

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Ετερόλογη έκφραση και
χαρακτηρισμός μιας κατεχολ-
οξειδωσης από το θερμόφιλο μύκητα
Myceliophthora thermophila

Καραγιαννάκη Ιωάννα

Επιβλέπων: Ε. Τόπακας, Επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο εφαρμοσμένης βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την στήριξη και την βοήθεια που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια της πραγματοποίησης της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Νικολάιβιτς Ευστράτιο για την αδιάλειπτη βοήθεια και συνεισφορά του σε όλα τα στάδια της εκτέλεσης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας της σχολής για την αρμονική συνεργασία κατά τη παραμονή μου στο εργαστήριο.

Καραγιαννάκη Ιωάννα
Αθήνα, Φεβρουάριος 2016

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση ενός γονιδίου (MtOx60685) του ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila* που κωδικοποιεί μία κατεχολοξειδάση, η έκφραση του στη ζύμη *Pichia Pastoris*, καθώς και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του παραγόμενου ενζύμου.

Καθώς το γονίδιο που απομονώθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) από το γενωμικό DNA του μύκητα περιείχε ένα εσώνιο, ακολούθησε *in vitro* μάτισμα του με τη μέθοδο της Splicing by Overlapping Extension PCR, όπου πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των δύο κωδικοποιουσών περιοχών το γονιδίου. Μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επικάλυψης/επέκτασης πραγματοποιήθηκε παραγωγή τμημάτων DNA που προέρχονταν από τη συνένωση των δύο αυτών περιοχών. Έπειτα, η επιθυμητή αλληλουχία απομονώθηκε και εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA και μετά τη γραμμικοποίηση του, ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση.

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τα μετασχηματισμένα στελέχη μελετήθηκε στον εξωκυτταρικό χώρο, παρουσιάζοντας τη μέγιστη ενεργότητα την 4^η μέρα καλλιέργειας σε υπόστρωμα κατεχίνης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη για τη βελτιστοποίηση των καλλιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού, με μέγιστη ενεργότητα να παρουσιάζεται για συγκέντρωση χαλκού 25 μ M.

Μετά τον καθαρισμό του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου, όπου εμφανίστηκαν παραπάνω από μία ζώνες. Η ζώνη που εμφανίστηκε στα 47 kDa ανήκει στην MtOx60685, ενώ οι παραπάνω ζώνες θεωρείται ότι αντιστοιχούν σε διαφορετικές γλυκοζυλιώσεις της πρωτεΐνης.

Με σκοπό την εύρεση της δράσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διάφορα υποστρώματα. Από τα υποστρώματα αυτά, μέγιστη ενεργότητα παρατηρήθηκε ποιοτικά στο υπόστρωμα 4-χλωροκατεχόλη, ενώ παρατηρήθηκε δράση σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, όπως στην κατεχίνη, στην επικατεχίνη, στη γουαιακόλη και στη L-τυροσίνη μετά από προσθήκη L- ντοπαμίνης. Εφόσον η ενεργότητα του ενζύμου σε

μονοφαινολικά υποστρώματα ήταν μηδαμινή, το ανασυνδυασμένο ένζυμο χαρακτηρίστηκε ως κατεχολοξειδάση.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό του ανασυνδυασμένου ενζύμου, η βέλτιστη θερμοκρασία υπολόγίστηκε στους 65 °C και βέλτιστο pH δράσης το 7.5 σε υπόστρωμα 4-χλωροκατεχόλη. Αναφορικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη είναι αρκετά θερμοσταθερή στους 40 °C (πάνω από 90% μετά από 24 h) ενώ ύστερα από επώαση στους 50 °C για μία ημέρα χάνει 60% της ενεργότητάς του. Μετά από επώαση στους 60 °C η πρωτεΐνη χάνει περίπου το 75% της ενεργότητας μετά το πέρας των 5 h, ενώ στους 70 °C από τη πρώτη μισή ώρα χάνεται το 90% της ενεργότητας.

Abstract

The purpose of the present diploma thesis is the isolation of a gene (MtOx60685) from the ascomycete *Myceliophthora thermophila* which encodes a catechol oxidase, the expression of this protein in the yeast *Pichia Pastoris* and the biochemical characterization of the produced enzyme.

As the gene was isolated using the polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA of the fungus which contained an intron, the in vitro splicing with the method of Overlapping Extension PCR followed, during which the amplification of the two coding regions in the gene was performed. The overlap / extension polymerase chain reaction method was used in the production of DNA fragments derived from the junction of these two regions. The desired sequence was isolated and inserted into the pPICZαA vector and after linearization of the recombinant plasmid, the procedure of transformation of the cells of the yeast *P. pastoris* by electroporation took place.

The expression of the recombinant protein from the transformed colonies was studied in the extracellular space, showing the maximum activity of the culture on day 4, using catechin as substrate. Additionally, a study was also conducted in order to optimize the copper concentration of the cultures, where the maximum activity occurs on copper concentration of 25 μM.

The result of the purification was evaluated using polyacrylamide gel electrophoresis revealing more than one bands. The band that appeared at 47 kDa belongs to MtOx60685, while the rest bands correspond to different glycosylations of the protein.

In order to determine the enzyme activity, assays were performed on various substrates. Out of these substrates, the maximum activity was observed qualitatively in 4-chlorocatechol, while activity in general was observed over a wide range of substrates, such as catechin, epicatechin, guaiacol and L- tyrosine after adding L- dopamine. Since the activity in mono-phenolic substrates was minimal, the recombinant enzyme was characterized as catechol oxidase.

The optimal temperature of action was calculated at 65 °C and the optimal pH of action 7.5 in 4- chlorocatechol. With respect to the thermal stability of the enzyme it was

observed that the protein is sufficiently thermostable at 40 °C (more than 90% after 24 h) and after incubation at 50 °C for one day it loses 60% of its activity. After incubation at 60 °C the protein loses about 75% of its activity in 5 h, while at 70 °C after the first half hour 90% of its activity is lost.

Περιεχόμενα

1.	Θεωρητικό Μέρος.....σελ.12
1.1	Φαινολοξειδάσες.....σελ.14
1.2	Κατεχολοξειδάση και Τυροσινάση.....σελ.14
1.3	Φυσική Δράση κατεχολοξειδάσης και τυροσινάσης.....σελ.16
1.4	Ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών χαλκού (Active sites of copper containing enzymes).....σελ.17
1.5.	Χαρακτηριστικά δομής.....σελ.18
1.5.1.	Χαρακτηριστικά της Δομής κατεχολοξειδάσης στις 3–Διαστάσεις.....σελ.18
1.5.2.	Χαρακτηριστικά της Δομής τυροσινάσης στις 3 – Διαστάσεις.....σελ.21
1.5.3.	Σύγκριση δομής τυροσινασών και κατεχολοξειδασών.....σελ.23
1.6	Μηχανισμός Δράσης.....σελ.27
1.6.1.	Κατεχολοξειδάση.....σελ.28
1.6.2.	Τυροσινάση.....σελ.28
1.7.	Εφαρμογές.....σελ.30
1.7.1.	Πολυφαινολοξειδάσες ως βιοκαταλύτες.....σελ.30
1.7.2.	Βιοεπανόρθωση των λυμάτων.....σελ.31
1.7.3.	Εφαρμογές στα τρόφιμα.....σελ.32
1.7.3.1.	Άναπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων....σελ.33
1.7.3.2.	Αντιδράσεις cross – linking.....σελ.33
1.7.4.	Παραγωγή βαφών.....σελ.34
1.7.5.	Βιοαισθητήρες.....σελ.35
1.7.6.	Υλικά.....σελ.35
2.	Πειραματικό Μέρος.....σελ.38
2.1	Υλικά.....σελ.40
2.1.1	Μικροοργανισμοί.....σελ.40
2.1.1.1.	<i>Escherichia coli</i>σελ.40
2.1.1.2.	<i>Pichia Pastoris</i>σελ.40
2.1.2	Θρεπτικά Μέσα.....σελ.42
2.1.3	Χημικά Αντιδραστήρια – Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων (kits)σελ.44
2.1.4.	Στήλες Χρωματογραφίας.....σελ.44
2.1.5.	Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης.....σελ.44

2.1.5.1. pCR® Blunt (Invitrogen).....σελ.44	σελ.44
2.1.5.2 pPICZaA (Invitrogen)σελ.45	σελ.45
2.1.6. Περιοριστικά Ένζυμα.....σελ.46	σελ.46
2.1.7. Εκκινητές (Primers)σελ.48	σελ.48
2.2 Μοριακές Τεχνικές.....σελ.50	σελ.50
2.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....σελ.50	σελ.50
2.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....σελ.54	σελ.54
2.2.3. Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)σελ.57	σελ.57
2.2.3.1. Συνένωση πλασμιδίου PCR Blunt – προϊόντος PCR.....σελ.57	σελ.57
2.2.3.2. Συνένωση πλασμιδίου pPICZaA – τμημάτων DNA.....σελ.58	σελ.58
2.2.4. Πέψη DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες.....σελ.59	σελ.59
2.2.5. Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)σελ.61	σελ.61
2.2.6. Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων.....σελ.61	σελ.61
2.2.6.1. Μετασχηματισμός των κυττάρων <i>E. coli</i> TOP10.....σελ.61	σελ.61
2.2.6.2. Μετασχηματισμός των κυττάρων <i>Pichia pastoris</i> X33.....σελ.62	σελ.62
2.3 Παραγωγή και παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....σελ.65	σελ.65
2.3.1 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....σελ.65	σελ.65
2.3.2 Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε εργαστηριακής κλίμακας καλλιέργειες <i>P. pastoris</i>σελ.65	σελ.65
2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών και μέτρηση ενεργότητας παραγόμενου ενζύμου.....σελ.66	σελ.66
2.3.4. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών.....σελ.67	σελ.67
2.3.5. Ηλεκτροφόρηση SDS πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).....σελ.69	σελ.69
2.3.6. Βελτιστοποίηση καλλιιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού.....σελ.73	σελ.73
2.3.7. Απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoH.....σελ.74	σελ.74
2.4 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός.....σελ.76	σελ.76
2.4.1. Ζυμογράφημα (Activity Staining)σελ.76	σελ.76
2.4.2. Επιλεκτικότητα Υποστρώματος.....σελ.76	σελ.76
2.4.3. Προσδιορισμός Βέλτιστης Θερμοκρασίας (T_{opt}).....σελ.77	σελ.77
2.4.4. Προσδιορισμός Βέλτιστου pH (pH_{opt}).....σελ.77	σελ.77

2.4.5. Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability).....σελ.78	σελ.78
3. Αποτελέσματα.....σελ.80	σελ.80
3.1. Ετερόλογη έκφραση.....σελ.82	σελ.82
3.1.1. Ενίσχυση του γονιδίου MtOx60685 του <i>M. thermophila</i> με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....σελ.82	σελ.82
3.1.2. Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA και μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i>σελ.86	σελ.86
3.1.3. Επιλογή κλώνου για έκφραση και παραγωγή της MtOx60685.....σελ.87	σελ.87
3.1.4. Βελτιστοποίηση καλλιιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού.....σελ.89	σελ.89
3.1.5. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεΐνης.....σελ.30	σελ.30
3.1.6. Απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoH.....σελ.91	σελ.91
3.1.7. Ζυμογράφημα (Activity Staining).....σελ.92	σελ.92
3.2. Χαρακτηρισμός της ανασυνδιασμένης κατεχολοξειδάσης.....σελ.93	σελ.93
3.2.1. Επιλεκτικότητα Υποστρώματος.....σελ.93	σελ.93
3.2.2. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης.....σελ.98	σελ.98
3.2.3. Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης.....σελ.99	σελ.99
3.2.4. Μελέτη θερμικής σταθερότητας ενζύμου.....σελ.100	σελ.100
4. Συμπεράσματα.....σελ.102	σελ.102
4.1. Προτάσεις για το μέλλον.....σελ.107	σελ.107
5. Βιβλιογραφία.....σελ.108	σελ.108

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Φαινολοξυδάσες

Η οξείδωση των οργανικών υποστρωμάτων με μοριακό οξυγόνο υπό ήπιες συνθήκες αποτελεί μία αντίδραση μεγάλου ενδιαφέροντος για βιομηχανικές και συνθετικές διαδικασίες τόσο από οικονομική και όσο και από περιβαλλοντική άποψη. Παρά το γεγονός ότι η αντίδραση των οργανικών ενώσεων με οξυγόνο ευνοείται θερμοδυναμικά, παρεμποδίζεται κινητικά λόγω της τριπλής θεμελειώδης κατάστασης του O_2 . Η σύνθεση και η διερεύνηση ενός λειτουργικού μοντέλου για μεταλλοένζυμα που έχουν δράση οξειδάσης ή οξυγενάσης, αποτελεί ελπιδοφόρο σενάριο για την ανάπτυξη νέων και αποτελεσματικών καταλυτών για αντιδράσεις οξείδωσης (Pavel Gentschev et al., 2000).

Οι φαινολοξυδάσες ανήκουν στην ομάδα πρωτεϊνών χαλκού τύπου – 3. Οι φαινολοξυδάσες είναι οξειδοαναγωγικά ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: τις τυροσινάσες - κατεχολοξειδάσες και τις λακκάσες. Και οι δύο αυτές ομάδες αντιδρούν με το οξυγόνο, χωρίς να χρειάζονται συμπαράγοντες (Nelson Durán et al., 2000).

1.2. Κατεχολοξειδάση και Τυροσινάση

Η κατεχολοξειδάση και η τυροσινάση είναι μεταλλοένζυμα, τα οποία περιέχουν ιόντα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο και καταλύουν την οξείδωση των υποκατεστημένων φαινολών, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Και τα δύο ένζυμα εμπλέκονται στην αρχική βαθμίδα σύνθεσης μελανίνης από την οξείδωση των φαινολών.

Η τυροσινάση είναι ικανή να καταλύσει δύο δράσεις:

- a) Την υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (δραστικότητα κρεολάσης) και
- b) την επακόλουθη οξείδωση των προκυττωσών ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δραστικότητα κατεχολάσης).

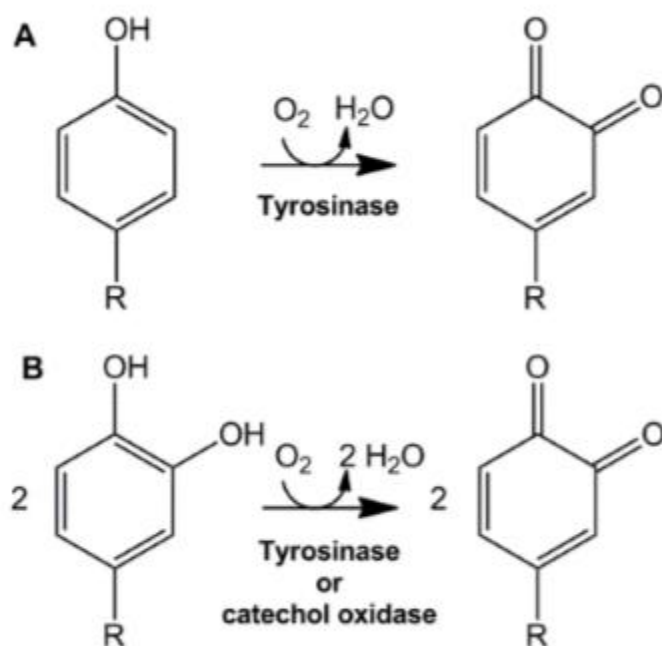
Και οι δύο παραπάνω δράσεις απαιτούν μοριακό οξυγόνο. Στη συνέχεια, οι ο-κινόνες υφίστανται μη ενζυματικές αντιδράσεις με διάφορα πυρηνόφιλα και παράγουν

ενδιάμεσα τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστικές - σκούρο καφέ - αποχρώσεις (Sonia Halaoui et al., 2006).

