



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

2015

*Κλωνοποίηση μιας λακκάσης από το
μύκητα *Myceliophthora thermophila*-
Βιοτεχνολογική αξιολόγηση εμπορικής
λακκάσης σε αντιδράσεις πολυμερισμού*

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV : ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Ε. ΤΟΠΑΚΑΣ

Κιλιμτζίδα Ευμορφία

Αθήνα, 6 Μαρτίου 2015

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Κατά την εκπόνηση της παρούσης διπλωματικής εργασίας, καθοριστική ήταν η συμβολή των υπευθύνων και των μελών της ομάδας του εργαστηρίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε κατά την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου παρείχε για ενασχόληση με θέματα του αντικειμένου της βιοτεχνολογίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω ακόμη να εκφράσω στον μεταπτυχιακό φοιτητή, Νίκο Μάνο, για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Καθοριστική ήταν η βοήθειά του τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και στην αντιμετώπιση προβλημάτων και σφαλμάτων που ανέκυψαν στην πορεία.

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για τη στήριξη και την αγάπη της.

Κιλιμτζίδα Ευμορφία

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσης εργασίας ήταν αφενός η κλωνοποίηση και η ετερόλογη έκφραση ενός γονιδίου του θερμοφίλου μύκητα *M. thermophila* που κωδικοποιεί ένα ένζυμο (λακκάση), και αφετέρου η χρήση της εμπορικής λακκάσης σε αντιδράσεις πολυμερισμού.

Για την έκφραση του γονιδίου, απομονώθηκε αρχικά το ολικό DNA του *M. thermophila*. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου ανασύρθηκε από τη βάση δεδομένων Genome Portal και ακολούθησε απομόνωση και ποσοτική της ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που επρόκειτο να αντιγραφεί με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ένθεση της ενισχυμένης αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pCR® Blunt. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης συνένωσης, και έπειτα, έλαβε χώρα ο μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*. Κατόπιν, η ενίσχυση των τριών κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδίου, καθώς και η παραγωγή των τμημάτων DNA που προέρχονταν από τη συνένωση των τριών αυτών περιοχών, επιτεύχθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pCR® Blunt για να μετασχηματιστούν τα κύτταρα του βακτηρίου *E.coli*. Έπειτα, η επιθυμητή αλληλουχία απομονώθηκε και εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό το μετασχηματισμό στελεχών *E. coli*. Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο απομονώθηκε και αφού πραγματοποιήθηκε γραμμικοποίηση του, ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ευκαρυωτικών κυττάρων του ζυμομύκητα *P.pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση. Η έκφραση της ετερόλογης αλληλουχίας από τα μετασχηματισμένα στελέχη *P.pastoris* μελετήθηκε σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, τα επίπεδα της βιομάζας ήταν ικανοποιητικά, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική ενεργότητα με υπόστρωμα το ABTS. Παρόλα αυτά, επιχειρήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης, και υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Επίσης, στα πλαίσια της βιοτεχνολογικής αξιολόγησης της εμπορικής λακκάσης, εξετάστηκε ο πολυμερισμός ορισμένων αρωματικών ενώσεων. Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας αυτής πραγματοποιήθηκε με βάση το μόριο της κατεχόλης, η δομή του οποίου είναι μια από τις απλούστερες από τις δομές των αρωματικών ενώσεων. Η βέλτιστη απόδοση των αντιδράσεων παρατηρήθηκε για θερμοκρασία ίση με 30°C και pH= 6. Εξετάστηκε, ακόμα και ο πολυμερισμός άλλων αρωματικών ενώσεων, όπως της πυρογαλλόλης, της κατεχίνης, του γαλλικού οξέος, της ανιλίνης, της υδροκινόνης, της κερσετίνης, καθώς και του καφεϊκού οξέος, με καταλύτη το ένζυμο

λακκάση. Για τις περισσότερες από αυτές τις ενώσεις λήφθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του πολυμερισμού της κατεχόλης.

Abstract

The present thesis focuses on both cloning and heterologous expression of a gene from the thermophilic fungus *M. thermophila* encoding a novel enzyme (laccase), as well as the use of the commercial laccase for polymerization reactions.

At first a procedure for the isolation of the total DNA from *M. thermophila* was performed. The nucleotide sequence of the gene was recovered from the Genome Portal database and this was followed by the in vitro quantitative amplification of the gene from the genomic DNA sample using polymerase chain reaction. The design of the primers was based on the nucleotide sequence that was going to be cloned with the aid of bioinformatics programs. The nucleotide sequence was inserted into the plasmid cloning vector pCR[®] Blunt via a ligation reaction and transformation of competent bacterial cells *E. coli* followed. The overlap extension polymerase chain reaction method was used to amplify the three coding regions of the gene and produce DNA fragments consisting of the three regions spliced together. The products were inserted into the pCR[®] Blunt vector in order to transform cells of the bacterium *E. coli*. The DNA sequence was isolated and inserted into the plasmid vector pPICZ α A and the recombinant plasmids were used to transform *E.coli* strains. After the isolation and the linearization of the recombinant plasmid, a procedure for transformation of eukaryotic cells of the yeast *P.pastoris* by electroporation was performed. The expression of the heterologous sequence in the modified strains was studied in small scale cultures. The study showed satisfactory levels of biomass growth, while no enzyme activity was detected when the enzyme was assayed in the presence of ABTS substrate. Nevertheless, an attempt to recover the protein was made.

In order to evaluate the biotechnological value of the commercial laccase, the polymerization of a variety of aromatic compounds was also studied. The optimization of this process was based on the molecule of catechol, which structure is one of the simplest of those of aromatic compounds. The optimum yield of the reactions observed in temperature equal to 30 ° C and pH = 6. Furthermore, the polymerization of other aromatic compounds such as pyrogallol, catechol, gallic acid, aniline, hydroquinone, quercetin, and caffeic was examined. For most of these compounds, the results that were obtained were similar to those of the polymerization of catechol.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	2
Περίληψη	3
Abstract.....	5
Θεωρητικό Μέρος.....	10
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	12
1.1 Θερμόφιλοι οργανισμοί – Θερμοάντοχα ένζυμα.....	12
1.2 Θερμόφιλος μύκητας : <i>Myceliophthora thermophila</i>	14
1.3 Λακκάσες: Θερμοάντοχα ένζυμα που εκφράζονται από τον <i>M.thermophila</i>	16
1.3.1 Λακκάσες : Μπλε οξειδωτικά ένζυμα χαλκού	16
1.3.2 Προέλευση λακκασών	17
1.3.3 Χαρακτηριστικά της δομής των λακκασών	17
1.3.4 Λειτουργία λακκασών.....	21
1.3.5 Βιομηχανικές εφαρμογές λακκασών.....	23
1.3.5.1 Οι λακκάσες ως εργαλεία για την οργανική σύνθεση	23
1.3.5.2 Οι λακκάσες ως εργαλεία για τη σύνθεση νέων υβριδικών μορίων και βιολογικών.....	24
1.3.5.3 Αντιδράσεις πολυμερισμού με λακκάσες	25
1.3.5.4 Εφαρμογές λακκασών για την παραγωγή βιολογικά ενεργών ενώσεων	27
1.3.5.5 Οι λακκάσες ως εργαλεία για την “πράσινη” βιομηχανία	28
Κεφάλαιο 2. Ετερόλογη έκφραση λακκασών	30
2.1 Ανάγκη για ανασυνδυασμένη πρωτεϊνική έκφραση	30
2.2 Συστήματα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών	31
Κεφάλαιο 3. Η χρήση του ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i> για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών.....	33
3.1 Ο μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας <i>P.Pastoris</i>	33
3.2 Επιλογή κατάλληλου υποκινητή.....	35

3.3 Μετασχηματισμός/ενσωμάτωση της αλληλουχίας στο χρωμόσωμα της ζύμης..	37
3.4 Έκκριση πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην <i>P. pastoris</i> ...	37
Πειραματικό Μέρος.....	41
Κεφάλαιο 4. Υλικά-Μέθοδοι.....	42
4.1 Συσκευές – Όργανα.....	42
4.2 Χημικά αντιδραστήρια- Εμπορικά ένζυμα	43
4.3 Διαλύματα.....	43
4.4 Μικροοργανισμοί	44
4.5 Θρεπτικά Μέσα.....	44
4.6 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης.....	46
4.6. 1 Πλασμιδιακός φορέας PCR® BLUNT (INVITROGEN)	46
4.6.2 Πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (Invitrogen)	47
4.7 Εκκινητές.....	49
4.8 Απομόνωση ολικού DNA από το μύκητα <i>M. thermophila</i>	50
4.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)	50
4.10 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	56
4.11 Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	57
4.12 Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)	57
4.13 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	59
4.14 Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)	61
4.15 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.....	62
4.15.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	62
4.15.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων	63
4.15.3 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων ζύμης <i>P.pastoris</i>	63
4.15.4 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P.pastoris</i>	64
4.16 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας	65

4.17 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών	65
4.18 Ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 66	
4.19 Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων	68
4.20 Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης	69
4.21 Υπολογισμός της ποσότητας της εμπορικής λακκάσης lcc1 για αντιδράσεις πολυμερισμού	70
4.22 Αντιδράσεις με κατεχόλη.....	71
4.22.1 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της λακκάσης.....	72
4.22.2 Επίδραση του χρόνου στην ενεργότητα της λακκάσης.....	72
4.22.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης	73
4.23 Διαδικασία απομόνωσης και μέτρησης του πολυμερούς	73
4.24 Έλεγχος για το σχηματισμό του πολυμερούς.....	74
Αποτελέσματα	75
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση	77
5.1 Ετερόλογη έκφραση	77
5.1.1 Απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου Mtlac2063133 του <i>M.thermophila</i> με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	77
5.1.2 Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	81
5.1.3 Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA και μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i>	83
5.1.4 Γραμμικοποίηση του πλασμιδίου pPICZaA και μετασχηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων <i>P.pastoris</i>	84
5.1.5 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου Mtlac2063133 σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	85
5.1.6 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης.....	86
5.2 Χρήση της εμπορικής λακκάσης lcc1 σε αντιδράσεις πολυμερισμού	87

5.2.1 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της λακκάσης.....	87
5.2.2 Επίδραση του χρόνου στην ενεργότητα της λακκάσης.....	89
5.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης	90
5.3 Πολυμερισμός της κατεχόλης.....	91
5.4 Πολυμερισμός της πυρογαλλόλης	94
5.5 Πολυμερισμός του γαλλικού οξέος	96
5.6 Πολυμερισμός ανιλίνης, υδροκινόνης, κερσετίνης, καφεϊκού οξέος.....	98
Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα - Μελλοντικές Προοπτικές	101
Παράρτημα	103
Βιβλιογραφία	106

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Θερμόφιλοι οργανισμοί – Θερμοάντοχα ένζυμα

Ο ρόλος των ενζύμων σε διάφορες διεργασίες είναι γνωστός εδώ και πολύ καιρό. Με την καλύτερη γνώση και τον καθαρισμό των ενζύμων, ο αριθμός των εφαρμογών τους έχει αυξηθεί σημαντικά, και κυρίως με τη χρήση των θερμοσταθερών ενζύμων, νέες βιομηχανικές εφαρμογές μπορούν να επιτευχθούν. Τα θερμοσταθερά ένζυμα έχουν μεγάλο βιοτεχνολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, διότι είναι καταλληλότερα σε βιομηχανικές διεργασίες, οι οποίες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες. Τα ένζυμα αυτά, τα οποία έχουν απομονωθεί κυρίως από θερμοφίλους οργανισμούς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, εξαιτίας της έμφυτης σταθερότητάς τους [Demirijan *et al.*, 2001]. Ενώ η πλειοψηφία των θερμοσταθερών ενζύμων χρησιμοποιείται στη βιομηχανία αμύλου [Roonam and Dalel, 1995; Crab and Mitchinson, 1997; Emmanuel *et al.*, 2000; Sarikaya *et al.*, 2000], ένας αριθμός άλλων διάφορων εφαρμογών αναπτύσσεται. Για παράδειγμα, στη βιομηχανία τροφίμων τα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση αμινοξέων [Satosi *et al.*, 2001], ενώ στη βιομηχανία πετρελαίου, χημικών και χάρτου έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξάλειψη των ρύπων που περιέχουν θείο μέσω της βιοαποικοδόμησης επιβλαβών ενώσεων [Bahrami *et al.*, 2001], καθώς και για την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από γλυκερίνη και την αντικατάσταση ρυπογόνων χημικών αντιδραστηρίων που προκαλούνται από τοξικά προϊόντα [Peter *et al.*, 2001].

Οι βασικοί λόγοι για την επιλογή θερμοσταθερών ενζύμων στις διεργασίες είναι η εγγενής τους (εσωτερική) θερμοσταθερότητα, η οποία συνεπάγεται δυνατότητες για παρατεταμένη αποθήκευση (σε θερμοκρασία δωματίου), η αυξημένη αντοχή σε οργανικούς διαλύτες [Kristjansson *et al.*, 1989], το μειωμένο ρίσκο κινδύνου μόλυνσης, καθώς και οι χαμηλές απώλειες δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους. Παρουσιάζουν, ακόμα, πολλά πλεονεκτήματα ως βιομηχανικοί καταλύτες, δεδομένου ότι σπάνια χρειάζονται τοξικά μεταλλικά ιόντα για τη λειτουργικότητά τους, δημιουργώντας έτσι τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν επεξεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον. Επίσης έχουν ένα προφανές πλεονέκτημα ως καταλύτες σε αυτές τις διαδικασίες, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες συχνά προωθούν την καλύτερη διείσδυση του ενζύμου και την αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος των πρώτων υλών [Paes *et al.*, 2006]. Είναι σε θέση να αντέχουν τις συχνά σκληρές συνθήκες της βιομηχανικής επεξεργασίας και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, και κατά συνέπεια έχουν σημαντικές δυνατότητες για πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Η χρήση αυτών των ενζύμων για τη βελτιστοποίηση αντιδράσεων, που πραγματοποιούνται στη βιομηχανία

τροφίμων και χάρτου, στα απορρυπαντικά, στα φάρμακα και στην απομάκρυνση των τοξικών αποβλήτων μελετάται εκτενώς.

Πολλές από αυτές τις αναφερθείσες διαδικασίες απαιτούν ένζυμα τα οποία είναι λειτουργικά σταθερά σε υψηλή θερμοκρασία επιτρέποντας έτσι την εύκολη ανάμιξη, την καλύτερη διαλυτότητα στο υπόστρωμα, την υψηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας, και τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης [Karlsson *et al.*, 2007]. Οι θερμοφίλοι οργανισμοί αποτελούν πηγές αυτών των βιομηχανικών θερμοσταθερών ενζύμων, διότι τα κυτταρικά τους συστατικά (ένζυμα, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) είναι επίσης θερμοσταθερά.

Οι μικροοργανισμοί, όπως και όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, προσαρμόζονται στις συνθήκες, στις οποίες πρέπει να ζήσουν και να επιβιώσουν. (Leuschner and Antranikian, 1995; Fredrich and Antrakian, 1996; Diane *et al.*, 1997; Zeikus *et al.*, 1998a,b). Γενικότερα, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε τέσσερις κύριες ομάδες με βάση τις βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξής τους, οι οποίες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 1.1 : Κατηγορίες μικροοργανισμών σε σχέση με τη θερμοκρασία ανάπτυξής τους [Brock TD *et al.*, 1986, [Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000], [Kristjansson & Stetter, 1992].

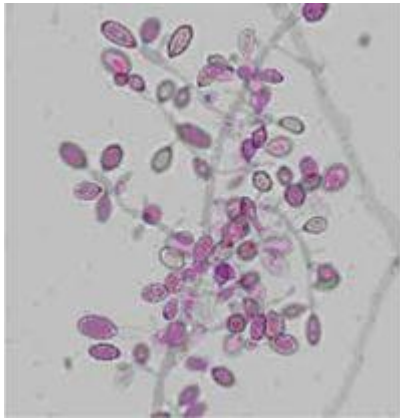
Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασίες ανάπτυξης
Ψυχρόφιλοι	<20 ° C
Μεσόφιλοι	20- 45 °C
Θερμόφιλοι	>55 ° C
Υπερθερμόφιλοι	>80 ° C

Σε βιομηχανικές εφαρμογές με θερμοφίλους οργανισμούς και θερμοσταθερά ένζυμα, τα απομονωμένα ένζυμα κυριαρχούν έναντι των μικροοργανισμών, διότι είναι πιο σταθερά και ενεργά σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τις βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης των μικροοργανισμών [Saboto *et al.*, 1999]. Οι περισσότερες, αλλά όχι όλες οι πρωτεΐνες από θερμοφίλους οργανισμούς είναι θερμοσταθερές. Τα εξωκυτταρικά ένζυμα εμφανίζουν γενικά υψηλή θερμική σταθερότητα, δεδομένου ότι δεν μπορούν να σταθεροποιηθούν με ειδικούς κυτταρικούς παράγοντες, όπως συμβατικούς διαλύτες [Santos *et al.*, 2002].

Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν από θερμοφίλους οργανισμούς μέσω είτε βελτιστοποιημένης ζύμωσης των μικροοργανισμών είτε κλωνοποίησης ταχέων αναπτυσσόμενων μεσόφιλων οργανισμών με τη χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA [Haki & Rakshit, 2003]. Ένας τέτοιος οργανισμός είναι και ο θερμοφίλος μύκητας *Myceliophthora thermophila*.

1.2 Θερμόφιλος μύκητας : *Myceliophthora thermophila*

Ο *M. thermophila* είναι ένας θερμόφιλος μύκητας, ο οποίος αναπτύσσεται βέλτιστα στο θερμοκρασιακό εύρος 45-50° C, αλλά όχι πάνω από 60°C. Ο *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile* και ο *Myceliophthora thermophila*, είναι, αντίστοιχα, το ανάμορφο και το τελειόμορφο στάδιο του ίδιου μύκητα. Ο μύκητας αυτός είναι ένας ετεροθαλλικός ασκομύκητας [Mouchacca *et al.*, 1997], που βρίσκεται στο ξύλο, στο άχυρο και σε φύλλα. Οι αποικίες του *M. thermophila* συνήθως απομονώνονται από το έδαφος ή από composts. Εδάφη υγρά, θερμαινόμενα από τον ήλιο αποτελούν ιδανικά μέρη για την ανάπτυξη του *M. thermophila*, επειδή δεν διαχέουν εύκολα τη θερμότητα και βοηθούν στην μόνωση της αποικίας. Ο ρυθμός ανάπτυξης στους 50°C υπολογίζεται σε 0.23 h⁻¹, ενώ στους 30°C σε 0.11 h⁻¹. Εκτός από το ρυθμό ανάπτυξης, παρατηρείται διαφορά και στη μορφολογία των αποικιών ανάλογα με τη θερμοκρασία, καθώς στους 30°C ο μύκητας αναπτύσσει μηκύλλιο μικρών διαστάσεων και δημιουργεί πρόωρα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής (κονίδια). [Maheshwari *et al.*, 2000]. Τα κονίδια αρχικά έχουν ομαλή επιφάνεια και είναι λευκά, ενώ όταν ωριμάσουν έχουν χρώμα σκούρο καφέ και τραχιά επιφάνεια [Chusid *et al.*, 2006].



Εικόνα 1.1 : Μορφή των κονιδίων του *M.thermophila* [Chusid et al., 2006].

Πρόσφατα έχει βρεθεί και η αλληλουχία του γονιδιώματός του, αποκαλύπτοντας το πλήρες φάσμα των ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιεί αυτός ο οργανισμός. Το γονιδίωμα του *M. thermophila* βρίσκεται στη βάση δεδομένων Genome Portal του Joint Genome Institute, University of California (<http://genome.jgi-psf.org/Spoth1/Spoth1.home>). Συνολικά έχει 9.296 γονίδια, 38.744.216 βάσεις DNA σε επτά γραμμικά χρωμοσώματα και 194 γονίδια RNA.



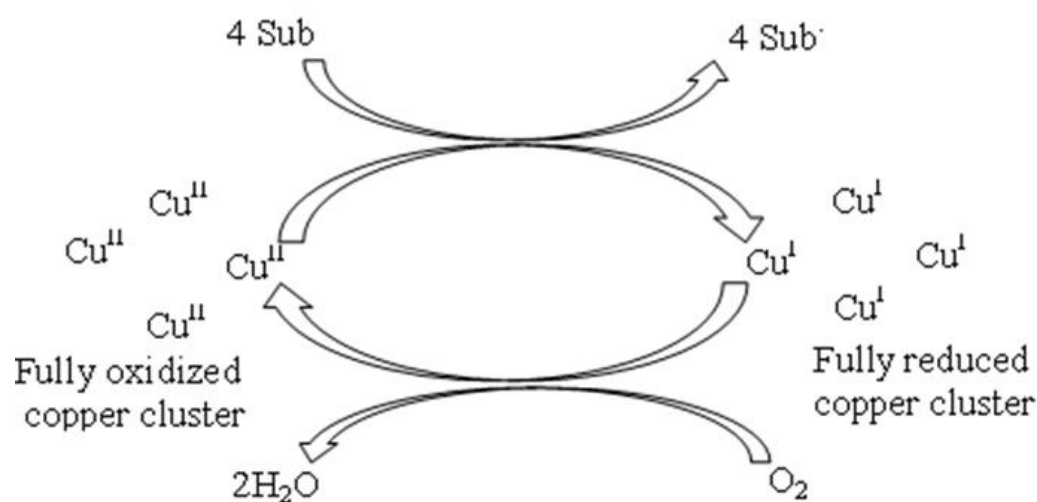
Εικόνα 1.2 : *Myceliophthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*)

Ο *M. thermophila* είναι μια εξαιρετική πηγή γονιδίων, που κωδικοποιούν εξωκυτταρικά θερμόφιλα ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά, καθώς και ο συνδυασμός ενζύμων, που προέρχονται από αυτό το είδος προωθούν την ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών για τα καύσιμα που προέρχονται από τη βιομάζα, για τα διάφορα χημικά και πολλές άλλες βιομηχανίες. Για παράδειγμα, οι κυτταρινάσες συντίθενται ταχύτατα από τον *M. thermophila*. Ο *M. thermophila* μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης σε απλούς υδατάνθρακες. Εκτός όμως από τις κυτταρινάσες, ένα γονίδιο που προέρχεται από *M. thermophila* χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να δημιουργηθεί ένα ένζυμο, η λακκάση και να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα φροντίδας του στόματος για την πρόληψη της κακοσμίας του στόματος [Brinch & Pedersen,2001]. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να βρεθεί σε προϊόντα όπως οδοντόκρεμα, στοματικό διάλυμα, και μέντες. Επίσης, οι λακκάσες μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα για επιβλαβή χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία χάρτου, χαρτοπολτού και κλωστοϋφαντουργίας. Οι λακκάσες, αν και είναι μια ομάδα ενζύμων με μικρή ιστορία στο χώρο της βιοτεχνολογίας, το πλήθος των εφαρμογών τους, τις καθιστά ένζυμα ελκυστικά προς μελέτη της παραγωγής και ταυτοποίησή τους.

1.3 Λακκάσες: Θερμοάντοχα ένζυμα που εκφράζονται από τον *M.thermophila*

1.3.1 Λακκάσες : Μπλε οξειδωτικά ένζυμα χαλκού

Οι λακκάσες (EC 1.10.3.2) είναι οξειδωτικά ένζυμα που περιέχουν τέσσερα ιόντα χαλκού σε δύο ενεργές περιοχές. Οι λακκάσες που αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη υποομάδα των μπλε οξειδασών με πολλαπλά ιόντα χαλκού (multi-copper oxidase), χρησιμοποιούν τη χαρακτηριστική ικανότητα οξειδοαναγωγής των ιόντων αυτών για να καταλύουν την οξείδωση ενός ευρέος φάσματος αρωματικών υποστρωμάτων, παράλληλα με την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Οι λακκάσες είναι ικανές να καταλύουν την άμεση οξείδωση των ορθο- και παραδιφαινολών, των αμινοφαινολών, των πολυφαινολών, των πολυαμινών, των διαμινών, καθώς και μερικών ανόργανων ιόντων. Μεταξύ περισσότερων από 200 είδη οξειδασών και οξυγενασών, μόνο έξι κατηγορίες ενζύμων είναι ικανές να καταλύουν αυτού του τύπου αντίδραση του οξυγόνου (οξειδάση του κυτοχρώματος c, λακκάσες, οξειδάση L-ασκορβικού, σερουλοπλασμίνη, οξειδάση χολερυθρίνης, και συνθάση φενοξαζινόνης) [Giardina *et al.*, 2009]. Εκτός από τις λακκάσες (EC 1.10.3.2), η οξειδάση του ασκορβικού οξέος (EC 1.10.3.3), η φεροξειδάση (EK 1.16.3.1), η νιτρώδη αναγωγάση (EK 1.7.2.1) και η σερουλοπλασμίνη (EK 1.16.3.1) είναι όλα τα μέλη αυτής της οξειδωτικής υπεροικογένειας πολυ-χαλκού.



Εικόνα 1.3 : Διαγραμματική παρουσίαση της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό

1.3.2 Προέλευση λακκασών

Η λακκάση ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από το σφρίγγος του ιαπωνικού δέντρου λάκα *Rhus vernicifera*. Από τότε οι λακκάσες έχουν βρεθεί σε διάφορους βασιδιομύκητες και ασκομύκητες, και επιπλέον οι λακκάσες που προέρχονται από μύκητες θεωρούνται η πιο σημαντική ομάδα των οξειδασών με πολλαπλά ιόντα χαλκού σε σχέση με τον αριθμό και την έκταση του χαρακτηρισμού τους. Στους μύκητες, διεξάγουν μια ποικιλία φυσιολογικών ρόλων, συμπεριλαμβανομένου τη μορφογένεση και την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλους τους μύκητες, από αυτούς που έχουν αναλυθεί μέχρι σήμερα, που καταναλώνουν ξύλο και είναι σχεδόν πανταχού παρόντος ένζυμα, καθώς έχουν απομονωθεί από φυτά, από μερικά είδη βακτηρίων, καθώς και από έντομα.

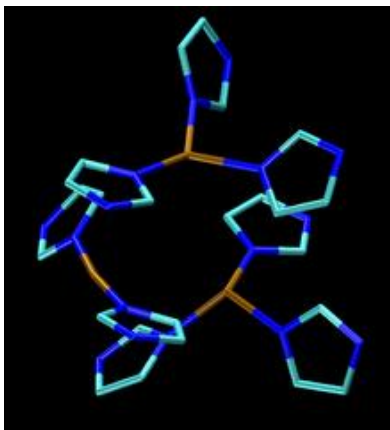
Βρίσκονται κυρίως σε λιγνινολυτικούς βασιδιομύκητες (*Phanerochaete*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Nematoloma*, *Sporotrichum*, *Stropharia*). Η παρουσία τους στους προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι περιορισμένη σε ορισμένα μόνο είδη (*Aquifex*, *Pyrobaculum*, *Azospirillum*, *Sinorhizobium*, *Marinomonas*, *Ralstonia*, *Streptomyces* ή *Bacillus*).

Στα φυτά, έχουν βρεθεί στο ξύλο και τα κυτταρικά τοιχώματα των ποωδών ειδών, όπου συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της λιγνίνης. Οι βακτηριακές λακκάσες φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στην μορφογένεση, στη βιοσύνθεση της καφέ σπορίων και στην προστασία που παρέχεται από το παλτό σπορίων ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία, στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και στην ομοιόσταση του χαλκού.

