



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης

Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός νέας
θερμοσταθερής κυτταρινάσης από εμπλουτισμένο
μεταγονιδιωματικό δείγμα Ισλανδικής θερμοπηγής**

Διπλωματική Εργασία

Κίσσας Δημήτριος

Επιβλέπων καθηγητής

Φραγκίσκος Κολίσης

Αθήνα, 2015

Στην οικογένεια μου
για τη στήριξη τους...

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Φραγκίσκου Κολίση.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Κολίση για την εμπιστοσύνη του με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Του οφείλω όλες τις γνώσεις και εμπειρίες που έλαβα όλο τον χρόνο της εργασίας μου.

Από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Σκρέτα, υπεύθυνο του εργαστηρίου Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο του και ήταν πάντα διαθέσιμος σε οτιδήποτε τον χρειάστηκα. Οι συμβουλές του και η επιστημονική του προσέγγιση στα προκύπτοντα προβλήματα αποτέλεσαν μάθημα για εμένα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες: Δήμητρα Γιαλαμά, Δάφνη Δεληβοριά, Στεφανία Πανούτσου, Ηλία Μάτη αλλά και τον Δρ. Μιχάλη Φασσέα για τις συμβουλές τους και την βοήθεια τους να προσαρμοστώ στο νέο εργαστηριακό περιβάλλον.

Τέλος, ένα ευχαριστώ είναι λίγο για την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Ζαραφέτα που με πολύ υπομονή όλη αυτή τη χρονιά, με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	7
Abstract.....	8
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Μέρος.....	10
1.1 Θερμοανθεκτικά Ένζυμα.....	10
1.2 Ανακάλυψη νέων πρωτεϊνών μέσω μεταγονιδιωματικής προσέγγισης.....	12
1.3 Κυτταρίνη	14
1.4 Ενζυμική Υδρόλυση Κυτταρίνης.....	17
1.4.1 Μηχανισμός Υδρόλυσης.....	17
1.4.2 Δομή Κυτταρινασών	20
1.4.3 Διαφορές κυτταρινολυτικών συστημάτων	21
1.5 Ετερόλογη έκφραση κυτταρινασών.....	22
1.5.1 Βακτήρια.....	23
1.5.2 Ζυμομύκητες	24
1.5.3 Νηματοειδείς μύκητες.....	24
1.6 Εφαρμογές κυτταρινασών	25
1.7 Escherichia coli σαν σύστημα έκφρασης	27
1.7.1 Επιλογή και σχεδιασμός πλασμιδίων	28
1.7.2 Πλασμίδια pET.....	29
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος.....	31
2.1 Όργανα – Συσκευές.....	31
2.2 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	31
2.3 Κύτταρα.....	32
2.4 Θρεπτικά Υλικά – Ρυθμιστικά Διαλύματα	33
2.5 Επαγωγείς – Αντιβιοτικά-Αντισώματα.....	34
2.6 Διαλύματα Πρότυπων Πρωτεϊνών – DNA.....	34
2.7 Μοριακές Τεχνικές	35
2.7.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	35
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	36
2.7.3 Πέψεις DNA	36
2.7.4 Αντίδραση συνένωσης μορίων DNA (ligation).....	37

2.7.5 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων	38
2.8 Τεχνικές ανάλυσης Πρωτεϊνών	39
2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	39
2.8.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250	41
2.8.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot).....	41
2.8.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	43
2.9 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός	43
2.9.1 Πρότυπες συνθήκες αντίδρασης.....	44
Κεφάλαιο 3: Λειτουργία, κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου <i>CelDZ1a</i>	45
3.1 Χαρακτηριστικά και βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχίας-στόχου.....	45
3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου <i>celDZ1a</i>	49
3.2.1 Απομόνωση Γονιδίου	49
3.2.2 Ανασυνδυασμός πλασμιδιακού φορέα pET28 – <i>celDZ1a</i>	50
3.2.3 Έκφραση σε μικρού όγκου καλλιέργεια και κλασμάτωση	51
3.2.4 Επιβεβαίωση λειτουργικότητας και ζυμογράφημα.....	53
Κεφάλαιο 4: Κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση του γονιδίου <i>CelDZ1</i> και χαρακτηρισμός της παραγόμενης κυτταρινάσης.....	56
4.1 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου <i>CelDZ1</i>	56
4.2 Παραγωγή και καθαρισμός <i>CelDZ1</i>	58
4.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός <i>CelDZ1</i>	61
4.3.1 Εύρεση βέλτιστου pH	61
4.3.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας.....	62
4.3.3 Μελέτη θερμικής σταθερότητας.....	63
4.3.4 Μελέτη σταθερότητας παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων	64
4.3.5 Μελέτη σταθερότητας παρουσία μετάλλων και αποδιατακτικών παραγόντων.....	65
4.3.6 Μελέτη κινητικών σταθερών	68
4.3.7 Μελέτη εκλεκτικότητας σε διαφορετικά υποστρώματα	69
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	70
Βιβλιογραφία	73

Περίληψη

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο ευρύτερο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος HotZyme (EU/FP7/KBBE-2010.3.5-0) που είχε ως στόχο την ανακάλυψη νέων, θερμοανθεκτικών υδρολασών από θερμά περιβάλλοντα μέσω μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Κατά τη διάρκεια της εργασίας έγινε απομόνωση και χαρακτηρισμός μια νέας θερμοσταθερής κυτταρινάσης με ενδιαφέρουσες ιδιότητες που την καθιστούν υποψήφιο ένζυμο για βιομηχανική χρήση. Στο πλαίσιο του προγράμματος πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση μεταγονιδιωματικού δείγματος εμπλουτισμένου σε πολυσακχαρίτες. Από τα δεδομένα αυτά, επιλέχθηκε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω της σχετικής ομοιότητας (59%) με μια χαρακτηρισμένη ενδογλουκανάση του *Bacillus Akibai* [1]. Η αλληλουχία αυτή απομονώθηκε με PCR από το μεταγονιδιωματικό δείγμα DNA, εκφράστηκε σε *E. coli* και βρέθηκε ότι κωδικοποιεί μια GH5 ενδογλουκανάση η οποία και ονομάστηκε CelDZ1a. Με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων προβλέφθηκε η ύπαρξη μιας διαμεμβρανικής έλικας στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης η οποία και αφαιρέθηκε, δίνοντας την παραλλαγή της αρχικής πρωτεΐνης που αναφέρεται ως CelDZ1. Η αφαίρεση της διαμεμβρανικής έλικας διευκόλυε τον καθαρισμό και αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου, καθώς και την αντίσταση του σε πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια παραγωγής του. Τέλος πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της CelDZ1 κατά τον οποίο προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά του νέου ενζύμου κάτω από ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Η κυτταρινάση CelDZ1 παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους 70 °C με χρόνο ημιζωής περίπου 4.5 h στους 70 °C βαθμούς και βέλτιστη τιμή pH 5. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το νέο ένζυμο παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, ακόμα και όταν αυτές προσεγγίζουν το σημείο κορεσμού. Επίσης, η δράση του ενισχύεται παρουσία ιόντων μαγγανίου και β-μερκαπτοαιθανόλης ενώ μειώνεται παρουσία ιόντων σιδήρου. Τέλος, ενδιαφέρων παρουσιάζει το γεγονός ότι η CelDZ1 επιδεικνύει εξαιρετική εκλεκτικότητα στην διάσπαση των β-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών των διαλυτών υποστρωμάτων.

Abstract

This work was performed in the framework of the European research program HotZyme (EU/FP7/KBBE-2010.3.5-0) which was aiming at the discovery of new, thermostable hydrolases from hot environments through metagenomics screening. In the present thesis, the isolation and characterization of a new thermostable cellulase with interesting properties for industrial use is described. In the context of the aforementioned research program, metagenomics sample enriched in polysaccharides was sequenced and analyzed with bioinformatics tools. An open reading frame which exhibits moderate similarity (59%) to a characterized endoglucanase from *Bacillus Akibai* [1] and bears a predicted cellulase catalytic domain was selected for further analysis. The sequence was isolated with PCR from the metagenomic DNA sample, expressed in *E. coli* and was found to encode for a GH5 endoglucanase which was designated as CelDZ1a. Furthermore, a transmembrane helix in the N terminus of the protein was predicted and removed, allowing a variation of the original protein referred to as CelDZ1. Removal of the transmembrane helix facilitated the purification and increased the expression levels of the enzyme as long as the proteolysis resistance during production. Finally, the biochemical characterization of CelDZ1 was performed, during which the properties of the new enzyme under a wide range of conditions were determined. The cellulase CelDZ1 presents optimal operation temperature of 70 °C with a half-life of approximately 4.5 h at 70 °C and optimum pH 5. It is noteworthy that the new enzyme has remarkable stability in the presence of high salt concentrations, even near saturation levels. In addition, activity is enhanced in the presence of Mn²⁺ ions and beta-mercaptoethanol, while activity is reduced in the presence of Fe ions. Finally, it is interesting that CelDZ1 exhibits excellent selectivity against beta 1-4 glycosidic linkages of insoluble substrates.

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό Μέρος

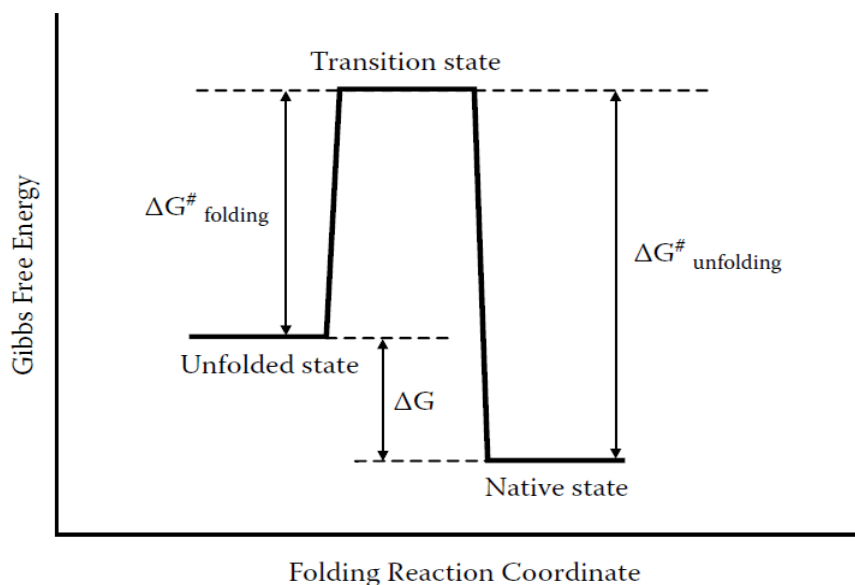
1.1 Θερμοανθεκτικά Ένζυμα

Οι ακραίες συνθήκες που επικρατούν στις βιομηχανικές διεργασίες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, πίεση και pH, απαιτούν τη χρήση ενζύμων τα οποία θα είναι ανθεκτικά σε αυτές. Τα συμβατικά ένζυμα που προέρχονται από μεσόφιλους οργανισμούς δεν επαρκούσαν και έτσι η έρευνα στράφηκε ιδιαίτερα τα τελευταία 20 χρόνια στην απομόνωση νέων ενζύμων από ακραία περιβάλλοντα τα οποία θα κάλυπταν αυτό το κενό.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσελκύουν τα ένζυμα τα οποία είναι σταθερά και λειτουργικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Πέραν του ότι χρησιμοποιώντας θερμοσταθερούς βιοκαταλύτες μειώνεται ένα από τα βασικότερα κόστη των βιομηχανικών διεργασιών, αυτό της ψύξης (καθώς δεν είναι απαραίτητη η μείωση της θερμοκρασίας της διεργασίας προκειμένου να είναι λειτουργικός ο βιοκαταλύτης), υπάρχουν πολλά ακόμα πλεονεκτήματα που συνδέονται με τη διεξαγωγή των διεργασιών σε υψηλές θερμοκρασίες. Μερικά από αυτά περιλαμβάνουν αυξημένη διαλυτότητα των υποστρωμάτων, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των ουσιών, μείωση του κόστους άντλησης λόγω μειωμένου ιξώδους των μιγμάτων, αύξηση της απόδοσης σε διεργασίες εκχύλισης και προστασία των υλικών από μολύνσεις μεσόφιλων μικροοργανισμών [2]. Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα απομονώνονται συνήθως από οργανισμούς οι οποίοι επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι οργανισμοί αυτοί είναι συνήθως αρχαία αλλά ο αριθμός των χαρακτηρισμένων ενζύμων από βακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς όλο και αυξάνεται [3]. Ανάλογα με την θερμοκρασία στην οποία δρουν τα ένζυμα, όπως και οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται διακρίνονται σε θεμόφιλα (60-80 °C) και υπερθεμόφιλα (>80 °C).

Η κατανόηση των παραμέτρων οι οποίες οδηγούν στην θερμοσταθερότητα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το σχεδιασμό νέων θερμοσταθερών ενζύμων. Παρόλα αυτά, το φαινόμενο δεν είναι ακόμα κατανοητό. Γενικά, η θερμοσταθερότητα οφείλεται σε μειωμένους ρυθμούς «αποαναδίπλωσης»

(unfolding) της πρωτεΐνης λόγω μεγάλου $\Delta G_{\text{unfolding}}$, αυξημένους ρυθμούς «αναδίπλωσης» (folding) λόγω μικρού $\Delta G_{\text{folding}}$ αλλά και σε συνδυασμούς και των δύο [4], όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 1: Διαφορές στην ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs ανάμεσα στην μη αναδιπλωμένη και την αναδιπλωμένη μορφή σύμφωνα με την θεωρία της μεταβατικής κατάστασης [4]

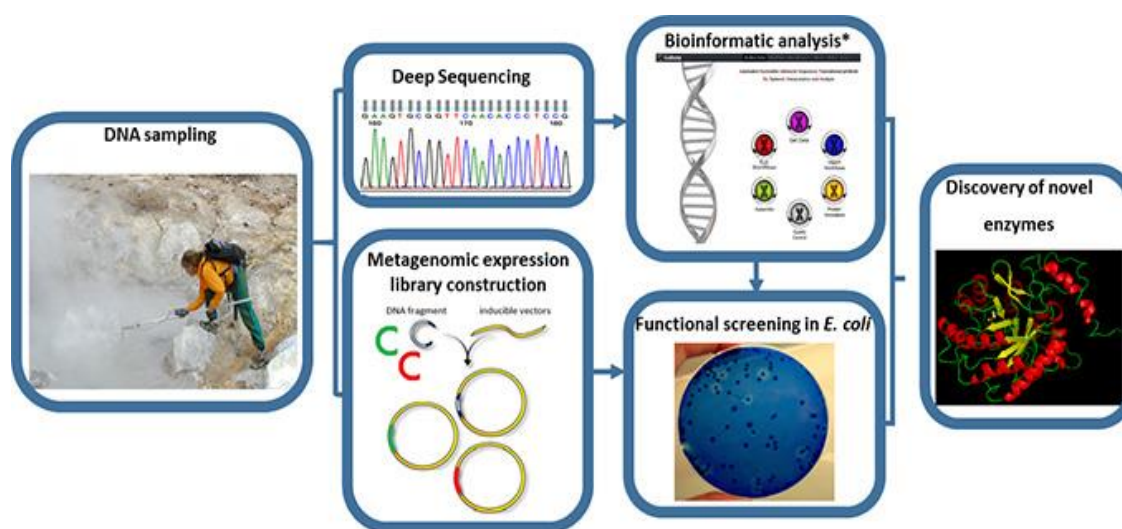
Βασικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την θερμοσταθερότητα είναι η υδροφοβικότητα η οποία οδηγεί σε αυξημένη συνοχή του ενζύμου λόγω ισχυρότερων δεσμών μεταξύ των δομών του [5]. Όσο αφορά την πρωτοταγή δομή, κατάλοιπα προλίνης έχουν δείξει να σχετίζονται με την θερμοσταθερότητα ενώ ύστερα από αλληλουχίσεις γονιδίων προκύπτουν αυξημένα ποσοστά σε ουρακίλη και γουανίνη [4]. Επιπλέον η θερμοσταθερότητα φαίνεται να επηρεάζεται και από εξωτερικούς παράγοντες όπως ωσμολύτες (γλυκερίνη και TMAO), μεταλλικά ιόντα αλλά και από υποστρώματα [4, 6]

1.2 Ανακάλυψη νέων πρωτεϊνών μέσω μεταγονιδιωματικής προσέγγισης

Η σύγχρονη βιολογία παρέχει πολλά εργαλεία για τη μελέτη των οργανισμών και των πρωτεϊνών τους. Με την γονιδιωματική για παράδειγμα πραγματοποιείται πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος των οργανισμών ενώ η όλο και αναπτυσσόμενη πρωτεωμική αναλύει το πρωτέωμα των οργανισμών αναλύοντας όλες τις πρωτεΐνες οι οποίες απαντώνται σε αυτόν. Παρότι με τη διαθεσιμότητα αυτών των εργαλείων και τεχνολογιών θα περίμενε κανείς πως η ανακάλυψη νέων πρωτεϊνών θα είναι μια εύκολη υπόθεση, αυτό καταρρίπτεται, καθώς όλες αυτές οι μέθοδοι απαιτούν οργανισμούς οι οποίοι θα είναι σε θέση να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο με τις συμβατικές τεχνικές καλλιέργειας. Είναι όμως πλέον αποδεκτό ότι περίπου το 99% των μικροοργανισμών δεν δύναται να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες με αποτέλεσμα το συντριπτικό ποσοστό της βιοποικιλότητας και κατ' επέκταση του πρωτεώματος της να παραμένει ανεξερεύνητο [7]. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος ακολουθείται η μεταγονιδιωματική προσέγγιση. Με τον όρο μεταγονιδιωματική, γίνεται αναφορά στην χρήση των σύγχρονων εργαλείων της γονιδιωματικής, για την μελέτη του γενετικού υλικού μικροβιακών οργανισμών και κοινοτήτων άμεσα στο περιβάλλον τους, χωρίς την ανάγκη απομόνωσης και καλλιέργειας μεμονωμένων ειδών. Πολλές φορές αντί του όρου μεταγονιδιωματική, χρησιμοποιούνται και οι όροι περιβαλλοντική γονιδιωματική (environmental genomics), οικογονιδιωματική (ecogenomics) ή και μεταγονιδιωματική κοινοτήτων (culture genomics).

Κατά την μεταγονιδιωματική, συλλέγεται δείγμα από ακραία περιβάλλοντα τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρον (π.χ. θερμοπηγές, θερμά ρεύματα, ηφαιστιογενή οικοσυστήματα, ενδιαιτήματα υψηλής πίεσης, αλατότητας, οξύτητας κ.α), από τα οποία απομονώνεται το γενετικό υλικό. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες είτε αλληλουχούνται είτε «πέπτονται» και εισάγονται σε κατάλληλους φορείς σχηματίζοντας μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες. Μία μέθοδος ανάλυσης των δεδομένων αλληλούχισης που προκύπτουν είναι η βιοπληροφορική. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία αναγνωρίζουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading

frames, ORFs) και τις αντίστοιχες υποθετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούν και τις συγκρίνουν με χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες με κριτήρια ομοιότητας αλληλουχίας, δομής κ.α [8, 9]. Έτσι προκύπτει μια λίστα πιθανών «γονιδίων-στόχων» τα οποία είναι δυνατό να απομονωθούν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το μεταγονιδιωτικό δείγμα. Η άλλη μέθοδος στηρίζεται στην εισαγωγή των βιβλιοθηκών έκφρασης σε κατάλληλα κύτταρα ξενιστές και στην λειτουργική ανάλυση τους σε κατάλληλα συστήματα [9]. Η λειτουργική ανάλυση είναι πιθανό να φανερώσει πιο ρηξικέλευθα αποτελέσματα καθώς δεν στηρίζεται σε γνωστές δομές αλλά ο σχεδιασμός συστημάτων ανάλυσης είναι το βασικότερο εμπόδιο.



Εικόνα 2: Σχηματική παρουσίαση μεταγονιδιωτικής προσέγγισης του ερευνητικού προγράμματος Hotzyme [10]

Η κατασκευή όμως βιβλιοθηκών DNA παρουσιάζει δυσκολίες. Αρχικά πρέπει να απομονωθεί DNA από όσο το δυνατόν περισσότερους οργανισμούς του δείγματος ώστε η μεταγονιδιωτική βιβλιοθήκη που θα σχηματιστεί να είναι κατά το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη [11]. Επίσης, κατά την διάρρηξη των μικροοργανισμών για απομόνωση του γενετικού τους υλικού, η διάτμηση του DNA σε πολύ μικρά κομμάτια πρέπει να αποφεύγεται καθώς οδηγεί σε λήψη χιμαιρικών προϊόντων [11]. Τέλος, το γενετικό υλικό πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμείξεις, ιδιαίτερα πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς οδηγούν σε δυσκολίες κατά την μετέπειτα επεξεργασία της βιβλιοθήκης [9].

Τα μεταγονιδιωματικά δείγματα περιέχουν πολύ μεγάλη ποσότητα και ποικιλία γενετικού υλικού. Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες πραγματοποιείται αναζήτηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, το γενετικό τους υλικό αντιπροσωπεύει μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα μέσα στο δείγμα. Για αυτό τον λόγο εφαρμόζονται τεχνικές εμπλουτισμού των δειγμάτων (enrichment). Έτσι συχνά πραγματοποιείται εμπλουτισμός του δείγματος σε κάποιο παράγοντα, ο οποίος θα ασκήσει εκλεκτική πίεση. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να στηρίζονται σε θρεπτικά υποστρώματα και χημικά ή φυσικά κριτήρια [12]. Ωστόσο ο εμπλουτισμός με κάποιο θρεπτικό αποτελεί την συνηθέστερη περίπτωση [12].

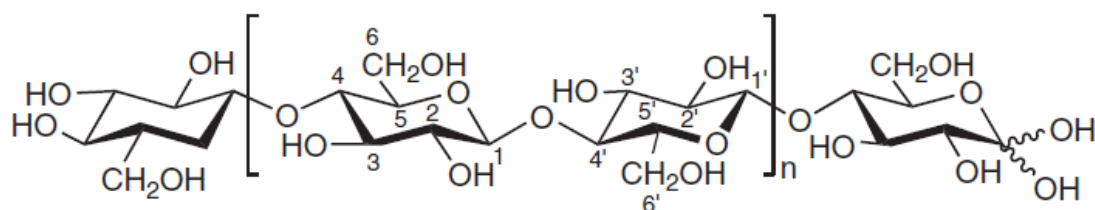
Είναι εμφανές το πλεονέκτημα της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης στο ότι μπορεί να αναλύσει άμεσα πολύ μεγάλη μικροβιακή ποικιλότητα, η οποία δεν θα ήταν εμφανής με άλλες μεθόδους. Οι μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες οι οποίες κατασκευάζονται περιέχουν μεγάλο όγκο γενετικών πληροφοριών των οποίων η επεξεργασία πραγματοποιείται όλο και πιο εύκολα με τα σύγχρονα εργαλεία αλληλούχισης και βιοπληροφορικής. Συνεπώς η μεταγονιδιωματική αποτελεί μονόδρομο για την εξερεύνηση της συνολικής μικροβιακής βιοποικιλότητας του πλανήτη.