Αντίθετα, η κατεχολοξειδάση έχει την ικανότητα να οξειδώνει μόνο τις ο- διφαινόλες σε ο- κινόνες (δεύτερη δράση), αλλά όχι να καταλύει την οξείδωση των μονοφαινολών (Sanchez-Amat & Solano 1997) (Εικόνα 1.1.).

Παρά τη μεγάλη βιολογική, ιατρική και οικονομική σημασία των δύο αυτών ενζύμων, η μοριακή βάση της λειτουργικής διάκρισης τους είναι ακόμα ασαφής (Even Solem et al., 2016).

Οι κατεχολοξειδάσες και οι τυροσινάσες, ειδικότερα αυτές που προέρχονται από φυτά, συχνά καλούνται πολυφαινολικές οξειδάσες (PPOs).



Εικόνα 1.1.: Καταλυόμενη οξείδωση φαινολικών από τυροσινάση (Α και Β) και από κατεχολοξειδάση (Β).

Η τυροσινάση εμφανίζεται ευρέως στα θηλαστικά, στα ασπόνδυλα, στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, στα οποία εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες (Van Gelder et al. 1997). Η πρώτη μυκητιακή τυροσινάση απομονώθηκε από το μανιτάρι *Agaricus bisporus* (AbT) (Nakamura et al. 1966) και η πρώτη βακτηριακή τυροσινάση από το *Streptomyces glaucescens* (Lerch & Ettinger 1972).

Οι λίγες κατεχολοξειδάσες που έχουν χαρακτηριστεί προέρχονται από φυτά και μύκητες. Δεν υπάρχουν αναφορές για κατεχολοξειδάσες βακτηριακής ή θηλαστικής προέλευσης. Όλες οι γνωστές κατεχολοξειδάσες είναι ενδοκυτταρικά ένζυμα. Χαρακτηρισμένες κατεχολοξειδάσες έχουν απομονωθεί από το φυτό *Ipomea batatas* (Eicken et al., 1998), από το φυτό *Lycopus europaeus* (Rompel et al., 1999), από το *Melissa officinalis* (Rompel et al., 2012) και από το *Coreopsis grandiflora* (Cornelia Kaintz et al., 2014). Όσο αναφορά τους μύκητες, μία πολυφαινολοξειδάση από το μύκητα *Alternaria tenuis* έχει χαρακτηριστεί ως κατεχολοξειδάση (Motoda, 1979a, Motoda, 1979b).

1.3. Φυσική Δράση κατεχολοξειδάσης και τυροσινάσης

Όπως αναφέρθηκε, η κατεχολοξειδάση και η τυροσινάση είναι τα βασικά ένζυμα στις πρώτες αντιδράσεις της μελανογένεσης, δηλαδή του σχηματισμού μελανίνης. Οι μελανίνες εμπλέκονται σε πολλές βιολογικά βασικές λειτουργίες όπως μελάγχρωση και άμυνα σε ξενιστές. Στα θηλαστικά, η μελανογένεση σχετίζεται με την χρώση των μαλλιών, του δέρματος, και των ματιών. Μία δραστηριότητα της τυροσινάσης σε βακτήρια είναι η συμμετοχή της στην αποτοξικοποίηση των φαινολικών ενώσεων (Borthakur et al., 1987). Επιπλέον, οι σχηματιζόμενες μελανίνες εμποδίζουν την αφυδάτωση των κυττάρων (Coayne & Al-Harhi, 1992).

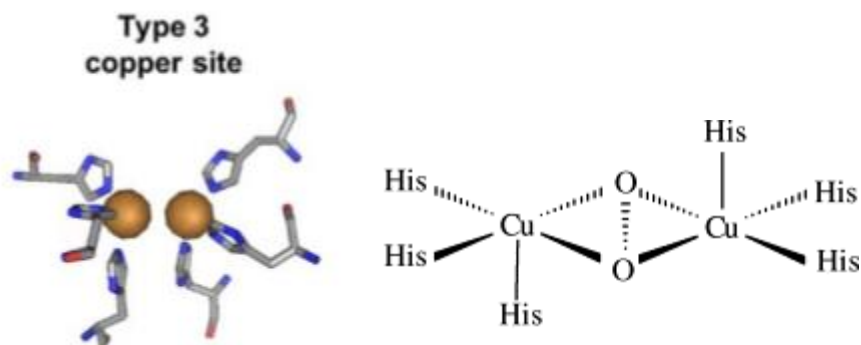
Στα φυτά, οι μελανίνες συμβάλλουν στο σχηματισμό φραγμών, ή συμμετέχουν σε αντιδράσεις αλκυλίωσης μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των πρωτεϊνών, ή ακόμη συμβάλλουν στη δημιουργία ενός τοξικού περιβάλλοντος για τον εισβολέα (Walker & Ferrar, 1998). Επιπλέον, τόσο η κατεχολοξειδάση όσο και η τυροσινάση, μπορούν να συμβάλουν στο σχηματισμό μελανινών κατεχόλης. Οι μελανίνες αυτές είναι ειδικές μελανίνες, οι οποίες παράγονται σε φυτά, και σχηματίζονται από παράγωγα κινονών κατεχόλης, προστατεύοντας το φυτό από παθογόνους οργανισμούς και έντομα (Dervall, 1961, Felton et al., 1989, Bi & Felton, 1995, Melo et al., 2006). Στα έντομα, οι μελανίνες εμπλέκονται στην άμυνα του οργανισμού και στις διαδικασίες επούλωσης πληγών (Sugumaran, 2002).

Στους μύκητες, η μελανίνη χρησιμεύσει ως μηχανισμός αντίστασης, καθώς και ως μηχανισμός άμυνας έναντι της μολυσματικότητας (Soler-Rivas et al. 1997, Jacobson 2000). Επιπλέον, συμβάλλει στην αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων ενάντια σε υδρολυτικά ένζυμα (Bell & Wheeler 1986). Επίσης, οι εξωκυτταρικές τυροσινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό και στην αποτοξικοποίηση των φυτικών φαινολικών ενώσεων (Sjoblad & Bollag 1981).

1.4. Ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών χαλκού (Active sites of copper containing enzymes)

Όπως αναφέρθηκε η κατεχολοξειδάση και η τυροσινάση, περιέχουν ιόντα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο. Τα ιόντα αυτά συντονίζονται με κατάλοιπα ιστιδίνης (His). Ο προσδιορισμός των ενεργών κέντρων βασίζεται στο συντονισμό των ιόντων χαλκού (Solomon et al., 2001). Τόσο η τυροσινάση, όσο και η κατεχολοξειδάση, ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών PF00264 και περιέχουν ένα ζεύγος ιόντων χαλκού, δηλαδή, μία τύπου-3 (T3) περιοχή χαλκού (Εικόνα 1.2.). Μία περιοχή χαλκού T3 περιέχει ένα ζευγάρι δύο αντισιδηρομαγνητικών ιόντων χαλκού που ονομάζονται CuA και CuB. Κάθε ιόν χαλκού συντονίζεται από τα τρία κατάλοιπα ιστιδίνης. Η T3 περιοχή χαλκού παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης σε μήκη κύματος 330 έως 345 nm (Jolley et al., 1974). Μία περιοχή T3 υπάρχει επίσης και στις αιμοκυανίνες (Cuff et al. 1998).

Το ενεργό κέντρο της κατεχολοξειδάσης και της τυροσινάσης υπάρχουν σε διάφορες μορφές κατά την διάρκεια του καταλυτικού κύκλου: δυο οξειδωμένες μορφές, οξυ – μορφή ($[\text{Cu (II)} - \text{O}_2^2 - \text{Cu (II)}]$) και μετα - μορφή ($[\text{Cu (II)} - \text{OH}^- - \text{Cu (II)}]$), και μία ασταθής δεοξυ-μορφή ($[\text{Cu(I) Cu(I)}]$) (Klabunde et al. 1998, Matoba et al. 2006).



Εικόνα 1.2.: Η δομή της T3 περιοχής χαλκού. Τα ιόντα χαλκού παρουσιάζονται με καφέ χρώμα.

1.5. Χαρακτηριστικά δομής

Η πρωτοταγής δομή της κατεχολοξειδάσης και της τυροσινάσης συνήθως σχηματίζεται από τρεις περιοχές: ένα N-τελικό άκρο, μια κεντρική καταλυτική περιοχή (ενεργό κέντρο), και ένα C-τελικό άκρο. Η κεντρική καταλυτική περιοχή περιέχει τα προστατευμένα κατάλοιπα ιστιδίνης, τα οποία όπως αναφέρθηκε βρίσκονται σε συντονισμό με τα ιόντα χαλκού της T3 περιοχής χαλκού. Το οξυγόνο συνδέεται ως υπεροξείδιο σε μία πλευρική γεφύρωση συντονισμού (Even Solem et al., 2016).

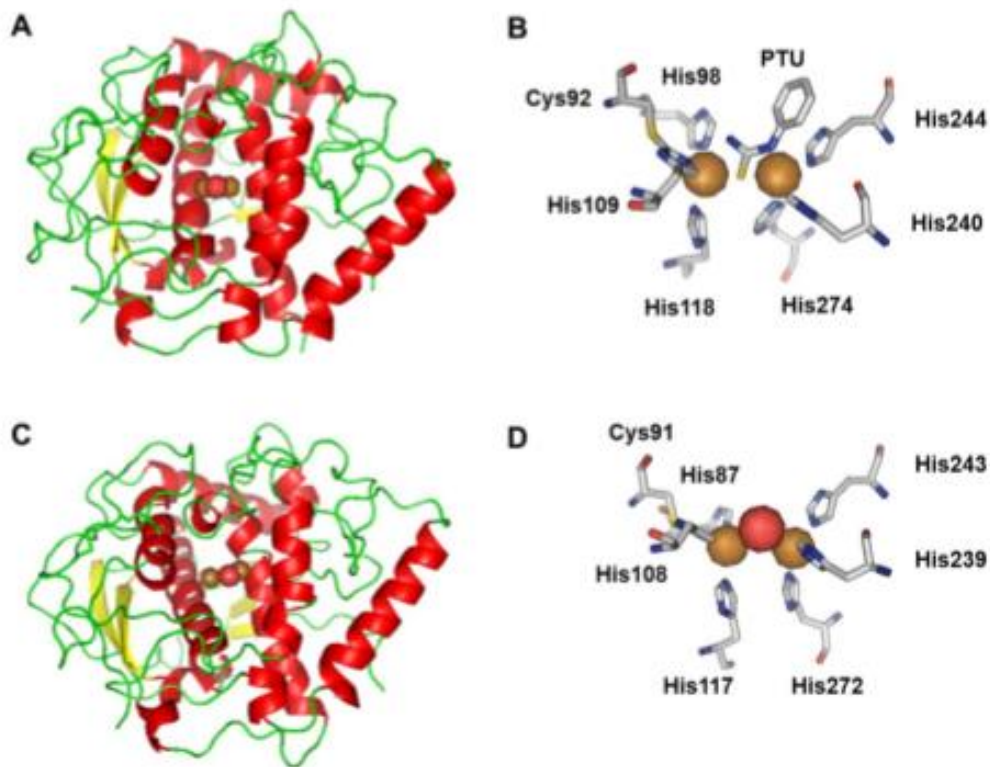
1.5.1. Χαρακτηριστικά της Δομής κατεχολοξειδάσης στις 3 – Διαστάσεις

Δύο κρυσταλλικές δομές από κατεχολοξειδάσες προερχόμενες από φυτά είναι γνωστές, από τη πατάτα *I. batatas* (IbCO) (Klabunde et al. 1998) και από το αμπέλι *Vitis vinifera* (VnCO) (Virador et al. 2009) (Εικόνα 1.3.). Επιπλέον, γνωστή είναι και η δομή μίας κατεχολοξειδάσης του μύκητα *Aspergillus oryzae* (AoCO4) (Hakulinen N. et al., 2013) (Εικόνα 1.4.).

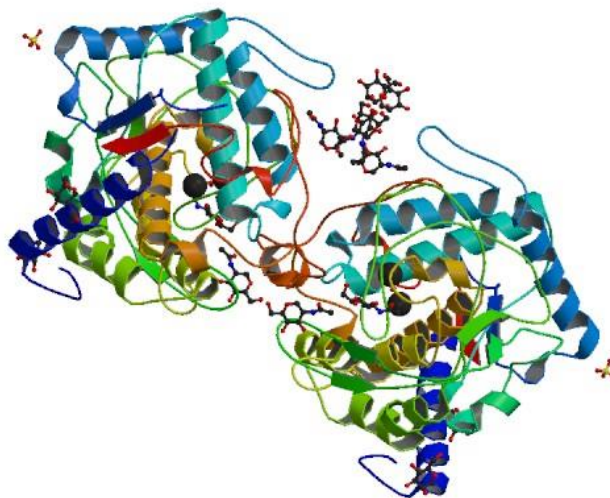
Η τρισδιάστατη δομή της κατεχολοξειδάσης IbCO φανερώνει ότι πρόκειται για ένα μονομερές με διαστάσεις 55 x 45 x 45 Å. Η συνολική δομή της IbCO σχηματίζει α-έλικα και δύο β-πτυχωτά φύλλα βρίσκονται στο N- και στο C-τελικό άκρο του ενεργού κέντρου, σχηματίζοντας μια μικρή δομή παράλληλων φύλλων. Το ενεργό κέντρο της IbCO βρίσκεται στη δέσμη τεσσάρων ελίκων και καλύπτεται εν μέρει από ένα κατάλοιπο - φύλακα (gatekeeper - Phe261 στην IbCO), το οποίο προστατεύει τον CuA και εμποδίζει

την πρόσδεση μονοφαινολικών υποστρωμάτων στο ενεργό της κέντρο. Επιπλέον, η IbCO περιέχει ένα δεσμό θειοαιθέρα μεταξύ του Cε άνθρακα της ιστιδίνης His109 (συμπλοκοποιητής χαλκού) και του θείου της κυστεΐνης Cys92 (Klabunde et al., 1998).

Η κατεχολοξειδάση AoCO4 ανήκει σε μια πρόσφατα ανακαλυφθείσα οικογένεια βραχείων-κατεχολοξειδασών, η οποία διαφέρει από τις άλλες κατεχολοξειδάσες λόγω της έλλειψης του C- τελικού άκρου και διαφορετικό πρότυπο ιστιδίνης για το CuA. Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του AoCO4 με τις άλλες γνωστές κατεχολοξειδάσες είναι χαμηλή (λιγότερο από 30%), και η κρυσταλλική δομή του AoCO4 αποκλίνει από εκείνη των αντίστοιχων ενζύμων με διάφορους τρόπους, κυρίως γύρω από την κεντρική α-ελικοειδή περιοχή του πυρήνα. Ένα διατομικό οξυγόνο ταυτοποιήθηκε ως μόριο γεφύρωσης (bridging molecule) μεταξύ των δύο ιόντων χαλκού (CuA και Cub) με απόσταση 4,2-4,3 Å. Το UV/vis φάσμα απορρόφησης του AoCO4 εμφανίζει ένα διακριτό μέγιστο στα 350 nm, το οποίο έχει αναφερθεί ότι είναι χαρακτηριστικό της οξυ- μορφής των ενζύμων χαλκού τύπου- 3 (Hakulinen N. et al., 2013).



