterases, the CE-15 family (CAZy database), and have been attributed the prevalent role of hydrolyzing the ester bonds between lignin alcohols and the 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid side chains of glucuronoxylan. This specific bond is considered to be one of the main bottlenecks that impair the complete dissociation of lignin from the hemicellulosic carbohydrates. As the exact function and catalytic mechanism of GEs is yet to be fully delineated, the present thesis focuses on a glucuronoyl esterase and also its mutant from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* (synonym *Sporotrichum thermophile*, *StGE2* and S213A *StGE2*, respectively) and a glucuronoyl esterase from the mesophilic microorganism *Podospira anserina* (*PaGE1*).

More specifically, the present work involved studies performed on the hydrolysis of a commercially available synthetic substrate by *StGE2* and *PaGE1*. With the aim to highlight GEs' mode of action, a novel and easy to apply protocol was developed. Besides its high biotechnological interest and broad applications, this three-level experimental procedure can also give rise to the discovery of different GEs via a wide/large-scale screening of heterologous Genomic and Metagenomic expression libraries.

Furthermore, the potential of *StGE2* to synthesize glucuronides was investigated through esterification and transesterification reactions in non

conventional systems. To evaluate its synthetic activity, the enzyme was also immobilized as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *StGE2* exhibited some indications of biocatalytic ability to synthesize glucuronic esters when free under the conditions used in the study.

With the aim to further examine the physiological role of GEs, isolation of lignin-carbohydrate complexes, LCCs followed. These hypothetically bulk compounds are suggested to constitute the “enriched in ester bonds-targets”, which are natural substrates of the enzyme. Fourier Transform InfraRed spectroscopy, FT-IR, was used for the analysis of the extracted products as well as the products after hydrolysis in the presence of not only *StGE2* but also other hemicellulases. The catalytic activity of *StGE2* and the hemicellulases studied against spruce as the raw material as well as the isolated LCCs, is a step towards the elucidation of the physiological function of GEs.

Finally, the present thesis involved extensive X-ray protein crystallography studies using *StGE2* and S213A *StGE2* mutant as macromolecular targets, with the latter being the catalytically inactive form of the enzyme with reference to the hydrolysis of the methyl 4-*O*-methyl-D-glucopyranuronate (MeGlcA). Successful crystallization followed by X-Ray diffraction data collection, led to the three-dimensional structure determination of *StGE2* and S213A at high resolution, 1.55 Å and 1.9 Å, respectively. Binding studies using synthetic substrate analogues were performed, and the crystal structure of the S213A mutant in complex with MeGlcA was determined at 2.35 Å resolution. These are the first crystal structures of a CE-15 family thermophilic GE and a catalytically inactive *StGE2* mutant in complex with a substrate analogue.

Overall, the results obtained from the kinetic studies, the possible synthetic ability as well as the catalytic activity of *StGE2* against natural substrates, make it an attractive research target of biotechnological interest. In addition, its 3D structure uncovered for the first time the fingerprint of substrate binding to a GE. In the context of the present thesis, the molecular, structural and catalytic studies of GEs broadens the scope of utilizing this enzyme in biotechnological applications as well employing it in a plethora of industrial processes in conjunction with different enzymes pertaining to the hemicellulolytic system.

*Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Μέρος*

<b>1.1</b>	<b>Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Βιοκατάλυση και θερμοσταθερότητα</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος</b> .....	<b>10</b>
1.3.1	Ημικυτταρινάσες .....	10
1.3.2	Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ημικυτταρινασών .....	12
1.3.3	Η CE15 οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών .....	13
<b>1.4</b>	<b>Αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας</b> .....	<b>19</b>
1.4.1	Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα δασικής προέλευσης – Μη κυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες .....	20
1.4.2	Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα προέλευσης κωνοφόρων ξυλωδών φυτών .....	22
1.4.2.i	Κύρια συστατικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προέλευσης κωνοφόρων ξυλωδών φυτών .....	24
1.4.2.ii	Λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα (LCCs) .....	28
1.4.2.iii	Σημασία απομόνωσης των LCCs .....	29
<b>1.5</b>	<b>Κρυσταλλογραφία ακτίνων X</b> .....	<b>32</b>
1.5.1	Ιστορική αναδρομή .....	32
1.5.2	Παρόν και μέλλον της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X .....	34
1.5.3	Εισαγωγή στον προσδιορισμό μιας τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων X .....	36
1.5.4	Πηγές ακτίνων X .....	39



1.5.5	Κρυστάλλωση πρωτεϊνικών στόχων .....	44
1.5.6	Περίθλαση ακτίνων X και προσδιορισμός της τρισδιάστατης εικόνας της πρωτεΐνης .....	49
1.5.7	Βελτιστοποίηση, έλεγχος αξιοπιστίας και ανάλυση πρωτεϊνικού μοντέλου .....	53

## *Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι*

2.1	<b>Βιοχημεία</b> .....	<b>57</b>
2.1.1	Υλικά .....	57
2.1.1.i	Ένζυμα και μικροοργανισμοί .....	57
2.1.1.ii	Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης .....	58
2.1.1.iii	Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμών – Ρυθμιστικά διαλύματα .....	60
2.1.1.iv	Συνθετικά και φυσικά υποστρώματα .....	61
2.1.1.v	Αντιδραστήρια, εμπορικά ένζυμα, τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (kit) .....	63
2.1.1.vi	Υλικά χρωματογραφίας .....	63
2.1.2	Συσκευές, όργανα και αναλώσιμα υλικά .....	64
2.1.3	Ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	66
2.1.3.i	Μετασηματισμός επιδεικτικών ΤΟΡΙΟΦ' κυττάρων <i>E. coli</i> .....	66
2.1.3.ii	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης .....	67
2.1.3.iii	Μετασηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i> .....	69
2.1.3.iv	Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασηματισμένα κύτταρα <i>P. pastoris</i> .....	70
2.1.3.v	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) .....	74
2.1.3.vi	Ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένων πρωτεϊνών .....	77
2.1.4	Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση της ενζυμικής ενεργότητας των <i>StGE2</i> και <i>PaGE1</i> .....	78
2.1.5	Σχηματισμός ενζυμικών συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών	82

2.1.5.i	Ακίνητοποίηση <i>S</i> tGE2 .....	82
2.1.5.ii	Προσδιορισμός της υδρολυτικής δράσης των <i>S</i> tGE2 CLEAs με HPLC ανάλυση .....	84
2.1.6	Διερεύνηση του συνθετικού δυναμικού της GE σε μη συμβατικά συστήματα .....	85
2.1.6.i	Διερεύνηση συνθετικής ικανότητας ακινητοποιημένης και λυοφιλοποιημένης <i>S</i> tGE2 σε συστήματα οργανικών διαλυτών απουσία νερού .....	88
2.1.6.ii	Διερεύνηση συνθετικής ικανότητας <i>S</i> tGE2 με δοκιμές εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών ουσιών .....	89
2.1.7	Ποιοτική ανάλυση προϊόντων αντιδράσεων με TLC – Απομόνωση ζώνης ενδιαφέροντος .....	91
2.1.8	Δοκιμασία απομόνωσης LCCs – Διερεύνηση της φυσιολογικής δράσης των GEs .....	94
2.1.8.i	Ανάλυση δειγμάτων μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR ...	95
2.1.8.ii	Μεθοδολογίες απομόνωσης LCCs .....	99
2.1.8.iii	Ανίχνευση ενζυμικής δράσης σε δείγματα ακατέργαστης βιομάζας σκανδιναβικής ελάτης ( <i>Picea abies</i> ) και σε εν δυνάμει LCCs .....	103
<b>2.2</b>	<b>Μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X .....</b>	<b>106</b>
2.2.1	Πρωτεϊνικοί στόχοι και υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες .....	106
2.2.2	<i>In silico</i> ανάλυση και στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών .....	107
2.2.3	Διερεύνηση της κρυστάλλωσης και βελτιστοποίηση συνθηκών ανάπτυξης κρυστάλλων .....	107
2.2.4	Ακτινοβολήση κρυστάλλων και συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X .....	110
2.2.5	Εύρεση και ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών .....	111

## *Κεφάλαιο 3: Πειραματικά Αποτελέσματα – Συμπεράσματα*

<b>3.1</b>	<b>Μελέτη της υδρόλυσης εμπορικά διαθέσιμου συνθετικού υποστρώματος από δύο GEs .....</b>	<b>114</b>
3.1.1	Ποιοτική αξιολόγηση της ενεργότητας των GEs .....	117
3.1.2	Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας των GEs μέσω HPLC ανάλυσης .....	118
3.1.3	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της απελευθέρωσης GlcA κατά την υδρόλυση του BnGlcA .....	121
3.1.4	Συμπεράσματα .....	123
<b>3.2</b>	<b>Διερεύνηση της βιοκαταλυτικής σύνθεσης εστέρων από την StGE2 σε μη συμβατικά συστήματα .....</b>	<b>124</b>
3.2.1	Σχηματισμός CLEAs StGE2 και προσδιορισμός της υδρολυτικής δράσης με HPLC ανάλυση .....	124
3.2.2	Διερεύνηση του συνθετικού δυναμικού της StGE2 σε μη συμβατικά συστήματα .....	126
3.2.3	Συμπεράσματα .....	132
<b>3.3</b>	<b>Διερεύνηση των φυσικών υποστρωμάτων της GE .....</b>	<b>133</b>
3.3.1	Διερεύνηση της φυσιολογικής ενζυμικής δράσης των GEs .....	134
3.3.2	Συμπεράσματα .....	144
<b>3.4</b>	<b>Δομικές μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X .....</b>	<b>145</b>
3.4.1	Βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχίας StGE2 .....	145
3.4.2	Ανάπτυξη κρυστάλλων StGE2 και κρυσταλλογραφικές μελέτες πρόσδεσης .....	146
3.4.2.i	Παραγωγή και απομόνωση ενζύμου .....	146
3.4.2.ii	Προσδιορισμός συνθηκών κρυστάλλωσης της StGE2 .....	148
3.4.2.iii	Πειράματα συγκρυστάλλωσης και εμφάνισης προσχηματισμένων κρυστάλλων σε διαλύματα εν δυνάμει προσδετών .....	149
3.4.3	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων StGE2 .....	151

3.4.4	Τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή <i>StGE2</i> .....	154
3.4.4.i	Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομής .....	154
3.4.4.ii	Βιοπληροφορική ανάλυση της <i>StGE2</i> με βάση την πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή δομή .....	158
3.4.4.iii	<i>Δομικά χαρακτηριστικά της StGE2</i> .....	160
3.4.4.iv	Σύγκριση της τριδιάστατης δομής της <i>StGE2</i> με τη δομικά ομόλογη <i>Cip2_GE</i> .....	166
3.4.4.v	Σύγκριση της θερμοφίλης <i>StGE2</i> με τη μεσόφιλη <i>Cip2_GE</i> - Διερεύνηση ενδείξεων θερμοσταθερότητας που απορρέουν από τη δομή .....	168
3.4.5	Ανάπτυξη κρυστάλλων <i>S213A StGE2</i> και δομικές μελέτες πρόσδεσης .	169
3.4.6	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων μονοκρυστάλλου <i>S213A</i> και κρυστάλλου εμβαπτισμένου σε διάλυμα αναλόγου υποστρώματος .....	171
3.4.7	Οι τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές των <i>S213A</i> και συμπλόκου <i>S213A</i> - ανάλογο υποστρώματος .....	174
3.4.7.i	Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομών .....	174
3.4.7.ii	Ανάλυση των τρισδιάστατων δομών <i>S213A</i> και συμπλόκου <i>S213A</i> - <i>MCU</i> .....	178
3.4.7.iii	Το καταλυτικό κέντρο της <i>StGE2</i> .....	180
3.4.8	Συμπεράσματα και μελλοντικές βλέψεις .....	192
	<b><i>Βιβλιογραφία</i></b> .....	<b>194</b>

---

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## Θεωρητικό Μέρος

### 1.1 Εισαγωγή

Ο δυσμενής περιβαλλοντικός αντίκτυπος της ανθρώπινης δραστηριότητας στον πλανήτη δεν αποτελεί πλέον αμφισβητήσιμο δεδομένο. Η κλιματική αλλαγή, η εξάντληση των διαθέσιμων φυσικών πόρων και η αύξηση του υπερπληθυσμού μεταφράζονται, στις μέρες μας, σε εθνικές στρατηγικές αντιμετώπισης των προκλήσεων μέσω της υιοθέτησης ενός μοντέλου αειφόρου ανάπτυξης. Πρόσφατα, οι ηγέτες των επτά πιο αναπτυγμένων χωρών δεσμεύτηκαν για τη μείωση των εκπομπών άνθρακα, την κατάργηση των ορυκτών καυσίμων έως το τέλος του αιώνα και την εφαρμογή καινοτόμων τεχνολογιών με στόχο την μεταμόρφωση των ενεργειακών κλάδων έως το 2050.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, η Βιοτεχνολογία κατέχει έναν από τους κεντρικούς ρόλους ως όχημα για την αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, τη δημιουργία βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων, τη μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο και την προαγωγή οικολογικών αλλά ανταγωνιστικών βιομηχανικών δραστηριοτήτων. Ο όρος βιοτεχνολογία περιλαμβάνει το σύνολο τεχνολογιών που βασίζονται σε κυτταρικές και βιομοριακές διεργασίες για την παραγωγή νέων ιατρικών και φαρμακευτικών («κόκκινη» βιοτεχνολογία), αγροτικών (κυρίως εισαγωγή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στη γεωργία, «πράσινη» βιοτεχνολογία) και βιομηχανικών («λευκή» βιοτεχνολογία) προϊόντων [BIO, 2008]. Ειδικότερα, η βιομηχανική βιοτεχνολογία («λευκή» βιοτεχνολογία ή «τρίτο κύμα» βιοτεχνολογίας) έχει ως σημείο αναφοράς τη χρήση βιοκαταλυτών (ενζύμων ή μικροοργανισμών) με στόχο την αποικοδόμηση της βιομάζας προς ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα ή ενέργεια αποτελεσματικά και με μειωμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις κατά τις διεργασίες βιομετατροπής [BIO, 2008].

Ωστόσο, ενώ ένας μεγάλος αριθμός εμπορικών ενζύμων είναι διαθέσιμα πλέον τόσο στον ακαδημαϊκό χώρο όσο και στη βιομηχανία, οι απαιτήσεις για καινοτόμα και πιο αποτελεσματικά ένζυμα παραμένουν υψηλές. Η αυξανόμενη εισροή των πληροφοριών από το χώρο της γονιδιωματικής και της βιολογίας έχει διευρύνει το βιοτεχνολογικό πεδίο της προσαρμογής των ενζυμικών ιδιοτήτων ώστε να ενισχύεται το προφίλ του εύρους των εφαρμογών και αποδοτικότητάς τους. Τα συνήθη εργαλεία πρωτεϊνικού σχεδιασμού όπως η ανάλυση με βάση την τρισδιάστατη δομή και οι σημειακές μεταλλάξεις, έχουν εμπλουτιστεί περιλαμβάνοντας πλέον στοχευμένες μεταλλάξεις περιοχών (regio targeted mutagenesis), επιλογή αμινοξικών καταλοίπων βάσει της ομολογίας, *in vivo* ή *in vitro* ανασυνδυασμό γονιδίων και κλωνοποίηση, εισάγοντας πληθώρα παραλλαγών σε γνωστές πρωτεΐνες [Christakopoulos & Topakas, 2012]. Οι παρούσες και δυνητικές εξελίξεις στο πεδίο της βιοκατάλυσης ανοίγουν νέους δρόμους στη βιομηχανική βιοτεχνολογία για τη δημιουργία νέων χημικών προϊόντων. Εταιρείες όπως οι Dyadic, Novozymes, DSM, Verenium, Metabolix και Cargill, είναι σε συνεχή αναζήτηση φυσικών βιοκαταλυτών με στόχο την ταυτοποίηση και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους μέσω συστημάτων σάρωσης, γενετικής μηχανικής καθώς και άλλων διαδικασιών υψηλής τεχνολογίας ώστε να προχωρήσουν στη μεγάλης κλίμακας παραγωγή τους [BIO, 2008].

Σημαντική κινητήριος δύναμη για τη βιομηχανία είναι η ανάγκη να αντικατασταθούν οι περιορισμένες ορυκτές πρώτες ύλες από υλικά βασισμένα σε σάκχαρα, έλαια και λίπη για την παραγωγή βιοκαυσίμων [Woodley, 2013]. Η μετάβαση στην παραγωγή καυσίμων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες εξελίσσεται με ταχείς ρυθμούς καθώς λαμβάνει μεγάλη χρηματοδότηση σε παγκόσμιο επίπεδο και τίθενται σε εφαρμογή υποχρεωτικοί οικολογικοί στόχοι [DSM position on White Biotechnology]. Η παραγωγή βιοαιθανόλης από καλλιέργειες αραβοσίτου, βιοαερίου (μεθάνιο) από οργανικά υπολείμματα, βιοντίζελ (μεθυλεστέρες των ανώτερων λιπαρών οξέων) από φυτικά ή ζωικά λίπη μέσω ενζυμικών διεργασιών βιομετατροπής και ζυμώσεων γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη στο βιοενεργειακό επίπεδο καθώς εξαλείφονται προβλήματα που ενέχουν οι χημικές διεργασίες. Παράλληλα, καλύπτονται οι ανάγκες για «πράσινη» βιομηχανική δραστηριότητα καθώς η παραγωγή αποβλήτων και η

ενεργειακή κατανάλωση ελαχιστοποιούνται [Narodoslawsky, 2013]. Μια «καθαρή» παραγωγή κάτω από ήπιες συνθήκες με μειωμένη κατανάλωση νερού, ενέργειας και διαλυτών σε ποσοστό έως 50% καταλήγει σε χαμηλές εκπομπές αποβλήτων και ρύπων (CO<sub>2</sub>).



Τα οφέλη της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας αντικατοπτρίζονται σε μια οικονομία βασισμένη σε βιοδιεργασίες οι οποίες δύνανται να αντικαταστήσουν κοστοβόρες πρακτικές πολλών σταδίων με απλούστερα συνθετικά βήματα και μικρό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Για το λόγο αυτό, το μεγαλύτερο κέρδος σε επίπεδο αγοράς σημειώνεται σε χημικά προϊόντα υψηλής ποιότητας (16 έως 60%) όπου έχουν απλοποιηθεί τα μονοπάτια παραγωγής πληρώντας προδιαγραφές ανταγωνιστικότητας και βιωσιμότητας.

Δευτερευόντως, σημαντικά ποσοστά όγκου πωλήσεων καταγράφονται για εξειδικευμένα ή υψηλής προστιθέμενης αξίας χημικά και πολυμερή (2 έως 20%) [Hirche, 2006]. Συνεπώς, το συνολικό αποτέλεσμα περιλαμβάνει μια πιο ισορροπημένη ενεργειακά εξέλιξη, συνυφασμένη με αγροτική και οικονομική ανάπτυξη, χημικά πιο φιλικά προς το περιβάλλον, καθώς και βιώσιμες λύσεις για τους τομείς της ενέργειας και της μεταφοράς. Η Λευκή Βιοτεχνολογία αποτελεί μία από τις ελάχιστες τεχνολογίες που η οικονομία και η οικολογία συμβαδίζουν [DSM position on White Biotechnology].



## 1.2 Βιοκατάλυση και θερμοσταθερότητα

Η πλήρης αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας με τη χρήση βιοκαταλυτών παραμένει μεγάλη ερευνητική πρόκληση για την αποδοτική παραγωγή βιοκαυσίμων που βασίζεται σε ένζυμα που υδρολύουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες προς ζυμώσιμα σάκχαρα [Berka *et al.*, 2011, Gool *et al.*, 2012]. Λόγω των έντονων βιομηχανικών διεργασιών οι οποίες περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, όξινα ή αλκαλικά pH και οξειδωτικές συνθήκες, απαιτούνται ένζυμα ανθεκτικά σε αυτές τις συνθήκες. Ένα από τα προαπαιτούμενα για τη βιομηχανική αξιοποίηση ενός ενζύμου είναι η θερμοανθεκτικότητα (διατήρηση καταλυτικής δράσης σε υψηλές θερμοκρασίες) ή/και η θερμοσταθερότητα (ικανότητα να ανθίστανται στη μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση αλλά να διατηρούν τη δράση τους τουλάχιστον στους 60°C για μεγάλο χρονικό διάστημα) [Vieille *et al.*, 1996, Vieille & Zeikus, 2001].

Οι θερμοφίλοι μικροοργανισμοί που επιδεικνύουν βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες άνω των 45°C αποτελούν ελκυστικές φυσικές πηγές θερμοσταθερών ενζύμων με δυνατότητες βιομηχανικών εφαρμογών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση με βέλτιστη θερμοκρασία κατάλυσης τους 72 °C η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τεχνικές μοριακής βιολογίας, απομονώθηκε από υπερθερμόφιλους και εξτρεμόφιλους μικροοργανισμούς (με βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης πάνω από τους 80 °C και τους 60 °C, αντίστοιχα) [Glazer & Nikaido, 2007, Haki & Rakshit, 2003]. Εν γένει, οι υψηλότερες καταλυτικές δράσεις των θερμοσταθερών ενζύμων καταγράφονται στο εύρος των θερμοκρασιών βέλτιστης ανάπτυξης των οργανισμών από τους οποίους προέρχονται [Vieille & Zeikus, 2001]. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα που διαθέτουν τα συγκεκριμένα ένζυμα σε σχέση με τα αντίστοιχα μεσόφιλα είναι η αντοχή τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις υποστρώματος χωρίς απώλεια της καταλυτικής τους αποτελεσματικότητας. Παράλληλα, οι υπάρχουσες ενζυμικές υδρολυτικές τεχνολογίες που λαμβάνουν χώρα στους 65°C χαρακτηρίζονται από χαμηλές ταχύτητες και μικρές αποδόσεις σακχάρων, απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενζύμων και είναι επιρρεπείς σε ζητήματα μικροβιακής μόλυνσης, περιορισμοί

που δύνανται να ξεπεραστούν με τη χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τη βιομετατροπή [Yeoman *et al.*, 2010, Viikari *et al.*, 2007]. Επιπλέον, η δυνατότητα χρήσης μεθόδων σε αυξημένες θερμοκρασίες έχει αξιοσημείωτη επιρροή στη βιοδιαθεσιμότητα και διαλυτότητα οργανικών ενώσεων προσφέροντας αποτελεσματική βιοαποκατάσταση [Becker, 2007]. Τέλος, η αξία των συγκεκριμένων διεργασιών ανάγεται και στις υψηλότερες ταχύτητες αντίδρασης και αποδόσεις λόγω μείωσης του ιξώδους και αύξησης του συντελεστή διάχυσης των υποστρωμάτων αλλά και των προϊόντων, ενώ για τις ενδόθερμες αντιδράσεις επιτυγχάνεται επιθυμητή μετατόπιση της ισορροπίας [Krahe *et al.*, 1996].

Μεταξύ των μικροοργανισμών που διαθέτουν τα επιθυμητά ένζυμα για τη βιομετατροπή της βιομάζας, ξεχωρίζουν νηματοειδείς μύκητες του γένους *Trichoderma*, *Aspergillus* και *Penicillium*, με τους δύο πρώτους να αποτελούν μεσόφιλους οργανισμούς. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα θερμοσταθερά ένζυμα σήμερα που απαντώνται στη βιομηχανία είναι οι αμυλάσες [Grab & Mitchinson, 1997, Sarikaya *et al.*, 2000] πολλές καινοτόμες εφαρμογές των οποίων βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Στη βιομηχανία τροφίμων, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται στη σύνθεση αμινοξέων [Satosi *et al.*, 2001], ενώ σε βιομηχανίες όπως αυτές πετρελαίου και χαρτιού για την απομάκρυνση επιμολύνσεων θείου κατά τη βιοαποικοδόμηση [Bahrami *et al.*, 2001] αλλά και για την αντικατάσταση χημικών αντιδρώντων με μη τοξικά παράγωγα [Wittlich *et al.*, 2001].

Ο *Myceliophthora thermophila* (γνωστός και ως *Sporotrichum thermophile*) είναι ένας θερμόφιλος μύκητας γνωστός για την παραγωγή μιας σειράς θερμοσταθερών ενζύμων (Πίνακας 1.1.1) που μπορούν να αξιοποιηθούν σε ποικίλες βιομηχανικές βιοδιεργασίες [Berka *et al.*, 2011, Johri *et al.*, 1999, Singh & Satyanarayana, 2006]. Το σύνολο των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το μύκητα *M. thermophila* έχει προβλεφθεί ότι περιλαμβάνει 683 πρωτεΐνες από τις οποίες 569 είναι ομόλογες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν σε 180 ένζυμα που ταξινομούνται στη βάση δεδομένων ενζύμων ενεργών ως προς υδατάνθρακες CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes, <http://www.cazy.org/>), ωστόσο πέραν αυτών το γονιδίωμα του μικροοργανισμού κωδικοποιεί

υδρολυτικά και οξειδωτικά ένζυμα ώστε να έχει δράση και σε μη υδατανθρακικά υποστρώματα [Berka *et al.*, 2011].

Πιο αναλυτικά, ο *M. thermophila* εκκρίνει μια εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (*Sporotrichum thermophile* Glucuronoyl Esterase) *StGE1* η οποία απομονώθηκε από τους Vafiadi *et al.*, 2009, και φέρεται να υδρολύει τον εστερικούς δεσμούς μεταξύ της γλυκουρονοξυλάνης και της λιγνίνης στη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα (§1.3.3). Επίσης, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί δύο τύποι εστερασών του φερουλικού οξέος *StFAE-A* [Torakas *et al.*, 2004] και *StFAE-C* [Torakas *et al.*, 2005] που καταλύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ του διμερούς του φερουλικού οξέος και της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης. Εξ αυτών, η *StFAE-C* βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να μεταφέρει μόρια φερουλικού οξέος σε μονάδες D-αραβινόζης, μετατρέποντάς την σε φερουλοποιημένο παράγωγο, το οποίο δρα ως αντιμικροβιακός παράγοντας για το *Mycobacterium bovis* [Vafiadi *et al.*, 2007].

Ακόμη, από το μύκητα απομονώθηκε μια πολυγαλακτουρονάση PGase με ενεργότητα πηκτινάσης, που υδρολύει πολύπλοκους πολυσακχαρίτες αποτελούμενους κυρίως από D-γαλακτουρονικό οξύ [Kaur *et al.*, 2004], μια ενδοξυλανάση της οικογένειας γλυκοζιδικών υδρολασών 11 [Vardakou *et al.*, 2003], μια ενδογλουκανάση της οικογένειας γλυκοζιδικών υδρολασών 7 [Karnaouri *et al.*, 2014] και β-γλυκοσιδάσες [Canevascini & Meyer, 1979, Meyer & Canevascini, 1981, Gaikwad & Maheshwari, 1994, Karnaouri *et al.*, 2013]. Η δράση τους ίσως εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος αλλά και στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης σε συνεργασία με άλλα κυτταροπλασματικά ένζυμα [Bharadwaj & Maheshwari, 1999].

Επιπρόσθετα, μια οξειδοαναγωγή, η πολυσακχαρολυτική μονοοξυγενάση (*StCel61a*, LPMO) [Dimarogona *et al.*, 2012] που διαφαίνεται να καταλύει άμεσα τη διάσπαση των γλυκοζιδικών δεσμών της κυτταρίνης εκθέτοντας την στη δράση των κυτταρινασών χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα ιόν μετάλλου ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Παράλληλα, μία αφυδρογονάση της κελλοβιόζης, η CDHst του *M. thermophila* αποτελεί ένα εξωκυτταρικό φλαβοένζυμο με δράση οξείδωσης της κελλοβιόζης προς λακτόνη ενώ μέσω της δυνατότητάς του να μεταφέρει ηλεκτρόνια, χρησιμοποιείται ως αμπερομετρικός βιοαισθητήρας για δοκιμές

ανίχνευσης του υποστρώματος και του προϊόντος [Subramaniam *et al.*, 1999]. Η φυτάση (φωσφοϋδρολάση της εξαφωσφορικής μυοϊνοσιτόλης) HAP-phytase που παράγεται από τον *M. thermophila*, υδρολύει το φυτικό οξύ που αποτελεί την κύρια μορφή αποθήκευσης φωσφόρου στα φυτά και το έδαφος ώστε να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές αποκατάστασης άγονων εδαφών στην προώθηση ανάπτυξης φυτικών στελεχών [Singh & Satyanarayana, 2010].

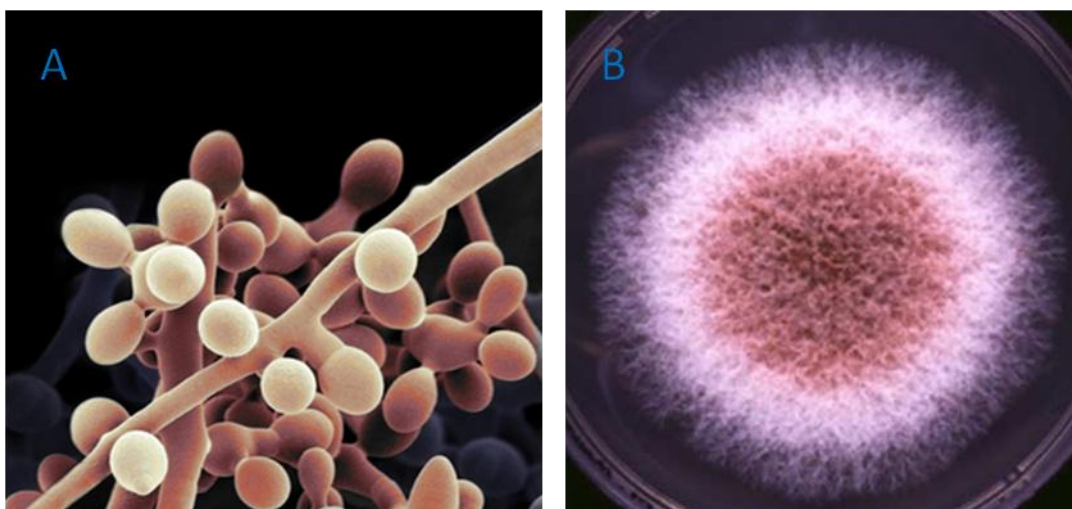
Τέλος, οι λακκάσες που εκκρίνονται από το μύκητα με οξειδωτική δράση σε φαινολικές ενώσεις με επακόλουθη αναγωγή του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O, έχουν βιομηχανική εφαρμογή ως βιοϋποκατάστατα επιβλαβών χημικών (βιομηχανία χάρτου, βαφών υφασμάτων) [Berka *et al.* 1997]. Ακόμη χρησιμοποιούνται για την οικολογική αποκατάσταση εδαφών, της ικανότητάς τους να αποικοδομούν ελαστικό καθώς και για τον πολυμερισμό της λιγνίνης από υπολείμματα της βιομετατροπής της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας [Rodríguez *et al.*, 2006, Gouveia *et al.*, 2013].

**Πίνακας 1.1.1** Ένζυμα και ιδιότητες που παράγονται από το μικροοργανισμό *Myceliophthora thermophila*

Ένζυμα	M.B. (kDa)	pH <sub>opt</sub>	T <sub>opt</sub> (°C)	Αναφορά
α-Γαλακτοσιδάση	60	5.0	60	Dotsenko <i>et al.</i> (2012)
β-Γλυκοζιδάση	-	5.4	65	Bhat <i>et al.</i> (1993)
β-Γλυκοζιδάση	90	5.0	70	Karnaouri <i>et al.</i> (2013)
Αφυδρογονάση της κελλοβιόζης I	91	-	-	Canevascini <i>et al.</i> (1991)
Αφυδρογονάση της κελλοβιόζης II	192	-	-	Canevascini <i>et al.</i> (1991)
Ενδογλουκανάση	65	5.0	60	Karnaouri <i>et al.</i> (2014)
Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος (φυσικός τύπος)	58	6.0	60	Vafiadi <i>et al.</i> (2009)
Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος	-	7.0	55	Topakas <i>et al.</i> (2010)
Εστεράση του φερουλικού οξέος	57	6.0	60	Topakas <i>et al.</i> (2004)
Πολυγαλακτουρονάση	48	5.0	25	Beeson <i>et al.</i> (2011)
Πολυσακχαρολυτική μονοοξυγενάση	81	8.0	65	Dimarogona <i>et al.</i> (2012)
Πηκτινάση	-	7.0	55	Kaur <i>et al.</i> (2004)
Φυτάσες	90	5.0	60	Singh & Satyanarayana (2009)
Λακκάση	85	6.5	60	Berka <i>et al.</i> (1997)

β-Μαννοσιδάση	97	5.3	40	Dotsenko <i>et al.</i> (2012)
β-Μαννανάση	48	5.2	69	Dotsenko <i>et al.</i> (2012)
Ξυλανάση	-	7.0	50	Sadaf & Khare (2014)

Εκτός από θερμοσταθερά ένζυμα ο *M. thermophila* παράγει πλήθος βιομορίων ενδιαφέροντος ανάμεσα στα οποία ξεχωρίζουν οι αντιμικροβιακών ιδιοτήτων ξυλο-ολιγοσακχαρίτες [Christakopoulos *et al.*, 2003] και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες [Katarodis *et al.*, 2004]. Όσον αφορά στους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες 1-κεστόζη, 2-κεστόζη και νεοκεστόζη που απομονώθηκαν από κύτταρα του μικροοργανισμού, μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων [Kim *et al.*, 2000] προσφέροντας ωφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα, με την πλήρη διάσπασή τους από τα πεπτικά ένζυμα δεν αποδίδουν θερμιδική αξία και είναι κατάλληλες για άτομα που πάσχουν από διαβήτη [Yun, 1996], αλλά και για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων [Rivello-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001].



**Εικόνα 1.1** Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Myceliophthora thermophila* όπου διακρίνονται Α) νεαροί και ώριμοι κωνidioφορείς (Πηγή εικόνας: Ronald de Vries, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center) Β) υφές που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο (Πηγή εικόνας: <http://www.gefor.4t.com/hongos/myceliophthorathermophila.html>).

Ο μικροοργανισμός αυξάνεται με το βέλτιστο ρυθμό σε θερμοκρασίες 35 - 48 °C ανάλογα με το υπόστρωμα, μπορεί όμως να καλλιεργηθεί σε θερμοκρασίες 25 - 55 °C ενώ εμφανίζει ανθεκτικότητα σε σύντομη έκθεση στους 59 °C [Bhat &

Maheshwari, 1987]. Ο ρυθμός ανάπτυξης που εμφανίζει ο *M. thermophila* σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης είναι παρόμοιος με εκείνον που παρατηρείται όταν ο αυξάνεται σε υπόστρωμα κυτταρίνης ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί ως ισχυρός κυτταρινολυτικός οργανισμός [Maheshwari *et al.*, 2000], ενώ οι αποικίες έχουν διαφορετική μορφολογία ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται (Εικόνα 1.1). Ο θερμόφιλος αυτός μύκητας απομονώθηκε από το έδαφος και από βιομάζα λαχανικών [Domsch *et al.*, 1993, Singh & Satyanarayana, 2006, 2008] και παράλληλα είναι αποτελεσματικός στην αποικοδόμηση ξύλου και άλλων κυτταρικών ουσιών με πιο γρήγορο ρυθμό από άλλους θερμόφιλους και μεσόφιλους μύκητες [Berka *et al.*, 2011, Domsch *et al.*, 1993, Maheshwari *et al.*, 2000].

Συμπερασματικά, ο μύκητας *M. thermophila* είναι εύκολα απομονώσιμος από δείγματα εδάφους αφού απαντάται σε άφθονες ποσότητες, αυξάνεται εύκολα με χρήση φθηνών θρεπτικών υλικών (υγρών ή στερεών) και είναι ακίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία (εξαιρέσεις παρατηρούνται μόνο σε περιπτώσεις ανοσοκαταστολής). Αξιοσημείωτη είναι η ποικιλία θερμοσταθερών ενζύμων που εκκρίνει με βιοτεχνολογικές εφαρμογές ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα μελέτης. Ο πρόσφατος χαρακτηρισμός του γονιδιώματός του [Berka *et al.*, 2011] αποτελεί ένα πρόσθετο έναυσμα για τη διερεύνηση του κυτταρινολυτικού του συστήματος. Τέλος, τα χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα που προσφέρει στα οποία συγκαταλέγονται η υψηλή ικανότητα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε υψηλές θερμοκρασίες και η χρήση θερμοσταθερών ενζύμων τον καθιστά ελκυστικό εργαλείο για αξιοποίηση σε διεργασίες βιομετατροπής της βιομάζας δυνητικά σε βιομηχανική κλίμακα.

## 1.3 Εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος

### 1.3.1 Ημικυτταρινάσες

Οι ημικυτταρινάσες αποτελούν ένα σύνολο ενζύμων που επιδεικνύει αξιοσημείωτη ποικιλία και αφορούν στην υδρόλυση των συστατικών της ημικυτταρίνης, ενός από τους πιο απαντώμενους πολυσακχαρίτες στη φύση, μετά την κυτταρίνη, αποτελώντας περίπου το 20-35% της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας [Saha, 2003]. Τα συγκεκριμένα ένζυμα διαδραματίζουν νευραλγικό ρόλο στην αποτελεσματική αξιοποίηση της φυτικής βιομάζας και του κύκλου του άνθρακα. Τα υποστρώματα των ημικυτταρινασών, οι ημικυτταρίνες, είναι η συνισταμένη ενός ετερογενούς συνόλου πολυσακχαριτών είτε διακλαδισμένων είτε ευθείας διάταξης οι οποίοι σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης του κυτταρικού τοιχώματος σχηματίζοντας ένα συμπαγές δίκτυο. Παράλληλα, ενώνονται ομοιοπολικά με τη λιγνίνη στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα ώστε μαζί με την κυτταρίνη να προκύπτει μια εξαιρετικά πολύπλοκη δομή [Shallom & Shoham, 2003]. Ωστόσο, η ακριβής συνεισφορά της ημικυτταρίνης στην αντίσταση που εμφανίζει η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα προς την πλήρη αποικοδόμησή της παραμένει να αποσαφηνιστεί καθώς έχει προταθεί η σημαντική συμμετοχή τους στο συγκεκριμένο φαινόμενο ειδικά στην περίπτωση πρώτων υλών προερχόμενων από φυλλοβόλα δέντρα (hardwood) (~20% περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη) [Vega-Sanchez & Ronald, 2010].

Η μεταβλητή σύσταση της οργάνωσης της ημικυτταρίνης απαιτεί τη συντονισμένη δράση πολλών ενζύμων ενώ η διεργασία αυτή συχνά λαμβάνει χώρα με αργούς ρυθμούς λόγω της δομής του κυτταρικού τοιχώματος που δε διαλυτοποιείται καθώς και της περιορισμένης διαθεσιμότητας των αποδοτικών κυτταρινολυτικών και ημικυτταρινολυτικών μικροοργανισμών. Δεδομένου ότι μεγάλο μέρος του ετεροπολυμερούς είναι είτε αδιάλυτο είτε στενά συνδεδεμένο με το αδιάλυτο πλέγμα κυτταρίνης, πολλές από τις ημικυτταρινάσες αποτελούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες και εκτός από τα ενεργά κέντρα διαθέτουν άλλες λειτουργικές περιοχές όπως οι δομές πρόσδεσης στην κυτταρίνη (carbohydrate-binding modules, CBMs) και οι αγκυρίνες. Οι πρώτες διευκολύνουν τη στόχευση των ενζύμων στους αδιάλυτους πολυσακχαρίτες ενώ οι δεύτερες μεσολαβούν



στην πρόσδεση των καταλυτικών περιοχών μέσω αλληλεπιδράσεων συνδετικής-αγκυρίνης [de Vries & Visser, 2001]. Οι καταλυτικές περιοχές των ημικυτταρινασών ταξινομούνται είτε στην οικογένεια των γλυκοσιδικών υδρολασών (GHs) είτε των υδατανθρακικών εστερασών (CEs) ανάλογα με την υδρόλυση είτε γλυκοσιδικών δεσμών είτε εστερικών δεσμών πλευρικών ομάδων οξικών εστέρων ή φερουλικού οξέος, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων CAZy, μπορούν να καταταχθούν σε οικογένειες σύμφωνα με την ομολογία της πρωτοταγούς δομής με την υπόδειξη αριθμών (όπως CE1 για την οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών 1), ενώ στις περιπτώσεις οικογενειών που διακρίνονται από παρόμοια αναδίπλωση (fold) μπορεί να γίνει περαιτέρω ομαδοποίηση σε υποκατηγορίες με χαρακτηριστικό γράμμα του αλφαβήτου (όπως GH-A) [Shallom & Shoaham, 2003].

Πιο αναλυτικά, τα ένζυμα που υδρολύουν την ημικυτταρίνη περιλαμβάνουν ξυλανάσες, αραβινοφουρανοσιδάσες, γλυκουρονιδάσες, ακετυλοεστεράσες και εστεράσες του φερουλικού οξέος [Duff & Murray, 1996]. Όσον αφορά στις ξυλανάσες, η ενεργότητά τους εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας του υποστρώματος εμφανίζοντας μείωση ενεργότητας με την αντίστοιχη μείωση του μήκους αλυσίδας. Κύριο ρόλο στη βιοαποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης κατέχουν οι ενδοξυλανάσες, διασπώντας τη σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν με τη σειρά τους να αποικοδομηθούν περαιτέρω σε ξυλόζη από τις β-ξυλοσιδάσες. Οι β-ξυλοσιδάσες με τη σειρά τους, υδρολύουν ξυλοολιγοσακχαρίτες από το μη αναγωγικό άκρο τους, απελευθερώνοντας μόρια D-ξυλόζης και το υπόστρωμα στο οποίο εμφανίζουν τη μέγιστη ενεργότητα είναι η ξυλοβιόζη ενώ η συγγενειά τους για τους ξυλοολιγοσακχαρίτες είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού πολυμερισμού τους. Στη συνέχεια, η β-ξυλοζιδάση υδρολύει τα ολιγομερή β-D-ξυλοπυρανοζιδίου που προκύπτουν από τη διάσπαση της ξυλάνης τα οποία θα δρούσαν παρεμποδιστικά στην περαιτέρω διάσπαση από την ενδοξυλανάση [Andrade *et al.*, 2004, Zanoelo *et al.*, 2004].

Σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της ξυλάνης διαδραματίζουν επίσης ένζυμα όπως η εστεράση της ακετυλοξυλάνης, η οποία αφαιρεί τις ακετυλοομάδες από τους C-2 και 3 των καταλοίπων β-D-ξυλοπυρανόζης της ακετυλο-

ξυλάνης, οι αραβινοφουρανοζιδάσες, οι οποίες διασπούν τις διακλαδισμένες και γραμμικές αραβινάνες, [Kaneko *et al.*, 2000, de Vries *et al.*, 2000] καθώς και η α-γλυκουρονιδάση, η οποία διασπά τους α-(1,2) δεσμούς μεταξύ των μονάδων γλυκουρονικού οξέος και των β-D-ξυλοπυρανοζών της κύριας αλυσίδας των γλυκουρονοξυλανών. Εξάλλου, οι εστεράσες του φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος συνεισφέρουν με την υδρόλυση των εστερικών δεσμών μεταξύ υδροξυκινναμικών οξέων (φερουλικό ή π-κουμαρικό οξύ) ή διϋδρο-διμερών μορφών του φερουλικού οξέος και των κύριων πολυμερών αλυσίδων της ξυλάνης [Polizeli *et al.*, 2005].

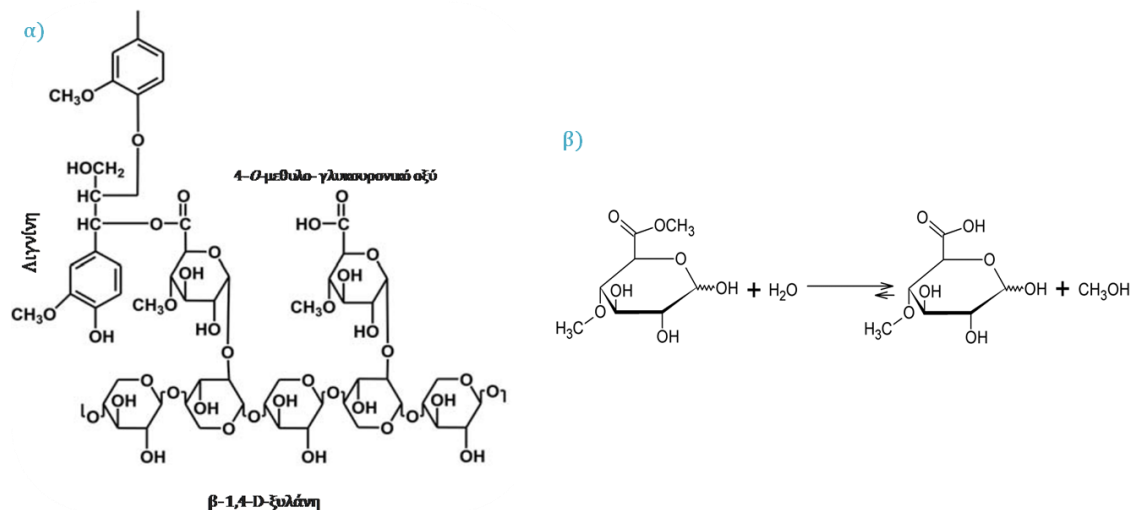
### 1.3.2 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ημικυτταρινασών

Η χρήση ημικυτταρινασών βρίσκει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανικές διεργασίες και η πιο απαιτητική από αυτές είναι η ανάπτυξη μιας μη κοστοβόρου μεθοδολογίας για τη διαλυτοποίηση της λιγνινοκυτταρίνης ως ανανεώσιμη ενεργειακή πηγή άνθρακα [Mielenz, 2001, Galbe & Zacchi, 2002]. Οι ημικυτταρινάσες χρησιμοποιούνται συνηθέστερα στη βελτίωση των ζωοτροφών, στη βιομηχανία χαρτοπολτού και άρτου και ειδικότερα οι γλυκοζιδάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ενζυμικές διεργασίες σύνθεσης ολιγοσακχαριτών. Πιο συγκεκριμένα, υψηλές αποδόσεις ποικιλίας ολιγοσακχαριτών μπορούν να επιτευχθούν με γλυκοζιδάσες όπου το πυρηνόφιλο αμινοξύ έχει αντικατασταθεί ώστε παρουσία ενεργοποιημένων δοτών γλυκόζης να λαμβάνει χώρα η σύνθεση ενώ ταυτόχρονα δεν διασπώνται τα προϊόντα της αντιδρασης [Shallom & Shoham, 2003]. Εξάλλου, η συνεργιστική δράση ποικίλων ημικυτταρινασών διευκολύνει την πρόσβαση στους κύριους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, για την αποτελεσματικότερη αποικοδόμησή τους μειώνοντας τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις των πλευρικών αλυσίδων και των ποικίλης φύσης υποκαταστατών. Έτσι, με τη δράση της εστεράσης της ακετυλοξυλάνης στην ξυλάνη, απομακρύνονται οι ακετυλομάδες που δρουν παρεμποδιστικά στη δράση της ενδοξυλανάσης. Αντίστοιχα, μικρά ακετυλιωμένα πολυμερή, που παράγονται από την ενδοξυλανάση, αποτελούν υπόστρωμα για τις εστεράσες. Πολύπλοκα υποστρώματα, όπως το πίτυρο σίτου το οποίο περιέχει μεγάλες

ποσότητες αραβινοξυλάνης, δεν διασπώνται εύκολα από τις ενδοξυλανάσες, χωρίς να προηγηθεί πέψη με α-αραβινοφουρανοσιδάση. Τέτοια ένζυμα, σε συνεργασία με τις ενδοξυλανάσες ενισχύουν τον αποπολυμερισμό της αραβινοξυλάνης. Συνεπώς, ο ιδανικός μικροοργανισμός προς βιοτεχνολογική αξιοποίηση, θα ήταν αυτός που θα έχει την ικανότητα να παράγει επαρκείς ποσότητες από όλα τα ένζυμα του ημικυτταρινολυτικού συμπλέγματος [Polizeli *et al.*, 2005].

### 1.3.3 Η CE15 οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών

Οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος (Glucuronoyl Esterases, GEs) αποτελούν μια κατηγορία ημικυτταρινασών πρόσφατα ανακαλυφθείσα στον μύκητα αποικοδόμησης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών δασικής προέλευσης *Schizophyllum commune*. Ο χαρακτηρισμός του ενζύμου έγινε βάσει της εκλεκτικής υδρόλυσης μεθυλεστέρων του 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος δεσμευμένων γλυκοσιδικά ή ελεύθερων ως συνθετικά ανάλογα (Σχήμα 1.3.1). Για το λόγο αυτό, εικάζεται ότι διαδραματίζει αξιοσημείωτο ρόλο στην αποικοδόμηση της βιομάζας αφού φαίνεται να διαχωρίζει τη λιγνίνη από την ημικυτταρίνη μέσω της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού μεταξύ καταλοίπων των ξυλανών και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.3.1.α) [Šráníková & Biely, 2006]. Η πρωτοταγής δομή της γλυκουρονικής εστεράσης από το μύκητα *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) περιγράφηκε από τους Li *et al.*, 2007 και η βιοπληροφορική αναζήτηση ομόλογων γονιδίων σε πληθώρα μυκήτων και βακτηρίων οδήγησε στη δημιουργία της νέας οικογένειας υδατανθρακικών εστερασών CE15 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων ενζύμων ενεργών ως προς υδατάνθρακες (Carbohydrate Active enZymes, CAZy, <http://www.cazy.org/> [Cantarel *et al.*, 2009]).



**Σχήμα 1.3.1** α) Αντιπροσωπευτική δομή πιθανού φυσικού υποστρώματος των γλυκουρονικών εστερασών β) Συνθετικό ανάλογο υποστρώματος ελεύθερου μεθυλεστέρα του 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος [Šrámíková & Biely, 2006].

Μέχρι σήμερα, η CE15 οικογένεια διαθέτει πάνω από 100 μέλη εκ των οποίων μόνο οκτώ έχουν χαρακτηριστεί (Πίνακας 1.3.1) ενώ δύο από αυτές έχουν κρυσταλλωθεί και οι τρισδιάστατες δομές τους έχουν λυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Κεφάλαιο 3.4 [Pokkuluri *et al.* 2011, Charangi *et al.* 2013]). Οι GEs που έχουν μελετηθεί, πέραν της αρχικής από τον μύκητα *S. commune*, περιλαμβάνουν δύο κλωνοποιημένες εστεράσες του βασιδιομύκητα *Phanerochaete chrysosporium* [Duranová *et al.*, 2009a], την καταλυτική περιοχή μιας κλωνοποιημένης εστεράσης από το μύκητα *Hypocrea jecorina*, μία εστεράση φυσικού τύπου [Vafiadi *et al.*, 2009] και η αντίστοιχη κλωνοποιημένη [Torakas *et al.*, 2010] του θερμόφιλου μύκητα *Myceliophthora thermophila*, η κλωνοποιημένη εστεράση από το μύκητα *Podospora anserina* [Katsimpouras *et al.*, 2014] και τέλος η κλωνοποιημένη εστεράση του μύκητα *Cerrena unicolor* [d'Errico *et al.*, 2015].

**Πίνακας 1.3.1** Οι οκτώ GEs της CE15 οικογένειας υδατανθρακικών εστερασών που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα.

Μικροοργανισμός	Ένζυμο	M.B. (kDa)	pH <sub>opt</sub>	T <sub>opt</sub> (°C)	Διαθέσιμη 3D δομή	Αναφορά
<i>Schizophyllum commune</i>	ScGE	44	7.0	50	-	Šprániková & Biely, 2006
<i>Schizophyllum commune</i>	rSCGE	53	-	-	-	Wong <i>et al.</i> , 2012
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PcGE1, PcGE2	49.5, 43.5	-	-	-	Duranová <i>et al.</i> , 2009a
<i>Hypocrea jecorina</i>	Cip2 GE	50	5.5	40	pdb:3PIC	Li <i>et al.</i> , 2007, Pokkuluri <i>et al.</i> 2011
<i>Myceliophthora thermophila</i>	StGE1	58	6.0	60	-	Vafiadi <i>et al.</i> , 2009
<i>Myceliophthora thermophila</i>	StGE2	43	7.0	55	pdb: 4G4G	Topakas <i>et al.</i> , 2010, Charavgi <i>et al.</i> , 2013
<i>Podospora anserina</i>	PaGE1	63	-	-	-	Katsimpouras <i>et al.</i> , 2014
<i>Cerrena unicolor</i>	CuGE	58	5.0	-	-	d'Errico <i>et al.</i> , 2015

Οι γλυκουρονικές εστεράσες ανήκουν στην οικογένεια εστερασών τύπου Σερίνης, όπου δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων μετάλλου ως βοηθητικά στην κατάλυση [Li *et al.*, 2007, Topakas *et al.*, 2010]. Ορισμένες εκ των GEs διαθέτουν δομικά αυτοτελείς περιοχές πρόσδεσης στην κυτταρίνη CBM (Carbohydrate Binding Module) οικογένειας 1 (σχεδόν αποκλειστικά σε μυκητιακής προέλευσης πρωτεΐνες) στο αμινοτελικό άκρο, καθώς και ένα πλούσιο σε προλίνη/σερίνη συνδετικό πεπτίδιο (linker) [Duranová *et al.*, 2009a]. Η πρωταρχικά ανακαλυφθείσα ScGE καθώς και οι PcGE2, rSCGE, Cip2 GE και StGE2 δε διαθέτουν τις συγκεκριμένες περιοχές ενωμένες με την καταλυτική περιοχή καθώς απαντάται κυρίως σε φυσικού τύπου απομονωμένες γλυκουρονικές εστεράσες. Η CBM1 περιοχή εντοπίζεται σε ποικίλα λιγνινοκυτταρινολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες) ωστόσο εφόσον δεν είναι απαραίτητο δομικό στοιχείο των GEs, ο ουσιαστικός ρόλος του

στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος τίθεται υπό αμφισβήτηση. Σύμφωνα με μια υπόθεση, οι CBM1 GEs απαιτούνται για τα πρωταρχικά στάδια της αποικοδόμησης όπου το λιγνινοκυτταρινούχο υλικό του τοιχώματος είναι ακόμα αδιάλυτο, ενώ στα μεταγενέστερα στάδια προτιμώνται οι εστεράσες χωρίς CBM1 ώστε να επιταχυνθεί η διεργασία της υδρόλυσης [Duranová *et al.*, 2009a].

Η εξειδικευμένη υδρολυτική δράση των GEs έχει μελετηθεί έναντι συνθετικών αναλόγων υποστρωμάτων και οι καταλυτικές δραστηριότητές τους καταγράφονται σε εύρος pH 5-7 και θερμοκρασίες 40-60 °C. Πιο αναλυτικά, κινητικές μελέτες της ScGE με χρήση συνθετικών αναλόγων τα οποία μιμούνται δομικά τους εστερικούς δεσμούς που απαντώνται στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα έδειξαν ότι οι GEs αναγνωρίζουν υδρολυτικά το γλυκουρονικό οξύ μάλλον παρά την αλκοόλη [Šráníková *et al.*, 2007]. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι το ένζυμο δεν υδρολύει μεθυλεστέρες του D-γαλακτουρονικού οξέος ούτε του νιτροφαίνυλο γλυκοσιδίου ενώ διαφαίνεται μια εξάρτηση της δράσης του από τη μεθυλίωση του C-4 του D-γλυκουρονικού [Duranová *et al.* 2009b]. Τόσο η ScGE όσο και η Cip2 GE, εμφάνισε καταλυτική δράση έναντι αλκυλο- και αρυλοαλκυλο-εστέρων του D-γλυκουρονικού οξέος και του 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος με προτίμηση στους δευτέρους [Šráníková & Biely, 2006, Li *et al.*, 2007, Duranová *et al.*, 2009b] ενώ η αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα για υποστρώματα που φέρουν 4-O-μεθυλο υποκατάσταση του γλυκουρονικού οξέος παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της CuGE.

Εξάλλου, βάσει μελετών που αφορούν στην εκλεκτικότητα της δράσης των GEs, έχει καταγραφεί μια κάποια προτίμηση του ενζύμου προς ογκοδέστερα υποστρώματα τα οποία διαθέτουν αρυλοαλκενυλο- υποκαταστάτες που προέρχονται από την εστεροποιημένη αλκοόλη καθώς και προς βενζυλο- παρά προς φαινυλοπροπυλο- υποκατάσταση [d'Errico *et al.*, 2015, Wong *et al.* 2012]. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα έρχεται σε αντίθεση με προγενέστερα αποτελέσματα [Li *et al.*, 2007, Šráníková *et al.*, 2007] που υποδείκνυαν μια κάπως υψηλότερη προτίμηση της ScGE για μεθυλεστέρες του γλυκουρονικού οξέος, ενώ υποστηρίζεται περαιτέρω από τη δομική ανάλυση της Cip2 GE [Pokkuluri *et al.*, 2011] όπου η καταλυτική κοιλότητα εντοπίζεται στην

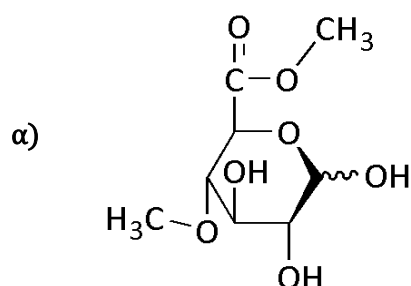
επιφάνεια του ενζύμου διευκολύνοντας πιθανά την πρόσβαση σε αυτήν υποκαταστατών με πολλές δομικές μονάδες όπως είναι οι γλυκουρονικοί εστέρες λιγνίνης των LCCs (§1.4.2).

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί από τις κινητικές μελέτες των *StGE2* και *PaGE1* σε συνθετικά υποστρώματα, ότι εκδηλώνεται μια εξειδίκευση ως προς εστέρες που φέρουν ένα συζυγιακό διπλό δεσμό αντιπροσωπευτικό των δομών των μονομερών αλκοολών της λιγνίνης (συναπυλική αλκοόλη, π-κουμαρυλική αλκοόλη και κωνιφερυλική αλκοόλη), ενώ η υποκατάσταση με ομάδα -OH του βενζυλικού δακτυλίου της αλκοόλης, μειώνει τη συγγένεια του ενζύμου ως προς αυτό [Katsimpouras *et al.*, 2014]. Ακόμη, συγκριτικά οι μεσόφιλες γλυκουρονικές εστεράσες (όπως η *PaGE1*) εμφανίζονται πιο δραστικές στην υδρόλυση υποστρωμάτων από τις αντίστοιχες θερμόφιλες (όπως οι *StGE1* και *StGE2*) [Vafiadi *et al.* 2009, Katsimpouras *et al.*, 2014]. Τέλος, η υψηλότερη συγγένεια προς υπόστρωμα που έχει καταγραφεί ως τώρα είναι της *rSGE* για το ογκώδες 4-νιτροφαίνυλο 2-*O*-(μεθυλο-4-*O*-μεθυλο- $\alpha$ -D-γλυκοπυρανοζυλοουρονικό)- $\beta$ -D-ξυλοπυρανοσίδιο (Πίνακας 1.3.2) προς το οποίο εμφάνισε αξιοσημείωτη συγγένεια η πλειονότητα των χαρακτηρισμένων GEs (*ScGE*, *PcGE1*, *PcGE2*, *Cip2 GE* και *StGE1*) [Đuranová *et al.* 2009b, Wong *et al.* 2012].

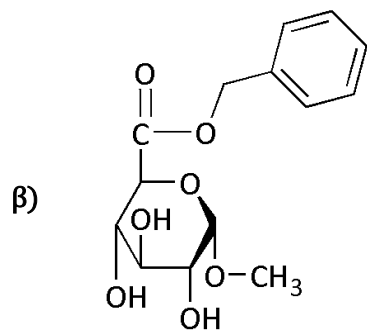
---

**Πίνακας 1.3.2** Τα συνθετικά ανάλογα υποστρώματος στα οποία οι GEs εμφάνισαν την πιο αξιοσημείωτη υδρολυτική εξειδίκευση.

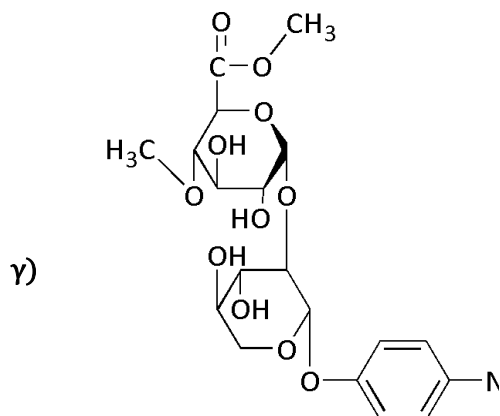
---



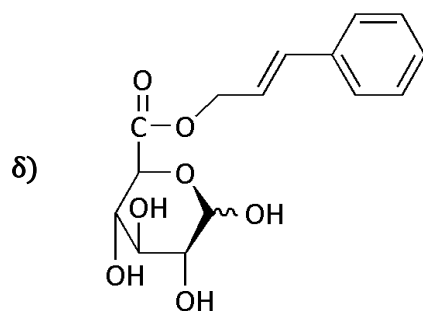
Μεθυλεστέρας του 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος [Đuranová *et al.*, 2009b]



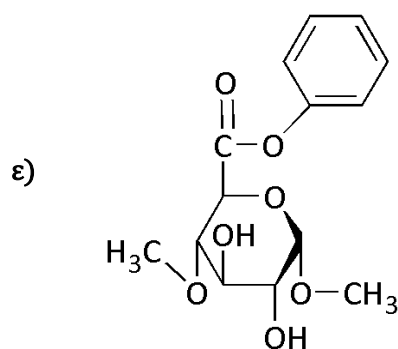
4-νιτροφαινυλο μεθυλο-β-D-γλυκουρονίδιο  
[Duranová *et al.*, 2009b]



4-νιτροφαινυλο 2-*O*-(μεθυλο-4-*O*-μεθυλο-α-D-γλυκοκυρανοζυλο ουρονικο)-β-D-ξυλοκυρανοσίδιο [Wong *et al.*, 2012]



trans-3-φαινυλο 2-προπενυλο-1-εστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος [Katsimpouras *et al.*, 2014]



Βενζυλεστέρας του μεθυλο-4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονίδιου [d'Errico *et al.*, 2015]



Στον Πίνακα 1.3.2 παρουσιάζονται οι χημικές δομές των συνθετικών υποστρωμάτων προς τα οποία έχει καταγραφεί η υψηλότερη υδρολυτική εξειδίκευση των GEs από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Τα συγκεκριμένα ένζυμα αναγνωρίζουν ως υποστρώματα τους εστέρες του γλυκουρονικού οξέος αλλά όχι τους εστέρες του γαλακτουρονικού οξέος, ενώ η 4-*O*-μεθυλο υποκατάσταση των καταλοίπων του γλυκουρονικού φαίνεται να αποτελεί ένα δομικό χαρακτηριστικό καθοριστικής σημασίας για την εξειδίκευσή και τη βέλτιστη αποδοτικότητά τους. Όσον αφορά στην εστεροποιημένη αλκοόλη, η προτίμηση δράσης των GEs φαίνεται να ακολουθεί τη σειρά βενζυλική> κινναμμική> φαινυλοπροπυλική> αλκενυλο> αλκυλο, όπου ευνοούνται οι ογκωδέστεροι αρυλοαλκενυλο υποκαταστάτες. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν το σύνολο των κινητικών μελετών ως προς υποστρώματα-μοντέλα των υποθετικών φυσικών υποστρωμάτων των GEs, ενδέχεται οι διαφορετικές γλυκουρονικές εστεράσες να εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό εξειδίκευσης η οποία και θα αποτυπώνεται σε κάποια διαφοροποίηση ως προς τον τρόπο δράσης τους [d'Errico *et al.*, 2015]. Τα μέχρι τώρα δεδομένα για την καταλυτικό ρόλο των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος διαφαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι εμπλέκονται στην απομάκρυνση της λιγνίνης στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, ωστόσο ο φυσιολογικός τους ρόλος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης ώστε το ένζυμο να αξιοποιηθεί σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

## 1.4 Αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η φυτική βιομάζα ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας εκτιμάται ότι δύναται να καλύψει τις παγκόσμιες ενεργειακές ανάγκες μέχρι το 2050 σε ποσοστό 10-20% [IEA, 2008]. Σύμφωνα με την Οδηγία 2003/30/EK της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, ο όρος βιομάζα αναφέρεται στο βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, αποβλήτων και καταλοίπων από γεωργικές (συμπεριλαμβανομένων φυτικών και ζωικών ουσιών), δασοκομικές και συναφείς βιομηχανικές δραστηριότητες, καθώς και το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα των βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. Η παραγωγή βιοενέργειας και ειδικότερα βιοκαυσίμων από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, συγκεντρώνει το παγκόσμιο ενδιαφέρον καθώς πρόκειται για ενεργειακές λύσεις «ουδέτερες» ως προς άνθρακα. Πιο αναλυτικά,

το CO<sub>2</sub> που παράγεται από την καύση τους δεσμεύεται εκ νέου από τα φυτά με τη φωτοσύνθεση, ενώ παρέχεται η δυνατότητα δέσμευσης άνθρακα σε οργανική μορφή (από τα φυτά και άλλους οργανισμούς) με παράλληλη συνεισφορά στην αντιμετώπιση του φαινομένου του θερμοκηπίου. Ακόμη τα βιοκαύσιμα έχουν υψηλή ομοιότητα ως προς τις ιδιότητες και το ενεργειακό περιεχόμενο με τα βασισμένα σε πετρέλαιο καύσιμα μεταφοράς [Lee *et al.*, 2008].

Σύμφωνα με εκτιμήσεις, οι δασικές και αγροτικές εκτάσεις παρέχουν τη δυνατότητα παραγωγής βιοκαυσίμων για να καλυφθεί παραπάνω από το 1/3 της παρούσας ζήτησης για καύσιμα μεταφοράς [Perlack *et al.*, 2005]. Ειδικότερα, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αναφέρονται στις υπολειμματικές μορφές βιομάζας, όπως τα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (στελέχη, κλαδιά, φύλλα, άχυρο), τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (υπολείμματα εκκοκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων), η βιομάζα δασικής προέλευσης (υπολείμματα επεξεργασίας ξύλου) και ενεργειακά φυτά (σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο, σόργο, σπόροι σιτηρών), καθώς και ενεργειακά φυτά λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης (ευκάλυπτος, ψευδακακία, αγριαγκινάρα, καλάμι). Ωστόσο, η αυξανόμενη κριτική όσον αφορά στη βιωσιμότητα των βιοκαυσίμων προερχόμενα από εδάδιμα φυτά, λόγω των κινδύνων αύξησης των τιμών των τροφίμων και μείωσης των διαθέσιμων αποθεμάτων, στρέφουν την προσοχή στα 2ης γενιάς βιοκαύσιμα που βασίζονται σε αγροτικά και δασικά υπολείμματα καθώς και ενεργειακές καλλιέργειες.

#### **1.4.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα δασικής προέλευσης – Μη κυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες**

Οι δασικές εκτάσεις καλύπτουν συνολικά ένα 40% της έκτασης της γης σήμερα ενώ το 75% του αποθηκευμένου άνθρακα στα φυτά απαντάται σε λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες δασικής προέλευσης [Horwarth, 2007]. Εκτιμάται ότι η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα αποτελεί το πιο άφθονο ανανεώσιμο υλικό αντιστοιχώντας στο 50% του συνόλου της βιομάζας παγκοσμίως [Claassen *et al.*, 1999, Wingren *et al.*, 2003]. Στα δασικά

οικοσυστήματα η πλήρης αποικοδόμηση των συστατικών της λιγνινοκυτταρίνης λαμβάνει χώρα από μικροοργανισμούς εξειδικευμένους στη βιομετατροπή των συστατικών που την απαρτίζουν ώστε να αποδίδεται κατ'αυτόν τον τρόπο πάνω από το 90% του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> που εισέρχεται στον κύκλο του άνθρακα [Falkowski *et al.*, 2000, Prentice *et al.*, 2001].

Αν και η λιγνινοκυτταρίνη δασικής προέλευσης είναι η πιο άφθονη πηγή υδατανθράκων παγκοσμίως, η διαθεσιμότητα και η σύστασή της ποικίλει καθώς βασίζεται κυρίως σε κλιματικούς παράγοντες και στον τύπο βλάστησης κάθε περιοχής. Οι συγκεκριμένες πρώτες ύλες περιλαμβάνουν κυρίως πολυσακχαρίτες (όπως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη) και λιγνίνη σε ποικίλες αναλογίες για διαφορετικής προέλευσης λιγνινοκυτταρίνη καθώς και άλλα εκχυλίσμα συστατικά (όπως ρητίνες, τερπένια, ταννίνες) σε χαμηλότερη περιεκτικότητα [Sjöström, 1993]. Τα τελευταία χρόνια, οι ανανεώσιμοι λιγνινοκυτταρινούχου προέλευσης πολυσακχαρίτες συγκεντρώνουν αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των δυνατοτήτων που προσφέρουν για την παραγωγή εξειδικευμένων υλικών και χημικών εκτός της αξιοποίησής τους στη βιομηχανία χάρτου [Ragauskas *et al.*, 2006, Willför *et al.*, 2008]. Οι μη κυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες, που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για υψηλής αξίας προϊόντα, απαρτίζονται από διαφορετικούς τύπους ετεροπολυσακχαριτών κυρίως ξυλάνες στα φυλλοβόλα και γαλακτογλυκομαννάνες (galactoglucomannans, GGMs) στα κωνοφόρα.

Μια ποικιλία μεθοδολογιών έχει αναπτυχθεί για την απομόνωση μη κυτταρινούχων υδατανθράκων από λιγνινοκυτταρινούχα όπως επεξεργασία με ατμό (steam explosion), με αλκαλικά διαλύματα, ή όξινα καθώς και εκχύλιση με θερμό ύδωρ (hydrothermolysis) όπου κυρίως ανεφέρονται σε πηγές φυλλοβόλων δέντρων λόγω της μειωμένης χρήσης τους σε πολλές χώρες [Karlsson *et al.*, 2004, van Heiningen 2006, Leschinsky *et al.*, 2009, Liu & Amidon 2009, Al-dajani & Tschirner 2010, Chirat *et al.*, 2012]. Όσον αφορά στις πρώτες ύλες από κωνοφόρα δέντρα (πέυκο, ελάτη) εφαρμόζονται τεχνικές απομόνωσης μη κυτταρινούχων υδατανθράκων όπως επεξεργασία με ύδωρ σε θερμοκρασίες μικρότερες των 100°C, κλασματοποίηση με θέρμανση σε μικροκύματα και εκχύλιση με αλκαλικά διαλύματα [Örså *et al.*, 1997, Capek *et al.*, 2000, Lundqvist

*et al.*, 2002, 2003, Yoon *et al.*, 2008]. Ορισμένα μέρη των μη κυτταρινούχων υδατανθράκων προέλευσης ελάτης δύνανται επίσης να απομονωθούν ως λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα (lignin-carbohydrate-complexes, LCCs) [Lawoko *et al.*, 2006]. Προσφάτως, έχει ανακύψει η ιδέα της διατήρησης των δομικών χαρακτηριστικών κατά την εκχύλιση μη κυτταρινούχων πολυσακχαριτών στη φυσική τους μη αποικοδομημένη μορφή αποφεύγοντας την υδρόλυση στο μέγιστο εφικτό βαθμό. Η εκχύλιση των συγκεκριμένων μορφών λιγνινοκυτταρινούχων αποδίδει ενώσεις που μπορούν να αξιοποιηθούν σε μια ποικιλία εφαρμογών όπως είναι η βιομηχανία τροφίμων, φαρμακευτική, χάρτου, υφασμάτων, καλλυντικών [Ebringerová *et al.*, 2005, Mikkonen *et al.*, 2008, Willför *et al.*, 2008]. Παράλληλα, οι μη κυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για τη δημιουργία καινοτόμων προϊόντων όπως βιοπολυμερή και υδροτζέλ [Gabrieli *et al.*, 2000, Hartman *et al.*, 2006, Mikkonen *et al.*, 2008], ή μετά από υδρόλυση να αποτελέσουν πηγές σακχάρων κατά τις ζυμώσεις προς βιοαιθανόλη ή χημικά αλλά και κατά την παραγωγή βιοπλαστικών [Werpy *et al.*, 2004].

#### **1.4.2 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα προέλευσης κωνοφόρων ξυλωδών φυτών**

Ως φυσική πρώτη ύλη, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα δασικής προέλευσης αποτελεί ένα πολύ ετερογενές υλικό. Τα δομικά συστατικά που κυριαρχούν είναι η κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες, οι πηκτίνες, η λιγνίνη (συνολικά αναλογούν στο 97 – 99%) ενώ σε μικρότερα ποσά απαντώνται μη δομικά συστατικά που περιλαμβάνουν εκχυλίσιμες οργανικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους καθώς και ανόργανα υλικά [Fengel & Wegener, 1984]. Οι δομικοί πολυσακχαρίτες κυμαίνονται σε επίπεδο δομής από ευθύγραμμους έως μεγάλου βαθμού διακλάδωσης ενώ διαθέτουν τροποποιήσεις των επαναλαμβανόμενων μονάδων τους ώστε να υπάρχει ετερογένεια. Εξάλλου, οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις (εκχυλίσιμα συστατικά ξύλου) αναφέρονται σε ρητίνη, φαινόλες, λίπη και υδατάνθρακες και μπορεί να είναι ενεργειακές πηγές για τα κύτταρα καθώς και να παίρνουν μέρος σε βιοσυνθετικές διεργασίες. Επίσης, έχουν προστατευτικό ρόλο για το ξυλώδες φυτό προστατεύοντάς το έναντι

μικροβιακών προσβολών και επιθέσεων φυτοφάγων. Η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται τυπικά από 3-5% αλλά διαφέρει ανάλογα με τον τύπο ξυλώδους φυτού, τα ποικίλα μέρη του φυτού και ακόμα με τις εποχές του χρόνου.