1.3 Κυτταρίνη

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί όπως κυρίως τα φυτά αλλά και τα φύκη καθώς και ορισμένα βακτήρια παράγουν πάνω από 180 δισεκατομμύρια τόνους οργανικής ύλης ετησίως με την μισή από αυτή περίπου να αποτελείται από έναν πολυσακχαρίτη, την κυτταρίνη. [13] Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά την κυτταρίνη το πιο άφθονο βιοπολυμερές και σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό της κόστος, χρησιμοποιείται σε πλήθος εφαρμογών από την παραγωγή χαρτιού μέχρι την βιομηχανία καυσίμων για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Η κυτταρίνη είναι ένα συσσωμάτωμα πολυμερισμένων γραμμικών αλυσίδων με την β-D-γλυκοκυρανόζη, ισομερές της D – γλυκόζης, να αποτελεί το δομικό συστατικό και να ενώνεται αποκλειστικά με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κάθε μονομερές

περιστρέφεται σε σχέση με το γειτονικό του κατά 180° μοίρες με αποτέλεσμα ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη να αποτελεί την επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα[14].

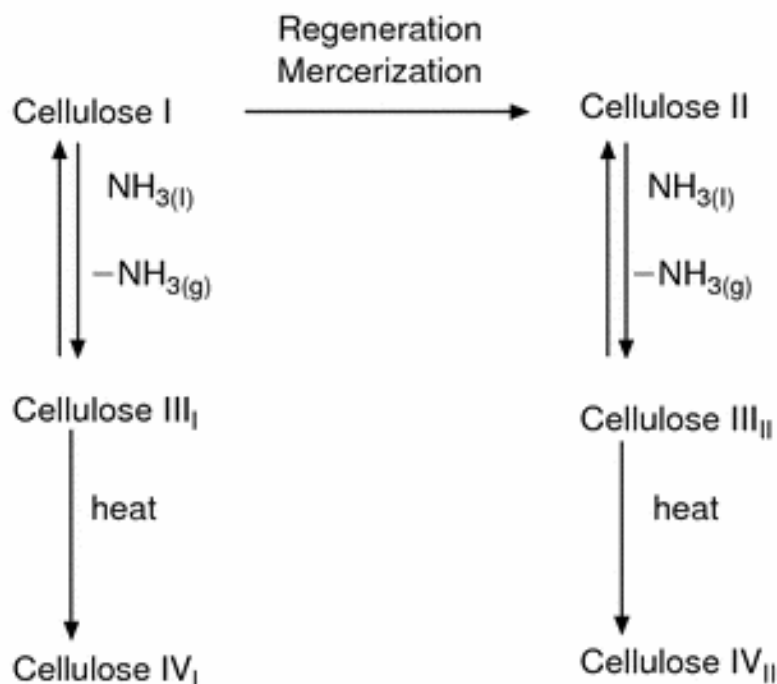


Εικόνα 3: Δομή κυτταρίνης [13]

Οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια της γλυκοκυρανόζης της ίδιας αλυσίδας καθώς και δεσμοί υδρογόνου σε συνδυασμό με δυνάμεις van der Waals ανάμεσα σε διαφορετικά επίπεδα σχηματίζουν κρυσταλλικές περιοχές[15]. Περίπου 30 μονάδες κυτταρίνης σχηματίζουν μεγαλύτερα σύμπλοκα γνωστά ως στοιχειώδη ινίδια (protofibrils), τα οποία με την σειρά τους πάλι σχηματίζουν μεγαλύτερες δομές τα μικροϊνίδια (microfibrils) από τα οποία και τελικά προκύπτει το τελικό πολυμερές τα ινίδια κυτταρίνης [16]. Ωστόσο ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών, ενώ εκτός από άμορφες περιοχές υπάρχουν και ανωμαλίες στην δομή των μικροϊνιδίων όπως πόροι ή διάφορες στρεβλώσεις [17, 18]. Έτσι ενώ από την μία η κρυσταλλικότητα αυξάνει την ανθεκτικότητα της κυτταρίνης σε χημική και ενζυμική προσβολή, η ύπαρξη των διαφόρων ανωμαλιών στην δομή αυξάνει την ειδική επιφάνεια και επιτρέπει την είσοδο νερού, άλλων διαλυτών και ενζύμων. Παράλληλα οι άμορφες περιοχές παρουσιάζουν αυξημένη υγροσκοπικότητα. Σαν αποτέλεσμα όλων αυτών διαφορετικές δομές προσφέρουν τελικά διαφορετικές ιδιότητες.

Άλλη μία σημαντική ιδιότητα της κυτταρίνης είναι ο πολυμορφισμός αφού μέσω κρυσταλλογραφίας, NMR αλλά και άλλων μεθόδων εμφανίζονται τέσσερις κύριες δομές: I, II, III, IV [19]. Στην φύση συναντάται η δομή I η οποία όπως αποδείχθηκε αργότερα αποτελείται και αυτή από δύο διαφορετικά πολύμορφα: το I_α και I_β . Η κυτταρίνη τύπου II η οποία είναι και η πιο συνηθισμένη μετά την κυτταρίνη τύπου I μπορεί να σχηματιστεί από τον τύπο I με χρήση δύο μεθόδων: την αναγέννηση και τον μερσερισμό. Κατά την πρώτη μέθοδο χρησιμοποιείται διαλύτης για την διαλυτοποίηση της κυτταρίνης τύπου I και ύστερα με καταβύθιση λαμβάνεται ο

τύπος II κυτταρίνης. Κατά τον μερσερισμό, η κυτταρίνη τύπου I διογκώνεται με εμβάπτιση σε πυκνό καυστικό νάτριο και σε επόμενο στάδιο εξουδετερώνεται με οξύ. Οι κυτταρίνες τύπου III_I και III_{II} λαμβάνονται και από τους δύο προηγούμενους τύπους με επεξεργασία με υγρή αμμωνία και άλλες αμίνες. Τέλος οι κυτταρίνες τύπου IV_I και IV_{II} λαμβάνονται με θέρμανση των κυτταρινών τύπου III στους 206 °C σε γλυκερόλη [13, 19]



Εικόνα 4: Πολύμορφα κυτταρίνης [20]

Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης εξαρτάται από την πηγή από την οποία προέρχεται αλλά και από τις μεθόδους με τις οποίες απομονώθηκε [21]. Σαν αποτέλεσμα ο βαθμός πολυμερισμού δεν είναι σταθερός με τις αναφορές να κάνουν λόγω από εκατοντάδες μέχρι αρκετές χιλιάδες. Η αύξηση του βαθμού πολυμερισμού μειώνει την διαλυτότητα της κυτταρίνης στο νερό κάτι το οποίο οφείλεται στην δημιουργία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στην εσωτερικές αλυσίδες [22]. Άρα υποστρώματα με υψηλό βαθμό πολυμερισμού και υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας, υδρολύονται με πολύ χαμηλότερους ρυθμούς, είτε με χημικά είτε με ενζυμικά μέσα.

1.4 Ενζυμική Υδρόλυση Κυτταρίνης

1.4.1 Μηχανισμός Υδρόλυσης

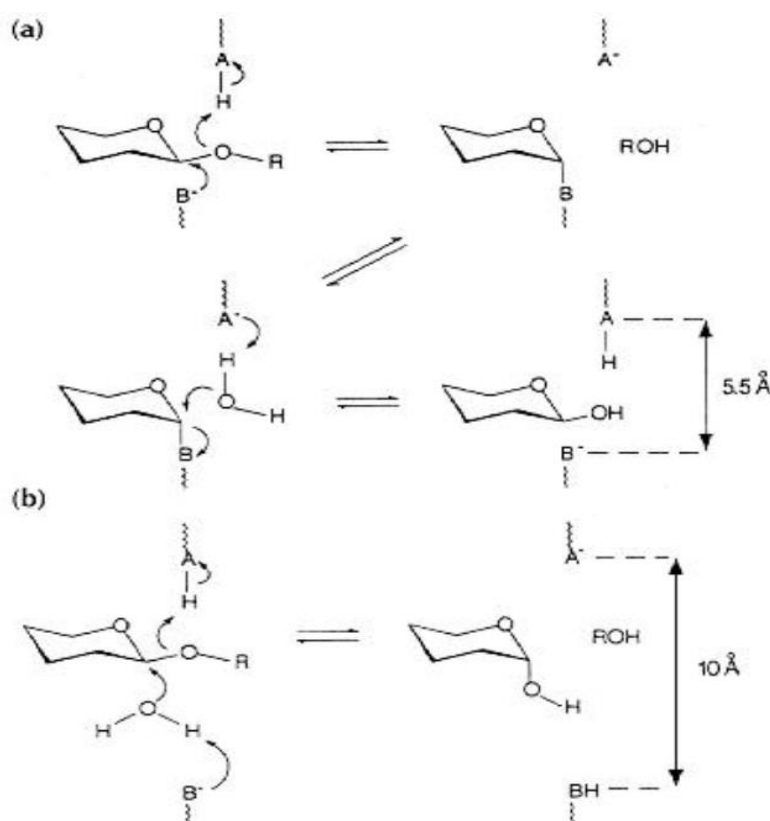
Η χρήση ενζύμων για την υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς τις πιο φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους επεξεργασίας. Η τεχνολογία πρωτοεμφανίστηκε ουσιαστικά κατά τον 2^ο παγκόσμιο πόλεμο και σήμερα αξιοποιείται σε πλήθος εφαρμογών. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό είναι γνωστά ως κυτταρινάσες. Με τον όρο «κυτταρινάση» γίνεται αναφορά σε ένα σύνθετο σύστημα ενζύμων τα οποία δρουν συνεργιστικά για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Το σύστημα αυτό αποτελείται γενικά από τρία ένζυμα:

- ένδο-1,4-β-γλουκανάσες: υδρολύουν τυχαία εσωτερικούς 1,4-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς
- έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες: απελευθερώνουν μόρια κελλοβιόζης από τα κομμένα άκρα κυτταρίνης
- β-γλυκοζιδάσες: υδρολύουν την κελλοβιόζη απελευθερώνοντας D-γλυκόζη

Αρχικά η ενδογλουκανάση δρα στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, στις οποίες είναι πιο εύκολα να εισχωρήσει το ένζυμο και δημιουργεί ελεύθερα άκρα στα οποία μπορεί να προσδεθεί η εξωγλουκανάση απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Υπάρχουν δύο είδη έξωγλουκανασών και προσδέονται και από τα δύο άκρα της αλυσίδας της κυτταρίνης [23]. Το ένα είδος προσδέεται στο αναγωγικό και το άλλο στο μη αναγωγικό κομμάτι της αλυσίδας. Η κελλοβιόζη η οποία απελευθερώνεται, υδρολύεται τελικά από την β-γλυκοζιδάση προς απελευθέρωση μορίων D-γλυκόζης. Οι δράσεις αυτές αποτελούν το γενικότερο μοντέλο καθώς έχουν βρεθεί για παράδειγμα κυτταρινάσες οι οποίες έχουν δράση και ένδο- και έξω- γλουκανάσης.

Όσο αφορά το μηχανισμό υδρόλυσης υπάρχουν δύο ειδών κυτταρινάσες η δράση των οποίων συνοδεύεται είτε με την διατήρηση είτε με την αναστροφή της διαμόρφωσης του ανωμερικού άνθρακα της β-D-γλυκοκυρανόζης [24]. Και στις δύο περιπτώσεις η κατάλυση πραγματοποιείται με την βοήθεια δύο καρβοξυλικών

ομάδων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και στηρίζεται στον μηχανισμό όξινης κατάλυσης. Η διαφορά των δύο αυτών μηχανισμών έγκειται στο γεγονός ότι στην περίπτωση της αναστροφής, η υδρόλυση πραγματοποιείται σε ένα στάδιο. Αντίθετα στην περίπτωση της διατήρησης, απαιτούνται δύο στάδια στα οποία συμπεριλαμβάνεται ο σχηματισμός ενός παροδικού συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος [25]. Συγκεκριμένα, η μία καρβοξυλική ομάδα τοποθετείται σε απόσταση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου από το οξυγόνο, λειτουργώντας σαν δότης πρωτονίων. Η άλλη ομάδα λειτουργεί σαν πυρηνόφιλο αντιδραστήριο ή βάση. Στην περίπτωση των ενζύμων τα οποία διατηρούν την διαμόρφωση, η βάση βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με τον ανωμερικό άνθρακα. Στην άλλη περίπτωση η απόσταση είναι μεγαλύτερη οπότε ανάμεσα στον άνθρακα και την βάση φιλοξενείται ένα μόριο νερού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα στην πρώτη περίπτωση η απόσταση ανάμεσα στις δύο καρβοξυλικές ομάδες να είναι 5.5 Å ενώ στην δεύτερη περίπτωση να είναι 10 Å [26].



Εικόνα 5: Μηχανισμός υδρόλυσης κυτταρινασών. Με A συμβολίζεται το οξύ ενώ με B η βάση. Στην πρώτη περίπτωση παρουσιάζεται ο μηχανισμός διατήρησης της δομής του ανωμερικού άνθρακα ενώ στην δεύτερη ο μηχανισμός της αναστροφής [27]

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των κυτταρινασών το οποίο επηρεάζει την καταλυτική δράση είναι το είδος και ο βαθμός συνέργειας ανάμεσα στα διαφορετικά ένζυμα. Ο όρος «συνέργεια» αναφέρεται στην ιδιότητα μέσω της οποίας η ενεργότητα ενός συστήματος κυτταρινασών είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα της ενεργότητας του κάθε ενζύμου ξεχωριστά. Συνεπώς, η αύξηση του βαθμού συνέργειας πρέπει να αποτελεί στόχο σε κάθε σύστημα κυτταρινασών. Στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά σε τεσσάρων ειδών συνέργειες [16]:

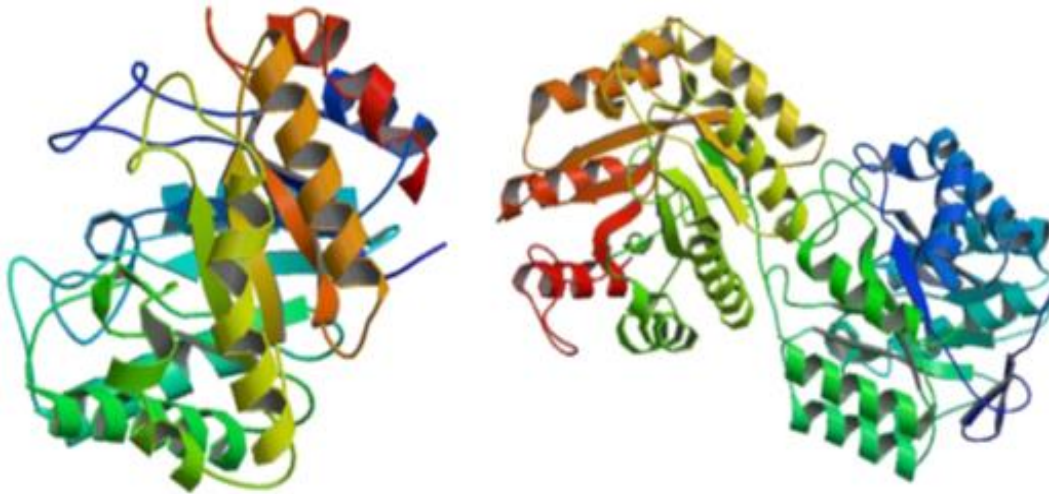
- ένδο-έξω: ανάμεσα στις ενδογλουκανάσες και τις εξωγλουκανάσες
- έξω-έξω: ανάμεσα σε εξωγλουκανάσες οι οποίες προσδέονται στα αναγωγικά άκρα και εξωγλουκανάσες οι οποίες προσδέονται στα μη αναγωγικά άκρα
- εξωγλουκανασών – β-γλυκοσιδασών: με αποτέλεσμα την διάσπαση της κελλοβιόζης
- ενδομοριακή συνέργεια ανάμεσα στο καταλυτικό κέντρο και μια επικράτεια πρόσδεσης σε κυτταρίνη η οποία θα περιγραφεί παρακάτω.

Ο βαθμός συνέργειας ανάμεσα στις ενδογλουκανάσες και τις εξωγλουκανάσες έχει μελετηθεί ιδιαίτερα αφού είναι ο πιο σημαντικός για την αποικοδόμηση της κυτταρινούχου βιομάζας. Ο βασικότερος παράγοντας αύξησης αυτού του είδους συνέργειας είναι η αύξηση του βαθμού πολυμερισμού του υποστρώματος και ύστερα η αύξηση των προσβάσιμων δεσμών [28]. Ωστόσο αυτοί οι παράγοντες δεν αυξάνουν απαραίτητα την απόδοση της κατάλυσης καθώς όπως έχει αναφερθεί αύξηση του βαθμού πολυμερισμού μειώνει την διαλυτότητα άρα και την πρόσβαση των ενζύμων στο υπόστρωμα. Παρόλα αυτά ο βαθμός συνέργειας αυξάνεται και με αύξηση της συνολικής ποσότητας του ενζύμου αλλά και με αύξηση του χρόνου αντίδρασης έχοντας σαν όριο τον κορεσμό του υποστρώματος [29].

1.4.2 Δομή Κυτταρινασών

Οι κυτταρινάσες αποτελούνται συνήθως από δύο βασικές δομές: το ενεργό κέντρο και μια περιοχή πρόσδεσης σε κυτταρίνη (carboxy binding module ή CBM) η οποία δεν έχει καταλυτική δράση αλλά βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο και το φέρνει σε επαφή με το υπόστρωμα. Το ενεργό κέντρο συνδέεται με το CBM μέσω ενός πεπτιδίου σύνδεσης. Υπάρχουν και άλλες δομές με γνωστές ή και άγνωστες δράσεις οι οποίες βρίσκονται στο N ή C τελικό άκρο της πρωτεΐνης αλλά δεν αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό για την κατάλυση. Ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται, μπορεί να περιέχονται στην πρωτεΐνη περισσότερα CBMs ή ακόμα και ενεργά κέντρα.

Λόγω των πολλών διαφορετικών οικογενειών στις οποίες κατατάσσονται, οι κυτταρινάσες παρουσιάζονται με πολλές διαφορετικές δομές. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν οι διαφορές ανάμεσα στις ένδο και έξω – γλουκανάσες οι οποίες υδρολύουν τον ίδιο δεσμό αλλά και οι διαφορές που παρουσιάζονται στις κυτταρινάσες ανάλογα με την βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας. Όσο αφορά τις ένδο και έξω γλουκανάσες, η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος ορίζεται από βρόγχους. Στις έξω-γλουκανάσες οι βρόγχοι αυτοί σχηματίζουν ένα κλειστό τούνελ μέσα στο οποίο παγιδεύεται το υπόστρωμα και καταλήγει τελικά στο ενεργό κέντρο. Οι ένδο-γλουκανάσες από την άλλη διαθέτουν μικρότερους βρόγχους οι οποίοι αφήνουν μεγαλύτερα κενά για να είναι δυνατή η πρόσδεση της μη επεξεργασμένης κυτταρίνης. Όσο αφορά την εξάρτηση από την θερμοκρασία οι ψυχρόφιλες κυτταρινάσες διαφέρουν από τις μεσόφιλες [23] στο ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευκινησία λόγω λιγότερων ή ασθενέστερων ενδομοριακών δεσμών, έχουν αυξημένα επίπεδα συμπλεγμάτων γλυκίνης και λιγότερα κατάλοιπα αργινίνης /προλίνης. Επιπλέον οι ψυχρόφιλες διαθέτουν μεγαλύτερους βρόγχους, λιγότερα υδρόφοβα κατάλοιπα και τέλος ευκολότερη πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Τα αντίθετα χαρακτηριστικά συναντώνται στις θερμόφιλες κυτταρινάσες. Διαθέτουν ένα πιο υδρόφοβο πρωτεϊνικό πυρήνα πολύ πιο συμπαγή δομή και λιγότερους βρόγχους. Επίσης άλλα χαρακτηριστικά αποτελούν οι αυξημένοι δεσμοί υδρογόνου, η χαμηλή ελεύθερη επιφάνεια και το υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο.



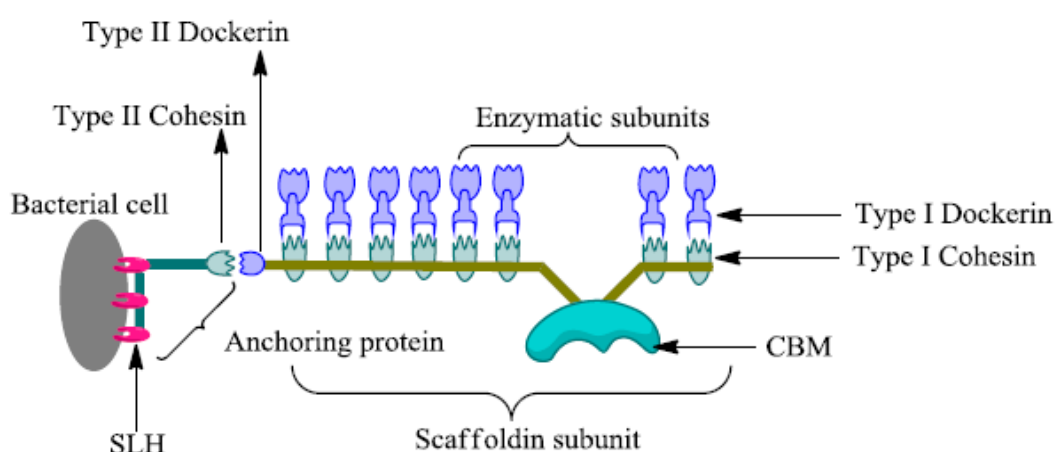
Εικόνα 6: Κρυσταλλική δομή δύο ένδο-γλουκανασών. Η πρώτη είναι μεσόφιλη από τον μύκητα *T. aurantiacus* και η δεύτερη ψυχρόφιλη από τον *P. haloplanktis*. Είναι εμφανής η χαλαρή δομή της ψυχρόφιλης ενδο-γλουκανάσης σε σχέση με την μεσόφιλη [23]

Οι κυτταρινάσες σύμφωνα με την βάση δεδομένων CAZy (<http://www.cazy.org>) ανήκουν στις γλυκοζιδάσες, υποκατηγορία των υδρολασών. Ανάλογα με την πρωτοταγή δομή τους και κρυσταλλογραφικά δεδομένα, οι ένδο-γλουκανάσες ανήκουν στις οικογένειες 5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 και 128. Οι έξω-γλουκανάσες ανήκουν στις οικογένειες 5-7 και 28 και τέλος οι β-γλυκοζιδάσες ανήκουν στις οικογένειες 1, 3, 4, 17, 30 και 116.