Εικόνα 1.3.: (Α): Τρισδιάστατη δομή της κατεχολοξειδάσης του *I. batatas* (PDB ID 1BT1). (Β): Ενεργό κέντρο της φαινυλθειουρίας (PTU) αναστολέας δεσμού της κατεχολοξειδάσης του *I. batatas*. (Γ): Τρισδιάστατη δομή της κατεχολοξειδάσης του *Vitis vinifera* (PDB ID 2P3X). (Δ): Ενεργό κέντρο της κατεχολοξειδάσης του *Vitis vinifera*. Οι δευτερεύουσες δομές εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα (α - έλικα), ενώ με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται οι δομές των β - πτυχωτών φύλλων. Τα ιόντα χαλκού εμφανίζονται με καφέ σφαίρες, το bridging molecule εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα και ο δεσμός θειοαιθέρα με κίτρινο χρώμα.



Εικόνα 1.4.: Δομή κατεχολοξειδάσης AoCO4 (PD ID: 4J3P).

1.5.2. Χαρακτηριστικά της Δομής τυροσινάσης στις 3 - Διαστάσεις

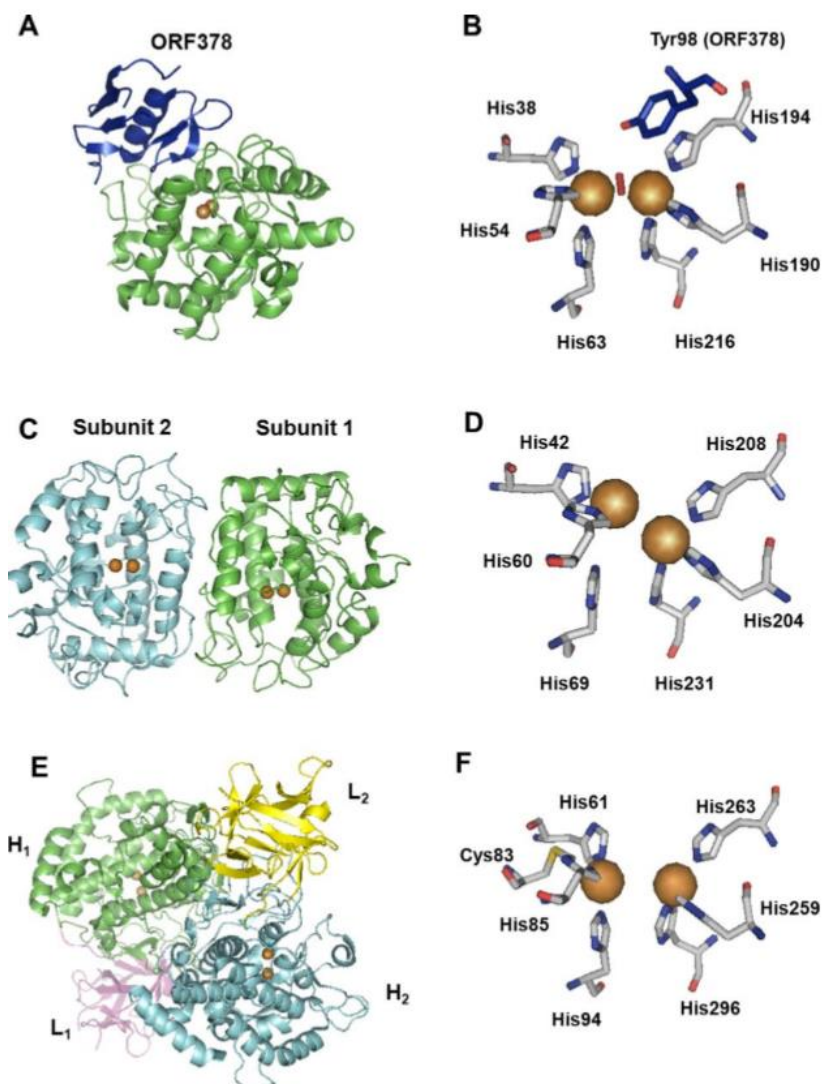
Οι τυροσινάσες από ζωικές και φυτικές προελεύσεις διαθέτουν και τις τρεις περιοχές που αναφέρθηκαν, ενώ οι τυροσινάσες από μύκητες στερούνται το N-τελικό άκρο. Οι τυροσινάσες βακτηριακής προέλευσης έχουν μόνο την κεντρική καταλυτική περιοχή, αλλά έχουν παραχθεί τυροσινάσες σε συνδυασμό με μια πρωτεΐνη – κουτί (caddie protein), η οποία δρα ως N-τελικό άκρο. Το N-τελικό άκρο κατευθύνει την πρωτεΐνη προς τους θυλακοειδείς αυλούς του χλωροπλάστη στα φυτά και εμπλέκεται στη διαδικασία ωρίμανσης της τυροσινάσης. Ο ρόλος του C-τελικού άκρου είναι να καλύψει την ενεργό θέση της τυροσινάσης, διατηρώντας το ένζυμο ανενεργό στην εκκριτική οδό (secretory pathway). Οι τυροσινάσες ενεργοποιούνται συνήθως με διάσπαση του N- και C-τελικού άκρου, ή στην περίπτωση της βακτηριακής τυροσινάσης, με απομάκρυνση της πρωτεΐνης – κουτί (caddie protein) (Marusek et al. 2006, Flurkey & Inlow, 2008).

Μερικές από τις μέχρι τώρα κρυσταλλικές δομές τυροσινάσων είναι διαθέσιμες από τους εξής μικροοργανισμούς: από τον *Streptomyces castaneoglobisporus* (ScT) (Matoba et al., 2006), από τον *Bacillus megaterium* (BmT) (Sendovski et al., 2011), και από τον *A. bisporus* (AbT) (Ismaya et al. 2011) (Εικόνα 1.5.).

Η τρισδιάστατη δομή της τυροσινάσης είναι κυρίως α-έλικα, όπως και της κατεχολοξειδάσης. Η δομή παράλληλων φύλλων σχηματίζεται από δύο β – πτυχωτά φύλλα, τα οποία βρίσκονται στο N-άκρο και C-άκρο της κεντρικής καταλυτικής περιοχής. Τα κατάλοιπα που σχηματίζουν αυτή τη σύντομη δομή παράλληλων φύλλων είναι πολύ προστατευμένα και σηματοδοτούν την αρχή και το τέλος της κεντρικής καταλυτικής περιοχής. Ο πυρήνας του ενζύμου σχηματίζεται από μία δέσμη τεσσάρων ελίκων, όπου βρίσκεται το καταλυτικό διπυρηνικό κέντρο του χαλκού. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στον πάτο μιας μεγάλης κοιλότητας, όπου συνδέεται το υπόστρωμα (Matoba et al., 2006, Ismaya et al., 2011, Sendovski et al., 2011).

Η πρώτη τρισδιάστατη δομή για τυροσινάσες παρουσιάστηκε για μία τυροσινάση από τον *S. castaneoglobisporus* (ScT) (Matoba et al. 2006). Η τρισδιάστατη δομή της τυροσινάσης αυτής παρουσιάστηκε ως ένα σύμπλοκο με μια πρωτεΐνη caddie. Η πρωτεΐνη caddie εμπλέκεται στη σύνδεση του χαλκού, καθώς και στην έκκριση και ενεργοποίηση του ενζύμου. Ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr98) από την caddie πρωτεΐνη καταλαμβάνει την πιθανή θέση δέσμευσης υποστρώματος του ScT, αλλά είναι σε απόσταση 3,0 Å από την ενεργό θέση, δηλαδή πολύ μακριά για να οξειδωθεί. Η βακτηριακή τυροσινάση από τον *B. megaterium* (BmT) είναι ένα ομοδιμερές, όπου οι διαστάσεις της κάθε μονάδας είναι 45 x 25 x 80 Å. Κάθε μονάδα περιέχει μια ενεργό θέση, με τις δύο θέσεις πρόσδεσης υποστρώματος να βρίσκονται σε εναλλακτικές κατευθύνσεις. Η δομή της AbT από τον *A. bisporus* έχει επίσης πολύ πρόσφατα παρουσιαστεί (Ismaya 2011 et al.). Είναι η πρώτη δομή που αποκαλύφθηκε για μία πλήρους-μήκους τυροσινάση μυκητιακής προέλευσης. Το ένζυμο είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από δύο βαριές (H) αλυσίδες και δύο ελαφριές (L) αλυσίδες. Οι διαστάσεις του τετραμερούς είναι 139 x 97 x 59 Å. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στην υπομονάδα H, όπου προστατεύεται στη δέσμη τεσσάρων ελίκων, ομοίως με τις ScT και BmT. Η θέση δέσμευσης υποστρώματος βρίσκεται στο κάτω μέρος σε μια ευρύχωρη κοιλότητα στην επιφάνεια της υπομονάδας H. Η αλυσίδα L έχει μια β-τριφυλλοειδείς πτυχή, που αποτελείται από 12 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. Η αλυσίδα L είναι περίπου 25 Å μακριά από την ενεργή θέση και δεν εμποδίζει την πρόσβαση προς αυτή. Η αλυσίδα L δεν παρουσιάζει καμία αλληλούχιση ή ομοιότητα στη δομή με την caddie πρωτεΐνη της ScT. Ο λειτουργικός ρόλος της αλυσίδας L δεν είναι ακόμη σαφής, είναι πιθανό να παίζει

ρόλο στην αναδίπλωση, στην δέσμευση χαλκού (copper-binding) και στη σταθερότητα του AbT in vivo (Εικόνα 1.5.) (Ismaya et al. 2011).



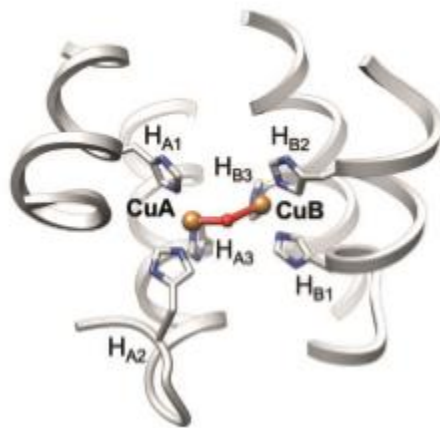
Εικόνα 1.5.: (Α): Τρισδιάστατη δομή της τυροσινάσης από τον *Streptomyces castaneoglo bisporus* (PDB ID 1WX2) σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη caddie ORF378. Η τυροσινάση παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα, ενώ η caddie πρωτεΐνη ORF378 με μπλε χρώμα. (Β): Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του *S. castaneoglo bisporus*. (C): Ομοδιμερή δομή της τυροσινάσης από τον *Bacillus megaterium* (PDB ID 3NM8). Οι υπομονάδες 1 και 2 εμφανίζονται με πράσινο και γαλάζιο χρώμα, αντίστοιχα. (D): Το δραστικό κέντρο της τυροσινάσης του *B. megaterium*. (Ε) Τετραμερής δομή της τυροσινάσης του *Agaricus bisporus* (PDB ID 2Y9W). Οι αλυσίδες εμφανίζονται ως: H (βαριά αλυσίδα) και L (ελαφριά αλυσίδα). (F) Ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του *A. bisporus*. Τα ιόντα χαλκού στο ενεργό κέντρο απεικονίζονται με καφέ σφαίρες.

1.5.3. Σύγκριση δομής τυροσινασών και κατεχολοξειδασών

Όπως αναφέρθηκε (παράγραφος 1.5.1.) η κατεχολοξειδάση περιέχει ένα δεσμό θειοαιθέρα μεταξύ του Cε άνθρακα της ιστιδίνης His109 και του θείου της κυστεΐνης Cys92. Ο δεσμός αυτός δεν έχει βρεθεί στην τυροσινάση ScT, και έχει προταθεί ότι η His54 της τυροσινάσης ScT με συντονισμό του CuB είναι ευέλικτη κατά την κατάλυση, ενώ στην IbCO η ευελιξία του αντίστοιχου υπολείμματος His109 περιορίζεται από τον δεσμό του θειοαιθέρα. Πιο πρόσφατα, ο δεσμός θειοαιθέρα βρέθηκε επίσης στις δομές της AbT (Ismaya et al., 2011) και VvCO (Virador et al., 2009). Το υπόλειμμα κυστεΐνης που σχηματίζει το δεσμό αυτό βρίσκεται επίσης στην αλληλουχία της τυροσινάσης από του μύκητα *Neurospora crassa* (Lerch 1982). Ως εκ τούτου, μέσω της παρουσίας ή της απουσίας του δεσμού θειοαιθέρα και της ευελιξίας της His με συντονισμό του CuB δεν μπορεί να διεξαχθεί συμπέρασμα για τη επιλεκτικότητα υποστρώματος μεταξύ τυροσινάσης και κατεχολοξειδάσης.

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός (Fishman et al., 2015) για την επιλεκτικότητα υποστρώματος μεταξύ των δύο ενζύμων, είναι η ικανότητα μίας διατηρημένης γλουταμίνης και μίας ασπαραγίνης να δεσμεύουν και να ενεργοποιούν ένα μόριο νερού προς αποπρωτονίωση των μονοφαινολών, δράση που απαιτείται για τη δραστικότητα της τυροσινάσης. Ο ισχυρισμός αυτός αποδείχθηκε (Even Solem et al., 2016) για την πολυφαινολοξειδάση I-VvPPOcs-3. Η πολυφαινολοξειδάση αυτή διαθέτει τις τρεις περιοχές που αναφέρθηκαν. Γύρω από τις ιστιδίνες H_{B1} και H_{B2}, η οποίες βρίσκονται σε συντονισμό με το CuB (εικόνα 1.6) η I-VvPPOcs-3 έχει την εξής ακολουθία αμινοξέων - I-E236-N-VP-HB1240-G-P-V-HB2-I-, η οποία περιέχει ένα καλά διατηρημένο γλουταμινικό. Ο Even Solem και η ομάδα του μετά από εκτέλεση ανάλυσης δραστικότητας (activity assay) σε gel παρατήρησαν ότι η I-VvPPOcs-3 καταλύει την οξείδωση της 4-μέθυλοκατεχόλης (4-MC), αλλά καταλύει σε αμελητέο βαθμό της οξειγόνωση των μονοφαινολών όπως τυραμίνη και p- τυροσόλη. Σε αντίθεση με τη δομή της τυροσινάσης του *Bacillus megaterium* (TyrBm), στην αλληλουχία της I-VvPPOcs-3 δεν βρέθηκε ασπαραγίνη, η οποία θα έπρεπε να βρίσκεται δίπλα στο CuB συντονισμένο με την H_{B1}240. Στην I-VvPPOcs-3 στην αντίστοιχη θέση υπάρχει μια γλυκίνη (G241), έχοντας ως αποτέλεσμα την έλλειψη της μονοφαινολικής δράσης. Μία γλυκίνη υπάρχει

επίσης στην αντίστοιχη θέση ΤοPPO-1 και ΤοPPO-2 από τη πολυφαινολάση από ραδίκι (*Taraxacum officinale*), για την οποία έχει παρατηρηθεί μόνο διφαινολική δράση.