1.3.3 Χαρακτηριστικά της δομής των λακκασών

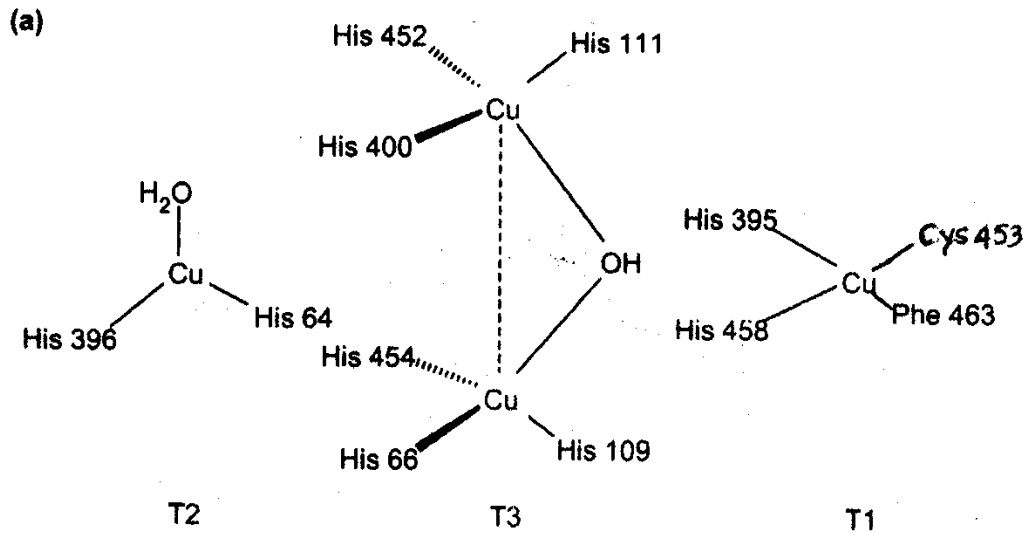
Η πλειοψηφία των μυκητιακών λακκασών είναι εξωκυτταρικές μονομερείς σφαιρικές γλυκοπρωτεΐνες των περίπου 60-70 kDa με ένα όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) περίπου pH 4,0. Γενικά γλυκοζυλιώνονται με ένα βαθμό γλυκοζυλίωσης μεταξύ 10 και 25% και μόνο σε λίγες περιπτώσεις μεγαλύτερο από 30% [Giardina et al., 2009]. Το τυπικό περιεχόμενο των λακκασών περιλαμβάνει ένα τύπου-1 (T1) (Cu^1), ένα τύπου-2 (T2) και δύο τύπου-3 (T3) ιόντα χαλκού (Cu^2 and Cu^3), με τα ιόντα χαλκού Cu^2 και Cu^3 να διατάσσονται σε ένα τριπυρηνικό σύμπλεγμα (TNC). Οι τρεις τύποι χαλκού μπορούν να διακριθούν μέσω φασματομετρίας UV-Vis. Ο τύπος 1 χαλκού στην οξειδωμένη του κατάσταση είναι υπεύθυνος για το μπλε χρώμα της λακκάσης, που απορροφά στα 610 nm. Μπορεί να μετατοπιστεί από τον υδράργυρο και να υποκατασταθεί από το κοβάλτιο. Απομάκρυνση του τύπου 1 χαλκού προκαλεί μείωση της δραστηριότητας της λακκάσης. Το κυάνιο μπορεί να αφαιρέσει όλο το χαλκό από το ένζυμο, παρόλα αυτά η εκ νέου ενσωμάτωση του τύπου 1 και

του τύπου 2 χαλκού έχει αποδειχθεί ότι είναι αδύνατη . Ωστόσο, ο τύπου 3 χαλκός μπορεί να ενσωματωθεί εκ νέου στο ένζυμο. [Giardina *et al.*, 2009]



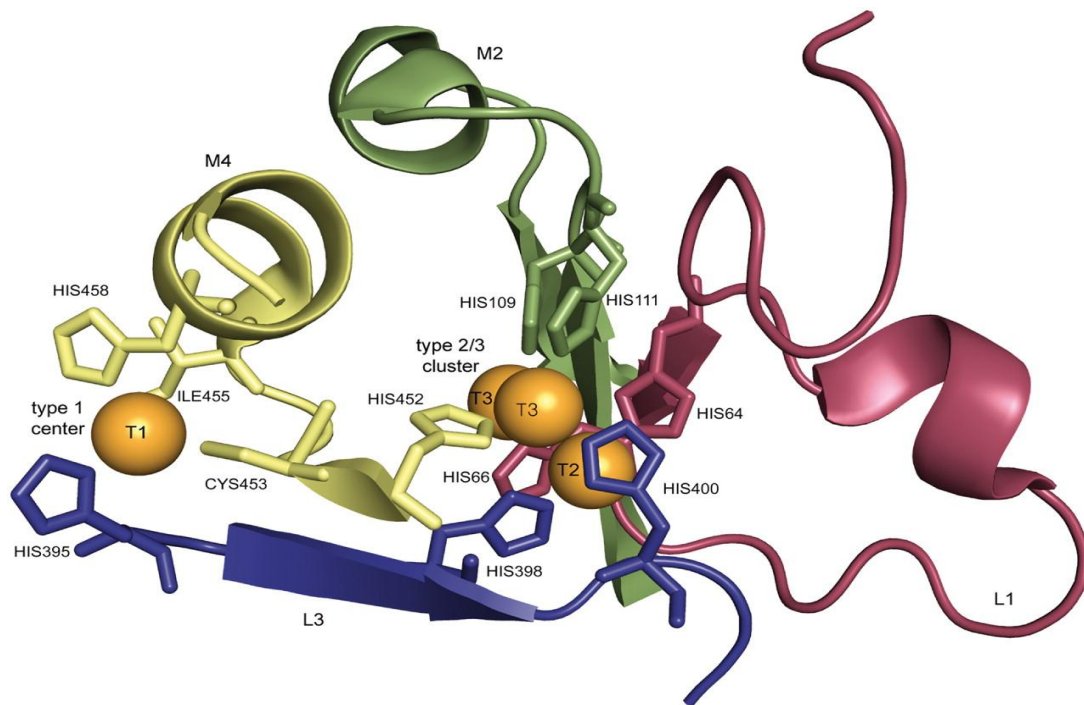
Εικόνα 1.4 : Τριπυρηνικό σύμπλεγμα λακασών. Κάθε κέντρο χαλκού δεσμεύεται από πλευρικές αλυσίδες ιστοιδίνης. (κέντρα χαλκού : καφέ, άζωτο: μπλε)

Οι οξειδάσες πολλαπλών ιόντων χαλκού ανήκουν σε μία πρωτεϊνική υπεροικογένεια ενζύμων που οξειδώνουν τα υποστρώματα σε ένα μονοπυρηνικό κέντρο T1 χαλκού. Τα ηλεκτρόνια από την T1 περιοχή χαλκού μεταφέρονται εσωτερικά στο τριπυρηνικό κέντρο χαλκού T2/T3, όπου λαμβάνει χώρα αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τέσσερα ηλεκτρόνια, αποδίδοντας δύο μόρια νερού. Το T1 άτομο χαλκού δεσμεύεται από δύο κατάλοιπα ιστοιδίνης και ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, τα οποία σχηματίζουν έναν μεταλλο-οργανικό δεσμό. Επιπλέον, οι πλευρικές αλυσίδες μιας μεθειονίνης, μια λευκίνη ή ισολευκίνη είναι σε κοντινή εγγύτητα με τον χαλκό T1. Το άτομο χαλκού T2 του τριπυρηνικού κέντρου συντονίζεται από δύο συνδέτες ιστοιδίνης, ενώ οι δύο χαλκοί T3 έχουν συνολικά έξι συνδέτες ιστοιδίνης.



Εικόνα 1.5 : Τρεις διαφορετικές περιοχές οξειδοαναγωγής των τεσσάρων ατόμων χαλκού στις λακκάσες

Ανάλυση των βασικών χαρακτηριστικών της αλληλουχίας των μυκητιακών λακκασών, η οποία βασίστηκε σε πολλαπλές αλληλουχίες περισσότερων από 100 λακκασών, έχει ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση ενός συνόλου από τέσσερα διαστήματα περιοχών αλληλουχίας, L1-L4, χρήσιμα για να προσδιορίσουν τις λακκάσες και να τις διακρίνουν από την ευρύτερη κατηγορία των οξειδάσων με πολλαπλά ιόντα χαλκού (multi copper oxidase). Πιο συγκεκριμένα, οι περιοχές L2 και L4 βρίσκονται σε όλες τις οξειδάσες με πολλαπλά ιόντα χαλκού, ενώ οι L1 και L3 είναι χαρακτηριστικές για τις λακκάσες. Οι περιοχές αλληλουχίας της λακκάσης L1-L4 περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα του 12^{ου} αμινοξέος που δρουν ως συνδέτες χαλκού. [Kumar *et al.*, 2003]



Εικόνα 1.6 : Συνδετικά κατάλοιπα χαλκού της λακκάσης από *Trametes versicolor* [PDB entry 1GYC]. Τα κέντρα χαλκού παρουσιάζονται με πορτοκαλί, τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις περιοχές L1, M2, L3, M4 με ροζ, πράσινο, μπλε και κίτρινο αντίστοιχα (PyMOL)

A						
<i>B. subtilis</i> CotA	100	VKTVV HLH GGVTP	112	148	AILWY HDH AMALT	160
<i>B. pumilus</i>	98	VKTVV HLH GGVTP	110	146	CTLWY HDH AMALT	158
<i>G. forsetii</i>	120	AESIV HWH GLHVS	132	160	GTYW FHPH PHRHT	172
<i>M. tractuosa</i>	118	EESIV HWH GMHVP	130	158	GTYW FHPH PHGRT	170
<i>S. linguale</i>	156	EESNI HWH GLLVP	168	156	NMAWY HHPH PHEKT	168
<i>E. coli</i> CueO	96	EETTL HWH GLEVP	108	136	ATCWF HHPH QHGKT	148
<i>S. pristinaespiralis</i>	108	VPVSL HHPH GVDYD	120	162	GYWHY HDH VVGTD	174
<i>S. griseus</i> EpoA	97	VDASL HVH GVDYD	109	151	GYWHY HDH VVGTD	163
<i>T. versicolor</i>	59	KSTSI HWH GFFQK	71	104	GTFWY HS HLSTQY	116
<i>M. thermophila</i>	131	NGTSI HWH GLHQK	143	176	GTSWY HS HFSAQY	188
<i>R. vernificera</i>	54	YGLTI HWH GVKQP	66	99	GTLWW HA HSDWTR	111
<i>Cucurbita</i> AsOX	55	EGVVI HWH GILQR	67	99	GTFFY HGH LGMQR	111
<i>B. subtilis</i> CotA	414	PTRGTH PIHL HLVSR	429	488	YVW HCH ILEHEDYD	504
<i>B. pumilus</i>	414	PTRGTH PIHL HLVQR	429	488	YVW HCH ILEHEDYD	504
<i>G. forsetii</i>	472	MMQMP HPVHI HQLQFN	487	538	FLY HCH NLEHEDMGM	555
<i>M. tractuosa</i>	477	MMQMP HPIHI HQVQFN	492	543	FVY HCH NLEHEDMGM	559
<i>S. linguale</i>	418	KGDEP HPMHL HGTFFQ	433	474	FVF HCH NLEHEDDGM	492
<i>E. coli</i> CueO	448	GDMML HPFHI HGTQFR	463	496	YMA HCH LLEHEDTGM	512
<i>S. pristinaespiralis</i>	247	HGEYY HTFHM HGHRWA	252	295	WMY HCH VQSHSDMGM	311
<i>S. griseus</i> EpoA	226	HGEFY HTFHI HGHRWA	241	284	WMY HCH VQSHSDMGM	300
<i>T. versicolor</i>	395	APGAP HPFHL HGHAF	405	449	WFL HCH IDFHLLEAGFAV	465
<i>M. thermophila</i>	469	PFTLP HPMHL HGHDFY	484	542	WLF HCH IAWHVSGGLGV	558
<i>R. vernificera</i>	428	GAATS HPMHL HGFNFY	443	492	WFL HCH FERHTTEGM	508
<i>Cucurbita</i> AsOX	440	NLSET HPWHL HGHDFW	455	503	WAF HCH IEPHLHMG	519

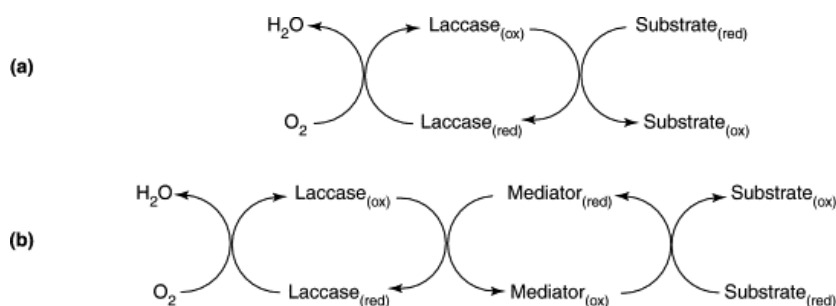
Εικόνα 1.7 : Ανάλυση της δομής βακτηριακών, μυκητιακών και φυτικών λακκασών, Πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών δέσμευσης του χαλκού από βακτηριακές, μυκητιακές και φυτικές λακκάσες. Φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης στα οποία δεσμεύονται τα ιόντα χαλκού.

1.3.4 Λειτουργία λακκασών

Οι λακκάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία μπορεί να εκκρίνεται ή να είναι ενδοκυτταρική, είναι διαφορετική στους διάφορους οργανισμούς, αλλά όλες καταλύουν διεργασίες πολυμερισμού ή αποπολυμερισμού. Στα φυτά παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και, μαζί με τις υπεροξειδάσες, στη λιγνιτοποίηση. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι λακκάσες είναι μεταξύ των βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στις διαδικασίες απολιγνιτοποίησης από μύκητες λευκής σήψης.

Στις αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται με λακκάσες, λαμβάνει χώρα οξειδωση ενός κατάλληλου μορίου υποστρώματος (φαινόλες και αρωματικές ή αλειφατικές αμίνες) στην αντίστοιχη δραστική ρίζα. Όπως έχει αναφερθεί, η οξειδοαναγωγική διαδικασία λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια του συμπλέγματος που αποτελείται από τα τέσσερα άτομα χαλκού, τα οποία σχηματίζουν τον καταλυτικό πυρήνα του

ενζύμου. Επίσης, είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα αυτών των ενζύμων, εξαιτίας της έντονης απορρόφησης τους από τους δεσμούς Cu–Cu. Το συνολικό αποτέλεσμα του καταλυτικού κύκλου είναι η αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου σε δύο μόρια νερού και η παράλληλη οξείδωση των τεσσάρων μορίων υποστρωμάτων για την παραγωγή τεσσάρων ριζών. Αυτά τα ενεργά ενδιάμεσα μπορούν έπειτα να παράγουν διμερή, ολιγομερή, καθώς και πολυμερή. Η πιο απλή περίπτωση είναι αυτή που τα μόρια του υποστρώματος οξειδώνονται στις αντίστοιχες ρίζες, με απευθείας αλληλεπίδραση του συμπλέγματος χαλκού (σχήμα 1α). Ωστόσο, είναι συχνό φαινόμενο τα υποστρώματα να μην οξειδώνονται απευθείας από τις λακκάσες, είτε επειδή είναι πολύ μεγάλα για να εισχωρήσουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είτε επειδή έχουν υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής. Μιμούμενα τη φύση, είναι πιθανό να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα, με την προσθήκη των λεγόμενων χημικών μεσολαβητών’’, οι οποίες είναι ενώσεις που δρουν ως ενδιάμεσα υποστρώματα για τις λακκάσες, και των οποίων η οξειδωμένη μορφή είναι ικανή να αλληλεπιδρά με το ογκώδες ή το υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των υποστρωμάτων – στόχων (σχήμα 1β). [Riva *et al.*, 2006]



Εικόνα 1.8 : Σχηματική απεικόνιση των οξειδοαναγωγικών κύκλων για την οξείδωση υποστρωμάτων καταλυόμενη με λακκάση με την απουσία (α) ή την απουσία (β) χημικών μεσολαβητών

Οι χημικοί μεσολαβητές μπορούν να διευρύνουν τη μεγάλη ποικιλία των οξειδωτικών αντιδράσεων που καταλύει η λακκάση. Κατάλληλοι μεσολαβητές οξειδοαναγωγής είναι καλά υποστρώματα για τη λακκάση, των οποίων οι οξειδωμένες μορφές έχουν αρκετό χρόνο ημιζωής για να επιτραπεί η διάχυση τους προς άλλα μη-οξειδώσιμα υποστρώματα για τη λακκάση (μη-φαινολικά

υποστρώματα ή μεγάλα μόρια), και διαθέτουν υψηλό δυναμικό οξειδωσης για να επιτρέψει στη λακκάση να τα οξειδώσει έμμεσα [Piscitelli & Pezzella, 2010].

1.3.5 Βιομηχανικές εφαρμογές λακκασών

Ένας αριθμός εφαρμογών για τις λακκάσες έχουν προταθεί σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως η κλωστοϋφαντουργία, τα τρόφιμα, η βιομηχανία χάρτου και χαρτοπολτού, η φαρμακευτική, η χημεία, η νανο-βιοτεχνολογία, καθώς και τα καλλυντικά. Στις περισσότερες από αυτές τις εφαρμογές, χρησιμοποιούνται μαζί με ένα χημικό μεσολαβητή. Οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λεύκανση υφασμάτων, για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων φαινολικών, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αμαύρωση, την εξάλειψη του σχηματισμού θολώματος και της ανάπτυξης θολότητας στους χυμούς φρούτων, τη μπίρα και το κρασί. Είναι επίσης χρήσιμες στη σύνθεση διαφόρων λειτουργικών οργανικών ενώσεων, όπως φάρμακα και βαφές, στη παραγωγή διαφόρων πολυμερών, στη παραγωγή ενέργειας σε βιοκαύσιμο από κύτταρα και σε βαφές μαλλιών. Όσον αφορά στη βιοαποκατάσταση, εφαρμόζονται στον αποχρωματισμό κλωστοϋφαντουργικών λυμάτων, στην αποικοδόμηση των πλαστικών απορριμμάτων που περιέχουν ολεφίνες, στην εξάλειψη της οσμής που εκπέμπεται από χώρους διάθεσης απορριμμάτων ή ζωικών αγροκτημάτων, στην απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων από ελαιόλαδο και στην απολύμανση εδαφών από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες(ΡΑΗ). [Piscitelli&Pezzella,2010]. Τέλος, χρησιμοποιούνται και για την κατασκευή των πωμάτων φελλού, όπου εκεί το ένζυμο μειώνει τη χαρακτηριστική γεύση του φελλού που συχνά μεταδίδεται στα πολυκαιρισμένα εμφιαλωμένα κρασιά. Προς το παρόν, οι κυριότερες τεχνολογικές εφαρμογές τους είναι στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας, των βαφών και των διαδικασιών που σχετίζονται με αποχρωματισμό των βαφών. [Riva *et al.*, 2006]

1.3.5.1 Οι λακκάσες ως εργαλεία για την οργανική σύνθεση

Οι αντιδράσεις με λακκάσες πραγματοποιούνται με σχηματισμό μιας ρίζας κατιόντος, με επακόλουθη αποπρωτονίωση της υδροξυ-ομάδας για την παραγωγή μία ρίζας. Η ρίζα αυτή μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί στο σχηματισμό ενός παραγώγου κινόνης ή να παράγει από μόνη της όμοια μοριακά διμερή. Αυτά τα διμερή μπορούν να είναι C-O ή C-C. Αυτές οι διμερείς αντιδράσεις σχηματισμού αναφέρονται ως "οξειδωτική σύζευξη". Μετά από κάποιο χρόνο αντίδρασης, τα ολιγομερή και πολυμερή μπορούν να δημιουργούνται από τα διμερή. Οι λακκάσες, ακόμα, μπορούν να ενώσουν ένα υπόστρωμα λακκάσης

(αρωματική ή υδροξυλική ομάδα) με ένα υπόστρωμα χωρίς λακκάση για τη δημιουργία νέων ετερομοριακών υβριδικών μορίων. Η αντίδραση αυτή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό φαινολικών δομών ή δομών κινόνης.

Άλλες αντιδράσεις περιλαμβάνουν οξείδωση του φαινολικού υποστρώματος καταλήγοντας σε οξειδωμένα υποστρώματα λακκάσης, οξειδωτική διάσπαση με αποτέλεσμα αποκαρβοξυλίωση, με αποτέλεσμα αποκαρβοξυλιωμένα υποστρώματα λακκάσης. Η σύνθεση νέων υβριδικών μορίων απαιτεί τον σχηματισμό καθορισμένων διμερών ή τριμερών. Ωστόσο, οι ρίζες που σχηματίζονται τείνουν να πολυμερίζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζονται απροσδιόριστα προϊόντα υψηλού μοριακού βάρους. Χρησιμοποιώντας καθορισμένες συνθήκες της αντίδρασης (π.χ. μικρό χρόνο αντίδρασης, συγκεκριμένες μοριακές συγκεντρώσεις και pH), ο ανεπιθύμητος πολυμερισμός μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, και έτσι να παράγονται μόνο τα επιθυμητά διμερή και τριμερή. [Mikolasch & Schauer, 2009].

1.3.5.2 Οι λακκάσες ως εργαλεία για τη σύνθεση νέων υβριδικών μορίων και βιολικών

Ο βιολογικός ρόλος των λακκασών ποικίλει από τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης, του άνθρακα και χουμικών οξέων, μέχρι και αντιδράσεων πολυμερισμού και σχηματισμό χρωστικής σε μικροβιακά κύτταρα και σπόρια. Πέρα από την δράση τους σε διεργασίες καταβολισμού, πολυμερισμού και αποπολυμερισμού, οι λακκάσες είναι ένζυμα ικανά να σχηματίσουν από δύο διαφορετικά μόρια, νέα χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα με υψηλές αποδόσεις. Έχουν πολλές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία, λόγω της φιλικής προς το περιβάλλον σύνθεσης χημικών και άλλων βιολογικά ενεργών ουσιών, όπως αντιβιοτικά, αμινοξέα και αντιοξειδωτικά. Επίσης, οι αντιδράσεις ολιγομερισμού και πολυμερισμού μπορούν να οδηγήσουν σε νέα ομοπολυμερή, ετεροπολυμερή και βιολικά. Αυτά είναι χρήσιμα σε πολλές εφαρμογές, όπως στην παραγωγή πολυμερών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, το συμπολυμερισμό συστατικών της λιγνίνης με ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, την επικάλυψη κυτταρικών ινών, τη βαφή μαλλιών και δερμάτων, καθώς και τον ολιγομερισμό πεπτιδίων. [Mikolasch & Schauer, 2009]

Επιπροσθέτως, μαζί με την υπεροξειδάση της λιγνίνης (lignin peroxidase) και την υπεροξειδάση του μαγγανίου (manganese peroxidase), είναι ένα λιγνινολυτικό ένζυμο. Ως αποτέλεσμα της οξείδωσης από τη λακκάση, οι ρίζες (κατιόντα) μπορούν να παραχθούν σε λιγνίνη, και αυτό μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση αλειφατικών ή αρωματικών δεσμών C-C και τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης. Επιπλέον, οι δι- και πολυυδροξυλιωμένες μονοαρωματικές, μεθοξυφαινολικές μονουδροξυλιωμένες βιαρλικές ενώσεις (υποστρώματα της λακκάσης), όπως υδροκινόνη, κατεχόλη, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ ή υδροξυλιωμένες διφαινόλες μπορούν να οξειδωθούν από λακκάσες [Mikolasch & Schauer, 2009].

Δεδομένου της ευελιξίας και της εξειδίκευσης τους σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, οι λακκάσες ως μια οικογένεια οξειδασών που περιέχει χαλκό και καταλύει μια πληθώρα υποστρωμάτων, μπορούν να γίνουν ένας από τους πιο σημαντικούς βιοκαταλύτες στη βιοτεχνολογία. Επίσης, οι αποτελεσματικές τεχνικές ακινητοποίησης μπορούν να μειώσουν το κόστος των τεχνικών που βασίζονται στις λακκάσες. Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για αυτό, όπως ακινητοποίηση σε μήτρα πολυαμιδίου, σε μαγνητικό διαχωρισμό σε σφαιρίδια silica, σε νανοσωματίδια και καολίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ακινητοποίηση οδηγεί σε αυξημένη ενζυμική σταθερότητα και αυξημένη αντίσταση στις αλλαγές του pH και της θερμοκρασίας. Η υψηλή σταθερότητα των λακκάσων στο διάλυμα, οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης, και η αποφυγή τοξικών διαλυτών, προσθέτων ή καταλυτών, καθιστούν τις λακκάσες ένζυμα ελκυστικά για χημική σύνθεση [Mikolasch & Schauer, 2009].

1.3.5.3 Αντιδράσεις πολυμερισμού με λακκάσες

Η απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων από τα υγρά απόβλητα είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για πολλές χημικές βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων του χαρτιού, της κλωστοϋφαντουργίας, τη μετατροπή του άνθρακα, τη διύλιση πετρελαίου, των χρωστικών ουσιών, καθώς και άλλων πηγών. [Atlow *et al.*, 1984; Buchanan *et al.*, 1998]. Επιπλέον, πολλές από τις φαινόλες και τα παράγωγά τους θεωρούνται επικίνδυνοι ρύποι. Η εκχύλιση διαλύτη, η μικροβιακή αποικοδόμηση, η προσρόφηση ενεργού άνθρακα και η χημική οξείδωση είναι μερικές από τις πιο συμβατικές μεθόδους που απαιτούνται για την απομάκρυνση φαινολών από τα βιομηχανικά απόβλητα [Buchanan and Nicell, 1997; Atlow *et al.*, 1984]. Ωστόσο, η μείωση του κόστους της επεξεργασίας και η ανάπτυξη ενεργειακά αποδοτικών διαδικασιών επεξεργασίας είναι απαραίτητες. Για την κάλυψη αυτής της ανάγκης, έχει δοθεί έμφαση στην πράσινη τεχνολογία, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης των ενζύμων για την επεξεργασία των λυμάτων και την απομάκρυνση των αρωματικών ενώσεων μέσω του πολυμερισμού [Buchanan and Nicell, 1999]. Ο ενζυμικός πολυμερισμός είναι μία εφαρμογή, η οποία έχει επιστήσει ιδιαίτερη προσοχή, εξαιτίας της ικανότητάς της να σχηματίζει πολυμερή, τα οποία είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω της συμβατικής σύνθεσης. Ως αποτέλεσμα, η χρήση αυτών των διεργασιών θα μπορούσε δυνητικά να παράγει πολυμερή πρωτότυπων δομών και ιδιοτήτων [Akkara *et al.*, 1996; Kobayashiet *et al.*, 1996]. Μόνο λίγα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων της υπεροξειδάσης κρένου (HRP) [Dordick *et al.*, 1987; Kazandjian *et al.*, 1986; Kurioka *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 1999], της υπεροξειδάσης σόγιας (SBP) [Uyama *et al.*, 1995; Kinsley and Nicell, 2000], της οξειδάσης bilirubin [Aizawa and Wang, 1996], της τυροσινάσης [Krastanov, 2000; Atlow *et al.*, 1984], της λακκάσης [Aktas_ *et al.*, 2000; Milstein *et al.*, 1989, 1994; Ikada *et al.*, 1996] και της λυπάσης [Ajima *et al.*, 1985; Okumura

et al., 1984; Uyama *et al.*, 1999), έχει αποδειχθεί ότι καταλύουν τον πολυμερισμό των μονομερών, όπως των φαινολών και των παραγώγων τους σε πολυμερή [Kobayashi *et al.*, 1995].

Η κατεχόλη, η κατεχίνη, καθώς και η πυρογαλλόλη είναι αρωματικές ενώσεις, των οποίων ο πολυμερισμός μπορεί να καταλυθεί με λακκάσες. Πιο συγκεκριμένα, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι της κατεχόλης μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό πολυμερών υλικών για φιλμ, τα οποία αξιοποιούνται σε ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών στους βιοαισθητήρες [Dubey *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1998]. Πολυφαινόλες, όπως η πολύ(κατεχόλη) με υψηλά συζευγμένες δομές έχουν εφαρμογές στον τομέα της μικροηλεκτρονικής, της μη-γραμμικής οπτικής και στους αισθητήρες, εξαιτίας της καλής θερμικής τους σταθερότητας και της μηχανικής τους αντοχής. Η ενζυμική σύνθεση των πολυφαινολών έχει γίνει χρησιμοποιώντας οξειδοαναγωγάσες, κυρίως με υπεροξειδάση horseradish (HRP) και κατά ένα μικρότερο βαθμό, χλωροϋπεροξειδάση (CPO), υπεροξειδάσες σόγιας (SBP) και λακκάσες. Το ένζυμο που μεσολαβεί στη σύνθεση των πολύ(φαινολών) έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις χημικές οδούς, όπως είναι οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης απουσία τοξικών καταλυτών η χρήση φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών. Ομοίως με τις υπεροξειδάσες, στις λακκάσες, η εκλεκτικότητα της σύζευξης μπορεί να ελεγχθεί από την επιλογή των συνθηκών αντίδρασης και από τα μονομερή. Το pH που συχνά αναφέρεται για τη βέλτιστη δραστηριότητα της λακκάσης από μύκητα είναι βασικό. Σε γενικές γραμμές, οι βέλτιστες δραστηριότητες της λακκάσης στην οξείδωση φαινολικών υποστρωμάτων έχουν αναφερθεί σε pH 5, ακριβώς πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο της.

Η πολυ(κατεχίνη) είναι ακόμα μια ένωση, η οποία έχει συντεθεί αποτελεσματικά μέσω πολυμερισμού καταλυόμενο με υπεροξειδάση horseradish (HRP) σε υδατική μεθανόλη. Το πολυμερές παρουσίασε σημαντικά ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα μονομερή της κατεχίνης. Επίσης, ενζυμική οξείδωση της κατεχίνης από υπεροξειδάση, τυροσινάση και λακκάση έχει ερευνηθεί ως πρότυπο του φαινομένου της ενζυματικής αμαύρωσης των λαχανικών και φρούτων. Η κατεχίνη, ένα συστατικό του πράσινου τσαγιού και του κρασιού, ανήκει στα флаβονοειδή, τα οποία είναι από τις πιο μελετημένες ομάδες των φυτικών πολυφαινολών. Ορισμένες έρευνες πρότειναν ότι τα προϊόντα που σχηματίζονται από κατεχίνη έχουν πιο σημαντική δραστηριότητες από την ίδια την κατεχίνη.

Επίσης, εκτός από την παραγωγή πολυμερών κατεχόλης και κατεχίνης, δυνατή είναι και η παραγωγή (πολυ)πυρογαλλόλης. Πιο συγκεκριμένα, έχουν γίνει μελέτες, στις οποίες λαμβάνει χώρα οξειδωτικός πολυμερισμός πυρογαλλόλης, που καταλύεται με λακκάση σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα σε κλειστό σύστημα και με

ελεγχόμενη θερμοκρασία και pH [Güresir *et al.*, 2004]. Έτσι, με εφαρμογή της λακκάσης ως καταλύτη, ο πολυμερισμός της πυρογαλλόλης, αλλά και άλλων φαινολικών υποστρωμάτων, μπορεί να είναι μια εναλλακτική διεργασία για το σχηματισμό πολυμερών με πρωτότυπες δομές.

Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμα και για τις διαδικασίες πολυμερισμού για το σχηματισμό χρωστικών σαν τη μελανίνη (melaninlike). Οι πολυφαινόλες αποτελούν βασικά συστατικά του φυσικού δέρματος και των χρωστικών των μαλλιών και μπορούν να πολυμεριστούν ενζυμικά για να δημιουργήσουν νέες εκδοχές της φυσικής μαύρης, καφέ και πορτοκαλί μελανίνης. Χρησιμοποιώντας διϋδροξυαφθαλίνες ως υποστρώματα, για παράδειγμα, μπορεί το δέρμα να χρωματιστεί με δράση λακκάσης. Επιπλέον, μάλλινες ίνες και κυτταρικές ίνες βαμβακιού μπορούν να βαφούν με την παρουσία λακκάσης και κατάλληλων υποστρωμάτων. Η επίστρωση λιγνοκυτταρικού υλικού δε μπορεί μόνο να χρωματίσει την επιφάνεια, αλλά να της δώσει και αντιμικροβιακές ιδιότητες. [Mikolasch & Schauer, 2009]

1.3.5.4 Εφαρμογές λακκασών για την παραγωγή βιολογικά ενεργών ενώσεων

Οι λακκάσες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην ενζυμικά καταλυόμενη παραγωγή νέων αντιβιοτικών, μέσω φαινολικής οξείδωσης, οξειδωτικής φαινολικής σύζευξης και οξείδωσης μέσω πυρηνικής αμίνωσης. Ωστόσο, η αντιβιοτική δραστηριότητα των σχηματισθέντων προϊόντων είναι συχνά χαμηλότερη από τη δραστηριότητα των υποστρωμάτων. Επιπλέον, αρκετά νέα παράγωγα πενικιλίνης και κεφαλοσπορίνης συντέθηκαν με οξείδωση, μέσω πυρηνικής αμίνωσης σχηματίζοντας C-N συζευγμένα ετεροδιμερή αμινοκινόνης. Τα ετεροδιμερή αμινοκινόνης αποτελούνται από ένα μόριο του υποστρώματος της οξειδωμένης λακκάσης και ένα μόριο της άλλης ένωσης της αντίδρασης. Η κυτταροτοξικότητα των νέων ενώσεων είναι αμελητέα. Αυτή η νέα τεχνολογία έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των κλασικών συνθετικών τεχνολογιών, επειδή μια ποικιλία νέων ουσιών μπορούν να συντεθούν ομαλά μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα και ευαίσθητες φυσικές ουσίες μπορούν να ενεργοποιηθούν με αυτόν τον τρόπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ενεργές ενώσεις, οι οποίες δεν είναι οι ίδιες υποστρώματα της λακκάσης, μπορούν να συνδεθούν με τα κατάλληλα υποστρώματα του ενζύμου. [Mikolasch & Schauer, 2009]. Εκτός από τα αντιβιοτικά, ένας μεγάλος αριθμός βιολογικά ενεργών ενώσεων μπορούν να παραχθούν από αντιδράσεις καταλυόμενες με λακκάσες. Οι βιολογικές δραστηριότητες τους κυμαίνονται από αντιοξειδωτικές, ορμονικές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, αντι-εκκριτικές, καθώς και αντι-νεοπλασματικές. Αν και οι περισσότερες από τις

αντιοξειδωτικές ενώσεις προέκυψαν από οξειδωτική σύζευξη, οι δομές των προϊόντων της αντίδρασης είναι αρκετά διαφορετικές.

