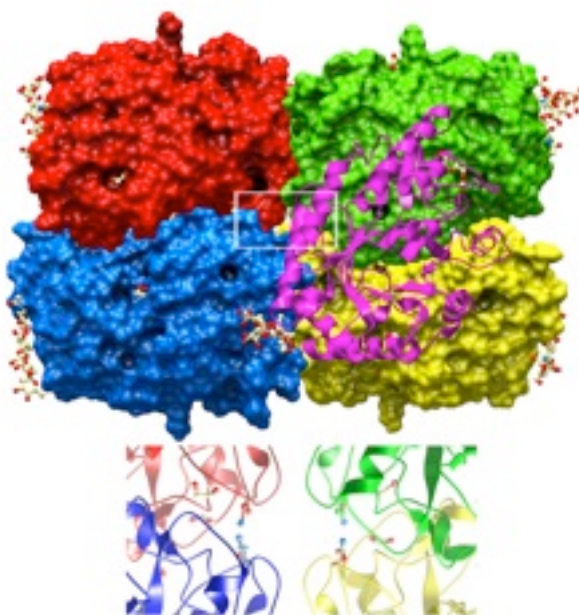




**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ  
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ**



**ΜΑΡΙΑ Β. ΔΗΜΑΡΟΓΚΩΝΑ**

**Επιβλέπων Καθηγητής : Π. Χριστακόπουλος**

**Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

**ΑΘΗΝΑ 2012**



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ  
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ**

**ΜΑΡΙΑ Β. ΔΗΜΑΡΟΓΚΩΝΑ**

**Επιβλέπων Καθηγητής : Π. Χριστακόπουλος**

**Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

*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,  
Βασίλη και Θεανώ*

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Αναπληρωτής Καθηγητής Χριστακόπουλος Παύλος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Κέκος Δημήτριος

Καθηγητής Κολίσης Φραγκίσκος

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Καθηγητής Βοργιάς Κωνσταντίνος

Καθηγητής Κέκος Δημήτριος

Καθηγητής Κολίσης Φραγκίσκος

Καθηγητής Λυμπεράτος Γεράσιμος

Αναπληρωτής Καθηγητής Χριστακόπουλος Παύλος

Επίκουρος Καθηγητής Μπεθάνης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής Χατζηνικολάου Δημήτριος

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας (ΙΟΦΧ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.).

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο για την ανάθεση της διατριβής αλλά και για τη διαρκή συμπαράσταση, καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθ. Δημήτρη Κέκο και Καθ. Φραγκίσκο Κολίση για την εμπιστοσύνη τους αλλά και τον αείμνηστο Νίκο Οικονομάκο η συμβολή του οποίου στη διάδοση της Δομικής Βιολογίας στην Ελλάδα είναι ανεκτίμητη και αποτελεί κληρονομιά για τις νέες γενιές επιστημόνων.

Τον Λέκτορα Ευάγγελο Τόπακα και την Ερευνήτρια Ευαγγελία Χρυσίνα, που όλα αυτά τα χρόνια με στήριξαν πνευματικά και ψυχικά, θέτοντας παράλληλα τις προϋποθέσεις για την ανάπτυξη της επιστημονικής μου σκέψης.

Την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Μουκούλη γιατί με βοήθησε σημαντικά κατά την εκπόνηση των αρχικών πειραμάτων της εργασίας αυτής και ήταν πάντα πρόθυμη να ακούσει τους προβληματισμούς μου και να μοιραστεί τις γνώσεις της.

Την Καθηγήτρια Leila Lo Leggio για τη φιλοξενία της στο Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης (Δανία) και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου και τον Καθηγητή Claus Felby για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Δασικών Μελετών του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης.

Το επιστημονικό προσωπικό των εγκαταστάσεων συγχροτρονικής ακτινοβολίας SRS, Daresbury Laboratory (Αγγλία), EMBL Hamburg outstation – σταθμός X13 (Αμβούργο, Γερμανία), MAXLAB – σταθμός 911-2 (Lund, Σουηδία) για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Τις εταιρείες SEKAB E-Technology (Örnköldsvik, Σουηδία), Innventia AB (Στοκχόλμη, Σουηδία) και Inbicon για την παροχή υποστρωμάτων.

Το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική υποστήριξη.

Τους συναδέλφους και φίλους από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του ΕΜΠ και του ΙΟΦΧ του ΕΙΕ για το ευχάριστο περιβάλλον συνεργασίας και φιλίας.

Τους φίλους και την οικογένειά μου χωρίς τους οποίους θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί η διδακτορική αυτή διατριβή.

## Περίληψη

Τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων αποτελούν την πιο άφθονη πηγή οργανικού άνθρακα στη γη και η αξιοποίησή τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές έχει προσελκύσει τα τελευταία χρόνια έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Τα ένζυμα που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της εφαρμογής τους σε πληθώρα διεργασιών όπως είναι η βιομηχανία χάρτου, η αρτοποιία, η υφαντουργία, η παραγωγή ζωοτροφών και απορρυπαντικών και η παραγωγή βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη κυτταρινούχα φυτά, αγροτικά ή δασικά παραπροϊόντα ή ακόμα και απορρίματα. Ειδικότερα, οι ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων ετών έχουν στραφεί στη μείωση του ενζυμικού φορτίου και κατά συνέπεια του κόστους που απαιτείται για τη μετατροπή της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα ώστε να είναι εφικτή και συμφέρουσα η παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανικό επίπεδο.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας με τη βοήθεια εργαλείων μοριακής και δομικής βιολογίας. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά δύο πρωτεΐνες της οικογένειας 61 της βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database) και μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά δύο ένζυμα η δράση των οποίων ήταν ήδη γνωστή, μία ξυλανάση και μία εστεράση του φερουλικού οξέος.

Αρχικά γίνεται μία ανασκόπηση της σύστασης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και των ενζύμων που συμβάλλουν στην αποικοδόμησή του. Τα ένζυμα αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε οικογένειες ανάλογα με την αμινοξική τους αλληλουχία. Αναλύονται ειδικότερα οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των ενζύμων που ανήκουν στις οικογένειες των γλυκοζιδικών υδρολασών 61 και 10 της CAZy και που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Παρουσιάζεται επίσης η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X ως εργαλείο για τη δομική μελέτη των μακρομορίων.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας 61 που μελετήθηκαν προέρχονταν από τους μύκητες *Fusarium oxysporum* (FoCel61) και *Sporotrichum thermophile* (StCel61). Κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν μέσω της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris* και χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να υδρολύουν μία ποικιλία σακχαρούχων υποστρωμάτων. Εξετάστηκε επίσης η συμβολή τους στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας παρουσία των κλασικών κυτταρινασών και συσχετίστηκε η παρατηρούμενη συνεργιστική δράση με τη



σύσταση των χρησιμοποιούμενων υλικών. Βρέθηκε ότι τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το βαθμό μετατροπής των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων όταν συνδυάζονται με τα γνωστά υδρολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται ευρέως στις διεργασίες αυτές και ότι η βελτίωση αυτή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λιγνίνη.

Η δομική μελέτη δύο ημικυτταρινασών που προέρχονται από το *F. oxysporum*, μίας ξυλανάσης της οικογένειας 10 (*FoXyn10a*) και μίας εστεράσης του φερουλικού οξέος τύπου C (*FoFaeC*) πραγματοποιήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Κρύσταλλοι των δύο ενζύμων με ικανότητα περίθλασης των ακτίνων X αναπτύχθηκαν σε μία ποικιλία συνθηκών. Για τον προσδιορισμό της δομής της *FoXyn10a* εφαρμόστηκε η τεχνική της μοριακής αντικατάστασης χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή μίας ομόλογης ξυλανάσης από το *Cellomonas fimi*. Η καινούρια δομή ανέδειξε ότι η *FoXyn10a* υιοθετεί τη διαμόρφωση  $(\beta/\alpha)_8$  barrel, μία αναδίπλωση κοινή σε όλα τα μέλη της οικογένειας 10, αλλά και την παρουσία ενός καινούριου βρόχου κοντά στην είσοδο του ενεργού κεντρού με πιθανό λειτουργικό ρόλο.

## Abstract

Plant cell walls are the most abundant source of organic carbon on the planet and their exploitation in biotechnological applications has attracted significant research interest. The enzymes implicated in plant biomass degradation are employed in a variety of industrial processes, ranging from paper, bread-making, textile, animal feed and detergent industry to the production of second generation bioethanol from cellulosic plants, agricultural and forestry byproducts or waste. Recent research efforts have focused on the reduction of protein loading required for the breakdown of lignocellulose to fermentable sugars, as the enzymic cost is currently the main obstacle of bioethanol production at industrial scale. The aim of the present PhD thesis was the biochemical and structural study of biocatalysts implicated in plant cell wall degradation. Two enzymes that belong to family glycoside hydrolase (GH) family 61 of CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) database were characterized biochemically while structural studies were carried out on a xylanase and a feruloyl esterase.

In the first part of the thesis, the plant cell wall composition as well as the enzymes involved in its degradation are described. The latter have been divided into different families based on their amino acid sequence. The properties and characteristics of enzymes that belong to the GH families 61 and 10 of CAZy database are presented in more detail. The basic principles of X-ray crystallography, employed for the structural study of macromolecules, are also outlined.

*FoCel61*, a *Fusarium oxysporum* GH61 and *StCel61*, a *Sporotrichum thermophile* GH61 were cloned and heterologously expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Their ability to hydrolyze a variety of polysaccharide substrates was subsequently investigated. Synergism experiments were performed by combining these enzymes with common cellulases and the resulting findings were correlated to the composition of the hydrolyzed material. It was found that both enzymes had the ability to increase the degree of lignocellulose conversion when combined with other cellulases and that this enhancing effect was dependent on the lignin content of the substrate.

The structural characterization of two hemicellulases derived from *F. oxysporum*, a GH10 xylanase (*FoXyn10a*) and a type C feruloyl esterase (*FoFaeC*) was performed by X-ray crystallography. Diffracting crystals of both enzymes were grown under a variety of

conditions. The structure of *FoXyn10a* was solved by molecular replacement using an homologous *Cellumonas fimi* xylanase as a starting model. *FoXyn10a* folds in the classical  $(\beta/\alpha)_8$  barrel (TIM barrel) while the most striking difference observed, upon comparison with related GH10 structures, is the presence of an elongated loop above the catalytic cleft with possible functional role.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Dimarogona M., Topakas E., Olsson L., Christakopoulos P. **Radical scavenging capacity of lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*.** *Bioresource Technology*, accepted.

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E.D. **A new crystal structure of a *Fusarium oxysporum* GH10 xylanase reveals the presence of an extended loop on top of the catalytic cleft.** *Acta Crystallographica Section D*, accepted.

Topakas E, Moukouli M, Dimarogona M, Christakopoulos P. **Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, in press.

Topakas E., Moukouli M., Dimarogona M., Vafiadi C., Christakopoulos P. **Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 87(5):1765-72.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P. **Cloning, expression and characterization of a family 61 glycoside hydrolase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*.** Carbohydrate Bioengineering Meeting, 15-18 Μαΐου, 2011, Lisbon, Portugal.

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E. D. **Crystal structure of a new endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* determined at 1.9 Å resolution.** 11<sup>th</sup> Hellenic Symposium on Catalysis. October 22-23, 2010, Athens, Greece.

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P. **Synergistic enhancement of cellulase performance on Hydrothermal pretreated wheat straw by the addition of GH-61 activity.** 4<sup>th</sup> Annual Workshop of COST FP0602 September 21-24, 2010, Cesme, Izmir, TURKEY.

Topakas E., Moukouli M., Dimarogona M., Vafiadi C., Christakopoulos P. **Identification of the nucleophilic serine in glucuronoyl esterases.** 4<sup>th</sup> Annual Workshop of COST FP0602. September 21-24, 2010, Cesme, Izmir, TURKEY.

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E. D. **Crystal structure of a new endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* determined at 1.9 Å resolution.** 5<sup>th</sup> International Conference of the Hellenic Crystallographic Association. September 24-25, 2010, Larissa, Greece.

Vafiadi C., Dimarogona M., Christakopoulos P. **Study on the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass pretreated with ionic liquids.** 60<sup>th</sup> Meeting of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. November 20-22, 2009, Athens, Greece.

Dimarogona M., Moukouli M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E. D. **Structural Studies of new hemicellulose degrading enzymes.** The 4<sup>th</sup> Conference of the Hellenic Crystallographic Association. September 26-27, 2008, Athens, Greece.

Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P., Chrysina E. D. **Structural studies of a new alkaline xylanase (FoXyn10a) from *Fusarium oxysporum* F3.** 33<sup>rd</sup> FEBS Congress. June 28 - July 3, 2008, Athens, Greece.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΧΟΛΕΙΑ

**EMBO Practical Course: “Computational structural biology - from data to structure to function”**, November 2011, Cambridge, UK.

**PhD course on Biotechnology for Bioethanol Production.** October 2009, Goteborg, Sweden.

**International School of Biological Magnetic Resonance: 9<sup>th</sup> Course.** Biophysics and Structure to Counter Threats and Challenges. June 2009, Erice, Sicily.

**EMBO Practical Course “X-ray crystal structure determination of macromolecules”** September 2008, Saint-Aubin, France.

**EMBO Practical Course “Protein expression, purification and crystallization” (PEPC6)** September 2008, Hamburg, Germany.

**TID Workshop “From Crystals to Structures”** June 2008, Crete, Greece.

Συντμήσεις.....	5
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.1 Η ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.....	7
1.1.1 Σύσταση, ιδιότητες και δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.....	7
1.1.2 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρικού τοιχώματος.....	13
1.1.3 Οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων CAZy.....	14
1.1.3.1 Ο παράγοντας διάσπασης της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης.....	15
1.1.3.2 Οι πρώτες ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με την οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων CAZy.....	16
1.1.3.3 Δομικές μελέτες των μελών της οικογένειας 61.....	17
1.1.3.4 Ο μηχανισμός δράσης της CBP21.....	18
1.1.3.5 Οξειδοαναγωγική αποδόμηση κυτταρίνης: ένας μηχανισμός παράλληλος στις κλασσικές υδρολυτικές κυτταρινάσες.....	19
1.1.3.6 Η οικογένεια 61- προοπτικές.....	22
1.1.4 Η οικογένεια 10 της βάσης δεδομένων CAZy.....	23
1.1.4.1 Τα δομικά χαρακτηριστικά των GH10s.....	25
1.2 Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ως εργαλείο για τη μελέτη βιοκαταλυτών που αποδομούν την ημικυτταρίνη.....	27
1.2.1 Πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία - εισαγωγή.....	27
1.2.2 Βασικές αρχές της μεθόδου.....	28
1.2.3.1 Η φύση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων.....	31
1.2.3.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	33
1.2.4 Περίθλαση ακτίνων-X.....	36
1.2.5 Τεχνικές προσδιορισμού της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.....	38
1.2.6 Κατασκευή και βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής δομής.....	39
1.2.7 Από τη δομή στη λειτουργία.....	42
2. Υλικά και μέθοδοι.....	43
2.1 Μοριακή βιολογία.....	43
2.1.1 Όργανα.....	43
2.1.2 Μικροοργανισμοί.....	44
2.1.3 Χημικά, ένζυμα και τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (κιτ).....	45

2.1.4 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.....	45
2.1.4 Μοριακές Τεχνικές .....	46
2.1.4.1 Απομόνωση DNA.....	46
2.1.4.2 Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)....	47
2.1.4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	50
2.1.4.4 Αντίδραση συνένωσης ενθέματος και πλασμιδιακού φορέα.....	51
2.1.4.5 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> (TOP10 και TOP10F') ..	53
2.4.1.5α Προετοιμασία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων για χημικό μετασηματισμό .....	53
2.1.4.5β Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων .....	53
2.1.4.6 Ανάκτηση πλασμιδίων από τα μετασηματισμένα βακτήρια.....	54
2.1.4.7 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	54
2.1.4.8 Μετασηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i> με ηλεκτροδιάτρηση .....	54
2.1.4.8α. Προετοιμασία πλασμιδίου και κυττάρων .....	55
2.1.4.8β Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> .....	56
2.1.4.9 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασηματισμένα κύτταρα <i>P. pastoris</i> .....	56
2.1.4.9α Επιλογή κλώνου έκφρασης με τρυβλία MM και καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	56
2.1.4.9β Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.....	57
2.1.4.10 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	58
2.1.4.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	59
2.1.4.11α Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου.....	59
2.1.4.11β Προετοιμασία δειγμάτων - ηλεκτροφόρηση.....	60
2.1.4.12 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Isoelectric focusing-PAGE, IEF- PAGE). .....	61
2.1.4.13 Ενζυμική απογλυκοζυλίωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	61
2.1.4.14 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης .....	62
2.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός .....	62
2.2.1 Ένζυμα.....	62

2.2.2 Υποστρώματα και αντιδραστήρια .....	62
2.2.3 Ανίχνευση ενεργότητας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	64
2.2.4 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης και προσδιορισμός σταθερότητας.....	64
2.2.5 Μελέτη πρόσδεσης σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες .....	65
2.2.6 Αντιδράσεις υδρόλυσης και πειράματα συνεργιτισμού .....	65
2.2.7 Πειράματα συνεργιτισμού με θερμοφιλα ένζυμα .....	66
2.2.8 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων .....	66
2.2.9 Μελέτη επίδρασης δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα των GH61 .....	67
2.3 NMR στο Πεδίο του Χρόνου (Time Domain NMR).....	68
2.4 Κρυσταλλογραφικές μελέτες .....	71
2.4.1 Πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για κρυστάλλωση.....	71
2.4.2 Βελτιστοποίηση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης .....	72
2.4.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ.....	73
2.4.4 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής και έλεγχος αξιοπιστίας πρωτεϊνικού μοντέλου.....	74
3. Παραγωγή και βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο πρωτεϊνών της οικογένειας 61 της βάσης δεδομένων CAZy.....	76
3.1 GH61 από το θερμοφιλο μύκητα <i>Sporotrichum thermophile</i> ( <i>StCel61</i> ) .....	76
3.1.1 Επιλογή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του <i>S. thermophile</i>	76
3.1.2 Ενίσχυση ακολουθίας, κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> .....	79
3.1.3 Επιλογή κλώνου για την έκφραση και παραγωγή της <i>StCel61</i> .....	80
3.1.4 Παραγωγή και καθαρισμός της <i>StCel61</i> .....	81
3.1.5 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>StCel61</i> .....	82
3.1.6 Πειράματα συνεργιτισμού με κυτταρινάσες.....	85
3.1.7 Πειράματα συνεργιτισμού με θερμοφιλα ένζυμα .....	88
3.1.8 Επίδραση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση στη λειτουργία της <i>StCel61</i> ....	89
3.1.9 Μελέτη επίδρασης δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της <i>StCel61</i> .....	91
3.1.10 Κρυσταλλογραφικές μελέτες της <i>StCel61</i> .....	93



3.1.10.1 Κλωνοποίηση και έκφραση του καταλυτικού τομέα της <i>StCel61</i> ( <i>StCel61 truncated</i> ).....	93
3.1.10.2 Δοκιμές κρυστάλλωσης <i>StCel61</i> .....	94
3.2 GH61 από το νηματοειδή μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> ( <i>FoCel61</i> ).....	95
3.2.1 Επιλογή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του <i>F. oxysporum</i>	95
3.2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της <i>FoCel61</i> .....	99
3.2.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της <i>FoCel61</i> .....	100
3.2.4 Πειράματα συνεργιτισμού με κυτταρινάσες.....	102
3.2.6 Κρυσταλλογραφικές μελέτες <i>FoCel61</i> .....	106
4. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της ξυλανάσης <i>FoXyn10a</i> .....	108
4.1 Ανάλυση της αλληλουχίας της <i>FoXyn10a</i> με βάση το γονιδίωμα του <i>F. oxysporum</i> .....	108
4.2 Παραγωγή και καθαρισμός της <i>FoXyn10a</i> .....	108
4.3 Κρυστάλλωση <i>FoXyn10a</i> και συλλογή δεδομένων περίθλασης.....	109
4.4 Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομής.....	111
4.5 Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας με βάση τη δομή .....	118
4.6 Ανάλυση της τριδιάστατης δομής της <i>FoXyn10a</i> .....	121
4.6 Ενεργό κέντρο.....	125
4.7 Σύγκριση της τριδιάστατης δομής της <i>FoXyn10a</i> με δομές δομικά ομόλογων ξυλανασών.....	127
4.8 Ο βρόχος L6 και ο πιθανός του ρόλος στην ενζυμική λειτουργία.....	129
5. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της εστεράσης του φερουλικού οξέος <i>FoFaeC</i> .....	130
5.1 Ανάλυση της αλληλουχίας της <i>FoFaeC</i> με βάση το γονιδίωμα του <i>F. oxysporum</i> .....	130
5.2 Παραγωγή και καθαρισμός της <i>FoFaeC</i> .....	131
5.3 Δοκιμές κρυστάλλωσης <i>FoFaeC</i> .....	132
5.3.1 Αρχική σάρωση πλήθους συνθηκών κρυστάλλωσης .....	132
6. Συμπεράσματα – Μελλοντικές Προτάσεις .....	138
7. Βιβλιογραφία .....	142

## Συντμήσεις

MB	:	Μοριακό Βάρος
P.Δ.	:	Ρυθμιστικό Διάλυμα
ΥΑΣ	:	Υδροθερμικά κατεργασμένο Άχυρο Σίτου
BMGY	:	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMG	:	Buffered Methanol-complex Medium
CAZy	:	Carbohydrate-Active enZYmes Database
CBM	:	Carbohydrate Binding Module, Τομέας Πρόσδεσης Πολυσακχαρίτη
CE	:	Carbohydrate Esterases, Εστεράσες Πολυσακχαριτών
CMC	:	CarboxyMethylCellulose, καρβοξυ-μεθυλοκυτταρίνη
CDH	:	Cellobiose Dehydrogenase
Dha	:	3-deoxy- <i>D</i> -lyxo-2-heptulosaric acid, 3-δεοξυ- <i>D</i> -lyxo-2-επτουροσαρικό οξύ
DNS	:	3,5-DiNitroSalicylic acid, 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ
DPPH	:	2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζύλιο
EDTA	:	EthyleneDiamineTetraAcetic acid, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EMBL	:	European Molecular Biology Laboratory
EPR	:	Electronic Paramagnetic Resonance, Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός
GalA	:	Galacturonic Acid, γαλακτουρονικό οξύ
GH	:	Glycoside Hydrolase, Γλυκοζιδική Υδρολάση
IEF	:	IsoElectric Focusing, Ηλεκτροφόρηση Ισοηλεκτρικής Εστίασης
ILTC	:	Ionic Liquid Treated Cellulose, κυτταρίνη που έχει υποστεί κατεργασία με ιοντικό υγρό
ITC	:	Isothermal Titration Calorimetry, Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης
MES	:	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid, 2-( <i>N</i> -μορφολινο)αιθανοσουλφονικό οξύ
NDSB-201	:	3-(1-pyridino)-1-propane sulfonate, 3-(1-πυριδινο)-1-προπανο σουλφονικό οξύ

NMR	:	Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
OD <sub>600</sub>	:	Optical Density, οπτική πυκνότητα στα 600 nm
PASC	:	Phosphoric Acid Swollen Cellulose, κυτταρίνη διογκωμένη μετά από κατεργασία με φωσφορικό οξύ
PCR	:	Polymerase Chain Reaction, Αλυσωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PDB	:	Protein Data Bank, Πρωτεϊνική βάση δεδομένων
PEG	:	PolyEthyleneGlycol, πολυαιθυλενογλυκόλη
pI	:	Isoelectric Point, ισοηλεκτρικό σημείο
PL	:	Polysaccharide Lyases, Λυάσες Πολυσακχαριτών
PMO	:	Polysaccharide Monooxygenase
Rha	:	Rhamnose, ραμνόζη
TCEP	:	Tris (2-CarboxyEthyl)Phosphine, τρις (2-καρβοξυαιθυλο)φωσφίνη
Tris	:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane, τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο
YNB	:	Yeast Nitrogen Base, αζωτούχος βάση ζύμης
YPD(S)	:	Yeast extract, Peptone, dextrose, (Sorbitol), εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, δεξτρόζη, (σορβιτόλη)
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulphate, δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο

## **1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1.1 Η ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος**

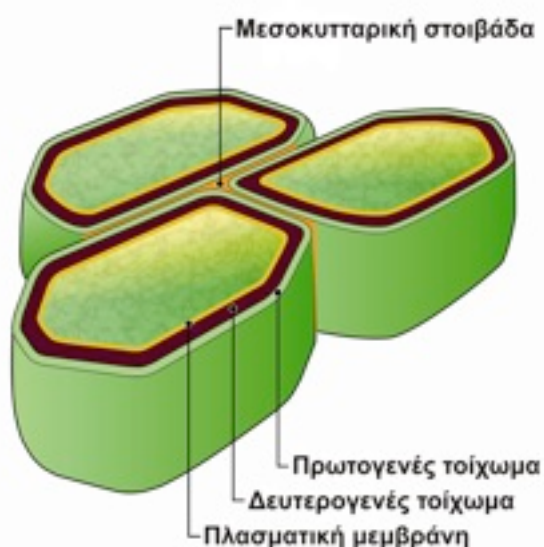
Η ενζυμική αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, λόγω της σύνθετης φύσης του και της περίπλοκης δομής του, απαιτεί τη συνεργιστική δράση ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτών που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση και το μηχανισμό δράσης τους. Τα ένζυμα που διασπούν, τροποποιούν ή σχηματίζουν γλυκοζιδικούς δεσμούς έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία σε μία διαρκώς αναπτυσσόμενη βάση δεδομένων, την CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database, <http://www.cazy.org/>) (Cantarel, Coutinho et al. 2009). Η CAZy σήμερα διαθέτει 128 οικογένειες γλυκοζιδικών υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GHs), 94 γλυκοζυλ-τρανσφερασών (GlycosylTransferases, GTs), 22 λυασών (Polysaccharide Lyases, PLs) και 16 εστερασών των πολυσακχαριτών (Carbohydrate Esterases, CEs) και 64 οικογένειες πρωτεϊνών πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBMs). Μόνο το 3% των ενζύμων που ανήκουν στην CAZy έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά ενώ η τρισδιάστατη δομή μόλις του 0.3% αυτών έχει προσδιορισθεί (Gilbert 2010). Τα παραπάνω ποσοστά αναδεικνύουν την τεράστια προσπάθεια που πρέπει να καταβληθεί ακόμα προκειμένου να διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός ενζυμικής αποικοδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.

#### **1.1.1 Σύσταση, ιδιότητες και δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος**

Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την αξιοποίηση της φυτικής βιομάζας ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιοκαυσίμων με σκοπό τη μερική αντικατάσταση του πετρελαίου από την ανανεώσιμη αυτή πηγή ενέργειας. Η διαδικασία της παραγωγής βιοαιθανόλης περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος σε μονοσακχαρίτες και εν συνεχεία τη μετατροπή τους μέσω ζύμωσης σε αιθανόλη. Ένα από τα βασικότερα προβλήματα κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων σε μεγάλη κλίμακα είναι το υψηλό κόστος του απαιτούμενου ενζυμικού φορτίου που οφείλεται στις εξαιρετικά ανθεκτικές στην αποικοδόμηση δομές των φυτικών τοιχωμάτων. Το τρέχον κόστος των κυτταρινασών υπολογίζεται σε 0.03 με 0.08 € ανά L παραγομένης αιθανόλης.

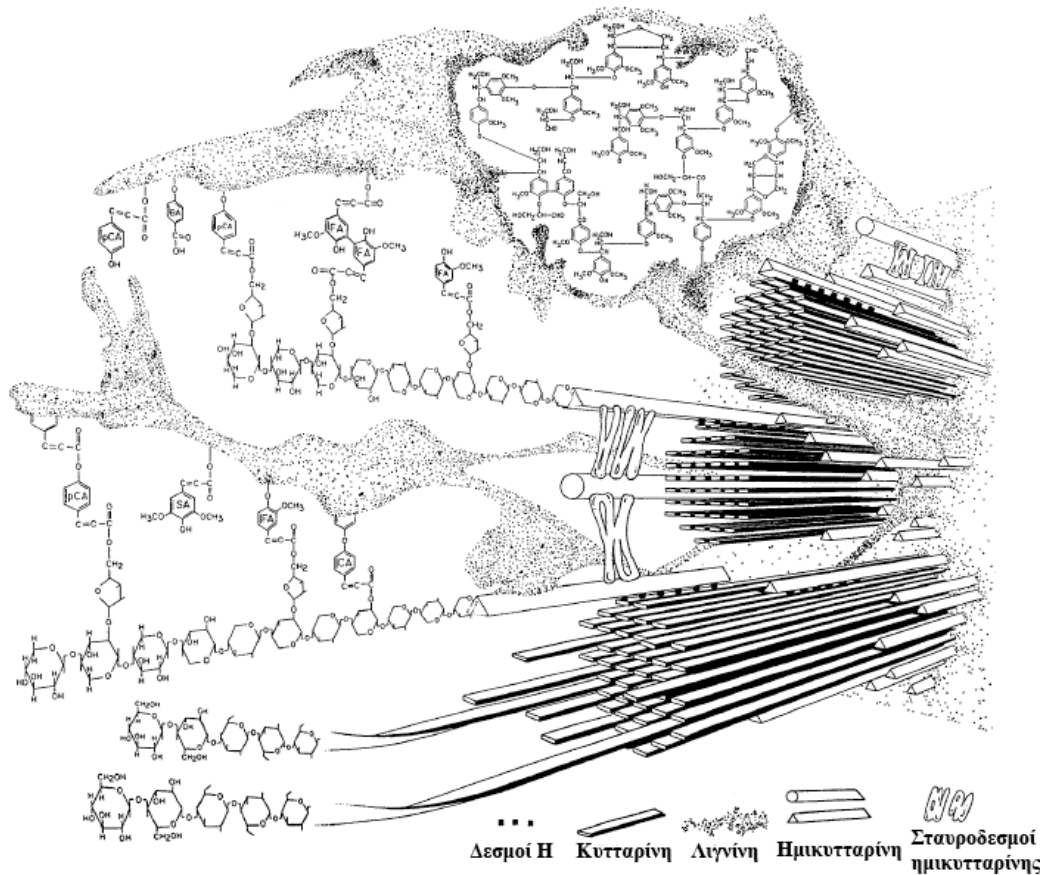
Μελλοντικός στόχος είναι η μείωση κατά 10 φορές του κόστους των κυτταρινασών. Για παράδειγμα, απαιτείται ενζυμικό φορτίο περίπου 25 mg μυκητιακής κυτταρινάσης για την υδρόλυση 1g προκατεργασμένης κυτταρίνης ενώ η δοσολογία για την υδρόλυση αντίστοιχων ποσών αμύλου απο αμυλάσες είναι 100 φορές μικρότερη. Ο στόχος είναι οι κυτταρινάσες να βελτιωθούν καταλυτικά ώστε να υδρολύουν την ίδια ποσότητα κυτταρίνης χρησιμοποιώντας το 1/10 του ενζυμικού φορτίου.

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί βασικό δομικό και λειτουργικό στοιχείο των φυτικών κυττάρων. Επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών όπως τη διαμόρφωση του σχήματος των κυττάρων που δομούν τους φυτικούς ιστούς και όργανα, την άμυνα απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς, τη διακυτταρική επικοινωνία και την αποθήκευση θρεπτικών ουσιών (Brett 1990). Δύο γειτονικά νεαρά φυτικά κύτταρα δημιουργούν πρώτα λεπτά και σχετικά ευλύγιστα τοιχώματα, τα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα που αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ένας άλλος πολυσακχαρίτης, η πηκτίνη, ως κολλώδης ουσία, συγκολλά και συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Ορισμένα, όμως, κύτταρα δημιουργούν ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που ισχυροποιεί επιπρόσθετα τη μηχανική υποστήριξη του φυτού (Εικόνα 1.1). Μετά τη νέκρωση των πιο πάνω κυττάρων δημιουργείται ο ξυλώδης κορμός των δένδρων.



**Εικόνα 1.1** Η δομή των φυτικών κυττάρων.

Στην πράξη, ωστόσο, το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του φυτού καθώς και την προέλευση και την ηλικία του ιστού, με τρόπο ώστε να μην είναι δυνατή μία γενική περιγραφή της σύστασης και της δομής του (Keegstra 2010). Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζονται τα επιμέρους συστατικά και η διάταξή τους στο δευτερογενές τοίχωμα κυττάρων χόρτου όπως αποτυπώθηκαν από τον Bidlack και τους συνεργάτες του (Bidlack 1992).



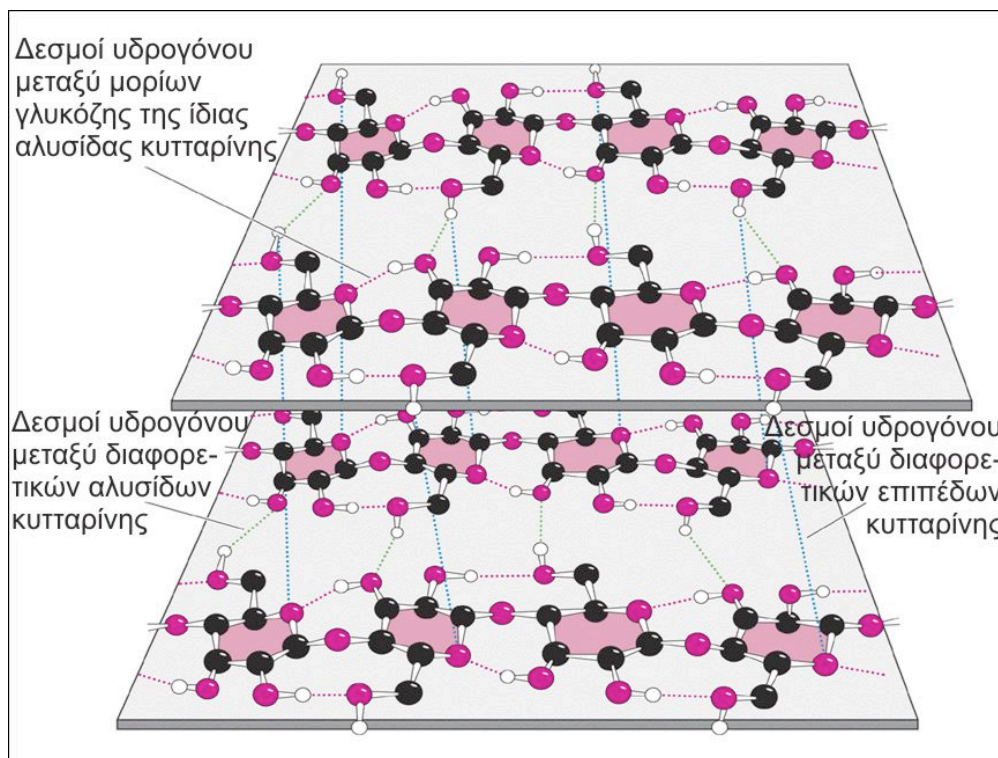
**Εικόνα 1.2** Σχηματική αναπαράσταση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος χόρτου (Bidlack 1992). Οι ίνες κυτταρίνης και οι αλυσίδες της ημικυτταρίνης είναι βυθισμένες στο στρώμα της λιγνίνης.

Τα βασικά βιοπολυμερή που απαντώνται στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα είναι οι πολυσακχαρίτες κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη καθώς και το ετερογενές αρωματικό πολυμερές λιγνίνη.

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και ονομάστηκε έτσι από τον Anselme Payen (19<sup>ος</sup> αιώνας) που τον όρισε σαν τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων και έτσι τον ονόμασε cellulose (cell =

κύτταρο). Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με  $\beta$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβάσιμη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.

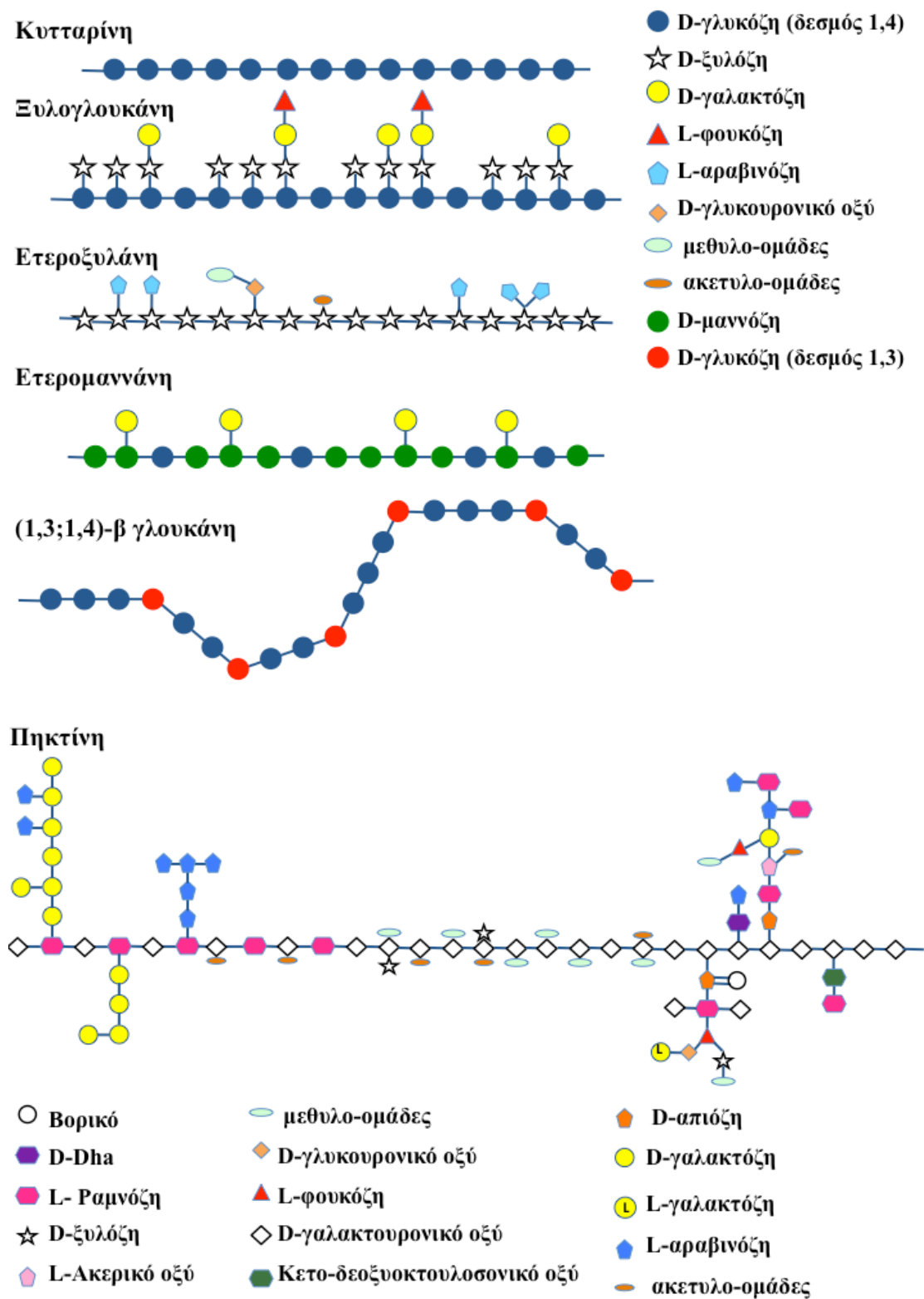
Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20 nm και μήκος 100 - 40000 nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες κυτταρίνης. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων κυτταρίνης διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης (Εικόνα 1.3). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες, κρυσταλλικές περιοχές. Ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών.



**Εικόνα 1.3** Δεσμοί υδρογόνου που απαντώνται στην κυτταρίνη.

Οι «ράβδοι» κυτταρίνης είναι βυθισμένες σε ένα στρώμα μη κυτταρινούχων πολυσακχαριτών που παρουσιάζουν υψηλή δομική πολυπλοκότητα και χημική ετερογένεια. Όλοι οι ημικυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες διαθέτουν ένα σκελετό σακχάρων ενωμένων με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στις ξυλάνες, τις μαννάνες και τις ξυλογλουκάνες οι αντίστοιχες δομικές μονάδες είναι β-1,4-D-ξυλόζη, β-1,4-D-μαννόζη και β-1,4-D-γλυκόζη ενώ στη γλυκομαννάνη ο σακχαρικός σκελετός δομείται από τυχαία εναλλασσόμενες μονάδες β-1,4-μαννόζης και β-1,4-γλυκόζης. Οι σκελετοί των ημικυτταρινούχων πολυσακχαριτών είναι υποκατεστημένοι με μία ποικιλία σακχάρων και οξικών ομάδων, γεγονός που εξηγεί τη μη κρυσταλλική φύση της ημικυτταρίνης. Στην ξυλάνη ο σκελετός μονάδων ξυλόζης είναι «διακοσμημένος» με μία μεγάλη ποικιλία διακλαδώσεων όπως το 4-O-μεθυλ-D-γλυκουρονικό οξύ, D-γλυκουρονικό οξύ, L-αραβινοφουρανόζη και ακετυλο-ομάδες, ανάλογα με την προέλευση της ξυλάνης. Οι μονάδες αραβινόζης πολλές φορές είναι εστεροποιημένες με φερουλικό οξύ το οποίο μπορεί να αποτελέσει σύνδεσμο μεταξύ των αλυσίδων ξυλάνης αλλά και με την πηκτίνη ή τη λιγνίνη. Στις ξυλογλουκάνες οι μονάδες γλυκόζης είναι υποκατεστημένες με μόρια ξυλόζης μέσω α(1→6) δεσμού τα οποία με τη σειρά τους ενδέχεται να φέρουν μόρια γαλακτόζης ή φουκόζης. Οι μαννάνες φέρουν α(1→6) μόρια γαλακτόζης και O-2/O-3 ακετυλοομάδες στις μονάδες μαννόζης της αλυσίδας. Σε ό,τι αφορά στην πηκτίνη, υπάρχουν 3 βασικοί τύποι: οι ομογαλακτουρονάνες, οι ραμνογαλακτουρονάνες τύπου I και οι ραμνογαλακτουρονάνες τύπου II. Οι ομογαλακτουρονάνες αποτελούνται από ένα σκελετό πολυγαλακτουρονικού οξέος. Οι ραμνογαλακτουρονάνες τύπου I έχουν ως επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα το δισακχαρίτη [(α-1,4)-D-GalA→(α-1,2)-L-Rha]<sub>n</sub> με υποκαταστάτες στο O4 των καταλοίπων ραμνόζης. Οι ραμνογαλακτουρονάνες τύπου II είναι οι πιο περίπλοκες με 13 διαφορετικά σάκχαρα και πάνω από 20 διαφορετικούς δεσμούς (Gilbert 2010).





**Εικόνα 1.4.** Παρουσιάζεται η δομή των πολυσακχαριτών που απαντώνται στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Αναδεικνύεται η υψηλή χημική ετερογένεια σε όλες τις περιπτώσεις πλην της κυτταρίνης (προσαρμογή της εικόνας που περιλαμβάνεται στην εργασία των (Burton, Gidley et al. 2010).

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

### 1.1.2 Ενζυμική υδρόλυση κυτταρικού τοιχώματος

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

- Κυτταρίνη. Υδρολύεται από τη συνεργιστική δράση ενδο-β-1,4-γλουκανασών (μέλη των οικογενειών GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61, 74 και 124), κελλοβιοϋδρολασών (GH 6, 7, 9, 48 και 74) και β-γλυκοζιδασών (GH 1, 3, 9, 30 και 116). Οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες υδρολύουν την αλυσίδα της κυτταρίνης σε τυχαία σημεία, οι κελλοβιοϋδρολάσες απελευθερώνουν κελλοολιγοσακχαρίτες από τα άκρα των αλυσίδων ενώ η β-γλυκοζιδάση υδρολύει τους ολιγοσακχαρίτες σε μονάδες γλυκόζης (Kubicek 1992).
- Ξυλογλουκάνη. Τα ένζυμα που υδρολύουν το σκελετό της ξυλογλουκάνης σε μη υποκατεστημένες μονάδες γλυκόζης (ενδο-ξυλογλουκανάσες ή ενδο-υδρολάσες της ξυλογλουκάνης) έχουν κατηγοριοποιηθεί στις οικογένειες GH 5, 7, 12, 16, 44 και 74. (Gilbert, Stalbrand et al. 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ένζυμα της οικογένειας 16, λόγω της ικανότητάς τους όχι μόνο να υδρολύουν την ξυλογλουκάνη αλλά και να αλλάζουν τη δομή της μέσω αντιδράσεων μεταγλυκοζυλίωσης (Eklof and Brumer 2010).

- Μαννάνες. Η υδρόλυση των πολυσακχαριτών αυτών λαμβάνει χώρα με τη συνδυαστική δράση ενδο-β-1,4-μαννανασών (GH 5 και 26), εξω-β-1,4-μαννοζιδασών (GH 2 και 5), β-1,4-γλυκοζιδασών, α-γαλακτοζιδασών (GH 4, 27, 36, 57 και 110) και ακετυλ-μανναν-εστερασών (Centeno, Guerreiro et al. 2006).
- Ξυλάνη. Ο σκελετός της ξυλάνης υδρολύεται κατά κύριο λόγο από ξυλανάσες των οικογενειών GH 5, 8, 10, 11 και 30 ενώ οι πλευρικές αλυσίδες αραβινόζης απομακρύνονται μέσω των αραβινοφουρανοζιδασών των οικογενειών GH 43, 51, 54 και 62 και τα ουρονικά οξέα μέσω των α-γλυκουρονιδασών των οικογενειών GH 67 και 115 (Gilbert 2010).
- Πηκτίνη. Η αποδόμηση του σύνθετου αυτού πολυσακχαρίτη πραγματοποιείται μέσω ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτών μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται πηκτινάσες, εξω-πολυγαλακτουρονάσες και ραμνογαλακτουρονάσες (GH 28), εξω-λυάσες του πολυγαλακτουρονικού (PL 2 και 9) καθώς και πηκτινικές λυάσες (PL 1, 2, 3, 9 και 10), μεθυλεστεράσες (CE 8) και εστεράσες του οξικού οξέος (CE 12 και 13) (Solbak, Richardson et al. 2005).

### 1.1.3 Οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων CAZy

Στην οικογένεια 61 των γλυκοζιδικών υδρολασών (GH61) συγκαταλέγονται περισσότερες από 200 πρωτεΐνες οι οποίες προέρχονται όλες από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η αυξημένη παρουσία τους στο γονιδίωμα κυτταρινολυτικών μυκήτων αποτελεί ένδειξη της σημασίας τους για την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας (Martinez and Reyes-Valdes 2008). Η κατηγοριοποίησή τους αρχικά ως γλυκοζιδικές υδρολάσες βασίστηκε στην ασθενή κυτταρινολυτική δράση που παρουσίαζαν κάποια μέλη της οικογενείας χωρίς όμως αυτή να θεωρείται η βασική λειτουργία τους στη φύση. Συστηματικές μελέτες επικεντρώθηκαν στη διαλεύκανση του ρόλου των GH61 οδηγώντας στην αποκάλυψη ενός νέου μηχανισμού δράσης που λειτουργεί συνεργιστικά με τις κλασικές κυτταρινάσες παρέχοντας με τον τρόπο αυτό ένα ισχυρό όπλο στην κατεύθυνση της οικονομικά βιώσιμης ενζυμικής υδρόλυσης λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.

### 1.1.3.1 Ο παράγοντας διάσπασης της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης

Από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα είχε ήδη διατυπωθεί η υπόθεση ότι πέρα από τις γνωστές υδρολάσες, οι κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί διαθέτουν ένα επιπλέον ενζυμικό σύστημα διάσπασης της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης (γνωστό ως παράγοντας διάσπασης) το οποίο την καθιστά πιο εύκολα υδρολύσιμη από τα υπόλοιπα ένζυμα (Reese, Siu et al. 1950). Η ανάγκη για μείωση του ενζυμικού φορτίου κατά την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον στην αναζήτηση των άγνωστων αυτών βιοκαταλυτών. Με βάση δημοσιευμένες μελέτες, πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να παίζουν το ρόλο αυτό είναι οι μονάδες πρόσδεσης υδατανθράκων (Carbohydrate Binding Modules, CBMs), η δράση των οποίων συμβάλλει στη μετάβαση του καταλυτικού τομέα από τη διαλυτή φάση στο στερεό υπόστρωμα. Ο ακριβής τρόπος δράσης των CBMs δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Με βάση μία υπόθεση που έχει διατυπωθεί σχετικά, οι πρωτεΐνες αυτές μειώνουν την ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ινών μέσω ενός μη υδρολυτικού μηχανισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση αλυσίδων κυτταρίνης από τη συμπαγή δομή που σχηματίζουν και την έκθεσή τους στην καταλυτική μονάδα. Άλλες μη υδρολυτικές πρωτεΐνες, η δράση των οποίων έχει συνδεθεί με τη χαλάρωση του κυτταρινικού πλέγματος, είναι οι εκτασίνες (expansins) που απαντώνται μόνο σε φυτικούς οργανισμούς καθώς και άλλες πρωτεΐνες τύπου εκτασινών απομονωμένες από βακτήρια και μύκητες οι οποίες δρουν συνεργιστικά με τις κλασικές κυτταρινάσες (Arantes and Saddler 2010).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας 61 (GH61) όπως αυτά περιγράφονται στη βάση δεδομένων CAZy οδηγούν σε αυξημένη υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων όταν χρησιμοποιούνται μαζί με κλασικά κυτταρινολυτικά σκευάσματα (Merino and Cherry 2007). Η συνεργιστική αυτή δράση παύει να παρατηρείται στην περίπτωση υποστρωμάτων που περιέχουν μόνο κυτταρίνη. Ο Harris και οι συνεργάτες του (Harris, Welner et al. 2010) κλωνοποίησαν και μελέτησαν μία ποικιλία GH61s από κυτταρινολυτικούς μύκητες όπως ο *Thielavia terrestris* και *Thermoascus aurantiacus*. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η προσθήκη κάποιων εκ των μελετώμενων πρωτεϊνών, σε ποσοστό 5-20% επί του συνολικού ενζυμικού φορτίου, οδηγεί σε αυξημένη αποδόμηση προεπεξεργασμένου σπάδικα αραβοσίτου, με την αύξηση αυτή να μεταβάλλεται ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη GH61. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι η

συνεργιστική δράση δεν αποτελεί προϊόν αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένη ενζυμική κατηγορία ή αμιγούς υδρολυτικής ενεργότητας των GH61s ενώ δεν παρατηρείται κατά την υδρόλυση υποστρωμάτων αποτελούμενων από καθαρή κυτταρίνη.

Οι αρχικές υποθέσεις για το μηχανισμό δράσης της αινιγματικής αυτής οικογένειας αναφέρονταν είτε σε ένα μη υδρολυτικό παράγοντα με επίδραση στην κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης (τύπου εκτασινών) είτε σε ένα βιοκαταλύτη με δράση πάνω σε έναν άγνωστο μέχρι τότε δεσμό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Δεδομένης όμως της έλλειψης συνεργιστικής δράσης σε καθαρές κυτταρίνες η πρώτη υπόθεση φαινόταν απίθανη ενώ παρά την εκτεταμένη διερεύνηση μεγάλης ποικιλίας υποστρωμάτων, καμία ερευνητική ομάδα δεν είχε καταφέρει να εντοπίσει το δεσμό-στόχο των GH61s. Οι εντατικές ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων 10 ετών οδήγησαν τελικά στην αποκάλυψη του τρόπου δράσης των ενζύμων αυτών. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά τα επιμέρους βήματα που οδήγησαν στην αποτύπωση του νέου αυτού μηχανισμού καθώς και οι προοπτικές που ανοίχθηκαν για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση των GH61s.