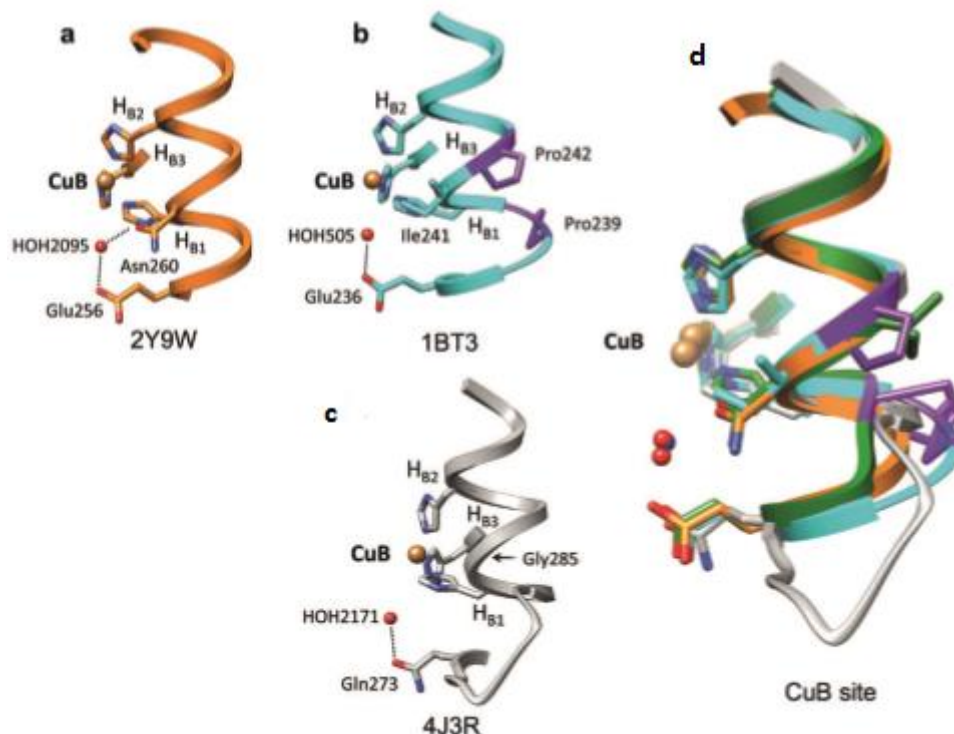
Εικόνα 1.6.: T-3 περιοχή χαλκού της VvPPOcs-3 στην μετα- μορφή με τα ιόντα χαλκού A και B και τις έξι ιστιδίνες που παρέχονται από της α – έλικες.

Το τμήμα αλληλουχίας της L-VvPPOcs-3 γύρω από την H_{B1} περιέχει επίσης δύο προλίνες, η οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς διαταράζουν τις δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών. Σε τυροσινάσες μυκητιακής προέλευσης (π.χ., *A. bisporus*), το γλουταμινικό και ασπαραγίνη παρέχονται από μια α-έλικα η οποία φέρει επίσης δύο από τα τρία CuB συντονισμένα με ιστιδίνες (H_{B1} και H_{B2}) (Εικόνα 1.7.a.). Στις φαινολοξειδάσες από φυτά, σε αυτό το μέρος η αλληλουχία περιέχει δύο προλίνες, μια αυστηρά διατηρημένα και μία περισσότερο μεταβλητή. Η πρώτη προλίνη (Pro242) στην κατεχολοξειδάση IbCO από τη πατάτα *I. Batatas* (Εικόνα 1.7.b.). βρίσκεται ανάμεσα στις ιστιδίνες H_{B1} και H_{B2} παρόμοια με την L-VvPPOcs-3. Αντικατάσταση αυτής της προλίνης στην L-3-VvPPOcs από ισολευκίνη, έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της αποτελεσματικότητας της μονοξυγόνωσης της p-τυροσόλης και της τυραμίνης. Επιπλέον, η καταλυτική οξείδωση της 4-μεθυλοκατεχόλης (4MC) ενισχύεται.

Η δεύτερη προλίνη (P239) συνοδευτικά με την H_{B1} στην ανοδική πλευρά είναι αυστηρά διατηρημένη στις φαινολοξειδάσες από φυτά, αλλά δεν υπάρχει σε αυτές από άλλους οργανισμούς. Προφανώς, η παρουσία αυτής της προλίνης σχετίζεται με τη δραστικότητα μονοφαινολάσης όπως επίσης φαίνεται και από της τυροσινάσες κρασιών (Decker H. et al., 2015) και φύλλων καρυδιάς (Rompel A. et al., 2014), όσο υπάρχουν το γλουταμινικό και τα κατάλοιπα ασπαραγίνης. Στην L-VvPPOcs-3, η αποκοπή αυτής της

προλίνης (P239del) συμβάλει σε αύξηση της αποδοτικότητας της κατάλυσης της p-τυροσόλης. Όσον αφορά την μονοξυγόνωση της τυραμίνης, η καταλυτική αποτελεσματικότητα μειώνεται δραστικά.

Συνεπώς, η παρουσία μίας ασπαραγίνης (εκτός από το διατηρημένο γλουταμικό) είναι αναγκαία για την δραστηριότητα μονοφαινολάσης. Οι διατηρημένες προλίνες ρυθμίζουν τη δραστηριότητα αυτή και / ή συμβάλουν στην επιλεκτικότητα υποστρώματος. Εάν υπάρχουν δύο προλίνες, αλλά όχι ασπαραγίνη, παρατηρείται δραστικότητα διφαινολάσης (Krebs B. et al., 1998) (Εικόνα 1.7.c.). Αντίστοιχα, εάν υπάρχει τόσο ασπαραγίνη όσο και γλουταμικό, αλλά όχι οι δύο προλίνες, τότε η δραστικότητα μονοξυγενάσης είναι πολύ ισχυρή. Αυτό ισχύει και για τις πολυφαινολοξειδάσες από άλλους οργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες (Dijkstra B.W. et al., 2011) (Εικόνα 1.7.a.). Εάν η ασπαραγίνη απουσιάζει, η δραστικότητα τυροσινάσης χάνεται πάλι (Rouvinen J. et al., 2013) (Εικόνα 1.7.c.). Ανεξάρτητα από την παρουσία των προλινών, το διατηρημένο γλουταμινικό και η διατηρημένη ασπαραγίνη (αν υπάρχει), καθώς και το διατηρημένο μόριο νερού λαμβάνουν πάντα την ίδια θέση (Εικόνα 1.7.d.).



Εικόνα 1.7.: Τμήματα των α-ελίκων που παρέχει το CuB-συντονισμένο με ιστιδίνες H_{B1} και H_{B2} από διαφορετικές δομές φαινολοξειδάσων: α) Τυροσινάση AbTyr από τον *A. Bisporus*, β) κατεχολοξειδάση από την γλυκοπατάτα *I. Batatas*, γ) πολυφαινολοξειδάση του μύκητα *A. oryzae* (εδώ μία γλουταμίνη Gln αντικαθιστά ένα γλουταμινικό Glu), δ) συνδυασμός των α-δ. Οι δακτύλιοι πυρρολιδίνης των προλινών σε άμεση γειτονία με H_{B1} επισημαίνονται με μωβ χρώμα, τα άτομα του χαλκού CuB συμβολίζονται με καφέ χρώμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα (ε), τα διατηρημένα γλουταμικά και οι ασπαραγίνες (αν υπάρχουν) λαμβάνουν την ίδια τοπολογική θέση, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι των προλινών. Το μόριο νερού (HOH112) φαίνεται με μπλε χρώμα.

1.6. Μηχανισμός Δράσης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.4., το ενεργό κέντρο της κατεχολοξειδάσης απαντάται σε τρεις μορφές: οξυ- μορφή, μετα- μορφή και διοξυ- μορφή. Η μετα- μορφή της κατεχολοξειδάσης μπορεί να μετασχηματιστεί στην αντίστοιχη οξυ- μορφή του ενζύμου με την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (Jolley et al., 1974, Rompel et al., 1999a, Rompel et al., 2012). Περαιτέρω, η μετα- μορφή μπορεί να μειωθεί μερικώς

σε μία μισή- μετα- μορφή [Cu (II) Cu (I)], η οποία είναι EPR-ανιχνεύσιμη (Himmelwright et al., 1980, Bubacco et al., 2003).

1.6.1. Κατεχολοξειδάση

Τόσο η οξυ- όσο και η μετα- μορφή οξειδώνουν διφαινόλες (διφαινολικός καταλυτικός κύκλος). Το προϊόν της δράσης αυτής είναι μία ο- κινόνη. Μετά την απελευθέρωση της ο- κινόνης, το ένζυμο αφήνεται στην διοξυ- μορφή του. Ένα μοριακό οξυγόνο, το οποίο έχει υψηλή συγγένεια με την δεοξυ- μορφή, συνδέεται ταχύτατα με το ενεργό κέντρο, δημιουργώντας την οξυ- μορφή της κατεχολοξειδάσης (εικόνα 1.9.).

Η κατεχολοξειδάση μπορεί να οξειδώσει μια ποικιλία από ρ-υποκατεστημένες διφαινόλες. Η συγγένεια ενός υποστρώματος με την κατεχολοξειδάση εξαρτάται έντονα από τις υδρόφοβες, στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές ιδιότητες της ομάδας των ο- διφαινολών στην ρ-θέση. Έχει αποδειχθεί ότι όταν το υπόστρωμα διαθέτει μια ομάδα - δότη ηλεκτρονίων σε ρ- θέση της ο- διφαινόλης, ο μηχανισμός της αντίδρασης θα ακολουθήσει το διφαινολικό μονοπάτι. Αντίθετα, όταν το υπόστρωμα έχει μια ομάδα – δέκτη ηλεκτρονίων στη ρ- θέση, ο μηχανισμός της αντίδρασης οδηγεί το ένζυμο σε ένα μονοπάτι αδρανοποίησης. Στο μονοπάτι αυτό, η κατεχολοξειδάση αμετάκλητα αδρανοποιείται και χάνει ένα από τα ιόντα χαλκού από την T3 περιοχή χαλκού (Εικόνα 1.9.).

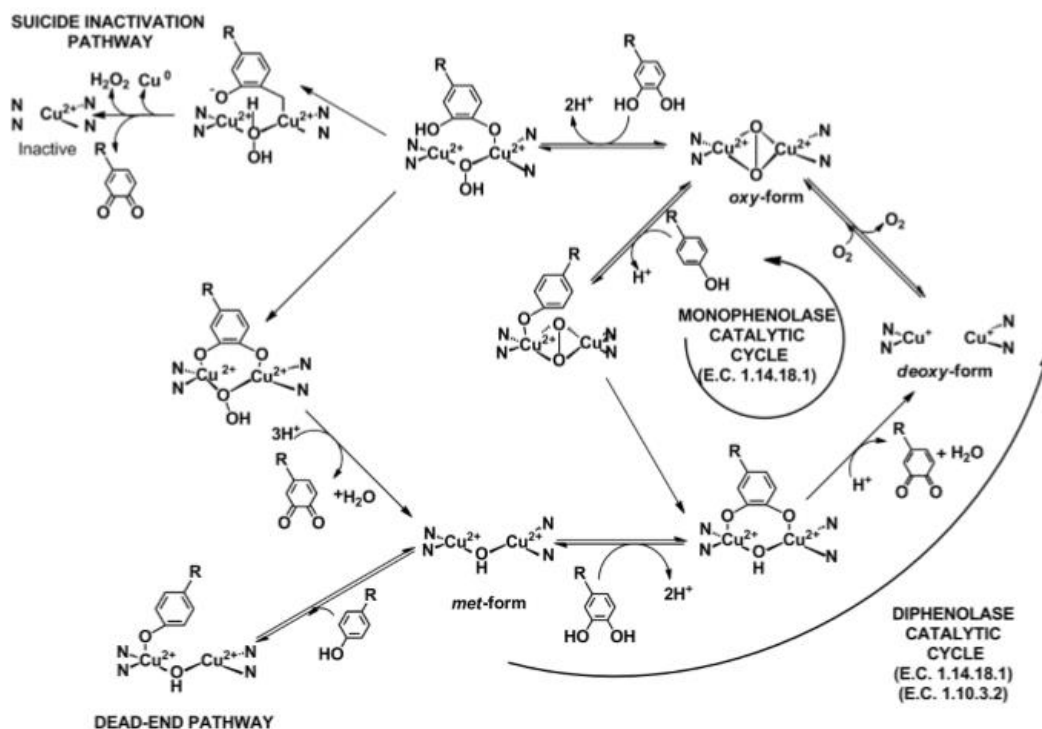
1.6.2. Τυροσινάση

Η τυροσινάση διαθέτουν όμοιο μηχανισμό με τις κατεχολοξειδάσες (διφαινολικός καταλυτικός κύκλος). Η διαφορά τους έγκειται στην πραγματοποίηση της επιπλέον δράσης της τυροσινάσης. Η δράση αυτή (οξειδωση των μονοφαινολών) απαιτεί την παρουσία μόνο της οξυ- μορφής του ενζύμου (μονοφαινολικός καταλυτικός κύκλος). Κατά τη διάρκεια του μονοφαινολικού κύκλου ένα από τα άτομα ενός μορίου μοριακού οξυγόνου που είναι συνδεδεμένο με την οξυ- μορφή ενσωματώνεται στη ο- θέση του μονοφαινολικού υποστρώματος (Itoh et al., 2001). Αντίστοιχα με την κατεχολοξειδάση, το

προϊόν της καταλυόμενης από τη τυροσινάση οξείδωσης μονοφαινολικών ή διφαινολικών υποστρωμάτων είναι μία ο-κινόνη.

Η εγγενής μορφή της κατεχολοξειδάσης αποτελείται από 85-90% μετα-μορφή, ενώ το υπόλοιπο είναι στην οξυ-μόρφη (Solomon et al. 1996). Όταν μονοφαινολικά υποστρώματα οξειδώνονται από τυροσινάση, παρατηρείται μια περίοδος υστέρησης. Η υστέρηση αυτή, σχετίζεται με την κατάσταση του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης. Κατά την περίοδο υστέρησης, το ένζυμο μετατρέπεται από την μετα-μορφή στην οξυ-μορφή, η οποία μπορεί να οξειδώσει τα μονοφαινολικά υποστρώματα. Η μετα-μορφή οξειδώνει διφαινολικά υποστρώματα (π.χ., L-DOPA).

Επιπλέον, ορισμένες μονοφαινόλες μπορούν να συνδεθούν με τη μετα-μορφή του ενζύμου, αλλά δεν μπορούν να οξειδωθούν και κατ'επέκταση το ένζυμο οδηγείται σε ένα αδιέξοδο μονοπάτι (Muñoz-Muñoz et al. 2010β) (Εικόνα 1.8.).



Εικόνα 1.8.: Μοριακός μηχανισμός των καταλυτικών κύκλων της κατεχολοξειδάσης και της τυροσινάσης. Στο μονοφαινολικό καταλυτικό κύκλο εμπλέκεται μόνο η τυροσινάση.

1.7. Εφαρμογές

Οι τυροσινάσες και οι κατεχολοξειδάσες είναι ένζυμα με πληθώρα εφαρμογών. Οι εφαρμογές αυτές βασίζονται στην ικανότητα τους να οξειδώνουν τόσο μικρά φαινολικά μόρια όσο και πρωτεΐνες που σχετίζονται με φαινολικές ομάδες (Greta Faccioa et al., 2012).