Εν γένει, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα δασικής προέλευσης περιλαμβάνει ως πρώτες ύλες 100.000 διαφορετικά είδη ξυλωδών φυτών με τα περισσότερα από αυτά να αναπτύσσονται σε τροπικές περιοχές. Όλα τα είδη ξυλωδών φυτών διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες τα αγγειόσπερμα - φυλλοβόλα (ανθοφόρα, hardwood) και τα γυμνόσπερμα - κωνοφόρα (softwood). Τα φυλλοβόλα (σημύδα, δρυς, ευκάλυπτος) διαθέτουν πλατιά φύλλα ενώ στα κωνοφόρα (πεύκο, ελάτη, κέδρος) τα φύλλα είναι βελονοειδή ή λεπιοειδή. Παράλληλα, διαφέρουν στη χημική σύστασή τους καθώς τα κωνοφόρα διαθέτουν περισσότερη λιγνίνη αλλά λιγότερη κυτταρίνη από τα φυλλοβόλα. Όσον αφορά στην περιεκτικότητά τους σε μη κυτταρινούχους πολυσακχαρίτες στα κωνοφόρα κυριαρχεί η γαλακτογλυκομαννάνη ενώ τα φυλλοβόλα διαθέτουν κυρίως μακρομόρια ξυλάνης. Η τυπική αναλυτική σύσταση των αγγειόσπερμων και γυμνόσπερμων συνοψίζεται στον Πίνακα 1.4.1.

**Πίνακας 1.4.1** Τυπική περιεκτικότητα συστατικών αγγειόσπερμων (φυλλοβόλα, hardwood) και γυμνόσπερμων (κωνοφόρα, softwood) [Sjöström, 1993].

Συστατικό	Αγγειόσπερμα (hardwood)	Γυμνόσπερμα (softwood)
Κυτταρίνη	44 ( $\pm$ 6) %	38 ( $\pm$ 5) %
Ημικυτταρίνες	24 ( $\pm$ 6) %	25 ( $\pm$ 4) %
Γλυκομαννάνες	2.5 ( $\pm$ 1) %	17 ( $\pm$ 3) %
Ξυλάνες	23 ( $\pm$ 7) %	8 ( $\pm$ 3) %
Άλλοι πολυσακχαρίτες	3 ( $\pm$ 1) %	6 ( $\pm$ 3) %
Λιγνίνη	24 ( $\pm$ 3) %	34 ( $\pm$ 7) %
Εκχυλίσιμα συστατικά ξύλου	3 ( $\pm$ 2) %	5 ( $\pm$ 3) %

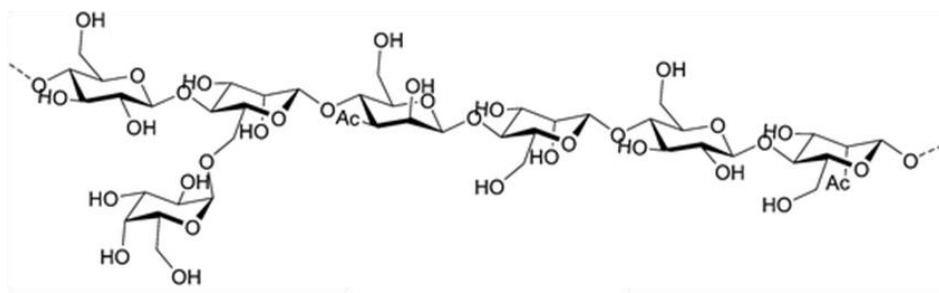
Η παρούσα διδακτορική διατριβή εντοπίστηκε στην κατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προέλευσης νορβηγικής ελάτης (Norway Spruce, *Picea abies*). Το συγκεκριμένο είδος ανήκει στα κωνοφόρα (softwood) ή γυμνόσπερμα, αποτελεί την πιο άφθονη πρώτη ύλη λιγνινοκυτταρίνης στις δασικές εκτάσεις της Σκανδιναβίας και η αξιοποίησή της βρίσκει πληθώρα εφαρμογών (όπως ξυλεία, επεξεργασία χαρτοπολτού, βιομηχανία).

#### ***1.4.2.i Κύρια συστατικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προέλευσης κωνοφόρων ξυλωδών φυτών***

Τα κύρια πολυμερή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι οι πολυσακχαρίτες και η λιγνίνη. Η κυτταρίνη, που αποτελεί το πιο γνωστό φυσικό πολυμερές σε αφθονία, αποτελείται από μονομερή β-D-γλυκοκυρανόζης ενωμένα με (1-4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ κάθε μονομερές είναι περιστραμμένο γύρω από τον β-(1,4)-γλυκοζιτικό δεσμό κατά 180° ως προς το επόμενο, ώστε η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της κυτταρίνης να είναι ο δισακχαρίτης της κελλοβιόζης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης στα ξυλώδη φυτά είναι μεταξύ 8.000 - 10.000 και πρόκειται για γραμμικό ομοπολυμερές [Fegel & Wegener, 1983]. Η γραμμικότητα οδηγεί τα μόρια κυτταρίνης σε ενδο- και δια-μοριακές αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου ώστε να σχηματίζονται μικροϊνίδια που περιλαμβάνουν τόσο υψηλής διάταξης κρυσταλλικές περιοχές όσο και χαμηλότερης διάταξης άμορφες περιοχές. Ένα ποσοστό 40-50% επί της ξηρής βιομάζας ξύλου αντιστοιχεί στην κυτταρίνη η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα και υποστήριξη στο ξυλώδες φυτό [O'Sullivan, 1997].

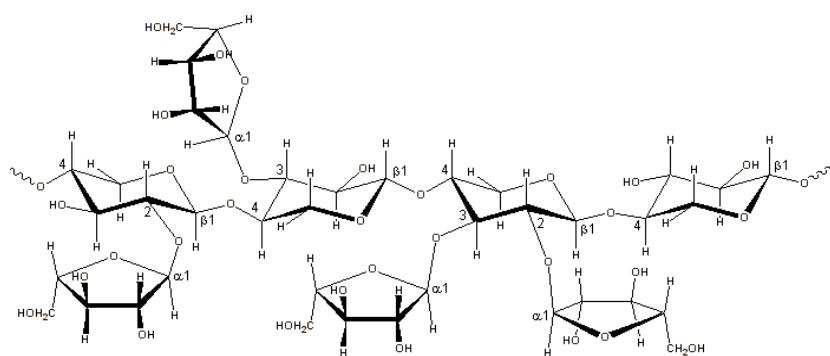
Αντίθετα με την κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες αποτελούν ένα σύνολο διακλαδισμένων ετεροπολυσακχαριτών με μέσο βαθμό πολυμερισμού 200. Οι ημικυτταρίνες των αγγειόσπερμων ξυλωδών φυτών περιλαμβάνουν μονομερή γλυκουρονοξυλάνης και γλυκομαννάνης. Όσον αφορά στα κωνοφόρα ξυλώδη φυτά η δομή τους παρουσιάζει κάποιες διαφορές σε σχέση με αυτή των φυλλοβόλων. Πιο αναλυτικά οι ημικυτταρίνες στο ξύλο των γυμνόσπερμων περιλαμβάνουν [Timell, 1967, Sjöström, 1993, Lundqvist *et al.*, 2002]:

- Γαλακτο-γλυκομαννάνες που αποτελούν κυρίαρχο συστατικό στα γυμνόσπερμα σε περιεκτικότητα ~20% επί του ξηρού υλικού (Σχήμα 1.4.1). Η κύρια αλυσίδα συνίσταται από μονάδες β-D-γλυκοπυρανόζης και β-D-μαννοπυρανόζης ενωμένες με (1-4) δεσμούς. Κατάλοιπα α-D-γαλακτοπυρανόζης είναι ενωμένα με (1-6) δεσμούς στη μαννοπυρανόζη σχηματίζοντας ένα μονομερές. Βασικό δομικό χαρακτηριστικό της είναι ότι οι C-2 και C-3 θέσεις στις δομικές μονάδες της αλυσίδας είναι μερικώς ακετυλιωμένες σε αναλογία 1:3 ή 1:4 προς κατάλοιπα εξόζης, ενώ είναι εύκολα διασπώμενες παρουσία αλκαλικών διαλυμάτων. Το περιεχόμενο γαλακτόζης στα κωνοφόρα ξυλώδη φυτά κυμαίνεται από 0.1:1:4 έως 1:1:3 αναλογία γαλακτόζης:γλυκόζης:μαννόζης όπου στην περίπτωση του χαμηλού ποσοστού γαλακτόζης το μονομερές αναφέρεται ως γλυκομαννάνη.



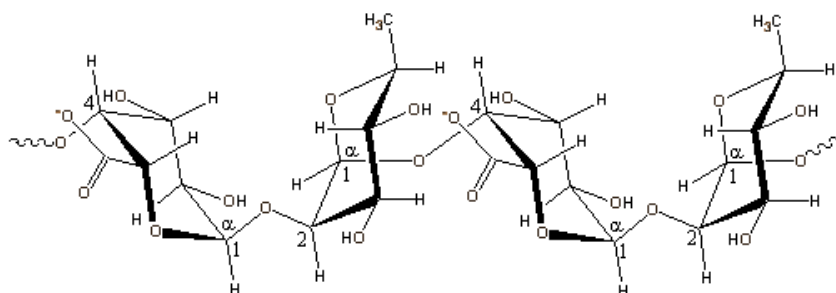
**Σχήμα 1.4.1** Αντιπροσωπευτική δομή της γαλακτογλυκομαννάνης.

- Αραβινοξυλάνη που αποτελεί το 5-10% επί του ξηρού υλικού στο ξύλο γυμνόσπερμων (Σχήμα 1.4.2). Η σύστασή της περιλαμβάνει ένα δίκτυο (1-4) ενωμένων μονάδων β-D-ξυλοπυρανόζης μερικώς υποκατεστημένων στον C-2 από ομάδες 4-O-μεθυλο-α-D-γλυκουρονικού οξέος σε αναλογία ~2:10 προς την ξυλόζη. Το δίκτυο περιέχει ακόμα 1.3 κατάλοιπα α-L-αραβινοφουρανόζη ανά 10 μονάδες ξυλόζης. Λόγω της δομής φουρανόζης των πλευρικών αλυσίδων της αραβινόζης, είναι εύκολα υδρολύσιμη από οξέα. Ωστόσο, τόσο η αραβινόζη όσο και το γλυκουρονικό σταθεροποιούν τη δομή έναντι αποικοδόμησης από αλκαλική προσβολή.



**Σχήμα 1.4.2** Αντιπροσωπευτική δομή της αραβινοξυλάνης.

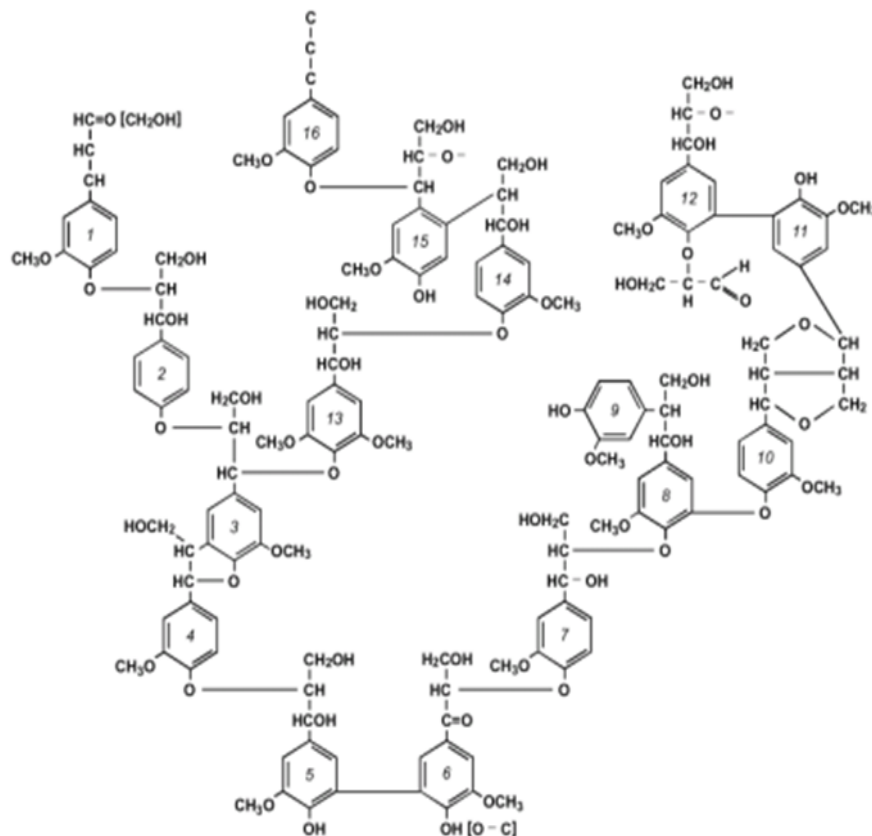
- Πηκτίνη** (Σχήμα 1.4.3) η οποία συνήθως δεν κατάτασσεται στις ημικυτταρίνες αλλά ο διαχωρισμός είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αυθαίρετος. Οι πολυσακχαρίτες που συνθέτουν τη δομή της περιλαμβάνουν D-γαλακτοσυλο-ουρονικό οξύ, D-γαλακτόζη, L-αραβινόζη και L-ραμνόζη. Οι πηκτικές ενώσεις αναφέρονται σε γαλακτουρονάνες, ραμνογαλακτορουνάνες, αραβινάνες και γαλακτάνες ενώ η βιολογική δράση τους σχετίζεται με την πλαστικότητα του κυτταρικού τοιχώματος επιτελώντας συγκολλητικό ρόλο στο κυτταρικό τοίχωμα.



**Σχήμα 1.4.3** Αντιπροσωπευτική δομή της πηκτίνης.



Όσον αφορά στη λιγνίνη (Σχήμα 1.4.4), πρόκειται για φυσικό πολυμερικό υλικό που προκύπτει από ενζυμική έναρξη του πολυμερισμού μέσω αφυδρογόνωσης των τριών πρόδρομων ενώσεων της συναπλικής αλκοόλης, της π-κουμαρυλικής αλκοόλης και της κωνιφερυλικής αλκοόλης [Freudenburg 1968, Adler, 1977]. Η δομή της λιγνίνης των κωνοφόρων ξυλωδών φυτών είναι κυρίως αποτέλεσμα του πολυμερισμού της κωνιφερυλικής αλκοόλης ενώ των φυλλοβόλων τόσο της συναπλικής όσο και της κωνιφερυλικής αλκοόλης. Η π-θέση του αρωματικού δακτυλίου είναι είτε αιθεροποιημένη είτε φαινολικού τύπου, ενώ η ο- θέση διαθέτει είτε καμία είτε 2-3 μέθοξυ ομάδες και εναλλακτικά μπορεί να είναι και C - υποκατεστημένη. Τα δομικά συστατικά της λιγνίνης δεν είναι ενωμένα με κάποια συγκεκριμένη διάταξη, αν και κάποιοι από τους τύπους σύνδεσης είναι θερμοδυναμικά ευνοούμενοι. Ο πολυμερισμός οδηγεί σε μια εξαιρετικά διακλαδισμένη τρισδιάστατη δομή με άγνωστο μοριακό βάρος και αποτελεί το 27-30% επί της ξηρής βιομάζας ξύλου κωνοφόρων και 20-26% των φυλλοβόλων.

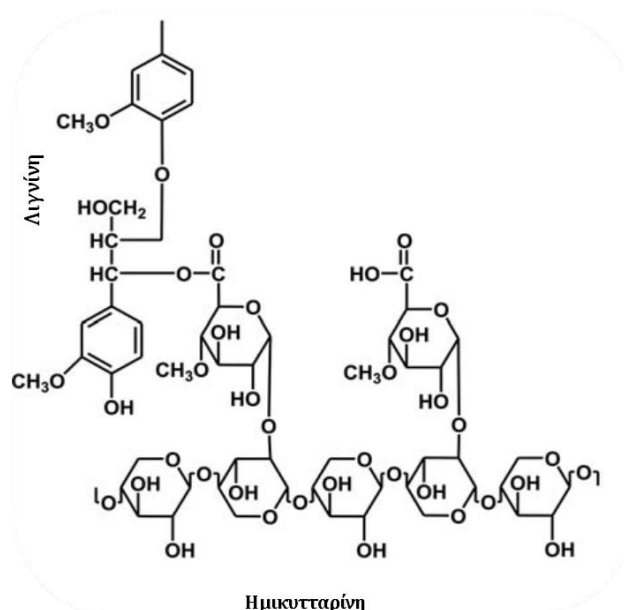


Σχήμα 1.4.4 Μία αντιπροσωπευτική δομή λιγνίνης.

### 1.4.2.ii Λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα (LCCs)

Ένα ερώτημα που έχει ανακύψει διαχρονικά είναι το αν η λιγνίνη είναι χημικά προσδεδεμένη σε πολυσακχαρίτες στα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά ή αν απαντάται σε ελεύθερη μορφή. Υπάρχουν ποικίλα ερευνητικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν την ομοιοπολική ένωση της λιγνίνης με πολυσακχαρίτες σχηματίζοντας τα επονομαζόμενα λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα (Lignin-Carbohydrate Complexes, LCCs) [Björkman, 1957, Fengel & Wegener, 1984, Koshijima & Watanabe, 2003]. Ο όρος εισήχθει από τον Björkman [Björkman, 1956] μετά την απομόνωσή ενός «αδιαχώριστου μίγματος» κατά την απομόνωση λιγνίνης από πρώτη ύλη αλεσμένης ελάτης, ένας όρος που έκτοτε έλαβε παγκόσμια αναγνώριση. Παράλληλα, αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα το αν τα LCCs μπορεί να είναι τεχνητό προϊόν των διεργασιών απομόνωσής τους ενώ και η φυσική δομή τους παραμένει άγνωστη.

Ως LCCs αναφέρονται τα σύμπλοκα ημικυτταρίνης με τις πλευρικές αλυσίδες της λιγνίνης (Σχήμα 1.4.5) ενώ σύμφωνα με τη μελέτη των Lawoko *et al.* 2005, το σύνολο της λιγνίνης από πρώτη ύλη λιγνινοκυτταρινούχων κωνοφόρων είναι ενωμένο ομοιοπολικά με πολυσακχαρίτες κυρίως ημικυτταρίνες [Westerberg *et al.*, 2012]. Ωστόσο, αυτά τα σύμπλοκα φαίνεται να απαντώνται σε μικρό βαθμό στα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά δασικής προέλευσης [Obst, 1982], ο βαθμός πολυμερισμού τους κυμαίνεται όπως και ο αριθμός των δομικών συστατικών λιγνίνης που είναι δεσμευμένα στην κύρια αλυσίδα της ημικυτταρίνης ενώ συχνά η απόδοση της απομόνωσής τους είναι πολύ χαμηλή της τάξης του 0.04-7.9% [Sakagami *et al.*, 2010]. Οι κύριοι τύποι LCCs που προτείνεται ότι υπάρχουν στα συγκεκριμένα υλικά είναι δεσμοί φαινολών-γλυκοσιδίων, εστέρες και βενζυλαιθέρες αλλά όχι βενζυλεστέρες αντίθετα με την επικρατούσα υπόθεση για άλλης προέλευσης πρώτες ύλες [Fengel & Wegener 1984, Koshijima & Watanabe 2003].



**Σχήμα 1.4.5** Παράδειγμα υποθετικής δομής λιγνινο-υδατανθρακικού συμπλόκου (LCC).

Ο σχηματισμός των LCCs υποστηρίζεται ότι λαμβάνει χώρα συνεχώς κατά τη βιοσύνθεση της λιγνίνης στα αναπτυσσόμενα φυτά όπου τυχαίες οξειδωτικές φαινοξυ-ρίζες των κωνιφερυλικών, κουμαρυλικών και σιναπυλικών αλκοολών οδηγούν σε ασταθή ενδιάμεσα δεκτικά σε πυρηνόφιλη προσβολή από μόρια ύδατος, αλκοολών ή καρβοξυλίων. Βάσει της συγκεκριμένης υπόθεσης οι βενζυλεστέρες και βενζυλαιθέρες των LCCs θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις των φυσικών δομών LCCs, ωστόσο μόνο για τις βενζυλαιθερικές ενώσεις έχει γίνει άμεσος προσδιορισμός ενώ για τις βενζυλεστερικές υπάρχουν μόνο έμμεσες ενδείξεις [Imamura *et al.*, 1994, Balakshin & Capanema, 2003]. Αντίθετα, εστέρες των LCCs έχουν ανιχνευτεί άμεσα μέσω φασματοσκοπίας NMR ως κύρια συστατικά LCCs από πρώτες ύλες αγγειόσπερμων και γυμνόσπερμων ξυλωδών φυτών [Balakshin & Capanema, 2003, Balakshin *et al.*, 2011, Yuan *et al.*, 2011].

### **1.4.2.iii Σημασία απομόνωσης των LCCs**

Η παρουσία σταθερών λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων δημιουργεί σημαντικά ζητήματα στον εκλεκτικό διαχωρισμό της λιγνίνης και των υδατανθράκων που δυσχεραίνει την αποικοδόμηση, γεγονός που αποτυπώνεται και κατά την απομόνωση των συγκεκριμένων συστατικών της

λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στις διεργασίες βιοδιυλιστηρίων [Balakshin *et al.*, 2011]. Στη βιομηχανία χαρτοπολτού, οι εστέρες των LCCs διασπώνται εύκολα σε αλκαλικές συνθήκες, ωστόσο σε άλλες εφαρμογές όπου η αλκαλική προεπεξεργασία της βιομάζας δεν είναι δυνατή ή οικονομικά συμφέρουσα (όπως βιομηχανίες παραγωγής ζωοτροφών ή βιοκαυσίμων), απαιτείται η ανάπτυξη ενζυμικών τεχνολογιών. Για το λόγο αυτό, είναι εξέχουσας σημασίας οι εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος (§1.3.3) ώστε να αποτελέσουν εξειδικευμένους βιοκαταλύτες για τη διάσπαση των εστερικών δεσμών προάγοντας σε συνδυασμό με άλλες ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες και οξειδοαναγωγάσες την πλήρη αποικοδόμηση των LCCs.

Εξάλλου, η προτεινόμενη δομή των LCCs (Σχήμα 1.4.5) διαφαίνεται να αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα των μελών της νεοσυσταθείσας οικογένειας των υδατανθρακικών εστερασών CE15 των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί. Μελέτες με συνθετικά ανάλογα υποστρώματος των εστερασών του γλυκουρονικού οξέος (*StGE2*, *PaGE1* [Katsimpouras *et al.*, 2014]) οδήγησαν στην παρατήρηση ότι υπάρχει υψηλή υδρολυτική εξειδίκευση ως προς την εστεροποιημένη κινναμμική αλκοόλη, η οποία απαντάται ως καταληκτική ομάδα στο μακρομόριο της λιγνίνης. Οι συγκεκριμένες ομάδες που πιθανά είναι εστεροποιημένες με 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικό οξύ καταλοίπων ημικυτταρίνης έχουν ανιχνευτεί σε απομονωμένη λιγνίνη λιγνινοκυτταρινούχων φυτών. Το δεδομένο αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι κατά τις βιοσυνθετικές διεργασίες της λιγνίνης οι υδροξυκινναμμικές ρίζες των αλκοολών διαχέονται στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα προσχηματισμένων ενεργοποιημένων ολιγομερών λιγνίνης για τον τερματισμό του πολυμερισμού [Sarkanen, 1971, Ralph *et al.*, 1998]. Εντούτοις, η εγγενής πολυπλοκότητα και ετερογένεια των λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών σε συνδυασμό με τη μη σαφώς καθορισμένη δομή των LCCs εμποδίζει την απομόνωση των επιθυμητών κλασμάτων. Ενώ σε μια ποικιλία λιγνινοκυτταρινούχων φυτών έχουν προσδιοριστεί γλυκουρονικοί εστέρες αλκοολών της λιγνίνης, η ύπαρξη λιγνινοφαινολικών εστέρων του γλυκουρονικού δε μπορεί να αποκλειστεί ως μία πιθανή δομή των LCCs. Λόγω της ταχείας αυτοϋδρόλυσης, όμως, που παρουσιάζουν τέτοιου τύπου φαινολικοί εστέρες, η υποθετική παρουσία τους δεν αναμένεται να διαδραματίζει καίριο ρόλο στην αντίσταση προς

αποικοδόμηση που παρουσιάζει η λιγνινοκυτταρίνη. Συμπερασματικά, η περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών υποστρωμάτων για το βιοχημικό χαρακτηρισμό των GEs οδηγεί σε συνθετικά ανάλογα επιχειρώντας τη δομική μίμηση των LCCs. Για το λόγο αυτό, είναι πρόδηλη η σημασία της απομόνωσης φυσικά απαντώμενων υποστρωμάτων για την αναζήτηση βιομηχανικά αξιοποιήσιμων εστερασών του γλυκουρονικού οξέος.

Τέλος, σύμφωνα με μελέτες, τα λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα παρουσιάζουν ποικιλία βιολογικών δράσεων. Ανοσολογικές έρευνες *in vivo* κατέγραψαν την πιθανή αντιμικροβιακή και αντιπαρασιτική δράση των LCCs καθώς και την αύξηση του χρόνου επιβίωσης πειραματόζωων λόγω αντιογκολογικής δράσης [Sakagami *et al.*, 1987, Harada *et al.*, 1988, Abe *et al.*, 1989, Oh-hara *et al.*, 1990]. Επιπρόσθετα, βάσει *in vitro* μελετών, LCCs ποικίλων λιγνινοκυτταρινούχων πρώτων υλών, επέδειξαν αντιρετροϊκή δράση έναντι του HIV και μάλιστα υψηλότερη από άλλες φαινολικού τύπου ενώσεις [Nakashima *et al.*, 1992, Sakagami *et al.*, 2008]. Αξιοσημείωτες είναι και άλλες αντιϊκές δράσεις των LCCs οι οποίες έχουν αξιοποιηθεί και προχωρήσει σε φάση κλινικών δοκιμών [Fukuchi *et al.*, 1989, López *et al.*, 2009] ενώ έχει παρατηρηθεί και συνεργιστική δράση με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της βιταμίνης C [Sakagami *et al.*, 2008]. Συνεπώς, διαφαίνεται ότι τα λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα είναι πιθανά κατάλληλα για την αποτροπή ασθενειών που προκαλούνται από ιούς αλλά και για αυτοάνοσα νοσήματα ενώ η συνεργιστική τους δράση με τη βιταμίνη C προσφέρει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν και ως διατροφικά συμπληρώματα.

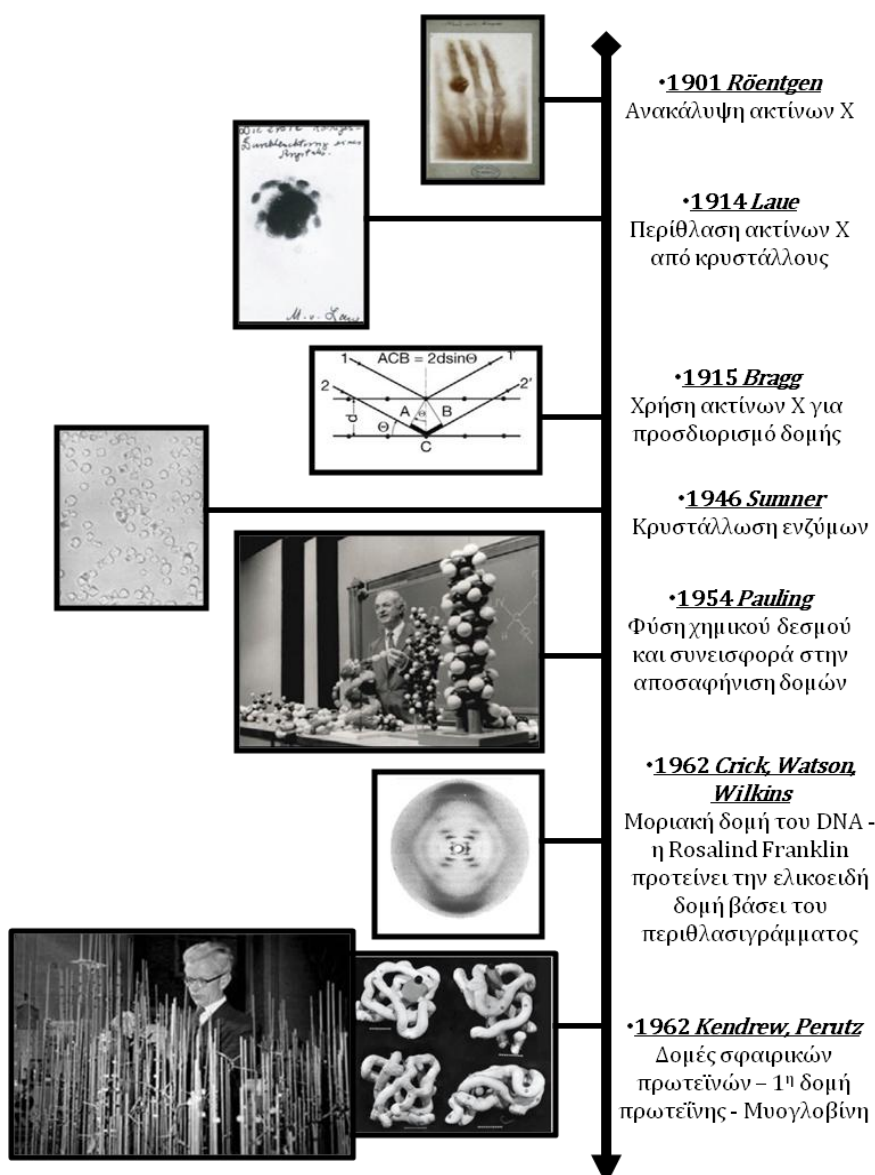
## 1.5 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

### 1.5.1 Ιστορική αναδρομή

Όταν ο Wilhelm Conrad Röntgen ανακάλυψε τις ακτίνες X το 1895, δεν ήταν δυνατόν να φανταστεί την πληθώρα σημαντικών εφαρμογών που θα έβρισκε η περίθλαση ακτίνων X σε κρυστάλλους βιολογικών μορίων. Μόλις μερικά χρόνια αργότερα, το 1912, ο Max von Laue παρουσίασε το πρώτο περιθλασίγραμμα κρυστάλλων ενώ ο William Lawrence Bragg το 1913, ανέπτυξε μια γενική εξίσωση, γνωστή ως νόμος του Bragg, για την περιγραφή της θεμελιώδους αρχής του σχηματισμού εικόνας από την περίθλαση ακτίνων X κρυστάλλου άλατος χλωριούχου νατρίου. Ο James Sumner ανέπτυξε τον πρώτο πρωτεϊνικό κρύσταλλο ουρεάσης το 1926. Σχεδόν 30 χρόνια αργότερα το 1953, οι James Watson και Francis Crick, από το εργαστήριο Cavendish, πρότειναν το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA βάσει των περιθλασιγραμμάτων της Rosalind Franklin [Watson & Crick, 1953]. Έκπληκτη η επιστημονική κοινότητα έστρεψε το ενδιαφέρον της στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X όταν το 1957 παρουσιάστηκε από τον John Kendrew η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός μακρομορίου, αυτού της μυογλοβίνης [Kendrew *et al.*, 1958], η οποία επιβεβαίωσε τη δομή α-έλικας που είχε προταθεί το 1951 από τους Linus Pauling και Robert Corey [Pauling & Corey, 1951a, 1951b, 1951c, Pauling *et al.*, 1951]. Καθώς το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό σχεδόν όλων των ζωντανών ουσιών και οι πρωτεΐνες είναι οι μηχανές ζωής, η δομική αποσαφήνισή τους είναι εύλογα από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις του 20<sup>ου</sup> αιώνα [Yigong Shi, 2014] (Σχήμα 1.5.1).

Οι πρώτες κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε ένζυμα και μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '60, είχαν προσδιοριστεί ήδη οι δομές της λυσοζύμης, της ριβονουκλεάσης A και S, της χυμοθρυψίνης και της καρβοξυπεπτιδάσης A. Αυτές οι δομές συμπεριλαμβανομένων και άλλων ενζύμων από το 1970 και έπειτα, αποκάλυψαν τις διαφορετικές διαμορφώσεις κέντρων πρόσδεσης και τους καταλυτικούς μηχανισμούς θέτοντας έτσι τα θεμέλια της μοριακής ενζυμολογίας. Η Protein Data Bank (PDB), η κύρια βάση δεδομένων τρισδιάστατων δομών μακρομορίων καθιερώθηκε το 1971 από το εργαστήριο του Brookhaven με 7 αρχικά καταθέσεις. Μέχρι το Σεπτέμβριο του

2015, υπήρχαν συνολικά 111.558 κατατεθειμένες δομές στην PDB, εκ των οποίων το 88.7% έχει προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, το 10.3% μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και μόλις το 0.8% μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (EM). Σε ακόμα μικρότερο ποσοστό, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται υβριδικές μεθοδοι που συμπεριλαμβάνουν και άλλες τεχνικές όπως η σκέδαση ακτίνων υπό μικρή γωνία (Small Angle X-ray Scattering, SAXS).



**Σχήμα 1.5.1** Η ιστορία της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X μέσα από τα βραβεία Νόμπελ που απονεμήθηκαν έως το 1962 και τον προσδιορισμό της πρώτης δομής πρωτεΐνης. Τα σημαντικά επιτεύγματα και οι εφαρμογές της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X έχουν συνολικά αναγνωριστεί με 28 βραβεία Νόμπελ.

### 1.5.2 Παρόν και μέλλον της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X

Η κρυσταλλογραφία μακρομορίων επιτρέπει τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης (3D) δομής μεγάλων μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Εξάλλου, μέσω της μεθόδου της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, εκτός από τη στατική εικόνα μιας τρισδιάστατης δομής, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η δυναμική συμπεριφορά πρωτεϊνών εφόσον είναι διαθέσιμες πολλές δομές με διαφορετικές διαμορφώσεις της ίδιας πρωτεΐνης [Acharya & Lloyd, 2005]. Βάσει της συνεισφοράς του πεδίου στην αποσαφήνιση της λειτουργίας και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, εμπλουτίζεται η επιστημονική γνώση και κατανόηση βασικών βιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών ενώ αποκρυπτογραφούνται «μονοπάτια» ασθενειών. Για το λόγο αυτό, μία από τις άμεσες πρακτικές εφαρμογές της είναι στο σχεδιασμό φαρμάκων διαδραματίζοντας νευραλγικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων ενώσεων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος [Garman, 2014].

Η ανακάλυψη από τους Bernal και Crowfoot το 1934 ότι οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι πεψίνης διατηρούν τη διάταξή τους εφόσον παραμείνουν ενυδατωμένοι σε σφραγισμένο τριχοειδή σωλήνα μετά το πέρας του πειράματος περίθλασης ακτίνων X, αποτέλεσε έναν ακόμη ακρογωνιαίο λίθο στο πεδίο της κρυσταλλογραφίας [Bernal & Crowfoot, 1934]. Αντίθετα με τους κρυστάλλους ανόργανων ουσιών ή μικρών οργανικών ενώσεων, οι μακρομοριακοί κρύσταλλοι είναι δυνατό να περιέχουν έως και 90% διαλύτη στο περιβάλλον των μορίων (συνήθως 30-70%) γεγονός που τους καθιστά «ευάλωτους» σε αλλοίωση από την έκθεση στις ακτίνες X επάγοντας αποδιάταξη στα μόρια που συνθέτουν το κρυσταλλικό πλέγμα [Acharya & Lloyd, 2005]. Αν και οι διαμοριακές και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν το κρυσταλλικό πλέγμα είναι ασθενείς, ωστόσο αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχία του πειράματος περίθλασης ακτίνων X αφού η διευθέτηση των μορίων και συνεπώς και το κρυσταλλικό πλέγμα, καταστρέφεται αν ο κρύσταλλος αφηθεί να αφυδατωθεί. Πληθώρα προκλήσεων σε τεχνικό επίπεδο στο χώρο της κρυστάλλωσης μακρομορίων ανακύπτουν από τη συγκεκριμένη ιδιότητα καθώς οι μακρομοριακές κρυσταλλικές δομές αποτελούν το μέσο όρο χωροχρονικά εκατομμυρίων μακρομορίων στο



εσωτερικό ενός κρυστάλλου με έναν θεωρητικά μεγάλο κρύσταλλο να έχει τυπικά διαστάσεις μικρότερες των 100 μm.

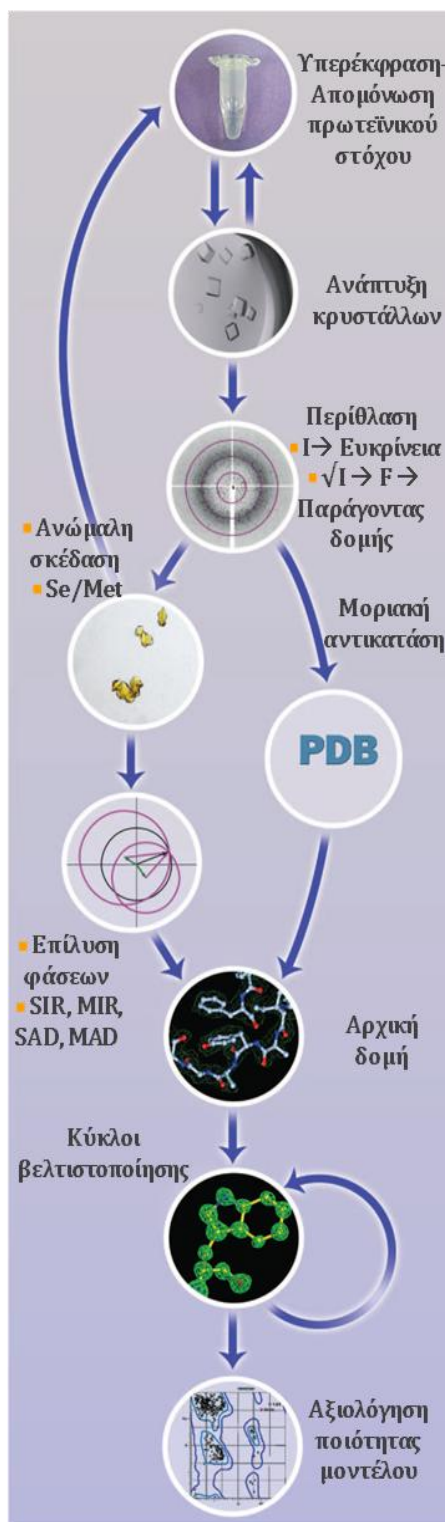
Τα τελευταία 20 χρόνια πάνω από 95% των μακρομοριακών δομών έχει προσδιοριστεί από κρυστάλλους που εκτίθενται στις ακτίνες X υπό κρυογονικές συνθήκες με τη χρήση ρεύματος αερίου αζώτου (100 K). Στις συγκεκριμένες συνθήκες, ο ρυθμός της καταστροφής του κρυσταλλικού πλέγματος από την ισχυρή ακτινοβολία μειώνεται κατά ~70% σε σύγκριση με την έκθεση σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου (~25 °C). Αν και οι βαθμοί των 100 K κάθε άλλο παρά είναι σχετικοί με τις φυσιολογικές θερμοκρασίες του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος, εντούτοις στο σύνολο των δομών που έχουν προσδιοριστεί στις συνθήκες αυτές, τα μόρια ύδατος, οι πιθανοί προσδέτες και οι εναλλακτικές διαμορφώσεις των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων τείνουν να είναι σαφέστερα ορισμένα. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην απαλοιφή της δυναμικής αταξίας των μορίων ενδοκρυσταλλικά και τελικά την καταγραφή μόνο της στατικής τους αταξίας κατά το χρόνο της έκθεσης τους στις ακτίνες X υπό το ρεύμα αζώτου.

Οι παρούσες εξελίξεις στο πεδίο της κρυσταλλογραφίας υπόσχονται μια νέα γενιά ανακαλύψεων και εφαρμογών για την αποκρυπτογράφηση των μυστικών της ζωής. Η κρυσταλλογραφία μεμβρανικών πρωτεϊνών (που αποτελούν το 30% των πρωτεϊνών του ανθρώπινου οργανισμού), η συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X σε εκσυγχρονισμένες υποδομές πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας και οι νέες εγκαταστάσεις παραγωγής υπερ-βραχύχρονων παλμών ακτίνων X (X-ray free-electron lasers, XFELs) διανοίγουν νέους ορίζοντες στον ευρύτερο χώρο των φυσικών επιστημών. Αρχικές αρνητικές προβλέψεις βραχυπρόθεσμου κορεσμού του πεδίου της κρυσταλλογραφίας και μονοπώλησης του ερευνητικού ενδιαφέροντος από τη Δομική Γονιδιωματική απέχουν πολύ από την πραγματικότητα. Από τις απαρχές της το 1913 με τον προσδιορισμό της δομής του NaCl που αποκάλυψε την κρυσταλλική φύση του ετεροπολικού δεσμού, έως τη δυνατότητα, σήμερα, να ταυτοποιούνται δομές βιολογικών μορίων που περιλαμβάνουν μέχρι και 300.000 μη υδρογονικά άτομα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X συνεχίζει να βρίσκεται στην κεντρική σκηνή ως απαραίτητο επιστημονικό εργαλείο [Garman, 2014].

### 1.5.3 Εισαγωγή στον προσδιορισμό μιας τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Νέες τεχνολογίες και μεθοδολογίες τροφοδοτούν συνεχώς τα διαδοχικά στάδια (Σχήμα 1.5.2) για τον προσδιορισμό μιας τρισδιάστατης μακρομοριακής δομής βελτιώνοντας τα ποσοστά επιτυχίας. Ωστόσο, το καίριο πρώτο βήμα συνεχίζει να αποτελεί η ανάπτυξη κρυστάλλων κατάλληλης ποιότητας για τη συλλογή δεδομένων υψηλής περιθλαστικής ικανότητας. Πριν τη δοκιμασία κρυστάλλωσης, απαιτείται η απομόνωση σε ικανοποιητική ποσότητα και υψηλή καθαρότητα του πρωτεϊνικού στόχου προς ταυτοποίηση, στόχος εφικτός πλέον με την πληθώρα διαθέσιμων συστημάτων πρωτεϊνικής έκφρασης σε συνδυασμό με τα εργαλεία βιοπληροφορικής και κλωνοποίησης. Ειδικότερα, η απομόνωση μπορεί να γίνει από φυσικές πηγές, ωστόσο η πιο διαδεδομένη τεχνική αφορά στο σχεδιασμό κλώνων DNA και στην υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης σε συστήματα προκαρυωτικών ή ευκαρυωτικών ξενιστών. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα μετάλλαξης αμινοξέων της ώστε να μειωθεί η ευκινησία περιοχών που εμποδίζουν την κρυστάλλωση όπως αμινο-τελικά και καρβοξυ-τελικά άκρα ή αποκλειστικής έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνικών περιοχών ενδιαφέροντος όπως είναι το καταλυτικό κέντρο ενός ενζύμου. Σημαντική εξέλιξη αποτελεί η ανάπτυξη αυτότροφων στελεχών για την εισαγωγή σεληνομεθειονίνης (Se/Met) σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ώστε να είναι δυνατή η συλλογή δεδομένων ανώμαλης σκέδασης για την επίλυση του προβλήματος φάσεων προς την επίλυση μιας δομής (Hendrickson & Ogata, 1997).

Η επόμενη φάση περιλαμβάνει την κρυστάλλωση του μακρομορίου. Το στάδιο αυτό καθορίζεται από ποικίλες μεταβλητές παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς, το pH κλπ. των οποίων ο ρόλος είναι πλέον κατανοητός, ωστόσο η ρύθμισή τους δεν εξασφαλίζει πάντα την πρόβλεψη των συνθηκών κρυστάλλωσης. Η σχετική μεθοδολογία στηρίζεται σε ένα σύνολο αρχών, τεχνικών, και ιδεών. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη κρυστάλλων μακρομορίων παραμένει μια σε αρκετό βαθμό εμπειρικής φύσης διεργασία που απαιτεί υπομονή, επιμονή και διαίσθηση από πλευράς του ερευνητή. Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια συστηματική προσέγγιση στη χρήση των κλασικών



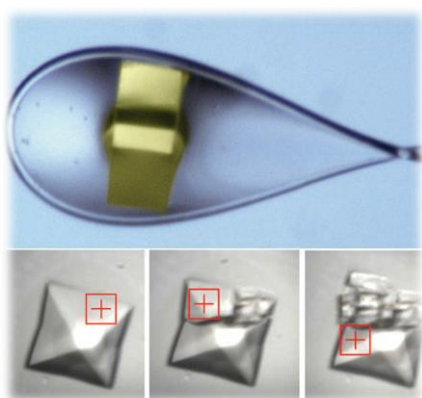
**Σχήμα 1.5.2** Διάγραμμα ροής των σταδίων που περιλαμβάνονται κατά τον προσδιορισμό μιας τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Πηγή εικόνας: Garman, 2014).

μεθόδων φυσικοχημείας για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών και των μηχανισμών που διέπουν την αυτοδιάταξη μεγάλων βιομορίων σε κρυσταλλικά πλέγματα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, είναι αξιοσημείωτη η συνεισφορά των εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων που προσφέρουν τη δυνατότητα ταχείας σάρωσης ευρύτατου φάσματος χημικών συνθηκών για τα πειράματα κρυστάλλωσης στη βάση μιας μεθοδολογίας δοκιμής και σφάλματος (trial and error) [McPherson & Gavira, 2013].

Στη συνέχεια, η επιτυχημένη «υαλοποίηση» (Εικόνα 1.5.1) ενός κρυστάλλου για τη συλλογή δεδομένων υπό κρυογενείς συνθήκες απαιτεί την παρουσία κατάλληλων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων. Η παραλαβή από τη σταγόνα του διαλύματος κρυστάλλωσης με τη χρήση μικρών ινών σε σχήμα βρόχου που συγκρατούν τον κρύσταλλο μέσω της επιφανειακής τάσης και ακολούθως το ακαριαίο «πάγωμα» με την έκθεση του σε ρεύμα N<sub>2</sub> αποτελούν βήματα που δεν επιδέχονται πλήρη αυτοματοποίηση.

Το ακόλουθο στάδιο της έκθεσης στις ακτίνες X και η συλλογή δεδομένων περίθλασης περιλαμβάνει πλέον την αξιοποίηση των σύγχρονων τρίτης γενιάς πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας σε συνδυασμό με ταχείς και υψηλής ακρίβειας ανιχνευτές. Η εξαιρετικά υψηλής και ελεγχόμενα κυμαινόμενης ενέργειας πηγή

συγχροτρονικής ακτινοβολίας, καθιστά εφικτή τη χρήση ακόμα και μικρών ασθενούς περιθλαστικής ικανότητας κρυστάλλων για τον προσδιορισμό μιας δομής μακρομορίου. Η ενέργεια και επομένως το μήκος κύματος των ακτίνων X δύναται να ρυθμιστεί ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή μεθόδων για τον προσδιορισμό των φάσεων όπως η ανώμαλη σκέδαση από βαρέα μέταλλα που έχουν προσδεθεί στο υπό εξέταση βιομόριο (Multiwavelength Anomalous Dispersion, MAD).



**Εικόνα 1.5.1** Κρύσταλλοι μακρομορίων κατά την έκθεση στις ακτίνες X. (πάνω) Κρύσταλλος σε ρεύμα  $N_2$  «υαλοποιημένος» από το φιλμ του διαλύματος κρυσπροστασίας προς αποφυγή πάγου. (κάτω) In situ διαδοχική σημειακά στοχευμένη συλλογή δεδομένων παρά την εμφανή αλλοίωση του κρυσταλλικού πλέγματος. (Πηγή εικόνας: Garman, 2014)

Εξάλλου, η αυτοματοποίηση, πλέον, της επεξεργασίας δεδομένων κατά τη συλλογή δεδομένων στο σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας έχει επιταχύνει και βελτιστοποιήσει το επόμενο στάδιο. Ο εκσυγχρονισμός του λογισμικού και η δυνατότητα αξιολόγησης των συλλεχθέντων δεδομένων παράλληλα με την εξέλιξη του πειράματος έκθεσης του κρυστάλλου στις ακτίνες X, επηρεάζει θετικά την επιτυχία του αποτελέσματος. Ταυτόχρονα, προσφέρεται η δυνατότητα υπολογισμού του εναπομείναντος χρόνου πριν την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος λόγω των μεγάλων δόσεων ισχυρής ακτινοβολίας και ανάλογης προσαρμογής της στρατηγικής συλλογής δεδομένων ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα δεδομένων περίθλασης ακτίνων X. Τα υπολογιστικά προγράμματα επεξεργασίας και βελτιστοποίησης έχουν εξελιχθεί σε τέτοιο βαθμό που μέθοδοι όπως αυτή της μοριακής αντικατάστασης μπορούν να οδηγήσουν στον επιτυχή προσδιορισμό μιας τρισδιάστατης δομής με τη χρήση έστω και μικρής ομολογίας αρχικών μοντέλων για την επίλυση του

προβλήματος των φάσεων. Ακόμα και σε περιπτώσεις που μια επίλυση της δομής δεν είναι εφικτή η διαθέσιμη ποικιλία υπολογιστικών προγραμμάτων μπορεί να ανιχνεύσει τις «παθολογίες» που οδήγησαν σε αποτυχία.

Μετά τον προσδιορισμό του αρχικού μοντέλου του εξεταζόμενου μακρομορίου, ακολουθεί η βελτιστοποίησή του έναντι των πειραματικών δεδομένων ώστε να «οικοδομηθεί» κατάλληλα στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Στα «εργαλεία» της κρυσταλλογραφίας συμπεριλαμβάνονται σήμερα υπολογιστικά προγράμματα που αυτοματοποιούν αυτούς τους κύκλους ανακατασκευής. Η βελτίωση ακόμα και του γραφικού περιβάλλοντος είναι εξαιρετικής σημασίας για τον ερευνητή ώστε η αναπαράσταση των πρωτεϊνικών μοντέλων και των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας να είναι πιο εύχρηστη και αξιόπιστη. Τέλος, η αξιολόγηση της ποιότητας και επαλήθευση της γεωμετρίας του βελτιστοποιημένου μοντέλου πριν την κατάθεση των ατομικών του συντεταγμένων στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB ολοκληρώνει την πολυπαραγοντική αυτή μεθοδολογία της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X [Garman, 2014].

#### 1.5.4 Πηγές ακτίνων X

Οι ακτίνες X ανήκουν στο ευρύτερο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και αντιστοιχούν σε μήκος κύματος 0.1-100 Å (1 Å = 0,1 nm). Είναι προϊόν της πρόσπτωσης ηλεκτρονίων υψηλών ταχυτήτων σε υλικά με αποτέλεσμα τη μετατροπή της κινητικής τους ενέργειας σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία του εύρους των ακτίνων X και κάποιου ποσοστού σε θερμότητα. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις των μορίων ώστε να είναι δυνατή η συλλογή δεδομένων περίθλασης σε ευκρίνεια ατομικής κλίμακας (1 Å).

Η βασική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την τοποθέτηση του κρυστάλλου σε γωνιόμετρο το οποίο περιστρέφεται κατά μικρή γωνία, την έκθεσή του σε εστιασμένη δέσμη ακτίνων X και την καταγραφή των περιθλάσεων στον ανιχνευτή. Οι διαθέσιμες πηγές ακτίνων X διαχωρίζονται στις συμβατικές και τις

συγχροτρονικές πηγές ενώ πρόσφατα ξεκίνησε και διαρκώς αναπτύσσεται ο κλάδος των πηγών υπερ-βραχύχρονων παλμών ακτίνων X.

Όσον αφορά στις συμβατικές πηγές, εγκατεστημένες κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια, η παραγωγή ακτίνων X βασίζεται στην απελευθέρωση ακτινοβολίας μετά από την επιτάχυνση ηλεκτρονίων εντός ηλεκτρικού πεδίου με αποτέλεσμα την ηλεκτρονιακή μετάπτωση του μεταλλικού στόχου της πηγής. Ειδικότερα, οι συμβατικές πηγές αποτελούνται είτε από μια λυχνία υψηλού κενού (~10 – 7 mm Hg), εφοδιασμένη με μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως χαλκός, Cu, ή μολυβδαίνιο, Mo) είτε από μια περιστρεφόμενη άνοδο, η οποία συνοδεύεται από μια πηγή υψηλής τάσης (20 – 70 kV). Η πηγή εκπέμπει ηλεκτρόνια τα οποία προσπίπτουν στο μεταλλικό στόχο προκαλώντας τη διέγερση του μετάλλου τα ηλεκτρόνια του οποίου κατά την αποδιέγερση τους μεταπίπτουν σε χαμηλότερες ενεργειακά στάθμες παράγοντας ακτίνες X. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται άνοδος αντί για λαμπτήρας ανόδου, αυτή ψύχεται με ροή ύδατος ενώ αποτελεσματική ψύξη πραγματοποιείται και με χρήση περιστρεφόμενης ανόδου κατά την εξέλιξη του πειράματος. Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργειες της τάξης των keV.

Σε αντίθεση με τις συμβατικές πηγές ακτίνων X, οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας απαιτούν μεγάλες εγκαταστάσεις (Εικόνα 1.5.2). Πιο συγκεκριμένα, δακτύλιοι εξαιρετικά μεγάλων διαστάσεων (διαμέτρου της τάξης των Km) λειτουργούν ως φορείς αποθήκευσης επιταχυμένων σωματιδίων. Η επιτάχυνση επιτυγχάνεται μέσω συστοιχίας ισχυρών ηλεκτρομαγνητών και τους προσδίδει σχετικιστικές ταχύτητες (της τάξης της ταχύτητας του φωτός). Πιο αναλυτικά, δέσμες φωτονίων υψηλής ενέργειας (GeV) εισέρχονται στους δακτυλίους όπου υπό την επίδραση μαγνητών κάμψης τίθενται σε καμπύλη τροχιά διατηρώντας την ενέργειά τους αλλά αποκτώντας επιτάχυνση να εκπέμπουν ακτίνες X υψηλής ενέργειας, «σκληρές ακτίνες X» (0.1 – 1 Å). Στη συνέχεια, κάτοπτρα εστίασης και μονοχρωμάτορες παράγουν τη μονοχρωματική ευθυγραμμισμένη δέσμη ακτίνων X.



**Εικόνα 1.5.2** Αεροφωτογραφία των εγκαταστάσεων της συγχροτρονικής πηγής ακτίνων X (European Synchrotron Radiation Facility, ESRF) στη Grenoble της Γαλλίας. Στην εικόνα φαίνεται ο προεπιταχυντής (storage ring) συγχροτρονικής ακτινοβολίας (Πηγή εικόνας: <http://www.lightsources.org/facility/esrf>).

Σημαντικό πλεονέκτημα των συγχροτρονικών πηγών ακτινοβολίας έναντι των συμβατικών είναι η λαμπρότητά τους (brilliance) που χαρακτηρίζει περιγραφικά την υψηλή ένταση και ευθυγράμμιση της δέσμης ακτίνων X και χρησιμοποιείται για συγκρίσεις οπτικής ποιότητας των πηγών. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα ενώ λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι περιθλάσεις είναι πιο ευδιακριτές. Μία άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η δυνατότητα ρύθμισης του μήκους κύματος (tunability) το εύρος του οποίου κυμαίνεται από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων X. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες διαφορετικών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες X μήκους κύματος  $1 \text{ \AA}$  ή μικρότερου με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου,

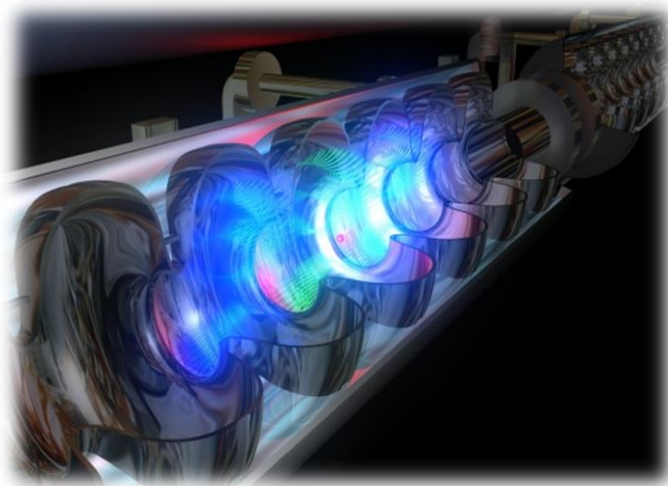


περιορίζοντας έτσι την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος αυξάνοντας το χρόνο ζωής του κρυστάλλου κατά την έκθεση του στη δέσμη ακτινοβολίας. Ο χρόνος ζωής των σωματιδίων στο δακτύλιο αποθήκευσης είναι περιορισμένος και όταν η ένταση της ακτινοβολίας φτάσει κάποιο ελάχιστο όριο απελευθερώνεται νέα δέσμη φωτονίων [Rhodes 1999, Cornuejols, 2000, Helliwell, 2015].

Η τρίτη γενιά συγχροτρονικών εγκαταστάσεων περιλαμβάνει εξαιρετικά υψηλής ροής εντάσεις ακτινοβολίας (φωτόνια ανά  $\text{sec}^{-1}$  ανά  $\text{mm}^2$ ) και σταθερές παράλληλες δέσμες φωτονίων που ρυθμίζονται να αποδώσουν ακτινοβολία X ενεργειακής τάξης 6-20 keV ( $\sim 2.1 - 0.62 \text{ \AA}$ ). Η συνεχής επανατροφοδότηση των συγχροτρονικών πηγών με ηλεκτρόνια έχει ως αποτέλεσμα σταθερότερες πειραματικές συνθήκες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Παράλληλα, η τεχνολογία των διαθέσιμων ανιχνευτών έχει εξελιχθεί ακολουθώντας την απαίτηση για μεγαλύτερους, ταχύτερους ανιχνευτές μεταβαλλόμενης θέσης. Οι ανιχνευτές διάταξης συζευγμένου φορτίου (charge-coupled device detectors, CCD) αντικαθίστανται από εξαιρετικά ταχείς (max 100 περιθλασιγράμματα/sec) ανιχνευτές διάταξης pixel (pixel array X-ray detectors, PADs). Εξάλλου, πολλές συγχροτρονικές εγκαταστάσεις χρησιμοποιούν πλέον και ρομποτικά συστήματα για την έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες X ώστε να είναι δυνατός ο απομακρυσμένος έλεγχος του πειράματος από τον ερευνητή χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία του κατά τη συλλογή δεδομένων. Ακόμα, οι δέσμες μικρής εστίασης (microfocus) (διαμέτρου έως 1 mm) επιτρέπουν, με τη βοήθεια κατάλληλου υποστηρικτικού λογισμικού, την παράλληλη χαρτογράφηση περισσότερων περιοχών ενός κρυστάλλου ώστε η έκθεσή του στις ακτίνες X να γίνει εκλεκτικά στη βέλτιστη εξ' αυτών ώστε να διασφαλιστεί η μείωση του «θορύβου» κατά τη συλλογή των δεδομένων (Εικόνα 1.5.1). Με τον τρόπο αυτό καθίσταται εφικτή η επιτυχής συλλογή δεδομένων ακόμα και με χρήση μικροκρυστάλλων. Παραδείγματα τέτοιων πηγών εξαιρετικά υψηλής λαμπρότητας (brilliance) αποτελούν η εγκατάσταση PETRA III στο EMBL-Hamburg Unit στο Αμβούργο της Γερμανίας και η NSLS II στις Η.Π.Α. [Garman, 2014, Helliwell, 2014].



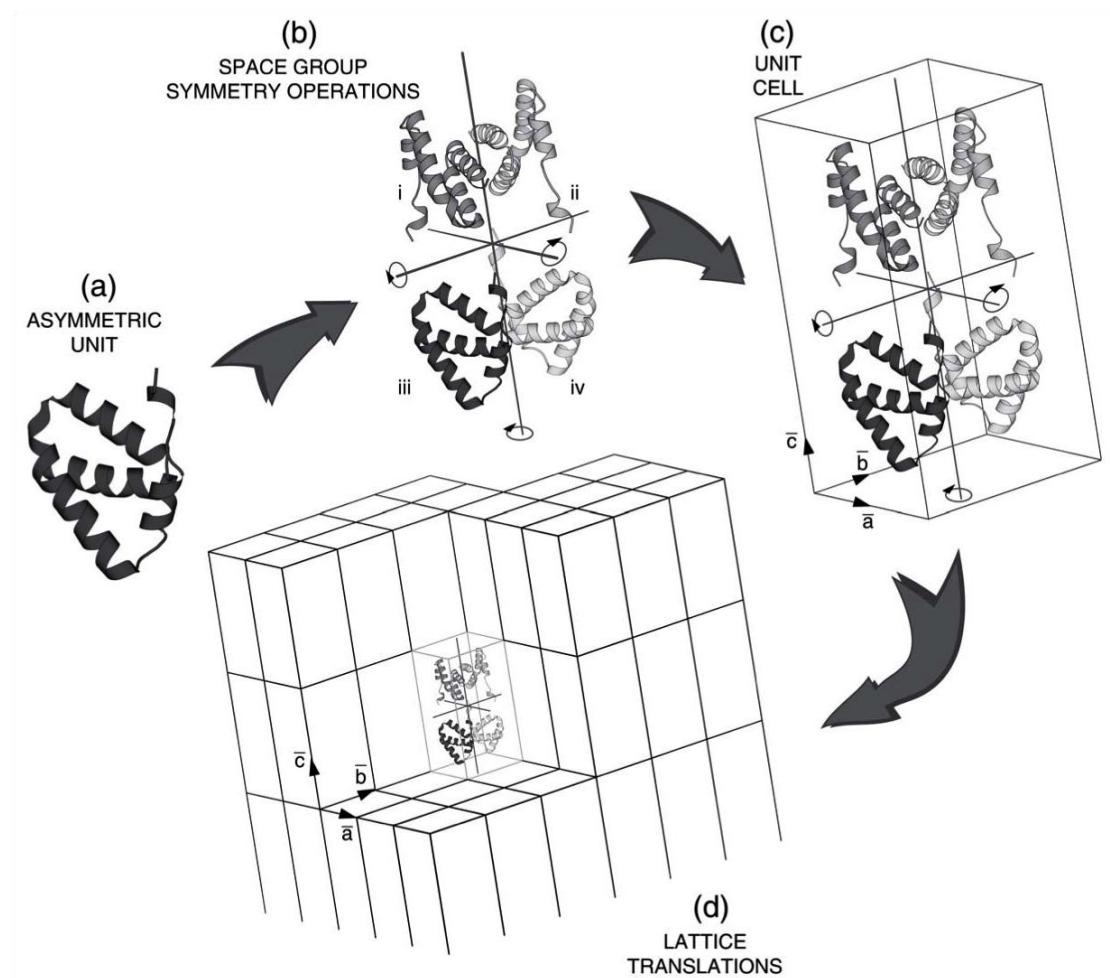
Παράλληλα με την εξέλιξη των πηγών ακτίνων X, έχει αρχίσει η λειτουργία εγκαταστάσεων λείζερ παραγωγής υπερ-βραχύχρονων παλμών ακτίνων X (X-ray Free Electron Laser, XFEL) λαμπρότητας που υπερβαίνει κατά ένα δισεκατομμύριο φορές τις πιο ισχυρές συμβατικές πηγές. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε γραμμικούς επιταχυντές μεγάλου μήκους και υπεραγωγίσιμους ενισχυτές ακτινοβολίας ηλεκτρονίων που διασχίζουν ειδικές διατάξεις μαγνητών καθώς κινούνται σε επίμηκη διεύθυνση (Εικόνα 1.5.3). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή εξαιρετικά βραχύχρονων (της τάξης 100 fs) και ισχυρών παλμών ακτίνων X ( $10^{13}$  φωτόνια). Το εκπληκτικό πλεονέκτημα της καινοτόμου μεθόδου έγκειται στο ότι η αλληλεπίδραση του κρυστάλλου με τον παλμό υπερπηδά το πρόβλημα των μεγάλων δόσεων ακτινοβολίας που απαιτούνται για τη συλλογή ικανοποιητικού αριθμού δεδομένων περίθλασης με τις ionίζουσες ακτίνες X να επιφέρουν ταυτόχρονα δομικές αλλαγές και τελικά καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη συλλογή πλήθους κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X σε θερμοκρασία δωματίου και τη χρήση νανοκρυστάλλων. Μια τέτοια πηγή απαντάται στο Στάνφορντ των Η.Π.Α. (LCLS) ενώ είναι υπό κατασκευή η πολλά υποσχόμενη Ευρωπαϊκή υποδομή EuroXFEL στο Αμβούργο της Γερμανίας [Chapman *et al.* 2011, Garman, 2014].



**Εικόνα 1.5.3** Αναπαράσταση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων που επιταχύνουν τα ηλεκτρόνια μέσω διάταξης υπεραγωγίσιμων ανιχνευτών στις μελλοντικές εγκαταστάσεις του European XFEL στο DESY του Αμβούργου, Γερμανία (Πηγή εικόνας: <http://www.xfel.eu/>).

### 1.5.5 Κρυστάλλωση πρωτεϊνικών στόχων

Ένας κρύσταλλος αποτελεί μια περιοδική διάταξη στοιχειωδών δομικών μονάδων του μορίου που καλούνται μοναδιαίες κυψελίδες. Η στοιχειώδης μοναδιαία κυψελίδα αντιπροσωπεύει πλήρως την τρισδιάστατη δομή και περιγράφεται από τρία διανύσματα  $a$ ,  $b$  και  $c$  και τρεις γωνίες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  που ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και την ορίζουν πλήρως (Σχήμα 1.5.3).



**Σχήμα 1.5.3** Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας (asymmetric unit, a), από την οποία με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας (space group, symmetry operators, b) προκύπτει η μοναδιαία κυψελίδα (unit cell, c). Η περιοδική επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας οδηγεί στο σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος (lattice, d) (Πηγή εικόνας: McPherson, 2009).

Η ασύμμετρη μονάδα αποτελεί το μικρότερο τμήμα το οποίο με εφαρμογή των αντίστοιχων τελεστών συμμετρίας που ορίζονται από την ομάδα χώρου συμμετρίας του κρυσταλλικού πλέγματος, συνθέτει στο σύνολό της τη μοναδιαία κυψελίδα. Καθώς η περιθλαστική ικανότητα ενός μόνο μορίου θα ήταν ασθενής και μη ανιχνεύσιμη ο κρύσταλλος δρα ως νευραλγικής σημασίας ενισχυτής της περίθλασης των ακτίνων X [Lattman & Loll, 2008]. Η ποιότητα της περίθλασης ακτίνων X ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου όπως αποτυπώνεται στο περιθλασίγραμμα καθώς ο βαθμός ακρίβειας με τον οποίο μπορούν να καθοριστούν οι ατομικές συντεταγμένες από τον προδιορισμό μιας κρυσταλλικής δομής σχετίζονται άμεσα με το βαθμό της εσωτερικής «τάξης» που τον διέπει. Η υψηλή ευκρίνεια αντικατοπτρίζει μια δομική ομοιομορφία των μορίων ως προς τη διευθέτησή τους μέσα στον κρύσταλλο καθώς και μια ακρίβεια στην περιοδική τους διάταξη [McPherson, 2014].

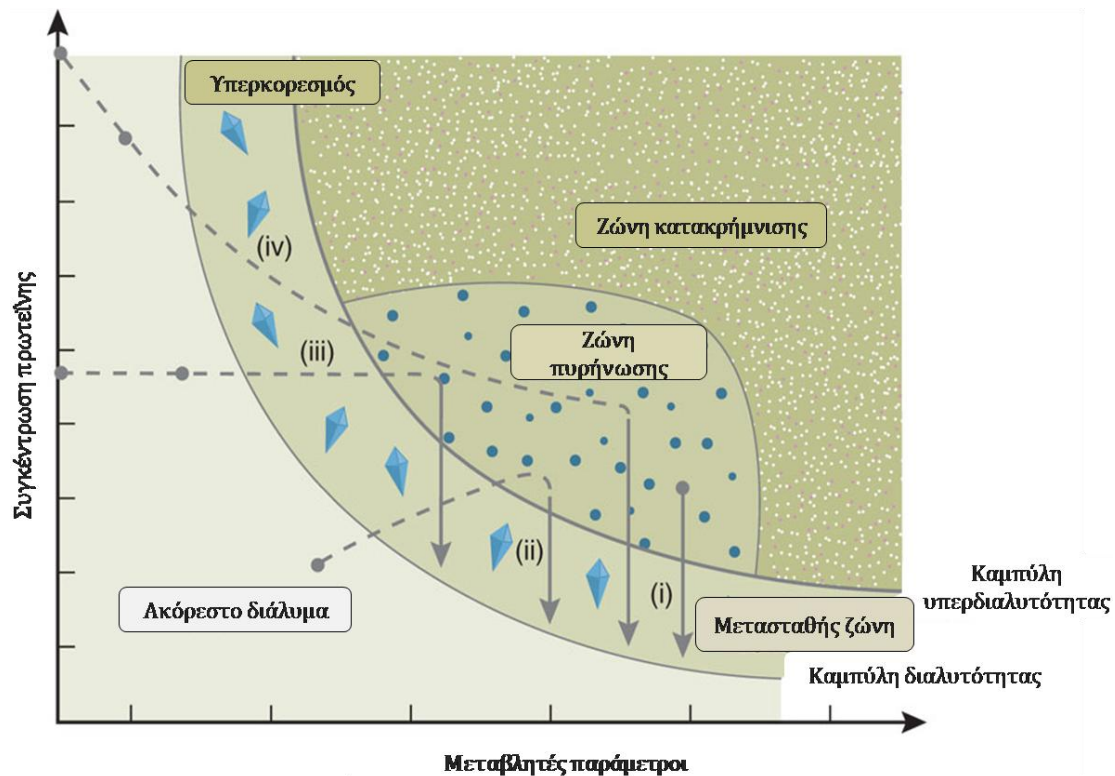
Η μεθολογία της κρυστάλλωσης βιομορίων βασίζεται στη δημιουργία ενός υπερκορεσμένου διαλύματος οι ιδιότητες του οποίου δεν παρεμποδίζουν τη φυσική κατάσταση του μακρομορίου. Ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται με προσθήκη φυσικών αλάτων ή πολυμερών και με τη ρύθμιση ποικίλων παραμέτρων οι οποίες περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, την ιονική ισχύ και το pH. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή του μακρομορίου όπως μεταλλικά ιόντα, προσδέτες και συμπαράγοντες (Πίνακας 1.5.1). Για την ταυτόχρονη διερεύνηση πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης έχει αναπτυχθεί πλειάδα εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων τα οποία χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ρομποτικές διατάξεις. Οι αυτοποιημένες αυτές μέθοδοι έχουν πολλαπλασιάσει το ποσοστό επιτυχίας στην εύρεση των κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης ενώ παράλληλα έχουν συμβάλει στην ελαχιστοποίηση των χρησιμοποιούμενων όγκων πρωτεϊνικού δείγματος (της τάξης των μερικών  $\mu\text{L}$  ή ακόμα και  $\text{nL}$ ). Η συγκεκριμένη βελτίωση είναι ιδιαίτερης σημασίας ειδικά για πρωτεΐνες που παρουσιάζουν δυσκολία στην παρασκευή τους όπως οι μεμβρανικές πρωτεΐνες.

**Πίνακας 1.5.1** Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών [McPherson, 1999].

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας	pH	Καθαρότητα
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Βαρύτητα	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Πίεση	Ιοντική ισχύς	Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση /υδρόλυση
Ηλεκτρικό / μαγνητικό πεδίο	Αναγωγικό / οξειδωτικό περιβάλλον	Χημική τροποποίηση
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Γενετικές τροποποιήσεις
Ιξώδες (viscosity)	Μεταλλικά ιόντα	Συμμετρία
Κατάσταση ισορροπίας	Σταυροδεσμοί	Σταθερότητα
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	Απορρυπαντικά/επιφανειο- δραστικές ουσίες/αμφολύτες	Ισοηλεκτρικό σημείο
	Προσμίξεις	Ιστορικό δείγματος

Ο προσδιορισμός των συνθηκών κρυστάλλωσης έχει ως επόμενο στάδιο τη βελτιστοποίησή τους. Η κρυστάλλωση οποιουδήποτε μακρομορίου εξελίσσεται με δύο διακριτά αλλά αδιαχώριστα βήματα: την πυρήνωση και την ανάπτυξη. Η πυρήνωση αποτελεί τη μεγαλύτερη πρόκληση αφού αντιπροσωπεύει μια μεταβατική φάση κατά την οποία τα μόρια μεταβαίνουν από ένα στάδιο πλήρους αποδιάταξης σε αυτό της οργανωμένης διευθέτησης στο χώρο. Αυτό διαφαίνεται να συμβαίνει μέσω σχηματισμού μερικώς διατεταγμένων ή κρυσταλλικών ενδιαμέσων που οδηγούν σε «κρίσιμους πυρήνες». Το στάδιο της πυρήνωσης ακολουθεί η ανάπτυξη του κρυστάλλου σε δύο και τρεις διαστάσεις διαδοχικά. Το κοινό χαρακτηριστικό της ανάπτυξης και της πυρήνωσης είναι ότι και τα δύο στάδια εξαρτώνται από τον υπερκορεσμό του μητρικού διαλύματος, ενώ η συνολική διαδικασία περιγράφεται από ένα διάγραμμα

φάσης (Σχήμα 1.5.4). Στον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος βρίσκεται η τιμή της παραμέτρου που επηρεάζει την κατακρήμιση της πρωτεΐνης (π.χ. άλατα) και στον κάθετο άξονα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα κρυστάλλωσης.