### **1.1.3.2 Οι πρώτες ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με την οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων v CAZy .**

Η πρώτη μελέτη σχετικά με την οικογένεια 61 έγινε το 1992 (Raguz, Yague et al. 1992) κατά την οποία απομονώθηκε και μελετήθηκε γονίδιο του μύκητα *Agaricus bisporus* που επαγόταν παρουσία κυτταρίνης. Η καταλυτική μονάδα της πρωτεΐνης που κωδικοποιούσε το συγκεκριμένο γονίδιο δεν παρουσίαζε ομολογία με καμία μέχρι τότε γνωστή γλυκοζιδική υδρολάση. Ωστόσο, λόγω της ρύθμισης της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου καθώς και της παρουσίας τομέα πρόσδεσης στην κυτταρίνη στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου θεωρήθηκε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης.

Μέχρι πολύ πρόσφατα είχαν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες πάνω σε γλυκοζιδικές υδρολάσες της οικογένειας 61 απομονωμένες από ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς όπως: *A. bisporus* (Raguz, Yague et al. 1992), *Aspergillus kawachii* (Hara, Hinoki et al. 2003), *Aspergillus nidulans* (Bauer, Vasu et al. 2006), *Cochliobolus heterostrophus* (Lev and Horwitz 2003), *Cryptococcus neoformans* (Chang and Kwon-Chung 1998), *Hypocrea jecorina* (Saloheimo, Nakari-Setälä et al. 1997; Foreman, Brown et al. 2003), *Phanerochaete chrysosporium* (Wymelenberg,

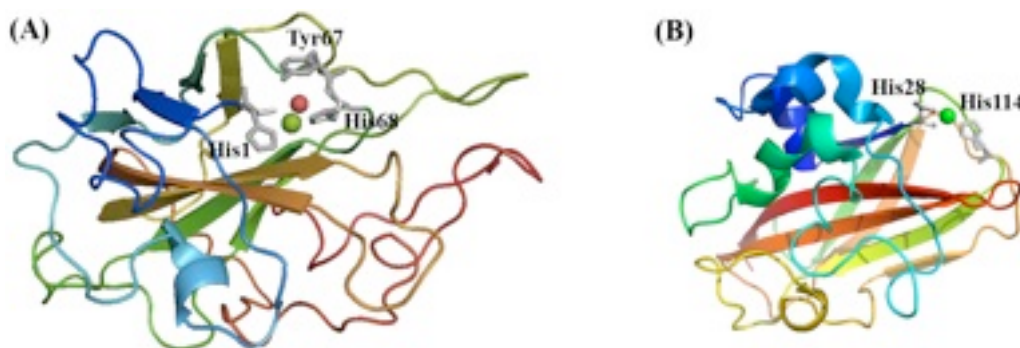
Denman et al. 2002), *T. aurantiacus* και *T. terrestris* (Harris, Welner et al. 2010), και *Volvariella volvacea* (Ding, Ge et al. 2006). Σχεδόν όλα τα ένζυμα που είχαν μελετηθεί ως προς τη δραστηρότητά τους σε διάφορα υποστρώματα παρουσίαζαν εξαιρετικά ασθενή κυτταρινολυτική δράση, πολύ ωστόσο χαμηλότερη από αυτή ήδη χαρακτηρισμένων ενδογλουκανασών από άλλες οικογένειες της βάσης δεδομένων CAZy όπως η Cel7B από το μύκητα *H. jecorina* (Karlsson, Saloheimo et al. 2001) και η AN1285.2 από τον *A. nidulans* (Bauer, Vasu et al. 2006). Η μόνη εκ των χαρακτηρισμένων γλυκοζιδικών υδρολασών της οικογένειας 61 που δεν παρουσίαζε ανιχνεύσιμη κυτταρινολυτική δράση είναι η CEL1 από τον *A. bisporus* (Armesilla, Thurston et al. 1994).

### 1.1.3.3 Δομικές μελέτες των μελών της οικογένειας 61

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X οι τριδιάστατες δομές της Cel61B από τον *H. jecorina* σε ευκρίνεια 1.6 Å (κωδικός PDB 2VTC) (Karkehabadi, Hansson et al. 2008), GH61E από τον *T. terrestris* σε ευκρίνεια 2.25 και 1.9 Å (κωδικοί PDB 3EII και 3EJA, αντίστοιχα) (Harris, Welner et al. 2010) και TaGH61 από τον *T. aurantiacus* σε ευκρίνεια 1.49 και 1.25 Å (κωδικοί PDB 2YET, 3ZUD, αντίστοιχα) (Quinlan, Sweeney et al. 2011). Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι κοινή και στις 3 δομές αποτελούμενη από έναν τομέα που αναδιπλώνεται σε β-σάντουιτς με δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και τοπολογία ανάλογη της ανοσοσφαιρίνης (Εικόνα 1.5). Ο προσδιορισμός της πρώτης δομής (Cel61B) αποκάλυψε την ύπαρξη μίας ομάδας συντηρημένων, κυρίως πολικών, αμινοξέων τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου. Στην περίπτωση της GH61E τα πλέον συντηρημένα αμινοξέα συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός ιοντικού δικτύου βυθισμένου στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των δομών είναι δύο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης στην επιφάνεια του ενζύμου κοντά στο αμινοτελικό άκρο που συμμετέχουν στη συναρμογή ενός μεταλλοκατιόντος (νικελίου στην περίπτωση της Cel61B, ψευδαργύρου και μαγνησίου στην περίπτωση της GH61E και χαλκού στην περίπτωση της TaGH61) η παρουσία του οποίου είναι απαραίτητη για τη δραστηρότητα του ενζύμου (Harris, Welner et al. 2010) (Quinlan, Sweeney et al. 2011). Ταυτόχρονα, καμία από τις ήδη προσδιορισμένες δομές δεν υπέδειξε κάποια περιοχή πρόσδεσης διαλυτού πολυσακχαρίτη ή κάποιου καταλυτικού κέντρου σε διαμόρφωση παρόμοια με αυτήν

που απαντάται συνήθως σε άλλες γλυκοζιδικές υδρολάσες. Το γεγονός αυτό ενίσχυσε ακόμα περισσότερο την πρόταση ότι οι GH61s έχουν έναν καινούριο, σε σχέση με τα ήδη γνωστά ένζυμα που συνδέονται με την αποδόμηση της βιομάζας, μηχανισμό δράσης.

Περαιτέρω μελέτη που αφορούσε στην αναζήτηση δομικών ομολόγων αποκάλυψε ότι η πλησιέστερη δομικά πρωτεΐνη είναι μία μη καταλυτική πρωτεΐνη πρόσδεσης στη χιτίνη προερχόμενη από το βακτήριο *Serratia marcescens* (κωδικός PDB: 2BEM, (Vaaje-Kolstad, Houston et al. 2005) (Εικόνα 1.5B). Η CBP21 ανήκει στην οικογένεια 33 (CBM33) των τομέων πρόσδεσης πολυσακχαριτών της βάσης δεδομένων CAZy και έχει την ικανότητα να δρα συνεργιστικά με άλλες χιτινάσες κατά την υδρόλυση της β-χιτίνης (Vaaje-Kolstad, Horn et al. 2005). Η δομική ομοιότητα συνιστάται, πέρα από το συνολικό τρόπο αναδίπλωσης των δύο πρωτεϊνών, στην ομάδα εκείνη των επιφανειακών αμινοξέων που συμμετέχουν στη συναρμογή του μεταλλοκατιόντος, τα οποία είναι ισχυρά συντηρημένα στις οικογένειες GH61 και CBM33.



**Εικόνα 1.5** Οι κρυσταλλικές δομές της GH61E από τον *T. terrestris* (κωδικός PDB 3EII) (A) και της CBP21 από το *S. marcescens* (κωδικός PDB: 2BEM) (B). Υποδεικνύεται το σημείο συναρμογής του μεταλλοκατιόντος που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των δύο ενζύμων. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PyMOL.

#### 1.1.3.4 Ο μηχανισμός δράσης της CBP21

Στοιχεία σχετικά με το μηχανισμό δράσης της CBP21 δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά το 2010 από τον Vaaje-Kolstad και τους συνεργάτες του (Vaaje-Kolstad,

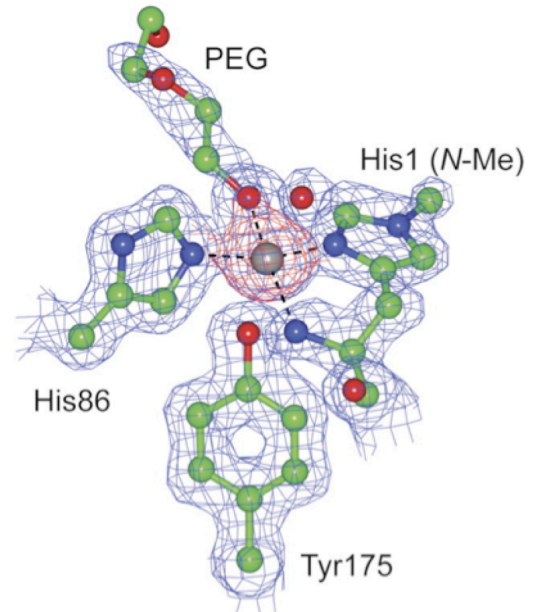
Westereng et al. 2010). Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα αποτελέσματά τους, η CBP21 δρα στο κρυσταλλικό υπόστρωμα σε δύο στάδια, ένα υδρολυτικό και ένα οξειδωτικό, απελευθερώνοντας μεγάλα τμήματα χιτίνης με οξειδωμένα άκρα και ζυγό αριθμό μονομερών, γεγονός που αποτελεί ένδειξη συγκεκριμένης κατεύθυνσης δράσης κατά μήκος του πολυσακχαρίτη. Η δράση της εξαρτάται από την παρουσία μοριακού οξυγόνου και ενισχύεται σημαντικά παρουσία αναγωγικών ουσιών που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων. Σε μία δεύτερη μελέτη (Forsberg, Vaaje-Kolstad et al. 2011), η ίδια ομάδα ανέδειξε την ικανότητα μίας άλλης πρωτεΐνης (CelS2 από τον *Streptomyces coelicolor*) που περιείχε μονάδα πρόσδεσης CBM33 να απελευθερώνει οξειδωμένους κελλοολιγοσακχαρίτες κατά τη δράση της σε κρυσταλλική κυτταρίνη και να ενισχύει τη δράση κυτταρινασών κατά την υδρόλυση αυτού του δύσκολα αποδομήσιμου υποστρώματος. Οι συγγραφείς πρότειναν πως ένας αντίστοιχος μηχανισμός δράσης θα μπορούσε να διατυπωθεί για τις πρωτεΐνες της οικογένειας 61, έτσι ώστε με κατάλληλη τροποποίηση των συνθηκών υδρόλυσης να είναι δυνατή η σημαντική αύξηση της απόδοσης της βιομετατροπής.

#### **1.1.3.5 Οξειδοαναγωγική αποδόμηση κυτταρίνης: ένας μηχανισμός παράλληλος στις κλασσικές υδρολυτικές κυτταρινάσες**

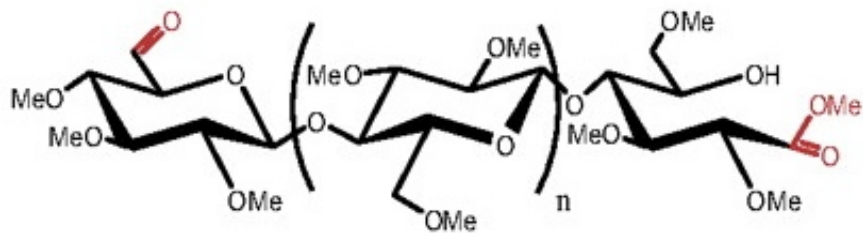
Κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκαν νέα δεδομένα που αφορούσαν στο μηχανισμό δράσης των GH61. Ο Quinlan και οι συνεργάτες του (Quinlan, Sweeney et al. 2011) έδειξαν ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι οξειδάσες που δεσμεύουν το  $\text{Cu}^{2+}$  και των οποίων η δράση ενισχύεται από την παρουσία αναγωγικών ουσιών όπως το γαλλικό και το ασκορβικό οξύ. Η κρυσταλλογραφική δομή της ανασυνδυασμένης GH61 από τον *T. aurantiacus* (TaGH61) σε ευκρίνεια 1.25 Å (κωδικός PDB 3ZUD) σε συνδυασμό με πειράματα Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) και Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electronic Paramagnetic Resonance, EPR) ανέδειξαν τη σημασία του ιόντος χαλκού τύπου II που συντονίζεται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, μία τυροσίνη, ένα μόριο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και ένα μόριο νερού και παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη συνάφεια για το ενεργό κέντρο από οποιοδήποτε άλλο δισθενές μεταλλοκατιόν. Ενδιαφέρον στη δομή αυτή παρουσιάζει η ιστιδίνη στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που συμμετέχει στη συναρμογή του



ιόντος χαλκού και είναι μεθυλιωμένη στο άζωτο Ne2 (Εικόνα 1.6). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η μεθυλομάδα αυτή ενδέχεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου, ενώ ο ακριβής της ρόλος χρήζει περαιτέρω μελέτης. Η ίδια ομάδα, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight) έδειξε ότι τα προϊόντα δράσης της *TaGH61* πάνω σε κυτταρίνη διογκωμένη μετά από κατεργασία με φωσφορικό οξύ (Phosphoric Acid Swollen Cellulose, PASC) παρουσία γαλλικού οξέος περιλάμβαναν κελλοδεξτρίνες βαθμού πολυμερισμού 3-8, μεταξύ των οποίων υπήρχαν και οξειδωμένα είδη. Περαιτέρω ανάλυση των ειδών αυτών ανέδειξε δύο κατηγορίες προϊόντων, οξειδωμένων είτε στον C1 του αναγωγικού άκρου (αλδονικά οξέα) είτε στον C6 του μη αναγωγικού άκρου (Εικόνα 1.7), οδηγώντας έτσι στη διαπίστωση ότι οι GH61 έχουν ενδεχομένως παραπάνω από ένα τρόπο δράσης. Την οξειδωτική δράση των GH61 κατέδειξαν και ο Westereng και οι συνεργάτες του (Westereng, Ishida et al. 2011). Η ομάδα αυτή κλωνοποίησε και εξέφρασε μέσω της ζύμης *Pichia pastoris* μία γλυκοζιδική υδρολάση της οικογένειας 61 από το *P. chrysosporium* (*PcGH61D*) με τέτοιο τρόπο ώστε το αμινοξύ στη θέση 1 της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης να είναι η ισχυρά συντηρημένη ιστιδίνη που απαντάται σε όλα τα ένζυμα της οικογενείας και που συμμετέχει στη συναρμογή του μεταλλοκατιόντος. Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα αποτελέσματα, η δράση της *PcGH61D* πάνω σε κυτταρινούχα υποστρώματα παρουσία αναγωγικού παράγοντα οδηγεί στην παραγωγή οξειδωμένων κελλοολιγοσακχαριτών και λειτουργεί συνεργιστικά με κυτταρινολυτικά σκευάσματα.



**Εικόνα 1.6** Το σημείο συναρμογής του ιόντος χαλκού στη δομή της *TaGH61* και η μεθυλιωμένη His1 (από (Quinlan, Sweeney et al. 2011))

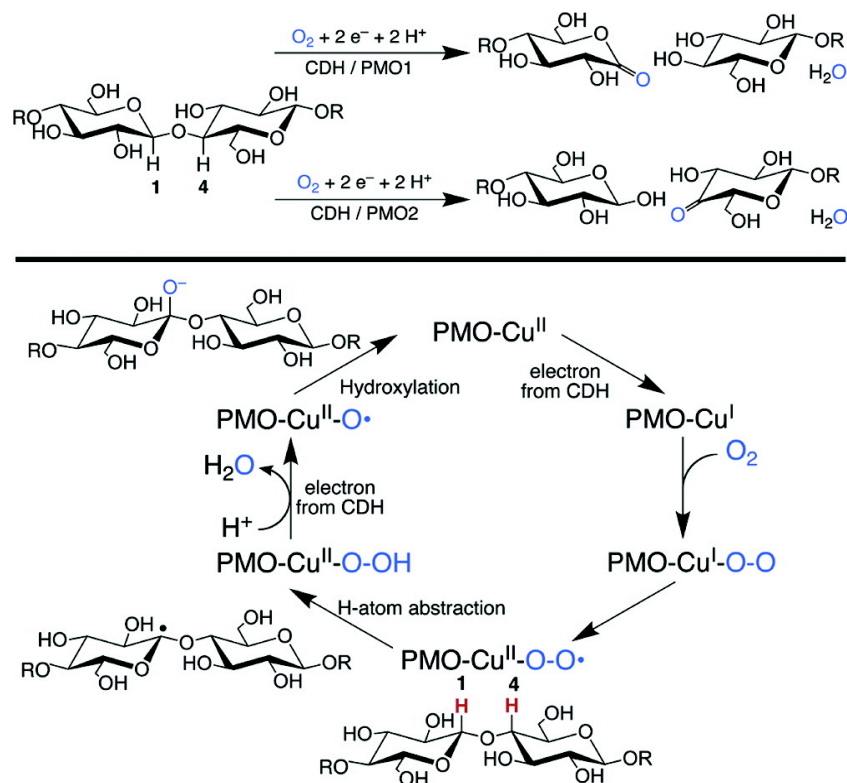


**Εικόνα 1.7** Σχηματική αναπαράσταση των δύο ειδών οξειδωμένων κελλοδεξτρινών (στον C6 του μη αναγωγικού άκρου και στον C1 του αναγωγικού άκρου) που ανιχνεύθηκαν με φασματοσκοπία μάζας κατά την επώαση κυτταρίνης PASC με *TaGH61* παρουσία γαλλικού οξέος από τον Quinlan και τους συνεργάτες του (Πηγή: (Quinlan, Sweeney et al. 2011)).

Σχεδόν ταυτόχρονα, ο Langston και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η συνδυαστική δράση μίας GH61 από τον *T. aurantiacus* και μίας αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης (Cellobiose Dehydrogenase, CDH) από τον *Humicola insolens* οδηγούσε στην αποδόμηση της κρυσταλλικής κυτταρίνης, παράγοντας ένα ετερογενές μίγμα κελλοολιγοσακχαριτών που περιελάμβανε είδη με οξειδωμένο αναγωγικό άκρο (Langston, Shaghasi et al. 2011). Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η προσθήκη GH61 και CDH σε μίγμα κυτταρινασών του ίδιου μύκητα (*T. terrestris*) οδηγούσε σε σημαντική αύξηση του βαθμού υδρόλυσης κρυσταλλικής κυτταρίνης, γεγονός που δεν παρατηρούνταν όταν τα δύο ένζυμα προστίθενταν ξεχωριστά. Η CDH είναι ένα εξωκυτταρικό ένζυμο που παράγεται από μύκητες που αποδομούν την κυτταρίνη και ενώ μελετάται για περισσότερα από 30 χρόνια, ο ακριβής της ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος (Henriksson, Johansson et al. 2000). Όλες οι CDH που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν μία καρβοξυτελική μονάδα φλαβίνης όπου πραγματοποιείται οξείδωση κελλοδεξτρινών και μία αμινοτελική μονάδα αίμης στην οποία μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια και η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως αναγωγικός παράγοντας.

Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα, ο Phillips και οι συνεργάτες του κατέταξαν τις GH61 ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (polysaccharide monoxygenases, PMOs) και πρότειναν τον εξής μηχανισμό δράσης (Phillips, Beeson et al. 2011): αρχικά γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίου από τη μονάδα αίμης της CDH και αναγωγή της PMO-Cu(II) σε PMO-Cu(I). Ένα μόριο O<sub>2</sub> προσδένεται στο PMO-Cu(I) και μετά από εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίου σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο PMO-Cu(II)-O-O· το οποίο αφαιρεί ένα H· από τη θέση 1 ή 4 του πολυσακχαρίτη. Ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο από τη CDH οδηγεί στην ομολυτική διάσπαση του PMO-Cu(II)-

O-OH σε PMO-Cu(II)-O· το οποίο υδροξυλιώνει το υπόστρωμα στη θέση 1 ή 4. Η προσθήκη του ατόμου O αποσταθεροποιεί το γλυκοζιδικό δεσμό και οδηγεί στη διάσπαση του πολυσακχαρίτη και το σχηματισμό λακτόνης (οξείδωση στη θέση 1) ή κετοαλδόζης (οξείδωση στη θέση 4) (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.8** Ο μηχανισμός δράσης των GH61. Στο άνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται οι δύο τρόποι δράσης που έχουν αποτυπωθεί και οδηγούν στην οξείδωση στη θέση 1 (PMO1) και 4 (PMO2) σχηματίζοντας λακτόνες και κετοαλδόζες, αντίστοιχα. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζεται αναλυτικότερα ο προτεινόμενος μηχανισμός στον οποίο συμμετέχουν η CDH ως δότης ηλεκτρονίων, το οξυγόνο και το ιόν χαλκού που απαντάται στις GH61 (Πηγή: (Phillips, Beeson et al. 2011)).

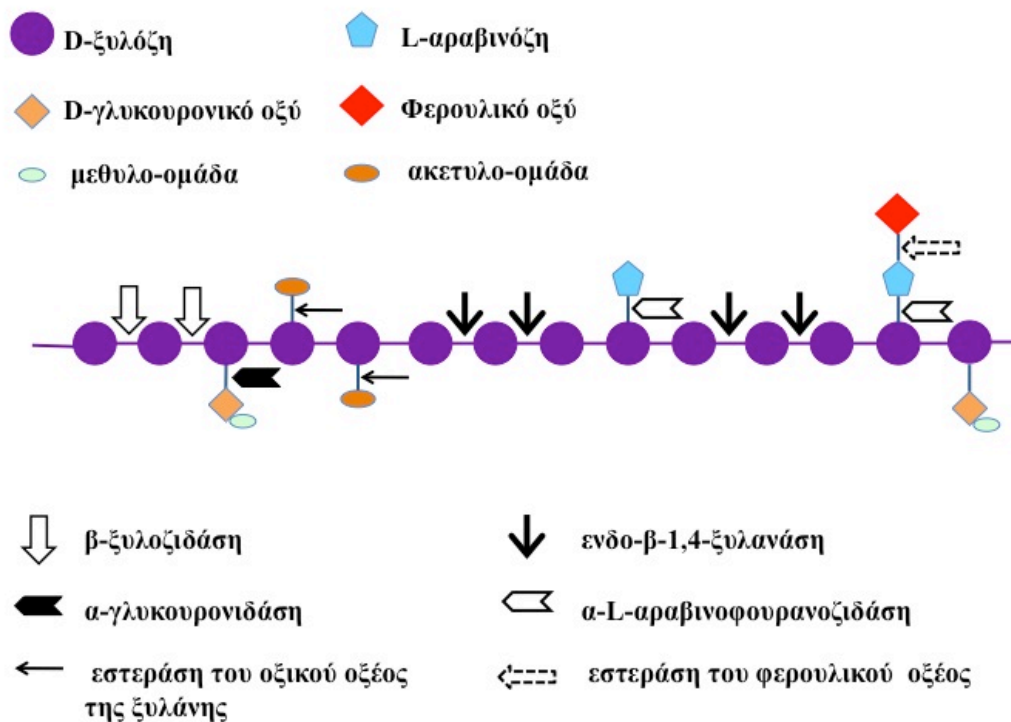
### 1.1.3.6 Η οικογένεια 61- προοπτικές

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μελέτες που αναφέρονται παραπάνω συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης ενός οξειδοαναγωγικού μηχανισμού αποδόμησης της κρυσταλλικής κυτταρίνης που δρα παράλληλα και διευκολύνει το έργο των κλασικών κυτταρινασών. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η κατηγοριοποίηση των ενζύμων αυτών ως γλυκοζιδικές υδρολάσες δεν ανταποκρίνεται στο μηχανισμό δράσης τους και με βάση τις δημοσιευμένες μελέτες

θα πρέπει να αναφέρονται ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Beeson, Phillips et al. 2011; Phillips, Beeson et al. 2011). Το γεγονός ότι πολλοί κυτταρινολυτικοί μύκητες εκφράζουν παραπάνω από 10 διαφορετικές GH61 κατά την ανάπτυξή τους σε κυτταρίνη (Tian, Beeson et al. 2009) (Berka, Grigoriev et al. 2011) καθώς και η υψηλή ετερογένεια ως προς την αμινοξική αλληλουχία που παρουσιάζουν τα ένζυμα αυτά (Harris, Welner et al. 2010), καταδεικνύουν την ύπαρξη ποικιλίας ως προς την στερεοειδίκευση και τη θέση οξειδωσης των μορίων γλυκόζης. Ο προσδιορισμός των αμινοξέων που καθορίζουν την εξειδίκευση των διαφόρων GH61 καθώς και η ταυτοποίηση των προϊόντων δράσης τους θα χαράξει νέες προοπτικές τόσο σε επίπεδο βασικής έρευνας καθώς πρόκειται για ένα νέο καταλυτικό μηχανισμό όσο και εφαρμοσμένης, λόγω του εξαιρετικού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η βελτιωμένη αποδόμηση της βιομάζας με τη χρήση των ενζύμων αυτών.

#### **1.1.4 Η οικογένεια 10 της βάσης δεδομένων CAZy**

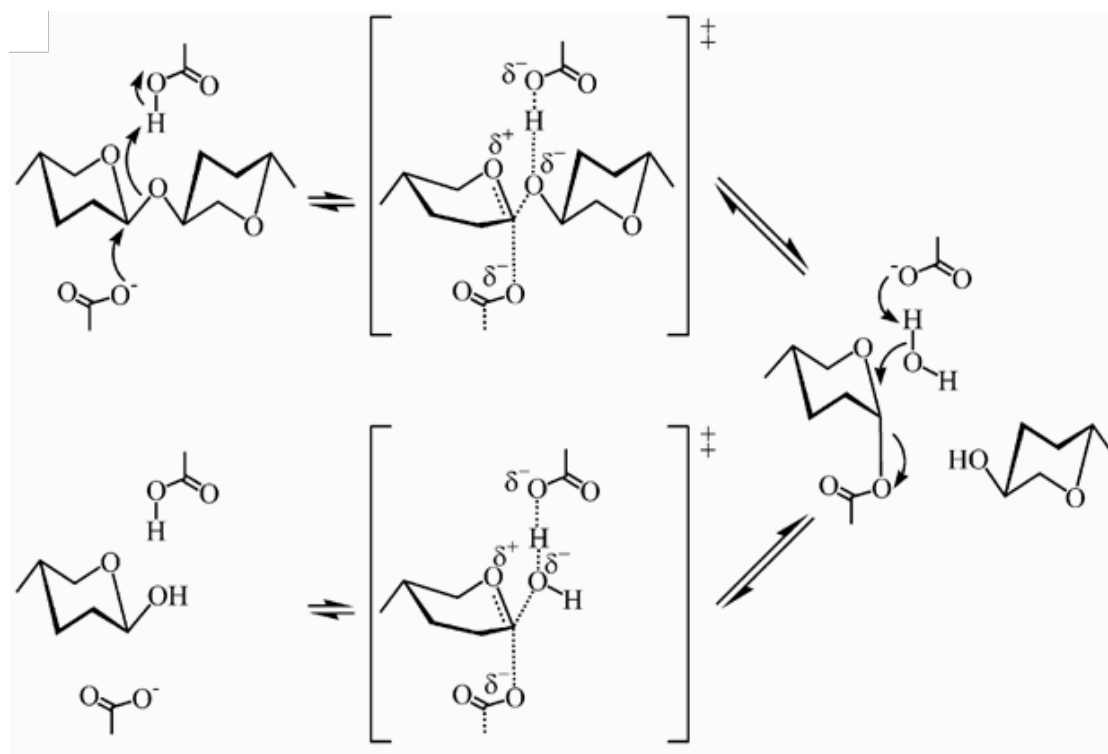
Η οικογένεια 10 της βάσης δεδομένων CAZy αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων (~1200) εκ των οποίων περίπου 220 έχουν χαρακτηριστεί και 21 έχουν γνωστή τριδιάστατη δομή. Στα μέλη της οικογένειας αυτής συγκαταλέγονται κατά κύριο λόγο ενδο-β-1,4-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8) αλλά και ενδο-β-1,3-ξυλανάσες (EC 3.2.1.32) και κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.1.91) (Collins, Gerday et al. 2005). Οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης και τους δεσμούς που βρίσκονται πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια (Εικόνα 1.9)



**Εικόνα 1.9** Υποθετική αλυσίδα ξυλάνης και τα ένζυμα που δρουν συνεργιστικά για την αποδόμησή της (τροποποίηση του αντίστοιχου σχήματος από Biely, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, οι ενδο-β-1,4-ξυλανάσες υδρολύουν τους β-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών της ξυλόζης με κατάλυση οξέος-βάσης μέσω ενός μηχανισμού διπλής μετατόπισης που οδηγεί στη διατήρηση της ανωμερούς διαμόρφωσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπως δείχθηκε για πρώτη φορά με NMR από τον Withers και τους συνεργάτες του (Withers, Dombroski et al. 1986). Ο μηχανισμός αυτός περιγράφηκε από τον Koshland το 1953 (Koshland 1953) και περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο (στάδιο γλυκοζυλίωσης) τη συναρμογή του εξωκυκλικού οξυγόνου με μία όξινη ομάδα του ενζύμου (καταλύτης οξύ/βάση). Ταυτόχρονα, το ανωμερικό κέντρο δέχεται πυρηνόφιλη προσβολή από μία καρβοξυλική ομάδα του ενζύμου (καταλυτικό πυρηνόφιλο) που βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά του δακτυλίου του σακχάρου με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ενδιάμεσου γλυκοζυλο-εστέρα. Στο δεύτερο στάδιο (στάδιο απογλυκοζυλίωσης), το άγλυκο τμήμα απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο και υποκαθιστάται από ένα μόριο νερού (στο σημείο αυτό γίνεται και η πρώτη αναστροφή της διαμόρφωσης του

ανωμερικού κέντρου). Το μόριο νερού αποπρωτονιώνεται μερικώς από τη συζυγή βάση της όξινης ομάδας του ενζύμου και προσβάλλει τον ανωμερικό άνθρακα με αποτέλεσμα να λύεται ο δεσμός του γλυκοζυλο-εστέρα και το ανωμερικό κέντρο να επανέρχεται στην αρχική του διαμόρφωση (Εικόνα 1.10).



**Εικόνα 1.10** Μηχανισμός δράσης γλυκοζιδικών υδρολασών σύμφωνα με τον οποίο διατηρείται η διαμόρφωση του ανωμερικού άνθρακα (Collins, Gerday et al. 2005).

Οι ενδο-β-1,4-ξυλανάσες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τις τελευταίες δεκαετίες και παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω του πλήθους των εφαρμογών τους. Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία χάρτου κατά τη λεύκανση του χαρτοπολτού, στη βιομηχανία τροφίμων για τη διαύγαση χυμών, την παραγωγή πρόσθετων βασισμένων σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες και την τροποποίηση προϊόντων αρτοποιίας (Biely 2003) καθώς και για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Dodd and Cann 2009).

#### 1.1.4.1 Τα δομικά χαρακτηριστικά των GH10s

Η οικογένεια 10 της βάσης δεδομένων CAZy ανήκει στην ομάδα GH-A (Clan GH-A) όλα τα μέλη της οποίας παρουσιάζουν την αναδίπλωση που χαρακτηρίζεται ως  $(\beta/\alpha)_8$  βαρέλι. Τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στο καταλυτικό οξύ/βάση και στο πυρηνόφιλο βρίσκονται στο τέλος των β-πτυχωτών φύλλων 4 και 7, αντίστοιχα

(Harris, Jenkins et al. 1994; Lo Leggio, Kalogiannis et al. 1999). Δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας σε ό,τι αφορά τη δραστηριότητα των ενζύμων που παρουσιάζουν αυτήν την αναδίπλωση, είναι σαφές ότι η ενζυμική λειτουργία καθορίζεται από επιμέρους δομικά χαρακτηριστικά και όχι από τη συνολική 3D διαμόρφωση που λαμβάνουν στο χώρο.

Η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (συνήθως ξυλάνης) χωρίζεται σε επιμέρους υπο-κέντρα σύνδεσης, συνήθως 4-7, (Biely, Kratky et al. 1981), η τοπολογία των οποίων διαφέρει σημαντικά ακόμα και μεταξύ ξυλανασών που παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας (Charnock, Spurway et al. 1998). Τα αμινοξέα που διαμορφώνουν τα υπο-κέντρα αυτά καθορίζουν τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και των μονομερών της ξυλόζης. Γενικά, η σύνδεση του γλυκού μέρους του σακχάρου («-» υπο-κέντρα) σε σχέση με το άγλυκο («+» υπο-κέντρα) γίνεται με πιο ισχυρές και ειδικές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν κυρίως δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης, έτσι ώστε να διαμορφώνουν και την εξειδίκευση της κάθε ξυλανάσης ως προς τη φύση του υποστρώματος που αυτή υδρολύει (Schmidt, Gubitz et al. 1999). Πιο πρόσφατη μελέτη, ωστόσο, ανέδειξε τη σημασία των αμινοξέων που βρίσκονται στα «+» υπο-κέντρα, η αλλαγή της διαμόρφωσης των οποίων με τη μεταβολή της θερμοκρασίας επηρέαζε τον τρόπο δράσης μίας θερμοφιλης ξυλανάσης (Santos, Meza et al. 2010).

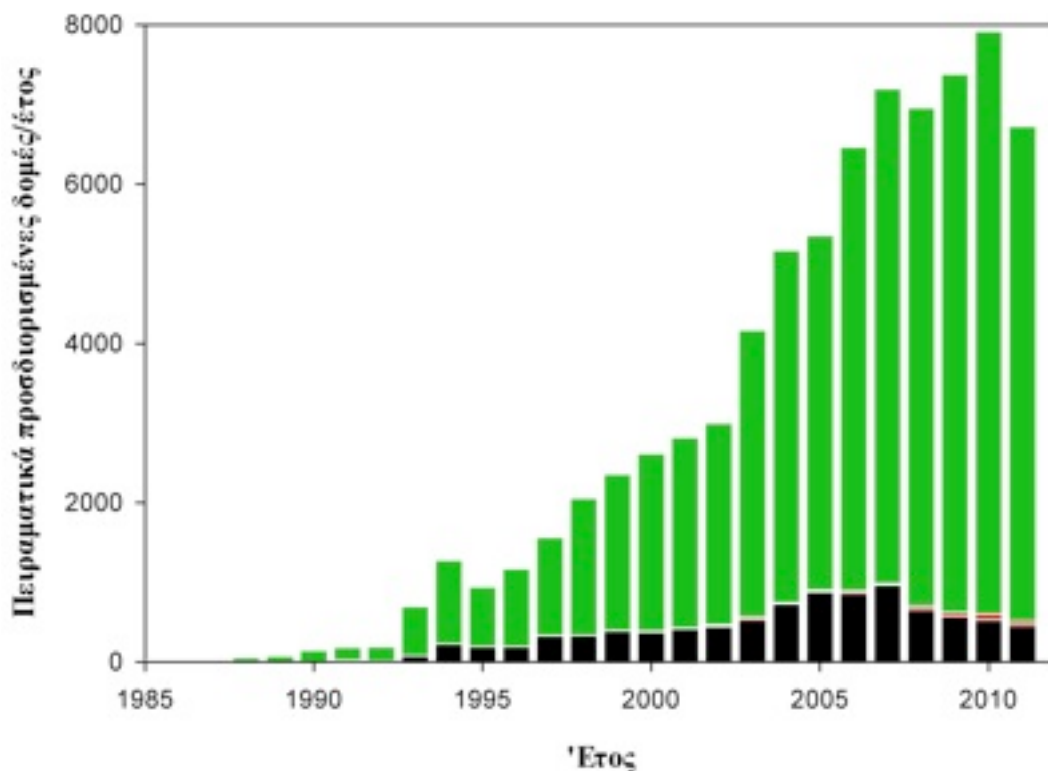
Μεγάλος είναι ο αριθμός των δομικών μελετών γύρω από τις ξυλανάσες της οικογένειας GH10 καθώς και οι εφαρμογές που έχουν προκύψει από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών. Η ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής των ξυλανασών, ως συμπλόκων με διάφορους υποκαταστάτες και ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός μεταλλαγμένων ενζύμων έχουν συμβάλλει στη διαλεύκανση των σχέσεων δομής και λειτουργίας και το σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών και σταθερών βιοκαταλυτών (Lo Leggio, Kalogiannis et al. 2001; Ihsanawati, Kumasaka et al. 2005; Gallardo, Pastor et al. 2010). Επιπλέον, προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του πρωτεϊνικού αναστολέα XIP-1 ως συμπλόκου με μία ξυλανάση της οικογένειας GH10 και μία της GH11 επέτρεψε τη διαλεύκανση του μηχανισμού παρεμπόδισης των ξυλανασών κατά την άμυνα των φυτικών οργανισμών έναντι εισβολέων μυκητιακής και βακτηριακής προέλευσης (Payan, Leone et al. 2004).

## **1.2 Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ως εργαλείο για τη μελέτη βιοκαταλυτών που αποδομούν την ημικυτταρίνη.**

### **1.2.1 Πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία - εισαγωγή**

Το επιστημονικό πεδίο που αφορά στη συστηματική και σφαιρική μελέτη της κατανομής, τροποποίησης και αλληλεπίδρασης των γονιδιακών προϊόντων (συνήθως πρωτεϊνών) είναι ευρέως γνωστό ως Λειτουργική Γενομική (Functional Genomics) και σημαντικός κλάδος της είναι η Δομική Γενομική (Structural Genomics). Η τελευταία έχει ως αντικείμενο τον συστηματικό προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών για την κατανόηση της φυσιολογίας των κυττάρων σε μοριακό επίπεδο (Heinemann, Illing et al. 2001). Μία από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών σε υψηλή διακριτική ικανότητα είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Το 87% των κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων Protein Data Bank, PDB έχει προσδιοριστεί με αυτή τη μέθοδο (Διάγραμμα 1.1). Στη ραγδαία εξάπλωση της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας συνέβαλλαν η χρήση της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις αρχές της δεκαετίας του '80, η συλλογή δεδομένων υπό κρυογενείς συνθήκες, η εφαρμογή της μεθόδου της ανώμαλης σκέδασης για τον προσδιορισμό των φάσεων (τεχνική MAD: Multiwavelength Anomalous Dispersion) (αρχές δεκαετίας '90) και φυσικά η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ανθρώπου (2001) καθώς και πολλών άλλων οργανισμών σε συνδυασμό με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας που οδήγησαν σε μία έκρηξη του διαθέσιμου προς έρευνα υλικού (Jaskolski 2010). Τα κρυσταλλογραφικά μοντέλα μακρομορίων υψηλής διακριτικής ικανότητας συμβάλλουν στη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης των ενζύμων καθώς και τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων ή άλλων βιοδραστικών ενώσεων.

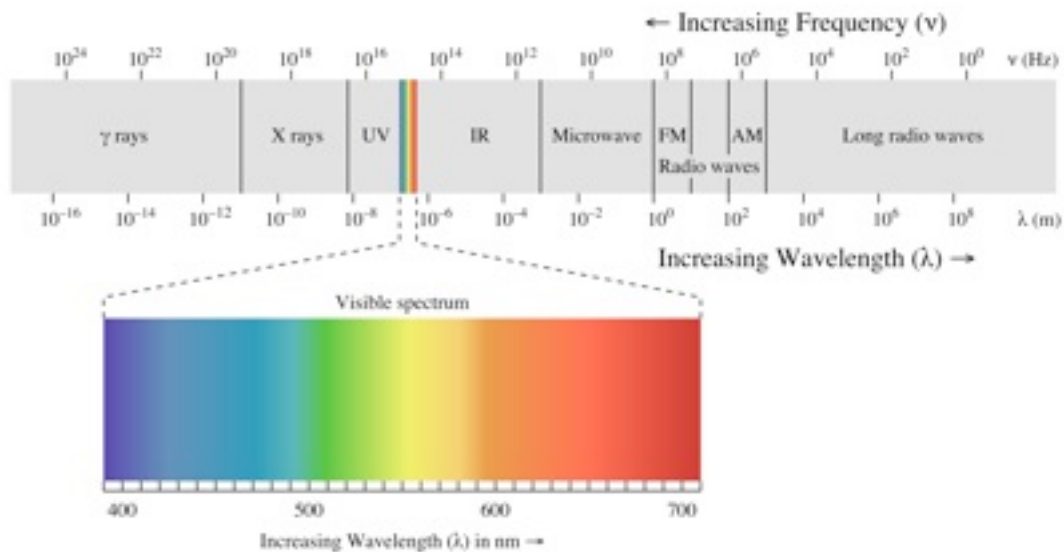




**Διάγραμμα 1.1** Αριθμός δομών βιομορίων που έχουν προσδιοριστεί ανά έτος με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (πράσινες ράβδοι), πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (μαύρες ράβδοι) και ηλεκτρονική μικροσκοπία (κόκκινες ράβδοι). Πηγή: [http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general\\_information/pdb\\_statistics/index.html](http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html)

### 1.2.2 Βασικές αρχές της μεθόδου

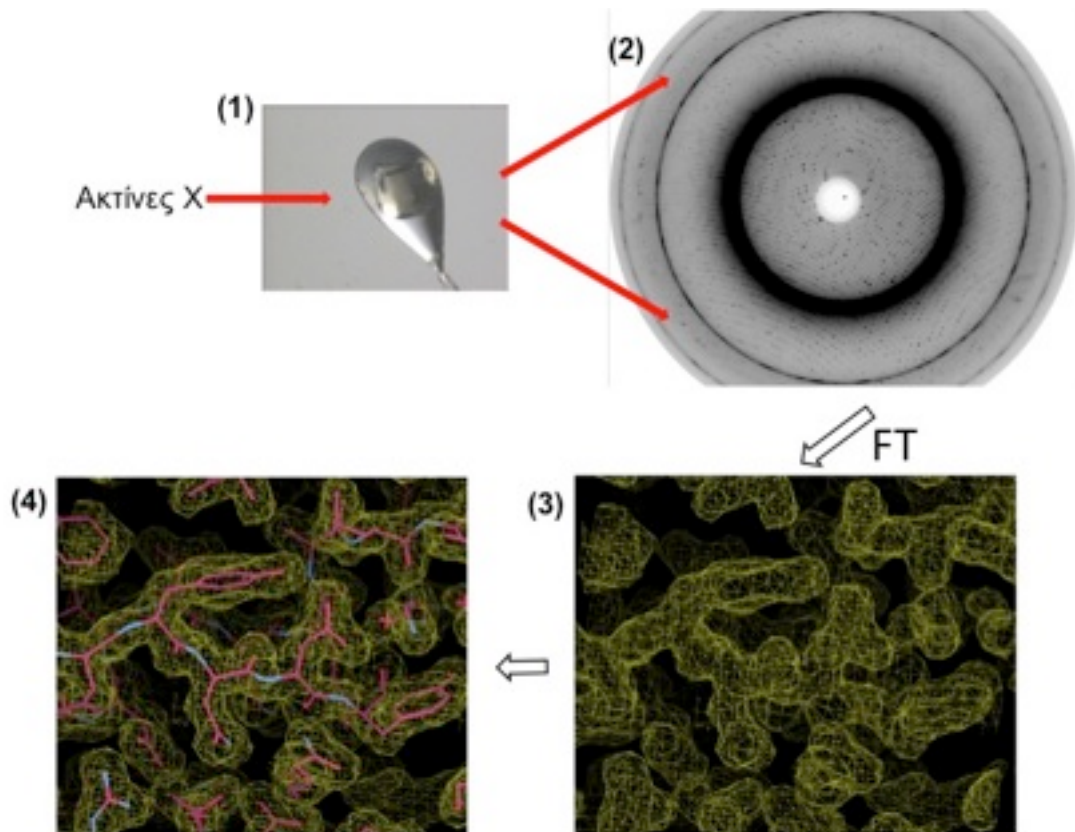
Η βασική αρχή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ στηρίζεται στην περίθλαση των ακτίνων-Χ από έναν κρύσταλλο του μακρομορίου. Οι ακτίνες-Χ διακρίνονται σε «μαλακές» με μήκος κύματος μεταξύ 10 – 0.1 nm και «σκληρές», με μήκος κύματος μεταξύ 0.1-0.01 nm. Η χρήση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας είναι αυτή που επιτρέπει τη συλλογή δομικών πληροφοριών σε ατομική διακριτική ικανότητα ( $10^{-10}$  m), καθώς σε όλες τις τεχνικές μικροσκοπίας η διακριτική ικανότητα καθορίζεται από το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας.



**Εικόνα 1.11** Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (Πηγή: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:EM\\_spectrum.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg)).

Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει την τοποθέτηση του κρυστάλλου σε γωνιοστάτη και την έκθεσή του σε ευθυγραμμισμένη δέσμη ακτίνων-X μήκους κύματος  $\sim 0.6$  με  $2.3 \text{ \AA}$  καθώς περιστρέφεται διαδοχικά κατά μικρή κάθε φορά γωνία. Τα αντίστοιχα περιθλασιγράμματα καταγράφονται από ανιχνευτή. Με χρήση τεχνικών που περιγράφονται παρακάτω ο κρυσταλλογράφος χρησιμοποιεί τα πειραματικά αυτά δεδομένα για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητα του μακρομορίου και την κατασκευή του μοριακού μοντέλου για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής (Σχήμα 1.1).

Για την παραγωγή ακτίνων-X χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικοί τύποι πηγών: οι συμβατικές πηγές ακτίνων-X, τα σύγχροτρον και οι πηγές Compton. Οι συμβατικές πηγές ακτίνων-X απαντώνται συνήθως σε ερευνητικά εργαστήρια και διακρίνονται σε λυχνίες και περιστρεφόμενες ανόδους. Οι ακτίνες-X παράγονται από επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια τα οποία εκπέμπονται από μία πηγή υψηλής τάσης και προσπίπτουν σε ένα μεταλλικό στόχο (π.χ. Cu). Με τον τρόπο αυτό προσδίδουν ενέργεια η οποία διεγείρει τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων του στόχου. Κατά το στάδιο της αποδιέγερσης τα ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακά στοιβάδων καταλαμβάνουν χαμηλότερες ενεργειακά θέσεις παράγοντας ακτινοβολία X με ενέργεια της τάξης των κιλο-ηλεκτρονιοβόλτ (keV). Υψηλότερης ενέργειας ακτίνες-X παράγονται στις συγχροτρονικές εγκαταστάσεις (Εικόνα 1.12). Αυτές περιλαμβάνουν



**Σχήμα 1.1** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθείται για τον προσδιορισμό της κρυσταλλογραφικής δομής ενός μακρομορίου. Ο κρύσταλλος εκτίθεται στις ακτίνες-X (1), καταγράφονται τα αντίστοιχα περιθλασιγράμματα από ανιχνευτή,(2) επεξεργάζονται με ειδικό λογισμικό και εν συνεχεία προσδιορίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα (3) μέσα στην οποία κατασκευάζεται το μοριακό μοντέλο (4). (Πηγή εικόνας κρυστάλλου: UCDavis/ChemWiki).

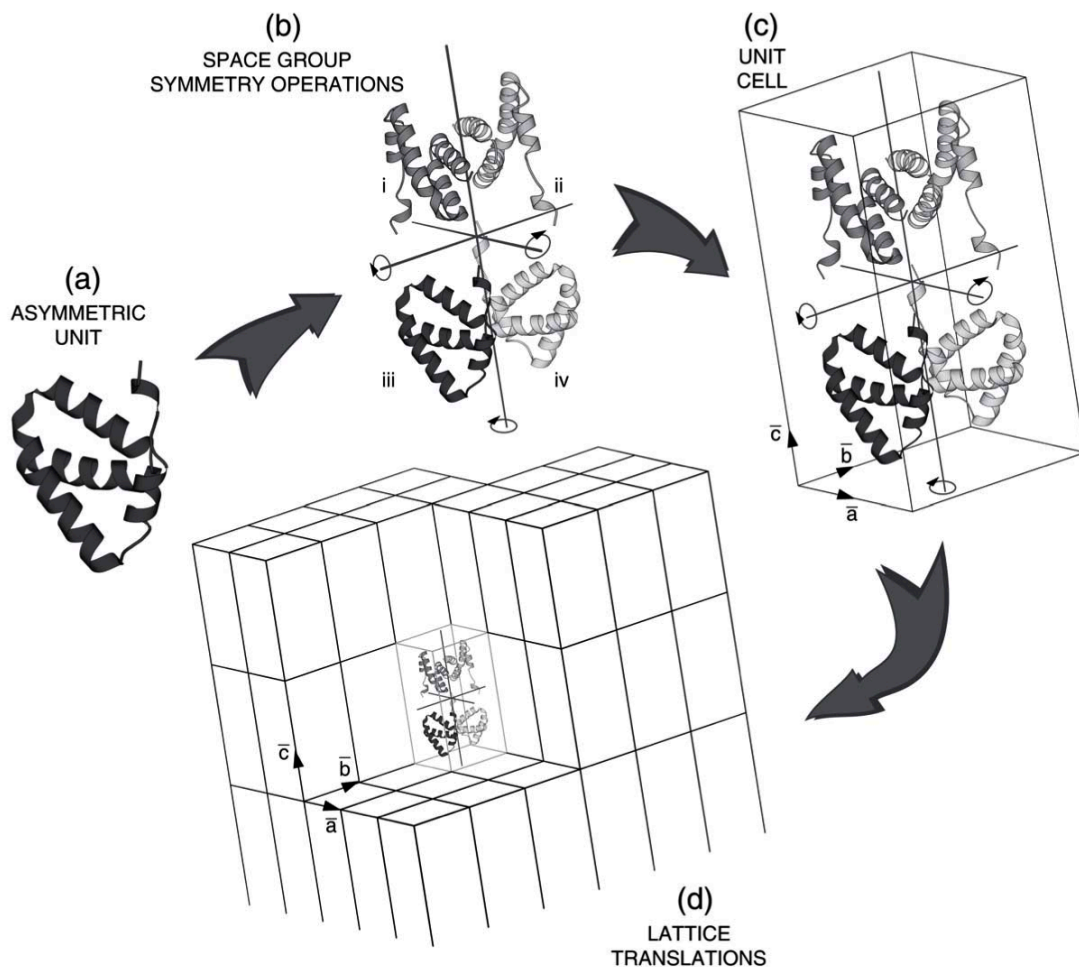
τεράστιους δακτυλίους και ισχυρούς ηλεκτρομαγνήτες οι οποίοι διασφαλίζουν την καμπύλη τροχιά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (της τάξης των γιγα-ηλεκτρονιοβόλτ (GeV)). Μετά από την αρχική τους επιτάχυνση, τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο δακτύλιο όπου διατηρούν σταθερή ενέργεια αλλά υφίστανται γωνιακή επιτάχυνση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



**Εικόνα 1.12** Η πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας Diamond που βρίσκεται στην Αγγλία (Harwell Science and Innovation Campus, Oxfordshire). Πηγή: <http://www.diamond.ac.uk/Home/Media/images.html>.

### 1.2.3.1 Η φύση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων

Για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης απαιτείται η ανάπτυξη κρυστάλλων, περιοδικών δηλαδή διατάξεων από στοιχειώδεις δομικές μονάδες (μοναδιαίες κυψελίδες) οι οποίες περιλαμβάνουν το υπό μελέτη βιομόριο. Η κρυστάλλωση είναι απαραίτητη καθώς η περίθλαση των ακτίνων-X από ένα μόνο μόριο θα ήταν εξαιρετικά ασθενής και μη ανιχνεύσιμη. Οι κρύσταλλοι δηλαδή λειτουργούν ως ενισχυτές του σήματος περίθλασης. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται από τρεις ακμές  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και τρεις γωνίες  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  και μπορεί να ανακατασκευασθεί από μικρότερα τμήματα, ασύμμετρες μονάδες, το πλήθος των οποίων είναι πεπερασμένο και υπαγορεύεται από την ομάδα χώρου συμμετρίας του κρυστάλλου για κάθε πλέγμα. Η ασύμμετρη μονάδα περιέχει όλες τις πληροφορίες που απαιτούνται για την ανακατασκευή της μοναδιαίας κυψελίδας με την εφαρμογή των κατάλληλων τελεστών συμμετρίας (Εικόνα 1.13).