Πολλές πιθανές εφαρμογές έχουν αναφερθεί για την κατεχολοξειδάση χωρίς όμως να υπάρχει σαφής ένδειξη για το αν το ένζυμο που εφαρμόζεται είναι τυροσινάση ή κατεχολοξειδάση. Πράγματι, οι κατεχολοξειδάσες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντί της τυροσινάσης στην οξείδωση των διφαινολικών υποστρωμάτων.

1.7.1. Πολυφαινολοξειδάσες ως βιοκαταλύτες

Η δυνητική αξία της χρήσης πολυφαινολοξειδασών για τη παραγωγή υποκατεστημένων κατεχολών έχει ιδιαίτερα αναγνωρισθεί λόγω του οι ενώσεις αυτές είναι απαραίτητα ενδιάμεσα στη σύνθεση φαρμακευτικών προϊόντων, πλαστικών, αντιοξειδωτικών και αγροχημικών. Η χρήση πολυφαινολοξειδασών στην ορθο-υδροξυλίωση των φαινολών είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι η δράση αυτή δεν επιτυγχάνεται εύκολα με χημική σύνθεση.

Το πρώτο προϊόν της αντίδρασης της τυροσινάσης με τη τυροσίνη, γνωστό ως L-DOPA, έχει υψηλή οικονομική αξία επειδή είναι το κύριο φάρμακο για την θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον. Η L-DOPA επί του παρόντος παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα και με χημική σύνθεση, και πολλές μελέτες έχουν στόχο την κατάστρωση μιας εναλλακτικής μεθόδου με βάση ένζυμα, χρησιμοποιώντας ελεύθερη ή ακινητοποιημένη τυροσινάση. Ωστόσο, η χρήση των συνδυασμένων ενζύμων τυροσινάση - φαινολική λυάση, που δεν καταλύουν την περαιτέρω οξείδωση του L-DOPA θα μπορούσε να είναι μία πιο ελπιδοφόρα μέθοδος (Rodrigo Otávio de Faria et al., 2007).

Η παραγωγή προϊόντων διφαινυλίου (biphenyl) από φαινολοξειδάσες μπορεί να είναι χρήσιμη, αποδίδοντας σχετικά πολύπλοκες ενώσεις από υποστρώματα όπως φλαβανόλες, λόγω αντιδράσεων προσθήκης που συμβαίνουν μετά την οξείδωση. Τέτοιες αντιδράσεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της δυνητικής χρήσης τους στην παραγωγή

αντιοξειδωτικών και χρωματιστών προϊόντων (Steenkamp J.A. et al., 2000). Η άμεση οξείδωση των φλαβονοειδών όπως κερσετίνη και φισετίνη, με πολυφαινολικές οξειδάσες έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σαν μια συνθετική αντίδραση δίνοντας υδροξυ τοπο-ειδικά προϊόντα.

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από πολυφαινολικές οξειδάσες παρέχουν διαδρομές σε μια σειρά φαινολικών πολυμερών. Μια πιθανή εφαρμογή τέτοιων πολυμερών είναι στην ικανότητά τους να δεσμεύουν πρωτεΐνες, ενεργώντας έτσι ως αντιφλεγμονώδη. Τα πολυπεπτίδια πολυμερή που παράγονται με θεραπεία με πολυφαινολικές οξειδάσες έχουν επίσης αναφερθεί ότι κατέχουν υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, αντίστοιχο με εκείνο που απαντάται στη φύση στην κόλλα (Cai Y. et al., 1997). Ένα νέο συνθετικό πολυμερές παρήχθη από οξείδωση των υδροξυ-ομάδων του πολυ (4-υδροξυστυρολίου) καταλυόμενη με πολυφαινολική οξειδάση, και η επακόλουθη μη-ενζυματική αντίδραση του οξειδωμένου πολυμερούς με ανιλίνη χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μιας μεθόδου για σύνδεση βιοπολυμερών.

Ιατρικές εφαρμογές των πολυφαινολοξειδασών περιλαμβάνουν επίσης την παραγωγή μελανινών ως φυσικές αντιβακτηριακές ενώσεις για τη θεραπεία των πληγών. Η συμμετοχή των ενζύμων αυτών στο νευρικό σύστημα δεν είναι σαφής. Υπάρχει μία θεώρηση ότι η μελανίνη παίζει προστατευτικό ρόλο στο νευρικό σύστημα (Baranowitz Steven, 1928) και έχει δοκιμαστεί για την θεραπεία νόσων αυτού. Έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την τοξικότητα της ντοπαμίνης.

Η ανθρώπινη τυροσινάση υπερεκφράζεται σε μελανοσώματα - κακοήγη κύτταρα. Ένα εμβόλιο κατά του μελανοσώματος που χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα για τυροσινάση έχει αναπτυχθεί με επιτυχία στις κλινικές δοκιμές (Chen et al. 1995, Bergman et al. 2003, Liao et al. 2006).

1.7.2. Βιοεπανόρθωση των λυμάτων

Οι πολυφαινολικές οξειδάσες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν τη δράση να οξειδώνουν τις φαινόλες προς κινόνες. Στην συνέχεια, οι τελευταίες υποβάλλονται σε μη ενζυματικό πολυμερισμό και σχηματίζουν στο νερό αδιάλυτα συσσωματώματα, τα οποία καταβυθίζονται. Η ενζυματική θεραπεία είναι αποτελεσματική σε μία ευρεία περιοχή τιμών

pH και θερμοκρασίας. Εκτός από την φαινόλη, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έχουν τη ικανότητα να καταβυθίζουν από το νερό έναν αριθμό υποκατεστημένων φαινολών (κρεσόλες, χλωροφαινόλες, ναφθόλη, κ.λπ.). Επιπλέον, ρύποι, οι οποίοι είναι αδρανής προς την πολυφαινολική οξειδάση, μπορεί ενζυματικά να καθιζάνουν μαζί με τη φαινόλη (Klibanov Alexander et al., 1984).

Βακτηριακές πολυφαινολοξειδάσες έχουν δοκιμαστεί στην αποτοξικοποίηση των λυμάτων με απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμό. Η τυροσινάση από τον *Streptomyces antibioticus*, για παράδειγμα, είχε δραστικότητα σε βιομηχανικούς ρύπους όπως οι 3- και 4- χλωροφαινόλες (Marino SM et al., 2011) και οι 3- και 4- φθοροφαινόλη (Giuseppe Battain et al., 2002). Η εφαρμογή των βακτηριακών πολυφαινολικών οξειδασών στη επεξεργασία μολυσμένων λυμάτων μπορεί πλέον να γίνει είτε με τα στελέχη που παράγουν πολυφαινολικές οξειδάσες, ή με το ένζυμο σε μια ακινητοποιημένη μορφή (R.G. Saratale, 2011). Οι πολυφαινολικές οξειδάσες έχει αναφερθεί ότι ενεργούν στην αποτελεσματικότητα της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα, παραδείγματος χάριν ευνοώντας τη μετατροπή της κατεχόλη σε p-κρεζόλη, p-χλωροφαινόλη, φαινόλη και p-μεθοξυφαινόλη (Shinji Wada et al., 1993). Ανάλογες δράσεις έχουν παρατηρηθεί μετά από ακινητοποίηση τυροσινάσης σε σφαιρίδια χιτοζάνης, η οποία επέτρεψε την απομάκρυνση των χλωροφαινολών και των αλκυλο-υποκατεστημένων φαινολών από τεχνητά λύματα (Kazunori Yamada et al., 2008). Η βακτηριακή πολυφαινολική οξειδάση μπορεί επίσης να βρει εφαρμογή στον αποχρωματισμό των λυμάτων, καθώς συμμετέχει στην αποδόμηση των διαφορετικών μορίων χρωστικής (Hipólito Fernando Pajot et al., 2011).

1.7.3. Εφαρμογές στα τρόφιμα

Οι πολυφαινολικές οξειδάσες έχουν προταθεί για την εφαρμογή στην επεξεργασία των τροφίμων, όχι μόνο για την μελανογόνο αντίδραση που καταλύουν, π.χ. στην παραγωγή τσαγιού (Slaga & Zhao, 2003), αλλά επίσης και για αντιδράσεις σταυρωτής σύνδεσης (cross-linking), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν τη δομή των τροφίμων.

1.7.3.1. Αναπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων

Η ενζυματική δραστικότητα της κατεχολοξειδάσης και της τυροσινάσης που υπάρχουν στους καρπούς και στους σπόρους και στα μικρόβια που συνδέονται με τα φρούτα και τους σπόρους, αξιοποιούνται στις διαδικασίες ζύμωσης του μαύρου τσαγιού, καφέ, κακάο, και μαύρες σταφίδες. Συβάλλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στο χρώμα των τελικών προϊόντων (Yoruk & Marshall, 2003). Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης των φύλλων τσαγιού, οι πολυφαινολικές οξειδάσες μπορούν να οξειδώσουν κατεχίνη σε θεαφλαβίνη. Οι θεαφλαβίνες είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις με πορτοκαλί χρώμα, οι οποίες προσδίδουν χρώμα και φωτεινότητα στο μαύρο τσάι μειώνοντας την στυφάδα, δηλαδή, την ξηρή αίσθηση που αφήνει στο στόμα το μαύρο τσάι (Subramanian et al. 1999).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινολικές οξειδάσες έχουν θετική επίδραση στη ζύμωση του κακάο. Η τυροσινάση από τον *A. bisporus* μπορεί να οξειδώσει πολυφαινόλες που συμβάλλουν στη στυπτικότητα, βελτιώνοντας έτσι την γεύση του κακάο (Selamat et al. 2002).

1.7.3.2. Αντιδράσεις cross - linking

Μια cross – linking αντίδραση εισάγει έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ πρωτεϊνών (ομο-cross-link) ή μεταξύ μιας πρωτεΐνης και υδατανθράκων (ετερο-cross-link). Οι cross-linking αντιδράσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τροποποίηση της δομής των τροφίμων και μπορούν να επηρεάσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Τα αντιδραστικά υπολείμματα στις πρωτεΐνες είναι Gln, Lys, Tyr, Cys.

Πολυφαινολικές οξειδάσες διαφόρων προελεύσεων έχουν δοκιμαστεί ως cross – linking παράγοντες σε μια ποικιλία πρωτεϊνών από γάλα, κρέας και δημητριακά. Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα στην αντίδραση που καταλύουν και, επιπλέον, χρησιμοποιούν συστατικά των τροφίμων στην αντίδραση τους, χωρίς να απαιτούν την προσθήκη οποιουδήποτε χημικού ή πρόσθετου τροφίμων. Η βελτίωση των ιδιοτήτων υφής των τροφίμων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση με βάση υδατάνθρακα πηκτικών παραγόντων. Πρόσφατα, μια συγκριτική μελέτη αξιολόγησε την ικανότητα των

διαφόρων τυροσυνασών από μύκητες και βακτήρια, π.χ. από το μανιτάρι *A. bisporus*, από το φυτό *Botryosphaeria obtusa* και από το *V. spinosum*, για να συνδέσει τον -συχνά χρησιμοποιούμενο- πηκτικό παράγοντα ζελατίνη και αποκάλυψε ότι η προσθήκη φαινολικών ενώσεων στο μίγμα της αντίδρασης επιταχύνθηκε σημαντικά τον ρυθμό της (Guebitz G.M. et al., 2012). Η τυροσινάση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη σύνδεση των πρωτεϊνών των μητρών των τροφίμων. Για παράδειγμα, στα γαλακτοκομικά και στο κρέας η τυροσινάση μπορεί να εφαρμοστεί στην παραγωγή τροφίμων χαμηλών θερμίδων και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Onwulata & Tomasula, 2008).

Η τυροσινάση από το μύκητα *Trichoderma* έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει στη βελτίωση της σταθερότητας των πηκτών από νωπό γάλα και καζεϊνικό νάτριο (Lantto R. et al., 2010). Αυτή η τυροσινάση έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει την ικανότητα να σχηματίζει προϊόντα σύζευξης πρωτεΐνης-ολιγοσακχαρίτη, όπου η πρωτεΐνη ήταν αλφα-καζεΐνη (Buchert J. et al., 2008), αλλά η αντίδραση δεν ήταν πολύ αποτελεσματική. Επιπλέον, αυτή η τυροσινάση υπήρξε επίσης αποτελεσματική στη βελτίωση της σφριγηλότητας στις γέλες που περιέχουν κρέας από στήθος κοτόπουλου με χαμηλά λιπαρά και δημιούργησε ένα δίκτυο μεταξύ των μορίων κολλαγόνου (Auutio K. et al., 2007). Στο ψήσιμο, αυτή η τυροσινάση έχει τη δυνατότητα να ενισχύει τη σκληρότητα και να μειώνει την επεκτασιμότητα της ζύμης (Buchert J. et al., 2007) και για να τροποποιήσει τη δομή του ψημένου ψωμιού πραγματοποιεί σύνδεση των πρωτεϊνών δημητριακών (Homma S. et al., 2001).

1.7.4. Παραγωγή βαφών

Λαμβάνοντας υπόψη το φυσιολογικό ρόλο των πολυφαινολικών οξειδάσεων στη σύνθεση της μελανίνης, τα ένζυμα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση βαφών και χρωμάτων. Επιπλέον, έχουν προταθεί για τη βαφή των ινών των ζώων. Πιο πρόσφατα, μια σύνθεση χρωματισμού που περιέχει τέτοια ένζυμα έχει προταθεί για το βάψιμο των μαλλιών (Warner JC et al., 2011).

1.7.5. Βιοαισθητήρες

Διάφοροι βιοαισθητήρες έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας τυροσινάσες από βακτήρια ή μανιτάρια, με στόχο την παρακολούθηση ακόμα και μικρο-ποσοτήτων φαινολικών ενώσεων σε ένα δείγμα. Όσον αφορά την εφαρμογή σε προϊόντα τροφίμων, μία συζευγμένη αντίδραση τυροσινάσης / β-γαλακτοσιδάσης έχει αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη ενός - μιας χρήσεως - βιοαισθητήρα με στόχο τον υπολογισμό τοξικών κυανογόνων γλυκοζιτών στα τρόφιμα όπως πυρήνες βερίκοκου, ροδάκινου και κερασιού (Tatsuma T. et al., 2000). Η τυροσινάση από μανιτάρι έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό του περιεχομένου φαινολικών σε χυμούς φρούτων, τσάι, αφεψήματα και μαρμελάδες (Karim F. et al., 2012).

1.7.6. Υλικά

Η ικανότητα της πολυφαινολικής οξειδάσης να πραγματοποιεί cross – linking αντιδράσεις, έχει χρησιμοποιηθεί για την ενεργοποίηση υλικών, όπως χιτοζάνη, με τη σύνδεση συγκεκριμένων ενζύμων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως βιοϋλικά. Ένζυμα - στόχοι μπορεί να είναι υποστρώματα για τη cross - linking αντίδραση στη φυσική μορφή τους, αν έχουν στην επιφάνεια τους εκτεθειμένες ομάδες τυροσύλης. Για παράδειγμα, η οργανοφωσφορική υδρολάση, η ακετυλοτρανσφεράση χλωραμφενικόλης και το κυτόχρωμα c έχειδειχθεί ότι διατηρούν τη δραστηρότητα τους μετά από σύζευξη με χιτοζάνη (Payne G.F. et al., 2001).