1.3.5.5 Οι λακκάσες ως εργαλεία για την “πράσινη” βιομηχανία

Οι λακκάσες έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες σε μια ποικιλία από βιομηχανικές εφαρμογές, όπου αντιπροσωπεύουν μία ελκυστική πορεία για το "πρασίνισμα" των χημικών διεργασιών. Χάρη στις ετερογενείς ιδιότητες που παρατηρούνται στις λακκάσες από διάφορες πηγές, ένας αυξανόμενος αριθμός τους έχει εφαρμοστεί σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες, με στόχο να βρεθεί το πλέον κατάλληλο ένζυμο για κάθε εφαρμογή. Ωστόσο, μέχρι τώρα υπάρχουν λίγα μόνο παραδείγματα της βιομηχανικής χρήσης της λακκάσης. Το μεγάλο εμπόδιο στην πρακτική χρήση τους είναι η μεγάλη ποσότητα των ενζύμων που απαιτούνται για την υλοποίηση των βιομηχανικών στόχων. Σημαντικές ανακαλύψεις προς μία βιομηχανική χρήση της λακκάσης έχουν γίνει από την ανασυνδυασμένη έκφραση της σε κατάλληλους ξενιστές και από την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων βιοκαταλυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρώτη παρασκευή βιομηχανικής λακκάσης (DeniLite®) που ξεκίνησε από τη Novozyme το 1996, βασίστηκε σε μια ανασυνδυασμένη και θερμοάντοχη λακκάση από τον *M. thermophila* εκφρασμένη σε *A. oryzae*. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Οι περισσότερες από τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές με λακκάσες βασίζονται στην ίδια εμπορική συσκευή. Η εμπορική αυτή συσκευή εφαρμόστηκε στην κατασκευή σταθερών και υψηλής ευαισθησίας βιοαισθητήρων που βασίζονται σε ιονικά υγρά για την ανίχνευση ροσμαρινικού οξέος σε φυτικά εκχυλίσματα, ρουτίνης και λουτεολίνης. Εφόσον η ισορροπία μεταξύ βέλτιστου pH για τη λειτουργία της λακκάσης και της αναστρεψιμότητας των υποστρωμάτων έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνη για το προφίλ του pH βιοαισθητήρων της κατεχίνης και κατεχολαμινών, αναμένεται ότι οι τροποποιήσεις των ιδιοτήτων του ενζύμου με ανασυνδυασμένη έκφραση από μεταλλαγμένες παραλλαγές μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη απόδοση των βιοαισθητήρων. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Επιπροσθέτως, οι λακκάσες έχουν εφαρμοστεί ευρέως στην βιοαποκατάσταση, ιδιαίτερα στις συνθετικές βαφές και, πιο πρόσφατα, στα τοξικά πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), και PAHs. Η καθαρισμένη ανασυνδυασμένη *lcc1* από *Trametes trogii* εκφρασμένη σε *P. pastoris* αποχρωματίζει διαφορετικά αρκετές συνθετικές χρωστικών υφασμάτων, ανάλογα με τις χημικές τους δομές. Η έκταση του αποχρωματισμού ενισχύεται με την προσθήκη συνθετικών μεσολαβητών. Επιπλέον, αυτό το ένζυμο έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερό και ενεργό παρουσία οργανικών διαλυτών. Μια πιθανή χρήση μιας *Rychnopus*

sanguineus ανασυνδυσασμένης λακκάσης εκφρασμένη σε *P. pastoris* για τη θεραπεία των λυμάτων που περιέχουν χρωστικές έχει επίσης προταθεί, εξαιτίας της αξιοσημείωτης ικανότητας της να αποικοδομεί, σε διαφορετικό βαθμό, τέσσερις συνθετικές χρωστικές που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις. Τέλος, μια μεταλλαγμένη ΡΟΧΑ1b λακκάση, η οποία επιλέχθηκε για τη βελτιωμένη σταθερότητα της σε ένα ευρύ φάσμα pH, εφαρμόστηκε με επιτυχία στον αποχρωματισμό βαφής. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Οι λακκάσες από μύκητες είναι, δηλαδή, ιδανικοί πράσινοι καταλύτες για πολλούς μετασχηματισμούς στην οργανική σύνθεση, που εκτείνονται από την οξείδωση των λειτουργικών ομάδων και σύζευξη των φαινολών και των στεροειδών ως την κατασκευή των δεσμών άνθρακα-αζώτου και τη σύνθεση σύνθετων πολυμερών. Σε ένα ενδιαφέρον παράδειγμα, μια ανασυνδυσασμένη λακκάση από *M. thermophila*, έχει εφαρμοστεί για την σύνθεση μιας διμερούς ρεσβερατρόλης, μια ένωση που επιδεικνύει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Η αντίδραση διεξήχθη σε μια παρασκευαστική κλίμακα, σε πολύ ήπιες συνθήκες, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της αποδόσης σε σύγκριση με την ανάλογη χημικώς καταλυόμενη αντίδραση.

Τέλος, οι ανασυνδυσασμένες λακκάσες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως σημαντικό μέτρο βιο-ελέγχου για την ασφαλή φύλαξη ή τη βελτίωση της ποιότητας και της αποδοχής των τροφίμων και των ποτών. Για παράδειγμα, μια λακκάση από τον *T. versicolor* UAMH έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εξάλειψη της εξαιρετικά τοξικής και μεταλλαξιογόνου τοξίνης AflatoxinB (AFB1) σε πηγές τροφίμων. Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα έκθεση, μια φασματοφωτομετρική μέθοδος έχει αναπτυχθεί για την αντιοξειδωτική δράση σε δείγματα τροφίμων, με τη χρήση των *P.pinsitus* και *M. thermophila* λακκασών εκφρασμένες σε *A. oryzae*. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Κεφάλαιο 2. Ετερόλογη έκφραση λακκασών

2.1 Ανάγκη για ανασυνδυσασμένη πρωτεϊνική έκφραση

Η παραγωγή των λακκασών από φυσικές πηγές δε μπορεί να ανταποκριθεί στην αυξανόμενη ζήτηση της αγοράς, λόγω των χαμηλών αποδόσεων των τυποποιημένων βιομηχανικών διεργασιών ζύμωσης με τις συνθήκες που απαιτούνται για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών. Η ανασυνδυσασμένη πρωτεϊνική έκφραση σε εύκολα καλλιεργήσιμους υποδοχείς επιτρέπει την αύξηση της παραγωγικότητας σε μικρότερο χρονικό διάστημα και μειώνει τις δαπάνες της παραγωγής. Η ευελιξία και η αύξηση των δυνατοτήτων της παραγωγής της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης έχει ανοίξει νέες εμπορικές ευκαιρίες για βιομηχανικές χρήσεις. Η παραγωγικότητά των ενζύμων μπορεί να αυξηθεί με την χρήση πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου, ισχυρών εκκινήτων και αποτελεσματικών σηματοδοτικών αλληλουχιών, κατάλληλα σχεδιασμένες να κατευθύνουν τις πρωτεΐνες στο εξωκυτταρικό μίγμα. Επιπλέον, η πρωτεϊνική μηχανική μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη βελτίωση της σταθερότητας, της δραστηριότητας ή και της εξειδίκευσης ενός ενζύμου, και επίσης τα κομμένα ένζυμα μπορούν να παραχθούν για να καλύψουν τις απαιτήσεις των διεργασιών. Τα ένζυμα υψίστης ποιότητας έχουν ληφθεί με τοποκατευθυνόμενη ή τυχαία μεταλλαξιγένεση, όπου μεμονωμένες αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων μπορούν να βελτιώσουν την απόδοση σε βιοχημικές (βέλτιστο pH, θερμοσταθερότητα, εξειδίκευση υποστρώματος) και σε καταλυτικές παραμέτρους (v_{max} , K_M και K_i). Επίσης, συγκεντρώνοντας και συνδυάζοντας μέρη παρόμοιων γονιδίων από διαφορετικά είδη ή στελέχη με μεθόδους "DNA ανάμιξης", έχει επιτευχθεί αξιοσημείωτη βελτίωση στην αποδοτικότητα των ενζύμων σε ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Από την αρχή της δεκαετίας του ενενήντα, η ανασυνδυσασμένη έκφραση των λακκασών αποτέλεσε πεδίο έρευνας και θέμα συζήτησης πολλών ερευνητικών ομάδων. Η ετερόλογη έκφραση λακκασών σε βακτήρια, ζυμομύκητες, νηματοειδείς μύκητες και φυτά έχει αναφερθεί, μαζί με παραδείγματα ομόλογης έκφρασης. Η ετερόλογη έκφραση της λακκάσης σε *Escherichia coli* έχει χρησιμοποιηθεί συχνά ως μια στρατηγική για την αντιμετώπιση του προβλήματος της μη εύκολης απόκτησης της από φυσικούς ξενιστές. Ωστόσο, πολύ συχνά η απόδοση της παραγωγής είναι χαμηλή, και τα ανασυνδυσασμένα ένζυμα σχηματίζουν συσσωματώματα, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυσχερής ο καθαρισμός τους. Από την άλλη πλευρά, η ανασυνδυσασμένη παραγωγή της λακκάσης από *Streptomyces coelicolor* (SLAC) σε

Streptomyces lividans απέφερε σημαντική ποσότητα λακκάσης (350 mg l⁻¹) με υψηλή καθαρότητα [Piscitelli & Pezzella, 2010].

2.2 Συστήματα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, η *E.coli* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως ένας κυτταρικός ξενιστής για την πρωτεϊνική έκφραση. Εντούτοις, η ευρεία εφαρμογή του συστήματος αυτού με πρωτεΐνες που προέρχονται από ευκαρυωτικά γονιδιώματα, τα οποία απαιτούν μεταμεταφραστική τροποποίηση υπήρξε προβληματική, διότι αυτός ο απλός μικροοργανισμός στερείται ενδοκυτταρικών μηχανισμών για την επίτευξη αυτών των αποτελεσμάτων. Η επιτυχής έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε *E.coli* συνεπώς εξαρτάται από τα πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια, τριτοβάθμια και λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης. Καθώς η *E.coli* είναι προκαρυωτικός οργανισμός, η ανικανότητα να αναδιπλώνει σωστά την ξένη πρωτεΐνη και να εκτελεί άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις περιορίζει τους τύπους των πρωτεϊνών που μπορούν να εκφραστούν σε αυτή. Δεδομένου ότι το προϊόν πρωτεΐνης μπορεί να ληφθεί ως αδιάλυτο και λανθασμένα διπλωμένο, η διαλυτοποίηση και η εκ νέου αναδίπλωση είναι βήματα που απαιτούνται. Αυτή η λανθασμένη αναδίπλωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανεπαρκών ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ή αναγωγικού περιβάλλοντος του κυτοπλάσματος. Επομένως, η *E.coli* δεν είναι κατάλληλη για χρήση σε μελέτες έκφρασης με πρωτεΐνες που περιέχουν υψηλό επίπεδο δισουλφιδικής συνδεσιμότητας ή πρωτεΐνες που απαιτούν άλλους τύπους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως γλυκοζυλίωση, ισομερισμό cis/trans προλίνης, δισουλφιδικό ισομερισμό, λιπιδίωση, θείωση ή φωσφορλίωση. [Daly & Hearn, 2004]

Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε *E. coli* τείνουν επίσης να διατηρούν την αμινο-τερματική μεθειονίνη τους, η οποία μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και να προκαλέσει ανοσογονικότητα. Εφόσον η *E. coli* δεν έχει την ικανότητα να γλυκοζυλιώνει ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, αυτός ο περιορισμός είναι ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να αλλάξει τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών. Η ανάπτυξη συνθηκών αναδίπλωσης της πρωτεΐνης σε συστήματα *E.coli* μπορεί να αποβεί δύσκολη και χρονοβόρα, και αυτοί οι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές απώλειες, μειωμένη παραγωγικότητα και αύξηση του κόστους κατασκευής της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. [Daly & Hearn, 2004]

Μια μεγάλη ποικιλία των πρωτεϊνών που δεν μπορούν να εκφραστούν σε *E.coli* στο σωστό επίπεδο μετα-μεταγραφικής ωρίμανσης έχουν παραχθεί στην

μεθυλοτροφική ζύμη *P.pastoris*. Τα συστήματα έκφρασης *P. pastoris* προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συστήματα έκφρασης *E. coli* για την παραγωγή πολλών ετερόλογων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις πρωτεΐνες-στόχους που περιέχουν πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς ή απαιτούν γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, πρωτεΐνες στις οποίες απουσιάζει η αμινο-τερματική μεθειονίνη ή που δε γίνεται ο σχηματισμός ολιγομερών για το σωστό σχηματισμό της ώριμης πρωτεΐνης. Τα συστήματα έκφρασης *P.pastoris*, εκτός του ότι επιτρέπουν την αυθεντική πρωτεΐνη να εκκρίνεται σε διαλυτή μορφή, έχουν επίσης την ικανότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. [Daly & Hearn, 2004].

Επίσης, οι ζύμες προσφέρουν την ταχύτητα της μικροβιακής ανάπτυξης και της ευκολίας του χειρισμού των μικροβιακών γονιδίων μαζί με την ικανότητα να εκτελούν ευκαρυωτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως πρωτεολυτική επεξεργασία, σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας, και γλυκοζυλίωση. Η ανάπτυξη της ζύμης είναι οικονομική, συνήθως δίνει υψηλές αποδόσεις και έχει χαμηλές απαιτήσεις από άποψη χρόνου και προσπάθειας. Επιπλέον, οι ζυμομύκητες είναι οργανισμοί κατάλληλοι για τη δημιουργία νέων ενζύμων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ο *Saccharmyces cerevisiae* και ο *Pichia pastoris* είναι οι ζυμομύκητες που επιλέγονται συχνά για την ανασυνδυασμένη έκφραση της λακκάσης. Επίσης, οι λακκάσες που προέρχονταν από φυτά παρήχθησαν σε αυτούς τους δύο ζυμομύκητες.

Ο *P. pastoris* είναι καλύτερος παραγωγός της ανασυνδυασμένης λακκάσης σε σχέση με τον *S. cerevisiae*, δίνοντας αποδόσεις από 8-17 mg / l. Οι υπερ-γλυκοζυλιωμένες λακκάσες συχνά παράγονται σε αυτές τις συμβατικές ζύμες. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Η έκφραση της λακκάσης σε ζύμες έχει διερευνηθεί λαμβάνοντας υπόψη μια σειρά από διαφορετικές παραμέτρους με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, τόσο οι φυσικές λακκάσες όσο και τα σηματοδοτικά πεπτίδια των ζυμών (για παράδειγμα *S. cerevisiae* α -factor ή ινβερτάση) έχουν χρησιμοποιηθεί με διαφορετικά αποτελέσματα για διάφορα εκφραζόμενα ένζυμα. Ως εκ τούτου, το καλύτερο σηματοδοτικό πεπτίδιο που οδηγεί στην έκκριση της ανασυνδυασμένης λακκάσης στη ζύμη δεν είναι ακόμα προβλέψιμο. Η επίδραση του pH, της θερμοκρασίας, του χαλκού και οι προαγωγείς έχουν επίσης μελετηθεί. Η υψηλή συγκέντρωση χαλκού απαιτείται για την παραγωγή μιας δραστικής λακκάσης σε ένα μετα-μεταφραστικό βήμα σε έναν ετερόλογο ξενιστή. Όλες αυτές οι παράμετροι και οι μεταβλητές αποδόσεις εμποδίζουν την πρόβλεψη του πλέον κατάλληλου ξενιστή, ή της πιο πολλά υποσχόμενης λακκάσης. [Piscitelli & Pezzella, 2010]

Κεφάλαιο 3. Η χρήση του ζυμομύκητα *P.pastoris* για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

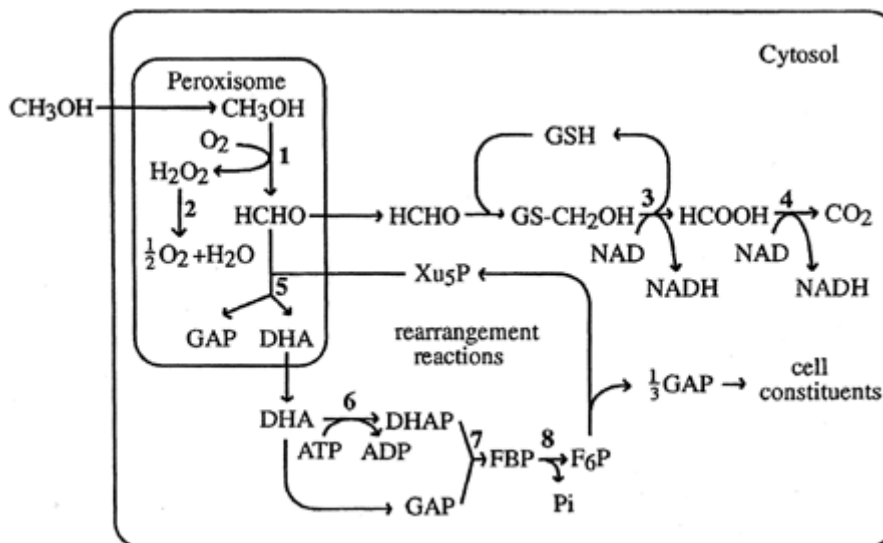
3.1 Ο μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας *P.Pastoris*

Η χρήση του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα, *Pichia pastoris*, ως κυτταρικού ξενιστή για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχει γίνει πολύ δημοφιλής τα τελευταία χρόνια. Ο *P.pastoris* είναι πιο εύκολος στο να χειριστεί και να καλλιεργηθεί σε σχέση με τα κύτταρα των θηλαστικών και μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες. Επίσης, ο *P.pastoris* είναι ένα ευκαρυωτικός οργανισμός, και με τον τρόπο αυτό παρέχει τη δυνατότητα για την παραγωγή διαλυτών, σωστά διπλωμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που έχουν υποστεί όλες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτούνται για τη λειτουργικότητά τους. Επιπροσθέτως, το γραμμικοποιημένο ξένο DNA μπορεί να εισαχθεί με υψηλή αποτελεσματικότητα μέσω ομόλογων διαδικασιών ανασυνδυασμού και να παράγει σταθερές κυτταρικές σειρές, ενώ οι φορείς έκφρασης μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και επιτρέπουν πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεΐνης-στόχου. Ένα ακόμη πλεονέκτημα του *P.pastoris* είναι ότι ισχυροί υποκινητές είναι διαθέσιμοι για να κατευθύνουν την έκφραση ενός ξένου γονιδίου ενδιαφέροντος, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων της πρωτεΐνης στόχου με σχετική τεχνική ευκολία και με χαμηλότερο κόστος από τα περισσότερα άλλα ευκαρυωτικά συστήματα [Daly & Hearn, 2004].

Ο *P. pastoris*, ως μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας, είναι ικανός να χρησιμοποιεί μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, εφόσον διαθέτει ένα εξειδικευμένο σύστημα καταβολισμού της μεθανόλης. Οι αρχικές αντιδράσεις εντοπίζονται στα υπεροξεισωμάτια του κυττάρου και καταλύονται από τρία βασικά ένζυμα: την αλκοολική οξειδάση, την καταλάση και την συνθάση της διωσροξυακετόνης. Οι υπόλοιπες αντιδράσεις πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα. [Patrick *et al.*, 2005]

Το πρώτο βήμα είναι η οξειδωση της μεθανόλης σε φορμαλδεΐδη και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το βήμα αυτό καταλύεται από το ένζυμο της αλκοολικής οξειδάσης (alcohol oxidase). Ο υποκινητής AOX διαχωρίζεται μέσα στο υπεροξεισωμάτιο μαζί με την καταλάση, η οποία διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό. Μια ποσότητα φορμαλδεΐδης, η οποία παράγεται από τον υποκινητή AOX αφήνει το υπεροξεισωμάτιο και οξειδώνεται περαιτέρω προς φορμικό και διοξειδίο του άνθρακα από δύο κυτταροπλασματικές διυδρογενάσες, αντιδράσεις που αποτελούν πηγή ενέργειας για τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε μεθανόλη. Η εναπομένουσα φορμαλδεΐδη σχηματίζει κυτταρικά συστατικά, μέσω

ενός κυκλικού μονοπατιού, το οποίο αρχίζει με τη συμπύκνωση της φορμαλδεΐδης με 5- φωσφορική ξυλουλόζη, μια αντίδραση, η οποία καταλύεται από τη συνθάση της διυδροξυακετόνης(DHAS). Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GAP) και η διυδροξυακετόνη (DHA) αφήνουν το υπεροξειώσωμα και εισέρχονται σε ένα κυτταροπλασματικό μονοπάτι που αναγεννά 5-μονοφωσφορική ξυλουλόζη και, για κάθε τρεις κύκλους, ένα μόριο του 3-φωσφορικής αφυδρογονάσης. (εικόνα 1.9) [Cereghino &Cregg, 2000]



Εικόνα 1.9 : Τα μεταβολικά μονοπάτια στην *P.Pastoris*. 1: αλκοολική οξειδάση, 2: καταλάση, 3: διυδρογενάση της φορμαλδεΐδης, 4: διυδρογενάση του φορμικού, 5: συνθάση της διυδροξυακετόνης, 6: κινάση της διυδροξυακετόνης, 7: αλδολάση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης, 8: φωσφατάση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης [Zhang et al., 2000]

Υπάρχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την αλκοολική οξειδάση, τα AOX1 και AOX2, τα οποία παρουσιάζουν ομολογία 97%. Η μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου παράγεται από το γονίδιο AOX1, η έκφραση του οποίου επάγεται από την παρουσία μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο. Η παραγωγή του ενζύμου μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλά επίπεδα, έως και 30% υψηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών πρωτεϊνών. Το γονίδιο AOX2 παράγει χαμηλότερα ποσοστά αλκοολικής οξειδάσης και ως εκ τούτου επιτρέπει την ανάπτυξη της ζύμης μονάχα σε χαμηλά επίπεδα μεθανόλης [Cereghino &Cregg, 2000].

Υπάρχουν τρεις φαινότυποι της *P.pastoris*, ανάλογα με τις ποσότητες μεθανόλης που καταβολίζονται. Ο φαινότυπος Mut⁺ (methanol utilization plus) περιγράφει στελέχη που αυξάνονται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μεθανόλης

με τη βοήθεια της αλκοολικής οξειδάσης που παράγεται από τα γονίδια AOX1 και AOX2. Το ένζυμο του AOX2 έχει την ίδια ειδική δραστηριότητα με αυτό του AOX1, όμως έχει πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (πιο αδύναμος υποκινητής) και μπορεί μόνο να καταναλώσει αργά τη μεθανόλη. Ο φαινότυπος αυτός ονομάζεται Mut^s (methanol utilization slow). Τέλος, ο φαινότυπος Mut⁻ (methanol utilization minus) αναφέρεται σε στελέχη στα οποία δεν εκφράζεται κανένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν την αλκοολική οξειδάση και συνεπώς δεν αναπτύσσονται παρουσία μεθανόλης, αφού είναι αδύνατο να τη μεταβολίσουν [Cereghino & Cregg, 2000].

3.2 Επιλογή κατάλληλου υποκινητή

Η έκφραση οποιουδήποτε ξένου γονιδίου σε *P. pastoris* περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια: (α) εισαγωγή του γονιδίου σε έναν φορέα έκφρασης (β) εισαγωγή του φορέα έκφρασης στον υποδοχέα του *P. pastoris* και (γ) την εξέταση των πιθανών στελεχών για την έκφραση του ξένου γονιδίου. Η πλειοψηφία της παραγωγής ετερόλογων πρωτεϊνών σε *P. pastoris* βασίζεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα που απαιτούνται για τον μεταβολισμό της μεθανόλης είναι παρόντα μόνο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μεθανόλη. Ως εκ τούτου, οι υποκινητές AOX είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι. Εκτός από τους υποκινητές της αλκοολικής οξειδάσης, για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι, όπως ο υποκινητής της διυδρογενάσης της 3-φωσφορικής γλουκαρaldeυδής GAP, ο YPT1 που κωδικοποιεί μια GTPάση η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία της έκκρισης και ο PEX8 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σημαντική για τη βιοσύνθεση των υπεροξεισωματιών. Κανένας όμως από τους παραπάνω υποκινητές δεν έχει καταφέρει να αποφέρει ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, σε σχέση με τον υποκινητή AOX1. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκινητής AOX1 επιτρέπει την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, ακόμη και αν έχει εισαχθεί μονάχα ένα αντίγραφο της ετερόλογης αλληλουχίας. Επίσης, έχει χαμηλή συγγένεια για το οξυγόνο, με αποτέλεσμα να απαιτείται επαρκής αερισμός για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι πως η έκφραση του υποκινητή καταστέλλεται από την παρουσία γλυκόζης ή γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα επιλογής στελεχών με τυχαίες μεταλλάξεις που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη κατά την παραγωγή της βιομάζας. [Menendez *et al.*, 2003]

Παρότι η χρήση του υποκινητή AOX1 αποδίδει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, υπάρχουν περιπτώσεις που καθιστούν ακατάλληλη τη χρήση του, όπως όταν πρόκειται για τη παραγωγή βιομηχανικών τροφίμων, όπου η προσθήκη μεθανόλης είναι απαγορευτική, ή σε ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας, όπου

η χρήση μεθανόλης κρίνεται επιβλαβής λόγω της ευφλεκτικότητάς της [Cereghino *et al.*, 2002; Daly & Hearn, 2005].

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της χρήσης του υποκινητή AOX1 παρουσιάζονται εκτενέστερα στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 1.2 : Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα του υποκινητή AOX

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Η μεταγραφή της ξένης πρωτεΐνης ρυθμίζεται άμεσα και ελέγχεται από ένα μηχανισμό αναστολής/καταστολής	Η παρακολούθηση της μεθανόλης κατά τη διάρκεια της διεργασίας είναι συχνά δύσκολη
Μπορούν να εκφραστούν υψηλά ποσοστά πρωτεΐνης, ακόμα και αν είναι τοξικά για το κύτταρο	Η μεθανόλη ενέχει τον κίνδυνο πυρκαγιάς
Η καταστολή της μεταγραφής από τις αρχικές πηγές διοξειδίου εξασφαλίζει ότι θα αποκτηθεί καλή κυτταρική ανάπτυξη, πριν το προϊόν του γονιδίου υπερεκφραστεί	Η μεθανόλη προέρχεται κυρίως από πετροχημικές πηγές, οι οποίες μπορεί να είναι ακατάλληλες για τη χρήση στην παραγωγή ορισμένων προϊόντων διατροφής και των προσθέτων
Η επαγωγή της μεταγραφής επιτυγχάνεται εύκολα με την προσθήκη μεθανόλης	Απαιτούνται δύο πηγές άνθρακα με τη μετάβαση από την μια στην άλλη να πρέπει να γίνεται σε ένα ακριβές χρονικό σημείο

[Patrick *et al.* , 2005]

Από την άλλη, ο υποκινητής AOX2 υπό τη ρύθμιση του οποίου βρίσκεται το γονίδιο AOX2, επιτρέπει τη παραγωγή χαμηλών ποσοτήτων αλκοολικής οξειδάσης και κατά συνέπεια, δε χρησιμοποιείται για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η τροποποίηση των φυσικοχημικών συνθηκών της καλλιέργειας ή η προσθήκη αντιαφριστικών ουσιών θα μπορούσε να καταστήσει τον υποκινητή ιδιαίτερα αποδοτικό. [Kobayashi *et al.*, 2000]

3.3 Μετασηματισμός/ενσωμάτωση της αλληλουχίας στο χρωμόσωμα της ζύμης

Μετά την ένθεση και κλωνοποίηση της ετερόλογης αλληλουχίας σε ένα πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιείται γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με πέψη από περιοριστικά ένζυμα που τέμνουν το πλασμίδιο σε ειδική θέση, η οποία εντοπίζεται ενδιάμεσα στην αλληλουχία του υποκινητή AOX1. Έπειτα, ακολουθεί μετασηματισμός των επιλεκτικών κυττάρων *P.pastoris* για τη δημιουργία γενετικώς σταθερών στελεχών που κωδικοποιούν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη [Cregg & Higgins, 1995]. Η ενσωμάτωση της ετερόλογης αλληλουχίας στο χρωμόσωμα της ζύμης πραγματοποιείται με ομόλογο ανασυνδυασμό στην περιοχή του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης. Τα ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και να αυξάνονται χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες μεθανόλης ως πηγή άνθρακα. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν, δηλαδή, το φαινότυπο Mut⁺ [Sreerikshna *et al.*, 1997].

Ωστόσο, είναι πιθανό να συμβεί διπλός ανασυνδυασμός στις περιοχές 5' AOX1 και 3' AOX1 του γονιδίου, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση ή τη διακοπή του γονιδίου που κωδικοποιεί την αλκοολική οξειδάση από την αλληλουχία του πλασμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο, παράγονται στελέχη ικανά να καταβολίζουν μικρές ποσότητες μεθανόλης, καθώς όλη η αλκοολική οξειδάση εκφράζεται από το γονίδιο AOX2 και έτσι αυτά τα στελέχη έχουν φαινότυπο Mut^s [Romanos *et al.*, 1995].

3.4 Έκκριση πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην *P. pastoris*

Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπορεί να είναι ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική. Συνεπώς, κατά την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στη ζύμη, είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη αν η έκφρασή της είναι ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική, κάτι που εξαρτάται από την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη-στόχος δεν εκκρίνεται, θα πρέπει να περάσει από ένα σύστημα έκκρισης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην αλλαγή της που μπορεί να προκληθεί από τη γλυκοζυλίωση ή στην έλλειψη άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες μπορεί να είναι απαραίτητες. Συνεπώς, η ενδοκυτταρική έκφραση είναι μια εναλλακτική στην έκκριση και συνήθως δεν οδηγεί στη γλυκοζυλίωση. Ωστόσο, ο καθαρισμός των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, μπορεί να αποβεί δυσκολότερος από τον καθαρισμό των εκκρινόμενων πρωτεϊνών,

καθώς η πρωτεΐνη-στόχος αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% της συνολικής ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης [Rees *et al.*, 1999].