**Σχήμα 1.5.4** Σχηματική παρουσίαση του διαγράμματος φάσεων κατά την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης. Διακρίνονται οι τέσσερις κύριες μέθοδοι κρυστάλλωσης: **i**) η τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμισης (microbatch), **ii**) η τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapour diffusion), **iii**) η διαπίδυση (Dialysis) και **iv**) η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (Free-interface diffusion, FID). Η κάθε τεχνική αποτελεί μια διαφορετική οδό για την επίτευξη πυρήνωσης και μετασταθών ζωνών θεωρώντας ως ρυθμιστική παράμετρο τη συγκέντρωση του κατακρημιστικού παράγοντα. Οι μαύρες κηλίδες αντιπροσωπεύουν τις αρχικές συνθήκες και στην περίπτωση της μεθόδου διάχυσης ελεύθερης επιφάνειας παρουσιάζονται δύο εναλλακτικά σημεία εκκίνησης καθώς το ακόρεστο πρωτεϊνικό διάλυμα μπορεί να περιέχει είτε μόνο την πρωτεΐνη είτε μίγμα αυτής με χαμηλής συγκέντρωσης κατακρημιστικού παράγοντα. Η διαλυτότητα ορίζεται ως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διαλύτη στην οποία βρίσκεται σε ισορροπία με πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Η καμπύλη υπερδιαλυτότητας ορίζεται ως το όριο διαχωρισμού συνθηκών κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα αυθόρμητη πυρήνωση (ή διαχωρισμός φάσεων ή κατακρήμιση), από εκείνες στις οποίες το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι διαυγές. (Πηγή εικόνας: Chayen & Saridakis, 2008).

Πιο αναλυτικά, η κύρια καμπύλη διαλυτότητας (solubility curve), υποδεικνύει τη μέγιστη διαλυτότητα σε καθορισμένες συγκεντρώσεις καταβυθιστικού ενώ για τιμές κάτω από την καμπύλη αυτή το σύστημα βρίσκεται σε μη κορεσμένη/ακόρεστη κατάσταση (undersaturation) και για τιμές πάνω από την

καμπύλη σε κατάσταση υπερκορεσμού (supersaturation). Η περιοχή υπερκορεσμού, τέλος, αποτελείται από τρεις λιγότερο διακριτές ζώνες:

- Τη μετασταθή ζώνη (metastable zone), όπου δεν παρατηρείται σχηματισμός νέων πυρήνων κρυστάλλωσης αλλά ευνοείται η ανάπτυξη ήδη υπάρχοντων κρυστάλλων που λειτουργούν ως πυρήνες (seeding).
- Τη μεταβλητή ζώνη (labile zone) όπου μπορεί να λάβει χώρα τόσο πυρήνωση (nucleation) όσο και ο σχηματισμός και ανάπτυξη πυρήνων και κρυστάλλων.
- Τη ζώνη κατακρήμνισης (precipitation zone), όπου παρατηρείται ο σχηματισμός άμορφου ιζήματος.

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο διαλύτης και ο σχηματισμός των καναλιών και των κοιλοτήτων στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους όπου αυτός διαχέεται καθώς σχετίζεται με την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης που θα συλλεγούν και ως εκ τούτου με την ευκρίνεια στην οποία θα προσδιορισθεί η τρισδιάστατη δομή. Το υψηλό περιεχόμενο σε διαλύτη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη καθώς το κάθε μακρομόριο στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους περιβάλλεται από στρώσεις ύδατος που διατηρούν τη δομή του σχεδόν πανομοιότυπη με αυτή όταν βρίσκεται σε διάλυμα. Συνεπώς, οι προσδέτες, τα ενζυμικά και η πλειονότητα των βιοχημικών χαρακτηριστικών είναι όμοια με αυτά του πλήρως διαλυτοποιημένου βιομορίου. Λόγω των εκτενών περιοχών που καταλαμβάνουν τα μόρια διαλύτη, τα πρωτεϊνικά μόρια στον κρύσταλλο δύνανται να καταλαμβάνουν ισοδύναμες αλλά όχι ταυτόσημες διαμορφώσεις ώστε να προάγονται ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις τους. Ως εκ τούτου, ιόντα, υποστρώματα, συνένζυμα, προσδέτες μπορούν να διαχέονται ελεύθερα μέσα και έξω από τους κρυστάλλους ενώ ενζυμικοί κρύσταλλοι, αν και «ακίνητοποιημένοι», είναι πλήρως προσβάσιμοι για πειράματα διερεύνησης της καταλυτικής τους δράσης απλά με τροποποίηση του μητρικού διαλύματος που τους περιβάλλει [McPherson, 2014].

### 1.5.6 Περίθλαση ακτίνων X και προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης

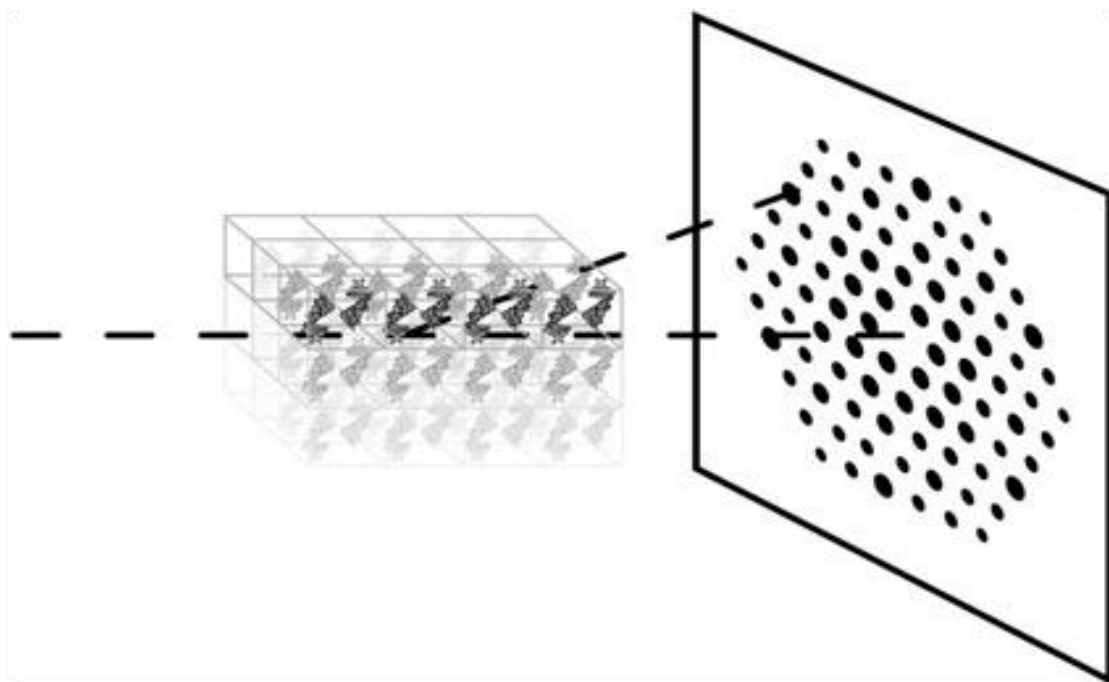
Το φαινόμενο κατά το οποίο το φως (ηλεκτρομαγνητικό κύμα) αλλά και οποιοδήποτε κύμα αποκλίνει από την ευθύγραμμη πορεία του όταν συναντήσει εμπόδιο ή οπή της τάξης του μήκους κύματος των διαδομένων κυμάτων ονομάζεται περίθλαση. Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος της τάξης του 0.1-100 Å γεγονός που καθιστά ανέφικτη τη δημιουργία φράγματος τόσο μικρού εύρους για τη μελέτη της περίθλασής τους. Ωστόσο, ο Max von Laue διατύπωσε την ιδέα της αξιοποίησης ενός κρυστάλλου ως φράγμα για τη μελέτη της περίθλασης των ακτίνων X θεμελιώνοντας έτσι την αρχή προσδιορισμού δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και για το λόγο αυτό βραβεύτηκε με το Nobel φυσικής το 1914. Παράλληλα, με στόχο την ερμηνεία των φαινομένων περίθλασης των ακτίνων X, ο W.L. Bragg υπέθεσε ότι τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα που σχηματίζουν τα άτομα του κρυστάλλου ανακλούν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα γι' αυτό και οι περιθλώμενες ακτινοβολίες καλούνται και ανακλάσεις. Οι ακτίνες X που ανακλώνται από τα γειτονικά επίπεδα, διανύουν διαφορετικές αποστάσεις και ο Bragg έδειξε ότι περίθλαση λαμβάνει χώρα όταν για 2 γειτονικά επίπεδα η διαφορά στη διαδρομή των ακτίνων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της δέσμης των ακτίνων. Ο νόμος του Bragg ορίζει ότι παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα με δείκτες  $h, k, l$  και διεπιφανειακή απόσταση  $d_{hkl}$  παράγουν ανάκλαση, όταν ακτίνα X μήκους κύματος  $\lambda$  προσπίπτει στα επίπεδα υπό γωνία  $\theta$  και ανακλάται υπό την ίδια γωνία, όταν η γωνία  $\theta$  υπακούει στη συνθήκη:

$$2d_{hkl}\sin\theta=n\lambda \quad (\text{Νόμος του Bragg})$$

Όπου  $n$ = ακέραιος αριθμός που καλείται και τάξη ανάκλασης

Τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα με δείκτες  $h, k, l$  (γνωστοί και ως δείκτες Miller) μπορούν να περιγραφούν από τις συντεταγμένες των σημείων τομής τους με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες  $a, b$  και  $c$ . Ο νόμος του Bragg αναφέρεται στην ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή των κυμάτων όταν πληρούν ή όχι, αντίστοιχα, την παραπάνω εξίσωση, όταν δηλαδή η διαφορά

διαδρομής των κυμάτων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος ή η διαφορά φάσης τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του  $2\pi$  θα προκύψει ενισχυτική συμβολή. Η διεπιφανειακή απόσταση  $d_{hkl}$  των επιπέδων χαρακτηρίζεται ως μέτρο της ευκρίνειας (διακριτικής ικανότητας) σε ένα πείραμα περίθλασης ακτινών X (Σχήμα 1.5.5). Όσο μικρότερη είναι η τιμή της διεπιφανειακής απόστασης τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η ευκρίνεια και λεπτομερέστερος ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής.

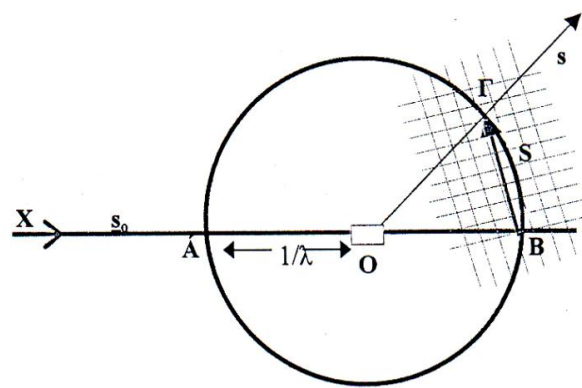


**Σχήμα 1.5.5** Σχηματική αναπαράσταση ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου και του περιθλασιγράμματός του. Η οριζόντια γραμμή αναπαριστά τη δέσμη ακτινών X με την οποία ακτινοβολείται ο κρύσταλλος και το τετράγωνο τον ανιχνευτή. Οι διάφορες περιθλώμενες ακτίνες αποτυπώνονται στον ανιχνευτή όπως φαίνεται από τις διακεκομμένες γραμμές που εξέρχονται του κρυστάλλου. Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από «κηλίδες» σε ένα μοτίβο κανονικά διατεταγμένων σημείων. Κάθε σημείο αποτελεί μια κηλίδα που έχει προκύψει από περιθλώμενη ακτίνα X όταν φτάσει στον ανιχνευτή (Πηγή εικόνας: Lattman and Loll, 2008).

Το 1921, ο Ewald εισήγαγε για την περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί την περιγραφή του φαινομένου και συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο (σημείο O), τον κρύσταλλο. Στο σημείο B βρίσκεται η αρχή του ανάστροφου πλέγματος



όπου η προσπίπτουσα δέσμη ακτινών X, στη διεύθυνση AO, συναντάει τη σφαίρα. Η συνθήκη για να παριστάνει μια ακτίνα της σφαίρας OΓ τη διεύθυνση των περιθλώμενων ακτινών X, ικανοποιείται εφόσον το σημείο Γ είναι σημείο του αντίστροφου πλέγματος (h,k,l). Το διάνυσμα ΒΓ σε αυτή τη περίπτωση είναι το διάνυσμα της σκέδασης S (Σχήμα 1.5.6). Επομένως, για να παρατηρηθεί μια περίθλαση hkl πειραματικά, ο κρύσταλλος θα πρέπει να περιστραφεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε το αντίστοιχο σημείο hkl του αντίστροφου πλέγματος να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης [Rhodes, 1999].



**Σχήμα 1.5.6** Η γεωμετρική κατασκευή του Ewald όπου OA είναι η ακτίνα της σφαίρας (Πηγή εικόνας: Rhodes, 1999).

Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας (hkl) είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του δομικού παράγοντα  $F(hkl)$  και ο δομικός παράγοντας είναι συνάρτηση των ατομικών δομικών παραγόντων. Καθώς η περίθλαση οφείλεται στο ηλεκτρονικό νέφος κάθε ατόμου, είναι δυνατό να εκφραστεί και ως συνάρτηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντί των διακριτών ηλεκτρονίων του κάθε ατόμου και αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (Fourier transformation) του περιθλασιγράμματος:

$$F(S) = \int_{\text{cell}} \rho(r) \exp [2\pi i r \cdot S] dv$$

Όπου  $dv = V dx d\psi dz$ , και  $r \cdot S = (a \cdot x + b \cdot \psi + c \cdot z) \cdot S = a \cdot S \cdot x + b \cdot S \cdot \psi + c \cdot S \cdot z = h \cdot x + k \cdot \psi + l \cdot z$

Συνεπώς, ο F(S) μπορεί να γραφεί και ως:

$$F(h\ k\ l) = V \int_{x=0}^1 \int_{\psi=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x\psi z) \exp[2\pi i(h \cdot x + k \cdot \psi + l \cdot z)] dx d\psi dz$$

Χρησιμοποιώντας το μετασχηματισμό Fourier, ( $F = |F| \exp[i\alpha]$ ) προκύπτει η ηλεκτρονική πυκνότητα:

$$\rho(x\ \psi\ z) = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + k\psi + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Παρόλο που το μέτρο του δομικού παράγοντα μπορεί να προκύψει από τις εντάσεις  $I(hkl) = |F(hkl)|^2$ , οι φάσεις  $\alpha(hkl)$  δεν μπορούν να προκύψουν κατευθείαν από το περιθλασίγραμμα. Αυτό αποτελεί και το γνωστό ως «πρόβλημα των φάσεων» που αντιμετωπίζεται με μια σειρά άμεσων ή έμμεσων μεθόδων επίλυσης. Σε αδρές γραμμές, οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μοριακή αντικατάσταση (Molecular Replacement, MR), την ανώμαλη σκέδαση (Single/Multiwavelength Anomalous Diffraction, SAD/MAD), την ισόμορφη αντικατάσταση (Isomorphous Replacement), και άμεσες μεθόδους (direct methods).

Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη, για την επίλυση του προβλήματος των φάσεων καθώς ένα ποσοστό της τάξης του 70% των κατατεθειμένων πρωτεϊνικών δομών στη βάση δεδομένων PDB έχουν προσδιοριστεί μέσω αυτής. Βασίζεται στην αξιοποίηση, όταν υπάρχει, ενός δομικά ομόλογου μοντέλου με την υπό εξέταση πρωτεΐνη ή τμήματος αυτής, το οποίο με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών ανάλογα με τη συμμετρία του κρυστάλλου, περιστρέφεται και μεταφέρεται στον χώρο και στις νέες θέσεις υπολογίζονται τα μέτρα των δομικών παραγόντων  $|F_c(hkl)|$ . Όταν οι τιμές των υπολογιζόμενων με βάση το μοντέλων  $|F_c(hkl)|$  πλησιάζουν αυτές που προκύπτουν από τα πειραματικά δεδομένα  $|F_o(hkl)|$  θεωρείται ότι έχει γίνει η επίλυση της δομής [Rhodes, 1999, Lattman & Loll, 2008].

Στις τεχνικές SAD και MAD αξιοποιείται η ιδιότητα της ανώμαλης σκέδασης των ακτίνων X από συγκεκριμένα άτομα που είτε προϋπάρχουν στο βιομόριο-

στόχο είτε εισάγονται με διάφορες τεχνικές, με πλέον διαδεδομένη την αντικατάσταση του αμινοξέος μεθειονίνη από σεληνομεθειονίνη κατά την ανασυνδυασμένη έκφραση των πρωτεϊνών [Ealick, 2000]. Η τεχνική της ισόμορφης αντικατάστασης στηρίζεται στη συλλογή δεδομένων περίθλασης από τον αρχικό κρύσταλλο του βιομορίου αλλά και από ένα ή περισσότερα υποκατεστημένα παράγωγά του που φέρουν βαρέα άτομα [Rould, 2007]. Οι άμεσες μέθοδοι εκμεταλλεύονται τις σχέσεις που διέπουν τις φάσεις συγκεκριμένων ομάδων δομικών παραγόντων. Λόγω της απαίτησης για δεδομένα υψηλής διακριτικής ικανότητας ( $<1.2 \text{ \AA}$ ) και μικρά βιομόρια η μέθοδος αυτή έχει περιορισμένη εφαρμογή στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία. Χρησιμοποιείται όμως σε συνδυασμό με τις τεχνικές που χρησιμοποιούν βαρέα άτομα για την εύρεση της θέσης των τελευταίων [Taylor, 2003].

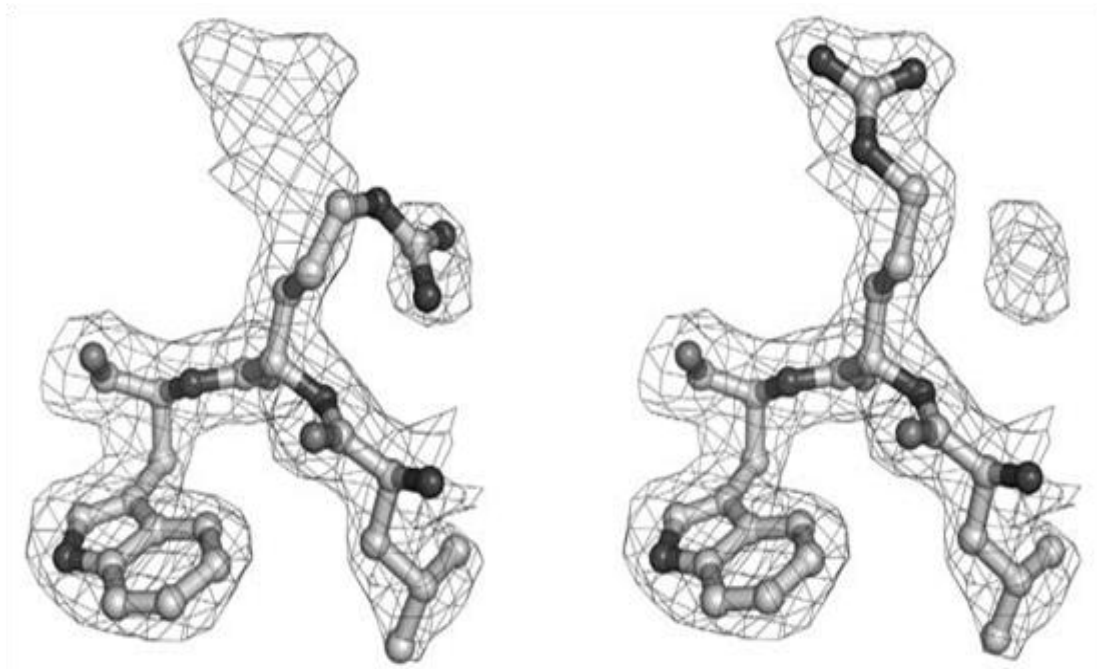
### 1.5.7 Βελτιστοποίηση, έλεγχος αξιοπιστίας και ανάλυση πρωτεϊνικού μοντέλου

Μέτρο σύγκρισης της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα αποτελεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας που ορίζεται ως

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)|)}$$

και όσον αφορά στην κρυσταλλογραφία μακρομορίων ένα μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας  $R = 0.2-0.3$  θεωρείται αξιόπιστο. Δεύτερος και πιο αξιόπιστος δείκτης της ποιότητας του μοντέλου είναι ο  $R_{free}$  που αντιστοιχεί στον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας  $R$  για ένα 5% περιθλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση. Η βελτιστοποίηση ενός μοριακού μοντέλου περιλαμβάνει την προσαρμογή των ατομικών παραμέτρων (συντεταγμένων  $x, y, z$  για κάθε άτομο της ασύμμετρης μονάδας και του παράγοντα Debye-Waller) έτσι ώστε οι πειραματικοί και οι υπολογιζόμενοι (χρησιμοποιώντας το μοντέλο) δομικοί παράγοντες να βρίσκονται στη βέλτιστη δυνατή συμφωνία. Η προσαρμογή του μοντέλου περιλαμβάνει την αλλαγή στις θέσεις των ατόμων και των παραγόντων Debye-Waller για όλα τα άτομα της

δομής εκτός από τα υδρογόνα. Καθώς τα υδρογόνα έχουν μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η επίδραση τους στην σκέδαση είναι πολύ μικρή γι' αυτό και συνήθως δεν λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό της δομής [Drenth, 2002]. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που έχουν εξαχθεί από τα συλλεχθέντα δεδομένα περίθλασης αποτελούν τη διδιάστατη υψομετρική αναπαράσταση της πυκνότητας  $\rho(xyz)$  το επίπεδο της οποίας εκφράζεται συχνά ως τυπική απόκλιση ( $\sigma$ ) από το μέσο όρο. Ο έλεγχος και η ανακατασκευή του μοντέλου γίνεται με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού μέσω των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  και  $F_o-F_c$  που υπολογίζονται με βάση το πλάτος των πειραματικών δομικών παραγόντων ( $|F_o|$ ) και το πλάτος των αντίστοιχων υπολογιζόμενων ( $|F_c|$ ) και τη φάση ( $\varphi_c$ ) που προκύπτουν από το μοντέλο αναφοράς. Ο χάρτης  $2F_o-F_c$  χρησιμοποιείται κυρίως κατά τους πρώτους κύκλους βελτιστοποίησης για τον έλεγχο του μοντέλου ενώ ο χάρτης  $F_o-F_c$  αναδεικνύει σημεία που πρέπει να προστεθούν στο πρωτεϊνικό μοντέλο [Rupp, 2009] (Σχήμα 1.5.7).



**Σχήμα 1.5.7** Παράδειγμα τμήματος ενός κρυσταλλογραφικού μοντέλου πριν τη βελτιστοποίηση (αριστερά) και μετά (δεξιά). Τα μοντέλα προσαρμόζονται στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η πλευρική αλυσίδα της αργινίνης είναι εμφανώς λάθος προσαρμοσμένη στο αρχικό μοντέλο προερχόμενη από μια δομή με χρήση της μεθόδου της μοριακής αντικατάστασης. (Πηγή εικόνας: Lattman & Loll, 2008).

Ο παράγοντας B (temperature factor ή παράγοντας Debye-Waller) είναι μια ακόμα ένδειξη της αξιοπιστίας του μοντέλου, καθώς αποτελεί τόσο μέτρο της θερμικής κίνησης όσο και της αποδιάταξης των ατόμων επηρεάζοντας έτσι το μέγεθος του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από κάθε πυρήνα ατόμου. Η τιμή του δίνεται από τη σχέση:

$$B_j = 8\pi^2 (u_j^2)$$

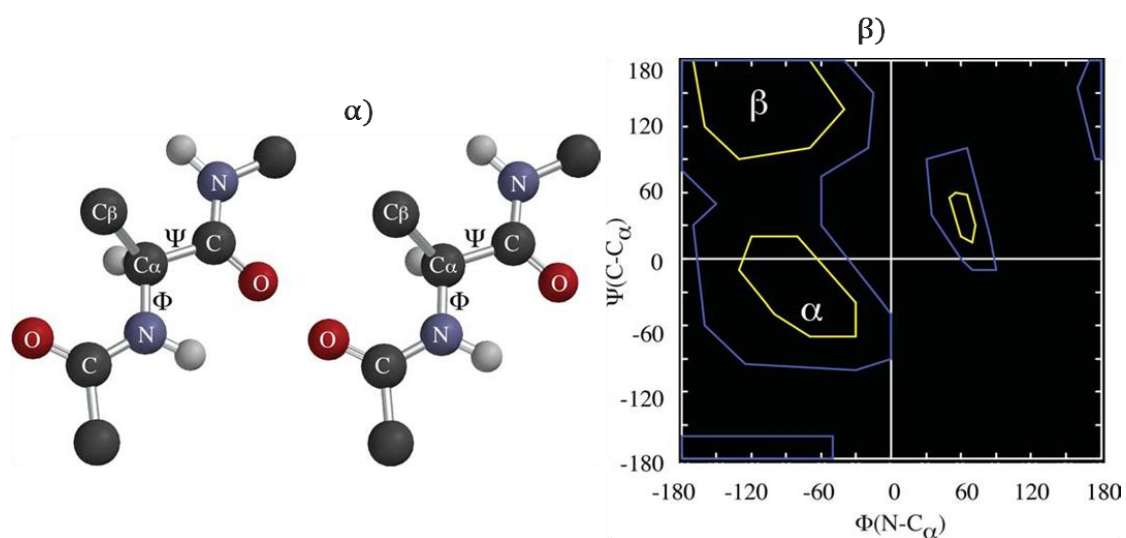
όπου ( $u_j^2$ ): η μέση τετραγωνική εκτόπιση του ατόμου j από τη θέση που έχει όταν βρίσκεται σε ηρεμία.

Η αποδιάταξη αναφέρεται στα άτομα ή τις ομάδες ατόμων που δεν καταλαμβάνουν την ίδια θέση σε κάθε στοιχειώδη κυψελίδα ή σε κάθε ασύμμετρη μονάδα ή σε κάθε μόριο της ασύμμετρης μονάδας και εκφράζεται με την κατάληψη ( $g_j$ ) η οποία αποτελεί μέτρηση του κλάσματος των μορίων στα οποία το άτομο j κατέχει πλήρως την θέση που προσδιορίζεται από το μοντέλο. Οι τιμές της κατάληψης των ατόμων της πρωτεΐνης συνήθως διατηρούνται σταθερές και ίσες με 1.0 κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης του πρωτεϊνικού μοντέλου.

Τη βελτιστοποίηση ακολουθεί ο έλεγχος του μοντέλου ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφόρων στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα του μοντέλου και της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικοί δεσμοί, δίεδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση).

Η στερεοχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι δίεδρες γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως παρουσιάζεται στο

Σχήμα 1.5.8. Ο G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος  $\phi$  και  $\psi$ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία [Rhodes, 2006].



**Σχήμα 1.5.8** α) Ορισμός των  $\phi$  ( $C\alpha-N$ ) και  $\psi$  ( $C\alpha-C$ ) δίεδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμματα) ενώ η περιοχή  $\alpha$  αντιστοιχεί σε δεξιόστροφη  $\alpha$ -έλικα και η περιοχή  $\beta$  σε αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια (Πηγή εικόνας: Rhodes, 2006).

Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την ανάλυση και ερμηνεία της προσδιοριζόμενης τρισδιάστατης δομής του πρωτεϊνικού μορίου-στόχου. Σε αυτό το στάδιο εκτιμώνται τα πιθανά κέντρα σύνδεσης προσδετών (κοιλότητες στο πρωτεϊνικό μόριο) τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του μορίου. Ακόμα, καταγράφονται και αξιολογούνται οι δεσμοί υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals των προσδετών με το μακρομόριο και η ικανότητα πρόσβασης αυτού στα πιθανά ενεργά κέντρα του μορίου [Blundell, 2002].

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Υλικά και Μέθοδοι

#### 2.1 Βιοχημεία

##### 2.1.1 Υλικά

###### 2.1.1.i Ένζυμα και μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εκφράσθηκαν, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν οι κλωνοποιημένες πρωτεΐνες μυκητιακής προέλευσης *Myceliophthora thermophila* (συνώνυμο *Sporotrichum thermophile*), εστεράση του γλυκουρονικού οξέος **StGE2** (Glucuronoyl Esterase 2), όπου τύπου 2 η ανασυνδυασμένη GE σε αντίθεση με το φυσικό τύπο 1, καθώς και η σημειακά μεταλλαγμένη **S213A StGE2** όπου το καταλυτικό αμινοξύ Σερίνη (η αρίθμηση ακολουθεί την αρίθμηση της πρωτοταγούς πρωτεϊνικής δομής) είχε μεταλλαχθεί σε Αλανίνη (σύμφωνα με την επιστημονική εργασία των Topakas *et al.*, 2010). Κατά τον ίδιο τρόπο, παράχθηκε και μελετήθηκε κινητικά η ανασυνδυασμένη **PaGE1** μυκητιακής προέλευσης *Podospora anserina* ενώ το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την έφραση της πρωτεΐνης ήταν ευγενική προσφορά του Jean-Guy Berrin (INRA, Aix Marseille Université, Marseille, France).

Η ετερόλογη έκφραση των *StGE2*, *S213A StGE2* και *PaGE1* επιτεύχθηκε μέσω του συστήματος της ζύμης *Pichia pastoris* X33 (γονότυπος: άγριος/φυσικός τύπος, φαινότυπος: Mut<sup>+</sup>) (Invitrogen, Η.Π.Α.). Ο μικροοργανισμός *P. pastoris* αποτελεί έναν μονοκύτταρο μεθυλότροφο ζυμομύκητα, ο οποίος διαθέτει όλα τα λειτουργικά πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν τα συστήματα ετερόλογης έκφρασης γονιδίων ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και η γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών (μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις). Πρόκειται για ένα σύστημα εύχρηστο, με υψηλό ρυθμό ανάπτυξης σε θρεπτικά μέσα ιδιαίτερα χαμηλού κόστους ενώ το στέλεχος X33

που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη ξεχωρίζει λόγω της δυνατότητάς του να πολλαπλασιάζεται αξιοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα τη μεθανόλη. Ειδικότερα, η μεθανόλη επάγει την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς καταβολίζεται σε φορμαλδεΰδη παρουσία οξυγόνου από την αλκοολική οξειδάση η οποία κωδικοποιείται από τα γονίδια *AOX1* και *AOX2*. Η έκφραση του *AOX1* γονιδίου οδηγεί σε παραγωγή αυξημένων επιπέδων πρωτεΐνης ενώ η έκφραση του *AOX2* γονιδίου σε χαμηλότερα. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και τα δύο γονίδια έχουν τη δυνατότητα να αυξάνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut<sup>+</sup>, methanol utilization plus), ενώ εκείνα στα οποία εκφράζεται μόνο το *AOX2* γονίδιο σε μικρές συγκεντρώσεις μεθανόλης (φαινότυπος Mut<sup>s</sup>, methanol utilization slow). Εξάλλου, η περιορισμένη έκκριση ενδογενών πρωτεϊνών από το συγκεκριμένο ζυμομύκητα ευνοεί την απομόνωση των επιθυμητών εξωκυτταρικών πρωτεϊνών σε αυξημένες συγκεντρώσεις (πρωτόκολλο EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, Η.Π.Α.). Τέλος το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* TOPIOF' χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού φορέα pPICZα.

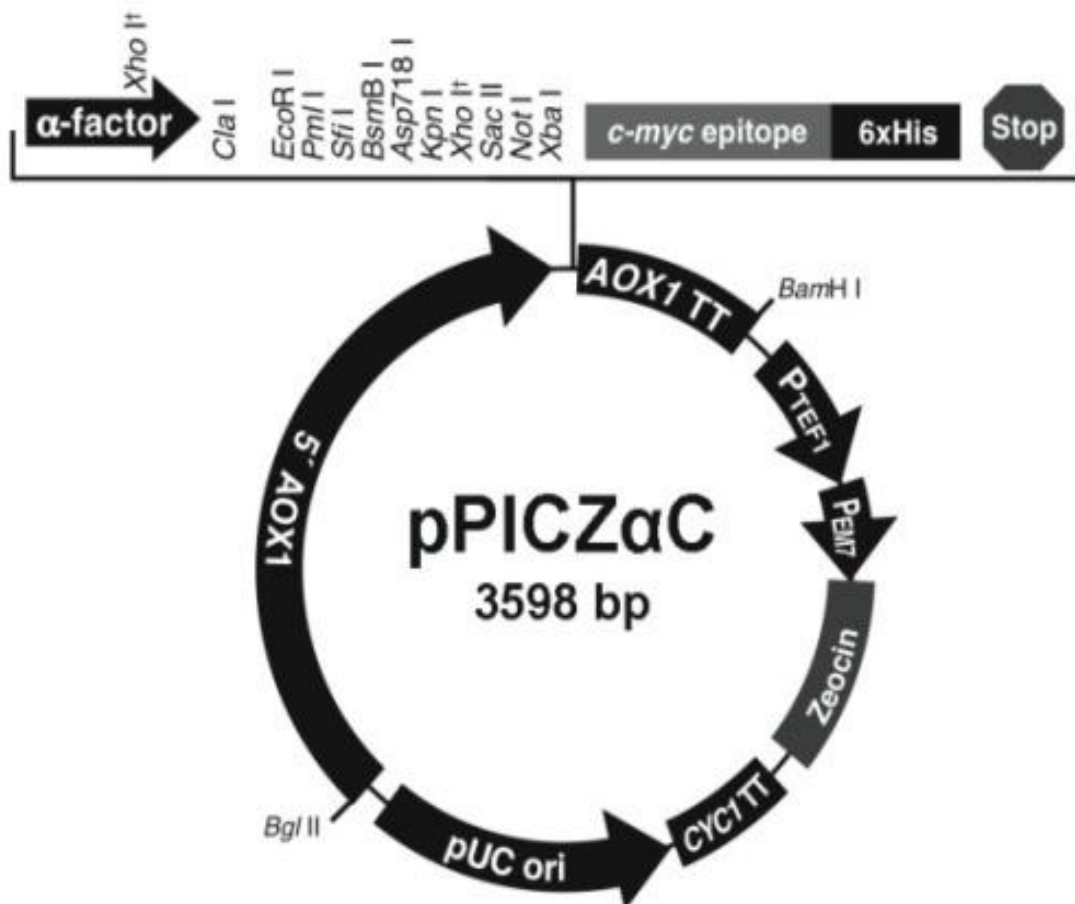
### **2.1.1.ii Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης**

Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC (Σχήμα 2.1.1, Invitrogen, Η.Π.Α.) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου *ge2* της *StGE2* καθώς και εκείνου που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη της S213A πρωτεΐνης. Ο συγκεκριμένος φορέας αποτελείται από 3598 bp και χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο ετερόλογο σύστημα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Ο pPICZαC ευνοεί την εύκολη απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών αφού η έκκρισή τους στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων του *P. pastoris* αποδίδεται σε ένα πεπτίδιο οδηγό, α-factor, της ζύμης *S. cerevisiae*. Ειδικότερα, στο φορέα εμπεριέχονται:

- ✓ ο υποκινητής της αλκοολικής οξειδάσης (*AOX1*) που ενεργοποιείται από τη μεθανόλη
- ✓ η περιοχή ομολογίας με τον *P. pastoris* ώστε να εξασφαλιστεί η ενσωμάτωσή του κατά το μετασχηματισμό



- ✓ το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (Zeocin Invinogen, Γαλλία)
- ✓ ο C-myc επίτοπος, όπου C το καρβοξυτελικό άκρο και αμινοξική αλληλουχία EQKLISEEDL, ώστε να διευκολυνθεί ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός στο μετέπειτα στάδιο της χρωματογραφίας συγγένειας, και τέλος
- ✓ το τμήμα έξι κωδικονίων ιστιδίνης (His-tag) για τον επιτυχή καθαρισμό των πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας που περιέχει ιόντα μετάλλων



Σχήμα 2.1.1 Ο χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pPICZαC της Invitrogen.

### 2.1.1.iii Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης μικροοργανισμών – Ρυθμιστικά διαλύματα

Για την ανάπτυξη των *E. coli* και *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά μέσα που παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.1. Τα θρεπτικά μέσα καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα προετοιμάστηκαν με απιονισμένο νερό, ενώ τα διαλύματα των τεχνικών μοριακής βιολογίας καθώς και της χρωματογραφίας, με υπερκάθαρο νερό. Στις περιπτώσεις που η αποστείρωση ήταν απαραίτητη (ανάπτυξη μικροοργανισμών, μοριακές τεχνικές) χρησιμοποιήθηκε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121 °C για 15 min υπό πίεση 0.1 MPa. Τα διαλύματα θερμοευαίσθητων υλικών (αντιβιοτικά, βιταμίνες) αποστειρώθηκαν με σύριγγα μέσω φίλτρων διαμέτρου 0.2 μm και στη συνέχεια προστέθηκαν στα θρεπτικά μέσα σε θερμοκρασία μικρότερη των 60 °C, ενώ η αποστείρωση της δεξτρώζης πραγματοποιήθηκε σε μορφή σκόνης

**Πίνακας 2.1.1** Σύσταση των θρεπτικών μέσων / Ρ.Δ. που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των *E. coli* / *P. pastoris*, καθώς και την παραγωγή και απομόνωση των *StGE2* / *S213A StGE2* / *PaGE1*.

<i>E. coli</i>	LS LB (ή LB) ± ζεοσίνη	0.5% (ή 1%) NaCl (w/v), 1% τρυπτόνη (w/v), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (w/v), pH 7.4 ± 25 μg/mL ζεοσίνη
	YPD[S] ± άγαρ ± ζεοσίνη	±100 μg/mL ζεοσίνη
<i>P. pastoris</i>		2% δεξτρώζη (w/v), [1 M σορβιτόλη] ±1.5% (w/v) άγαρ
	YNB (Δ-μα 10x, 1 L)	34 g YNB + 100 g θειικό αμμώνιο
	BMGY ή BMMY	1% εκχύλισμα ζύμης (w/v), 2% πεπτόνη (w/v), 100 mM Ρ.Δ. φωσφορικό κάλιο pH 6.0,

	1.34% YNB (w/v), 4x10 <sup>-5</sup> βιοτίνη (w/v), 1% γλυκερόλη (BMGY) (v/v) ή 0.5% μεθανόλη (BMMY) (v/v)
MD (Minimal Dextrose) ή MM (Minimal Methanol)	1.34 % YNB, 4x10 <sup>-5</sup> βιοτίνη (w/v), 1.5 % άγαρ (w/v), 2% δεξτρόζη (MD) ή 0.5% μεθανόλη (M/M) (v/v)
P.Δ. Talon	300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
P.Δ. φωσφορικού καλίου (α, β)	1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , α) pH 6.0 και β) pH 7.0
Ρυθμιστικά διαλύματα	P.Δ. Διαπίδυσης (dialysis) 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
P.Δ. Talon – Ιμιδαζολίου (Χρωματογραφία)	100mM Ιμιδαζολίου 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

### 2.1.1.iv Συνθετικά και φυσικά υποστρώματα

Στο πλαίσιο της πειραματικής μεθοδολογίας απομόνωσης λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων (lignin-carbohydrate complexes, LCCs) εμπλουτισμένων σε εστερικούς δεσμούς-στόχο για βιοκατάλυση από την *StGE2*, χρησιμοποιήθηκαν υπολείμματα βιομάζας σκανδιναβικής ελάτης (*Picea abies*) ευγενική προσφορά του Dr. Hampus Sunner (Chalmers University of Technology, Göteborg, Σουηδία) καθώς και φελλός φυτικής προέλευσης εμπορικά διαθέσιμος (bark). Όσον αφορά στη βιομάζα ελάτης είχε προηγηθεί άλεση σε σφαιρόμυλο (ball milling), περαιτέρω μικρο-άλεση (jet milling) και διαχωρισμός (turbo separation device) σε ξεχωριστά δείγματα ανάλογα με τα

μεγέθη μικροαλεσμένων σωματιδίων τους, ενώ σε δύο από αυτά είχε απομακρυνθεί η πηκτίνη με τη διαδικασία που περιγράφεται στην §2.1.8.ii. [Azuma & Tetsuo, 1988]. Τα έξι δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.2.

**Πίνακας 2.1.2** Δείγματα *Picea abies* που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μεθοδολογία απομόνωσης LCCs.

Στάδια άλεσης και διαλογής δείγματος <i>P. abies</i>	Περαιτέρω επεξεργασία	Διάμετρος σωματιδίων
1	-	~310μm (FG)
1	Απηλλαγμένο από πηκτίνη	~310μm (FG Dep)
1	-	~110μm (FF)
2	-	~100μm (FG2)
2	-	~20μm (FF2)
2	Απηλλαγμένο από πηκτίνη	~20μm (FF3)

Μικροποσότητες από όλα τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της αρχικής τους σύστασης με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed spectroscopy, FT-IR). Για την ανίχνευση της δράσης της *StGE2* έναντι φυσικών υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε το αρχικό δείγμα ξηρής βιομάζας *P. abies* δεύτερης άλεσης και διαλογής μεγέθους σωματιδίων εύρους ~20μm από το οποίο έχει απομακρυνθεί η πηκτίνη (FF3) καθώς και τα προϊόντα των μεθοδολογιών απομόνωσης LCCs ως πιθανά ανάλογα φυσικού υποστρώματος συμπλεγμένου με λιγνίνη.

Με στόχο τη δημιουργία πρωτοκόλλου ποσοτικοποίησης της ενζυμικής ενεργότητάς των *StGE2* και *PaGE1* έγινε κινητική μελέτη στο εμπορικά διαθέσιμο συνθετικό υπόστρωμα βενζυλικού εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος (BnGlcA, Carbosynth, Compton, UK). Για την αξιολόγηση της ενεργότητας

ακίνητοποιημένης *StGE2* με τη μέθοδο σχηματισμού ενζυμικών συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών (Cross-linked enzyme aggregates, CLEAs) χρησιμοποιήθηκε ως ανάλογο υποστρώματος του ενζύμου ο D-γλυκουρονικός εστέρας της 3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλης [Katsimpouras *et al.*, 2014]. Τέλος για τη διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας του βιοκαταλύτη χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα D-γλυκουρονικό οξύ (GlcA), αλειφατικές και αρωματικές αλκόολες καθώς και οξικός εστέρας της κινναμμικής αλκοόλης. Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού και προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

#### **2.1.1.v Αντιδραστήρια, εμπορικά ένζυμα και τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (kit)**

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία), Panreac (Ισπανία), AppliChem (Γερμανία), Fisher Scientific (Η.Π.Α.). Για τις αντιδράσεις διερεύνησης υδρόλυσης αρχικού δείγματος ξηρής βιομάζας ελάτης καθώς και απομονωμένων LCCs παρουσία *StGE2* χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα α-γλυκουρονιδάση της εταιρείας Prozomix (UK) και ενδο-β-1,4 ξυλανάση από το μύκητα *Fusarium oxysporum* που ανήκει στην οικογένεια GH11 των γλυκοζυλο-υδρολασών της CAZy (<http://www.cazy.org/>, Glycosyl hydrolases 11) [Moukouli *et al.* 2011]. Τέλος, για την ανίχνευση απελευθέρωσης γλυκουρονικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα D-Glucuronic Acid & D-Galacturonic Acid Assay Kit της εταιρείας Megazyme (Ιρλανδία).

#### **2.1.1.vi Υλικά χρωματογραφίας**

Ο καθαρισμός και η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έγινε με στήλες χρωματογραφίας συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου (κοβαλτίου) υλικό Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.). Κατά τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid

Chromatography) χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C<sub>18</sub> Nucleosil 250 mm x 4.6 mm, Macherey – Nagel (Γερμανία). Τέλος, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) πραγματοποιήθηκε με φύλλα αλουμινίου TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck (Γερμανία), η παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (Preparative Layer Chromatography, PLC) με υάλινες πλάκες PLC Silica gel 60 0.5 mm Merck.

### 2.1.2 Συσσκευές, όργανα και αναλώσιμα υλικά

Η συγκεκριμένη διδακτορική εργασία περιελάμβανε τη χρήση των παρακάτω συσκευών και οργάνων:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας με ανάδευση ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα)
- Επωαστήρας Orbital incubator S150, Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Μικροφυγόκεντρος Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).
- Περισταλτική αντλία Econo Gradient, BioRad (Η.Π.Α.)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor Buchi RE 111, Buchi (Ελβετία)
- Συλλέκτης κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Συσσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying) Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen (Γερμανία)
- Συσσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσσκευή υπερδιήθησης-συμπύκνωσης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL και μεμβράνες Diaflo PM-10, Amicon, Millipore, (Η.Π.Α.).
- Συσσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius Bioluminescence, (Η.Π.Α.).

Syngene (Μ. Βρετανία)

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easigel H1-set της εταιρίας Scie-plas (Μεγάλη Βρετανία)
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α)
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Milli-Q, Millipore (Η.Π.Α)
- Σύστημα χρωματογραφίας διαχωρισμού πρωτεϊνών (Econo Gradient Pump, BioRad και Waters 600E, Millipore (Η.Π.Α.) και ανιχνευτής UV ακτινοβολίας (280 nm) για την ανίχνευση των εκλούμενων πρωτεϊνών.
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Jasco (Ιαπωνία) με αντλία PU 987, και φωτομετρικούς ανιχνευτές: UV 975 και λογισμικό διαχείρισης και καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία) ή εναλλακτικά UV-Vis ProStar 335 Ανιχνευτή Συστοιχίας Διόδων, Agilent Technologies (Η.Π.Α.)
- Φασματογράφος Μάζας (MS) Varian 500-MS Ion Trap, Agilent Technologies (Ολλανδία)
- Φασματόμετρο υπερύθρου FT-IR MAGNA-IR 560 Nicolet, εφοδιασμένο με ανιχνευτή DTGS, διασχιστή ακτίνας KBr και δειγματοφορέα στερεών δειγμάτων DRIFT (Diffuse Reflectance, Spectra Tech Inc. Shelton CT, USA)
- Φασματόμετρο υπερύθρου FT-IR Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX συνοδευόμενο από οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)
- Φωτόμετρο μικροπλακών (Microplate reader) SpectraMax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.)

Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκαν αναλώσιμα, πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά, των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), ROTH (Η.Π.Α.), SIMAX (Τσεχία), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).

## 2.1.3 Ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

### 2.1.3.i Μετασχηματισμός επιλεκτικών ΤΟΡΙΟF' κυττάρων *E. coli*

Το συνενωμένο με πλασμιδιακό φορέα pPICZαC γονίδιο *ge2* της GE, αυτό που έφερε τη σημειακή μετάλλαξη της S213A πρωτεΐνης [Torakas *et al.*, 2010] όσο και αυτό που έφερε το γονίδιο της *page1* εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος PaGE1 [Katsimpouras *et al.*, 2014], εισήχθησαν σε επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα ΤΟΡΙΟF'. Εν γένει, για την εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε κύτταρα ακολουθείται η μεθοδολογία του μετασχηματισμού που διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος και τη κυτταρική δομή του ξενιστή. Σε όλες τις περιπτώσεις κατά το μετασχηματισμό, τα κύτταρα του εκάστοτε ξενιστή γίνονται παροδικά διαπερατά ώστε να είναι επιτυχής η είσοδος των πλασμιδίων. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, χάρις στην ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό που τους έχει προσδώσει το εισαγόμενο πλασμίδιο, διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα αφού θα αναπτυχθούν μόνο αυτά που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στο μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό.

Στην περίπτωση των ΤΟΡΙΟF' και του pPICZαC το αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται είναι η ζεοσίνη ενώ ακολουθείται μετασχηματισμός με θερμικό στρες (heat shock), ο οποίος ενδείκνυται για αρνητικά κατά gram βακτήρια. Το είδος αυτό μετασχηματισμού βασίζεται σε έλξη μεταξύ βακτηρίου και ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA, καθώς μετά από έκθεση σε χλωριούχο ασβέστιο τα τοιχώματα των κυττάρων έχουν φορτιστεί θετικά αλληλεπιδρώντας με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του πλασμιδίου [Cohen *et al.*, 1972; Sambrook *et al.*, 1989]. Η απόδοση σε μετασχηματισμένα κύτταρα με αυτή τη μέθοδο είναι ικανοποιητική αν και όχι η υψηλότερη και η πορεία αναλυτικότερα περιλαμβάνει:

- Ήπια απόψυξη σε παγόλουτρο επιλεκτικών *E. coli* κυττάρων ΤΟΡΙΟF' (από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ , παρουσία γλυκερόλης, επαναιωρημένα διαδοχικά σε  $\text{MgCl}_2$  0.1M και  $\text{CaCl}_2$  0.1M).
- Προσθήκη 1 μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με ήπιες ελικοειδείς κινήσεις και το μίγμα παραμένει σε παγόλουτρο για 30 min.



- Μεταφορά στους 42°C για 90sec (θερμικό σοκ) και επανατοποθέτηση του μίγματος στο παγόλουτρο.
- Προσθήκη 200 μl θρεπτικού υλικού LS-LB και επώαση στους 37°C για 1 h.
- Το μίγμα μετασχηματισμένων με pPICZαC και μη βακτηριακών κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* με στερεό θρεπτικό μέσο LS-LB παρουσία 25 μg/mL ζεοσίνης. Τα τρυβλία επώαστηκαν για ~16 h σε θερμοκρασία 37°C και αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

Στη συνέχεια, έγινε επιλογή μετασχηματισμένων TOP10F' αποικιών που αναπτύχθηκαν και ανάκτηση pPICZαC. Μεμονωμένες αποικίες εμβολιάστηκαν σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LS-LB παρουσία ζεοσίνης η κάθε μία και ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για ~16 h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και ανάκτηση πλασμιδίων μικρής κλίμακας με χρήση του σκευάσματος GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas, Καναδάς). Μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Cla I και Xba I (Takara, Ιαπωνία) (άκρα ένθετου DNA) η επιτυχής ανάκτηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **2.1.3.ii Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και σε ορισμένες περιπτώσεις ανάκτηση του DNA. Τα μόρια DNA μετακινούνται στο πήκτωμα κάτω από την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση του πεδίου (volts/cm πηκτώματος) ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν (Sambrook *et al.*, 1989). Ειδικότερα, για την αξιολόγηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε οριζόντια πηκτή αγαρόζης Agarose low EEO (AppliChem) συγκέντρωσης 1% (w/v). Σε ηλεκτροφορήσεις απομόνωσης μορίων DNA η πηκτή παρασκευαζόταν από την αγαρόζη υψηλής ποιότητας Seakem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Δανία). Για την παρασκευή της

πηκτής χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TBE και διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) (Πίνακας 2.1.3).

**Πίνακας 2.1.3** Σύσταση διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Διάλυμα TBE 10X (1L)	Διάλυμα φόρτωσης 1mL(loading buffer)
108 g βάση Tris	900 μl γλυκερόλη (50%)
55 g βορικό οξύ	100 μl κυανού βρωμοφαινόλης 10X (Bromophenol Blue)
40 ml EDTA 0.5M pH 8	

Η παρασκευή πήκτωματος αγαρόζης περιελάμβανε ζύγιση 0.5 g αγαρόζης και διαλυτοποίηση σε 50 ml διαλύματος TBE υπό βρασμό και ανάδευση μέχρι διαύγασης. Αφού το διάλυμα είχε ψυχθεί και πριν την πήξη του προστέθηκαν 50 μL βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1mg/mL ώστε να μεταφερθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετώντας κατάλληλη «χτένα» για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης επιθυμητού μεγέθους αναλόγως με τον αριθμό δειγμάτων προς ταυτοποίηση. Μετά την πήξη του διαλύματος αγαρόζης προστέθηκαν 50 ml διαλύματος TBE, αφαιρέθηκε η «χτένα» και σε κάθε οπή τοποθετήθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος που είχε αναμιχθεί με διάλυμα χρωστικής (loading buffer). Η εκτίμηση του μεγέθους αλλά και της ποσότητας των δειγμάτων DNA έγινε με πρότυπα δείγματα μορίων DNA διακριτού αριθμού βάσεων (HyperLadder™ I: 200-10,000 bp) ενώ η ηλεκτροφόρηση γινόταν με εφαρμογή τάσης 60 Volt επί ~1h. Ακολουθούσε εμφάνιση με χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ώστε να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι διαχωρισμένες ζώνες DNA με βάση τη φωτεινότητά τους (InGenius Bio Imaging της Syngene, Μεγάλη Βρετανία). Οι ζώνες συγκρίνονταν βάσει της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας και της φωτεινότητάς τους με αυτές των πρότυπων μορίων DNA γνωστού μεγέθους, καθώς ο ρυθμός μετακίνησης κατά

μήκος του πηκτώματος είναι αντιστρόφως ανάλογος με το δεκαδικό λογάριθμο του μεγέθους των νουκλεϊκών οξέων.

### **2.1.3.iii Μετασηματισμός κυττάρων *P. pastoris***

Τα ανακτημένα, και ταυτοποιημένα μετά την ηλεκτροφόρηση, πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο της *StGE2*, της *S213A StGE2* καθώς και της *PaGE1*, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασηματισμό κυττάρων *P. pastoris*. Η μέθοδος μετασηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για τα κύτταρα ζύμης ήταν η ηλεκτροδιάτρηση, όπου αυξήθηκε η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με εφαρμογή εξωτερικής τάσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

Πριν το μετασηματισμό τα πλασμίδια γραμμικοποιήθηκαν (linearization) με επώαση στους 37 °C για 3h ώστε να γίνει πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sac I* της εταιρείας TAKARA (Ιαπωνία). Για τη γραμμικοποίηση εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της *Sac I* όπου η απομάκρυνση του ενζύμου έγινε με στήλη καθαρισμού DNA της εταιρείας Macherey-Nagel, ενώ στο τελευταίο βήμα χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό αντί για ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης για την έκλυση DNA.

Για την εισαγωγή των γραμμικοποιημένων πλασμιδίων στο χρωμοσωμικό DNA της *P. pastoris* χρειάστηκε προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων της ζύμης. Αναλυτικότερα:

- Σε θρεπτικό υλικό YPD όγκου 50 mL αναπτύχθηκαν κύτταρα ζύμης *X33* με επώαση και υπό ανάδευση (180 rpm) για 24 h στους 30 °C.
- Από την προκαλλιέργεια λήφθηκαν 10 mL για τον εμβολιασμό 250 mL θρεπτικού μέσου YPD και ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας στους 30 °C υπό ανάδευση για ~4h ή μέχρι τιμή  $OD_{600} \sim 1.5$ .
- Στη συνέχεια, έγιναν τέσσερις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για 5 min σε 1500 x g και στους 4 °C. Το πρώτο ίζημα κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 250 mL αποστειρωμένου και ψυγμένου υπερκάθαρου νερού, το δεύτερου σε 125 mL, το τρίτο σε 10 mL αποστειρωμένου και ψυγμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M και το

τέταρτο σε 0,5 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M. Μετά την τελευταία επαναδιαλυτοποίηση το εναιώρημα κυττάρων φυλασσόταν σε παγόλουτρο στους 0°C μέχρι το στάδιο του μετασχηματισμού (αυθημερόν).

Κατά το μετασχηματισμό, 30  $\mu$ L γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZ $\alpha$ C αναμίχθηκαν με 80  $\mu$ L εναιωρήματος των επιδεκτικών κυττάρων X33 και το μίγμα μεταφέρθηκε σε ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0,2 cm η οποία είχε ψυχθεί και παρέμεινε σε παγόλουτρο για ~5 min. Στη συνέχεια η κυψελίδα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α) όπου και εφαρμόστηκε ηλεκτρικός παλμός 2 kV για 4 ms. Ακολούθησε άμεση προσθήκη 1 mL ψυγμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M και μεταφορά του μίγματος σε αποστειρωμένο σωλήνα (falcon 15 mL) και παρέμεινε στους 30°C για ~1-2 h. Στη συνέχεια, επιστρώθηκε το μίγμα των μετασχηματισμένων κυττάρων της ζύμης σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS+άγαρ+ζεοσίνη, ώστε να επωαστούν στους 30°C για 3-5 ημέρες για την ανάπτυξη αποικιών.

#### **2.1.3.iv Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris***

##### **α) Υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας**

Μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZ $\alpha$ C, αξιοποιήθηκαν για εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών 50 mL θρεπτικού υλικού BMGY η κάθε μία ώστε να επιλεγεί έπειτα ο κλώνος για έκφραση των StGE2 και S213A StGE2 πρωτεϊνών σε μεγαλύτερη κλίμακα. Οι προκαλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση 200 rpm στους 30 °C για ~20 h ή μέχρι τελικής τιμής OD<sub>600nm</sub> 2-6. Σύμφωνα με την τιμή OD<sub>600nm</sub> φυγοκεντρήθηκε, προς απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού που περιείχε γλυκερόλη, κατάλληλος όγκος προκαλλιέργειας ώστε μετά από επαναιώρηση σε 50 mL θρεπτικού μέσου BMMY η OD<sub>600nm</sub> να έχει τιμή 1. Οι μικρής κλίμακας καλλιέργειες BMMY επώαστηκαν υπό ανάδευση 200 rpm στους 30°C για 5 μέρες με καθημερινή προσθήκη 250  $\mu$ L (0.5% (v/v))

μεθανόλης προς επαγωγή της έκφρασης της εκάστοτε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Από το υπερκείμενο των καλλιέργειών λαμβάνονταν μικρά δείγματα ημερησίως, προς έλεγχο της παρουσίας πρωτεΐνης, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Με αυτόν τον τρόπο επελέγη η βέλτιστη διάρκεια καλλιέργειας για μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνική έκφραση καθώς και ο επιθυμητός κλώνος, ο οποίος στη συνέχεια ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο YPD+άγαρ+ζεοσίνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C προς βραχυπρόθεσμη μελλοντική χρήση.

Η φύλαξη (stock) των μετασηματισμένων δειγμάτων του επιλεγμένου κλώνου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε βαθιά κατάψυξη στους -80 °C, περιελάμβανε αρχικά την προκαλλιέργειά του σε θρεπτικό μέσο YPD για 16 h στους 30 °C. Τα κύτταρα που αναπτύσσονταν φυγοκεντρούνταν και επαναιωρούνταν σε YPD που περιείχε 15% (v/v) γλυκερόλη με στόχο η τελική OD<sub>600nm</sub> να έχει τιμή 50-100. Τέλος, τα κύτταρα καταψύχονταν άμεσα με ταχεία εμβάπτιση σε υγρό άζωτο (flash freezing) και αποθηκεύονταν στους -80 °C.

#### β) Καλλιέργειες για την πρωτεϊνική απομόνωση

Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

- 200 mL θρεπτικού μέσου BMGY εμβολιάστηκαν με αποικία του επιλεγμένου μετασηματισμένου στελέχους (4x50 mL, μοιρασμένο σε τέσσερις γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL).
- Η προκαλλιέργεια επώαστηκε (σύμφωνα και με την §2.1.3.iv.α) σε θερμοκρασία 30 °C για 16-20 h υπό ανάδευση 200 rpm.
- Μετά από φυγοκέντρηση κατάλληλου όγκου προκαλλιέργειας BMGY, το ίζημα κυττάρων επαναιωρήθηκε στον επιθυμητό όγκο θρεπτικού υλικού BMMY (συνήθως 1 L) ώστε η τελική O.D.<sub>600nm</sub> να έχει τιμή 1 (4x250mL, μοιρασμένο σε τέσσερις γυάλινες κωνικές φιάλες του 1 L με πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για την εξασφάλιση καλού αερισμού της καλλιέργειας). Η επαγωγή έγινε για το προκαθορισμένο χρονικό διάστημα με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση

0.5% (v/v) και η καλλιέργεια παρέμεινε στους 30°C υπό ανάδευση 200 rpm (Εικόνα 2.1.1).

- Μετά το πέρας συνήθως έξι ημερών οι καλλιέργειες συλλέγονταν, φυγοκεντρούνταν για 10 min στα 1500 x g, 4 °C και το υπερκείμενο όπου βρίσκονταν και οι εκκρινόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνταν για τα επόμενα βήματα του πρωτοκόλλου προς απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών από τις υπόλοιπες της ζύμης.



**Εικόνα 2.1.1** Καλλιέργεια *Pichia pastoris* σε θρεπτικό μέσο BMMY.

#### γ) Καθαρισμός ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Τα κυτταρικά θραύσματα απομακρύνθηκαν με διήθηση υπό κενό αρχικά με χρήση απλού διηθητικού χαρτιού και στη συνέχεια φίλτρων διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2  $\mu\text{m}$  (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters). Ακολούθησε συμπύκνωση του, διαυγέστερου πλέον, υπερκειμένου της καλλιέργειας με συσκευή υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 Amicon, Millipore (Η.Π.Α.) μέγεθος αποκλεισμού 10 kDa, μέχρι τελικού όγκου ~30 mL. Η μεμβράνη επιτρέπει τη διαφυγή μακρομορίων μικρότερων από τη διάμετρο των πόρων της (10 kDa) μαζί με το υπόλοιπο διάλυμα ενώ συμπυκνώνεται το διάλυμα πρωτεϊνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισοροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Talon το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για την εξισορρόπηση της στήλης χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου για τον επακόλουθο

καθαρισμό των πρωτεϊνών. Η εξισορρόπηση του συμπυκνωμένου διαλύματος πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης μέσω μεμβρανών κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Daltons, Sigma-Aldrich) οι οποίες πριν τη μεταφορά του διαλύματος είχαν βυθιστεί σε απιονισμένο νερό (μετά από βρασμό) για 30 min. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης κατά το οποίο μικρά μόρια του διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης της ισορροπίας στο σύστημα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα στο Talon ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ( $V_{P.A.} > 100X V_{\delta-τος\ πρωτεϊνών}$ ) για ~24 h σε θερμοκρασία 4°C υπό ήπια ανάδευση.

δ) Απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με τη χρήση Χρωματογραφία Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

Στο τελευταίο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε IMAC ώστε να επιτευχθεί η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης μέσω των έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His-tag, rPICZαC) που προστέθηκαν στο καρβοξυτελικό άκρο της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Σε αλκαλικό περιβάλλον, τα αμινοξέα ιστιδίνης λόγω της αρνητικής τους φόρτισης προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) ακίνητοποιημένα σε ρητίνη [Porath *et al.*, 1992] ώστε να επιτυγχάνεται με τη μέθοδο αυτή η απομόνωση ετερόλογων πρωτεϊνών από τις αυτόλογες του μικροοργανισμού ξενιστή. Για το λόγο αυτό, και η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση διαλύματος ιμιδαζολίου (0-100 mM), το οποίο ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτύλιους της ιστιδίνης στην αλληλεπίδραση με τα κατιόντα ακίνητοποιημένου μετάλλου.

Ειδικότερα, στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε  $Co^{2+}$  και εναλλακτικά  $Ni^{2+}$  ως ακίνητοποιημένο μέταλλο της στήλης χρωματογραφίας [Bush *et al.*, 1991] και το πρωτεϊνικό διάλυμα κατά τον καθαρισμό παρέμεινε στους 4 °C προς αποφυγή της δράσης πρωτεασών που συνυπάρχουν στο υπερκείμενο και την εξασφάλιση της σταθερότητας της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η ροή της κινητής φάσης της χρωματογραφίας ρυθμίστηκε στα 2 mL/min με αντλία Econo Gradient, Biorad (Η.Π.Α.) και η ανίχνευση των εκλουόμενων

πρωτεϊνών έγινε με ανιχνευτή UV (280 nm) και λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124 DataApex (Τσεχία). Τέλος, τα πρωτεϊνικά κλάσματα που απομονώθηκαν συλλέχθηκαν με συλλέκτη κλασμάτων Waters, Millipore (Η.Π.Α.) και το πρωτεϊνικό διάλυμα εξισορροπήθηκε μέσω διαπίδυσης με μεμβράνες κυτταρίνης και ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, pH 8.0.

### ***2.1.3.v Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)***

Για την αξιολόγηση της καθαρότητας των απομονωμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μετά την τελική εξισορρόπηση στο διάλυμα φύλαξης τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Πιο αναλυτικά, για τη δημιουργία του πηκτώματος το μονομερές ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται σε αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις με δι-ακρυλαμίδιο (cross linking). Η χημική ένωση υπερθειικό αμμώνιο (APS) παίζει το ρόλο του καταλύτη ενώ η ένωση N,N,N',N'- τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED) είναι ο ενεργοποιητής στην αντίδραση πολυμερισμού. Οι σχηματιζόμενοι πόροι του πηκτώματος έχουν μέγεθος που καθορίζει και το μέγεθος των πρωτεϊνών προς διαχωρισμό. Ενώ η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι συνεχής, η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE) είναι ασυνεχής αφού λαμβάνει χώρα σε ένα πολυ-ρυθμιστικό σύστημα (Multi Buffer System, MBS) δια μέσου δυο πηκτωμάτων, όπου το ένα να επιστοιβάζεται του άλλου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται τρία ρυθμιστικά διαλύματα: το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάσης (stacking gel) και το ρυθμιστικό διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel). Η σύσταση και οι αναλογίες των επιμέρους διαλυμάτων παρατίθεται στον Πίνακα 2.1.4.

Αφού παρασκευαστεί αρχικά το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού, αυτό τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ειδικές γυάλινες πλάκες που έχουν προηγουμένως καθαριστεί με αιθανόλη. Μετά από ~30 min και όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού, παρασκευάζεται το πήκτωμα της



επιστοίβασης το οποίο προστίθεται πάνω από το πρώτο πήκτωμα και τοποθετείται σε αυτό ειδική «χτένα» για το σχηματισμό οπών τοποθέτησης δειγμάτων. Εφόσον ολοκληρωθεί ο σχηματισμός και του δεύτερου πηκτώματος, οι γυάλινες πλάκες μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini- Protean 3 της εταιρείας BIORAD, (Η.Π.Α.) αφού απομακρυνθεί η χτένα ενώ προστίθενται ~500 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

**Πίνακας 2.1.4** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, πηκτώματος επιστοίβασης και διαχωρισμού της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.

P.Δ. ηλεκτροφόρησης (running buffer)	Πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) 4%	Πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) 12.5%
30.3 g/L Tris	3 mL Υπερκάθαρο νερό	3.5 mL Υπερκάθαρο νερό
144 g/L γλυκίνη	3.75 mL { 0.25M Tris SDS 0.2% (w/v) pH 6.8	9.4 mL { 0.25M Tris SDS 0.2% (w/v) pH 6.8
SDS 1% (w/v)	0.75 mL Ακρυλαμίδιο 40 %	5.8 mL Ακρυλαμίδιο 40 %
pH 8.3	20 µL TEMED	30 µL TEMED
	60 µL APS 10% (w/v)	90 µL APS 10% (w/v)

Για την προετοιμασία των δειγμάτων προς αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκαν το SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη, όπου το πρώτο αποτελεί ένα ιοντικό απορρυπαντικό και η δεύτερη ένωση αναγωγικό παράγοντα. Η παρουσία του SDS και μετά από θέρμανση, αποδιατάσσει την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών εξουδετερώνοντας τους δευτερεύοντες μη δισουλφιδικούς δεσμούς ενώ της β-μερκαπτοαιθανόλης εξασφαλίζει αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να αναχθούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί τους. Επιπλέον, το SDS προσδένεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία με το βάρος τους έτσι ώστε το ενδογενές φορτίο του μακρομορίου να

είναι τελικά ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο που έχει προσδωθεί από το SDS και η κινητικότητά στο πήκτωμα να είναι συνάρτηση του πρωτεϊνικού μοριακού βάρους. Ειδικότερα, η μεθοδολογία που ακολουθείται για την προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων περιλαμβάνει το βρασμό για ~5 min των απομονωμένων πρωτεϊνικών διαλυμάτων όγκου 15  $\mu$ L στα οποία είχαν προστεθεί 7  $\mu$ L διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Η σύσταση του διαλύματος φόρτωσης είναι: 1 g SDS, 5 mL 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5 mL 50% (w/w) γλυκερόλη, 2.5 mL  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη, 4 mL 0.1% (w/v) κυανού βρωμοφαινόλης.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα καθώς και 5-7  $\mu$ L πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Πίνακας 2.1.5) τοποθετήθηκαν στις σχηματισμένες οπές του πηκτώματος και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 35 mA ανά πήκτωμα για ~1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρώσης (Staining solution) σύστασης: 40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0.4% (w/v) Coomassie G-250, για περίπου 20 min υπό ήπια ανάδευση στην ειδική συσκευή Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία). Τέλος, ακολούθησε αποχρωματισμός με διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) σύστασης: 40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, ομοίως υπό ήπια ανάδευση, ώστε να εμφανιστούν και να αξιολογηθούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

---

**Πίνακας 2.1.5** Η σύσταση του προτύπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού M.B. (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των απομονωμένων πρωτεϊνών.

---

MW ( kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116.0	$\beta$ -γαλακτοζιδάση	<i>E. coli</i>
66.2	Αλβουμίνη ορού βοδινού	Πλάσμα βοδινού αίματος
45.0	Ωαλβουμίνη	Ασπράδι αυγού κότας

35.0	Γαλακτική αφυδρογονάση	Μύες χοίρων
25.0	REase Bsp98I	<i>E. coli</i>
18.4	β-λακτογλοβουλίνη	Γάλα αγελάδος
14.4	Λυσοζύμη	Ασπράδι αυγού κότας

### 2.1.3.vi Ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένων πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες των οποίων η καθαρότητα ταυτοποιήθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE εμφανίζοντας την επιθυμητή ευδιάκριτη ζώνη στο πήκτωμα, αξιολογήθηκαν περαιτέρω ως προς τη συγκέντρωσή τους. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης έγινε κυρίως με φασματοσκοπική μέθοδο μέτρησης της απορρόφησης του καθαρού πρωτεϊνικού διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm αλλά και με τη μέθοδο Bradford. Η φασματοσκοπική μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου Bradford αφού είναι σύντομη, δεν καταστρέφει το χρησιμοποιούμενο για τη μέτρηση πρωτεϊνικό δείγμα ενώ απαιτεί μικρή ποσότητά του.

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm, όπου απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών [Stoscheck, 1990], εφαρμόζεται όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μεγάλη καθαρότητα στο διάλυμα και χρησιμοποιείται το μαθηματικό μοντέλο:

$$C_{\text{mg/mL}} = (\text{O.D.}_{280\text{nm}} \times \text{MW}) / \epsilon$$

μέτρηση της απορρόφησης του πρωτεϊνικού δείγματος στα 280 nm.

όπου:

$C_{\text{mg/mL}}$  : η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/mL,

$\text{O.D.}_{280\text{nm}}$  : η τιμή της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος με τη χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm έπειτα από το μηδενισμό με το ίδιο διάλυμα απουσία πρωτεΐνης,

$\text{M.W.}$  : το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού μορίου,

$\epsilon$  : ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ( $M^{-1}/cm^{-1}$ ) (molar extinction coefficient) της εκάστοτε πρωτεΐνης σύμφωνα με το πρόγραμμα *ProtParam* του ExPASy [Gasteiger, *et al.* 2003].

Η μέτρηση της συγκέντρωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford βασίστηκε στην ιδιότητα της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά κατάλοιπα πρωτεϊνών, ειδικότερα κατάλοιπα αργινίνης, ώστε να εμφανίζεται έγχρωμο προϊόν έντασης ανάλογης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η τιμή της απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνη - χρωστική στα 595 nm καθορίζει και την τιμή της συγκέντρωσης μετά από σύγκριση και με πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται ως πρότυπη πρωτεΐνη η αλβουμίνη ορού βοδινού σε γνωστές τιμές συγκεντρώσεων [Bradford, 1976].

#### 2.1.4 Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση της ενζυμικής ενεργότητας των *StGE2* και *PaGE1*

Η πειραματική διαδικασία αξιολόγησης της ενεργότητας και υπολογισμού των κινητικών σταθερών των GEs για τη δημιουργία πρωτοκόλλου ταχείας ανίχνευσης των προϊόντων υδρόλυσης περιελάμβανε:

- α) την ποιοτική αξιολόγηση της ενζυμικής ενεργότητας με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC),
- β) την ενζυμική αντίδραση παρουσία εμπορικά διαθέσιμου υποστρώματος βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος (BnGlcA, §3.1, Σχήμα 3.1.1),
- γ) τον προσδιορισμό της παραγόμενης βενζυλικής αλκοόλης με χρήση συστήματος διαχωρισμού HPLC και
- δ) τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης D-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) με χρήση της μεθόδου του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit Megazyme (Ιρλανδία).

Λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας του υποστρώματος BnGlcA στο νερό χρησιμοποιήθηκε για τη διαλυτοποίηση του διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO) σε τελική συγκέντρωση 250 mM και φύλαξη στους -20°C. Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (unit, U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol προϊόντος (βενζυλική αλκοόλη ή GlcA αντίστοιχα) ανά min, σε θερμοκρασία 45°C για την *StGE2* και 35°C για την *PaGE1*, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία που επελέγει για τη διεξαγωγή της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσία της θερμοφίλης *StGE2* ήταν 45°C ώστε να αποφευχθεί υψηλός βαθμός αυτοϋδρόλυσης του εστέρα (άυξηση σε υψηλότερη θερμοκρασία) αλλά να εξασφαλίζεται η υψηλή δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου (βέλτιστη στους 55°C [Torakas *et al.*, 2010]). Στην περίπτωση της μεσόφιλης *PaGE1*, η θερμοκρασία που επελέγει βάσει μη δημοσιευμένων πειραματικών δεδομένων (του Εργαστηρίου Biotechnologie des Champignons Filamenteux – Polytech Marseille από την ομάδα του Jean-Guy Berrin, Γαλλία) ήταν 35°C αφού η βέλτιστη είχε προσδιοριστεί στους 37°C και πέραν αυτής το ένζυμο εμφανίζει ταχεία απώλεια της δραστηριότητας του. Το pH της αντίδρασης και στις δύο περιπτώσεις ρυθίστηκε με P.Δ. φωσφορικού καλίου 100 mM στο 6.0 καθώς στο βέλτιστο και για τα δύο ένζυμα pH 7.0 παρατηρούνταν αυξημένη αυτοϋδρόλυση του εστέρα στις αντιδράσεις ελέγχου. Ο τερματισμός της αντίδρασης για την ανάλυση μέσω HPLC έγινε με διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH ενώ κατά τη διάρκεια των μετρήσεων τα δείγματα φυλάσσονταν σε παγόλουτρο. Όλες οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα εις τριπλούν.

Αναλυτικότερα η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής:

α) Για την ποιοτική ανάλυση με TLC, 5 mM BnGlcA σε P.Δ. φωσφορικού καλίου 50 mM pH 6 όγκου αντίδρασης 500 μL, επώαστηκε για 30 min παρουσία είτε απομονωμένης *PaGE1* (50 μg) σε θερμοκρασία 35 °C είτε συμπυκνωμένου μετά από διήθηση υπερκείμενου καλλιέργειας *StGE2* (1 μg) σε θερμοκρασία 45 °C. Οι αντιδράσεις ελέγχου παρασκευάστηκαν ομοίως παρουσία απενεργοποιημένων ενζύμων (βρασμός). Ακολούθησε ανάλυση με TLC και σύστημα ανάπτυξης βουτανόλη:αιθανόλη:νερό (10:5:2, v/v) ενώ για την οπτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα N-1-ναφθυλαιθυλενο-διχλωροδιαμίνης 6.5 mM σε 3 % (v/v) θειικό οξύ [Bounias, 1980] όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §2.1.7.

β) Η ποσοτικοποίηση της ενζυμικής δράσης των GEs τόσο μέσω HPLC ανάλυσης όσο και μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού, περιελάμβανε αρχικά εκκίνηση της αντίδρασης υδρόλυσης με προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  του αντίστοιχου ενζύμου σε Tris-HCl 20 mM pH 8, ενώ το εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος ήταν 0.25 – 20 mM, σε τελικό όγκο 470  $\mu\text{L}$  P.Δ. φωσφορικού καλίου 100 mM pH 6. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα υπό ανάδευση 900 στροφών/min σε τελικό όγκο 500  $\mu\text{L}$ . Για τον τερματισμό της αντίδρασης μετά την πάροδο 30 min, προστίθονταν 100  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  αποφεύγοντας το βρασμό και περαιτέρω αυτοϋδρόλυση του εστέρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 3000 στροφές (rpm) για 10 min και το υπερκείμενο διάλυμα εξεταζόταν είτε μέσω συστήματος διαχωρισμού HPLC είτε φασματοφωτόμετρου μικροπλακών και χρήση εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση αντίστοιχων αντιδράσεων ελέγχου (control).

γ) Οι κινητικές μελέτες έγιναν σε εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος 0.25 – 20 mM και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με το σύστημα HPLC (Jasco PU 987) με στήλη αντίστροφης φάσης C-18 (CC 250/4.6 Nucleosil 100-5, Macherey-Nagel). Μετά από δοκιμασίες για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό υδρολυόμενου BnGlcA και προϊόντος βενζυλικής αλκοόλης ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  σε αναλογία 6:4 (v/v) και ροή 0.4 mL/min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ανίχνευση έγινε φωτομετρικά στα 254 nm σε ανιχνευτή UV-Vis ProStar 335 Συστοιχίας Διόδων (Agilent Technologies) με ενέσιμο όγκο δείγματος 50  $\mu\text{L}$  και χρόνο καταγραφής 15 min, ενώ η ολοκλήρωση των κορυφών έγινε μέσω των λογισμικών Borwin v 1.22 και Varian Pro Star αντίστοιχα για κάθε ανιχνευτή. Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα βενζυλικής αλκοόλης και εύρος συγκεντρώσεων 0.5 – 12 mM. Έπειτα από αφαίρεση των τιμών της αυτοϋδρόλυσης του BnGlcA, υπολογίστηκαν οι ειδικές ενεργότητες (Units/mg) και εκτιμήθηκαν οι σταθερές Michaelis - Menten  $K_M$ ,  $V_{\max}$  και  $k_{\text{cat}}$ , καθώς και ο λόγος  $k_{\text{cat}}/K_M$  μέσω βελτιστοποίησης της εξίσωσης Michaelis-Menten με μη γραμμική μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *scipy.optimize.leastsq* όπως διατίθεται από το πακέτο *SciPy* (*scipy.org*) με χρήση του αλγόριθμου Levenberg-Marquardt του πακέτου *Minpack*

([netlib.org/minpack](http://netlib.org/minpack)), ενώ τα όρια εμπιστοσύνης των τιμών υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα *lmfit* ([lmfit.github.io/lmfitpy](https://lmfit.github.io/lmfitpy)) του πακέτου *python* ([python.org](http://python.org)).

δ) Επικουρικά, έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου GlcA με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit Megazyme προς αξιολόγηση της ενζυμικής ενεργότητας της *StGE2* στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος με μία εναλλακτική μέθοδο. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κατά τον τρόπο που περιγράφηκε, ωστόσο για τον τερματισμό της αντίδρασης δε χρησιμοποιήθηκε  $\text{CH}_3\text{COOH}$  καθώς ο προσδιορισμός όπως καθορίζεται από το εμπορικό σκεύασμα απαιτεί βασικό pH διαλύματος. Ειδικότερα, το πρωτόκολλο του σκευάσματος βασίζεται σε έμμεσο προσδιορισμό με μέτρηση της απορρόφησης του παραγόμενου NADH στα 340 nm κατά την οξείδωση του υπό εξέταση προϊόντος GlcA από την γλυκουρονική αφυδρογονάση. Η συγκεκριμένη μέτρηση απαιτεί ρύθμιση του pH στο 7.4 γεγονός που αποκλείει τον τερματισμό της ενζυμικής υδρόλυσης του εστέρα με προσθήκη  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Παράλληλα, τερματισμός με βρασμό θα επέφερε σε απαγορευτικό βαθμό αυτοϋδρόλυση του BnGlcA οδηγώντας σε αναξιόπιστες μετρήσεις. Για το λόγο αυτό τα δείγματα μετά την ενζυμική υδρόλυση 30 min τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο ώστε να μετριάσει τόσο η δράση της θερμόφιλης *StGE2* όσο και η αυτοϋδρόλυση του υποστρώματος. Μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές (rpm) για 10 min, το υπερκείμενο διάλυμα αναλύθηκε με τη χρήση φωτομέτρου μικροπλακών (Microplate reader) SpectraMax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.) στους 25°C. Για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς του GlcA χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις προτύπου διαλύματος σε συνθήκες ίδιες με αυτές ανάλυσης και αφού συνυπολογίστηκαν οι αντιδράσεις ελέγχου, έγινε ποσοτικοποίηση της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας (U/mg) ενώ η εκτίμηση των κινητικών σταθερών έγινε με την εφαρμογή DataAnalysis (Data Evaluation Systems, Evan Kantrowitz).

## 2.1.5 Σχηματισμός ενζυμικών συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών

Η χρήση των ενζυμικών συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών (Cross Linked Enzyme Aggregates, CLEAs) στον τομέα της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας προσφέρει οικονομικά και περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα. Σε αυτά συγκαταλέγονται αρχικά, η απλή μεθοδολογία παραγωγής τους από εκχυλίσματα πολυενζυμικών μιγμάτων και η αποφυγή υψηλού κόστους φορέων ακινητοποίησης. Η ακινητοποίηση με πρόσδεση σε φορείς όπως ιοντοανταλλακτικές ρητίνες ή ο εγκλεισμός σε αδρανείς φορείς αν και διευκολύνει τον πειραματικό χειρισμό, σε αντίθεση με την ελεύθερη μορφή των ενζύμων, μειονεκτεί κυρίως λόγω της μεγάλης μη καταλυτικής μάζας που ανέρχεται σε ποσοστό 90-99% της συνολικής. Για το λόγο αυτό, η μείωση της κατ'όγκον ενεργότητας οδηγεί σε χαμηλότερη παραγωγικότητα. Συνεπώς, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους ακινητοποίησης, η χρήση των CLEAs είναι πολλά υποσχόμενη. Η δυνατότητα αποθήκευσής τους, η σταθερότητά τους έναντι μετουσίωσης λόγω θερμοκρασίας, οργανικών διαλυτών ή πρωτεόλυσης σε συνδυασμό με την υψηλή καταλυτική απόδοση και την ευκολία στην ανάκτηση και ανακύκλωσή τους, τα αναδεικνύει σε ιδανική επιλογή για βιοκαταλυτικές διεργασίες. Η γλουταραλδεΐδη αποτελεί γενικά τον παράγοντα που επιλέγεται για τη δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών (cross-linking) καθώς είναι μικρού κόστους και ευρέως εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο. Αν και η χημική διαδικασία των διασταυρούμενων δεσμών δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη, θεωρείται ότι βασίζεται στο σχηματισμό βάσεων Schiff μέσω ενδο- και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των ελεύθερων αμινομάδων καταλοίπων Λυσίνης στις επιφάνειες γειτονικών ενζυμικών μορίων με το διλειτουργικό αντιδραστήριο [Sheldon, 2011].

### 2.1.5.i Ακινητοποίηση *StGE2*

Τόσο η απομονωμένη *StGE2* όσο και το υπερκείμενο διάλυμα καλλιέργειάς της (crude, μετά τις πρώτες διηθήσεις του όπως περιγράφεται στην §2.1.3.iv.γ), ακινητοποιήθηκαν μέσω της μεθόδου σχηματισμού ενζυμικών



συσσωματωμάτων διασταυρούμενων δεσμών (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs). Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: την καταβύθιση του ενζύμου μετά από προσθήκη του σε διάλυμα ενός παράγοντα καταβύθισης και τη δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών (cross-linking) με προσθήκη κατάλληλου διδραστικού αντιδραστηρίου στο διάλυμα καταβυθισμένου ενζύμου όπως είναι η γλουταραλδεΐδη [Schoenaart *et al.* 2004, Sheldon, 2011, Vafiadi *et al.*, 2007].

Ειδικότερα, κατά το πρώτο στάδιο της καταβύθισης η μεθοδολογία περιελάμβανε προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  ενζυμικού διαλύματος σε 900  $\mu\text{L}$  κατάλληλου διαλύματος καταβύθισης και ανάδευση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος φύλαξης της πρωτεΐνης Ρ.Δ. φωσφορικού καλίου, pH 6.0 προς πλήρη επαναδιαλυτοποίηση του πρωτεϊνικού ιζήματος και σε pH τέτοιο ώστε η *SrGE2* να διατηρεί την επιθυμητή ενεργότητα [Torakas *et al.*, 2010]. Το δεύτερο στάδιο σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών μετά την καταβύθιση του ενζύμου ή του υπερκειμένου καλλιέργειάς του, αφορούσε σε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας γλουταραλδεΐδης σε εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου στην παρούσα διδακτορική διατριβή οι δοκιμασίες ακινητοποίησης έγιναν με συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης 10, 50, 100, 150 και 200 mM. Η μεθοδολογία μετά την προσθήκη γλουταραλδεΐδης περιελάμβανε ανάδευση του μίγματος για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου και μετέπειτα προσθήκη 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Το προκύπτον αιώρημα που περιείχε το ακινητοποιημένο ένζυμο (CLEAs) φυγοκεντρήθηκε (12000 rpm, 30 min) και μετά την απόχυση του υπερκειμένου ακολούθησε έκπλυση του κολλώδους ιζήματος του ακινητοποιημένου ενζύμου με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος πριν την τελική φυγοκέντρωση. Τέλος, τα συσσωματώματα εξαχνώθηκαν υπό κενό σε (freeze-drying), ζυγίσθηκαν και αξιολογήθηκε η ενεργότητά τους. Για την ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας CLEAs (scale up) και διερεύνηση της ενεργότητάς τους, η μεθοδολογία επαναλήφθηκε με παραλλαγές στις αρχικές ποσότητες ενζύμου ή του υπερκειμένου καλλιέργειας (1 ή 2 mL), του μέσου καταβύθισης, του ρυθμιστικού διαλύματος και της ποσότητας γλουταραλδεΐδης διατηρώντας τις αρχικές αναλογίες ανάμιξης σταθερές.

### ***2.1.5.ii Προσδιορισμός της υδρολυτικής δράσης των CLEAs StGE2 με HPLC ανάλυση***

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ακινητοποιημένης *StGE2* τόσο της απομονωμένης όσο και του υπερκείμενου καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε μέσω HPLC ανάλυσης έναντι του D-γλυκουρονικού εστέρα της 3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλης (εστέρας C). Η μέτρηση ενεργότητας της ακινητοποιημένης *StGE2* μετά την ενζυμική υδρόλυση του εστέρα C, περιελάμβανε ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό της παραγόμενης αλκοόλης C. Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (unit, U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος (αλκοόλη C) ανά min, σε θερμοκρασία 50°C η οποία και ανάχθηκε ανά mg CLEAs.

Για τη διεξαγωγή της ενζυμικής αντίδρασης, 5 mg κάθε προς μελέτη CLEAs διαφορετικής συγκέντρωσης γλουταραλδεϋδης ή διαφορετικού καταβυθιστικού μέσου, προστέθηκε σε 250  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος εστέρα C σε P.Δ. φωσφορικού καλίου pH 6.0 ώστε σε τελική συγκέντρωση υποστρώματος 0.368 mM. Μετά από επώαση για 45 min στους 50 °C υπό ανάδευση 900 rpm και τερματισμό της αντίδρασης με μεταφορά σε παγόλυτρο για αποφυγή της αυτοϋδρόλυσης του εστέρα ακολούθησε φυγοκέντρωση (1500 rpm, 1 min) και άμεση χρωματογραφική ανάλυση με HPLC. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με χρήση αντίστοιχων αντιδράσεων ελέγχου (control), οι οποίες περιείχαν α) 15  $\mu\text{L}$  διάλυμα απομονωμένου ενζύμου μη ακινητοποιημένου και 235  $\mu\text{L}$  εστέρα C σε P.Δ. φωσφορικού καλίου pH 6.0, β) 15  $\mu\text{L}$  διάλυμα πολυενζυμικού μίγματος *StGE2* μη ακινητοποιημένου και 235  $\mu\text{L}$  εστέρα C σε P.Δ. φωσφορικού καλίου pH 6.0 για τον προσδιορισμό της ενεργότητάς του και πιθανού σφάλματος απορρόφησης χρωστικών και άλλων ενώσεων του μίγματος και γ) μόνο 250  $\mu\text{L}$  εστέρα C σε P.Δ. φωσφορικού καλίου pH 6.0 για το συνυπολογισμό του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του εστέρα C στις συνθήκες της αντίδρασης.

Η απελευθέρωση της παραγόμενης αλκοόλης C αναλύθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με στήλη αντίστροφης φάσης C18 Nucleosil (250 mm x 4.6 mm) Macherey - Nagel (Γερμανία) και το σύστημα HPLC (Jasco PU 987) με όγκο δείγματος 20  $\mu\text{L}$ . Ο διαχωρισμός εστέρα C και του προϊόντος υδρόλυσης

αλκοόλη C, έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 7:3 (v/v) και ροή 0.4 mL/min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά (Jasco UV 975) στα 220 nm. Οι κορυφές καταγράφηκαν με χρόνο ανάλυσης τα 15 min για κάθε δείγμα ενώ η ολοκλήρωση των κορυφών των χρωματογραφημάτων επιτεύχθηκε μέσω του λογισμικού Borwin v 1.22 Clarity Version 2.3.3.124, DataApex (Τσεχία). Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της αλκοόλης C χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις των 5, 10, 25, 40, 50 και 60 mg/L στο Ρ.Δ. της αντίδρασης.

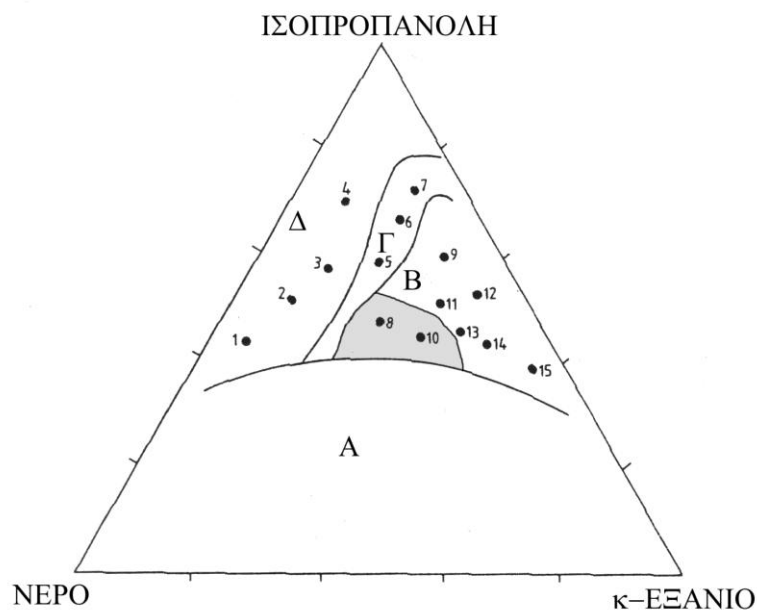
### **2.1.6 Διερεύνηση του συνθετικού δυναμικού της GE σε μη συμβατικά συστήματα**

Η εισαγωγή οργανικών διαλυτών στις βιοκαταλυτικές αντιδράσεις σύνθεσης βασίζεται σε πληθώρα πλεονεκτημάτων. Αρχικά, οι οργανικοί διαλύτες αυξάνουν τη διαλυτότητα υδρόφοβων ή περιορισμένης υδατοδιαλυτότητας υποστρωμάτων βελτιώνοντας την απόδοση. Παράλληλα, η χημική ισορροπία μπορεί να μετατοπιστεί ευνοώντας τη σύνθεση αντί της αυθόρμητης υδρόλυσης είτε τροποποιώντας το διαχωρισμό του υποστρώματος/προϊόντος μεταξύ των επιθυμητών φάσεων είτε αντικαθιστώντας την υδατική φάση με υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες. Η μείωση ή αντικατάσταση του υδατικού περιεχομένου στο μίγμα της αντίδρασης μπορεί να εξαλείψει τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις όπως η υδρόλυση κατά τη μετεστεροποίηση ενώ μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση απόδοσης σε επιθυμητό προϊόν προσφέροντας δυνατότητες όπως η μείωση πιθανής αναστολής της αντιδρασης σύνθεσης από το ίδιο το προϊόν. Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν την εύκολη ανάκτηση του προϊόντος και του βιοκαταλύτη επί παραδείγματι μέσω εξάτμισης του οργανικού διαλύτη ή διήθησης [Vermeë & Tramper, 1995].

Προς αυτήν την κατεύθυνση, μία μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είναι και η χρήση μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών ως μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατική φάση. Τα μικρογαλακτώματα απουσία τασιενεργών ουσιών αποτελούν τριαδικά συστήματα που συνίστανται από έναν

οργανικό διαλύτη, μία αλειφατική αλκοόλη και νερό. Παρουσιάζουν θερμοδυναμική σταθερότητα και αποτελούν οπτικά διαυγείς διασπορές υδατικών συστημάτων μικροσταγονιδίων σε οργανικό διαλύτη. Ειδικότερα, τα σταγονίδια σταθεροποιούνται από τα μόρια αλκοόλης, τα οποία προσροφώνται στην επιφάνειά τους προσδίδοντάς τους σφαιρική συμμετρία ενώ τα ενζυμικά μόρια εγκλωβίζονται στα υδατικά μικροσταγονίδια, δημιουργώντας ένα παχύ στρώμα νερού. Με αυτό το τρόπο προστατεύονται και δεν έρχονται σε επαφή με την περιβάλλουσα οργανική φάση. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των μη συμβατικών μικρογαλακτωμάτων είναι ότι είναι ελεύθερα από τασιενεργές ουσίες, γεγονός που μειώνει τα προβλήματα διαχωρισμού του ενζύμου από τα διάφορα προϊόντα των αντιδράσεων. Κατά συνέπεια, χάρη στη χρήση μικρογαλακτωμάτων, είναι εφικτή η απομόνωση και η ανάκτηση του ενζύμου. Στο Σχήμα 2.1.2 απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων του τριαδικού μίγματος κ-εξανίου: ισοπροπανόλης: νερού στους 25 °C. Τα αριθμημένα σημεία του διαγράμματος φάσεων αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιεκτικότητες των συστατικών του τριαδικού συστήματος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1.6. Αναλυτικότερα, διακρίνονται οι ακόλουθες περιοχές:

- ∞ **A:** Περιλαμβάνει τα ασταθή αδιαφανή μικρογαλακτώματα, τα οποία τείνουν να διαχωριστούν σε δύο σταθερές φάσεις.
- ∞ **B:** Αντιπροσωπεύει τα μικρογαλακτώματα που συνίστανται από υδατικά μικροσταγονίδια διασπειρόμενα σε μια εξωτερική φάση κ-εξανίου. Τα μικρογαλακτώματα στην περιοχή αυτή είναι σταθερά και διαυγή.
- ∞ **Γ:** Η περιοχή αυτή βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές B και Δ και σε αυτήν εμφανίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ νερού και ισοπροπανόλης με διασπορά στο πλούσιο σε κ-εξάνιο μέσο, ενώ τα μικρογαλακτώματα είναι επίσης σταθερά και διαυγή.
- ∞ **Δ:** Στην περιοχή αυτή τα τριαδικά διαλύματα κ-εξανίου: ισοπροπανόλης: νερού είναι σταθερά και δεν ανιχνεύονται μικροδομές.



**Σχήμα 2.1.2** Διάγραμμα φάσεων του τριαδικού μίγματος κ-εξανίου : ισο-προπανόλης : νερού όπου διακρίνονται οι περιοχές δομής **A** (ασταθή μικρογαλακτώματα), **B** (σταθερά διαυγή μικρογαλακτώματα), **Γ** (δεσμοί υδρογόνου μεταξύ νερού - ισοπροπανόλης με διασπορά στο πλούσιο σε κ-εξάνιο μέσο), **Δ** (σταθερά τριαδικά διαλύματα).

**Πίνακας 2.1.6** Σύσταση του τριαδικού συστήματος κ-εξάνιο:ισοπροπανόλη:νερό (ρυθμιστικό διάλυμα 0.05M Tris-HCl, pH 7.5) [Khmelnitsky *et al.*, 1988]

Σύστημα	Σύστημα (%v/v)		
	κ-εξάνιο	ισοπροπανόλη	νερό
1	15.8	65.3	18.9
2	23.4	64.6	12.0
3	27.1	64.4	8.5
4	19.8	74.7	5.5
5	37.8	57.2	5.0
6	34.1	63.4	2.5
7	34.4	63.8	1.8
8	45.9	47.8	6.3

9	47.2	50.8	2.0
10	55.7	39.7	4.6
11	53.4	43.4	3.2
12	56.9	41.5	1.6
13	58.9	38.4	2.7
14	64.4	33.4	2.2
15	71.1	27.7	1.2

Οι περιεκτικότητες του τριαδικού συστήματος που αναφέρονται στην περιοχή Β είναι οι πιο κατάλληλες για αντιδράσεις αντίστροφων μικκυλίων. Ωστόσο, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ενζυμικής δράσης στα συστήματα αυτά, προτείνονται και δοκιμές σε συστάσεις όπως ορίζονται από τις περιοχές Γ και Δ, όπου είναι υψηλή η περιεκτικότητα της μη πολικής ουσίας και μπορεί να υπάρξει σταθεροποίηση και από το το ένζυμο που αποτελεί το τέταρτο συστατικό [Khmelnitsky *et al.*, 1988].

#### ***2.1.6.i Διερεύνηση συνθετικής ικανότητας ακινητοποιημένης και λυοφιλοποιημένης StGE2 σε συστήματα οργανικών διαλυτών απουσία νερού***

Οι αντιδράσεις διερεύνησης εστεροποίησης και μετεστεροποίησης του D-γλυκουρονικού οξέος με τη δράση ακινητοποιημένης (CLEAs, §2.1.4.i) ή λυοφιλιωμένης StGE2, πραγματοποιήθηκαν με τις αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες καθώς και τον εστέρα που αναφέρονται στην §2.1.1.iv (αναλυτικότερα στην §3.2.2 και Πίνακας 3.2.1) είτε ισομοριακά είτε σε περίσσεια, παρουσία μοριακών κοσκίων (molecular sieves) ώστε να απορροφάται το παραγόμενο H<sub>2</sub>O και η ισορροπία της αντίδρασης να ευνοεί την ενζυμική σύνθεση [Otto & Bornscheuer, 1998]. Η τριτοταγής βουτανόλη (tert-butanol, TBA) χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη ισομοριακών ποσοτήτων αλκοόλης ή εστέρα και ως φορέας των αρωματικών αλκοολών και του αρωματικού εστέρα σε περίσσεια, ώστε να αποφευχθεί η τοξική επίδραση

υψηλών συγκεντρώσεων των αντιδρώντων στην ενζυμική ενεργότητα [Klibanov, 2001]. Ο συνολικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 1 mL ενώ χρησιμοποιήθηκαν Eppendorf των 1.5 mL με αεροστεγές πώμα που περιείχαν κατάλληλη ποσότητα GlcA ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 50 mM. Στην περίπτωση των CLEAs, χρησιμοποιήθηκαν 3 mg ακινητοποιημένου ενζύμου το οποίο είχε αξιολογηθεί ως προς τη δραστικότητα έναντι του εστέρα C με HPLC ανάλυση όπως περιγράφηκε (§2.1.5.ii), ενώ στην περίπτωση της λυοφιλωμένης StGE2 η εξάχνωση υπό κενό 20 µL ενζύμου συγκέντρωσης 2 mg/mL είχε ήδη λάβει χώρα στα Eppendorff που θα χρησιμοποιούνταν για τις αντιδράσεις. Στη συνέχεια, προστέθηκε ο επιθυμητός οργανικός διαλύτης και εισήχθη σε επωαστήρα με ανάδευση 900 rpm θερμοκρασίας 50 °C για μέγιστο 72 h κατά τον οποίο λήφθηκαν δείγματα ημερησίως. Για τις αντιδράσεις ελέγχου ακολουθούνταν η ίδια μεθοδολογία απουσία ακινητοποιημένου ή λυοφιλοποιημένου ενζύμου. Ο έλεγχος προόδου των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (§ 2.1.7).

#### ***2.1.6.ii Διερεύνηση συνθετικής ικανότητας StGE2 με δοκιμές εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών ουσιών***

Τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία επιφανειενεργών ουσιών αποτελούνταν από κ-εξάνιο, αλειφατική αλκοόλη ή TBA στην οποία περιέχονταν η αρωματική αλκοόλη (ή εστέρας) ως αντιδραστήριο εστεροποίησης (ή μετεστεροποίησης στην περίπτωση του εστέρα) σε ισομοριακή ποσότητα ή σε περίσσεια ως προς διαλυτοποιημένο GlcA σε Ρ.Δ. φωσφορικού καλίου pH 6.0 (υδατική φάση). Τα τριαδικά αυτά μίγματα αποτελούν ομογενή και οπτικά ισότροπα συστήματα, όπως περιγράφεται στην §2.1.6, ενώ η ισοπροπανόλη αντικαταστάθηκε από την TBA. Τα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα αντιδράσεων της εν δυνάμει εστεροποίησης (ή μετεστεροποίησης) με τη δράση της StGE2 σε τριαδικά συστήματα μικρογαλακτωμάτων αναλογιών κ-εξανίου: TBA: υδατικής φάσης

**α)** 47.2: 50.8: 2.0 (v/v/v),

β) 53.4: 43.4: 3.2 (v/v/v) και

γ) 37.8: 57.2: 5 (v/v/v).

Για τις δοκιμές αντιδράσεων εστεροποίησης του D-γλυκουρονικού οξέος με τη δράση της *SrGE2* χρησιμοποιήθηκαν οι αλκοόλες:

- 1-βουτανόλη,
- 2-βουτανόλη,
- 1-επτανόλη,
- βενζυλική αλκοόλη,
- 3-φαινυλο-1-προπανόλη (A),
- κινναμική αλκοόλη (B) και
- 3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη (C)

ενώ για αυτές της μετεστεροποίησης ο οξικός εστέρας της κινναμικής αλκοόλης (B).

Κατά την αντίδραση σύνθεσης, η αλειφατική αλκοόλη (βουτανόλη-1 ή επτανόλη-1) εκτός από απαραίτητο συστατικό για τη σταθεροποίηση του μικρογαλακτώματος αποτελούσε και αντιδρών σε περίσσεια. Αντίθετα, στην περίπτωση των αρωματικών αλκοολών (βενζυλική αλκοόλη και αλκοόλες A,B και C) ή εστέρα ως αντιδρώντα, ισομοριακά ή αναλογία 1:2 ή σε περίσσεια, η TBA χρησιμοποιούνταν ως φορέας σταθεροποίησης του μικρογαλακτώματος. Οι δοκιμές έλαβαν χώρα σε όγκο αντιδράσεων 1 mL και σε Eppendorf των 1.5 mL με αεροστεγές πώμα λόγω της πτητικότητας των συστατικών. Η διεξαγωγή των δοκιμών αντίδρασης περιελάμβανε ανάμιξη των αλκοολών προς εστεροποίηση σε περίσσεια ή διαλυτοποιημένες σε TBA σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, με κ-εξάνιο. Για την έναρξη της αντίδρασης στο οργανικό μίγμα προστέθηκε P.Δ. φωσφορικού καλίου στο οποίο ήταν διαλυτοποιημένα 25 mM D-γλυκουρονικού οξέος και 20  $\mu$ L ενζύμου συγκέντρωσης 2.0 mg/mL. Οι αντιδράσεις ελέγχου ακολουθούσαν την ίδια μεθοδολογία με αντικατάσταση του όγκου του ενζύμου από αντίστοιχο όγκο P.Δ. Μετά από άμεση και έντονη ανάδευση (~2 min) το μικρογαλάκτωμα σταθεροποιούνταν (διαυγές μονοφασικό σύστημα) και εισάγονταν σε επωαστήρα με ανάδευση 900 rpm επιλεγμένης θερμοκρασίας (δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 45 °C, 50 °C ή 55 °C) για μέγιστο χρονικό διάστημα 72 h κατά το οποίο λαμβάνονταν δείγματα ημερησίως. Ο



έλεγχος προόδου των αντιδράσεων γινόταν ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (§ 2.1.7).

### 2.1.7 Ποιοτική ανάλυση προϊόντων αντιδράσεων με TLC – Απομόνωση ζώνης ενδιαφέροντος

Η ανίχνευση και αξιολόγηση προϊόντων των αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε μη συμβατικά συστήματα για τη διερεύνηση της συνθετικής ικανότητας της *SzGE2*, περιελάμβανε τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Η μεθοδολογία της TLC βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας αφού χρησιμοποιείται ως στατική φάση, λεπτή ροφητική στοιβάδα ενώ ως κινητή φάση σύστημα διαλύτη ανάπτυξης.

Ειδικότερα, η στατική φάση επιστρώνεται σε γυαλί, πλαστικό ή αλουμίνιο όπου τα δύο τελευταία είναι και τα δημοφιλέστερα λόγω της ελαστικότητας και της ευκολίας κοπής τους χωρίς καταστροφή της επίστρωσης. Το διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina) ή ρητίνες με όξινες ή βασικές ομάδες χρησιμοποιούνται συνήθως ως υλικά επίστρωσης αναμεμιγμένα με μικρή ποσότητα διένυδρου θειϊκού ασβεστίου (γύψος) ώστε να εξασφαλιστεί καλή προσκόλληση στο φορέα επίστρωσης. Η επιλογή του κατάλληλου υλικού επίστρωσης για την ανάλυση καθορίζεται από την πολικότητα των ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν αφού για μη πολικές προτιμάται η alumina και για πιο πολικές το silica gel. Η κινητή φάση, εξάλλου, περιλαμβάνει οργανικούς διαλύτες ανάπτυξης ή μίγμα τους (όπως εξάνιο, τολουόλιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη) όπου ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος γίνεται βάσει της προσρόφησης, αλλά μπορεί να περιλαμβάνει και υδατικό μίγμα διαλυτών, όπου ο διαχωρισμός επηρεάζεται και από φαινόμενα κατανομής. Ο βαθμός συγκράτησης κάθε συστατικού στη στοιβάδα προσρόφησης εκφράζεται μέσω του παράγοντα επιβράδυνσης  $R_f$ , που αποτελεί το λόγο της απόστασης που κινήθηκε η ένωση προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης ανάπτυξης (μέτωπο διαλύτη). Για την εύρεση του κατάλληλου συστήματος έκλουσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες σε διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης ώστε οι

τιμές  $R_f$  των συστατικών του δείγματος να διαφέρουν τουλάχιστον κατά  $\sim 0.2$  και να είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους [Κορδοπάτης & Μαγκαφά, 2005].

Για την ανίχνευση πιθανών προϊόντων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης τόσο στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων όσο και στα συστήματα οργανικών διαλυτών με την υπό διερεύνηση δράση της *StGE2*, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου με επίστρωση κανονικής φάσης silica gel 60 F254 Merck (Γερμανία). Οι διαλύτες ανάπτυξης που δοκιμάστηκαν ήταν:

- $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  σε αναλογία 95 : 5 (v/v),
- $\text{H}_2\text{O} : \text{HCOOH} : \text{CH}_3\text{CN}$  σε αναλογίες 70 : 10 : 13 (v/v),
- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 : \text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$  σε αναλογία 30 : 20 (v/v),
- $n\text{-CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$  σε αναλογίες 50 : 25 : 25 (v/v) και
- $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  σε αναλογίες 65:15:2 (v/v)

Πιο αναλυτικά, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Κοπή των πλακών TLC στις κατάλληλες διαστάσεις για τον αριθμό δειγμάτων που θα αξιολογούνταν και σημείωση (με χρήση μολυβιού) της γραμμής βάσης (1 cm από το κάτω άκρο της πλάκας) καθώς και των θέσεων φόρτωσης τους.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύτη ανάπτυξης σε γυάλινο δοχείο ανάπτυξης ώστε η στάθμη να μην ξεπερνά τη χαραγμένη γραμμή βάσης της πλάκας TLC αλλά και να εξασφαλιστεί ο κορεσμός σε ατμούς του χώρου.
- Φόρτωση όγκου δείγματος  $\sim 5\text{-}10$   $\mu\text{L}$  στις προσημειωμένες θέσεις, εξάτμιση με ρεύμα αέρα των κηλίδων και ομοιόμορφη βύθιση της πλάκας στο διαλύτη.
- Μετά την άνοδο του διαλύτη χάριν σε τριχοειδείς δυνάμεις σε ύψος  $\sim 1$  cm από το άνω άκρο της πλάκας, αφαίρεση της πλάκας από το δοχείο ανάπτυξης, εξάτμιση του διαλύτη και ανίχνευση των προσροφημένων και κατανεμημένων συστατικών των δειγμάτων.

Αρχικά η ανίχνευση για τη διαπίστωση ύπαρξης προϊόντων που έφεραν φαινολικό δακτύλιο λάμβαναν χώρα με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

στα 254 nm χάριν στις ειδικές φθορίζουσες πλάκες σε UV που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν εναλλακτικά δύο χημικές μέθοδοι που αφορούσαν σε ψεκασμό της πλάκας με αντιδραστήρια ώστε να προκύψουν έγχρωμα παράγωγα των προϊόντων.

Το πρώτο αντιδραστήριο που δοκιμάστηκε για την ανίχνευση σακχάρων (D-γλυκουρονικό οξύ ελεύθερο και εν δυνάμει εστεροποιημένο) αποτελούνταν από διάλυμα N-1-ναφθυλαιθυλενο-διχλωροδιαμίνης 6.5 mM σε 3 % (v/v) θειικό οξύ. Μετά από ξήρανση στους 100 °C για ~5-10 min η εμφάνιση καφέ κηλίδων (ή ελαφρά ιώδους σε περίπτωση υπερβολικής ποσότητας βαφής ή θέρμανσης) είναι θετική ένδειξη προϊόντων αφού οφείλεται σε αντίδραση αφυδρογόνωσης των N-υδρογόνων και υδροξυλικών ομάδων των σακχάρων με κυκλιτόλες (cyclitols) [Bounias, 1980]. Τέλος, έγινε δοκιμασία ανίχνευσης εναλλακτικά με διάλυμα ανιλίνης-φθαλικού σε κορεσμένη n-βουτανόλη (εκχύλιση με υπερκάθαρο νερό), για τη διερεύνηση αποφυγής χρώσης ανεπιθύμητων προσμίξεων, κατά την οποία αφού διαβράχθηκε η πλάκα, θερμάνθηκε στους 100 °C για ~5 min [Partridge, 1949].

Στην περίπτωση της απομόνωσης πιθανού προϊόντος ενζυμικής σύνθεσης, χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία στοιβάδας (Preparative Layer Chromatography, PLC) και ακολούθως ταυτοποίηση του με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS). Διάλυμα της αντίδρασης συστήματος μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών όπου ανιχνεύτηκε παρουσία προϊόντος με TLC, αλλά αυξημένου όγκου (10 mL, scale up) όμοιας αναλογίας συστατικών, αντιδρώντων και όμοιων συνθηκών αντίδρασης, φορτώθηκε στη βάση της υάλινης πλάκας PLC με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε για τη μέθοδο TLC. Ο διαχωρισμός έλαβε χώρα στο ίδιο σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε με τη μεθοδολογία TLC ενώ για τον προσδιορισμό της ζώνης ενδιαφέροντος η πλάκα PLC τοποθετήθηκε σε συσκευή φωτογράφισης σε κλειστό θάλαμο InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία) υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Η ζώνη ενδιαφέροντος λήφθηκε με απόξεση του υλικού επίστρωσης των πλακών (Silica gel) και ακολούθησε εκχύλιση για την παραλαβή του συστατικού προς ταυτοποίηση. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη αιθανόλη (4x5 mL) υπό ανάδευση και ακολούθησε διήθηση. Στη

συνέχεια επαναλήφθηκε η μεθοδολογία TLC στο σύστημα ανάπτυξης της αντίδρασης προς επιβεβαίωση της παρουσίας προϊόντος στο εκχύλισμα. Τέλος το δείγμα εξατμίστηκε υπό κενό για να ακολουθήσει διαλυτοποίησή του σε διάλυμα μεθανόλης : ύδατος αναλογίας 1:1 (v/v) προς μετέπειτα ταυτοποίηση της σύστασής του με απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο μαζών (Varian 500-MS Ion Trap, Agilent Technologies).

### 2.1.8 Δοκιμασία απομόνωσης LCCs – Διερεύνηση φυσιολογικής δράσης της GE

Η διερευνητική διεργασία απομόνωσης LCCs από σκανδιναβική ελάτη (*Picea abies*) περιελάμβανε δοκιμασίες ακολουθώντας δύο εναλλακτικές μεθοδολογίες: α) βάσει του πρωτοκόλλου που διατυπώθηκε από τους J. Azuma και K. Tetsuo [Azuma & Tetsuo, 1988] και β) βάσει της μεθοδολογίας των A.X. Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009]. Η δεύτερη μεθοδολογία ακολουθήθηκε στην περίπτωση της πρώτης ύλης φελλού φυτικής προέλευσης. Η απαραίτητη ανάλυση της σύστασης των αρχικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες, η αξιολόγηση των προϊόντων της απομόνωσης καθώς και των προϊόντων μετά από ενζυμική κατεργασία των υπολειμμάτων, έγινε μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed spectroscopy, FT-IR). Η ανάλυση στόχευε στον προσδιορισμό της σύστασης των αρχικών δειγμάτων ξύλου *P. abies* αλλά και των προϊόντων απομόνωσης καθώς και στην ανίχνευση εμπλουτισμού σε εστερικούς δεσμούς στόχο για την StGE2 (εστεροποιημένων αλκοολών της λιγνίνης με μονάδες 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (MeGlcA) της γλυκουρονοξυλάνης) στα απομονωμένα κλάσματα LCCs σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα.

### 2.1.8.i Ανάλυση δειγμάτων μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας (Infra-Red, IR) από το υπό εξέταση δείγμα ουσίας με την πρόκληση δονήσεων και περιστροφικών κινήσεων στα μόρια. Για να λάβει χώρα η απορρόφηση θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπέσει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόριο εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου. Ειδικότερα, αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας (ανενεργή στο IR δόνηση) αλλά απορροφούν μόρια των οποίων μεταβάλλεται η διπολική ροπή κατά τη δόνηση ενώ όσο μεγαλύτερη η μεταβολή τόσο ισχυρότερη η απορρόφηση. Κατά συνέπεια, η φασματοσκοπία υπερύθρου μελετά την απορρόφηση από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας αφού τα μόρια απορροφούν ενέργεια  $\Delta E = h\nu$  από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση [Βαλαβανίδης, 2006]. Το φάσμα IR υποδιαιρείται στις εξής περιοχές:

- Εγγύς Υπέρυθρο (NIR) (0.75 – 2.5  $\mu\text{m}$ , 13300-4000  $\text{cm}^{-1}$ )
- Θεμελιώδη Περιοχή (IR) (2.5 – 25  $\mu\text{m}$ , 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ )
- Άπω Υπέρυθρο (FIR) (25 – 1000  $\mu\text{m}$ , 400 – 10  $\text{cm}^{-1}$ )

Η τεχνική της φασματοσκοπίας IR με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα, εκτός από ποιοτική ανάλυση μπορεί να αφορά και σε ποσοτική (δυνατότητα ανάλυσης του φάσματος ενός μείγματος στα επιμέρους φάσματα των συστατικών του μέσω διαθέσιμης «βιβλιοθήκης» φασμάτων IR) ακόμα και θερμικά ευαίσθητων ενώσεων αέριας, υγρής ή στερεής κατάστασης, ενώ διακρίνεται από μεγάλη ευαισθησία. Εξάλλου, ενώ η συνήθης φασματοσκοπία υπερύθρου περιλαμβάνει ανάλυση της πολυχρωματικής ακτινοβολίας της πηγής με χρήση μονοχρωμάτορα (πρίσμα ή φράγμα), η φασματοσκοπία FT-IR πλεονεκτεί αφού χρησιμοποιεί το *συμβολόμετρο Michelson* (interferometer) το οποίο απαρτίζεται από δύο κάτοπτρα κάθετα μεταξύ τους, εκ των οποίων το ένα είναι κινητό, καθώς και ένα διαιρέτη δέσμης

(beam splitter) που παρεμβάλλεται μεταξύ τους. Επιπλέον, η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης, επεξεργασίας, υπολογισμού μέσου όρου και αποθήκευσης δεδομένων πολλαπλών φασμάτων. Επίσης είναι εφικτή η αφαίρεση φασμάτων (difference spectroscopy) για ακριβή ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών που μπορεί να οφείλονται τόσο στην μεταβαλλόμενη σύσταση, όσο και στην φυσική κατάσταση του δείγματος ενώ είναι δυνατή και η μελέτη μοριακών αλλαγών και αλληλεπιδράσεων. Ωστόσο, η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει την φασματοσκοπία FT-IR μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση που η ατμόσφαιρα του φωτομέτρου δεν έχει πλήρως εκκενωθεί, καθώς σε αυτή την περίπτωση το φάσμα υπερύθρου παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H<sub>2</sub>O και το CO<sub>2</sub> του χώρου του φωτομέτρου. Τέλος, το σοβαρότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η απαιτούμενη ακριβής ρύθμιση του συμβολομέτρου Michelson αφού, σε αντίθεση με τα συμβατικά, τα FTIR φασματοφωτόμετρα δεν παρέχουν πληροφορία σε περίπτωση μη καλής ρύθμισης [Καμίτσος & Χρυσικός, 1999].

Πιο αναλυτικά, κατά την FT-IR τεχνική η ακτινοβολία από την πηγή προσπίπτει σε ένα διαχωριστή δέσμης που αποτελείται από ένα φιλμ γερμανίου σε υπόστρωμα KBr, διαπερατό στο μέσο IR. Λόγω της ημιδιαπερατότητάς του, δημιουργούνται δύο δέσμες, από τις οποίες η μία ανακλάται σε σταθερό κάτοπτρο και η άλλη ανακλάται στο κινητό κάτοπτρο του συμβολόμετρου Michelson. Οι δύο αυτές δέσμες ενώνονται, διαπερνούν το δείγμα και προσκρούουν μαζί στον ανιχνευτή. Η διαφοροποίηση του φασματομέτρου FT-IR, όπως αναφέρθηκε, έγκειται στη χρήση του συμβολόμετρου Michelson το κινητό κάτοπτρο του οποίου έχει τη μοναδική ιδιότητα σε κάθε σημείο του να δίνει ταυτόχρονα πληροφορίες για όλες τις επιμέρους IR συχνότητες. Το εξαγόμενο σήμα καταγράφεται ως συμβολόγραμμα ενώ αποκωδικοποιείται και μετατρέπεται σε συμβατικό IR φάσμα (διαπερατότητα T% συναρτήσει κυματαριθμού  $\bar{\nu}$  όπου  $\bar{\nu} = 1/\lambda$  και  $\lambda$  μήκος κύματος σε cm) με χρήση του μαθηματικού μετασχηματισμού Fourier.

Οι περιοχές φάσματος ενδιαφέροντος κατά την ανάλυση με FT-IR διαχωρίζονται σε ευρείες κατηγορίες βάσει των ατόμων ή λειτουργικών ομάδων

των οποίων οι δονήσεις προκαλούν απορρόφηση στην κάτω περιοχή και επιγραμματικά είναι οι εξής:

- *Περιοχή τάσεως υδρογόνου ( $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ )* όπου απορροφούν δονήσεις τάσεως C-H, O-H, N-H, S-H.
- *Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ( $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ )* όπου απορροφούν τριπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-αζώτου καθώς και οι δύο διπλοί δεσμοί (C=C=C, N=C=O).
- *Περιοχή τάσεως διπλού δεσμού ( $2000-1600\text{ cm}^{-1}$ )* όπου υπεύθυνες για την απορρόφηση είναι οι δονήσεις δεσμών C=C, C=O, C=N.
- *Περιοχή τάσεως και κάμψεως απλού δεσμού ( $1500-700\text{ cm}^{-1}$ )* όπου εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, δονήσεις κάμψεως δεσμών C-H, δονήσεις τάσεως και κάμψεως απλών δεσμών μεθυλενίου, μεθυλίου, αμινομάδων. Ονομάζεται περιοχή αποτυπωμάτων (fingerprint region). Το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο (δακτυλικό αποτύπωμα).
- Περιοχή άπω υπέρυθρου ( $\bar{\nu} < 400\text{ cm}^{-1}$ ), όπου εμφανίζονται δονήσεις σκελετού και αναφέρονται στο σύνολο των δεσμών και κυρίως σε κυκλικές ενώσεις [Βαλαβανίδης, 2006].

Ωστόσο, ο προσδιορισμός των χημικών δεσμών και συνεπώς η ανάλυση του δείγματος απαιτεί διεξοδική και συνδυαστική μελέτη του χαρακτηριστικού φάσματος απορρόφησης του καθώς μπορεί να εμφανίζονται δεσμοί που απορροφούν σε ίδιες περιοχές και διαχωρίζονται μέσω άλλων χαρακτηριστικών υπέρυθρων ζωνών τους που δεν αλληλεπικαλύπτονται. Επιπλέον, η έλλειψη συγκεκριμένης ζώνης απορρόφησης από το φάσμα μπορεί να αποδοθεί όχι μόνο στην απουσία του αντίστοιχου είδους δομικής μονάδας από το δείγμα αλλά και στο μειωμένο αριθμό τους ώστε να εκδηλώνεται χαμηλής έντασης σήμα. Τέλος, για την ποιότητα του φάσματος, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και η καθαρότητα του δείγματος αφού όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των συστατικών του τόσο πιο πολύπλοκο το φάσμα που θα προκύψει δυσχαιρένοντας την ακριβή ανάλυσή του [Socrates, 2001].

Η ανάλυση περιελάμβανε αρχικά τη κονιορτοποίηση κάθε ξηρού δείγματος προς αποφυγή της σκέδασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (απαιτείται απουσία

υγρασίας για την ανάλυση) [Pecsok *et al.*, 1976]. Ακολούθησε ανάμιξη ~10 mg υλικού με ~100 mg βρωμιούχο κάλιο (διαυγές KBr, κατάλληλο για FT-IR ανάλυση, Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) ώστε να σχηματιστεί μια ομοιογενής λεπτομερής μάζα, η οποία στη συνέχεια συμπίεστηκε σε παστίλιες (pellets) με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας. Στη συνέχεια, η παστίλια δείγματος με μήτρα KBr τοποθετήθηκε σε δειγματοφορέα κατάλληλο για στερεά δείγματα του φασματομέτρου FT-IR για να ακολουθήσει η ανάλυση. Για μηδενισμό και αφαίρεση θορύβου και υγρασίας χρησιμοποιήθηκε παστίλια ~100 mg KBr. Η περιοχή ενδιαφέροντος που μελετούνταν για κάθε δείγμα κάλυπτε εύρος 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , χρησιμοποιώντας ανάλυση Happ-Genzel. Τα φασματομέτρα υπερύθρου FT-IR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1) το MAGNA-IR 560 της Nicolet ήταν εφοδιασμένο με ανιχνευτή DTGS KBr, διασχιστή ακτίνας Kbr (beam splitter) και δειγματοφορέα στερεών δειγμάτων DRIFT (Diffuse Reflectance, Spectra Tech Inc. Shelton CT, USA) (Εικόνα 2.1.2) και εναλλακτικά 2) το Micro FTIR Biorad Excalibur FTS 3000MX συνοδευόμενο από οπτικό μικροσκόπιο Inspect IR Plus. Η επεξεργασία και οπτικοποίηση των δεδομένων υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier έγινε με το πρόγραμμα *Essential FTIR™* v.3.50 (Operant LLC, <http://www.essentialftir.com/>).

**Εικόνα 2.1.2** Φασματόμετρο υπερύθρου FT-IR MAGNA-IR 560, Nicolet όπου διακρίνεται και ο δειγματοφορέας στερεών δειγμάτων.





### 2.1.8.ii. Μεθοδολογίες απομόνωσης LCCs

Την ανάλυση με FT-IR των αρχικών δειγμάτων ακολούθησε εφαρμογή μεθοδολογιών πρωτοκόλλων απομόνωσης λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων (Lignin-Carbohydrate Complexes, LCCs) εκ των οποίων η πρώτη εφαρμόστηκε για πρώτη ύλη *P. abies* ενώ η δεύτερη και για πρώτη ύλη φελλό φυτικής προέλευσης.

α) Η πρώτη μεθοδολογία κατά τους J. Azuma και K. Tetsuo [Azuma and Tetsuo, 1988], η οποία ενδείκνυται για δείγματα διαφόρων πηγών προελεύσεως, περιελάμβανε αρχικό δείγμα 50 g αναμειγμένων υπολειμμάτων ξύλου *P. abies* όλων των διαθέσιμων μεγεθών μικροαλεσμένων σωματιδίων στα οποία δεν είχε απομακρυνθεί η πηκτίνη (FG, FF, FG2, FF2). Τα διαδοχικά στάδια προετοιμασίας, απομόνωσης και καθαρισμού που ακολουθήθηκαν κατά την κατεργασία του αρχικού δείγματος, παραλλάσσοντας το πρωτόκολλο όπου κρίθηκε απαραίτητο ώστε να προσαρμοστεί στο διαθέσιμο εργαστηριακό εξοπλισμό περιελάμβαναν τα εξής:

- Στο δείγμα 50 g *P. abies* προστέθηκε μίγμα αιθανόλης:βενζολίου (1:2, v/v) με στόχο εκχύλιση υπό ανάδευση για 48 h. Στη συνέχεια, στο δείγμα προστέθηκαν 500 mL διαλύματος οξικού καλίου (CH<sub>3</sub>COOK) 0.25% (w/v) και παρέμεινε για 24 h στους 60° C υπό ανάδευση για αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Παραλλάσσοντας τη μεθοδολογία (άλεση σε ατμόσφαιρα αζώτου με δονούμενο σφαιρόμυλο), το δείγμα εξαχνώθηκε υπό κενό χωρίς περαιτέρω άλεση καθώς είχε ήδη υποστεί προκατεργασία μικροάλεσης σε σφαιρόμυλο. Το πρώτο αυτό στάδιο προετοιμασίας αποσκοπούσε στην απομάκρυνση της πηκτίνης (depectination) και των μη εγγενών στην κυτταρική δομή του ξύλου οργανικών ουσιών που εκχυλίστηκαν (extractive-free wood).
- Στο επόμενο στάδιο επιδιώχθηκε η εκχύλιση των LCCs και για το λόγο αυτό το ξηρό δείγμα *P. abies* που παραλήφθηκε στο προηγούμενο στάδιο αναμίχθηκε με 100 mL υδατικού διαλύματος 1,4 – διοξανίου

80% (v/v) για 48 h υπό ανάδευση. Το υπόλειμμα του δείγματος, εκπλύθηκε και επανεκχυλίστηκε με το ίδιο διάλυμα. Τα διαλύματα διήθησης και έπλυσης των δύο εκχυλίσεων συλλέχθηκαν και αναμίχθηκαν ώστε να συμπυκνωθούν σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40° C μέχρι όγκου ~5 mL για να εξισορροπηθούν έναντι υπερκάθαρου νερού. Για τη διαπίδυση χρησιμοποιήθηκαν βενζυλιωμένες μεμβράνες κυτταρίνης για μείωση του μεγέθους πόρων τους ώστε να διαχωρίζονται ενώσεις με  $MB \leq 1.2$  kDa από ενώσεις με  $MB > 2$  kDa για την προετοιμασία των οποίων ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρείας (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Το ίζημα που καταβυθίστηκε φέρεται να αποτελεί τη λιγνίνη, η οποία απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση στα 8000 g για 15 min και εκπλύθηκε έπειτα τρις με υπερκάθαρο νερό. Τα υδατικά διαλύματα διήθησης και έκπλυσης ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν μέχρι ~5 mL θερμοκρασία < 40° C για να εξαχνωθούν υπό κενό.

- Το στάδιο που ακολούθησε περιελάμβανε τον καθαρισμό των εν δυνάμει LCCs που παραλήφθηκαν μετά την εξάχνωση υπό κενό. Το ξηρό υπόλειμμα LCCs και άλλων προσμίξεων διαλυτοποιήθηκε σε 8 mL υδατικού διαλύματος 1,4 - διοξανίου 50% (v/v) και εκχυλίστηκε με 8 mL χλωροφορμίου με στόχο την απομάκρυνση λιγνίνης μη συμπλοκοποιημένης με υδατάνθρακες. Το χλωροφόρμιο και οι ενδιάμεσες θολές φάσεις εκπλύθηκαν πέντε φορές με 4 mL υπερκάθαρου νερού. Τα ενωμένα υδατικά διαλύματα εξισορροπήθηκαν έναντι υπερκάθαρου νερού με τη χρήση βενζυλιωμένων μεμβρανών κυτταρίνης ομοίως με το προηγούμενο στάδιο.
- Μετά τη διαπίδυση το υδατικό διάλυμα που περιείχε τα εν δυνάμει LCCs εξαχνώθηκε υπό κενό και διαλυτοποιήθηκε σε 1.4 mL μίγματος πυριδίνης: οξικού οξέος: νερού (9: 1: 4 (v/v/v)) και εκχυλίστηκε με 8.4 mL χλωροφορμίου (x6 τον όγκο του διαλύματος). Μετά την προσθήκη 10 mL υπερκάθαρου νερού η υδατική φάση (υπερκείμενη)

παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση (8000 g για 15 min). Το χλωροφόρμιο και οι ενδιάμεσες ζελατινοειδείς φάσεις εκπλύθηκαν με 10 mL υπερκάθαρου νερού και μετά από φυγοκέντρηση ομοίως, οι υδατικές φάσεις ενώθηκαν και εξισορροπήθηκαν έναντι υπερκάθαρου νερού με τη χρήση των βενζυλιωμένων μεμβρανών κυτταρίνης. Το υδατικό διάλυμα των εν δυνάμει LCCs τέλος εξαχνώθηκε υπό κενό.

Παραλλάσσοντας το πρωτόκολλο απομόνωσης LCCs που ακολουθήθηκε, παραλείφθηκε το τελευταίο στάδιο που περιελάμβανε κλασματοποίηση με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, λόγω εφαρμογής της μεθοδολογίας σε πολύ μικρότερης μάζα διαθέσιμου αρχικού δείγματος (50 g έναντι 1 kg της μεθοδολογίας). Για το λόγο αυτό, το ξηρό υπόλειμμα του τελευταίου σταδίου αναλύθηκε με FT-IR με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο §2.1.7.i.

β) Η δεύτερη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε διερευνητικά για την εν δυνάμει απομόνωση LCCs όπως διατυπώθηκε από τους Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009] αφορούσε σε δείγματα αχύρου κριθαριού και βλαστών αραβοσίτου. Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε δοκιμασία εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθοδολογίας σε αρχικό δείγμα ξύλου *P. abies* στο οποίο είχε απομακρυνθεί η πηκτίνη πριν την παραλαβή του καθώς και φελλού φυτικής προέλευσης. Το δείγμα *P. abies* που χρησιμοποιήθηκε ήταν προϊόν ανάμιξης των δειγμάτων μεγέθους σωματιδίων ~310 και ~20  $\mu\text{m}$  (FG Dep και FF3) στα οποία είχε απομακρυνθεί η πηκτίνη.

Τα διαδοχικά στάδια απομόνωσης που ακολουθήθηκαν κατά την κατεργασία αρχικών δειγμάτων με στόχο την παραλαβή εν δυνάμει LCCs περιελάμβαναν τα εξής:

- Αρχικά έλαβε χώρα εκχύλιση με 90% ουδέτερο υδατικό διάλυμα διοξανίου με αναλογία στερεού δείγματος προς υγρό 1:20 (g/mL) στους 80° C για 4 h υπό ανάδευση. Το διάλυμα διηθήθηκε και το υπόλειμμα εκπλύθηκε δις με 90% υδατικό διάλυμα διοξανίου. Τα διαλύματα διήθησης και έκπλυσης ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (~50 mL) ενώ στη συνέχεια αναμίχθηκαν με x3 όγκους 95% αιθανόλης (1 h στους 25° C. Το ίζημα

ημικυτταρίνης που καταβυθίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου για να ξηρανθεί σε ρεύμα αέρα και να απομακρυνθούν η αιθανόλη και το εναπομείναν διοξάνιο. Το ημικυτταρινικό κλάσμα που απομονώθηκε σε αυτό το στάδιο (H1) ήταν διαλυτό σε 90% διοξάνιο ενώ στο υπερκείμενο διάλυμα μετά από εξάτμιση της αιθανόλης και του εναπομείναντος διοξανίου, επανακαταβυθίστηκε σε pH 1.5- 2.0 με προσθήκη διαλύματος 6 M HCl για τη ρύθμιση, το διαλυτό σε διοξάνιο κλάσμα λιγνίνης. Το κλάσμα λιγνίνης διηθήθηκε, εκπλύθηκε με όξινο (pH 2.0) υπερκάθαρο νερό και λυοφιλοποιήθηκε ώστε να αναλυθεί με FT-IR και να ελεγχθεί η πρόοδος της μεθοδολογίας.

- Στη συνέχεια, το απαλλαγμένο από ουσίες διαλυτές σε 90% ουδέτερο διοξάνιο στερεό υπόλειμμα, εκχυλίστηκε σε 80% (v/v) υδατικό διάλυμα διοξανίου (η αναλογία στερεού: διαλύματος ήταν 1:20 g/mL) το οποίο περιείχε 0.05 M HCl και παρέμεινε υπό ανάδευση για 4 h στους 70° C (με πωματισμό και όχι σε ατμόσφαιρα αζώτου, παραλλάσσοντας το πρωτόκολλό). Μετά τη διήθηση, ακολούθησε έκπλυση δις με 80 % υδατικό διάλυμα διοξανίου και τα υπερκείμενα διαλύματα εξουδετερώθηκαν με 1 M NaOH σε pH 5.5. Το διάλυμα που προέκυψε από την ανάμιξη διηθήματος και έκπλυματος, συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξάτμιστήρα υπό κενό (~50 mL) και προστέθηκαν x3 όγκοι 95% αιθανόλης (1 h, 25° C) για την απομόνωση όξινων διαλυτών στο διοξάνιο ημικυτταρινών (H2) οι οποίες καταβυθίστηκαν, διηθήθηκαν και ξηράθηκαν όπως περιγράφηκε.
- Το στερεό υπόλειμμα έπειτα από τις δύο διαδοχικές εκχυλίσεις με διοξάνιο, κατεργάστηκε με DMSO στους 80 °C για 4 h και μετά από διήθηση και έκπλυση με DMSO παραλήφθηκε άλλο ένα κλάσμα ημικυτταρίνης (H3) από το υπερκείμενο διάλυμα και το έκπλυμα με προσθήκη x3 όγκους 95% αιθανόλης όπως περιγράφηκε.
- Το τελευταίο κλάσμα ημικυτταρίνης απομονώθηκε μετά από διαλυτοποίηση σε υδατικό διάλυμα 8% KOH (w/v) (η αναλογία στερεού: διαλύματος ήταν 1:20 g/mL) του εκχυλισμένου με DMSO υπολείμματος, στους 50° C για 4 h. Το αδιάλυτο υπόλειμμα που

αποτελούσε εν δυνάμει την κυτταρίνη, διαχωρίστηκε με διήθηση και το υπερκείμενο ρυθμίστηκε σε pH 5.5 - 6.0 με 6 M HCl. Οι ημικυτταρίνες (H4) που απελευθερώθηκαν στο υπερκείμενο καταβυθίστηκαν με x3 όγκους 95 % αιθανόλης όπως περιγράφηκε.

Τα στερεά κλάσματα αναλύθηκαν με FT-IR με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο §2.1.7.i.

### ***2.1.8.iii. Ανίχνευση ενζυμικής δράσης σε δείγματα ακατέργαστης βιομάζας σκανδιναβικής ελάτης (*Picea abies*) και σε εν δυνάμει LCCs***

Για την ανίχνευση της δράσης της *StGE2* έναντι φυσικών υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε το αρχικό δείγμα ξηρής βιομάζας *P. abies* δεύτερης άλεσης και διαλογής μεγέθους σωματιδίων εύρους ~20μm από το οποίο έχει απομακρυνθεί η πηκτίνη (FF3) καθώς και τα προϊόντα των μεθοδολογιών απομόνωσης LCCs τόσο από πρώτη ύλη *P. abies* όσο και φελλού φυτικής προέλευσης. Στις δοκιμασίες υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες α) μεμονωμένα η *StGE2*, β) η *StGE2* σε συνδυασμό με τα ένζυμα α-γλυκουρονιδάση από το βακτήριο *Cellvibrio japonicus* (Prozomix, UK) και ενδο-β-1,4-ξυλανάση (Xyn11) [Moukouli et al. 2011], με στόχο τη διερεύνηση της δράσης του ενζύμου και γ) μόνο τα ένζυμα α-γλυκουρονιδάση και Xyn11. Όλες οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα εις διπλούν σε P.Δ. φωσφορικού καλίου, pH 6.0, με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 5% (w/v), για 3 h στους 45 °C υπό ανάδευση (850 rpm). Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν: *StGE2* 0.1 U/mg υποστρώματος ή 5 U/mL αντίδρασης, α-γλυκουρονιδάση 1.28 U/mg υποστρώματος ή 64 U/mL αντίδρασης και Xyn11 0.44 U/mg υποστρώματος ή 22 U/mL αντίδρασης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο τερματισμός γινόταν με βρασμό για 5 min για την απενεργοποίηση της δράσης των ενζύμων. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε 10.000 rpm, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο το οποίο φυλάχθηκε για ανίχνευση απελευθέρωσης GlcA ενώ το υπόλειμμα

εκπλύθηκε με υπερκάθαρο νερό τρις με αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις και απόρριψης του υπερκλειμένου. Το στερεό υπόλειμμα εξαχνώθηκε υπό κενό και αναλύθηκε με FT-IR με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο §2.1.7.i για εντοπισμό πιθανών διαφορών με τη σύσταση του αρχικού δείγματος πριν την ενζυμική κατεργασία του.

Το υπερκείμενο της αντίδρασης στο οποίο είχαν μετουσιωθεί τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα με βρασμό, εξετάστηκε για ενδεχόμενη απελευθέρωση γλυκουρονικού οξέος: **1)** με το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit Megazyme (Ιρλανδία) και **2)** με τη μέθοδο Hestrin [Hestrin, 1949].

- 1)** Πιο αναλυτικά, η ανάλυση με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος βασίστηκε στο πρωτόκολλο της εταιρείας ενώ η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην οξείδωση του D-γλυκουρονικού οξέος από το ένζυμο αφυδρογονάση εστέρων των ουρονικών οξέων (uronate dehydrogenase) παρουσία νικοτινάμιδο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο ( $\text{NAD}^+$ ) σε D-γλυκουρικό εστέρα (D-glucarate) με σχηματισμό ανηγμένου νικοτινάμιδο-αδενίνο-δινουκλεοτιδίου (NADH). Η ποσότητα του NADH που σχηματίστηκε αντιστοιχούσε στην αύξηση της απορρόφησης του δείγματος στα 340 nm και ήταν στοιχειομετρική με την ποσότητα του D-γλυκουρονικού οξέος.
- 2)** Εναλλακτικά, η μέθοδος Hestrin αφορά σε ποσοτικοποίηση παραγώγων καρβοξυλικών οξέων μέσω της αντίδρασής τους με υδροξυλαμίνη και περιελάμβανε την χρήση διαλυμάτων:
  - i)* υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης 2 M
  - ii)* υδροξειδίου του νατρίου NaOH 3.5 N
  - iii)* διάλυμα πυκνού υδροχλωρικού οξέος αραιωμένου με x2 όγκους υπερκάθαρου νερού και
  - iv)* τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.37 M διαλυτοποιημένου σε 0.1 N υδροχλωρικού οξέος.

Το αντιδραστήριο αλκαλικής υδροξυλαμίνης προετοιμάστηκε ακριβώς πριν τη χρήση του (διατηρείται μέχρι 3 h σε θερμοκρασία δωματίου) με

ανάμιξη ίσων όγκων των διαλυμάτων *i)* και *ii)*. Σε 200  $\mu\text{L}$  του προς ανάλυση υπερκείμενου διαλύματος εν δυνάμει υδρόλυσης φυσικών υποστρωμάτων της *SzGE2*, προστέθηκαν 400  $\mu\text{L}$  του διαλύματος υδροξυλαμίνης. Μετά από τουλάχιστον 1 min το pH ρυθμίστηκε στο  $1.2 \pm 0.2$  με 200  $\mu\text{L}$  του διαλύματος οξέος *iii)*, προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  του διαλύματος σιδήρου *iv)* και μετά από ανάδευση η απορρόφηση του ιώδους-καφέ διαλύματος προσδιορίστηκε στα 540 nm. Τα υπολείμματα πρωτεΐνης λόγω των μετουσιωμένων ενζύμων δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση καθώς καταβυθίστηκαν με την προσθήκη του πυκνού οξέος και του διαλύματος σιδήρου και ακολούθησε φυγοκέντρηση πριν τη μέτρηση. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα και για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο ο D-γλυκουρονικός εστέρας της 3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλης (εστέρας C) σε συγκεντρώσεις των 1.28, 2.1, 3.2, 6.4 και 12.8 mM στο P.Δ. της αντίδρασης.

## 2.2 Μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

### 2.2.1 Πρωτεϊνικοί στόχοι και υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής έλαβαν χώρα εκτεταμένες μελέτες με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και στόχο τον προσδιορισμό και τη διερεύνηση της δομής και του μηχανισμού κατάλυσης του ανασυνδυασμένου ενζύμου *SrGE2*. Η γνώση της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής επιτρέπει τη μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας του ενζύμου ιδιαίτερα παρουσία υποστρωμάτων για την αποσαφήνιση του μηχανισμού φυσιολογικής δράσης του στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν δομικές μελέτες τόσο του ενζύμου (*SrGE2*) στη φυσική διαμόρφωση όσο και ενός μεταλλάγματος αυτού (*S213A*) παρουσία και απουσία ενός συνθετικού αναλογου υποστρώματος.

Ως συνθετικά ανάλογα υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις: 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικός μεθυλεστέρας, ευγενική προσφορά του Dr. Peter Biely, Institute of Chemistry of the Slovak Academy of Sciences (Μπρατισλάβα, Σλοβακία), η οποία είχε παρουσιάσει συγγένεια ως προς την *SrGE2* [Topakas *et al.*, 2010], ο βενζυλεστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος (BnGlcA, Carbosynth, Compton UK, §2.1.1.iv, Πίνακας 3.4.1), ο μεθυλεστέρας του D-γλυκουρονικού οξέος που συντέθηκε χημικά στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών (ΕΜΠ), από το Θ. Σπάθα στο πλαίσιο της διπλωματικής του εργασίας, και το εμπορικά διαθέσιμο D-γλυκουρονικό οξύ. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ) υπό την επίβλεψη της Δρ. Ε. Χρυσίνα. Στις πειραματικές μεθόδους περιλαμβάνονταν: βιοπληροφορική ανάλυση, δοκιμές κρυσταλλογένεσης, συγκρυστάλλωσης και εμβαπτισμού προσχηματισμένων πρωτεϊνικών κρυστάλλων σε διαλύματα των συγκεκριμένων υποστρωμάτων, πειράματα συλλογής δεδομένων περίθλασης πρωτεϊνικών κρυστάλλων και πρωτόκολλα λύσης, βελτιστοποίησης και προσδιορισμού των τρισδιάστατων δομών των υπό μελέτη πρωτεϊνικών δειγμάτων.



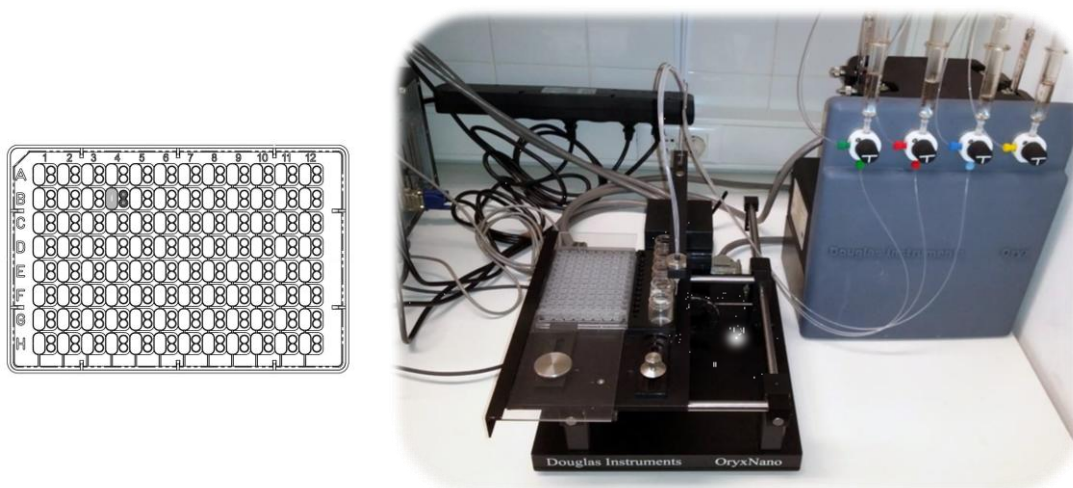
## 2.2.2 *In silico* ανάλυση και στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών

Η αμινοξική αλληλουχία της GE που εκφράζεται στο φυσικό οργανισμό, σε μορφή FASTA (αμινοξική ή νουκλεοτιδική αλληλουχία σε μορφή κειμένου, όπου τα αμινοξέα ή οι βάσεις ακολουθούν κώδικα ενός γράμματος) αναλύθηκε με ποικιλία εργαλείων βιοπληροφορικής και αλγορίθμων. Η σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο του διαδικτυακού προγράμματος *SignalP v.3.0* [Emanuelsson *et al.* 2007] ενώ οι εν δυνάμει θέσεις γλυκοζυλίωσης με τους διακομιστές *NetNGlyc v.1.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, [Gupta *et al.*, 2004] και *NetOGlyc v.4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>, [Steentoft *et al.*, 2013]). Ο υπολογισμός του θεωρητικού μοριακού βάρους των πρωτεϊνών έγινε με το πρόγραμμα *ProtParam* του ExPASy [Gasteiger *et al.* 2003] ενώ ο αλγόριθμός *BLASTP Basic Local Alignment Search Tool* της διαδικτυακής βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) [Altschul *et al.*, 1997] χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση ομόλογων πρωτεϊνών. Η πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών ομόλογων ενζύμων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *ClustalW2* [Larkin *et al.*, 2007] του διακομιστή EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του *ESPrpt 2.2* [Gouet *et al.*, 2003].