Η δραστηρότητα της οξειδωμένης ομάδας της τυροσίλης, η οποία είναι μια κινόνη που παράγεται από την τυροσινάση (*A. bisporus*), με ελεύθερες αμινομάδες πολυμερούς, έχει αξιοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της χιτοζάνης με την τυροσίνη- περιεχόμενο πεπτιδίο YGG (KVSALKE) 5GGC (Kcoil) το οποίο είναι σε θέση να προσλάβει πρωτεΐνες που φέρουν το πεπτιδίο - ταίρι (EVSALEK) 5 (Ecoil) μέσω αλληλεπιδράσεων διπλής ελίκωσης (De Crescenzo G. et al., 2008). Κατά παρόμοιο τρόπο, η τυροσινάση από μανιτάρι έχει χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό ομοιοπολικών πρωτεϊνών- πολυσακχαριτών βιοσυζεύκτες με οξείδωση των υπολειμμάτων τυροσίνης των πρωτεϊνών μεταξιού, σερικίνη και πεπτιδία σερικίνης προερχόμενα έτσι ώστε στη

συνέχεια αντιδρούν με τις ελεύθερες αμινομάδες της χιτοζάνης (Freddi G. et al., 2007, Park Y.H. et al., 2004). Η καταλυόμενη από τυροσινάση πρόσδεση των πρωτεϊνών μεταξίου στη χιτοζάνη μείωσε το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού, το κατέστησε πιο συμπαγές, αύξησε τη θερμική σταθερότητα και μείωσε την κολλητικότητα του, καθιστώντας το κατάλληλο για ιατρικές εφαρμογές χιτοζάνης (Freddi G. et al., 2007, Park Y.H. et al., 2004). Η τυροσινάση από μανιτάρι έχει επίσης προταθεί για την κατευθυνόμενη πρόσδεση πρωτεϊνών που περιέχουν τυροσίνη που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες ιδιότητες συγγένειας με υποστρώματα που φέρουν αμινομάδες, π.χ. αντιγόνα ή αντισώματα σε επιφάνειες από πολυαλλυλαμίνη (Barbari T.A. & Ahmed S.R., 2006, Barbari T.A. et al., 2006).

Η τυροσινάση έχει δείξει δραστικότητα σε τυροσίνες μεγάλων πολυμερών, όπως ίνες από μαλλί, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί με διαφορετικές πρωτεΐνες, π.χ. κολλαγόνο, ελαστίνη και ζελατίνη για την απόκτηση βακτηριοκτόνων και μυκητοκτόνων ιδιοτήτων (Buchert J. et al., 2005). Ως αποτέλεσμα της δραστικότητας αυτής στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που περιέχουν τυροσίνη, η τυροσινάση έχει επίσης εφαρμοστεί στην παραγωγή συγκολλητικών, ξεκινώντας από μια πολυφαινολική πρωτεΐνη με ένα ένζυμο προς μια πρωτεΐνη με λόγο 5/50 μονάδες ενζύμου ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης (Benedict & Picciano). Επιπλέον, η δραστικότητα της τυροσινάσης από μανιτάρι (*Aspergillus oryzae*) παρουσία ντοπαμίνης παρέχει συγκολλητικές ιδιότητες σε ένα αραιωμένο διάλυμα που περιέχει χιτοζάνη (Nakamura Y. et al., 2008). Το ιξώδες του διαλύματος αυξάνεται με την πρόοδο της αντίδρασης, πιθανώς λόγω της αλληλεπίδρασης της κινόνης (like – product της αντίδρασης) με τις αμινομάδες της χιτοζάνης.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

2.1.1.1. Escherichia coli

Για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* TOP10. Πιο συγκεκριμένα, τα *E. coli* TOP10 χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt (Invitrogen), αλλά και για τον πολλαπλασιασμό του φορέα pPICZαA (Invitrogen).

Το *E. coli* είναι ένα Gram-αρνητικό, δυνητικά αναερόβιο βακτήριο που απαντάται στο γαστρεντερικό σύστημα θερμόαιμων οργανισμών και αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 37 °C. Απαντάται σε πολλές εφαρμογές στην βιοτεχνολογία καθώς αναπτύσσεται με ιδιαίτερα γοργούς ρυθμούς (20-30 λεπτά σε ιδανικές συνθήκες), ενώ παράλληλα απαιτεί απλά και διαθέσιμα υποστρώματα για την ανάπτυξη του.

Το στέλεχος TOP10, πριν τη χρήση του, είχε γίνει δεκτικό (competent) σε θερμικό σοκ.

2.1.1.2. Pichia Pastoris

Για την ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia Pastoris* (Invitrogen), το στέλεχος X-33 (γονότυπος: φυσικός τύπος, φαινότυπος: Mut⁺).

Η *P. pastoris* εμφανίζει σχετικά μεγάλους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται σε απλά και χαμηλού κόστους υποστρώματα. Παρά το γεγονός ότι η ταχύτητα ανάπτυξης είναι χαμηλότερη από άλλους μετασχηματίσιμους φορείς (λ.χ. *E.coli*), τα συστήματα έκφρασης *P. pastoris* παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα για την παραγωγή πολλών ετερόλογων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, στις οποίες απαιτούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις πρωτεΐνες - στόχους που περιέχουν πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς ή απαιτούν γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, πρωτεΐνες στις οποίες απουσιάζει

η αμινο-τερματική μεθειονίνη ή που δε γίνεται ο σχηματισμός ολιγομερών για το σωστό σχηματισμό της ώριμης πρωτεΐνης. Τα συστήματα έκφρασης *P. pastoris*, εκτός του ότι επιτρέπουν την αυθεντική πρωτεΐνη να εκκρίνεται σε διαλυτή μορφή, έχουν επίσης την ικανότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, γραμμικοποιημένο ξένο DNA μπορεί να εισαχθεί με υψηλή αποτελεσματικότητα μέσω ομόλογων διαδικασιών ανασυνδυασμού και να παράγει σταθερές κυτταρικές σειρές, ενώ οι φορείς έκφρασης μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και επιτρέπουν πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεΐνης - στόχου. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της *P. pastoris* είναι ότι ισχυροί υποκινητές είναι διαθέσιμοι για να κατευθύνουν την έκφραση ενός ξένου γονιδίου, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων της πρωτεΐνης στόχου με σχετική τεχνική ευκολία και με χαμηλότερο κόστος από τα περισσότερα άλλα ευκαρυωτικά συστήματα [Daly & Hearn, 2004].

Ο *P. pastoris*, ως μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας, είναι ικανός να χρησιμοποιεί μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, εφόσον διαθέτει ένα εξειδικευμένο σύστημα καταβολισμού της. Η ικανότητα της αυτή πηγάζει από τα δυο γονίδια αλκοολικής οξειδάσης που διαθέτει, ονόματι AOX1 και AOX2. Παρ'ότι τα δυο αυτά γονίδια εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας (~97%), η απώλεια της λειτουργίας του AOX1 οδηγεί σε δραστική μείωση της ικανότητας της *P. pastoris* να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα μεθανόλης. Βάσει της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε υπόστρωμα μεθανόλης, τα στελέχη μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες:

1. Muts (Methanol utilization slow), που αποτελούν συνήθως στελέχη στα οποία δεν λειτουργεί το AOX1 και μεταβολίζουν την μεθανόλη με σχετικά αργό ρυθμό,
2. Mut⁺ (Methanol utilization plus), δηλαδή στελέχη με την ικανότητα να αναπτύσσονται γρήγορα με την μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Η έκφραση του γονιδίου AOX1 ελέγχεται ταυτόχρονα από δυο μηχανισμούς: ένα μηχανισμό παρεμπόδισης από την γλυκόζη και ένα μηχανισμό επαγωγής από την μεθανόλη. Οπότε, προκειμένου να επαχθεί η μεταγραφή του γονιδίου πρέπει ο μικροοργανισμός να αναπτύσσεται απουσία γλυκόζης και παρουσία μεθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκινητής AOX1 επιτρέπει την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, ακόμη και αν έχει εισαχθεί μονάχα ένα αντίγραφο της

ετερόλογης αλληλουχίας. Η έκφραση του υποκινητή καταστέλλεται από την παρουσία γλυκόζης ή γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα επιλογής στελεχών με τυχαίες μεταλλάξεις που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη. [Menendez et al., 2003].

2.1.2 Θρεπτικά Μέσα

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0.1 MPa. Οι υπερευαίσθητες ουσίες (αντιβιοτικά και βιταμίνες) αποστειρώνονται χωρία με διήθηση σε φίλτρα σύριγγας πόρων διαμέτρου 0.2 μm και προστίθονται στα θρεπτικά υλικά μετά από ψύξη των τελευταίων στους 50-60°C. Σε περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιείχε δεξτρόζη, αυτή αποστειρωνόταν ξεχωριστά σε μορφή σκόνης για την αποφυγή της αμαύρωσης του σακχάρου (αντίδραση Maillard με τα αμινοξέα της πηγής αζώτου). Οι συστάσεις των θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς επίσης και οι αντίστοιχοι μικροοργανισμοί φαίνονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1.:Συστάσεις θρεπτικών υλικών.

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό	Σύσταση
<i>E.coli</i> Top 10	LB Medium	Tryptone 1% Yeast Extract 0.5% NaCl 1% Agar (for plates) 1.5% pH 7,4 50 mg/mL Καναμυκίνη
	LB Low Salt	Tryptone 1% Yeast Extract 0.5% NaCl 0.5% Agar (for plates) 1.5% pH 7,4 (25 µg/mL Zeocin)
<i>P. pastoris</i>	YPD(S) Medium	Yeast Extract 1% Peptone 2% Dextrose 2% Agar (for plates) 2% (Sorbitol 1M) 100 µg/mL Zeocin
	Buffered glycerol-complex medium / Buffered methanol-complex medium (BMGY / BMMY)	Yeast Extract 1% Peptone 2% 1M Potassium Phosphate (Buffer pH 6.0) 10% v/v YNB 10% v/v Biotin 0,2% v/v Glycerol (1:10) 10% v/v ή MeOH 0.5% v/v
	Minimal Medium (MD / MM)	Agar 1.5% YNB 10% v/v Biotin (0.02 %) 0.2% v/v MeOH 0.5% ή Glycerol 10% CuSO ₄ 10 mM

Η σύσταση του YNB είναι η εξής:
3,4% Yeast Nitrogen Base
10% Ammonium Sulfate.

2.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια – Τυποποιημένα πακέτα μεθόδων (kits)

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και AppliChem (Γερμανία).

Το τυποποιημένο αντιδραστήριο NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, για την απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης αγοράστηκε από την εταιρεία Macherey-Nagel (Γερμανία). Το GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.).

2.1.4. Στήλες Χρωματογραφίας

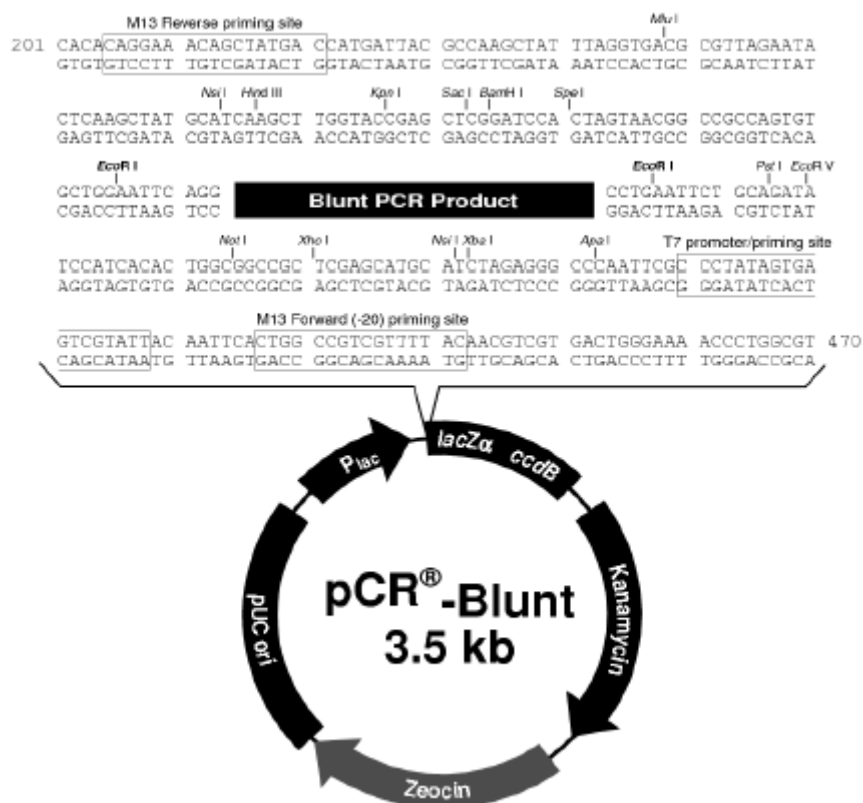
Για την απομόνωση και τον καθαρισμό του ανασυνδυασμένου ενζύμου χρησιμοποιήθηκε στήλη εναλλαγής ιόντων κοβαλτίου σε ρητίνη Talon™ (Clontech Laboratories Inc., Η.Π.Α.).

2.1.5. Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης

2.1.5.1. pCR® Blunt (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt έχει μήκος 3512 βάσεις και είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να καθιστάται κατάλληλος για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA που φέρουν ισοτελή άκρα (blunt ends). Στο φορέα αυτό εντοπίζεται μια περιοχή έναρξης αντιγραφής, η οποία εξασφαλίζει υψηλά επίπεδα αντιγραφής του πλασμιδίου στα κύτταρα του ξενιστή. Η θέση κλωνοποίησης των νουκλεοτιδικών περιοχών στο πλασμίδιο βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια LacZa και ccdB. Το γονίδιο ccdB (control of cell death) βρίσκεται σε σύντηξη με το γονίδιο LacZa και είναι γονίδιο θανάτου. Όταν γίνεται σύνδεση ενός τμήματος DNA στο πλασμίδιο διακόπτεται η έκφραση της αλληλουχίας lacZa-ccdB, με αποτέλεσμα να

αναπτύσσονται στο στερεό θρεπτικό μόνο τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία φέρουν τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια. Τα κύτταρα που έχουν λάβει το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σκοτώνονται λόγω της έκφρασης του *ccdB*. Τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα θανατώνονται λόγω έκθεσης στο αντιβιοτικό του στερεού θρεπτικού μέσου (καναμυκίνη ή ζεοσίνη), καθώς το πλασμίδιο διαθέτει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά (εικόνα 2.1).