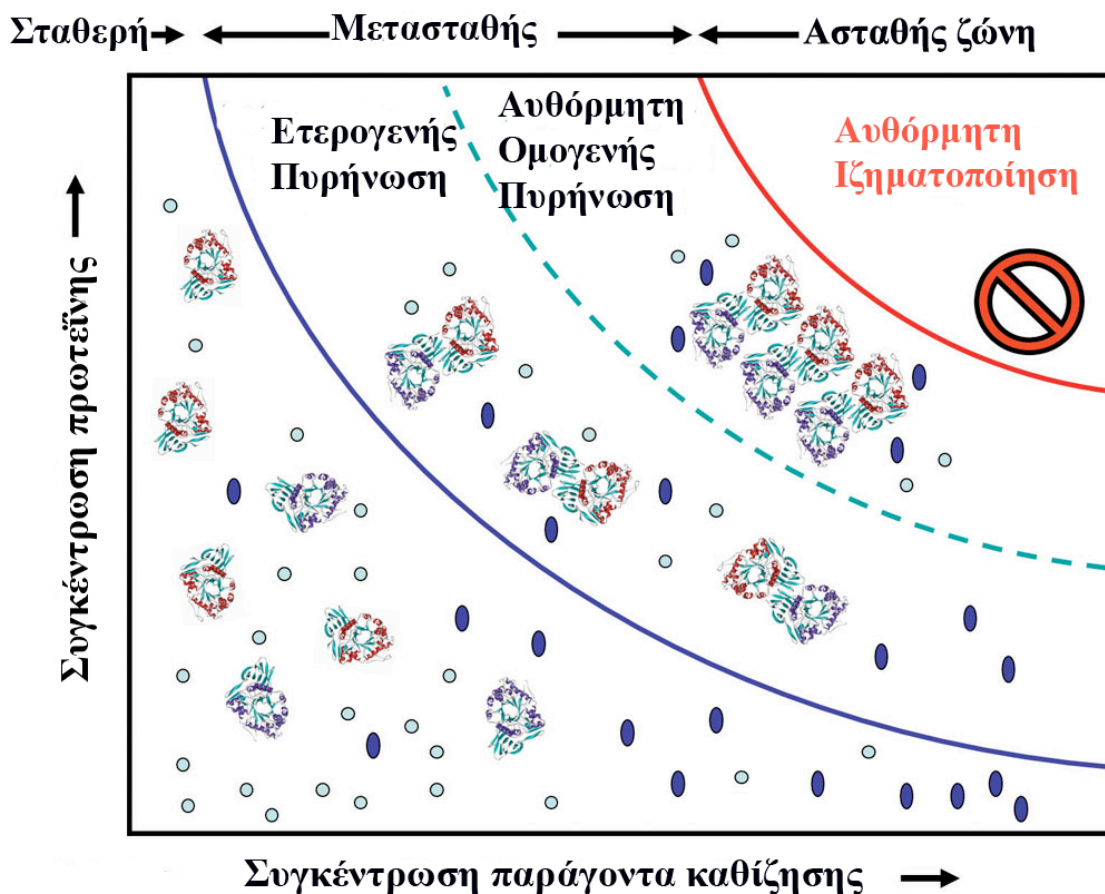
**Εικόνα 1.13.** Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας (asymmetric unit, a), από την οποία με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας (space group symmetry operations, b) προκύπτει η μοναδιαία κυψελίδα (unit cell, c). Από την επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας σε διατεταγμένη μορφή σχηματίζεται ο κρύσταλλος (d) (Πηγή εικόνας: A. McPherson, 2008, EMBO PEPC6 Course).

Οι μακρομοριακοί κρύσταλλοι αποτελούνται από περίπου 50% διαλύτη (ποσοστό ωστόσο που μπορεί να κυμαίνεται από 25 έως 90% ανάλογα με τη φύση του μακρομορίου) ο οποίος κατανέμεται σε «κανάλια» μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (γέφυρες άλατος, υδρογόνου και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις) είναι πολύ λιγότερες από αυτές που συναντώνται σε κρυστάλλους κοινών μορίων. Για το λόγο αυτό οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι συνήθως πιο μικρού μεγέθους, πιο εύθραστοι ενώ περιθλούν τις ακτίνες-X πολύ πιο ασθενώς. Είναι ευαίσθητοι στη θερμοκρασία και καταστρέφονται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ακτινοβολία λόγω σχηματισμού ελεύθερων ριζών και καταστροφής του κρυσταλλικού πλέγματος (Garman 1999). Η παρουσία υψηλών

ποσοτών διαλύτη, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξασθένησης του σήματος περίθλασης, συμβάλλει ταυτόχρονα και στη διατήρηση των δομικών και βιολογικών ιδιοτήτων των μακρομορίων που εισέρχονται στον κρύσταλλο, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη τους με τη διάχυση υποστρωμάτων, συνενζύμων, παρεμποδιστών, προσδετών ή ιόντων μέσα και έξω από το πλέγμα (Rupp 2009).

### 1.2.3.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

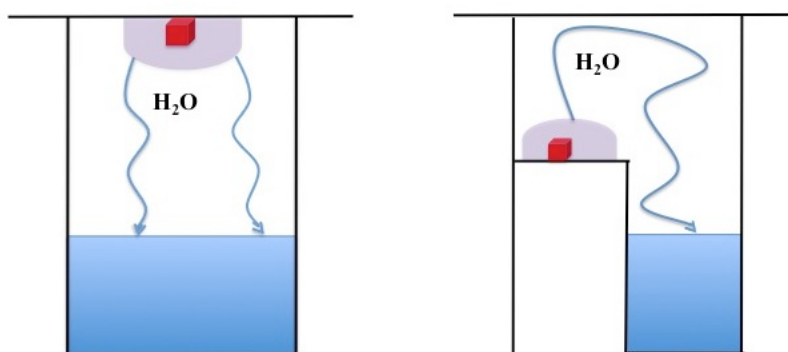
Η κρυστάλλωση ενός μορίου και γενικότερα οποιασδήποτε χημικής ουσίας συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικά ωστόσο αλληλοεξαρτώμενα στάδια: α) την πυρήνωση και β) την ανάπτυξη του κρυστάλλου. Η πυρήνωση είναι ένα φαινόμενο δύσκολο να προσεγγιστεί τόσο θεωρητικά όσο και πειραματικά καθότι πρόκειται για αλλαγή φάσης πρώτης τάξης κατά την οποία τα μόρια μεταβαίνουν από μία τελείως τυχαία σε μία οργανωμένη διάταξη. Είναι πιθανό αυτό να συμβαίνει μέσω του σχηματισμού μερικώς δομημένων ή παρακρυσταλλικών ενδιάμεσων - σε αυτή την περίπτωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων - τα οποία τελικά μετατρέπονται σε μικρές οργανωμένες δομές, τους «κρίσιμους πυρήνες» (McPherson 2004). Αναγκαία προϋπόθεση για την κρυστάλλωση των μακρομορίων είναι η δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού (Διάγραμμα 1.2). Πρόκειται για μία θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση κατά την οποία η μακρομοριακή ουσία βρίσκεται σε διαλυμένη μορφή ενώ οι φυσικοχημικές συνθήκες του διαλύματος βρίσκονται εκτός του ορίου διαλυτότητάς της. Η ισορροπία αποκαθίσταται με το σχηματισμό στερεής φάσης όπως είναι οι κρύσταλλοι μέχρι να αποκατασταθεί η κατάσταση κορεσμού. Ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται με αλλαγή των ιδιοτήτων ενός ακόρεστου διαλύματος του βιομορίου έτσι ώστε να μειωθεί η διαλυτότητά του ή να αυξηθούν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των διαλυμένων μορίων. Αυτό γίνεται με διάφορους τρόπους όπως α) αλλαγή της ιοντικής ισχύος (προσθήκη άλατος) β) αλλαγή των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (αλλαγή pH, προσθήκη ιόντων που υποβοηθούν τη σύζευξη των μορίων γ) αλλαγή της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και του διαλύτη (προσθήκη πολυμερών ή ιόντων) δ) αλλαγή θερμοκρασίας.



**Διάγραμμα 1.2** Σχηματική απεικόνιση του δισδιάστατου διαγράμματος φάσεων στο οποίο υποδεικνύονται επιπλέον τα στάδια πυρήνωσης. Τα μόρια νερού απεικονίζονται ως γαλάζιες σφαίρες και τα μόρια παράγοντα καθίζησης ως μπλε ελλείψεις. Η μετασταθής και η ασταθής ζώνη αντιστοιχούν σε κατάσταση υπερκορεσμού ενώ κατά την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών επιδιώκεται η μετάβαση στη ζώνη αυθόρμητης ομογενούς πυρήνωσης (Rupp 2009).

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι σχετικά απλή. Σε αδρές γραμμές, η πρωτεΐνη διαλυτοποιείται σε ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα, αναμιγνύεται με το διάλυμα κρυστάλλωσης μέσα σε ένα κλειστό σύστημα και το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας μέχρι εκεί που επιτρέπει η κινητική του συστήματος. Διάφορες τεχνικές κρυστάλλωσης με παραλλαγές ως προς τον τρόπο ανάμιξης και εξισορρόπησης έχουν αναπτυχθεί, όπως είναι η τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης (Batch), η τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapour diffusion), η διαπίδυση (Dialysis) και η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (Free-interface diffusion). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η τεχνική διάχυσης των ατμών με κρεμάμενη ή καθήμενη σταγόνα (Εικόνα 1.14). Η διάταξη περιλαμβάνει κλειστό σύστημα το οποίο

αποτελείται από ένα βοθρίο που φέρει τη σταγόνα (μίγμα πρωτεΐνης και διαλύματος κρυστάλλωσης) και μία δεξαμενή με διάλυμα κρυστάλλωσης. Το διάλυμα της δεξαμενής απορροφά ατμούς ύδατος από τη σταγόνα λόγω της διαφοράς στη συγκέντρωση των επιμέρους συστατικών του. Η δε πρωτεΐνη που βρίσκεται στη σταγόνα οδηγείται με τον τρόπο αυτό σε κατάσταση υπερκορεσμού και κατ'επέκταση σε ανάπτυξη κρυστάλλων.



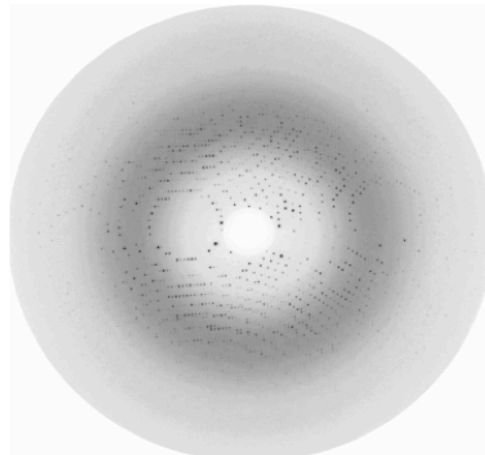
**Εικόνα 1.14.** Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της τεχνικής διάχυσης με κρεμάμενη (αριστερά) και καθήμενη (δεξιά) σταγόνα.

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



### 1.2.4 Περίθλαση ακτίνων-Χ

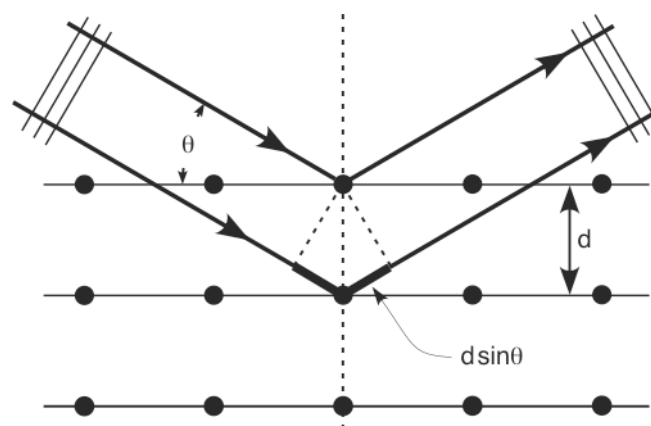
Κατά την έκθεση του κρυστάλλου σε ακτίνες-Χ καταγράφονται τα περιθλασιγράμματα που προκύπτουν από τη σκέδαση των ακτίνων από τα ηλεκτρόνια των ατόμων του κρυσταλλικού πλέγματος, φαινόμενο που περιγράφηκε πρώτα από τον Lawrence Bragg το 1913 (Εικόνα 1.15).



**Εικόνα 1.15** Περιθλασίγραμμα ενός κρυστάλλου φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

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

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



**Σχήμα 1.2** Σχηματική απεικόνιση του νόμου του Bragg.

Η περιθλώμενη ακτινοβολία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα κύμα πλάτους  $|F|$  και φάσης  $\phi$  και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$F(hkl) = |F(hkl)| \cdot \exp[i\phi(hkl)]$$

Το κύμα  $F(hkl)$  καλείται δομικός παράγοντας της ανάκλασης  $hkl$  που αντιστοιχεί στο επίπεδο περίθλασης που ορίζεται από τους τρεις αυτούς δείκτες (δείκτες Miller). Η απόσταση μεταξύ των επί μέρους επιπέδων περίθλασης καλείται ως περιθλαστική ικανότητα,  $d_{hkl}$ . Για κάθε ανάκλαση  $hkl$ , ο  $F(hkl)$  μπορεί να υπολογιστεί μέσω μετασχηματισμού *Fourier* της ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $\rho$  και περιγράφεται μαθηματικά από την παρακάτω εξίσωση:

$$F(hkl) = \int_{\text{κυψελίδα}} \rho(xyz) \cdot \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dV$$

Δηλαδή ο δομικός παράγοντας για κάθε ανάκλαση  $hkl$  προκύπτει ως το ολοκλήρωμα σε όλο τον όγκο ( $dV$ ) της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου του γινομένου της ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $\rho(xyz)$  με το μιγαδικό αριθμό  $\exp[2\pi i(hx+ky+lz)]$ . Οι συντεταγμένες  $x,y,z$  περιγράφουν τη διάταξη των ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα και είναι κλασματικές συντεταγμένες των ακμών  $a, b, c$ , αντίστοιχα. Οι μετρήσεις των πειραμάτων περίθλασης γίνονται στον αντίστροφο χώρο που συνδέεται με τον ορθό μέσω μετασχηματισμού *Fourier*. Οι παράγοντες δομής είναι στοιχεία του αντίστροφου χώρου ενώ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του ορθού.

Με βάση τα προηγούμενα η ηλεκτρονιακή πυκνότητα είναι ο αντίστροφος μετασχηματισμός *Fourier* ( $FT^{-1}$ ) του περιθλασιγράμματος. Στην περίπτωση αυτή, επειδή το περιθλασίγραμμα αποτελείται από διακριτές περιθλάσεις ο μετασχηματισμός είναι ένα άθροισμα και όχι ολοκλήρωμα:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(hkl)| \cdot \exp[i\phi(hkl)] \cdot \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Από τα περιθλασιγράμματα που προκύπτουν κατά την πειραματική διαδικασία είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι εντάσεις των περιθλάσεων από τις οποίες προκύπτει και το πλάτος  $|F(hkl)|$ , όχι όμως η φάση  $\phi$ , γεγονός που στην κρυσταλλογραφία αναφέρεται ως πρόβλημα των φάσεων.

### 1.2.5 Τεχνικές προσδιορισμού της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Το πρόβλημα των φάσεων αντιμετωπίζεται με την εφαρμογή κατάλληλων πειραματικών και υπολογιστικών μεθόδων με κυριότερες τη μοριακή αντικατάσταση (Molecular Replacement, MR), την ισόμορφη αντικατάσταση (Isomorphous Replacement), τη μέθοδο της ανώμαλης σκέδασης (Single/Multiwavelength Anomalous Diffraction, SAD/MAD) και τις άμεσες μεθόδους (direct methods) (Taylor 2003). 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). 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 σελινομεθειονίνη κατά την ανασυνδυασμένη έκφραση των πρωτεϊνών (Ealick 2000). Οι άμεσες μέθοδοι εκμεταλλεύονται τις σχέσεις που διέπουν τις φάσεις συγκεκριμένων ομάδων παραγόντων δομής. 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).

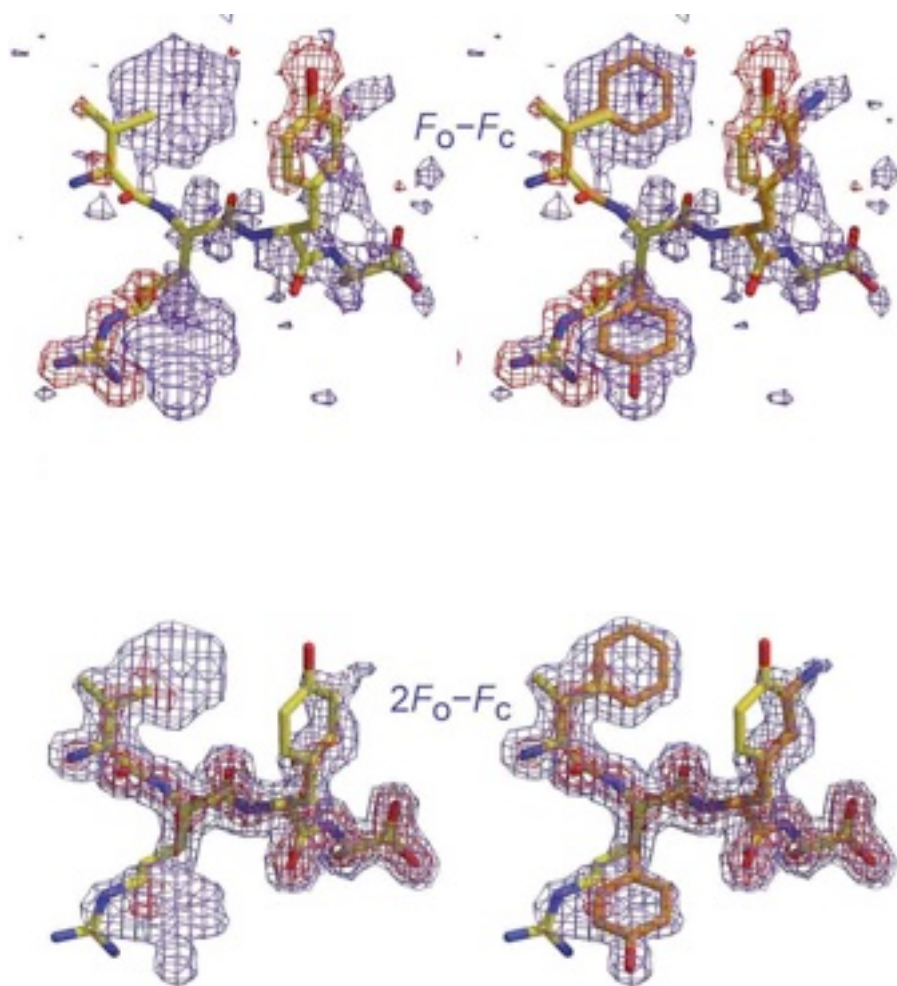
Η τεχνική μοριακής αντικατάστασης αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Rossmann et al. (1962) και έκτοτε αποτελεί μία από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές (περίπου το 70% των κατατεθειμένων πρωτεϊνικών δομών στη βάση δεδομένων PDB έχουν προσδιοριστεί με μοριακή αντικατάσταση) με την ισχύ της να μεγαλώνει συνεχώς καθώς ολοένα και περισσότερες καινούριες πρωτεϊνικές δομές γίνονται γνωστές (Evans and McCoy 2008). Η βασική ιδέα είναι η χρήση ενός ή περισσότερων μοντέλων (μοντέλα αναζήτησης) δομικά παρόμοιων με την πρωτεΐνη στόχο ή τμήματος αυτής για την εύρεση του σωστού προσανατολισμού και θέσης στην άγνωστη κρυσταλλική δομή. Αυτό γίνεται είτε με απευθείας αναζήτηση λύσης (6-D μέθοδοι, με βασικό μειονέκτημα το μεγάλο υπολογιστικό κόστος) είτε με εύρεση του προσανατολισμού και της θέσεως του μακρομορίου σε δύο ξεχωριστά στάδια. Προγράμματα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία είναι τα *EPMR* (Kissinger,

Gehlhaar et al. 1999), *SOMoRe* (Jamrog, Zhang et al. 2003), *Queen Of Spades* (Glykos and Kokkinidis 2001) και *COMO* (Tong, 1996). Τα προγράμματα που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία κάνουν χρήση του χώρου Patterson, όπως είναι τα *MOLREP* (Vagin and Teplyakov, 1997) και *AMoRe* (Navaza 1994) ή, πιο πρόσφατα, τις συναρτήσεις “μέγιστης πιθανότητας” (maximum-likelihood) όπως είναι το πρόγραμμα *PHASER* (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007). Η κατασκευή του μοντέλου αναζήτησης είναι ένα από τα πλέον κρίσιμα στάδια για την επιτυχή επίλυση της δομής και γίνεται με βάση μία ή και περισσότερες γνωστές δομές πρωτεϊνών που παρουσιάζουν ταυτότητα αλληλουχίας, συνήθως μεγαλύτερη από 30%, με την πρωτεΐνη στόχο. Στα πλαίσια της αυτοματοποίησης για την ταχύτερη εύρεση λύσης καθώς και για την επιτυχή αντιμετώπιση περιπτώσεων, όπου πχ δεν υπάρχουν γνωστές δομές με υψηλή αμινοξική ταυτότητα, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια αλγόριθμοι που εκτελούν αυτοματοποιημένα τα επιμέρους στάδια της μοριακής αντικατάστασης: την κατασκευή αρχικών μοντέλων και την παράλληλη εκτέλεση μοριακής αντικατάστασης και βελτιστοποίησης μοντέλου κάνοντας χρήση μίας μεγάλης ποικιλίας διαθέσιμων προγραμμάτων. Τέτοιοι αλγόριθμοι αυτοματοποίησης είναι το *JCSG MR pipeline* (Schwarzenbacher, Godzik et al. 2008), *Casp R* (Claude, Suhre et al. 2004), *MrBUMP* (Keegan and Winn 2008) και *BALBES* (Long, Vagin et al. 2008).

### 1.2.6 Κατασκευή και βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής δομής

Ο προσδιορισμός της τριδιάστατης δομής του βιομορίου ολοκληρώνεται, μετά από την εύρεση μίας αρχικής λύσης, μέσω μίας κυκλικής διαδικασίας ανακατασκευής της δομής και βελτιστοποίησης των συντεταγμένων του μοντέλου. Η επιτυχία του σταδίου αυτού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης και κατ'επέκταση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι χάρτες αυτοί αποτελούν μία διδιάστατη υψομετρική αναπαράσταση της πυκνότητας  $\rho(xyz)$  το επίπεδο της οποίας εκφράζεται συχνά ως τυπική απόκλιση ( $\sigma$ ) από το μέσο όρο. Για τον οπτικό έλεγχο και την ανακατασκευή του μοντέλου χρησιμοποιούνται οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  και  $F_o - F_c$  που υπολογίζονται με βάση το πλάτος των πειραματικά προσδιορισμένων παραγόντων δομής ( $|F_o|$ ) και το πλάτος ( $|F_c|$ ) και φάση ( $\phi_c$ ) που προκύπτουν από το μοντέλο αναζήτησης. 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 τα σημεία που πρέπει να προστεθούν ή να αφαιρεθούν από το πρωτεϊνικό μοντέλο (Εικόνα 1.16).



**Εικόνα 1.16.** Οι χάρτες  $2F_o-F_c$  και  $F_o-F_c$ . Στο χάρτη  $F_o-F_c$  με κόκκινο αναδεικνύονται οι περιοχές που πρέπει να αφαιρεθούν από το μοντέλο και με μπλε οι περιοχές που πρέπει να προστεθούν. Το αρχικό μοντέλο είναι κίτρινο και το διορθωμένο πορτοκαλί. Αντίστοιχα για το χάρτη  $2F_o-F_c$  (Rupp, 2009).

Το στάδιο της ανακατασκευής της δομής περιλαμβάνει προσθήκη τμημάτων της αλληλουχίας που ενδεχομένως απουσιάζουν, πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων, μορίων νερού και άλλων προσδετών. Πραγματοποιείται είτε άμεσα από τον κρυσταλλογράφο με χρήση κατάλληλων προγραμμάτων όπως τα *O* (Jones, Zou et al. 1991) και *COOT* (Emsley, Lohkamp et al. 2010) είτε με τη βοήθεια ειδικών

προγραμμάτων αυτόματης τοποθέτησης τμημάτων του βιομορίου στην πυκνότητα όπως είναι τα *Buccaneer* (Cowtan 2006), *ARP/wARP* (Perrakis, Harkiolaki et al. 2001) και *AutoBuild* (Adams, Afonine et al. 2010). Κατά την προσθήκη νέων τμημάτων στο μοντέλο πραγματοποιείται ταυτόχρονα τοπική βελτιστοποίηση της δομής στον ορθό χώρο με βάση γεωμετρικά κριτήρια. Η διαδικασία ωστόσο αυτή δεν επαρκεί για την εξάλειψη όλων των ατελειών του μοντέλου όπως είναι λανθασμένα μήκη δεσμών και διαμορφώσεις δίεδρων γωνιών. Για το λόγο αυτό μετά από κάθε στάδιο ανακατασκευής της δομής στον ορθό χώρο ακολουθεί βελτιστοποίηση της δομής στον αντίστροφο. Με βάση το νέο μοριακό μοντέλο υπολογίζονται οι αντίστοιχοι παράγοντες δομής και στη συνέχεια ελαχιστοποιείται η απόκλιση ανάμεσα στις θεωρητικές και πειραματικά προσδιορισμένες εντάσεις με κατάλληλη τροποποίηση των παραμέτρων του μοντέλου. Επειδή συνήθως τα πειραματικά δεδομένα δεν επαρκούν ως μοναδικό κριτήριο βελτιστοποίησης της δομής επιβάλλονται ταυτόχρονα και στερεοχημικοί περιορισμοί, το βάρος των οποίων μειώνεται με την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων. Προγράμματα που χρησιμοποιούνται ευρέως στο στάδιο αυτό είναι τα *REFMAC* (Murshudov, Vagin et al. 1997), *Buster/TNT* (Tronrud 1997) και *CNS* (Brunger, Adams et al. 1998). Τα δύο στάδια ανακατασκευής και βελτιστοποίησης της δομής επαναλαμβάνονται μέχρις ότου το μοντέλο δεν επιδέχεται σημαντική βελτίωση ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει ικανοποιητική γεωμετρία.

Η απόκλιση του μοντέλου από τα πειραματικά δεδομένα ελέγχεται αριθμητικά μέσω των παραγόντων αξιοπιστίας  $R$  και  $R_{\text{free}}$ . Ο παράγοντας  $R$  υπολογίζεται με βάση τον τύπο  $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$  και επομένως σε κάθε κύκλο βελτιστοποίησης ελέγχεται η σύγκλιση του υπό κατασκευή μοντέλου με τα πειραματικά δεδομένα βάσει της τιμής του. Ο παράγοντας  $R_{\text{free}}$  υπολογίζεται με τον ίδιο τρόπο για ένα όμως ποσοστό (συνήθως 5%) των περιθλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη διαδικασία βελτιστοποίησης. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η υπερβελτιστοποίηση ενώ όταν η τιμή του παράγοντα αυτού πάψει να μειώνεται αυτό αποτελεί ένδειξη ολοκλήρωσης της διαδικασίας βελτιστοποίησης.

Η τελική αξιολόγηση του μοντέλου γίνεται με μία σειρά προγραμμάτων που εξετάζουν τόσο τη γεωμετρία όσο και τη συμφωνία του με τα πειραματικά δεδομένα. Στην πρώτη κατηγορία τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα *PROCHECK* (Laskowski, Rullmann et al. 1996), *WHATCHECK* (Hoof, Vriend et al. 1996) και

*MOLPROBITY* (Chen, Arendall et al. 2010). Για τον έλεγχο της συμβατότητας του μοντέλου με τα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιείται ο εξυπηρετητής *EDS* (Kleywegt, Harris et al. 2004) καθώς και το πρόγραμμα *SFCHECK* (Vaguine, Richelle et al. 1999).

### 1.2.7 Από τη δομή στη λειτουργία

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επίλυσης και προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής του μακρομορίου-στόχου, ακολουθεί η βιολογική ερμηνεία της λειτουργίας του μακρομορίου με βάση τη δομή. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιείται υπέρθεση της καινούριας δομής με δομές ομόλογων (είτε σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας, είτε δομικά ομόλογων) πρωτεϊνών προκειμένου να εντοπιστούν διαφορές και ομοιότητες. Στη συνέχεια, εφόσον το μακρομόριο μελετάται παρουσία κάποιου προσδέτη π.χ. υποστρώματος, γίνεται χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη. Απώτερος σκοπός της διαδικασίας που περιγράφηκε στην περίπτωση των βιοκαταλυτών ειδικότερα, είναι ο προσδιορισμός της σχέσης δομής-λειτουργίας προκειμένου να αποτιμηθεί ο λειτουργικός ρόλος συγκεκριμένων αμινοξέων και να σχεδιαστούν πιο αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες ή ενώσεις βιοτεχνολογικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (Carvalho, Trincao et al. 2009). Το πιο δύσκολο εγχείρημα στο στάδιο αυτό είναι η απόδοση ενός βιολογικού ρόλου στην πρωτεΐνη στην περίπτωση που αυτός είναι άγνωστος, όπως συμβαίνει για το 30-50% των κατατεθειμένων δομών που έχουν προκύψει από Κέντρα Δομικής Γενομικής (Chandonia and Brenner 2006). Στην περίπτωση αυτή, σημαντική είναι η χρήση υπολογιστικών αλγοριθμικών εργαλείων όπως είναι η πολλαπλή δομική στοίχιση, η αναζήτηση δομικών ομολόγων και γνωστών μοτίβων. Ταυτόχρονα, οι πληροφορίες που προκύπτουν από την κρυσταλλογραφική δομή μπορούν να συνδυαστούν με άλλες τεχνικές όπως είναι οι υπολογιστικές προσεγγίσεις μοριακής δυναμικής και η *in silico* πρόσδεση υποστρωμάτων για τη διαλεύκανση της λειτουργίας της υπό μελέτη πρωτεΐνης (Manjasetty, Turnbull et al. 2008).

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Μοριακή βιολογία

Στην παρούσα εργασία κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν στη ζύμη *P. pastoris* δύο πρωτεΐνες της οικογένειας 61 των γλυκοζιδικών υδρολασών: η *StCel61* από το μύκητα *S. thermophile* και η *FoCel61* από το μύκητα *F. oxysporum*. Επιπλέον, κλωνοποιήθηκε και έγιναν προσπάθειες προετοιμασίας της καταλυτικής υπομονάδας της *StCel61*, αφαιρέθηκαν δηλαδή από την αρχική πρωτεΐνη τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στο πεπτίδιο σύνδεσης και την μονάδα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία αυτή.

#### 2.1.1 Όργανα

Κατά την κλωνοποίηση, έκφραση και βιοχημικό χαρακτηρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία).
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Milli-Q (Millipore, ΗΠΑ).
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen, Γερμανία.
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, (Labequip, Καναδάς).
- Αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- Ιξωδόμετρο Ostwald.
- Συσκευή διήθησης υπό κενό



- Συσκευή συμπύκνωσης Amicon: Amicon chamber 8400 με μεμβράνη Diaflo PM-10, μέγεθος αποκλεισμού 10 kDa, Millipore, Billerica, USA.
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών Mini-PROTEAN 3 (BIORAD, Η.Π.Α).
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Συλλέκτης κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).
- Συσκευή αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης TC-512 TECHNE (Η.Π.Α).
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easigel H1-set της εταιρίας Scie-plas (Μεγάλη Βρετανία).
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α).

### 2.1.2 Μικροοργανισμοί

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μικροοργανισμοί:

1. Ο θερμόφιλος μύκητας *S. thermophile* ή *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 από την εταιρεία DSMZ (DSM No:1799, Γερμανία). Ο μικροοργανισμός φυλάσσονταν στους 4 °C σε δοκιμαστικούς σωλήνες με στερεό υπόστρωμα αποτελούμενο από 30 g/l εκχύλισμα βύνης, 3 g/l πεπτόνη, 1.5% (w/v) άγαρ pH 5.6 και υπό κλίση (slant) μετά από επώαση στους 45 °C για 5-6 ημέρες. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν κάθε 20-30 ημέρες προς αποφυγή μολύνσεων.

2. Ο μεσόφιλος μύκητας *F. oxysporum* (στέλεχος FGSC 9935 (NRRL 34936)) που απομονώθηκε από το κύμινο (Christakopoulos, Macris et al. 1989). Η διατήρηση του μικροοργανισμού γινόταν σε επικλινείς καλλιέργειες σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 20 mL με 7 mL θρεπτικό υλικό άγαρ που περιείχε εκχύλισμα πατάτας (PDA), 3.9% (w/v). Μετά από την επώαση του μικροοργανισμού στους 30 °C για 120 h, οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυλάσσονταν στους 4 °C και ανανεώνονταν κάθε 3 μήνες.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση και έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προμηθεύτηκαν από την εταιρία Invitrogen (Η.Π.Α). Πιο συγκεκριμένα, για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδιακών φορέων pCR<sup>®</sup>-Blunt και pPICZαC χρησιμοποιήθηκαν αντιστοίχως τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* TOP10 και TOP10F'. Για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος X-33 της μεθυλότροφης ζύμης *P. pastoris* (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut+).

### **2.1.3 Χημικά, ένζυμα και τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα (κιτ)**

Η τρυπτόνη, το εκχύλισμα ζύμης, το άγαρ, το χλωριούχο νάτριο και η καναμυκίνη προμηθεύτηκαν από τη SIGMA (Γερμανία) ενώ η ζεοσίνη από την Invivogen (Γαλλία). Η πολυμεράση VentR<sup>®</sup> DNA και η ριβονουκλεάση A (Rnase A) αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs (Beverly, MA), η πολυμεράση Phusion high-fidelity DNA polymerase από την εταιρεία Finnzymes (Espoo, Φινλανδία) και η πολυμεράση KOD Hot Start από τη Novagen. Τα σκευάσματα απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Perfectprep Gel Cleanup) και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep kit) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Eppendorf (Γερμανία) και Fermentas (Καναδάς), αντίστοιχα. Τα σκευάσματα Zero Blunt<sup>®</sup> PCR Cloning Kit, EasySelect<sup>™</sup> *Pichia* Expression Kit και ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC αγοράστηκαν από την Invitrogen (Η.Π.Α) ενώ τα περιοριστικά ένζυμα από την TAKARA (Ιαπωνία).

### **2.1.4 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας**

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνταν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και υπό πίεση 0.1 MPa. Η δεξτρόζη αποστειρωνόταν ξεχωριστά σε μορφή σκόνης. Οι θερμοευαίσθητες ουσίες όπως οι βιταμίνες και τα αντιβιοτικά αποστειρώνονταν με διήθηση σε φίλτρα διαμέτρου 0.2 μm και προστίθενταν στα θρεπτικά μετά από ψύξη των τελευταίων στους 60 °C. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων παρουσιάζεται στον

Πίνακα 2.1. Στην περίπτωση που παρασκευαζόταν στερεό θρεπτικό μέσο γινόταν προσθήκη 2% άγαρ.

**Πίνακας 2.1** Σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των *E. coli* και *P.pastoris*

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό μέσο	Σύσταση
<i>E. coli</i>	LB (Luria Bertani)	1% τρυπτόνη (w/v), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (w/v), 1% NaCl (w/v), pH= 7.0
<i>P. pastoris</i>	YPD(S)	1% εκχύλισμα ζύμης (w/v), 2% πεπτόνη (w/v), 2% δεξτρόζη (w/v), (1 M σορβιτόλη)
	BMGY/BMMY	1% εκχύλισμα ζύμης (w/v), 2% πεπτόνη (w/v), 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό κάλιο pH 6.0, 1.34% YNB* (w/v), $4 \times 10^{-5}$ βιοτίνη (w/v), 1% γλυκερόλη (BMGY) ή 0.5% μεθανόλη (BMMY) (v/v)
	MD (Minimal Dextrose)/ MM (Minimal Methanol)	1.34 % YNB, 2% δεξτρόζη (MD) ή 0.5% μεθανόλη (M/M) (v/v), $4 \times 10^{-5}$ βιοτίνη (w/v) και 1.5 % άγαρ (w/v).

\*σύσταση δ/τος YNB 10X: 34 g YNB + 100 g θειικό αμμώνιο/lit

## 2.1.4 Μοριακές Τεχνικές

### 2.1.4.1 Απομόνωση DNA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του ολικού DNA βασίστηκε σε αυτή που είχε αναφερθεί από τους Murray and Thompson (Murray and Thompson 1980). Λυοφιλωμένα κύτταρα (0.5 g ξηρό βάρος) κονιοποιήθηκαν σε γουδί και εν συνεχεία διαλυτοποιήθηκαν σε 10 ml διαλύματος εξαγωγής (0.1 M Tris, pH 7.5, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% (w/v) βρωμιούχο δεκαεξυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) και 1% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολούθησε επώαση στους 65 °C για 30 min με περιστασιακή ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1 (v/v) και το μίγμα μετά από ανάδευση

σχημάτισε γαλάκτωμα το οποίο φυγοκεντρήθηκε στα 5,000 xg για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση απομακρύνθηκε και ίσος όγκος ισοπροπανόλης προστέθηκε και αναμίχθηκε με 2 έως 4 γρήγορες και ήπιες αναστροφές. Το κατακρημνισμένο DNA μεταφέρθηκε σε σωλήνα που περιείχε 70% αιθανόλη για 20 min και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε, ξηράνθηκε και διαλύθηκε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA με 20 μg/ml Rnase A. Ο καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο ήταν το τελευταίο στάδιο για την προετοιμασία του κυτταρικού DNA που χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα τα πειράματα.

#### 2.1.4.2 Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *Stc161* και *Foc161* σχεδιάστηκαν με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντλήθηκε από το γονιδίωμα των *S. thermophile* και *F. oxysporum* αντίστοιχα (χρωμόσωμα\_2:3103350-3104378 *S. thermophile* v2.0, DOE Joint Genome Institute;



**Εικόνα 2.1** Η συσκευή αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων *Stc161*, *Stc161\_trunc* και *Foc161*.

<http://genome.jgi-psf.org/>, και *foxg-09688.2*, *F. oxysporum* Sequencing Project. Broad Institute of Harvard and MIT; <http://www.broad.mit.edu>). Για την κλωνοποίηση του γονιδιακού τμήματος που αντιστοιχεί στην καταλυτική μονάδα της *Stc161* (*Stc161\_trunc*), χωρίς δηλαδή την αλληλουχία που κωδικοποιεί το πεπτιδίο σύνδεσης και τον τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες στο καρβοξυτελικό άκρο της αρχικής πρωτεΐνης, σχεδιάστηκε ο κατάλληλος αντίστροφος εκκινητής (*Stc161\_trunc R'*) ενώ ως ευθύ εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος με αυτόν που είχε σχεδιαστεί για τον πολλαπλασιασμό του αρχικού γονιδίου *Stc161* (F). Η παρασκευή τους έγινε από την εταιρία Eurofins MWG Operon. Στην Εικόνα 2.1

παρουσιάζεται η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR, στους Πίνακες 2.2α και β η σύσταση του μίγματος της κάθε αντίδρασης και στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι χρησιμοποιούμενες πολυμεράσες, οι συνθήκες αντίδρασης και το μέγεθος του προϊόντος.

**Πίνακας 2.2α** Η σύσταση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των γονιδίων *Stcel61* και *Focel61*

Συστατικό (μl)	<i>Stcel61</i>	<i>Focel61</i>
Πολυμεράση (2 U/ μl)	1	0.5
DNA (~100 ng/ μl)	5	1
Εκκινητής F (50 μM)	1	1
Εκκινητής R (50 μM)	1	1
dNTPs mix (10 mM)	5	1
MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	3	-
Ρυθμιστικό διάλυμα	5 (10x)	10 (5x)
Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	29	35.5

**Πίνακας 2.2β** Σύσταση της αντίδρασης PCR για τον πολλαπλασιασμό του *Stcel61\_trunc*.

Συστατικό (μl)	
Πολυμεράση (2 U/ μl)	1
Πλασμίδιο pPICZαC/ <i>Stcel61</i> (4x10 <sup>-3</sup> mg/ml)	1
Εκκινητής F (50 μM)	1
Εκκινητής R (50 μM)	1
dNTPs mix (10 mM)	5
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)	5
Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	33

<b>Πίνακας 2.3</b> Οι εκκινητές, πολυμεράσες, συνθήκες της αντίδρασης PCR και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων				
<b>Γονίδιο</b>	<b>Εκκινητής</b>	<b>Πολυμεράση</b>	<b>Πρόγραμμα PCR</b>	<b>Μέγεθος προϊόντος</b>
<i>Stcel61</i> (F)	5'-GC <u>ATCGAT</u> GCATGGCCACGTCAGCCACATCG-3' <sup>1</sup>	VentR® DNA polymerase	[95 °C για 20 s	966
<i>Stcel61</i> (R)	5'-CGTCTAGACACTGGGAGTACCACTCGTTG-3' <sup>2</sup>		58 °C για 10 s 70 °C για 20 s ]x30 70 °C για 2 min	
<i>Stcel61_trunc</i> (R')	5'-CGTCTAGACCGGCAATGAGGGCCGGGC-3' <sup>2</sup>	KOD Hot Start	95 °C για 2 min [95 °C για 20 sec 60 °C για 10 s 70 °C για 15 s ]x30	665
<i>Focel61</i> (Foxg_09688.2)F	5'-CC <u>ATCGAT</u> GCACGGTCACGTCGCAAAGG-3' <sup>1</sup>	Phusion DNA polymerase	[98 °C για 10 s	682
<i>Focel61</i> (Foxg_09688.2) R	5'-GCTCTAGAATAGTTCGCACAGCAGGG-3' <sup>2</sup>		57 °C για 25 s; 72 °C για 30 s]x35 72 °C για 5 min	

<sup>1</sup> Υπογραμμισμένη η αλληλουχία πέψης του περιοριστικού ενζύμου *Cla*I

<sup>2</sup> Υπογραμμισμένη η αλληλουχία πέψης του περιοριστικού ενζύμου *Xba*I

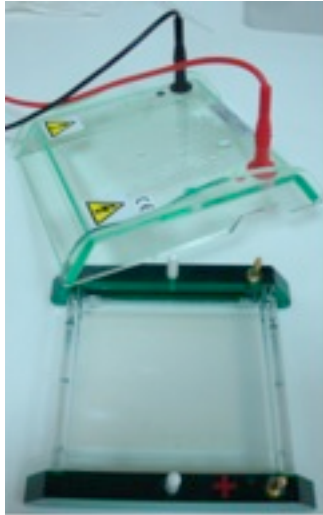
### 2.1.4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ταυτοποίηση, ο διαχωρισμός και η ανάκτηση των μορίων DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (w/v). Η σύσταση του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της πηκτής (διάλυμα TBE) και του διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4. Σε ηλεκτροφορήσεις ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε η αγαρόζη Agarose low EEO (AppliChem) ενώ στην περίπτωση απομόνωσης μορίων DNA η πηκτή παρασκευαζόταν από την αγαρόζη υψηλής ποιότητας Seakem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Δανία).

**Πίνακας 2.4** Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

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

Για την παρασκευή της πηκτής 0.5 g αγαρόζης αναμιγνύονταν με 50 ml διαλύματος TBE, ακολουθούσε βρασμός για περίπου 2 min και το μίγμα αφήνονταν να ψυχθεί χωρίς όμως να πήξει. Ακολουθούσε προσθήκη 5 ml βρωμιούχου αιθιδίου (συγκέντρωσης 1 mg/ml) και μεταφορά του υγρού ακόμα μίγματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 2.2). Μετά το σχηματισμό της πηκτής προστίθενταν 50 ml διαλύματος TBE και τα δείγματα DNA φορτώνονταν στις ειδικές θήκες. Για την εκτίμηση του μεγέθους αλλά και της ποσότητας των δειγμάτων DNA χρησιμοποιούνταν πρότυπα δείγματα μορίων DNA (HyperLadder™ I: 200-10,000 bp). Η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 60 Volt για περίπου 1h και ακολουθούσε εμφάνιση και φωτογράφιση των διαχωρισμένων ζωνών DNA με χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (InGenius Bio Imaging της Syngene, Μεγάλη Βρετανία). Στην περίπτωση που ήταν επιθυμητή η ανάκτηση DNA, γινόταν απομάκρυνση της αντίστοιχης ζώνης της πηκτής με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας. Ακολουθούσε καθαρισμός του DNA με χρήση του σκευάσματος Nucleospin DNA Clean-up kit της εταιρείας Macherey-Nagel.



**Εικόνα 2.2** Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και την ανάκτηση των μορίων DNA.

#### 2.1.4.4 Αντίδραση συνένωσης ενθέματος και πλασμιδιακού φορέα

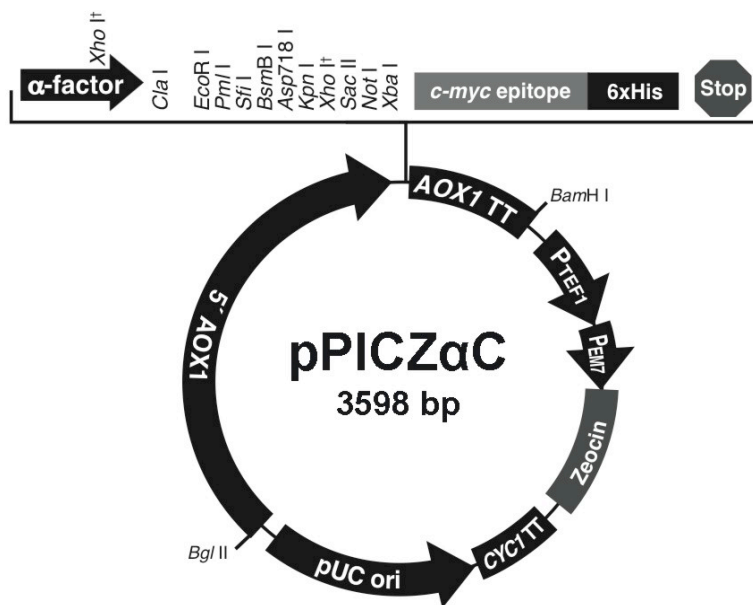
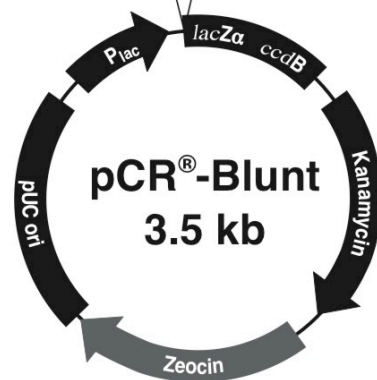
Οι αντιδράσεις συνένωσης ενθεμάτων με ισοτελή άκρα (blunt ends) στον πλασμιδιακό φορέα pCR<sup>®</sup>-Blunt (Εικόνα 2.3) πραγματοποιήθηκαν με χρήση του Zero Blunt<sup>®</sup> PCR Cloning Kit της εταιρείας Invitrogen. Στην περίπτωση που τα ενθέματα είχαν υποστεί κατεργασία με περιοριστικά ένζυμα και διέθεταν μονόκλωνα κολλώδη άκρα (sticky ends) η συνένωση γινόταν με φορέα pPICZαC (Εικόνα 2.3) που είχε υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Η σύσταση των αντιδράσεων συνένωσης για τις δύο περιπτώσεις περιγράφονται στον Πίνακα 2.5. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιούνταν ταυτόχρονα αντιδράσεις ελέγχου (control) κατά τις οποίες από το μίγμα συνένωσης παραλείπονταν α) το ένθετο και β) το ένθετο και η λιγάση.

**Πίνακας 2.5.** Σύσταση μίγματος συνένωσης ενθέματος με πλασμιδιακό φορέα. Η αντίδραση γινόταν στους 16 °C για 3-4 h.

	Ισοτελή άκρα (pCR <sup>®</sup> -Blunt)	Κολλώδη άκρα (pPICZαC)		
		1:3	1:5	1:7
<b>Συστατικό</b>				
Πλασμίδιο	1 μl (25 ng)	1 μl	1 μl	1 μl
Ένθετο DNA	5 μl	3 μl	5 μl	7 μl
T4 DNA Λιγάση	1 μl	1μl	1 μl	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10X)	1 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Υπερκάθαρο νερό	2 μl	13	11	9



M13 Reverse priming site Mlu I  
 201 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTAT TTAGGTGACG CGTTAGAATA  
 GTGTGTCCTT TGTTCGATACT GGTACTAATG CGTTTCGATA AATCCACTGC GCAATCTTAT  
  
Nsi I Hind III Kpn I Sac I BamH I Spe I  
 CTCAAGCTAT GCATCAAGCT TGGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT  
 GAGTTCGATA CGTAGTTCGA ACCATGGCTC GAGCCTAGGT GATCATTGCC GGC GGTCACA  
  
EcoR I EcoR I Pst I EcoR V  
 GCTGGAATTC AGG **Blunt PCR Product** CCTGAATTC GCAGATA  
 CGACCTTAAG TCC GGACTTAAGA CGTCTAT  
  
Not I Xho I Nsi I Xba I Apa I T7 promoter/priming site  
 TCCATCACAC TGGCGGCCG TCGAGCATGC ATCTAGAGGG CCCAATTCGC CCTATAGTGA  
 AGGTAGTGTG ACCGCCGGCG AGCTCGTACG TAGATCTCCC GGGTTAAGCG GGATATCACT  
  
 M13 Forward (-20) priming site  
 GTCGTATTAC AATTCAGTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT 470  
 CAGCATAATG TTAAGTGACC GGCAGCAAAA TGTTCAGCA CTGACCCTTT TGGGACCGCA



Εικόνα 2.3 Οι χάρτες των πλασμιδίων pCR®-Blunt pPICZαC της Invitrogen

#### **2.1.4.5 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* (TOP10 και TOP10F')**

##### **2.4.1.5α Προετοιμασία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων για χημικό μετασηματισμό**

Η προετοιμασία των βακτηριακών κυττάρων για ενσωμάτωση πλασμιδιακού DNA με χρήση χλωριούχου ασβεστίου βασίστηκε σε γνωστή μεθοδολογία που είχε διατυπωθεί από τους Cohen et al. (Cohen, Chang et al. 1972). Αρχικά έγινε εμβολιασμός σε 5ml LB (παρουσία 50 µg/ml τετρακυκλίνης στην περίπτωση των TOP10F') και επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) για περίπου 16 h στους 37 °C. Στη συνέχεια 1 ml της προκαλλιέργειας αυτής μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 250 ml που περιείχε 100 ml LB (χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού) και ακολούθησε πάλι επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) για περίπου 2 h στους 37 °C. Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε μεταξύ των τιμών 0.4-0.8, η καλλιέργεια αφέθηκε να ψυχθεί για περίπου 30 min σε παγόλουτρο. Εν συνεχεία τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 12 ml MgCl<sub>2</sub> 0.1 M. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε με επαναιώρηση σε 4 ml CaCl<sub>2</sub> 0.1 M και στη συνέχεια το κυτταρικό διάλυμα παρέμεινε στους 4 °C για περίπου 16 h. Μετά από προσθήκη 1.9 ml γλυκερόλης 50% (v/v), το αιώρημα μοιράστηκε σε δείγματα των 100 µl σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf τα οποία ψύχθηκαν απότομα σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80 °C.

##### **2.1.4.5β Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων**

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού φορέα στο εσωτερικό των TOP10 και TOP10F' αρχικά γινόταν αργή απόψυξη των κυττάρων με μεταφορά τους σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια γινόταν ήπια προσθήκη 1 µl πλασμιδίου απομονωμένου με χρήση του σκεύασματος GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep ή 5 µl από την αντίδραση συνένωσης και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 min. Μετά από μεταφορά στους 42 °C για αυστηρά 90 sec και επανατοποθέτηση στο παγόλουτρο, γινόταν προσθήκη 200 µl LB για τα TOP10 και LS-LB για τα TOP10F' και επώαση στους 37 °C για 1 h. Ακολουθούσε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με LB/καναμυκίνη (50 µg/ml) στην περίπτωση των TOP10 μετασηματισμένων με pCR<sup>®</sup>-Blunt ή σε τρυβλία με LS LB/ζεοσίνη (25 µg/ml) στην περίπτωση των TOP10F' μετασηματισμένων με

pPICZαC. Η επώαση διαρκούσε περίπου 16 h στους 37 °C και κατόπιν τα τρυβλία αποθηκεύονταν στους 4 °C.