1.4.3 Διαφορές κυτταρινολυτικών συστημάτων

Οι μικροοργανισμοί προκειμένου να διασπάσουν την κυτταρίνη, πρέπει να παράγουν κυτταρινάσες εξωκυτταρικά καθώς η απορρόφηση της ενδοκυτταρικά είναι αδύνατη λόγω μη διαλυτότητας. Έτσι κάποια αερόβια βακτήρια και νηματοειδείς μύκητες διεισδύουν στη δομή της κυτταρίνης μέσω σχηματισμού υφών και εκκρίνουν τις κυτταρινάσες μέσα σε κοιλότητες [16, 30]. Τα αναερόβια βακτήρια από την άλλη καθώς και ορισμένοι μύκητες μην μπορώντας να εισχωρήσουν στην κυτταρίνη σχημάτισαν δομές γνώστες ως κυτταρινοσώματα (cellulosomes) τα οποία είναι ισχυρά προσδεδεμένα στο κυτταρικό τους τοίχωμα.

Το κυτταρινόσωμα αποτελείται από μια μη καταλυτική υπομονάδα υποστήριξης, την πρωτεΐνη - ικρίωμα (scaffoldin) ενώ πάνω σε αυτή βρίσκεται προσδεμένος ένας αριθμός υδρολασών. Για να προσδεθούν τα ένζυμα πάνω στον βασικό κορμό της πρωτεΐνης - ικρίωματος πρέπει να διαθέτουν μια ειδική περιοχή την «ντοκερίνη» (dockerin) η οποία προσδέεται σε ειδικές θέσεις στην πρωτεΐνη-ικρίωμα οι οποίες ονομάζονται «κοχεσίνες» (cohesins) [25]. Κάθε «κοχεσίνη» είναι εκλεκτική για κάθε «ντοκερίνη». Η συνύπαρξη των ενζύμων στο κυτταρινόσωμα αυξάνει την συνεργατική δράση των ενζύμων ενώ παράλληλα μειώνει την ανταγωνιστικότητα για μια θέση υποστρώματος κάτι το οποίο θα μείωνε την απόδοση [13].



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση κυτταρινοσώματος [23]

1.5 Ετερόλογη έκφραση κυτταρινασών

Η ετερόλογη έκφραση αποτελεί την βασική μέθοδο για την υπερπαραγωγή κυτταρινασών, με κάθε οργανισμό-φορέα να έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Για την παραγωγή τέτοιων ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί βακτήρια, μύκητες, ακόμη και φυτά. Για την χρήση κάποιου οργανισμού για αυτό το σκοπό πρέπει να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Αρχικά πρέπει να είναι σε θέση να παράγουν υψηλής ποιότητας ενεργές κυτταρινάσες. Επίσης, για την

υδρόλυση των μη διαλυτών υποστρωμάτων, οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι σε θέση να εκκρίνουν ή να φέρουν εξωκυτταρικά τις παραγόμενες πρωτεΐνες. Τέλος, στην προσπάθεια εφαρμογής ενοποιημένων βιοδιεργασιών (consolidated bioprocessing, CBP) για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι σημαντικό να παράγονται διαφορετικές κυτταρινάσες από τον ίδιο οργανισμό ενώ παράλληλα αυτός να είναι σε θέση να μπορεί να ρυθμίζει την παραγωγή τους ώστε να εξασφαλιστεί μέγιστη συνέργεια μεταξύ τους [29]. Με τον όρο ενοποιημένες βιοδιεργασίες περιγράφεται η προσπάθεια οι διεργασίες παραγωγής κυτταρινασών, υδρόλυσης της κυτταρίνης και ζύμωσης των πεντοζών και εξοζών να πραγματοποιηθούν σε ένα μόνο στάδιο. Μέχρι τώρα κανένας οργανισμός δεν έχει καταφέρει να χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες διεργασίες [29].

1.5.1 Βακτήρια

Το *E. coli* αποτελεί ιδανικό σύστημα έκφρασης καθώς αναπτύσσεται ταχέα σε φθηνά θρεπτικά υλικά ενώ εφαρμόζονται εύκολες τεχνικές για τον μετασχηματισμό του αλλά και την απομόνωση πρωτεϊνών από αυτό. Παρόλα αυτά εμφανίζει δυσκολίες λόγω ύπαρξης σπάνιων κωδικονίων αλλά και έλλειψης ορισμένων μετα-μεταφραστικών λειτουργιών στο κυτταρόπλασμα αυτού όπως ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μέσω των οποίων σταθεροποιούνται πολλές θερμοανθεκτικές και μη πρωτεΐνες [31].

Η έκφραση σε είδη *λακτοβάκιλων* και στον *Bacillus subtilis* έχει αυξημένη απόδοση λόγω διαφορών σε μέτα-μεταφραστικό επίπεδο. Το *Z. mobilis* είναι ένα αναερόβιο βακτήριο το οποίο έχει την δυνατότητα να ζυμώνει μεγάλο εύρος σακχάρων προς αιθανόλη. Η ανθεκτικότητα του στην αιθανόλη, η αυξημένη απόδοση (12-30 φορές) σε σχέση με το *E. coli* στην παραγωγή πρωτεϊνών αλλά και ιδιότητα του να εκκρίνει κυτταρινάσες και ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά καθιστούν το συγκεκριμένο βακτήριο μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική τόσο σε σχέση με τα άλλα βακτήρια όσο και με τις ζύμες [32, 33]. Επιπλέον εφαρμογή βρίσκουν και τα βακτήρια *Pseudomonas cellulosa* και *Streptomyces lividans* [23].

1.5.2 Ζυμομύκητες

Οι ζύμες αποτελούν ένα σημαντικό σύστημα για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών καθώς διαθέτουν ευκαρυωτικό μέτα-μεταφραστικό σύστημα για την σωστή έκφραση των πρωτεϊνών, μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις και μπορούν να εκκρίνουν τις πρωτεΐνες. Επίσης δεν διαθέτουν τοξίνες και ανήκουν στην κατηγορία GRAS (Generally Regarded as Safe) του FDA (U.S. Food and Drug Administration) αποτέλεσε τα προϊόντα τους να γίνονται πιο εύκολα δεκτά σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς, από την βιομηχανία τροφίμων [31]. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες ζύμες είναι τα είδη: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* και *Yarrowia lipolytica*. Η χρήση του *S. cerevisiae* ήταν η πιο συνηθισμένη αλλά μειώθηκε λόγω μειωμένης απόδοσης με πλασμιδιακό DNA, υπεργλυκοζυλίωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και μειωμένη ταχύτητα ανάπτυξης.

1.5.3 Νηματοειδείς μύκητες

Κύριο πλεονέκτημα τους αποτελεί η δυνατότητα έκκρισης μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών αλλά παρόλα αυτά υστερούν στις υπόλοιπες δυνατότητες. Παρόλα αυτά έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές προσπάθειες βελτιστοποίησης αυτών των συστημάτων. Κύρια είδη για ετερόλογη έκφραση είναι: *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *T. reesei*, *Penicillium chrysogenum* και *Rhizopus oryzae* [23].

Χαρακτηριστικά	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. thermocellum</i>	<i>B. subtilis</i>
Κατάλυση πεντοζών	-/+	+++	-	+++
Κατάλυση ολιγοσακχαριτών	-	-/+	+++	+++
Ικανότητα έκκρισης πρωτεϊνών	+	-/+	+++	+++
Ευκολία γενετικών τροποποιήσεων	+++	+++	-/+	++
Κόστος μέσων ανάπτυξης	++	-	++	+++
Αντίσταση σε αναστολή από το προϊόν	+++	-	-/+	+++
Αντίσταση σε άλατα/τοξικές ουσίες	+	-	-	+++
Αξία κυτταρικών κατάλοιπων	++	-	-	+++
Ρυθμός ανάπτυξης	++	+++	+	+++
Αναερόβια ζύμωση	+++	++	+++	+
Θερμοκρασία καλλιέργειας	~30 °C	~37 °C	~60 °C	~30-45 °C

Πίνακας 1: Σύγκριση βασικών χαρακτηριστικών συνήθων συστημάτων έκφρασης [29]

1.6 Εφαρμογές κυτταρινασών

Οι κυτταρινάσες βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών στην βιομηχανία. Η συνεχής εξελίξεις στην έρευνα γύρω από τις κυτταρινάσες έδωσαν και συνεχίζουν να δίνουν ενζυμικά προϊόντα με όλο και καλύτερες ιδιότητες. Σαν αποτέλεσμα οι κυτταρινάσες βρίσκουν εφαρμογή από την παραγωγή βιοαιθανόλης μέχρι την επεξεργασία τροφίμων.

Βασικός τομέας χρήσης των κυτταρινασών στον οποίο είναι και στραμμένη η έρευνα, αποτελεί η υδρόλυση της λιγνιτοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή αιθανόλης. Η διαδικασία αυτή αποτελείται από πολλά στάδια όπως προκατεργασία (μηχανική, χημική, βιολογική) και υδρόλυση του υλικού προς ζυμώσιμα σάκχαρα. Οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται σε όλα αυτά τα στάδια αλλά απαιτείται περαιτέρω εξέλιξη τους προς την αύξηση της απόδοσης της διαδικασίας καθώς λόγω των ιδιοτήτων του υποστρώματος η δράση τους παρεμποδίζεται ισχυρά [34].

Επίσης, οι κυτταρινάσες βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον τομέα της υφαντουργίας. Χρησιμοποιούνται για το πετροπλύσιμο των υφασμάτων τύπου «τζίν» [34] και τα προϊόντα κυτταρινασών πλούσια σε ενδο-γλουκανάσες χρησιμοποιούνται για το στίλβωμα των υφασμάτων και ενίσχυση των χρωμάτων καθώς λειαίνουν τις ίνες αφαιρώντας τα χνούδια, δημιουργώντας έτσι μια βελτιωμένη επιφάνεια [35].

Όσο αφορά τον τομέα των τροφίμων οι κυτταρινάσες σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα όπως ξυλανάσες και πηκτινάσες χρησιμοποιούνται για την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης των χυμών των φρούτων σε χυμοποιεία, οινοποιεία αλλά και ελαιοτριβεία. Οι β-γλυκοζιδάσες πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών για αύξηση του αρωματικού χαρακτήρα του χυμού του κάθε φρούτου ή και σε συνδυασμό με πηκτινάσες για μείωση της πικρής γεύσης των λαχανικών και των φρούτων [36]. Ιδιαίτερα στις βιομηχανίες παραγωγής κρασιού οι κυτταρινάσες βρίσκουν επιπλέον χρήσεις. Κατά την οινοποίηση ερυθρών ποικιλιών η ενζυμική υδρόλυση των μεμβρανών των ραγών, οδηγεί σε αυξημένη διάχυση ανθοκυανών από τους φλοιούς προς το γλεύκος. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η ένταση του χρώματος στο τελικό προϊόν. Επιπλέον, η επεξεργασία με κυτταρινάσες διευκολύνει την επεξεργασία των στέμφυλων καθώς είναι δυνατή η χρήση ηπιότερων πιέσεων στα πιεστήρια ενώ σε συνδυασμό με πηκτινάσες διευκολύνεται η διαύγαση [37]. Σε βιομηχανίες οι οποίες χρησιμοποιούν πολτούς φρούτων ή σε ζυθοποιείες, η χρήση κυτταρινασών συμβάλει στην μείωση του ιξώδους των πολτών ή του χυλού της βύνης αντίστοιχα, ώστε να βελτιώνονται οι συνθήκες ροής [38].

Άλλες εφαρμογές είναι η εξαγωγή καροτενοειδών ώστε να παραχθούν φυσικές χρωστικές, η επεξεργασία ζωικών τροφών, η επεξεργασία του εδάφους για

ενίσχυση της αποικοδόμησης της κυτταρίνης με συνέπεια την λίπανση του εδάφους και τέλος η χρήση αλκαλικών κυτταρινασών στην παραγωγή απορρυπαντικών [34].

1.7 *Escherichia coli* σαν σύστημα έκφρασης

Το *E. coli* αποτελεί το πιο μελετημένο σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Η δυνατότητα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι μειωμένη, οπότε στην περίπτωση κατά την οποία αυτές δεν είναι απαραίτητες, το *E. coli* αποτελεί τον συχνότερα χρησιμοποιούμενο οργανισμό ετερόλογης έκφρασης.

Εκτός από την σχεδόν πλήρη γνώση των χαρακτηριστικών του, σημαντικά πλεονεκτήματα αποτελούν η μεγάλη διαθεσιμότητα γενετικών συστημάτων, οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις και τα φθηνά θρεπτικά υλικά [39].

Παρόλα αυτά το *E. coli* έχει σοβαρά μειονεκτήματα. Εκτός της αδυναμίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που αναφέρθηκε παραπάνω, βασικό μειονέκτημα αποτελεί και η αδυναμία έκκρισης των πρωτεϊνών [39]. Αυξημένα επίπεδα μιας ετερόλογης πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένα επίπεδα λειτουργικής διαλυτής πρωτεΐνης είτε λόγω πρωτεολυτικής αποδόμησης είτε λόγω σχηματισμού αδιάλυτων δομών γνωστών ως «πρωτεϊνικά έγκλειστα» (inclusion bodies) [40]. Όσο αφορά την πρωτεολυτική αποδόμηση, αυτή οφείλεται στο ότι αυξημένη ποσότητα ξένης ως προς το κύτταρο πρωτεΐνης οδηγεί σε απόκριση θερμικού σοκ. Τα πρωτεϊνικά έγκλειστα από την άλλη οφείλονται σε εσφαλμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα των σχηματισμό αυτών των δομών που συνήθως δεν εμφανίζουν βιολογική αξία [40], αν και με επαναδιάλυση του πρωτεϊνικού εγκλείστου, η δράση της πρωτεΐνης ενδέχεται να αποκατασταθεί. Ωστόσο η διαδικασία της επαναδιάλυσης μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη. Για επίλυση των προβλημάτων αυτών αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές όπως προσθήκη στην πρωτεΐνη ενός σήματος αλληλουχίας, με

χρήση πρωτεϊνών- μεταφορέων, χρήση κυττάρων με μεταλλαγμένη εξωτερική μεμβράνη και περίβλημα γενικότερα και τέλος έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες καταστρέφουν την εξωτερική μεμβράνη [39].

1.7.1 Επιλογή και σχεδιασμός πλασμιδίων

Η επιλογή και ο σχεδιασμός πλασμιδιακών φορέων οι οποίοι θα εισαχθούν σε επιλεγμένα κύτταρα-ξενιστές, πρέπει να πραγματοποιείται δίδοντας προσοχή σε συγκεκριμένα στοιχεία. Αυτά πρέπει να είναι ο αριθμός αντιγράφων του πλασμιδίου, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου-στόχου και η φύση του παραγόμενου προϊόντος [40]. Επίσης, ένα πλασμίδιο πολλές φορές θα πρέπει να φέρει παράγοντες εκλεκτικότητας (όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά) μέσω των οποίων θα είναι εφικτή η επιλογή των κυττάρων στα οποία περιέχεται. Τέλος σε περιπτώσεις εισαγωγής πολλαπλών πλασμιδίων πρέπει να χρησιμοποιηθούν περισσότεροι παράγοντες εκλεκτικότητας ενώ θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ασυμβατότητα ύπαρξης κάποιων πλασμιδίων στο ίδιο κύτταρο [41].

Κατά την ετερόλογη έκφραση γονιδίων για την παραγωγή πρωτεϊνών-στόχων είναι επιθυμητή η κατά το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται πλασμίδια με μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Έτσι κατά την αναπαραγωγή των κυττάρων σε μια καλλιέργεια μειώνονται οι πιθανότητες παραγωγής κυττάρων ελευθέρων πλασμιδίου.

Επιπλέον, πολύ σημαντικό στοιχείο του πλασμιδίου αποτελεί ο υποκινητής, ο οποίος θα πρέπει να είναι ισχυρός ώστε να επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα έκφρασης αλλά ταυτόχρονα να ρυθμίζεται και εντός στενών πλαισίων. Σε περιπτώσεις έκφρασης τοξικών για το κύτταρο πρωτεϊνών, θα πρέπει το βασικό (μη επαγόμενο) επίπεδο πρωτεϊνικής παραγωγής να είναι χαμηλό [42]. Δύο ειδών υποκινητές χρησιμοποιούνται κυρίως: οι θερμικοί και οι χημικοί [41]. Οι θερμικοί παρουσιάζουν τα μειονεκτήματα της θερμικής υστέρησης και εμφάνισης θερμικού σοκ σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ οι χημικοί του πιθανού κόστους των επαγωγέων τους.

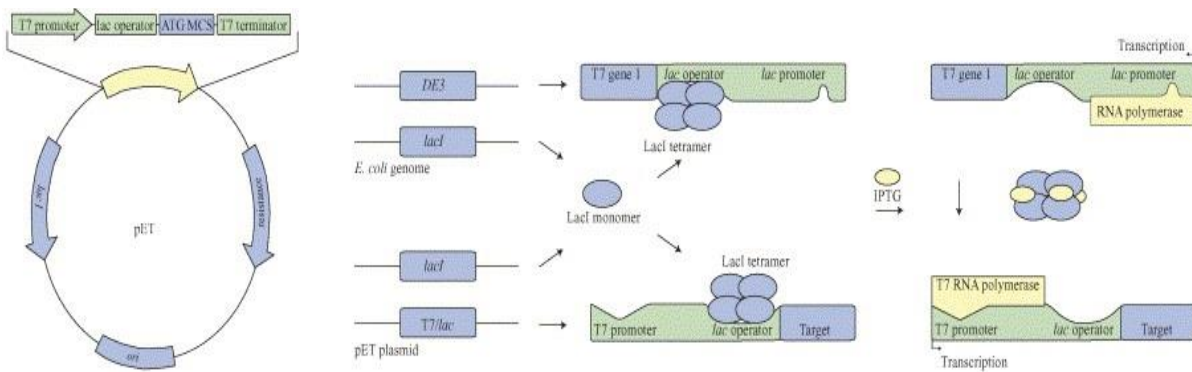
Τα περισσότερα πλασμίδια φέρουν γονίδια τα οποία λειτουργούν ως παράγοντες επιλογής και είτε προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά είτε εκφράζουν αυξότροφους παράγοντες. Με αυτόν τον τρόπο σε μια καλλιέργεια επιβιώνουν μόνο οι επιθυμητοί συνδυασμοί φορέων-ξενιστών. Παρόλα αυτά και οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι ακόμα και αν χάσει ένα κύτταρο το πλασμίδιο, υπάρχει αρκετό γονιδιακό προϊόν για να εξασφαλιστεί η αντίσταση στον παράγοντα επιλογής [40]. Επιπλέον σε μεγάλου όγκου καλλιέργειες τα κύτταρα τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο μπορούν να προστατέψουν τα ελεύθερα πλασμιδίου κύτταρα από τον παράγοντα επιλογής. Για αυτό τον λόγο έχουν αναπτυχθεί επιπλέον τεχνικές οι οποίες οδηγούν σε θανάτωση του κυττάρου όταν αυτό χάσει το πλασμίδιο [43].

Εκτός των παραπάνω, πολλές φορές χρησιμοποιούνται αλληλουχίες οι οποίες ενισχύουν την αντιγραφή (όπως το Downstream Box), σταθεροποιούν το mRNA (*ompA* στο *E. coli*) καθώς και ισχυρά κωδικόνια τερματισμού ώστε να απελευθερωθεί η RNA πολυμεράση κατά την χρήση ισχυρών υποκινητών [42]. Ανάλογα με την φύση της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι δυνατή η χρήση γονιδίων για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης ή άλλης δομής η οποία προσκολλάται στην πρωτεΐνη στόχο και βοηθά στην τελική ανάκτηση της [43]. Τέλος αν η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι τοξική για το κύτταρο χρησιμοποιούνται σηματοδοτικές αλληλουχίες για την έκκριση της εκτός του κυτταροπλάσματος [43].

1.7.2 Πλασμίδια pET

Οι φορείς έκφρασης pET αποτελούν τους πιο κοινούς φορείς έκφρασης στο *E. coli*. Περισσότερα από 40 διαφορετικά πλασμίδια είναι διαθέσιμα έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε επαγωγείς, θέσεις περιορισμού για την εισαγωγή διαφορετικών γονιδίων, καθώς και μιας ποικιλίας γονιδίων για διαφορετικές χρήσεις (όπως αντίσταση σε αντιβιοτικά).

Η έκφραση βασίζεται στην χρήση τροποποιημένων κυττάρων (DE3) τα οποία κωδικοποιούν την T7 RNA πολυμεράση η οποία ρυθμίζεται από τον T7 προαγωγό μέσω του επαγωγέα Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ο οποίος αποτελεί ανάλογο της λακτόζης [41]. Πιο συγκεκριμένα, στα συνήθη συστήματα, τόσο στο κύτταρο όσο και στο πλασμίδιο βρίσκεται ο αναστολέας *lacI*, ο οποίος απουσία επαγωγέα σχηματίζει τετραμερή τα οποία αναστέλλουν την λειτουργία του χειριστή *lac*. Κατά την προσθήκη του επαγωγέα IPTG, αυτός προσδένεται στο τετραμερές και ξεκινάει η μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης.



Εικόνα 8: Λειτουργία συστήματος έκφρασης pET [33]

Το βασικό επίπεδο πρωτεϊνικής παραγωγής μηδενίζεται με την προσθήκη της T7 λυσοζύμης η οποία είναι αναστολέας της T7 RNA πολυμεράσης. Για την έκφραση της T7 λυσοζύμης εισάγεται στο κύτταρο το πλασμίδιο *plysS* ή το πλασμίδιο *plysE* τα οποία κωδικοποιούν την παραγωγή της T7 λυσοζύμης [41].