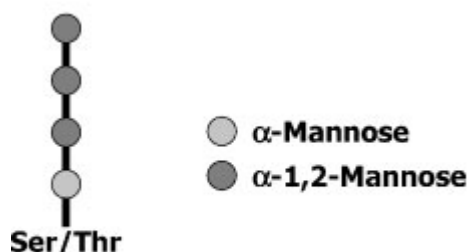
Στην περίπτωση της εξωκυτταρικής έκφρασης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας που κατευθύνει το παραγόμενο πρωτεϊνικό μόριο στο μονοπάτι έκκρισης. Η επιλογή της σηματοδοτικής αυτής αλληλουχίας μπορεί να βασιστεί είτε στην σηματοδοτική αλληλουχία της ίδιας της πρωτεΐνης (εάν διαθέτει) είτε στον παράγοντα α από τον *S.cerevisiae* ή στη σηματοδοτική αλληλουχία του φωσφορικού οξέος (PHO) ή στην σηματοδοτική αλληλουχία ινβεργτάσης (SUC2) [Li *et al.*, 2001]. Η πιο συνήθης σηματοδοτική αλληλουχία για το σύστημα έκκρισης της ζύμης *P.Pastoris* είναι ο παράγοντας α από τον *S.cerevisiae*. Αυτή η αλληλουχία αποτελείται από 19 σηματοδοτικά πεπτίδια αμινοξέα, ακολουθούμενα από 60 αμινοξέα.

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ετερόλογων πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, το ενεργειακά αποδεκτό δίπλωμα της πρωτεΐνης και τη γλυκοζυλίωση των μορίων. Η *P.pastoris* έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς, σε αντίθεση με πολλά προκαρυωτικά συστήματα, τα οποία εξαιτίας του αναγωγικού δυναμικού του κυτταροπλάσματος αδυνατούν να σχηματίσουν τέτοιους δεσμούς [Heimo *et al.*, 1997].

Η γλυκοζυλίωση στην *P.pastoris* περιλαμβάνει ολιγοσακχαρίτες μικρού μήκους (8-14 μονάδες μαννόζης για κάθε αλυσίδα), σε σχέση με εκείνους του *S. cerevisiae* (50-150 μονάδες μαννόζης) και μικρότερη συχνότητα γλυκοζυλίωσης, με αποτέλεσμα οι ετερόλογες πρωτεΐνες να μην υπεργλυκοζυλιώνονται. Ακόμη, τα πρότυπα γλυκοζυλίωσης στην *P.pastoris* μοιάζουν περισσότερο με εκείνα των ανώτερων ευκαρυωτικών και διαφέρουν σημαντικά από εκείνα του *S. cerevisiae*. Ο τελευταίος παράγει ολιγοσακχαρίτες με 1,3 δεσμούς γλουκάνης, ενώ στην μεθυλότροφη ζύμη δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο [White *et al.*, 1994].

Η *P. pastoris*, όπως και οι άλλοι μύκητες, προσθέτουν ολιγοσακχαρίτες στην υδροξυλική ομάδα (-OH) της πλευρικής ομάδας μιας σερίνης ή θρεονίνης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (O-γλυκοζυλίωση). Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί αποτελούνται από μονάδες μαννόζης και γενικά παρουσιάζουν χαμηλότερη πολυπλοκότητα από εκείνους των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ζύμη έχει τη δυνατότητα να γλυκοζυλιώνει ετερόλογες πρωτεΐνες οι οποίες μπορεί να μην γλυκοζυλιώνονται από τον οργανισμό που τις παράγει, αλλά ακόμη και αν γλυκοζυλιώνονται, υπάρχει η περίπτωση να προστεθούν ολιγοσακχαρίτες σε διαφορετικά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει το μοριακό βάρος των ετερόλογων πρωτεϊνών ως και 20kDa, όπως μελετήθηκε στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της γλυκοαμυλάσης από τον *Aspergillus awamori* [Heimo *et al.*, 1997]. Τα πρότυπα γλυκοζυλίωσης διαφέρουν ανάμεσα στις ετερόλογες πρωτεΐνες που εκφράζονται, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχθεί

ότι μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργία του ανασυνδυασμένου μορίου [Mochizuki *et al.*, 2000].

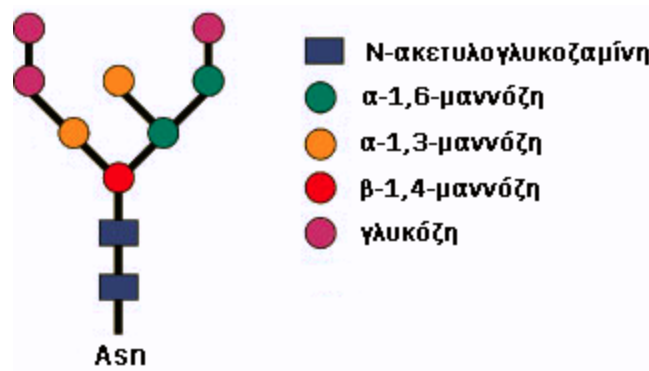


Εικόνα 1.10 : Δομή ενός συνήθους O-linked ολιγοσακχαρίτη (O-γλυκοζυλίωση) [Cereghino & Cregg, 2000]

Η *P. pastoris* έχει τη δυνατότητα να προσθέτει ολιγοσακχαρίτες στην –NH₂ πλευρική ομάδα των καταλοίπων της ασπαραγίνης (N-γλυκοζυλίωση). Ένας προσχηματισμένος ολιγοσακχαρίτης που αποτελείται από N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc), μαννόζη (Man) και γλυκόζη (Glc) μεταφέρεται ως ενιαίο μόριο στις πρωτεΐνες που γλυκοζυλιώνονται εντός του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο πρόδρομος αυτός ολιγοσακχαρίτης συγκρατείται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω ενός λιπιδίου που ονομάζεται δολιχόλη και μεταφέρεται με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοζυλική μεταφοράση. Το σάκχαρο συγκροτείται στη δολιχόλη μέσω ενός πυροφωσφορικού δεσμού υψηλής ενέργειας, ο οποίος παρέχει την ενέργεια που καθοδηγεί τη μεταφορά του σακχάρου στην πρωτεΐνη. Η ποικιλότητα των N-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών είναι αποτέλεσμα όψιμων τροποποιήσεων της αρχικής πρόδρομης δομής. Έτσι, ενώ η πρωτεΐνη βρίσκεται ακόμη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αφαιρούνται τρία κατάλοιπα γλυκόζης από τις γλυκοσιδάσες I και II και ένα κατάλοιπο μαννόζης από την α-1,2 μαννοσιδάση, αφήνοντας μια δομή με οκτώ κατάλοιπα μαννόζης και δυο N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Man₈GlcNAc₂) [Lis & Shanon, 2003].

Παρόλο που στα ευκαρυωτικά συστήματα προστίθενται κατάλοιπα γαλακτόζης, σιαλικού οξέος και σε κάποιες περιπτώσεις φουκόζης, στη ζύμη παρατηρείται η προσθήκη μαννοζών, οι οποίες προσδένονται με α-1,6 δεσμό στις α-1,3-μαννόζες που ήδη υπάρχουν στον αρχικό πυρήνα μαννόζης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Man α-1,3 - Man α-1,4 - GlcNAc₂). Οι πολύπλοκοι ολιγοσακχαρίτες δημιουργούνται είτε μέσω περαιτέρω πρόσθεσης σακχαρικών καταλοίπων στα ήδη υπάρχοντα σακχαρικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης τα οποία έχουν προστεθεί στο ΚΕΔ, είτε μέσω της πρόσθεσης επιπλέον νέων σακχάρων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η επιλογή αυτή εξαρτάται από το δίπλωμα της πρωτεΐνης

καθώς και από το αν τα υπάρχοντα σάκχαρα είναι προσιτά στα ένζυμα των δεξαμενών του Golgi. Η προσθήκη επιπλέον σακχάρων στο Golgi προωθεί περαιτέρω το σωστό δίπλωμα και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, αν και η ενζυμική ενεργότητα και η δυνατότητα έκκρισης δε φαίνεται να επηρεάζονται από την απουσία των σακχαρικών καταλοίπων της πρωτεΐνης [Herscovics & Orlean , 1993].



Εικόνα 1.11 : Η δομή του πυρήνα Asn που συνδέεται με τον ολιγοσακχαρίτη. Το σημείο διακλάδωσης όπου προστίθενται περαιτέρω ολιγοσακχαρίτες βρίσκεται στα αριστερά από την α-1,3-μαννόζη.

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4. Υλικά-Μέθοδοι

4.1 Συσκευές – Όργανα

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσης πειραματικής διαδικασίας είναι τα ακόλουθα :

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA Easigel H1-set της εταιρείας Scie-plas
- Επωαστήρας με ανάδευση (orbital incubator), ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-500rpm) ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd
- Μικρός επωαστήρας με ανάδευση ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-1400rpm) Eppendorf Thermomixer Comfort
- Φωτόμετρο του οίκου Hitachi UV 2000.
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ BIORAD
- Φασματόμετρο υπερύθρου (FT-IR)
- Συσκευή συμπύκνωσης πρωτεϊνικού διαλύματος Millipore Amicon Stirred Cell Model
- Κλίβανος αποστείρωσης (αυτόκαυστο) Labo Autoclave του οίκου SANYO
- Φούρνος ξήρανσης
- Πρέσα για προετοιμασία των δειγμάτων προς FT-IR
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία).
- Αναλυτικός ζυγός
- Φίλτρα διήθησης
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B.Braun Biotec. International, Melsungen
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.).
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μεγάλη Βρετανία)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).

Τα εργαστηριακά σκεύη και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις ακόλουθες εταιρίες : Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

4.2 Χημικά αντιδραστήρια- Εμπορικά ένζυμα

- Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία).
- Τα ένζυμα προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες : Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), New England Biolabs® Inc., (Η.Π.Α.), Takara BIO Inc., (Ιαπωνία), Invitrogen (Η.Π.Α.), Invivogen (Γαλλία), Novagen (Η.Π.Α.), Clontech (Η.Π.Α.), EMD4Biosciences (Γερμανία), Stratagene (Η.Π.Α.), BIORAD Laboratories (Η.Π.Α.). Επίσης, τα τυποποιημένα εμπορικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής : το πακέτο GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit της εταιρίας Fermentas (Η.Π.Α.) για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, το πακέτο Nucleospin Gel Clean up kit της εταιρίας Macherey-Nagel για την απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και το πακέτο GenElute™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit της εταιρίας Sigma–Aldrich για την απομόνωση του ολικού DNA από τον μικροοργανισμό *M. thermophila*.

4.3 Διαλύματα

Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Πιο συγκεκριμένα, τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω :

- Διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης
 - i) Ρυθμιστικό Διάλυμα TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X : 108 g/l Tris base, 55 g/l βορικό οξύ, 40 mL/l 0.5 M EDTA, pH 8.0
 - ii) Ρυθμιστικό Διάλυμα δείγματος ηλεκτροφόρησης (Loading Buffer): 900 μL γλυκερόλη 50% (v/v), 100 μL Βρωμοφαινόλη Blue 10X

- Διαλύματα για την παρασκευή θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα *P. pastoris*
 - i) Ρυθμιστικό Διάλυμα φωσφορικών: 132 mL K₂HPO₄ 1M, 868 mL KH₂PO₄ 1M, pH 6.0
 - ii) Διάλυμα YNB (Yeast Nitrogen Base):: 34 gr/L YNB χωρίς θειϊκό αμμώνιο και αμινοξέα, 100 gr/L θειϊκό αμμώνιο
 - iii) Διάλυμα γλυκερόλης 10X: 100mL γλυκερόλης σε 900 mL ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα για την προετοιμασία της στήλης ρητίνης
 - i) Tris base 50mM : 3 M NaCl, ρύθμιση pH 8 με HCl

4.4 Μικροοργανισμοί

Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί :

- Ο θερμόφιλος μύκητας *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464, ο οποίος προμηθεύτηκε από την εταιρεία DSMZ (DSM No:1799, Γερμανία).
- Τα βακτηριακά στελέχη *Esherichia coli* TOP10 [γονότυπος: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*] της εταιρίας Invitrogen.
- Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, στέλεχος X33 (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut+) (Invitrogen) για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

4.5 Θρεπτικά Μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο στους 121 ° C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0.1 MPa. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθετο και 1,5% (για τα βακτήρια) ή 2% (για τη ζύμη) άγαρ. Η σύσταση των θρεπτικών μέσων

παρουσιάζεται στον πίνακα 4.1. Όσο αναφορά τις υπερευαίσθητες ουσίες (αντιβιοτικά και βιταμίνες) αποστειρώνονταν με διήθηση σε φίλτρα σύριγγας πόρων διαμέτρου 0,2μm και προσθέτονταν στα θρεπτικά υλικά μετά από ψύξη στους 50-60°C.

Πίνακας 4.1 : Σύσταση των θρεπτικών υλικών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό μέσο	Σύσταση
<i>M. thermophila</i>	Potato Dextrose Agar (pH 5)	1 g/l K ₂ HPO ₄ 0,5 g/l MgSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g/l CaCl ₂ .2H ₂ O 10 g/l yeast extract 1% (w/v) glucose
	Luria Bertani (LB) (pH 7,4)	0,5% (w/v) Yeast 1% (w/v) Tryptone 1% (w/v) NaCl 100 μg/ml kanamicyn
<i>E.Coli</i>	Low Salt Luria Bertani (LB) (pH 7,4)	0,5% (w/v) Yeast 1% (w/v) Tryptone 0,5% (w/v) NaCl 50 μg/ml kanamycin
	YPD(S)	1% (w/v) Yeast 2% (w/v) Peptone 2% (w/v) Glucose (1M Sorbitol) 100 μg/ml Zeocin
<i>P.Pastoris</i>	MD/MM	2,5 ml YNB (10x) 0,05 ml Biotin 500x (2g/l) 0,5 g Glucose/ 0,125 ml Methanol 0,37 g Agar 22,4 ml Νερό -/ 2,5 ml ABTS (10x) -/25 μl (100x) CuSO ₄ 100x (2,5 g/l)
	BMGY/BMMY	1% (w/v) Yeast 2% (w/v) Peptone 0,1M Potasium phosphate buffer pH 6,0

25 ml YNB+ammonium sulfane(10x) 0,5 ml Biotin 500x (2 g/l) 25ml Glucerosol (10%)/1,250ml Methanol (250μl/50ml) -/ 2,5 ml CuSO ₄

4.6 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης

Για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCR[®] Blunt (Invitrogen, Η.Π.Α), ενώ για την έκφραση της χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (Invitrogen, Η.Π.Α).

4.6. 1 Πλασμιδιακός φορέας PCR[®] BLUNT (INVITROGEN)

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR[®] Blunt που έχει μήκος 3512 βάσεις είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να καθίσταται κατάλληλος για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA που φέρουν ισοτελή άκρα (blunt ends) και συνεπώς μπορούν να εισαχθούν σε αυτόν τμήματα DNA που έχουν παραχθεί με τη δράση της KOD πολυμεράσης. Στο φορέα αυτό εντοπίζεται η περιοχή έναρξης της αντιγραφής, η οποία εξασφαλίζει υψηλά επίπεδα αντιγραφής του πλασμιδίου στα κύτταρα του ξενιστή. Η θέση κλωνοποίησης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στο πλασμίδιο βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια LacZα και ccdB. Το γονίδιο ccdB (control of cell death) βρίσκεται σε σύντηξη με το γονίδιο LacZα και είναι γονίδιο θανάτου. Όταν γίνεται σύνδεση ενός τμήματος DNA στο πλασμίδιο διακόπτεται η έκφραση της αλληλουχίας lacZα-ccdB, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται στο στερεό θρεπτικό μέσο μόνο τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

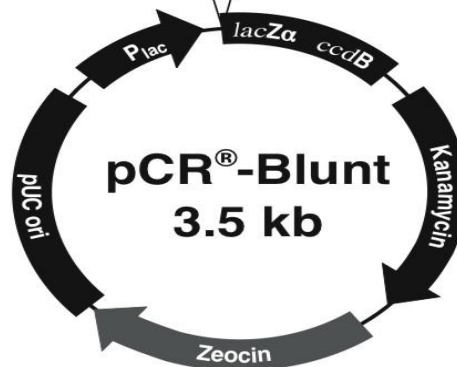
M13 Reverse priming site Mlu I
 201 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTAT TTAGGTGACG CGTTAGAATA
 GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTCGATA AATCCACTGC GCAATCTTAT

Nsi I Hind III Kpn I Sac I BamH I Spe I
 CTC AAGCTAT GCATCAAGCT TGGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT
 GAGTTCGATA CGTAGTTCTGA ACCATGGCTC GAGCCTAGGT GATCATTGCC GGCGGTCA CA

EcoR I EcoR I Pst I EcoR V
 GCTGGAATTC AGG **Blunt PCR Product** CCTGAATTCT GCAGATA
 CGACCTTAAG TCC GGACTTAAGA CGTCTAT

Not I Xho I Nsi I Xba I Apa I T7 promoter/priming site
 TCCATCACAC TGGCGGCCGC TCGAGCATGC ATCTAGAGGG CCAATTTCGC CCTATAGTGA
 AGGTAGTGTG ACCGCCGGCG AGCTCGTACG TAGATCTCCC GGGTTAAGCG GGATATCACT

M13 Forward (-20) priming site
 GTCGTATTAC AATTCACCTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT 470
 CAGCATAAATG TTAAGTGACC GGCAGCAAAA TGTTCAGCA CTGACCCTTT TGGGACCGCA



Εικόνα 4.1 : Χάρτης του πλασμιδίου pCR®-Blunt της Invitrogen. Διακρίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά του πλασμιδίου, δηλαδή : η θέση έναρξης της αντιγραφής (pUC ori), ο υποκινητής P_{lac} ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου lacZα-ccdB, το γονίδιο θανάτου ccdB σε σύντηξη με το LacZα, για την επιλογή των ανασυνδυασμένων στελεχών, τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και ζεοσίνη.

4.6.2 Πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (Invitrogen) επιτρέπει τη παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον ζυμομύκητα *P. pastoris* αλλά και την έκκριση τους στον εξωκυττάριο χώρο με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας α -factor της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Ο επίτοπος c-myc επιτρέπει την ανίχνευση της παραγόμενης πρωτεΐνης από τα αντισώματα αντι-myc και αντι-myc-HRP και τον καθαρισμό τους σε στήλες ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, ενώ τα έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης συμβάλλουν στο διαχωρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η αντιγραφή του πλασμιδίου εξασφαλίζεται από τη θέση έναρξης της αντιγραφής. Ακόμη, το πλασμίδιο περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1), ο οποίος κατευθύνει την επαγόμενη από τη μεθανόλη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η αλκοολική οξειδάση συμμετέχει στον καταβολισμό

της μεθανόλης, οξειδώνοντάς την σε φορμαλδεΐδη και H₂O₂. Συνεπώς, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορούν να μεγαλώσουν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη. Τέλος, το πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στα μετασχηματισμένα στελέχη έναντι του αντιβιοτικού ζεοσίνη.

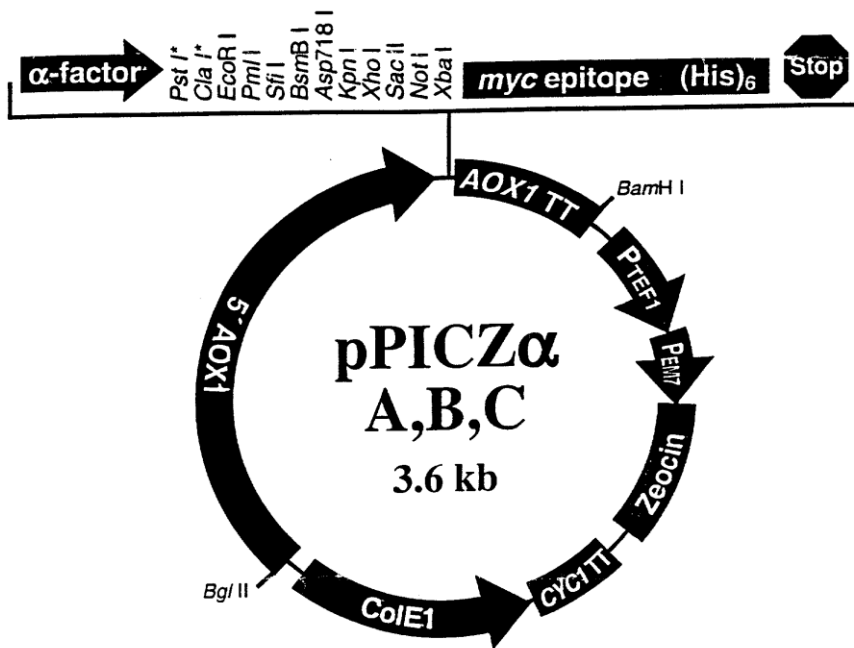


FIG. 1

Εικόνα 4.2 : Χάρτης του πλασμιδίου pPICZαA της Invitrogen. Στην εικόνα φαίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά του πλασμιδίου : το σημείο έναρξης της αντιγραφής, ο υποκινητής του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 που επάγει υψηλά επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρουσία μεθανόλης, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σηματοδοτική αλληλουχία (α-factor) για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης, το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, η αλληλουχία του-myc επίτοπου (myc epitope) για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το αντίστοιχο αντίσωμα και το γονίδιο κωδικοποίησης έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (6×His) για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση στηλών ιοντοαλλακτικής χρωματογραφίας.

4.7 Εκκινητές

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εναρκτήρια μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου Mtlac-2063133 ή τμημάτων αυτού με τις τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επικάλυψης σχεδιάστηκαν με οδηγό τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντλήθηκε από το γονιδίωμα του *M. thermophila*, από τη βάση δεδομένων Genome Portal (<http://genome.igi-psf.org/Spoth1/Spoth1.home.html>). Η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων έγινε από την εταιρία Eurofins MWG Operon (Γερμανία). Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *EcoRI* και *XbaI*.

Εκκινητές για το γονίδιο Mtlac-2063133 συμβατοί με το πλασμίδιο pPICZαA

MtLac2063133F: GC **GAA TTC** GGA ACT CTT GTC CAT GAT GAA CAG

(32bp, Θερμοκρασία τήξης (Tm=56°C) για υβριδοποίηση 24 bp)

MtLac2063133R: GCT **CTA GA** TGA CCG GAA TCC TCA CTA TCC

(29 bp, Θερμοκρασία τήξης (Tm=55°C) για υβριδοποίηση 21bp)

Εκκινητές για την overlapping PCR (μπλε:βάσεις που υβριδοποιείται ο εκκινητής, πράσινα: τα τμήματα του εκκινητή που αιωρούνται)

MtLac2063133e1R: **AAG GCC GTG CCA ATG** CAT GCT AAG GTT CCG GTC ATT C

(37bp, Tm=55°C for annealing 22bp)

MtLac2063133e2F: **CAT TGG CAC GGC CTT TCT CAG**

(21bp, Tm=56°C)

MtLac2063133e2R: **CAG ATC GTT TCC ATG CCCA TGA TCA TGT GTG CCA GAA TGT G**

(40bp, Tm=56°C for annealing 24bp)

MtLac2063133e3F: **GCA TGG AAA CGA TCT GGG TGG**

(21bp, Tm=56°C)

Μοριακές Τεχνικές

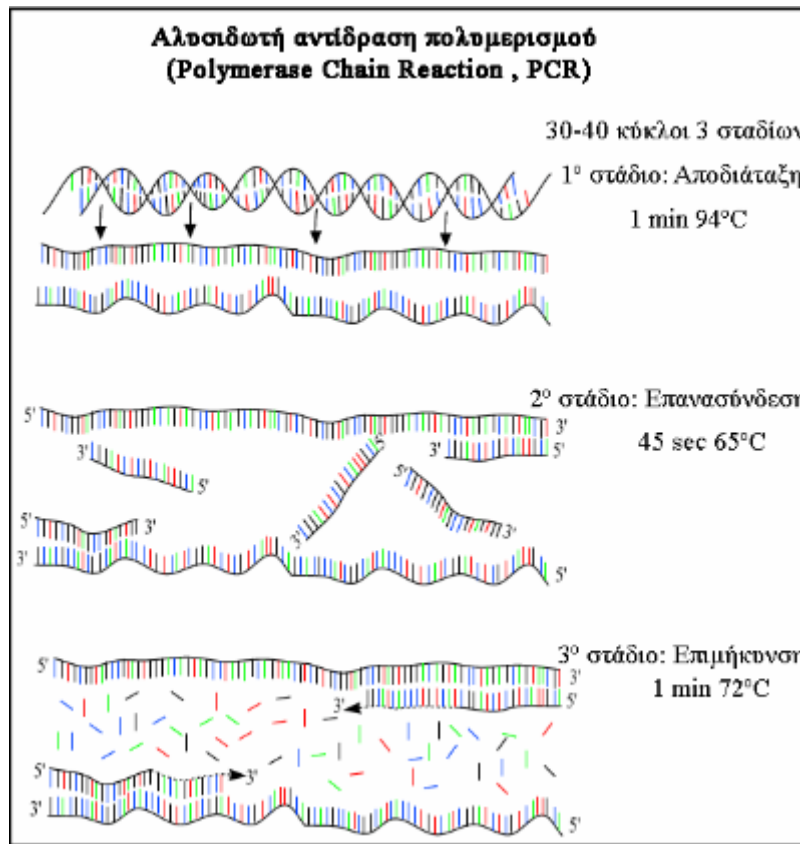
4.8 Απομόνωση ολικού DNA από το μύκητα *M. thermophila*

Η απομόνωση DNA από το θερμόφιλο μύκητα *M. thermophila* έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του τυποποιημένου πακέτου της Sigma – Aldrich, GenElute™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit. Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για 48 ώρες. Η βιομάζα του συλλέχθηκε με τη βοήθεια υφασμάτινου ηθμού, και στη συνέχεια λυοφιλιώθηκε σε συσκευή εξάχνωσης υπό κενό. Πραγματοποιήθηκε κονιορτοποίηση σε γουδί και παρελήφθησαν 0,1 g σκόνης για την απομόνωση του ολικού DNA.

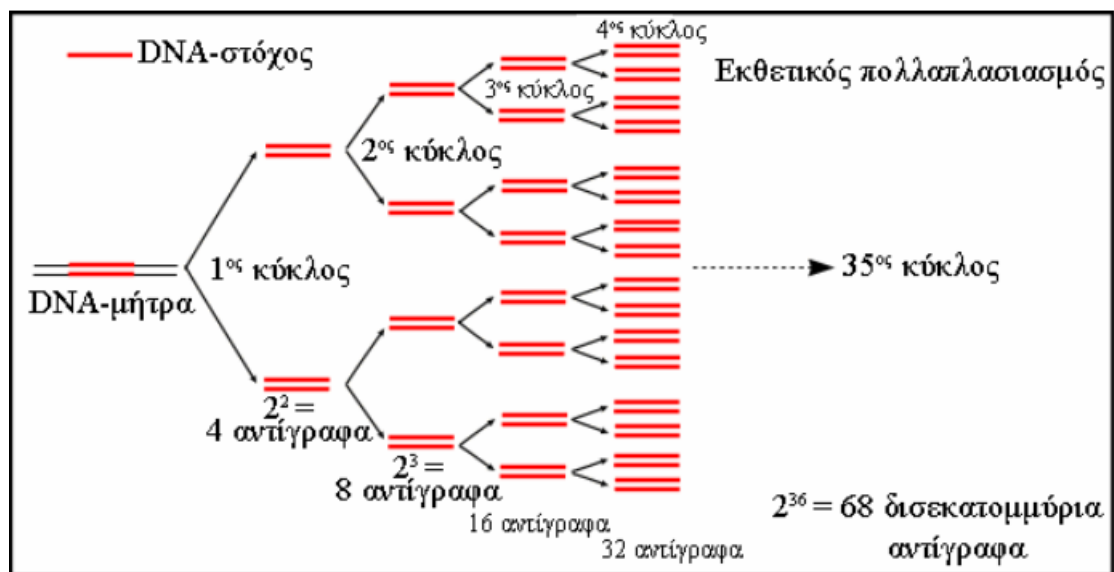
4.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Το αρχικό υλικό για την διεξαγωγή της PCR είναι ένα δείγμα DNA στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται πολλαπλασιασμός του DNA, η αρχική ποσότητα DNA που χρειάζεται είναι πολύ μικρή : ακόμη και ένα μόριο DNA αρκεί. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου. Για να προκύψει μονόκλωνο DNA, αρκεί η θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων. Καθώς το ένζυμο χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA ώστε να ξεκινήσει τη σύνθεση, προσθέτουμε στην αντίδραση δύο ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές. Καθένας από αυτούς είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους κλώνους DNA-στόχου, ώστε να υβριδοποιείται, δηλαδή να προσδένεται σε αυτή. Επομένως, τα σημεία έναρξης της σύνθεσης DNA *in vitro* μπορούν να καθοριστούν προσθέτοντας στην αντίδραση εκκινητές που έχουν την κατάλληλη αλληλουχία, ώστε να υβριδοποιούνται με τη μήτρα σε συγκεκριμένες και επιθυμητές περιοχές. Οι εκκινητές επιλέγονται ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που επιθυμείται να πολλαπλασιαστεί. Κάθε νέος κλώνος DNA που συντίθεται από έναν εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Δημιουργούνται λοιπόν νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών σε κάθε νέο κλώνο DNA που συντίθεται. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά, ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι, οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις θέσεις πρόσδεσης που έγιναν προσβάσιμες λόγω της αποδιάταξης και συντίθεται νέοι κλώνοι. Οι κύκλοι θέρμανσης, προσκόλλησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασής τους με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων μορίων DNA επαναλαμβάνονται, έτσι ώστε μετά από

κύκλους το μίγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά έως αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές.



Εικόνα 4.3 : Περιγραφή ενός πλήρους κύκλου μιας PCR αντίδρασης



Εικόνα 4.4 : Εκθετικός πολλαπλασιασμός των νεοσυστατων κλώνων σε μια αντίδραση PCR

Στην πράξη, η τυπική απόδοση ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση είναι το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος που πολλαπλασιάζεται. Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του προϊόντος της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου 10% περίπου του όγκου της αντίδρασης αναμιγνύεται με νερό και με το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος (loading buffer). Στην παρούσα εργασία, η πρώτη PCR έγινε για τη λήψη ολόκληρου του γονιδίου μαζί με τα ιντρόνια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της KOD πολυμεράσης. Η KOD DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι μια ανασυνδυασμένη μορφή της *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 DNA πολυμεράσης. Η KOD DNA πολυμεράση είναι μια υψηλής πιστότητας θερμοσταθερή πολυμεράση, η οποία ενισχύει το DNA-στόχο με εξαιρετική ακρίβεια και απόδοση. Η ικανότητα του ενζύμου να διορθώνει την εξωνουκλεατική αλληλουχία με κατεύθυνση 3' → 5', έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλότερη συχνότητα μετάλλαξης PCR από οποιοδήποτε άλλη εμπορικά διαθέσιμη DNA πολυμεράση.