#### **2.1.4.6 Ανάκτηση πλασμιδίων από τα μετασχηματισμένα βακτήρια**

Για την απομόνωση πλασμιδίων pCR<sup>®</sup>-Blunt από μετασχηματισμένα TOP10 γινόταν εμβολιασμός σε 5ml LB παρουσία 50 μg/ml καναμυκίνης ενώ στην περίπτωση των TOP10F' μετασχηματισμένων με pPICZαC χρησιμοποιούνταν 5ml LS-LB με 25 μg/ml ζεοσίνη. Ακολουθούσε επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) για περίπου 16 h στους 37 °C και στη συνέχεια γινόταν η ανάκτηση πλασμιδίων μικρής κλίμακας με χρήση του σκευάσματος GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep kit της εταιρείας Fermentas. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων γινόταν από την εταιρεία VBC-Biotech Services GmbH (Αυστρία).

#### **2.1.4.7 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού (ή περιοριστικά ένζυμα) είναι ένζυμα που έχουν απομονωθεί από αρχαία και βακτήρια και τα οποία κόβουν το δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Στην παρούσα εργασία, για την κλωνοποίηση γονιδίων στο φορέα pPICZαC γινόταν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Cla* I και *Xba* I ενώ με το *Sac* I γινόταν η γραμμικοποίηση πλασμιδίων πριν από την εισαγωγή τους στο γονιδίωμα της *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση. Οι αντιδράσεις πέψης γίνονταν στους 37 °C με βάση τα αντίστοιχα πρωτόκολλα της εταιρείας TAKARA (Ιαπωνία) από την οποία προμηθεύονταν τα ένζυμα (Πίνακας 2.6).

#### **2.1.4.8 Μετασχηματισμός κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση**

Για την εισαγωγή του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου στο χρωμοσωμικό DNA της *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης κατά την οποία αυξάνεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με την εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο του EasySelect<sup>™</sup> *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

**Πίνακας 2.6** Τα ένζυμα περιορισμού, οι αντίστοιχες αλληλουχίες πέψης και η σύσταση των μιγμάτων πέψης

Περιοριστική ενδονουκλέαση	Θέση περιορισμού	Μίγμα αντίδρασης
<i>Cla</i> I	5'...AT <sup>↓</sup> CGAT...3' 3'...TAGC <sup>↑</sup> TA...5'	5 μl πλασμιδιακό DNA (~2 μg) 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα M
<i>Xba</i> I	5'...T <sup>↓</sup> CTAGA...3' 3'...AGATC <sup>↑</sup> T...5'	1 μl <i>Cla</i> I (~10 U) 1 μl <i>Xba</i> I (~15 U) 11 μl υπερκάθαρο νερό
<i>Sac</i> I	5'...GAGCT <sup>↓</sup> C...3' 3'...C <sup>↑</sup> TCGAG...5'	30 μl πλασμίδιο pPICZαC (~10 μg) 10 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα L 1 μl <i>Sac</i> I (~10 U) 55 μl υπερκάθαρο νερό

#### 2.1.4.8α. Προετοιμασία πλασμιδίου και κυττάρων

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαC γραμμικοποιήθηκε στην περιοχή 5' *AOXI* με το περιοριστικό ένζυμο *Sac* I και ακολούθησε καθαρισμός με χρήση του σκευάσματος Nucleospin DNA Clean-up kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Στο τελευταίο στάδιο καθαρισμού το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο επαναιωρήθηκε σε 30 μl υπερκάθαρου νερού.

Για την προετοιμασία των κυττάρων της *P. pastoris* έγινε αρχικά προκαλλιέργεια X-33 σε 5 ml μέσο YPD (30 °C, 180 rpm, ~ 16h). Στη συνέχεια τα 5 ml μεταφέρθηκαν σε 200 ml YPD (τα οποία τοποθετούνται σε 2 κωνικές φιάλες των 250 ml) και επωάστηκαν στους 30 °C υπό ανάδευση μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει την τιμή 1.3-1.5 (~ 3-4 h). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (5 min στα 1500 xg, 4 °C) και επαναδιαλυτοποίηση του πρώτου ιζήματος σε 500 ml υπερκάθαρο νερό, του δεύτερου σε 250 ml υπερκάθαρο νερό, του τρίτου σε 20 ml διαλύματος σορβιτόλης 1 M και του τελευταίου σε 1 ml διαλύματος σορβιτόλης 1 M. Όλα τα παραπάνω διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί και προψυχθεί στους 4 °C. Τα κύτταρα μετά από την τελευταία επαναδιαλυτοποίηση παρέμειναν στους 0 °C και χρησιμοποιήθηκαν για το στάδιο του μετασχηματισμού.

#### 2.1.4.8β Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Πριν από την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού για το μετασχηματισμό των κυττάρων *P. pastoris*, 30 μl από το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο pPICZαC αναμίχθηκαν με 80 μl των κατάλληλα προετοιμασμένων κυττάρων. Το μίγμα



Εικόνα 2.4 Η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων *P. pastoris*.

μεταφέρθηκε σε ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης τοποθετημένη σε παγόλουτρο και παρέμεινε εκεί για περίπου 5 min. Ακολούθησε εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού (2 kV για 4 ms) με χρήση της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD (Η.Π.Α) (Εικόνα 2.4) και άμεση προσθήκη 1 ml παγωμένου διαλύματος σορβιτόλης 1 M. Μετά από μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα, το μίγμα παρέμεινε για 1-2 h στους 30 °C και στη συνέχεια έγινε επίστρωση σε θρεπτικό υλικό YPDS με 100 μg/ml ζεοσίνη. Οι ανασυνδυασμένες αποικίες εμφανίστηκαν μετά από επώαση 3-10 ημερών στους 30 °C.

#### 2.1.4.9 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris*

##### 2.1.4.9α Επιλογή κλώνου έκφρασης με τρυβλία MM και καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Επιλέχθηκαν τυχαία περίπου 25 μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων X-33 στα τρυβλία με τη ζεοσίνη, και ανακαλλιεργούνταν σε τρυβλία MM εμπλουτισμένα με 0.4% (w/v) β-γλουκάνης (με πυκνότητα ~ 1 αποικία/cm<sup>2</sup>) καθώς και σε τρυβλία MD για την ανάπτυξη της βιομάζας. Μετά από επώαση 24 h στους 30 °C, τα τρυβλία MM χρωματίστηκαν με 1% (w/v) Congo Red για 5 min και αποχρωματίστηκαν με 1 M NaCl. Γύρω από τις αποικίες που παρήγαγαν ανασυνδυασμένα πρωτεΐνη σχηματίστηκαν με τον τρόπο αυτό ορατές κηλίδες λόγω

της ασθενούς κυτταρινολυτικής δράσης που παρουσιάζουν ορισμένες GH61 (Teather and Wood 1982).

Από τις αποικίες αυτές επιλέχθηκαν 5 έως 10 για υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου προκειμένου να προσδιοριστεί ο κλώνος που θα χρησιμοποιούνταν για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Αναλυτικότερα, αρχικά έγινε εμβολιασμός 50 ml μέσου BMGY με τις επιλεγμένες αποικίες σε ισάριθμες κωνικές φιάλες των 250 ml και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση (28-30 °C, 200 rpm) για περίπου 16-20 h, μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει την τιμή 2-6. Στη συνέχεια, και με βάση την τιμή OD<sub>600</sub>, φυγοκεντρήθηκε συγκεκριμένος όγκος της κάθε προκαλλιέργειας έτσι ώστε με επαναιώρηση σε 50 ml μέσου BMMY να είναι OD<sub>600</sub>=1. Οι καλλιέργειες σε BMMY για την επαγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρέμειναν για 5 ημέρες στους 28-30 °C υπό ανάδευση (200 rpm) ενώ κάθε μέρα προστίθενταν 250 ml μεθανόλης ώστε η τελική συγκέντρωση να παραμένει 0.5% (v/v). Καθημερινά λαμβάνονταν μικρά δείγματα από το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας για να ελεγχθεί η παρουσία αλλά και ο βαθμός έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης ώστε να επιλεγθεί ο αντίστοιχος κλώνος και να προσδιοριστεί η βέλτιστη διάρκεια καλλιέργειας. Επειδή δεν ήταν γνωστή η κύρια δράση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ώστε να ελεγχθεί η δραστηριότητά τους με κινητικό πείραμα (assay), η παρουσία και η σχετική ποσότητά τους προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Ο κλώνος που επιλέχθηκε τελικά για μεγάλης κλίμακας παραγωγή της πρωτεΐνης ανακαλλιιεργήθηκε σε τρυβλία YPD με ζεοσίνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας (μήνες έως έτη), γινόταν προκαλλιέργεια των κλώνων σε υγρό μέσο YPD για 16 h στους 30 °C και ακολουθούσε φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε YPD εμπλουτισμένο με 15 % (v/v) γλυκερόλη σε τελικό OD<sub>600</sub>=50-100. Τα κύτταρα καταψύχονταν με ταχεία εμβάπτιση σε υγρό άζωτο (flash freezing) και αποθηκεύονταν στους -80 °C.

#### **2.1.4.9β Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας**

Ο επιλεγμένος κλώνος χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 6 κωνικών των 250 ml που περιείχαν 50 ml BMGY έκαστη και στη συνέχεια με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο έγινε η μεταφορά των ανασυνδυασμένων κυττάρων σε 1 lt μέσου BMMG με  $OD_{600}=1$  (μοιρασμένου ισόποσα σε 4 κωνικές φιάλες του 1 lt, Εικόνα 2.5). Η επαγωγή έγινε για το προκαθορισμένο χρονικό διάστημα με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0.5% (v/v). Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού οι καλλιέργειες συλλέγονταν, φυγοκεντρούνταν για 10 min στα 1500 xg, 4 °C και το υπερκείμενο φυλασσόταν για το επόμενο στάδιο του καθαρισμού.



**Εικόνα 2.5** Κωνικές φιάλες με καλλιέργειες *P. pastoris* σε θρεπτικό μέσο BMMG.

#### **2.1.4.10 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών**

Το στάδιο του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με αξιοποίηση των 6 συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (His-tag) που είχαν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και τα οποία έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με ιόντα κοβαλτίου ακινητοποιημένα σε στήλες ρητίνης. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή διαλύματος ιμιδαζολίου που ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των ιστιδινών της πρωτεΐνης για την πρόσδεση στα ιόντα  $Co^{2+}$ . Όλα τα στάδια του καθαρισμού έλαβαν χώρα στους 4 °C για την επιβράδυνση της δράσης των πρωτεασών που υπάρχουν στο εξωκυτταρικό υγρό και την καλύτερη συντήρηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η ρύθμιση της ροής της κινητής φάσης της χρωματογραφίας στα 2 ml/min έγινε με χρήση της αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.) ενώ για την ανίχνευση των εκλούμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV (280 nm) με λογισμικό καταγραφής Clarity Version 2.3.3.124 (DataApex, Τσεχία). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με συλλέκτη κλασμάτων (Waters, Millipore, Η.Π.Α.).

Αρχικά το υπερκείμενο της καλλιέργειας υποβλήθηκε σε διήθηση υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2  $\mu\text{m}$  (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters). Ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι τελικού όγκου  $\sim 30$  ml χρησιμοποιώντας συσκευή Amicon με μεμβράνη που επέτρεπε τη διόδο μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa (Amicon chamber 8400, Millipore, Billerica, Η.Π.Α.). Το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα, στη συνέχεια, εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl (διάλυμα Talon) και στη συνέχεια διαβιβάστηκε σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Talon, Clontech; εσωτερική διάμετρος 1.0 cm, μήκος 15 cm) η οποία προηγουμένα είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα Talon. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 60 ml ίδιου διαλύματος για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ουσιών και έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης με εφαρμογή διαλύματος Talon με γραμμικά αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (0-100 mM). Τα κλάσματα που περιείχαν πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και αφαλατώθηκαν με διαπίδυση έναντι ρ. δ. 20 mM Tris-HCl pH 8. Ο έλεγχος του βαθμού καθαρότητας έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE).

#### **2.1.4.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)**

##### **2.1.4.11α Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου**

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη: την πηκτή επιστοιβάσης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel). Οι αναλογίες των επιμέρους συστατικών των δύο τμημάτων της πηκτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα της πηκτής διαχωρισμού και τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ειδικές γυάλινες πλάκες που έχουν προηγουμένως καθαριστεί με αιθανόλη. Το μίγμα αφήνεται για περίπου 30 min προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της πηκτής και στη συνέχεια προστίθεται από πάνω το μίγμα της πηκτής επιστοιβάσης ενώ τοποθετείται ειδική χτένα για το σχηματισμό των οπών τοποθέτησης των δειγμάτων. Όταν η πηκτή είναι έτοιμη οι γυάλινες πλάκες



μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αφού απομακρυνθεί η χτένα. Στη συσκευή προστίθενται περίπου 500 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (30.3 g/l Tris, 144 g/l γλυκίνη, 1% (w/v) SDS, pH 8.3).

**Πίνακας 2.7** Σύσταση πηκτής επιστοίβασης και διαχωρισμού στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) 4%		Πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) 12.5%	
Υπερκάθαρο νερό	3 ml	Υπερκάθαρο νερό	3.5 ml
0.25 M Tris 0.2% (w/v) SDS pH 6.8	3.75 ml	0.25 M Tris 0.2% (w/v) SDS pH 8.8	9.4 ml
40 % ακρυλαμίδιο	0.75 ml	40 % ακρυλαμίδιο	5.8 ml
TEMED	20 $\mu$ l	TEMED	30 $\mu$ l
10% (w/v) APS	60 $\mu$ l	10% (w/v) APS	90 $\mu$ l

#### 2.1.4.11β Προετοιμασία δειγμάτων - ηλεκτροφόρηση

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα (~1-5  $\mu$ g πρωτεΐνης) όγκου 15  $\mu$ l αναμίχθηκαν με 7  $\mu$ l διαλύματος φόρτωσης (1 g SDS, 5 ml 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5 ml 50% (w/w) γλυκερόλη, 2.5 ml μερκαπτοαιθανόλη, 4 ml 0.1% (w/v) κυανού βρωμοφαινόλης) και ακολούθησε βρασμός για 5-7 min. Στη συνέχεια τα δείγματα καθώς και 5-7  $\mu$ l πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Πίνακας 2.8) τοποθετήθηκαν στις οπές της πηκτής και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με 35 mA/πήκτωμα για περίπου 1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε στο διάλυμα χρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0.4% (w/v) Coomassie G-250) οπού παρέμεινε για περίπου 20 min υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ).

MW ( kDa)	Πρωτεΐνη	Προέλευση
116.0	β-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

**Πίνακας 2.8** Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του MB των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

#### 2.1.4.12 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου (Isoelectric focusing-PAGE, IEF- PAGE).

Για τον προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου με τη συσκευή PhastSystem electrophoresis unit (Amersham Biosciences AB, Σουηδία) και με βάση το αντίστοιχο πρωτόκολλο της εταιρείας. Οι πηκτές ήταν προπαρασκευασμένες και εφοδιασμένες με αμφολύτες που κάλυπταν την περιοχή pH 3.0 - 9.0 ενώ χρησιμοποιήθηκε πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών γνωστών pI (pH 3.5-9.3) από την εταιρεία GE Healthcare.

#### 2.1.4.13 Ενζυμική απογλυκοζυλίωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για την απομάκρυνση των σακχάρων από τις θέσεις *N*-γλυκοζυλίωσης χρησιμοποιήθηκε η γλυκοζιδάση Endo H (P0702S) από την εταιρεία New England Biolabs (ΗΠΑ) σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Αρχικά έγινε η μετουσίωση 2 μg πρωτεΐνης με βρασμό για 10 min σε 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης 10X. Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί και κατόπιν προστέθηκαν 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος απογλυκοζυλίωσης 10X, 5 μl γλυκοζιδάσης Endo H και 3 μl H<sub>2</sub>O. Η

επώαση έγινε στους 37 °C για 3 h και η αλλαγή στο μοριακό βάρος λόγω απομάκρυνσης των σακχάρων εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

#### **2.1.4.14 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης**

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) η οποία στηρίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin και την οξείδωση των αρωματικών αμινοξέων (κυρίως τρυπτοφάνης και τυροσίνης). Η συγκέντρωση του ανηγμένου αντιδραστηρίου Folin προσδιορίζεται μέσω της τιμής της απορρόφησης στα 750 nm με βάση το νόμο Lambert Beer. Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin).

Στην περίπτωση των πειραμάτων κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών η συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm (Stoscheck 1990). Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης για κάθε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα ProtParam του ExPASy (Gasteiger, Gattiker et al. 2003).

## **2.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός**

### **2.2.1 Ένζυμα**

Για τις αντιδράσεις υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα: β-γλυκοζιδάση (BLUC) από το μύκητα *Aspergillus niger*, κελλοβιοϋδρολάση I (CBHI) και ενδο-β-γλουκανάση (EGII) από το μύκητα *Trichoderma longibrachiatum*, της εταιρίας Megazyme (Ιρλανδία) καθώς και το πολυενζυμικό κυτταρινολυτικό μίγμα Celluclast, από το μύκητα *Trichoderma reesei* της εταιρείας Novozymes (Δανία).

### **2.2.2 Υποστρώματα και αντιδραστήρια**

Για την ανίχνευση ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (carboxymethyl-62

cellulose, CMC), υδροξυαιθυλ-κυτταρίνη (hydroxyethyl-cellulose) από την εταιρεία Fluka (Buchs, Ελβετία), υδροξυπροπυλ-μεθυλ-κυτταρίνη (hydroxypropyl-methylcellulose, HPMC), λαμιναρίνη (laminarin), ξυλάνη βρώμης (oat spelt xylan), ξυλάνη οξιάς (beechwood xylan), αραβικό κόμμι (arabic gum) από την εταιρεία SIGMA (Γερμανία), ξυλάνη σημύδας από τη ROTH (H.P.A.), β-γλουκάνη κριθαριού (barley β-glucan), λιχενάνη (lichenan), αραβινοξυλάνη σίτου (wheat arabinoxylan) από τη MEGAZYME (Ιρλανδία), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel) από τη Macherey-Nagel και το διηθητικό χαρτί από τη Merck (Darmstadt, Germany).

Για τα πειράματα συνεργιστικής δράσης χρησιμοποιήθηκε ο αναγωγικός παράγοντας τρις (2-καρβοξυαιθυλο)φωσφίνη, (Tris (2-CarboxyEthyl)Phosphine, TCEP) και η κυτταρίνη που είχε υποστεί επεξεργασία με ιοντικά υγρά (Ionic Liquid Treated Cellulose - ILTC) από την εταιρεία SIGMA. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) Το υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου (Pretreated Wheat Straw, PWS) από την εταιρεία Inbicon (Skaerbaek, Δανία). Ο χρόνος παραμονής στον υδροθερμικό αντιδραστήρα ήταν κατά μέσο όρο 12 min ενώ η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 190 °C με παροχή ατμού (Thomsen, Thygesen et al. 2006). Η σύστασή του PWS (50.2% γλουκάνη, 3.8% ημικυτταρίνη, 25.5% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ, 2.8% άμυλο) προσδιορίστηκε με βάση γνωστή διαδικασία (Xiros, Katapodis et al. 2009). β) Έλατο προκατεργασμένο με ατμό (190°C, 5 min) υπό ήπιες όξινες συνθήκες (Steam pretreated under weak acidic conditions spruce, PS) από την εταιρεία SEKAB E-Technology (Örnköldsvik, Sverige), με σύσταση 51.4% γλουκάνη, 7.0% ημικυτταρίνη, 39.7% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 1.6% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ γ) δύο προϋδρολυμένοι αλκαλικοί πολτοί (PP1 και PP2) από γυμνόσπερμα-αιθαλή δέντρα (60% έλατο και 40% μικρά τεμάχια πεύκου) από τους οποίους είχε απομακρυνθεί η λιγνίνη σε διαφορετικό βαθμό από την εταιρεία Innventia AB (Στοκχόλμη, Σουηδία). Ο πολτός PP2 είχε υποβληθεί σε ένα επιπλέον στάδιο απολιγνινοποίησης παρουσία οξυγόνου. Η σύστασή τους ήταν 79.3% γλουκάνη, 13.4% ημικυτταρίνη, 6.9% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.4% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ για το PP1 και 96.3% γλουκάνη, 2.5% ημικυτταρίνη, 1.0% λιγνίνη αδιάλυτη σε οξύ και 0.2% λιγνίνη διαλυτή σε οξύ για το PP2.

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αδιάλυτων λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε η ουσία 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH·) από την εταιρεία SIGMA.

### **2.2.3 Ανίχνευση ενεργότητας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών**

Για τη διερεύνηση ενδεχόμενης υδρολυτικής ικανότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έγινε επώαση 20 περίπου ωρών με μία σειρά συνθετικών και φυσικών υποστρωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε συγκεκριμένο pH και θερμοκρασία ανάλογα με τη μελετούμενη πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων που προέκυπταν προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959). Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 2 mg/ml.

### **2.2.4 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης και προσδιορισμός σταθερότητας**

Μετά από τον εντοπισμό του υποστρώματος εκείνου στο οποίο η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσίαζε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης καθώς και η σταθερότητα σε ένα εύρος pH και θερμοκρασιών. Πιο συγκεκριμένα, για την εύρεση του βέλτιστου pH δράσης έγινε διαλυτοποίηση του επιλεγμένου υποστρώματος στα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα : 0.1 M κιτρικό-φωσφορικό (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0, 8.0, 9.0) και 0.1 M γλυκίνη-NaOH (pH 9.0, 10.0, 11.0). Ακολουθούσε επώαση με την πρωτεΐνη για 5 h σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS. Αντίστοιχα, για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης έγινε επώαση 5 h με το επιλεγμένο υπόστρωμα το οποίο είχε προηγουμένα διαλυτοποιηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 30-90 °C με βήμα 10 °C.

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας σε διαφορετικά pH έγινε επώαση της πρωτεΐνης στα ρυθμιστικά διαλύματα που είχαν χρησιμοποιηθεί κατά την εύρεση του βέλτιστου pH σε θερμοκρασία 4 °C για 1, 8 και 24 h. Ακολούθησε μέτρηση της εναπομένουσας ενζυμικής δραστηριότητας στις βέλτιστες συνθήκες δράσης και με το επιλεγμένο υπόστρωμα. Αντίστοιχα, για την εύρεση της θερμοκρασιακής σταθερότητας η πρωτεΐνη παρέμεινε στους 30-90 °C για 1, 8 και 24 h και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η εναπομένουσα ενζυμική δραστηριότητα.

### 2.2.5 Μελέτη πρόσδεσης σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες

Η δυνατότητα πρόσδεσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες προσδιορίστηκε ποιοτικά με βάση μία μέθοδο που περιγράφεται από τους Bolam et al. (Bolam, Xie et al. 2004). 50 ml δ/τος πρωτεΐνης (~20 µg) αναμίχθηκαν με 2 mg αδιάλυτου πολυσακχαρίτη και τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο υπό ήπια ανάδευση για περίπου 1 h. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο που περιείχε τη μη δεσμευμένη πρωτεΐνη απομακρύνθηκε. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε, διαδικασία που επαναλήφθηκε δύο φορές. Ακολούθησε βρασμός σε 15 µl ρυθμιστικού διαλύματος με 10% (w/v) SDS για 10 min ώστε να αποκολληθεί η ενδεχομένως προσδεδεμένη πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη στα δύο κλάσματα (υπερκείμενο πρώτης φυγοκέντρησης και μετά από βρασμό με SDS) ανιχνεύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

### 2.2.6 Αντιδράσεις υδρόλυσης και πειράματα συνεργιτισμού

Οι αντιδράσεις υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν σε σωλήνες τύπου erppendorf των 2 ml, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία) υπό ανάδευση 1000 rpm και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. 1.5 ml ενζυμικού μίγματος διαλυμένου σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> προστέθηκαν στο προς υδρόλυση υπόστρωμα τελικής συγκέντρωσης 3% (w/v). Για τη μελέτη της επίδρασης αναγωγικών ουσιών στην ενζυμική λειτουργία προστέθηκε τρις (2-καρβοξυαιθυλο)φωσφίνη (TCEP) ή ασκορβικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Οι ποσότητες των ενζυμικών εμπορικών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συνεργιτισμού εκφρασμένες σε mg πρωτεΐνης / g υποστρώματος ήταν οι ακόλουθες: 11, 2.5 και 14 για τα Celluclast, EGII και CBHI, αντίστοιχα. Κάθε φορά γινόταν προσθήκη β-γλυκοζιδάσης σε ποσοστό ~3% (w/w) επί του συνολικού πρωτεϊνικού φορτίου. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα (~60µl) από τις αντιδράσεις και μετρούνταν τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν εις διπλούν.

### 2.2.7 Πειράματα συνεργιτισμού με θερμοφιλα ένζυμα

Η δράση της *StCel61* κατά την υδρόλυση του υδροθερμικά κατεργασμένου άχυρου σίτου (PWS) από μίγμα θερμοφίλων ενζύμων μελετήθηκε στα πλαίσια μίας συνεργασίας με την ομάδα της Δρ. Liisa Viikari στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι (Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki). Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ. Nóra Szijártó. Το μίγμα θερμοφίλων ενζύμων αποτελείτο από την ενδογλουκανάση Cel5A του *T. aurantiacus* (*TaEGII*) σε ποσοστό 17% (w/w), τις κελλοβοιοϋδρολάσες Cel7A του *Acremonium thermophilum* (*AtCBHI*) και Cel6A του *Chaetomium thermophilum* (*CtCBHI*) σε ποσοστά 52% και 17% (w/w), αντίστοιχα, και την ξυλανάση Xyn10A του *T. aurantiacus* (*TaXYL*) σε ποσοστό 14% (w/w). Σε όλες τις υδρολύσεις προστέθηκαν 2 mg/g υποστρώματος από τη β-γλυκοζιδάση Cel3A του *A. thermophilum* (*AtβG*). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 72 h σε σωλήνες τύπου falcon των 10 ml υπό ανάδευση 250 rpm και σε θερμοκρασία 55 °C. 5 ml ενζυμικού μίγματος διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 50 mM και pH 5.0, 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, προστέθηκαν σε 2% (w/v) PWS. Δείγματα από τις αντιδράσεις λήφθηκαν στις 24 και 72 h και μετρήθηκαν τα αναγωγικά σάκχαρα με τη μέθοδο DNS. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν εις διπλούν.

### 2.2.8 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των αδιάλυτων λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου (PWS), προκατεργασμένο με ατμό έλατο (PS) και των δύο προϋδρολυμένων αλκαλικών πολτών (PP1 και PP2). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το μεθανολικό εκχύλισμα των παραπάνω υλικών. Η εκχύλιση με μεθανόλη πραγματοποιήθηκε σε διάταξη Soxhlet. 10 g υποστρώματος εκχυλίστηκαν με μεθανόλη διαδοχικά 10 φορές, διαδικασία που διήρκεσε περίπου 5 h και το τελικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 20 ml (Suzuki et al., 2008).

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) όπως

περιγράφεται από το Serpen και τους συνεργάτες του (Serpen, Caruano et al. 2007). Η ελεύθερη ρίζα DPPH· απορροφά στα 515 nm. Από τη μείωση στην τιμή της μετρούμενης απορρόφησης κατά τη δέσμευσή του DPPH· από την υπό μελέτη ουσία εκτιμάται η αντιοξειδωτική της δράση. Αρχικά μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm διαλύματος DPPH· σε μεθανόλη συγκέντρωσης 0.1 mM. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη υποστρώματος και μεθανολικού εκχυλίσματος σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις, το μίγμα αναδεύτηκε για 10 min και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης από την ποσότητα του υποστρώματος που απαιτούνταν για την κατανάλωση του 50% της αρχικής ποσότητας DPPH· (EC<sub>50</sub>).

### **2.2.9 Μελέτη επίδρασης δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα των GH61**

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δράση της *StCel61* αλλά και πώς αυτή επηρεάζεται από τη φύση τους, πραγματοποιήθηκε μία σειρά υδρολύσεων παρουσία διαφορετικών μετάλλων. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 0.5 ml και συγκέντρωση *StCel61* 1 μM στους 50 °C για 16 h. Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 5 mM στο μίγμα της αντίδρασης ήταν: MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> και ZnSO<sub>4</sub>. Αρχικά τόσο η πρωτεΐνη όσο και το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιούνταν στην περαιτέρω πειραματική διαδικασία επώαστηκαν με 10 mM χηλικού υποκαταστάτη αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) προκειμένου να απομακρυνθούν ήδη υπάρχοντα μεταλλικά ιόντα που θα επηρέαζαν τις τελικές μετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η *StCel61* παράμεινε στους 37 ° C για 10 min στο ρυθμιστικό της διάλυμα (Tris HCl 100 mM pH 8.0) εμπλουτισμένο με (EDTA), ενώ το υπόστρωμα εξισορροπήθηκε με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 50 mM pH 5.0 που επίσης περιείχε 10 mM χηλικού υποκαταστάτη. Ακολούθησε απομάκρυνση του EDTA με πολλαπλές διαδοχικές πλύσεις της *StCel61* και με διαπίδυση στην περίπτωση του υποστρώματος χρησιμοποιώντας τα ίδια ρυθμιστικά διαλύματα.



### 2.3 NMR στο Πεδίο του Χρόνου (Time Domain NMR)

Προκειμένου να εξεταστεί αν η δράση των GH61 επηρεάζει την κατάσταση και τη θέση των μορίων νερού που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με τις ίνες της κυτταρίνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στο Πεδίο του Χρόνου (Time Domain NMR). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Dr. Claus Felby (Center for Forest and Landscape, University of Copenhagen) στα πλαίσια μίας επίσκεψης μικρής διάρκειας (Short Term Scientific Mission, STSM) χρηματοδοτούμενης από το πρόγραμμα COST FP0602 ([http://www.cost.esf.org/domains\\_actions/fps/Actions/FP0602](http://www.cost.esf.org/domains_actions/fps/Actions/FP0602)).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της κατάστασης των μορίων νερού που βρίσκονται σε δείγματα κυτταρινών και ξύλων καθώς και για την εκτίμηση της επίδρασης της βιομηχανικής κατεργασίας στις αλληλεπιδράσεις νερού-κυτταρίνης (Froix and Nelson 1975; Araujo, Mackay et al. 1993; Elder, Labbe et al. 2006).

Με την εισαγωγή του δείγματος μέσα στο μαγνητικό πεδίο έντασης  $B_0$ , προσανατολίζονται οι μαγνητικές ροπές όλων των πυρήνων σε σχέση με την ένταση του πεδίου. Ο προσανατολισμός αυτός μπορεί να είναι παράλληλος με τη  $B_0$  και χαμηλότερος ενεργειακά (κατάσταση  $\alpha$  με κβαντικό αριθμό spin  $m=1/2$  όταν  $s=1/2$ ) ή αντιπαράλληλος με τη  $B_0$  και υψηλότερος ενεργειακά (κατάσταση  $\beta$  με  $m=-1/2$  όταν  $s=1/2$ ). Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων είναι πολύ μικρή, γι'αυτό παρουσιάζεται μία μικρή περίσσεια πυρήνων στη χαμηλότερη ενεργειακά στάθμη.

Η εφαρμογή παλμών ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κατάλληλων συχνοτήτων προκαλεί την εξίσωση των πληθυσμών των πυρήνων στις δύο ενεργειακές καταστάσεις. Όταν διακοπεί η ακτινοβολία, οι πυρήνες επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση. Η αποκατάσταση της ισορροπίας συνοδεύεται από μεταβολή του προσανατολισμού της μαγνητικής ροπής των πυρήνων η οποία επάγει τη δημιουργία ηλεκτρικού σήματος. Το ηλεκτρικό αυτό σήμα ανιχνεύεται από το πηνίο εκπομπής/λήψης, ενισχύεται και μορφοποιείται. Στη συνέχεια υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier κατά τον οποίο το σήμα συναρτήσεως του χρόνου μετασχηματίζεται στο αντίστοιχο φάσμα συναρτήσεως της συχνότητας.

Μία από τις παραμέτρους που περιγράφουν τη διαδικασία αυτή είναι ο χρόνος χαλάρωσης spin-spin ( $T_2$ ). Η τιμή του εξαρτάται κυρίως από το πόσο ελεύθερα μπορούν να κινούνται οι πυρήνες υδρογόνου. Για παράδειγμα, οι πυρήνες που βρίσκονται σε στερεά κατάσταση έχουν μικρότερους χρόνους χαλάρωσης από αυτούς που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση.

Στο κυτταρινικό πλέγμα υπάρχουν δύο κατηγορίες μορίων νερού, με διαφορετικούς χρόνους  $T_2$  (Hartley, Kamke et al. 1992). Με μία γενικευμένη και απλουστευτική προσέγγιση, οι δύο κατηγορίες μορίων νερού είναι οι ακόλουθες (Felby, Thygesen et al. 2008):

1. Προσδεμένο νερό που διακρίνεται περαιτέρω σε α) πρωτεύον και β) δευτερεύον προσδεμένο νερό. Το πρωτεύον προσδεμένο νερό αλληλεπιδρά με την επιφάνεια των κυτταρινικών ινών μέσω δεσμών υδρογόνου ενώ το δευτερεύον συνδέεται με την ημικυτταρίνη, τη λιγνίνη ή άλλα μόρια νερού με τριχοειδείς δυνάμεις ή δεσμούς υδρογόνου.
2. Το ελεύθερο νερό που γεμίζει τα αυλάκια του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος όταν η υγρασία είναι 60-70% (κατάσταση κορεσμού).

Με τη χρήση επομένως του NMR στο Πεδίο του χρόνου είναι δυνατό να καταγραφεί η αλλαγή της κατάστασης των μορίων νερού που αλληλεπιδρούν με το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και κατά συνέπεια να μελετηθεί η επίδραση της δράσης των κυτταρινολυτικών ενζύμων κατά την αποδόμηση της βιομάζας.

Για τη μελέτη των αλλαγών που προκαλεί η δράση της *FoCel61*, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα: Whatman filter paper No 1 και μίσχος αραβοσίτου κατεργασμένος με οξύ (ευγενική προσφορά του Dr. Claus Felby). Πριν από τη χρήση, ο μίσχος αραβοσίτου εκπλένεται αρκετές φορές με απιονισμένο νερό και στο τέλος αφήνεται να στεγνώσει σε συνθήκες δωματίου. Για κάθε κατεργασία, σε σωληνίσκο NMR τοποθετούνταν 100 mg υποστρώματος και κατόπιν τα ένζυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 100 mM pH 5.5 (200 μl). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40°C ενώ η σύσταση των ενζυμικών μιγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.9.

**Πίνακας 2.9** Σύσταση ενζυμικών μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα NMR στο Πεδίο του Χρόνου.

Υπόστρωμα	Δείγμα	Σύσταση Ενζυμικού Μίγματος
Whatman filter paper No 1	1a	11 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i>
	2a	1.1 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i>
	3a	5 $\mu\text{M}$ CBHI, 3.5 $\mu\text{M}$ EGII, 0.1 $\mu\text{M}$ $\beta$ -gluc.
	4a	11 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i> + (5 $\mu\text{M}$ CBHI, 3.5 $\mu\text{M}$ EGII, 0.1 $\mu\text{M}$ $\beta$ -gluc.)
	5a	1.1 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i> + (5 $\mu\text{M}$ CBHI, 3.5 $\mu\text{M}$ EGII, 0.1 $\mu\text{M}$ $\beta$ -gluc.)
	6a (δείγμα ελέγχου)	Άπενεργοποιημένα ένζυμα με θέρμανση σε συγκεντρώσεις όπως του δείγματος 4a
Μίσχος αραβοσίτου κατεργασμένος με οξύ	1b	11 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i>
	2b	1.1 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i>
	3b	11 $\mu\text{M}$ <i>FoCel61</i> + 30 $\mu\text{l}$ Celluclast
	4b	1.1 $\mu\text{M}$ <i>Cel61</i> + 30 $\mu\text{l}$ Celluclast
	5b	30 $\mu\text{l}$ Celluclast
	6 b(control)	Άπενεργοποιημένα ένζυμα με θέρμανση σε συγκεντρώσεις όπως του δείγματος 3b



**Εικόνα 2.6** Ο φασματογράφος NMR που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των μετρήσεων NMR στο Πεδίο του Χρόνου.

Οι μετρήσεις NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker mq20-Minispec (Εικόνα 2.6) με μόνιμο μαγνήτη 0.47 Tesla (συχνότητα συντονισμού πρωτονίων 20 MHz). Η τιμή του χρόνου  $T_2$  προσδιορίστηκε με τη σειρά Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Συλλέχθηκαν περίπου 5000 σήματα αντήχησης (echoes) με διαχωρισμό παλμών 0.05 msec, λήψη 32 σαρώσεων και

χρόνο ανακύκλωσης 5 sec. Για τον προσδιορισμό της κατανομής των χρόνων χαλάρωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μετασχηματισμού Laplace CONTIN (Provencher 1982).

Πριν από την έναρξη κάθε πειράματος ( $t=0$ ), τα δείγματα (υπόστρωμα και ενζυμικό μίγμα) επωάζονταν για 15min στους 40 °C. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν τις χρονικές στιγμές 0, 15, 30, 60, 120 και 180 min.

## 2.4 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

### 2.4.1 Πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για κρυστάλλωση

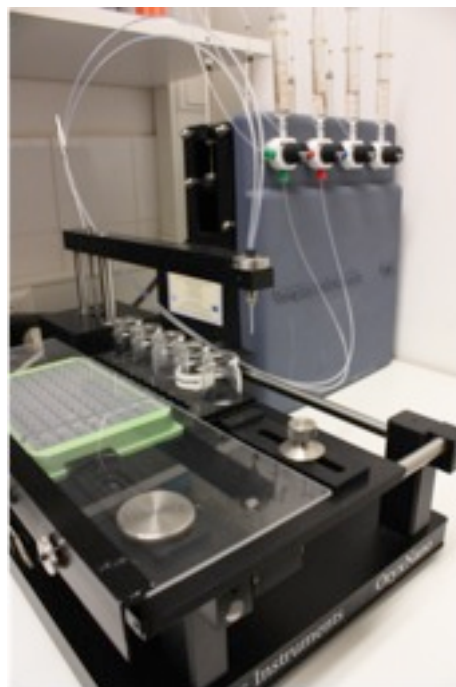
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης για τις πρωτεΐνες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.10.

**Πίνακας 2.10** Οι πρωτεΐνες για τις οποίες πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης στην παρούσα εργασία.

Πρωτεΐνη	Οικογένεια	Είδος	Μικροοργανισμός
Ξυλανάση ( <i>FoXyn10a</i> )	GH10	Φυσικό	<i>F. oxysporum</i>
Εστεράση του φερουλικού οξέος ( <i>FoFaeC</i> )	Τύπος C	Κλωνοποιημένο, <i>P. pastoris</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>StCel61</i>	GH61	Κλωνοποιημένο, <i>P. pastoris</i>	<i>S. thermophile</i>
<i>FoCel61</i>	GH61	Κλωνοποιημένο, <i>P. pastoris</i>	<i>F. oxysporum</i>

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΟΦΧ, ΕΙΕ) καθώς και στο Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Ινστιτούτου Χημείας του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης. Για την εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εμπορικά σκευάσματα κρυστάλλωσης: JCSG-*plus*<sup>TM</sup> Screen (MD1-37), PACT *premier*<sup>TM</sup>, HT-96 (MD1-36) από την εταιρεία Molecular

Dimensions (Αγγλία), JCSG+ suite, PACT suite και PEGs Suite από την εταιρεία Qiagen (Γερμανία) και το INDEX HT από τη Hampton Research (Αμερική). Τα σκευάσματα αυτά περιλαμβάνουν μία μεγάλη ποικιλία συνθηκών κρυστάλλωσης (96 ανά σκεύασμα) αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιτυχούς κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών. Τα αρχικά πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν αυτοματοποιημένα με τη βοήθεια ρομπότ κρυστάλλωσης (OryxNano και Oryx8 της εταιρείας Douglas Instruments, Ltd) σε ειδικά πιάτα 96 θέσεων (MRC Crystallization plate, Molecular Dimensions) (Εικόνα 2.7). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθήμενη σταγόνα. Το διάλυμα πρωτεΐνης



Εικόνα 2.7 Το ρομπότ OryxNano που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης.

αναμίχθηκε με το διάλυμα κρυστάλλωσης (μητρικό διάλυμα) σε αναλογία 2:1 ή 1:1 σχηματίζοντας σταγόνα τελικού όγκου 0.3 ή 0.5 μl αντίστοιχα, η οποία εξισορροπήθηκε έναντι 100 μl διαλύματος κρυστάλλωσης (μητρικό διάλυμα) σε χώρο κλεισμένο αεροστεγώς. Κατά τη διαδικασία τροποποίησης των αρχικών συνθηκών προκειμένου να αναπτυχθούν καλύτεροι κρύσταλλοι οι κρυσταλλώσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης σε πιάτα 24 θέσεων (VDX plates, Hampton Research) με σταγόνες μεγαλύτερου όγκου (συνήθως 2 μl)

#### 2.4.2 Βελτιστοποίηση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης

Μετά τον προσδιορισμό των συνθηκών που οδηγούσαν στο σχηματισμό πρωτεϊνικών κρυστάλλων ή ακόμα και ιζήματος κρυσταλλικής φύσεως, επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών με σκοπό την ανάπτυξη κρυστάλλων κατάλληλων για συλλογή δεδομένων ακτίνων-X.

Η διαδικασία αυτή συμπεριλάμβανε αλλαγή του όγκου της σταγόνας, της τεχνικής κρυστάλλωσης, της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ή κάποιου από τους

παράγοντες κρυστάλλωσης, του pH και της θερμοκρασίας καθώς και αντικατάσταση κάποιου εκ των συστατικών του διαλύματος κρυστάλλωσης από μια χημικά παραμφερή ουσία. Επίσης, πολλές φορές επιχειρήθηκε η χρήση πρόσθετων προσμίξεων που θα μπορούσαν να καταστήσουν πιο πυκνή και ομοιόμορφη τη διευθέτηση των πρωτεϊνικών μορίων στον κρύσταλλο (Additive Screen HT, Hampton Research). Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της μικροσποράς (streak seeding) κατά την οποία μικροκρύσταλλοι μεταφέρονται με τρίχα αλόγου σε διαυγή εξισορροπημένη σταγόνα στην οποία ένας από τους κατακρημνιστικούς παράγοντες ή η πρωτεΐνη βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση από αυτή που οδηγεί στη δημιουργία μικροκρυστάλλων (Bergfors 2003). Οι κρύσταλλοι αυτοί αποτελούν θέσεις πυρήνωσης από τις οποίες αναπτύσσονται μεγαλύτεροι κρύσταλλοι. Οι μικροκρύσταλλοι μπορούν επίσης να προστεθούν με πιπέττα σε μορφή διαλύματος ως επιπλέον συστατικό της σταγόνας κρυστάλλωσης (microseeding method). Για την επιβράδυνση της ανάπτυξης των κρυστάλλων προστέθηκε γλυκερόλη 10% στο διάλυμα κρυστάλλωσης ή 10 μl μίγματος 1:1 παραφίνης-σιλικόνης από την εταιρεία Fluka (Buchs, Ελβετία).

#### **2.4.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X**

Η ακτινοβολία των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε υπό κρυογενείς συνθήκες (100 K). Προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου και κατά συνέπεια η καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος κατά τη μεταφορά στο υγρό N<sub>2</sub>, ο κρύσταλλος εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα κρυστάλλωσης εμπλουτισμένο με κάποιο κρυοπροστατευτικό μέσο όπως αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη και ποικιλία πολυαιθυλενογλυκολών χαμηλού μοριακού βάρους. Σε ορισμένες περιπτώσεις η σύσταση του μητρικού διαλύματος είναι τέτοια ώστε να μην επιβάλλεται προσθήκη επιπλέον κρυοπροστατευτικής ουσίας. Η ακτινοβολία των κρυστάλλων υπό κρυογενείς συνθήκες (100 K) έγινε στους ακόλουθους σταθμούς συγχροτρονικής ακτινοβολίας: SRS, Daresbury Laboratory (Αγγλία), EMBL Hamburg outstation – σταθμός X13 (Αμβούργο, Γερμανία), MAXLAB, σταθμός 911-2 (Lund, Σουηδία) καθώς και στην πηγή ακτίνων SuperNova diffractometer ( $\lambda = 1.5415 \text{ \AA}$ ) της εταιρείας Oxford Diffraction (Agilent Technologies) που βρίσκεται εγκατεστημένη στο ΙΟΦΧ, ΕΙΕ (Εικόνα 2.8). Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τα

προγράμματα *MOSFLM* (Leslie, 1992) και *SCALA* (Evans 2006) του πακέτου *CCP4* (Collaborative Computational Project 4, Number 4, 1994).



Εικόνα 2.8. Η πηγή ακτίνων SuperNova diffractometer που βρίσκεται εγκατεστημένη στο ΙΟΦΧ/ΕΙΕ.

#### 2.4.4 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής και έλεγχος αξιοπιστίας πρωτεϊνικού μοντέλου

Στην παρούσα εργασία, η δομή της ξυλανάσης *FoXyn10a* επιλύθηκε με εφαρμογή της μεθόδου μοριακής αντικατάστασης μέσω των προγραμμάτων *BALBES* (Long, Vagin et al. 2008) και *PHASER* (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) του πακέτου *CCP4*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πρόγραμμα *Buccaneer* (Cowtan 2006) το οποίο ανακατασκευάζει την πρωτεϊνική αλυσίδα (άνθρακες Ca) στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Το τελικό μοντέλο προέκυψε μετά από μία σειρά κύκλων βελτιστοποίησης μέσω του προγράμματος *REFMAC* (Murshudov, Vagin et al. 1997) και ανακατασκευής του πρωτεϊνικού μοντέλου με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *COOT* (Emsley, Lohkamp et al. 2010). Με χρήση του αυτοματοποιημένου πρωτόκολλου του *COOT*, προστέθηκαν τα μόρια νερού που σχημάτιζαν δίκτυα δεσμών υδρογόνου με την πρωτεΐνη και τα άλλα μόρια διαλύτη. Η αξιοπιστία του τελικού μοντέλου ελέγχθηκε με το πρόγραμμα *MOLPROBITY* (Chen, Arendall et al. 2010) καθώς και με ανάλυση του διαγράμματος Ramachandran (Ramachandran,

Ramakrishnan et al. 1963). Η αναζήτηση δομικών ομολόγων πραγματοποιήθηκε με τον εξυπηρετητή Dali (Holm and Rosenstrom 2010) και η πολλαπλή δομική στοίχιση με το πρόγραμμα *MultiProt* (Shatsky, Nussinov et al. 2004). Η σύγκριση με δομές ομολόγων ξυλανασών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *SUPERPOSE* (Krissinel and Henrick 2004) ενώ οι εικόνες για την οπτικοποίηση της καινούριας δομής παράχθηκαν με τα προγράμματα *Pymol* (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) και *MolSoft* (Raush, Totrov et al. 2009).



### **3. Παραγωγή και βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο πρωτεϊνών της οικογένειας 61 της βάσης δεδομένων CAZy.**

#### **3.1 GH61 από το θερμοφίλο μύκητα *Sporotrichum thermophile* (StCel61)**

##### **3.1.1 Επιλογή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του *S. thermophile***

Ο νηματοειδής μύκητας *S. thermophile* παρουσιάζει υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς του να διασπά αποτελεσματικά την κυτταρίνη σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ενζυμική αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50 °C παρουσιάζει μία σειρά πλεονεκτημάτων όπως είναι οι αυξημένοι ρυθμοί υδρόλυσης, η μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης του αντιδραστήρα, η καλύτερη μεταφορά μάζας και η μείωση του ιξώδους του υποστρώματος με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας για ενζυμική υδρόλυση (Margaritis and Merchant 1986). Ένα άλλο χαρακτηριστικό του *S. thermophile* είναι η ιδιότητά του να αναπτύσσεται και να διασπά την κυτταρίνη γρηγορότερα από τον ευρέως χρησιμοποιούμενο μύκητα *T. reesei*, παρά το γεγονός ότι παράγει λιγότερες κυτταρινάσες (Bhat and Maheshwari 1987). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη θερμοφιλή φύση του μύκητα, έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το κυτταρινολυτικό του σύστημα για την ανακάλυψη νέων ενζυμικών ενεργοτήτων. Το γονιδίωμα του *S. thermophile* ATCC 42464 έγινε γνωστό τον Ιούνιο του 2009 από το JGI (DOE Joint Genome Institute, US Department of Energy, Office of Science). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας 61 σε σχέση με τον *T. reesei*, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ενός διαφορετικού μηχανισμού αποικοδόμησης της φυτικής βιομάζας από το *S. thermophile* αλλά και άλλους μύκητες που ανήκουν στην οικογένεια *Chaetomiaceae*, όπως ο *T. terrestris* (Berka, Grigoriev et al. 2011).

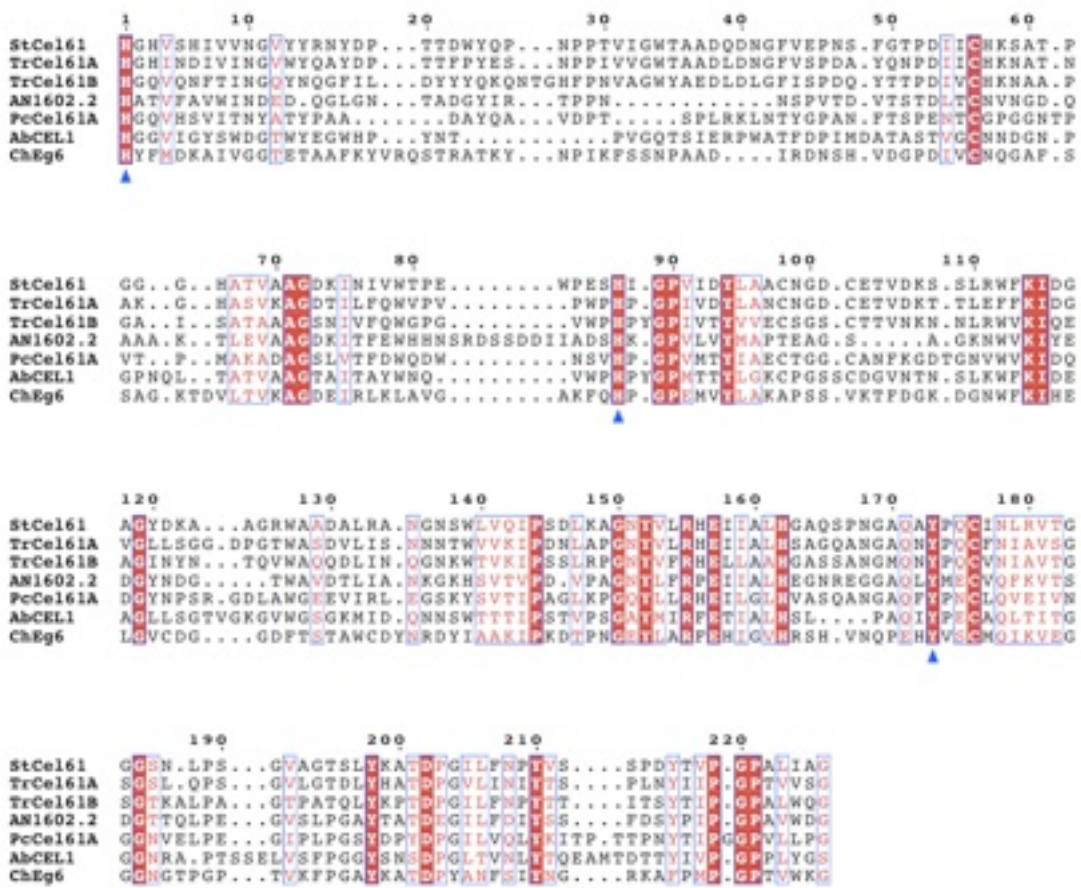
Χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης InterPro της βάσης δεδομένων του γονιδιώματος του *S. thermophile* (<http://genome.jgi-psf.org/Spoth2/Spoth2.home.html>), εντοπίστηκαν αρχικά οι νουκλεοτιδικές εκείνες αλληλουχίες που κωδικοποιούν υποθετικές πρωτεΐνες ομόλογες με μέλη της οικογένειας 61. Στη συνέχεια, αντιστρέφοντας τη διαδικασία, προσδιορίστηκαν οι

πρωτεϊνικές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) που παρουσιάζουν ομολογία με τα επιλεγμένα γονίδια χρησιμοποιώντας το εργαλείο αναζήτησης *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, Gish et al. 1990). Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην εύρεση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με καταλυτικούς τομείς ομόλογους στην οικογένεια 61. Τελικά επιλέχθηκε το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2:3103350-3104378 (Protein ID:46583) και κωδικοποιεί μία υποθετική πρωτεΐνη με 57% και 48% αμινοξική ταυτότητα ως προς τον καταλυτικό τομέα της Cel61A (GenBank accession number CAA71999) και Cel61B (AAP57753) του μύκητα *T. reesei*, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.1** Χαρακτηριστικά του γονιδίου *Stcel61*. Η σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης προσδιορίστηκε με το SignalP (Emanuelsson, Brunak et al. 2007), το θεωρητικό MB και pI με το ProtParam (Gasteiger E. 2005) ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τα NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc/>, (Gupta R. 2004) και NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>, (Julenius, Molgaard et al. 2005).