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος

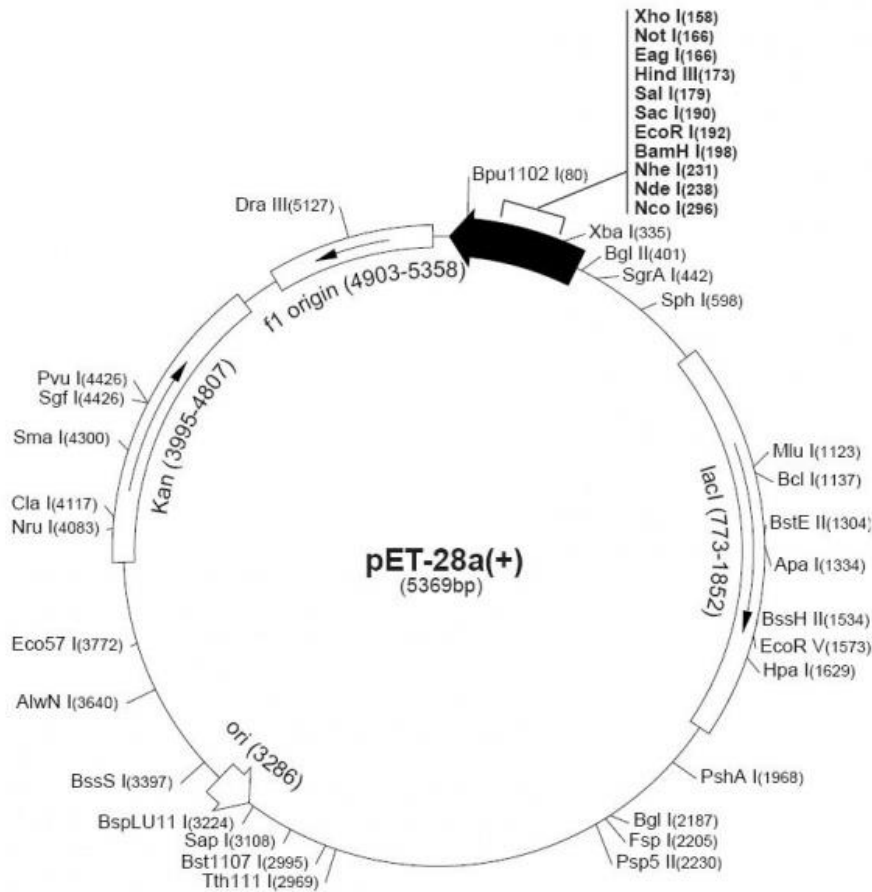
2.1 Όργανα – Συσκευές

- Επωαστήρας GFL 3033
- Φυγόκεντρος Kubota 7780
- Μικροφυγόκεντρος Eppendorf Mini Spin
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Biorad Micropulser
- Συσκευή απεικονίσεων UVP Chemidoc – It² Imager
- Κλίβανος αποστείρωσης Raypa AES steam sterilizer
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Biorad Mini PROTEANS System
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη Thermoscientific Owl HEP με παροχή από Consort EV231 Electrophoresis power supply
- Θερμοκυκλοποιητής MS Research PTC – 200 (Peltier Thermal Cycler)
- Συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας UVP UV Transilluminator
- Συσκευή ανάδευσης FINE PCR Compact Rocker CR300t
- pH – μετρο MeterLab PHM201 portable pH meter
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Millipore Milli-Q plus
- Στήλες αφαλάτωσης PD-10 της GE Healthcare
- Φωτόμετρο με χρήση κυψελίδας Hitachi UV 2000
- Φωτόμετρο συμβατό με 69-well plates, Tecan Safire² με λογισμικό Maggellan v6.00

2.2 Πλασμιδιακοί Φορείς

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pET-28a(+) (Novagen). Ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει γονιδιακή κασέτα που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη που χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό επιλογής. Το πλασμίδιο περιέχει επίσης το γονίδιο *lacI* μέρος του γονιδίου *lac* και έναν T7 υποκινητή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το *lacI* αναστέλλει την μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης, οπότε ο υποκινητής δεν λειτουργεί και δεν εκφράζεται το

γονίδιο στόχος. Όταν προστίθεται Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside (IPTG), το οποίο λειτουργεί ως ανάλογο της λακτόζης, προσδένεται στον αναστολέα *lacI* και επιτρέπει την παραγωγή της T7 RNA πολυμεράσης, άρα και την παραγωγή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 9: Χάρτης πλασμιδίου pET-28a(+)

2.3 Κύτταρα

- BL21 (DE3): Χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση της πρωτεΐνης στόχου καθώς κωδικοποιούν την T7 RNA πολυμεράση
- NEB 10 beta: Χρησιμοποιήθηκαν όταν απαιτήθηκε υψηλή απόδοση κατά τον μετασχηματισμό. Επίσης δεν περιέχουν το γονίδιο *endA+* το οποίο κωδικοποιεί ένδονουκλεάσες και για αυτό τον λόγο προτιμώνται ως στελέχη αποθήκευσης πλασμιδίων.

2.4 Θρεπτικά Υλικά – Ρυθμιστικά Διαλύματα

- Θρεπτικό Υλικό (LB): 10g/L τρυπτόνη, 10g/L NaCl, 5g/L εκχύλισμα ζύμης και απιονισμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Για παρασκευή στερεού θρεπτικού προστίθενται και 15g/L άγαρ.
- Διάλυμα χρώσης Coomasie: 50% μεθανόλη, 40% ακετόνη και $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/mL Coomasie Brilliant Blue R-250
- Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής μετά από χρώση με Coomasie (Destain): 50% μεθανόλη, 40% H₂O και 10% ακετόνη
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Running Buffer): 15,1g Tris – Base, 94g γλυκίνη και προσθήκη νερού μέχρι τα 950ml. Τέλος, προστίθενται και 50ml διαλύματος SDS 10% w/v. Το διάλυμα που προκύπτει είναι 5 φορές πιο πυκνό από την επιθυμητή συγκέντρωση του τελικού διαλύματος οπότε πριν την χρήση απαιτείται αραιώση 1:5.
- Ρυθμιστικό διάλυμα για την μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη (Transfer Buffer): 0,025M Tris Base και 0,192M γλυκίνη αραιώνονται 1/10. Για την παρασκευή του τελικού ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιούνται 100ml/L από τα παραχθέν διάλυμα, 200ml/L μεθανόλη και 700ml/L απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου(6x): Στα 10ml προστίθενται 3ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 1mg μπλε της βρωμοθυμόλης, 1,5ml γλυκερόλη, 0,6g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 100μL β-μερκαπτοαιθανόλη και προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τον τελικό όγκο
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (loading buffer): Στα 10ml προστίθενται 3ml γλυκερόλη 30%, 25mg μπλε της βρωμοθυμόλης και απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.
- Διαλύματα καθαρισμού NPI: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl και ανάλογα με την συγκέντρωση ιμιδαζόλης το διάλυμα χαρακτηρίζεται ως NPI-10 για 10mM ιμιδαζόλης, NPI-20 για 20mM ιμιδαζόλης NPI-200 για 200mM ιμιδαζόλης κτλ. Το pH όλων των διαλυμάτων ρυθμίζεται στο 8.

2.5 Επαγωγείς - Αντιβιοτικά-Αντισώματα

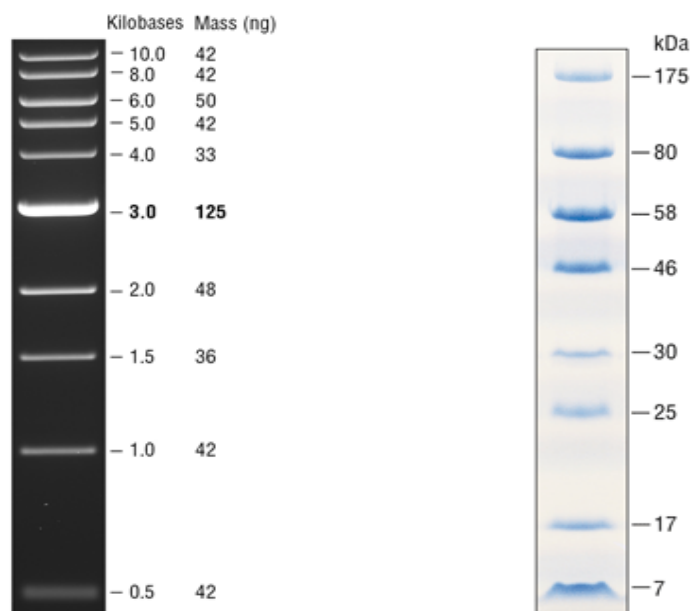
- Χρησιμοποιήθηκε ο επαγωγέας Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside (IPTG)
- Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν καναμικίνη τελικής συγκέντρωσης 50 µg/mL
- Το αντίσωμα ήταν Anti-His, συγκέντρωσης 1/6000 με συζευγμένη υπεροξειδάση χρένου (HRP conjugated)

2.6 Διαλύματα Πρότυπων Πρωτεϊνών - DNA

Για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) της New England Biolabs Inc.

Λόγω ότι το μοριακό βάρος της CelDZ1a είναι 43 kDa η πρωτεΐνη αναμένεται να εμφανίζεται λίγο πιο κάτω από τη ζώνη των 46 kDa.

Για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα πρότυπων βάσεων DNA 1 Kb DNA Ladder της New England Biolabs Inc.



Εικόνα 10: Πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών και βάσεων DNA. Η πρώτη εικόνα από αριστερά, παρουσιάζει το χρησιμοποιηθέν πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών και δεξιά παρουσιάζεται το χρησιμοποιηθέν πρότυπο διάλυμα βάσεων DNA

2.7 Μοριακές Τεχνικές

2.7.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλωτή και με τελικό όγκο 50μl. Οι εκκινητές είχαν σχεδιαστεί για την επιλογή των γονιδίων *celDZ1a* και *celDZ1* και περιείχαν θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα XbaI και XhoI. Επίσης, στον εμπρόσθιο εκκινητή είχε προστεθεί ένας ιχνηθέτης έξι ιστιδίων (His-tag) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στις τεχνικές καθαρισμού όσο και στην ανίχνευση της πρωτεΐνης μέσω Western blotting όπως θα περιγραφεί αργότερα. Οι ποσότητες των αντιδρώντων ήταν οι εξής:

5x Q5 Reaction Buffer (μl)	10
dNTPs, 10 μM (μl)	1
Q5 υψηλής πιστότητας πολυμεράση (μl)	0.5
DNA εκμαγείο (CelDZ1) (μl)	1
Υπερκαθαρό νερό (μl)	32.5
Εμπρόσθιος Εκκινητής, 10μM (μl)	2.5
Ανάστροφος Εκκινητής, 10μM (μl)	2.5

Πίνακας 2: Υλικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης όγκου 50μl.

Χρησιμοποιήθηκε Q5 πολυμεράση λόγω της δυνατότητας της για διορθωτική δράση (proofreading), ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα εισαγωγής μετάλλαξης κατά την αντιγραφή.

Στις διαγνωστικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί εάν οι κλώνοι που επιλέχθηκαν περιείχαν το γονίδιο στόχο, ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1μl κυτταρικής καλλιέργειας που προήλθε από τον εμβολιασμό αποικίας που προέκυψε μετά την αντίδραση συνένωσης μορίων DNA, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Επίσης, αντί της Q5 πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση αφού στη φάση αυτή δεν υπάρχει ανάγκη για ακρίβεια στην αντιγραφή.

2.7.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον έλεγχο αλλά και την απομόνωση των αλληλουχιών DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα το οποίο αποτελείται από 1% αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων και προστίθενται 5μl βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδες φως. Το διάλυμα μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου καθώς επανέρχεται στη θερμοκρασία δωματίου στερεοποιείται. Οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με ειδικό χτενάκι το οποίο εμβαπτίζεται στο υγρό διάλυμα και αφού το τελευταίο στερεοποιηθεί αφαιρείται. Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, οπότε σε 10μl δείγμα προστίθεται 5μl ρυθμιστικό διάλυμα και το τελικό διάλυμα μεταφέρεται σε μια από τις θέσεις φόρτωσης στην πηκτή. Για την εκτίμηση του μεγέθους των αλληλουχιών του DNA οι οποίες βρίσκονται στα δείγματα, φορτώνονται 5μl από πρότυπα δείγματα μορίων DNA (ladder). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V για περίπου 45min.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή μεταφέρεται πάνω σε λάμπα εκπομπής υπεριώδους φωτός μέσω της οποίας γίνονται εμφανή τα κομμάτια DNA τα οποία λήφθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης καθώς και το μέγεθός τους όταν αυτό συγκρίνεται με το πρότυπο δείγμα. Αν απαιτείται η απομόνωση μιας αλληλουχίας DNA, η οποία και εντοπίζεται σε μια φθορίζουσα ζώνη της πηκτής, είναι δυνατόν αυτή να απομονωθεί κόβοντας απλά με ένα ξυράφι την περιοχή στην οποία βρίσκεται.

2.7.3 Πέψεις DNA

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 40μl και τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέχθηκαν ήταν το XbaI και XhoI σε ρυθμιστικό διάλυμα NEB 2.1. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 30min το μείγμα παρασκευάστηκε ως εξής:

- 10μl DNA
- 1μl από κάθε περιοριστικό ένζυμο
- 4μl ρυθμιστικό διάλυμα (NEB 2.1)
- 24μl υπερκαθαρό νερό

2.7.4 Αντίδραση συνένωσης μορίων DNA (ligation)

Για την συνένωση διαφορετικών κομματιών DNA και συγκεκριμένα για την συνένωση των γονιδίων με τον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις τελικού όγκου 15μl. Για μέγιστη απόδοση ο μοριακός λόγος γονιδίου/φορέα πρέπει να είναι 3/1. Για να επιτευχθεί όμως αυτός ο λόγος απαιτεί γνώση της συγκέντρωσης DNA τόσο του γονιδίου όσο και του πλασμιδιακού φορέα. Χάρη συντομίας λοιπόν, πραγματοποιούνται τρεις αντιδράσεις με λόγους όγκων γονιδίου/φορέα 1/3, 1/1 και 3/1 με τις οποίες καλύπτονται ικανοποιητικά οι πιθανότητες ο μοριακός λόγος να προσεγγίζει το 3/1. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλωτή στους 16 °C για 4h και ύστερα για απενεργοποίηση της λιγάσης στους 60 °C για 10min. Χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση σε συνδυασμό με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο περιέχετε ATP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

γονίδιο/φορέας	1/1	3/1	1/3
Πλασμιδιακός φορέας (μl)	6	2	6
Γονίδιο (μl)	6	6	2
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (μl)	1,5	1,5	1,5
Λιγάση (μl)	0,6	0,6	0,6
Υπερκαθαρό νερό (μl)	0,9	4,9	4,9

Πίνακας 3: Υλικά και ποσότητες για κάθε αντίδραση συνένωσης μορίων DNA.

2.7.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Για τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκαν δύο ειδών διαδικασίες: α) ο μετασχηματισμός με θερμικό σοκ (heat shock transformation) β) η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation). Η ηλεκτροδιάτρηση ακολουθήθηκε για τον μετασχηματισμό των NEB 10 beta κυττάρων με τα μίγματα των αντιδράσεων συνένωσης (ligation mixes) λόγω καλύτερης απόδοσης. Το θερμικό σοκ λόγω της ευκολίας που παρουσιάζει χρησιμοποιήθηκε σε επόμενο στάδιο για τον μετασχηματισμό των κυττάρων BL21 (DE3) με το ήδη απομονωμένο πλασμίδιο.

Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ (heat shock transformation)

Χημικώς επιδεκτικά κύτταρα BL21 (DE3) μεταφέρονται στον πάγο για κάποια λεπτά. Σε κάθε 100μl κύτταρα προσθέτονται 1μl DNA, ανακατεύονται και αφήνονται στον πάγο για περίπου 10min. Το μείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 42 °C για 50sec και αμέσως μετά πάλι στον πάγο για 2min. Ύστερα προστίθεται 1ml LB και τοποθετείται στους 37 °C με συνεχή ανάδευση για 1h. Τέλος το μείγμα επιστρώνεται σε τρυβλία αγαρόζης τα οποία περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό LB και αντιβιοτικό επιλογής, στη συγκεκριμένη περίπτωση καναμικίνη, συγκέντρωσης 50μg/ml, όπου και επωάζονται στους 37°C προς το σχηματισμό αποικιών.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Επιλέγονται ηλεκτρο-επιδεκτικά κύτταρα NEB 10 beta, τα οποία μεταφέρονται σε πάγο. Σε ένα ψυγμένο δοχείο τύπου Eppendorf αναμιγνύονται 50μl κύτταρα με 1μl DNA, αναδεύονται ήπια και αφήνονται στον πάγο για 10-30min. Ύστερα, το μείγμα μεταφέρεται σε ψυγμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης όπου και πραγματοποιείται η ηλεκτροδιάτρηση στο προεπιλεγμένο πρόγραμμα για *E.Coli*. Αμέσως μετά προστίθενται 500μl LB. Το μείγμα μεταφέρεται σε αναδευόμενο επωαστήρα όπου και αφήνεται για 1h στους 37 °C και μετά επιστρώνεται σε τρυβλία αγαρόζης τα οποία περιέχουν καναμικίνη συγκέντρωσης 50 μg/ml ως αντιβιοτικό επιλογής και LB σαν θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία αφήνονται σε φούρνο θερμοκρασίας 37°C για περίπου 16 ώρες μέχρι να εμφανιστούν αποικίες.

2.8 Τεχνικές ανάλυσης Πρωτεϊνών

Για να διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη-στόχος παράγεται στο σωστό μοριακό βάρος αλλά και για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα παραγωγής και η καθαρότητα της ακολουθήθηκαν οι παρακάτω τεχνικές:

2.8.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η τεχνική αυτή χρησιμεύει στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, μπορεί να ελεγχθεί κατά πόσο μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη υπάρχει σε ένα διάλυμα, αλλά και πόσες άλλες πρωτεΐνες υπάρχουν σε αυτό το διάλυμα. Ταυτόχρονα είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης αν πραγματοποιηθεί σύγκριση με πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στηρίζεται σε δύο αρχές. Η πρώτη αναφέρεται στην ιδιότητα των πόρων της πηκτής να επιτρέπει πιο γρήγορα την διέλευση των πρωτεϊνών χαμηλότερου μοριακού βάρους. Η δεύτερη λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι δύο πρωτεΐνες μπορεί να έχουν ίδιο μοριακό βάρος, ωστόσο λόγω διαφορετικής τεταρτοταγούς δομής να διαπερνούν με διαφορετική ταχύτητα τους πόρους της πηκτής. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και επιστρέφει στην πρωτοταγή της δομή με προσθήκη απορρυπαντικού Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) στην πηκτή αλλά και με θέρμανση των δειγμάτων στους 100 °C με διάλυμα φόρτωσης που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη σαν αποδιατακτικούς παράγοντες. Το SDS έχει και άλλο σημαντικό ρόλο καθώς με την θέρμανση στους 100 °C προσδένεται ισχυρά στην πρωτεΐνη προσδίδοντας της αρνητικό φορτίο ώστε κατά την ηλεκτροφόρηση να κινηθεί προς τον θετικό πόλο.

Η πηκτή αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές με διαφορετική χρησιμότητα και σύσταση. Η πρώτη είναι η πηκτή επιστοίβασης η οποία φέρει τις διαφορετικές πρωτεΐνες στο ίδιο ύψος ώστε όταν εισέλθουν στην επόμενη πηκτή να βρίσκονται στην ίδια αφετηρία. Η άλλη πηκτή είναι η πηκτή διαχωρισμού μέσω της οποίας

πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Οι πηκτές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είχαν όλες συγκέντρωση 12% v/v σε πολυακρυλαμίδιο.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα πριν φορτωθούν στην πηκτή αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης και θερμαίνονται στους 100 °C για 10min.

Παρασκευή Πηκτής

	Πηκτή επιστοίβασης	Πηκτή διαχωρισμού
dH₂O (ml)	5,4	3,3
acrylamide – bisacrylamide (ml)	1,3	4
1M Tris-HCl pH 6,8 (ml)	1	2,5
10% w/v SDS (μl)	80	100
10% APS (μl)	80	100
TEMED (μl)	8	4

Πίνακας 4: Υλικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης και της πηκτής διαχωρισμού.

Πρώτα παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού, η οποία τοποθετείται ανάμεσα σε ειδικές γυάλινες πλάκες μέχρι τα 3/4 του ύψους. Το υπόλοιπο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων στην πηκτή. Μόλις πολυμεριστεί η πηκτή διαχωρισμού, απορρίπτεται το νερό και προστίθεται η πηκτή επιστοίβασης. Πριν πολυμεριστεί η πηκτή επιστοίβασης πρέπει να προστεθεί ειδικό πλαστικό χτενάκι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις φόρτωσης. Μόλις πολυμεριστεί και η πηκτή επιστοίβασης αφαιρείται τα χτενάκι. Παράλληλα φορτώνεται και διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Prestained Protein Marker, Broad Range της NEB) ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών βαρών των άγνωστων πρωτεϊνών στο διάλυμα.

Στην συνέχεια οι γυάλινες πλάκες μεταφέρονται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή συμπληρώνεται με Running Buffer, φορτώνονται τα δείγματα και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση στα 120V, 1000mA μέχρι το διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών να φτάσει στο τέλος της πηκτής. Ακολούθως η πηκτή αναλύεται είτε με χρώση με

Coomasie Brilliant Blue R-250 είτε με Western Blot ανάλογα με το στόχο της ανάλυσης, όπως θα περιγραφεί παρακάτω.

2.8.2 Χρώση με Coomasie Brilliant Blue R-250

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε όταν είναι απαραίτητη η εμφάνιση τόσο της προς ανάλυση πρωτεΐνης όσο και των υπολοίπων που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα καθώς το Coomasie προσδένεται μη-ειδικά στις πρωτεΐνες. Έτσι ελέγχεται αν λαμβάνεται η απαραίτητη πρωτεΐνη και ο βαθμός καθαρότητάς της στο διάλυμα.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, ανοίγονται οι γυάλινες πλάκες και αφαιρείται η πηκτή επιστοίβασης. Στο επόμενο βήμα η πηκτή διαχωρισμού εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης για περίπου 30min. Ύστερα ακολουθούν πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού (destain) μέχρι να εμφανίζονται μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών.

2.8.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot)

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην χρήση αντισωμάτων τα οποία προσδένονται ειδικά στην προς ανάλυση πρωτεΐνη. Έτσι ελέγχεται με ακρίβεια κατά πόσο παράγεται σωστά η πρωτεΐνη και αν υπάρχουν προϊόντα αποδόμησης είτε λόγω προβλημάτων έκφρασης είτε λόγω πρωτεόλυσης.