Στη συνέχεια ακολουθούν πίνακες, στους οποίους αναγράφονται τα συστατικά κάθε αντίδρασης, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες έλαβαν χώρα ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας- στόχου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR με σκοπό τη λήψη ολόκληρου του γονιδίου, τα συστατικά της οποίας αναφέρονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 : Συστατικά της αντίδρασης PCR για τη λήψη ολόκληρου του γονιδίου

Γενωμικό DNA	2 μl
Υπερκάθαρο Νερό	32 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)	5 μl
25 μM MgSO ₄	3 μl
Εκκινητής (Primer) Forward	1 μl
Εκκινητής (Primer) Reverse	1 μl
KOD πολυμεράση	1 μl
DNTPs	5 μl

Οι συνθήκες στις οποίες έλαβε χώρα η παραπάνω αντίδραση παρουσιάζονται στον πίνακα :

Πίνακας 4.3 : Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τη λήψη ολόκληρου του γονιδίου

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)
Ενεργοποίηση της πολυμεράσης	2 min	95
Αποδιάταξη DNA	20 sec	95
Υβριδοποίηση εκκινητών	10 sec	50
Επέκταση εκκινητών	40 sec	70
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	1 min	68

Κατόπιν, έγιναν τρεις διαφορετικές αντιδράσεις PCR για να ενισχυθούν ποσοτικά οι τρεις κωδικοποιούσες αλληλουχίες (εξωνία) του γονιδίου. Τα συστατικά, καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 4.4: Συστατικά της αντίδρασης PCR για απομόνωση εξωνίων

DNA	1 μ l
Υπερκάθαρο Νερό	33 μ l
Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)	5 μ l
MgSO ₄	3 μ l
Εκκινητής (Primer) Forward	1 μ l
Εκκινητής (Primer) Reverse	1 μ l
KOD πολυμεράση	1 μ l
dNTPs	5 μ l

Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση για τα εξώνια 1 και 3 παρουσιάζονται παρακάτω :

Πίνακας 4.5 : Συνθήκες της αντίδρασης_PCR για τα εξώνια 1 και 3

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)
Ενεργοποίηση της πολυμεράσης	2 min	95
Αποδιάταξη DNA	20 sec	95
Υβριδοποίηση εκκινητών	10 sec	50
Επέκταση εκκινητών	10 sec	70
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	1 min	68

Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση για το εξώνιο 2 παρουσιάζονται παρακάτω :

Πίνακας 4.6 : Συνθήκες της αντίδρασης PCR για το εξώνιο 2

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)
Ενεργοποίηση της πολυμεράσης	2 min	95
Αποδιάταξη DNA	20 sec	95
Υβριδοποίηση εκκινητών	10 sec	51
Επέκταση εκκινητών	30 sec	70
Τελική επέκταση και επιδιόρθωση	1 min	68

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης (extension polymerase chain reaction, OE-PCR), με σκοπό τη συνένωση των τριών εξονίων, τα οποία έχουν απομονωθεί. Τα συστατικά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επικάλυψης αναγράφονται στον πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7 : Συστατικά της αντίδρασης overlapping PCR

DNA	3 μl
Υπερκάθαρο Νερό	31 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)	5 μl
MgSO ₄	3 μl
Εκκινητής (Primer) Forward	1 μl
Εκκινητής (Primer) Reverse	1 μl
KOD πολυμεράση	1 μl
DNTPs	5 μl

Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η παραπάνω αντίδραση παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8 :

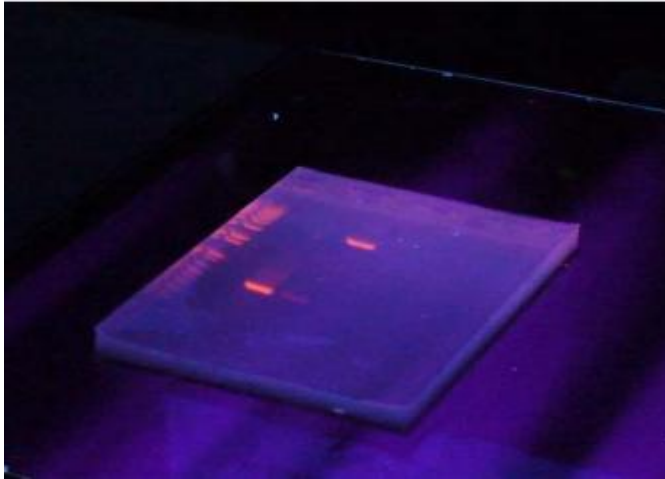
Πίνακας 4.8 : Συνθήκες της αντίδρασης overlapping PCR

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)
Αρχική αποδιάταξη	2 min	95
Αποδιάταξη	20 sec	95
Υβριδοποίηση	10 sec	58
Επέκταση	40 sec	70
Τελική επέκταση	1 min	58

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 35 φορές. Ακολούθησε έλεγχος του δείγματος με ηλεκτροφόρηση (δείγμα+10 ml loading buffer) και απομόνωση του DNA με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Extraction kit της εταιρίας Macherey-Nagel.

4.10 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους και τους σχήματός τους. Τα μικρά τμήματα γενικά κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα. Έπειτα, εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Τα μόρια DNA που μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα διατηρούνται άθικτα και είναι δυνατόν να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν. Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Παρασκευάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (σε μορφή λεπτής πλάκας) με μικρά πηγαδάκια και εμβαπτίζεται σε ένα διάλυμα με κατάλληλες συγκεντρώσεις αλάτων. Στην παρούσα εργασία, μετρήθηκαν 0,5 g [1% (w/v)] αγαρόζης σε 50 mL διαλύματος 1 × TBE. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με βρασμό για 2 min περίπου. Το διάλυμα αφέθηκε για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο πήκτωμα προστέθηκε 5 mL βρωμιούχο αιθίδιο αρχικής συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στα δείγματα προστίθεται μικρή ποσότητα ενός διαλύματος βαρύτερου από το νερό που περιέχει μια χρωστική. Με αυτόν τον τρόπο καθίστανται ορατά, γεγονός που διευκολύνει την τοποθέτησή τους στο πήκτωμα. Έπειτα, με τη βοήθεια κατάλληλου τροφοδοτικού, δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο, οπότε τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Τα μικρά μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Άλλοι παράγοντες, όπως το φορτίο και το σχήμα, επηρεάζουν επίσης την κίνηση των μορίων μέσα στο πήκτωμα. Καθώς μετακινούνται, τα διαφορετικά μόρια DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές (ανάλογα με το μέγεθός τους) περιοχές του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 60 Volts για 45 λεπτά περίπου. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με UV, και έτσι οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV).



Εικόνα 4.5: Πήκτωμα αγαρόζης κάτω από το φως UV. Οι ζώνες του DNA συνδέονται με το EtBr και φθορίζουν κόκκινο.

4.11 Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης

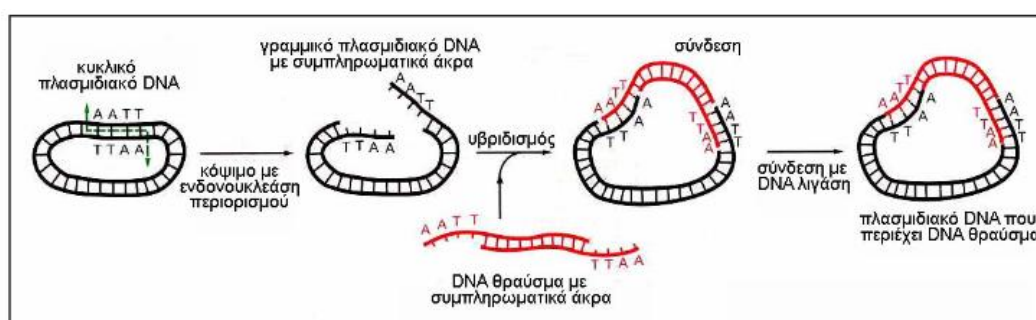
Για την απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, είναι πρώτα απαραίτητη η κατάτμηση του τεμαχίου της γέλης, το οποίο περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA, πράγμα που κρίνεται από των αριθμό των βάσεων του. Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της Macherey-Nagel. Επίσης, για την αύξηση της απόδοσης της απομόνωσης χρησιμοποιείται αγαρόζη υψηλής καθαρότητας.

4.12 Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)

Σχεδόν όλα τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν παλίνδρομες θέσεις, δηλαδή θέσεις στις οποίες η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβάζεται στην κατεύθυνση 5' προς 3'. Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού λειτουργούν ως διμερή, αποτελούμενα από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες που εφαρμόζουν στο DNA με τέτοιο τρόπο, ώστε ο άξονας της αμφίπλευρης συμμετρίας τους να συμπίπτει με αυτόν της αλληλουχίας αναγνώρισης. Το ένζυμο κινείται κατά μήκος του DNA και, όταν φτάσει στην αλληλουχία – στόχο, κόβει τους δύο κλώνους. Το σημείο κοπής είναι διαφορετικό ανάλογα το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Για ορισμένα ένζυμα περιορισμού είναι στο μέσο της θέσης αναγνώρισης, οπότε δημιουργούνται λεία άκρα (blunt ends). Άλλα ένζυμα κόβουν τις δύο αλυσίδες του DNA σε συμμετρικά έκκεντρα σημεία (staggered cuts) μία ή δύο βάσεις από το

μέσο, οπότε δημιουργούνται προεξέχοντα άκρα 2 ή 4 βάσεων αντίστοιχα. Τα προεξέχοντα άκρα είναι προς την 5' ή την 3' κατεύθυνση, ανάλογα με το ένζυμο. Επειδή η αλληλουχία της μονόκλωνης προέκτασης είναι παλινδρομική, μπορεί να στοιχίζεται με τον εαυτό της, και έτσι αυτά τα άκρα αποκαλούνται κολλώδη άκρα (sticky ends). Ένζυμα που ενώνουν τμήματα DNA που έχουν είτε λεία είτε κολλώδη άκρα ονομάζονται λιγάσες.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση, η οποία απομονώνεται από το βακτηριοφάγο T4.



Εικόνα 4.6: Σχηματισμός του ανασυνδυαμένου πλασμιδιακού DNA

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης KOD Hot Start είναι τμήματα του DNA που φέρουν ισοτελή άκρα (blunt ends), όπως ισοτελή άκρα φέρει και το πλασμίδιο pCR® Blunt. Για τη συνένωση αυτών των τμημάτων με το πλασμίδιο pCR® Blunt απαιτούνται τα συστατικά που αναφέρονται στον πίνακα 4.9.

Πίνακας 4.9 : Συστατικά της αντίδρασης συνένωσης τμημάτων DNA με ισοτελή άκρα στο πλασμίδιο pCR® Blunt

pCR® Blunt	1 μl
Τμήμα DNA	5 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα λιγάσης (Buffer)	1 μl
T₄ DNA λιγάση	1 μl
Υπερκάθαρο νερό	2 μl

Κατόπιν, για να εισαχθούν τα τμήματα του DNA στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA πραγματοποιήθηκε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *XbaI*, από τη δράση των οποίων προκύπτουν κολλώδη άκρα (sticky ends). Έγιναν δύο αραιώσεις του γονιδίου, 1:3 και 1:7, καθώς και οι αντιδράσεις ελέγχου που δε

περιέχουν το γονίδιο. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων είναι $V = 20 \text{ ml}$. Απαιτούνται τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10 : Αναλογίες αντιδράσεων τελικού όγκου 20μL, συνένωσης τμημάτων DNA με συμπληρωματικά άκρα στο πλασμίδιο pPICZaA.

	1:3	1:7	Control 1	Control 2
Υπερκάθαρο νερό	13 μl	9 μl	16 μl	17 μl
Buffer λιγάσης (10x)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Πλασμίδιο pPICZaA	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Τμήμα DNA	3 μl	7 μl	-	-
Λιγάση T4	1 μl	1 μl	1 μl	-

Τα δείγματα τοποθετούνται στο thermomixer στους 16°C και η διαδικασία αυτή διαρκεί τρεις ώρες. Προστέθηκαν ωστόσο, 0,5% NaCl, και όχι 1% NaCl, διότι η ζεοσίνη καταστρέφεται σε κανονική αλατότητα. Μετά την προσθήκη των αναφερθεισών ποσοτήτων ρυθμίστηκε το pH με NaOH στο 7,4.

4.13 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια και ο λειτουργικός ρόλος συνίσταται στην προστασία των μικροοργανισμών από την εισβολή ξένου DNA, διότι αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες, μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων, και διασπούν το μόριο DNA σε αυτά τα σημεία. Οι αλληλουχίες-στόχοι είναι συχνά παλίνδρομες, δηλαδή εμφανίζουν συμμετρία γύρω από ένα κεντρικό σημείο. Το DNA του στελέχους – ξενιστή είναι προστατευμένο, καθώς οι θέσεις που προσβάλλονται από τα δικά του ένζυμα είναι μεθυλιωμένες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται και οι αλληλουχίες πέψης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 4.11 : Περιοριστικές ενδονουκλεάσες, μικροοργανισμοί προέλευσης και αλληλουχίες πέψης

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	Οργανισμός προέλευσης	Αλληλουχία πέψης
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T T A A ↑G...5'
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'...T [↓] C T A G A...3' 3'...A G A T C T...5'
<i>PmeI</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	5'...G T T T [↓] A A A C...3' 3'...C A A A _↓ T T T G...5'

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI*. Τα συστατικά της αντίδρασης παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί :

Πίνακας 4.12 : Συστατικά της αντίδρασης πέψης πλασμιδιακού DNA από τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI*

Πλασμιδιακό DNA	5μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	2 μl
Περιοριστικό ένζυμο <i>EcoRI</i>	1 μl
Περιοριστικό ένζυμο <i>XbaI</i>	1 μl
Υπερκάθαρο νερό (MillQ H ₂ O)	11 μl

- Ο τελικός όγκος του δείγματος είναι V= 20μl και η αντίδραση εισάγεται στους 37°C για μια ώρα.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση ελέγχου, όπου εισάγονται 20 μl του δείγματος και 5 μl loading buffer.
- Τα πλασμίδια αποστέλλονται για sequencing.
- Λήψη του κομμένου από τα ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* γονιδίου και τοποθέτηση του στο πλασμίδιο pPICZaA, μέσω αντίδρασης συνένωσης.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά με στόχο τη λήψη πολλαπλών αντιγράφων DNA.

Ωστόσο, το DNA που λήφθηκε από την παραπάνω διαδικασία, απαιτείται να γραμμικοποιηθεί, ώστε να μπορέσει να ενσωματωθεί στο ζυμομύκητα *P. Pastoris*. Η γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaA έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου *PmeI*. Τα συστατικά της αντίδρασης καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.13 : Συστατικά αντιδράσεων τελικού όγκου 100 μl για τη γραμμικοποίηση του DNA

Lac pPICZaA	70μl
<i>PmeI</i>	2μl
Buffer (10x)	10μl
dH₂O	18μl

Η γραμμικοποίηση πραγματοποιείται στον επωαστήρα στους 30 °C και διαρκεί μια ώρα. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 4 μl DNA με πιο αραιό gel, διότι το μέγεθος του DNA είναι μεγάλο και σε αραιότερο gel θα κινηθεί καλύτερα. Για τον καθαρισμό του DNA πραγματοποιείται το Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit και για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων γίνεται ηλεκτροφόρηση 5 μl DNA.

4.14 Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)

Έπειτα από την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCR® Blunt και pPICZaA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους, με στόχο τη διαβεβαίωση της ορθότητάς της ύστερα από την επεξεργασία μέσω των μοριακών διαδικασιών (PCR, πέψη). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC – Biotech Services GmbH (Αυστρία), αφού στάλθηκε δείγμα καθαρού πλασμιδιακού DNA όγκου 10 μL (300 – 500 ng).

4.15 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Ο μετασηματισμός αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε κύτταρα τα οποία έχουν μετατραπεί σε παροδικά διαπερατά μακρομόρια. Ο εντοπισμός των μετασηματισμένων κυττάρων επιτυγχάνεται από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που τους προσδίδει το εισαγόμενο πλασμίδιο (παρουσία αντιβιοτικού θα αναπτυχθούν μόνο τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο).

4.15.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*

- Αρχικά έγινε εμβολιασμός μίας αποικίας βακτηρίων TOP10 σε 5 mL θρεπτικού μέσου LB, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού.
- Ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση (180 rpm) στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- Στη συνέχεια 1 mL από αυτή την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 100 mL LB, τα οποία επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 37°C, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα (OD_{600nm}) στα 600 nm να κυμαίνεται από 0.4 έως 0.8. Η φιάλη με την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε πάγο, όπου παρέμεινε εκεί για 30 λεπτά.
- Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (1500×g, 5 λεπτά, 4°C) και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 12 mL στείρου παγωμένου διαλύματος 0,1 M $MgCl_2$.
- Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε 4 mL στείρου παγωμένου διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε στους 4°C για 16 περίπου ώρες, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης των κυττάρων στο μετασηματισμό.
- Τα βακτηριακά κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C, έπειτα από προσθήκη 1,9 mL διαλύματος γλυκερόλης 50% w/w στο εναιώρημα και τη δημιουργία κλασμάτων όγκου 0,1 mL σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf.

4.15.2 Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων

- Αρχικά, 100 μl επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων λήφθηκε από τους -80°C και τοποθετήθηκε σε πάγο, ώστε να ξεπαγώσει.
- Στη συνέχεια 5μl πλασμιδιακού DNA προστίθενται στα κύτταρα με αργές ελικοειδείς κινήσεις, προκειμένου να μην σπάσουν τα κύτταρα. Το μίγμα αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολούθησε θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για ενάμισι λεπτό και άμεση προσθήκη 0,2 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB στο μείγμα.
- Έπειτα, το μείγμα αφέθηκε για 5 λεπτά στον πάγο, και κατόπιν επώαζεται στους 37°C για 1 ώρα.
- Έπειτα, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LS.LB (150-300 μl) σε τρυβλίο *Petri*, παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη (25 μg/mL ζεοσίνη
- Ακολούθησε επώαση για περίπου 16 ώρες στους 37°C.
- Μετά την εμφάνιση αποικιών, λήφθηκαν 5–10 μεμονομένες αποικίες για εμβολιασμό σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB ή LS.LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού και επώαση, υπό ανάδευση (200rpm) για 16 περίπου ώρες στους 37°C.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1500xg για 10 λεπτά) με σκοπό τη λήψη των κυττάρων και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).
- Ο έλεγχος της επιτυχίας του ανασυνδυασμού έγινε με την πέψη του πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης.

4.15.3 Προετοιμασία επιδεικτικών κυττάρων ζύμης *P.pastoris*

- Τα κύτταρα της ζύμης *P.pastoris* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό YPD των 50 ml και τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 30 °C για 24 ώρες.
- Έπειτα, με μια ποσότητα των 10 ml εμβολιάστηκαν οι δύο καλλιέργειες των 300 ml YPD.
- Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C στα 200 rpm για τέσσερις περίπου ώρες, έως ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 600 nm (OD₆₀₀) να είναι περίπου 1,3-1,5.
- Ακολούθησε μεταφορά της καλλιέργειας σε αποστειρωμένα tubes και φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στα 5000 rpm στους 4°C.
- Έπειτα, μετά τη ρίψη του υπερκείμενου υγρού, επαναδιαλύθηκαν τα κύτταρα σε παγωμένο υπερκάθαρο νερό 150 ml, με τη βοήθεια vortex.

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στα 5000 rpm στους 4°C.
- Έπειτα, μετά τη ρίψη του υπερκείμενου υγρού, επαναδιαλύθηκαν τα κύτταρα σε παγωμένο υπερκάθαρο νερό 150 ml, με τη βοήθεια vortex.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στα 5000 rpm στους 4°C.
- Επαναδιάλυση κυττάρων σε 12 ml παγωμένης σορβιτόλης 1M και μεταφορά τους σε μικρό falcon.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στα 5000 rpm στους 4°C.
- Επαναδιάλυση κυττάρων σε παγωμένης σορβιτόλης 1M και λήψη όγκου κυττάρων 1,5ml.

4.15.4 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *P.pastoris*

- Πριν τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιήθηκε η γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαA με πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση *PmeI*. Το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο καθαρίστηκε και απομονώθηκε με Nucleospin Gel Clean up kit της Macherey-Nagel. Ωστόσο, στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αυτής, αντί για ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης του DNA, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό για την έκλυση από τη στήλη, με σκοπό την αποφυγή παρουσίας αλάτων.
- Στη συνέχεια, από το 1,5ml κυττάρων, λήφθηκαν 80 μl κυττάρων ζύμης *P.pastoris* και αναμίχθηκαν με 30 μl DNA γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαA.
- Το μίγμα μεταφέρθηκε σε προψυγμένη κυψελίδα, η οποία είναι ειδική για ηλεκτροδιάτρηση και έχει εμβαπτιστεί σε διάλυμα 70% αιθανόλη.
- Το μίγμα αφέθηκε στον πάγο για 5 λεπτά και τα κύτταρα ήταν έτοιμα για το μετασηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση στη συσκευή GENE PULSER της BIORAD.
- Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού, πραγματοποιήθηκε άμεση προσθήκη παγωμένης σορβιτόλης 1M μέσα στην κυψελίδα και το δείγμα μεταφέρθηκε σε στείρο σωλήνα falcon (15 mL) και επωάστηκε για δύο ώρες στους 30°C χωρίς ανάδευση.
- Μετά το πέρας δυο ωρών, τα μετασηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία που περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό YPDS και ζεοσίνη και επωάζονται στους 30°C για 3 – 4 ημέρες.
- Μετά το πέρας τεσσάρων ημερών, λήφθηκαν οι αποικίες που έχουν αναπτυχθεί και τοποθετήθηκαν σε τριβλίο YPD.
- Το τριβλίο επωάστηκε στους 30°C για 48 ώρες.

4.16 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Μεμονωμένες αποικίες μετασηματισμένων στελεχών της ζύμης *P.pastoris* χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 50 mL θρεπτικού υλικού BMGY σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL. Η προκαλλιέργεια επώαστηκε στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση (200 rpm) για 16-20 ώρες. Έπειτα, κατάλληλος όγκος της προκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε, και τα κύτταρα που συλλέχθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε 50 mL θρεπτικού υλικού BMMY, ώστε η τελική συγκέντρωση τους να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα ίση με τη μονάδα (O.D.600nm =1). Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση (200 rpm), ενώ κάθε 24 ώρες πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες και προστίθενται 250 μL μεθανόλης. Από κάθε δείγμα, λαμβανόταν μια ποσότητα καλλιέργειας και μετρούταν η οπτική απορρόφηση στα 600 nm. Η υπόλοιπη ποσότητα του δείγματος φυγοκεντρούταν και το υπερκείμενο υγρό συλλεγόταν και χρησιμοποιούταν στον έλεγχο της ύπαρξης και των επιπέδων παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

4.17 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

Μετά από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε κλίμακα μικρής καλλιέργειας, ακολουθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός της. Αρχικά, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για είκοσι λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση του κυτταρικού υλικού και τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού. Τα κυτταρικά θραύσματα διαχωρίστηκαν από το υπερκείμενο με διήθηση με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού, και στη συνέχεια με διήθηση υπό κενό με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 μm και 0.2 μm. Από τις διηθήσεις προκύπτει διαυγές διάλυμα, το οποίο συμπυκνώθηκε με τη χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400. Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιήθηκαν ειδικές μεμβράνες, οι οποίες επιτρέπουν τη διέλευση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος μικρότερο από 10 kDa και εφαρμόζεται πίεση, η οποία ρυθμίζεται στα 50 psi. Το συμπυκνωμένο διάλυμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl (Talon). Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα τοποθετείται σε ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich), οι οποίες επιτρέπουν την ανταλλαγή του διαλύτη στο εσωτερικό και το εξωτερικό της πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάστασης ισορροπίας στο σύστημα. Συνεπώς, μετά το τέλος της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο Talon buffer με pH 8. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για περίπου 30 min, ενώ στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του διαλύματος των πρωτεϊνών στο 1/3 περίπου του όγκου του

σχηματιζόμενου σωλήνα. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ($VP.Δ. \geq 100 \times V_{\text{διαλ/τος πρωτεϊνών}}$), για 24 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση. Εν συνεχεία, το πρωτεϊνικό διάλυμα διαβιβάστηκε σε κατάλληλα προετοιμασμένη στήλη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.), όπου κρατείται η επιθυμητή πρωτεΐνη και αποβάλλονται οι τυχόν άλλες πρωτεΐνες. Η στήλη προετοιμάζεται κατά τον εξής τρόπο:

- Τοποθέτηση 4 ml ρητίνης στη πλαστική στήλη.
- Ακολουθεί έκπλυση της στήλης προκειμένου να καθαριστεί η ρητίνη από το διάλυμα αποθήκευσης.
- Τοποθετούνται τρεις στήλες Talon buffer και αφού προετοιμαστεί η στήλη, τοποθετείται το δείγμα.
- Η επιθυμητή πρωτεΐνη κρατείται στη στήλη, ενώ όλες οι υπόλοιπες αποβάλλονται.
- Η στήλη ξεπλένεται με 10 ml Talon buffer, με σκοπό την απομάκρυνση των εναπομεινάντων πρωτεϊνών.
- Προστίθενται 5 ml 5 mM ιμιδαζόλιο, και κατόπιν 7 ml 100 mM ιμιδαζόλιο, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με τα κατάλοιπα ιστιδίνης για την πρόσδεση στα ιόντα κοβαλτίου, απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεδεμένα μόρια.
- Ακολουθεί καθαρισμός και αποθήκευση της ρητίνης σε 20 % αιθανόλη στους 4°C.

4.18 Ηλεκτροφόρηση πολυπεπτιδίων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης είναι μια βιοχημική μέθοδος, στην οποία τα πρωτεϊνικά μόρια διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος κατά τη διέλευση τους μέσω των πόρων του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, ιονικής ισχύος και θερμοκρασίας. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με ομάδες του δις-ακρυλαμιδίου (cross-linking). Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με την παρουσία μιας χημικής ένωσης που παίζει το ρόλο του καταλύτη, του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και ενός ενεργοποιητή, της N,N,N',N'- τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου καθώς και κατά την προετοιμασία του προς διαχωρισμό δείγματος χρησιμοποιούνται κυρίως ιοντικά απορρυπαντικά (SDS) και αναγωγικοί παράγοντες, οι οποίοι δημιουργούν αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών). Το SDS αποδιατάσσει

τα μόρια των πρωτεϊνών μετά από θέρμανση, καθώς εξουδετερώνει τους δευτερεύοντες δεσμούς και συνδέεται με τα πολυπεπτίδια με σταθερό λόγο βάρους. Με τον τρόπο αυτό εξουδετερώνεται το φορτίο του πολυπεπτιδίου, καθώς το ενδογενές φορτίο του μορίου είναι ελάχιστο σε σύγκριση με το αρνητικό φορτίο του συνδεδεμένου SDS. Έτσι, η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μοριακό τους βάρους.

Στην ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα επιστίβαξης, *stacking gel*), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται, αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού, *resolving gel*). Το πήκτωμα επιστίβαξης επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων, λόγω της μικρής ποσότητας ακρυλαμιδίου που περιέχει. Έτσι, πολυπεπτίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους μετατοπίζονται με την ίδια κινητικότητα και παρατάσσονται όλα μαζί σε μια ιδεατή γραμμή, στο όριο των δυο πηκτωμάτων. Στη συνέχεια, τα μόρια κινούνται στο πήκτωμα διαχωρισμού, δια μέσου πολύ μικρότερων πόρων, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini – Protean 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).



Εικόνα 4.7 Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που Mini-Protean 3 (Biorad, Η.Π.Α.)

Ένα ζεύγος γυάλινων πλακών καθαρίστηκε με διάλυμα αιθανόλης 70% v/v και εφαρμόστηκε πάνω στη συσκευή. Παρασκευάστηκε το διάλυμα διαχωρισμού, το οποίο εκχύθηκε ανάμεσα στις γυάλινες και αφέθηκε να πήξει για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε και εκχύθηκε το πήκτωμα επιστίβαξης και τοποθετήθηκε η ειδική «χτένα». Μετά την πήξη του διαλύματος (30 λεπτά), οι πλάκες προσαρμόστηκαν στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκαν 400 – 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS 1X έως την χαραγή. Η «χτένα» αφαιρέθηκε και τα δείγματα φορτώθηκαν στις οπές, που σχηματίστηκαν στο πήκτωμα επιστίβαξης από την τοποθέτηση της «χτένας». Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα όγκου 15 μl προστέθηκαν 7 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και ακολούθησε βρασμός του μίγματος για 5 λεπτά. Στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

εκτός από τα δείγματα, φορτώθηκαν 7 μ L πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, ή Low Range Markers: sc-2360, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Τέλος, διαβιβάστηκε ρεύμα 35mA/πήκτωμα για μία ώρα περίπου.

Πίνακας 4.14 Αναλογίες συστατικών για την παρασκευή πηκτώματος επιστίβαξης και διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE.

ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (Stacking gel) 4%		ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (Resolving gel) 10%	
Υπερκάθαρο Νερό	3,0 ml	Υπερκάθαρο Νερό	4,6 ml
0.25 M Tris/SDS 0.2% (pH 6.8)	3,75 ml	0.75 M Tris/SDS 0.2% (pH 8.8)	9,4 ml
40%bis-acrylamide (30:1)	0,75 ml	40% bis-acrylamide (30:1)	4,7 ml
TEMED	20 μ l	TEMED	30 μ l
APS 10% w/v	60 μ l	APS 10% w/v	90 μ l

4.19 Εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων

Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων έγινε με δύο τρόπους : με χρώση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 και με χρώση με άργυρο (silver straining).

Η πρώτη μέθοδος στηρίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και ειδικότερα σε κατάλοιπα αργίνινης (Arg), με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος. Το πήκτωμα αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκε προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (Staining solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 για 20 λεπτά και μετά εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) μέχρι οι ζώνες των πρωτεϊνών να γίνουν ευδιάκριτες. Καθ' όλη τη διάρκεια χρωματισμού – αποχρωματισμού το πήκτωμα ανακινούταν σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία).