Κωδικός Genome Portal	46583
Περιοχή (Scaffold)	2:3103350-3104378
Μήκος γονιδίου	1029
Αριθμός Αμινοξέων	343
Δομικά αυτοτελείς περιοχές – Οικογένεια CAZy	Αμινοξέα 4-237: GH61
	Αμινοξέα 310-338: CBM 1
Αριθμός εξωνίων	1
Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης	Αμινοξέα 1-20: MSKASALLAGLTGAALVAA
Θεωρητικό Μοριακό Βάρος (Da)	33238
Θεωρητικό pI	5.59
Περιοχές Γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: 1
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: 23

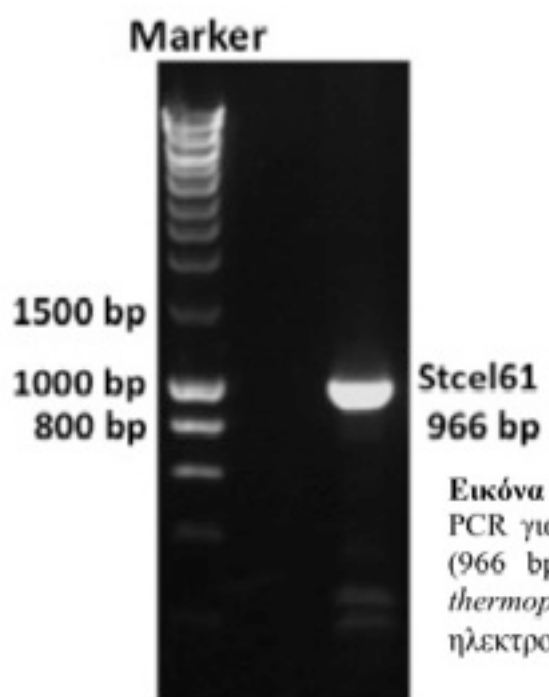
Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει επίσης 35%, 34%, 34% και 28% αμινοξική ταυτότητα με τις GH61 από τους μύκητες *A. nidulans* (AN1602.2, EAA64722), *P. chrysosporium* (Cel61A, AAM22493), *A. bisporus* (CEL1, AAA53434) και *C. heterostrophus* (Eg6, AAM76663), αντίστοιχα (Εικόνα 3.1). Το αντίστοιχο γονίδιο, που ονομάστηκε *Stcel61* δεν περιέχει εσόνια γεγονός που διευκόλυνε την κλωνοποίησή του και την ετερόλογη έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης (Πίνακας 3.1).



**Εικόνα 3.1** Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας της *StCel61* με 6 ομόλογες πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια GH61: *TrCel61A* (GenBank accession number CAA71999) και *TrCel61B* (AAP57753) από το *T. reesei*, AN1602.2 (EAA64722) από τον *A. nidulans*, *PcCel61A* (AAM22493) από το *P. chrysosporium*, *AbCEL1* (AAA53434) από τον *A. bisporus* και *ChEg6* (AAM76663) από το *C. heterostrophus*. Τα αμινοξέα που είναι ίδια σε όλες τις πρωτεΐνες εμφανίζονται λευκά σε κόκκινο πλαίσιο ενώ αυτά που παρουσιάζουν ομοιότητα είναι κόκκινα σε λευκό πλαίσιο. Με τα τριγωνικά σχήματα αναδεικνύονται τα αμινοξέα που πιθανώς συμμετέχουν στη συναρμογή του μεταλλοκατιόντος, με βάση τη δομή της *TrCel61B* και την πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας (κωδικός PDB 2VTC). Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα *T-Coffee* (Notredame, Higgins et al. 2000) και *ESPRIT* (Gouet, Courcelle et al. 1999).

### 3.1.2 Ενίσχυση ακολουθίας, κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Η επιλεγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύθηκε από απομονωμένο γονιδιακό DNA του *S. thermophile* ATCC 42464 χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.4.2. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να αποκλειστούν οι πρώτες 57 βάσεις του γονιδίου που αντιστοιχούν στα αμινοξέα της σηματοδοτικής αλληλουχίας έκκρισης και να εισαχθούν οι αλληλουχίες πέψης των περιοριστικών ενζύμων *Cla* I και *Xba* I στην αρχή και το τέλος του γονιδίου, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR όπως αυτό οπτικοποιήθηκε και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνα 3.2** Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *Stcel61* (966 bp) από το γονιδιακό DNA του *S. thermophile* όπως οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

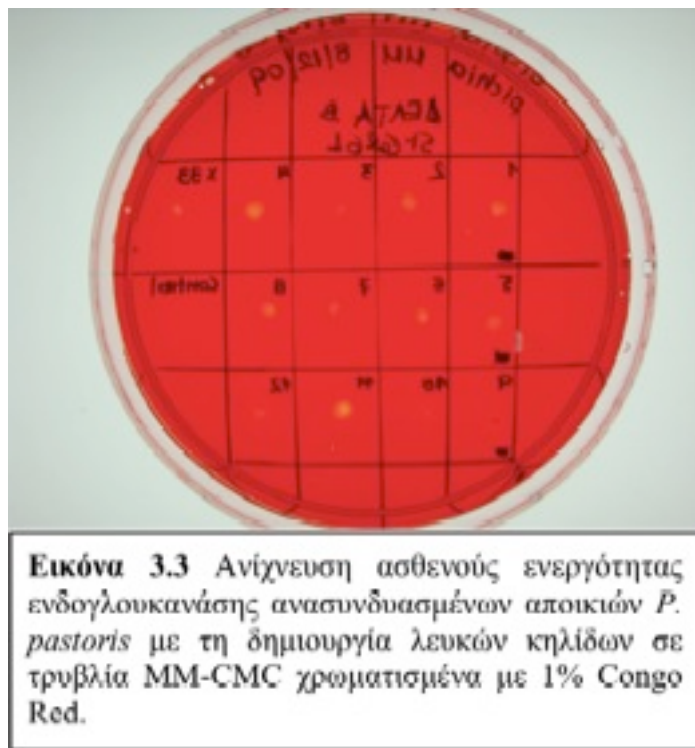
Στη συνέχεια έγινε απομόνωση της ενισχυμένης αλληλουχίας με ηλεκτροφόρηση του υπόλοιπου μίγματος PCR (45  $\mu$ l) σε πηκτή αγαρόζης ακολουθούμενη από καθαρισμό με χρήση του σκευάσματος Nucleospin DNA Clean-up (Macherey-Nagel). Το γονίδιο ενσωματώθηκε στο φορέα pCR<sup>®</sup>-Blunt με αντίδραση συνένωσης και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε με

μετασχηματισμό κυττάρων TOP10. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου με χρήση του σκευάσματος GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas) και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του για να εξακριβωθεί η επιτυχής κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε πέψη του πλασμιδίου pCR®-Blunt/Stc161 με *Cla* I και *Xba* I, απομόνωση του γονιδίου με τα κολλώδη πλέον άκρα και εισαγωγή του στο φορέα pPICZαC υπό τον έλεγχο του υποκινητή *AOXI* (Εικόνα 2.3). Ο καινούριος ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων TOP10F' και ακολούθησε απομόνωσή του και γραμμικοποίηση με *Sac* I. Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο απομονώθηκε από το μίγμα πέψης χρησιμοποιώντας το σκεύασμα Nucleospin DNA Clean-up kit (Macherey-Nagel) με μόνη διαφορά το ότι το τελευταίο στάδιο της έκλουσης πραγματοποιήθηκε με υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό και όχι το διάλυμα έκλουσης του σκευάσματος προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία αλάτων στο διάλυμα του γραμμικοποιημένου φορέα. Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση και επώαση στους 30 °C προκειμένου να επιλεχθούν οι αποικίες εκείνες που παρουσίαζαν αντίσταση στη ζεοσίνη.

### 3.1.3 Επιλογή κλώνου για την έκφραση και παραγωγή της *StCel61*

Συνολικά απομονώθηκαν 10 κλώνοι για να ελεγχθεί η ικανότητά τους να παράγουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε σταθερή μορφή και ικανοποιητική ποσότητα. Αρχικά μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MM στο οποίο είχε προστεθεί CMC χαμηλού ιξώδους και χρωματίστηκαν με 1% Congo Red. Από τις αποικίες που παρουσίασαν ασθενή κυτταρινολυτική δράση (σχηματισμός μικρών κηλίδων σε κόκκινο φόντο, Εικόνα 3.3) επιλέχθηκαν 5 για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της ανασυνδυασμένης GH61 με υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας (50 ml BMGY για την ανάπτυξη της βιομάζας και 50 ml BMMY για την έκφραση της *StCel61*). Τα δείγματα υπερκείμενου της καλλιέργειας BMMY για κάθε κλώνο λαμβάνονταν καθημερινά και υποβάλλονταν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, ποσοτικό προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry καθώς και έλεγχο ενεργότητας χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα β-γλουκάνη 1 % (w/v). Η σύγκριση γινόταν κάθε φορά με αντίστοιχη καλλιέργεια μη ανασυνδυασμένων κυττάρων X-33. Τελικά επιλέχθηκε ο κλώνος εκείνος που οδηγούσε στη μεγαλύτερη

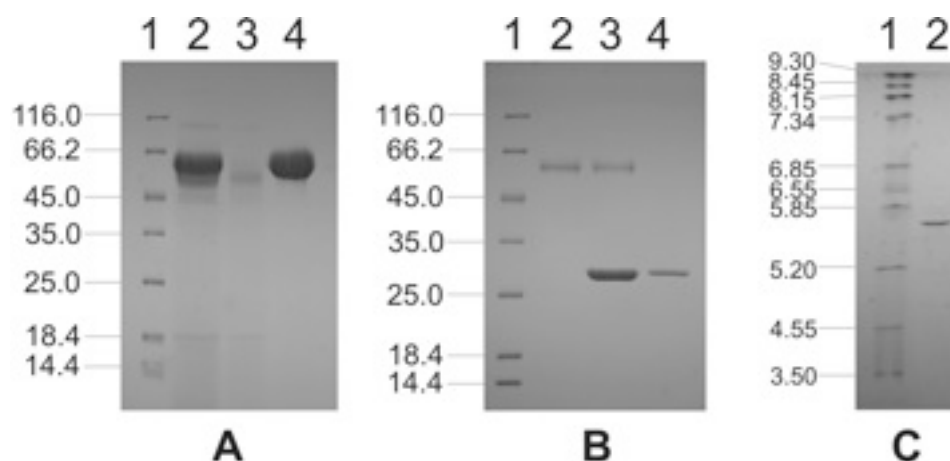
παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (περίπου 50 mg/lt καλλιέργειας) και ανακαλλιεργήθηκε προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τα περαιτέρω πειράματα χαρακτηρισμού της *StCel61*.



### 3.1.4 Παραγωγή και καθαρισμός της *StCel61*

Η ανασυνδυασμένη *StCel61* απομονώθηκε από 1 lt υγρής καλλιέργειας BMMY διάρκειας 6 ημερών κατά τις οποίες γινόταν καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση 0.5% (v/v) και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η καθαρότητά της εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και το ισοηλεκτρικό της σημείο με IEF σε ένα εύρος pH 3 έως 9. Το καθαρό ένζυμο που ανακτήθηκε τελικά είχε MB ~60 kDa και pI 5.6. Η μεγάλη απόκλιση ανάμεσα στο πειραματικό (60 kDa) και το θεωρητικά υπολογισμένο (33.2 kDa) MB δεν μπορεί να αποδοθεί στα επιπλέον αμινοξέα που προστίθενται στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη λόγω της κλωνοποίησης στο φορέα pPICZαC, και πιο συγκεκριμένα στο επίτοπο C-myc και τα κατάλοιπα ιστιδίνης που έχουν προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο και τα οποία αντιστοιχούν σε μία αύξηση του MB κατά 2.5 kDa περίπου. Η σημαντική αυτή διαφορά οφείλεται κατά κύριο λόγο στο φαινόμενο της υπεργλυκοζυλίωσης από την *P. pastoris* (Conde, Cueva et al. 2004). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1, υπάρχουν μία και 23 πιθανές θέσεις N- και

*O*-γλυκοζυλίωσης αντίστοιχα στην αλληλουχία της *St*Cel61, όλες στην περιοχή του πεπτιδίου σύνδεσης (linker peptide) ανάμεσα στον καταλυτικό τομέα και τον τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτη (CBM1). Μετά από κατεργασία με Endo H και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE του προϊόντος της αντίδρασης δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή του MB (Εικόνα 3.4), γεγονός που καταδεικνύει ότι η παρατηρούμενη διαφορά οφείλεται σε εκτεταμένη *O*-γλυκοζυλίωση στην περιοχή του πεπτιδίου σύνδεσης. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί για πολλές άλλες γλυκοζιδικές υδρολάσες στις οποίες η περιοχή μεταξύ καταλυτικού τομέα και τομέα σύνδεσης παρουσιάζει μεγάλη δομική ευκαμψία και συνήθως είναι εκτεταμένα *O*-γλυκοζυλιωμένη, με το μοτίβο όμως γλυκοζυλίωσης να μεταβάλλεται με μία πληθώρα παραγόντων, όπως είναι οι συνθήκες έκφρασης και ανάπτυξης (Arakane, Zhu et al. 2003; Koseki, Mese et al. 2008; Beckham, Bomble et al. 2010).



**Εικόνα 3.4** SDS-PAGE (A, B) και IEF (C) της *St*Cel61. A. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB, 2/ εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδυασμένης *P. pastoris*, 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/ καθαρή *St*Cel61 B. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB, 2/ καθαρή *St*Cel61, 3/ *St*Cel61 μετά από κατεργασία με Endo H, 4/ ενδογλυκοζιδάση Endo H (29 kDa). C. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστών pI εύρους 3.5-9.3, 2/ καθαρή *St*Cel61.

### 3.1.5 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *St*Cel61

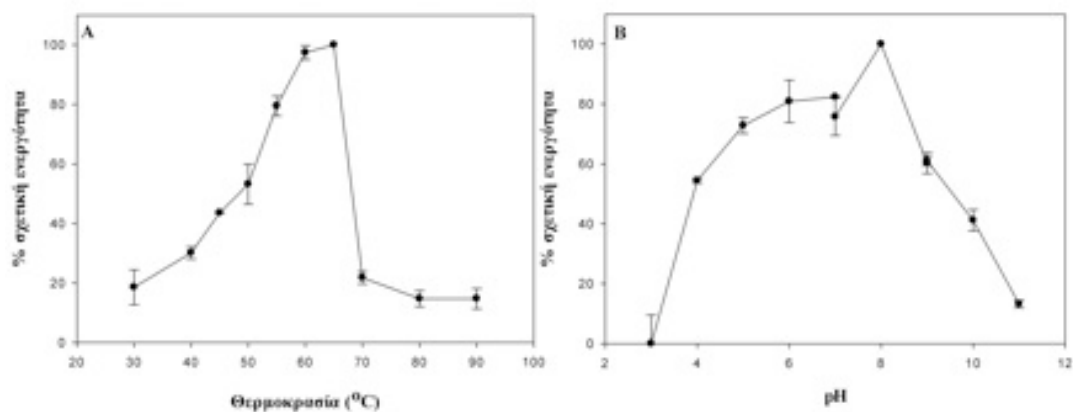
Για την ανίχνευση της ενεργότητας της *St*Cel61 χρησιμοποιήθηκε μία μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, η *St*Cel61 παρουσιάζει ασθενή υδρολυτική δράση στα CMC, β-γλουκάνη κριθαριού, λιχενάνη, αραβινοξυλάνη σίτου και ξυλάνη οξιάς.

**Πίνακας 3.2** Προσδιορισμός δραστηριότητας της *StCel61* σε μία ποικιλία πολυσακχαριτών, “-”: μη ανιχνεύσιμη δράση.

Υπόστρωμα	Αναγωγικά άκρα ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g protein}$ )
CMC	$27.3 \pm 0.2$
HEC	$3 \pm 0.3$
HPMC	-
$\beta$ -γλουκάνη κριθαριού	$28 \pm 1.6$
Λιχενάνη	$27.6 \pm 0.2$
Λαμιναρίνη	-
Κυτταρίνη Avicel	-
Αραβινοξυλάνη σίτου	$26.4 \pm 4.8$
Ξυλάνη οξιάς	$20.4 \pm 1.2$
Αραβικό κόμμι	-
Χιτίνη	-

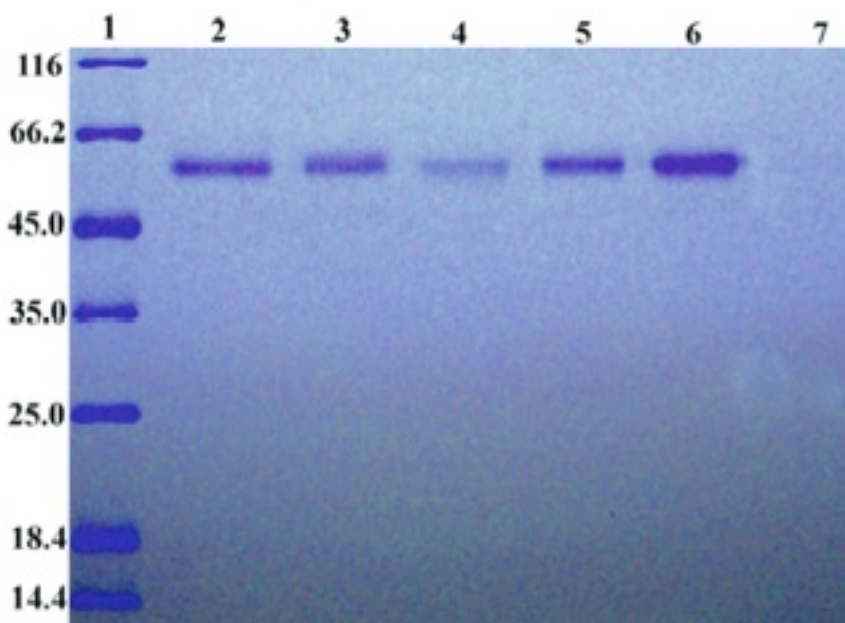
Παρά το γεγονός ότι δεν ήταν γνωστή η βασική δράση της *StCel61* ώστε να προσδιοριστεί και η κατάλληλη δοκιμή δραστηριότητας (assay), για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH και θερμοκρασίας δράσης χρησιμοποιήθηκε η ασθενής υδρολυτική συμπεριφορά πάνω στη λιχενάνη. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος λιχενάνης 0.5% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7 αναμίχθηκαν με 50  $\mu\text{l}$  διαλύματος *StCel61* 10  $\mu\text{M}$  σε 20 mM Tris HCl pH 8 και το μίγμα επώαστηκε για 5 h στους 30, 40, 50, 60, 70, 80 και 90 °C. Ακολούθησε μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων και προσδιορισμός της σχετικής ενεργότητας σε κάθε θερμοκρασία ως ποσοστό επί της μέγιστης μετρούμενης υδρολυτικής δράσης. Αντίστοιχα, για την εύρεση του βέλτιστου pH η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 60 °C μετά από διαλυτοποίηση της λιχενάνης σε ένα μεγάλο εύρος pH. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.1, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 65 °C και το βέλτιστο pH δράσης είναι 8. Οι σχετικές ενεργότητες μετά από επώαση 5 ωρών στους 40, 50, 60, 65 και 70 °C ήταν αντίστοιχα 30, 53, 97, 100 και 22%. Σε pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, και 10 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 54, 73, 81, 82, 100, 61 and 41%.





**Διάγραμμα 3.1** Σχετική ενεργότητα της *StCel61* σε ένα εύρος θερμοκρασιών (A) και pH (B).

Τέλος, ελέγχθηκε η ικανότητα της *StCel61* να προσδέεται σε κυτταρίνη Avicel και αδιάλυτη αραβινοξυλάνη σίτου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, η πρωτεΐνη σε συγκέντρωση 0.3 mg/ml προσδέθηκε στην κυτταρίνη, όχι όμως στην αραβινοξυλάνη.



**Εικόνα 3.5** Μελέτη πρόσδεσης *StCel61* σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB, 2/ και 5/ καθαρή *StCel61*, 3/ και 6/ το υπερκείμενο μετά από επώαση με κυτταρίνη Avicel και αραβινοξυλάνη, αντίστοιχα και 4/ και 7/ το κλάσμα της προσδεδεμένης *StCel61* στην κυτταρίνη Avicel και την αραβινοξυλάνη, αντίστοιχα.

### 3.1.6 Πειράματα συνεργιτισμού με κυτταρινάσες

Προκειμένου να εξεταστεί αν η *StCel61* ενισχύει τη δράση των γνωστών κυτταρινασών κατά την υδρόλυση της φυτικής βιομάζας όπως έχει αναφερθεί για άλλα μέλη της οικογένειας GH61 (Harris, Welner et al. 2010), πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεργιτισμού πάνω σε μία σειρά υποστρωμάτων. Η *StCel61* συνδυάστηκε είτε με το εμπορικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα Celluclast που προέρχεται από το μύκητα *T. reesei*, είτε με μίγμα καθαρών κυτταρινασών. Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να απομονωθεί η δράση της *StCel61* από τις υπόλοιπες GH61 που υπάρχουν στο Celluclast (Martinez, Berka et al. 2008). Τα ένζυμα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM pH 5 παρουσία 1mM  $MnCl_2$  και 0.02% (w/v)  $NaN_3$ . Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C για 120 h (5 ημέρες). Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρές κυτταρίνες: η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel και η περισσότερο άμορφη κυτταρίνη που είχε υποστεί επεξεργασία με ιοντικά υγρά, ILTC (Wang, Yang et al. 2011). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα σύνθετα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα: υδροθερμικά κατεργασμένο άχυρο σίτου, PWS, έλατο προκατεργασμένο με ατμό υπό ήπιες όξινες συνθήκες, PS και δύο προϋδρολυμένοι αλκαλικοί πολτοί από αγγειόσπερμα-αιθαλή δέντρα (60% έλατο και 40% πεύκο), PP1 και PP2. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.3.

Θεωρώντας τα μετρούμενα αναγωγικά σάκχαρα ως ανάλογα γλυκόζης και με βάση τη σύσταση των υποστρωμάτων προσδιορίστηκε η % μετατροπή της κυτταρίνης για τα διάφορα ενζυμικά μίγματα. Στα Διαγράμματα 3.2 και 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων στα μίγματα των αντιδράσεων υδρόλυσης.

Η προσθήκη *StCel61* στο Celluclast οδήγησε σε αύξηση στο ποσοστό μετατροπής τόσο στην περίπτωση του PWS όσο και του PS, με το ποσό της προστιθέμενης GH61 να είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον παρατηρούμενο συνεργιτισμό (Διάγραμμα 3.2). Η ενισχυτική δράση ήταν περισσότερο έντονη σε χαμηλά ποσοστά υδρόλυσης, όπως φαίνεται στην περίπτωση του PS. Πιο συγκεκριμένα, όταν γινόταν προσθήκη 3 mg *StCel61*/g υποστρώματος στη σταθερά χρησιμοποιούμενη ποσότητα Celluclast, ποσό που αναλογεί σε 20% του συνολικού

ενζυμικού φορτίου, ο βαθμός υδρόλυσης του PWS αυξανόταν κατά 15% ενώ του PS κατά 32%.

**Πίνακας 3.3** Η σύσταση των ενζυμικών μιγμάτων και τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα συνεργιτισμού

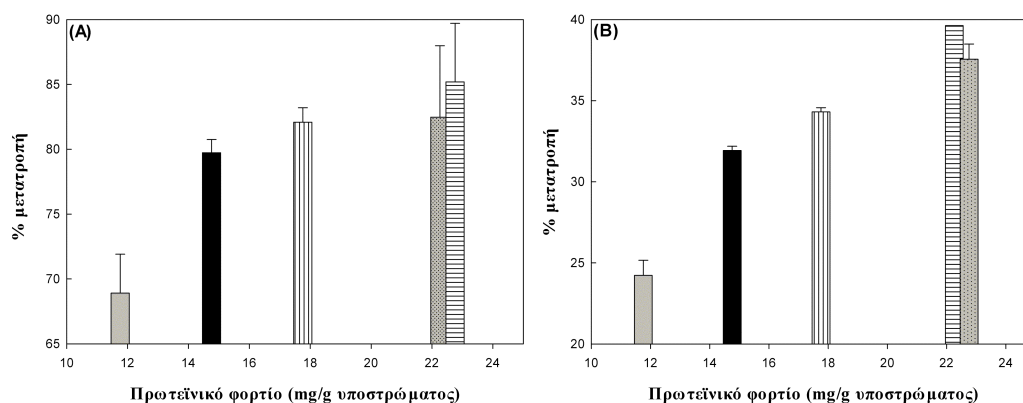
<b>Υποστρώματα</b>	Λιγνινοκυτταρινούχα: PWS, PS, PP1, PP2 Καθαρές κυτταρίνες: Avicel, ILTC
<b>Ενζυμικά Μίγματα*</b>	Celluclast (11 mg/g υποστρ.) <i>St</i> Cel61 (3, 6 και 10.5 mg/g υποστρ.) + Celluclast (11 mg/g υποστρ.) Celluclast (22 mg/g υποστρ.) Κυτταρινάσες (2.5 mg EGII + 14 mg CBHI/g υποστρ.) <i>St</i> Cel61 (3 και 10.5 mg/g υποστρ.) + Κυτταρινάσες (2.5 mg EGII + 14 mg CBH I/g υποστρ.) Κυτταρινάσες (5 mg EGII + 28 mg CBH I/g υποστρ.)

\* Σε όλα τα ενζυμικά μίγματα γινόταν προσθήκη β-γλυκοζιδάσης σε ποσοστό ~3% (w/w) επί του συνολικού πρωτεϊνικού φορτίου.

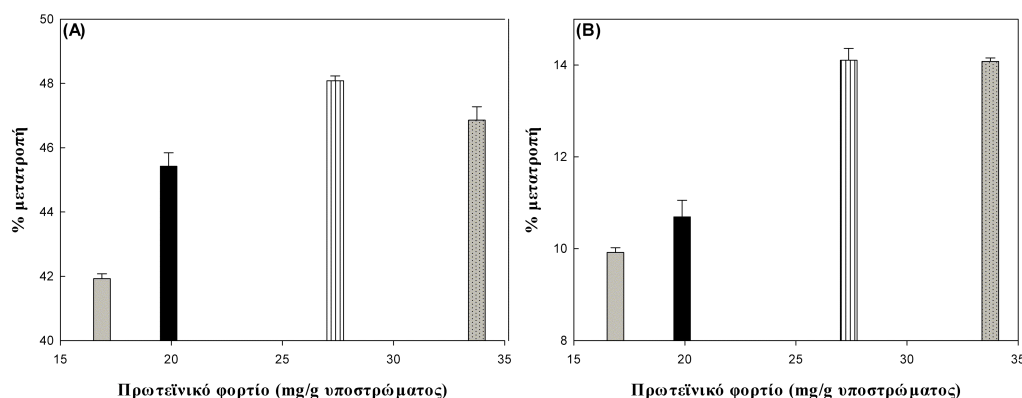
Όταν η ποσότητα της *St*Cel61 αυξανόταν στα 6 mg/g υποστρώματος, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 20% και 42%. Επίσης, ένα μίγμα αποτελούμενο από 11 mg/g Celluclast και 10.5 mg/g *St*Cel61, συγκρινόμενο με ποσότητα Celluclast ίσου σχεδόν συνολικού ενζυμικού φορτίου (22 mg/g υποστρώματος) οδηγούσε σε υδρόλυση του PS αυξημένη κατά 7%.

Η ενισχυτική δράση της *St*Cel61 παρατηρήθηκε επίσης στην περίπτωση του μίγματος καθαρών κυτταρινασών (Διάγραμμα 3.3). Κατά την προσθήκη 3 mg *St*Cel61/g υποστρώματος στο μίγμα κυτταρινασών, ποσό που αναλογεί σε 15% του συνολικού ενζυμικού φορτίου, ο βαθμός υδρόλυσης του PWS και του PS αυξήθηκε κατά 8%. Όταν η προστιθέμενη *St*Cel61 ήταν 10.5 mg/g υποστρώματος, αποτελώντας το 40% του συνολικού ενζυμικού φορτίου, ο βαθμός υδρόλυσης του PWS αυξήθηκε κατά 15% ενώ του PS κατά 42%. Το μίγμα 16.5 mg καθαρών κυτταρινασών και 10.5 mg *St*Cel61 είχε σχεδόν το ίδιο υδρολυτικό αποτελέσμα με 33 mg κυτταρινασών έτσι

ώστε το απαιτούμενο ενζυμικό φορτίο να μειώνεται κατά 20%. Δεδομένου ότι η *St*Cel61 ήταν 100% ανενεργή πάνω στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα, η παρατηρούμενη συνεργιστική δράση δεν μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα μίας σημαντικής ενδο- ή εξω-1,4- κυτταρινολυτικής δράσης.

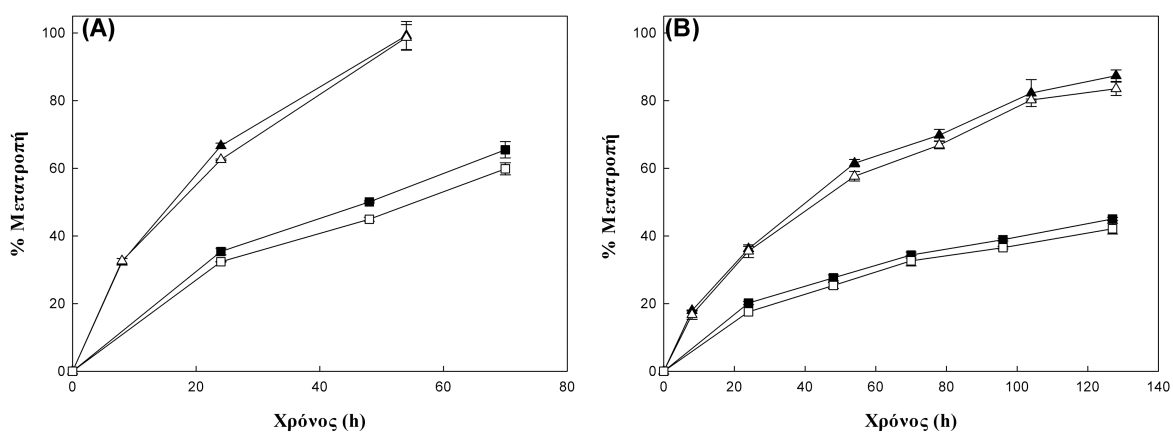


**Διάγραμμα 3.2** Επίδραση της *St*Cel61 στην υδρόλυση του PWS (A) και PS (B) από το Celluclast. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στα δείγματα που λήφθηκαν στις 100 h αντίδρασης. Η ράβδος (■) αντιστοιχεί σε 11 mg Celluclast /g υποστρώματος. Το ποσό αυτό του Celluclast εμπλουτισμένο με 3, 6 και 10.5 mg *St*Cel61 αντιστοιχεί στις ράβδους (■), (▨) και (▩). Στη ράβδο (▧), το ποσό του Celluclast διπλασιάστηκε (22 mg/g υποστρώματος).



**Διάγραμμα 3.3** Επίδραση της *St*Cel61 στην υδρόλυση του PWS (A) και PS (B) από μίγμα καθαρών κυτταρινασών. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στα δείγματα που ελήφθησαν στις 24 h αντίδρασης. Η ράβδος (■) αντιστοιχεί σε 2.5 mg EGII + 14 mg CBH I/g υποστρ. Το μίγμα αυτό εμπλουτισμένο με 3 και 10.5 mg *St*Cel61 αντιστοιχεί στις ράβδους (■) και (▨). Στη ράβδο (▧), το ποσό των καθαρών κυτταρινασών διπλασιάστηκε (5 mg EGII + 28 mg CBHI/g υποστρ.).

Στην περίπτωση των καθαρών κυτταρινών, η προσθήκη *St*Cel61 δεν είχε καμία επίδραση στο συνολικό βαθμό μετατροπής, ανεξάρτητα από το βαθμό κρυσταλλικότητας (Διάγραμμα 3.4). Το ποσοστό υδρόλυσης ήταν πολύ υψηλότερο στην περίπτωση της ILTC από την κυτταρίνη Avicel (94% και 42.2% αντίστοιχα, στην περίπτωση επεξεργασίας με Celluclast). Η έλλειψη συνεργισισμού σε καθαρές κυτταρίνες έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη ((Harris, Welner et al. 2010) χωρίς ωστόσο να έχει εξηγηθεί η αιτία της.

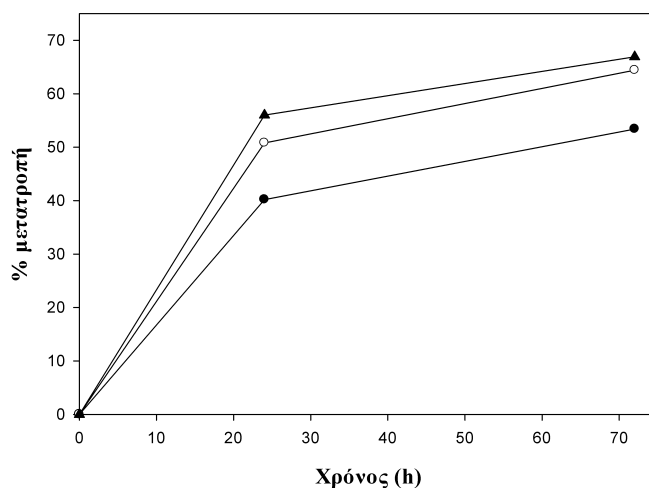


**Διάγραμμα 3.4** Επίδραση της *St*Cel61 στην υδρόλυση της κυτταρίνης Avicel (■) και ILTC (▲). Α. υδρόλυση με Celluclast μόνο (11 mg/g υποστρώματος, πλήρη σύμβολα) ή με προσθήκη *St*Cel61 (6 mg/g υποστρώματος, σύμβολα με περίγραμμα μονάχα), και Β. υδρόλυση με μίγμα καθαρών κυτταρινών μόνο (CBHI: 14 mg, EGII: 2.5 mg/g υποστρώματος, πλήρη σύμβολα) ή και με προσθήκη *St*Cel61 (10.5 mg/g υποστρώματος, σύμβολα με περίγραμμα μονάχα).

### 3.1.7 Πειράματα συνεργισισμού με θερμοφιλα ένζυμα

Δεδομένου ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *St*Cel61 ήταν 65 °C, εξετάστηκε αν η παρατηρούμενη συνεργιστική δράση είναι πιο έντονη σε υψηλότερες θερμοκρασίες (55 °C) χρησιμοποιώντας μίγμα θερμοφίλων ενζύμων κατά την υδρόλυση του PWS. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν τα ποσοστά μετατροπής κατά την εφαρμογή 6 mg μίγματος θερμοφίλων/g PWS, 6 mg μίγματος + 3 mg *St*Cel61/g PWS και 9 mg μίγματος θερμοφίλων/g PWS. Στο Διάγραμμα 3.5 παρουσιάζονται τα σχετικά αποτελέσματα. Όπως και στην περίπτωση των μεσόφιλων ενζύμων, η προσθήκη της *St*Cel61 προκάλεσε αύξηση του συνολικού βαθμού μετατροπής. Πιο

συγκεκριμένα, η προσθήκη προσθήκη 3 mg *StCel61*/g υποστρώματος, ποσό που αντιστοιχεί σε 37.5% του συνολικού ενζυμικού φορτίου, σε 6 mg μίγματος θερμοφίλων ενζύμων οδήγησε σε ενίσχυση του βαθμού υδρόλυσης κατά 20%, προκαλώντας το ίδιο σχεδόν αποτέλεσμα με 9 mg μίγματος ενζύμων. Το αντίστοιχο ποσοστό κατά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τα μεσόφιλα ένζυμα στους 40 °C (προσθήκη *StCel61* σε ποσοστό 40% επί του συνολικού φορτίου) ήταν 15%. Τα αποτελέσματα βεβαίως αυτά δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ένζυμα, αναλογίες και χρόνοι αντίδρασης. Αποτελούν ωστόσο μία αρχική ένδειξη για τη δυνατότητα πιο αποτελεσματικής αξιοποίησης της ενισχυτικής δράσης των GH61 με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων και θερμοκρασιών.



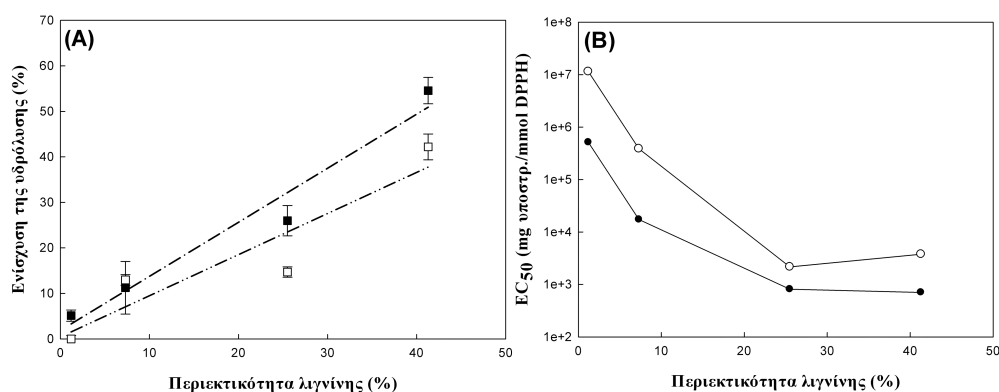
**Διάγραμμα 3.5** Επίδραση της *StCel61* στην υδρόλυση του PWS από μίγμα θερμοφίλων ενζύμων. Το σύμβολο (●) αντιστοιχεί σε 6 mg μίγματος θερμοφίλων/g PWS, το σύμβολο (○) σε 6 mg μίγματος θερμοφίλων + 3 mg *StCel61*/g PWS και το σύμβολο (▲) σε 9 mg μίγματος θερμοφίλων/g PWS.

### 3.1.8 Επίδραση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση στη λειτουργία της *StCel61*

Οι υδρολύσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μία ποικιλία λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων επέτρεψαν τη διερεύνηση του συσχετισμού ανάμεσα στη σύσταση του υποστρώματος και τη συνεργιστική δράση της *StCel61*. Πράγματι, μετά από σύγκριση των επιμέρους πειραματικών αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η περιεκτικότητα σε λιγνίνη τόσο πιο

σημαντική ήταν η επίδραση της GH61 στο βαθμό μετατροπής της βιομάζας (Διάγραμμα 3.6). Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες που αναδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της δράσης των GH61 και ουσιών με αναγωγικό χαρακτήρα (Quinlan, Sweeney et al. 2011; Westereng, Ishida et al. 2011), διερευνήθηκε περαιτέρω με τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ισχύος των επιμέρους υποστρωμάτων.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών γενικά πραγματοποιείται σε εκχυλίσματά τους και κατά συνέπεια η διαδικασία εκχύλισης επηρεάζει την αντίστοιχη κάθε φορά μέτρηση. Από την άλλη μεριά, η υδρόλυση των υλικών αυτών από κυτταρινάσες αποτελεί τυπικό παράδειγμα ετερογενούς κατάλυσης που πραγματοποιείται ανάμεσα στη διαλυτή φάση όπου βρίσκονται τα ένζυμα και στο αδιάλυτο υπόστρωμα, έτσι ώστε να παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον η απευθείας μέτρηση της αντιοξειδωτικής ισχύος του στερεού. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών με τη μέθοδο του DPPH· τόσο για τα αδιάλυτα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα όσο και για τα μεθανολικά εκχυλίσματα αυτών (Διάγραμμα 3.6).



**Διάγραμμα 3.6** Α. % ενίσχυση υδρόλυσης κατά την προσθήκη 9 mg *SrCel61* σε 11 mg Celluclast/g υποστρώματος (σύμβολο ■, γραμμή παλινδρόμησης ---) και 16.5 mg *SrCel61* σε μίγμα κυτταρινάσων (CBHI: 14 mg, EGII: 2.5 mg/g υποστρώματος) (σύμβολο □, γραμμή παλινδρόμησης -·-·-). Β. Αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος μεθανόλης (○) και του αδιάλυτου υποστρώματος (●), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του DPPH. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν με αύξουσα συγκέντρωση λιγνίνης ήταν τα ακόλουθα (άξονας X): PP2, PP1, PWS και PS.

Όπως είναι αναμενόμενο, όσο υψηλότερη ήταν η περιεκτικότητα σε λιγνίνη των επιμέρους υποστρωμάτων, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αντιοξειδωτική τους ισχύς. Η διαπίστωση αυτή, σε συνδυασμό με τη σύνδεση ανάμεσα στη συνεργιστική δράση και τη σύσταση των λιγνινοκυτταρινούχων, επιβεβαίωσε την υπόθεση σχετικά με την ενίσχυση της δράσης των GH61 από ουσίες που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων και επιπλέον προσδιόρισε την πηγή τους στη λιγνίνη και τις φαινολικές της ενώσεις κατά την υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.

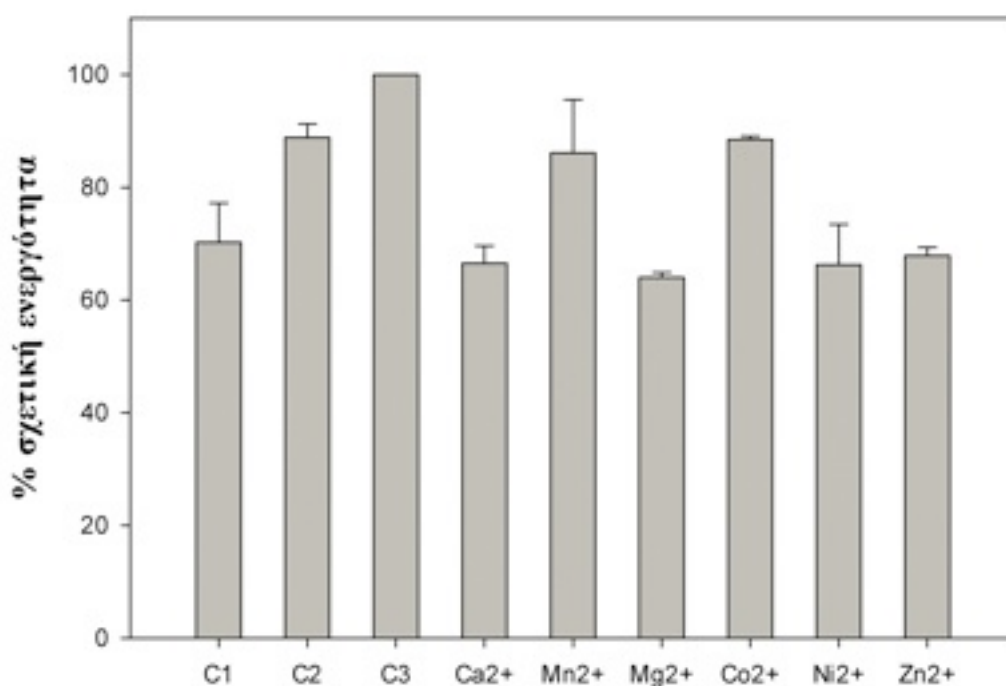
Προκειμένου να εξεταστεί περαιτέρω ο οξειδωτικός χαρακτήρας της *StCel61*, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια μία σειρά πειραμάτων συνεργιστικού πάνω σε καθαρές κυτταρίνες (Avicel) ή λιγνινοκυτταρινούχα χαμηλής συγκέντρωσης λιγνίνης (PP2) με προσθήκη εξωτερικών δοτών ηλεκτρονίων όπως ήταν τα αναγωγικά TCEP και ασκορβικό οξύ ή το εκχύλισμα μεθανόλης του PS, του υποστρώματος δηλαδή με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Χωρίς την προσθήκη των αναγωγικών δεν παρατηρήθηκε κανένα συνεργιστικό αποτέλεσμα, όπως είχε διαπιστωθεί και προηγουμένως (Διάγραμμα 3.4). Αντίθετα, η προσθήκη TCEP και εκχυλίσματος στο μίγμα της αντίδρασης οδήγησε σε αυξημένη μετατροπή παρουσία *StCel61*, χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυτοοξείδωση των αναγωγικών ουσιών όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Quinlan, Sweeney et al. 2011).

### **3.1.9 Μελέτη επίδρασης δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της *StCel61***

Στο Διάγραμμα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών δισθενών μεταλλικών ιόντων στη δράση της *StCel61*. Καταρχάς είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη (υδρόλυση λιχενάνης) αποτελεί παράπλευρη λειτουργία της *StCel61* και όχι το βασικό της ρόλο, γεγονός που υποδεικνύει τη σχετικότητα των παρατηρήσεων και συμπερασμάτων που είναι δυνατό να εξαχθούν. Παρατηρείται ότι η κατεργασία με 10 mM EDTA δεν έχει σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα της *StCel61* (δείγμα C1), παρά το γεγονός ότι η παρουσία μετάλλου θεωρείται απαραίτητη για τη λειτουργία των GH61 (Harris, Welner et al. 2010). Η παρατήρηση αυτή έρχεται ωστόσο σε συμφωνία με την



παρατήρηση των (Quinlan, Sweeney et al. 2011) σύμφωνα με τους οποίους η συνάφεια του ιόντος χαλκού με τα μέλη της οικογένειας 61 είναι τόσο ισχυρή που η κατεργασία με EDTA να μην οδηγεί απαραίτητα στην απομάκρυνση του ιόντος. Από την άλλη μεριά, όπως αναφέρουν οι (Carrer, Stolz et al. 2006) είναι δυνατό κατά τη διάρκεια της διαπίδυσης μετά την επώαση με EDTA να γίνεται επαναπρόσληψη μετάλλου από το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρείται στα δείγματα όπου τόσο το ένζυμο όσο και το υπόστρωμα δεν έχουν υποστεί κατεργασία με EDTA ενώ μεταξύ των επιμέρους αλάτων δε παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις, με μόνα ίσως τα άλατα μαγγανίου και κοβαλτίου να παρουσιάζουν λίγο περισσότερη ενισχυτική δράση έναντι των υπολοίπων που εξετάστηκαν.

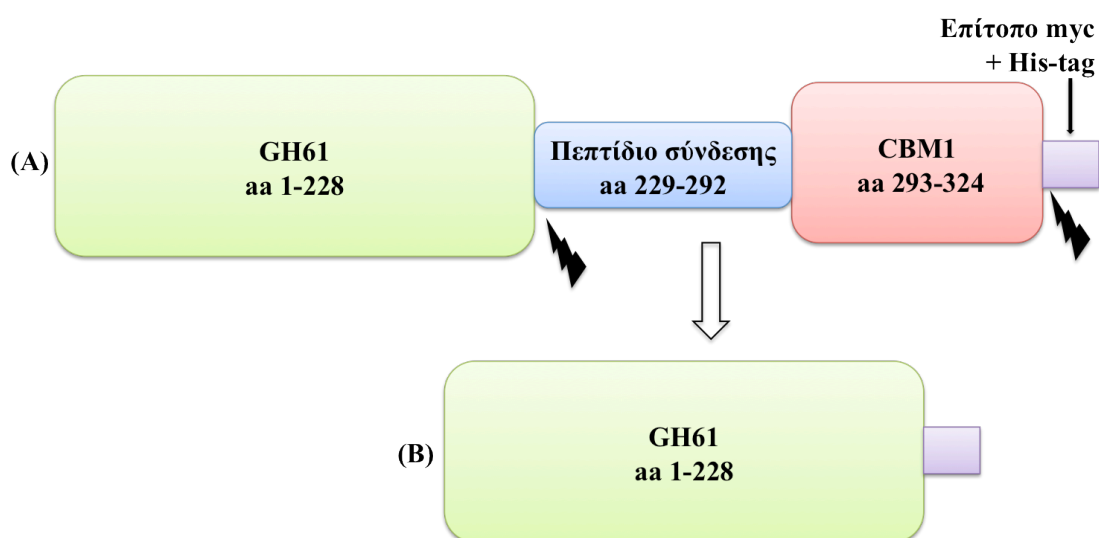


**Διάγραμμα 3.7** Μελέτη της επίδρασης των δισθενών μετάλλων στη δραστηριότητα της *StCel61*. Σε όλες τις υδρολύσεις χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα και ένζυμο που είχαν επωαστεί με EDTA εκτός αν αναφέρεται το αντίθετο. C1: κανένα επιπλέον μέταλλο, C2: *StCel61* που δεν έχει υποστεί κατεργασία με EDTA, C3: *StCel61* και υπόστρωμα που δεν έχει υποστεί κατεργασία με EDTA. Οι υπόλοιπες ράβδοι αντιστοιχούν σε προσθήκη 5 mM από το αντίστοιχο άλας στο μίγμα της αντίδρασης.

### 3.1.10 Κρυσταλλογραφικές μελέτες της *St*Cel61

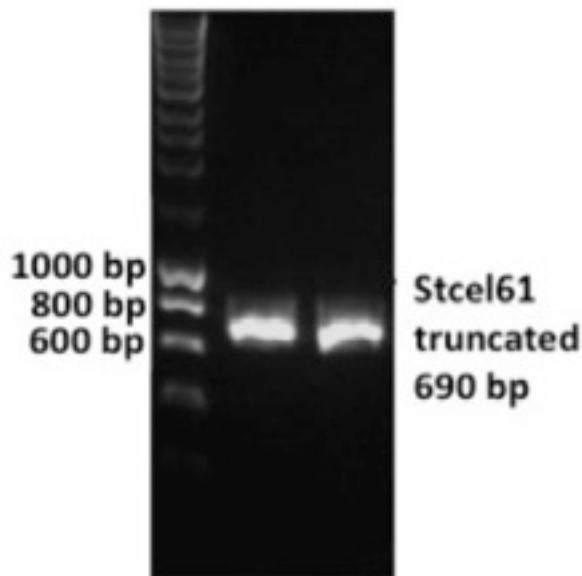
#### 3.1.10.1 Κλωνοποίηση και έκφραση του καταλυτικού τομέα της *St*Cel61 (*St*Cel61 truncated)

Προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχούς κρυστάλλωσης επιχειρήθηκε να κλωνοποιηθεί και να εκφραστεί το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στον τομέα με ομολογία στην οικογένεια 61, αφαιρώντας δηλαδή από την αρχική αλληλουχία τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στο γλυκοζυλιωμένο πεπτίδιο σύνδεσης και τον τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες (CBM1) (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6** Τα επιμέρους τμήματα της αλληλουχίας της *St*Cel61 πριν (A) και μετά (B) την αφαίρεση των αμινοξέων που αντιστοιχούν στο πεπτίδιο σύνδεσης και τον τομέα CBM1 (αμινοξέα 229-324).

Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε ο κατάλληλος αντίστροφος εκκινητής (ο ευθύς εκκινητής ήταν ο ίδιος με αυτόν που είχε χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου *St*Cel61, Πίνακας 2.3) και η PCR πραγματοποιήθηκε στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαC/*St*cel61 στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2β (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του μέρους εκείνου του γονιδίου της *StCel61* που περιλαμβάνει μόνο τον καταλυτικό τομέα (690 bp) από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαC/*Stcel61*.

Μετά από τον επιτυχή πολλαπλασιασμό και απομόνωση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή της καινούριας πρωτεΐνης ήταν η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για την *StCel61*. Η έκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης δεν κατέστη δυνατή από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris* παρά το γεγονός ότι δοκιμάστηκαν πολλές μετασχηματισμένες αποικίες *P. pastoris* και επαναλήφθηκε η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης για την παραγωγή καινούριων στελεχών. Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε η κρυστάλλωση ολόκληρης της *StCel61*.

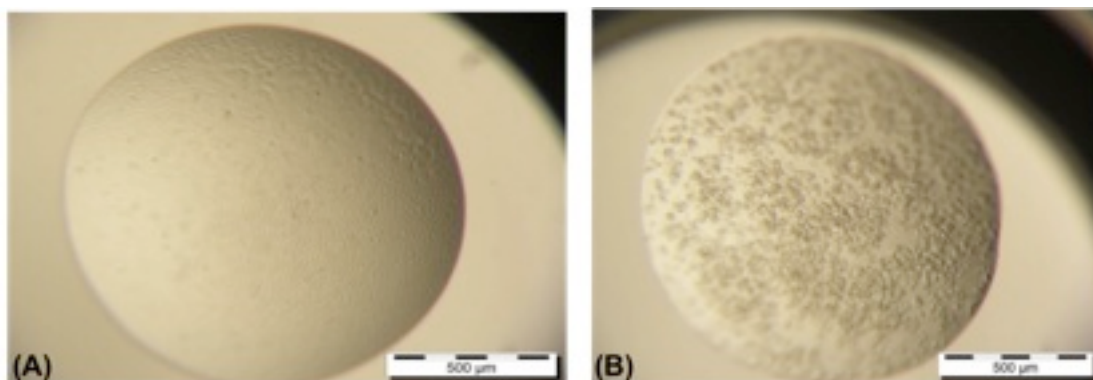
### 3.1.10.2 Δοκιμές κρυστάλλωσης *StCel61*

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες της *StCel61* πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Dr. Leila Lo Leggio στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης στα πλαίσια μίας επίσκεψης σύντομης διάρκειας χρηματοδοτούμενης από το EMBO (European Molecular Biology Organization).

Για τον προσδιορισμό αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε σε πρώτη φάση σάρωση πλήθους συνθηκών με χρήση ρομπότ. Παρά το μεγάλο αριθμό διαλυμάτων που δοκιμάστηκαν, δεν έγινε δυνατή η ανάπτυξη κρυστάλλων ή ακόμα και ιζήματος κρυσταλλικής φύσης. Τελικά επιλέχθηκε για περαιτέρω

επεξεργασία η συνθήκη F2 από το σκεύασμα JCSG+ (3.15 M θειικό αμμώνιο, 0.1 M κιτρικό τρινάτριο pH 5) η οποία σε συνδυασμό 1:1 ή 2:1 με την *StCel61* (40 mg/ml) έδινε το αποτέλεσμα που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8A. Στα πλαίσια της προσπάθειας βελτίωσης του αποτελέσματος αυτού, δοκιμάστηκε αλλαγή του pH, της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και του θειικού αμμωνίου, η τεχνική της σποράς και η χρήση ποικιλίας προσμίξεων (σκεύασμα Additive Screen HT - Hampton Research). Επίσης, δεδομένης της σημασίας των ιόντων δισθενών μετάλλων στις ήδη γνωστές δομές GH61, συμπεριλήφθηκαν τα ακόλουθα άλατα στο διάλυμα κρυστάλλωσης σε συγκέντρωση 15 mM:  $Zn(O_2CCH_3)_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $BaBr_2$ ,  $SrCl_2$ ,  $Pb(O_2CCH_3)_2$  and  $FeCl_2$ .

Το αρχικό αποτέλεσμα τελικά βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη 200 mM 3-(1-πυριδινό)-1-προπανο σουλφονικό οξύ NDSB-201 (Εικόνα 3.8B). Οι σφερουλίτες που αναπτύχθηκαν ψύχθηκαν στους 100K και εκτέθηκαν σε συγχροτρονική ακτινοβολία στο σταθμό 911-2 στο MAXLAB (Lund, Σουηδία), χωρίς όμως να παρουσιάσουν ικανότητα περίθλασης των ακτίνων-X.



**Εικόνα 3.8** Το αποτέλεσμα της δοκιμής κρυστάλλωσης της *StCel61* (σε συγκέντρωση 40 mg/ml) με 3.15 M θειικό αμμώνιο, 0.1 M κιτρικό τρινάτριο pH 5 πριν (A) και μετά (B) την προσθήκη NDSB-201.

## 3.2 GH61 από το νηματοειδή μύκητα *Fusarium oxysporum* (*FoCel61*)

### 3.2.1 Επιλογή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το γονιδίωμα του *F. oxysporum*

Αρχικά, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων του Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu>), εντοπίστηκαν οι νουκλεοτιδικές εκείνες αλληλουχίες του

γονιδιώματος του *F. oxysporum* που κωδικοποιούν υποθετικές πρωτεΐνες με ομολογία σε μέλη της οικογένειας 61. Αντιστρέφοντας τη διαδικασία στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) που παρουσίαζαν συγγένεια αλληλουχίας με τα επιλεγμένα γονίδια χρησιμοποιώντας το εργαλείο αναζήτησης *BLAST* (Altschul, Gish et al. 1990). Εντοπίστηκαν 11 ORFs ομόλογα στην οικογένεια GH61, γεγονός που συνάδει με τον χαρακτηρισμό του *F. oxysporum* ως ισχυρού κυτταρινολυτικού μύκητα (Panagiotou, Kekos et al. 2003; Christakopoulos, Xiros et al. 2008).

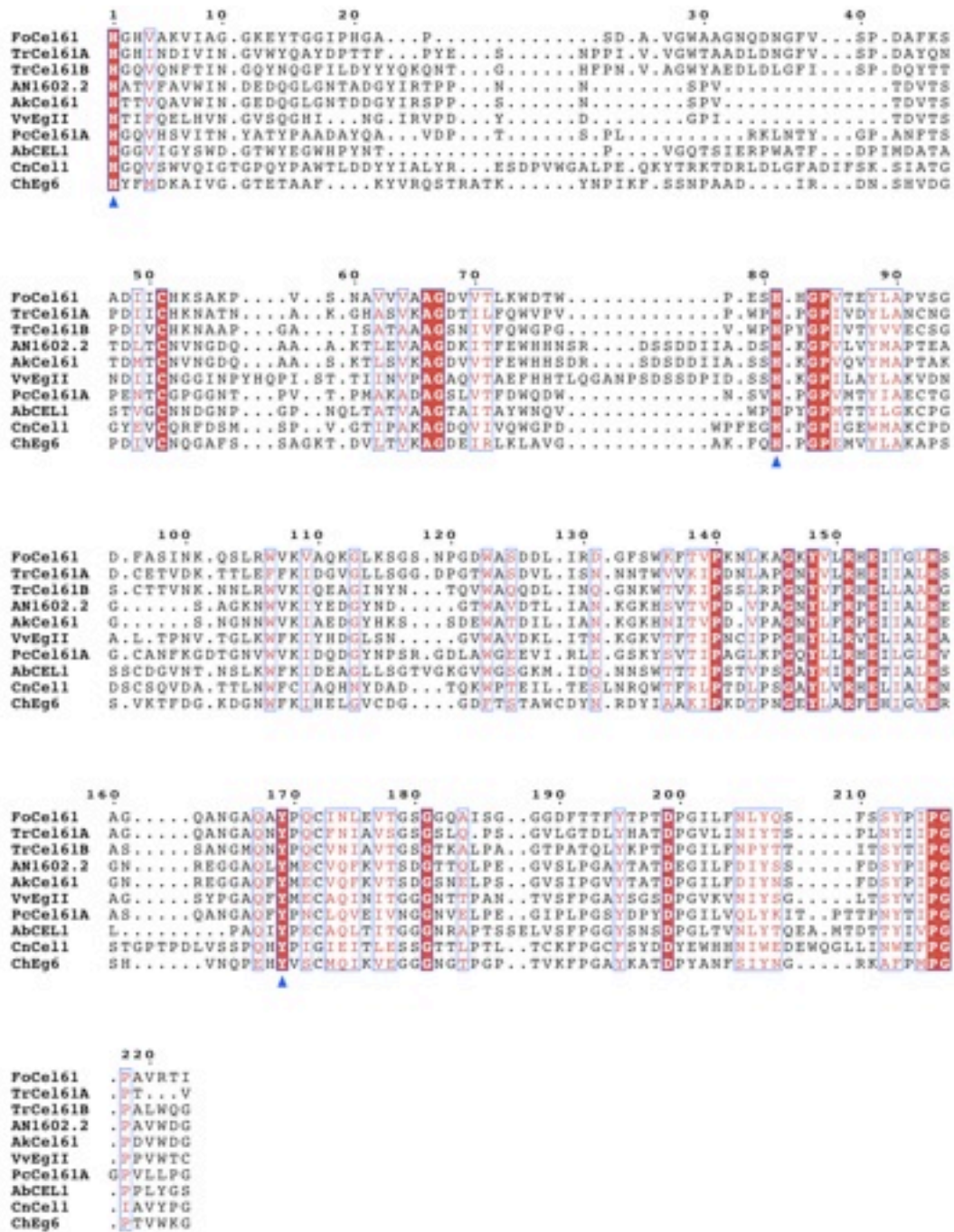
Το γονίδιο *Foxg\_09688.2* ή *FoCel61* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που παρουσιάζει τη μέγιστη αμινοξική ταυτότητα με τη *Cel61A* (46%, GenBank accession number CAA71999) και τη *Cel61B* (40%, AAP57753) του *T. reesei*. (Πίνακας 3.4). Ομολογία παρουσιάζει επίσης με τον καταλυτικό τομέα των GH61

**Πίνακας 3.4** Χαρακτηριστικά του γονιδίου *Foxg\_09688.2* ή *FoCel61*. Η σηματοδοτική αλληλουχία έκφρασης προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα SignalP (Emanuelsson, Brunak et al. 2007), το θεωρητικό MB και pI με το πρόγραμμα ProtParam (Gasteiger E. 2005) ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τα NetNGlyc (Gupta R. 2004) και NetOGlyc (Julenius, Molgaard et al. 2005).

Κωδικός Broad Institute	<i>Foxg_09688.2</i> .
Περιοχή (Scaffold)	12: 400772-401792
Μήκος γονιδίου	1021
Αριθμός Αμινοξέων	242
Αριθμός εξωνίων	1
Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης	Αμινοξέα 1-19: MHCNLSLGVVAALLAGANA
Θεωρητικό Μοριακό Βάρος (Da)	26300
Θεωρητικό pI	7.12
Περιοχές Γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: 1 (Asn4)
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: 1 (Thr 241)

από τους μύκητες *A. nidulans* (AN1602.2, 39% ταυτότητα, EAA64722), *A. kawachii* (*AkCel61*, 38%, BAB62318.1), *V. volvacea* (EgII, 34%, AY559101), *P. chrysosporium* (*Cel61A*, 34%, AAM22493), *A. bisporus* (CEL1, 32%, AAA53434), *C. neoformans* (Cell, 30%, AAC39449) και *C. heterostrophus* (Eg6, 27%, AAM76663) (Εικόνα 3.9). Το γονίδιο αυτό, που επιπλέον δεν περιέχει εσόνια, γεγονός που διευκολύνει την ετερόλογη έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση και παραγωγή της GH61 από το *F. oxysporum*, (*FoCel61*).

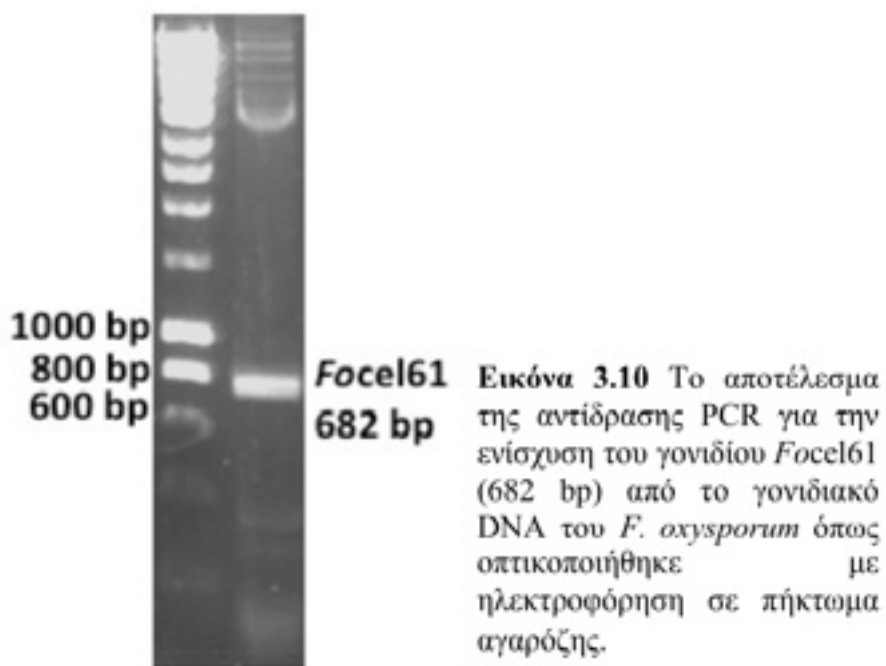
Τα χαρακτηριστικά του γονιδίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των GH61 που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, η *FoCel61* δε διαθέτει τομέα πρόσδεσης σε πολυσακχαρίτες (CBM) όπως εξάλλου συμβαίνει και στην περίπτωση των *H. jecorina* *Cel61B* (Karkehabadi, Hansson et al. 2008) και *Cryptococcus neoformans* *Cell* (Chang and Kwon-Chung 1998).



**Εικόνα 3.9** Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας της *FoCel61* με 9 ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας GH61: *TrCel61A* (GenBank accession no CAA71999) και *TrCel61B* (AAP57753) του *T. reesei*, AN1602.2 (EAA64722) του *A. nidulans*, *AkCel61* (BAB62318.1) του *A. kawachii*, *VvEgII* (AY559101) του *V. voluacea*, *PcCel61A* (AAM22493) του *P. chrysosporium*, *AbCEL1* (AAA53434) του *A. Bisporus*, *CnCell* (AAC39449) του *C. neoformans* και *ChEg6* (AAM76663) του *C. heterostrophus*. Με λευκό χρώμα παρουσιάζονται τα ταυτόσημα αμινοξέα ενώ με κόκκινο τα παρόμοια. Με ▲ υποδεικνύονται τα αμινοξέα που πιθανώς συμμετέχουν στη συναρμογή του μεταλλοκατιόντος, με βάση τη δομή της *TrCel61B* και την πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τα προγράμματα *T-Coffee* (Notredame, Higgins et al. 2000) και *ESPRIT* (Gouet, Courcelle et al. 1999).

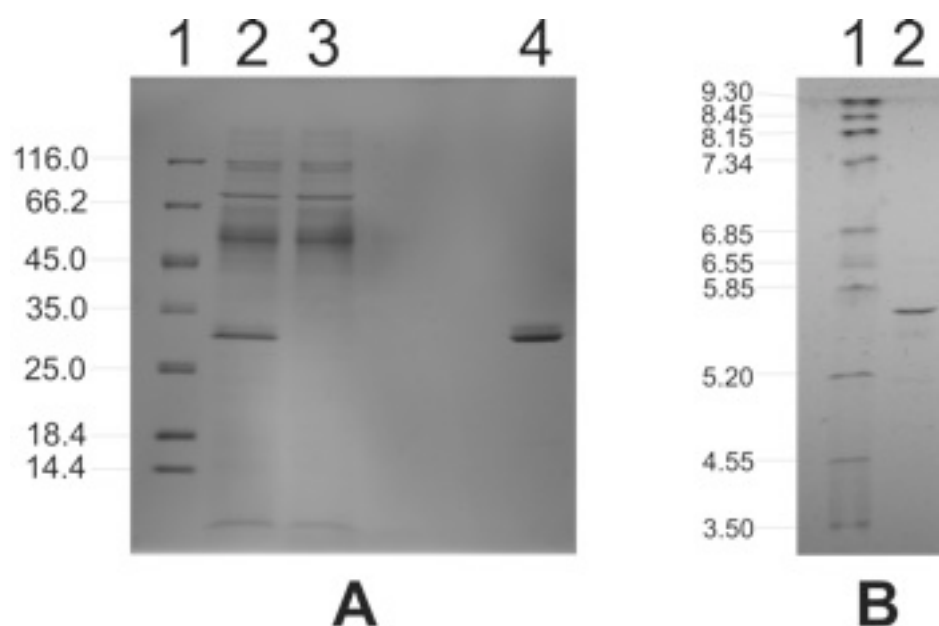
### 3.2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της *FoCel61*

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κλωνοποίηση, έκφραση και καθαρισμό της *FoCel61* ήταν ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για την *StCel61* (§.3.1.2, 3.1.3 και 3.1.4). Στην Εικόνα 3.10 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για τον πολλαπλασιασμό του αντίστοιχου γονιδίου από το γονιδιακό DNA του *F. oxysporum*.



Η καθαρότητα της ανασυνδυσμένης *FoCel61* εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και το ισοηλεκτρικό της σημείο με IEF σε ένα εύρος pH 3 έως 9. Το καθαρό ένζυμο που ανακτήθηκε τελικά είχε MB ~26 kDa και pI 5.6 (Εικόνα 3.11). Το πειραματικά προσδιορισμένο MB είναι σε συμφωνία με το θεωρητικό, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη δεν είναι γλυκοζυλιωμένη. Η απουσία N-γλυκοζυλίωσης επιβεβαιώθηκε και πειραματικά με επεξεργασία με γλυκοζιδάση Endo H κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο MB της επεξεργασμένης πρωτεΐνης.





**Εικόνα 3.11** SDS-PAGE (A) και IEF (B) της *FoCel61*. A. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών χαμηλών MB, 2/ εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας ανασυνδυασμένης *P. pastoris*, 3/ έξοδος στήλης TALON και 4/ καθαρή *FoCel61* B. 1/ πρότυπο διάλυμα μίγματος πρωτεϊνών γνωστών pI εύρους 3.5-9.3, 2/ καθαρή *FoCel61*.

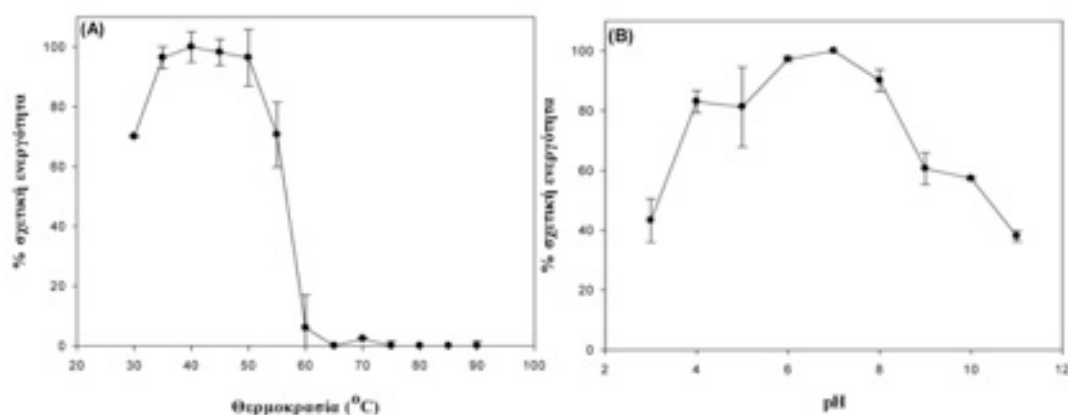
### 3.2.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της *FoCel61*

Για την ανίχνευση της ενεργότητας της *FoCel61* χρησιμοποιήθηκε μία μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην §2.2.3 του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι», σε θερμοκρασία 40 °C και 50 mM ρυθιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών pH 7. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5, η *FoCel61* παρουσιάζει ασθενή υδρολυτική δράση στις ξυλάνες (αραβινοξυλάνη πίτυρου και ξυλάνη οξιάς) και ακόμα ασθενέστερη στα CMC και λιχενάνη.

**Πίνακας 3.5** Προσδιορισμός δραστηριότητας της *FoCel61* σε μία ποικιλία πολυσακχαριτών, “-”: μη ανιχνεύσιμη δράση.

Υπόστρωμα	Αναγωγικά άκρα ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g protein}$ )
CMC	$7 \pm 2.2$
HEC	-
HPMC	-
$\beta$ -γλουκάνη κριθαριού	-
Λιχενάνη	$11.4 \pm 1.9$
Λαμιναρίνη	-
Κυτταρίνη Avicel	-
Αραβινοξυλάνη πίτυρου	$210.9 \pm 7.9$
Ξυλάνη οξιάς	$139.8 \pm 0.8$
Αραβικό κόμμι	-
Χιτίνη	-

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης της *FoCel61*, χρησιμοποιήθηκε η ασθενής υδρολυτική συμπεριφορά πάνω στη λιχενάνη, όπως και στην περίπτωση της *StCel61*. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος λιχενάνης 0.5% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7 αναμίχθηκαν με 50  $\mu\text{l}$  διαλύματος *FoCel61* 1  $\mu\text{M}$  σε 20 mM Tris HCl pH 8 και το μίγμα επώαστηκε για 1 h στους 30, 40, 50, 60, 70, 80 και 90 °C. Ακολούθησε μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων και προσδιορισμός της σχετικής ενεργότητας σε κάθε θερμοκρασία ως ποσοστό επί της μέγιστης μετρούμενης υδρολυτικής δράσης. Αντίστοιχα, για την εύρεση του βέλτιστου pH η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 50 °C μετά από διαλυτοποίηση της λιχενάνης σε ένα μεγάλο εύρος pH.



**Διάγραμμα 3.8** Σχετική ενεργότητα της *FoCel61* σε ένα εύρος θερμοκρασιών (A) και pH (B).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.8, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 40 °C και το βέλτιστο pH δράσης είναι 7. Οι σχετικές ενεργότητες μετά από αντιδράσεις μίας ώρας στους 30, 35, 40, 45, 50, 55 και 60 °C ήταν αντίστοιχα 70, 96, 100, 98, 96, 71 και 6% ενώ στους 65 °C η πρωτεΐνη ήταν ανενεργή. Σε pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, και 10 τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 38, 86, 91, 98, 100, 88, 57 και 56%.

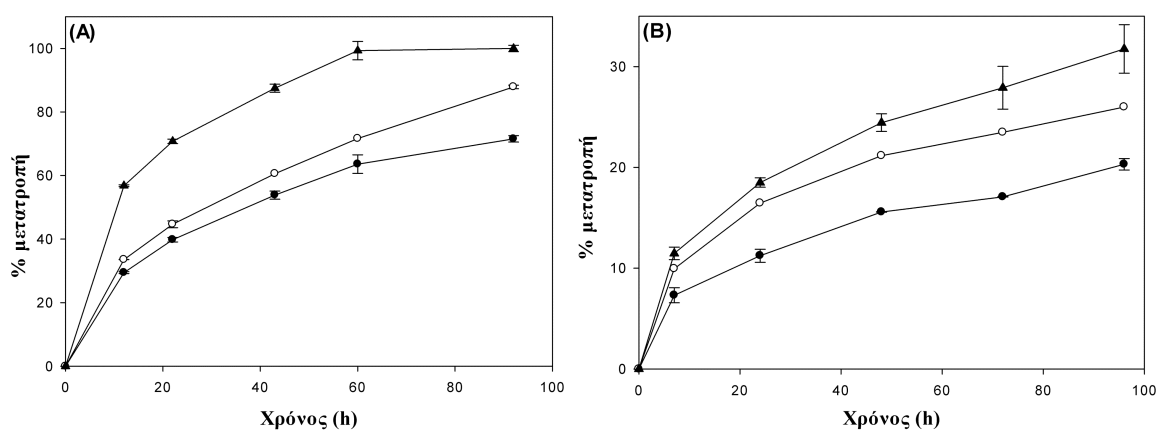
### 3.2.4 Πειράματα συνεργιτισμού με κυτταρινάσες

Προκειμένου να εξεταστεί αν η *FoCel61* παρουσιάζει ενισχυτική δράση κατά την υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων από τις κλασικές κυτταρινάσες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνεργιτισμού πάνω στο PWS και το PS, χρησιμοποιώντας είτε το Celluclast είτε μίγμα καθαρών κυτταρινασών όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.6. Τα ένζυμα διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών 100 mM pH 5.5 παρουσία 1mM MnCl<sub>2</sub> και 0.02% NaN<sub>3</sub> (w/v). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C για 96 h (4 ημέρες). Θεωρώντας τα μετρούμενα αναγωγικά σάκχαρα ως ανάλογα γλυκόζης και με βάση τη σύσταση των υποστρωμάτων προσδιορίστηκε η % μετατροπή της κυτταρίνης για τα διάφορα ενζυμικά μίγματα. Στα Διαγράμματα 3.9 και 3.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων στα μίγματα των αντιδράσεων υδρόλυσης. Όπως και στην περίπτωση της *StCel61*, η προσθήκη καθαρής *FoCel61* στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα δεν είχε κανένα υδρολυτικό αποτέλεσμα.

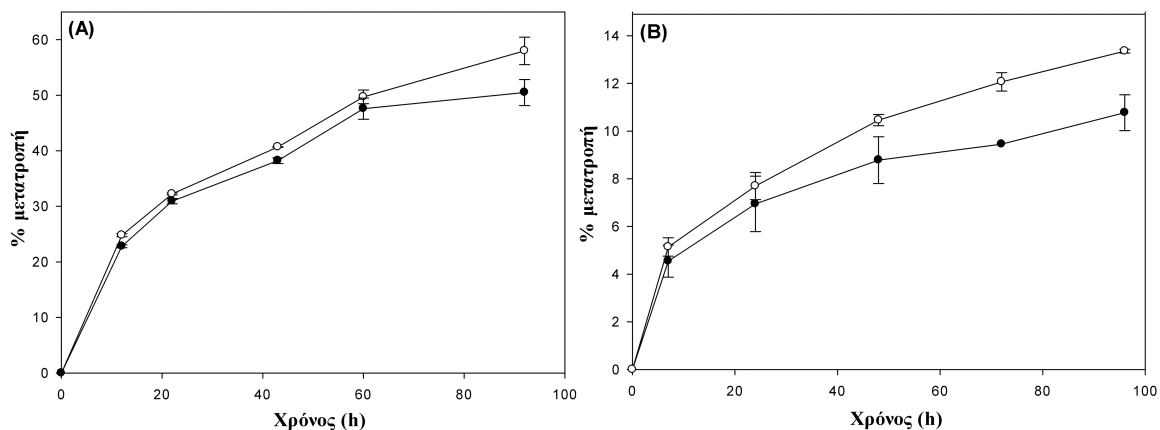
**Πίνακας 3.6** Η σύσταση των ενζυμικών μιγμάτων και τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα συνεργεισμού της *FoCel61*

<b>Υποστρώματα</b>	Λιγνινοκυτταρινούχα: PWS, PS Καθαρές κυτταρίνες: Avicel
<b>Ενζυμικά Μίγματα*</b>	Celluclast (11 mg/g υποστρ.) <i>FoCel61</i> (9 mg/g υποστρ.) + Celluclast (11 mg/g υποστρ.) Celluclast (22 mg/g υποστρ.) Κυτταρινάσες (2.5 mg EGII + 14 mg CBH I/g υποστρ.) <i>FoCel61</i> (9 mg/g υποστρ.) + Κυτταρινάσες (2.5 mg EGII + 14 mg CBH I/g υποστρ.)

\* Σε όλα τα ενζυμικά μίγματα γινόταν προσθήκη β-γλυκοζιδάσης σε ποσοστό ~3% (w/w επί του συνολικού πρωτεϊνικού φορτίου).



**Διάγραμμα 3.9** Επίδραση της *FoCel61* στην υδρόλυση του PWS (A) και PS (B) από το Celluclast. Το σύμβολο (●) αντιστοιχεί σε 11 mg Celluclast/g υποστρώματος, το σύμβολο (○) σε 11 mg Celluclast + 9 mg *FoCel61*/g υποστρώματος και το σύμβολο (▲) σε 22 mg Celluclast /g υποστρώματος.



**Διάγραμμα 3.10** Επίδραση της *FoCel61* στην υδρόλυση του PWS (A) και PS (B) από το μίγμα κυτταρινασών. Το σύμβολο (●) αντιστοιχεί στο μίγμα κυτταρινασών (2.5 mg EGII + 14 mg CBHI/g υποστρώματος ενώ το σύμβολο (○) στο μίγμα αυτό εμπλουτισμένο με 9 mg *FoCel61* /g υποστρώματος.

Όπως φαίνεται και στα παραπάνω σχήματα, η προσθήκη της *FoCel61* στο Celluclast καθώς και στο μίγμα καθαρών κυτταρινασών οδηγούσε σε αύξηση στο συνολικό βαθμό υδρόλυσης, ειδικά στην περίπτωση του PS. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της υδρόλυσης με Celluclast, η προσθήκη 9 mg *FoCel61*/g υποστρώματος οδηγούσε σε αύξηση στο ποσοστό υδρόλυσης κατά 23 και 28% στα PWS και PS, αντίστοιχα. Όταν η υδρόλυση πραγματοποιούνταν παρουσία μίγματος καθαρών κυτταρινασών, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 15 και 34%. Ο παρατηρούμενος συνεργισμός και στην περίπτωση αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί σε αθροιστική υδρολυτική δράση της GH61, καθότι όπως προαναφέρθηκε όταν προστέθηκε μόνη της δεν προκάλεσε απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων σε κανένα από τα παραπάνω υποστρώματα.

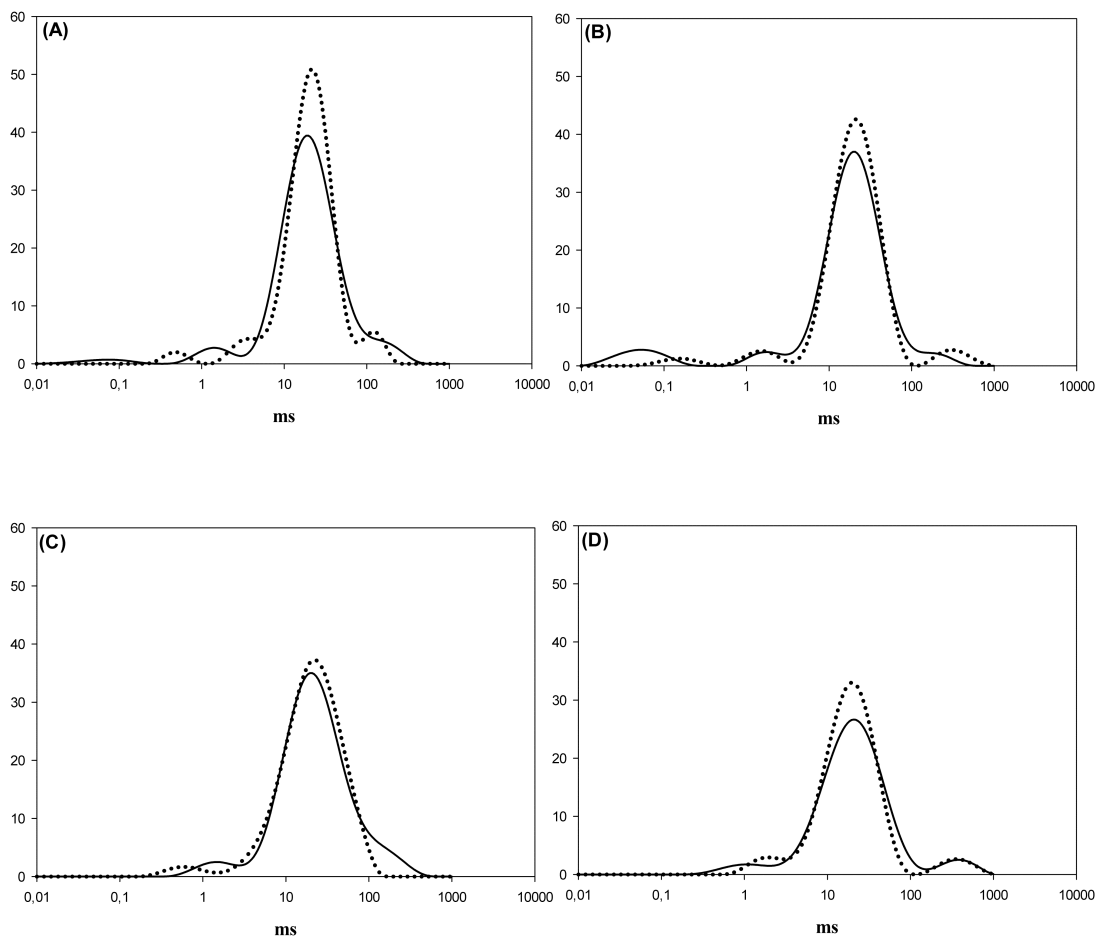
### 3.2.5 Μελέτη της επίδρασης της *FoCel61* στα μόρια νερού με χρήση NMR στο Πεδίο του Χρόνου.

Σκοπός των πειραμάτων με NMR στο Πεδίο του χρόνου ήταν να διαπιστωθεί αν η προσθήκη GH61 προκαλούσε κάποια επιπλέον μεταβολή στην κατάσταση των μορίων νερού που αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι με την τεχνική αυτή είναι δυνατό να αποτυπωθεί η δράση κυτταρινολυτικών ενζύμων κατά τα πρώτα στάδια της

αποδόμησης κυτταρινούχων υποστρωμάτων μέσω της καταγραφής παραμέτρων όπως ο χρόνος χαλάρωσης  $T_2$  (Felby, Thygesen et al. 2008).

Σε ό,τι αφορά τα πειράματα σε filter paper (καθαρή κυτταρίνη), δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (δείγμα 6a), τόσο στα δείγματα που είχαν υποστεί κατεργασία με μίγμα κυτταρινασών (3a), όσο και στα υπόλοιπα στα οποία είχε γίνει προσθήκη *FoCel61* μόνης ή σε συνδυασμό το κυτταρινολυτικό μίγμα (δείγματα 1a, 2a, 4a και 5a). Τα παραπάνω έρχονται σε αντίθεση με τα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Felby, Thygesen et al. 2008), ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί πως χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό κυτταρινολυτικό μίγμα στις 2 εργασίες.

Στην περίπτωση του προκατεργασμένου μίσχου αραβοσίτου, η προσθήκη του Celluclast 1.5L (δείγμα 5b) προκάλεσε τις ίδιες μεταβολές που είχαν παρατηρηθεί και στην προαναφερθείσα μελέτη: η κορυφή στο 1 ms αρχίζει σταδιακά να χωρίζει στα δύο ενώ η κορυφή που αντιστοιχεί στο ελεύθερο νερό (στα 10 - 100 ms) γίνεται στενότερη (Διάγραμμα 3.11A). Όταν στο Celluclast προστίθεται *FoCel61* (δείγματα 3a και 4a), παρατηρούνται οι ίδιες αλλαγές στην κορυφή στο 1 ms, αλλά η μεταβολή στην κορυφή του ελεύθερου νερού είναι ασθενέστερη (Διάγραμμα 3.11B), ενώ η προσθήκη σκέτης *FoCel61* δεν προκαλεί καμία διαφοροποίηση (Διάγραμμα 3.11C).

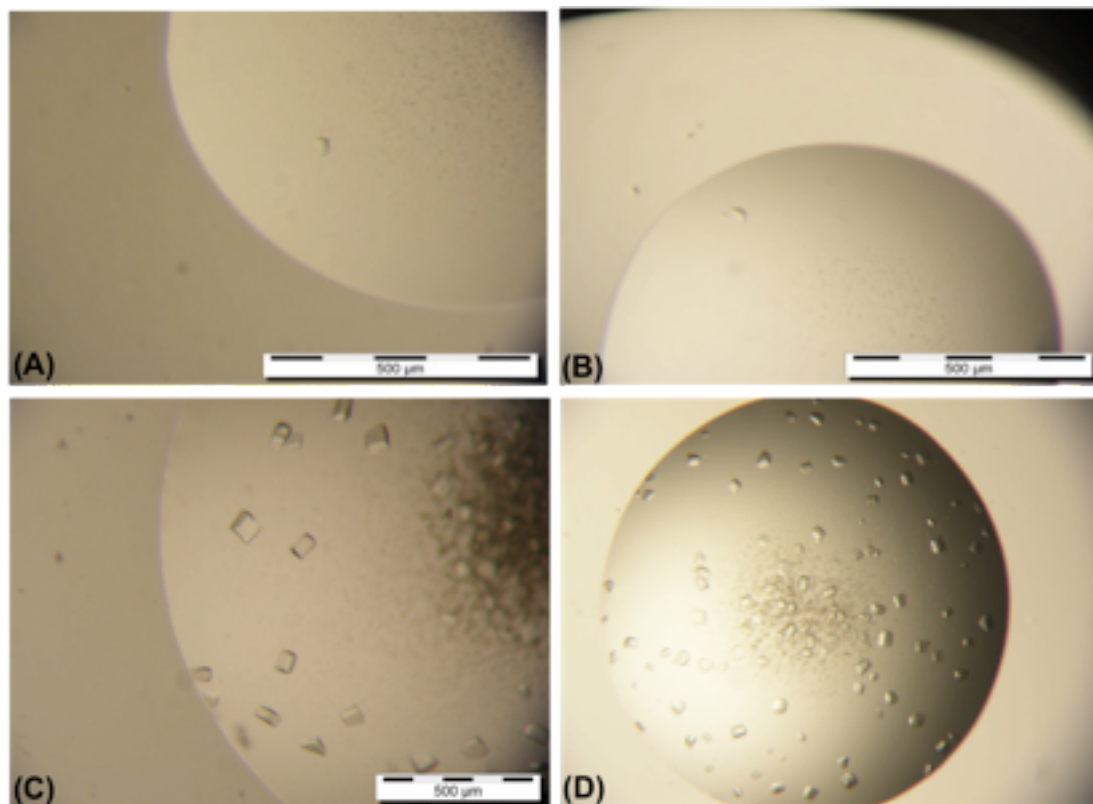


**Διάγραμμα 3.11** Φάσμα Πεδίου Χρόνου NMR του προκατεργασμένου μίσχου αραβοσίτου στις χρονικές στιγμές  $t=0$  ( — ) και  $t=180$  min ( ... ) κατά την επεξεργασία με Celluclast (A), Celluclast εμπλουτισμένο με *FoCel61* (B), *FoCel61* μόνο (C) και απενεργοποιημένα ένζυμα (D). Ο χρόνος χαλάρωσης παρουσιάζεται σε λογαριθμική κλίμακα.

### 3.2.6 Κρυσταλλογραφικές μελέτες *FoCel61*

Όπως και στην περίπτωση της *StCel61*, οι κρυσταλλογραφικές μελέτες της *FoCel61* πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Dr. Leila Lo Leggio στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης. Μετά από δοκιμή πλήθους συνθηκών κρυστάλλωσης με τη βοήθεια ρομπότ, μικροί κρύσταλλοι εμφανίστηκαν παρουσία 0.2 M  $\text{LiSO}_4$ , 25% PEG3350 και 0.1 M Bis Tris pH 6.5 ή Hepes pH 7.5 (συνθήκες G3

και G4 από το σκεύασμα INDEX HT της Hampton Research), σε συγκέντρωση 3.25 mg/ml *FoCel61* και αναλογία ανάμιξης 1:1 ή 2:1 (Εικόνα 3.12).



**Εικόνα 3.12** Κρύσταλλοι της *FoCel61* που αναπτύχθηκαν σε 0.2 M  $\text{LiSO}_4$ , 25% PEG3350 (A, C) και 0.1 M Bis Tris pH 6.5 ή HEPES pH 7.5 (B, D). Η αναλογία ανάμιξης ήταν 1:1, η συγκέντρωση *FoCel61* 3.25 mg/ml και ο όγκος σταγόνας 0.3 μl (A, B) και 4 μl (C, D). Οι κρύσταλλοι στα A και B αναπτύχθηκαν με την τεχνική της καθίμενης σταγόνας ενώ στα C και D με την τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας.

Οι κρύσταλλοι αυτοί αφού εμβαπτίστηκαν σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα (μητρικό διάλυμα με 35% PEG 3350 ή 27% γλυκερόλη) για μερικά δευτερόλεπτα, ψύχθηκαν απότομα με βύθιση σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε συγχροτρονική ακτινοβολία στο σταθμό 911-2 στο MAXLAB (Lund, Σουηδία). Η περιθλαστική ικανότητα ήταν πολύ χαμηλή (ευκρίνεια 15 Å), παρά το μεγάλο αριθμό των κρυστάλλων που δοκιμάστηκαν και τη χρήση τεχνικών όπως η ανόπτηση (annealing) και η αφυδάτωση (Heras and Martin 2005). Ταυτόχρονα, προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των κρυστάλλων, η αρχική συνθήκη κρυστάλλωσης (G3 από το INDEX HT) τροποποιήθηκε με χρήση προσμίξεων κρυστάλλωσης, αντικατάσταση του  $\text{LiSO}_4$  με άλλα άλατα λιθίου και την αλλαγή της συγκέντρωσης των επιμέρους συστατικών κρυστάλλωσης. Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν δεν παρουσίασαν κάποια ιδιαίτερη βελτίωση στην περιθλαστική ικανότητα.



## 4. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της ξυλανάσης *FoXyn10a*

### 4.1 Ανάλυση της αλληλουχίας της *FoXyn10a* με βάση το γονιδίωμα του *F. oxysporum*

Η αμινοξική αλληλουχία της *FoXyn10a* προσδιορίστηκε με βάση το γονίδιο foxg\_17421.2 της βάσης δεδομένων του Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu>). Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του γονιδίου και της αντίστοιχης πρωτεΐνης.

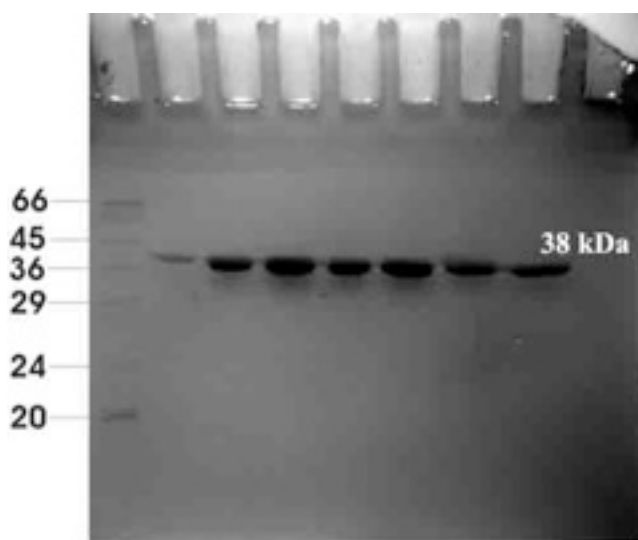
**Πίνακας 4.1** Χαρακτηριστικά του γονιδίου foxg\_17421.2 και της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί. Τα θεωρητικά MB και pI προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα ProtParam (Gasteiger E. 2005) ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τα NetNGlyc (Gupta R. 2004) και NetOGlyc (Julenius, Molgaard et al. 2005).

Κωδικός Broad Institute	foxg_17421.2
Μήκος γονιδίου (συμπεριλαμβάνονται τα εσόνια)	1004
Αριθμός εξονίων	3
Αριθμός Αμινοξέων	280
Θεωρητικό Μοριακό Βάρος (Da)	31322.3
Θεωρητικό pI	8.96
Περιοχές Γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: 1 (Asn54)
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: 5 (Thr163, Thr167, Thr169, Thr 172, Thr 174)

### 4.2 Παραγωγή και καθαρισμός της *FoXyn10a*

Τα στάδια παραγωγής και καθαρισμού της ξυλανάσης *FoXyn10a* πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών (Ε.Μ.Π.) από τον Δρ. Ευάγγελο Τόπακα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην εργασία των (Christakopoulos, Nerinckx et al. 1997; Topakas and Christakopoulos 2004).

Το MB του καθαρού ενζύμου με βάση την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ήταν 38kDa και το πειραματικά προσδιορισμένο pI 9.5. Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE της καθαρής ξυλανάσης που χρησιμοποιήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα κρυστάλλωσης,



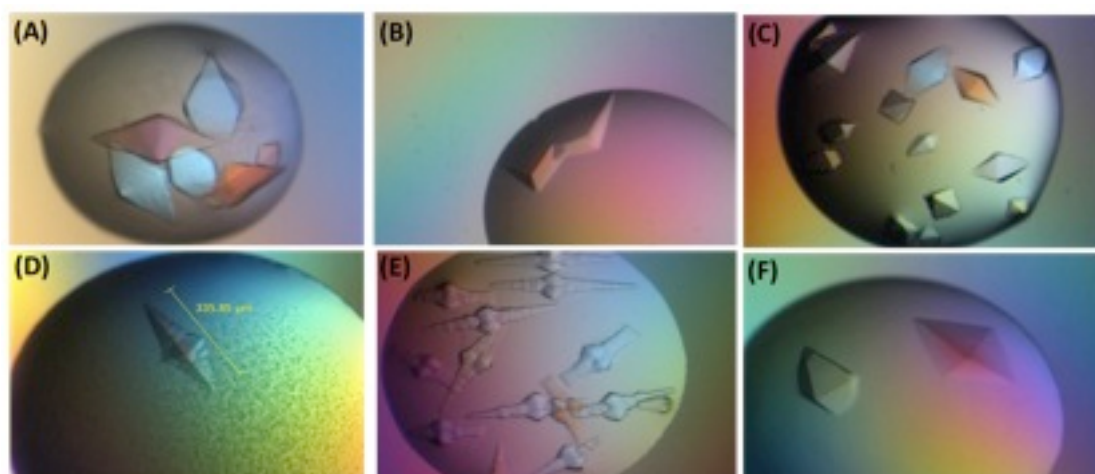
**Εικόνα 4.1** Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE της καθαρής *FoXyn10a*. Στην αριστερή λωρίδα παρουσιάζεται πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών γνωστού MB.

### 4.3 Κρυστάλλωση *FoXyn10a* και συλλογή δεδομένων περίθλασης

Οι δοκιμές κρυστάλλωσης της *FoXyn10a* πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΟΦΧ, ΕΙΕ) στην Ομάδα Δομικής Βιολογίας και Χημείας υπό την επίβλεψη της Δρ. Ε. Χρυσίνα. Τα αρχικά πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν από την κ. Σοφία Τουλίου στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας στο ίδιο εργαστήριο σε συνεργασία με την Δρ. Χρυσίνα. Η τεχνική που εφαρμόστηκε τότε ήταν η διάχυση ατμών με κρεμάμενη σταγόνα. Κρύσταλλοι της *FoXyn10a* αναπτύχθηκαν σε μία ποικιλία συνθηκών. Αυτή που οδήγησε στο πλέον ικανοποιητικό αποτέλεσμα περιείχε 0.2 M (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca, 0.1 M (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As(O)ONa pH 6.5, 17.5% (w/v) PEG 8000 και 10% γλυκερόλη.

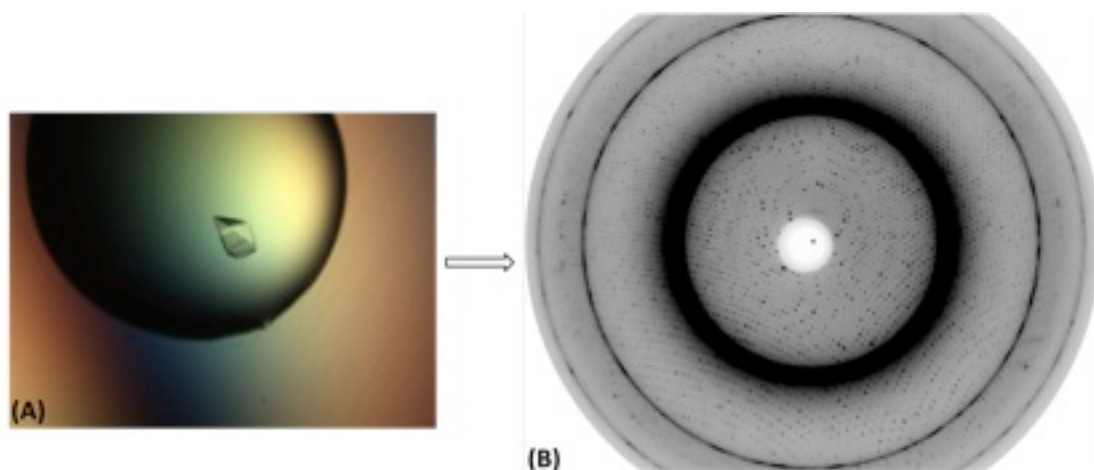
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, εν συνεχεία, διερευνήθηκε μεγάλο πλήθος συνθηκών κρυστάλλωσης με τη βοήθεια ρομπότ κρυστάλλωσης και εμπορικών σκευασμάτων (Oryx-Nano crystallization robot (Douglas Instruments, Ltd). Στην περίπτωση αυτή αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό

διαφορετικών συνθηκών αφού σε κάθε δοκιμή κρυστάλλωσης ελέγχονται 96 διακριτές συνθήκες. (Εικόνα 4.2).



**Εικόνα 4.2** Κρύσταλλοι της *FoXyn10a* που αναπτύχθηκαν στις ακόλουθες συνθήκες του εμπορικού σκευάσματος *JCSG-plus<sup>TM</sup>*: (A) 0.1 M οξικό αμμώνιο, 0.1 M Bis Tris pH 5.5 και 17% (w/v) PEG 10,000 (συνθήκη H6), (B) 0.005 M χλωριούχο κοβάλτιο, 0.005 M χλωριούχο κάδμιο, 0.005 M χλωριούχο μαγνήσιο, 0.005 M χλωριούχο νικέλιο, 0.1 M HEPES pH 7.5, 12% (w/v) PEG 3350 (συνθήκη G5), (C) 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% w/v PEG 8000, 8% (v/v) αιθυλενογλυκόλη (συνθήκη B4), (D) 10% (w/v) PEG 1000, 10% (w/v) PEG 8000 (συνθήκη C12), (E) 0.1 M HEPES pH 7.0, 10% (w/v) PEG 6000 (συνθήκη C4), (F) 0.02 M χλωριούχο μαγνήσιο, 0.1 M HEPES pH 7.5, 22% (w/v) πολυακρυλικό οξύ 5100 (συνθήκη G2).

Η συνθήκη που παρουσίασε τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα δίνοντας ευμεγέθεις κρυστάλλους με ικανοποιητική περίθλαση των ακτίνων-X και που τελικά χρησιμοποιήθηκε για την συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περιείχε 0.1 M οξικό αμμώνιο, 0.1 M Bis Tris pH 5.5 και 17% (w/v) PEG 10,000 (H6, *JCSG-plus<sup>TM</sup>*). Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν με ανάμειξη ίσων όγκων (0.5 μl) πρωτεΐνης 15.5 mg ml<sup>-1</sup> σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM MES-NaOH pH 6.0 και διαλύματος κρυστάλλωσης, και εξισσοροπήθηκαν έναντι 100 μl μητρικού διαλύματος στους 16 °C. Ακολούθησε έκθεση μονοκρυστάλλου της *FoXyn10a* (Εικόνα 4.3) σε συγχροτρονική ακτινοβολία. Ο κρύσταλλος είχε προηγουμένως εμβαπτιστεί σε μητρικό διάλυμα εμπλουτισμένο με 18% (v/v) αιθυλενογλυκόλη, η οποία χρησιμοποιείται συχνά ως κρυοπροστατευτικό. Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης έγινε στους 100K στο σταθμό X13 (λ=0.8123 Å) του EMBL (Αμβούργο, Γερμανία).