## 2.2.3 Διερεύνηση της κρυστάλλωσης και βελτιστοποίηση συνθηκών ανάπτυξης κρυστάλλων

Ο προσδιορισμός των συνθηκών κρυστάλλωσης απαιτούσε υψηλές συγκεντρώσεις των ανασυνδυασμένων και απομονωμένων *SitGE2* και *S213A SitGE2* πρωτεϊνών (§ 2.1.3). Για τον λόγο αυτό οι πρωτεΐνες σε P.Δ. Tris-HCl 20mM pH 8.0, συμπυκνώθηκαν πριν την κρυστάλλωση με τη χρήση φιαλιδίων όγκου 500 μL, 15mL και 50 mL για αντίστοιχο όγκο δείγματος που έφεραν φίλτρα μη περατά από μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa VIVASPIN™ (Sartorius Stedim Biotech, Γερμανία).

Η διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης έγινε με τη χρήση των διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων κρυστάλλωσης JCSG-plus™ Screen, Structure Screen I & II HT-96 από την εταιρεία Molecular Dimensions (Αγγλία) και PEGs Suite από την εταιρεία Qiagen (Γερμανία). Μέσω των παραπάνω σκευασμάτων επιτυγχάνεται η σάρωση μεγάλου εύρους διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης (96 ανά σκεύασμα) για κάθε δείγμα πρωτεΐνης παρουσία ποικιλίας αλάτων ή άλλων πρόσθετων καθώς και σε διαφορετικά pH του διαλύματος κρυστάλλωσης. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την αξιοποίηση ρομπότ κρυστάλλωσης Oryx-Nano (Douglas Instruments Ltd, UK) ενώ η μεθοδολογία βασίστηκε στη διάχυση ατμών με καθήμενη σταγόνα με τη χρήση ειδικών βάσεων κρυστάλλωσης 96 θέσεων SWISSCI 'MRC' (SWISSCI AG, Zug, Switzerland) (Εικόνα 2.2.1).



**Εικόνα 2.2.1** Η βάση κρυστάλλωσης 96 θέσεων SWISSCI 'MRC' (SWISSCI AG, Zug, Switzerland) και το ρο Oryx-Nano (Douglas Instruments Ltd, UK) στο οποίο τοποθετείται.

Ειδικότερα, το πρωτεϊνικό διάλυμα αναμίχθηκε με το μητρικό διάλυμα κρυστάλλωσης σε αναλογίες είτε 2:1 ή 1:1 ενώ ο τελικός όγκος της σταγόνας ήταν 0.3 - 1  $\mu$ L αναλόγως με το στάδιο διερεύνησης. Το δείγμα μετά την ανάμιξη τοποθετήθηκε σε ειδική μικροπλάκα, η τελευταία καλύφθηκε αεροστεγώς με διάφανη μεμβράνη και αφέθηκε σε επωαστήρα κρυστάλλωσης θερμοκρασίας 16 °C. Η παρακολούθηση ανάπτυξης κρυστάλλων και φωτογράφιση των σταγόνων έγινε με στερεομικροσκόπιο 160X, Leica MZ16 (Leica Microsystems

GmbH, Γερμανία) εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα και σύστημα πολωμένου φωτός.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι αρχικές συνθήκες ανάπτυξης κρυστάλλων, είτε με τη μορφή μικροκρυσταλλικού ιζήματος είτε ως μεμονωμένοι κρύσταλλοι βελονοειδούς μορφής. Στη συνέχεια, ακολούθησε η βελτιστοποίηση αυτών προκειμένου να αναπτυχθούν πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι κατάλληλης ποιότητας και μεγέθους για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X υψηλής ευκρίνειας. Η βελτιστοποίηση περιελάμβανε μικρή διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ή κάποιου άλλου παράγοντα κρυστάλλωσης, στις αναλογίες ανάμιξης μητρικού και πρωτεϊνικού διαλύματος, μικρές αλλαγές στο pH διαλύματος κρυστάλλωσης, στη θερμοκρασία κρυστάλλωσης ή και προσθήκη γλυκερόλης 10% στο διάλυμα κρυστάλλωσης για την επιβράδυνση ανάπτυξης κρυστάλλων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μακρο- είτε της μικροσποράς (macro-, microseeding) όπου είτε μικροκρύσταλλοι είτε θρυμματισμένοι κρύσταλλοι μεταφέρονται σε νέα σταγόνα με τη χρήση κατάλληλου

μεγέθους βρόχου ινών (loop, Εικόνα 2.2.2). Η νέα σταγόνα όπου εμβαπτίζονταν ο βρόχος ινών, περιείχε διάλυμα είτε μικρότερης συγκέντρωσης πρωτεΐνης ή κατακρημνιστικού παράγοντα από εκείνη στην οποία παρατηρήθηκε η δημιουργία των κρυστάλλων προς βελτιστοποίηση, είτε επρόκειτο για εξισορροπημένη σταγόνα όπου

μικροκρύσταλλοι - θρυμματισμένοι κρύσταλλοι αποτελούν προστιθέμενο συστατικό [Bergfors, 2003]. Οι μικροκρύσταλλοι/θρυμματισμένοι κρύσταλλοι λειτουργούν με αυτό τον τρόπο ως θέσεις πυρήνωσης για την ανάπτυξη μεγαλύτερων πιθανώς βελτιωμένης ποιότητας κρυστάλλων. Τέλος, έγιναν πειράματα συγκρυστάλλωσης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών στόχων με ανάλογα υποστρώματος σε ποικίλες συγκεντρώσεις και εν δυνάμει προσδέτες.



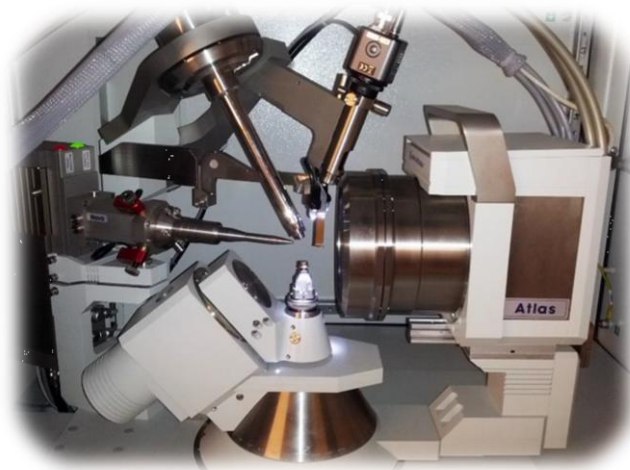
**Εικόνα 2.2.2** Βρόχοι ινών (loops) που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά κρυστάλλων και τοποθέτησή τους στη βάση του γωνιόμετρου (Εικόνα 2.2.3) κατά τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X.

## 2.2.4 Ακτινοβολήση κρυστάλλων και συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X

Η καταλληλότητα των κρυστάλλων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα περίθλασης ακτίνων-X κρίνεται αρχικά από το μέγεθος και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά τα οποία εξετάζονται με τη βοήθεια στερεομικροσκοπίου εφοδιασμένου με διάταξη πολωμένου φωτός. Οι βελτιωμένοι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν ακτινοβολήθηκαν υπό κρυογενείς συνθήκες (100 K). Πριν την έκθεσή τους στο ρεύμα αζώτου οι κρύσταλλοι μεταφέρθηκαν, με τη βοήθεια βρόχου ανάλογου μεγέθους με αυτό του κρυστάλλου, σε διάλυμα που περιέχει τις συνθήκες κρυστάλλωσης παρουσία 20% (v/v) γλυκερόλης. Η γλυκερόλη δρα ως κρυοπροστατευτικό προς αποφυγή σχηματισμού πάγου που θα κατέστρεφε το κρυσταλλικό πλέγμα κατά την έκθεση στο ρεύμα N<sub>2</sub> ενώ η εμβάπτιση στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα διαρκεί λίγα μόνο δευτερόλεπτα. Η αποφυγή σχηματισμού πάγου και η μη αποτύπωση αυτού στα περιθλασιγράμματα (με τη μορφή δακτυλιδιών πάγου, ice rings) βελτιώνει την ποιότητα των δεδομένων που συλλεγόνται. Η επιλογή του κρυοπροστατευτικού έγινε μετά από δοκιμές διαφόρων ευρέως χρησιμοποιούμενων όπως αιθυλενογλυκόλη, MPD (2-μέθυλο-2,4-πεντανοδιόλη), πολυαιθυλενογλυκόλες χαμηλού MB σε ποικίλες αναλογίες ανάμιξης με το μητρικό διάλυμα.

Πέραν της ακτινοβολήσης των πρωτεϊνικών κρυστάλλων, έγιναν δοκιμασίες διαποτισμού των προσχηματισμένων κρυστάλλων με τα υπό μελέτη ανάλογα υποστρώματος προς πιθανό σχηματισμό συμπλόκου. Για τον λόγο αυτό, μονοκρύσταλλοι εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα κρυστάλλωσης αναμεμειγμένο με υδατικό διάλυμα του κάθε αναλόγου υποστρώματος ενώ έγιναν δοκιμές με ποικίλες συγκεντρώσεις των ουσιών και με διαφορετική διάρκεια εμβάπτισης. Η διαδικασία αποσκοπεί στη διάχυση της υπό μελέτης ουσίας εντός των καναλιών του διαλύτη μέσα στην πρωτεΐνη και στη μελέτη της εν δυνάμει σύνδεσής της στο μελετώμενο κέντρο χωρίς να αλλοιωθεί το κρυσταλλικό πλέγμα του προσχηματισμένου κρυστάλλου. Ακολούθησε ταχεία μεταφορά σε διάλυμα παρόμοιας σύστασης με αυτό της εμβάπτισης εμπλουτισμένο με 15 % (v/v) γλυκερόλη.

Η ακτινοβολήση και συλλογή δεδομένων των *StGE2* μονοκρυστάλλων έγινε στην πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL Hamburg outstation - σταθμός X13 ( $\lambda=0.8123 \text{ \AA}$ , Αμβούργο, Γερμανία) στον ανιχνευτή συζευγμένου φορτίου 225-mm MAR CCD με τη χρήση του προγράμματος *DNA software package*, διαθέσιμου στο σταθμό. Η ακτινοβολήση των S213A *StGE2* μονοκρυστάλλων καθώς και συμπλόκων αυτών (κρύσταλλοι εμποτισμένοι με διαλύματα αναλόγων υποστρωμάτων και προσδετών *StGE2* αλλά και S213A, έλαβε χώρα στη συμβατική πηγή ακτίνων X μικροεστιασμένης ακτινοβολίας SuperNova diffractometer (χαλκού CuK $\alpha$ ,  $\lambda = 1.5415 \text{ \AA}$ , Oxford Diffraction, Agilent Technologies) και η συλλογή δεδομένων έγινε σε ανιχνευτή συζευγμένου φορτίου (CCD) διαμέτρου 135 mm, που βρίσκονται εγκατεστημένα στο ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ (Εικόνα 2.2.3). Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τη συγχροτρονική και τη συμβατική πηγή ακτίνων X αναλύθηκαν και έγινε η επεξεργασία τους με τα προγράμματα *XDS package* [Kabsch, 2010] και *CrysAlis<sup>Pro</sup>* (Agilent Technologies), αντίστοιχα. Περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τα προγράμματα *SCALA* [Evans, 2006] του πακέτου *CCP4* [Collaborative Computational Project 4, 1994].



**Εικόνα 2.2.3** Η πηγή ακτίνων X SuperNova diffractometer (Oxford Diffraction, Agilent Technologies) που βρίσκεται εγκατεστημένη στο ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ. Διακρίνονται το γωνιόμετρο τοποθέτησης του βρόχου με χρήση μαγνητικής βάσης, η πηγή ακτίνων X, το ακροφύσιο ρεύματος N<sub>2</sub>, η κάμερα καταγραφής του πειράματος και ο ανιχνευτής συζευγμένου φορτίου.

## 2.2.5 Εύρεση και ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου *StGE2*, της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *S213A StGE2* και συμπλόκου *S213A StGE2* – αναλόγου υποστρώματος έγινε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης και χρήση του προγράμματος *Phaser* [McCoy *et al.*, 2007] του πακέτου *CCP4* (Winn *et al.*, 2011). Ακολούθησαν διαδοχικοί κύκλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα *REFMAC* [Murshudov *et al.* 1997] και ανακατασκευής των πρωτεϊνικών μοντέλων με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *Coot* [Emsley *et al.* 2010] ενώ μέσω του ίδιου προγράμματος έγινε και η προσθήκη μορίων ύδατος και άλλων μορίων του διαλύματος κρυστάλλωσης.

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δομών που προσδιορίστηκαν έγινε αρχικά με επαλήθευση της ορθής στερεοχημείας των πρωτεϊνικών καταλοίπων με το πρόγραμμα *PROCHECK* [Laskowski *et al.*, 1993] ενώ ο έλεγχος της αξιοπιστίας τους ολοκληρώθηκε μέσω του προγράμματος *MolProbity* [Chen *et al.* 2010]. Η δομική κατάταξη της *StGE2* έγινε με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων *CATH* σύμφωνα με τις υπεροικογένειες, τις αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains) και τους τύπους αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Η τοπολογία των δομών εξήχθει μέσω του εξυπηρετητή *PDBsum* (<http://www.ebi.ac.uk/> [Laskowski *et al.*, 1997]) ενώ η απόδοση της δευτεροταγούς δομής με το πρόγραμμα *PROMOTIF* [Hutchinson & Thornton, 1996] από το βοηθητικό πρόγραμμα *PDBsum* του εξυπηρετητή EBI (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>) [Laskowski *et al.*, 1997]. Οι προσβάσιμες στο διαλύτη πρωτεϊνικές περιοχές προσδιορίστηκαν με τη χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας *PDBE PISA platform* ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html), Krissinel & Henrick, 2007). Ο εξυπηρετητής *DALI* ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server) [Holm & Rosenstrom, 2010]) χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση ομόλογων πρωτεϊνικών δομών και η σύγκριση για την ανάλυση δομικών διαφορών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος *SUPERPOSE* [Winn *et al.*, 2011] όπου πραγματοποιήθηκε υπέρθεση των υπό εξέταση δομών.

Στην περίπτωση της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου, το μοντέλο του αναλόγου υποστρώματος 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκοουρονικού μεθυλεστέρα

προέκυψε με χρήση του προγράμματος *PRODRG* [Schüttelkopf & van Aalten, 2004] το οποίο εφαρμόζει επιτρεπτές τροποποιήσεις των γωνιών στρέψης του μορίου ώστε να προσαρμοστεί στην περιοχή πρόσδεσης όπως αυτή ορίζεται από τους χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  και  $F_{obs}-F_{calc}$ . Περαιτέρω, για την ανάλυση της δομής του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *CONTACT* [Winn *et al.*, 2011] ώστε να υπολογιστούν οι δεσμοί υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεις κατά την πρόσδεση του αναλόγου υποστρώματος στην S213A πρωτεΐνη εφαρμόζοντας ως κριτήρια μέγιστης απόστασης σχηματισμού αλληλεπιδράσεων τα 3.3 και 4.0 Å, αντίστοιχα. Η σχηματική αναπαράσταση οπτικοποίησης και των τριών νέων δομών έγινε με το πρόγραμμα *MolSoft* [Raush *et al.* 2009]. Στην περίπτωση της δομής του συμπλόκου, τα προγράμματα *LIGPLOT* [Wallace *et al.*, 1995] και *MolScript* [Kraulis, 1991] χρησιμοποιήθηκαν για να αποτυπωθούν οι αλληλεπιδράσεις του αναλόγου υποστρώματος στο κέντρο πρόσδεσης της πρωτεΐνης, ενώ ο  $2F_{obs}-F_{calc}$  χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας αναπαρίστατο σχηματικά με χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών *BobScript* και η εικόνα του αποδόθηκε με το πρόγραμμα *Raster3D* [Merritt & Bacon, 1997].

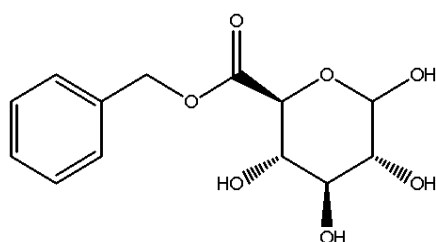
### *Πειραματικά αποτελέσματα - Συμπεράσματα*

#### **3.1 Μελέτη της υδρόλυσης εμπορικά διαθέσιμου συνθετικού υποστρώματος από δύο GEs**

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής που αφορούσε στη μελέτη της δράσης των ημικυτταρινασών και ειδικότερα των GEs, εξετάστηκε η υδρόλυση του BnGlcA από την *SzGE2* και την *PaGE1*. Στόχο αποτελούσε η δημιουργία ενός απλού, εξειδικευμένου και καινοτόμου πρωτοκόλλου ταχείας αξιολόγησης της καταλυτικής δράσης των GEs αξιοποιώντας ένα πρόσφατα εμπορικά διαθέσιμο μόριο ως ένα εν δυνάμει υπόστρωμα - μοντέλο. Το συνθετικό υπόστρωμα BnGlcA (Σχήμα 3.1.1) μιμείται δομικά το προτεινόμενο φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου, υδατανθρακικά σύμπλοκα μεταξύ γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης (§1.3.2 και 1.4.3 [Duranová *et al.*, 2007]) ενώ οι βενζυλικοί εστέρες των LCCs αποτελούν πρόδρομες δομές κατά τη βιοσύνθεση της λιγνίνης. Παράλληλα, διαφαίνεται να συγκαταλέγεται στα ανάλογα γλυκουρονικών οξέων που δύνανται να αναγνωριστούν προς υδρόλυση από GEs [Duranová *et al.*, 2009]. Για το λόγο αυτό, το συνθετικό ανάλογο εκτός από τις κινητικές μελέτες, εξετάστηκε και μέσω πειραμάτων συγκρυστάλλωσης και εμβάπτισης προσχητισμένων πρωτεϊνικών κρυστάλλων *SzGE2* και *S213A SzGE2* ως προς πιθανή πρόσδεσή του στο καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης (§3.4.2.iii, Πίνακας 3.4.1). Ωστόσο, το συγκεκριμένο υπόστρωμα δε διαθέτει τη μεθοξυ-ομάδα στην θέση 4 του γλυκουρονικού δακτυλίου η οποία διαφαίνεται να κατέχει ιδιαίτερο ρόλο βάσει ενδείξεων αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας παρουσία της συντελώντας στην ακριβέστερη δομική μίμηση του υποθετικού φυσικού υποστρώματος των GEs [Duranová *et al.*, 2009, d'Errico *et al.*, 2015]. Στην παρούσα μελέτη το BnGlcA



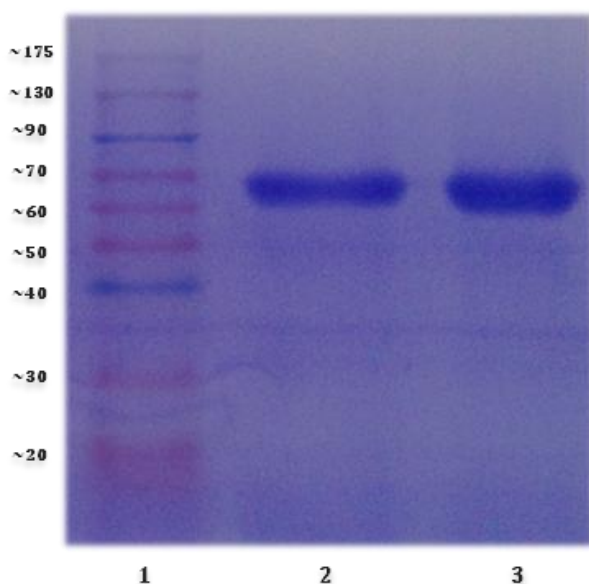
χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της υδρολυτικής δράσης των GEs: α) μέσω μεθόδου ταχείας ποιοτικής ανάλυσης με TLC χωρίς οργανολογικές απαιτήσεις, β) μέσω ποσοτικής ανάλυσης με HPLC που επιτρέπει εκτιμήσεις ακριβείας των κινητικών παραμέτρων της υδρόλυσης και τέλος γ) μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος, κατάλληλου για σάρωση της ενζυμικής δραστηριότητας.



**Σχήμα 3.1.1** Η χημική δομή του βενζυλικού εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε τόσο για τις κινητικές μελέτες όσο και για δομικές μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

Το αρχικό στάδιο υπολογισμού της ενζυμικής ενεργότητας έναντι του BnGlcA περιελάμβανε την έκφραση, παραγωγή και απομόνωση των υπό μελέτη GEs. Όσον αφορά στην *PaGE1*, το *page1* γονίδιο που κωδικοποιούσε την υποθετική πρωτεΐνη του μύκητα *Podospora anserina* (ομολογία αλληλουχίας με την *StGE2* 55%, XP\_003665709.1 [Torakas *et al.*, 2010]) κλωνοποιήθηκε και εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα πλασμιδιακό φορέα pPICZαC στο Εργαστήριο Biotechnologie des Champignons Filamenteux – Polytech Marseille, στη Γαλλία, από την ομάδα του Jean-Guy Berrin. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 481 αμινοξέων αποτελούμενη από: ένα πεπτίδιο έκκρισης (1-21) ένα μη καταλυτικό δομικό στοιχείο πρόσδεσης σε υδατάνθρακες της οικογένειας 1 (CBM1, 22-59) ομοιοπολικά ενωμένο με το καταλυτικό κέντρο των GEs (106-481) που περιέχει το συντηρημένο πενταπεπτίδιο G-C-S-R-N-G που φέρει την καταλυτική πυρηνόφιλη Σερίνη (πιο αναλυτικά στο Κεφ. 3.4) ενώ παρεμβάλλεται ένα πεπτίδιο σύνδεσης (linker peptide, 60-105) [Katsimpouras *et al.*, 2014]. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία για τον μετασχηματισμό *E. coli* TOPIOF' κυττάρων προς πολλαπλασιασμό του ανασυνδυασμένου pPICZαC, κατόπιν απομόνωση και γραμμικοποίησή του ώστε να λάβει χώρα ο τελικός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση των *Pichia pastoris* κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα συνενωμένο με το *page1* γονίδιο.

Ακολούθησε η παραγωγή του ενζύμου με το ετερόλογο σύστημα έκφρασης *P. pastoris* και στη συνέχεια η απομόνωση και ο καθαρισμός με τη χρήση IMAC (Co<sup>2+</sup>) με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην §2.1.3.



**Εικόνα 3.1.1** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) βαθμού πολυμερισμού 12,5%. Στήλη 1: πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Στήλες 2,3: Κλάσματα απομονωμένης πρωτεΐνης PaGE1.

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε 12.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου για την αξιολόγηση της καθαρότητας του ενζύμου εμφάνισε μία πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε σε MB ~63 kDa (Εικόνα 3.1.1). Το θεωρητικά υπολογισμένο MB μέσω του προγράμματος *ProtParam* του εξυπηρετητή ExPASy [Gasteiger *et al.*, 2005] ήταν ~50kDa, λαμβάνοντας υπόψιν το συνδετικό πεπτίδιο, το πεπτίδιο έκκρισης και τη δομικά αυτοτελή περιοχή πρόσδεσης στην κυτταρίνη CBM1. Η ανάλυση πιθανών περιοχών N-γλυκοζυλίωσης μέσω του αλγόριθμου *NetNGlyc* v.1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> [Gupta *et al.*, 2004]) δεν ανέδειξε κάποια θέση στην αλληλουχία ενώ με τον αλγόριθμο *NetOGlyc* v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc> [Steentoft *et al.*, 2013]) υπολογίστηκαν 22 πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης στην περιοχή του πεπτιδίου σύνδεσης στις οποίες μπορεί να αποδοθεί το αυξημένο MB σε σύγκριση με το θεωρητικά υπολογισμένο.

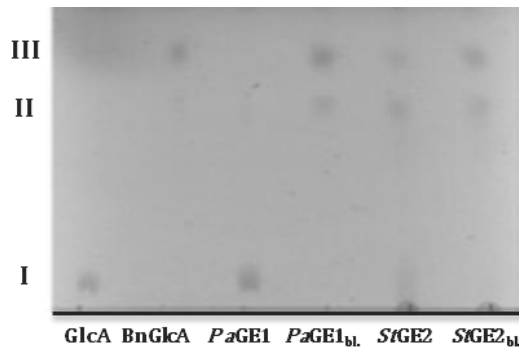
Στην περίπτωση της παραγωγής και απομόνωσης της *SrGE2* ακολουθήθηκε όμοια μεθοδολογία (πιο αναλυτικά στην §3.4.2.i). Οι συγκεντρώσεις των δύο

ενζύμων προσδιορίστηκαν φωτομετρικά στα 280nm [Stoscheck, 1990] λαμβάνοντας υπόψιν τους μοριακούς συντελεστές απόσβεσης  $\epsilon$  (molar extinction coefficient), σύμφωνα με το πρόγραμμα *ProtParam* του ExPASy [Gasteiger *et al.*, 2003], οι οποίοι ήταν  $50,795 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$  για την *StGE2* και  $89,545 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$  για την *PaGE1*. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των GEs που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υδρόλυσης για την HPLC ανάλυση και τον φωτομετρικό προσδιορισμό ήταν  $0.59 \text{ mg/mL}$  ενώ αυτή της *PaGE1*  $0.94 \text{ mg/mL}$ .

### 3.1.1 Ποιοτική αξιολόγηση της ενεργότητας των GEs

Το συνθετικό ανάλογο υποστρώματος BnGlcA χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανάπτυξη μιας εύχρηστης και ταχείας μεθοδολογίας η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη εκτίμηση της ενεργότητας διαφορετικών ενζυμικών δειγμάτων ώστε να βρίσκει εφαρμογή στον καθαρισμό και την απομόνωση νέων GEs. Για την ανίχνευση του GlcA ως προϊόντος της υδρόλυσης είτε παρουσία *PaGE1* είτε *StGE2*, έγινε ανάλυση μέσω TLC όπως περιγράφεται στην §2.1.4. Στο Σχήμα 3.1.2 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα TLC όπου στην τρίτη στήλη που υποδεικνύει την αντίδραση παρουσία *PaGE1*, η κηλίδα που υποδεικνύει το BnGlcA (ζώνη III) έχει εξαφανιστεί ενώ στην πέμπτη στήλη που υποδεικνύει την αντίδραση παρουσία υπερκείμενου καλλιέργειας *StGE2* η αντίστοιχη κηλίδα του BnGlcA είναι μειωμένης έντασης υποδηλώνοντας τη μερική ενζυμική δράση.

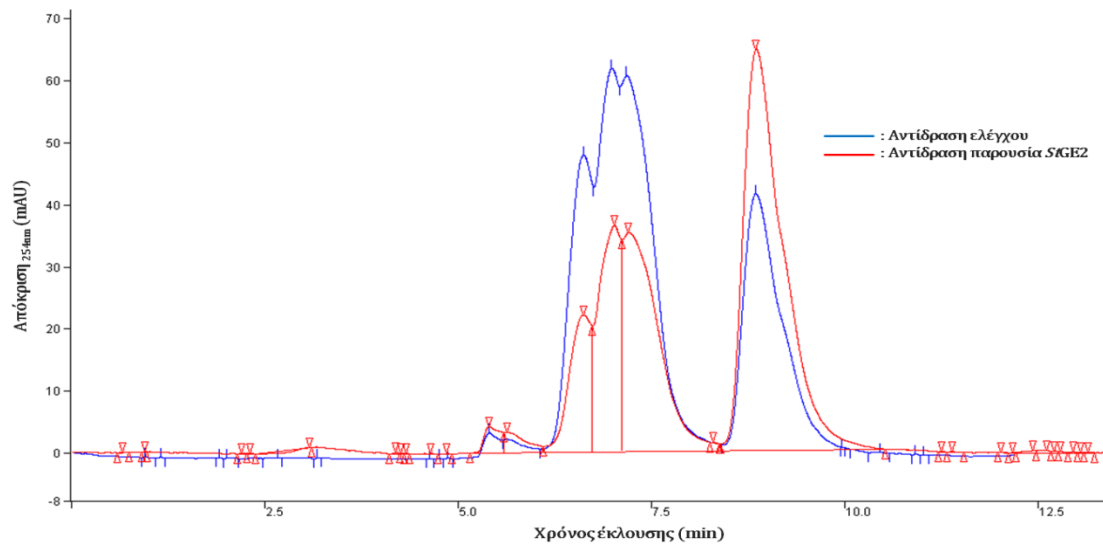
Οι παράγοντες επιβράδυνσης  $R_f$  αντιστοιχούν σε 0.1 και 0.85 για το GlcA (ζώνη I) και το BnGlcA, αντίστοιχα, ενώ η κηλίδα που εμφανίζεται στη ζώνη II αντιστοιχεί σε  $R_f$  0.7. Η συγκεκριμένη κηλίδα μπορεί να αποδοθεί σε ισομερή δακτυλίου ή διμερή του BnGlcA ενώ αποτυπώνεται και ως ευρεία διπλή-τριπλή κορυφή στην ανάλυση μέσω HPLC που ακολουθεί (§3.1.2). Η κυμαινόμενης έντασης κηλίδα στη ζώνη II βάσει και των δειγμάτων υπερκείμενου καλλιέργειας *StGE2* υποδεικνύει ότι η ισορροπία των ισομερών ή διμερών μορφών του υποστρώματος επηρεάζεται από τη σύσταση της αντίδρασης.



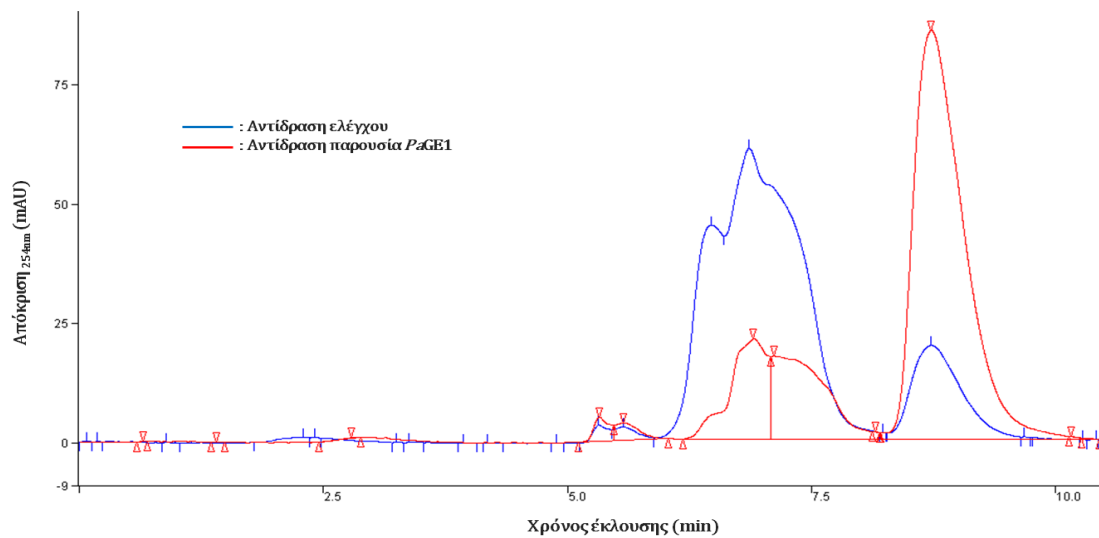
**Σχήμα 3.1.2** Χρωματογράφημα TLC ανάλυσης της ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης του BnGlcA παρουσία *PaGE1* (3η στήλη) και *StGE2* (5η στήλη). Οι αντιδράσεις ελέγχου παρουσία απενεργοποιημένων *PaGE1* (4η στήλη) και *StGE2* (6η στήλη) υποδεικνύονται ως *PaGE1<sub>bl</sub>* και *StGE2<sub>bl</sub>*, αντίστοιχα.

### 3.1.2 Ποσοτικοποίηση της ενεργότητας των GEs μέσω HPLC ανάλυσης

Ως μέθοδος ακριβείας για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των GEs και εκτίμησης των κινητικών παραμέτρων, η ανάλυση μέσω HPLC βασίστηκε σε πρωτόκολλο τερματισμού της ενζυμικής αντίδρασης και ακολούθως διαχωρισμού και ανίχνευσης του προϊόντος. Η βενζυλική αλκοόλη που παράγεται κατά την υδρόλυση του BnGlcA παρουσία *StGE2* καθώς και *PaGE1*, ποσοτικοποιήθηκε με μέτρηση της UV απορρόφησης στα 254 nm με τη μεθοδολογία που αναλύεται στην §2.1.4. Στα χρωματογραφήματα των Σχημάτων 3.1.2 και 3.1.3 που αφορούν στις τις ενζυμικές υδρολύσεις παρουσία *StGE2* και *PaGE1* αντίστοιχα, η έκλυση του εστέρα καταγράφηκε με μία ευρεία κορυφή (χρόνος κατακράτησης  $R_t \sim 6-8$  min) ενώ της αλκοόλης με μια πιο οξεία κορυφή (χρόνος κατακράτησης  $R_t \sim 9-10$  min). Η διπλή ή τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο συνθετικό ανάλογο υποστρώματος πιθανά αποδίδεται σε α και β ανωμερή, ισομερή δακτυλίου ή διμερή της ένωσης όπως διαφάνηκε και από τα πειράματα δεδομένα της TLC ανάλυσης (§3.1.1). Κατά την ενζυμική υδρόλυση παρουσία *StGE2* (45 °C, Σχήμα 3.1.3), η αυτοϋδρόλυση του εστέρα ήταν υψηλότερη λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας σε σύγκριση με αυτή στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσία της μεσόφιλης *PaGE1* (35 °C, Σχήμα 3.1.4).



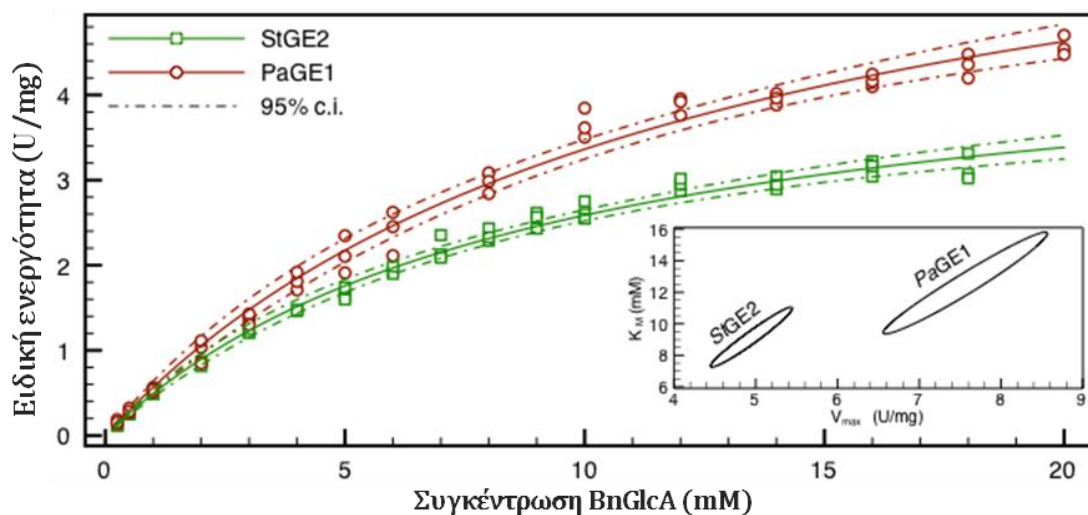
**Σχήμα 3.1.3** Παράδειγμα χρωματογραφήματος υδρόλυσης 10mM BnGlcA παρουσία *StGE2*.



**Σχήμα 3.1.4** Παράδειγμα χρωματογραφήματος υδρόλυσης 10mM BnGlcA παρουσία *PaGE1*.

Έπειτα από συνυπολογισμό της αυτοϋδρόλυσης, προσδιορίστηκαν οι ειδικές ενεργότητες για κάθε ένζυμο στο εύρος συγκεντρώσεων του υποστρώματος και εκτιμήθηκαν οι κινητικές σταθερές  $K_M$ ,  $V_{max}$  και  $K_{cat}$  καθώς και ο λόγος  $k_{cat}/K_M$ , μέσω βελτιστοποίησης της εξίσωσης Michaelis-Menten όπως περιγράφεται στην §2.1.4. Οι τιμές παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1.1 με την ένδειξη των αντίστοιχων ορίων επιστοσύνης όπως υπολογίστηκαν με το

πρόγραμμα *lmfit* ([lmfit.github.io/lmfitpy](https://lmfit.github.io/lmfitpy)), όπου ως c.i. (correlation interval) ορίζονται τα όρια εμπιστοσύνης για κάθε τιμή.



**Σχήμα 3.1.5** Γραφικές παραστάσεις εφαρμογής της εξίσωσης Michaelis-Menten στις τιμές ειδικής ενεργότητας (U/mg) της *StGE2* (πράσινο) και *PaGE1* (κόκκινο). Με διακεκομμένες γραμμές καθώς και στο εσωτερικό διάγραμμα υποδεικνύονται τα όρια εμπιστοσύνης (c.i.) 95% για τις τιμές  $K_M$  και  $V_{max}$ .

**Πίνακας 3.1.1** Οι κινητικές σταθερές για την *StGE2* και *PaGE1* όπως προσδιορίστηκαν κατά την ποσοτικοποίηση της ενζυμικής υδρόλυσης του βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος με HPLC.

Κινητικές παράμετροι	<i>StGE2</i>	<i>PaGE1</i>
$K_M$ (mM), 95% c.i.	8.0–9.9	10.6–13.8
$V_{max}$ (U/mg), 95% c.i.	4.7–5.2	7.0–7.9
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ), 95% c.i.	3.4–3.7	7.4–8.3
$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}M$ )	374–425	601–698

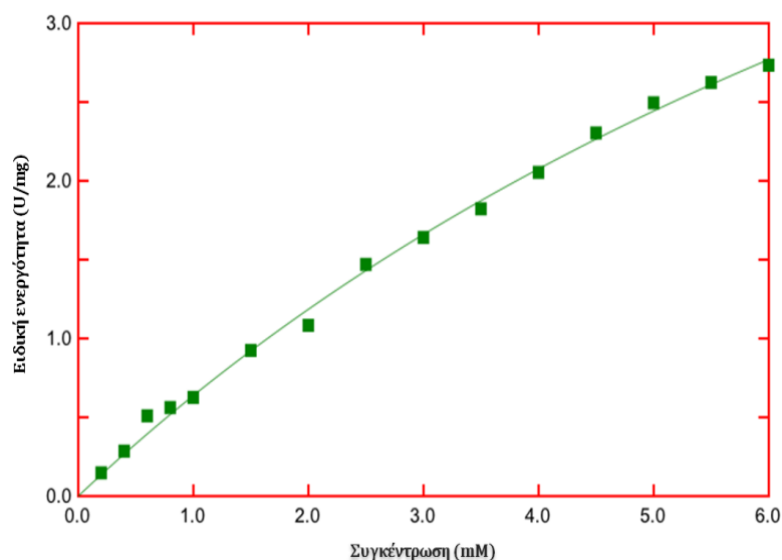
Στο Σχήμα 3.1.5 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση εφαρμογής της εξίσωσης Michaelis-Menten στις τιμές ειδικής ενεργότητας (U/mg) τόσο για την *StGE2* όσο και την *PaGE1* στο πειραματικό εύρος των συγκεντρώσεων

υποστρώματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης τα ένζυμα παρουσιάζουν μέτρια υδρολυτική εξειδίκευση έναντι του BnGlcA γεγονός που μπορεί να αποδοθεί και στην έλλειψη της μεθοξυ-ομάδας στην θέση 4 του γλυκουρονικού δακτυλίου (πιο αναλυτικά §1.3.3 και §3.4.8). Συγκριτικά, η *StGE2* εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για το συγκεκριμένο υπόστρωμα σε σχέση με την *PaGE1*, ενώ η τελευταία επιδεικνύει μεγαλύτερη ταχύτητα και αποδοτικότητα κατά την υδρόλυση (υψηλότερος δείκτης εξειδίκευσης,  $k_{cat}/K_M$ ). Καθώς το υδρόφοβο BnGlcA έχει περιορισμένη διαλυτότητα, η χρήση του DMSO για την αύξηση της διαλυτοποίησης μπορεί να είχε κάποια επίδραση στην κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων χωρίς όμως να αλλοιώνεται η εκτίμηση για τη συγγένεια που εμφανίζει το ένζυμο για το υπόστρωμα. Εν γένει, ο προσδιορισμός της παραμέτρου  $K_M$  με αξιοπιστία απαιτεί συγκεντρώσεις υποστρώματος τουλάχιστον διπλάσιας τιμής ώστε οι παρατηρούμενες υψηλές τιμές  $K_M$  να αυξάνουν την αβεβαιότητα. Σε συνδυασμό με την αστάθεια και την περιορισμένη διαλυτότητά του, το BnGlcA φαίνεται ότι δεν αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για μελέτη της ενζυμικής δράσης των GEs. Ωστόσο, στο εύρος συγκεντρώσεων και τις συνθήκες αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, οι κινητικές σταθερές και οι τιμές ειδικές ενεργότητας προσφέρουν αξιόπιστη πρόβλεψη για την ενζυμική δραστηριότητα.

### 3.1.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της απελευθέρωσης GlcA κατά την υδρόλυση του BnGlcA

Στο δεύτερο σκέλος της πειραματικής αξιολόγησης της ενζυμικής ενεργότητας της *StGE2* έναντι του BnGlcA, έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της  $NAD^+$  - εξαρτώμενης οξειδωσης του GlcA ως προϊόντος της υδρόλυσης από τη γλυκουρονική αφυδρογονάση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit (§2.1.4). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την ενζυμική αντίδραση ήταν όμοια με αυτή της ανάλυσης με HPLC, ενώ η δοκιμασία διεξήχθη μόνο στην περίπτωση υδρόλυσης παρουσία *StGE2* καθώς είχε το χαρακτήρα ανίχνευσης

και όχι ποσοτικοποίησης δεδομένου ότι δεν ήταν δυνατός ο αποτελεσματικός τερματισμός της ενζυμικής αντίδρασης (§2.1.4).



**Σχήμα 3.1.6** Παράδειγμα διαγράμματος εφαρμογής της εξίσωσης Michaelis-Menten με μη γραμμική μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων στις τιμές ειδικής ενεργότητας (U/mg) της *SzGE2* για την υδρόλυση του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 0.2 – 6 mM με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό. Το διάγραμμα προέκυψε με χρήση της εφαρμογής DataAnalysis (Data Evaluation Systems, Evan Kantrowitz).

Στο Σχήμα 3.1.6 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 0.2 – 6 mM στην ειδική ενεργότητα της *SzGE2*, ενώ οι κινητικές σταθερές εκτιμήθηκαν με την εφαρμογή DataAnalysis (Data Evaluation Systems, Evan Kantrowitz) με τιμές  $K_M$  στα  $12.1 \pm 1.6$  mM και  $V_{max}$   $8.3 \pm 0.8$  U/mg. Οι συγκεκριμένες εκτιμήσεις των κινητικών σταθερών απέχουν από αυτές που υπολογίστηκαν κατά την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση του προϊόντος της βενζυλικής αλκοόλης μέσω της HPLC ανάλυσης. Καθώς πρόκειται για έμμεσο προσδιορισμό και δεν πραγματοποιήθηκε τερματισμός της ενζυμικής αντίδρασης λόγω περιορισμών της αναλυτικής μεθόδου η μέλετη της δράσης της *SzGE2* με την εναλλακτική μέθοδο ανίχνευσης του προϊόντος GlcA δεν ενδείκνυται για την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων αλλά μόνο για ημιποσοτικό προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας. Ωστόσο πλεονεκτεί στην



απαίτηση μικρών όγκων δειγμάτων και στην ταυτόχρονη μέτρησή τους με τη χρήση του φωτομέτρου μικροπλακών ώστε να δύναται να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση της ενζυμικής εξειδίκευσης με εφαρμογές κατά την απομόνωση νέων GEs δεδομένης της έλλειψης πρωτοκόλλων ταχείας αξιολόγησης της δράσης τους.

### 3.1.4 Συμπεράσματα

Ο χαρακτηρισμός των γλυκουρονικών εστερασών απαιτεί μια γρήγορη, εύχρηστη μέθοδο και καινότομο μέθοδο ποσοτικοποίησης της ενζυμικής δράσης με εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα. Η πειραματική διαδικασία της κινητικής μελέτης των *StGE2* και *PaGE1* με ενζυμική υδρόλυση του BnGlcA και προσδιορισμό της παραγόμενης βενζυλικής αλκοόλης μέσω ανάλυσης με HPLC, χαρακτηρίζεται από ακρίβεια, ευαισθησία, αξιοπιστία και ταχύτητα ακόμα και σε περιπτώσεις που η συγγένεια ως προς το υπόστρωμα δε διαφαίνεται υψηλή. Παράλληλα, η συγκεκριμένη μεθοδολογία προσφέρει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης συντελώντας σε μειωμένο χρόνο προσδιορισμού για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος. Ωστόσο, ο φωτομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου GlcA με χρήση εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος οδήγησε σε ασυμφωνία ως προς την αντίστοιχη εκτίμηση των κινητικών σταθερών της *StGE2*. Οι περιορισμοί της φωτομετρικής αναλυτικής μεθοδολογίας την καθιστούν κατάλληλη μόνο για συνθήκες ταχείας σάρωσης της ενζυμικής δράσης των GEs έναντι υποστρωμάτων. Σε συνδυασμό με την ποιοτική αξιολόγηση της υδρολυτικής δράσης ενζύμου μέσω TLC ανάλυσης, μιας μη χρονοβόρας και χωρίς οργανολογικές απαιτήσεις μεθόδου, η συνολική πειραματική μεθοδολογία τριών σταδίων που αναπτύχθηκε, πληροί τις προδιαγραφές ενός εύχρηστου, νέου πρωτοκόλλου βασισμένου σε εμπορικά διαθέσιμο υπόστρωμα με εφαρμογή στην εργαστηριακή πρακτική προάγοντας την αποσαφήνιση της δράσης της συγκεκριμένης οικογένειας βιοκαταλυτών.

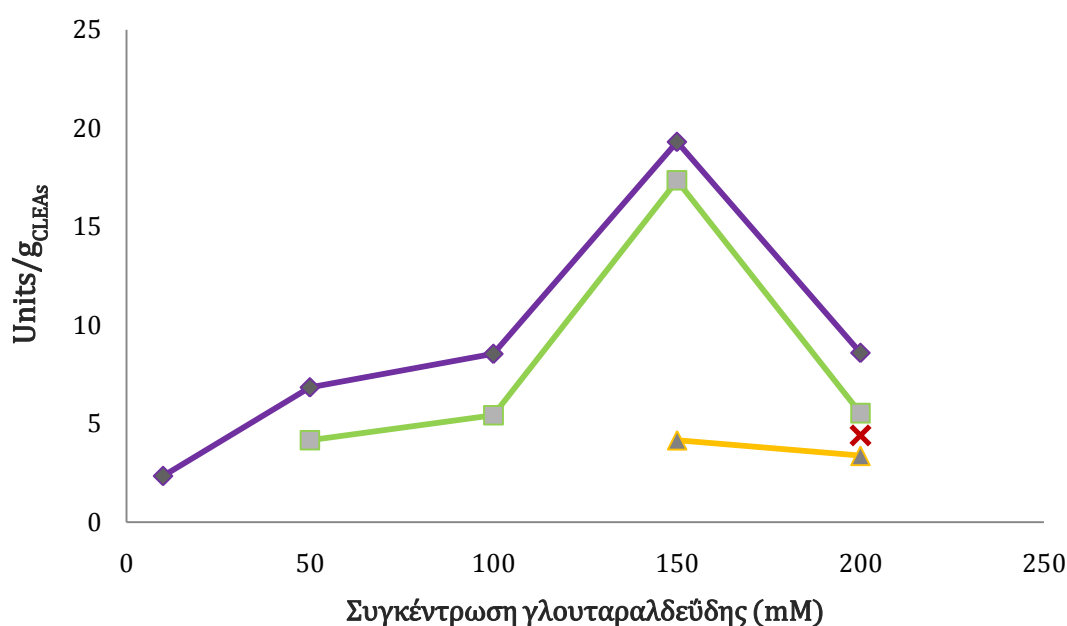
## 3.2 Διερεύνηση της βιοκαταλυτικής σύνθεσης εστέρων από την *SzGE2* σε μη συμβατικά συστήματα

Η ευρεία εφαρμογή της βιοκατάλυσης σε μη υδατικά συστήματα ή παρουσία ελάχιστου ύδατος προς εξασφάλιση της ενζυμικής ενεργότητας, βασίζεται στη χρήση οργανικών διαλυτών ως το μέσο για την ενζυμική τροποποίηση δυσδιάλυτων στο νερό αντιδρώντων μετατοπίζοντας την ισορροπία προς τα επιθυμητά προϊόντα (§2.1.6). Μέσω μη συμβατικών συστημάτων έλαβε χώρα για πρώτη φορά ποιοτική αξιολόγηση της συνθετικής ικανότητας της *SzGE2* ως προς αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία αρχικά έγιναν δοκιμασίες ακινητοποίησης της *SzGE2*. Στη συνέχεια, ανιχνεύτηκε η ύπαρξη συνθετικής δράσης του ενζύμου σε συστήματα οργανικών διαλυτών στη λυοφιλιωμένη μορφή του απουσία ύδατος ενώ στο τρίτο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκε το συνθετικό δυναμικό της ελεύθερης (μη ακινητοποιημένης *SzGE2* με συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία επιφανειοδραστικών ουσιών. Στόχο αποτελούσε πιθανή σύνθεση γλυκουρονικών εστέρων μέσω εστεροποίησης του GlcA με αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες προς γλυκουρονίδια δεδομένης της ποικιλίας βιοτεχνολογικών εφαρμογών που προσφέρουν.

### 3.2.1 Σχηματισμός CLEAs *SzGE2* και προσδιορισμός της υδρολυτικής δράσης με HPLC ανάλυση

Η μεθοδολογία ακινητοποίησης της *SzGE2* περιγράφεται αναλυτικά στην §2.1.6, και περιελάμβανε αρχικά τη ταχεία καταβύθιση υπερκείμενου καλλιέργειας του ενζύμου (crude) με κατάλληλο παράγοντα καταβύθισης και στη συνέχεια προσθήκη του παράγοντα σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών (γλουταραλδεΐδη). Ως μέσα καταβύθισης δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου, το διάλυμα κορεσμένου θειικού αμμωνίου ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), η TBA και η αιθανόλη, ενώ δείγματα λαμβάνονταν πριν και μετά την καταβύθιση ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του κάθε μέσου. Καθώς η *SzGE2* αποτελεί εξωκυτταρική πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε το

υπερκείμενο καλλιέργειας (crude), ώστε η παρουσία σε μικρή αναλογία άλλων εξωκυτταρικών πρωτεϊνών να προάγει τη δημιουργία μεγαλύτερου αριθμού ομοιοπολικών διασταυρούμενων δεσμών με τη γλουταραλδεΐδη δεδομένου ότι ο αριθμός των ενζυμικών μορίων και ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζουν συσσωματώματα αναμένεται να έχουν σημαντική επίδραση στη συνολική ενεργότητά τους [Schoenaart *et al.*, 2004].



**Σχήμα 3.2.1** Ενεργότητα υπερκείμενου καλλιέργειας *StGE2* των CLEAs με καταβυθιστικό παράγοντα κορεσμένο δ-μα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (μωβ), TBA (πράσινο) και αιθανόλη (πορτοκαλί) και CLEA απομονωμένης *StGE2* με παράγοντα καταβύθισης  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (κόκκινο), για διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης.

Το στάδιο ανίχνευσης της υδρολυτικής δράσης των CLEAs που παραλήφθηκαν με χρήση HPLC και η πειραματική διαδικασία των ενζυμικών αντιδράσεων περιγράφονται αναλυτικά στην §2.1.6. Στο Σχήμα 3.2.1 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του παράγοντα σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών στην ενεργότητα του υπερκείμενου καλλιέργειας ( $\text{U/g}_{\text{CLEAs}}$ ). Πιο αναλυτικά, όπως παρατηρείται για τις περιπτώσεις καταβυθιστικών διαλυμάτων που δοκιμάστηκαν, η υψηλότερη ενεργότητα καταγράφηκε σε συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 150 mM. Η αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών (10, 50,

100, 150 και 200 mM) είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της τελικής ποσότητας CLEAs ενώ για συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 10mM παραλήφθηκε μόνο στην περίπτωση του κορεσμένου δ-τος ως καταβυθιστικού μέσου. Όσον αφορά στα μέσα καταβύθισης, πιο αποτελεσματικό καταλυτικά αποδείχθηκε συνολικά το δ-μα κορεσμένου  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ακολούθησε η TBA ενώ για την αιθανόλη CLEAs παραλήφθηκε μόνο για συγκεντρώσεις γλουταραλδεΐδης 150 και 200 mM. Σύμφωνα με μετρήσεις ενεργότητας του ενζύμου στο υπερκείμενο διάλυμα που απομακρύνθηκε μετά την προσθήκη του κάθε καταβυθιστικού παράγοντα, πλήρης καταβύθιση παρατηρήθηκε στην περίπτωση του κορεσμένου δ-τος  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ενώ τα CLEAs παρέμειναν αδιάλυτα στο μίγμα της αντίδρασης υδρόλυσης (50°C, pH 6). Σε όλες τις περιπτώσεις το ακινητοποιημένο ενζύμο επέδειξε καταλυτική ενεργότητα έναντι του D-γλυκουρονικού εστέρα της 3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλης ενώ στην περίπτωση της απομονωμένης *SzGE2* (κόκκινο σημείο, Σχήμα 3.2.1) η ακινητοποίηση ήταν εφικτή μόνο με καταβυθιστικό παράγοντα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και συγκέντρωση γλουταλδεΐδης 200 mM με ενεργότητα μικρότερη από τα αντίστοιχα CLEAs υπερκείμενου καλλιέργειάς της. Για τη μελέτη του συνθετικού δυναμικού του ενζύμου, επιλέχθηκαν τα CLEAs συγκέντρωσης γλουταραλδεΐδης 150 mM και παράγοντα καταβύθισης τόσο  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (CLEA150<sub>AmSulf</sub>) όσο και TBA (CLEA150<sub>TBA</sub>) για τα οποία παρατηρήθηκε η υψηλότερη ενεργότητα. Ωστόσο, η καταλυτική απόδοση των CLEAs σε υδατικό σύστημα δεν ερμηνεύει και τη συμπεριφορά του ενζύμου σε οργανικούς διαλύτες.

### **3.2.2 Διερεύνηση του συνθετικού δυναμικού της *SzGE2* σε μη συμβατικά συστήματα**

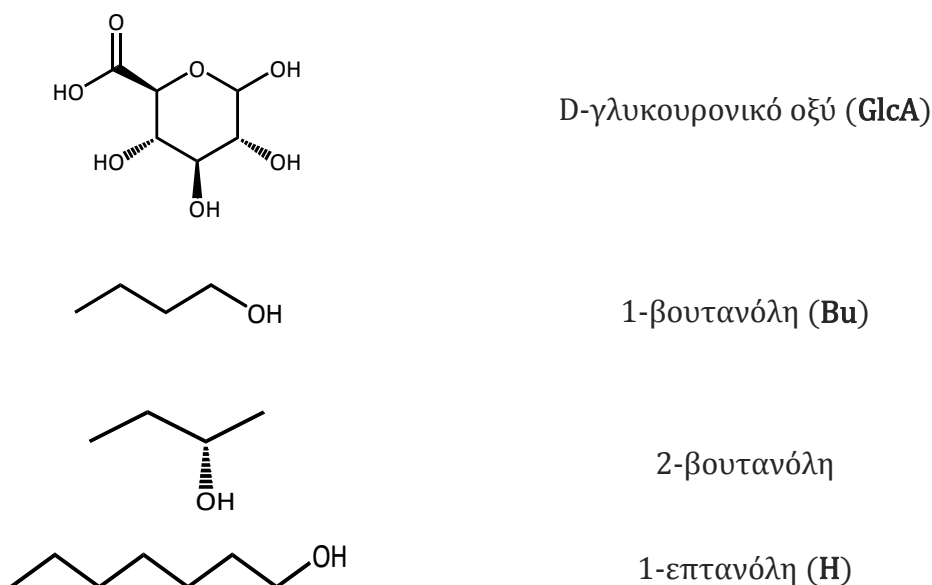
Η συνθετική ενεργότητα του ενζύμου διερευνήθηκε ως προς το δυναμικό κατάλυσης αντιδράσεων εστεροποίησης του GlcA τόσο με μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας αλειφατικές αλκοόλες όσο και αρωματικές καθώς και μετεστεροποίησης με αρωματικό εστέρα όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §2.1.6 (Πίνακας 3.2.1). Οι δοκιμασίες αντιδράσεων με χρήση των αρωματικών

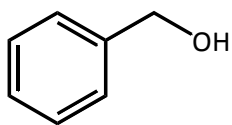
αλκοολών και αρωματικού εστέρα ως αντιδρώντα, αποσκοπούσαν και στη διερεύνηση της συνθετικής εξειδίκευσης ως προς υποστρώματα-μοντέλα που προσομοιάζουν το υποθετικό φυσικό υπόστρωμά της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου, όπως είναι οι εστέρες του GlcA το οποίο απαντάνται στη γλυκουρονοξυλάνη με φαινολικές ομάδες αλκοολών οι οποίες απαντώνται στη λιγνίνη. Τα μη συμβατικά συστήματα που δοκιμάστηκαν υπάγονταν σε δύο κύριες κατηγορίες: **1)** οργανικών αντιδρώντων απουσία ύδατος και με ακινητοποιημένη ή λυοφιλωμένη *SzGE2* και **2)** τριαδικό σύστημα κ-εξανίου, οργανικών αντιδρώντων και υδατικής φάσης σε περιεκτικότητα 2%, 3.2%, 5%, 5.5% ως μικρογαλάκτωμα απουσία επιφανειοδραστικών. Στον Πίνακα 3.2.1 συνοψίζονται τα αντιδρώντα που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων, με το D-γλυκουρονικό οξύ να αποτελεί την ένωση προς εστεροποίηση ή το αντιδρών μετεστεροποίησης.

---

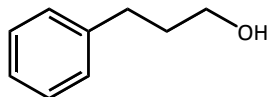
**Πίνακας 3.2.1** Τα αντιδρώντα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του συνθετικού δυναμικού της *SzGE2* μέσω αντιδράσεων σε μη συμβατικά συστήματα.

---

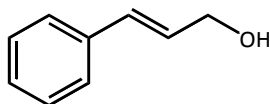




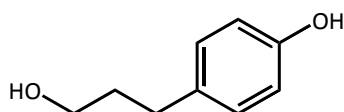
βενζυλική αλκοόλη (BA)



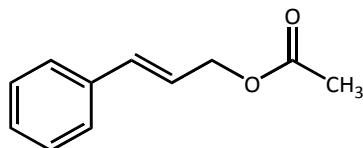
3-φαινυλ-1-προπανόλη (A)



κινναμική αλκοόλη (B)



3-(4-υδροξυφαινυλ)-1- προπανόλη (C)



οξικός εστέρας της κινναμικής αλκοόλης (CAc)

---

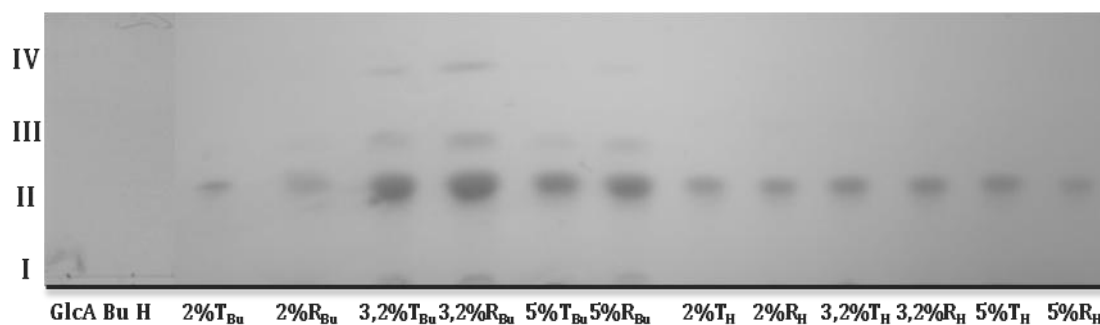
Όσον αφορά στα ελεύθερα ύδατος μη συμβατικά συστήματα (solvent-free), οι ενζυμικές αντιδράσεις σύνθεσης έγιναν με τη χρήση είτε λυοφιλιωμένης *SzGE2* είτε  $CLEA150_{AmSulf}$ , ή  $CLEA150_{TBA}$ . Το GlcA δε διαλυτοποιήθηκε πλήρως σε καμία αντίδραση παρουσία των οργανικών διαλυτών ώστε με τα CLEAs να απαρτίζουν ένα σύστημα βιοκατάλυσης στερεάς φάσης. Στην περίπτωση των τριαδικών συστημάτων μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών, οι αναλογίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1 Στο σύστημα α (περιεκτικότητα υδατικής φάσης 2%) η πλήρης διαλυτοποίηση του D-γλυκουρονικού οξέος δεν ήταν εφικτή με αποτέλεσμα να παρατηρείται ανεπιθύμητη θολερότητα στο μίγμα της αντίδρασης. Ο επιτυχής σχηματισμός του διαυγούς μονοφασικού συστήματος μικρογαλακτωμάτων βασίζεται στον εγκλωβισμό του ενζύμου σε υδατικά μικροσταγονίδια διεσπαρμένα στην οργανική φάση διατηρώντας το προστατευμένο από την επαφή με αυτή που θα είχε ως αποτέλεσμα τη μετουσίωσή του (§2.1.6).

**Πίνακας 3.2.2** Αναλογίες συστατικών συστημάτων μικρογαλακτωμάτων απουσία επιφανειοδραστικών ουσιών.

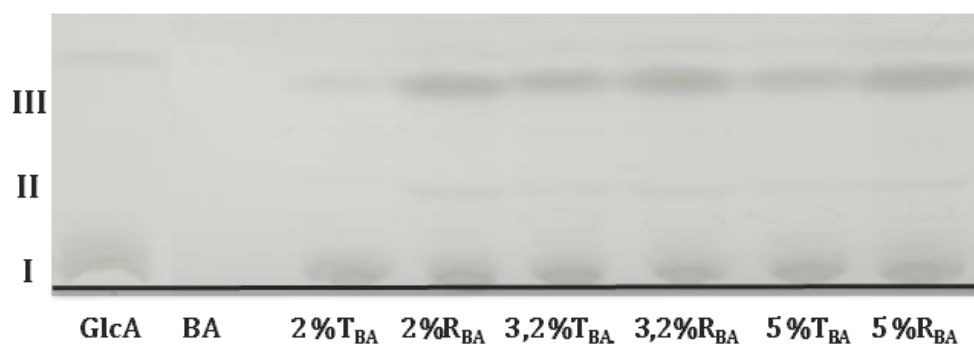
Σύστημα	κ-Εξάνιο	Αλκοόλες/Εστέρας	Υδατική φάση
α	47,2	50,8	2,0
β	53,4	43,4	3,2
γ	37,8	57,2	5,0
δ	19,8	74,7	5,5

Η ανίχνευση προϊόντων των αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης στα μη συμβατικά συστήματα έγινε μέσω ανάλυσης με TLC όπως περιγράφεται στην §2.1.7. Μετά από δοκιμασίες με ποικίλα συστήματα διαλυτών ανάπτυξης, επελέγει το σύστημα χλωροφορμίου : μεθανόλης : ύδατος σε αναλογίες 65:15:2 ως το καταλληλότερο για το διαχωρισμό εστέρων από τις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Στα μη συμβατικά συστήματα οργανικών αντιδρώντων απουσία ύδατος παρουσία είτε ακινητοποιημένης είτε λυοφιλιωμένης *SiGE2* οι αντιδράσεις σύνθεσης δεν οδήγησαν σε ανίχνευση προϊόντων.

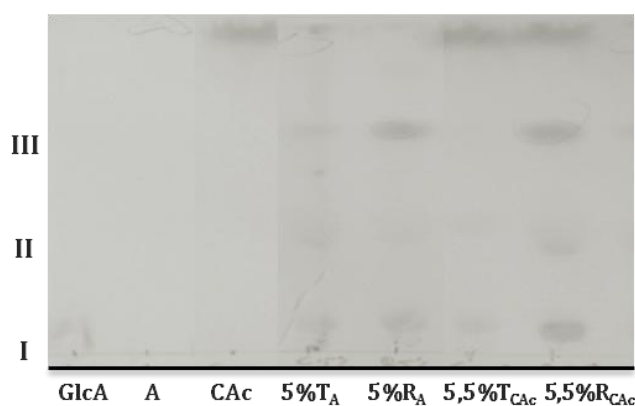
Ειδικότερα, προϊόντα ανιχνεύτηκαν μόνο στην περίπτωση αντιδράσεων σύνθεσης σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων ως προς τη σύνθεση εστέρων του GlcA με τις αλειφατικές αλκοόλες βουτανόλη (Bu), επτανόλη (H) (Σχήμα 3.2.2), βενζυλεστέρα του γλυκουρονικού οξέος (Σχήμα 3.2.3), γλυκουρονικού εστέρα της 3-φαινυλο-1-προπανόλης (A), καθώς και μετεστεροποίηση του οξικού εστέρα της κινναμικής αλκοόλης (CAc) προς γλυκουρονικό εστέρα της κινναμικής αλκοόλης (B) (Σχήμα 3.2.4). Ωστόσο, όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση των αντιδράσεων ελέγχου, στην πλειονότητα των αντιδράσεων και στις εξεταζόμενες συνθήκες, η σύνθεση έλαβε χώρα και αυθόρμητα απουσία ενζύμου. Τα προϊόντα που ανιχνεύονται παράλληλα στις ζώνες III και IV όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.2.2 και στη ζώνη II στα Σχήματα 3.2.3-3.2.4 πιθανά μπορούν να αποδοθούν σε ανωμερή ή ισομερή δακτυλίου ή διμερή των γλυκουρονικών εστέρων που σχηματίστηκαν (§3.1.1).



**Σχήμα 3.2.2** Ανίχνευση συνθετικής δράσης *StGE2* με συστήματα μικρογαλακτωμάτων υδατικής φάσης 2%, 3.2% και 5% ως προς εστέρα του GlcA με αντιδρώντα Bu και H. Με T και R υποδεικνύονται οι αντιδράσεις ελέγχου και οι ενζυμικές αντιδράσεις, αντίστοιχα.



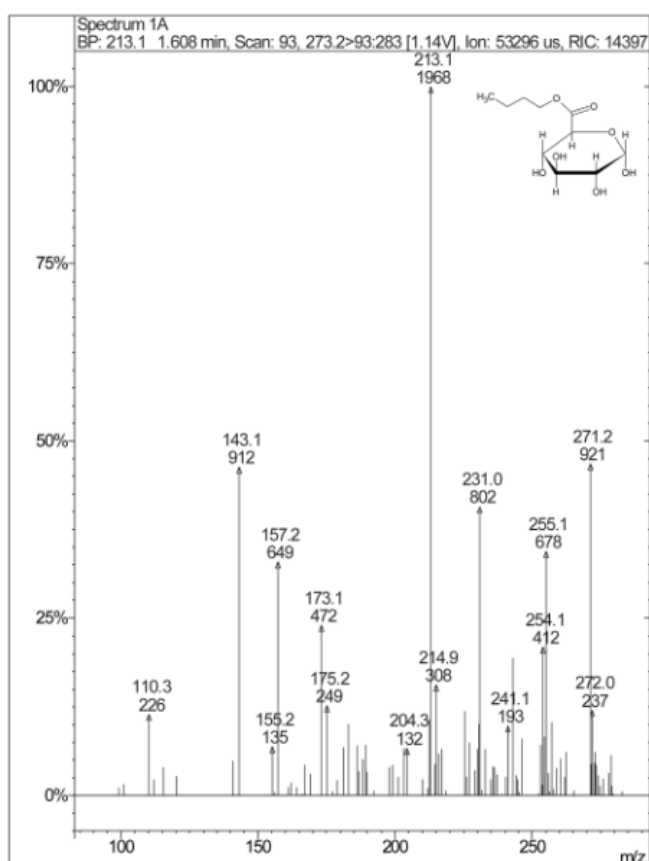
**Σχήμα 3.2.3** Ανίχνευση συνθετικής δράσης *StGE2* με συστήματα μικρογαλακτωμάτων υδατικής φάσης 2%, 3.2% και 5% ως προς BnGlcA με αντιδρών BA. Με T και R υποδεικνύονται οι αντιδράσεις ελέγχου και οι ενζυμικές αντιδράσεις, αντίστοιχα.



**Σχήμα 3.2.4** Ανίχνευση συνθετικής δράσης *StGE2* με συστήματα μικρογαλακτωμάτων υδατικής φάσης 5% και 5.5% αντίστοιχα ως προς εστεροποίηση του GlcA με αλκοόλη A και μετεστεροποίηση του CInAc. Με T και R υποδεικνύονται οι αντιδράσεις ελέγχου και οι ενζυμικές αντιδράσεις, αντίστοιχα.



Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 3.2.2, στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων υδατικής φάσης 2% (Πίνακας 3.2.2, α), 3.2% (Πίνακας 3.2.2, β) και 5% (Πίνακας 3.2.2, γ), ανιχνεύτηκαν προϊόντα με αντιδρώντα βουτανόλη και επτανόλη για χρόνο αντίδρασης 24 h. Ωστόσο καθώς και σε αυτά τα συστήματα ανιχνεύτηκε ότι οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα αυθόρμητα σε συγκρίσιμο βαθμό με τις αντίστοιχες παρουσία του εξεταζόμενου ενζύμου, μόνο για το σύστημα υδατικής φάσης 3.2% παρουσία βουτανόλης (κηλίδα μεγάλης έντασης στη ζώνη II) κρίθηκε αναλυτικού ενδιαφέροντος η ταυτοποίηση του προϊόντος με ακόλουθη φασματοσκοπία μάζας. Μετά το διαχωρισμό και την απομόνωση της ζώνης II (Σχήμα 3.2.2) με τη χρήση PLC όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §2.1.7 το δείγμα αναλύθηκε μέσω δίδυμης φασματοσκοπίας μάζας (MS/MS).



**Σχήμα 3.2.5** Καταγραφή φάσματος ως ραβδογράφημα MS του απομονωμένου προϊόντος της αντίδρασης ενζυμικής εστεροποίησης παρουσία *StGE2* σε σύστημα μικρογαλακτώματος απουσία τασιενεργών με αντιδρώντα Bu και GlcA.

Στο Σχήμα 3.2.5 παρουσιάζεται το φάσμα MS που λήφθηκε σύμφωνα με το οποίο το υπό εξέταση δείγμα αντιστοιχούσε στον βουτυλικό εστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος. Πιο αναλυτικά, η υψηλότερη κορυφή που παρατηρείται με τιμή  $m/z$  213,1 αντιστοιχεί στο θραύσμα του GlcA. Η δεύτερη υψομετρικά φασματική γραμμή που αντιστοιχεί σε θραύσμα  $m/z$  271,2 αποδίδεται στο ψευδο-μοριακό ιόν  $[M+Na]^+$  και υποδηλώνει την παρουσία του βουτυλικού εστέρα του GlcA. Η κορυφή με τιμή  $m/z$  143,1 αντιστοιχεί σε σχάση του δακτυλίου του γλυκουρονικού οξέος ενώ η κορυφή με τιμή  $m/z$  231,0 αντιστοιχεί στη σχάση της βουτυλικής ομάδας του εστέρα.

### 3.2.3 Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, στόχο αποτέλεσε η ποιοτική αξιολόγηση της συνθετικής ενεργότητας της *StGE2* ως προς αλειφατικά και αρωματικά γλυκουρονίδια. Στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων απουσία τασιενεργών που εξετάστηκαν, το ένζυμο εμφάνισε ενδείξεις συνθετικού δυναμικού τόσο μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης όσο και μετεστεροποίησης. Στην περίπτωση βουτυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος ως προϊόντος σύνθεσης σε σύστημα υδατικής φάσης 3.2%, η ποιοτική ανίχνευση με TLC οδήγησε στην απομόνωση και ταυτοποίησή του με χρήση MS. Ωστόσο, η ακινητοποιημένη *StGE2* όσο και η λυοφιλιωμένη μορφή του ενζύμου δεν παρουσίασε δυναμικό ως προς τη σύνθεση γλυκουρονιδίων στα μη συμβατικά συστήματα που εξετάστηκαν, γεγονός που ενδέχεται να οφείλεται στην τοξική επίδρασή των οργανικών διαλυτών στην ενζυμική δράση. Μελλοντική αξιοποίηση της συνθετικής ικανότητας του ενζύμου, δύναται να περιλαμβάνει τη διερεύνηση της δράσης του σε διαφορετικής σύστασης μη συμβατικά συστήματα καθώς και μειωμένου χρόνου αλλά και μεγαλύτερης κλίμακας αντιδράσεις στα συστήματα που ανιχνεύθηκαν προϊόντα, ώστε να είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση αλλά και ο προσδιορισμός της συνθετικής εξειδίκευσής του. Απώτερο στόχο θα αποτελέσει τα πιθανά προϊόντα αλειφατικών και αρωματικών εστέρων του γλυκουρονικού οξέος να αξιοποιηθούν ως προς τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους.