Αρχικά, λαμβάνεται η πηκτή διαχωρισμού από την οποία πρέπει να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες σε ειδική μεμβράνη. Η πηκτή διαχωρισμού εμβαπτίζεται σε transfer buffer για 15min. Παράλληλα, η ειδική μεμβράνη τοποθετείται σε μεθανόλη για 15sec, ύστερα σε υπερκαθαρό νερό για 2min και τέλος σε transfer buffer για 15min. Ύστερα, στην συσκευή μεταβίβασης τοποθετούνται τρία ειδικά χαρτιά εμβαπτισμένα σε transfer buffer, από πάνω η πηκτή, η μεμβράνη και τέλος άλλα

τρία ειδικά χαρτιά εμβαπτισμένα σε transfer buffer. Η συσκευή σφραγίζεται και ρυθμίζεται στα 12V για 55min. Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών λαμβάνεται η μεμβράνη και τοποθετείται σε διάλυμα γάλακτος 5% σε TBS-Tween για 1h ώστε οι πρωτεΐνες του γάλακτος να προσδεθούν στην υπόλοιπη επιφάνεια της μεμβράνης και να μην επιτρέψουν την μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος αργότερα στην μεμβράνη (blocking). Η μεμβράνη μετά ξεπλένεται με TBS-Tween και τοποθετείται στο Anti-His αντίσωμα για 1h.

Λόγω του ότι στο γονίδιο *celDZ1* είχε προστεθεί ένας ιχνηθέτης έξι ιστιδίων, εκφράζεται στο N τελικό άκρο της πρωτεΐνης ένα μοτίβο αμινοξέων που αποτελείται από 6 ιστιδίνες. Έτσι με την χρήση αντισώματος, Anti-His, το οποίο προσδέεται στο συγκεκριμένο μοτίβο, είναι δυνατός ο εντοπισμός της πρωτεΐνης με εξαιρετική ακρίβεια λόγω της εκλεκτικότητας του αντισώματος.

Στο επόμενο στάδιο, ακολουθούνται πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με TBS-Tween και μετά απλώνονται στην μεμβράνη από 1ml λουμινόλη και 1ml υπεροξειδίου του υδρογόνου αντίστοιχα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποσυντίθεται παρουσία συζευγμένων δομών στο αντίσωμα όπως η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) και ενεργοποιεί με την σειρά του την λουμινόλη, η οποία εκπέμπει φώς σε σκοτεινές συνθήκες. Τέλος, σε δωμάτιο εμφάνισης φωτογραφιών, τοποθετείται πάνω από την μεμβράνη φωτογραφικό φιλμ και τα δύο αυτά κλείνονται σε ειδική συσκευή για λίγα δευτερόλεπτα. Σε όλη την διαδικασία για προστασία του φιλμ δεν πρέπει να υπάρχει φως, οπότε λειτουργεί μόνο μια μικρή λάμπα εκπομπής κόκκινου φωτός. Στο φιλμ φωτογραφίζονται οι πρωτεΐνες της μεμβράνης οι οποίες εκπέμπουν φως λόγω της λουμινόλης. Το φιλμ για να εμφανιστούν τα ίχνη των πρωτεϊνών που υπήρχαν στην μεμβράνη, εμβαπτίζεται πρώτα σε διάλυμα εμφάνισης ύστερα πλένεται σε νερό βρύσης και τέλος σε διάλυμα διόρθωσης. Μετά το βήμα αυτό το φιλμ είναι προστατευμένο από το φως και οι μαύρες ζώνες που εμφανίζονται αντιπροσωπεύουν την πρωτεΐνη που φέρει το επίτοπο.

2.8.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1976 [44] και βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 εμφανίζεται με δύο μορφές μια ερυθρή και μία κυανή με μέγιστο απορρόφησης τα 465 και 595nm αντίστοιχα. Όταν η χρωστική προσδεθεί στην πρωτεΐνη και συγκεκριμένα στα βασικά και αρωματικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, η ερυθρή μορφή μετατρέπεται σε κυανή. Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο υπολογισμός της ποσότητας των δειγμάτων με άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Τόσο για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς όσο και για την μέτρηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Αναμιγνύονται 1500μl Coomassie Reagent (thermo kit) με 30μl δείγμα και με 30μl υπερκαθαρό νερό για τυφλό.
- Επάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min
- Φωτομέτρηση στα 595nm

2.9 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός

Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες κάθε φορά ώστε να προσδιοριστούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του. Η ενεργότητα εκφράζεται είτε ως σχετική ενεργότητα είτε ως ειδική ενεργότητα σε units/mg ενζύμου. Ως ένα unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1μmole γλυκόζης ανά λεπτό στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας, είτε σχετικής είτε ειδικής, πραγματοποιείται χρήση της μεθόδου του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος (DNS). Η μέθοδος του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο δινιτροσαλικυλικό οξύ και τα ελεύθερα ημιακεταλικά υδροξύλια των αναγωγικών σακχάρων. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται με θέρμανση πάνω από 70°C και δίνει μέγιστο απορρόφησης στα 540nm. Η διαδικασία μέτρησης έχει ως εξής:

- Σε γνωστό όγκο δείγματος προσθέτουμε ίσο όγκο DNS.
- Θερμαίνουμε το δείγμα στους 100 °C για 5 min.
- Μετράται η απορρόφηση στα 540 nm.

Για τον υπολογισμό της σχετικής ενεργότητας ορίζουμε ως 100% την μέγιστη τιμή απορρόφησης και αντιστοιχούμε τις υπόλοιπες ως προς αυτή. Για να εκφράσουμε αντίστοιχα την ενεργότητα σε units, χρησιμοποιούμε καμπύλη αναφοράς γλυκόζης ώστε να μετατρέψουμε την τιμή απορρόφησης που λάβαμε από την υδρόλυση του εκάστοτε υποστρώματος σε ποσό γλυκόζης.

Η αντιστοιχία απορρόφησης με συγκέντρωση εκφράζεται μέσω του νόμου Lambert – Beer ο οποίος προβλέπει γραμμική σχέση ανάμεσα στα δύο μεγέθη σύμφωνα με την σχέση:

$A = \epsilon \cdot b \cdot c$ όπου: A: η απορρόφηση

ϵ : η μοριακή απορροφητικότητα (1/mole/cm)

c: συγκέντρωση (M)

b: μήκος κυψελίδας

Η παραπάνω σχέση ισχύει μέχρι συγκεντρώσεις της προς μέτρησης ουσίας της τάξης των 0,01 M. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκύπτουν σημαντικές αποκλίσεις λόγω επικαλύψεων των ηλεκτρονιακών νεφών των μορίων της ουσίας κάτι το οποίο φροντίζεται να αποφευχθεί.

2.9.1 Πρότυπες συνθήκες αντίδρασης

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν από αυτό το σημείο και μετά στις βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή 70 °C και pH 5 και αποτελούνταν από 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 με 1% w/v καρβοξυ-μέθυλο-κυτταρίνη και 3,13 mg/L ένζυμο. Ανάλογα την ιδιότητα του ενζύμου που εξετάζεται κάθε φορά είναι δυνατό να αλλάζει κάποια παράμετρος ενώ η εναπομένουσα ενεργότητα μετριέται με την μέθοδο του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος.

Κεφάλαιο 3: Λειτουργία, κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου *CelDZ1a*

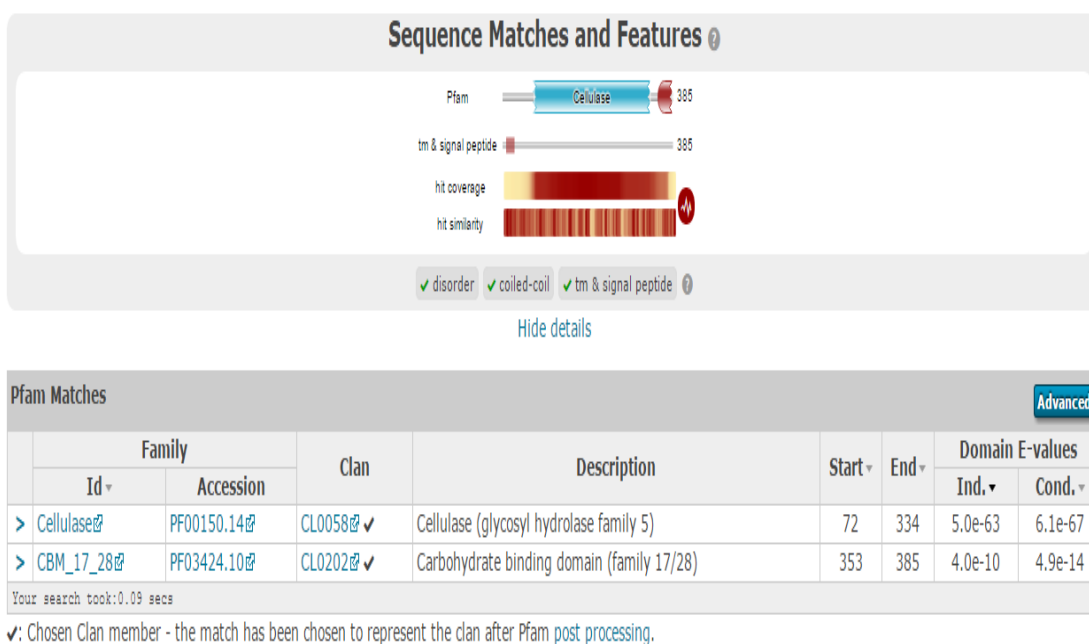
3.1 Χαρακτηριστικά και βιοπληροφορική ανάλυση αλληλουχίας-στόχου

Το γενετικό υλικό προήλθε από μεταγονιδιωματικό δείγμα εμπλουτισμένο σε πολυσακχαρίτες από θερμότητα της Ισλανδίας η οποία βρισκόταν σε θερμοκρασία 50 °C και pH 7. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος από τους Soley R. Gudbergsdottir και Xu Peng (Danish Archaea Centre, Department of Biology, Copenhagen University)



Εικόνα 11: Θερμοπηγή (Ηφαίστειο Glensdalur, Ισλανδία) από την οποία προήλθε το εμπλουτισμένο μεταγονιδιωματικό δείγμα και στο οποίο εντοπίστηκε το γονίδιο *celDZ1a*

Ύστερα από βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος από τον Ευθύμιο Λαδουκάκη, στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., επιλέχθηκε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του οποίου η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζει 59% ομοιότητα με μια χαρακτηρισμένη ενδο-γλουκανάση από το βακτήριο *Bacillus akibai*. Εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία στην βάση δεδομένων HMMER βρέθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:



Εικόνα 12: Αποτελέσματα ανάλυσης της αμινοξικής αλληλουχίας μέσω HMMER

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η πρωτεΐνη η οποία παράγεται και από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως CelDZ1a περιέχει μια καταλυτική ομάδα της οικογένειας 5 των γλυκοζι-υδρολασών και ένα CBM της οικογένειας 17/28.

Η αμινοξική αλληλουχία στην συνέχεια εισήχθη στην πλατφόρμα υπολογισμού πρωτεϊνικών παραμέτρων ProtParam ExPASy και βρέθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Number of amino acids: 385

Molecular weight: 43197.0

Theoretical pI: 5.71

Amino acid composition:

Ala (A)	26	6.8%
Arg (R)	11	2.9%
Asn (N)	34	8.8%
Asp (D)	20	5.2%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	5	1.3%
Glu (E)	26	6.8%
Gly (G)	30	7.8%
His (H)	8	2.1%
Ile (I)	36	9.4%
Leu (L)	29	7.5%
Lys (K)	28	7.3%
Met (M)	9	2.3%
Phe (F)	13	3.4%
Pro (P)	19	4.9%
Ser (S)	28	7.3%
Thr (T)	15	3.9%
Trp (W)	13	3.4%
Tyr (Y)	14	3.6%
Val (V)	21	5.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 46

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 39

Εικόνα 13: Αποτελέσματα υπολογισμού πρωτεϊνικών παραμέτρων της CelDZ1 από την πλατφόρμα ProtParam ExPASy

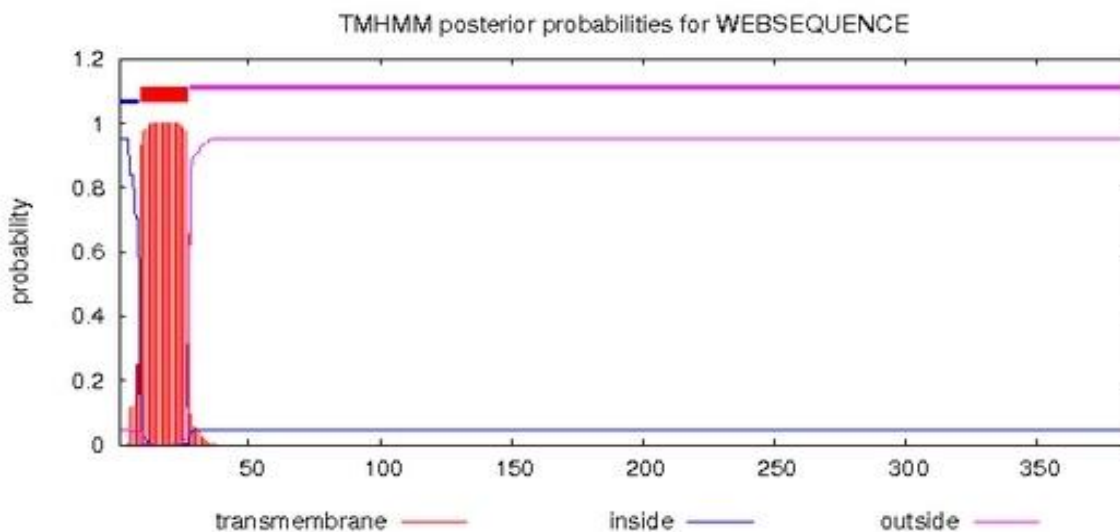
Άρα το μοριακό βάρος είναι 43kDa με pI στο pH 5,71 ενώ φαίνεται και το ποσοστό του κάθε αμινοξέος στην πρωτεΐνη.

Επιπλέον η αμινοξική αλληλουχία εισήχθη για ανάλυση στην διαδικτυακή πλατφόρμα TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) η οποία ελέγχει για την ύπαρξη δομών οι οποίες προσδένουν τις πρωτεΐνες στις μεμβράνες του κυττάρου.

TMHMM result

[HELP](#) with output formats

```
# WEBSEQUENCE Length: 385
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 19.547579999999999
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 19.54572
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.95175
# WEBSEQUENCE POSSIBLE N-term signal sequence
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 8
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 9 27
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 28 385
```



[plot](#) in postscript, [script](#) for making the plot in gnuplot, [data](#) for plot

Εικόνα 14: Πρόβλεψη ύπαρξης διαμεμβρανικής έλικας στη αμινοξική αλληλουχία της CeIDZ1 από την πλατφόρμα TMHMM

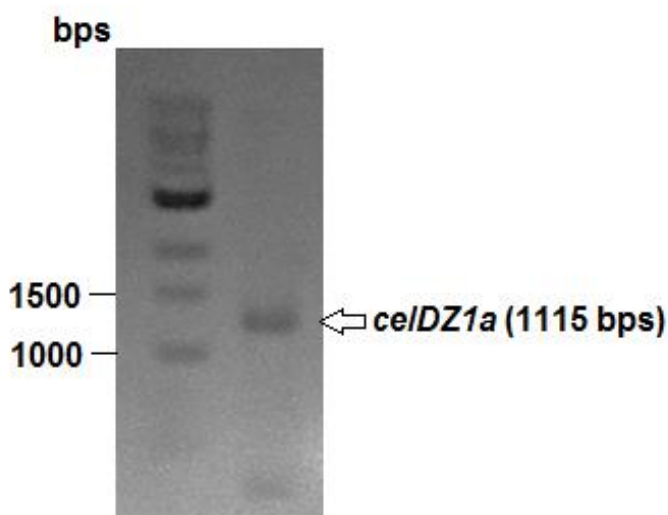
Πράγματι, προβλέφθηκε ότι η αμινοξική αλληλουχία περιέχει μια διαμεμβρανική έλικα στο N τελικό άκρο της η οποία εκτείνεται από το 9^ο μέχρι το 27^ο αμινοξύ με το κύριο σώμα να βρίσκεται στο εξωκυτταρικό χώρο. Αυτή η δομή πιθανά στον αρχικό οργανισμό να χρησίμευε για την διατήρηση της πρωτεΐνης πάνω στην μεμβράνη. Γενικά λόγω της αδιάλυτης φύσης των κυτταρινούχων υποστρωμάτων, δεν μπορούν να εισέλθουν στον ενδοκυτταρικό χώρο του κυττάρου. Για τον λόγο αυτό τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό αυτών των υποστρωμάτων πρέπει είτε να εκκρίνονται είτε να βρίσκονται μέσω διαμεμβρανικών δομών προσδεδεμένα στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Μια τέτοια ιδιότητα όμως δεν είναι απαραίτητη, καθώς η πρωτεΐνη εκφράζεται σε ετερόλογο οργανισμό ενώ

παράλληλα μπορεί να δυσχεράνει την διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης προσκολλώντας την πρωτεΐνη στο κυτταρικό υπόλειμμα λόγω υψηλής υδροφοβικότητας των διαμεμβρανικών πεπτιδίων.

3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *celDZ1a*

3.2.1 Απομόνωση Γονιδίου

Από το γονιδιωματικό δείγμα έγινε απομόνωση του γονιδίου-στόχου με PCR και το αποτέλεσμα ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Όπως φαίνεται από την εικόνα 8, εμφανίζεται μια ζώνη DNA στο αναμενόμενο μέγεθος του *celDZ1a*.



Εικόνα 15: *CelDZ1a* σε πηκτή αγαρόζης

Το γονίδιο απομονώθηκε κόβοντας με ξυράφι το κομμάτι της πηκτής στο οποίο εμφανίζεται και καθαρίστηκε με το πρωτόκολλο για gel extraction της Macherey – Nagel GmbH & Co. KG. Αυτό πραγματοποιείται ως εξής:

- 200μL NTI / 100mg πηκτή και τοποθέτηση στους 50 °C για 5-10min μέχρι να διαλυθεί η πηκτή.
- Τοποθέτηση σε ειδικό φιλτράκι και φυγοκέντριση στα 11000g για 30s ώστε να προσδεθεί το DNA στην επιφάνεια του φίλτρου.

- Ακολουθούνται δύο πλύσεις του φίλτρου με 700μl NT3 και φυγοκέντριση κάθε φορά στα 11000g για 30s.
- Ξήρανση του φίλτρου με μια επιπλέον φυγοκέντριση στα 11000g για 1min.
- Διαβροχή του φίλτρου με 30μl αποστειρωμένου νερού και μετά από 1min φυγοκέντριση στα 11000g για 1min και συλλογή του DNA.

3.2.2 Ανασυνδυασμός πλασμιδιακού φορέα pET28 – *celDZ1a*

Ακολούθησε πέψη του πλασμιδίου pET28a(+) με XbaI και XhoI με σκοπό τη δημιουργία συμβατών άκρων ώστε να είναι δυνατή η προσθήκη του γονιδίου-στόχου. Με το πέρας της πέψης δημιουργήθηκε ένα διάλυμα με το πλασμίδιο και την αλληλουχία η οποία κόπηκε. Στη συνέχεια επιλέχθηκε η στρατηγική η κομμένη αλληλουχία του πλασμιδίου που υπήρχε μεταξύ των περιοριστικών θέσεων να αφαιρεθεί. Ο λόγος ήταν ότι κατά την αντίδραση συνένωσης μορίων DNA η οποία θα ακολουθούσε, θα ανταγωνιζόταν το γονίδιο που προσπαθήσαμε να εισάγουμε για επανένωση με τον πλασμιδιακό φορέα. Έτσι μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης αφού δημιουργούνται ξανακλεισμένοι φορείς οι οποίοι δεν περιέχουν το γονίδιο – στόχο. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Plasmid DNA purification της Macherey – Nagal GmbH & Co. KG. μέσω του οποίου, αφαιρούνται οι μικρές πλασμιδιακές αλληλουχίες που δεν είναι απαραίτητες. Στο στάδιο αυτό, η πραγματοποίηση αντίδρασης συνένωσης μορίων DNA ανάμεσα στο γονίδιο *celDZ1a* και στο πλασμίδιο προς το σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET28 – *celDZ1a* ήταν πλέον έτοιμη να πραγματοποιηθεί.

Τα μείγματα των αντιδράσεων λιγάσης εισήχθησαν με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα τύπου NEB 10 beta. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε τρυβλία και με το πέρας 16h λήφθηκαν δέκα αποικίες και εμβολιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια 5 ml LB με καναμικίνη συγκέντρωσης 50μg/ml. Ακολουθήθηκε επώαση στους 37 °C με ήπια ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει στο 0,3 στα 600nm. Για έλεγχο των καλλιεργειών, λήφθηκε δείγμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν DNA εκμαγείο για διαγνωστική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το προϊόν της αντίδρασης

ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να βρεθεί ποιες καλλιέργειες περιέχουν το πλασμίδιο *pET28 – celDZ1a*. Επιλέχθηκε μία από τις καλλιέργειες η οποία περιείχε το πλασμίδιο – στόχο, λήφθηκαν 800μl τα οποία αναμίχθηκαν με 1ml αποστειρωμένη γλυκερόλη συγκέντρωσης 50% v/v και το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Η γλυκερόλη έχει την ιδιότητα να προστατεύει τις μεμβράνες του κυττάρου από τους κρυστάλλους του πάγου στις χαμηλές θερμοκρασίες, οπότε τα κύτταρα αποθηκεύονται με ασφάλεια.

Για την υπερέκφραση του γονιδίου που μας ενδιέφερε, το ίδιο πλασμίδιο εισήχθη σε κύτταρα έκφρασης τύπου BL21 (DE3). Άρα επιλέγονται για μεγαλύτερη ευκολία χημικώς επιδεικτικά BL21 (DE3) κύτταρα τα οποία μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο *pET28 – celDZ1a* και η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως επαναλαμβάνεται μέχρι αποθήκευσης των κυττάρων.