Έπειτα, για μεγαλύτερη ακρίβεια, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος με χρώση αργύρου (silver straining), εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας της κατά την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Στη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες δεσμεύουν ιόντα αργύρου, και με

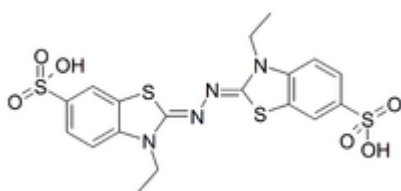
αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια εικόνα από μέταλλα αργύρου λεπτότατα διαμερισμένα [Chevallet *et al.*, 2006].

4.20 Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford [Bradford, 1976]. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η όξινη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 εμφανίζεται με δύο διαφορετικές έγχρωμες μορφές, μια ερυθρή και μια κυανή [Bradford 1976]. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 προσδένεται στα βασικά και στα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών και ειδικότερα σε κατάλοιπα αργινίνης. Κατά την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη χρωστική, η ερυθρή μορφή μετατρέπεται σε κυανή, προκαλώντας μια μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm. Η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης προκύπτει από την τιμή απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνη - χρωστική στα 595 nm και τη σύγκριση της μετρούμενης τιμής με πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων, προσθήκη διαλύματος Bradford και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να ανιχνευθούν ποσότητες πρωτεΐνης από 1-20 μg .

4.21 Υπολογισμός της ποσότητας της εμπορικής λακκάσης lcc1 για αντιδράσεις πολυμερισμού

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η εμπορική λακκάση lcc1 από τον *M. thermophila*, όπως έχει χαρακτηριστεί και εκφραστεί ετερόλογα στον *Aspergillus oryzae* από τον Berka και τους συνεργάτες του [Berka *et al.*, 1997]. Με τη χρήση της λακκάσης αυτής πραγματοποιήθηκαν διάφορες αντιδράσεις πολυμερισμού. Αρχικά, έγινε υπολογισμός της ποσότητας της λακκάσης (Unit/ml) που χρησιμοποιήθηκε, σύμφωνα με το υπόστρωμα ABTS, η δομή του οποίου παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4.8 : Δομή της χημικής ένωσης ABTS

Η λακκάση έχει τη δυνατότητα να οξειδώνει το ABTS στο έγχρωμο παράγωγό του που απορροφά στα 420nm. Χρησιμοποιήθηκε ο τύπος Lambert-Beer :

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Όπου

A = απορρόφηση προϊόντος

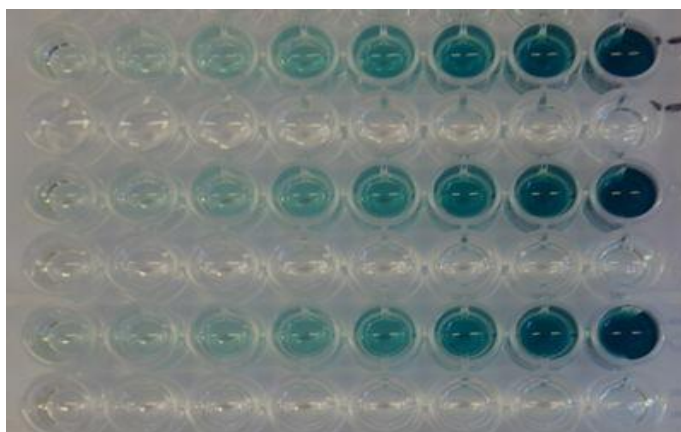
ϵ = σταθερά που εξαρτάται από την ουσία

Για το ABTS είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = απόσταση διαδρομής της δέσμης φωτός από την κυψελίδα

C = συγκέντρωση προϊόντος

Με τη χρήση του παραπάνω τύπου είναι εφικτό να γίνει αντιστοίχιση της απορρόφησης στη συγκέντρωση έγχρωμου προϊόντος. Χρησιμοποιώντας έτσι το μέσο όρο των δύο μετρήσεων, και αφαιρώντας από την τιμή απορρόφησης του τυφλού, η ποσότητα της λακκάσης υπολογίστηκε ίση με 1.712.570 Unit/ml.



Εικόνα 4.9 : Σχηματισμός του έγχρωμου προϊόντος μετά την οξείδωση του ABTS. Στην εικόνα παρουσιάζονται αυξανόμενες συγκεντρώσεις της οξειδωμένης μορφής του ABTS. Το προϊόν απορροφά στα 420nm.

4.22 Αντιδράσεις με κατεχόλη

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με εύρος Unit [4,4-8900]. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι τιμές 4,4 -220 –440 – 2200 - 4400 - 8900 Unit. Για 4,4 και 220 Unit, βρέθηκε πως δε λαμβάνεται ιζημα, ενώ για 440 Unit λήφθηκε ιζημα, όμως η μέτρησή του καθίστατο αδύνατη. Αντίθετα, για ποσότητες ενζύμου από 2200 έως 8900 Unit, παραλαμβάνονταν ιζημα σε μεγαλύτερες ποσότητες και ήταν δυνατή η μέτρηση του. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 4.15 : Πίνακας αντιστοίχισης της ποσότητας του ενζύμου με τις ποσότητες του ιζήματος

Units ενζύμου	Ποσότητα ιζήματος (mg)
2200	4,6
4400	5,8
8900	10,3

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, η μεγαλύτερη ποσότητα ιζήματος λήφθηκε, όταν χρησιμοποιήθηκαν 8900 Units λακκάσης. Ωστόσο, λόγω της μη γραμμικότητας της σχέσης ποσότητας ενζύμου-ποσότητας ιζήματος, επιλέχθηκε η οικονομική χρήση των 2200 Unit λακκάσης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επομένως, για τη χρήση των Unit, η τυπική αντίδραση που έλαβε χώρα ήταν η εξής :

Όγκος αντίδρασης : $V=25$ ml

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) : CH_3COONa pH =5

Θερμοκρασία : 25°C , 200 rpm

Ποσότητα λακκάσης : x Unit/ml, όπου x οι διαφορετικές τιμές του ενζύμου

Ποσότητα κατεχόλης : 0,00625 g

4.22.1 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της λακκάσης

Για την εξέταση της επίδρασης του pH στην ενεργότητα της λακκάσης, έγιναν πειράματα με εύρος pH από pH=3 έως και pH=7. Πιο αναλυτικά, για pH 3-5, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4 και κιτρικό οξύ, ενώ , για pH 6-7, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4 και $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$. Η τυπική αντίδραση που πραγματοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

Όγκος αντίδρασης : $V=25$ ml

Θερμοκρασία : 45°C

Ποσότητα λακκάσης : 1,3 μl, τα οποία αντιστοιχούν σε 2200 Unit/αντίδραση, δηλαδή 88 Unit/ml

Ποσότητα κατεχόλης : 0,00625 g

200 rpm

4.22.2 Επίδραση του χρόνου στην ενεργότητα της λακκάσης

Για την εξέταση της επίδρασης του χρόνου στην ενεργότητα της λακκάσης, έγιναν πειράματα σε τρεις διαφορετικούς χρόνους. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε χρόνο τρεις, έξι και εικοσιτέσσερις ώρες. Η τυπική αντίδραση ήταν η ακόλουθη:

Όγκος αντίδρασης : $V=25$ ml

Θερμοκρασία : 45°C , 200 rpm

Ποσότητα λακκάσης : 1,3 μl, τα οποία αντιστοιχούν σε 2200 Unit/αντίδραση, δηλαδή 88 Unit/ml

Ποσότητα κατεχόλης : 0,00625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα : Na_2HPO_4 - $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$

pH=6

4.22.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης

Για την εξέταση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης, έγιναν πειράματα σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στις θερμοκρασίες 30°C, 40°C, 50°C και 60°C. Η τυπική αντίδραση ήταν η ακόλουθη:

Όγκος αντίδρασης : V=25 ml

Ποσότητα λακκάσης : 1,3 μl, τα οποία αντιστοιχούν σε 2200 Unit/αντίδραση, δηλαδή 88 Unit/ml

Ποσότητα κατεχόλης : 0,00625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα : Na₂HPO₄ - Na₂H₂PO₄

pH=6

200 rpm

4.23 Διαδικασία απομόνωσης και μέτρησης του πολυμερούς

Τα βήματα που έλαβαν χώρα προκειμένου να απομονωθεί και να μετρηθεί η ποσότητα του πολυμερούς ήταν τα ακόλουθα:

1. Μεταφορά 10 ml του δείγματος σε σωλήνα τύπου falcon.
2. Φυγοκέντρηση συγκεκριμένου όγκου αντίδρασης για 10 λεπτά.
3. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε νερό και μεταφορά σε προζυγισμένο erpendorf 1,5 ml.
4. Νέα φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού με χρήση πιπέτας.
5. Freeze drying του πολυμερούς με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη.
6. Ζύγισμα για τον τελικό υπολογισμό της ποσότητας.

4.24 Έλεγχος για το σχηματισμό του πολυμερούς

Στην παρούσα εργασία, η κατεχόλη, η πυρογαλλόλη, το γαλλικό οξύ, η κατεχίνη, η ανιλίνη, η υδροκινόνη, η κερσετίνη και το καφεϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την παραγωγή πολυμερών, μέσω της οξειδωσης καταλυόμενης με λακκάση. Οι μηχανισμοί του πολυμερισμού εκτιμήθηκαν με βάση τις μεθόδους της υπεριώδους και ορατής φασματομετρίας (UV-Vis) και της φασματομετρίας IR μετασχηματισμού Fourier (FTIR).

Με τη μέθοδο UV-Vis μελετήθηκε η μοριακή αναδιοργάνωση των φαινολικών ενώσεων που καταλύονται με λακκάση μετά από διαφορετικές περιόδους επώασης. Παρακολουθήθηκε το φάσμα του κάθε διαλύματος και ερμηνεύτηκε από την UV-Vis φασματοφωτομετρία. Το φαινολικό διάλυμα που δε περιείχε λακκάση παρακολουθήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Όσο αναφορά τη φασματομετρία μετασχηματισμού Fourier (FTIR), αρχικά οι φαινολικές ενώσεις λυοφιλιώθηκαν και έπειτα αναμίχθηκαν με μια μικρή ποσότητα βρωμιούχου καλίου (KBr) που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα. Κατόπιν, λήφθηκαν τα φάσματα του μονομερούς και του πολυμερούς κάθε φορά με τη χρήση του φασματόμετρου υπερύθρου (FT-IR).

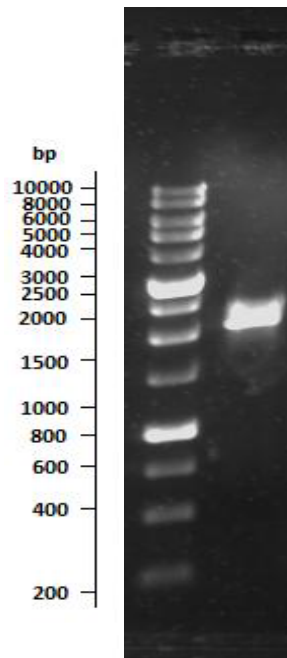
Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.1 Ετερόλογη έκφραση

5.1.1 Απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου Mtlac2063133 του *M.thermophila* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Έπειτα από την απομόνωση του ολικού DNA του *M. thermophila*, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου πακέτου GenElute™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit της εταιρίας Sigma–Aldrich, το γονίδιο Mtlac2063133, το οποίο αποτελείται από τρία εξώνια και δύο εσώνια, ενισχύθηκε ποσοτικά με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία που επρόκειτο να αντιγραφεί. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Oligo-Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Τα συστατικά που εισήχθησαν στο μίγμα της αντίδρασης, καθώς και οι ποσότητες αυτών αναφέρονται στον πίνακα 4.2 (Υλικά- Μέθοδοι), ενώ οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβε χώρα η αντίδραση αναφέρονται στον πίνακα 4.3 (Υλικά-Μέθοδοι). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 ml με τη χρήση της πολυμεράσης KOD Hot Start (Novagen) που προέρχεται από τον οργανισμό *T. kodakarensis*. Το στάδιο της πρόσδεσης και σταθεροποίησης των εκκινητών (annealing) έγινε στους 50°C και καθορίστηκε από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) των συγκεκριμένων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Μετά το πέρας των ορισθέντων κύκλων αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1 % w/v. Το δείγμα που υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση περιείχε 5 μl προϊόντα της PCR, 5 μl υπερκάθαρο νερό και 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer). Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) ώστε να μπορούν να διακριθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των μορίων DNA έγινε με τη βοήθεια του βασικού δείκτη μοριακών μεγεθών κλιμακούμενου βήματος (Hyperladder™ I: 200 bp-10 kb, Bioline).



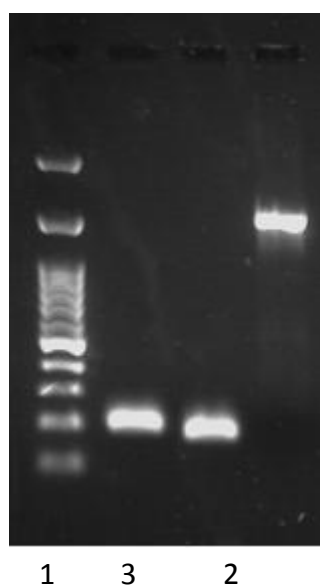
Εικόνα 5.1 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου Mtlac 2063133

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR κατέδειξαν μια ζώνη ανάμεσα στα 2000 και 2500 ζεύγη βάσεων, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο Mtlac2063133 με μέγεθος 2093 bp, όπως αυτό υποδεικνύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το τμήμα του πηκτώματος που έφερε την ενισχυμένη ακολουθία κόπηκε και ακολούθησε απομόνωση της αλληλουχίας από το πήκτωμα με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Clean up kit.

Μετά την απομόνωση της επιθυμητής αλληλουχίας, ακολούθησε η ένθεση της στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt. Τα τμήματα του DNA που είναι προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης KOD Hot Start (Novagen) φέρουν ισοτελή άκρα, όπως και το πλασμίδιο pCR® Blunt και η συνένωσή τους επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Η αντίδραση συνένωσης πραγματοποιήθηκε σε μοριακή αναλογία τμημάτων DNA προς τον πλασμιδιακό φορέα ίση με 1:10 και επώαστηκε για δύο ώρες στους 16°C. Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR®-Blunt χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν βακτηριακά κύτταρα *E.coli* TOP10, τα οποία είχαν καταστεί επιδεκτικά μετά από κατεργασία με χρήση χλωριούχου ασβεστίου. Ο μετασχηματισμός επιτεύχθηκε με σύντομη έκθεση των κυττάρων σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ). Έπειτα, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού καναμικίνη σε τρυβλία *Petri* και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν ορισμένες και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB παρουσία καναμικίνης. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση (200rpm) στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης τα βακτηριακά κύτταρα

απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermantas). Στη συνέχεια, δείγμα καθαρού πλασμιδιακού DNA όγκου 10 μ L στάλθηκε στην εταιρεία VBC – Biotech Services GmbH (Αυστρία) για ανάλυση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου που παραλήφθηκε με αυτή του wild type γονιδίου (Παράρτημα).

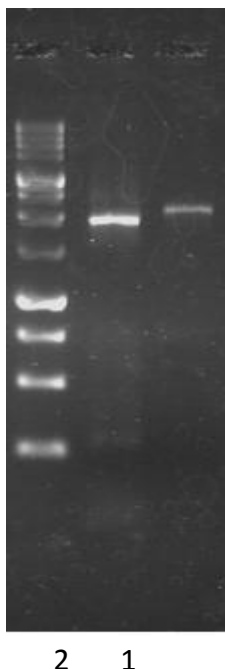
Αφού ταυτοποιήθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Επικάλυψης/ Επέκτασης (Overlap extension polymerase chain reaction), έτσι ώστε να παραχθεί το γονίδιο που θα αποτελείται μόνο από τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες, διότι στο γονίδιο Mtlac2063133, οι τρεις κωδικοποιούσες αλληλουχίες (εξώνια), διακόπτονται από δύο μη κωδικοποιούσες (εσώνια). Αρχικά, τα τρία εξώνια ενισχύθηκαν ποσοτικά με τρεις διαφορετικές αντιδράσεις PCR. Τα συστατικά που εισήχθησαν στο μίγμα κάθε αντίδρασης, καθώς και οι ποσότητες αυτών αναφέρονται στον πίνακα 4.4 (Υλικά-Μέθοδοι), ενώ οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβαν χώρα οι αντιδράσεις αναφέρονται στον πίνακες 4.5 και 4.6 (Υλικά- Μέθοδοι). Το στάδιο της πρόσδεσης και σταθεροποίησης των εκκινητών (annealing) έγινε στους 50°C για τα εξώνια 1 και 3 μεγέθους 221 bp και 201 bp αντίστοιχα, ενώ για το εξώνιο 2, μεγέθους 1514 bp, έγινε στους 51°C. Μετά το πέρας 35 κύκλων αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1 % w/v. Κάθε δείγμα που υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση περιείχε 5 μ L προϊόν της PCR, 5 μ L υπερκάθαρο νερό και 5 μ L ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer). Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί :



Εικόνα 5.2 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για την ενίσχυση των τριών εξωνίων του γονιδίου Mtlac 2063133. Η θέση στη ζώνη 1 αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR για

την επαύξηση του εξωνίου μήκους 221 bp, η θέση στη ζώνη 3 αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR για την επαύξηση του εξωνίου μήκους 201 bp και η θέση στη ζώνη 2 αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR για την επαύξηση του εξωνίου μήκους 1514 bp.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών που φέρουν τα τρία εξώνια από το πήκτωμα με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Clean up kit. Στη συνέχεια, οι τρεις αυτές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες υποβλήθηκαν στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Επικάλυψης/Επέκτασης [Torakas *et al.*, 2011]. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα μόρια MtLac2063133e1R, MtLac2063133e2F, MtLac2063133e2R και MtLac2063133e3F. Τα συστατικά που εισήχθησαν στο μίγμα της αντίδρασης, καθώς και οι ποσότητες αυτών αναφέρονται στον πίνακα 4.7 (Υλικά-Μέθοδοι), ενώ οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβε χώρα η αντίδραση αναφέρονται στον πίνακα 4.8 (Υλικά- Μέθοδοι). Η θερμοκρασία του σταδίου υβριδοποίησης των εκκινητών ρυθμίστηκε στους 58°C και ορίστηκαν 35 κύκλοι αντίδρασης. Μετά το πέρας των ορισθέντων κύκλων της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1 % w/v.

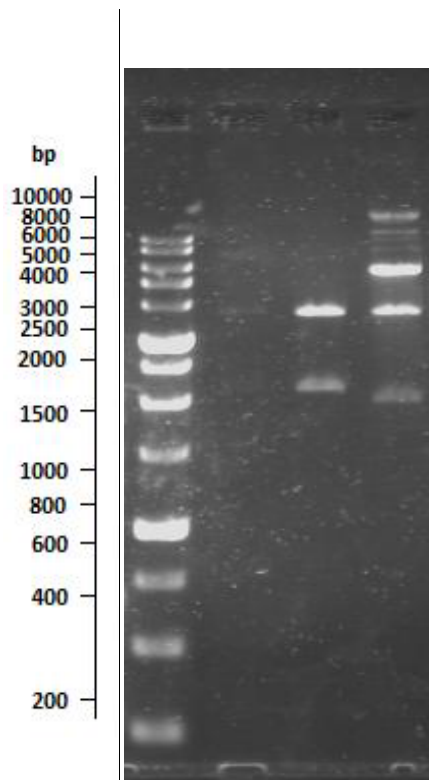


Εικόνα 5.3 : Η θέση στη ζώνη 1 αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου μαζί με τα εσώνια, ενώ η θέση στη ζώνη 2 αντιστοιχεί στο προϊόν της OE-PCR, το οποίο έχει μήκος 1936 bp, που ισούται με το άθροισμα του μήκους των τριών εξωνίων του γονιδίου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση αποκόπηκε το τμήμα του πηκτώματος που έφερε τη ζώνη, η οποία αντιστοιχούσε στο επιθυμητό προϊόν και ακολούθησε απομόνωση της αλληλουχίας με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Clean up kit.

5.1.2 Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Αφού απομονώθηκε η επιθυμητή αλληλουχία, ακολούθησε η συνένωσή της με το πλασμίδιο pCR® Blunt. Συγκεκριμένος όγκος της αντίδρασης συνένωσης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli*. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασία σύντομης έκθεσης σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB σε τριβλία *Petri* παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (50 µg/mL καναμυκίνη) και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37° C. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν τέσσερις και μεταφέρθηκαν σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB παρουσία καναμυκίνης. Έπειτα, επώαστηκαν υπό ανάδευση (200rpm) στους 37° C. Μετά το τέλος της επώασης τα βακτηριακά κύτταρα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermantas). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εκτέθηκε σε πέψη από τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, δείγμα καθαρού πλασμιδιακού DNA όγκου στάλθηκε στην εταιρεία VBC – Biotech Services GmbH για ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA.



Εικόνα 5.4: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCR®-Blunt με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*/*XbaI* σε πήκτωμα. Οι ζώνες στα δείγματα αντιπροσωπεύουν: 3^η θέση το γονίδιο με τα εσώνια (2093 bp) και το πλασμίδιο (3600 bp), 4^η θέση το γονίδιο χωρίς εσώνια (1936 bp) και το πλασμίδιο (3600 bp).

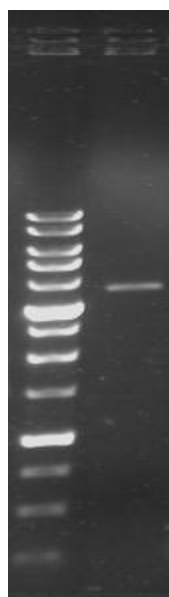
Αφού επιβεβαιώθηκε ότι η απομονωθείσα αλληλουχία είναι η επιθυμητή, έγινε πολλαπλασιασμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli* TOP10. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τέλος, το τμήμα του πηκτώματος που περιείχε το γονίδιο κόπηκε και καθαρίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Clean up kit.

5.1.3 Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA και μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli*

Η αλληλουχία του Mtlac2063133 γονιδίου που προέκυψε από τη δράση των περιοριστικών ενζύμων *EcoRI* / *XbaI* έφερε μονόκλινα κολλώδη άκρα (sticky ends) και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA (Invitrogen) που φέρει αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα. Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις συνένωσης με λιγάση σε διάφορες μοριακές αναλογίες τμημάτων DNA προς τον πλασμιδιακό φορέα (1:3, 1:7). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και δύο αντιδράσεις ελέγχου. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, τα οποία είχαν καταστεί επιδεκτικά μετά από κατεργασία με χρήση χλωριούχου ασβεστίου. Σε 100μL κυττάρων προστέθηκαν 5 μL πλασμιδίου και ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασία σύντομης έκθεσης σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ). Έπειτα, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LS-LB σε τρυβλίο *Petri*, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (25 μg/mL ζεοσίνη) για την επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών. Στη συνέχεια, λήφθηκαν μεμονωμένες αποικίες για τον εμβολιασμό 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LS-LB παρουσία ζεοσίνης. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση (200rpm), στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, τα βακτηριακά κύτταρα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επιτυχίας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου μέσω πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XbaI* και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1% w/v. Στη συνέχεια, το πλασμίδιο εισήχθη σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* TOP10 προς πολλαπλασιασμό. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασία σύντομης έκθεσης σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (θερμικό σοκ). Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LS-LB, και κατόπιν επιλέχθηκαν ορισμένες ανασυνδυασμένες αποικίες για τον εμβολιασμό 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LS-LB παρουσία ζεοσίνης. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση (200rpm) στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, τα βακτηριακά κύτταρα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επιτυχίας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου μέσω πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI/XbaI* και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v.

5.1.4 Γραμμικοποίηση του πλασμιδίου pPICZαA και μετασχηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων *P.pastoris*

Πριν την εισαγωγή τους στα ευκαρυωτικά κύτταρα *P.pastoris*, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο, έπρεπε να μετατραπούν σε γραμμικά μόρια. Η γραμμικοποίηση του κυκλικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου *PmeI*. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 70 μl πλασμιδιακού DNA. Μετά την αντίδραση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και απομόνωση του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Clean up kit. Ωστόσο, στο τελευταίο στάδιο καθαρισμού έγινε προσθήκη αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού για την έκλουση του DNA από τη στήλη και όχι του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης, όπως προβλέπεται από το πρωτόκολλο. Η διαφοροποίηση αυτή κρίθηκε απαραίτητη, διότι το καθαρό πλασμιδιακό DNA έπρεπε να είναι απαλλαγμένο από άλατα, καθώς θα χρησιμοποιούνταν για το μετασχηματισμό των κυττάρων της ζύμης *P.Pastoris* με τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης.



Εικόνα 5.5 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης της πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαA με το περιοριστικό ένζυμο *PmeI*. Η ζώνη αντιπροσωπεύει το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο (3600 bp) και το γονίδιο (1936 bp).

Τα κύτταρα του φυσικού στελέχους X33 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό YPD και προετοιμάστηκαν κατάλληλα για να καταστούν επιδεκτικά. Στη συνέχεια, εναιώρημα επιδεκτικών κυττάρων X33 αναμείχθηκε με γραμμικό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαA και ακολούθησε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση. Μετά

την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού προστέθηκε άμεσα σορβιτόλη, μια διαλυτή ουσία, η οποία συμβάλλει στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, και συνεπώς συμβάλλει στην αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν στους 30°C για δύο ώρες και επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS παρουσία ζεοσίνης. Ακολούθησε επώαση στους 30°C. Η ανάπτυξη στο θρεπτικό μέσο ήταν δυνατή μόνο για κύτταρα που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, καθώς ο πλασμίδιο έφερε δείκτη ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη.

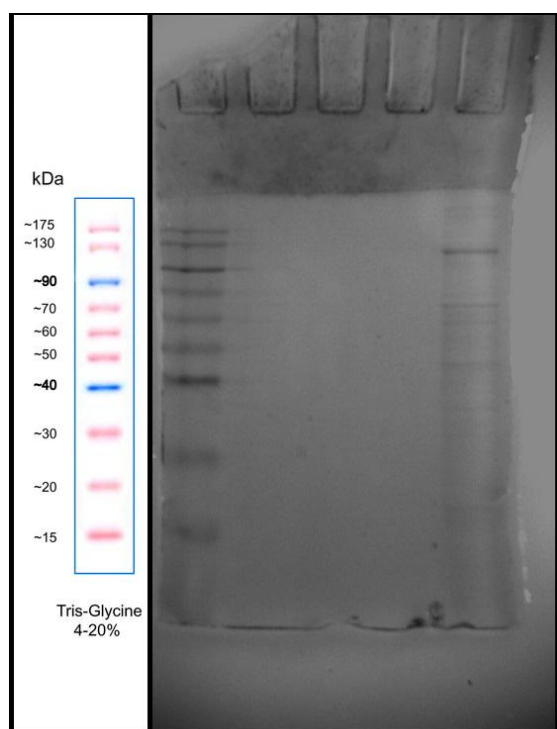
Μετά το πέρας 3-4 ημερών, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του πλασμιδίου, και πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος φαινοτύπων. Ο έλεγχος έγινε με ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό MD και MM. Θεωρητικά οι μετασχηματισμένοι κλώνοι που απομονώθηκαν θα παρουσίαζαν φυσιολογική ανάπτυξη στα τρυβλία MD και παραγωγή ενεργού ενζύμου στα τρυβλία MM. Και στα δύο τρυβλία παρουσιάστηκε ανάπτυξη της *P. pastoris*, ωστόσο δεν παρουσιάστηκε ενεργότητα της παραγόμενης λακκάσης στο τρυβλίο MM.

5.1.5 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου Mtlac2063133 σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου από τα μετασχηματισμένα στελέχη *P.pastoris*, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα (Buffered Complex Glycerol Medium, BMGY). Η γλυκερόλη, αν και καταστέλλει τη δράση του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1), και επομένως και την έκφραση του γονιδίου, ευνοεί την ανάπτυξη της βιομάζας. Μετά από επώαση 24 ωρών, έγινε λήψη συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας, έτσι ώστε μετά από φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 mL θρεπτικού υλικού BMMY (Buffered Complex Methanol Medium), το εναιώρημα να είχε οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD_{600nm}) ίση με τη μονάδα. Η παρουσία της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο επάγει την έκφραση του γονιδίου Mtlac2063133. Η καλλιέργεια επώαστηκε για έξι μέρες και κάθε 24 ώρες προστίθετο μεθανόλη και λαμβανόταν δείγμα, στο οποίο μετρούταν η οπτική απορρόφηση στα 600 nm, καθώς και η ενεργότητα του ενζύμου. Η οπτική απορρόφηση (οπτική πυκνότητα OD_{600nm}) μετρούταν με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων της παραγόμενης βιομάζας. Η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με τη μέθοδο ABTS, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική ενεργότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Παρόλα αυτά, επιχειρήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης, και κατόπιν ελέγχθηκε το μοριακό βάρος της με ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

5.1.6 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης

Με σκοπό την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης, η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου falcon. Μέσω φυγοκέντρησης, απομακρύνθηκε το κυτταρικό υλικό και λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό των καλλιεργειών. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθήθηκε με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού, και έπειτα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 μm και 0.2 μm, προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανά κυτταρικά θραύσματα. Από τις διαδοχικές διηθήσεις λήφθηκαν διαυγή διαλύματα, τα οποία συμπυκνώθηκαν με τη χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400, μέχρι τελικού όγκου 10 ml. Το συμπύκνωμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με ρυθμιστικό διάλυμα Talon με τη μέθοδο της διαπίδυσης. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικές μεμβράνες που επιτρέπουν τη μεταφορά του διαλύτη, αλλά όχι της πρωτεΐνης. Κατόπιν, επιχειρήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης με τη βοήθεια της στήλης Talon® Metal Affinity Resin. Στη στήλη αυτή, τα ιόντα κοβαλτίου που είναι ακινητοποιημένα, αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν δεσμούς με τα έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης που φέρει η πρωτεΐνη. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη. Για την έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ιμιδαζολίου, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με τα κατάλοιπα ιστιδίνης για την πρόσδεση στα ιόντα κοβαλτίου. Λόγω πιθανού προβλήματος στη στήλη, η πρωτεΐνη δεν ήταν δυνατό να απομονωθεί. Παρόλα αυτά, το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου.



Εικόνα 5.6 : Ηλεκτροφόρηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης κατέδειξαν την ύπαρξη πρωτεΐνης, η οποία έχει μοριακό βάρος περίπου 100 kDa. Θεωρητικά το μέγεθος της πρωτεΐνης θα ήταν περίπου 82 kDa, ωστόσο η αύξηση του μοριακού βάρους που παρατηρείται οφείλεται στην υπεργλυκοζυλίωση από την *P.pastoris*.