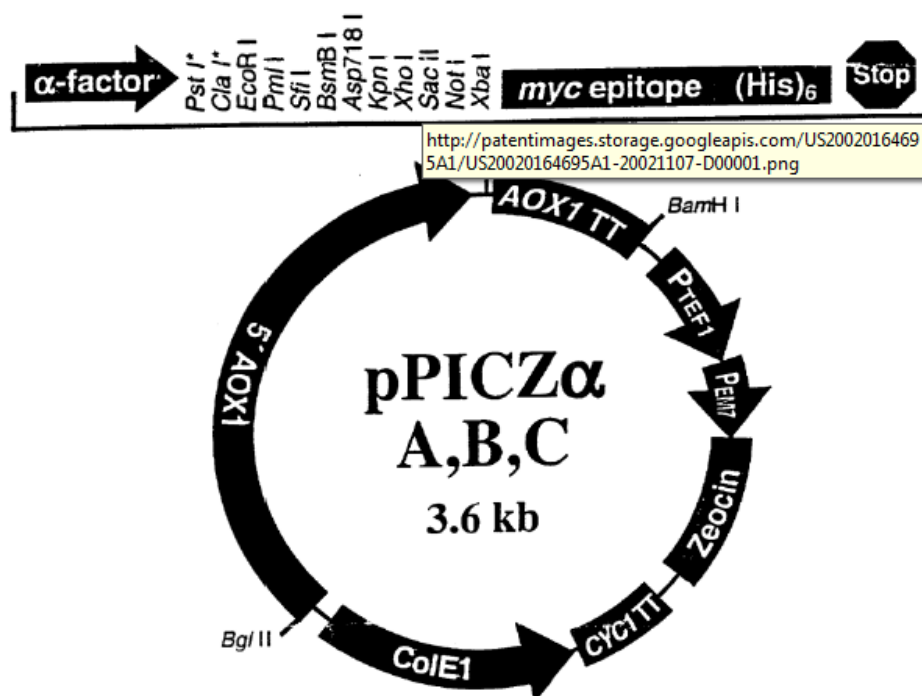


Εικόνα 2.1: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt με τα σημεία περιορισμού και τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες

2.1.5.2 pPICZaA (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZaA (Invitrogen), ο οποίος έχει μήκος 3593 bp, επιτρέπει την παραγωγή ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών στο ζυμομήκητα *P. pastoris* αλλά και την έκκριση τους στον εξωκυττάριο χώρο με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας *α-factor* της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Ο επίτοπος *c-myc* επιτρέπει την ανίχνευση της παραγόμενης πρωτεΐνης από τα αντισώματα αντι-*myc* και αντι-*myc*-HRP και τον

καθαρισμό τους σε στήλες ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, ενώ τα έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης συμβάλλουν στο διαχωρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η αντιγραφή του πλασμιδίου εξασφαλίζεται από τη θέση έναρξης της αντιγραφής. Ακόμη, το πλασμίδιο περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (AOX1), ο οποίος κατευθύνει την επαγόμενη από μεθανόλη έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Η αλκοολική οξειδάση συμμετέχει στον καταβολισμό της μεθανόλης, οξειδώνοντάς την σε φορμαλδεϋδή και H₂O₂. Συνεπώς, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορούν να μεγαλώσουν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη. Τέλος, το πλασμίδιο περιέχει και ένα γονίδιο, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στα μετασχηματισμένα στελέχη έναντι του αντιβιοτικού ζεοσίνη (εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Χάρτης του πλασμιδίου pPICZαA (Invitrogen).

2.1.6. Περιοριστικά Ένζυμα

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν παλίνδρομες θέσεις, δηλαδή θέσεις στις οποίες η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβάζεται στην κατεύθυνση 5' προς 3'. Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού λειτουργούν ως διμερή, αποτελούμενα από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες που εφαρμόζουν στο DNA με τέτοιο τρόπο, ώστε ο άξονας της αμφίπλευρης συμμετρίας τους να συμπίπτει με αυτόν της αλληλουχίας αναγνώρισης. Το ένζυμο κινείται κατά μήκος του DNA και όταν φτάσει στην αλληλουχία – στόχο, κόβει τους δύο κλώνους. Το σημείο κοπής είναι διαφορετικό ανάλογα το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Για ορισμένα ένζυμα περιορισμού είναι στο μέσο της θέσης αναγνώρισης, οπότε δημιουργούνται λεία άκρα (blunt ends). Άλλα ένζυμα κόβουν τις δύο αλυσίδες του DNA σε συμμετρικά έκκεντρα σημεία (staggered cuts) μία ή δύο βάσεις από το μέσο, οπότε δημιουργούνται προεξέχοντα άκρα 2 ή 4 βάσεων, αντίστοιχα. Τα προεξέχοντα άκρα είναι προς την 5' κατεύθυνση ή την 3' κατεύθυνση, ανάλογα με το ένζυμο. Επειδή η αλληλουχία της μονόκλωνης προέκτασης παλινδρομική, μπορεί να στοιχίζεται με τον εαυτό της, και έτσι αυτά τα άκρα αποκαλούνται κολλώδη άκρα (sticky ends). Τα ένζυμα που ενώνουν τμήματα DNA που έχουν είτε λεία είτε κολλώδη άκρα ονομάζονται λιγάσες.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση, η οποία απομονώνεται από το βακτηριοφάγο T4. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI, οι περιοριστικές ακολουθίες των οποίων φαίνονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Περιοριστικές ενδονουκλεάσες, μικροοργανισμοί προέλευσης και αλληλουχίες πέψης.

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

2.1.7. Εκκινητές (Primers)

Οι εκκινητές (Primers) είναι μικρά κομμάτια DNA που κατασκευάζονται στο εργαστήριο και έχουν οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία. Συνεπώς, οι εκκινητές παρασκευάζονται ώστε να είναι συμπληρωματικοί στην επιθυμητή αλληλουχία DNA, η οποία επιθυμείται να ενισχυθεί μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εναρκτήρια μόρια για την ενίσχυση του γονιδίου MtOx60685 ή τμημάτων αυτού με τις τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σχεδιάστηκαν με οδηγό τα νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντλήθηκε από το γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila* και φαίνονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων για κλωνοποίηση του γονιδίου στο πλασμίδιο pPICZaA.

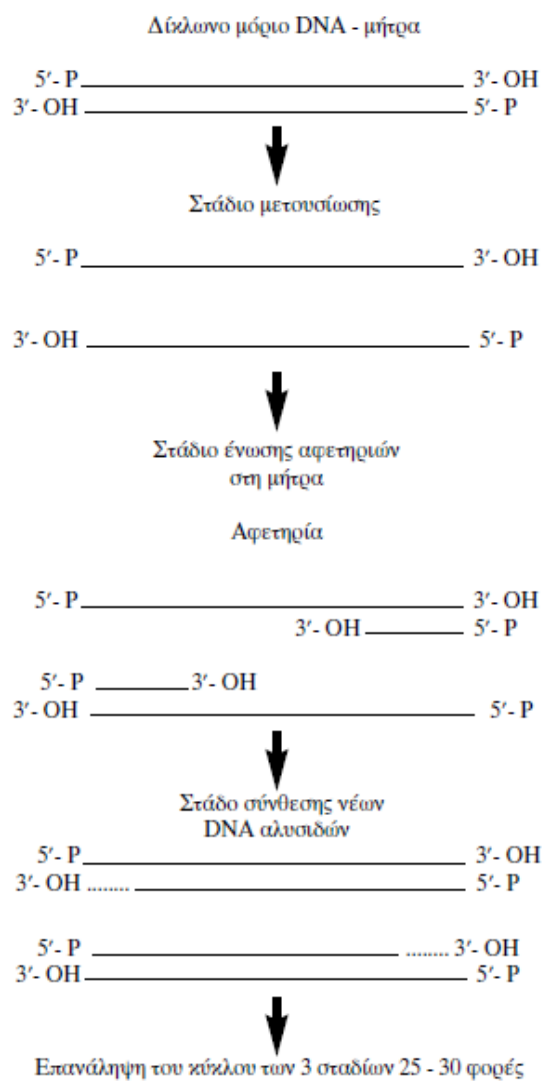
Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία Ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Περιοριστικά Ένζυμα
MtOx60685F	GC GAA TTC CGC TGT TCT TCC GAT GCG CC	EcoRI
MtOx60685R	GCT CTA GAT AAA AGT AGC ACA GCT CGC C	XbaI
MtOx60685eF	CGG GTC TCT GTC CAA GGA TG	
MtOx60685eR	CTT GGA CAG AGA CCC GTA TTC GCG GCG AAA GAT GAG C	

2.2 Μοριακές Τεχνικές

2.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι ένα εργαλείο για την αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA εκατομμύρια φορές. Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση ασθενειών, τον προσδιορισμό βακτηρίων και ιών και σε πολλές ακόμα εφαρμογές.

Η μέθοδος περιλαμβάνει συνεχώς επαναλαμβανόμενους κύκλους διαδοχικής αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας του μίγματος. Κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (εικόνα 2.3.): i) μετουσίωση του δίκλωνου DNA (denaturation), όπου οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA σπάνε, ii) υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες-μήτρα, που προέκυψε στο πρώτο στάδιο (annealing), iii) στάδιο σύνθεσης αντιγράφων DNA (Primer extension).



Εικόνα 2.3.: Στάδια αντιγραφής DNA με τη μέθοδο της PCR.

Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλούς τέτοιους κύκλους, σε κάθε έναν εκ των οποίων χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία οι νεοσύστατοι κλώνοι.

Για την πραγματοποίηση της αντιγραφής με PCR απαραίτητη είναι η χρήση μίας θερμοάντοχης πολυμεράσης και μιας συσκευής που να μπορεί να μεταβάλλει ταχύτατα τη θερμοκρασία (θερμοκυκλοποιητής) (εικόνα 2.4.). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η KOD Hot Start.



Εικόνα 2.4.: Συσκευή PCR TC-512 της εταιρείας TECHNE, Η.Π.Α., που χρησιμοποιήθηκε.

Στον πίνακα 2.4. παρουσιάζεται η σύσταση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου από το γενωμικό DNA, ενώ στο Πίνακα 2.5. παρουσιάζονται οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση.

Πίνακας 2.4.: Σύσταση αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου MtOx60685.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πολυμεράση (2 Units/μL)	1
Γενωμικό DNA (100 ng/μL)	5
Εκκινητής F (50μM)	1
Εκκινητής R (50 μM)	1
dNTPs mix (10 mM)	5
MgSO ₄ (100mM)	3
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10x)	5
Υπερκάθαρο Νερό	29
Total reaction mix	50

Πίνακας 2.5.: Συνθήκες για τη λήψη ολόκληρου του γονιδίου μέσω αντίδρασης PCR.

Στάδιο	Χρόνος(sec)	Θερμοκρασία (°C)
Ενεργοποίηση Πολυμεράσης	120	95
Αποδιάταξη	15	94
Υβριδοποίηση	30	61
Επέκταση	100	72
Τελική Επέκταση και επιδιόρθωση	60	68

Η αντίδραση της PCR ολοκληρώθηκε σε 35 κύκλους.

Το γονίδιο MtOx60685 περιέχει ένα εσώνιο (intron), δηλαδή ένα τμήμα του γονιδίου που δεν μεταφράζεται σε αμινοξέα στην ώριμη πρωτεΐνη. Για την απομάκρυνση του πραγματοποιήθηκε PCR με εκτομή τμημάτων DNA μέσω επικάλυψης εκκινητών (Splicing by Overlapping Extension PCR, SOE-PCR ή *in vitro* μάτισμα). Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο σχεδιασμό ζεύγους αλληλοεπικαλυπτόμενων εκκινητών, οι οποίοι σε συνδυασμό με τους εξωτερικούς εκκινητές, χρησιμοποιούνται σε ζεύγη για την ενίσχυση των δύο εξονίων ξεχωριστά, με εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA pCR® Blunt. Στην συνέχεια, γίνεται η ένωσή των δύο εξονίων σε μία τελική PCR με DNA-στόχο τα προϊόντα των δύο προηγούμενων αντιδράσεων PCR (Overlapping PCR). Η

σύσταση των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.6., ενώ στον Πίνακα 2.7. παραθέτονται οι θερμοκρασιακές συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντίδρασεις PCR, καθώς και αναλυτικά οι εκκινητές σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 2.6.: Συστατικά αντιδράσεων PCR για το μάτισμα του γονιδίου.

Συστατικό	SOE-PCR (μL)	PCR Συνένωσης (μL)
Πολυμεράση (2 Units/μL)	1	1
Πλασμιδιακό DNA (Αραίωση 1:100) ή προϊόντα SOE-PCR	1	1+1
Εκκινητής F (50μM)	1	1
Εκκινητής R (50 μM)	1	1
dNTPs mix (10 mM)	5	5
MgSO₄ (100mM)	3	3
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10x)	5	5
Υπερκάθαρο Νερό	33	32
Total reaction mix	50	50

Πίνακας 2.7.: Συνθήκες και εκκινητές των αντιδράσεων PCR.

	Εκκινητές	Συστατικό	Χρόνος(sec)	Θερμοκρασία (°C)
Εξώνιο 1	MtOx60685F -	Αποδιάταξη	15	94
	MtOx60685eR	Υβριδοποίηση	30	61
		Επέκταση	28	68
Εξώνιο 2	MtOx60685eF	Αποδιάταξη	15	94
	-	Υβριδοποίηση	30	61
	MtOx60685R	Επέκταση	70	68
MtOx60685 (χωρίς εσώνιο)	MtOx60685F -	Αποδιάταξη	15	94
	MtOx60685R	Υβριδοποίηση	30	61
		Επέκταση	80	68

Για τον καθαρισμό των μιγμάτων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του NucleoSpin® PCR Clean-up kit της Macherey-Nagel.

Ακολούθησε έλεγχος του δείγματος με ηλεκτροφόρηση και απομόνωση του DNA με τη βοήθεια του τυποποιημένου πακέτου Nucleospin Gel Extraction kit της εταιρίας Macherey-Nagel, διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ανάκτηση των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (w/v).

Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του.

Η αγαρόζη είναι ένα πολυσακχαρίτης, ο οποίος με την διάλυση του σε νερό και την θέρμανση του ζελατινοποιείται, και με την πήξη του σχηματίζει ένα δίκτυο μέσα από το οποίο είναι δυνατό να διέλθουν και να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους τα μόρια του DNA.

Το διάλυμα στο οποίο έγινε η παρασκευή της γέλης ήταν το TBE (πίνακας 2.8.). Το EDTA που περιέχεται στο TBE είναι ισχυρός χημικός υποκατάστατης, οπότε δεσμεύει τα κατιόντα μαγνησίου Mg^{+2} τα οποία αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην λειτουργία των νουκλεάσων και άλλων περιοριστικών ενζύμων, προστατεύοντας τα δείγματα από τυχόν αλλοιώσεις.

Επιπλέον, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα υπό UV ένωση η οποία προσδένεται σε δίκλινα νουκλεϊκά οξέα, καταλαμβάνοντας τον χώρο μεταξύ δυο διαδοχικών ζευγών βάσεων. Η πρόσδεση του με το DNA (και υπό περιπτώσεις αναδιπλωμένο RNA) ενισχύει την φθοριστική του ικανότητα καθιστώντας την παρουσία DNA στην πηκτή ιδιαίτερα εμφανή υπό υπεριώδη φωτισμό.

Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline, Η.Π.Α.), η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 2.9. Το SDS, το οποίο περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης, έχει την δυνατότητα αποδιατάσει πρωτεΐνες που πιθανώς να είναι περιπλεγμένες με το DNA και αλλάζουν το φαινόμενο μέγεθος του. Η γλυκερόλη έχοντας μεγαλύτερη πυκνότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα αναγκάζει το δείγμα να καταβυθιστεί στο πηγάδι της πηκτής, περιορίζοντας την διάχυση του DNA εκτός της πηκτής. Η βαφή BPB λειτουργεί ως ένδειξη της προόδου της ηλεκτροφόρησης καθώς λόγω του ελαφρώς αρνητικού φορτίου της συμπεριφέρεται σαν μόριο DNA με μήκος ~450 ζεύγη βάσεων (bp, base pairs).