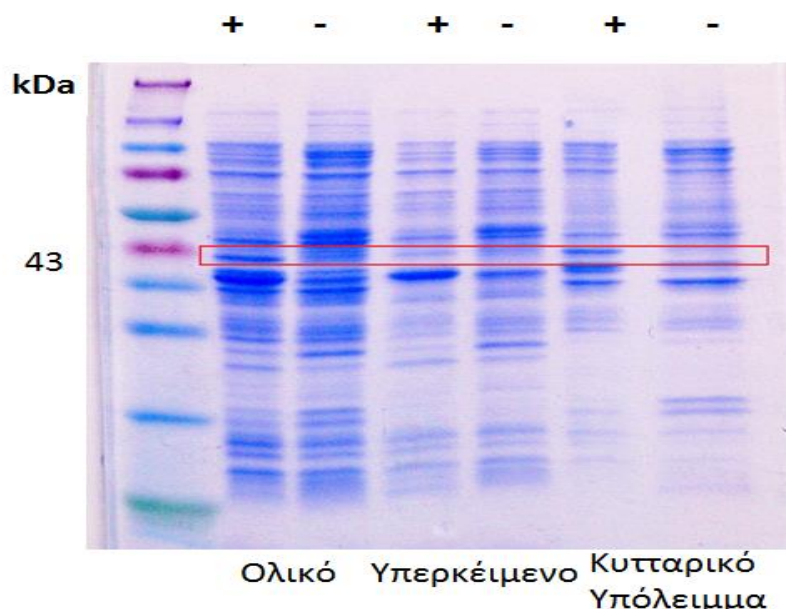
3.2.3 Έκφραση σε μικρού όγκου καλλιέργεια και κλασμάτωση

Για να ελεγχθεί αν το γονίδιο είναι λειτουργικό και παράγεται πρωτεΐνη με τις αναμενόμενες ιδιότητες, κύτταρα BL21 (DE3) που περιέχουν τόσο το πλασμίδιο *pET28a(+)* όσο και το πλασμίδιο *pET28 – celDZ1a* επώαστηκαν σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες όγκου 5ml μέχρι 0,5 οπτική πυκνότητα στα 600nm και ακολουθήθηκε υπερέκφραση με προσθήκη IPTG 0,2mM. Τα κύτταρα τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο *pET28a(+)* λειτουργούν σαν κύτταρα ελέγχου αφού δεν εκφράζουν την *CelDZ1*. Για να ελεγχθεί ίση ποσότητα κυττάρων και από τις δύο καλλιέργειες, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση λαμβάνοντας τόσο όγκο και από τις δύο καλλιέργειες, ώστε να έχουν και οι δύο 1 βαθμό οπτικής πυκνότητας (1 OD) στα δύο προς εξέταση δείγματα.

Τα δύο δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 6000g για 5min, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το κυτταρικό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 200μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε διάνοιξη των κυτταρικών μεμβρανών με υπερήχους ρυθμίζοντας τη συσκευή υπερήχων σε χαμηλή ένταση για λίγα δευτερόλεπτα. Τόσο ο χρόνος όσο και η ένταση προσαρμόστηκαν για αποφυγή

υπερθέρμανσης των δειγμάτων η οποία θα προκαλούσε μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Εκτός του ελέγχου της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης, είναι σημαντικό να ελεγχθεί η διαλυτότητά της. Αυτό επιτυγχάνεται κλασμώνοντας τα δείγματα με φυγοκέντριση σε δύο κλάσματα: το υπερκείμενο και το κυτταρικό υπόλειμμα. Ο έλεγχος πραγματοποιείται παρατηρώντας πόσο ποσοστό της πρωτεΐνης – στόχου βρίσκεται στο υπερκείμενο και πόσο στο κυτταρικό υπόλειμμα σε σχέση με το δείγμα πριν την κλασμάτωση (ολικό δείγμα). Αναλόγως το που βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό θα ακολουθηθούν διαφορετικές τεχνικές καθαρισμού όπως θα περιγραφούν παρακάτω. Συγκεκριμένα, λήφθηκε 100μl από κάθε δείγμα μετά την διάνοιξη των κυττάρων (ολικά δείγματα) και το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε στα 12.000g για 15min. Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το κάθε δείγμα ενώ τα κυτταρικά υπολείμματα επαναδιαλύθηκαν με 100μl PBS. Συμπερασματικά, σχηματίστηκαν τόσο για το δείγμα στο οποίο εκφράζεται η CelDZ1 όσο και για το δείγμα ελέγχου τρία ξεχωριστά κλάσματα: το ολικό, το υπερκείμενο και το κυτταρικό υπόλειμμα. Όλα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ακολουθήθηκε χρώση με Coomassie.

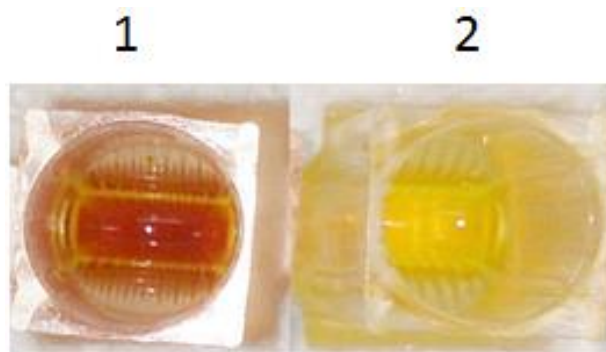


Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου της CelDZ1a. Με (+) παρουσιάζονται τα δείγματα εσωκυτταρικού υλικού κυττάρων που παράγουν την πρωτεΐνη-στόχο, ενώ με (-) παρουσιάζονται τα δείγματα εσωκυτταρικού υλικού κυττάρων που φέρουν κενό πλασμίδιο (δείγμα ελέγχου)

Από την παραπάνω πηκτή φαίνεται ότι η πρωτεΐνη παράγεται στο σωστό μέγεθος αφού στο αναμενόμενο μοριακό βάρος τα δείγματα τα οποία εξέφραζαν την CelDZ1 εμφανίζουν μια επιπλέον ζώνη σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Επίσης, το μεγαλύτερο ποσοστό της CelDZ1 παράγεται στο κυτταρικό υπόλειμμα. Αυτό οφείλεται συνήθως σε λάθος αναδίπλωση της πρωτεΐνης, η οποία σχηματίζει έγκλειστα τα οποία δεν παρουσιάζουν καμία βιολογική δράση. Άλλος λόγος παραμονής στο κυτταρικό υπόλειμμα είναι η παρουσία αλληλουχιών, συνήθως υδρόφοβων περιοχών, οι οποίες συγκρατούν την πρωτεΐνη στις κυτταρικές μεμβράνες. Η ύπαρξη τέτοιων δομών μπορεί να προβλεφτεί με κατάλληλο λογισμικό, μέσω της αμινοξικής αλληλουχίας, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Σε κάθε περίπτωση, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης από το κυτταρικό υπόλειμμα είναι χρονοβόρος, παρουσιάζει δυσκολίες και για αυτό θα πρέπει να ελεγχθεί η πιθανότητα απομόνωσης της πρωτεΐνης από το υπερκείμενο το οποίο απαιτεί ευκολότερες τεχνικές.

3.2.4 Επιβεβαίωση λειτουργικότητας και ζυμογράφημα

Για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υδρόλυσης στις συνθήκες από τις οποίες προήλθε η μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη. Άρα πραγματοποιήθηκε αντίδραση χρησιμοποιώντας 20μl από το ολικό δείγμα σαν ένζυμο στους 50 °C για 10min με 1% CMC (carboxy methyl cellulose) ως υπόστρωμα λόγω της πιθανής δράσης ένδο-γλουκανάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM φωσφορικού νατρίου pH 7. Σαν αντίδραση ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 20μl από το ολικό δείγμα στο οποίο δεν εκφράζεται η CelDZ1. Με την μέθοδο του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος που περιγράφεται φάνηκε ότι το CMC υδρολύθηκε προς παραγωγή αναγωγικών σακχάρων, άρα η CelDZ1 είναι λειτουργική και παρουσιάζει δράση ένδο-γλουκανάσης. Η αντίδραση ελέγχου δεν άλλαξε χρώμα άρα η υδρόλυση αποδίδεται στην CelDZ1.

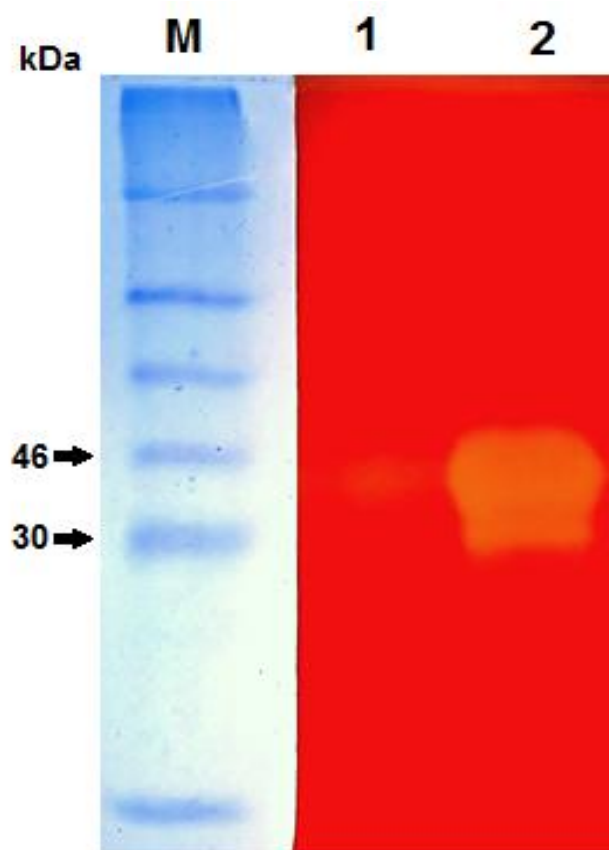


Εικόνα 17: Έλεγχος λειτουργικότητας με την μέθοδο του Δινιτροσαλικυλικού οξέος σε αντίδραση με CMC ως ενζυμικό υπόστρωμα . 1. Το σκούρο χρώμα υποδηλώνει την απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων τα οποία προέρχονται από την υδρολυτική δράση της CelDZ1a που περιέχεται στο κυτταρικό υλικό . 2) Απουσία αλλαγής χρώματος λόγω μη ύπαρξης πρωτεΐνης με κυτταρινολυτική δράση στο υλικό κυττάρων που έφεραν κενό πλασμίδιο (δείγματα ελέγχου)

Για μεγαλύτερη ασφάλεια και για να είναι εμφανής η δράση της CelDZ1, πραγματοποιήθηκε μια παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία ονομάζεται ζυμογράφημα. Η τεχνική του ζυμογραφήματος χρησιμεύει στον εντοπισμό υδρολυτικών ενζύμων με βάση την ειδίκευση τους σε συγκεκριμένα υποστρώματα και με βάση το μοριακό τους βάρος. Σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου προστίθεται υπόστρωμα το οποίο υδρολύεται από το ένζυμο και με τεχνικές χρώσης, εμφανίζεται η περιοχή στην οποία υδρολύθηκε το υπόστρωμα.

Συγκεκριμένα, για την παρασκευή του ζυμογραφήματος, παρασκευάστηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αλλά με 10% v/v πολυακρυλαμίδιο και με 0,25% CMC σαν ενζυμικό υπόστρωμα. Τα ολικά δείγματα από την κλασμάτωση (και αυτό στο οποίο παράγεται η CelDZ1 και το δείγμα ελέγχου) αναμίχθηκαν με loading buffer 6x το οποίο δεν περιείχε χρωστική (μπλε της βρωμοθυμόλης) μέχρι αραιώσης του loading buffer στο 1x. Το διάλυμα δεν θερμάνθηκε στους 100 °C ενώ ως πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών επιλέχθηκε ο NEB Prestained Broad Range Protein Ladder. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή διαχωρισμού επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 7, 50mM το οποίο περιέχει επιπλέον 2% v/v Triton-X100, για 30min με ήπια ανάδευση. Η πηκτή μεταφέρεται για άλλα 30min σε ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς Triton-X100 και μετά πάλι σε ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 2h στους 50 °C. Μετά πραγματοποιείται χρώση της πηκτής με διάλυμα 0,5%w/v Congo Red για 40min και ύστερα πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα 1M Tris-HCl pH 7.

Το Congo Red έχει την ικανότητα να προσδένεται στους β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Όταν οι δεσμοί αυτοί υδρολύονται λόγω ενζυμικής δράσης δεν είναι δυνατή η χρώση του υποστρώματος οπότε εμφανίζεται ο χαρακτηριστικός φαινότυπος που υποδηλώνει υδρόλυση της κυτταρίνης. Τέλος, σταθεροποιείται η χρώση εμβαπτίζοντας την πηκτή σε διάλυμα 1M MgCl₂.



Εικόνα 18: Ανάλυση με ζυμογράφημα για την ανίχνευσης κυτταρινολυτικής ενεργότητας μέσω SDS-PAGE και χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου που περιέχει CMC με Congo Red. M: διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών 1: κυτταρικό υλικό το οποίο παράγει την πρωτεΐνη – στόχο. 2: κυτταρικό υλικό από το οποίο δεν παράγεται η πρωτεΐνη – στόχος.

Από την πηκτή παρατηρείται η υδρολυτική δράση της CelDZ1 η οποία εμφανίζεται με αποχρωματισμό στο ύψος των 43kDa. Στο δείγμα ελέγχου πάλι δεν εμφανίζεται ενζυμική δράση.

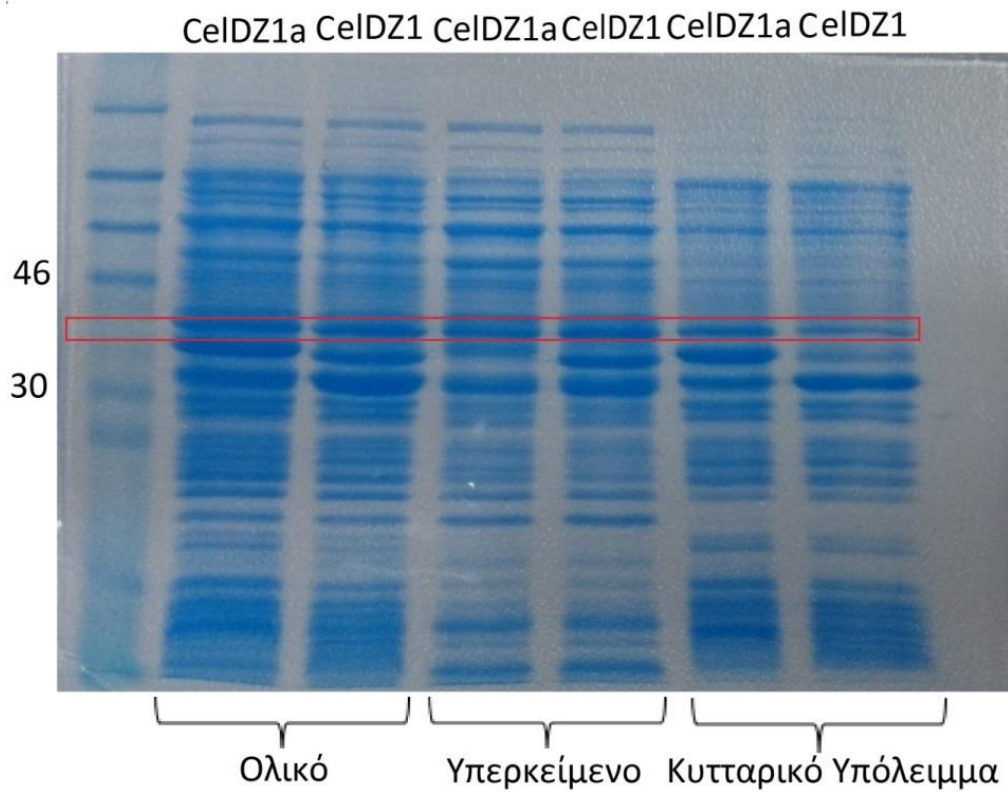
Κεφάλαιο 4: Κλωνοποίηση, ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *CelDZ1* και χαρακτηρισμός της παραγόμενης κυτταρινάσης

4.1 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *CelDZ1*

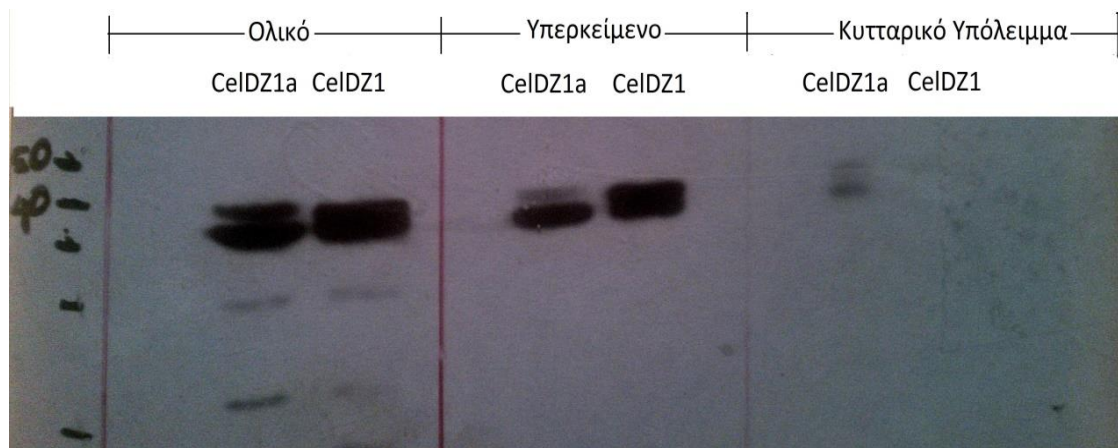
Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, αν και παράγεται ενεργή πρωτεΐνη δεν παράγεται σε τόσο μεγάλη ποσότητα στο υπερκείμενο. Αυτό σημαίνει ότι για κάποιο λόγο η πρωτεΐνη παραμένει προσδεσμένη στο κυτταρικό υπόλειμμα. Για να καθαριστεί από εκεί απαιτείται η χρήση χρονοβόρων και πιο δαπανηρών τεχνικών οι οποίες καθιστούν την βιομηχανική αξιοποίηση του ενζύμου λιγότερο πιθανή. Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε η κλωνοποίηση του *CelDZ1a* απαλλαγμένης από την διαμεμβρανική έλικα η οποία πιθανά προσδένει την πρωτεΐνη στο κυτταρικό υπόλειμμα. Το νέο γονίδιο ονομάζεται *CelDZ1*.

Για τον σχηματισμό του *CelDZ1* ο εμπρόσθιος εκκινητής σχεδιάστηκε έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικός του κομματιού της αλληλουχίας του γονιδίου το οποίο βρίσκεται μετά από το κομμάτι της αλληλουχίας που εκφράζει την διαμεμβρανική έλικα. Έτσι η διαμεμβρανική έλικα δεν θα εκφραστεί κάτι το οποίο πιθανώς θα δώσει μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης στο διαλυτό κομμάτι. Η μη έκφραση της έλικας αναμένεται να μην επηρεάσει την λειτουργία της καθώς βρίσκεται στην αρχή της αλληλουχίας της πρωτεΐνης και δεν έχει καταλυτική δράση. Παρόλα αυτά δεν αποκλείεται και το αντίθετο καθώς οποιαδήποτε αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μπορεί να επηρεάσει την αναδίπλωση της, άρα και την καταλυτική της δράση.

Έτσι, με αλλαγή μόνο του εμπρόσθιου εκκινητή επαναλήφθηκε η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε και για την *CelDZ1a* και ύστερα από κλασμάτωση σε μικρού όγκου καλλιέργεια βρέθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:



Εικόνα 19: Κλασμάτωση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Η CelDZ1a και CelDZ1 εμφανίζονται σε μοριακό βάρος περίπου 43kDa.



Εικόνα 20: Κλασμάτωση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE και εμφάνιση με Western blot. Στο φιλμ εμφανίζονται μόνο οι CelDZ1a και CelDZ1 και τα υποβαθμισμένα προϊόντα τους τα οποία περιέχουν τα κατάλοιπα ιστιδίνης στο N άκρο.

Παρατηρείται, ιδιαίτερα από το Western blot ότι όντως αυξήθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο. Επίσης φαίνεται ότι η CelDZ1 υποβαθμίζεται λιγότερο σε σχέση με την CelDZ1α της οποίας η μεγαλύτερη ποσότητα δεν εμφανίζεται στο σωστό μοριακό βάρος καθώς κάποιο κομμάτι της χάνεται κατά την έκφραση. Όποτε πλέον είναι δυνατή η λήψη αυξημένης ποσότητας πρωτεΐνης καθαρίζοντας το υπερκείμενο. Η ενεργότητα ελέγχθηκε με την μέθοδο του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος όπου τα αποτελέσματα ήταν θετικά. Έτσι επιλέχθηκε η χρήση της CelDZ1 αντί της CelDZ1α για τα επόμενα στάδια της παρούσας εργασίας.

4.2 Παραγωγή και καθαρισμός CelDZ1

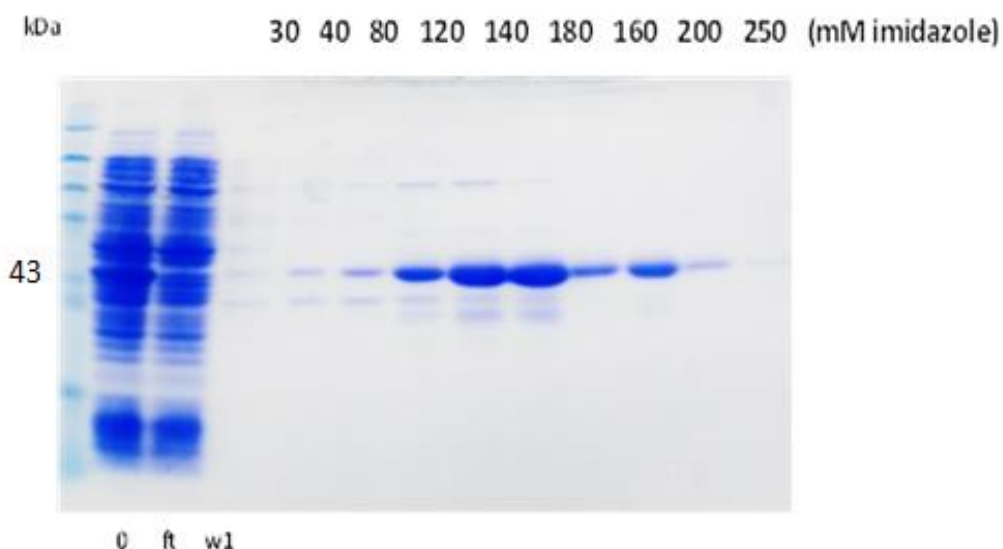
Κύτταρα BL21 (DE3) pET28-CelDZ1 από τους -80 °C εμβολιάστηκαν σε 5ml LB το οποίο περιείχε καναμικίνη συγκέντρωσης 50μg/ml ως αντιβιοτικό επιλογής. Ακολουθήθηκε επώαση στους 37 °C με ήπια ανάδευση για 16h. Το υλικό μεταφέρθηκε σε 1L φρέσκο LB με ίδια συγκέντρωση αντιβιοτικού το οποίο επώαστηκε στους 37 °C με ήπια ανάδευση μέχρι τελικής οπτικής πυκνότητας στα 600nm 0,5. Για καλό αερισμό της καλλιέργειας το υλικό μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες με τέτοιο τρόπο ώστε να μην ξεπερνάει το 1/3 του ύψους της κάθε φιάλης. Με την επίτευξη της απαραίτητης τιμής οπτικής πυκνότητας, προστέθηκαν 0,2mM επαγωγέα IPTG ώστε να ξεκινήσει η παραγωγή της πρωτεΐνης. Σε αυτό το στάδιο για να μην επιβαρυνθεί το κύτταρο και να παραχθεί καλύτερης ποιότητας πρωτεΐνη η θερμοκρασία επώασης μειώθηκε στους 25 °C. Η καλλιέργεια παρέμεινε σε αυτές τις συνθήκες τουλάχιστον 16h ώστε να παραχθεί αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης.