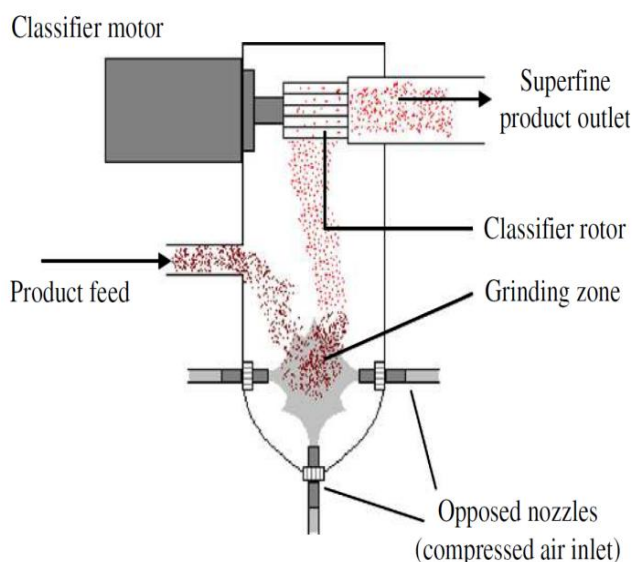
### 3.3 Διερεύνηση των φυσικών υποστρωμάτων της GE

Στο πλαίσιο αποσαφήνισης της φυσιολογικής δράσης των GEs έγινε μελέτη της απομόνωσης φυσικών υποστρωμάτων του ενζύμου από πρώτη ύλη σκανδιναβικής ελάτης (*Picea abies*) καθώς και φελλού (φυτικής προέλευσης, bark). Ειδικότερα, οι GEs φέρονται να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ των πλευρικών ομάδων του 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος της γλυκουρονοξυλάνης και αρωματικών αλκοολών της λιγνίνης [Duranová *et al.*, 2009]. Οι δομές όπου εντοπίζεται ο συγκεκριμένος δεσμός αποτελούν μέρος της ευρύτερης μακρομοριακής αρχιτεκτονικής που συνθέτει τα ονομαζόμενα ως λιγνινο-υδατανθρακικά σύμπλοκα (Lignin-Carbohydrate Complexes, LCCs, §1.3.2 και 1.4.3). Τα LCCs συνεισφέρουν στην αντίσταση που εμφανίζει η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα έναντι στην πλήρη αποικοδόμησή της ώστε οι GEs να αποκτούν νευραλγικό ρόλο στην αποτελεσματική αξιοποίηση της [d'Errico *et al.*, 2015].

Με στόχο τη μελέτη για πρώτη φορά της δράσης των GEs σε φυσικά υποστρώματα, έγινε ενζυμική κατεργασία τόσο με *SzGE2* όσο και τις ημικυτταρινάσες  $\alpha$ -γλυκουρονιδάση και ενδο- $\beta$ -1,4-ξυλανάση της GH11 οικογένειας γλυκοσιδικών υδρολασών (*Xyn11*), πρώτης ύλης μικροαλεσμένου ξύλου κωνοφόρου *P. abies* (με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην §2.1.9). Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης LCCs σε πρώτες ύλες μικροαλεσμένου ξύλου *P. abies* και φελλού (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §2.1.8). Ακολούθησε ενζυμική κατεργασία των απομονωμένων κλασμάτων τόσο παρουσία *SzGE2* όσο και συνεργιστικά με τα ένζυμα  $\alpha$ -γλυκουρονιδάση και *Xyn11* με την ίδια πειραματική διαδικασία (§2.1.9). Τα αρχικά δείγματα πρώτων υλών, τα εν δυνάμει LCCs δείγματα καθώς και το ξηρό υπόλειμμα των κλασμάτων που υπέστησαν ενζυμική κατεργασία, αναλύθηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR ενώ στα διαλύματα των ενζυμικών αντιδράσεων έγινε ανίχνευση της απελευθέρωσης γλυκουρονικού οξέος με τη μεθοδολογία του εμπορικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit καθώς και τη μέθοδο Hestrin [Hestrin, 1949].

### 3.3.1 Διερεύνηση της φυσιολογικής ενζυμικής δράσης των GEs

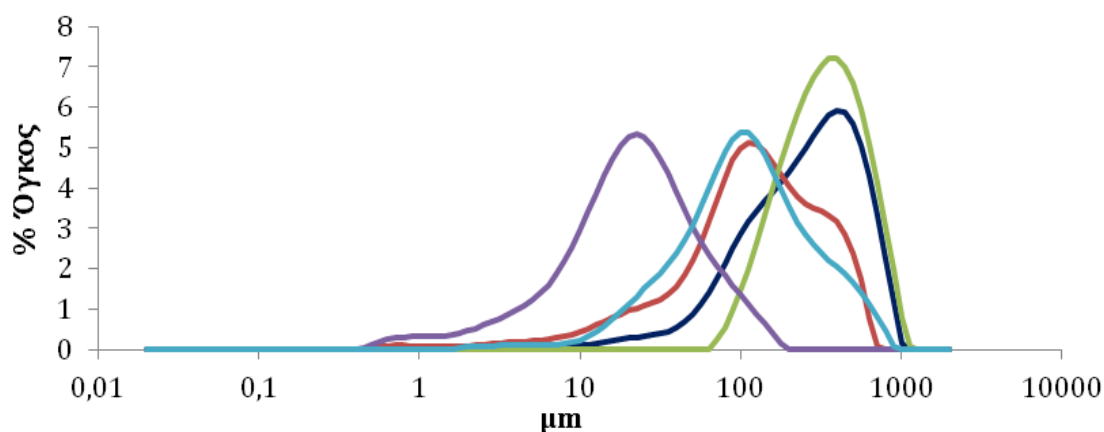
Οι προκατεργασμένες (άλεση) πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση δυνητικά LCCs περιελάμβαναν μικροαλεσμένη και μικροδιαχωρισμένη σκανδιναβική ελάτη, καθώς και αλεσμένο φελλό φυτικής προέλευσης. Όσον αφορά στην *P. abies*, η μικροάλεση και διαχωρισμός έγινε στη διάταξη που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3.1. Η μικροάλεση, ο διαχωρισμός και η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων με την τεχνική μέτρησης μεγέθους σωματιδίων περίθλασης λέιζερ, έγινε στο IATE Montpellier (Γαλλία), από όπου προέκυψαν πέντε αρχικά δείγματα *P. abies* όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.1.



**Εικόνα 3.3.1** Αναπαράσταση της διεργασίας μικροάλεσης και διαχωρισμού αρχικών δειγμάτων *P. abies*, και των τμημάτων που αποτελούν τη διάταξη μικροάλεσης (jet milling) και διαχωρισμού (turbo separation).

Για όλα τα δείγματα (§2.1.1.v. και Πίνακας 2.1.2), εκτός του πρωταρχικού πριν την άλεση το οποίο αντιπροσωπεύεται από το δείγμα πρώτης άλεσης FG όπως συμπεραίνεται από το Σχήμα 3.3.1, έγινε ανάλυση της σύστασής τους μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR (§2.1.8.i). Αναλύθηκαν, παράλληλα, δύο πρόσθετα αρχικά δείγματα ξηρής βιομάζας *P. abies* πρώτης άλεσης και διαλογής διαμέτρου σωματιδίων εύρους ~310μm, FG Dep, καθώς και δεύτερης άλεσης και διαλογής μεγέθους σωματιδίων ~20μm, FF3, από τα οποία είχε

απομακρυνθεί η πηκτίνη ακολουθώντας το πρώτο στάδιο της μεθοδολογίας απομόνωσης LCCs των Azuma και Tetsuo [Azuma & Tetsuo, 1988].

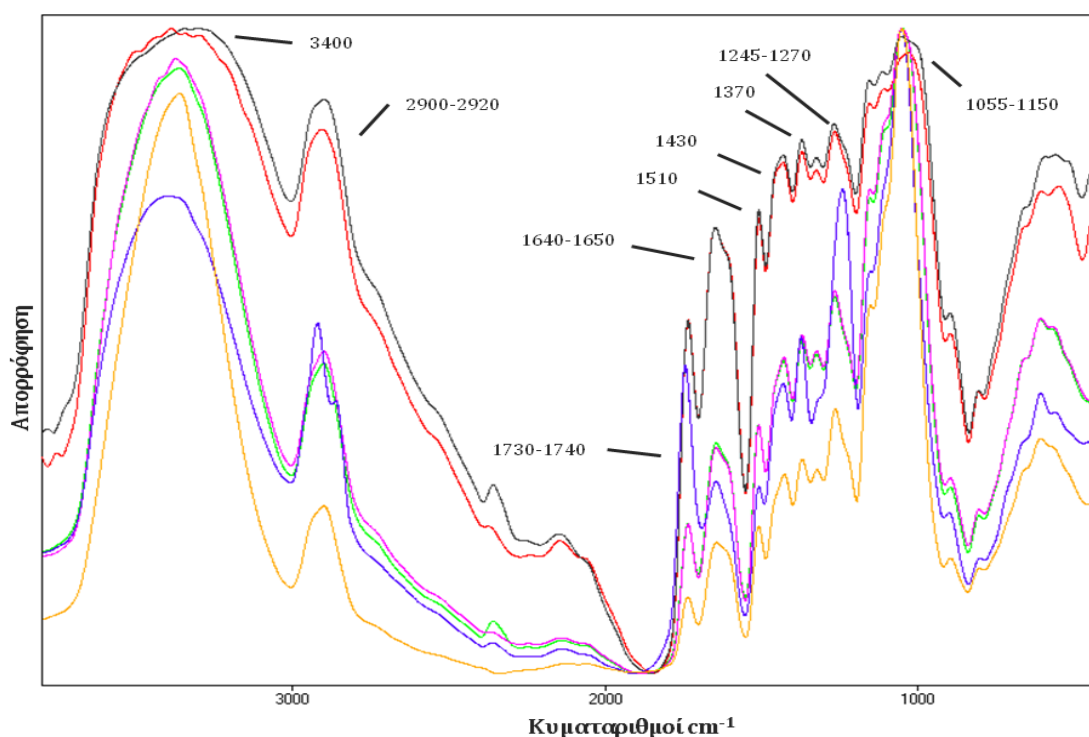


**Σχήμα 3.3.1** Σύσταση και κατανομή μεγέθους σωματιδίων (δεδομένα περίθλασης λέιζερ) δειγμάτων ξηρής βιομάζας *P. abies*. Οι καμπύλες υποδεικνύουν την κατανομή μεγέθους και όγκου των διαχωρισμένων μικροαλεσμένων κλασμάτων: αρχικό δείγμα ξηρής βιομάζας πριν την άλεση (μπλε), δείγμα πρώτης άλεσης διαμέτρου σωματιδίων ~310μm (πράσινο, FG), δείγμα πρώτης άλεσης διαμέτρου σωματιδίων ~110μm (κόκκινο, FF), δείγμα δεύτερης άλεσης μεγέθους σωματιδίων ~100μm (γαλάζιο, FG2) και δείγμα δεύτερης άλεσης μεγέθους σωματιδίων εύρους ~20μm (μωβ, FF2).

Οι κορυφές των φασμάτων FT-IR για τα αρχικά δείγματα *P. abies* (Σχήμα 3.3.2) εμφάνισαν διαφοροποιήσεις ανάλογα με την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων τους μετά την άλεση τους και το διαχωρισμό τους. Η FG βιομάζα των πιο ευμεγεθών σωματιδίων ταυτίζεται σχεδόν σε περιεχόμενο με την FG Dep στην οποία έχει απομακρυνθεί η πηκτίνη και διαφοροποιούν σε κάποιο βαθμό την εικόνα του FT-IR φάσματός τους σε σύγκριση με τα μικροαλεσμένα δείγματα FG2 και FF2 καθώς και FF3 στο οποίο επίσης έχει απομακρυνθεί η πηκτίνη. Πιθανά, το μεγαλύτερο μέγεθος των σωματιδίων αυξάνει την τάση για απορρόφηση υγρασίας (περιοχή φάσματος  $1643\text{ cm}^{-1}$ ) ενώ παρατηρούνται διαφορές και στο περιεχόμενο σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.

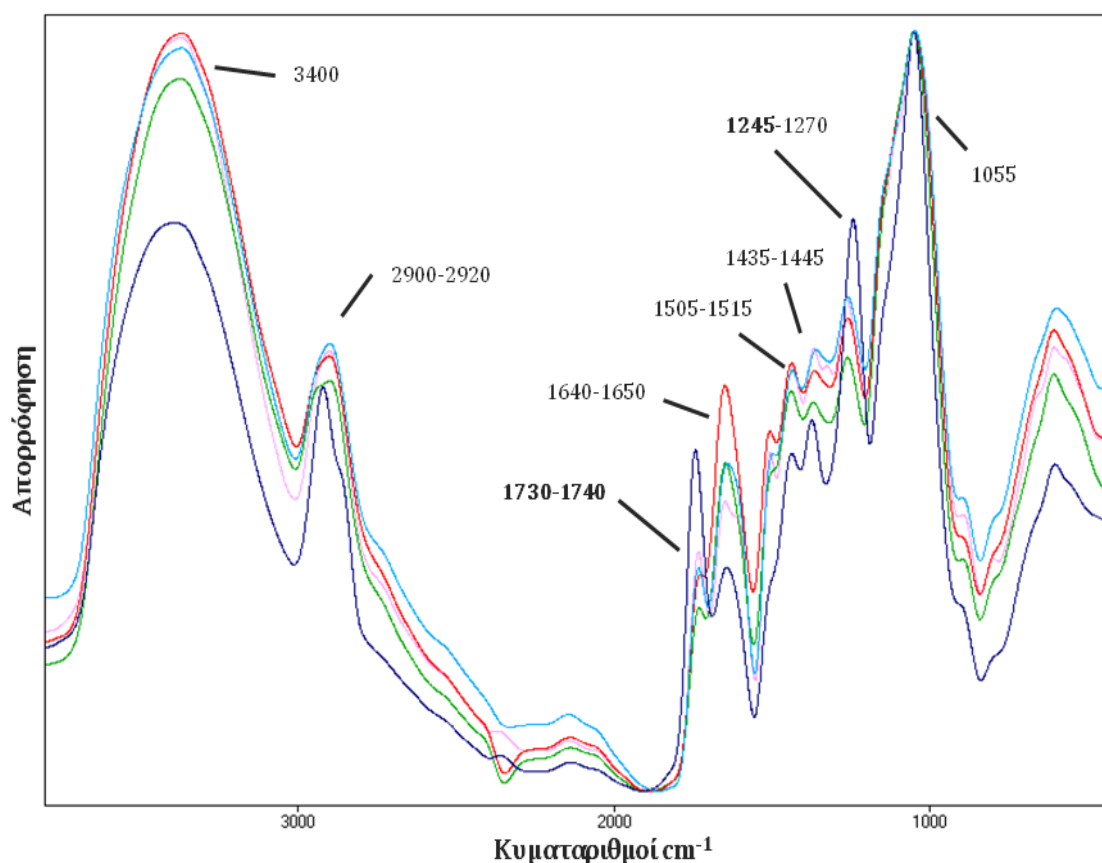
Οι κορυφές ενδιαφέροντος κατά την ανάλυση των φασμάτων περιλαμβάνουν κυρίως τις περιοχές απορρόφησης  $1730\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$  και  $1245\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες υποδεικνύουν παρουσία ακέτυλο-, φέρουλο- και γλυκουρονικών ομάδων της

ημικυτταρίνης και διερευνούνται ως προς τη διαφοροποίηση τους μετά την ενζυμική κατεργασία καθώς και κατά την απομόνωση LCCs. Παρατηρούμενες κορυφές σε περιοχές  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $2900\text{ cm}^{-1}$ ,  $1160\text{ cm}^{-1}$  και  $1020\text{ cm}^{-1}$  είναι ενδεικτικές για την κυτταρίνη ενώ εμφανίζονται και σε FT-IR φάσματα ημικυτταρινών αφού αποδίδονται σε δονήσεις C-OH και C-O-C του γλυκοζιδικού δεσμού. Ειδικότερα, μια ευρεία, πολλαπλή κορυφή σε κυματαριθμούς  $1050\text{ cm}^{-1}$  -  $1100\text{ cm}^{-1}$  αποτελεί χαρακτηριστικό υψηλά υποκατεστημένων αραβινοξυλανών. Απορροφήσεις στα  $1643\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται είτε σε απορροφημένη υγρασία είτε στην παρουσία πηκτίνης ενώ οξείες κορυφές στην περιοχή  $1505\text{ cm}^{-1}$  -  $1510\text{ cm}^{-1}$  δίνουν μια εκτίμηση για το περιεχόμενο σε λιγνίνη της εξεταζόμενης λιγνινοκυτταρινούχου πρώτης ύλης [Marchessault, 1962, Chen *et al*, 1997, Jin *et al*, 2009].



**Σχήμα 3.3.2** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR για όλα τα αρχικά δείγματα *P. abies* που χρησιμοποιήθηκαν: FG – κόκκινο, FG Dep – γκρι, FF – πράσινο, FG2 – ροζ, FF2 – κίτρινο, FF3 – μωβ.

Το ακατέργαστο αρχικό δείγμα FF3 υδολύθηκε ενζυμικά παρουσία τόσο της *StGE2* όσο και παρουσία των ημικυτταρινασών *Xyn11* και  $\alpha$ -γλυκουρονιδάσης με την πειραματική διαδικασία που αναλύεται στην §2.1.9. Τα στερεά υπολείμματα FF3 μετά την ενζυμική κατεργασία και τη λυοφιλίωσή τους αναλύθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.3. Όπως διαφαίνεται από την ασθενέστερη κορυφή του φάσματος FT-IR, σε σύγκριση με το ακατέργαστο δείγμα, στα 1730-1740  $\text{cm}^{-1}$  και 1245  $\text{cm}^{-1}$ , η *StGE2* παρουσιάζει κάποια υδρολυτική δράση συγκρίσιμη με τη μεμονωμένη δράση των δύο άλλων ημικυτταρινασών. Οι συγκεκριμένες κορυφές υποστηρίζεται ότι αποδίδονται στις δονήσεις τάσης O=C-OH εστέρων γλυκουρονικών οξέων της ημικυτταρίνης [Åkerholm & Salmén, 2001].



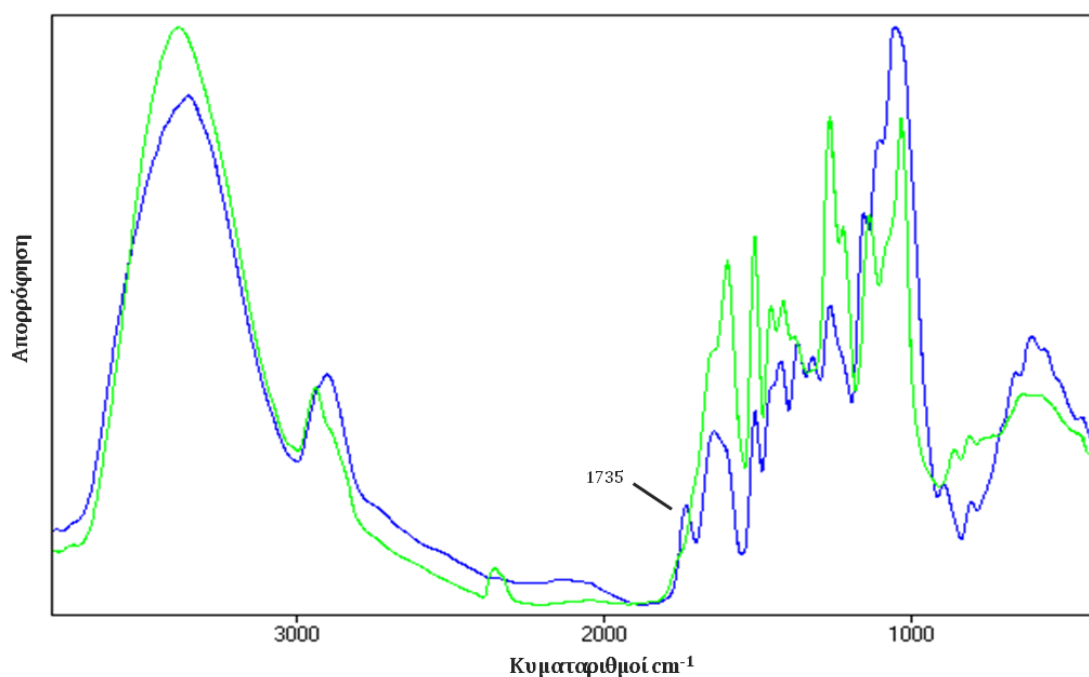
**Σχήμα 3.3.3** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR που περιλαμβάνει α) το αρχικό δείγμα *P. abies* FF3 – μπλε και τα δείγματα μετά από ενζυμική κατεργασία του αρχικού β) με *StGE2* – γαλάζιο γ) με *StGE2* και *Xyn11* – ροζ δ) με *StGE2* και  $\alpha$ - γλυκουρονιδάση – πράσινο καθώς και ε) με *StGE2*, *Xyn11* και  $\alpha$ - γλυκουρονιδάση – κόκκινο, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση της Xyn11 δεν παρατηρήθηκε κάποια συνεργιστική δράση ωστόσο στην περίπτωση της ενζυμικής δράσης της StGE2 παρουσία και α-γλυκουρονιδάσης, οι χαρακτηριστικές κορυφές εστέρων εμφανίζονται ασθενέστερες. Η επανάληψη της δοκιμασίας με διπλασιασμό των ενζυμικών συγκεντρώσεων δεν οδήγησε σε κάποια πρόσθετη παρατήρηση από τα ληφθέντα φάσματα FT-IR. Επιπρόσθετα, με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit (Megazyme) όσο και της μεθόδου Hestrin [Hestrin, 1949], δεν ανιχνεύθηκε απελευθέρωση GlcA ώστε να μην είναι δυνατή η περαιτέρω αξιολόγηση της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου στο ακατέργαστο δείγμα *P. abies*. Ωστόσο, δεν αποκλείεται η πιθανή υδρολυτική δράση χωρίς να συνοδεύεται από απελευθέρωση του GlcA από την ημικυτταρίνη.

Η μελέτη της απομόνωσης LCCs με την εφαρμογή δύο εναλλακτικών μεθοδολογιών, αποσκοπούσε στον εμπλουτισμό των αρχικών δειγμάτων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (*P. abies*, φελλού) στους εστερικούς δεσμούς που αποτελούν πιθανά στόχο για την GE ώστε να διερευνηθεί η καταλυτική δράση του ενζύμου έναντι φυσικών εν δυνάμει υποστρωμάτων. Μετά από ανάμιξη των αρχικών δειγμάτων *P. abies* ακολουθήθηκε η μεθοδολογία κατά τους J. Azuma και K. Tetsuo [Azuma & Tetsuo, 1988] όπως περιγράφεται στην §2.1.8.ii.α). Η μέθοδος οδήγησε σε απομονωμένο κλάσμα ξηρής βιομάζας με εξαιρετικά χαμηλή απόδοση της τάξης του 0.3% επί της αρχικής ξηρής βιομάζας. Ωστόσο, βάσει βιβλιογραφικών αναφορών τα LCCs απαντώνται σε μικρό βαθμό στα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά δασικής προέλευσης [Obst 1982] και οι αποδόσεις των δοκιμασιών απομόνωσής τους έχουν αναφερθεί να είναι και της τάξης του 0.04- 7.9% [Sakagami *et al.*, 2010] (§1.4.3.ii). Στο Σχήμα 3.3.4 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR του ακατέργαστου αρχικού δείγματος *P. abies* και του κλάσματος εν δυνάμει LCCs κατά Azuma. Όπως παρατηρείται δεν καταγράφεται εμπλουτισμός στους επιθυμητούς εστερικούς δεσμούς γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε σε υδρόλυσή τους κατά την διεργασία απομόνωσης από τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια είτε σε απώλειες σε ορισμένα στάδια απομόνωσης. Ειδικότερα, το πρωτόκολλο Azuma παραλλάχθηκε με τη χρήση βενζυλιωμένων μεμβρανών για το στάδιο της διαπίδυσης ώστε το μειωμένο



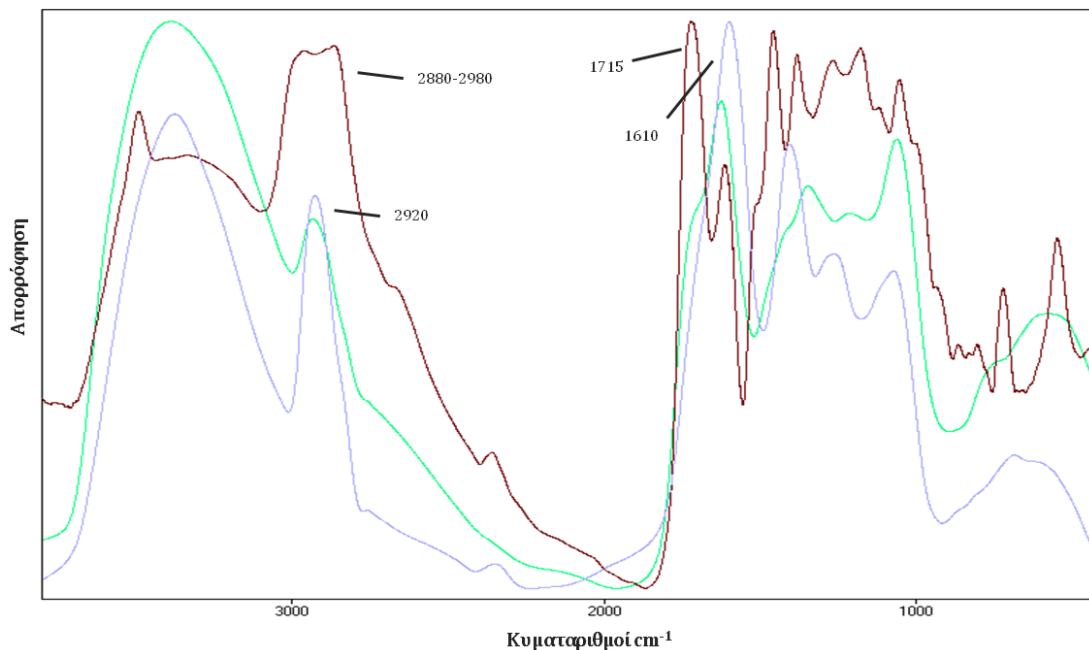
μέγεθος πόρων να συγκρατεί ενώσεις M.B.  $\leq 1.2$  kDa. Καθώς η δομή και το M.B. των LCCs παραμένουν προϊόντα υποθέσεων και δεν έχουν προσδιοριστεί με βεβαιότητα η παραλλαγή αυτή μπορεί να αποδείχτηκε καθοριστικής σημασίας για το αποτέλεσμα.



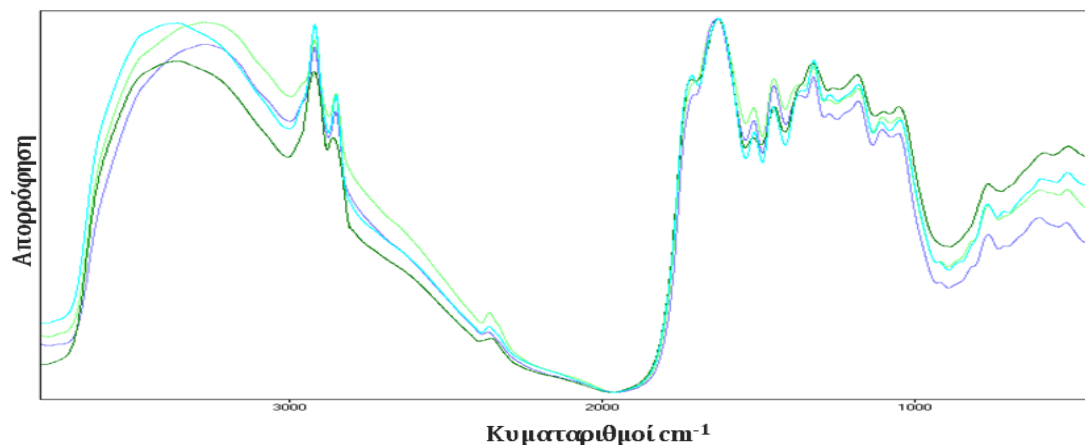
**Σχήμα 3.3.4** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR του αρχικού δείγματος *P. abies* (ανάμιξη των αρχικών FG, FF, FG2, FF2) – μπλε και το κλάσμα απομόνωσης ακολουθώντας τη μεθοδολογία J. Azuma και K. Tetsuo [Azuma & Tetsuo, 1988] – πράσινο.

Ακολούθησε δοκιμασία απομόνωσης LCCs με χρήση νέας εναλλακτικής μεθοδολογίας κατά τους Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009] με τα διαδοχικά στάδια που περιγράφονται αναλυτικά στην §2.1.8.ii.β). Αρχικά, η δοκιμασία αφορούσε σε δείγμα αλεσμένου φελλού φυτικής προέλευσης (bark) και τα κλάσματα απομόνωσης αναφέρονται ως H1 για ημικυτταρίνες διαλυτές σε 90% ουδέτερο διοξάνιο, H2 για ημικυτταρίνες διαλυτές σε 80% όξινο διοξάνιο εμπλουτισμένες σε εστερικούς δεσμούς και H3 για τις ημικυτταρίνες διαλυτές σε DMSO (BH1, BH2, BH3 για το αρχικό δείγμα φελλού, αντίστοιχα), λιγότερο εμπλουτισμένες

σε εστερικούς δεσμούς ενώ στο κλάσμα H4 οι επιθυμητοί εστέρες της ημικυτταρίνης θεωρούνται σαπωνοποιημένοι.



**Σχήμα 3.3.5** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR για τα κλάσματα απομόνωσης φελλου ακολουθώντας τη μεθοδολογία των Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009]: BH1 – καφέ, BH2 - πράσινο, BH3 – μωβ.

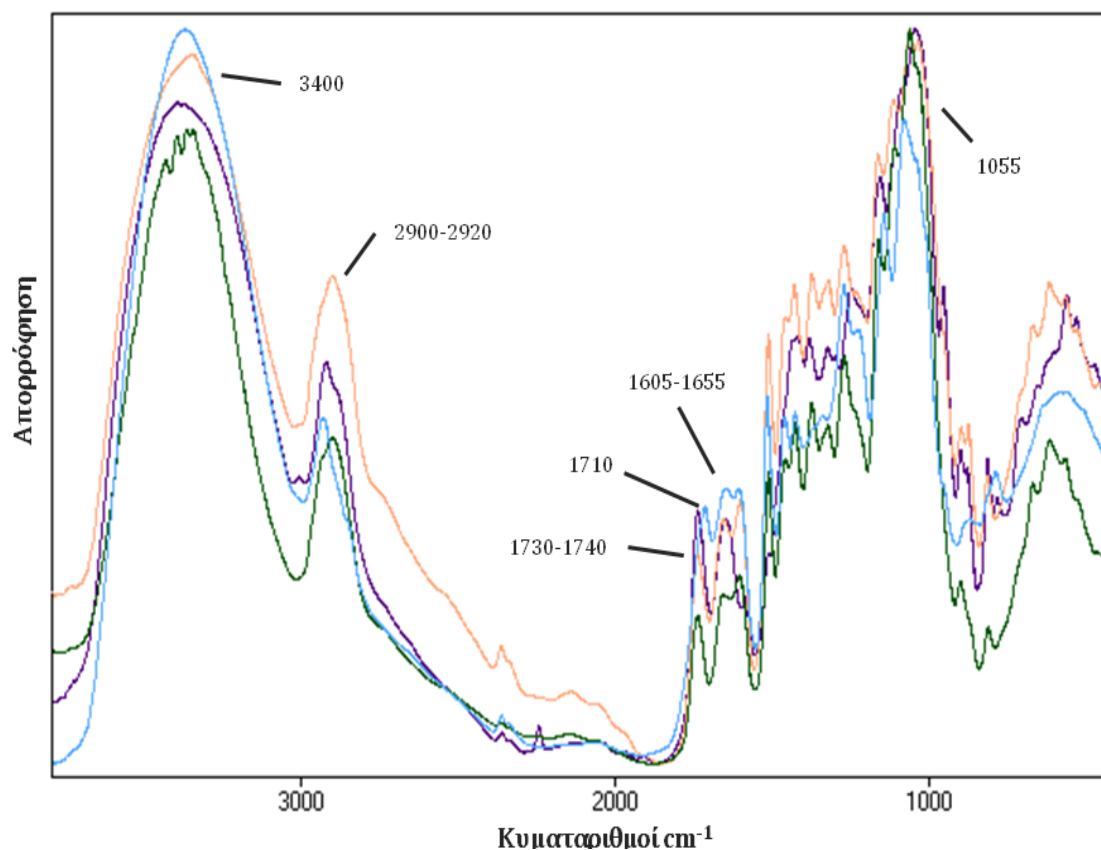


**Σχήμα 3.3.6** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR α) για το κλάσμα απομόνωσης φελλου BH2 ακολουθώντας τη μεθοδολογία των Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009] - σκούρο πράσινο, του ενζυμικά κατεργασμένου BH2 β) με *StGE2* – γαλάζιο, γ) με *StGE2* και α- γλυκουρονιδάση – ανοιχτό πράσινο καθώς και δ) με *StGE2*, *Χyn11* και α- γλυκουρονιδάση – μπλε, αντίστοιχα.

Η ανάλυση των φασμάτων FT-IR των απομονωμένων κλασμάτων παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.5. Το αρχικό δείγμα φελλού δεν εμφάνισε χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης δονήσεων στο φάσμα, πιθανώς λόγω της αδυναμίας άλεσής του σε κατάλληλου μεγέθους για την ανάλυση κόκκων. Παράλληλα, από τις κορυφές του φάσματος δε μπορεί να εκτιμηθεί η σύσταση σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη του υλικού ώστε να γίνουν αξιόπιστες συγκρίσεις. Ωστόσο, διαφάνηκε ένας πιθανός εμπλουτισμός σε εστέρες στο BH1 κλάσμα απομόνωσης συγκριτικά με τα BH2 και BH3. Επίσης, η ενζυμική κατεργασία του δείγματος απομόνωσης BH2 (αναμενόταν σύμφωνα με τη μεθοδολογία να είναι το πιο εμπλουτισμένο στις επιθυμητές σύστασης ημικυτταρίνες [Jin *et al.*, 2009]) με τα ένζυμα *SrGE2*, *Xyn11* και α-γλυκουρονιδάση δεν οδήγησε σε κάποια πρόσθετη παρατήρηση καθώς όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.6 δεν υπήρξε καμία καταλυτική επίδραση στο δείγμα. Επίσης, με χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit (Megazyme) όσο και της μεθόδου Hestrin [Hestrin, 1949] για την αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε GlcA στο διάλυμα της κάθε ενζυμικής αντίδρασης, δεν ανιχνεύτηκε απελευθέρωση GlcA.

Η μεθοδολογία Jin *et al.* εφαρμόστηκε και σε αρχικό δείγμα σκανδιναβικής ελάτης στο οποίο είχε απομακρυνθεί η πηκτίνη, κατά τον ίδιο τρόπο. Η ανάλυση με FT-IR των απομονωμένων κλασμάτων PH1, PH2 και PH3 παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.7. Σύμφωνα με τις κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών εστερικών δεσμών γλυκουρονικών καταλοίπων ημικυτταρίνης, ο επιθυμητός εμπλουτισμός ήταν επιτυχής για τα κλάσματα απομόνωσης PH2 και PH3 ημικυτταρινών διαλυτών σε 80% όξινο διοξάνιο και DMSO, αντίστοιχα. Η απόδοση της μεθόδου σε στερεό υπόλειμμα εν δυνάμει LCCs ήταν 5% για το κλάσμα PH2 και 1% για το κλάσμα PH3 επί της αρχικής ξηρής βιομάζας. Στην περίπτωση του PH3, η ανάκτησή του από το διάλυμα DMSO αποδείχθηκε εξαιρετικά δύσκολη καθώς η απομάκρυνση του συγκεκριμένου διαλύτη κατέστη δυνατή μετά από διαδοχικές αραιώσεις με υπερκάθαρο νερό και διαδοχικές λυοφυλιώσεις. Ωστόσο, οι χαμηλές αποδόσεις των συγκεκριμένων μεθόδων μπορούν να αποδοθούν και στις σχετικά μικρές τάξεις μεγέθους των αρχικών προς κατεργασία δειγμάτων (20 g) δεδομένου ότι πρόκειται για μεθοδολογίες

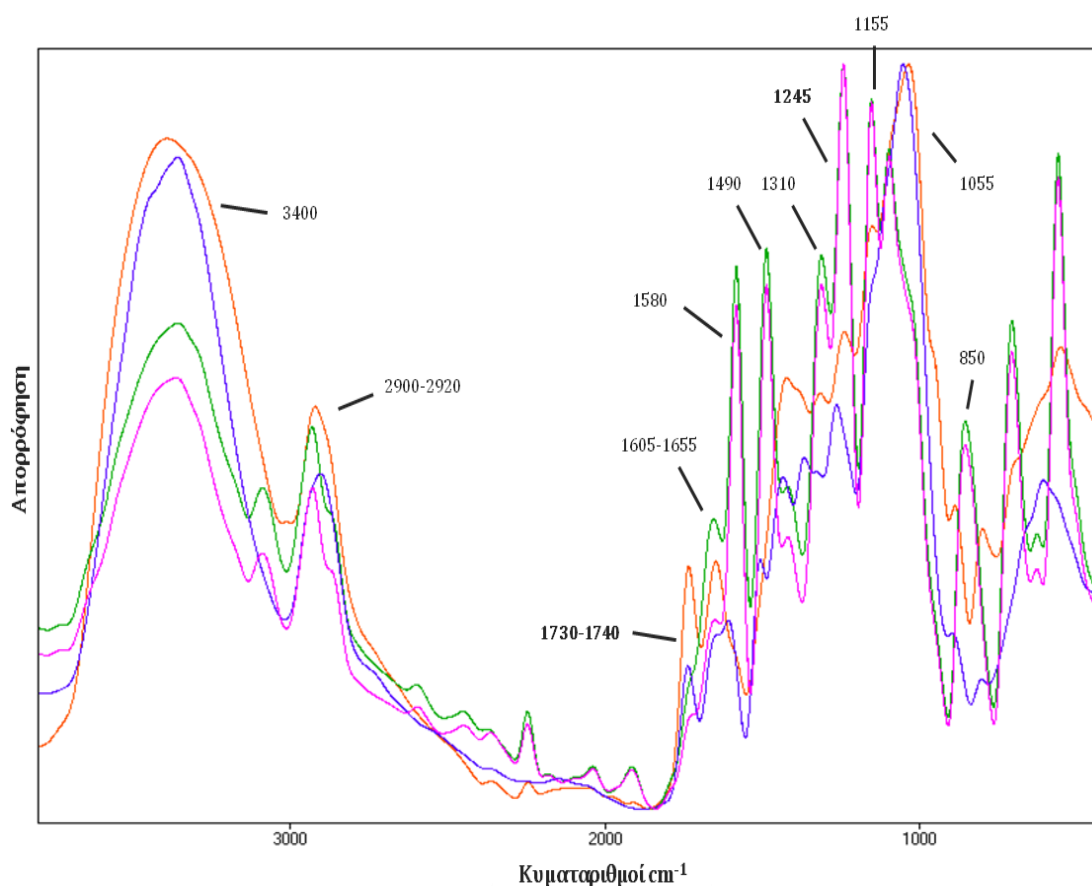
που χρησιμοποιούν αρχικά δείγματα της τάξης των kg. Για την περαιτέρω μελέτη της υδρολυτικής δράσης της *StGE2* επελέγη το κλάσμα PH2.



**Σχήμα 3.3.7** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR για τα κλάσματα απομόνωσης *P. abies* ακολουθώντας τη μεθοδολογία των Jin *et al.* [Jin *et al.*, 2009]: Αρχικό (FG Dep + FF3) – πράσινο, PH1 – πορτοκαλί, PH2 – μωβ και PH3 – γαλάζιο.

Όπως συμπεραίνεται από την υπέρθεση των φασμάτων FT-IR του *P. abies* κλάσματος απομόνωσης PH2 και των ενζυμικά κατεργασμένων δειγμάτων που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.8, η *StGE2* εμφανίζει υδρολυτική ενεργότητα ως προς το κλάσμα ημικυτταρινών διαλυτών σε 80% όξινο διοξάνιο. Η κορυφή στα  $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$  η οποία αντιστοιχεί σε γλυκουρονικούς εστέρες της ημικυτταρίνης εμφανίζεται ασθενέστερη στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης με το υπό εξέταση ένζυμο, σε σύγκριση με την ενζυμική κατεργασία παρουσία *Xyn11* και  $\alpha$ -γλυκουρονιδάσης αλλά απουσία *StGE2* (ροζ για την παρουσία *StGE2* και πράσινο για την παρουσία *Xyn11* και  $\alpha$ -γλυκουρονιδάσης). Παράλληλα, διαφαίνεται πιο καθαρά ο εμπλουτισμός σε εστέρες του κλάσματος

απομόνωσης (πορτοκαλί) σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα (μπλε) λαμβάνοντας υπόψιν την απορρόφηση σε περιοχές φάσματος  $1735\text{ cm}^{-1}$  και  $1245\text{ cm}^{-1}$ . Οι οξείες κορυφές στα  $1580\text{ cm}^{-1}$ ,  $1490\text{ cm}^{-1}$ ,  $1245\text{ cm}^{-1}$  και  $1155\text{ cm}^{-1}$  στα φάσματα απορρόφησης των ενζυμικά κατεργασμένων δειγμάτων αντιστοιχούν σε δονήσεις δευτεροταγών αμινών και δεσμών  $\text{S}=\text{O}$  ώστε να αποδίδονται σε αμινοξικά κατάλοιπα.



**Σχήμα 3.3.8** Υπέρθυση φασμάτων απορρόφησης FT-IR που περιλαμβάνει α) το αρχικό δείγμα *P. abies* – μπλε, β) το κλάσμα απομόνωσης PH2 [Jin *et al.*, 2009] – πορτοκαλί και τα δείγματα μετά από ενζυμική κατεργασία του PH2 γ) με *StGE2* – ροζ καθώς και με δ) *Xyn11* και α-γλυκουρονιδάση – πράσινο, αντίστοιχα.

Καθώς η ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας FT-IR δεν αποτελεί ποσοτική μέθοδο, η διερεύνηση της απελευθέρωσης γλυκουρονικού οξέος ως το προϊόν της υδρόλυσης έγινε με τη χρήση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος D-Glucuronic Acid/D-Galacturonic Acid Assay Kit (Megazyme). Η συγκέντρωση GlcA στα διαλύματα των ενζυμικών αντιδράσεων προσδιορίστηκε στα 0.028

mg/mL παρουσία *StGE2* (υποδηλώνοντας απελευθέρωση εστεροποιημένου GlcA από την ημικυτταρίνη) και 0.102 mg/mL παρουσία *Xyn11* και α-γλυκουρονιδάσης, αντίστοιχα (υποδηλώνοντας απελευθέρωση μη εστεροποιημένου GlcA από την ημικυτταρίνη). Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης προϊόντος γλυκουρονικού οξέος στο ενζυμικό διάλυμα της αντίδρασης υποστηρίζουν την υδρόλυση του κλάσματος απομόνωσης εν δυνάμει LCCs, PH2. Ωστόσο, με τη μέθοδο Hestrin δεν κατέστη εφικτή η ανίχνευση του εν δυνάμει προϊόντος υδρόλυσης λόγω φωτομετρικών παρεμποδίσεων από το χρωματισμό των δειγμάτων ανάλυσης καθώς και τον αφρισμό κατά την προσθήκη των αντιδραστηρίων.

### 3.3.2 Συμπεράσματα

Η *StGE2* εμφάνισε ενδείξεις καταλυτικής ενεργότητας ως προς την υδρόλυση εστέρων του γλυκουρονικού οξέος της ημικυτταρίνης σε αρχική μικροαλεσμένη ξηρή βιομάζα σκανδιναβικής ελάτης (*P. abies*), ενώ παρουσία της ημικυτταρινάσης α-γλυκουρονιδάση προέκυψε ένδειξη συνεργιστικής δράσης. Παράλληλα, η απομόνωση, εμπλουτισμένων σε εστερικούς δεσμούς στόχο για την *StGE2*, λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων από το αρχικό δείγμα με τη μεθοδολογία των Jin *et al.*, διαφαίνεται επιτυχής τόσο από τα δεδομένα της FT-IR ανάλυσης των κλασμάτων απομόνωσης όσο και από την ενεργότητα των ημικυτταρινασών που εξετάστηκαν. Η έλλειψη μεθόδων που οδηγούν με αυξημένες αποδόσεις σε απομονωμένες φυσικές δομές λιγνινο-υδατανθρακικών συμπλόκων είναι μία από τις προκλήσεις που κρίνεται απαραίτητο να αντιμετωπιστούν μελλοντικά για την αξιοποίηση του υδρολυτικού δυναμικού των GEs σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ωστόσο, η ενζυμική υδρόλυση των πιθανών φυσικών υποστρωμάτων της *StGE2*, αρχικού δείγματος *P. abies* και LCCs, αποτελεί για πρώτη φορά μία ένδειξη προς την αποσαφήνιση της φυσιολογικής δράσης των GEs στην αποικοδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων.

## 3.4 Δομικές μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

### 3.4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχίας *StGE2*

Η ένδεια πρότερων απτών κρυσταλλογραφικών δεδομένων για το καταλυτικό κέντρο της *StGE2* και των υπολοίπων μελών της CE-15 οικογένειας επέβαλε αρχικά μια ευρεία ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της *StGE2* με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής. Η ανάλυση της αλληλουχίας του ενζύμου που εκφράζεται στο φυσικό οργανισμό (κωδικός Uniprot: G2QJR6) πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο *BLASTP* [Altschul *et al.*, 1997], και οδήγησε σε μια λίστα θεωρητικά συντηρημένων περιοχών που άνηκαν σε υποθετικές πρωτεΐνες εκτός της Cip2\_GE (56 % ταυτότητα, 72 % ομολογία σε 92 % κάλυψη). Οι αλληλουχικά ομόλογες πρωτεΐνες σχετίζονται με την οικογένεια υδατανθρακικών εστερασεών 15 (CE-15, §1.3.3 ) ενώ η εξέταση των αντιστοιχισμένων αλληλουχιών τους αναδείκνυε τη συντηρημένη περιοχή G-C-S-R-X-G (γλυκίνη- κυστεΐνη- σερίνη- αργινίνη-X- γλυκίνη, όπου X μη συντηρημένο αμινοξύ). Το συγκεκριμένο μοτίβο αλληλουχίας εμπεριέχει το δυνητικά καταλυτικό πυρηνόφιλο κατάλοιπο Σερίνης (Σερίνη<sup>213</sup> της *StGE2*) που διαφαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο στο ενεργό κέντρο της οικογένειας των CE-15 υδρολασών [Torakas *et al.*, 2010].

Παράλληλα, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης της αλληλουχίας ανέδειξαν ότι τα κατάλοιπα 206 έως 227 με την αλληλουχία αμινοξέων RLGVTGCSRNGKGAFITGALVD εμπίπτουν στο μοτίβο GXXXXGK επονομαζόμενο ως μοτίβο P-βρόχου [Walker *et al.*, 1982], το οποίο θεωρείται ότι ακολουθεί την αρχιτεκτονική περιοχής DUF463 (Domain of Unknown Function, περιοχή άγνωστης λειτουργίας) [Punta *et al.*, 2012]. Το συγκεκριμένο μοτίβο είναι σύνηθες σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ATP/GTP. Παρά, ωστόσο τη χαμηλή τιμή E-value (Expect value) που συνοδεύει το αποτέλεσμα και προσδίδει βαρύτητα στην αντιστοίχιση της συγκεκριμένης αλληλουχίας, δεν υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που να υποστηρίζουν την ύπαρξη του μοτίβου P-βρόχου. Επιπρόσθετα, με τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα, οι εστεράσες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας δεν απαιτούν φωσφορικές ρίζες (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) για την ενεργότητα τους. Συνεπώς, είναι μικρή η πιθανότητα το μοτίβο P-βρόχου να έχει ένα λειτουργικό ρόλο.

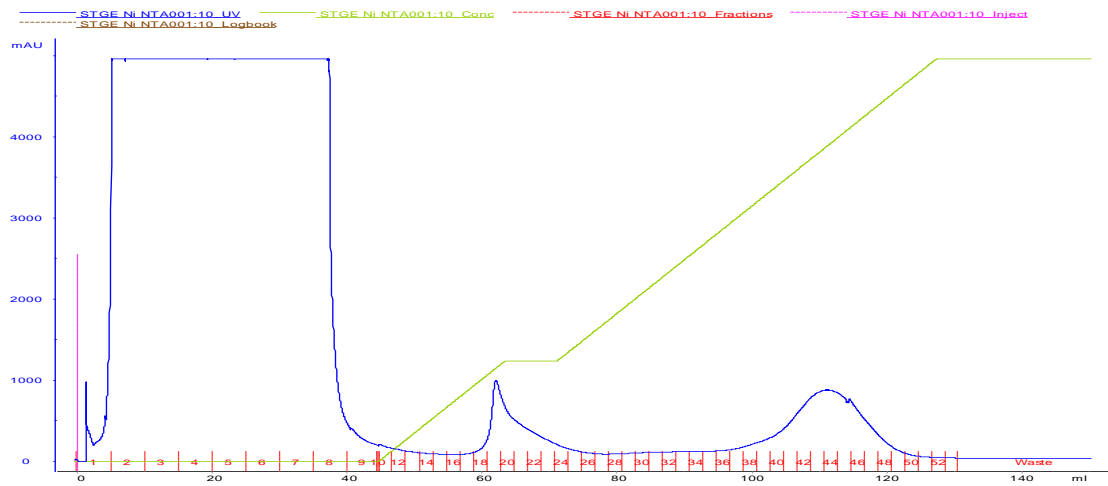
Δεδομένου του ότι ο μεθυλότροφος ζυμομύκητας *P. pastoris* που χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης παρουσιάζει το φαινόμενο της υπεργλυκοζυλίωσης ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ενδοκυτταρικού του συστήματος [Conde *et al.*, 2004], διερευνήθηκε η ύπαρξη N- και O-γλυκοζυλίωσης βάσει της αλληλουχίας. Η ανάλυση πιθανών περιοχών N-γλυκοζυλίωσης (προσθήκη ολιγοσακχαρίτη σε κατάλοιπο Ασπαραγίνης) μέσω του αλγόριθμου *NetNGlyc* v.1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> [Gurta *et al.*, 2004]) δεν ανέδειξε κάποια θέση στην αλληλουχία ενώ με τον αλγόριθμο *NetOGlyc* v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc> [Steentoft *et al.*, 2013]) υπολογίστηκαν 10 πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης (προσθήκη ολιγοσακχαρίτη τύπου GalNAc σε κατάλοιπα Θρεονίνης ή Σερίνης).

### 3.4.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων *StGE2* και κρυσταλλογραφικές μελέτες πρόσδεσης

#### 3.4.2.i Παραγωγή και απομόνωση ενζύμου

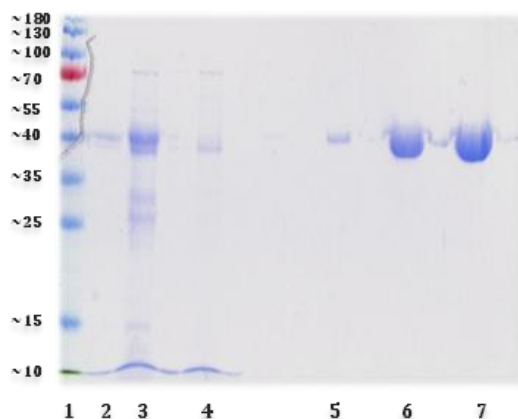
Η απομόνωση του γονιδίου *ge2* που κωδικοποιεί τη σύνθεση της GE από το γονιδίωμα του θερμόφιλου μύκητα *M. therophila*, καθώς και η ετερόλογη έκφραση στο σύστημα της μεθυλότροφης ζύμης *P. pastoris* πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην εργασία των Torakas *et al.*, 2010. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαC που έφερε το γονίδιο *ge2* χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό *E. coli* TOPIOF' κυττάρων προς πολλαπλασιασμό με τη διαδικασία θερμικού στρες (heat shock). Στη συνέχεια, απομονώθηκε και γραμμικοποιήθηκε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *SacI* ώστε να λάβει χώρα ο τελικός μετασχηματισμός των κυττάρων της *Pichia pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen. Ακολούθησε η παραγωγή του ενζύμου με το ετερόλογο σύστημα έκφρασης *P. pastoris*, έπειτα η απομόνωση και ο καθαρισμός του με τη χρήση IMAC (Co<sup>2+</sup> ή Ni<sup>2+</sup>) (Εικόνα 3.4.1).





**Εικόνα 3.4.1** Απομόνωση της *StGE2* με τη μέθοδο IMAC ( $\text{Ni}^{2+}$ ) και χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος απομόνωσης (ÄKTApurifier UPC10, GE Healthcare Life Sciences, UK) διαθέσιμο στο IBΦXB, ΕΙΕ. Με μπλε γραμμή υποδεικνύεται η απόκριση του ανιχνευτή στα 280 nm ενώ με πράσινη η βαθμίδωση άλατος ιμιδαζολίου (mM). Τα κλάσματα που αντιστοιχούν σε όγκο έκλυσης 100 έως 120 mL και συγκέντρωση ιμιδαζολίου 38 – 50 mM, αποτελούν την απομονωμένη πρωτεΐνη.

Για την αξιολόγηση της υψηλής καθαρότητας του ενζύμου που αποτελεί ένα από τα προαπαιτούμενα για την επιτυχή κρυστάλλωση, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε 12.5% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η πρωτεϊνική ζώνη που εμφανίστηκε αντιστοιχούσε σε MB 43 kDa (Εικόνα 3.4.2) παρόμοιο με το θεωρητικά υπολογισμένο MB μέσω του προγράμματος *ProtParam* του εξυπηρετητή ExPASy [Gasteiger *et al.*, 2005] ώστε να θεωρηθεί κατάλληλη για πειράματα κρυστάλλωσης.

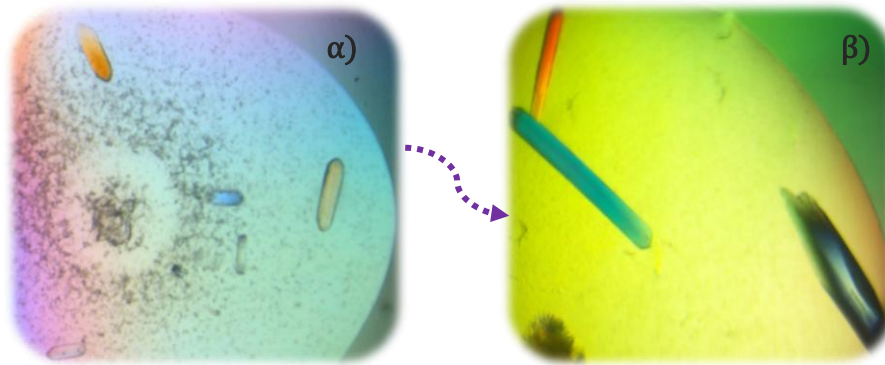


**Εικόνα 3.4.2** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) βαθμού πολυμερισμού 12,5%. Στήλη 1: πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Στήλες 2, 3: Ενζυμικό εκχύλισμα υγρής καλλιέργειας. Στήλη 4: Κλάσμα έκπλυσης της ρητίνης. Στήλες 5, 6, 7: Κλάσματα απομονωμένης *StGE2*.

### **3.4.2.ii Προσδιορισμός συνθηκών κρυστάλλωσης της *StGE2***

Το ενζυμικό δείγμα *StGE2* συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 20 mg/ml σε Tris-HCl 20mM pH 8.0 ώστε να πραγματοποιηθούν οι δοκιμές κρυσταλλογένεσης. Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν στο IBΦXB – EIE, στην Ομάδα Δομικής Βιολογίας και Χημείας υπό την επίβλεψη της Δρ. Ε. Χρυσίνα και η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθημένη σταγόνα αξιοποιώντας ρομπότ κρυστάλλωσης (Oryx-Nano crystallization robot, Douglas Instruments, Ltd). Με τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων κρυστάλλωσης που προσέφεραν τη δυνατότητα 96 διαφορετικών συνθηκών ανά ξεχωριστό σκεύασμα, σαρώθηκε πλήθος συνθηκών για αρχικό όγκο σταγόνας 0.3  $\mu$ L. Ίζημα κρυσταλλικής φύσης, βελονοειδείς και πολύ μικρού μεγέθους κρύσταλλοι προέκυψαν σε πλήθος περιπτώσεων με τη χρήση του εμπορικού σκεύασματος JCSG-plus™, ωστόσο με τη χρήση του σκεύασματος PEGs Suite προέκυψαν πιο ευμεγέθεις κρύσταλλοι σε μεγαλύτερο αριθμό σταγόνων. Ακολούθως, η διερεύνηση κρυσταλλογένεσης για την *StGE2* επικεντρώθηκε μόνο στις συνθήκες ενδιαφέροντος του σκεύασματος PEGs Suite αυξάνοντας τον όγκο σταγόνας σε 1  $\mu$ L. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στη σταγόνα ήταν 10 mg/mL αφού αναμίχθηκαν ίσοι όγκοι *StGE2* σε Tris-HCl 20mM pH 8.0 και διαλύματος κρυστάλλωσης ενώ η εξισορρόπηση έγινε έναντι 50  $\mu$ L μητρικού διαλύματος στους 16° C σε ακινησία.

Κρυσταλλογένεση βελονοειδών, μικρού μεγέθους αλλά και μεγαλύτερου μεγέθους κρυστάλλων παρατηρήθηκε σε πλήθος συνθηκών με εύρος pH 7.5 – 8.5 παρουσία PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) 2000MME, 3350, 4000, 6000 συγκεντρώσεων 25%, 30% και 35% (w/v) (Εικόνα 3.4.3α) ). Με περαιτέρω διερεύνηση των συγκεκριμένων αρχικών συνθηκών προσδιορίστηκε η βέλτιστη συνθήκη με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα (διάλυμα 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 παρουσία 30% (w/v) PEG3350) από την οποία προέκυψαν ορθορομβικού σχήματος μονοκρύσταλλοι μέσου μεγέθους ~ 10 x 10 x 350  $\mu$ m σε διάστημα ενός μηνός (Εικόνα 3.4.3β).



**Εικόνα 3.4.3** α) Παράδειγμα κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν σε αρχικές συνθήκες κρυστάλλωσης 0.1 M TrisHCl, pH 8.5, 25% (w/v) PEG3000. β) Βελτιστοποιημένοι κρύσταλλοι SfGE2 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κρυστάλλωσης 0.1 M TrisHCl, pH 8.0, 30% (w/v) PEG3350 και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων X για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης..

### **3.4.2.iii Πειράματα συγκρυστάλλωσης και εμφάνισης προσχηματισμένων κρυστάλλων σε διαλύματα εν δυνάμει προσδετών**

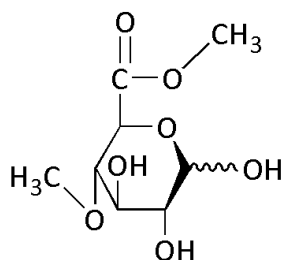
Την εύρεση επαναλήψιμων συνθηκών κρυστάλλωσης ακολούθησε η μελέτη συγκρυστάλλωσης παρουσία αναλόγων υποστρώματος του ενζύμου (Πίνακας 3.4.1 και §2.2.1) καθώς και εμφάνισης προσχηματισμένων μονοκρυστάλλων σε διαλύματα των εν λόγω ενώσεων. Τα πειράματα περιελάμβαναν μελέτες με χρήση διαλυμάτων 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκοκυραουρονικού μεθυλεστέρα, βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος, μεθυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος συγκεντρώσεων 0.25 mM, 0.5 mM, 2.5 mM και 5 mM σε μητρικό διάλυμα κρυστάλλωσης (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 30% (w/v) PEG3350) ώστε η αναλογία πρωτεΐνης – εν δυνάμει προσδέτη να κυμαίνεται σε εύρος 1:1-1:20. Τα παραπάνω υποστρώματα επελέγησαν προς διερεύνηση της αναγνώρισης και εκλεκτικότητας που επιδεικνύει το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου αφού προσομοιάζουν δομικά, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, μέρος των υποθετικών φυσικών υποστρωμάτων των GEs, των συμπλόκων τύπου LCCs (§1.4.2.iii [Duranová *et al.*, 2007, 2009]). Η μέθοδος συγκρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν, ομοίως, η διάχυση ατμών με καθήμενη σταγόνα αξιοποιώντας ρομπότ κρυστάλλωσης και συγκέντρωση πρωτεΐνης στη σταγόνα

10 mg/mL. Ανάπτυξη κρυστάλλων παρατηρήθηκε μόνο παρουσία 2.5 mM 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκοκυρανονοικού μεθυλεστέρα και 0.5 mM βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος (Εικόνα 3.4.4). Επίσης, έγιναν προσπάθειες σχηματισμού του συμπλόκου με εμβάπτιση προσχηματισμένων ευμεγέθων μονοκρυστάλλων *S*tGE2 σε διάλυμα που έφερε το ανάλογο υποστρώματος και εμποτισμό του κρυστάλλου από 1h – 16 h. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αλλοίωση του κρυσταλλικού πλέγματος ή και πλήρης καταστροφή του κρυστάλλου για χρόνο εμβάπτισης μεγαλύτερου των 3 h.

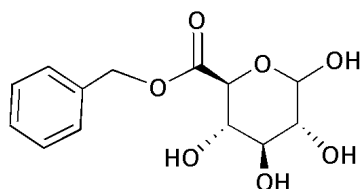
---

**Πίνακας 3.4.1** Τα ανάλογα υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές συγκρυστάλλωσης και εμβάπτισμού προσχηματισμένων πρωτεϊνικών κρυστάλλων στο πλαίσιο των κρυσταλλογραφικών μελετών με μοριακούς στόχους τις *S*tGE2 και S213A *S*tGE2.

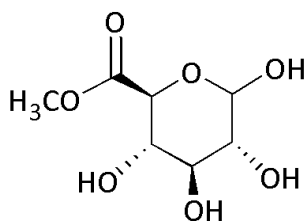
---



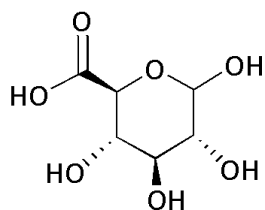
4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικός  
μεθυλεστέρας  
MB = 222.19 g/mol



Βενζυλικός εστέρας του D-  
γλυκουρονικού οξέος  
MB = 284.26 g/mol



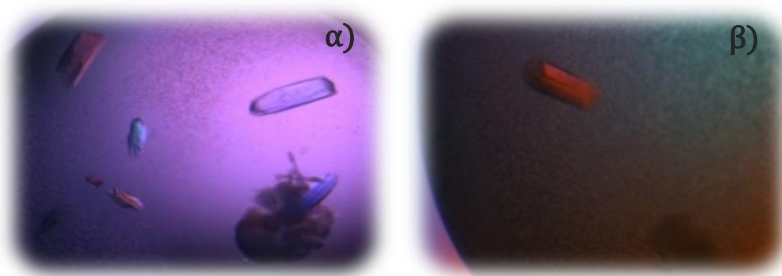
Μεθυλεστέρας του D-  
γλυκουρονικού οξέος  
MB = 208.17 g/mol



D-γλυκουρονικό οξύ  
MB = 194.14 g/mol

---

Παράλληλα, δεδομένης της αλληλουχίας P-βρόχου που ανέδειξε η βιοπληροφορική ανάλυση της *StGE2* αλληλουχίας (§ 3.4.1) έλαβαν χώρα πειράματα συγκρυστάλλωσης του ενζύμου στις προσδιορισμένες συνθήκες παρουσία μορίων που θα απαιτούνταν για το λειτουργικό ρόλο ενός τέτοιου μοτίβου σε ένζυμα που χρησιμοποιούν φωσφορικές ρίζες για τη δραστηριότητά τους. Για το λόγο αυτό και προς διαλεύκανση φυσιολογικής δράσης της *StGE2* χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις ATP, ADP (παρουσία ή όχι  $Mg^{2+}$  ως συμπράγοντα), άλας νατρίου του β-NADP και άλας νατρίου της 6-Φωσφορικής γλυκόζης σε συγκεντρώση 10 mM ώστε να είναι σε περίσσεια ως προς την πρωτεΐνη (1:40) ενώ η μέθοδος ήταν ομοίως η διάχυση ατμών με καθημερινή σταγόνα και χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης. Ωστόσο σε καμία από τις υπό μελέτη συνθήκες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων. Οι ίδιες συγκεντρώσεις διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για τα διαλύματα εμποτισμού προσχηματισμένων *StGE2* κρυστάλλων.

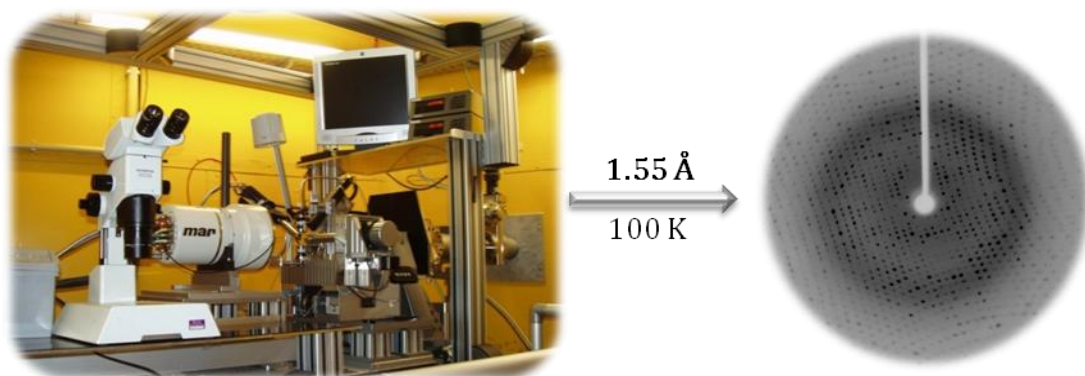


**Εικόνα 3.4.4** Κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν στις συνθήκες κρυστάλλωσης που ταυτοποιήθηκαν, παρουσία **α)** 2.5 mM 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα. **β)** 0.5 mM βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος.

### 3.4.3 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων *StGE2*

Με τη βοήθεια κατάλληλου μεγέθους βρόχου ένας *StGE2* κρύσταλλος μεταφέρθηκε στην κεφαλή γωνιομέτρου και εκτέθηκε στη συγχροτρονική ακτινοβολία στους 100 K αφού προηγουμένως είχε εμβαπτιστεί σε κρυστοπροστατευτικό διάλυμα (διάλυμα κρυστάλλωσης παρουσία 20% (v/v) γλυκερόλης). Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τη βοήθεια

του *DNA software package* του σταθμού X13 στο EMBL (Αμβούργο, Γερμανία) σε υψηλή ευκρίνεια 1.55 Å και περιελάμβανε συνολικά 299 περιθλασιγράμματα (Εικόνα 3.4.5) με εύρος περιστροφής 0.3° και χρόνο έκθεσης στη συγχροτρονική ακτινοβολία ( $\lambda=0.8123$  Å) τα 55 sec.



**Εικόνα 3.4.5** Ο σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας X13 που χρησιμοποιήθηκε (EMBL/outstation, Αμβούργο) και το αντίστοιχο περιθλασίγραμμα που συλλέχθηκε από την έκθεση μονοκρυστάλλου *SrGe2* στις ακτίνες X.

Στον Πίνακα 3.4.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων που έγιναν με τα προγράμματα *XDS package* [Kabsch, 2010] και *SCALA* [Evans, 2006], αντίστοιχα. Όπως προέκυψε, η συμμετρία του κρυστάλλου *SrGe2* ήταν σύμφωνη με την ομάδα χώρου συμμετρίας  $P2_12_12_1$ , ορθορομβικού κρυσταλλικού συστήματος, ενώ οι διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας ήταν  $a=46.0$ ,  $b=58.7$ ,  $c=136.2$  Å και γωνίες  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  με 1 μόριο ανά ασύμμετρη μονάδα.

**Πίνακας 3.4.2** Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έκθεση μονοκρυστάλλου της *SrGE2* σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων X

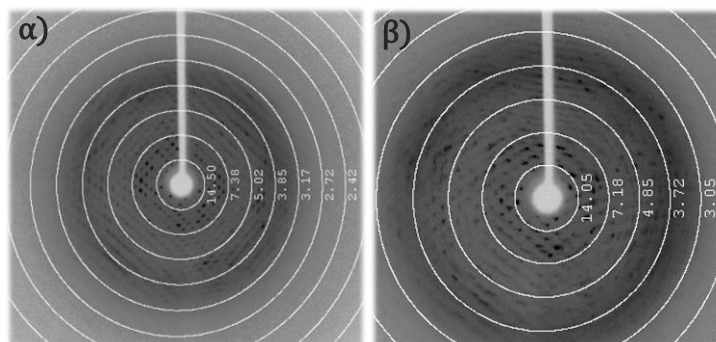
Σταθμός	MX beamline X13, EMBL/DESY
Μήκος κύματος (Å)	0.8123
Αρ. περιθλασιγραμμάτων	299
(εύρος περιστροφής ανά περιθλασίγραμμα)	(0.3°)
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a= 46.0, b=58.7, c=136.2
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	190519
(εξωτερική στοιβάδα)	(25955)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	51271
(εξωτερική στοιβάδα)	(7498)
Ευκρίνεια (Å)	19.45 - 1.55
Πληρότητα δεδομένων	94.5
(εξωτερική στοιβάδα) (%)	(95.9)
$\alpha R_m$	0.069
(εξωτερική στοιβάδα)	(0.498)
$\beta < (I / \sigma(I)) >$	9.5
(εξωτερική στοιβάδα)	(2.5)
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1.63 - 1.55
Πολλαπλότητα	3.7
(εξωτερική στοιβάδα)	(3.5)
B-factor (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	13.5

$\alpha R_m = \sum_i \sum_h | < I_h > - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $< I_h >$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i$ -οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση  $h$ , αντίστοιχα.

$\beta \sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση του  $I$ .

Επιπροσθέτως, στη συμβατική πηγή ακτίνων X εγκατεστημένης στο ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ, έγινε έκθεση των εμβαπτισμένων *SrGE2* κρυστάλλων ή πιθανών συγκρυστάλλων σε διαλύματα αναλόγων υποστρωμάτων αλλά και εν δυνάμει προσδετών με διαθέσιμες φωσφορικές ρίζες ( $PO_4^{3-}$ ). Στην ίδια πηγή εκτέθηκαν στην ακτινοβολία οι μονοκρυστάλλοι του ενζύμου που αναπτύχθηκαν παρουσία

2.5 mM 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα και 0.5 mM βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις δεν έγινε δυνατή η συλλογή είτε λόγω έλλειψης είτε πολύ χαμηλής περιθλαστικής ικανότητας (Εικόνα 3.4.6).



**Εικόνα 3.4.6** Ενδεικτικά περιθλασιγράμματα χαμηλής περιθλαστικής ικανότητας πιθανού συγκρυστάλλου *StGE2* α) παρουσία 2.5 mM 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα β) εμβαπτισμένου σε διάλυμα 10mM ATP.

### 3.4.4 Τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή *StGE2*

#### 3.4.4.i Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομής

Η επίλυση του προβλήματος των φάσεων από τα ληφθέντα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της ανασυνδυασμένης *StGE2* βασίστηκε στη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με χρήση του προγράμματος *Phaser* [McCoy *et al.* 2007] του πακέτου *CCP4* (Winn *et al.*, 2011). Ως αρχικό μοντέλο αξιοποιήθηκε η μόνη διαθέσιμη δομή καταλυτικής περιοχής της ομόλογης GE, Cip2 GE (κωδικός PDB 3PIC, Rokkukuri *et al.* 2011] καθώς εμφανίζει 72% ομολογία με την *StGE2* σύμφωνα με τον αλγόριθμο *BLASTP* του NCBI [Altschul *et al.*, 1997]. Τον υπολογισμό των αρχικών φάσεων και των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  και  $F_{obs}-F_{calc}$  ακολούθησαν διαδοχικοί κύκλοι ανισοτροπικής βελτιστοποίησης των παραγόντων θερμοκρασίας με το πρόγραμμα *REFMAC*



[Murshudov *et al.*, 1997]. Η ανισοτροπική μέθοδος βελτιστοποίησης κατέστη εφικτή βάσει της ποιότητας και πληρότητας των δεδομένων (αυξημένος αριθμός περιθλάσεων και εντάσεων) υψηλή ευκρίνειας 1.55 Å, ώστε οι δονήσεις κάθε ατόμου στο μοντέλο γύρω από μια θέση ισορροπίας να δύνανται να περιγραφούν από 9 παραμέτρους (3 συντεταγμένες θέσης και 6 παραμέτρους θερμικής διακύμανσης) αντί για την παραδοχή ότι η δόνηση είναι ισοτροπική σε όλες τις κατευθύνσεις (3 συντεταγμένες θέσης και 1 παράμετρος Debye-Waller/ B factor). Παράλληλα, μέσω του προγράμματος μοριακών γραφικών *Coot* [Emsley *et al.* 2010] στους κύκλους βελτιστοποίησης παρεμβάλλονταν διαδοχικοί κύκλοι ανακατασκευής του πρωτεϊνικού μοντέλου ενώ ενσωματώθηκαν και τα μόρια ύδατος που σχημάτιζαν είτε άμεσους είτε μέσω δικτύου μορίων νερού, δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη (water-mediated hydrogen-bond interactions). Στα τελικά στάδια βελτιστοποίησης του μοντέλου, με εξέταση των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  και  $F_{obs}-F_{calc}$  κατέστη εμφανής πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αποδόθηκε σε 2 μόρια γλυκερόλης και 14 μόρια αιθυλενογλυκόλης προερχόμενα από το κρυοπροστατευτικό και το μητρικό διάλυμα, αντίστοιχα, και τα οποία προστέθηκαν επίσης μέσω του προγράμματος *Coot*. Η τρισδιάστατη δομή της *SrGE2* βελτιστοποιήθηκε σε τελικό κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας  $R$  ίσο με 0.204 ενώ ο δείκτης αξιοπιστίας  $R_{free}$  ήταν 0.254. Πιο συγκεκριμένα, τα στατιστικά στοιχεία βελτιστοποίησης συνοψίζονται στον Πίνακα 3.4.3.