5.2 Χρήση της εμπορικής λακκάσης Icc1 σε αντιδράσεις πολυμερισμού

Στην παρούσα εργασία, εκτός από την κλωνοποίηση και την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί μια καινοτόμα λακκάση, εξετάστηκε και η χρήση της εμπορικής λακκάσης σε αντιδράσεις πολυμερισμού μιας, με σκοπό τη βιοτεχνολογική της αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αντίδραση του πολυμερισμού του μορίου της κατεχόλης καταλυόμενη με το συγκεκριμένο ένζυμο, καθώς και η επίδραση του pH, του χρόνου και της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης. Μελετήθηκε ακόμα και ο πολυμερισμός ορισμένων άλλων αρωματικών ενώσεων, όπως της πυρογαλλόλης, του γαλλικού οξέος, της ανιλίνης, της κερσετίνης, της υδροκινόνης και του καφεϊκού οξέος.

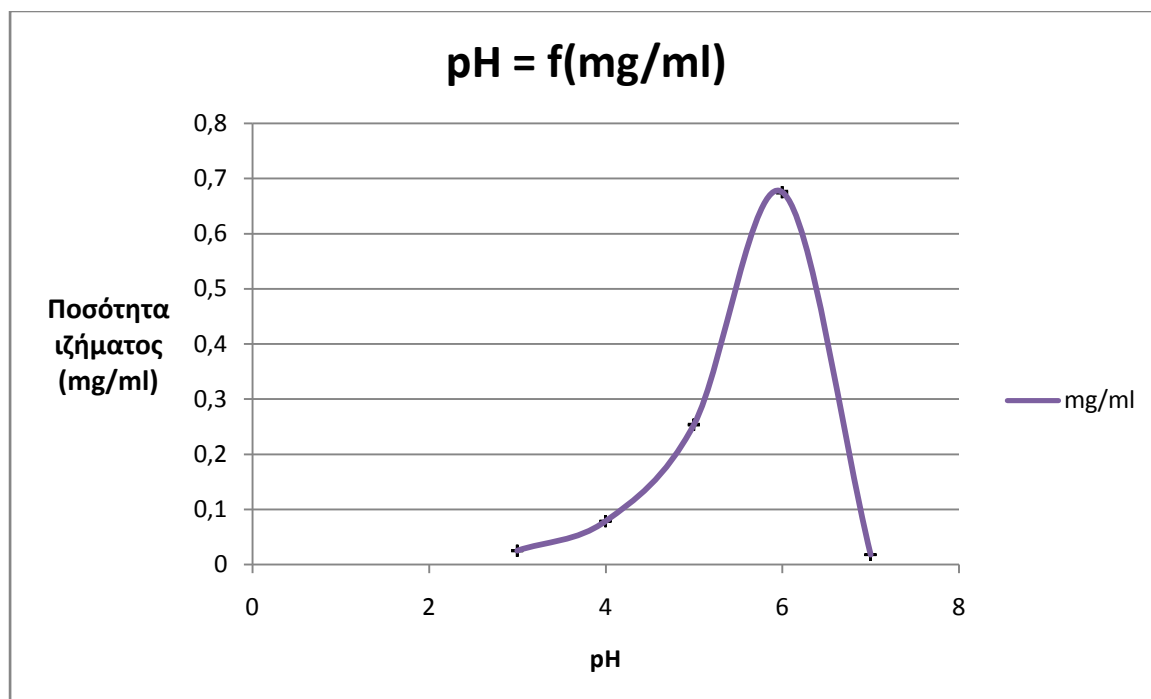
5.2.1 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της λακκάσης

Εξετάστηκε ένα εύρος pH από 3 έως 7, και μετά τη διεξαγωγή των αντιδράσεων, προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα που αναφέρονται στον πίνακα.

Πίνακας 5.1 : Τιμές pH, ιζήματος και τυπικές αποκλίσεις

pH	mg/ml	Τυπική απόκλιση (SD)
3	0,025	0,000495
4	0,07857	0,000424
5	0,25357	0,000919
6	0,675	0,001909

Έτσι, με βάση τα δεδομένα του πίνακα 5.1, κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα, το οποίο παρουσιάζει την ποσότητα του ιζήματος που παράγεται από την αντίδραση συναρτήσει του pH.



Διάγραμμα 5.1 : Διάγραμμα του pH συναρτήσει της ποσότητας ιζήματος κατεχόλης σε mg/ml

Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στο παραπάνω διάγραμμα, το βέλτιστο pH ενεργότητας της λακκάσης είναι το pH 6, αποτέλεσμα, το οποίο συμφωνεί με αυτό του Berka και των συνεργατών του [Berka *et al.*, 1997]. Στην έρευνα αυτή, μελετήθηκε η δραστικότητα της λακκάσης συναρτήσει του pH με υποστρώματα το ABTS και τη συριγκαλαζίνη. Και με τα δύο αυτά υποστρώματα, ήταν φανερό πως το βέλτιστο pH για τη δραστικότητα της λακκάσης ισούται με pH 6 [Berka *et al.*, 1997]. Συνεπώς, όταν το ένζυμο λειτουργεί σε pH 6, έχει τη δυνατότητα να μετατρέψει περισσότερη ποσότητα προϊόντος, με αποτέλεσμα να παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερούς.

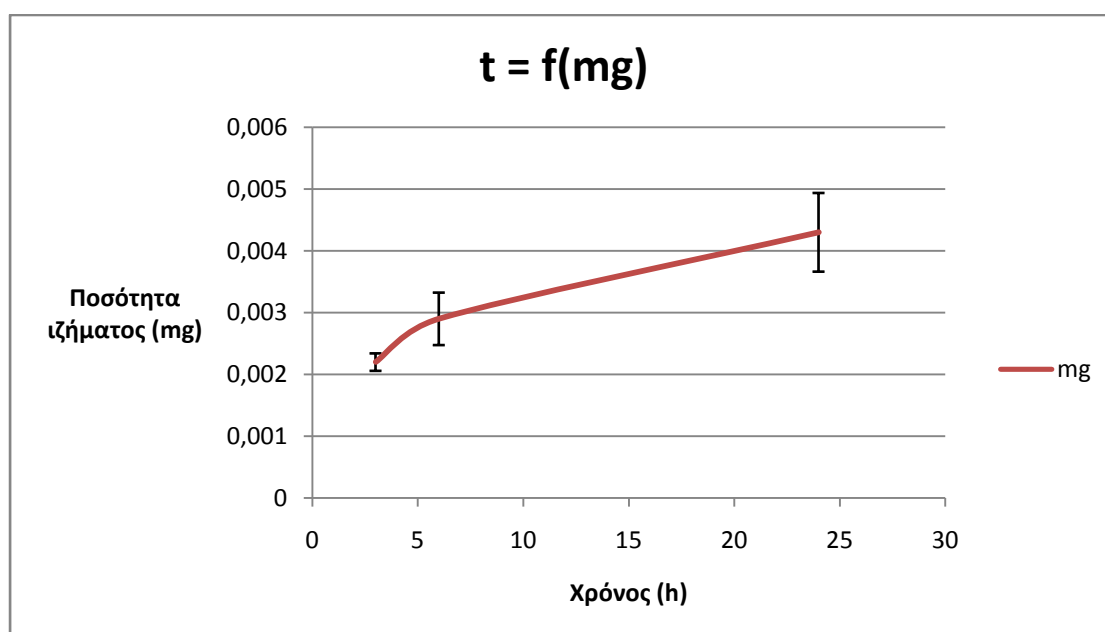
5.2.2 Επίδραση του χρόνου στην ενεργότητα της λακκάσης

Μετά τη διεξαγωγή της αντίδρασης σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (τρεις, έξι και εικοσιτέσσερις ώρες), προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα που αναφέρονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2 : Χρόνος , ποσότητα ιζήματος και τυπικές αποκλίσεις

Χρόνος (hour)	Ποσότητα ιζήματος (mg)	Τυπική απόκλιση (SD)
3	2,2	0,0001414
6	2,9	0,0004243
24	4,3	0,0006364

Έτσι, με βάση τα δεδομένα του πίνακα 5.2, κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα, το οποίο παρουσιάζει την ποσότητα του ιζήματος που παράγεται από την αντίδραση συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 5.2 : Διάγραμμα χρόνου αντίδρασης συναρτήσει των ποσοτήτων ιζήματος της κατεχόλης

Είναι φανερό από το διάγραμμα πως πλησιάζει σε ένα πλατό στις 24 ώρες, ενώ πριν από αυτό το σημείο δεν υπάρχει μεγάλη παραγωγή του προϊόντος. Συνεπώς,

διατηρείται ο χρόνος των 24 ωρών αντίδρασης ως ο βέλτιστος χρόνος για την ενεργότητα της λακκάσης.

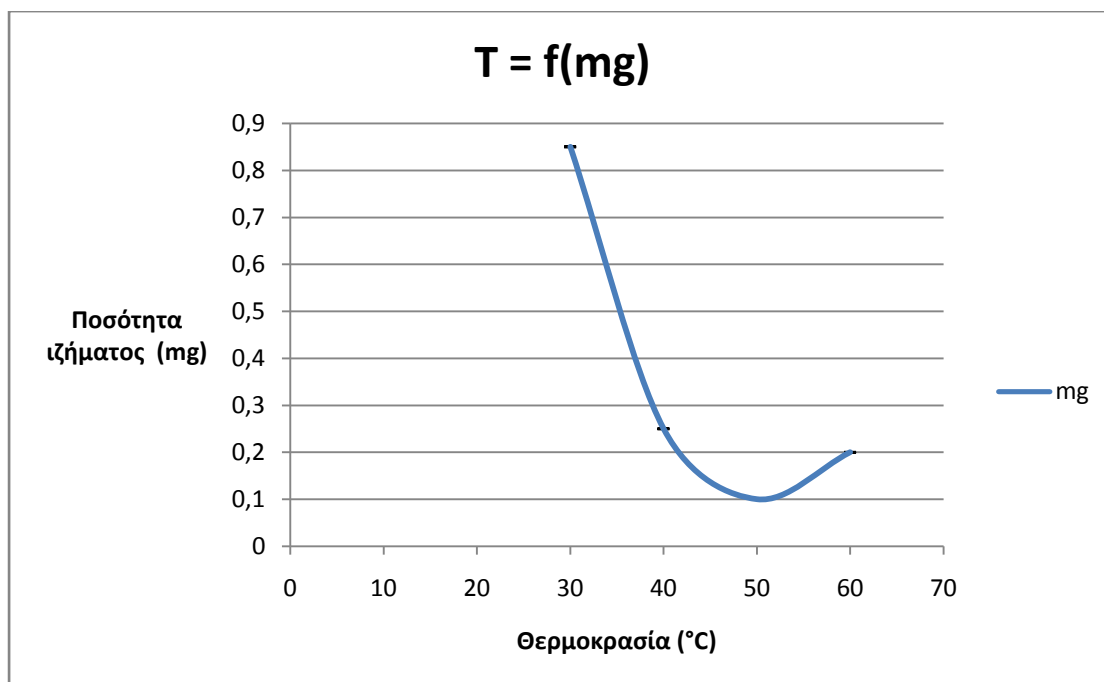
5.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης

Για την εξέταση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της λακκάσης, έγιναν πειράματα σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (30°C, 40°C, 50°C και 60°C). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.3 : Θερμοκρασία , ποσότητα ιζήματος και τυπικές αποκλίσεις

Θερμοκρασία(°C)	Ποσότητα ιζήματος (mg)	Τυπική απόκλιση (SD)
30	0,85	0,000636
40	0,25	0,000636
50	0,1	0
60	0,2	0,000283

Έτσι, με βάση τα δεδομένα του πίνακα 5.3, κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα, το οποίο παρουσιάζει την ποσότητα του ιζήματος που παράγεται από την αντίδραση συναρτήσει της θερμοκρασίας .

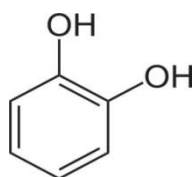


Διάγραμμα 5.3 : Διάγραμμα θερμοκρασίας συναρτήσει της ποσότητας ιζήματος κατεχόλης

Από το διάγραμμα παρατηρείται πως σε χαμηλές θερμοκρασίες (30°C) το ένζυμο παραμένει ενεργό για περισσότερη ώρα, συνεπώς παράγει περισσότερο προϊόν. Αντίθετα, στους 40°C και 50°C, φαίνεται πως το ένζυμο καταστρέφεται και δε μπορεί να καταλύσει την αντίδραση πολυμερισμού. Ωστόσο, στους 60°C παρατηρείται μια μικρή αύξηση παραγωγής του πολυμερούς. Η αύξηση αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αυτοοξειδωση της κατεχόλης σε υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυμερούς.

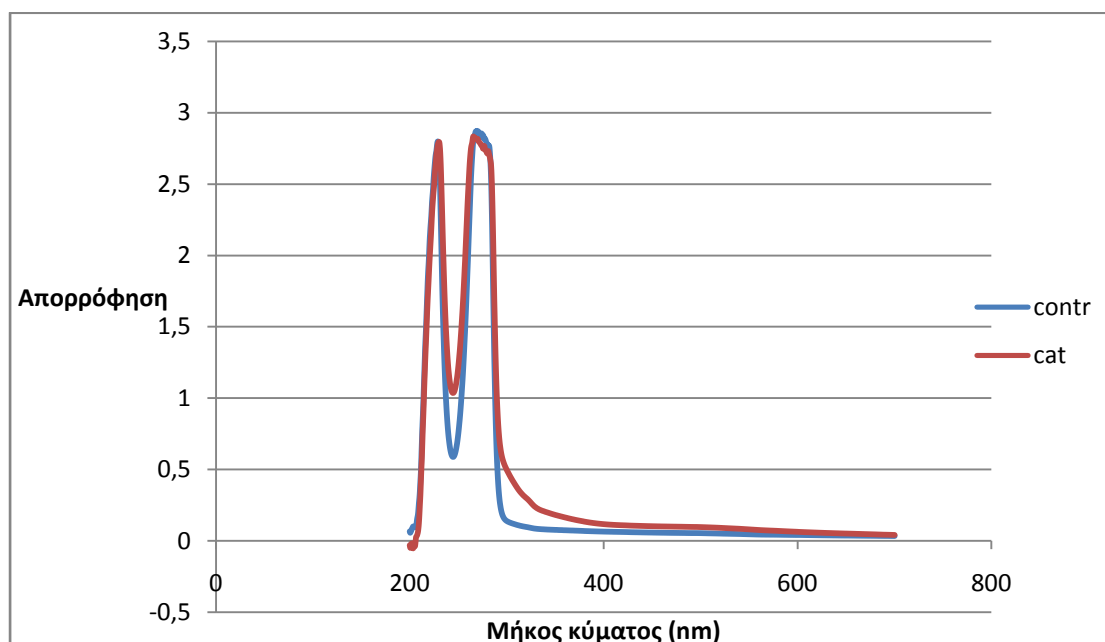
5.3 Πολυμερισμός της κατεχόλης

Το μόριο της κατεχόλης, η δομή του οποίου παρουσιάζεται στην εικόνα 5.8 , πολυμερίστηκε σε συνθήκες θερμοκρασίας 45°C και pH 6 για 24 ώρες.



Εικόνα 5.7 : Δομή της κατεχόλης

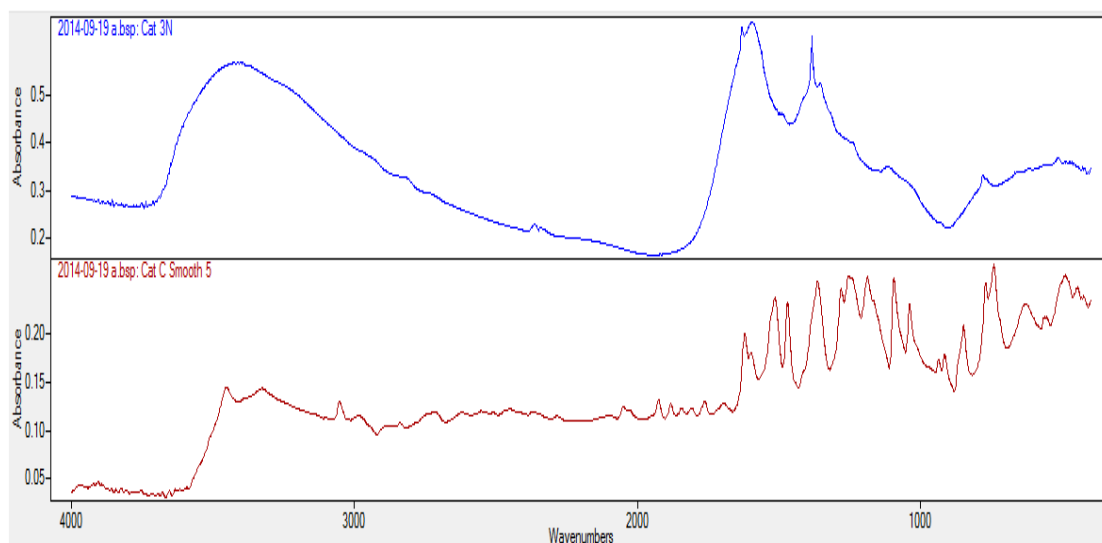
Για τη μελέτη της επιτυχίας του πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη μέθοδο της υπεριώδους και ορατής φασματομετρίας (UV-Vis). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.4



Διάγραμμα 5.4 : Μέτρηση της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου, ενώ η κόκκινη στο πολυμερές της κατεχόλης

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτό του Sun [Sun *et al.*, 2013]. Από το διάγραμμα παρατηρείται πως μια νέα κορυφή εμφανίστηκε στα 249 nm. Επίσης, σχηματίζεται και μια άλλη κορυφή στα 310 nm. Σε αυτή την κορυφή αναφέρεται και ο Sun με τους συνεργάτες του [Sun *et al.*, 2013]. Η κορυφή εξαφανίζεται στη συνέχεια της αντίδρασης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων. Αυτά τα ενδιάμεσα θα μπορούσαν να αντιδράσουν αυθόρμητα, σχηματίζοντας διμερή, oligομερή και πολυμερή. Η κορυφή που αντιπροσωπεύει τα ενδιάμεσα εξαφανίζεται μετά από ένα χρονικό διάστημα, λόγω της κατανάλωσης των ενδιάμεσων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Επίσης, το χρώμα του διαλύματος της κατεχόλης άλλαξε από άχρωμο σε σκούρο καφέ κατά την διάρκεια της ενζυμικής οξειδωσης. Ο οξειδωτικός πολυμερισμός οδήγησε στην παραγωγή της δομής σύζευξης, καθιστώντας το χρώμα του διαλύματος να γίνει σκούρο [Sun *et al.*, 2013].

Για την αξιολόγηση των δομικών ιδιοτήτων των φαινολικών ενώσεων και των αντίστοιχων πολυμερών τους, δοκιμάστηκαν τα φάσματα FT-IR.

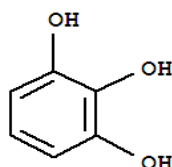


Εικόνα 5.8 :Το φάσμα FT-IR της κατεχόλης και πολύ(κατεχόλης), η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στην πολυ(κατεχόλη), ενώ η κόκκινη στο μονομερές της κατεχόλης

Παρατηρείται ότι το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτό του Sun [Sun *et al.*, 2013]. Οι κορυφές μεταξύ των 3450 και 3320 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών O-H. Οι κορυφές μεταξύ των 1.600-1.500 cm^{-1} αντιπροσωπεύουν τις αρωματικές δονήσεις, ενώ οι κορυφές μεταξύ 1300 και 1.000 cm^{-1} σχηματίστηκαν λόγω των δεσμών C-H, C- O, και C = O [Sun *et al.*, 2013]. Η ομαλή σταθερή δομή του πολυμερούς δίνει λίγες δονήσεις δεσμών και ένα ομαλό διάγραμμα FT-IR. Αντίθετα, το μονομερές δίνει περισσότερες δονήσεις, και συνεπώς περισσότερες κορυφές στο διάγραμμα FT-IR.

5.4 Πολυμερισμός της πυρογαλλόλης

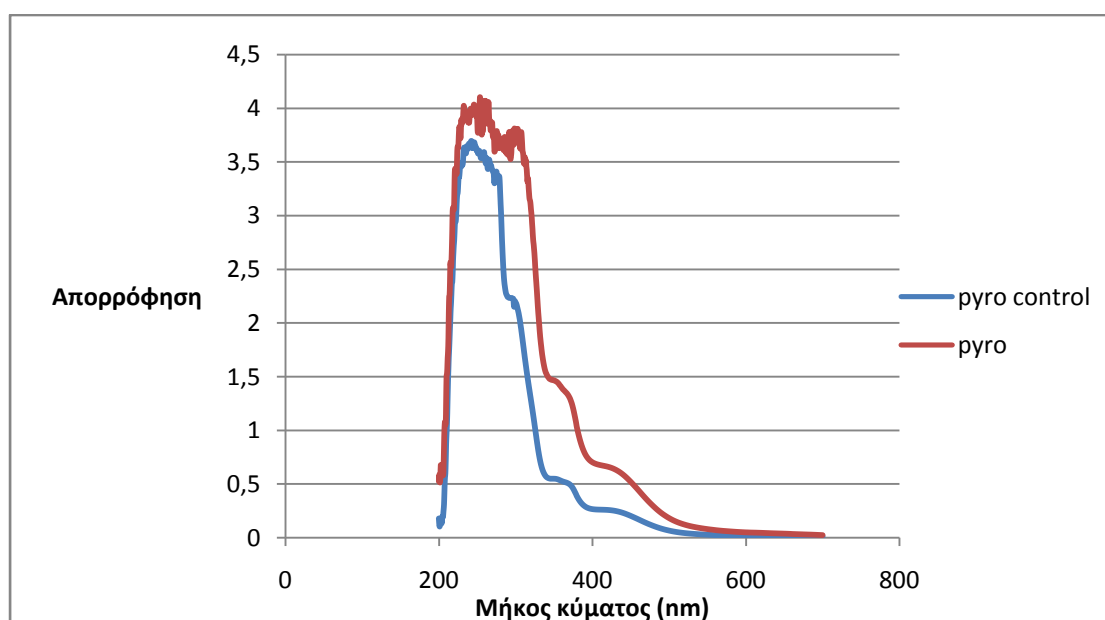
Η πυρογαλλόλη είναι μια οργανική ένωση, η οποία παράγεται μέσω θέρμανσης του γαλλικού οξέος. Η δομή της απεικονίζεται στο σχήμα 5.12.



Εικόνα 5.9 : Δομή της πυρογαλλόλης

Ο πολυμερισμός της πυρογαλλόλης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 45°C και pH 6.

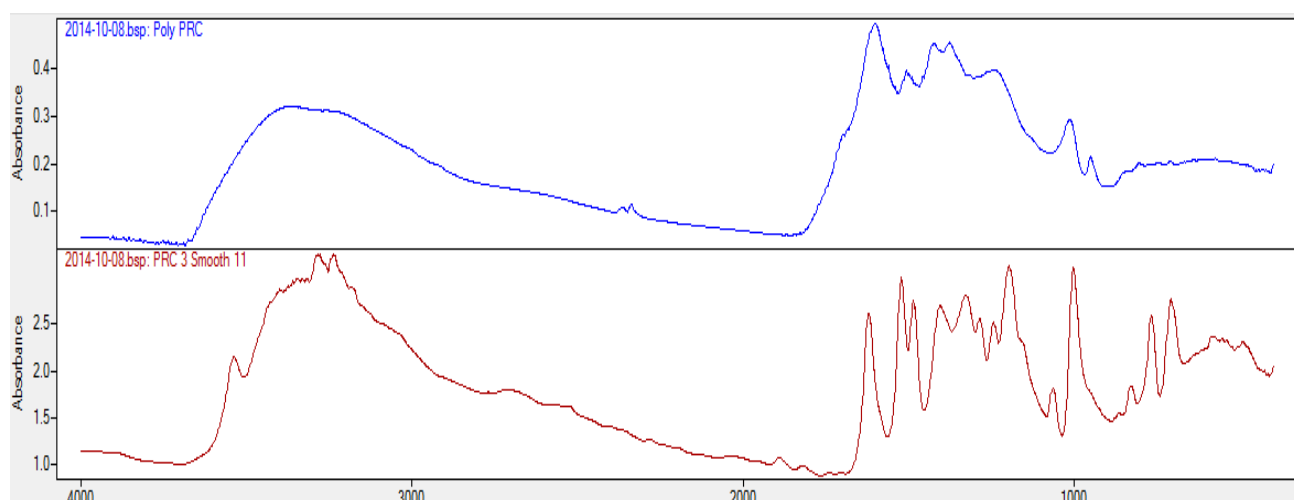
Για τη μελέτη της επιτυχίας του πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη μέθοδο της υπεριώδους και ορατής φασματομετρίας (UV-Vis). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.5.



Διάγραμμα 5.5 : Διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου, ενώ η κόκκινη στο πολυμερές της πυρογαλλόλης

Παρατηρείται πως δημιουργούνται νέες κορυφές στα 265,308,360 και 423 nm, καθώς αυξάνεται η απορρόφηση. Οι κορυφές αυτές αυξάνονται με τη πάροδο του χρόνου, και συνεπώς και με τη δημιουργία του πολυμερούς.

Για την αξιολόγηση των δομικών ιδιοτήτων των φαινολικών ενώσεων και των αντίστοιχων πολυμερών τους, δοκιμάστηκαν τα φάσματα FT-IR.

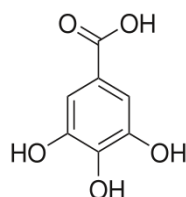


Εικόνα 5.10 :Το φάσμα FT-IR της πυρογαλλόλης και πολύ(πυρογαλλόλης), η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο πολυμερές της πυρογαλλόλης, ενώ η κόκκινη στο μονομερές

Είναι φανερό πως το μονομερές τροποποιείται από το ένζυμο. Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτό που κατασκευάστηκε από τον Güresir και τους συνεργάτες του [Güresir *et al.*, 2004]. Οι διευρυμένες κορυφές μεταξύ των 3450 και 3320 cm^{-1} οφείλονται στις χαρακτηριστικές δονήσεις των δεσμών O-H της πυρογαλλόλης. Οι κορυφές μεταξύ των 1470 και 1620 cm^{-1} εμφανίζονται εξαιτίας των δονήσεων του αρωματικού δακτυλίου C=C. Η ομαλή σταθερή δομή του πολυμερούς δίνει λίγες δονήσεις δεσμών και ένα ομαλό διάγραμμα FT-IR. Αντίθετα, το μονομερές δίνει περισσότερες δονήσεις, και συνεπώς περισσότερες κορυφές στο διάγραμμα FT-IR.

5.5 Πολυμερισμός του γαλλικού οξέος

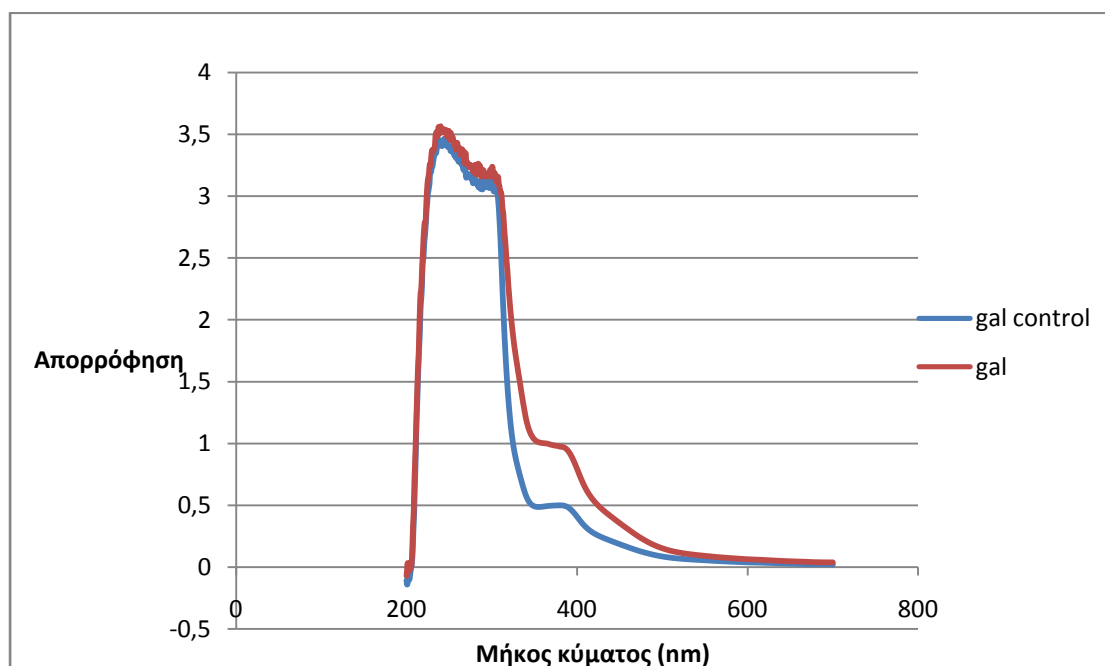
Το γαλλικό οξύ είναι ένα φαινολικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία. Η δομή του φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 5.11: Δομή γαλλικού οξέος

Ο πολυμερισμός του πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 45°C και pH 6.

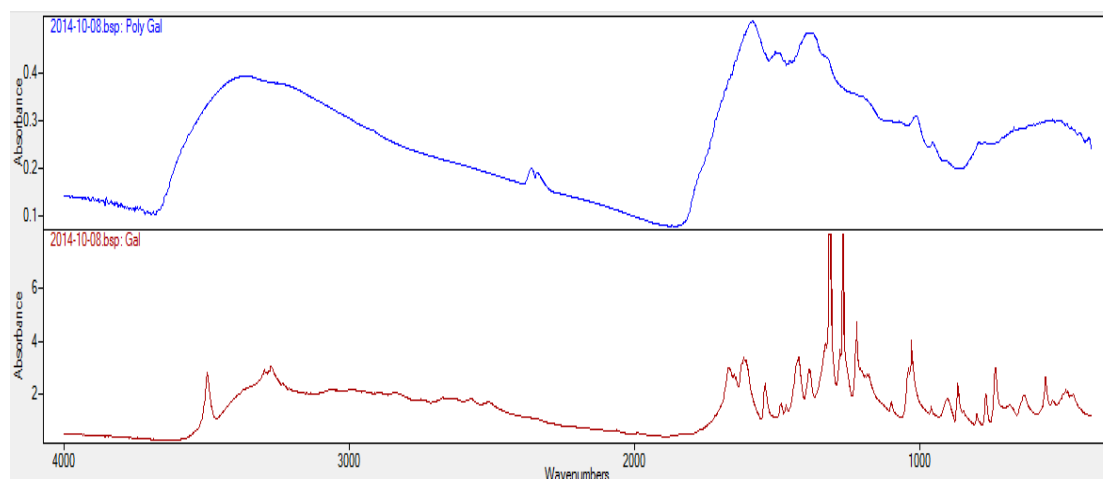
Για τη μελέτη της επιτυχίας του πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη μέθοδο της υπεριώδους και ορατής φασματομετρίας (UV-Vis). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.6.