Για τον καθαρισμό αξιοποιήθηκε η αλληλουχίας των έξι ιστιδίων οι οποίες έχουν προστεθεί στο N τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, όπου οι ιστιδίνες της πρωτεΐνης προσδένονται σε ιόντα νικελίου (Ni) και το σύμπλοκο τους ακινητοποιείται στο φίλτρο στήλης πολυπροπυλενίου 5ml. Η στήλη ύστερα

ξεπλύθηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη για την σύνδεση με τα ιόντα Ni. Η γνώση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου που απαιτείται για να αρχίσει η έκλυση της πρωτεΐνης από την στήλη είναι εξαιρετικής σημασίας για την επιλογή των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν τόσο για τις πλύσεις όσο και για την έκλυση της πρωτεΐνης. Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος διερευνητικός καθαρισμός με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Φυγοκέντριση της καλλιέργειας στα 6000g για 10min στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση σε 10ml NPI-10.
- Ρήξη κυτταρικών μεμβρανών με υπερήχους στη συσκευή με την ρύθμιση στη μέγιστη ένταση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές για 15sec.
- Φυγοκέντριση στα 10.000g για 15min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο της καλλιέργειας αναμιγνύεται με Ni-NTA agarose beads (Qiagen) και αφήνεται για ήπια ανάδευση στους 4 °C για 1h.
- Η στήλη γεμίζεται με 5ml NPI-10, προστίθεται το φίλτρο και στη συνέχεια αδειάζεται η στήλη.
- Αδειάζεται το δείγμα και αφήνονται να κάτσουν τα beads στο φίλτρο.
- Η στήλη ξεπλένεται με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζόλης NPI-10, 20, 30, 40, 80, 120, 140, 160, 180, 200, 250.
- Για κάθε πλύση τοποθετείται δοχείο κάτω από την στήλη για την συλλογή των δειγμάτων.

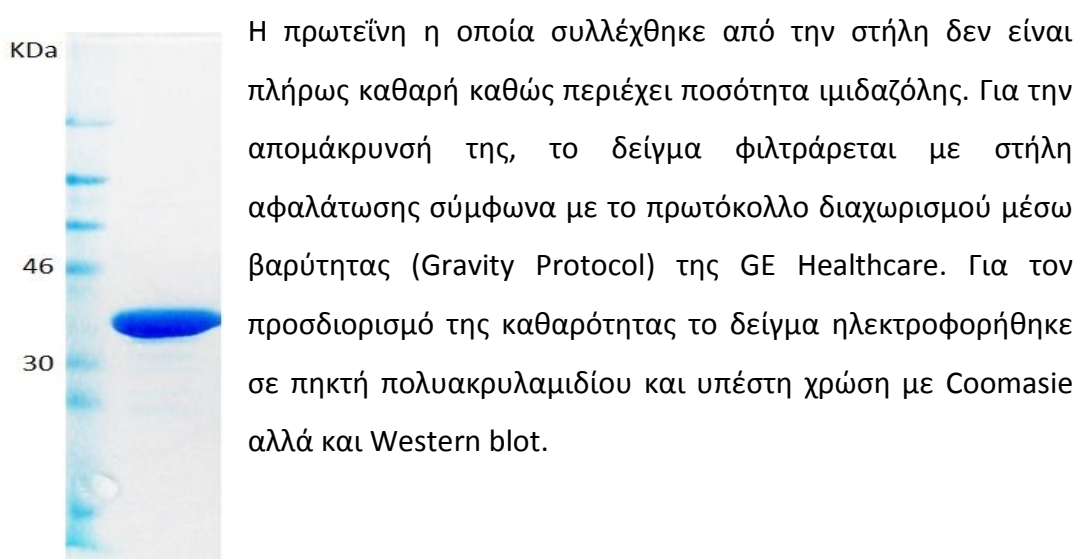
Τα δείγματα από κάθε πλύση ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ελλέχθηκαν τόσο για την καθαρότητα που επιτυγχάνεται όσο και για το ποσοστό της CelDZ1 το οποίο απομακρύνεται κάθε φορά από την στήλη.



Εικόνα 21: Προϊόντα καθαρισμού δειγμάτων κλιμακούμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζόλης όπως προκύπτουν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω πηκτή, προκύπτει ότι μέχρι τα 20mM ιμιδαζόλης δεν χάνεται πρωτεΐνη ενώ με 200mM ιμιδαζόλης ξεπλένεται όλη η πρωτεΐνη από την στήλη. Για αυτό για τις πλύσεις επιλέχθηκε το NPI-10 και NPI-20, ενώ για την έκλουση της πρωτεΐνης επιλέχθηκε το NPI-200.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε με νέα καλλιέργεια ώστε να εξασφαλισθεί "φρέσκια" πρωτεΐνη και στον καθαρισμό η στήλη ξεπλύθηκε με 5ml NPI-10 και 5ml NPI-20. Η πρωτεΐνη παραλήφθηκε με έκλουση με 3ml NPI-200.



Η πρωτεΐνη η οποία συλλέχθηκε από την στήλη δεν είναι πλήρως καθαρή καθώς περιέχει ποσότητα ιμιδαζόλης. Για την απομάκρυνσή της, το δείγμα φιλτράρεται με στήλη αφαλάτωσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαχωρισμού μέσω βαρύτητας (Gravity Protocol) της GE Healthcare. Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και υπέστη χρώση με Coomassie αλλά και Western blot.

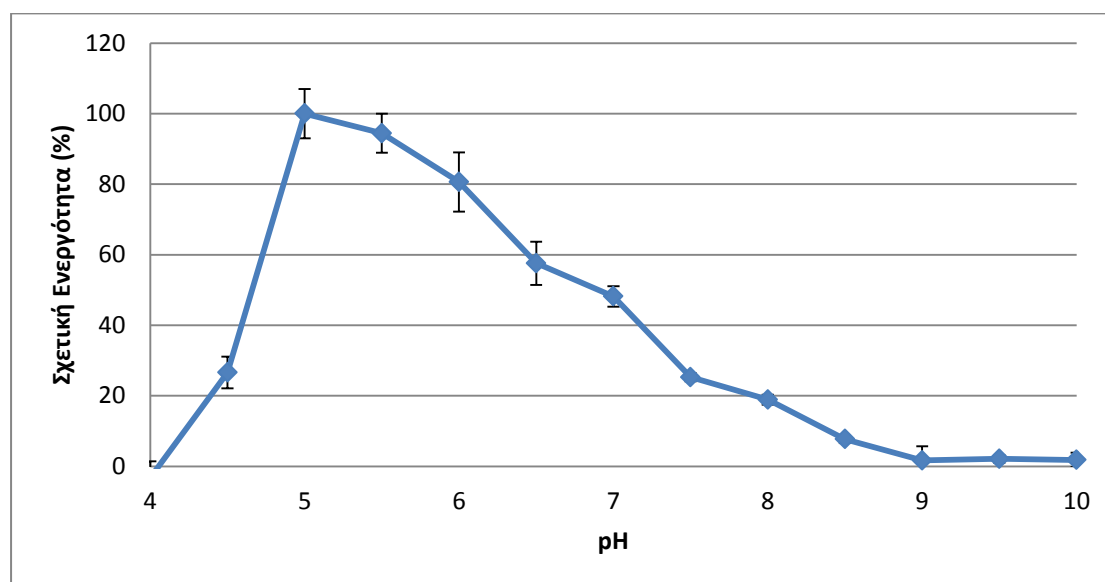
Εικόνα 22: Δείγμα καθαρισμένης CeIDZ1 μετά από χρώση με Coomassie

Η καθαρή πρωτεΐνη (εικ. 22) αναμίχθηκε με 50% γλυκερόλη, ψύχθηκε άμεσα με υγρό άζωτο (flash freezing) και αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της στο διάλυμα με την μέθοδο Bradford και βρέθηκε: $C=1043,3\mu\text{g/ml}$. Με καθαρή την πρωτεΐνη και γνωστή την συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ο βιοχημικός χαρακτηρισμός.

4.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός CelDZ1

4.3.1 Εύρεση βέλτιστου pH

Για τον υπολογισμό του βέλτιστου pH πραγματοποιήθηκαν πρότυπες αντιδράσεις υδρόλυσης σε ένα εύρος pH 4-10 σε θερμοκρασία $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Για τα pH 4-6 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 50mM. Αντίστοιχα, για το pH 6,5-7,5 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50mM και για τα pH 8-10 ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM.

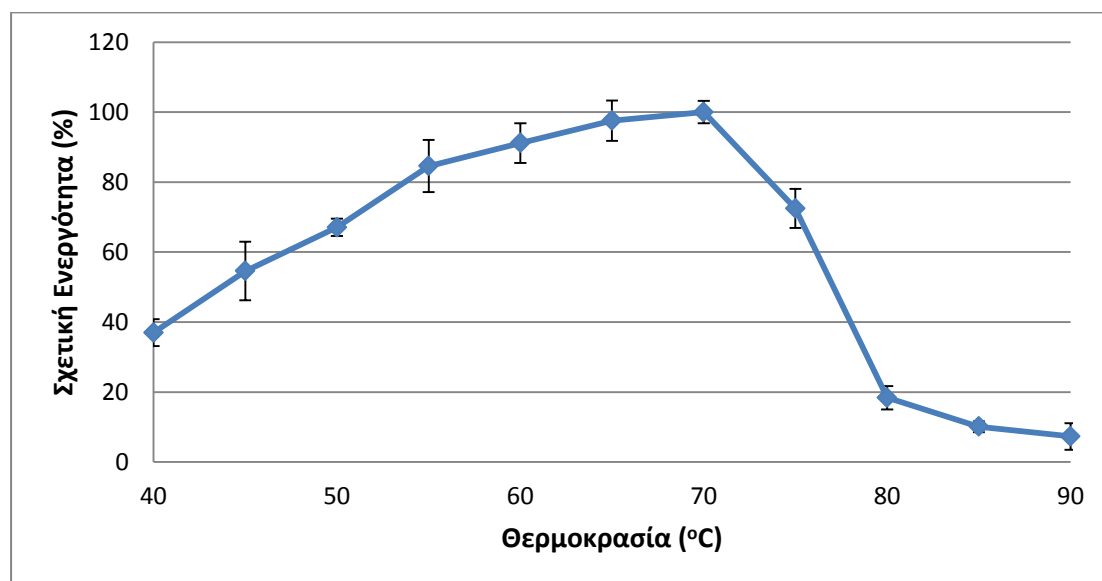


Διάγραμμα 1: Σχετική ενεργότητα σε κλιμακούμενες τιμές pH στους $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα βέλτιστο pH είναι το 5 ενώ μπορεί να λειτουργήσει μέχρι το pH 7 όπου διατηρεί την μισή ενεργότητα του.

4.3.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας

Γνωρίζοντας το βέλτιστο pH μελετάται η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Για τον υπολογισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας η πρότυπη αντίδραση επωάστηκε σε εύρος θερμοκρασιών 40 – 95°C, και μετρήθηκε η σχετική ενεργότητα. Ως 100% ορίστηκε η μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας που μετρήθηκε στους 70°C.

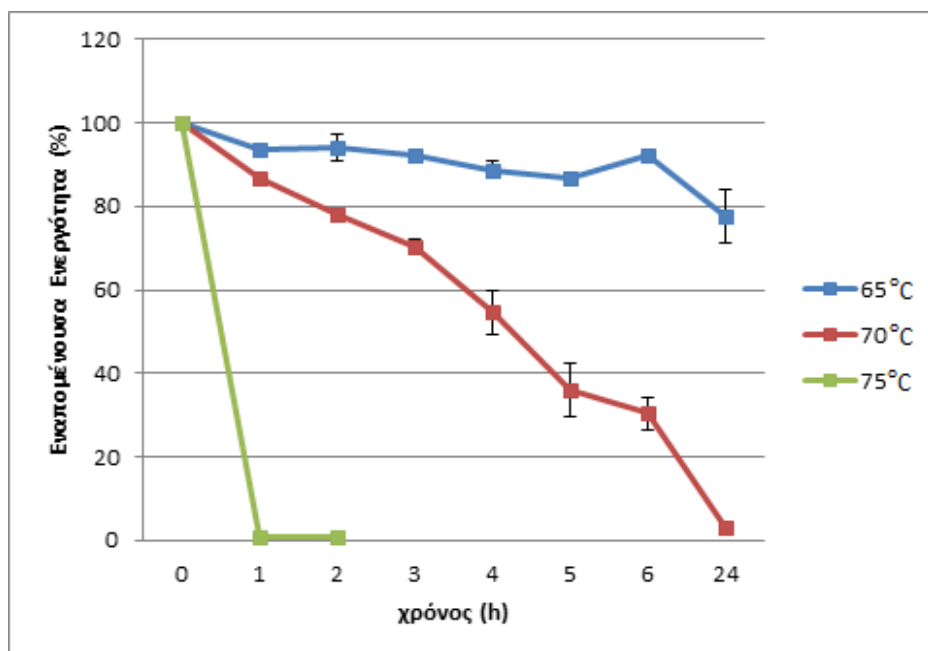


Διάγραμμα 2: Σχετική ενεργότητα σε κλιμακούμενες θερμοκρασίες

Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι στους 70 °C αν και παρουσιάζει εξίσου υψηλά ποσοστά ενεργότητας και στους 65 °C. Μετά τους 70 °C παρουσιάζεται απότομη πτώση της ενεργότητας οπότε στο συγκεκριμένο σημείο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στον χειρισμό της θερμοκρασίας.

4.3.3 Μελέτη θερμικής σταθερότητας

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο ένζυμο τρία μείγματα με 104,3μg/ml ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 50mM pH 5 τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασίες 65, 70 και 75 °C. Κάθε ώρα λαμβάνονταν δείγματα 20ml και προστίθενται στο μείγμα της πρότυπης αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό μετρήθηκε η εναπομένουσα σχετική ενεργότητα. Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου που δεν είχε υποστεί επώαση σε κάποια θερμοκρασία.

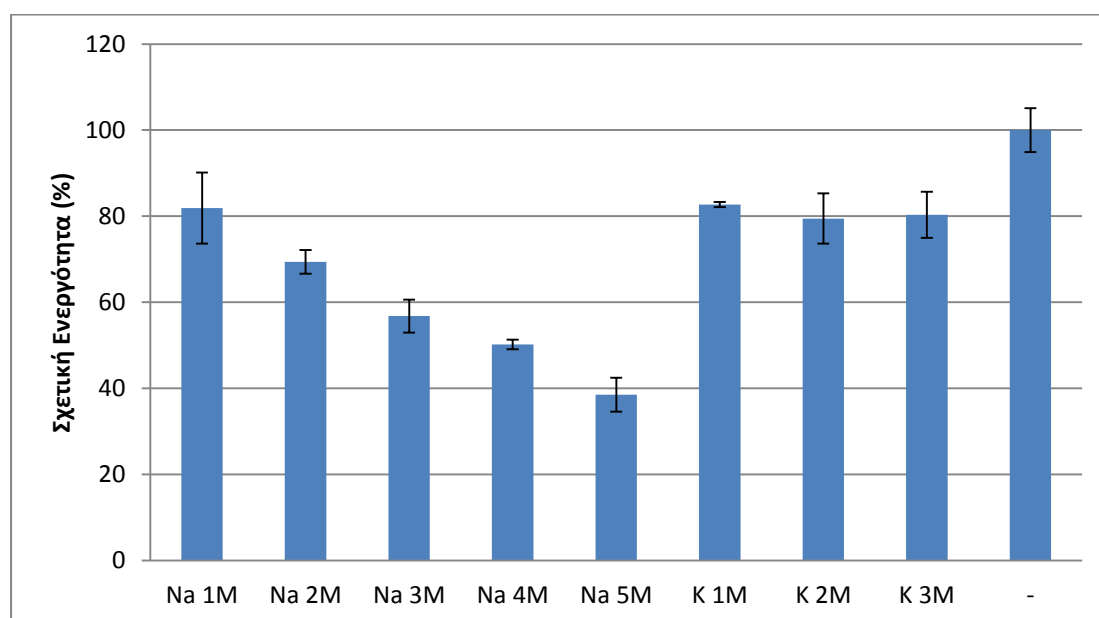


Διάγραμμα 3: Εναπομένουσα ενεργότητα μετά από επώαση για 24 ώρες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στον άξονα γ είναι σχετική ενεργότητα

Παρατηρείται ότι στους 65 °C είναι σταθερό μέχρι και 24h. Αντίθετα στους 70 °C όσο περνάει η ώρα η εναπομένουσα ενεργότητα μειώνεται. Τέλος στους 75 °C δεν παρατηρείται κάποια εναπομένουσα ενεργότητα ούτε μετά από 1h.

4.3.4 Μελέτη σταθερότητας παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του ενζύμου παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων και της επίπτωσης τους στην καταλυτική του ικανότητα πραγματοποιήθηκε το εξής πείραμα. Στα μείγματα της πρότυπης αντίδρασης προστέθηκαν κάθε φορά NaCl και KCl σε συγκεντρώσεις 1,2,3,4,5 M για το NaCl και 1,2,3,4 M για το KCl αντίστοιχα. Για τον υπολογισμό της σχετικής ενεργότητας ως 100% θεωρήθηκε η ενεργότητα που μετρήθηκε στην αντίδραση όπου δεν περιέχονταν άλατα.

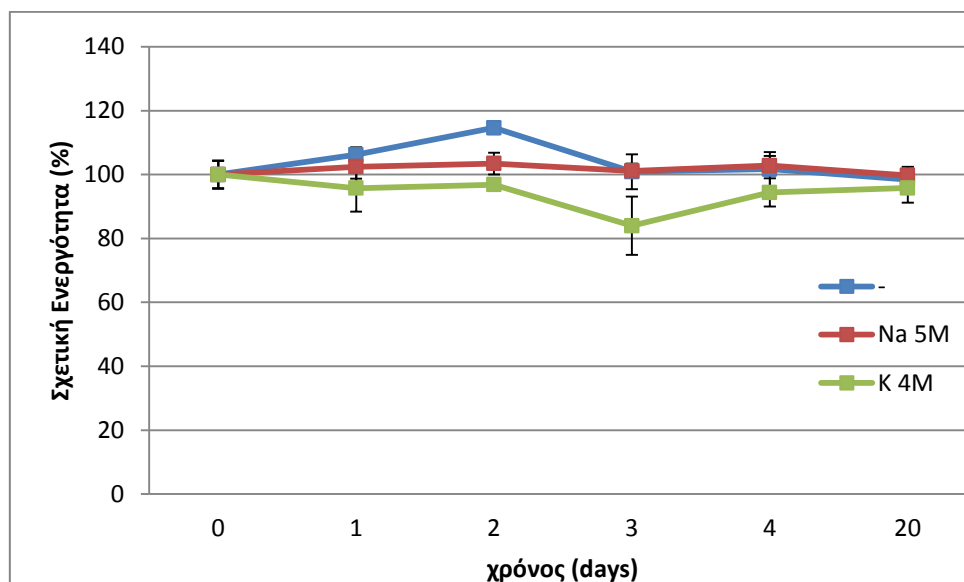


Διάγραμμα 4: Σχετική ενεργότητα της CelDZ1 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων.

Γενικά η παρουσία αλάτων μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του Na μειώνεται γραμμικά και η ενεργότητα. Στο K αντίθετα μετά από μία αρχική μείωση, η ενεργότητα παραμένει σταθερή περίπου στο 80%. Η στήλη - περιέχει την αντίδραση στην οποία δεν έχει προστεθεί αλάτι και αποτελεί το 100%.

Για τον προσδιορισμό της αντοχής της CelDZ1 σε άλατα πραγματοποιήθηκε το εξής πείραμα. 104,3 μg/ml ενζύμου αποθηκεύτηκαν σε νερό, 5M NaCl και 4M KCl σε

θερμοκρασία δωματίου για 20 μέρες. Κάθε μέρα λαμβανόταν 20μl δείγμα και μετρούνταν η εναπομένουσα ενεργότητα στην πρότυπη αντίδραση. Η σχετική ενεργότητα υπολογίστηκε με την μέθοδο του Δινιτροσαλικυλικού Οξέος λαμβάνοντας ως 100% την ενεργότητα του ενζύμου που δεν είχε υποστεί επώαση με άλατα.

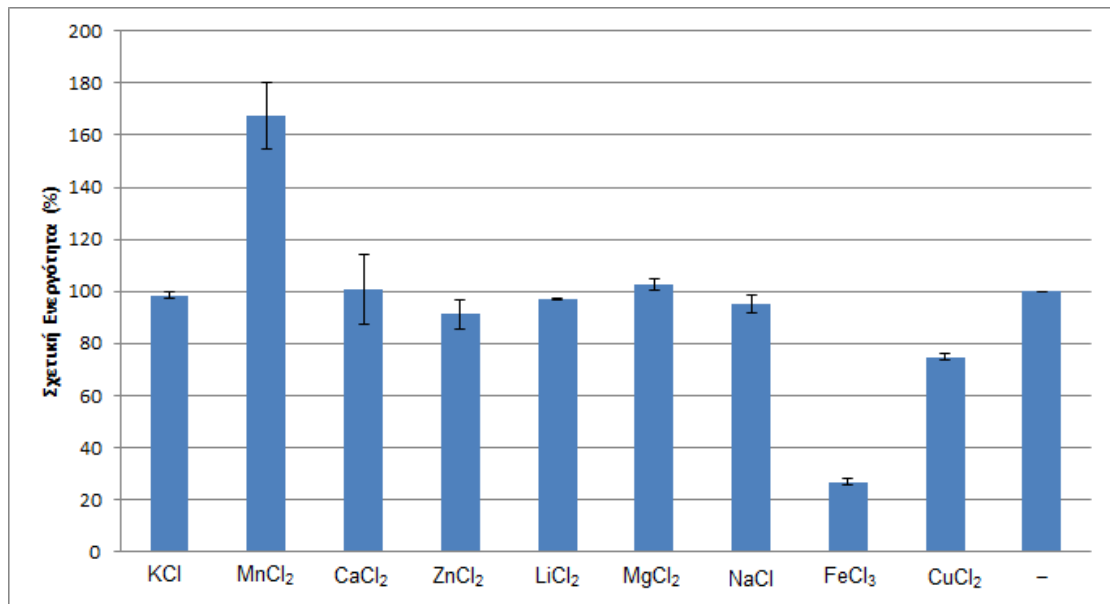


Διάγραμμα 5: Εναπομένουσα ενεργότητα ύστερα από επώαση σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων για 20 ημέρες

Ακόμα και μετά το πέρας 20 ημερών, το ένζυμο παραμένει ενεργό. Το ένζυμο το οποίο είχε επωαστεί σε υπερκαθαρό νερό απουσία αλάτων και σε θερμοκρασία δωματίου δεν χάνει την ενεργότητα του (καμπύλη -).