**Εικόνα 4.3** (A) Ο κρύσταλλος της *FoXyn10a* που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης και (B) το αντίστοιχο περιθλασίγραμμα.

Συνολικά συλλέχθηκαν 244 περιθλασιγράμματα με εύρος ταλάντωσης  $0.3^\circ$  και χρόνο έκθεσης σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων-X 55 sec. Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τα προγράμματα *MOSFLM* (Leslie 1992) και *SCALA* (Evans 2006). Η ομάδα χώρου συμμετρίας ήταν  $P4_12_12$  με διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας  $a=b=124.22$ ,  $c=284.04$  Å και γωνίες  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  και 5 μόρια ξυλανάσης ανά ασύμμετρη μονάδα. Στον Πίνακα 4.2 συνοψίζονται τα στατιστικά αποτελέσματα που αφορούν στην επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης.

#### 4.4 Προσδιορισμός και βελτιστοποίηση δομής

Η δομή της *FoXyn10a* προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης. Το αρχικό πρωτεϊνικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για εύρεση λύσης κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα *BALBES* (Long, Vagin et al. 2008) με βάση τη δομή της ξυλανάσης από το *Cellulomonas fimi* (*Cf Xyn10A*) με κωδικό PDB 3CUI (Poon to be published). Με βάση το πρόγραμμα *EMBOSS Needle* του EBI (Needleman and Wunsch 1970), η *CfXyn10A* παρουσιάζει 42.3% αμινοξική ταυτότητα και 56% ομολογία με την *FoXyn10a*. Το *BALBES* κατάφερε να εντοπίσει 4 μόρια πρωτεΐνης στην ασύμμετρη μονάδα. Ωστόσο παρατηρήθηκε πρόσθετη

**Πίνακας 4.2** Στατιστικά στοιχεία που αφορούν στη συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έκθεση μονοκρυστάλλου της *FoXyn10a* σε συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων-Χ.

Σταθμός	X13, SRS, EMBL-Hamburg outstation
Μήκος κύματος (Å)	0.8123
Πλήθος περιθλασιγραμμάτων (εύρος ταλάντωσης)	244 (0.3°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2</i>
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=124.2 Å, c=284.0 Å, α=β=γ= 90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	5
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	1016139
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων	173419
Ευκρίνεια (Å)	17.9- 1.9
Πληρότης δεδομένων (εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.3 (99.2)
<sup>1</sup> R <sub>merge</sub> (εξωτερική στοιβάδα)	0.108 (0.343)
< I / σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα )	9.1 (5.0)
Εξωτερική στιβάδα (Å)	2.00-1.90
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα )	5.9 (5.6)
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot )	13.5

<sup>1</sup> Ο συντελεστής R<sub>merge</sub> ορίζεται ως  $\sum_h \sum_i \langle I_h \rangle - I_{h,i} / \sum_h \sum_i I_{h,i}$  όπου  $\langle I_h \rangle$  η μέση ένταση της ανεξάρτητης ανάκλασης h που προκύπτει από τις i-μετρήσεις της λόγω κρυσταλλογραφικής ή/και Friedel συμμετρίας.

ηλεκτρονιακή πυκνότητα η οποία αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη της παρουσίας ενός ακόμα μορίου. Η πρωτεϊνική αλυσίδα του πέμπτου μορίου ιχνηλατήθηκε με τη βοήθεια του *Buccaneer* (Cowtan 2006) και το τελικό μοντέλο προέκυψε μετά από μία σειρά διαδοχικών κύκλων βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα *REFMAC* (Murshudon, Vagin et al. 1997) και το πρόγραμμα μοριακών γραφικών για την ανακατασκευή πρωτεϊνικών μοντέλων *COOT* (Cowtan 2006).

Καθώς το μοντέλο βελτιωνόταν, οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  και  $F_o - F_c$  καθιστούσαν εμφανή την παρουσία πρόσθετης

συνεχούς ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο αμινοτελικό άκρο του ενζύμου, γεγονός που καταδείκνυε την παρουσία επιπλέον αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλληλουχία που είχε προκύψει από τη βάση δεδομένων του Broad Institute. Συνολικά προστέθηκαν 47 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της κρυσταλλικής δομής. Τα 21 εξ αυτών προέκυψαν από επιπλέον βάσεις του γονιδιώματος του *F. oxysporum* (Broad Institute) που δεν είχαν συμπεριληφθεί στο γονίδιο foxg\_17421.2 (αμινοξέα 27-47). Τα υπόλοιπα 26 (αμινοξέα 1-27), δεδομένου ότι δεν ήταν γνωστές οι αντίστοιχες βάσεις του γονιδιώματος, ταυτοποιήθηκαν με βάση τόσο την ηλεκτρονιακή πυκνότητα (χάρτες  $2F_o-F_c$  και  $F_o-F_c$ ) όσο και την πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας ομόλογων ξυλανασών που ανέδειξε τα συντηρημένα αμινοξέα στη συγκεκριμένη περιοχή (Εικόνα 4.5A). Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται η πρωτοταγής δομή της FoXyn10a όπως είχε αρχικά αποδοθεί με βάση το γονίδιο foxg\_17421.2 και όπως τελικά προέκυψε από τη μετάφραση των επιπλέον διαθέσιμων βάσεων από το γονιδίωμα του *F. oxysporum* και από την κρυσταλλική δομή. Η αναντιστοιχία ανάμεσα στην πειραματικά προσδιορισμένη αλληλουχία και την προβλεπόμενη από τη βάση δεδομένων του Broad Institute οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η περιοχή αυτή του γονιδιώματος δεν έχει αλληλουχηθεί σε όλο της το εύρος. Το γεγονός αυτό εξηγεί και την θεωρητικά προβλεπόμενη απουσία σηματοδοτικού πεπτιδίου έκκρισης που δεν είναι δυνατή στην περίπτωση της ξυλανάσης που είναι εξωκυτταρικό ένζυμο καθώς και τη μεγάλη απόκλιση ανάμεσα στο θεωρητικά προβλεπόμενο και πειραματικά προσδιορισμένο MB του ενζύμου.

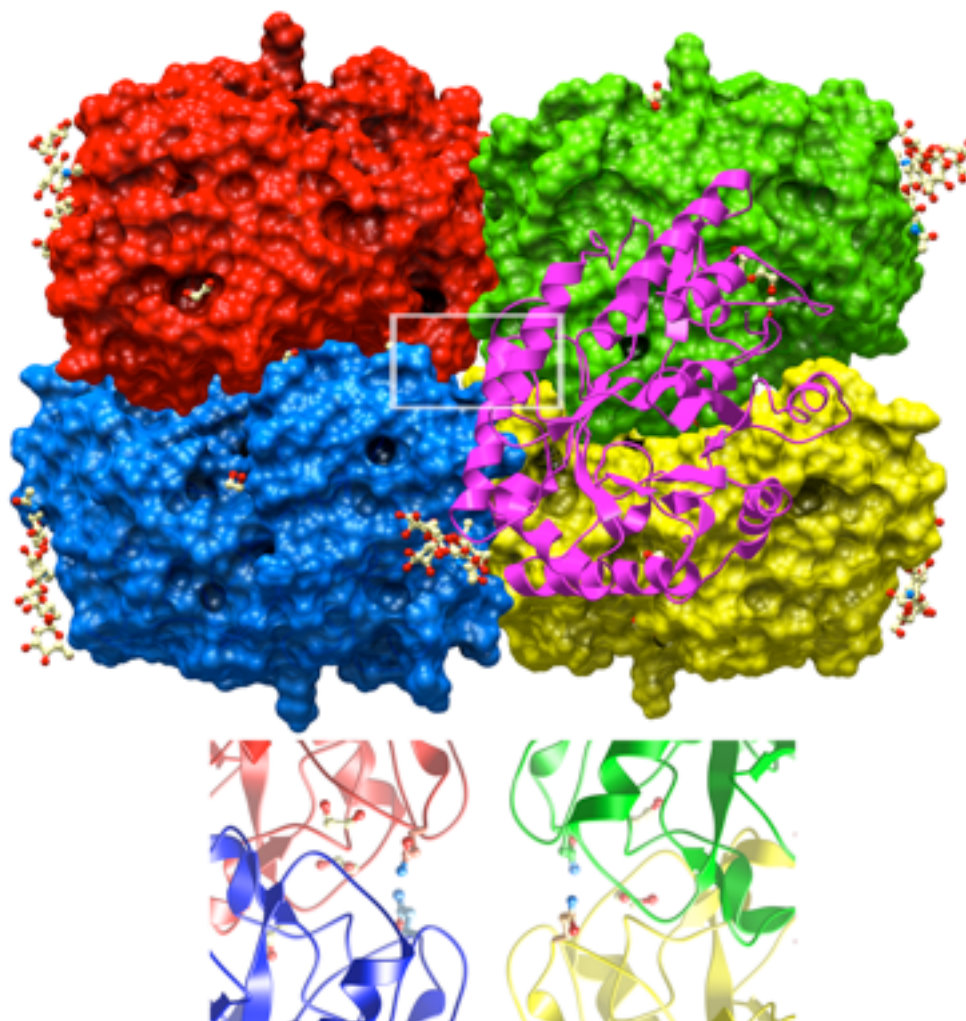
**Πίνακας 4.3** Η αμινοξική αλληλουχία της FoXyn10a όπως περιγράφεται από τη βάση δεδομένων του Broad Institute και όπως τελικά διαμορφώθηκε μετά από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής (UniProt accession number: B3A0S5). Αναδεικνύονται τα επιπλέον αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου που προστέθηκαν κατά τον προσδιορισμό της δομής.

Αλληλουχία με βάση το γονίδιο Foxg_17421.2 της βάσης δεδομένων του Broad Institute	MKWEAIQPNRGQFNWGPADQHAAAATSRGYELRCHTLVWHSQLPSPWV ANGNWNNTLQAVMRDHINAVMGRYRGKCTHWDVVNEALNEDGTYR DSVFLRVIGEAYIPIAFRMAAADPTTKLYYNDYNLEYGNAKTEGAKRI ARLVKSYGLRIDGIGLQAHMTSESTPTQNTPTPSRAKLASVLQGLADLGV DVAYTELDIRMNTPATQQKLQTNADAYARIVGSCMDVKRCVGITVWGI SDKYSWVPGTFPGEQSALLWNDNFQKKPSYTSTLNTINRR
Αλληλουχία κρυσταλλικής δομής (UniProt accession number: B3A0S5)	AASGLEAAMKAAGKQYFGTALTVRNDQGEIDIINNKNKNEIGSITPEN MKWEAIQPNRGQFNWGPADQHAAAATSRGYELRCHTLVWHSQLPSPWV ANGNWNNTLQAVMRDHINAVMGRYRGKCTHWDVVNEALNEDGTYR DSVFLRVIGEAYIPIAFRMAAADPTTKLYYNDYNLEYGNAKTEGAKRI ARLVKSYGLRIDGIGLQAHMTSESTPTQNTPTPSRAKLASVLQGLADLGV DVAYTELDIRMNTPATQQKLQTNADAYARIVGSCMDVKRCVGITVWGI SDKYSWVPGTFPGEQSALLWNDNFQKKPSYTSTLNTINRR

Επιπλέον πυκνότητα παρατηρήθηκε πλησίον της πλευρικής αλυσίδας της Asn101 σε όλα τα μονομερή. Η αλληλουχία Asn101-Gln102-Thr103 αποτελεί μοτίβο N-γλυκοζυλίωσης. Συνολικά 15 σάκχαρα (N-ακετυλγλουκοζαμίνη: NAG, α-D-μαννόζη: MAN και β-D-μαννόζη: BMA) ενσωματώθηκαν στο μοντέλο με βάση το τυπικό μοτίβο N-γλυκοζυλίωσης (Deshpande, Wilkins et al. 2008) (Εικόνα 4.5B). Τα μόρια νερού προστέθηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο του COOT (Emsley, Lohkamp et al. 2010) και εφόσον δημιουργούσαν δεσμούς υδρογόνου με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα ή άλλα μόρια διαλύτη. Πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα παρατηρήθηκε επίσης για 26 μόρια αιθυλενογλυκόλης που επίσης ενσωματώθηκαν στο μοντέλο. Το τελικό μοντέλο που αφορά στη δομή της FoXyn10a βελτιστοποιήθηκε σε ένα τελικό δείκτη αξιοπιστίας  $R$  ίσο με 0.213 και  $R_{\text{free}}$  ίσο με 0.242 και αποτελείται από 5 μονομερή εκ των οποίων τα A και D φέρουν 327 και τα B, C και E 326 αμινοξέα (Εικόνα 4.4). Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζεται η σταδιακή μείωση των δεικτών αξιοπιστίας  $R$  και  $R_{\text{free}}$  στα διάφορα στάδια κατασκευής του μοντέλου ενώ ο Πίνακας 4.5 περιέχει τα στατιστικά αποτελέσματα από το τελικό στάδιο βελτιστοποίησης της δομής της FoXyn10a. Το διάγραμμα Ramachandran έδειξε ότι το 98.4% των αμινοξέων ήταν σε ευνοϊκές περιοχές ενώ όλα τα αμινοξέα είναι σε επιτρεπόμενες περιοχές.

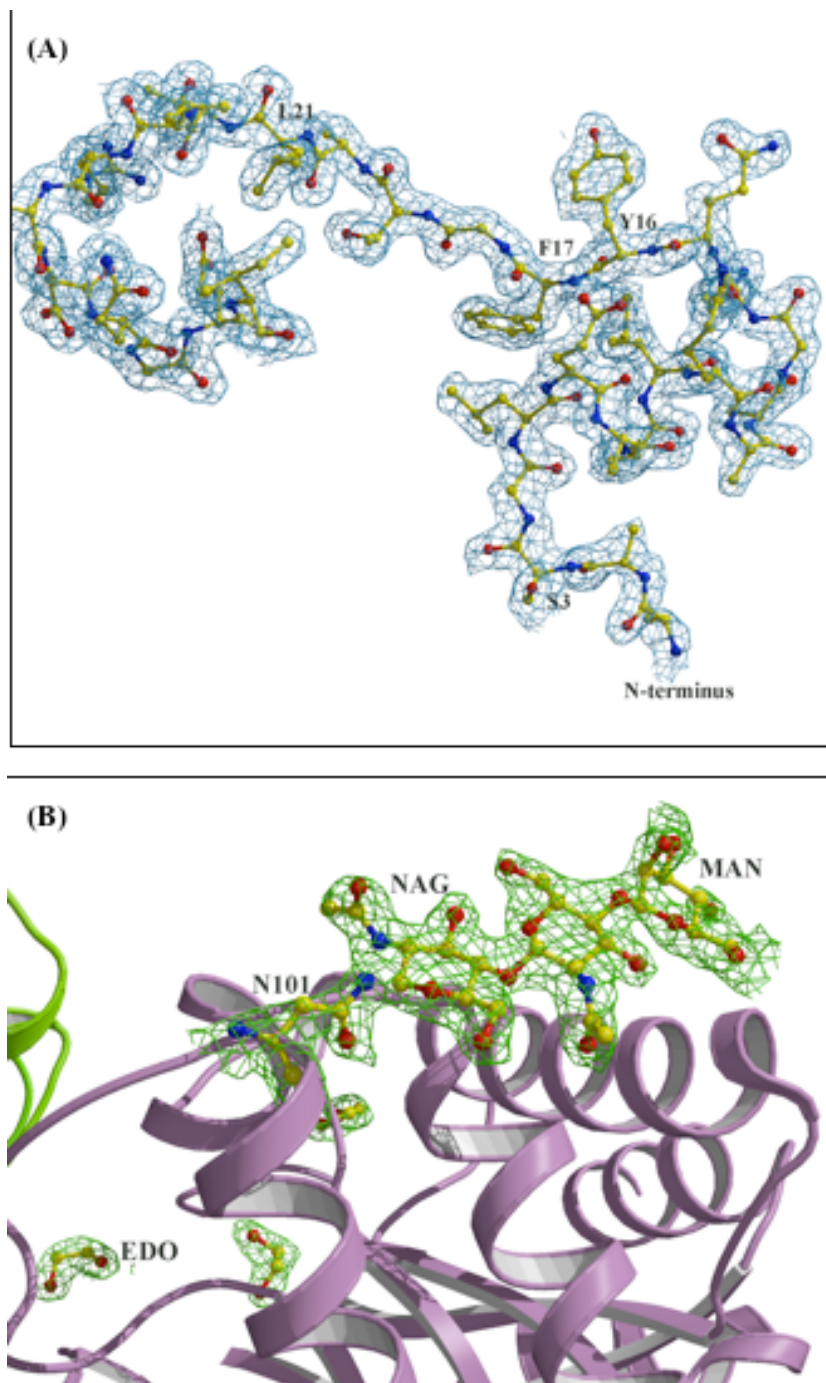
**Πίνακας 4.4** Η μείωση της τιμής των δεικτών αξιοπιστίας  $R$  και  $R_{\text{free}}$  κατά την κατασκευή του μοντέλου που αφορά τη δομή της FoXyn10a

Στάδιο κατασκευής του μοντέλου	Τιμή $R$	Τιμή $R_{\text{free}}$
Τοποθέτηση 4 μονομερών στην ασύμμετρη μονάδα από το <i>BALBES</i>	0.479	0.512
Τοποθέτηση 5 <sup>ου</sup> μονομερούς από το <i>Buccaneer</i>	0.373	0.405
Προσθήκη μορίων νερού και 235 αμινοτελικών αμινοξέων στα 5 μονομερή	0.287	0.317
Προσθήκη σακχάρων στην Asn101 των 5 μονομερών	0.237	0.2643
Τελικό μοντέλο	0.213	0.242



**Εικόνα 4.4** Σχηματική απεικόνιση της στερεοδιάταξης των 5 μορίων *FoXyn10a* στην ασύμμετρη μονάδα. Παρουσιάζεται η επιφάνεια των μονομερών A (κόκκινο), B (πράσινο), C (κίτρινο) και D (μπλε) ενώ το E εμφανίζεται σε σχηματική αναπαράσταση δευτεροταγούς δομής (φούζια). Ένθετο: το «σημείο συνάντησης» των υπομονάδων A, B, C και D όπου αναδεικνύεται η θέση της Asn25 και των γειτονικών μορίων EDO. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *MolSoft* (Raush, Totrov et al. 2009).





**Εικόνα 4.5** Σχηματική παρουσίαση του  $2Fo-Fc$  χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε ισοϋψείς του  $1\sigma$  πάνω από το μέσο όρο. Στο (A) απεικονίζονται τα 30 πρώτα αμινοξέα που προστέθηκαν στο αμινοτελικό άκρο του μοντέλου κατά την επίλυση της δομής και στο (B) η γλυκοζυλιωμένη Asn101 του μονομερούς A. Στο (B) παρουσιάζονται επίσης τα μόρια αιθυλενογλυκόλης (EDO) που βρίσκονται στη διεπιφάνεια των μορίων A (μωβ) και D (πράσινο).

**Πίνακας 4.5** Στατιστικά βελτιστοποίησης και ποιότητα μοντέλου

Εύρος ευκρίνειας (Å)	17.91-1.94
Αριθμός περιθλάσεων	154871
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	12700
Αριθμός μορίων ύδατος	1901
Αριθμός μορίων αιθυλενογλυκόλης	26 (7-chain A, 7-chain B, 6-chain C, 3-chain D, 3-chain E)
Αριθμός σακχάρων	(2NAG, 1BMA)
Αλυσίδα A	(2NAG, 1BMA, 2MAN)
Αλυσίδα B	(2NAG, 1BMA)
Αλυσίδα C	(2NAG, 1BMA, 1MAN)
Αλυσίδα D	(2NAG, 1BMA, 1MAN)
Αλυσίδα E	(2NAG, 1BMA, 1MAN)
<sup>1</sup> R <sub>free</sub> (εξωτερική στιβάδα)	0.242 (0.316)
<sup>1</sup> R (εξωτερική στιβάδα)	0.213 (0.36)
Μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.008
Μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.069
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας (Å <sup>2</sup> )	
Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα	14.6
Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca, C, N, O):	14.2
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	15
Μέση τιμή παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	
Μόρια ύδατος	25.5
Μόρια αιθυλενογλυκόλης	29.1
Σάκχαρα – Αλυσίδα A	NAG508(30.7), NAG509(34.4), BMA600

	(38.6)	
Σάκχαρα – Αλυσίδα B	NAG508(19.8), BMA600(33.4), MAN602(40.6)	NAG509(23.5), MAN601(42.1),
Σάκχαρα – Αλυσίδα C	NAG508(23), NAG509(24.7), BMA600(26.7)	
Σάκχαρα – Αλυσίδα D	NAG508(23.8), BMA600(31), MAN601(41.7)	NAG509(26.7),
Σάκχαρα – Αλυσίδα E	NAG508(19), BMA600(35.2), MAN601(44.5)	NAG509(25.2),

<sup>1</sup> Ο παράγοντας  $R$  ορίζεται ως  $R = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το πλάτος του πειραματικού και του υπολογιζόμενου με βάση το μοντέλο δομικού παράγοντα, αντίστοιχα.

#### 4.5 Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας με βάση τη δομή

Με τη βοήθεια του εργαλείου *BLAST* (Altschul, Madden et al. 1997) και την αλληλουχία της *FoXyn10a* όπως προέκυψε από την κρυσταλλική δομή εντοπίστηκε ένας μεγάλος αριθμός υποθετικών και χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια GH10. Η πλησιέστερη από άποψη αλληλουχίας πρωτεΐνη είναι μία υποθετική ξυλανάση που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Gibberella zeae* (ανάμορφο του *Fusarium graminearum*) (NCBI reference sequence: XP\_386621.1) με 87% ταυτότητα για 98% κάλυψη αμινοξικής αλληλουχίας, ενώ η πλησιέστερη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη είναι μία ενδο-β-1,4-ξυλανάση (*XynII*, NCBI reference sequence: BAE71410.1) από τον *Aureobasidium pullulans* με 62% ταυτότητα (επίσης για 98% κάλυψη αμινοξικής αλληλουχίας). Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας της *FoXyn10a* με τις 10 πλησιέστερες από άποψη ομολογίας χαρακτηρισμένες ξυλανάσες. Μεταξύ των ομόλογων ξυλανασών που προσδιορίστηκαν με το εργαλείο *BLAST* η πλησιέστερη στην *FoXyn10a* 45% ταυτότητα της οποίας η δομή είναι γνωστή είναι ένα χμαιοτικό ένζυμο σχεδιασμένο με βάση τις ξυλανάσες *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 *Fxyn* και *CfXyn10a* (FC-14-15, κωδικός PDB code 1V6Y) (Kaneko, Ichinose et al. 2004). Η αμέσως επόμενη είναι η *CfXyn10a* (κωδικός PDB 3CUI) που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοντέλου επίλυσης της δομής της *FoXyn10a*. Σύγκριση των αλληλουχιών που στοιχίστηκαν έδειξε ότι η αμινοξική ακολουθία της *FoXyn10a* έφερε 6 πρόσθετα

αμινοξέα (219-225) η παρουσία των οποίων παρατηρείται μόνο σε μία χαρακτηρισμένη ενδο-β-1,4-ξυλανάση, την XynII από τον *A. pullulans* (Tanaka, Muguruma et al. 2006).

FoXyn10a

α0 10 20 30 40

β1

FoXyn10a  
 ApXynII  
 XYN10G5  
 PEXYND  
 PoxYNA  
 TaXylA  
 SmXYNAM6  
 FC-14-15  
 CEXYN10A  
 XynAS9

FoXyn10a

α2a 50 60 70 80 90 100 110

α2b

β3

α3a

α3b

FoXyn10a  
 ApXynII  
 XYN10G5  
 PEXYND  
 PoxYNA  
 TaXylA  
 SmXYNAM6  
 FC-14-15  
 CEXYN10A  
 XynAS9

FoXyn10a

β4 120 130 140 150 160 170 180

α4a

α4b

β5

FoXyn10a  
 ApXynII  
 XYN10G5  
 PEXYND  
 PoxYNA  
 TaXylA  
 SmXYNAM6  
 FC-14-15  
 CEXYN10A  
 XynAS9

FoXyn10a

α5 190 200 210 220 230 240 250

β6a

β6b

α6

β7

FoXyn10a  
 ApXynII  
 XYN10G5  
 PEXYND  
 PoxYNA  
 TaXylA  
 SmXYNAM6  
 FC-14-15  
 CEXYN10A  
 XynAS9

FoXyn10a

α7 260 270 280 290 300 310 320

β8

η1

α8

FoXyn10a  
 ApXynII  
 XYN10G5  
 PEXYND  
 PoxYNA  
 TaXylA  
 SmXYNAM6  
 FC-14-15  
 CEXYN10A  
 XynAS9

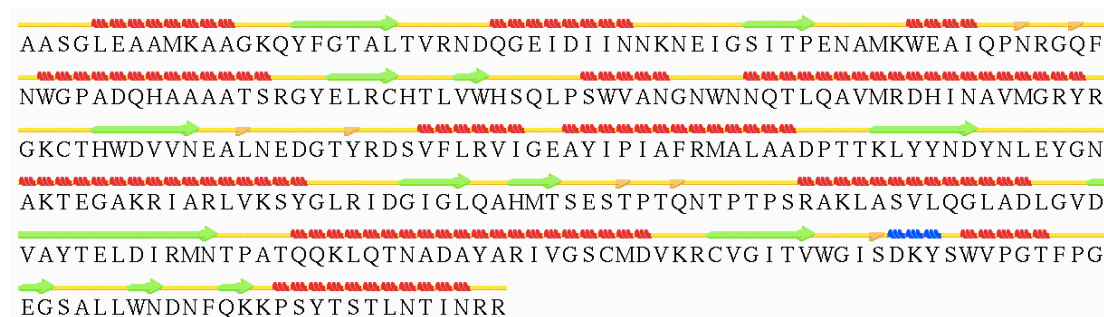
FoXyn10a

NTIN..RR.....  
 ApXynII KTIQSFRRS.....  
 XYN10G5 DAWG.GSATGSATST  
 PEXYND AGLQSGSGSSSSSTSS  
 PoxYNA IGFGN.....  
 TaXylA EALGGDSSG.GGGPGE  
 SmXYNAM6 TAFIDAAAGDPGGPGE  
 FC-14-15 EAFGSRSHHHHHH..  
 CEXYN10A EAFGAS.....  
 XynAS9 AALNGGSPAPG....

**Σχήμα 4.1** Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχίας της *FoXyn10a* με τις 10 πλησιέστερες από άποψη ομολογίας χαρακτηρισμένες ξυλανάσες: *ApXynII*, XYN10G5 (*Phialophora* sp. CGMCC3328 GenBank accession number ADZ99358.1), *PfXYND* (*Penicillium funiculosum* GenBank accession number CAG25554.1), *PcXYNA* (*Phanerochaete chrysosporium* GenBank accession number: AAG44992.1), *TaXylA* (*Thermobifida alba* GenBank accession number: CAB02654.1), *SmXYNAM6* (*Streptomyces megasporus* GenBank accession number: ADE37527.1), FC-14-15, *CfXYN10a* και *XynAS9* (*Streptomyces* sp. S9, GenBank accession number: ABX71815.1). Τα αμινοξέα που είναι ίδια σε όλες τις ξυλανάσες εμφανίζονται λευκά σε κόκκινο πλαίσιο ενώ αυτά που παρουσιάζουν ομοιότητα είναι κόκκινα σε λευκό πλαίσιο. Οι α- και  $\beta_{10}$ -έλικες, τα β-πτυχωτά φύλλα και οι β-στροφές συμβολίζονται ως α, η, β και TT αντίστοιχα.

#### 4.6 Ανάλυση της τριδιάστατης δομής της *FoXyn10a*

Όπως όλες οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10 (Lo Leggio, Kalogiannis et al. 1999), η *FoXyn10a* υιοθετεί τη διαμόρφωση  $(\beta/\alpha)_8$  barrel (TIM barrel) (Εικόνα 4.4). Η δευτεροταγής της δομή, όπως προσδιορίστηκε από το πρόγραμμα *STRIDE* (Frishman and Argos 1995), περιλαμβάνει 13 α-έλικες, 13 β-πτυχωτά φύλλα και μία  $\beta_{10}$ -έλικα (αμινοξέα 289-291) (Σχήμα 4.2). Το χαρακτηριστικό σχήμα σκεύους που παρατηρείται σε όλα τα μέλη της οικογένειας GH10 εμφανίζεται και στην περίπτωση της *FoXyn10a*. Η ελλειπτική διατομή στην άνω επιφάνεια του σκεύους έχει διαστάσεις  $\sim 40 \text{ \AA}$  και  $\sim 55 \text{ \AA}$  για το μικρότερο και το μεγαλύτερο ημιάξονα, αντίστοιχα, ενώ στο κάτω άκρο του δοχείου η διατομή είναι περισσότερο κυκλική με διάμετρο  $\sim 35 \text{ \AA}$ . Η τριτοταγής δομή της *FoXyn10a* σταθεροποιείται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων Cys81-Cys123 και Cys273-Cys279.



**Σχήμα 4.2** Η δευτεροταγής δομή του μονομερούς A της δομής της *FoXyn10a* όπως προσδιορίστηκε από το πρόγραμμα *STRIDE*. Με κόκκινο εμφανίζονται οι α-έλικες, με πράσινο τα β-πτυχωτά φύλλα, με μπλε οι  $\beta_{10}$ -έλικες, με κίτρινο οι βρόχοι και οι στροφές.

Η διάταξη των 5 μονομερών της *FoXyn10a* στην ασύμμετρη μονάδα είναι συμπαγής και διατηρείται μέσω ενός μεγάλου αριθμού αλληλεπιδράσεων κυρίως μεταξύ των μονομερών A, B, C και D (μείωση της προσβάσιμης επιφάνειας κατά 15%) και σε μικρότερο βαθμό του E που είναι περισσότερο εκτεθειμένο στο διαλύτη (μείωση της προσβάσιμης επιφάνειας κατά 7%) (Πίνακες 4.6 και 4.7). Τα μόρια A-D και C-B σχετίζονται μέσω περιστροφής 180° γύρω από τον άξονα z (Εικόνα 4.4). Η υπέρθεση των αλυσίδων B, C, D και E στο A έδειξε ότι τα πέντε μόρια *FoXyn10a* στην ασύμμετρη μονάδα είναι πανομοιότυπα με μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d. για τα άτομα Ca) ~0.13 Å για τα B, C και D και ~0.25 Å για το E λόγω κάποιων εύκαμπτων βρόχων (loop regions).

Λόγω της ομοιότητας των A, B, C και D σχολιάζονται μόνο οι διαφορές που προέκυψαν από τη σύγκριση των μονομερών A και E. Η υπέρθεση του E στο A ανέδειξε μία σειρά διαδοχικών μεταβολών που περιλάμβανε τα κατάλοιπα Lys49, Gln89 και Glu51 του A προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με τα Gly296 και Thr297 του D. Πιο συγκεκριμένα, η διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας της Lys49 (A) μεταβλήθηκε σημαντικά (περιστροφή των διεδρων γωνιών ( $\chi_1$ ,  $\chi_2$ ,  $\chi_4$ ) κατά (~140 °, ~29 °, ~17 °), αντίστοιχα) προκειμένου να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου O της Gly296(D) και OD1 της Asn46(A). Η νέα θέση της Lys49 (A) προκάλεσε επιπλέον μεταβολές στη Gln89 (A) με μετατόπιση όλων των ατόμων της κατά ~1.2 Å προκειμένου να αποφευχθεί η στερεοχημική παρεμπόδιση με το άτομο NE1 της Gln89 (A). Στη νέα θέση της Gln89 (A) το άτομο OE1 (A) ήταν πολύ κοντά στο OE1 του Glu51 (A) με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της πλευρικής του αλυσίδας (περιστροφή των διεδρων γωνιών ( $\chi_1$ ,  $\chi_2$ ,  $\chi_3$ ) κατά (~100 °, ~120 °, ~150 °), αντίστοιχα), και το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με την Pro55 O (A) μέσω του μορίου ύδατος Wat90. Στον κενό χώρο που προέκυψε από τη μετατόπιση του OE1 του Glu51 (A) εντοπίζεται ένα μόριο ύδατος (Wat418 O) μέσω του οποίου σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου τα κατάλοιπα Gln89 OE1 (A) και Thr297 O (D). Προκειμένου να επιτευχθεί η συμπαγής διάταξη των επιμέρους μονάδων του τετραμερούς, τα άτομα Ca των καταλοίπων Ala52 and Pro299 μετατοπίστηκαν κατά ~0.6 Å και ~0.8 Å, αντίστοιχα, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά μόρια μέσω των μορίων αιθυλενογλυκόλης. Στην περίπτωση του μονομερούς E, η πλευρική αλυσίδα της Gln89 στρέφεται προς το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και η

διαμόρφωσή της σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με τα γειτονικά κατάλοιπα Lys49 (E), Glu51 (E).

Γενικά, η τοποθέτηση των μορίων *FoXyn10a* κατά το σχηματισμό του τετραμερούς στηρίζεται στη δημιουργία άμεσων δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πολικών καταλοίπων των μορίων αλλά και μέσω μορίων ύδατος και αιθυλενογλυκόλης (Πίνακες 4.6 και 4.7). Για παράδειγμα, αμινοξέα όπως η Pro215 (D) μετατοπίστηκε κατά  $\sim 0.8 \text{ \AA}$  κατά την αλληλεπίδρασή της τόσο με ένα μόριο αιθυλενογλυκόλης όσο και με αμινοξέα του γειτονικού μονομερούς προκαλώντας περαιτέρω μεταβολές στα αμινοξέα Asn56 (A) και Gln59 (A). Μικρές αλλαγές παρατηρήθηκαν επίσης σε όλα τα άτομα της Asn25 (μετατόπιση κατά  $\sim 0.5 \text{ \AA}$ ) η οποία εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις λόγω στερεοδιάταξης μεταξύ των 4 μονάδων του τετραμερούς σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου μέσω του ατόμου ND2 με το άτομο OD2 του Asp309 του συγγενούς μονομερούς (A-D και B-C). Η θέση της Asn25 στο “σημείο συνάντησης” των τεσσάρων μονομερών αναδεικνύεται στο ένθετο της Εικόνας 4.4.

Άλλες αλλαγές -λιγότερο ωστόσο σημαντικές- που καταγράφηκαν από τη σύγκριση των πέντε μονομερών περιλαμβάνουν το βρόχο μεταξύ της έλικας  $\alpha 1$  και του φύλλου  $\beta 2$  (αμινοξέα 33 με 37). Ο βρόχος αυτός μετατοπίστηκε ελαφρά ( $\sim 0.4 \text{ \AA}$ ) υπό την επίδραση των αλληλεπιδράσεων λόγω στερεοδιάταξης με τα αντίστοιχα αμινοξέα του μονομερούς B. Η πλευρική αλυσίδα της Asn37 (A) άλλαξε διαμόρφωση (οι διεδρες γωνίες  $\chi_1$  και  $\chi_2$  περιστράφηκαν κατά  $100^\circ$  και  $90^\circ$ , αντίστοιχα) προκειμένου να σχηματίσει πολικές van der Waals αλληλεπιδράσεις με το αντίστοιχο κατάλοιπο του μονομερούς B μέσω μορίων ύδατος. Η ίδια αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε στην Asn37 (C) που σχηματίζει άμεσους δεσμούς υδρογόνου με την Asn37 (D). Επιπλέον μεταβολές καταγράφηκαν στα κατάλοιπα Arg191 (A) (μικρή περιστροφή της διεδρης γωνίας  $\chi_3$  κατά  $\sim 12^\circ$ ) και Leu237 (A) (περιστροφή της διεδρης γωνίας  $\chi_1$  κατά  $\sim 22^\circ$ ) ως αποτέλεσμα της στερεοχημικής παρεμπόδισης κατά τη στοιβάξη των μορίων A και C.

Συνοψίζοντας, οι πιο αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις μεταξύ των μονομερών A και E εντοπίζονται κυρίως στα αμινοξέα που σχηματίζουν τους βρόχους μεταξύ των στοιχείων δευτεροταγούς δομής  $\beta 2$  και  $\alpha 2a$  καθώς και  $\beta 3$  και  $\alpha 3a$ . Οι βρόχοι



αυτοί βρίσκονται στην είσοδο του ενεργού κέντρου του ενζύμου και εμπλέκονται στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών A, B, C και D.

**Πίνακας 4.6 Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των καταλοίπων των 5 μονομερών της *FoXyn10a*.**

Αμινοξύ αναφοράς	Άτομο	Αμινοξύ Στόχος	Άτομο	Απόσταση (Å)
Asn25 (A)	ND2	Asp309 (D)	OD2	3.1
Asn56 (A)	ND2	Pro215 (D)	O	2.8
Lys290 (A)	NZ	Lys290 (D)	NZ	3.0
Gly296 (A)	O	Lys49 (D)	NZ	2.8
Asp309 (A)	OD2	Asn25 (D)	ND2	3.3
Phe311 (A)	O	Asp31 (B)	OD2	2.9
Asn25 (B)	ND2	Asp309 (C)	OD2	3.3
Asn56 (B)	ND2	Pro215 (C)	O	2.8
Pro215 (B)	O	Asn56 (C)	OD1	3.0
Gln257 (B)	OE1	Tyr174 (E)	OH	3.3
Gln257 (B)	OE1	Arg140 (E)	NH1	2.9
Gly296 (B)	O	Asn46 (C)	ND2	3.3
Gly296 (B)	O	Lys49 (C)	NZ	2.9
Phe311 (B)	O	Asp21 (A)	OD2	2.9
Asp66 (C)	OD2	Ser92 (E)	OG	2.6
Gly296 (C)	O	Lys49 (B)	NZ	2.9
Phe311 (C)	O	Asp31 (D)	OD2	2.9
Asn56 (D)	ND2	Pro215 (A)	O	2.9
Gly296 (D)	O	Lys49 (A)	NZ	2.9
Phe311 (D)	O	Asp31 (C)	OD2	2.9

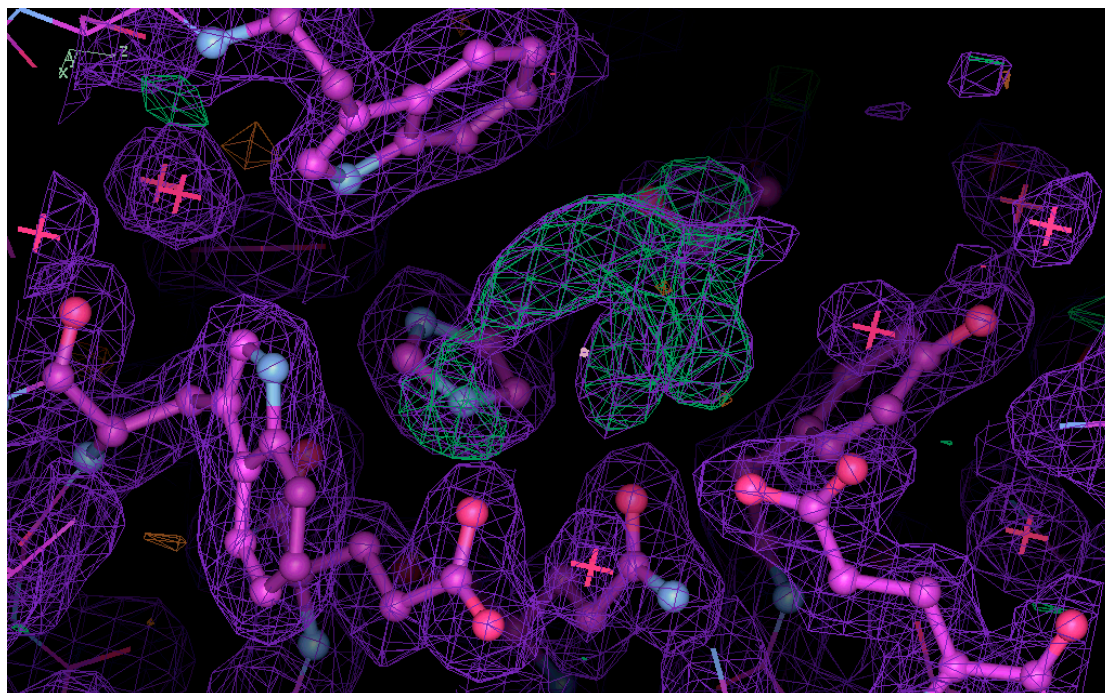
**Πίνακας 4.7** Κατάλογος των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των 5 μονομερών της *FoXyn10a* μέσω μορίων αιθυλενογλυκόλης και ύδατος

Μόριο-αναφοράς → H <sub>2</sub> O → EDO → Μόριο-στόχος						
→ EDO → H <sub>2</sub> O → Μόριο-στόχος						
Asn61 ND2 (A)	→	Wat133 O	→	EDO408 O2 (D)	→	Glu301 OE2 (D)
Glu301 OE2 (A)	→	EDO400 O1 (A)	→	Wat98 O	→	Asn61 ND2 (D)
Ser303 N (C)	→	EDO406 O2 (C)				
		EDO406 O1 (C)	→	Wat169 O	→	Asp25N (B)
Pro299 N (C)	→	EDO400 O1 (C)				
		EDO400 O2 (C)	→	Wat262 O	→	Asn61 ND2 (B)
Ser303 N (A)	→	EDO413 O2 (A)				
		EDO413 O1 (A)	→	Wat67 O	→	Asn25 N (D)
Asn101 N (E)	→	EDO407 O2 (E)				
		EDO407 O1 (E)	→	Wat1176 O	→	Asn322 ND2 (D)
Thr252 OG1 (A)	→	EDO409 O1 (A)				
		EDO409 O2 (A)	→	Wat1323 O	→	Val23 O (D), Glu67 OE1 (D)

#### 4.6 Ενεργό κέντρο

Το ενεργό κέντρο της *FoXyn10a* παρουσιάζει την κλασική διαμόρφωση των GH10 ξυλανάσων αποτελούμενο από δύο καταλυτικά γλουταμικά αμινοξέα, Glu131 (στο βρόχο β4-α4a) και Glu245 (στο φύλλο β7) τα οποία προσανατολίζονται προς το εσωτερικό του καναλιού και παίζουν το ρόλο του νουκλεόφιλου και του καταλύτη οξέος-βάσης, αντίστοιχα (Εικόνα 4.7) (Lo Leggio, Kalogiannis et al. 1999). Σε συμφωνία με άλλες δομές ομολόγων ξυλανάσων, οι Ca και τα καρβοξυλικά άτομα άνθρακα (Cδ) των δύο καταλυτικών γλουταμικών απέχουν 12.6 Å και 6.8 Å, αντίστοιχα. Τα καρβοξυλικά οξυγόνα OE1 και OE2 του Glu245 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα NE2 της His208 και ND2 της Asn172. Με βάση προηγούμενη μελέτη της ξυλανάσης Xyl10A του *Streptomyces lividans* (Roberge, Shareck et al. 1997), η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των δύο αμινοξέων συμβάλλει στη διατήρηση της κατάστασης ιονισμού του γλουταμικού οξέος.

Το καταλυτικό κέντρο οριοθετείται από μία ομάδα συντηρημένων αρωματικών αμινοξέων μεταξύ των οποίων τα Trp86, Trp285 και Trp293. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  και  $F_o-F_c$  ανέδειξαν την παρουσία πρόσθετης πυκνότητας (Εικόνα 4.6) σε όλα τα μονομερή εκτός από το E όπου η παρατηρούμενη πυκνότητα ήταν πολύ μικρή. Η πυκνότητα αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία ενός προσδέτη. Η ταυτοποίηση του άγνωστου αυτού όμως προσδέτη παρά την εκτεταμένη σάρωση των συστατικών των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό και την κρυστάλλωση της FoXyn10a δεν κατέστη δυνατή. Η ένωση αυτή φαίνεται να συμβάλλει μαζί με τις αλληλεπιδράσεις λόγω στερεοδιάταξης στις προαναφερθείσες δομικές τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν το κατάλοιπο Gln89. Η παρουσία, τέλος, 2 μορίων αιθυλενογλυκόλης στο ίδιο κέντρο των A, B, C και D (EDO 401 και 402), αποτελεί ένδειξη πιθανών θέσεων πρόσδεσης του υποστρώματος όπως είχε προταθεί και σε παλαιότερη μελέτη στην οποία μόρια γλυκερόλης ήταν προσδεμένα κοντά στο ενεργό κέντρο της ξυλανάσης από το *Penicillium simplicissimum* (Schmidt, Schlacher et al. 1998).



**Εικόνα 4.6** Σχηματική παρουσίαση των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  και  $F_o-F_c$  σε ισοϋψείς του 1σ και 3σ πάνω από το μέσο όρο, αντίστοιχα. Απεικονίζεται η πρόσθετη πυκνότητα που εντοπίστηκε στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου χωρίς ωστόσο να καταστεί δυνατή η ταυτοποίησή της.

#### 4.7 Σύγκριση της τριδιάστατης δομής της *FoXyn10a* με δομές δομικά ομόλογων ξυλανασών

Η συνολική αναδίπλωση της *FoXyn10a* είναι πανομοιότυπη με αυτή όλων των μελών της οικογένειας GH10. Οι λίγες διαφορές που παρατηρούνται εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές βρόχων ενώ μικρές αποκλίσεις σε τμήματα δευτεροταγούς δομής δεν επηρεάζουν τη συνολική διαμόρφωση.

Πιο συγκεκριμένα, η δομή της *FoXyn10a* συγκρίθηκε με τις ξυλανάσες FC-14-15 (κωδικός PDB 1V6Y) και *CfXyn10a* (κωδικός PDB 3CUI) μέσω υπέρθεσης των τμημάτων δευτεροταγούς δομής. Οι δύο αυτές ξυλανάσες επιλέχθηκαν γιατί η FC-14-15 είναι το πλησιέστερο από άποψη ομολογίας ένζυμο με γνωστή δομή ενώ η *CfXyn10a* χρησιμοποιήθηκε από το *BALBES* για την κατασκευή του μοντέλου αναζήτησης κατά τον προσδιορισμό της δομής με μοριακή αντικατάσταση.

Η υπέρθεση των FC-14-15 και *FoXyn10a*, μη συμπεριλαμβανομένων των εύκαμπτων περιοχών, έδειξε ότι η μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d) επί όλων των ατόμων Ca ήταν 1.8 Å. Η σύγκριση των δύο δομών ανέδειξε διαφορές κυρίως στην περιφέρεια των δύο μορίων. Πιο συγκεκριμένα, ο βρόχος που αποτελείται από τα αμινοξέα 134 με 138 είναι μετατοπισμένος κατά ~2.5 Å στην περίπτωση της FC-14-15 λόγω της παρουσίας δύο επιπλέον αμινοξέων (Σχήμα 4.1). Σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται επίσης στην έλικα α5 (αμινοξέα 181-196) και το γειτονικό της βρόχο (μετατοπίσεις στα άτομα της κύριας αλυσίδας που κυμαίνονται από 1.5 έως 7 Å). Η νέα αυτή διαμόρφωση ενδεχομένως σταθεροποιείται από την παρουσία ενός μορίου BMA λόγω γλυκοζυλίωσης της Asn101, το οποίο όμως τελικά δε συμπεριελήφθηκε στην τελική δομή λόγω ανεπαρκούς ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Τα αμινοξέα 22 με 39 σχηματίζουν μία α-έλικα και ένα βρόχο τα οποία επίσης διαφέρουν σημαντικά από τα αντίστοιχα δομικά στοιχεία της FC-14-15 (μετατοπίσεις ατόμων της κύριας αλυσίδας από ~2 έως 7Å). Ο βρόχος μεταξύ των ελικών α3a και α3b είναι πιο επιμήκης στην περίπτωση της δομής της *FoXyn10a* λόγω της παρουσίας των δύο επιπλέον αμινοξέων Gly97 και Asn98 .

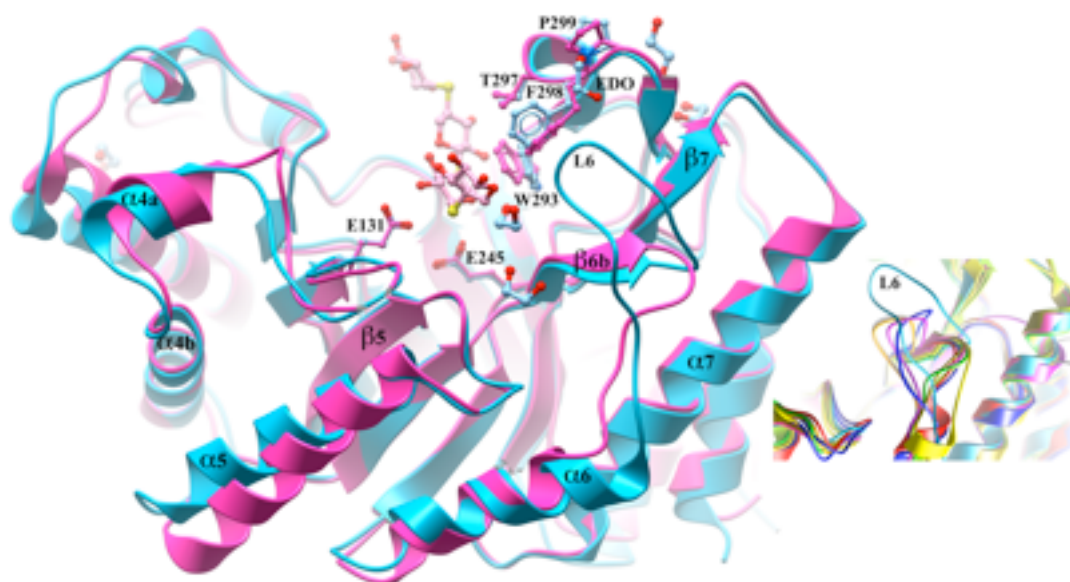
Για τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών που εντοπίζονται σε αμινοξέα που εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε η υπέρθεση με δομές ξυλανασών ως συμπλόκων με διάφορα ανάλογα υποστρώματος προκειμένου να ταυτοποιηθούν αμινοξέα με λειτουργικό ρόλο σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες

(Schmidt, Gubitz et al. 1999; Ducros, Charnock et al. 2000; Vardakou, Flint et al. 2005). Τα κατάλοιπα αυτά ήταν τα Glu45, Trp285 για το -2, τα Lys49, His82, Trp86, Asn130, Glu131, Gln206, Glu245, Trp285, Trp293 για το -1, το Asn46 για το -3 και τα Tyr178, His208 για +1 υποκέντρο σύνδεσης. Μεταξύ αυτών των αμινοξέων, το μόνο που παρουσίαζε μεγάλη διαφορά στη στερεοδιάταξη ήταν η Trp293, ένα υψηλά συντηρημένο αμινοξύ η λειτουργική σημασία και κινητικότητα του οποίου για τη σύνδεση υποστρώματος είχε αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Teixeira, Lo Leggio et al. 2001). Στη δομή της *FoXyn10a*, η πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος αυτού παρουσιάζεται σημαντικά διαφοροποιημένη (η δίεδρη γωνία  $\chi_2$  περιστρέφεται κατά  $\sim 40^\circ$ ) σε σύγκριση με την αντίστοιχη τρυπτοφάνη της FC-14-15 λόγω της παρουσίας του προσδέτη στο ενεργό κέντρο των 4 από τα 5 μονομερή της ασύμμετρης μονάδας. Η αλλαγή αυτή επηρεάζει επίσης τη διαμόρφωση των Thr297, Phe298 and Pro299.

Ανάλογες διαφοροποιήσεις με τις προαναφερθείσες παρατηρήθηκαν κατά τη σύγκριση της *FoXyn10a* με τη δομή της *CfXyn10a* (Εικόνα 4.7). Η μέση τετραγωνική απόκλιση (r.m.s.d) επί όλων των ατόμων Ca κατά την υπέρθεση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής ήταν 1.2 Å. Η πλευρική αλυσίδα της Trp293 στην περίπτωση της *CfXyn10a* επηρεάζεται λιγότερο από την πρόσδεση του αναλόγου ξυλοτετραόζης (thio-linked xylo-tetraose) από ό,τι στη δομή της *FoXyn10a*. Μία επιπλέον διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στα άτομα κύριας αλυσίδας των αμινοξέων 138-150 (μετατόπιση των Ca κατά  $\sim 4.0$  Å).