Διάγραμμα 5.6 : Διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου, ενώ η κόκκινη στο πολυμερές του γαλλικού οξέος

Παρατηρείται πως δημιουργούνται νέες κορυφές στα 250 και 393 nm. Οι κορυφές αυτές αυξάνονται με τη πάροδο του χρόνου, και συνεπώς και με τη δημιουργία του πολυμερούς.

Για την αξιολόγηση των δομικών ιδιοτήτων των φαινολικών ενώσεων και των αντίστοιχων πολυμερών τους, δοκιμάστηκαν τα φάσματα FT-IR.



Εικόνα 5.12 :Το φάσμα FT-IR του γαλλικού οξέος και του πολύ(γαλλικού) οξέος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο πολυμερές του γαλλικού οξέος, ενώ η κόκκινη στο μονομερές

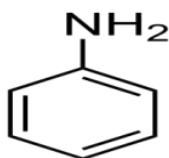
Είναι φανερό πως το μονομερές τροποποιείται από το ένζυμο. Η ομαλή σταθερή δομή του πολυμερούς δίνει λίγες δονήσεις δεσμών και ένα ομαλό διάγραμμα FT-IR. Αντίθετα, το μονομερές δίνει περισσότερες δονήσεις, και συνεπώς περισσότερες κορυφές στο διάγραμμα FT-IR.

Παρατηρείται ότι οι ζώνες μεταξύ 3.500 και 3.300 cm^{-1} που υπήρχαν σε όλα FT-IR φάσματα των δειγμάτων και ανήκουν στις φαινολικές O- H ζώνες δονήσεις έγιναν ευρύτερες μετά από επώαση με τη λακκάση. Αυτό θα μπορούσε να προκληθεί από την οξειδωτική αντίδραση που καταλύεται από τη λακκάση. Οι ζώνες στα $1.600-1.500\text{ cm}^{-1}$ αντιπροσωπεύουν τις αρωματικές δονήσεις. Οι ζώνες μεταξύ 1300 και 1.000 cm^{-1} σχηματίστηκαν λόγω των διαφόρων δομών δόνησης, όπως C-H, C- O, και C = O. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν αυτές τις κορυφές. Τέλος, καθώς τα πολυμερή έχουν πιο άκαμπτες ομάδες σε σύγκριση με τα μονομερή, οι εντάσεις των ζωνών απορρόφησης μεταξύ 1600 και 1000 cm^{-1} των πολυμερών τείνουν να αποδυναμωθούν.

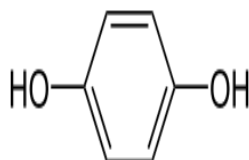
5.6 Πολυμερισμός ανιλίνης, υδροκινόνης, κερσετίνης, καφεϊκού οξέος

Εξετάστηκαν περαιτέρω υποστρώματα, όπως η ανιλίνη, η υδροκινόνη και η κερσετίνη και το καφεϊκό οξύ. Παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της αντίδρασης, ωστόσο δεν υπήρχε η δυνατότητα απομόνωσης του πολυμερούς, αν και υπάρχουν αναφορές για τον επιτυχή πολυμερισμό αυτών των ενώσεων από λακκάσες προερχόμενες από άλλους μικροοργανισμούς [Junker *et al.*, 2013]. Ο Junker, για παράδειγμα, αναφέρει τον ενζυμικό πολυμερισμό της ανιλίνης σε πολυανιλίνη (PANI) με καταλύτη λακκάση από *Trametes versicolor* σε υδατικό μέσο.

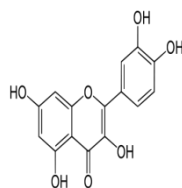
Οι δομές των μορίων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες:



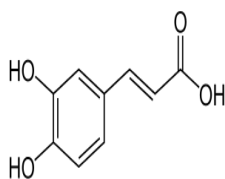
Εικόνα 5.13 : Δομή ανιλίνης



Εικόνα 5.14: Δομή υδροκινόνης



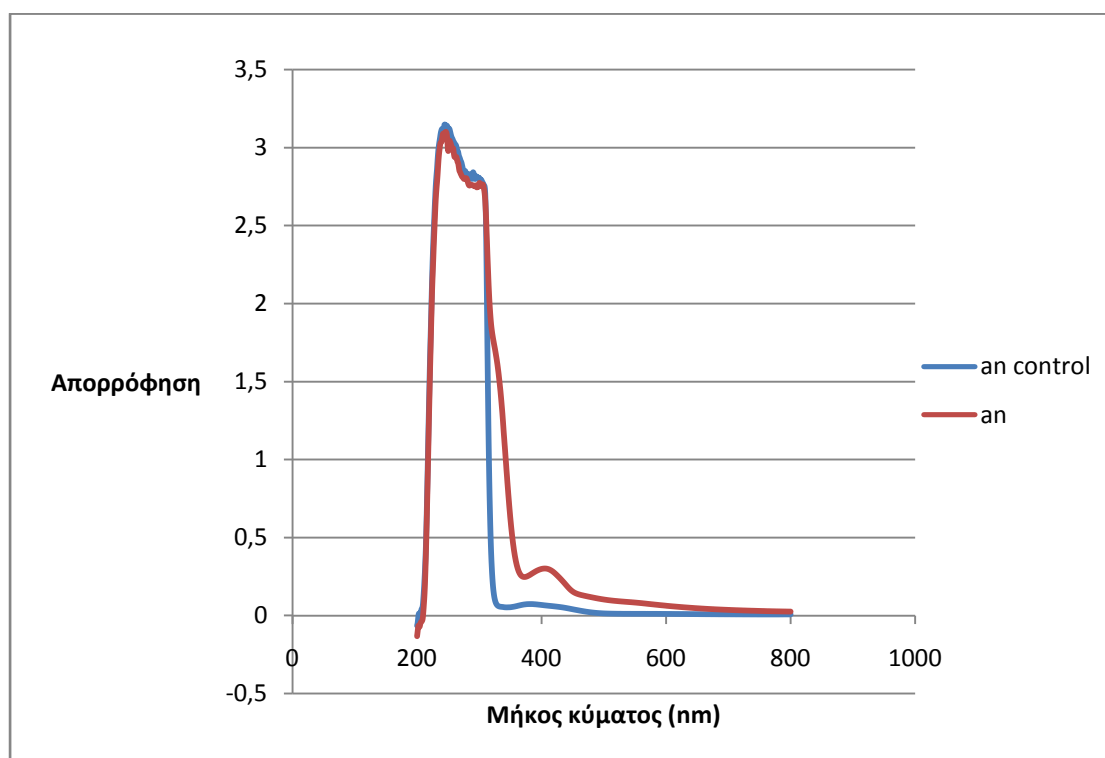
Εικόνα 5.15 : Δομή κερσετίνης



Εικόνα 5.16 : Δομή καφεϊκού οξέος

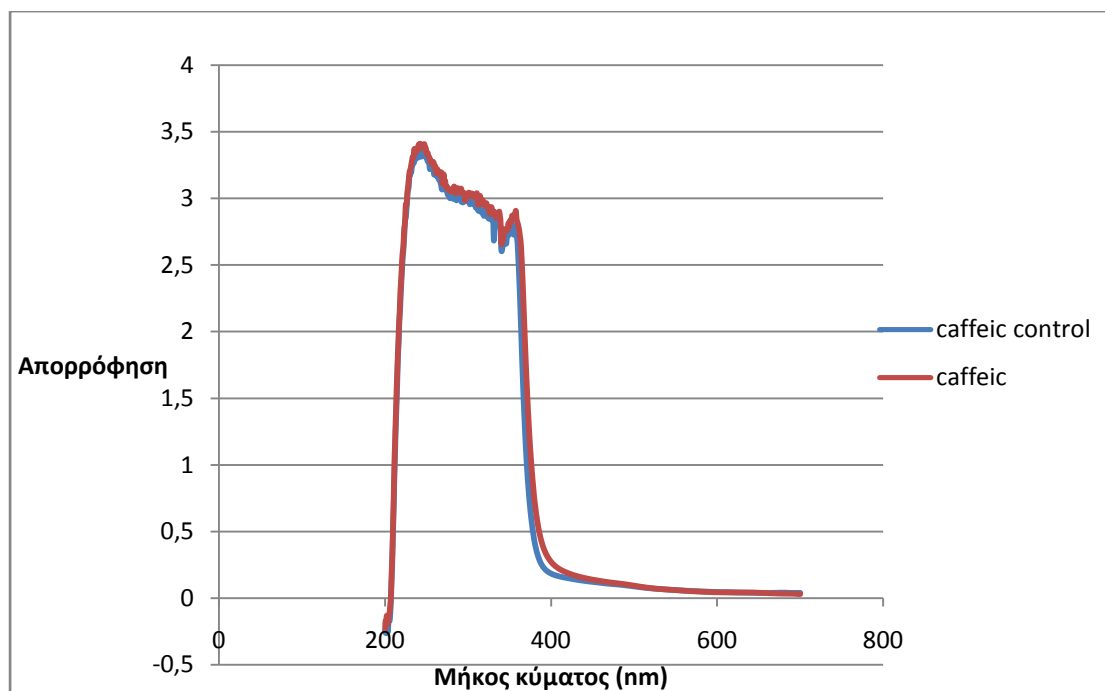
Ο πολυμερισμός των παραπάνω αρωματικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 45°C και pH 6 για 24 ώρες.

Όσο αναφορά την ανιλίνη και το καφεϊκό οξύ, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα από τη μελέτη της υπεριώδους και ορατής φασματομετρίας (UV-Vis).



Διάγραμμα 5.7: Διάγραμμα της απορρόφησης της ανιλίνης συναρτήσει του μήκους κύματος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου, ενώ η κόκκινη στο πολυμερές της ανιλίνης

Παρατηρείται πως δημιουργούνται νέες κορυφές στα 254 και 379 nm. Οι κορυφές αυτές αυξάνονται με τη πάροδο του χρόνου, και συνεπώς και με τη δημιουργία του πολυμερούς. Παρόλο την ένδειξη για την ύπαρξη πολυμερούς, δεν υπήρχε η δυνατότητα απομόνωσής του.



Διάγραμμα 5.8 : Διάγραμμα της απορρόφησης του καφεϊκού οξέος συναρτήσει του μήκους κύματος, η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα αναφοράς, ενώ η κόκκινη στο πολυμερές του καφεϊκού οξέος

Δε παρατηρήθηκε καμία μετατροπή του υλικού ούτε λήφθηκαν διαγράμματα UV-Vis, που να υποδεικνύουν τον πολυμερισμό του υλικού, καθώς από το διάγραμμα φαίνεται πως οι καμπύλες της αντίδρασης του καφεϊκού οξέος καταλυόμενη από λακκάση και του δείγματος αναφοράς σχεδόν συμπίπτουν.

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα - Μελλοντικές Προοπτικές

Τη σημερινή εποχή, τα θερμοσταθερά ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, διότι καθίστανται κατάλληλα σε βιομηχανικές διεργασίες, οι οποίες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες. Οι θερμοφίλοι οργανισμοί αποτελούν μια σημαντική πηγή αυτών των ενζύμων. Ο *M.thermophila* είναι ένας θερμοφίλος αερόβιος μύκητας, ο οποίος παράγει μια πληθώρα θερμοσταθερών ενζύμων, τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι οι λακκάσες, οι οποίες είναι μπλε οξειδάσες με πολλαπλά ιόντα χαλκού που καταλύουν την οξείδωση μιας μεγάλης ποικιλίας φυσικών υποστρωμάτων (φαινόλες, πολυφαινόλες, ανιλίνες, αρύλιο διαμίνες, μεθοξυ-υποκατεστημένες φαινόλες, βενζινεθιόλες, ανόργανες / οργανικές μεταλλικές ενώσεις και πολλά άλλα), που είναι η κύρια αιτία που τις καθιστά ελκυστικές για δεκάδες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Οι λακκάσες έχουν αποκτήσει σημαντική προσοχή τα τελευταία χρόνια στον τομέα της βιοτεχνολογίας, λόγω διαφόρων πλεονεκτημάτων τους σε σύγκριση με άλλα οξειδωτικά ένζυμα, όπως το μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, η υψηλή σταθερότητα και το γεγονός ότι το νερό είναι το μοναδικό παραπροϊόν των αντιδράσεων που καταλύονται από αυτά τα ένζυμα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση ενός γονιδίου του μύκητα *M.thermophila*, το οποίο κωδικοποιεί μια λακκάση. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου ανασύρθηκε από τη βάση δεδομένων Genome Portal. Στη συνέχεια, ενισχύθηκε ποσοτικά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ενώ το γονίδιο που αποτελούσαν μόνο από τις τρεις κωδικοποιούσες περιοχές λήφθηκε από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης/ επέκτασης. Έπειτα, το γονίδιο αυτό τοποθετήθηκε στον φορέα pPICZαA και μεταφέρθηκε στα επιδεκτικά κύτταρα του ζυμομύκητα *P.pastoris*. Ως ευκαρυωτικός οργανισμός, η ζύμη *P. pastoris* έχει τα πλεονεκτήματα των ανώτερων ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης, όπως είναι η ικανότητα μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες είναι σημαντικές για την επεξεργασία των πρόδρομων πρωτεϊνικών μορίων, τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και τη γλυκοζυλίωση. Η υπερέκφραση ήταν επιτυχής και η μελέτη του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Η μελέτη κατέδειξε ικανοποιητικά επίπεδα ανάπτυξης της βιομάζας, όμως η ληφθείσα πρωτεΐνη δε παρουσίαζε την αναμενόμενη ενεργότητα στο υπόστρωμα ABTS. Ωστόσο, η μελέτη συνεχίστηκε με ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Τα μελλοντικά πειράματα στοχεύουν στην διερεύνηση της ενεργότητας του ενζύμου με τη χρήση άλλων υποστρωμάτων, καθώς και στο χαρακτηρισμό του.

Επίσης, στα πλαίσια της βιοτεχνολογικής αξιολόγησης της εμπορικής λακκάσης, πραγματοποιήθηκε ο ενζυμικός πολυμερισμός της κατεχόλης, της πυρογαλλόλης, καθώς και του γαλλικού οξέος καταλυόμενος με λακκάση σε βέλτιστη θερμοκρασία 30°C και pH = 6 σε ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄ - Na₂H₂PO₄ σε κλειστό σύστημα με επαρκές οξυγόνο. Εξετάστηκαν ακόμα και άλλες αρωματικές ενώσεις, όπως η κατεχίνη, η ανιλίνη, η κερσετίνη, η υδροκινόννη και το καφεϊκό οξύ. Αν και παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της αντίδρασης, δεν υπήρχε η δυνατότητα απομόνωσης του πολυμερούς. Παρόλα αυτά, η μελλοντική μελέτη οφείλει να εξετάσει τις αντιδράσεις πολυμερισμού και άλλων αρωματικών υποστρωμάτων. Επίσης, η αξιοποίηση των ιδιοτήτων των πολυμερών σε βιοτεχνολογικές και βιομηχανικές εφαρμογές καθίσταται μια μελλοντική πρόκληση. Η έρευνα θα μπορούσε να κατευθυνθεί στην κατασκευή πολυμερών ή ετεροπολυμερών με ιδιότητες όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα ή η θερμική αντοχή. Συμπερασματικά, εξαιτίας των πολύπλευρων βιοχημικών ιδιοτήτων τους, την υψηλή πρωτεϊνική τους σταθερότητα, το εύρος του φάσματος των υποστρωμάτων και του μεγάλου εύρους των εφαρμογών τους, οι λακκάσες είναι χρήσιμοι βιοκαταλύτες και με την εφαρμογή τους σε αντιδράσεις πολυμερισμού, τα φαινολικά υποστρώματα μπορούν να αποτελέσουν μια εναλλακτική διεργασία για το σχηματισμό πολυμερών με πρωτότυπες δομές.

Παράρτημα

Σύγκριση του γονιδίου με ιντρόνια και wild type :

Gene with introns

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WT          -ATGTTACTTTTCGAAACTATCTATTTC-----TGCTTGC-CAAATGGCTGTCCGT-TGC 50
Sample      GGWACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGAGTGTGA 60
           *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

WT          TGTGTAT--GC-----CGGAACTCTTGTCCATGATGAACAGTTCATCCC 92
Sample      TGGATATCTGCAGAATTCAGGCGAATTCGGAACCTTGTCCATGATGAACAGTTCATCCC 120
           **   ***   **   *****

WT          GGACCATAATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAGAACCGGGAAGA 152
Sample      GGACCATAATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAGAACCGGGAAGA 180
           *****

WT          CGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGGCTGCCATACACTTGCTTCCTGGCGCTAGGAC 212
Sample      CGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGGCTGCCATACACTTGCTTCCTGGCGCTAGGAC 240
           *****

WT          TTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGGAACCTTAGCATGGTGAGTAGAGCAGC 272
Sample      TTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGGAACCTTAGCATGGTGAGTAGAGCAGC 300
           *****

WT          GCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTTGGCAGCGCCTTT 332
Sample      GCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTTGGCAGCGCCTTT 360
           *****

WT          CTCAGCGATTCGCCCGTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCGC 392
Sample      CTCAGCGATTCGCCCGTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCGC 420
           *****

WT          CCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATTCGACCGAACCAGAAGACGCAGGGACATACTTCT 452
Sample      CCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATTCGACCGAACCAGAAGACGCAGGGACATACTTCT 480
           *****

WT          ACCATTACACGTTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGACT 512
Sample      ACCATTACACGTTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGACT 540
           *****

WT          GTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCGAAGACCACTTCC 572
Sample      GTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCGAAGACCACTTCC 600
           *****

WT          AGAAGAGCGATTCGAAATGATTCAAGGCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGCG 632
Sample      AGAAGAGCGATTCGAAATGATTCAAGGCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGCG 660
           *****

WT          AGACACGGGGTATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCCAGG 692
Sample      AGACACGGGGTATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCCAGG 720
           *****

WT          GCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCGG 752
Sample      GCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCGG 780
           *****

WT          GTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCAA 812
Sample      GTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCAA 840
           *****

WT          CTGACTGCACTCTCCCGGTCATCGATGTGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTCA 872
Sample      CTGACTGCACTCTCCCGGTCATCGATGTGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTCA 900
           *****

WT          TTGGTGCCACAGGCGCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAACGATTCACCTA 932
Sample      TTGGTGCCACAGGCGCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAAC----- 950
```

```

*****
WT      TTGTTTCAGGTCGACGGCAGCGAGTACAATGCGCCGGTAACGGTTGACCATATCCAGCTCG 992
Sample  -----

WT      GCGGAGGTCAACGTTTCGACGTTCTCTCCGCACCAAGACGGCCGAGGAGCTCAGATGCA 1052
Sample  -----

WT      ACGGCGACAAGACCACCTATTTCTGCAATTTGAAACCGCGGATCGTCCCGATCCCTACC 1112
Sample  -----

WT      GCGGCTATGGCGTCTTACGGTATAATCTCGGCACTCCGGTCCCGCCGCCCCACGACTC 1172
Sample  -----

WT      CGGCGCTCACTCTCCCGGCCAAGTCAACAACCTGGCTGGAATACACTTTCCAGCCACTTC 1232
Sample  -----

WT      ATCCTTCGAGCAGCTTGTCTCCACGGCCGAAGAGGTCACCCGCGCGTCATTCTCGAAG 1292
Sample  -----CACC CGCGCGTCATTCTCGAAG 973
                *****

WT      CCGAGCAAAGATCGACCCTGCAACCGGTGCGCTTGTCTGGAAGCTCGCGCACATGACCT 1352
Sample  CCGAGCAAAGATCGACCCTGCAACCGGTGCGCTTGTCTGGAAGCTCGCGCACATGACCT 1033
                *****

WT      GGACTGACATGTACGCGACAAGCCGGTGTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGGCCG 1412
Sample  GGACTGACATGTACGCGACAAGCCGGTGTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGGCCG 1093
                *****

WT      CCATGCCGGACTATGCCGCGGCGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGT 1472
Sample  CCATGCCGGACTATGCCGCGGCGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGT 1153
                *****

WT      TCCCCGGAAGAAAGACGAGGTGCTCGAGATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACA 1532
Sample  TCCCCGGAAGAAAGACGAGGTGCTCGAGATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACA 1213
                *****

WT      GCGGTGCCAGCGGCATCGTFCGAGACGCACCCCTTCCACGCCACGGTTCAGCACTTCTACG 1592
Sample  GCGGTGCCAGCGGCATCGTFCGAGACGCACCCCTTCCACGCCACGGTTCAGCACTTCTACG 1273
                *****

WT      ATGTGGGCAGTGGGCCCGCAAGTACGATCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCT 1652
Sample  ATGTGGGCAGTGGGCCCGCAAGTACGATCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCT 1333
                *****

WT      TGGGATACCGGCCAATCAAGCGGGACACGACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAGG 1712
Sample  TGGGATACCGGCCAATCAAGCGGGACACGACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAGG 1393
                *****

WT      TGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAGGGCGTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCG 1772
Sample  TGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAGGGCGTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCG 1453
                *****

WT      TGTGGATGGTGCCTGTACATTTCTGGCACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTGA 1832
Sample  TGTGGATGGTGCCTGTACATTTCTGGCACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTGA 1513
                *****

WT      TGTCTCATTTGCGTAGCTTGTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTT 1892
Sample  TGTCTCATTTGCGTAGCTTGTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTT 1573
                *****

WT      TCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTCCGAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTG 1952
Sample  TCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTCCGAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTG 1633
                *****

WT      TCTGTGAGCCAGAATACTTACATACGGCGGCGAGCGTCTACGGAAATGATACACACGCC 2012
Sample  TCTGTGAGCCAGAATACTTACATACGGCGGCGAGCGTCTACGGAAATGATACACACGCC 1693
                *****

WT      CCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACACGAACAATGTTGTGCCGCGGGGGCCGGGGAT 2072
Sample  CCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACACGAACAATGTTGTGCCGCGGGGGCCGGGGAT 1753
                *****

```


WT AGTGAGGATTCCGGTCA-CTAA----- 2093
Sample AGTGAGGATTCCGGTCATCTAGAGCCCTGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTG 1813
***** **

WT -----
Sample GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGGGTCACCTAAAT 1873

WT -----
Sample AGCTGGCGTAWACAKGTCMAACGGCSG 1900

Βιβλιογραφία

Aktas N, Kibarar G, Tanyolaç A. Effects of reaction conditions on laccase-catalysed 1-naphthol polymerisation. *J Chem Technol Biotechnol* 2000;75:840–6.

Alessandra Piscitelli, Cinzia Pezzella, Paola Giardina, Vincenza Faraco and Sannia Giovanni (2010) ; Heterologous laccase production and its role in industrial applications

Annett Mikolasch & Frieder Schauer; Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials

Bahrami, A., Shojaosadati, S., Mahbeli, G., 2001. Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria. *Biotechnol. Lett.* 23,899–901.

Berka M.Randy , Palle Schneider, Elizabeth J. Golightly, Stephen H. Brown, Mark Madden, Kimberly M. Brown, Torben Halkier, Kristine Mondorf, Feng Xu, 1997, Characterization of the Gene Encoding an Extracellular Laccase of *Myceliophthora thermophila* and Analysis of the Recombinant Enzyme Expressed in *Aspergillus oryzae*

Brinch, D.S. Pedersen, P.B. "Toxicological Studies on Laccase from *Myceliophthora Thermophila* Expressed in *Aspergillus oryzae*". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001.

Brock TD: Introduction, an overview of the thermophiles. In *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*. Edited by Brock TD. New York: John Wiley & Sons; 1986:1-16.

Cereghino JL, Cregg JM. 2000; Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45–66.

Chaurasia, Pankaj Kumar, Shashi Lata Bharati, and Sunil Kumar Singh. (2013); "Comparative Studies on the Blue and Yellow Laccases." *Research in Plant Sciences*

Chevallet Mireille , Sylvie Luche, Thierry Rabilloud ; 2006, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels

Chusid, Michael J. "Severe Osteomyelitis Caused by *Myceliophthora Thermophila* after a Pitchfork Injury." *American Composite Manufacturer Association*. Sept. 2006.

Crab, W., Mitchinson, C., 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol.* 15, 349–352.

Cregg JM, Higgins DR. 1995. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot.* 73: 891–897.

Davis J, Vaughan DH, Cardosi MF (1998) Modification of catechol polymer redox properties during electropolymerization in the presence of aliphatic amines. *Electrochim Acta* 43:291–300

Dijkhuizen, L., Van der Maarel, M., Van der Veen, B.U., 2002.

Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.* 94, 137–155.

Dubey S, Singh D, Misra RA (1998) Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microbiol Technol* 23:432–437

Emmanuel, L., Stefan, J., Bernard, H., Abdel, B., 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 3–14.

Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N: Biorefineries: Current status, challenges and future direction. *Energy and Fuels* 2006, 20:1727-1737.

G.D. Haki, S.K. Rakshit 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review

Giardina Paola, Allesandra Piskitelli, Cinzia Pecella, Vincenzo Lettera, Vincenza Faraco, Giovanni Sannia. *Fungal laccase : Structure, function and application*, 2014

Heimo H, Palmu K, Suominen I. 1997; Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. *Prot Exp Pur* 10: 70–79.

Herscovics A, Orlean P. 1998 , *Glycoprotein biosynthesis in yeast*.

Huttermann A. , C. Herche, A. Haars, *Holzforschung* 1980,34, 64.

Ikada R, Uyama H, Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide): laccase catalysed oxidative polymerisation of syringic acid. *Macromolecules* 1996;29:3053–4.

J. A. Vinson, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, 439, 151.

J. Jankun, S. H. Selman, R. Swiercz, E. Skrzypczak-Jankun, *Nature* 1997, 387, 561;

Junkera Katja, Reinhard Kissnerb, Boris Rakvinc, Zengwei Guoa, Martin Willekea,

Stephan Busatoa, Thomas Webera, Peter Walde, 2013, The use of *Trametes versicolor* laccase for the polymerization of aniline in the presence of vesicles as templates

Juvenio López, José M. Hernández-Alcántara, Pedro Roqueroc, Carmina Montiela, Keiko Shiraid, Miquel Gimenoa, Eduardo Bárzanaa (2013), *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward apolyconjugated semiconducting material.

Kamm B, Kamm M: Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, 64:137-145.

Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, *et al.* 2000; Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the *AOX2* promoter in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 89(5): 479–484.

Kobayashi S., H. Uyama, M. Ohmae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2001, 74, 613; [12e] R. A.

Gross, A. Kumar, B. Kalra, *Chem. Rev.* 2001, 101, 2097

Kristjansson JK, Stetter KO: Thermophilic bacteria. In *Thermophilic bacteria*. Edited by Kristjansson JK. London: CRC Press Inc; 1992:1-18.

Kristjansson JK: Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology* 1989, 7:349-353.

Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng* 83:386–394

Lis H, Sharon N. 2003. Protein glycosylation. Structural and functional aspects.

Renugopalakrishnan, V. (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142:105-124.

Li PZ, Go XG, Arellano RO, Renugopalakrishnan V. 2001. Glycosylated and phosphorylated proteins—expression in yeast and oocytes of *Xenopus*: prospects and challenges—relevance to expression of thermostable proteins. [Review.] *Protein Express. Purif.* 22: 369–380.

Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK: Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000, 64:461-488.

Menendez J, Valdes I, Cabrera N. 2003; The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast* 20: 1097–1108.

Milstein O, Nicklas B, Hüttermann A. Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;31:70–4.

Milstein O, Hüttermann A, Fründ R, Lüdemann HD. Enzymatic co-polymerisation of lignin with low-molecular mass compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;40:760–7.

Mochizuki S, Hamato N, Hirose M, *et al.* 2001; Expression and characterisation of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Pur* 23: 55–65.

Motoichi Kurisawa, Joo Eun Chung, Hiroshi Uyama, Shiro Kobayashi (2003), Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly (catechin).

Mouchacca J. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie Mycol.* 1997;18:19–69

Murat Güresir , Nahit Aktas , Abdurrahman Tanyolaç (2004), Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase.

Nahit Aktas, Abdurrahman Tanyolac (2003) , Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol.

Paes G, O'Donohue MJ: Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Journal of Biotechnology* 2006, 125:338-350.

Paola Giardina, Vincenza Faraco, Cinzia Pezzella, Alessandra Piscitelli, Sophie Vanhulle, Giovanni Sannia (2009) ;Laccases: a never-ending story

Pernilla Turner, Gashaw Mamo and Eva Nordberg Karlsson 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining.

Peter, W., Alexandra, T., Klaus, D., 2001. Conversions of glycerol to 1,3-propandiol by a newly isolated thermophilic strain. *Biotechnol. Lett.* 23, 463–466.

Poonam, N., Dalel, S., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 770–778.

Rachel Daly and Milton T. W. Hearn (2004) ; Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production

Ramesh Maheshwari, Girish Bharadwaj, Mahalingeshwara K. Bhat (2000); Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes.

Rees GS, Gee CK, Ward HL, Ball C, Tarrant GM, Poole S, Bristow AF. 1999. Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur. Cytokine Netw.* 10: 383–392.

Renate Reiss, Julian Ihssen, Michael Richter, Eric Eichhorn, Boris Schilling, Linda Thöny-Meyer (2013) ; Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra

Romanos M. 1995; Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6: 527–533

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423–488.

Saboto, D., Nucci, R., Rossi, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z.,

Lakowicz, J., 1999. The b-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C. *Biophys. Chem.* 81, 23–31.

Santos H, da Costa MS: Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology* 2002, 4:501-509.

Sarikaya, E., Higassa, T., Adachi, M., Mikami, B., 2000. Comparison of degradation abilities of a- and b-amylases on raw starch granules. *Proc. Biochem.* 35, 711–715.

Sears IB, Oconnor J, Rossanese OW, Glick BS. 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 14: 783–790.

Sergio Riva (2006) ; Laccases: blue enzymes for green chemistry

Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, *et al.* 1997; Strategies for optimal synthesis of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55–62

Sue Macauley-Patrick Mariana L. Fazenda, Brian McNeil and Linda M. Harvey (2005) ; Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system

Sun Xuejiao, Rubing Bai, Ya Zhang, Qiang Wang, Xuerong Fan, Jiugang Yuan, Li Cui, Ping Wang, 2013 Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds

Taxon Details Myceliophthora Thermophila ATCC42464." DOE Joint Genome Institute.

Topakas Evangelos, Moukouli Maria, Dimarogona Maria, Christakopoulos Paul, 2011, Expression, characterization and structural modeling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila

Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

The Regents of the University of California, Dec. 2012.

White CE, Kempf NM, Komives EA. 1994; Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. Structure 2(11): 1003–1005.

Zhang, W., Inan, M., Meagher, M.M. (2000) Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 5:275- 287