4.3.5 Μελέτη σταθερότητας παρουσία μετάλλων και αποδιατακτικών παραγόντων

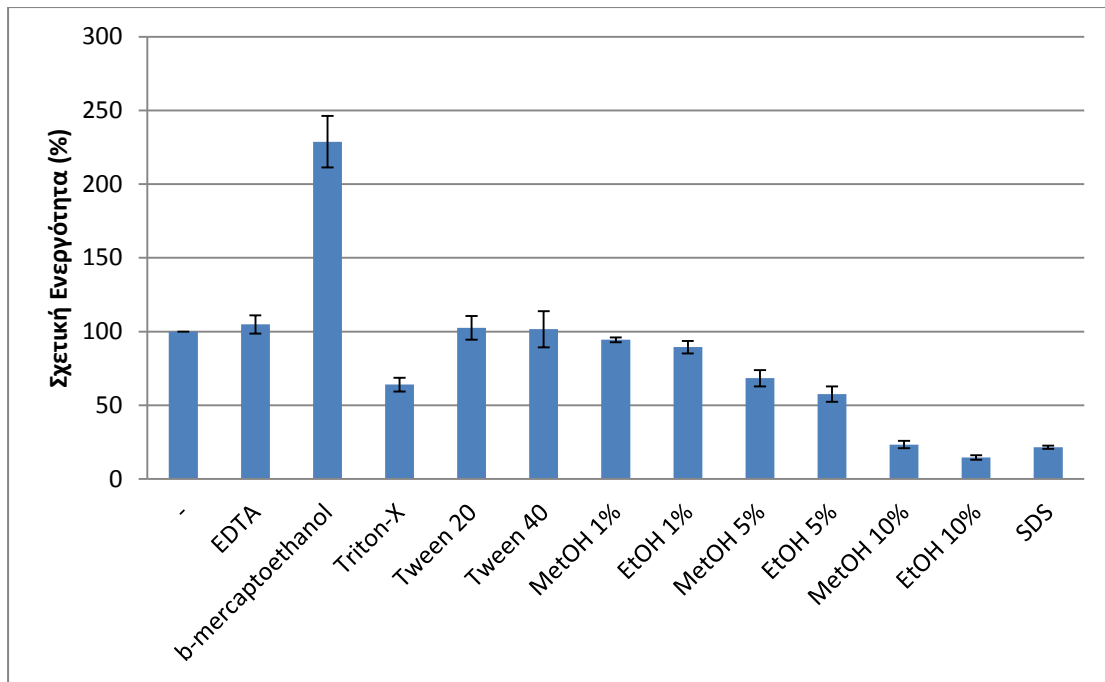
Για την μελέτη της επίδρασης μεταλλικών ιόντων στην καταλυτική ικανότητα του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη αντίδραση στην οποία προστέθηκαν άλατα μετάλλων σε συγκέντρωση 1mM. Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου που μετρήθηκε στην αντίδραση όπου δεν περιέχονταν μεταλλικά άλατα (στήλη – στο παρακάτω διάγραμμα).



Διάγραμμα 6: Σχετική ενεργότητα παρουσία 1mM ιόντων μετάλλων

Παρουσία ιόντων Mn^{2+} φαίνεται να ενισχύεται η δράση του ενζύμου ενώ παρουσία ιόντων Fe^{3+} μειώνεται δραστικά.

Για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων αποδιατακτικών παραγόντων όπως απορρυπαντικών και οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα του ενζύμου, οι χημικές ουσίες προστέθηκαν στην πρότυπη αντίδραση σε ποσοστό 1% v/v για τα απορρυπαντικά και 1%, 5% και 10% v/v για τους οργανικούς διαλύτες. Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε αντίδραση όπου δεν περιέχονταν αποδιατακτικοί παράγοντες (στήλη – στο διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Σχετική ενεργότητα παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων

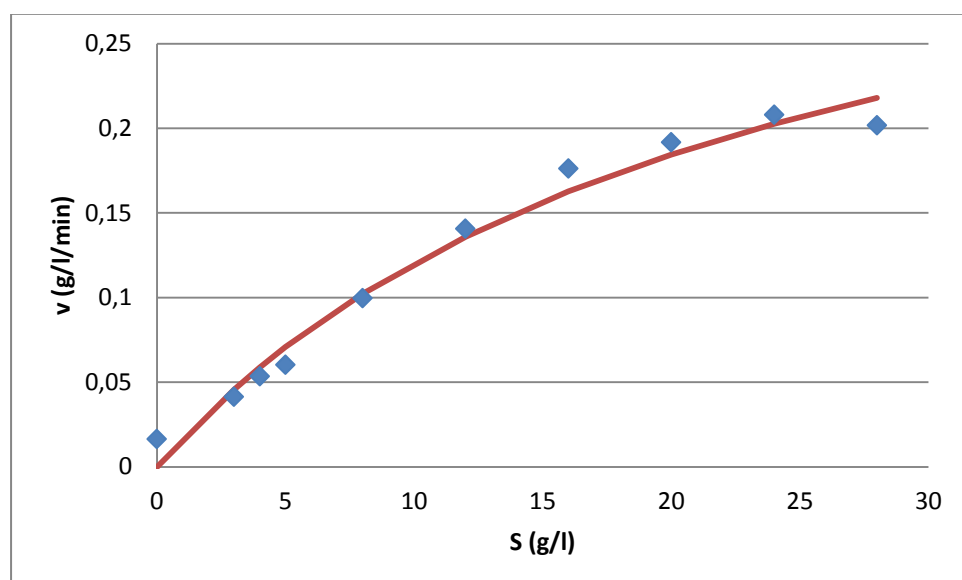
Παρατηρείται ενίσχυση της ενεργότητας (228%) παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Η ενίσχυση από τέτοιου είδους αναγωγικούς παράγοντες αποτελεί ένδειξη ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι πιθανό να βρίσκεται κυστεΐνη, παρόλα αυτά κάτι τέτοιο δεν ισχύει αφού στην αμινοξική αλληλουχία δεν περιέχονται κυστεΐνες. Παράλληλα η σταθερότητα παρουσία EDTA υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει κάποιο ιόν μετάλλου στο ενεργό κέντρο. Η διασαφήνιση των παραπάνω απαιτεί περαιτέρω ανάλυση με ακριβέστερες μεθόδους όπως κρυσταλλογραφία, η οποία είναι σε εξέλιξη. Τέλος παρουσία οργανικών διαλυτών παρατηρείται σταδιακή μείωση της ενεργότητας όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους. Από τα δεδομένα του διαγράμματος φαίνεται ότι η CelDZ1 είναι ενεργή μέχρι 5% v/v μεθανόλης και αιθανόλης καθώς διατηρεί λίγο πιο πάνω από το 50% της ενεργότητάς της.

4.3.6 Μελέτη κινητικών σταθερών

Θεωρήθηκε ότι η ενζυμική δράση ακολουθεί κινητική Michaelis – Menten οπότε υπολογίζονται οι σταθερές K_m και V_{max} . Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πρότυπες αντιδράσεις αλλάζοντας κάθε φορά την συγκέντρωση του υποστρώματος σε ένα εύρος από 3 – 28 g/l CMC. Οι πειραματικές συνθήκες προσαρμόστηκαν για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων. Συγκεκριμένα δεν επιτράπηκε η υδρόλυση πάνω από το 5% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος ώστε να ληφθεί γραμμική σχέση ανάμεσα στην παραγωγή προϊόντος και τον χρόνο αντίδρασης. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων προσαρμόζονται με μη γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση Michaelis – Menten με την βοήθεια του solver του excel. Η εξίσωση Michaelis – Menten περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$

Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στην θεωρητική καμπύλη και προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα ταχύτητας σε σχέση με την συγκέντρωση υποστρώματος. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός αύξησης της ταχύτητας σε σχέση με το υπόστρωμα μειώνεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Παρατηρείται καλή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην θεωρητική καμπύλη που προβλέπεται από την κινητική Michaelis-Menten. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του CMC αυξάνεται το ιξώδες και λόγω φαινομένων διάχυσης ίσως επηρεάζει τις κινητικές σταθερές αλλά και αυξάνει τα πειραματικά σφάλματα. Έτσι οι τιμές που υπολογίστηκαν αποτελούν μία ένδειξη της λειτουργίας του ενζύμου.

Με εφαρμογή του Solver λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

$$K_m=22,73 \pm 3,24 \text{ g/l}$$

$$v_{\max}=0,41 \pm 0,04 \text{ g/l/min}$$

Οι συγκεντρώσεις περιγράφονται σε g/L λόγω της φυσικής ανομοιογένειας του υποστρώματος.

4.3.7 Μελέτη εκλεκτικότητας σε διαφορετικά υποστρώματα

Για τη μελέτη διαφόρων υποστρωμάτων, στις πρότυπες αντιδράσεις αντικαταστάθηκε η καρβοξυ-μέθυλο-κυτταρίνη από άλλα υδατοδιαλυτά και μη υποστρώματα όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Για μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα επιλέχθηκε η Avicel και διηθητικό χαρτί (Whatman no1) για την οποία ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τα υπόλοιπα υποστρώματα αλλά η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε thermomixer με ανάδευση στα 1000rpm για 24h. Στις περιπτώσεις υποστρωμάτων τα οποία δεν εμφάνισαν ενεργότητα, επανελήφθησαν οι αντιδράσεις διπλασιάζοντας την ποσότητα του ενζύμου ενώ στα υδατοδιαλυτά υποστρώματα διπλασιάστηκε και ο χρόνος.

Υποστρώματα	Τύπου δεσμών	Διαλυτότητα	Ειδική Ενεργότητα (units/mg)
CMC	β-1,4 Γλυκοζιτικοί	διαλυτό	74.0 ± 9.5
β-D- γλουκάνη κριθαριού	β-1,4 Γλυκοζιτικοί	διαλυτό	589.0 ± 6.8
Κελλοβιόζη	β-1,4 Γλυκοζιτικοί	διαλυτό	μη μετρήσιμη
Λαμιναρίνη	β-1,3 Γλυκοζιτικοί	διαλυτό	μη μετρήσιμη
Γαλακτομαννάνη	β-1,4 μανοπυρανοζικοί	διαλυτό	μη μετρήσιμη
Πηκτίνη	α-1,4 γαλακτουρονικοί	διαλυτό	μη μετρήσιμη
Ξυλάνη σημούδας	β-1,4 ξυλοζιδικοί	διαλυτό	μη μετρήσιμη
Avicel	β-1,4 Γλυκοζιτικοί	μη διαλυτό	μη μετρήσιμη
Διηθητικό Χαρτί	β-1,4 Γλυκοζιτικοί	μη διαλυτό	μη μετρήσιμη

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μελέτης εκλεκτικότητας της CelDZ1 ως προς την υδρόλυση διαφόρων υποστρωμάτων.

Παρατηρείται ότι η CelDZ1 είναι ενεργή σε διαλυτά υποστρώματα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς όπως το CMC και η γλουκάνη. Αντίθετα δεν παρουσιάζει ενεργότητα στο αδιάλυτο υπόστρωμα (Avicel), δεν παρουσιάζει δράση β-γλυκοσιδάσης καθώς δεν παρουσιάζει ενεργότητα έναντι της κελοβιόζης και τέλος δεν μπορεί να υδρολύσει τους β-1,3 γλυκοζιτικούς δεσμούς της γλυκόζης στην λαμιναρίνη και της μαννόζης στην μαννάνη. Άρα η CelDZ1 παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα στην υδρόλυση των β-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Μετά από βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης εμπλουτισμένου μεταγονιδιωματικού δείγματος DNA, επιλέχθηκε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για περαιτέρω μελέτη. Κριτήρια επιλογής του αποτέλεσαν η σχετική ομολογία (59%) που παρουσίαζε η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία με μια χαρακτηρισμένη ενδογλουκανάση από τον οργανισμό *Bacillus akibai* [1]. Μετά την κλωνοποίηση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και την έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί σε *E. coli*, βρέθηκε μέσω πειραμάτων μελέτης της

λειτουργικότητας ότι το υπό μελέτη γονίδιο εκφράζει μια GH5 ενδογλουκανάση που ονομάστηκε CelDZ1a.

Δημιουργώντας τον κλώνο CelDZ1, που προέκυψε ως αποτέλεσμα αντικατάστασης της διαμεμβρανικής έλικας στο N τελικό άκρο της πρωτεΐνης με ένα επίτοπο εξιστιδίνης, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγόμενης ποσότητας διαλυτού ενζύμου ενώ μειώθηκε και το ποσοστό υποβάθμισης της πρωτεΐνης λόγω πρωτεόλυσης κατά το στάδιο παραγωγής της. Για τον λόγο αυτό, η πρωτεΐνη CelDZ1 επιλέχθηκε για τα πειράματα βιοχημικού χαρακτηρισμού.

Από τον βιοχημικό χαρακτηρισμό βρέθηκε ότι:

- Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου παρατηρούνται στους 70 °C και pH 5. Το pH 5 ως βέλτιστη τιμή είναι σύνηθες για τέτοιου είδους ένζυμα, παρόλα αυτά διαφέρει από την κοντινότερη σε ομολογία χαρακτηρισμένη ενδογλουκανάση η οποία δρα σε αλκαλικά pH.
- στους 65°C μετά από επώαση για 24h δεν παρατηρείται μείωση της ενεργότητας του ενζύμου ενώ στους 70 °C παρουσιάζει χρόνο ημιζωής περίπου 4,5h. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν την CelDZ1 μια κυτταρινάση καλής θερμοσταθερότητας για χρήση σε σχετικές εφαρμογές.
- Η CelDZ1 παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (ακόμα και στο σημείο κορεσμού) KCl και NaCl, τόσο κατά την επώαση της μέχρι και 20 ημέρες σε αυτά αλλά και κατά την παρουσία τους στην ενζυμική αντίδραση. Η ιδιότητα αυτή του ενζύμου είναι εξαιρετικά κρίσιμη σε εφαρμογές υδρόλυσης βιομάζας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την προκατεργασία της βιομάζας χρησιμοποιούνται ισχυρές βάσεις και οξέα τα οποία στη συνέχεια εξουδετερώνονται με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες αλάτων στο υλικό που προορίζεται για περεταίρω ενζυμική υδρόλυση. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μεταγονιδιωματικό δείγμα στο οποίο εντοπίστηκε το γονίδιο *celDZ1* δεν προέρχεται από οικοσύστημα υψηλής αλατότητας.
- Τα μεταλλικά ιόντα Mn^{2+} ενισχύουν την υδρολυτική δράση του ενζύμου ενώ τα ιόντα Fe^{3+} την μειώνουν. Η ενίσχυση της δράσης από τα ιόντα Mn^{2+}

μπορεί να οφείλεται στην πρόσδεση τους στο ενεργό κέντρο αλλά κάτι τέτοιο μένει να επιβεβαιωθεί από τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου η οποία είναι σε εξέλιξη.

- Κατά την μελέτη διαφορετικών αποδιατακτικών παραγόντων, βρέθηκε να ενισχύεται σημαντικά η δράση της CelDZ1 παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Παρουσία μεθανόλης και αιθανόλης σε συγκέντρωση 1% η δράση της CelDZ1 δεν επηρεάζεται ποιοτικά ενώ σε συγκέντρωση 5% μειώνεται στο 68% και 57% αντίστοιχα.
- Η CelDZ1 παρουσίασε εκλεκτικότητα σε υποστρώματα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (CMC, β-γλουκάνη) ενώ παρέμεινε ανενεργή σε υποστρώματα με διαφορετικούς δεσμούς (ξυλάνη, μαννάνη) καθώς και σε αδιάλυτα υποστρώματα (Anicel, διηθητικό χαρτί).

Βιβλιογραφία

1. Fukumori, F., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequence of the alkaline cellulase gene from the alkalophilic Bacillus sp. strain 1139*. Journal of general microbiology, 1986. **132**(8): p. 2329-2335.
2. Demirjian, D.C., F. Morís-Varas, and C.S. Cassidy, *Enzymes from extremophiles*. Current opinion in chemical biology, 2001. **5**(2): p. 144-151.
3. Van Den Burg, B., *Extremophiles as a source for novel enzymes*. Current opinion in microbiology, 2003. **6**(3): p. 213-218.
4. Sen, S. and L. Nilsson, *Thermostable Proteins: Structural Stability and Design*. 2011: CRC Press.
5. Querol, E., J.A. Perez-Pons, and A. Mozo-Villarias, *Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability*. Protein Engineering, 1996. **9**(3): p. 265-271.
6. Ward, O. and M. Moo-Young, *Thermostable enzymes*. Biotechnology advances, 1988. **6**(1): p. 39-69.
7. Schloss, P.D. and J. Handelsman, *Biotechnological prospects from metagenomics*. Current Opinion in Biotechnology, 2003. **14**(3): p. 303-310.
8. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 2013: Garland Science.
9. Streit, W.R. and R.A. Schmitz, *Metagenomics – the key to the uncultured microbes*. Current opinion in microbiology, 2004. **7**(5): p. 492-498.
10. Zarafeta Dimitra, e.a., *Discovery Of novel thermostable enzymes of industrial interest by metagenomic screening, in 16th European Congress on Biotechnology*. July 2014: Edinburgh Scotland.
11. Schmeisser, C., H. Steele, and W.R. Streit, *Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **75**(5): p. 955-962.
12. Cowan, D., et al., *Metagenomic gene discovery: past, present and future*. Trends in Biotechnology, 2005. **23**(6): p. 321-329.

13. Pérez, S. and D. Samain, *Structure and Engineering of Celluloses*, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, H. Derek, Editor. 2010, Academic Press. p. 25-116.
14. Stephen, A.M. and G.O. Phillips, *Food polysaccharides and their applications*. Vol. 160. 2014: CRC Press.
15. Pizzi, A. and N. Eaton, *The structure of cellulose by conformational analysis. 2. The cellulose polymer chain*. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry*, 1985. **22**(1): p. 105-137.
16. Lynd, L.R., et al., *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2002. **66**(3): p. 506-577.
17. Cowling, E.B. *Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials*. in *Biotechnology and bioengineering symposium*. 1975.
18. Blouin, F., L. Martin, and S. Rowland, *Gel-Permeation Properties of Cellulose Part III: Measurement of Pore Structure of Unmodified and of Mercerized Cottons in Fibrous Form*. *Textile Research Journal*, 1970. **40**(9): p. 809-813.
19. O'SULLIVAN, A.C., *Cellulose: the structure slowly unravels*. *Cellulose*, 1997. **4**(3): p. 173-207.
20. Gautam, S., et al., *A review on systematic study of cellulose*. 2010.
21. Mark, R.E., *Molecular and cell wall structure of wood*, in *Adhesion in Cellulosic and Wood-based Composites*. 1981, Springer. p. 7-51.
22. Zhang, Y.H.P. and L.R. Lynd, *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems*. *Biotechnology and bioengineering*, 2004. **88**(7): p. 797-824.
23. Juturu, V. and J.C. Wu, *Microbial cellulases: engineering, production and applications*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014. **33**: p. 188-203.
24. Henrissat, B. and G. Davies, *Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases*. *Current opinion in structural biology*, 1997. **7**(5): p. 637-644.

25. Bayer, E.A., et al., *Cellulose, cellulases and cellulosomes*. Current opinion in structural biology, 1998. **8**(5): p. 548-557.
26. Davies, G. and B. Henrissat, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*. Structure, 1995. **3**(9): p. 853-859.
27. Bhat, M. and S. Bhat, *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*. Biotechnology advances, 1997. **15**(3): p. 583-620.
28. Zhang, Y.H.P. and L.R. Lynd, *A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase*. Biotechnology and bioengineering, 2006. **94**(5): p. 888-898.
29. Zhang, X.-Z. and Y.-H.P. Zhang, *Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications*. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, 2013: p. 131-146.
30. Eriksson, K.-E.L., R.A. Blanchette, and P. Ander, *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. 1990: Springer-verlag.
31. Juturu, V. and J.C. Wu, *Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications*. Biotechnology advances, 2012. **30**(6): p. 1219-1227.
32. Delgado, O.D., et al., *Chromosomal integration and expression of green fluorescent protein in Zymomonas mobilis*. Biotechnology letters, 2002. **24**(15): p. 1285-1290.
33. Linger, J.G., W.S. Adney, and A. Darzins, *Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by Zymomonas mobilis*. Applied and environmental microbiology, 2010. **76**(19): p. 6360-6369.
34. Kuhad, R.C., R. Gupta, and A. Singh, *Microbial cellulases and their industrial applications*. Enzyme research, 2011. **2011**.
35. Harman, G.E. and C.P. Kubicek, *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Vol. 2. 2002: CRC Press.
36. Baker, R.A. and L. Wicker, *Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry*. Trends in Food Science & Technology, 1996. **7**(9): p. 279-284.
37. Singh, A., R.C. Kuhad, and O.P. Ward, *Industrial application of microbial cellulases*. Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, 2007: p. 345-358.

38. Grassin, C. and P. Fauquembergue, *Enzymes, fruit juice processing*. Encyclopedia of Bioprocess Technology, 2009.
39. Chen, R., *Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond*. Biotechnology advances, 2012. **30**(5): p. 1102-1107.
40. Shuler, M.L. and F. Kargi, *Bioprocess engineering*. 2002: Prentice Hall New York.
41. Sørensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. Journal of biotechnology, 2005. **115**(2): p. 113-128.
42. Hannig, G. and S.C. Makrides, *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*. Trends in Biotechnology, 1998. **16**(2): p. 54-60.
43. Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(5): p. 411-421.
44. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.