**Πίνακας 3.4.3** Στατιστικά στοιχεία βελτιστοποίησης και ποιότητα του μοντέλου της *SrGE2*.

Ευκρίνεια τελικού σταδίου βελτιστοποίησης (Å)	19.45 - 1.55
Αριθμός περιθλάσεων	48582
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν στη βελτιστοποίηση	31-397
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	2751
Αριθμός ετεροατόμων	
	μόρια ύδατος 412
	αριθμός μορίων αιθυλενογλυκόλης 14
	αριθμός μορίων γλυκερόλης 2
$\delta R_{\text{free}}$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.254 (0.333)
$\gamma R$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.204 (0.247)
Μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d.)	
	μήκους δεσμών (Å) 0.005
	γωνίας δεσμών (°) 0.967
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας (Å <sup>2</sup> ) πρωτεϊνικών μορίων	
	σύνολο δομής 15.5
	ατόμων κύριας αλυσίδας (Ca, C, N, O) 15.0
	ατόμων πλευρικής αλυσίδας 16.1
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	
	μόρια ύδατος 26.2
	μόρια αιθυλενογλυκόλης 28.5
	μόρια γλυκερόλης 31.9

<sup>γ</sup>O κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R$  ορίζεται:  $\sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων αντιστοίχως.

<sup>δ</sup>O  $R_{\text{free}}$  ορίζεται ως ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  για το 5 % των κρυσταλλογραφικών δεδομένων το οποίο επιλέγεται τυχαία και δε συμπεριλαμβάνεται στη βελτιστοποίηση.

Το μοντέλο αποτελείται από ένα μονομερές και 367 αμινοξέα σαφώς ορισμένα στο χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ . Εξετάζοντας την πρωτοταγή δομή της ενδογενούς πρωτεΐνης η οποία περιλαμβάνει 397 κατάλοιπα (μη προσμετρώντας την ουρά ιστιδινών), δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου που αντιστοιχεί στο σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης (18 αμινοξέα) καθώς πρόκειται για εξωκυτταρική πρωτεΐνη όπως και στην

ακολουθία 12 καταλοίπων που προηγούνται της Cys31. Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου που περιλαμβάνει τον επίτοπο του c-myc (αλληλουχία Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu που επιτρέπει την ανίχνευση της πρωτεΐνης από το αντίστοιχο αντίσωμα όταν αυτό κριθεί απαραίτητο) και των έξι κωδικονίων His (για την ανίχνευση και καθαρισμό με IMAC). Η έλλειψη κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X στα εν λόγω άκρα δύναται να αποδοθεί στην αποδιάταξη που διακρίνει αυτές τις περιοχές μη καταλαμβάνοντας σαφώς προσδιορισμένη θέση στο χώρο καθώς και στην έκθεσή τους στο διαλύτη μη συμμετέχοντας στην αναδίπλωση της *StGE2* και συνεπώς τα αμινοξέα που τις απαρτίζουν απαλείφθηκαν από τη δομή. Τέλος, παρά την πρόβλεψη του αλγόριθμου *NetOGlyc* v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc> [Steentoft *et al.*, 2013]) για πιθανές θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης, δεν παρατηρήθηκε πρόσθετη πυκνότητα που να υποδείκνυε γλυκοζυλίωση σε κανένα σημείο της δομής.

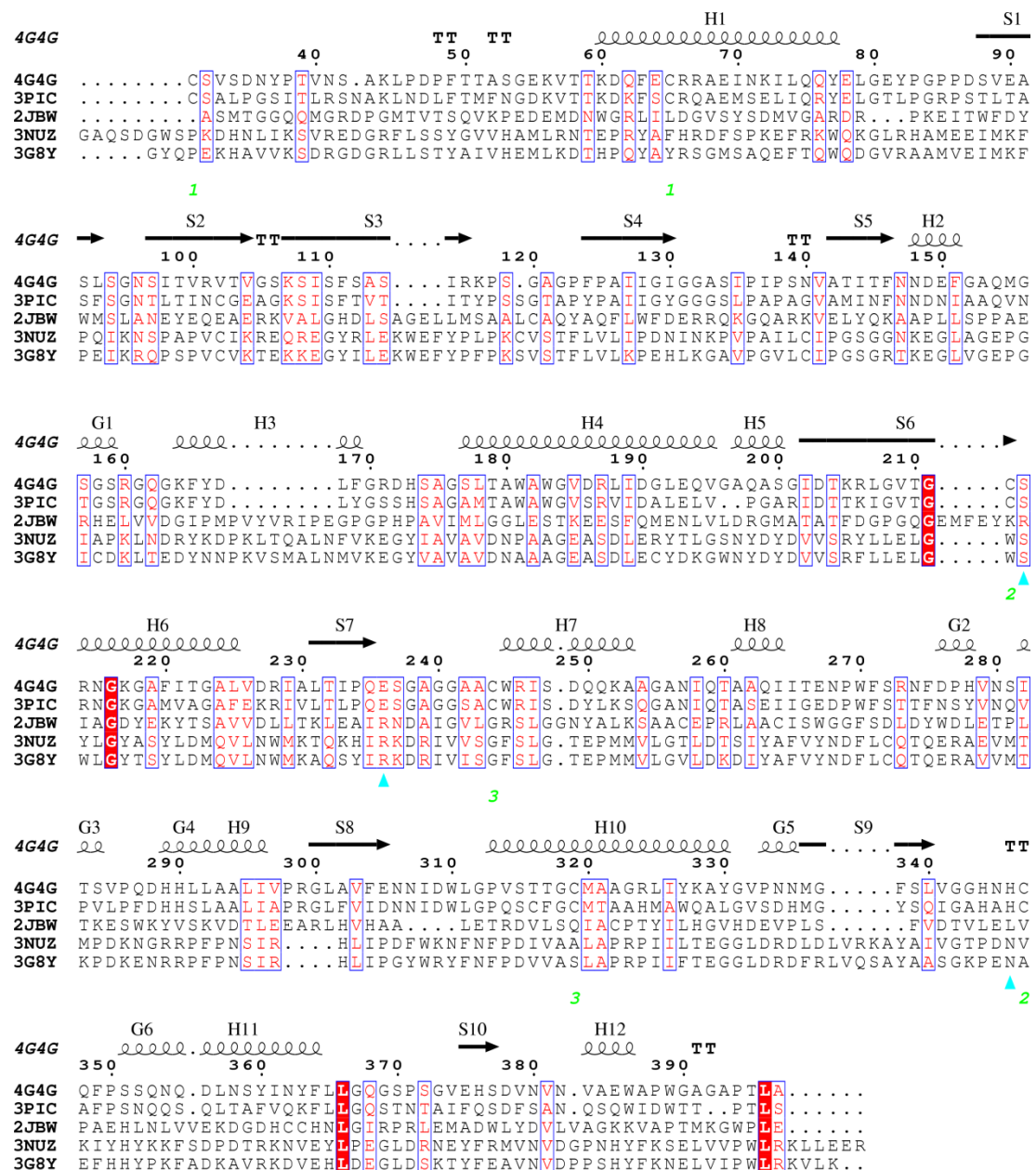
Με ανάλυση του μοντέλου με χρήση των προγραμμάτων *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010) και *PROCHECK* [Laskowski *et al.*, 1993] επαληθεύτηκε η αξιοπιστία του. Τα παραπάνω προγράμματα ελέγχουν λεπτομερώς τη στερεοχημική ποιότητα πρωτεϊνικών δομών σε επίπεδο ολόκληρης της δομής αλλά και στη γεωμετρία κάθε αμινοξικού κατάλοιπου, με βάση χωροταξικούς περιορισμούς που διέπουν τις πρωτεΐνες. Μεταξύ άλλων, ελέγχονται οι γωνίες και οι δίεδρες γωνίες (διάγραμμα Ramachandran [Ramachandran *et al.*, 1963]) μεταξύ γειτονικών ατόμων και οι αποστάσεις των δεσμών μεταξύ ατόμων. Η ανάλυση έδειξε ότι 96.4% των αμινοξέων άνηκαν σε ευνοϊκές περιοχές σύμφωνα με το διάγραμμα Ramachandran ενώ όλα τα αμινοξέα κατελάμβαναν επιτρεπτές περιοχές. Οι ατομικές συντεταγμένες και οι παράγοντες δομής της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου κατατέθηκαν στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (<http://www.pdb.org>) με κωδικό 4G4G.

### **3.4.4.ii Βιοπληροφορική ανάλυση της *StGE2* με βάση την πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή δομή**

Η συγκριτική ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλουχιών και δομών δύναται να διαδραματίσει έναν θεμελιώδη ρόλο στην αποσαφήνιση των χαρακτηριστικών και της λειτουργίας ενός ενζύμου. Για το λόγο αυτό, σε συνέχεια της βιοπληροφορικής ανάλυσης (§3.4.1), οι ατομικές συντεγμένες της τριδιάστατης δομής της *StGE2* (κωδικός PDB: 4G4G που περιελάμβανε μόνο τα αμινοξέα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που εμφανίζονται στην κρυσταλλική δομή) εισήχθησαν στον εξυπηρετητή *DALI* [Holm & Rosenstrom, 2010] ώστε να γίνει διερεύνηση δομικά ομόλογων πρωτεϊνών. Ο εξυπηρετητής *Dali* επιτρέπει τη σύγκριση της νέας τριτοταγούς δομής με δομές που διατίθενται στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB και σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί ο αλγόριθμος, το κριτήριο δομικής ομολογίας εκφράζεται από το Z-score. Ειδικότερα, τιμές Z-score μεγαλύτερες του 20 καταδεικνύουν σαφή ομολογία ενώ τιμές εύρους 8-20 υποδηλώνουν πιθανή ομολογία των υπό σύγκριση δομών.

Στο συγκριμένο πλαίσιο ανάλυσης της *StGE2* δομής, προέκυψε όπως ήταν αναμενόμενο ένα βέβαιο δομικό ομόλογο το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως αρχικό μοντέλο για την επίλυση της δομής, η *Cip2\_GE* (κωδικός PDB: 3PIC), η οποία παρουσιάζει και ομολογία στην αμινοξική ακολουθία του ενζύμου κατά 72%. Επιπροσθέτως, από την ανάλυση προέκυψε μεγάλος αριθμός δυνητικά δομικών ομόλογων πρωτεϊνών εκ των οποίων επιλέχθηκαν για αναλυτικότερη σύγκριση οι δύο πλησιέστερες και μία τρίτη διασταυρώνοντας το υψηλό Z-score με την ομολογία της αλληλουχίας του από [Altschul *et al.*, 1997] της *StGE2* ακολουθίας αμινοξέων σύμφωνα με τη δομή. Στο Σχήμα 3.4.1 παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας της *StGE2* σύμφωνα με τη δομή (κωδικός PDB: 4G4G) με τις 4 πλησιέστερες δομικά ομόλογες πρωτεΐνες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται μία χαρακτηρισμένη  $\alpha/\beta$  υδρολάση που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της νικοτίνης και η οποία αποτελεί και κατά 36% αλληλουχικό ομόλογο (Z-score: 16.2, κωδικός PDB: 2JBW [Schleberger *et al.*, 2007]), μία μη πλήρως χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη τύπου εστεράσης (κωδικός PDB: 3G8Y, Z-score: 18.8) και μία φερόμενη ως ακετυλο-εστεράση ξυλάνης (κωδικός PDB:

3NUZ, Z-score: 18.8). Στις υπό σύγκριση πρωτεΐνες (Σχήμα 3.4.1) είναι αξιοσημείωτη η παρουσία του συντηρημένου καταλοίπου Σερίνης (Ser213 στη δομή της *SrGE2*) που διαφαίνεται να κατέχει νευραλγικό ρόλο στο μηχανισμό κατάλυσης του ενζύμου με εξαίρεση τη 2JBW δομή όπου έχει αντικατασταθεί από Αργινίνη (αμινοξύ με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες).



**Σχήμα 3.4.1** Πολλαπλή στοίχιση *SrGE2* αλληλουχίας σύμφωνα με τη δομή (κωδικός PDB: 4G4G) με τα πλησιέστερα αλληλουχικά και δομικά ομόλογα: η Cip2\_GE (το πλησιέστερο ομόλογο τόσο βάσει της αλληλουχίας όσο και της δομής με 56% ταύτιση σε 97% κάλυψη αλληλουχίας και Z-score 59.1 αντίστοιχα, κωδικός PDB: 3PIC [Pokkuluri *et al.*, 2011]), η 2,6-

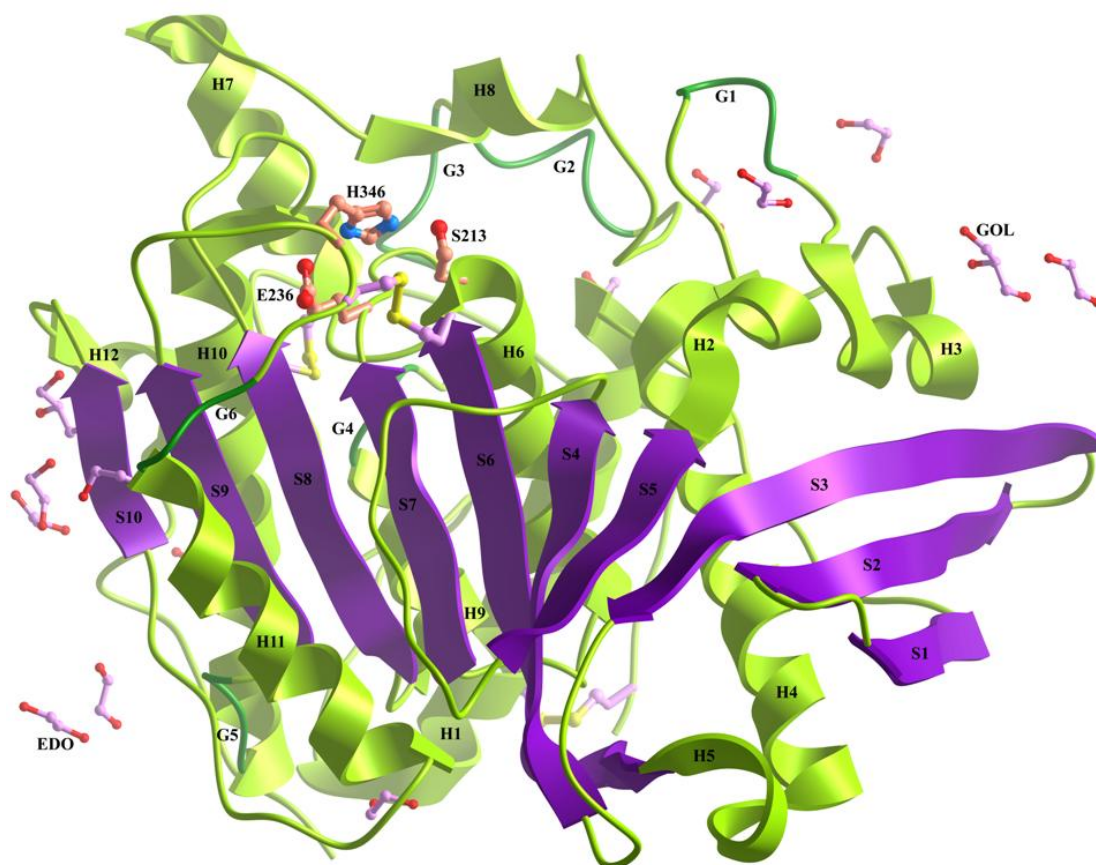
διυδροξυ-ψευδο-οξυνικοτινο υδρολάση (η πλησιέστερη σε επίπεδο αλληλουχίας ομόλογη πρωτεΐνη με 28% ταύτιση σε 37% κάλυψη αλληλουχίας που αποτελεί παράλληλα δομικό ομόλογο με Z-score 16.2, κωδικός PDB: 2JBW [Schleberger *et al.*, 2007]), μία φερόμενη ακέτυλο-εστεράση ξυλάνης (δομικά ομόλογη με Z-score 18.8, κωδικός PDB: 3NUZ, Joint centre for structural genomics, υπό δημοσίευση) και η SusD/RagB-συσχετιζόμενη πρωτεΐνη τύπου εστεράσης (δομικά ομόλογη με Z-score 18.8, κωδικός PDB: 3G8Y, Joint centre for structural genomics, υπό δημοσίευση). Τα αμινοξέα που ταυτίζονται αναπαρίστανται με λευκό χρώμα σε κόκκινο φόντο ενώ αυτά που παρουσιάζουν ομοιότητα (ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά) με κόκκινο χρώμα σε λευκό φόντο. Επίσης υποδεικνύονται στην ίδια γραμμή οι δισουλφιδικοί δεσμοί (αριθμοί με πράσινο χρώμα) και τα αμινοξέα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον συμμετέχοντας διαμορφώνοντας το καταλυτικό κέντρο της *StGE2* (τρίγωνα κυανού χρώματος). Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής ήτοι οι  $\alpha$ - και  $3_{10}$ -έλικες, τα  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα και οι  $\beta$ -στροφές συμβολίζονται ως H, G, S και TT αντίστοιχα.

### **3.4.4.iii Δομικά χαρακτηριστικά της *StGE2***

Σύμφωνα με ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της *StGE2* (Εικόνα 3.4.7) και την ταξινόμηση αυτής βάσει της *CATH*, το ένζυμο ανήκει στην υπεροικογένεια των  $\alpha/\beta$  υδρολασών, είναι μια υδρολάση τύπου σερίνης και η αρχιτεκτονική του ακολουθεί την αναδίπλωση 3-επιπέδων  $\alpha\beta\alpha$  sandwich με τοπολογία διπλώματος Rossmann ενώ η πλησιέστερη ομολογία εμφανίζεται με τις δομικές αυτοτελείς περιοχές (domains) της οικογένειας των V-τύπου ATP συνθασών (Vacuolar type-κενοτόπιο/χυμοτόπιο, σύνθεση ATP μέσω άντλησης πρωτονίων και χρήση ADP). Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από την ανάλυση της *StGE2* αλληλουχίας (§ 3.4.1), που υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μοτίβου p-βρόχου το οποίο απαντάται σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δέσμευση ATP, δύνανται οι V-τύπου ATP συνθάσες να θεωρηθούν ως πρόγονος του ενζύμου.

Πιο αναλυτικά, η υπεροικογένεια των  $\alpha/\beta$  υδρολασών χαρακτηρίζεται από την «κανονική τρισδιάστατη αναδίπλωση» (canonical fold) η οποία αναφέρεται σε μία  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια οκτώ  $\beta$ -κλώνων στο κέντρο της τρισδιάστατης δομής που περιστοιχίζεται από δύο συστάδες  $\alpha$ -ελίκων (τέσσερις και δύο  $\alpha$ -έλικες εκατέρωθεν της επιφάνειας) [Ollis *et al.*, 1992]. Ωστόσο, η τρισδιάστατη δομή της *StGE2* παρουσιάζει αποκλίσεις από την «κανονική αναδίπλωση» της υπεροικογένειας. Ειδικότερα, η  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια διακρίνεται από μια προέκτασή κατά δύο αντιπαράλληλους  $\beta$ -κλώνους στο αμινοτελικό άκρο της ώστε να προκύπτει τελικά ένα στραμμένο  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο το οποίο

παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο στρώματα 18 συνολικά ελίκων (Εικόνα 3.4.7). Πιο συγκεκριμένα, στην «κανονική αναδίπλωση» συναντούμε στη μια πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας δύο α-έλικες αντίθετα με τη δομή της *SrGE2* που καταγράφονται οκτώ α- και δύο  $3_{10}$ -έλικες ενώ στην άλλη πλευρά οι αναμενόμενες τέσσερις α-έλικες έχουν αντικατασταθεί από μια οκτάδα α- και  $3_{10}$ -ελίκων ίσα μοιρασμένων. Παράλληλα, οι θέσεις δύο εκ των καταλοίπων της καταλυτικής τριάδας, ήτοι η Σερίνη213 (Ser213) και το Γλουταμινικό οξύ236 (Glu236) συμβαδίζουν με το μοτίβο που προτείνεται από την «κανονική αναδίπλωση».



**Εικόνα 3.4.7** Απεικόνιση της συνολικής τρισδιάστατης δομής της *SrGE2* όπως προσδιορίστηκε σε υψηλή ευκρίνεια 1.55 Å. Η στραμμένη β-πτυχωτή επιφάνεια στο κέντρο της δομής (βιολετί, με επισήμανση S για τους β-κλώνους που την απαρτίζουν) περιστοιχίζεται από δύο στρώματα α-ελίκων (ανοιχτό πράσινο, με επισήμανση H) και  $3_{10}$  ελίκων (σκούρο πράσινο, με επισήμανση G). Τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (S213, E236, H346) υποδεικνύονται με αναπαράσταση σφαίρας – ράβδου (πορτοκαλί) καθώς και οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί (ροζ). Η αναπαράσταση έγινε με το πρόγραμμα *MolSoft* [Raush *et al.*, 2009].

Μέσω του αλγορίθμου *PROMOTIF* [Hutchinson & Thornton, 1996] όπως εφαρμόζεται από το βοηθητικό πρόγραμμα *PDBsum* του εξυπηρετητή EBI (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>) [Laskowski *et al.*, 1997] έγινε η ανάλυση και ανάθεση της δευτεροταγούς δομής της *StGE2* σύμφωνα με τις ατομικές συντεταγμένες της δομής. Αναλυτικά, η οργάνωση της δευτεροταγούς δομής (Πίνακας 3.4.4) περιλαμβάνει:

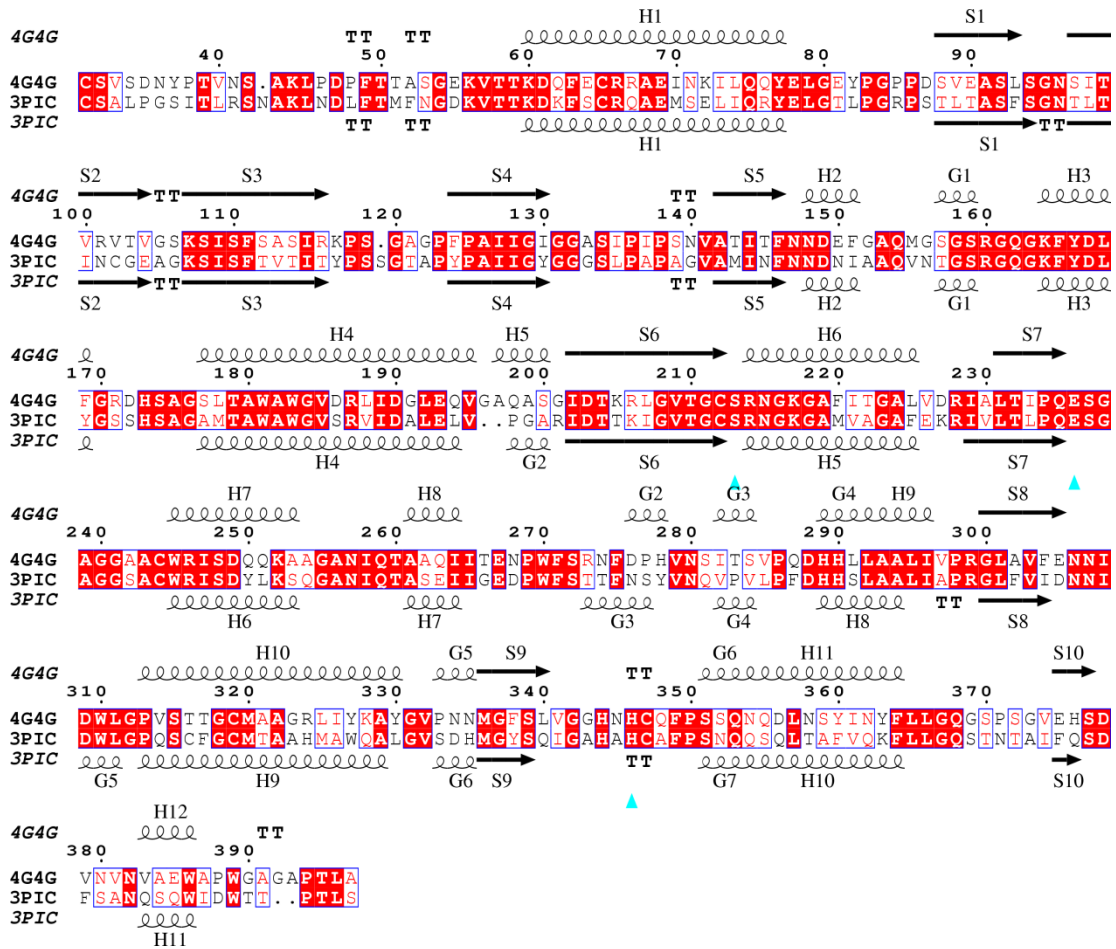
- ✓ τη β-πτυχωτή επιφάνεια (μικτή) 10 β-κλώνων (8 παράλληλα και 2 αντιπαράλληλα συνεργώντας στη διαμόρφωση στραμμένου πτυχωτού φύλλου),
- ✓ 4 δομικές αυτοτελείς περιοχές β-α-β (2 παράλληλοι β-κλώνοι που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και ενώνονται με βρόχο που περιέχει έστω μία α-έλικα),
- ✓ μοτίβα β-φουρκέτας (2 γειτονικοί β-κλώνοι αντιπαράλληλοι που σχηματίζουν υδρογονικούς δεσμούς),
- ✓ ένα σπάνια απαντώμενο μοτίβο ψ-βρόχου (2 αντιπαράλληλοι β-κλώνοι με ένα β-κλώνο ανάμεσά τους ο οποίος σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου εκατέρωθεν και δεν είναι εύκολα πιθανός ο σχηματισμός του κατά την πρωτεϊνική αναδίπλωση [Hutchinson *et al.* 1990],
- ✓ 2 μοτίβα β-διόγκωσης (περιοχή ανωμαλίας σε ένα β-πτυχωτό φύλλο όπου υπεισέρχεται ένα ή μέχρι τρία αμινοξέα διαταράσσοντας το κανονικό σχηματισμό υδρογονικών δεσμών ανάμεσα στους β-κλώνους),
- ✓ 12 α-έλικες (3.6 αμινοξέα/περιστροφή) και 6  $3_{10}$ -έλικες (3 αμινοξέα/περιστροφή),
- ✓ 17 αλληλεπιδράσεις έλικας-έλικας (α-έλικες),
- ✓ 31 β-στροφές (αλλαγή κατεύθυνσης πολυπεπτιδικής αλυσίδας όπου το αμινοξύ *i* σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το *i*+3 αμινοξύ),
- ✓ 5 γ-στροφές (το αμινοξύ *i* σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το *i*+2 αμινοξύ) και
- ✓ 3 δισουλφιδικούς δεσμούς.



**Πίνακας 3.4.4** Ταυτοποίηση και σύγκριση δευτεροταγών δομών *StGE2* και *Cip2\_GE* από τον αλγόριθμο του *PROMOTIF* [Hutchinson & Thornton, 1996].

<i>Promotif</i>	<i>StGE2</i>	<i>Cip2_GE</i>
β-πτυχωτή επιφάνεια	1	1
Δομικές επικράτειες β-α-β	4	4
Μοτίβα β-φουρκέτας (β-hairpin)	2	2
Μοτίβο ψ-βρόχου (psi-loop)	1	1
Μοτίβα β-διογκώσης (β-bulges)	2	3
β-κλώνοι	10	10
α-έλικες	12	11
3 <sub>10</sub> -έλικες	6	7
Αλληλεπιδράσεις έλικας-έλικας	17	21
β-στροφές	31	22
γ-στροφές	5	4
Δισουλφιδικοί δεσμοί	3	3

Στον Πίνακα 3.4.4 παρουσιάζεται η σύγκριση των χαρακτηριστικών δευτεροταγούς δομής της *StGE2* και της μόνης άλλης διαθέσιμης δομής εστεράσης του γλυκουρονικού οξέος, *Cip2\_GE* χωρίς να εντοπίζονται αξιοσημείωτες διαφορές στα μοτίβα με εξαίρεση τον αριθμό β-στροφών και την κατανομή των ελίκων σε α- και 3<sub>10</sub>-έλικες. Η δομή της GE και στις δύο τρισδιάστατες δομές σταθεροποιείται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και ειδικότερα ανάμεσα στα κατάλοιπα Κυστεΐνης των Cys31-Cys65, Cys212-Cys347 και Cys244-Cys319. Στο Σχήμα 3.4.2 απεικονίζεται η στοίχιση *StGE2* αλληλουχίας σύμφωνα με τη δομή (κωδικός PDB: 4G4G) με την *Cip2\_GE* (κωδικός PDB: 3PIC) καθώς και η αντιστοίχιση των στοιχείων που συνθέτουν τη δευτεροταγή δομή τους κατά μήκος της ακολουθίας των αμινοξέων.



**Σχήμα 3.4.2** Στοιχισή αλληλουχίας της *StGE2* με τη *Cip2\_GE*. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής: α- και 3<sub>10</sub>-έλικες, οι β-κλώνοι και οι β-στροφές επισημαίνονται ως H, G, S και TT, αντίστοιχα. Τα αμινοξέα που ταυτίζονται αναπαρίστανται με λευκό χρώμα σε κόκκινο φόντο ενώ αυτά που παρουσιάζουν ομοιότητα (ως προς τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά) με κόκκινο χρώμα σε λευκό φόντο. Επίσης υποδεικνύονται τα αμινοξέα που αποτελούν την καταλυτική τριάδα (τρίγωνα κυανού χρώματος).

Όσον αφορά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ο όρος της καταλυτικής τριάδας δύναται να αποδοθεί στα αμινοξέα Σερίνη213, Γλουταμινικό οξύ236 και Ιστιδίνη346 (Ser213, Glu236 και His346) καθώς η αρχιτεκτονική τους συμβαδίζει με αυτήν που προτείνεται από τον καταλυτικό μηχανισμό των α/β υδρολασών. Πιο αναλυτικά, η Ser213 αποτελεί μια πυρηνόφιλη Σερίνη που εντοπίζεται ανάμεσα στο β-κλώνο S6 και στην α-έλικα H6 σχηματίζοντας τον επονομαζόμενο «πυρηνόφιλο ώμο» (“nucleophilic elbow”) ώστε να διακρίνεται συνήθως από τιμές διεδρων γωνιών σε μη ευνοϊκές περιοχές βάσει των περιορισμών του διαγράμματος Ramachandran [Ollis *et al.*, 1992, Nardini &

Dijkstra, 1999, Quevillon-Cheruel *et al.*, 2005], οι οποίες ωστόσο στην περίπτωση της *SzGE2* βρίσκονται σε επιτρεπτές αν και όχι ευνοϊκές περιοχές. Πιθανώς αυτό μπορεί να αποδοθεί στις τοπικές αλληλεπιδράσεις κατά την πυρηνόφιλη προσβολή της Ser213 η οποίες θα αντιστάθμιζαν το ενεργειακό κόστος που απαιτείται για υιοθέτηση μη ευνοϊκών διαμορφώσεων των ψ και φ δίδρων γωνιών λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Στη συνέχεια, η His346 «γεφυρώνει» τον κλώνο S9 και την  $3_{10}$ -έλικα G6 εν δυνάμει δρώντας ως αμφολύτης (οξύ/βάση) συμπληρώνοντας μ'αυτόν τον τρόπο τη φύση του υποστρώματος κατά την πρόσδεσή του, ενώ το Glu236 ανάμεσα στον κλώνο S7 και την α-έλικα H7 φέρεται να ρυθμίζει το βασικό χαρακτήρα της His346 [Correia *et al.*, 2008]. Η εντοπισμένη θέση και οργάνωση της καταλυτικής τριάδας καθορίζεται από το συμπαγές δίκτυο δεσμών υδρογόνου που εκδηλώνονται ανάμεσά τους. Η υδροξυλομάδα της Ser213 αλληλεπιδρά με το άτομο αζώτου NE2 (ονομασία ατόμου σύμφωνα με τις κατατεθειμένες ατομικές συντεταγμένες του 4G4G pdb) της His346, ενώ το άτομο οξυγόνου OE1 του Glu236 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο αζώτου ND1 (με αποστάσεις δεσμών 2.7 Å και 2.8 Å, αντίστοιχα).

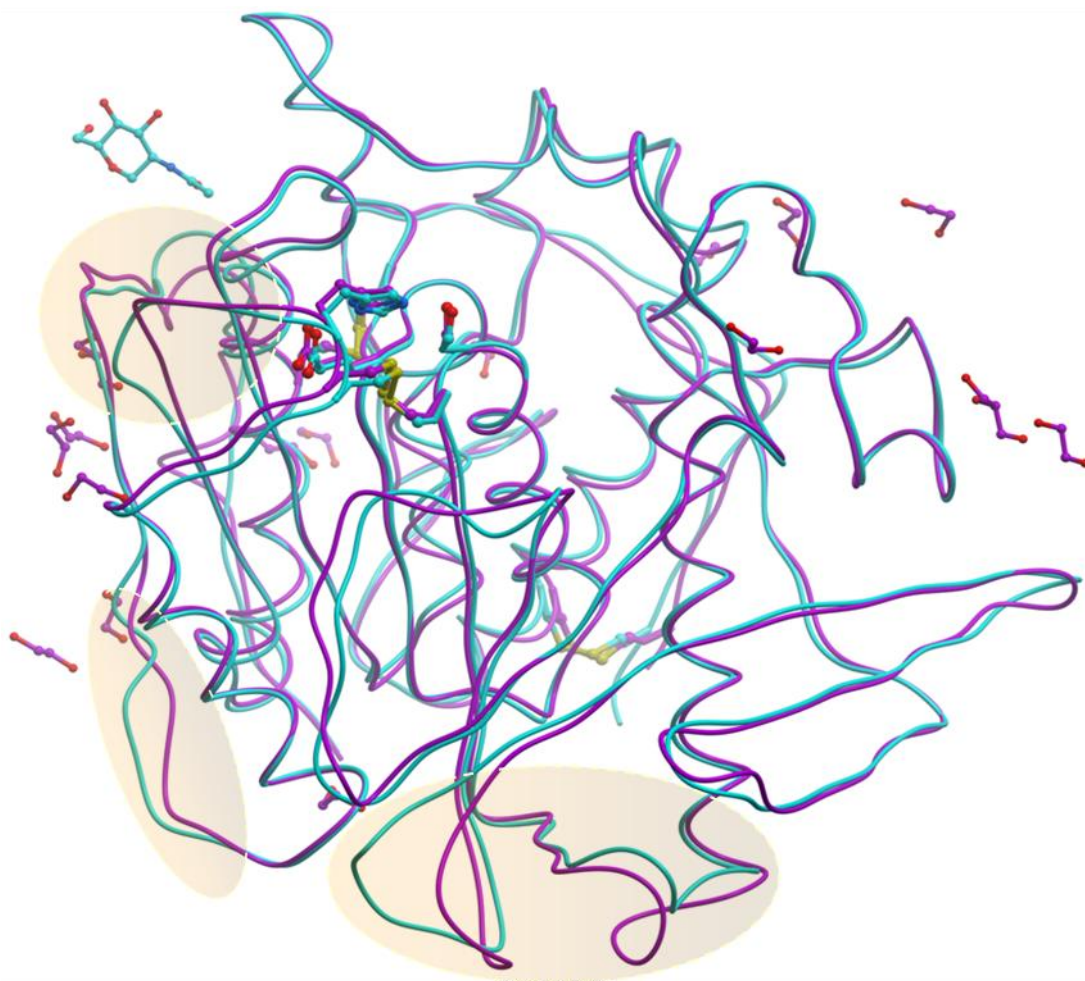
Εξάλλου, η κρυσταλλική δομή της *SzGE2* με ένα μόριο στην ασύμμετρη μονάδα ακολουθεί τη μονομερή μορφή που υιοθετεί η ενδογενής πρωτεΐνη σε διάλυμα όπως δείχνουν τα δεδομένα που προέκυψαν από χρωματογραφία μοριακής διήθησης της *SzGE1* που απομονώθηκε από το φυσικό οργανισμό στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών (Ε.Μ.Π.) από τη Δρ. Χριστίνα Βαφειάδη όπως περιγράφεται στην εργασία των Vafiadi *et al.*, 2009. Η ανάλυση των πρωτεϊνικών περιοχών διεπαφής με τη χρήση του διακομιστή *PDBe PISA* ([http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html)) [Krissinel & Henrick, 2007] καταδεικνύει την απουσία χαρακτηριστικών αλληλεπιδράσεων που συνεργούν στο σχηματισμό σταθερών τεταρτοταγών δομών. Τέλος, την τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή πλαισιώνουν συνολικά δεκατέσσερα μόρια αιθυλενογλυκόλης (από το διάλυμα κρυστάλλωσης) και δύο μόρια γλυκερόλης (από το διάλυμα κρυσταλλότητας που χρησιμοποιήθηκε).

#### 3.4.4.iv Σύγκριση της τριδιάστατης δομής της *StGE2* με τη δομικά ομόλογη *Cip2\_GE*

Η σύγκριση της *StGE2* με τη δομή της *Cip2\_GE*, της μόνης έτερης διαθέσιμης μέχρι σήμερα δομής μέλους της CE-15 οικογένειας, ανέδειξε ότι συνολικά οι δύο δομές είναι ομόλογες με 56% ταύτιση αλληλουχίας (σε κάλυψη αλληλουχίας 97% για τα αμινοξέα που περιλαμβάνονται στην κρυσταλλική δομή). Όπως προσδιορίστηκε από τον εξυπηρετητή *DALI* το Z-score ήταν 59 (§3.4.4.ii και Σχήμα 3.4.1) με μια τιμή μέσης τετραγωνικής απόκλισης (r.m.s.d.) (άτομα Ca) 1.1 Å για το μονομερές B της *Cip2\_GE*, το πλησιέστερο δομικό ομόλογο, η οποία αποτελείται από τρία μονομερή ανά μοναδιαία κυψελίδα.

Ωστόσο, η υπέρθεση των δύο κρυσταλλικών δομών επί των Ca με το πρόγραμμα *SUPERPOSE* [Winn *et al.*, 2011] κατέδειξε μία τιμή r.m.s.d. 3.5 Å υποδηλώνοντας τις παρατηρούμενες αλλαγές σε επιλεγμένα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής καθώς και στα αμινο- και καρβοξυ- τελικά άκρα. Η λεπτομερής σύγκριση των δύο δομών οδήγησε στον εντοπισμό διαφορών είτε σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής που συσχετίζονται με την προσθήκη/απαλοιφή καταλοίπων και συνεπώς επακόλουθες τροποποιήσεις στο δευτεροταγές επίπεδο δομής, είτε λόγω της παρουσίας/απουσίας θέσης γλυκοζυλίωσης, είτε τέλος λόγω του διαφορετικού τρόπου επιστοιβάσης των μονομερών στη μοναδιαία κυψελίδα. Πιο συγκεκριμένα, η εισαγωγή δύο καταλοίπων οδήγησε στο σχηματισμό μια α-έλικας (H5, αμινοξέα 197 - 200) αντί για μια  $3_{10}$ -έλικα στη *Cip2\_GE* δομή (Εικόνα 3.4.7, Σχήμα 3.4.2, Εικόνα 3.4.8). Παρόμοιες δομικές αλλαγές καταγράφονται για τα αμινοξέα 276-278 τα οποία σχηματίζουν μια  $3_{10}$ -έλικα (G2) μικρότερη σε μήκος από την αντίστοιχη στη *Cip2\_GE* δομή. Επίσης, στα αμινοξέα 289-292 τα οποία συνθέτουν μία  $3_{10}$ - (G4) και μία α-έλικα (H9) έναντι μίας μόνο α-έλικας στη *Cip2\_GE* καθώς και στα κατάλοιπα 309-311 που οριοθετούν ένα βρόχο ενώ στη *Cip2\_GE* μια  $3_{10}$ -έλικα. Όλες οι προαναφερθείσες αλλαγές παρατηρούνται στη διεπιφάνεια των μονομερών όπου εκδηλώνονται αλληλεπιδράσεις με συμμετρικά μόρια εντός της μοναδιαίας κυψελίδας. Από αυτές, η τελευταία τροποποίηση που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 309-311 θεωρείται πιο αξιοσημείωτη αφού εντοπίζεται στην ευρύτερη περιοχή πλησίον του καταλυτικού κέντρου της *StGE2* και συνοδεύεται από διαφοροποίηση στον

αριθμό των αμινοξέων που διαμορφώνουν των κλώνο S9 (κατάλοιπα 336-340) με ένα επιπλέον κατάλοιπο ώστε να υιοθετεί μια πιο εκτενή διαμόρφωση σε σύγκριση με τον αντίστοιχο κλώνο στη Cip2\_GE (Σχήμα 3.4.2, Εικόνα 3.4.8). Τα κατάλοιπα που έπονται συνθέτουν ένα μοτίβο απότομης στροφής που φέρει το αμινοξύ της καταλυτικής τριάδας His346 (πιο αναλυτικός σχολιασμός στην §3.4.7.iii).



**Εικόνα 3.4.8** Υπέρθωση των κρυσταλλικών δομών (με αναπαράσταση κορδονιού) της Sige2 (μωβ) και της Cip2\_GE (γαλάζιο). Η καταλυτική τριάδα αμινοξέων υποδεικνύεται και στις δύο δομές με αναπαράσταση σφαίρας-ράβδου και ακολουθούν το χρωματισμό κάθε δομής αντίστοιχα. Με αναπαράσταση σφαίρας-ράβδου υποδεικνύονται και τα μόρια αιθυλενογλυκολών και γλυκερόλης που προσδένονται μη ειδικά στην Sige2 καθώς και το μόριο N-ακέτυλο γλυκοζαμίνης (πάνω αριστερά) στη θέση N-γλυκοζυλίωσης της Cip2\_GE. Επισημαίνονται, τέλος, οι δομικές περιοχές που εμφανίζουν τις πιο εκτεταμένες διαφοροποιήσεις.

Πρόσθετες σημαντικές αλλαγές που καταγράφονται, αποδίδονται σε μετατοπίσεις που επιβάλλονται από διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των Cip2\_GE μονομερών με 3 μόρια στην ασύμμετρη μονάδα της, καθώς και σε αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με συμμετρικά μόρια και υπαγορεύονται από τη διευθέτηση των μορίων στον κρύσταλλο όπως στην περίπτωση των αμινο- και καρβοξυ-τελικών άκρων [Pohkukuri *et al.*, 2011]. Επιπλέον, τα αμινοξέα που διαμορφώνουν την H12 α-έλικα και το βρόχο που προηγείται είναι έντονα διαφοροποιημένα σε σχέση με τη Cip2\_GE δομή καθώς το μοτίβο N-γλυκοζυλίωσης στην αλληλουχία (Asn-X-Ser) και το προσδεδεμένο στην Asn447 μόριο N-ακέτυλογλυκοζαμίνης είναι απόντα στην StGE2 (το αντίστοιχο μοτίβο αλληλουχίας στην StGE2 είναι Asn-X-Ala) (Εικόνα 3.4.8, §3.4.1).

#### ***3.4.4.v Σύγκριση της θερμόφιλης StGE2 με τη μεσόφιλη Cip2\_GE - Διερεύνηση ενδείξεων θερμοσταθερότητας που απορρέουν από τη δομή***

Πρότερες μελέτες της σταθερότητας της StGE2 βάσει της θερμοκρασίας υπέδειξαν ότι το ένζυμο παραμένει ενεργό για τουλάχιστον 24 h στους 50°C ενώ διατηρεί περισσότερο από 70% της ενεργότητάς του στους 60-70°C ενώ επιδεικνύει χρόνο ημιζωής 22 h στους 55°C και 0.5 h στους 60°C [Topakas *et al.*, 2010]. Αντίθετα, η Cip2\_GE από το μεσόφιλο μύκητα *Hypocrea jecorina* εμφανίζει κάποια σταθερότητα στους 40 °C ενώ ο χρόνος ημιζωής της στους 50°C και 60°C είναι μόνο 10 min και 2 min, αντίστοιχα [Li *et al.*, 2007]. Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, έγινε μια συγκριτική αναλύση της θερμόφιλης StGE2 και του μεσόφιλου ομολόγου της Cip2\_GE βάσει των τρισδιάστατων δομών τους ώστε να καταγραφούν διαφορές στα δομικά χαρακτηριστικά τους που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη θερμοσταθερότητά τους. Ωστόσο, η αξιολόγηση της πρωτεϊνικής θερμοσταθερότητας βασίζεται σε ποικίλες τυπικές ενδείξεις.

Πρωταρχικά, σε επίπεδο αλληλουχίας εξετάστηκε ο αριθμός Προλινών (Pro) που συμμετέχουν στη σύσταση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας προσμετρώντας

τις επιτρεπτές διαμορφώσεις και τους περιορισμούς που αυτές επιβάλλουν στο αμινιξύ που προηγείται [Prajapati *et al.*, 2007]. Η βασική δομή της *SzGE2* περιλαμβάνει 22 κατάλοιπα Προλίνης έναντι 17 της *Cip2\_GE*. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε ο αριθμός των θερμοευαίσθητων αμινοξέων όπως η Μεθειονίνη, Κυστεΐνη, Ασπαραγίνη και Γλουταμίνη τα οποία στην *SzGE2* είναι 48 έναντι 54 της *Cip2\_GE* γεγονός που συμβαδίζει με την πλειοψηφία των βιβλιογραφικών δεδομένων κατά τη σύγκριση των θερμοφίλων πρωτεϊνών με τα μεσόφιλα ομόλογά τους [Kumar *et al.*, 2000]. Παράλληλα, ο λόγος του αριθμού Αργινινών προς το άθροισμα Αργινινών και Λυσινών στη δομή, Arg/(Arg+Lys), αποτελεί έναν ακόμα δείκτη [Mrabet *et al.*, 1992] που επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση της *SzGE2* που διαθέτει υψηλότερο λόγο Arg/(Arg+Lys) σε σύγκριση με τη *Cip2\_GE* (0.56 έναντι 0.5, αντίστοιχα). Ομοίως, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβάνονται στα δομικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά σε θερμοσταθερές πρωτεΐνες. Ωστόσο, μέσω του διακομιστή ESBRI [Costantini *et al.*, 2008] καθώς και του προγράμματος *CaPTURE* [Gallivan & Dougherty, 1999] διαπιστώθηκε ότι και οι δύο δομές των *SzGE2* και *Cip2\_GE* διακρίνονται από τον ίδιο αριθμό γεφυρών άλατος (συνδυαστικός τύπος υδρογονικού δεσμού και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων: RCOO<sup>-</sup> Ασπαρτικού ή Γλουταμινικού οξέος με RNH<sub>3</sub><sup>+</sup> Λυσίνης ή Αργινίνης) και δεσμών κατιόντος-π (κυρίως ηλεκτροστατικός χαρακτήρας αλληλεπίδρασης: αρνητικά φορτισμένο δυναμικό πλευρικών αλυσίδων αρωματικών αμινοξέων όπως Φαινυλαλανίνη, Τυροσίνη και Τρυπτοφάνη με κατιόντα πλευρικών αλυσίδων Λυσίνης ή Αργινίνης).

### **3.4.5 Ανάπτυξη κρυστάλλων S213A *SzGE2* και δομικές μελέτες πρόσδεσης**

Με στόχο τη διαλεύκανση του λειτουργικού ρόλου της *SzGE2* καθώς και την εν δυνάμει καθοριστική σημασία της πυρηνόφιλης Σερίνης στην αναγνώριση υποστρωμάτων και καταλυτικό μηχανισμό, έλαβε χώρα σημειακή μετάλλαξη της Ser213 προς Ala213 σύμφωνα με την εργασία των Torakas *et al.*, 2010. Στο

πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τη συγκεκριμένη εργασία για τον μετασχηματισμό *E. coli* TOPIOF' κυττάρων και έπειτα των *P. pastoris* κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση. Ακολούθησε η παραγωγή του ενζύμου με το ετερόλογο σύστημα έκφρασης *P. pastoris* και στη συνέχεια η απομόνωση και ο καθαρισμός με τη χρήση IMAC ( $\text{Co}^{2+}$ ). Η σημειακά μεταλλαγμένη πρωτεΐνη παρουσίασε ολική απώλεια ενεργότητας ως προς το συνθετικό υπόστρωμα 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικός μεθυλεστέρας [Torakas *et al.*, 2010] (§2.2.1, Πίνακας 3.4.1). Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε 12.5% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου έδειξε και σ' αυτήν την περίπτωση υψηλή καθαρότητα της πρωτεΐνης με μία πρωτεϊνική ζώνη MB 43 kDa ώστε η S213A *SzGE2* να θεωρηθεί κατάλληλη για πειράματα κρυστάλλωσης.

Μετά τη συμπύκνωση της καθαρής πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 20 mg/ml και Tris-HCl 20mM pH 8.0 ακολούθησαν δοκιμασίες κρυστάλλωσης τόσο στις ίδιες συνθήκες με αυτές που προσδιορίστηκαν για την *SzGE2* όσο και με τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων. Ομοίως, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθημερινή σταγόνα και χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης ενώ η πρωτεϊνική συγκέντρωση στη σταγόνα ήταν 10 mg/ml με ανάμιξη ίσου όγκου διαλύματος κρυστάλλωσης και εξισορρόπηση έναντι 50  $\mu\text{L}$  μητρικού διαλύματος στους 16° C. Η κρυστάλλωση της S213A έγινε εφικτή σε χρόνο μιας εβδομάδας, σε διαφορετικές της *SzGE2* συνθήκες, με χρήση του σκευάσματος PEGs Suite και όγκο σταγόνας 1  $\mu\text{L}$ . Οι κρύσταλλοι ήταν μεσαίου μεγέθους ~ 30 x 30 x 90  $\mu\text{m}$  και αναπτύχθηκαν παρουσία 0.1M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH 4.6 και PEG550 MME 25% (v/v) (Εικόνα 3.4.9).



**Εικόνα 3.4.9** Ο S213A μονοκρύσταλλος που εκτέθηκε στην ακτινοβολία συμβατικής πηγής ακτίνων X στο IBΦXB (ΕΙΕ) και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κρυστάλλωσης 0.1M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH 4.6 και PEG550 MME 25% (v/v).

Η περαιτέρω αποσαφήνιση των σχέσεων δομής – λειτουργίας, όπως και στην περίπτωση της *SzGE2*, απαιτούσε μελέτες πρόσδεσης που περιελάμβαναν πειράματα συγκρυστάλλωσης παρουσία των αναλόγων υποστρώματος 4-*O*

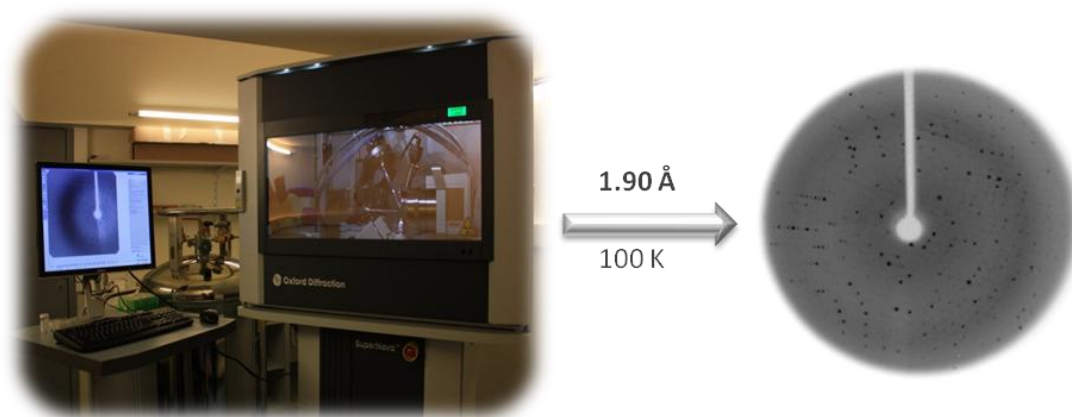


μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα, βενζυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος, μεθυλεστέρα του D-γλυκουρονικού οξέος συγκεντρώσεων 0.25 mM, 0.5 mM, 2.5 mM και 5 mM στο μητρικό διάλυμα κρυσταλλογένεσης (§3.4.2.iii, Πίνακας 3.4.1 και §2.2.1). Επιπρόσθετα, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία και για τη διερεύνηση του ρόλου του μοτίβου P-βρόχου χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις ATP, ADP, άλας νατρίου του β-NADP και άλας νατρίου της 6-G-P συγκεντρώσεως 10 mM σε έναν πρόσθετο κύκλο πειραμάτων συγκρυστάλλωσης. Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν οδήγησε σε ανάπτυξη ευμεγεθών εν δυνάμει συγκρυστάλλων. Τέλος, επαναλήφθηκαν δοκιμασίες εμφάπτισης προσχηματισμένων S213A μονοκρυστάλλων στα παραπάνω διαλύματα με την γνωστή πειραματική διαδικασία.

### 3.4.6 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων μονοκρυστάλλου S213A και κρυστάλλου εμφάπτισμένου σε διάλυμα αναλόγου υποστρώματος

Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων για μονοκρύσταλλο S213A έγινε μετά την εμφάπτισή του στο διάλυμα κρυστάλλωσης παρουσία 15% (v/v) γλυκερόλης ως κρυστοπροστατευτικού. Στη συνέχεια, με κατάλληλο βρόχο ινών ο κρύσταλλος εκτέθηκε στην ακτινοβολία της συμβατικής πηγής ακτινών X SuperNova diffractometer (Oxford Diffraction, Agilent Technologies, ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ) στους 100 K. Το πρόγραμμα *CrysAlis<sup>Pro</sup>* Software system (Agilent, 2011) χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση αυτή για τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων σε υψηλή ευκρίνεια 1.9 Å. Συνολικά συλλέχθηκαν 210 περιθλασιγράμματα (Εικόνα 3.4.10) με εύρος περιστροφής 0.5° και χρόνο έκθεσης στις ακτίνες X ( $\lambda=1.5418$  Å) τα 180 sec. Η ανάλυση και ο προκαταρκτικός χαρακτηρισμός έγινε με το πρόγραμμα *SCALA* [Evans, 2006] κατατάσσοντας τον S213A κρύσταλλο στην  $P2_12_1$  ομάδα χώρου συμμετρίας με διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας  $a=52.0$  Å,  $b=69.6$  Å και  $c=103.8$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  και ένα μόριο στην ασύμμετρη μονάδα. Σε σύγκριση με την ομάδα χώρου συμμετρίας

της S<sub>t</sub>GE2, αν και ο S213A κρύσταλλος άνηκε επίσης στο ορθορομβικό πλέγμα ωστόσο εμφάνισε απώλεια ενός εκ των τριών δυαδικών αξόνων συμμετρίας.



**Εικόνα 3.4.10** Η πηγή ακτίνων X SuperNova diffractometer (Oxford Diffraction, Agilent Technologies) που χρησιμοποιήθηκε και βρίσκεται εγκατεστημένη στο ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ και το αντίστοιχο περιθλασίγραμμα που συλλέχθηκε από την έκθεση μονοκρυστάλλου S213A στις ακτίνες X.

Ακολούθησε εκλεκτική έκθεση στην ακτινοβολία της συμβατικής πηγής ακτίνων X (ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ), με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε, όλων των S213A κρυστάλλων για τους οποίους δεν είχε επέλθει διαλυτοποίηση ή πλήρη αλλοίωση του κρυσταλλικού τους πλέγματος μετά την εμφάνισή τους στα ποικίλα διαλύματα αναλόγων υποστρώματος και εν δυνάμει προσδετών (§3.4.5.ii). Ωστόσο, πλήρη κρυσταλλογραφικά δεδομένα ευκρίνειας 2.35 Å συλλέχθηκαν μόνο στην περίπτωση μονοκρυστάλλου S213A εμποτισμένου 1 h με μητρικό διάλυμα κρυστάλλωσης παρουσία 4-Ο-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα συγκέντρωσης 5 mM (Πίνακας 3.4.1, Σχήμα 3.4.3.α), §3.4.2.iii) ενώ μεγαλύτεροι χρόνοι εμφάνισης καθιστούσαν ανέφικτη τη συλλογή δεδομένων. Το ένζυμο είχε παρουσιάσει συγγένεια για το συγκεκριμένο υπόστρωμα ενώ η σημειακή μετάλλαξη S213A επέφερε απώλεια της δραστηριότητας της σύμφωνα με την εργασία των Torakas *et al.*, 2010.

**Πίνακας 3.4.5** Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έκθεση των S213A κρυστάλλων στην ακτινοβολία της συμβατικής πηγής ακτίνων Χ.

Πείραμα	S213A	Σύμπλοκο S213A - MCU
Σταθμός	Συμβατική πηγή SuperNova, Agilent Technologies, IBΦXB, EIE	Συμβατική πηγή SuperNova, Agilent Technologies, IBΦXB, EIE
Μήκος κύματος (Å)	1.5418	1.5418
Αρ. περιθλασιγραμμάτων	210	184
(εύρος περιστροφής ανά περιθλασίγραμμα)	(0.5°)	(0.5°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	$P2_12_1$	$P2_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a= 52.0, b= 69.6, c= 103.8	a= 52.1, b= 69.8, c= 103.9
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1	1
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	97087	50703
(εξωτερική στοιβάδα)	(8291)	(6741)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	30113	15099
(εξωτερική στοιβάδα)	(4161)	(2119)
Ευκρίνεια (Å)	13.97 - 1.90	13.48 - 2.35
Πληρότητα δεδομένων	99.0	92.8
(εξωτερική στοιβάδα) (%)	(95.6)	(90.4)
$\alpha R_m$	0.080	0.110
(εξωτερική στοιβάδα)	(0.210)	(0.150) 1.5418
$\beta < (I / \sigma(I)) >$	11.4	7.7
(εξωτερική στοιβάδα)	(3.0)	(5.3)
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.00 - 1.90	2.48 - 2.35

Πολλαπλότητα	3.2	3.4
(εξωτερική στοιβάδα)	(2.0)	(3.2)
B-factor (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	8.5	14.8

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_h$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i$ -οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση  $h$ , αντίστοιχα.

<sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση του  $I$ .

Η ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε ότι ο κρύσταλλος του συμπλόκου – αναλόγου υποστρώματος παρέμεινε ισόμορφος ως προς το μη συμπλοκοποιημένο S213A κρύσταλλο, με διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας  $a=52.1 \text{ \AA}$ ,  $b=69.8 \text{ \AA}$  και  $c=103.9 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Στον Πίνακα 3.4.5 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων και για τους δύο S213A, συμπλοκοποιημένο και μη.

### 3.4.7 Οι τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές των S213A και συμπλόκου S213A - ανάλογο υποστρώματος

#### 3.4.7.i Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομών

Με αρχικό μοντέλο την κρυσταλλική δομή της S<sub>t</sub>GE2 (§3.4.4) και χρήση της μεθόδου μοριακής αντικατάστασης, όπως περιγράφηκε, προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή της μεταλλαγμένης S213A από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν. Ακολούθησαν κύκλοι ιστροπικής βελτιστοποίησης των παραγόντων θερμοκρασίας (λόγω χαμηλότερης ευκρίνειας από την S<sub>t</sub>GE2 δομή, §3.4.4.i) για τα πειραματικά δεδομένα ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο που περιγράφηκε ώστε να προκύψει το τελικό πρωτεϊνικό μοντέλο. Στα τελικά στάδια βελτιστοποίησης, οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  και  $F_{obs}-F_{calc}$  υπέδειξαν την ενσωμάτωση 8 μορίων αιθυλενογλυκόλης και 3 μορίων γλυκερόλης. Η τρισδιάστατη δομή της S213A βελτιστοποιήθηκε σε τελικό κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας  $R$  ίσο

με 0.169 ενώ ο δείκτης αξιοπιστίας  $R_{free}$  ήταν 0.208. Πιο συγκεκριμένα, τα στατιστικά στοιχεία βελτιστοποίησης συνοψίζονται στον Πίνακα 3.4.6.

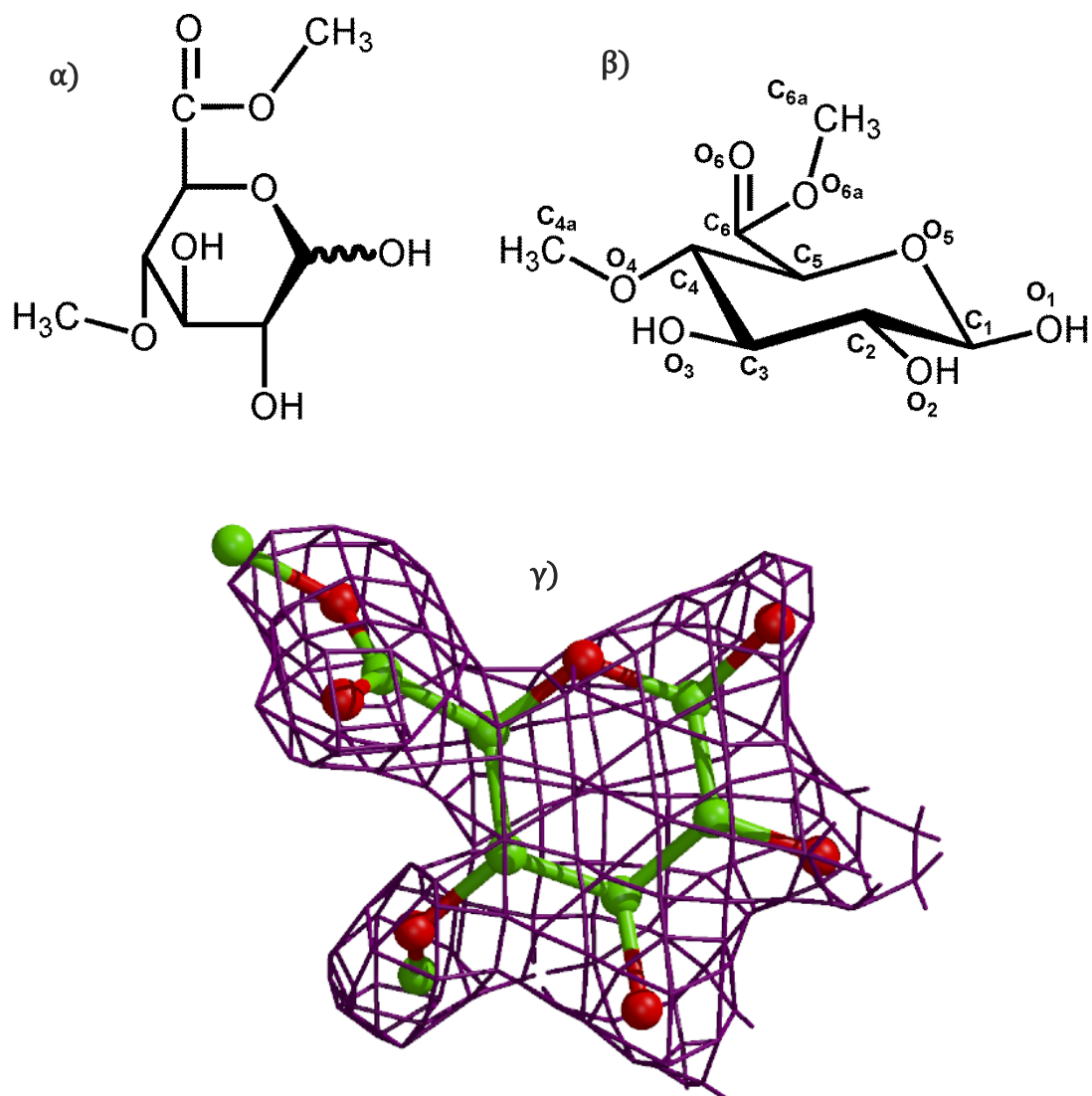
Παρόμοια, η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου S213A με το συνθετικό ανάλογο υποστρώματος 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα (Σχήμα 3.4.3.α), MCU, ονομασία σύμφωνα με τις κατατεθειμένες ατομικές συντεταγμένες στη βάση δεδομένων PDB), προσδιορίστηκε αξιοποιώντας ως αρχικό μοντέλο για τον προσδιορισμό των φάσεων από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, τη δομή της μεταλλαγμένης S213A. Κατόπιν εφαρμογής του πρωτοκόλλου ισοτροπικής βελτιστοποίησης και ανακατασκευής του μοντέλου όπως περιγράφηκε, στα τελικά στάδια οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  και  $F_{obs}-F_{calc}$  κατέστησαν εμφανή την παρουσία πρόσθετης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην περιοχή που οριοθετείται από την καταλυτική τριάδα αμινοξέων του ενζύμου γεγονός που κατέδειξε την πρόσδεση του β-ανωμερούς του MCU (Σχήμα 3.4.3.β). Το μοντέλο του MCU προσαρμόστηκε στην περιοχή πρόσδεσης όπως αυτή καθοριζόταν από τους χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από εφαρμογή επιτρεπών τροποποιήσεων των γωνιών στρέψης του μέσω του προγράμματος *PRODRG* (<http://davarc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrgr/>). Η δομή του συμπλόκου υποβλήθηκε σε περαιτέρω βελτιστοποίηση μετά την ενσωμάτωση του MCU (Σχήμα 3.4.3.γ) και στα τελικά στάδια συμπεριλήφθηκαν 20 μόρια αιθυλενογλυκόλης και 2 μόρια γλυκερόλης στο μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας  $R$  ίσο με 0.186 ενώ ο δείκτης αξιοπιστίας  $R_{free}$  ήταν 0.245. Τα αναλυτικότερα στατιστικά στοιχεία βελτιστοποίησης και του μοντέλου του συμπλόκου παρατίθενται στον Πίνακα 3.4.6.

**Πίνακας 3.4.6** Στατιστικά στοιχεία βελτιστοποίησης και ποιότητας των μοντέλων της S213A και συμπλόκου S213A – ανάλογο υποστρώματος.

Ευκρίνεια τελικού σταδίου βελτιστοποίησης (Å)	13.97–1.90	13.48–2.35
Αριθμός περιθλάσεων	28557	14330
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν στη βελτιστοποίηση	29–397	29–397
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	2760	2736
Αριθμός ετεροατόμων		
μόρια ύδατος	437	212
αριθμός μορίων αιθυλενογλυκόλης	8	20
αριθμός μορίων γλυκερόλης	3	2
ανάλογο υποστρώματος (MCU)	-	1
$\delta R_{free}$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.208 (0.254)	0.245 (0.298)
$\gamma R$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.169 (0.212)	0.186 (0.230)
Μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d.)		
μήκους δεσμών (Å)	0.006	0.006
γωνίας δεσμών (°)	0.997	1.006
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας (Å <sup>2</sup> ) πρωτεϊνικών μορίων		
σύνολο δομής	7.6	8.7
ατόμων κύριας αλυσίδας (Ca, C, N, O)	7.5	8.7
ατόμων πλευρικής αλυσίδας	7.7	8.7
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα		
μόρια ύδατος	18	12.4
μόρια αιθυλενογλυκόλης	22.5	15.0
μόρια γλυκερόλης	19.9	16.6
ανάλογο υποστρώματος (MCU)	-	13.5

$\gamma O$  κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R$  ορίζεται:  $\sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων αντιστοίχως.

$\delta O$   $R_{free}$  ορίζεται ως ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  για το 5 % των κρυσταλλογραφικών δεδομένων το οποίο επιλέγεται τυχαία και δε συμπεριλαμβάνεται στη βελτιστοποίηση.



**Σχήμα 3.4.3** α) Συντακτικός τύπος του 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα (MCU). β) Το β ανωμερές του MCU που προσδέθηκε στην S213A, επισημαίνοντας και το αριθμητικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε. γ) Σχηματική παρουσίαση του  $2F_o-F_c$  χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε ισοψή του  $1\sigma$  πάνω από το μέσο όρο.

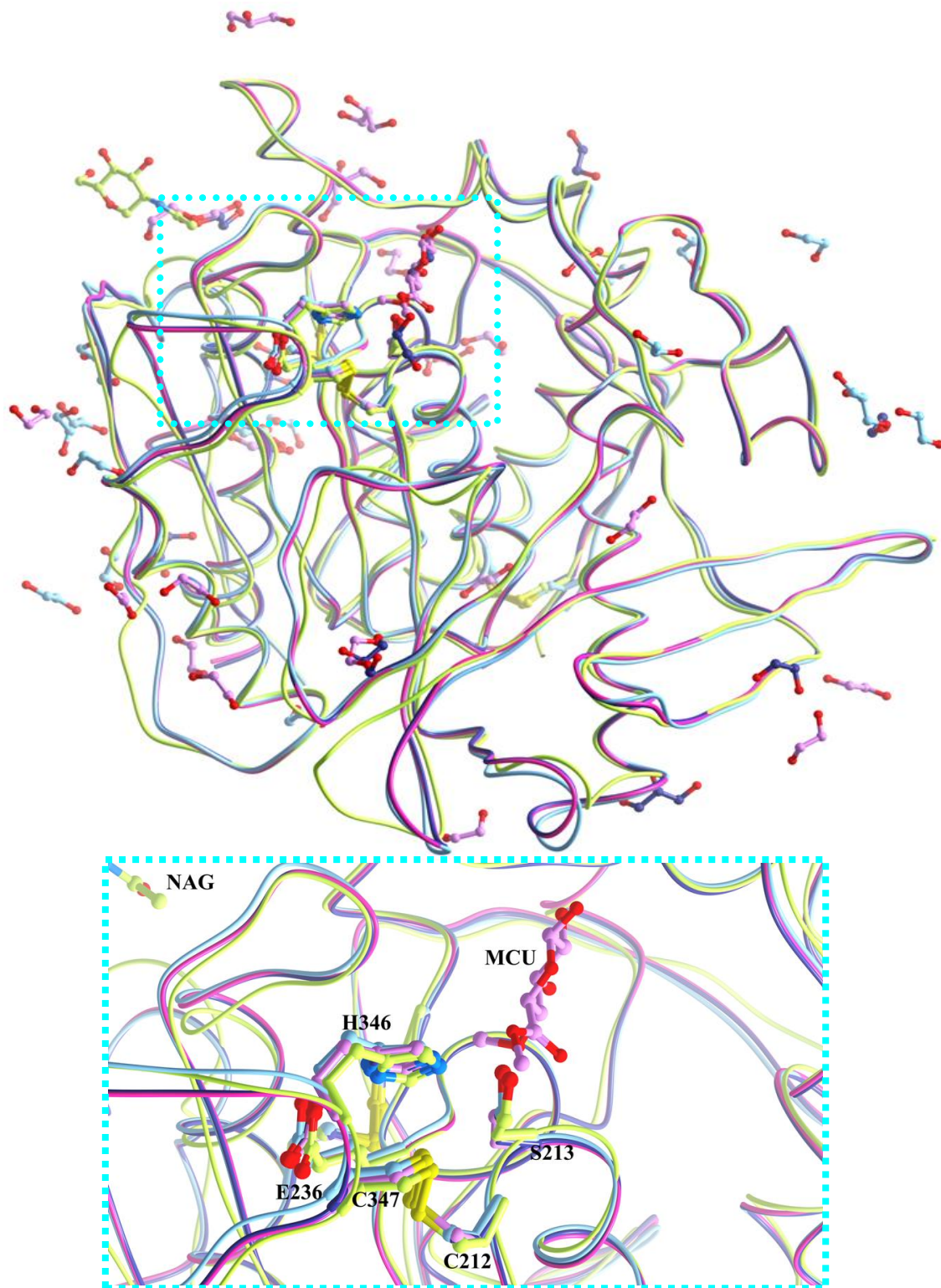
Το S213A μοντέλο υψηλής ευκρίνειας  $1.9 \text{ \AA}$  αποτελείται από ένα μονομερές και δύο πρόσθετα αμινοξέα είναι σαφώς ορισμένα στο χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{obs}-F_{calc}$  σε σχέση με την *StGE2* ώστε να περιλαμβάνει τελικά 369 αμινοξέα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα για την περιοχή του αμινοτελικού άκρου που προηγείται του Asp29 ώστε να μη συμπεριληφθούν στη δομή. Οι δομικές μελέτες που ακολούθησαν οδήγησαν στον προσδιορισμό σε ευκρίνεια  $2.35 \text{ \AA}$  του μοντέλου του συμπλόκου S213A – MCU μετά από πειράματα εμβάπτισης. Η ανάλυση των μοντέλων με

χρήση των προγραμμάτων *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010) και *PROCHECK* [Laskowski *et al.*, 1993] επαλήθευσε την αξιοπιστία τους και έδειξε ότι το 96% των αμινοξέων κατελάμβαναν ευνοϊκές περιοχές σύμφωνα με το διάγραμμα Ramachandran ενώ όλα τα αμινοξέα άνηκαν σε επιτρεπτές περιοχές. Συνολικά και στις 3 κρυσταλλικές δομές ενσωματώθηκαν μόρια αιθυλενογλυκολών και γλυκερόλης προερχόμενα είτε από τα μητρικά διαλύματα κρυστάλλωσης είτε από το διάλυμα κρυσπρωστασίας. Τα συγκεκριμένα μόρια απαντώνται κυρίως «παγιδευμένα» στη διεπιφάνεια των μονομερών κατά την επιστοίβασή τους στη μοναδιαία κυψελίδα υποδεικνύοντας μη ειδικό τρόπο πρόσδεσης στο μόριο. Ωστόσο, η παρουσία τους συνεισφέρει στη σταθεροποίηση του κρυσταλλικού πλέγματος και η εξέταση των θέσεων πρόσδεσής τους διευκόλυνε την ερμηνεία των δομικών χαρακτηριστικών. Οι ατομικές συντεταγμένες και οι παράγοντες δομής των νέων τρισδιάστατων δομών S213A και S213A - MCU κατατέθηκαν στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (<http://www.pdb.org>) με κωδικούς 4G4I και 4G4J, αντίστοιχα.