Εκτός από τη σύγκριση με τις δύο προαναφερθείσες ξυλανάσες, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή δομική στοίχιση χρησιμοποιώντας τις 11 πρώτες ξυλανάσες που προέκυψαν μετά από αναζήτηση δομικών ομολόγων μέσω του εξυπηρετητή Dali (Holm and Rosenstrom 2010) (κωδικοί PDB: 1B3Y, 1ISY, 1NQ6, 1TA3, 1V0M, 1V6Y, 1VBR, 1XYZ, 3CUG, 3NJ3, 3O2L). Μετά από οπτική παρατήρηση της υπέρθεσης όλων των δομικών ομολόγων διαπιστώθηκε ότι παρά την υψηλή ομοιότητα σε ό,τι αφορά τη συνολική αναδίπλωση, ο βρόχος μεταξύ των β6b και α6 (L6) λαμβάνει ιδιαίτερα εκτεταμένη διαμόρφωση στην περίπτωση της *FoXyn10a* (Εικόνα 4.7, ένθετο). Πιο συγκεκριμένα, στη δομή της *FoXyn10a* ο βρόχος αυτός αποτελείται από τα αμινοξέα 211-223 και εμπλέκεται στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών A και D καθώς και B και C μέσω των αμινοξέων Asn56, Pro215. Αν και η συμπαγής διάταξη των 4 μονομερών στην

ασύμμετρη μονάδα θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι επηρεάζει τη στερεοδιάταξη του βρόχου αυτού, το γεγονός ότι αυτή διατηρείται στην περίπτωση του μονομερούς E που είναι περισσότερο εκτεθειμένο στο διαλύτη καθιστά πιθανή τη διαμόρφωση αυτή και στις φυσιολογικές συνθήκες δράσης του ενζύμου.



**Εικόνα 4.7** Υπέρθηση των κρυσταλλικών δομών της *FoXyn10a* (γαλάζιο) και του συμπλόκου της *CfXyn10A* με θειοξυλοτετραόζη (φούξια). Με αναπαράσταση σφαίρας-ράβδου παρουσιάζονται τα δύο καταλυτικά γλουταμικά αμινοξέα, η Trp 293 και τα γειτονικά της αμινοξέα καθώς και τα μόρια αιθυλενογλυκόλης (ως EDO παρουσιάζεται η EDO400). Ένθετο: πολλαπλή δομική στοίχιση της *FoXyn10a* με τα 11 πλησιέστερα δομικά ομόλογα επικεντρωμένη στο βρόχο L6.

#### 4.8 Ο βρόχος L6 και ο πιθανός του ρόλος στην ενζυμική λειτουργία

Η στερεοδιάταξη των αμινοξέων που ανήκουν στο βρόχο L6 πάνω από το καταλυτικό κέντρο τα οποία προσανατολίζονται προς τα «+» υποκέντρα καθιστά πιθανό το λειτουργικό ρόλο του βρόχου αυτού μέσω της εν δυνάμει αλληλεπίδρασής του με το υπόστρωμα. Η κλειστή διαμόρφωση σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με ένα μόριο αιθυλενογλυκόλης (EDO400) και την Pro299. Η πρόσδεση της αιθυλενογλυκόλης ενδεχομένως αποτελεί ένδειξη ότι μία υπομονάδα ξυλόζης θα μπορούσε να φιλοξενηθεί στη θέση αυτή. Ο βρόχος L6 φαίνεται να επηρεάζει τη

θέση των αμινοξέων 190-198 ο σκελετός των οποίων μετατοπίζεται κατά ~1.0 έως ~2.5 Å σε σχέση με τα αντίστοιχα κατάλοιπα της δομής της CfXyn10A.

Η μόνη χαρακτηρισμένη ξυλανάση που επίσης διαθέτει επιπλέον αμινοξέα στην περιοχή μεταξύ των β6b και α6 είναι η XynII από τον *A. pullulans* (Tanaka, Muguruma et al. 2006) η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τη FoXyn10a χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η δομή της. Με βάση την εργασία των Tanaka και των συνεργατών του, η ξυλανάση αυτή δεν ανήκει σε καμμία από τις δύο φυλογενετικές οικογένειες (I και II) στις οποίες είχαν κατηγοριοποιηθεί οι GH10 ξυλανάσες σε προηγούμενη μελέτη (Sato, Niimura et al. 1999). Η XynII φέρεται να αποκλίνει από την οικογένεια I και διαθέτει αυτά τα επιπλέον αμινοξέα που απουσιάζουν από τις ξυλανάσες των οικογενειών I και II. Οι XynII και FoXyn10a παρουσιάζουν κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως είναι το υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο (8.9 στην περίπτωση της XynII *A. pullulans* και 9.5 στην περίπτωση της FoXyn10a), σε αντίθεση με την πλειοψηφία των GH10 ξυλανασών μυκητιακής προέλευσης (Lafond, Tauzin et al. 2011). Επίσης, παρουσιάζουν βέλτιστο pH 6-8 και σταθερότητα σε αλκαλικά pH.

## **5. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της εστεράσης του φερουλικού οξέος FoFaeC**

### **5.1 Ανάλυση της αλληλουχίας της FoFaeC με βάση το γονιδίωμα του *F. oxysporum***

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FoFaeC είναι το foxg\_12213.2 όπως αυτό περιγράφεται στη βάση δεδομένων του Broad Institute. Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του γονιδίου.

Με τη βοήθεια του εργαλείου *BLAST* (Altschul, Madden et al. 1997), προσδιορίστηκαν οι πρωτεΐνες εκείνες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς την υποθετική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο foxg\_12213.2. Οι εστεράσες τύπου C από τους μικροοργανισμούς *A. nidulans* AN1772.2, *T. stipitatus* και *A. niger* παρουσιάζουν 51%, 50% και 42% ταυτότητα αλληλουχίας με την FoFaeC,

αντίστοιχα, ενώ καμμία από τις ομόλογες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με τη διαδικασία αυτή δεν είχε γνωστή δομή.

**Πίνακας 5.1** Χαρακτηριστικά του γονιδίου foxg\_12213.2 και της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί. Η σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα *SignalP* (Emanuelsson, Brunak et al. 2007), το θεωρητικό MB και pI με το πρόγραμμα *ProtParam* (Gasteiger E. 2005) ενώ οι θέσεις γλυκοζυλίωσης με τα *NetNGlyc* (Gupta R. 2004) και *NetOGlyc* (Julenius, Molgaard et al. 2005).

Κωδικός Broad Institute	foxg_12213.2 (χρωμόσωμα 13)
Μήκος γονιδίου (με εσόνια)	1667
Αριθμός εξονίων	1
Αριθμός Αμινοξέων	558
Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης	MLFASLVLVLGFIPQVLS
Θεωρητικό Μοριακό Βάρος (Da)	59393.5
Θεωρητικό pI	6.89
Περιοχές Γλυκοζυλίωσης	Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης: Asn117, 167, 378
	Πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης: -

## 5.2 Παραγωγή και καθαρισμός της FoFaeC

Η κλωνοποίηση, έκφραση και ο καθαρισμός της FoFaeC πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών (Ε.Μ.Π.) από την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Μουκούλη σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην αντίστοιχη εργασία (Μουκούλι, Topakas et al. 2008). Το καθαρό ένζυμο είχε MB 62 kDa και pI 6.8, σε συμφωνία με τις θεωρητικές προβλέψεις του προγράμματος *ProtParam* για την κλωνοποιημένη πρωτεΐνη.



### 5.3 Δοκιμές κρυστάλλωσης FoFaeC

#### 5.3.1 Αρχική σάρωση πλήθους συνθηκών κρυστάλλωσης

Οι δοκιμές κρυστάλλωσης της FoFaeC πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΟΦΧ, ΕΙΕ), Ομάδα Δομικής Βιολογίας και Χημείας υπό την επίβλεψη της Δρ. Χρυσίνα. Η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 26 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM pH 8. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθημένη σταγόνα. Η αρχική σάρωση μεγάλου πλήθους συνθηκών κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ρομπότ (Oryx-Nano crystallization robot (Douglas Instruments, Ltd). Χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα με 96 διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης έκαστο: τα JCSG-plus<sup>TM</sup> Screen (MD1-37), PACT premier<sup>TM</sup>, HT-96 (MD1-36) (Molecular Dimensions) και PEGs Suite (Qiagen). Η σταγόνα είχε όγκο 0.3 μl με 66.67% (v/v) πρωτεΐνη και η επώαση γινόταν στους 16 °C. Κρύσταλλοι της FoFaeC αναπτύχθηκαν σε έναν μεγάλο αριθμό συνθηκών και ποικιλία μεγέθους και μορφολογίας. Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται ορισμένες από τις συνθήκες που οδήγησαν στην ανάπτυξη κρυστάλλων.

**Πίνακας 5.2** Οι συνθήκες που οδήγησαν στην ανάπτυξη κρυστάλλων της FoFaeC.

Εμπορικό σκεύασμα	Συνθήκη	Σύσταση
JCSG-plus <sup>TM</sup>	D3	0.2 M NaCl, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.2, 50% (v/v) PEG200
	D6	0.2 M MgCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris pH 8.5, 20% (v/v) PEG8000
	D7	0.2 M LiSO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris pH 8.5, 40% (v/v) PEG400
	E6	0.2 M zinc acetate, 0.1 M imidazole pH 8, 20% (w/v) PEG3000
PACT premier <sup>TM</sup>	B1	0.1 M MIB buffer pH= 4.0, 25 % w/v PEG 1500
PEGs Suite	A8	0.1 M MES pH 6.5, 30% (v/v) PEG300
	B8	0.1 M Tris HCl pH 8.5, 30% (v/v) PEG300
	A10	0.1 M MES pH 6.5, 25% (v/v) PEG 550MME

### 5.3.2 Βελτιστοποίηση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης

Οι συνθήκες D3 και D7 του JCSG-*plus*<sup>TM</sup> οδήγησαν στο σχηματισμό λεπτών, διδιάστατων (Εικόνα 5.1) και μικρών βελονοειδών κρυστάλλων, αντίστοιχα.

Προκειμένου να βελτιωθεί το μέγεθος και η ποιότητα των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν στη συνθήκη D3 (0.2 M NaCl, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.2, 50% (v/v) PEG200) τροποποιήθηκαν διάφορες παράμετροι του αρχικού πειράματος κρυστάλλωσης όπως ο όγκος της σταγόνας, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία επώασης, το pH, η συγκέντρωση του PEG200 και του NaCl. Επίσης, στο μητρικό διάλυμα κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα γλυκερόλη και οκτυλογλυκοζίδιο (10% και 0.06%, αντίστοιχα) ενώ δοκιμάστηκε και η αντικατάσταση του PEG200 με πολυαιθυλενογλυκόλη υψηλότερου MB, PEG400. Για να επιβραδυνθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης, έγινε χρήση μίγματος παραφίνης-σιλικόνης (σε αναλογία 1:1) το οποίο τοποθετήθηκε πάνω από το διάλυμα κρυστάλλωσης.

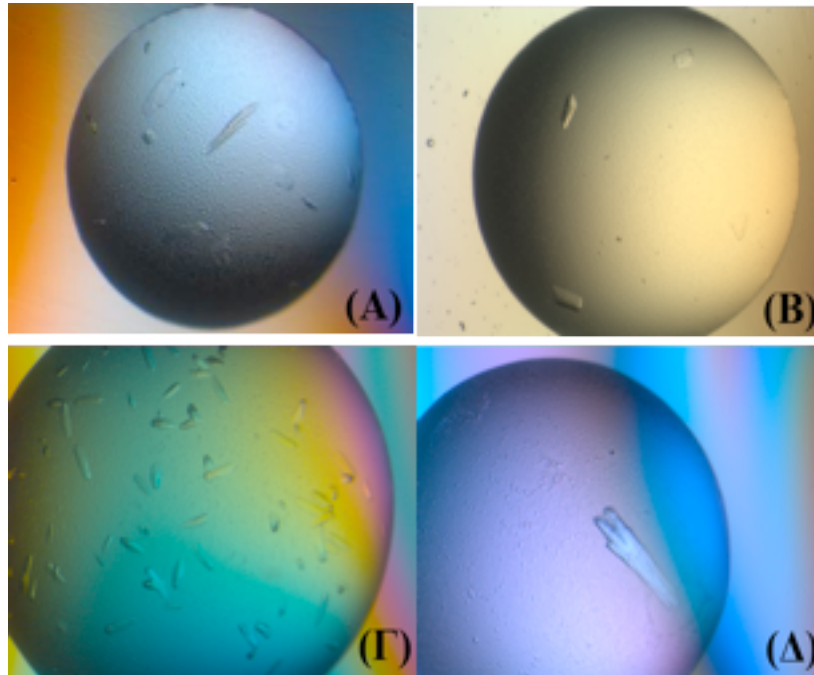
Τέλος, εφαρμόστηκε η τεχνική της μικροσποράς είτε μεταφέροντας θραύσματα μικροκρυστάλλων στις προς κρυστάλλωση σταγόνες, είτε παρασκευάζοντας διαδοχικές αραιώσεις των πυρήνων κρυστάλλωσης. Πιο συγκεκριμένα, επαναλήφθηκε το πείραμα κρυστάλλωσης μειώνοντας όμως την αρχική συγκέντρωση *FoFaeC* από 20 σε 15 mg/ml έτσι ώστε μετά την εξισορρόπηση οι σταγόνες να παραμένουν διαυγείς (μετάβαση στην ακόρεστη περιοχή του διαγράμματος φάσεων). Στη συνέχεια, για τη μεταφορά των ήδη ανεπτυγμένων μικροκρυστάλλων *FoFaeC* σε σταγόνα χρησιμοποιήθηκε αλογότριχα, η οποία βυθίστηκε αρχικά στην σταγόνα που περιείχε τους πυρήνες κρυστάλλωσης, συμπαρέσειρε αρκετούς από αυτούς και στη συνέχεια τους μετέφερε στην επιφάνεια της νέας σταγόνας που έφερε το ένζυμο προς κρυστάλλωση σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Εναλλακτικά, προετοιμάστηκε ένα διάλυμα πυρήνων μετά απο θραύση ενός μεγάλου κρυστάλλου (έντονη ανάδευση για 2 min σε 50 ml μητρικού δ/τος). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση αναμιγνύοντας 0.6 ml πρωτεΐνης, 0.4 ml διαλύματος κρυστάλλωσης και 0.2 ml διαλύματος πυρήνων αραιωμένου 10, 100 και 500 φορές στο διάλυμα κρυστάλλωσης. Στον Πίνακα 5.3 παρουσιάζονται συνοπτικά

οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτίωση των κρυστάλλων της *FoFaeC* καθώς και το αντίστοιχο πειραματικό αποτέλεσμα.

**Πίνακας 5.3** Συνοπτική παρουσίαση των δοκιμών κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν για τη βελτίωση της μορφολογίας των κρυστάλλων της FoFaeC που αναπτύσσονταν σε 0.2 M NaCl, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.2, 50% (v/v) PEG200 (συνθήκη D3 του JCSG-plus<sup>TM</sup>)

Περιγραφή των δοκιμών κρυστάλλωσης	Πειραματικό αποτέλεσμα
Αλλαγή όγκου σταγόνας από 0.3 μl σε 1 μl	Μεγαλύτεροι κρύσταλλοι αλλά χαμηλής ποιότητας
Μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης από 26 mg/ml σε 20 και 15 mg/ml	Μικρή βελτίωση στη μορφολογία των κρυστάλλων
Αλλαγή θερμοκρασίας επώασης από τους 16 °C στους 20 °C	Ανάπτυξη κρυστάλλων αλάτων και όχι πρωτεΐνης
Αλλαγή pH από 6.2 σε 5.7, 6.7 και 7.5	Μικρή βελτίωση στη μορφολογία των κρυστάλλων σε pH 6.7
Αλλαγή συγκέντρωσης PEG 200 από 50% σε 60%	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων
Αλλαγή συγκέντρωσης NaCl από 0.2 σε 0.4 M	Σημαντική βελτίωση της μορφολογίας των κρυστάλλων
Προσθήκη 10% γλυκερόλης ή 0.06% (v/v) οκτυλογλυκοζιδίου στο μητρικό διάλυμα	Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κρυστάλλων
Προσθήκη 10 μl μίγματος 1:1 παραφίνης-σιλικόνης πάνω από το μητρικό διάλυμα	Δε βελτιώθηκε η μορφολογία των κρυστάλλων
Μικροσπορά	Ανάπτυξη πολλών αλλά μικρών κρυστάλλων.

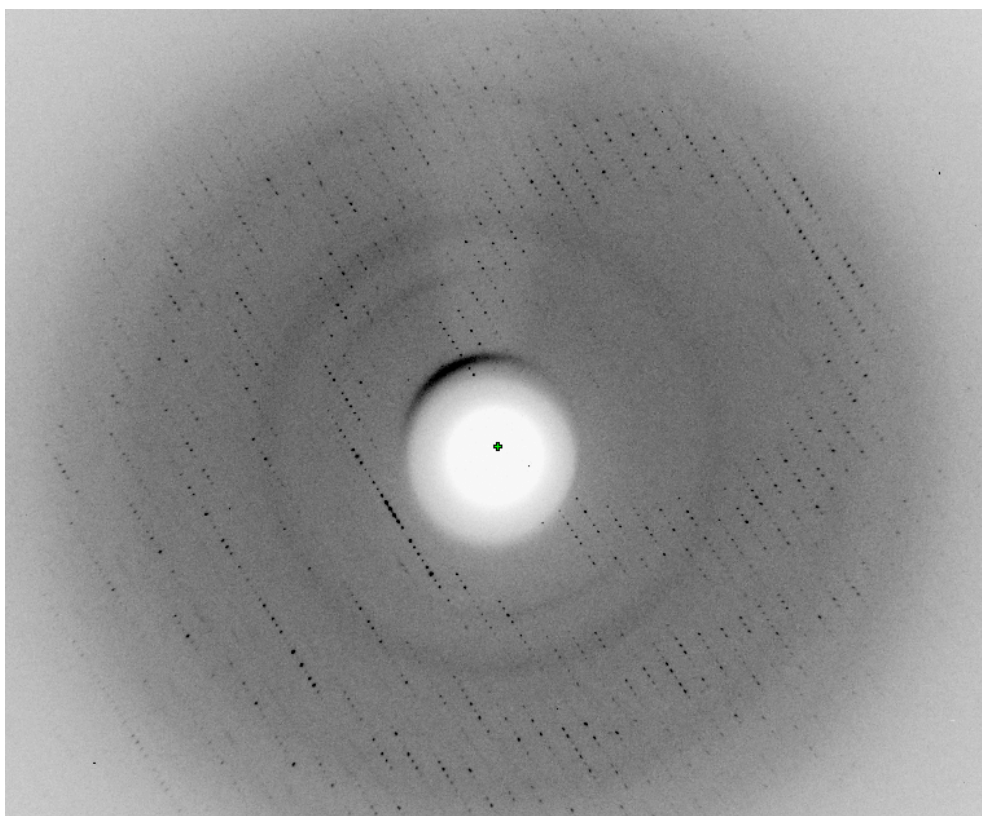
Καμμία από τις παραπάνω προσπάθειες δεν οδήγησε στην ανάπτυξη ευμεγεθών μονοκρυστάλλων. Στην Εικόνα 5.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά κρύσταλλοι της FoFaeC που αναπτύχθηκαν στα πρώτα στάδια αλλά και κατά την προσπάθεια βελτίωσης του αρχικού αποτελέσματος.



**Εικόνα 5.1** Το αποτέλεσμα ορισμένων προσπαθειών βελτίωσης των κρυστάλλων *FoFaeC* που αναπτύσσονταν σε 0.2 M NaCl, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.2, 50% (v/v) PEG200 (D3). (A) Οι κρύσταλλοι στην αρχική συνθήκη, (B) με 0.4 M NaCl, (Γ) μικροσπορά και (Δ) προσθήκη PEG1500.

#### 5.4 Έκθεση των κρυστάλλων συγχροτρονική ακτινοβολία ακτίνων-X.

Οι κρύσταλλοι της *FoFaeC* ακτινοβολήθηκαν με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας στους 100K στο σταθμό X13 ( $\lambda=0.8123 \text{ \AA}$ ) του EMBL (Αμβούργο, Γερμανία). Παρά το γεγονός ότι παρουσίαζαν περιθλαστική ικανότητα σε διακριτική ικανότητα  $\sim 3 \text{ \AA}$ , δεν έγινε δυνατή η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά το περιθλασίγραμμα που προέκυψε από κρύσταλλο *FoFaeC*, αναπτυγμένο σε 0.4 M NaCl, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.2 και 50% (v/v) PEG200.



**Εικόνα 5.2** Περιθλασίγραμμα που προέκυψε κατά την ακτινοβολή κρυστάλλου *FoFaeC* στο σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας X13 (EMBL, Αμβούργο). Το όριο της περιθλαστικής ικανότητας είναι  $\sim 3 \text{ \AA}$ .

## 6. Συμπεράσματα – Μελλοντικές Προτάσεις

Ένας από τους βασικότερους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η βελτίωση της υπάρχουσας γνώσης γύρω από την οικογένεια 61 της βάσης δεδομένων CAZy. Κατά την περίοδο έναρξης των πειραμάτων, η κύρια δράση των ενζύμων αυτών ήταν άγνωστη παρά τη μεγάλη διάδοσή τους στο γονιδίωμα των κυτταρινολυτικών μυκήτων. Οι αρχικές ωστόσο ενδείξεις ότι είχαν την ικανότητα να αυξάνουν την αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων παρουσία των γνωστών κυτταρινασών, είχε συμβάλει στην αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος γύρω από τη μυστηριώδη αυτή οικογένεια και τις πιθανές της βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Τα αρχικά πειράματα της παρούσας εργασίας ανέδειξαν μία ασθενή υδρολυτική δράση σε κυτταρινικούς και ημικυτταρινικούς πολυσακχαρίτες. Δεδομένου ότι ήταν πολύ ασθενέστερη άλλων γνωστών ενδο-κυτταρινασών και ξυλανασών δεν ήταν δυνατό να θεωρηθεί ως η κύρια λειτουργία των *StCel61* και *FoCel61*. Για παράδειγμα, η δραστηριότητα σε καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC) είναι περίπου 1000 φορές χαμηλότερη από αυτή άλλων χαρακτηρισμένων ενδογλουκανασών από το μύκητα *T. reesei* (Nakazawa, Okada et al. 2008). Η ασθενής αυτή υδρολυτική συμπεριφορά έχει επίσης αναφερθεί και για άλλες GH61, και πιο συγκεκριμένα από τους μύκητες *A. nidulans* (Bauer, Vasu et al. 2006), *A. kawachii* (Koseki, Mese et al. 2008), *T. reesei* (Karlsson, Saloheimo et al. 2001; Xing, Liu et al. 2006), *T. terrestris* (Harris, Welner et al. 2010) και *P. lycopersici* (Valente, Infantino et al. 2011). Αποτελεί ωστόσο κοινή διαπίστωση ότι αυτό δεν είναι παρά μία παράπλευρη αντίδραση και όχι ο βασικός ρόλος των GH61 στη φύση. Με βάση τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες που αναδεικνύουν τον οξειδωτικό χαρακτήρα των GH61, είναι πιθανό ότι τα ελάχιστα αναγωγικά σάκχαρα που ανιχνεύονται προϋπάρχουν στο υπόστρωμα και ανήκουν σε κελλοολιγосακχαρίτες που απελευθερώνονται κατά τη δράση των GH61 σε σημείο κοντά στο αναγωγικό άκρο (Westereng, Ishida et al. 2011) ή προκύπτουν από την οξειδωτική δράση των GH61 στο μη αναγωγικό άκρο (τύπου 2 μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών με βάση την εργασία των Phillips, Beeson et al., 2011).

Η ικανότητα των πρωτεϊνών GH61 και CBM33 να ενισχύουν την αποτελεσματικότητα των ενδο- και εξω- κυτταρινασών, χωρίς ωστόσο να έχουν πανομοιότυπο τρόπο δράσης, έχει πλέον διαπιστωθεί για αρκετά μέλη των δύο οικογενειών πάνω σε μία ποικιλία υποστρωμάτων και σε συνδυασμό με διάφορες συστάσεις ενζυμικών μιγμάτων (Harris, Welner et al. 2010; Forsberg, Vaaje-Kolstad et al. 2011; Langston, Shaghasi et al. 2011; Westereng, Ishida et al. 2011). Η συνεργιστική αυτή δράση αναδείχθηκε και στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, με αύξηση του βαθμού μετατροπής λιγνινοκυτταρινούχων υλικών μέχρι και 40%, κατά την προσθήκη των ανασυνδυασμένων GH61 σε μίγμα κυτταρινασών. Παράλληλα, αναδείχθηκε ο ρόλος ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, όπως είναι η λιγνίνη που αποτελεί συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και εξωτερικά προστιθέμενων αναγωγικών, η παρουσία των οποίων είναι απαραίτητη για την εκδήλωση του ενισχυτικού χαρακτήρα των GH61. Διαπιστώθηκε ότι όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε λιγνίνη και κατά συνέπεια η αντιοξειδωτική ισχύς του υδρολυόμενου υλικού, τόσο πιο έντονο είναι το συνεργιστικό αποτέλεσμα, το οποίο εξάλλου μηδενίζεται στην περίπτωση υποστρωμάτων που αποτελούνται μόνο από κυτταρίνη.

Προκειμένου να ερμηνευθούν σωστά τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι πολύ σημαντικό να ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι λόγω του τρόπου κλωνοποίησης, στο αμινοτελικό άκρο των δύο GH61 υπάρχουν 2 επιπλέον αμινοξέα. Δεδομένου ότι το ισχυρά συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης που στη φυσική πρωτεΐνη βρίσκεται στη θέση 1 συμμετέχει στο συντονισμό του μεταλλοκατιόντος και επιπλέον παρουσιάζει το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μεθυλίωσης, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η παρουσία επιπλέον αμινοτελικών αμινοξέων στη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη θα μπορούσε να επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η εφαρμογή διαφορετικής στρατηγικής για την παραγωγή τους, όπως είναι η ομόλογη έκφραση, θα μπορούσε να αποτελέσει την απάντηση στο ερώτημα αυτό και να αναδείξει τη σημαντικότητα της τοποθέτησης της ιστιδίνης αυτής στη θέση 1 της αμινοξικής αλληλουχίας.

Τα πρόσφατα ευρήματα γύρω από τη δράση των GH61 ανέδειξαν την ύπαρξη ενός καινούριου, οξειδωτικού ενζυμικού μηχανισμού που δρα παράλληλα με τις κλασικές κυτταρινάσες, ανοίγοντας νέες οδούς για την αξιοποίηση της βιομάζας σε βιομηχανικό επίπεδο. Τα ένζυμα αυτά κατηγοριοποιούνται πλέον ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών και όχι ως γλυκοζιδικές υδρολάσες, όπως είχαν αρχικά



καταταχθεί στην CAZy με βάση την ασθενή κυτταρινολυτική δράση που είχε ανιχνευθεί αρχικά. Η μεγάλη ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ομόλογες στην οικογένεια GH61 και απαντώνται στους κυτταρινολυτικούς μύκητες, αποτελεί ένδειξη όχι μόνο της σημαντικότητας των ενζύμων αυτών αλλά και ενδεχομένως της ύπαρξης περισσότερων του ενός τρόπων δράσης και πολυσακχαριτών-στόχων (Harris, Welner et al. 2010). Κατά συνέπεια, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να στραφεί στη διαλεύκανση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των διαφόρων μελών της οικογένειας GH61 για το σχεδιασμό των ενζυμικών μιγμάτων που θα οδηγήσουν στο βέλτιστο υδρολυτικό αποτέλεσμα. Το είδος των χρησιμοποιούμενων GH61, το μίγμα των κλασικών κυτταρινασών καθώς και η μεταξύ τους αναλογία, είναι παράμετροι που θα εξαρτηθούν επίσης από τη σύσταση του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού που υδrolύεται. Σημαντική παράμετρος, ταυτόχρονα, που θα πρέπει να μελετηθεί εκτεταμένα, είναι ο ρόλος του μοριακού οξυγόνου και των αναγωγικών ουσιών ως ενισχυτικών της δράσης των νέων οξειδωτικών ενζύμων αλλά και του δισθενούς μετάλλου η παρουσία του οποίου είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους.

Η παρούσα εργασία περιλάμβανε επίσης δομικές μελέτες ήδη χαρακτηρισμένων ενζύμων με σκοπό την ενίσχυση των γνώσεων γύρω από τις σχέσεις δομής-λειτουργίας. Επιλέχθηκαν μία ξυλανάση (*FoXyn10a*) και μία εστεράση του φερουλικού οξέος (*FoFaeC*) από το μύκητα *F. oxysporum*, δύο ημικυτταρινάσες που είχαν ήδη χαρακτηριστεί βιοχημικά από την ομάδα του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας (Ε.Μ.Π.), αναδεικνύοντας τη συμβολή τους στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και τη δυνατότητα για εφαρμογή τους σε ένα αριθμό βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Christakopoulos, Nerinckx et al. 1997; Moukoulis, Torakas et al. 2008).

Η τριδιάστατη δομή της *FoXyn10a* ανέδειξε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι το ένζυμο αναδιπλώνεται σε  $(\beta/\alpha)_8$  barrel, όπως όλες οι ξυλανάσες της οικογένειας GH10. Επίσης, διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός βρόχου στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου με καινούρια σε σχέση με τις ήδη γνωστές δομές GH10 ξυλανασών διαμόρφωση, και πιθανό λειτουργικό ρόλο. Δεδομένου ότι δεν είναι γνωστή η δομή κάποιας ξυλανάσης με αντίστοιχα χαρακτηριστικά, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η διερεύνηση του ρόλου του βρόχου αυτού και η σύνδεσή του με τα καταλυτικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Στην προσπάθεια αυτή, θα μπορούσε να συμβάλλει η

συγκρυστάλλωση της *FoXyn10a* με ανάλογα ξυλοολιγοσακχαριτών προκειμένου να διαπιστωθεί η εμπλοκή του βρόχου αυτού στην πρόσδεση του υποστρώματος. Επίσης, η αφαίρεση των σχετικών αμινοξέων με τεχνικές μοριακής βιολογίας και η δομική και βιοχημική μελέτη του νέου ενζύμου σε σύγκριση με το αρχικό, καθώς και ο προσδιορισμός της δομής ξυλανασών που διαθέτουν τα επιπλέον κατάλοιπα όπως η *XynII A. pullulans* θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη γνώση μας σχετικά με τη σχέση δομής-λειτουργίας των ξυλανασών που φέρουν το ιδιαίτερο αυτό χαρακτηριστικό. Σκοπός φυσικά όλων των παραπάνω είναι ο σχεδιασμός βιοκαταλυτών με επιθυμητές ιδιότητες προκειμένου να έχουν τη βέλτιστη αποδοτικότητα στα πλαίσια των βιοτεχνολογικών διεργασιών.

Σε ό,τι αφορά στις δομικές μελέτες πάνω στην εστεράση *FoFaeC*, κρύσταλλοι του ενζύμου αναπτύχθηκαν σε μία ποικιλία συνθηκών, χωρίς ωστόσο να διαθέτουν ικανότητα περίθλασης των ακτίνων-X σε υψηλή διακριτική ικανότητα. Προκειμένου να προσδιοριστεί η τριδιάστατη δομή της *FoFaeC* θα πρέπει να βελτιωθεί η ποιότητά τους, είτε με τροποποίηση των ήδη προσδιορισμένων συνθηκών κρυστάλλωσης είτε με εύρεση νέων. Επίσης, δεδομένου ότι δεν είναι γνωστή η δομή κανενός ομόλογου ενζύμου, είναι απαραίτητη η χρήση βαρέων ατόμων και ο προσδιορισμός των φάσεων μέσω της τεχνικής της ανώμαλης σκέδασης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με αντικατάσταση του αμινοξέος μεθειονίνη από σελινομεθειονίνη κατά την έκφραση σε *P. pastoris* (Larsson and Jones 2007), είτε με εμφύσηση των κρυστάλλων σε διαλύματα κατάλληλων βαρέων μετάλλων και την αξιοποίηση του σήματος ανώμαλης σκέδασης των συγκεκριμένων ατόμων.

## 7. Βιβλιογραφία

Achyuthan, K. E., A. M. Achyuthan, et al. (2010). "Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels." *Molecules* 15(12): 8641-8688.

Adams, P. D., P. V. Afonine, et al. (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2): 213-221.

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): 3389-3402.

Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-410.

Arakane, Y., Q. Zhu, et al. (2003). "Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase." *Insect Biochem Mol Biol* 33(6): 631-648.

Arantes, V. and J. N. Saddler (2010). "Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis." *Biotechnol Biofuels* 3: 4.

Araujo, C. D., A. L. Mackay, et al. (1993). "A Diffusion-Model for Spin-Spin Relaxation of Compartmentalized Water in Wood." *Journal of Magnetic Resonance Series B* 101(3): 248-261.

Armesilla, A. L., C. F. Thurston, et al. (1994). "CEL1: a novel cellulose binding protein secreted by *Agaricus bisporus* during growth on crystalline cellulose." *FEMS Microbiol Lett* 116(3): 293-299.

Bauer, S., P. Vasu, et al. (2006). "Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30): 11417-11422.

Beckham, G. T., Y. J. Bomble, et al. (2010). "The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* Family 7 cellulase is a flexible, disordered protein." *Biophys J* 99(11): 3773-3781.

Beeson, W. T., C. M. Phillips, et al. (2011). "Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases." *J Am Chem Soc*.

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): 922-927.

- Bhat, K. M. and R. Maheshwari (1987). "Sporotrichum thermophile Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity." *Appl Environ Microbiol* 53(9): 2175-2182.
- Bidlack, J., Malone, M., Benson, R. (1992). "Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants." *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72: 51-56.
- Biely, P. (2003). Xylanolytic enzymes
- Biely, P., Z. Kratky, et al. (1981). "Substrate-binding site of endo-1,4-beta-xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*." *Eur J Biochem* 119(3): 559-564.
- Bolam, D. N., H. Xie, et al. (2004). "X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties." *J Biol Chem* 279(22): 22953-22963.
- Brett, C. T., Waldron, K.W. (1990). "Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls." Unwin Hyman London.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5): 905-921.
- Burton, R. A., M. J. Gidley, et al. (2010). "Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls." *Nat Chem Biol* 6(10): 724-732.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, et al. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D233-238.
- Carrer, C., M. Stolz, et al. (2006). "Removing coordinated metal ions from proteins: a fast and mild method in aqueous solution." *Anal Bioanal Chem* 385(8): 1409-1413.
- Carvalho, A. L., J. Trincao, et al. (2009). "X-ray crystallography in drug discovery." *Methods Mol Biol* 572: 31-56.
- Centeno, M. S., C. I. Guerreiro, et al. (2006). "Galactomannan hydrolysis and mannose metabolism in *Cellvibrio mixtus*." *FEMS Microbiol Lett* 261(1): 123-132.
- Chandonia, J. M. and S. E. Brenner (2006). "The impact of structural genomics: expectations and outcomes." *Science* 311(5759): 347-351.
- Chang, Y. C. and K. J. Kwon-Chung (1998). "Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* 66(5): 2230-2236.
- Charnock, S. J., T. D. Spurway, et al. (1998). "The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved." *J Biol Chem* 273(48): 32187-32199.
- Chayen, N. E. (2009). "High-throughput protein crystallization." *Adv Protein Chem Struct Biol* 77: 1-22.

- 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.
- Christakopoulos, P., B. J. Macris, et al. (1989). "Direct Fermentation of Cellulose to Ethanol by *Fusarium-Oxysporum*." *Enzyme and Microbial Technology* 11(4): 236-239.
- Christakopoulos, P., C. Xiros, et al. (2008). "Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production." *Industrial Crops and Products* 28(2): 213-224.
- Christakopoulos, P., W. Nerinckx, et al. (1997). "The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F/10." *Carbohydr Res* 302(3-4): 191-195.
- Claude, J. B., K. Suhre, et al. (2004). "CaspR: a web server for automated molecular replacement using homology modelling." *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W606-609.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, et al. (1972). "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia-Coli* by R-Factor DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(8): 2110-&.
- Collins, T., C. Gerday, et al. (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." *FEMS Microbiol Rev* 29(1): 3-23.
- Conde, R., R. Cueva, et al. (2004). "A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins." *J Biol Chem* 279(42): 43789-43798.
- Cowtan, K. (2006). "The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(Pt 9): 1002-1011.
- Dauter, Z., M. Jaskolski, et al. (2010). "Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: a personal view." *J Synchrotron Radiat* 17(4): 433-444.
- Deshpande, N., M. R. Wilkins, et al. (2008). "Protein glycosylation pathways in filamentous fungi." *Glycobiology* 18(8): 626-637.
- Ding, S., W. Ge, et al. (2006). "Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting." *FEMS Microbiol Lett* 263(2): 207-213.
- Dodd, D. and I. K. Cann (2009). "Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production." *Glob Change Biol Bioenergy* 1(1): 2-17.
- Ducros, V., S. J. Charnock, et al. (2000). "Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Structural and kinetic analysis of the *Streptomyces lividans* xylanase 10A." *J Biol Chem* 275(30): 23020-23026.
- Ealick, S. E. (2000). "Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography." *Curr Opin Chem Biol* 4(5): 495-499.

- Eklof, J. M. and H. Brumer (2010). "The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling." *Plant Physiol* 153(2): 456-466.
- Elder, T., N. Labbe, et al. (2006). "Time domain-nuclear magnetic resonance study of chars from southern hardwoods." *Biomass & Bioenergy* 30(10): 855-862.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, et al. (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." *Nat Protoc* 2(4): 953-971.
- 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.
- Evans, P. and A. McCoy (2008). "An introduction to molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 1): 1-10.
- Felby, C., L. G. Thygesen, et al. (2008). "Cellulose-water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR." *Cellulose* 15(5): 703-710.
- Foreman, P. K., D. Brown, et al. (2003). "Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*." *J Biol Chem* 278(34): 31988-31997.
- Forsberg, Z., G. Vaaje-Kolstad, et al. (2011). "Cleavage of cellulose by a CBM33 protein." *Protein Sci* 20(9): 1479-1483.
- Forsberg, Z., G. Vaaje-Kolstad, et al. (2011). "Cleavage of cellulose by a CBM33 protein." *Protein Sci* 20(9): 1479-1483.
- Frishman, D. and P. Argos (1995). "Knowledge-based protein secondary structure assignment." *Proteins* 23(4): 566-579.
- Froix, M. F. and R. Nelson (1975). "Interaction of Water with Cellulose from Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation-Times." *Macromolecules* 8(6): 726-730.
- Gallardo, O., F. I. Pastor, et al. (2010). "Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution." *J Biol Chem* 285(4): 2721-2733.
- Garman, E. (1999). "Cool data: quantity AND quality." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 10): 1641-1653.
- Gasteiger E., H. C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571-607.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, et al. (2003). "ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." *Nucleic Acids Research* 31(13): 3784-3788.
- Gilbert, H. J. (2010). "The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction." *Plant Physiol* 153(2): 444-455.

- Gilbert, H. J., H. Stalbrand, et al. (2008). "How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation." *Curr Opin Plant Biol* 11(3): 338-348.
- Glykos, N. M. and M. Kokkinidis (2001). "Multidimensional molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10): 1462-1473.
- Gouet, P., E. Courcelle, et al. (1999). "ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." *Bioinformatics* 15(4): 305-308.
- Gupta R., J. E. a. B. S. (2004). "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins." In preparation.
- Hara, Y., Y. Hinoki, et al. (2003). "Cloning and sequence analysis of endoglucanase genes from an industrial fungus, *Aspergillus kawachii*." *Biosci Biotechnol Biochem* 67(9): 2010-2013.
- Harris, G. W., J. A. Jenkins, et al. (1994). "Structure of the catalytic core of the family F xylanase from *Pseudomonas fluorescens* and identification of the xylopentaose-binding sites." *Structure* 2(11): 1107-1116.
- Harris, P. V., D. Welner, et al. (2010). "Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family." *Biochemistry* 49(15): 3305-3316.
- Hartley, I. D., F. A. Kamke, et al. (1992). "Cluster Theory for Water Sorption in Wood." *Wood Science and Technology* 26(2): 83-99.
- Heinemann, U., G. Illing, et al. (2001). "High-throughput three-dimensional protein structure determination." *Curr Opin Biotechnol* 12(4): 348-354.
- Henriksson, G., G. Johansson, et al. (2000). "A critical review of cellobiose dehydrogenases." *J Biotechnol* 78(2): 93-113.
- Heras, B. and J. L. Martin (2005). "Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61(Pt 9): 1173-1180.
- Holm, L. and P. Rosenstrom (2010). "Dali server: conservation mapping in 3D." *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue): W545-549.
- Hooft, R. W., G. Vriend, et al. (1996). "Errors in protein structures." *Nature* 381(6580): 272.
- Jamrog, D. C., Y. Zhang, et al. (2003). "SOMoRe: a multi-dimensional search and optimization approach to molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 2): 304-314.
- Jaskolski, M. (2010). "Personal remarks on the future of protein crystallography and structural biology." *Acta Biochim Pol* 57(3): 261-264.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, et al. (1991). "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models." *Acta Crystallogr A* 47 ( Pt 2): 110-119.

- Julenius, K., A. Molgaard, et al. (2005). "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites." *Glycobiology* 15(2): 153-164.
- Kaneko, S., H. Ichinose, et al. (2004). "Structure and function of a family 10 beta-xylanase chimera of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 FXYN and *Cellulomonas fimi* Cex." *J Biol Chem* 279(25): 26619-26626.
- Karkehabadi, S., H. Hansson, et al. (2008). "The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution." *J Mol Biol* 383(1): 144-154.
- Karlsson, J., M. Saloheimo, et al. (2001). "Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*." *Eur J Biochem* 268(24): 6498-6507.
- Keegan, R. M. and M. D. Winn (2008). "MrBUMP: an automated pipeline for molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 1): 119-124.
- Keegstra, K. (2010). "Plant cell walls." *Plant Physiol* 154(2): 483-486.
- Kissinger, C. R., D. K. Gehlhaar, et al. (1999). "Rapid automated molecular replacement by evolutionary search." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 2): 484-491.
- Kleywegt, G. J., M. R. Harris, et al. (2004). "The Uppsala Electron-Density Server." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1): 2240-2249.
- Koseki, T., Y. Mese, et al. (2008). "Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*." *Appl Microbiol Biotechnol* 77(6): 1279-1285.
- Koshland, D. E. (1953). "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 28(4): 416-463.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2004). "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1): 2256-2268.
- Kubicek, C. P. (1992). "The Cellulase Proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 45: 1-27.
- Lafond, M., A. Tauzin, et al. (2011). "GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production." *Microb Cell Fact* 10: 20.
- Langston, J. A., T. Shaghasi, et al. (2011). "Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61." *Appl Environ Microbiol*.
- Larsson, A. M. and T. A. Jones (2007). "Selenomethionine labeling of recombinant proteins." *Methods Mol Biol* 389: 165-174.



- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, et al. (1996). "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR." *J Biomol NMR* 8(4): 477-486.
- Leslie, A. G. W. (1992). "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data." *Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* No. 26, SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK
- Lev, S. and B. A. Horwitz (2003). "A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection." *Plant Cell* 15(4): 835-844.
- Lo Leggio, L., S. Kalogiannis, et al. (1999). "High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta)alpha-barrel architecture." *Proteins* 36(3): 295-306.
- Lo Leggio, L., S. Kalogiannis, et al. (2001). "Substrate specificity and subsite mobility in *T. aurantiacus* xylanase 10A." *FEBS Lett* 509(2): 303-308.
- Long, F., A. A. Vagin, et al. (2008). "BALBES: a molecular-replacement pipeline." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 1): 125-132.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Manjasetty, B. A., A. P. Turnbull, et al. (2008). "Automated technologies and novel techniques to accelerate protein crystallography for structural genomics." *Proteomics* 8(4): 612-625.
- Margaritis, A. and R. F. J. Merchant (1986). "Thermostable Cellulases from Thermophilic Microorganisms." *Crc Critical Reviews in Biotechnology* 4(3): 327-367.
- Martinez, D., R. M. Berka, et al. (2008). "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)." *Nat Biotechnol* 26(5): 553-560.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, et al. (2007). "Phaser crystallographic software." *Journal of Applied Crystallography* 40(Pt 4): 658-674.
- McPherson, A. (2004). "Introduction to protein crystallization." *Methods* 34(3): 254-265.
- Merino, S. T. and J. Cherry (2007). "Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108: 95-120.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars." *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Moukouli, M., E. Topakas, et al. (2008). "Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*." *Appl Microbiol Biotechnol* 79(2): 245-254.

- Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980). "Rapid Isolation of High Molecular-Weight Plant DNA." *Nucleic Acids Research* 8(19): 4321-4325.
- 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): 240-255.
- Nakazawa, H., K. Okada, et al. (2008). "Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4): 681-689.
- Navaza, J. (1994). "Amore - an Automated Package for Molecular Replacement." *Acta Crystallographica Section A* 50: 157-163.
- Needleman, S. B. and C. D. Wunsch (1970). "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." *J Mol Biol* 48(3): 443-453.
- Notredame, C., D. G. Higgins, et al. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *J Mol Biol* 302(1): 205-217.
- Panagiotou, G., D. Kekos, et al. (2003). "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation." *Industrial Crops and Products* 18(1): 37-45.
- Payan, F., P. Leone, et al. (2004). "The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I: structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases." *J Biol Chem* 279(34): 36029-36037.
- Perrakis, A., M. Harkiolaki, et al. (2001). "ARP/wARP and molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10): 1445-1450.
- Phillips, C. M., W. T. Beeson, et al. (2011). "Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*." *ACS Chem Biol* 6(12): 1399-1406.
- Poon, D. K. Y., D'Angelo, I.D., Kuntz, D.A., Kantner, T., Ludkiwzek, M.L., Tarling, C., Rose, D.R., Saul, M., McIntosh, L.P., Withers, S.G (to be published).
- Provencher, S. W. (1982). "Contin - a General-Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral-Equations." *Computer Physics Communications* 27(3): 229-242.
- Quinlan, R. J., M. D. Sweeney, et al. (2011). "Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Raguz, S., E. Yague, et al. (1992). "Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*." *Gene* 119(2): 183-190.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, et al. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." *J Mol Biol* 7: 95-99.

- Raush, E., M. Totrov, et al. (2009). "A new method for publishing three-dimensional content." *PLoS One* 4(10): e7394.
- Reese, E. T., R. G. Siu, et al. (1950). "The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis." *Journal of Bacteriology* 59(4): 485-497.
- Rhodes, G. (1999). "Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models." Academic Press.
- Roberge, M., F. Shareck, et al. (1997). "Characterization of two important histidine residues in the active site of xylanase A from *Streptomyces lividans*, a family 10 glycanase." *Biochemistry* 36(25): 7769-7775.
- Rould, M. A. (2007). "The same but different: isomorphous methods for phasing and high-throughput ligand screening." *Methods Mol Biol* 364: 159-182.
- Rupp, B. (2009). "Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology." Garland Science.
- Saloheimo, M., T. Nakari-Setälä, et al. (1997). "cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast." *Eur J Biochem* 249(2): 584-591.
- Santos, C. R., A. N. Meza, et al. (2010). "Thermal-induced conformational changes in the product release area drive the enzymatic activity of xylanases 10B: Crystal structure, conformational stability and functional characterization of the xylanase 10B from *Thermotoga petrophila* RKU-1." *Biochem Biophys Res Commun* 403(2): 214-219.
- Sato, Y., Y. Niimura, et al. (1999). "Module-intron correlation and intron sliding in family F/10 xylanase genes." *Gene* 238(1): 93-101.
- Schmidt, A., A. Schlacher, et al. (1998). "Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*." *Protein Sci* 7(10): 2081-2088.
- Schmidt, A., G. M. Gubitz, et al. (1999). "Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant." *Biochemistry* 38(8): 2403-2412.
- Schwarzenbacher, R., A. Godzik, et al. (2008). "The JCSG MR pipeline: optimized alignments, multiple models and parallel searches." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 1): 133-140.
- Serpen, A., E. Capuano, et al. (2007). "A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components." *J Agric Food Chem* 55(19): 7676-7681.
- Sharff, A. and H. Jhoti (2003). "High-throughput crystallography to enhance drug discovery." *Curr Opin Chem Biol* 7(3): 340-345.
- Shatsky, M., R. Nussinov, et al. (2004). "A method for simultaneous alignment of multiple protein structures." *Proteins* 56(1): 143-156.

- Solbak, A. I., T. H. Richardson, et al. (2005). "Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric." *J Biol Chem* 280(10): 9431-9438.
- Stoscheck, C. M. (1990). "Quantitation of protein." *Methods Enzymol* 182: 50-68.
- Tanaka, H., M. Muguruma, et al. (2006). "Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene." *Appl Microbiol Biotechnol* 70(2): 202-211.
- Taylor, G. (2003). "The phase problem." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 11): 1881-1890.
- Teather, R. M. and P. J. Wood (1982). "Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen." *Appl Environ Microbiol* 43(4): 777-780.
- Teixeira, S., L. Lo Leggio, et al. (2001). "Anisotropic refinement of the structure of *Thermoascus aurantiacus* xylanase I." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 3): 385-392.
- Thomsen, M. H., A. Thygesen, et al. (2006). "Preliminary results on optimization of pilot scale pretreatment of wheat straw used in coproduction of bioethanol and electricity." *Appl Biochem Biotechnol* 129-132: 448-460.
- Tian, C., W. T. Beeson, et al. (2009). "Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52): 22157-22162.
- Topakas, E. and P. Christakopoulos (2004). "Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterases by *Fusarium oxysporum* during submerged batch cultivation." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20(3): 245-250.
- Tronrud, D. E. (1997). "TNT refinement package." *Methods Enzymol* 277: 306-319.
- Vaaje-Kolstad, G., B. Westereng, et al. (2010). "An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides." *Science* 330(6001): 219-222.
- Vaaje-Kolstad, G., D. R. Houston, et al. (2005). "Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21." *J Biol Chem* 280(12): 11313-11319.
- Vaguine, A. A., J. Richelle, et al. (1999). "SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 1): 191-205.
- Valente, M. T., A. Infantino, et al. (2011). "Molecular and functional characterization of an endoglucanase in the phytopathogenic fungus *Pyrenochaeta lycopersici*." *Curr Genet* 57(4): 241-251.
- Vardakou, M., J. Flint, et al. (2005). "A family 10 *Thermoascus aurantiacus* xylanase utilizes arabinose decorations of xylan as significant substrate specificity determinants." *J Mol Biol* 352(5): 1060-1067.

Wang, K., H. Y. Yang, et al. (2011). "Structural comparison and enhanced enzymatic hydrolysis of the cellulosic preparation from *Populus tomentosa* Carr., by different cellulose-soluble solvent systems." *Bioresour Technol* 102(6): 4524-4529.

Westereng, B., T. Ishida, et al. (2011). "The Putative Endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* Is a Metal-Dependent Oxidative Enzyme that Cleaves Cellulose." *PLoS One* 6(11): e27807.

Withers, S. G., D. Dombroski, et al. (1986). "Direct <sup>1</sup>H n.m.r. determination of the stereochemical course of hydrolyses catalysed by glucanase components of the cellulase complex." *Biochem Biophys Res Commun* 139(2): 487-494.

Wymelenberg, A. V., S. Denman, et al. (2002). "Transcript analysis of genes encoding a family 61 endoglucanase and a putative membrane-anchored family 9 glycosyl hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl Environ Microbiol* 68(11): 5765-5768.

Xing, M., G. Liu, et al. (2006). "Improvement of the cellulolytic activity of *Trichoderma reesei* endoglucanase IV with an additional catalytic domain." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22(12): 1301-1305.

Xiros, C., P. Katapodis, et al. (2009). "Evaluation of *Fusarium oxysporum* cellulolytic system for an efficient hydrolysis of hydrothermally treated wheat straw." *Bioresour Technol* 100(21): 5362-5365.