### ***3.4.7.ii Ανάλυση των τρισδιάστατων δομών S213A και συμπλόκου S213A - MCU***

Η σύγκριση της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του S213A με αυτήν της *SrGE2* δεν ανέδειξε διαφορές με εξαίρεση ορισμένες περιοχές που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις συμμετρίας του κρυστάλλου. Υπέρθωση των ατομικών συντεταγμένων του S213A επί των Ca ατόμων της *SrGE2* υπέδειξε ότι οι δύο δομές διαφέρουν ελάχιστα με μια μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d.) της τάξης του 0.4 Å. Παράλληλα, η σύγκριση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου S213A – MCU τόσο με την *SrGE2* (r.m.s.d. 0.40 Å) όσο και με την S213A (r.m.s.d. 0.12 Å) οδήγησε στο συμπέρασμα πως η πρόσδεση του αναλόγου υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο δεν επιφέρει αξιοσημείωτη αλλαγή στο σύνολο της δομής (Εικόνα 3.4.11). Τέλος, μόρια αιθυλενογλυκόλης και γλυκερόλης πλαισιώνουν και αυτές τις δύο δομές ενώ αξιοσημείωτη είναι η παρουσία δύο μορίων αιθυλενογλυκόλης στην περιοχή του ενεργού κέντρου της S213A δομής (Πίνακας 3.4.6, Εικόνα 3.4.11 και §3.4.7.iii).





**Εικόνα 3.4.11** Υπέρθηση των *S1GE2* (γαλάζιο), *S213A* (σκούρο μπλε), σύμπλοκο *S213A* – *MCU* (φούξια) και της *N*-γλυκοζυλιωμένης (μόριο *NAG*) *Cip2\_GE* (ανοιχτό πράσινο) [Rokkukuri *et al.*, 2011]. Τα αμινοξέα που συνθέτουν την καταλυτική τριάδα επισημαίνονται με αναπαράσταση σφαίρας-ράβδου ακολουθώντας το χρωματισμό κάθε δομής καθώς και οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί παρόντες σε όλες τις δομές (κίτρινο). **Ένθετο:** Το καταλυτικό κέντρο όπου διακρίνεται ο δεσμός που διαφαίνεται να υδρολύει η *S1GE2*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *Molsoft* [Raush *et al.*, 2009].

### 3.4.7.iii Το καταλυτικό κέντρο της StGE2

Η καταλυτική περιοχή της μονομερούς τρισδιάστατης δομής της StGE2 απαντάται στην επιφάνεια του μορίου κυρίως εκτεθειμένη στο διαλύτη χωρίς να επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με τη διάταξη των συμμετρικών μορίων στη μοναδιαία κυψελίδα. Τα αμινοξέα που συνθέτουν την καταλυτική τριάδα είναι προσανατολισμένα προς το διαλύτη με προσβάσιμες επιφάνειες 27.1 Å<sup>2</sup>, 2.7 Å<sup>2</sup> και 75.7 Å<sup>2</sup> για τη Ser213, Glu236 και His346, αντίστοιχα, όπως προκύπτει από την ανάλυση του εξυπηρετητή *PDB* *PISA* ([http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html)) [Krissinel & Henrick, 2007]. Στην περίπτωση των καταλυτικών αμινοξέων Ser213 και Glu236 δεν παρατηρούνται στερεοχημικές παρεμποδίσεις από συμμετρικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες στη μοναδιαία κυψελίδα με εξαίρεση την περιοχή της H346.

Σύμφωνα με την StGE2 δομή, οι κλώνοι S9 και S7 διαμορφώνουν το ενεργό κέντρο συντονίζοντας τα κατάλοιπα H346 και Glu236 για το σχηματισμό της καταλυτικής τριάδας με τη Ser213 (Εικόνα 3.4.7). Εξάλλου, τα κατάλοιπα της τριάδας συμμετέχουν σε ένα συμπαγές δίκτυο δεσμών υδρογόνου συνεισφέροντας στην αυστηρή αρχιτεκτονική της καταλυτικής κοιλότητας. Ειδικότερα, εστιάζοντας στην πυρηνόφιλη Ser213 η ομάδα υδροξυλίου της αλληλεπιδρά άμεσα με το NE2 της His346 η οποία με τη σειρά της σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μέσω του ND1 ατόμου αζώτου της με το OE1 της Glu236. Η εικόνα συμπληρώνεται με πρόσθετες άμεσες και έμμεσες μέσω μορίων ύδατος πολικές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα Arg214, Gly216, Lys217, Gln235, Phe304, και Asn306 (Πίνακας 3.4.7α-γ)

**Πίνακας 3.4.7α** Δεσμοί υδρογόνου της καταλυτικής Ser213 στην StGE2 δομή

Ser213/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N	Gln235 O	3.0	167.4
O	Gly216 N	2.9	127.7
	Lys217 N	3.1	160.0
OG	His346 NE2	2.7	173.7
	Arg214 N	3.2	120.1
	Wat567 O	2.7	-

...Arg214 NH2	3.1	166.3
...Arg214 N	3.1	160.5
...Wat577 O	2.8	-

**Πίνακας 3.4.7β** Δεσμοί υδρογόνου του καταλυτικού Glu236 στην *SrGE2* δομή

Glu236/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
OE1	His346 ND1	2.8	146.8
	Asn306 ND2	3.0	156.6
OE2	Cys347 N	2.8	147.4
	Wat560 O	2.8	-
O	Gln235 O	3.3	105.0
	Wat568 O	3.0	-
	...Lys217 NZ	3.1	-
	...Ser237 O	3.0	100.9
	...Wat578 O	3.0	-
	...Lys217 NZ	2.8	-
	...Gln259 OE1	2.8	141.6
N	...Wat740 O		-
	Phe304 O	2.8	161.4

**Πίνακας 3.4.7γ** Δεσμοί υδρογόνου της καταλυτικής His346 στην *SrGE2* δομή

His346/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
ND1	Glu236 OE1	2.8	123.8
NE2	Ser213 OG	2.7	96.0
N	Wat700 O	2.8	-
O	Wat867 O	2.8	-
	...Wat775 O	3.0	-
	...Asn345 ND2	3.3	138.5

Στην περίπτωση της S213A δομής, η ανάλυση έδειξε ότι μετάλλαξη της Ser213 σε Ala με την επακόλουθη απουσία της υδροξυλομάδας δεν επηρέασε την αρχιτεκτονική του κέντρου. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων της N και O της κύριας αλυσίδας της Ala213 με τα γειτονικά αμινοξέα καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με την His346 και το Glu236 παραμένουν (Πίνακας 3.4.8α-γ). Ωστόσο, στην S213A δομή ο βρόχος που φέρει την His346 (αμινοξέα 344 έως 350) υπόκειται σε μετατοπίσεις εύρους ~0.5 Å έως ~ 1.0 Å που αποδίδονται σε αλληλεπιδράσεις εσωτερικής διάταξης του κρυστάλλου. Παρά αυτές τις μετατοπίσεις, η θέση της His346 στην καταλυτική κοιλότητα διατηρείται (εύρους ~0.5 Å σε όλα τα άτομα). Ο δισουλφιδικός δεσμός που σχηματίζει η Cys347 με την Cys212 ενισχύει περαιτέρω την «άκαμπτη» αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου γεφυρώνοντας με αυτόν τον τρόπο δύο παρακείμενα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, την His346 και τη Ser213, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.4.8α** Δεσμοί υδρογόνου της μεταλλαγμένης Ala213 στην S213A δομή

Ala213/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N	Gln235 O	3.0	169.7
O	Gly216 N	2.9	120.1
	Lys217 N	3.0	156.2

**Πίνακας 3.4.8β** Δεσμοί υδρογόνου του Glu236 στην S213A δομή

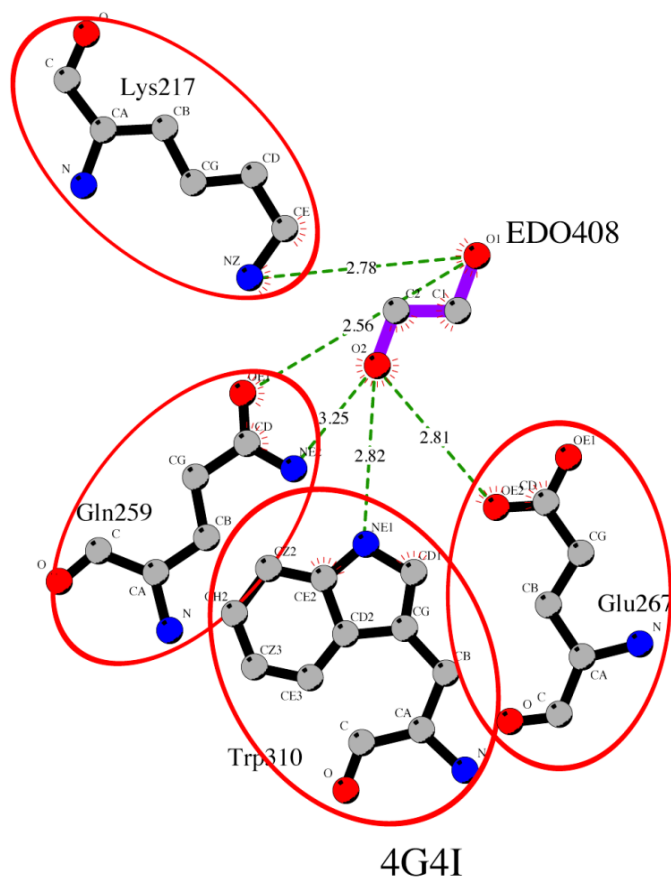
Glu236/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
OE1	His346 ND1	2.6	157.9
	Asn306 ND2	3.3	145.7
OE2	Cys347 N	2.8	154.3
	Wat539 O	2.8	-
	...Gln235 NE2	2.9	173.1
	...Wat514 O	2.9	-
	...Glu305	2.9	112.0
	...Gln353	2.7	122.9
	...Wat539	2.9	-

N	Phe304 O	2.7	165.8
O	Gln235 O	3.3	103.9
	Wat906 O	3.0	147.1
	...Lys217 NZ	3.1	-
	...Ser237 O	3.0	96.4

**Πίνακας 3.4.8γ** Δεσμοί υδρογόνου της H346 στην S213A δομή

His346/άτομο	Άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
ND1	Glu236 OE1	2.6	129.1
NE2	Wat557	2.9	-
	...Wat511	2.8	-
	...Arg214 N		
	...Arg214 NH2		
	...Wat654		
N	Wat707 O	2.8	-

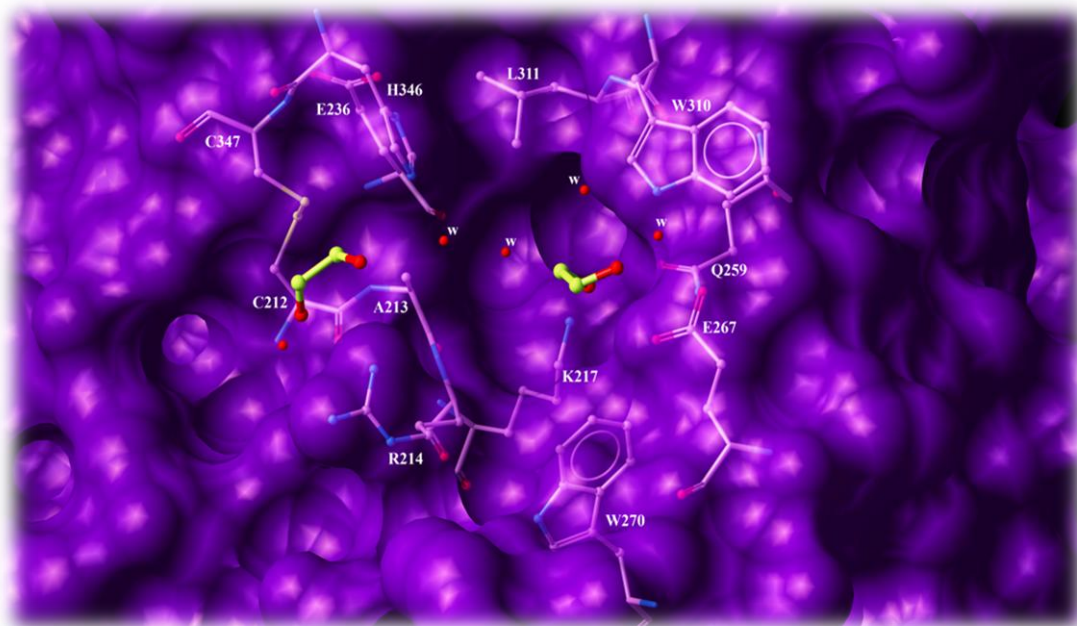
Παράλληλα, εντοπίστηκε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην καταλυτική περιοχή της Ser213A δομής που αντιστοιχούσε σε δύο μόρια αιθυλενογλυκόλης, EDO406 και EDO408. Τα συγκεκριμένα μόρια καταλαμβάνουν την είσοδο του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα η EDO408 σχηματίζει πέντε δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά αμινοξέα Lys217 NZ, Gln259 OE1, NE2 Glu267 OE2 και Trp310 NE1 (Σχήμα 3.4.4, Εικόνα 3.4.12). Συνεπώς, κατέστη εμφανές ότι η καταλυτική κοιλότητα διαθέτει το δυναμικό πρόσδεσης του αναλόγου υποστρώματος σχηματίζοντας ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις αξιοποιώντας τα αμινοξέα που οριοθετούν την περιοχή (Πίνακας 3.4.9).



**Σχήμα 3.4.4** Διάγραμμα LIGPLOT αλληλεπιδράσεων της EDO408 με αμινοξέα της καταλυτικής περιοχής. Οι δεσμοί της EDO408 αναπαρίστανται με μωβ χρώμα ενώ των αμινοξέων της περιοχής με μαύρο χρώμα. Οι δεσμοί υδρογόνου συμβολίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές ενώ υποδεικνύονται οι αποστάσεις τους σε Å.

**Πίνακας 3.4.9** Δεσμοί υδρογόνου της EDO408 στην καταλυτική κοιλότητα της S213A

EDO408 άτομο	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O1	Lys 217A NZ	2.8	-
	Gln 259A OE1	2.6	131.9
O2	Gln 259A NE2	3.3	128.7
	Glu 267A OE2	2.8	110.6
	Trp 310A NE1	2.8	159.6



**Εικόνα 3.4.12** Αναπαράσταση επιφάνειας της κοιλότητας του ενεργού κέντρου όπου έχουν προσδεθεί τα μόρια αιθυλενογλυκόλης (EDO406, EDO408). Οι προσδέτες και τα αμινοξέα της περιοχής υποδεικνύονται με μοντέλα σφαίρας-ράβδου ενώ τα μόρια ύδατος (w) που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων απεικονίζονται ως σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *Molsoft* [Raush *et al.*, 2009].

Αντίστοιχα όσον αφορά στις δομικές μελέτες της μεταλλαγμένης S213A ως σύμπλοκο με το ανάλογο υποστρώματος, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την πρόσδεση του MCU μέσω σχηματισμού ενός εκτεταμένου δικτύου αλληλεπιδράσεων (7 απευθείας και 4 έμμεσους δεσμούς υδρογόνου καθώς και 59 Van der Waals αλληλεπιδράσεις) με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (Πίνακας 3.4.10-3.4.11, Σχήμα 3.4.5 και Σχήμα 3.4.6). Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου είναι τα ίδια που καταγράφηκαν στην S213A δομή σε αλληλεπίδραση με το μόριο αιθυλενογλυκόλης (Σχήμα 3.4.4) από κοινού με την His346 (NE2). Πιο αναλυτικά, δύο άτομα οξυγόνου του δακτυλίου γλυκοπυρανόζης, O2 και O3 (Σχήμα 3.4.3β), ευθυγραμμίζονται με τη θέση που καταλαμβάνουν οι υδροξυλομάδες της αιθυλενογλυκόλης μετατοπισμένα κατά  $\sim 0.7 \text{ \AA}$  και  $\sim 0.2 \text{ \AA}$ , αντίστοιχα (Εικόνα 3.4.14).

**Πίνακας 3.4.10** Απευθείας και έμμεσοι μέσω μορίων ύδατος δεσμοί υδρογόνου του MCU στην καταλυτική κοιλότητα της S213A.

Άτομο	Πρωτεϊνικό άτομο	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
01	Glu267 OE2	2.5	119.9
02	Gln259 NE2	2.6	127.1
	Glu267 OE1	2.4	119.2
	Trp310 NE1	2.9	169.8
03	Lys217 NZ	2.8	0.0
	Gln259 OE1	2.5	127.6
05	Wat693 O	3.3	-
	Wat695 O	3.3	-
06	Wat695 O	3.3	-
06a	His346 NE2	3.0	146.0
	Wat693 O	2.9	-
	...Arg214 NH1	3.2	-

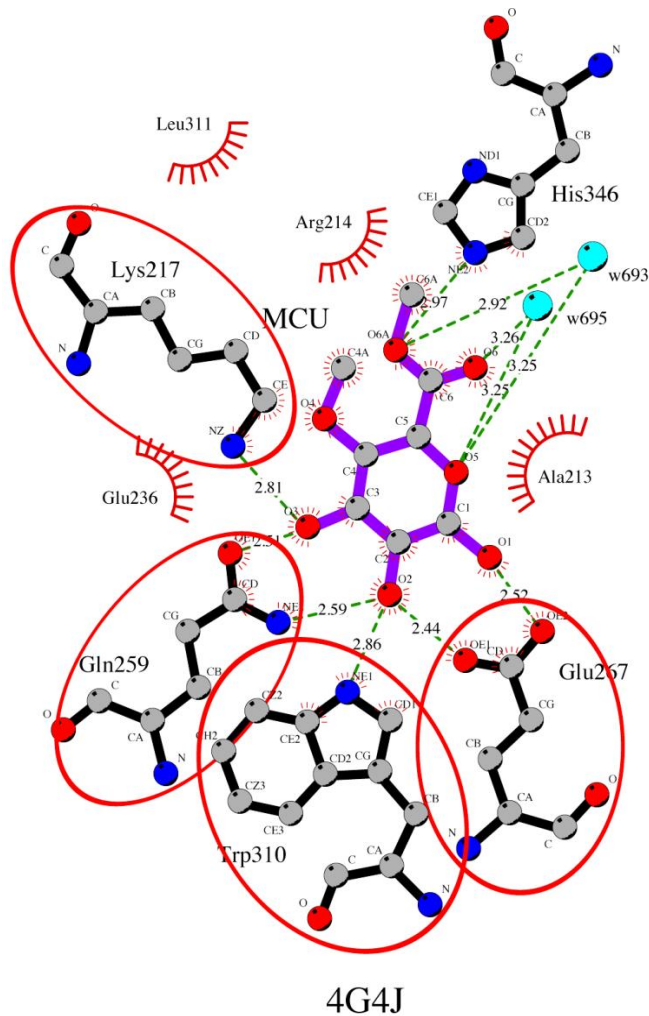
Συνολικά 7 απευθείας δεσμοί υδρογόνου



**Πίνακας 3.4.11** Van der Waals αλληλεπιδράσεις του MCU στην καταλυτική κοιλότητα της S213A.

Άτομο υποστρώματος	Πρωτεϊνικό άτομο	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Glu267 OE1, OE2	2
<b>C2</b>	Gln259 OE1, NE2; Glu267 OE1, OE2, CD; Trp310 NE1	6
<b>C3</b>	Lys217 NZ; Gln259 OE1	2
<b>C4</b>	Lys217 NZ	1
<b>C4a</b>	Ala213 CA, CB; Lys217 NZ; Glu236 O; Leu311 CD2; Wat670; Wat712	7
<b>C5</b>	Wat693; Wat695; Wat712	3
<b>C6</b>	Ala213 CB; His346 NE2; Wat693; Wat695	4
<b>C6a</b>	Ala213 CB; Arg214 NH1; His346 NE2, CD2; Wat694; Wat693	6
<b>O1</b>	Glu267 CD, OE1; Wat695	3
<b>O2</b>	Gln259 OE1, CD; Glu267 CD, OE2; Trp310 CD1, CE2	6
<b>O3</b>	Lys217 CE; Gln259 CD, NE2; Wat670	4
<b>O4</b>	Ala213 CA, CB, C; Arg214 N; Lys217 CE, NZ	6
<b>O6</b>	Ala213 CB; Arg214 CB, CG, CD, NH1, N	6
<b>O6a</b>	Ala213 CB; His346 CD2; Wat694	3

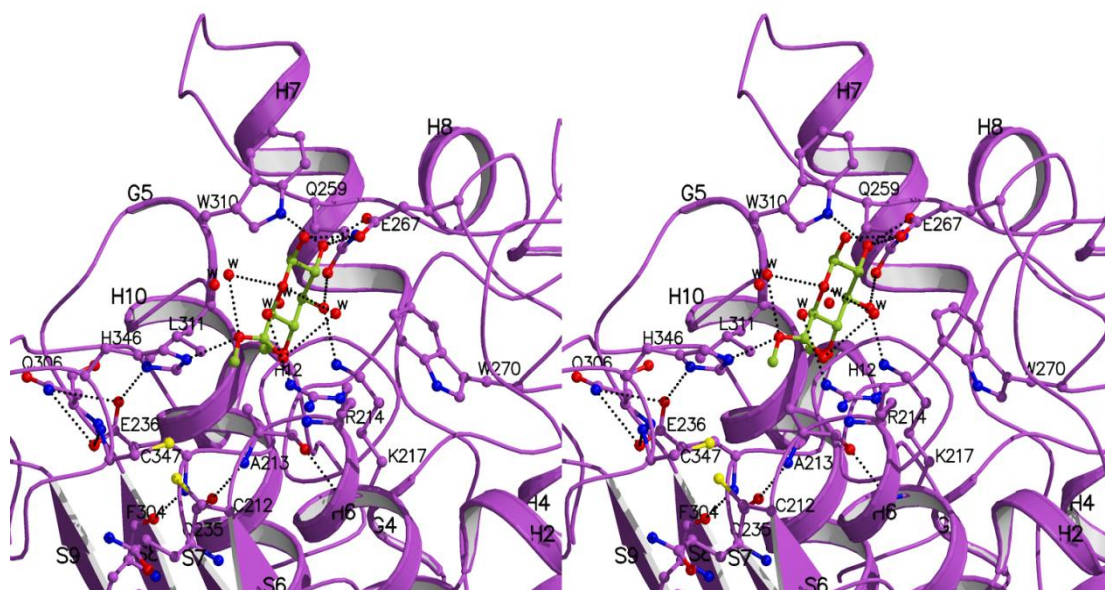
**Συνολικά 59 Van der Waals αλληλεπιδράσεις**



**Σχήμα 3.4.5** Διάγραμμα LIGPLOT αλληλεπιδράσεων του MCU με αμινοξέα της περιοχής του ενεργού κέντρου. Οι δεσμοί του MCU αναπαρίστανται με μωβ χρώμα ενώ των αμινοξέων της περιοχής με μαύρο χρώμα. Οι δεσμοί υδρογόνου συμβολίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές ενώ υποδεικνύονται οι αποστάσεις τους σε Å. Τα αμινοξέα που σχηματίζουν Van der Waals αλληλεπιδράσεις επισημαίνονται με ημικύκλια με κόκκινες ακτίνες. Τα μόρια ύδατος (w) που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων απεικονίζονται ως σφαίρες. Σε κόκκινους κύκλους βρίσκονται τα αμινοξέα που είναι κοινά και στις αλληλεπιδράσεις της EDO408 στην καταλυτική περιοχή της S213A.

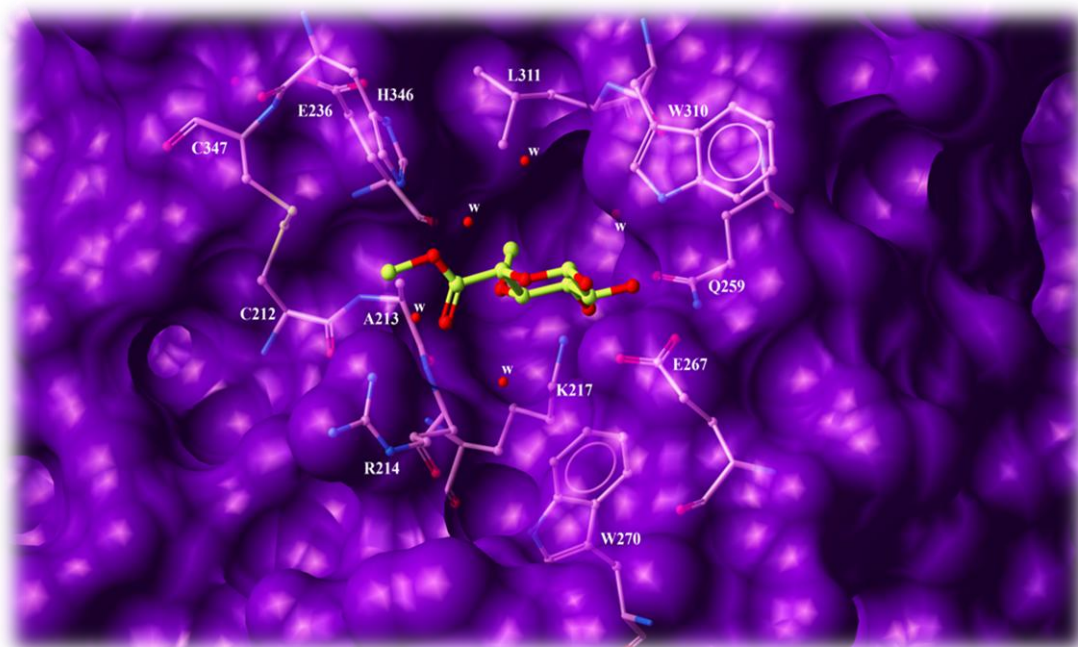
Πιο συγκεκριμένα, το ανάλογο υποστρώματος αξιοποιεί ως «άγκυρες» τα άτομα οξυγόνου των περιφερειακών υδροξυλομάδων του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης για να προάγει την πρόσδεσή του στην καταλυτική κοιλότητα. Τα άτομα των πλευρικών αλυσίδων τόσο της Gln259 όσο και του Glu267 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα O1, O2 και O3 του σακχάρου. Η διαμόρφωση της Glu267 πλευρικής αλυσίδας τροποποιείται (περιστροφή των διεδρων γωνιών ( $\chi_1, \chi_3$ ) κατά ( $\sim 74^\circ, \sim 127^\circ$ ), αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις μη συμπλοκοποιημένες δομές ώστε να ευνοηθεί η ισχυρή πρόσδεση του αναλόγου υποστρώματος (Εικόνα 3.4.14). Ακόμη, το NE1 άτομο της Trp310 NE1 είναι σε στενή επαφή με το O2 ενώ το NZ άτομο της Lys217 αλληλεπιδρά με το O3. Μια πρόσθετη πολική αλληλεπίδραση αναπτύσσεται ανάμεσα στο άτομο NZ της

Lys217 και του O4 σε μια απόσταση 3.4 Å. Το σύστημα των δεσμών υδρογόνου συμπληρώνεται από το O5 το οποίο συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με το NH1 άτομο της Arg214 (Wat693 O και Wat695 O). Παράλληλα, το O6a άτομο του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης το οποίο αφορά στον εστερικό δεσμό προς υδρόλυση, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο NE2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου της H346. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση συμβαδίζει με την πρόταση ότι η θέση της καταλυτικής τριάδας είναι σαφώς εντοπισμένη και η κοιλότητα δομημένη κατά τρόπο ώστε να επιβάλει έναν προσανατολισμό στο υπόστρωμα που να προάγει την άμεση πυρηνόφιλη προσβολή ανεξάρτητα από την απουσία ενός πυρηνόφιλου στη S213A δομή του συμπλόκου. Προς το σκοπό αυτό, η σύγκριση της *SzGE2* κρυσταλλικής δομής με αυτήν του συμπλόκου κατέδειξε ότι το OG άτομο της Ser213 πράγματι είναι προσανατολισμένο προς τον εστερικό δεσμό σε μια απόσταση ~ 2.2 Å.



**Σχήμα 3.4.6** Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου στην καταλυτική κοιλότητα της S213A των αμινοξέων και μορίων ύδατος της κοιλότητας με τα άτομα του αναλόγου υποστρώματος MCU καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται από την καταλυτική τριάδα. Οι πλευρικές αλυσίδες και τα άτομα της κύριας αλυσίδας που συμμετέχουν στην πρόσδεση υποδεικνύονται με αναπαράσταση σφαίρας-ράβδου. Τα μόρια ύδατος (w) απεικονίζονται ως σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές. Η απεικόνιση προετοιμάστηκε με το πρόγραμμα *Molscript* [Kraulis, 1993] και αποδόθηκε με το πρόγραμμα *Raster3D* [Merritt & Bacon, 1997].

Οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις του αναλόγου υποστρώματος αφορούν κυρίως την παλέτα των αμινοξέων που συμμετέχουν στους προαναφερθέντες δεσμούς υδρογόνου. Ανάμεσα σ'αυτές, είναι αξιοσημείωτη αυτή του ατόμου αζώτου της κύριας αλυσίδας της Arg214 με το O4 της μέθοξυ- ομάδας και με το O6 του εστερικού δεσμού (σε μια απόσταση  $\sim 3.4$  Å), το οποίο σχηματίζει επιπρόσθετα δεσμό υδρογόνου με το OG άτομο της Ser213. Το γεγονός αυτό παρέχει ενδείξεις ότι η Arg214 δύναται να καταλαμβάνει εντοπισμένη θέση ώστε να αποτελέσει συστατικό της επονομαζόμενης «οπής οξυανιόντος» (Εικόνα 3.4.13, Σχήμα 3.4.5 και Σχήμα 3.4.6).

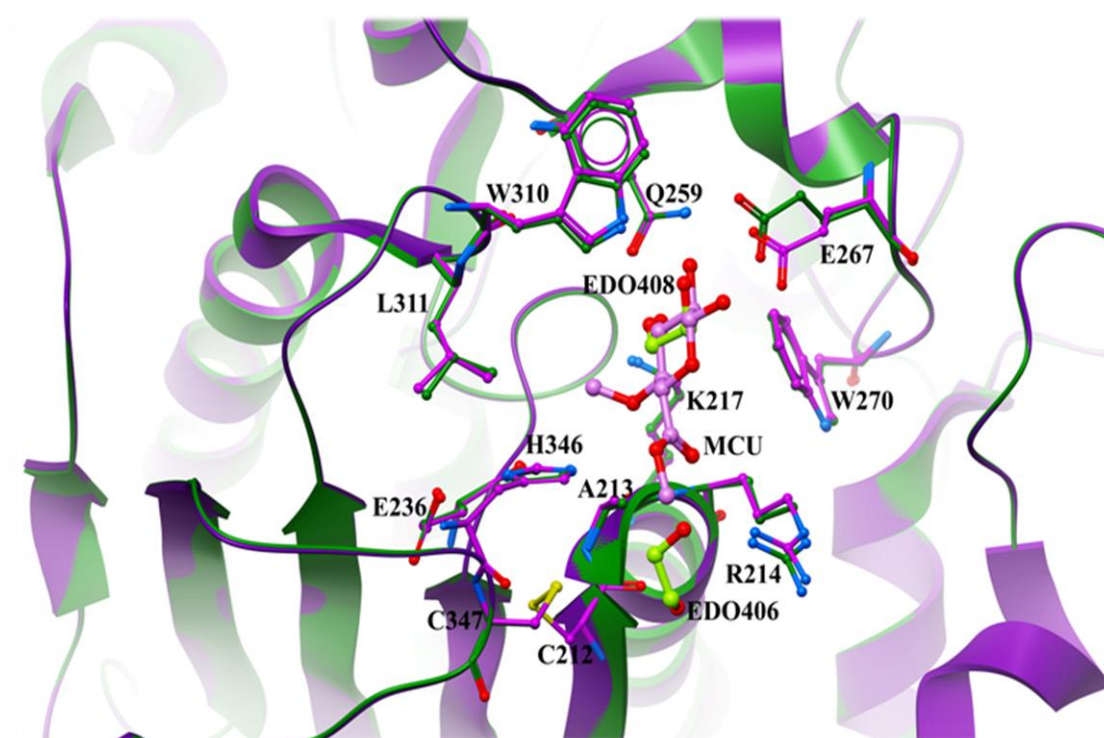


**Εικόνα 3.4.13** Αναπαράσταση επιφάνειας της κοιλότητας του ενεργού κέντρου όπου έχει προσδεθεί το ανάλογο υποστρώματος. Οι προσδέτες και τα αμινοξέα της περιοχής υποδεικνύονται με μοντέλα σφαίρας-ράβδου. Τα μόρια ύδατος (w) που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων απεικονίζονται ως σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *Molsoft* [Raush *et al.*, 2009].

Υπέρθεση των δομών του S213A και του συμπλόκου S213A ανέδειξε πως το ανάλογο υποστρώματος προσδένεται στην ίδια θέση που καταλαμβάνει ένα εκ των δύο μορίων αιθυλενογλυκόλης που απαντώνται στο καταλυτικό κέντρο της μη συμπλοκοποιημένης δομής. Ειδικότερα, η EDO408 μιμείται τρόπον τινά τη



θέση των ατόμων C2, O2, C3 και O3 του δακτυλίου γλυκοπυρανόζης, ενώ η EDO406 εντοπίζεται στην ευρύτερη περιοχή της κοιλότητας. Δεδομένου του ότι το σύμπλοκο σχηματίστηκε με τη χρήση προσχηματισμένων κρυστάλλων της μεταλλαγμένης S213A, διαφαίνεται ότι το ανάλογο υποστρώματος εκτόπισε τα μόρια αιθυλενογλυκόλης κατά την πρόσδεσή του γεγονός που μπορεί να αποσαφηνίσει την ποιότητα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που αποδίδεται στο MCU (Σχήματα 3.4.3-3.4.5)



**Εικόνα 3.4.14** Υπέρθηση των αμινοξέων που συνθέτουν την καταλυτική κοιλότητα της S213A (πράσινο) και της S213A ως σύμπλοκο με τον 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα (μωβ). Επίσης υποδεικνύονται τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, οι πλευρικές αλυσίδες και άτομα της κύριας αλυσίδας που εμπλέκονται στην πρόσδεση, όπως και τα μόρια αιθυλενογλυκόλης 406 και 408 προσδεδεμένα στη S213A κρυσταλλική δομή (ο χρωματισμός ακολουθεί το χρωματισμό της κάθε δομής). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *Molsoft* [Raush *et al.*, 2009].

### 3.4.8 Συμπεράσματα και μελλοντικές βλέψεις

Οι κρυσταλλικές δομές μίας νέας ανασυνδυασμένης θερμόφιλης GE σε συνδυασμό με τη συμπλοκοποιημένη και μη δομή της μεταλλαγμένης S213A ταυτοποιήθηκαν σε ευκρίνεια 1.55 Å, 2.35 Å και 1.9 Å, αντίστοιχα. Η S<sub>2</sub>GE2 ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών και η δομή της ακολουθεί μια αρχιτεκτονική αναδίπλωσης 3-επιπέδων *αβ* sandwich με τοπολογία διπλώματος Rossmann. Τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί, ένας εκ των οποίων απαντάται στην είσοδο της καταλυτικής κοιλότητας, συνεισφέρουν στη συμπαγή διαμόρφωση (rigidity) της δομής και στην αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου.

Η χαρτογράφηση του καταλυτικού κέντρου μετά την πρόσδεση του συνθετικού αναλόγου υποστρώματος 4-*O*-μεθυλο-D-γλυκουρονικού μεθυλεστέρα υπέδειξε ότι τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, συγκεκριμένα η Ser213, το Glu236 και η His346 συμμετέχουν σε μία σαφώς ορισμένη διάταξη που προάγει την άμεση πυρηνόφιλη προσβολή. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συντονίζεται εν μέρει από τους β-κλώνους S6, S7 και S9 της β-πτυχωτής επιφάνειας που «καθοδηγούν» την H346 και τα άλλα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας σε ένα προσανατολισμό που καθιστά εφικτή την αναγνώριση και δέσμευση του υποστρώματος. Η δομή του συμπλόκου αποκάλυψε, επιπλέον, την εγγενή προσαρμοστικότητα των αμινοξέων που συνθέτουν το σχήμα και το περιβάλλον της κοιλότητας όπως το Glu267 που μεταβάλλει τη διαμόρφωση της πλευρικής του αλυσίδας προκειμένου να προάγει τη δέσμευση του αναλόγου υποστρώματος. Η παραπάνω διάταξη συμπληρώνεται από το άζωτο της κύριας αλυσίδας της Arg214 της επονομαζόμενης «οπής οξυανιόντος» το οποίο εντοπίζεται έναντι του εστερικού και της μέθοξυ-ομάδας ώστε να δύναται να προταθεί η συνεισφορά του στη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου κατά την κατάλυση. Η μέθοξυ-ομάδα που περιλαμβάνει τα άτομα O4 και C4a πιθανά διαδραματίζει πρόσθετο ρόλο με αυτόν των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας στην αναγνώριση του υποστρώματος, ενισχύοντας τη δέσμευση μέσω ενός αυξημένου αριθμού Van der Waals αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα που οριοθετούν το ενεργό κέντρο (Πίνακας 3.4.11). Επόμενο στόχο αποτελεί η ενδελεχής μελέτη της S<sub>2</sub>GE2 μέσω σημειακών μεταλλάξεων των αμινοξέων που

πλασιώνουν το καταλυτικό της κέντρο ώστε να χαρακτηριστεί πλήρως ο λειτουργικός της ρόλος. Προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση, έχει γίνει η επιλογή και ο σχεδιασμός εκκινήτων για τις κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις των L311A, L311N, L311Q, L311R και K217R *S<sub>t</sub>GE2* ώστε να αξιολογηθούν οι πιθανές αλλαγές που δύνανται να επιφέρουν στη διαμόρφωση και στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων της καταλυτικής κοιλότητας του ενζύμου.

Η *S<sub>t</sub>GE2* και η *Cip2\_GE* αποτελούν τα μόνα χαρακτηρισμένα μέλη της CE15 οικογένειας εστερασών μέχρι σήμερα των οποίων η τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί. Άμεση σύγκριση των δύο ενζύμων αποσαφηνίζει τα βιοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά που ανάγουν την *S<sub>t</sub>GE2* σε καταλληλότερο πρωτεϊνικό στόχο από τη μεσόφιλη *Cip2\_GE* για την περαιτέρω διερεύνηση των GEs προς εκμετάλευση των βιοτεχνολογικών εφαρμογών τους. Σε αυτές συγκαταλέγονται η θερμοσταθερότητα, η προσβασιμότητα των αμινοξέων της καταλυτικής του τριάδας, η αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου ως προς την αναγνώριση υποστρώματος καθώς και η μονομερής της μορφή τόσο στον κρύσταλλο όσο και στο διάλυμα. Οι κρυσταλλικές δομές της *S<sub>t</sub>GE2* και του συμπλόκου της S213A *S<sub>t</sub>GE2* αποκάλυψαν για πρώτη φορά το δακτυλικό αποτύπωμα της πρόσδεσης υποστρώματος σε μια GE. Ως εκ τούτου, οι νέες προοπτικές που διανοίγονται από τη μοριακή, δομική και καταλυτική μελέτη της *S<sub>t</sub>GE2*, σκιαγραφούν έναν ελκυστικό ενζυμικό στόχο που μπορεί να αποτελέσει μοντέλο για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό δραστικών βιοκαταλυτών, προσφέροντας, παράλληλα, δυνατότητες βιομηχανικής αξιοποίησης σε συνεργασία με ένζυμα του ημικυτταρινολυτικού συμπλέγματος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, M., K. Okamoto, et al. (1989). "Induction of antiparasite activity by pine cone lignin-related substances." In Vivo **3**(6): 359-62.
- Acharya, K. R. and M. D. Lloyd (2005). "The advantages and limitations of protein crystal structures." Trends Pharmacol Sci **26**(1): 10-4.
- Adler, E. (1977). "Lignin chemistry—past, present and future." Wood Science and Technology **11**(3): 169-218.
- Akerholm, M., B. Hinterstoisser, et al. (2004). "Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy." Carbohydr Res **339**(3): 569-78.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Amidon, T. E. and S. Liu (2009). "Water-based woody biorefinery." Biotechnol Adv **27**(5): 542-50.
- Andrade, S. d. V., M. d. L. T. d. M. Polizeli, et al. (2004). "Effect of carbon source on the biochemical properties of  $\beta$ -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*." Process Biochemistry **39**(12): 1931–1938.
- Azuma, J. I. T., K. (1988). "Lignin-carbohydrate complexes from various sources." Methods in Enzymology **161**: 12–18.
- Bahrami, A. S., S.; Mahbeli, G. (2001). "Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria." Biotechnology Letters **23**: 899–901.
- Balakshin, M., E. Capanema, et al. (2011). "Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy." Planta **233**(6): 1097-110.
- Balakshin, M. Y., E. A. Capanema, et al. (2003). "Elucidation of the structures of residual and dissolved pine kraft lignins using an HMQC NMR technique." J Agric Food Chem **51**(21): 6116-27.
- Becker, D. R. (2007). "The next generation of USDA Forest Service community assistance grants programs." International Symposium on Society and Resource Management.
- Beeson, W. T. I., A.T.; Hausmann C.D.; Cate, J.H.; Marletta, M.A. (2011). "Extracellular aldonolactonase from *Myceliophthora thermophila*." Applied Environmental Microbiology **77**(2): 650-656.



- Bergfors, T. (2003). "Seeds to crystals." J Struct Biol **142**(1): 66-76.
- Berka, R. M., I. V. Grigoriev, et al. (2011). "Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*." Nat Biotechnol **29**(10): 922-7.
- Berka, R. M., P. Schneider, et al. (1997). "Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*." Appl Environ Microbiol **63**(8): 3151-7.
- Bernal, J. D. C., D. (1934). "X-Ray Photographs of Crystalline Pepsin." Nature **133**: 794-795.
- Bharadwaj, G. and R. Maheshwari (1999). "A comparison of thermal characteristics and kinetic parameters of trehalases from a thermophilic and a mesophilic fungus." FEMS Microbiol Lett **181**(1): 187-93.
- Bhat, K. M. and R. Maheshwari (1987). "Sporotrichum thermophile Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity." Appl Environ Microbiol **53**(9): 2175-82.
- Bhat, K. M. G., J.S.; and Maheswari, R. (1993). "Purification and characterization of an extracellular -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity." Journal of General Microbiology **139**(11): 2825-2832.
- BIO (2008). "Biotechnology Industry Organization: Guide to Biotechnology 2008." [www.bio.org](http://www.bio.org).
- Björkman, A. (1956). "Studies on finely divided wood. Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents." Svensk Papperstidn **59**: 477-485.
- Björkman, A. (1957). "Studies on finely divided wood. Part 3. Extraction of lignin-carbohydrate complexes with neutral solvents." Svensk Papperstidn **60**: 243-251.
- Blundell, T. L., H. Jhoti, et al. (2002). "High-throughput crystallography for lead discovery in drug design." Nat Rev Drug Discov **1**(1): 45-54.
- Bounias, M. (1980). "N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin-layer plates by a mathematical calibration process." Anal Biochem **106**(2): 291-5.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

- Breierova, E., Z. Hromadkova, et al. (2005). "Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by *Cryptococcus laurentii*." Z Naturforsch C **60**(5-6): 444-50.
- Bush, G. L., A. M. Tassin, et al. (1991). "Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor." J Biol Chem **266**(21): 13811-4.
- Canevascini, G., P. Borer, et al. (1991). "Cellobiose dehydrogenases of *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile*." Eur J Biochem **198**(1): 43-52.
- Canevascini, G. M., H.P. (1979). "13-Glucosidase in the cellulolytic fungus *Sporotrichum thermophile* Apinis." Experimental Mycology **3**: 203-214.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, et al. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." Nucleic Acids Res **37**: D233-8.
- Capek, P. and V. Hribalova (2004). "Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity." Phytochemistry **65**(13): 1983-92.
- Capek, P., M. Kubackova, et al. (2000). "Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst." Carbohydr Res **329**(3): 635-45.
- Chapman, H. N., P. Fromme, et al. (2011). "Femtosecond X-ray protein nanocrystallography." Nature **470**(7332): 73-7.
- Charavgi, M. D., M. Dimarogona, et al. (2013). "The structure of a novel glucuronoyl esterase from *Myceliophthora thermophila* gives new insights into its role as a potential biocatalyst." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **69**(Pt 1): 63-73.
- Chayen, N. E. and E. Saridakis (2008). "Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal." Nat Methods **5**(2): 147-53.
- Chen, H. F., C.; Angiuli, M.; Yao, J.; Raspi C.; Bramanti, E. (2010). "Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis." Carbohydrate Polymers **82**: 772-778.
- Chen, V. B., W. B. Arendall, 3rd, et al. (2010). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 1): 12-21.
- Chirat, C. L., D.; Sanglard, M. (2012). "Extraction of xylans from hardwood chips prior to kraft cooking." Process Biochemistry **47**(3): 381-385.

- Christakopoulos, P., P. Katapodis, et al. (2003). "Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases." Int J Biol Macromol **31**(4-5): 171-5.
- Christakopoulos, P. and E. Topakas (2012). "Editorial note: advances in enzymology and enzyme engineering." Comput Struct Biotechnol J **2**: e201209001.
- Claassen, P. A. M. v. L., J.B.; López, A.M.; van Niel, E.W. J.; Sijtsma, L. ; Stams, A.J.M.; de Vries, S.S.; Weusthuis R.A. (1999). "Utilisation of biomass for the supply of energy carriers." Applied Microbiology and Biotechnology **52**: 741-755.
- Cohen, S. N., A. C. Chang, et al. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-4.
- Collaborative Computational Project, N.4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 5): 760-3.
- Conde, R., R. Cueva, et al. (2004). "A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins." J Biol Chem **279**(42): 43789-98.
- Cornuéjols, D. (2000). "Synchrotron radiation is brighter than ever." CERN Courier **40**(8): 26-29.
- Correia, M. A., J. A. Prates, et al. (2008). "Crystal structure of a cellosomal family 3 carbohydrate esterase from Clostridium thermocellum provides insights into the mechanism of substrate recognition." J Mol Biol **379**(1): 64-72.
- Crab, W., Mitchinson, C. (1997). "Enzymes involved in the processing of starch to sugars." Trends in Biotechnology **15**: 349-352.
- Cullen, B., P. W. Watt, et al. (2002). "The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action." Int J Biochem Cell Biol **34**(12): 1544-56.
- de Vries, R. P. and J. Visser (2001). "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 497-522, table of contents.
- Dembitsky, V. M. (2005). "Astonishing diversity of natural surfactants: 5. Biologically active glycosides of aromatic metabolites." Lipids **40**(9): 869-900.

- d'Errico, C., J. O. Jorgensen, et al. (2015). "Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): model studies using a fungal glucuronoyl esterase from *Cerrena unicolor*." Biotechnol Bioeng **112**(5): 914-22.
- Dimarogona, M., E. Topakas, et al. (2012). "Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*." Bioresour Technol **110**: 480-7.
- Domsch, K. H. G., W.; Anderson, TW. (1993). *Compendium of Soil Fungi*, IHW Verlag.
- Dotsenko, G. S., M. V. Semenova, et al. (2012). "Cloning, purification, and characterization of galactomannan-degrading enzymes from *Myceliophthora thermophila*." Biochemistry (Mosc) **77**(11): 1303-11.
- Drenth, J. (2003). "Principles of Protein X-ray Crystallography." Springer Science & Business Media.
- DSM. "DSM position on White Biotechnology." [www.dsm.com](http://www.dsm.com).
- Duff, S. J. B. M., W.D. (1996). "Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review." Bioresource Technology **55**: 1-33.
- Duranova, M., S. Spanikova, et al. (2009a). "Two glucuronoyl esterases of *Phanerochaete chrysosporium*." Arch Microbiol **191**(2): 133-40.
- Duranova, M., J. Hirsch, et al. (2009b). "Fungal glucuronoyl esterases and substrate uronic acid recognition." Biosci Biotechnol Biochem **73**(11): 2483-7.
- Ealick, S. E. (2000). "Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography." Curr Opin Chem Biol **4**(5): 495-9.
- Ebringerova, A., Z. Hromadkova, et al. (2008). "Norway spruce galactoglucomannans exhibiting immunomodulating and radical-scavenging activities." Int J Biol Macromol **42**(1): 1-5.
- Ebringerová, A. H., Z.; Heinze, T. (2005). "Hemicellulose." Polysaccharides I **186**: 1-67.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, et al. (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." Nat Protoc **2**(4): 953-71.
- Emsley, P., B. Lohkamp, et al. (2010). "Features and development of Coot." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 4): 486-501.
- Evans, P. (2006). "Scaling and assessment of data quality." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 1): 72-82.

- Falkowski, P., R. J. Scholes, et al. (2000). "The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system." Science **290**(5490): 291-6.
- Fengel, D. W., G. (1984). Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, Berlin/New York: Walter de Gruyter.
- Freudenberg, K. (1968). The constitution and biosynthesis of lignin. In Constitution and Biosynthesis of Lignin, New York: Springer-Verlag.
- Fukuchi, K., H. Sakagami, et al. (1989). "Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances." Anticancer Res **9**(2): 313-7.
- Gabrieli, I. G., P.; Glasser, W.G.; Jain, R.K.; Kenne, L. (2000). "Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood." Carbohydrate Polymers **43**(4): 367-374.
- Gaikwad, J. S. M., R. (1994). "Localization and release of  $\beta$ -glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus *Sporotrichum thermophile*." Experimental Mycology **18**(4): 300-310.
- Galbe, M. and G. Zacchi (2002). "A review of the production of ethanol from softwood." Appl Microbiol Biotechnol **59**(6): 618-28.
- Garman, E. F. (2014). "Developments in x-ray crystallographic structure determination of biological macromolecules." Science **343**(6175): 1102-8.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, et al. (2003). "ExpPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Res **31**(13): 3784-8.
- Gouet, P., X. Robert, et al. (2003). "ESPrpt/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins." Nucleic Acids Res **31**(13): 3320-3.
- Gupta, R. J., E.; Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.
- Haki, G. D. and S. K. Rakshit (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." Bioresour Technol **89**(1): 17-34.
- Harada, H., H. Sakagami, et al. (1988). "Induction of antimicrobial activity by antitumor substances from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc." Anticancer Res **8**(4): 581-7.
- Hartman, J. A., A.C.; Lindblad, M.S.; Sjöberg, J. (2006). "Oxygen barrier materials from renewable sources: Material properties of softwood

hemicellulose-based films." Journal of Applied Polymer Science **100**(4): 2985–2991.

- Helliwell, J. R. and E. P. Mitchell (2015). "Synchrotron radiation macromolecular crystallography: science and spin-offs." IUCr **2**(Pt 2): 283-91.
- Hendrickson, W. A. O. C. M. (1997). "Phase Determination from Multiwavelength Anomalous Diffraction Measurements." Methods in Enzymology **276**: 494–523.
- Her, N., G. Amy, et al. (2008). "Characterizing dissolved organic matter and evaluating associated nanofiltration membrane fouling." Chemosphere **70**(3): 495-502.
- Hestrin, S. (1949). "The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application." J Biol Chem **180**(1): 249-61.
- Hirche, C. (2006). Trend Report No. 16: industrial biotechnology–white biotechnology: a promising tool for the chemical industry. ACHEMA 2006 28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology. **16**: 1-7.
- Holladay, J. E., T. A. Werpy, et al. (2004). "Catalytic hydrogenation of glutamic acid." Appl Biochem Biotechnol **113-116**: 857-69.
- Holm, L. and P. Rosenstrom (2010). "Dali server: conservation mapping in 3D." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W545-9.
- Horwath, W. R. (2007). "Carbon Cycling and Formation of Soil Organic Matter." Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry: 303-339.
- Huang, H. J., S. Ramaswamy, et al. (2010). "Process modeling and analysis of pulp mill-based integrated biorefinery with hemicellulose pre-extraction for ethanol production: a comparative study." Bioresour Technol **101**(2): 624-31.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1990). "HERA--a program to draw schematic diagrams of protein secondary structures." Proteins **8**(3): 203-12.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1996). "PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins." Protein Sci **5**(2): 212-20.
- IEA (2008). "International Energy Agency: World Energy Outlook". [www.worldenergyoutlook.org](http://www.worldenergyoutlook.org).

- Imamura, T., T. Watanabe, et al. (1994). "Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*." Phytochemistry **37**(4): 1165-73.
- Imamura, T. W., T.; Kuwahara, M.; Koshijima, T. (1994). "Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*." Phytochemistry **37**(4): 1165-1173.
- Jacobs, A., J. Lundqvist, et al. (2002). "Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy." Carbohydr Res **337**(8): 711-7.
- Jin, A. X. R., J.L.; Peng, F.; Xu, F.; Zhou, G.Y.; Sun R.C.; Kennedy, J.F. (2009). "Comparative characterization of degraded and non-degradative hemicelluloses from barley straw and maize stems: Composition, structure, and thermal properties." Carbohydrate Polymers **78**(3): 609-619.
- Johri, J. K. S., S.; Nautiyal, C.S. (1999). "Occurrence of salt, pH, and temperature tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils." Current Microbiology **39**: 89-93.
- Kabsch, W. (2010). "Xds." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 2): 125-32.
- Kaneko, S., ; Ishii, T.; Kobayashi, H.; Kusakabe, I. (1998). "Substrate specificities of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases produced by two species of *Aspergillus niger*." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **62**: 695-699.
- Karlsson, O. I., T.; Kishimoto, T.; Magara, K.; Matsumoto, Y.; Hosoya, S. "Isolation of lignin-carbohydrate bonds in wood. Model experiments and preliminary application to pine wood." Journal of Wood Science **50**: 142-150.
- Karnaouri, A., E. Topakas, et al. (2013). "Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 beta-glucosidase from *Myceliophthora thermophila*." Peer J **1**: 46.
- Karnaouri, A. C., E. Topakas, et al. (2014). "Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction." Appl Microbiol Biotechnol **98**(1): 231-42.
- Katapodis, P., E. Kalogeris, et al. (2004). "Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media." Appl Microbiol Biotechnol **63**(4): 378-82.

- Katsimpouras, C., A. Benarouche, et al. (2014). "Enzymatic synthesis of model substrates recognized by glucuronoyl esterases from *Podospora anserina* and *Myceliophthora thermophila*." *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(12): 5507-16.
- Kaur, G., S. Kumar, et al. (2004). "Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis." *Bioresour Technol* **94**(3): 239-43.
- Kendrew, J. C., G. Bodo, et al. (1958). "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis." *Nature* **181**(4610): 662-6.
- Khmel'nitsky, Y. L., R. Hilhorst, et al. (1988). "Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions. Cholesterol oxidation catalyzed by cholesterol oxidase." *Eur J Biochem* **176**(2): 265-71.
- Klibanov, A. M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents." *Nature* **409**(6817): 241-6.
- Kohn, R. K. P. (1978). "Dissociation-constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives." *Chemické Zvesti* **32**: 478-485.
- Koshijima, T. W., T. (2003). "Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues." Springer Series in Wood Science.
- Krahe, M. A., G.; Märkl, H. (1996). "Fermentation of extremophilic microorganisms." *FEMS Microbiology Reviews* **18**(2-3): 271-285.
- Kraulis, P. J. (1991). "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." *Journal of Applied Crystallography* **24**(5): 946-950.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2007). "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state." *J Mol Biol* **372**(3): 774-97.
- Kumar, S., C. J. Tsai, et al. (2000). "Factors enhancing protein thermostability." *Protein Eng* **13**(3): 179-91.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-8.
- Laskowski, R. A., D. S. Moss, et al. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." *J Mol Biol* **231**(4): 1049-67.
- Lattman, E. E. L., P.J. (2008). "Protein Crystallography: A Concise Guide." Johns Hopkins University Press.



- Lawoko, M. (2005). Lignin polysaccharide networks in softwood and chemical pulps: characterisation, structure and reactivity. School of Chemical Science and Engineering (CHE), Fibre and Polymer Technology, KTH.
- Lawoko, M. H., G.;Gellerstedt, G. (2006). "Characterization of lignin-carbohydrate complexes from spruce sulfite pulp-lignin-polysaccharide networks." Holzforschung **50**(162-165).
- Lee, S. K., H. Chou, et al. (2008). "Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels." Curr Opin Biotechnol **19**(6): 556-63.
- Leschinsky, M. S., H.; Patt, R. (2009). "Detailed mass balances of the autohydrolysis of Eucalyptus globulus at 170°C." BioResources **4**(2): 687-703.
- Li, X. L., S. Spanikova, et al. (2007). "Identification of genes encoding microbial glucuronoyl esterases." FEBS Lett **581**(21): 4029-35.
- Lopez, B. S., M. Yamamoto, et al. (2009). "A clinical pilot study of lignin--ascorbic acid combination treatment of herpes simplex virus." In Vivo **23**(6): 1011-6.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj, et al. (2000). "Thermophilic fungi: their physiology and enzymes." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 461-88.
- Marchessault, R. H. L., C.Y. (1962). "The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans." Journal of Polymer Science **59**(168): 357-378.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, et al. (2007). "Phaser crystallographic software." J Appl Crystallogr **40**(Pt 4): 658-674.
- McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McPherson, A. (2009). Introduction to Macromolecular Crystallography, 2nd Edition, New York, Wiley-Blackwell.
- McPherson, A. and J. A. Gavira (2014). "Introduction to protein crystallization." Acta Crystallogr F Struct Biol Commun **70**(Pt 1): 2-20.
- Merritt, E. A. and D. J. Bacon (1997). "Raster3D: photorealistic molecular graphics." Methods Enzymol **277**: 505-24.
- Meyer, H. P. and G. Canevascini (1981). "Separation and some properties of two Intracellular beta-glucosidases of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*." Appl Environ Microbiol **41**(4): 924-31.

- Mielenz, J. R. (2001). "Ethanol production from biomass: technology and commercialization status." Curr Opin Microbiol **4**(3): 324-9.
- Mikkonen, S. (2008). "Second-generation renewable diesel offers advantages." Hydrocarbon Processing February: 63-66.
- Moukouli, M., E. Topakas, et al. (2011). "Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*." N Biotechnol **28**(4): 369-74.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, et al. (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-55.
- Nakashima, H., T. Murakami, et al. (1992). "Lignified materials as medicinal resources. V. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of some synthetic lignins." Chem Pharm Bull (Tokyo) **40**(8): 2102-5.
- Nardini, M. and B. W. Dijkstra (1999). "Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 732-7.
- Narodoslowsky, M. (2013). "Chemical engineering in a sustainable economy." Chemical Engineering Research and Design **91**(10): 2021-2028.
- Obst, J. R. (1982). "Frequency and alkali resistance of lignin-carbohydrate bonds in wood." Tappi Journal **65**(4): 109-112.
- Oh-Hara, T., H. Sakagami, et al. (1990). "Antimicrobial spectrum of lignin-related pine cone extracts of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc." In Vivo **4**(1): 7-12.
- Ollis, D. L., E. Cheah, et al. (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." Protein Eng **5**(3): 197-211.
- Örså, F. H., B.; Thornton, J. (1997). "Dissolution and dispersion of spruce wood components into hot water." Wood Science and Technology **31**(4): 279-290.
- Otto, R. T. B., U.T.; Scheib, H.; Pleiss, J.; Sylatk, C.; Schmid, R.D. (1998). "Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: Synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters." Biotechnology Letters **20**(11): 1091-1094.
- Partridge, S. M. (1949). "Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars." Nature **164**(4167): 443.

- Pauling, L. and R. B. Corey (1951a). "Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(5): 235-40.
- Pauling, L. and R. B. Corey (1951b). "Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(11): 729-40.
- Pauling, L. and R. B. Corey (1951c). "The polypeptide-chain configuration in hemoglobin and other globular proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(5): 282-5.
- Pauling, L., R. B. Corey, et al. (1951). "The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(4): 205-11.
- Pecsok, R. L. S., L.D.; Cairns, T.; McWilliam, I.G. (1976). Modern methods of chemical analysis. New York, John Willy&Sons Inc.
- Perlack, R. D. W., L.L.; Turnhollow, A.F.; Graham, R.L.; Stokes, B.J.; Erbach, D.C. (2005). "Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply." Oak Ridge National Laboratory: 59.
- Pokkuluri, P. R., N. E. Duke, et al. (2011). "Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorina*." Proteins **79**(8): 2588-92.
- Polizeli, M. L. R., A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." Applied Microbiology and Biotechnology **67**(5): 577-591.
- Porath, J. (1992). "Immobilized metal ion affinity chromatography." Protein Expr Purif **3**(4): 263-81.
- Prajapati, R. S., M. Das, et al. (2007). "Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability." Proteins **66**(2): 480-91.
- Prentice, C. F., G.; Fasham, M.; Goulden, M.; Heimann, M.; Jaramillo, V.; Kheshgi, H.; Quéré, C.L.; Scholes R.; Wallace, D. (2001). "The carbon cycle and atmospheric CO<sub>2</sub>." Climate Change 2001: The Scientific Basis: Contribution of WGI to the Third Assessment Report of the IPCC.
- Quevillon-Cheruel, S., N. Leulliot, et al. (2005). "Crystal structure of yeast YHR049W/FSH1, a member of the serine hydrolase family." Protein Sci **14**(5): 1350-6.

- Ragauskas, A. J. N., M.; Kim, D.H.; Eckert, C.A.; Hallett, J.P.; Liotta, C.L. (2006). "From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production." Industrial Biotechnology **2**(1): 55-65.
- Ralph, J., R. D. Hatfield, et al. (1998). "NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 12803-8.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, et al. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." J Mol Biol **7**: 95-9.
- Raush, E., M. Totrov, et al. (2009). "A new method for publishing three-dimensional content." PLoS One **4**(10): e7394.
- Ray, B., S. S. Bandyopadhyay, et al. (2011). "Extracellular glycoconjugates produced by cyanobacterium *Wollea saccata*." Int J Biol Macromol **48**(4): 553-7.
- Rhodes, G. (1999). Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models, Elsevier Science and Technology Books, New York.
- Rhodes, G. (2006). Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models, Third Edition, Elsevier Science and Technology Books, New York.
- Richardson, S., J. Lundqvist, et al. (2002). "Initial characterization of ethyl(hydroxyethyl) cellulose using enzymic degradation and chromatographic methods." Biomacromolecules **3**(6): 1359-63.
- Rivero-Urgell, M. S.-O. A. (2001). "Oligosaccharides: application in infant food." Early Human Development **65**: S43-S52.
- Rould, M. A. (2007). "The same but different: isomorphous methods for phasing and high-throughput ligand screening." Methods Mol Biol **364**: 159-82.
- Rupp, B. (2009). Biomolecular crystallography: principles, practice and applications to structural biology, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Sadaf, A. and S. K. Khare (2014). "Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis." Bioresour Technol **153**: 126-30.
- Saha, B. C. (2003). "Hemicellulose bioconversion." J Ind Microbiol Biotechnol **30**(5): 279-91.

- Sakagami, H., M. Ikeda, et al. (1987). "Antitumor activity of polysaccharide fractions from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc." Anticancer Res **7**(6): 1153-9.
- Sakagami, H., T. Kushida, et al. (2010). "Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine." Pharmacol Ther **128**(1): 91-105.
- Sakagami, H., K. Satoh, et al. (2008). "Anti-HIV and vitamin C-synergized radical scavenging activity of cacao husk lignin fractions." In Vivo **22**(3): 327-32.
- Sakagami, H., M. Yoshihara, et al. (1992). "Effect of pine seed shell extract on microbial and viral infection." In Vivo **6**(1): 13-6.
- Sambrook, J. F., E.F.; Maniatis T. (1996). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarikaya, E. H., T.; Adachi, M.; Mikami, B. (2000). "Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules." Process Biochemistry **35**: 711-715.
- Sarkanen, K. V. L., C.H. (1971). Occurrence, Formation, Structure and Reactions, C.H. Wiley-Interscience: New York.
- Satosi, H. S., O.; Kenji, T.; Kazuhisa, K.; Tetsuo, K.; Toshiaki, and K. K.; Hitosi (2001). "Chemo-enzymaticsynthesis of 3-(2-naphtyl)-L-alanine by an amino transferase from the extreme thermophiles *Thermococcus profundus*." Biotechnology Letters **23**: 589-591.
- Schleberger, C., P. Sachelaru, et al. (2007). "Structure and action of a C-C bond cleaving alpha/beta-hydrolase involved in nicotine degradation." J Mol Biol **367**(2): 409-18.
- Schoevaart, R., M. W. Wolbers, et al. (2004). "Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)." Biotechnol Bioeng **87**(6): 754-62.
- Schuttelkopf, A. W. and D. M. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 8): 1355-63.
- Shallom, D. and Y. Shoham (2003). "Microbial hemicellulases." Curr Opin Microbiol **6**(3): 219-28.
- Sheldon, R. A. (2011). "Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)." Appl Microbiol Biotechnol **92**(3): 467-77.

- Shi, Y. (2014). "A Glimpse of Structural Biology through X-Ray Crystallography." Cell **159**(5): 995-1014.
- Singh, B. and T. Satyanarayana (2006). "Phytase production by thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation and its application in dephytinization of sesame oil cake." Appl Biochem Biotechnol **133**(3): 239-50.
- Singh, B. and T. Satyanarayana (2008). "Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications." Bioresour Technol **99**(8): 2824-30.
- Singh, B. and T. Satyanarayana (2009). "Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*." Bioresour Technol **100**(6): 2046-51.
- Singh, B. and T. Satyanarayana (2010). "Plant growth promotion by an extracellular HAP-phytase of a thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*." Appl Biochem Biotechnol **160**(5): 1267-76.
- Sjöström, E. (1993). Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, Academic Press, Orlando.
- Socrates, G. (2001). Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts, Chichester Wiley.
- Spanikova, S. and P. Biely (2006). "Glucuronoyl esterase--novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*." FEBS Lett **580**(19): 4597-601.
- Spanikova, S., M. Polakova, et al. (2007). "Synthetic esters recognized by glucuronoyl esterase from *Schizophyllum commune*." Arch Microbiol **188**(2): 185-9.
- Steentoft, C., S. Y. Vakhrushev, et al. (2013). "Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology." EMBO J **32**(10): 1478-88.
- Stoscheck, C. M. (1990). "Quantitation of protein." Methods Enzymol **182**: 50-68.
- Subramaniam, S. S., S. R. Nagalla, et al. (1999). "Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*." Arch Biochem Biophys **365**(2): 223-30.
- Taylor, G. (2003). "The phase problem." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 11): 1881-90.

- Timell, T. E. (1967). "Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses." Wood Science and Technology **1**(1): 45-70.
- Topakas, E., M. Moukouli, et al. (2010). "Functional expression of a thermophilic glucuronyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine." Appl Microbiol Biotechnol **87**(5): 1765-72.
- Topakas, E., H. Stamatis, et al. (2004). "Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*." Appl Microbiol Biotechnol **63**(6): 686-90.
- Topakas, E. V., C.; Stamatis, H.; Christakopoulos, P. (2005). "Sporotrichum thermophile type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis." Enzyme and Microbial Technology **36**(5): 729-736.
- Vafiadi, C., E. Topakas, et al. (2007). "Chemoenzymatic synthesis of feruloyl D-arabinose as a potential anti-mycobacterial agent." Biotechnol Lett **29**(11): 1771-4.
- Vafiadi, C., E. Topakas, et al. (2008). "Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation." J Biotechnol **133**(4): 497-504.
- Vafiadi, C., E. Topakas, et al. (2009). "Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*." FEMS Microbiol Lett **296**(2): 178-84.
- Vafiadi, C., E. Topakas, et al. (2006). "Regioselective esterase-catalyzed feruloylation of L-arabinobiose." Carbohydr Res **341**(12): 1992-7.
- van Gool, M. P., K. Toth, et al. (2012). "Performance of hemicellulolytic enzymes in culture supernatants from a wide range of fungi on insoluble wheat straw and corn fiber fractions." Bioresour Technol **114**: 523-8.
- van Heiningen, A. (2006). "Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery." Pulp and Paper Canada **107**(6): 38-43.
- Vardakou, M., P. Katapodis, et al. (2003). "Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan." Int J Biol Macromol **33**(1-3): 129-34.
- Vega-Sanchez, M. E. and P. C. Ronald (2010). "Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement." Curr Opin Biotechnol **21**(2): 218-24.

- Vermuë, M.H. and Tramper, J. (1995). "Interrelations of chemistry and biotechnology 5. Biocatalysis in nonconventional media — medium engineering aspects." Pure & Applied Chem. **67**: 345–373.
- Vieille, C., D. S. Burdette, et al. (1996). "Thermostables." Biotechnol Annu Rev **2**: 1-83.
- Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." Microbiol Mol Biol Rev **65**(1): 1-43.
- Viikari, L., M. Alapuranen, et al. (2007). "Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis." Adv Biochem Eng Biotechnol **108**: 121-45.
- Vodenicarova, M., G. Drimalova, et al. (2006). "Xyloglucan degradation using different radiation sources: a comparative study." Ultrason Sonochem **13**(2): 157-64.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." EMBO J **1**(8): 945-51.
- Wallace, A. C., R. A. Laskowski, et al. (1995). "LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions." Protein Eng **8**(2): 127-34.
- Watanabe, T., T. Sato, et al. (1992). "Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase." Eur J Biochem **209**(2): 651-9.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "The structure of DNA." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **18**: 123-31.
- Werpy, T. P., G. (2004). "Top Value Added Chemicals from Biomass." Department of Energy, Office of Scientific and Technical Information.
- Westerberg, N. (2012). "Chromatographic separation of wood constituents." Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology.
- Willför, S. S., K; Tenkanen, M; Holmbom, B. (2008). "Spruce-derived mannans—A potential raw material for hydrocolloids and novel advanced natural materials." Carbohydrate Polymers **72**(2): 197-210.
- Wingren, A. G., M.; Zacchi, G. (2003). "Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks." Biotechnology Progress **19**(4): 1109–1117.



- Winn, M. D., C. C. Ballard, et al. (2011). "Overview of the CCP4 suite and current developments." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 235-42.
- Wittlich, P. T., A.; Vorlop, K.D. (2001). "Conversions of glycerol to 1,3-propandiol by a newly isolated thermophilic strain." Biotechnology Letters **23**: 463-466.
- Wong, D. W., V. J. Chan, et al. (2012). "Functional Cloning and Expression of the *Schizophyllum commune* Glucuronoyl Esterase Gene and Characterization of the Recombinant Enzyme." Biotechnol Res Int **2012**: 951267.
- Woodley, J. M. (2013). "Protein engineering of enzymes for process applications." Curr Opin Chem Biol **17**(2): 310-6.
- Xu, C., A. Pranovich, et al. (2008). "Kinetics of acid hydrolysis of water-soluble spruce O-acetyl galactoglucomannans." J Agric Food Chem **56**(7): 2429-35.
- Yeoman, C. J., Y. Han, et al. (2010). "Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry." Adv Appl Microbiol **70**: 1-55.
- Yoon, S.-H. M., K.; van Heiningen, A. (2008). "Hot-water pre-extraction from loblolly pine (*Pinus taeda*) in an integrated forest products biorefinery." Tappi Journal **7**(6): 27-32.
- Yuan, T. Q., S. N. Sun, et al. (2011). "Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative <sup>13</sup>C and 2D HSQC NMR spectroscopy." J Agric Food Chem **59**(19): 10604-14.
- Yun, J. W. (1996). "Fructooligosaccharides—occurrence, preparation and application." Enzyme and Microbial Technology **19**: 107-117.
- Zanoelo, F. F., L. Polizeli Md Mde, et al. (2004). "Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta- D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*." J Ind Microbiol Biotechnol **31**(4): 170-6.
- Βαλαβανίδης, Α. (2006). «Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Καμίτσος, Ε. Ι., Χρυσικός, Γ.Δ. (1999). «Εφηρμοσμένη Μοριακή Φασματοσκοπία - Στοιχεία Φασματοσκοπίας Υπερύθρου.» Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Κορδοπάτης, Π., Μαγκαφά, Β. (2005). «Μεθοδολογία απομόνωσης και ταυτοποίησης φυσικών προϊόντων ΙΙ. Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων», Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.