Πίνακας 2.8.: Σύσταση διαλύματος TBE(10X) για την παρασκευή γέλης αгарόζης.

Διάλυμα TBE	
Συστατικό	Συγκέντρωση
Tris Base	108 g/L
Βορικό Οξύ	55 g/L
EDTA	0,5 M

Πίνακας 2.9.: Σύσταση διαλύματος Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue.

Διάλυμα Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue	
Συστατικό	Συγκέντρωση
SDS	0.9 %
Γλυκερόλη	50 %
BPB, BromoPhenol Blue	0.05 %

Το πήκτωμα αгарόζης παρασκευάστηκε ως εξής:

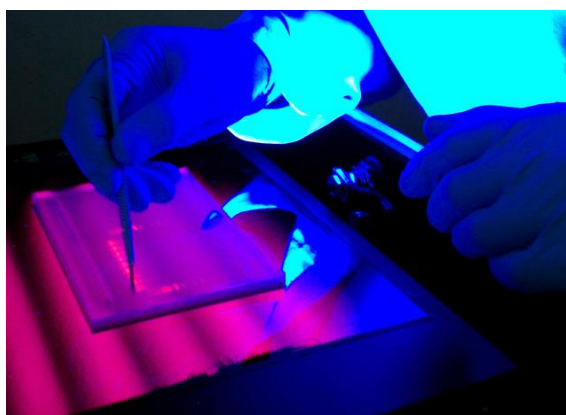
Σε 50 mL TBE γινόταν προσθήκη 0,5 g αгарόζης και βρασμός του μίγματος για περίπου 2 λεπτά. Ύστερα από ψύξη περίπου στους 50 °C, γινόταν προσθήκη 5 µL (1 mg/mL) βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide). Στην συνέχεια, το υγρό ακόμα μίγμα μεταφερόταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 2.5.).

Μετά την πήξη του μίγματος στη συσκευή, προστίθενται 50 mL διαλύματος TBE και τα δείγματα φορτώνονταν στις ειδικές θέσεις που είχαν σχηματιστεί (πηγαδάκια-wells). Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με ανάμειξη 5 µl δείγματος DNA με 3 µl υπερκάθαρο νερό και 2 µl διαλύματος φόρτωσης. Παράλληλα με το δείγμα που πρόκειται να μελετηθεί τοποθετείται πάντα και ένα δείγμα αναφοράς (Ladder) που περιέχει μόρια DNA γνωστού μήκους (HyperLadder™ I: 200-10,000 bp), ώστε να καθίσταται δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των δειγμάτων. Οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιούνταν η ηλεκτροφόρηση ήταν 60 V για περίπου 45 min. Για την εμφάνιση και φωτογράφιση των προκυπτουσών ζωνών χρησιμοποιούνταν η συσκευή InGenius BioImaging, Syngene (M. Βρετανία), ενώ σε περίπτωση που ήταν επιθυμητή η ανάκτηση κάποιου τμήματος DNA ακολουθούταν η εξής διαδικασία:

Ύστερα από την κατάτμηση του τεμαχίου της γέλης, το οποίο περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA, πράγμα που κρίνεται από των αριθμό των βάσεων του, ακολουθείται το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit της Macherey-Nagel.



Εικόνα 2.5: Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 2.6.: Πήκτωμα αгарόζης κάτω από το φως UV κατά τη διάρκεια της λήψης του επιθυμητού τμήματος DNA.

2.2.3. Αντίδραση Συνένωσης Μορίων DNA (Ligation)

Οι αντιδράσεις συνένωσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA Ligase, μεταξύ τμημάτων DNA και πλασμιδιακών φορέων.

2.2.3.1. Συνένωση πλασμιδίου PCR Blunt – προϊόντος PCR.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συνένωση του προϊόντος της αντίδρασης PCR με το πλασμίδιο pCR® Blunt, ώστε να γίνει δυνατή η καλλιέργεια του και η παραλαβή του σε μεγάλη ποσότητα (πίνακας 2.10.). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16 °C για 2 h.

Πίνακας 2.10.: Ligation προϊόντος αντίδρασης PCR με το πλασμίδιο pCR® Blunt.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακός φορέας	1
Προϊόν αντίδρασης PCR	5
Ρυθμιστικό Διάλυμα Λιγάσης (10X)	1
Λιγάση	1
Υπερκάθαρο Νερό	2
Total Reaction mix	10

2.2.3.2. Συνένωση πλασμιδίου pPICZaA – τμημάτων DNA.

Για την συνένωση τμημάτων DNA με τον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις μεταξύ του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου και του γονιδίου, με διάφορες μοριακές αναλογίες, αλλά και αντιδράσεις ελέγχου της αντίδρασης πέψης του πλασμιδιακού φορέα, οι οποίες δεν περιέχουν γονίδιο. Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16 °C για 4 h και οι ποσότητες φαίνονται στον πίνακα 2.11.

Πίνακας 2.11.: Ligation γονιδίου με το pPICZaA.

Συστατικά	Ποσότητες (μL)			
	Περίπτωση 1	Περίπτωση 2	Control 1	Control 2
Γονίδιο	3	7	-	-
Πλασμιδιακός Φορέας	1	1	1	1
Ρυθμιστικό Διάλυμα Λιγάσης (10X)	2	2	2	2
Λιγάση	1	1	1	-
Υπερκάθαρο Νερό	13	9	16	17
Total Reaction mix	20	20	20	20

2.2.4. Πέψη DNA με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Μετά την ένθεση και κλωνοποίηση της ετερόλογης αλληλουχίας σε ένα πλασμιδιακό φορέα, πραγματοποιείται γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με πέψη από περιοριστικά ένζυμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα περιοριστικά ένζυμα είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους το γεγονός ότι διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο εσωτερικό μορίων DNA, αναγνωρίζοντας και κόβοντας τις ίδιες πάντα ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA. Για την *P. pastoris* η ειδική αυτή θέση εντοπίζεται ενδιάμεσα στην αλληλουχία του υποκινητή AOX1.

Πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις (diagnostic digestions) στα μετασχηματισμένα πλασμίδια με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα XbaI και EcoRI και η σύσταση των αντιδράσεων φαίνεται στον πίνακα 2.12. Το μίγμα επωάστηκε στους 37 °C για 1 h.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pPICZaA (Double Digestion Plasmid) με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI (πίνακας 2.13.). Το μίγμα επωάστηκε στους 37 °C για 1.5 h. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1.5 μL από το κάθε ένζυμο και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για ακόμη 1.5 h. Τα ίδια αυτά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν και για την πέψη του μετασχηματισμένου πλασμιδίου PCR - Blunt (πίνακας 2.14.). Σε αυτή τη περίπτωση το μίγμα επωάστηκε στους 37 °C για 3 h.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε γραμμικοποίηση (linearization) του πλασμιδίου pPICZaA με το ένζυμο PmeI (πίνακας 2.15.) με επώαση του μίγματος στους 37 °C για 3 h.

Πίνακας 2.12.: Σύσταση αντιδράσεων *Diagnostic Digestion*.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	5
Ρυθμιστικό Διαλυμα	2
EcoRI	1
XbaI	1
Υπερκάθαρο νερό	11
Total Reaction mix	20

Πίνακας 2.13.: Πέψη του *pPICZαA*.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	6
Ρυθμιστικό Διαλυμα (10x)	3
EcoRI	1.5
XbaI	1.5
Υπερκάθαρο νερό	18
Total Reaction mix	30

Πίνακας 2.14.: Πέψη του πλασμιδίου *PCR - Blunt*.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	32
Ρυθμιστικό Διαλυμα (10x)	4
EcoRI	2
XbaI	2
Total Reaction mix	40

Πίνακας 2.15.: Γραμμικοποίηση του πλασμιδίου pPICZaA.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Πλασμιδιακό DNA	60
Ρυθμιστικό Διαλυμα	8
PmeI	5
Υπερκάθαρο νερό	7
Total Reaction mix	80

Ο έλεγχος της κατατετμημένης αλληλουχίας έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παράγραφος 2.2.2.).

2.2.5. Αλληλούχηση του DNA (Sequencing)

Ύστερα από την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCR® Blunt και pPICZaA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους, με σκοπό την διαβεβαίωση της ορθότητάς της ύστερα από την επεξεργασία μέσω των μοριακών διαδικασιών (PCR, πέψη).

2.2.6. Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)

2.2.6.1. Μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* TOP10

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E. Coli* TOP10 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο θερμικού σοκ (Heat – Shock Transformation). Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Αρχικά, 100 μL επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων λήφθηκαν από τους – 80 °C και τοποθετήθηκαν σε πάγο, ώστε να ξεπαγώσουν.
2. Στην συνέχεια, 10 μL πλασμιδιακού DNA (ligation mix) ή 1 μL πλασμιδίου που απομονώθηκε με βάση το πρωτόκολλο του GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) προστέθηκε στα κύτταρα με αργό ρυθμό.
3. Το μίγμα επωάστηκε στο πάγο για 30 min.

4. Στην συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε θερμομίξερ στους 42 °C για 70 sec και αμέσως μετά στον πάγο για 5 min.
5. Στην συνέχεια, στο μίγμα προστέθηκαν 200 μL αποστειρωμένου θρεπτικού LB Medium.
6. Το μίγμα επωάστηκε στους 37 °C για μία ώρα.
7. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε στερεό θρεπτικό LB Medium το οποίο περιείχε αντιβιοτικό στο οποίο είχε ανθεκτικότητα το εκάστοτε πλασμίδιο.
8. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για περίπου 18 h.
9. Στην συνέχεια, επιλέχθηκαν 10 μεμονωμένες αποικίες κυττάρων και εμβολιάστηκαν σε 5 mL υγρής καλλιέργειας LB Medium. Ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών στους 37 °C για περίπου 16 h.
10. Τέλος, με σκοπό την λήψη του πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (1500xg, 10 min) για λήψη των κυττάρων και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.).

Ο έλεγχος της επιτυχίας του ανασυνδυασμού έγινε με πέψη του πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI (diagnostic digestion) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (παράγραφοι 2.2.2. και 2.2.4).

2.2.6.2. Μετασχηματισμός των κυττάρων *Pichia pastoris* X33

Για την επιτυχία του μετασχηματισμού είναι απαραίτητο τα κύτταρα *P. pastoris* να καταστούν δεκτικά σε ηλεκτροδιάτρηση (electrocompetent). Αυτό πραγματοποιείται ως ακολούθως:

Αρχικά πραγματοποιείται μια καλλιέργεια *P. pastoris* X33 σε υγρό μέσο YPD (250 ml) στους 30 °C και στα 200 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm της καλλιέργειας να ανέλθει σε 3 μονάδες (baffled) ή 1 μονάδα (regural). Στην συνέχεια ακολουθεί η εξής διαδικασία:

1. Φυγοκέντρωση στα 5.000 rpm για 5 min (4 °C) και απόρριψη υπερκείμενου.
2. Επαναιώρηση σε 250 mL ddH₂O.
3. Φυγοκέντρωση στα 5.000 rpm για 5 min (4 °C) και απόρριψη υπερκείμενου.
4. Επαναιώρηση σε 150 mL ddH₂O
5. Φυγοκέντρωση στα 5.000 rpm για 5 min (4 °C) και απόρριψη υπερκείμενου.
6. Επαναιώρηση σε 5 mL διαλύματος 1M Σορβιτόλης.
7. Μεταφορά σε falcon (15 mL) και προσθήκη 2 mL Σορβιτόλης.
8. Φυγοκέντρωση στα 7.000 rpm για 5 min και απόρριψη υπερκείμενου.
9. Επαναιώρηση σε 0.6 mL διαλύματος 1M Σορβιτόλης

Οι πολλαπλοί κύκλοι επαναιώρησης συμβάλλουν στην αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και των λοιπών αλάτων της καλλιέργειας, η παρουσία των οποίων μπορεί να δημιουργήσει βραχυκύκλωμα στην κυψελίδα της ηλεκτροδιάτρησης μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιτυχίας της. Η σορβιτόλη συμβάλλει στην σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων και στην πρόληψη δημιουργίας κρυστάλλων νερού.

Για την εισαγωγή του πλασμιδίου pPICZaA στα κύτταρα της *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για το μετασχηματισμό μεγάλου εύρους κυττάρων και βασίζεται στην εφαρμογή σύντομου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος στα επιδεκτικά κύτταρα.

Πριν τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιήθηκε γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaA (παράγραφος 2.2.4.3.). Στην συνέχεια, ακολουθήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

1. Σε 80 μ L κυττάρων *P. pastoris* προστέθηκαν 30 μ L πλασμιδιακό DNA (γραμμικό).
2. Το μίγμα επωάστηκε στον πάγο για 5 min.

3. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (electroporator – εικόνα 2.7.). Η συσκευή έχει ρυθμιστεί στο πρόγραμμα “Pic”.
4. Μέτα την εφαρμογή παλμού (2 kV για 4 ms), προστέθηκε αμέσως 1 mL διαλύματος Σορβιτόλης 1M.
5. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε Falcon των 15 mL και επωάστηκαν στους 30 °C για 1 – 2 h.
6. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPDS Zeocin στους 30 °C για 3 d.
7. Τέλος, επιλέχθηκαν αποικίες που έχουν αναπτυχθεί και τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο YPD, το οποίο επωάστηκε στους 30 °C για 2 d.



Εικόνα 2.7.: Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ (Biorad, Η.Π.Α.), που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροδιάτρηση.

2.3. Παραγωγή και παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

2.3.1. Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν έγινε επιλογή τυχαίων μεμονωμένων αποικιών (7 αποικίες), οι οποίες εμβολιάστηκαν σε 50 mL BMGY (προκαλλιέργειες) σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν στους 30 °C για περίπου 18 h με συνεχή ανάδευση (200 rpm). Ύστερα, από μέτρηση την απορρόφησης στα 600 nm, επιλέχθηκε ποσότητα κυττάρων τέτοια ώστε η τελική συγκέντρωση τους στις κυρίως καλλιέργειες να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα ίση με τη μονάδα. Η ποσότητα αυτή φυγοκεντρήθηκε και επαναιωρήθηκε σε BMMY (κύρια καλλιέργεια). Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση (200 rpm) για 5 d. Κάθε 24 h πραγματοποιούνταν δειγματοληψία με σκοπό την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (μέτρηση κυτταρικής ανάπτυξης), καθώς επίσης και στον έλεγχο της ύπαρξης και των επιπέδων παραγωγής της συνολικής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου. Η επαγωγή της πρωτεΐνης στις καλλιέργειες διατηρούνταν με την προσθήκη στις καλλιέργειες 250 μ L μεθανόλης καθημερινά (τελική συγκέντρωση 0.5% v/v).

Μαζί με τις καλλιέργειες των αναδυνδιασμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του φυσικού στελέχους X33 της *P. pastoris*, ώστε να χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς των μετρήσεων.

2.3.2. Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε εργαστηριακής κλίμακας καλλιέργειες *P. Pastoris*

Ο κλώνος με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 2 κωνικών φιαλών (250 mL) με 50 mL MM έκαστη και ύστερα από επώαση 16 h (19 °C, 200 rpm) έγινε μεταφορά ποσότητας κυττάρων τέτοιας ώστε η τελική συγκέντρωση τους στις κυρίως καλλιέργειες να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα ίση με τη μονάδα σε κωνικές φιάλες 1 L, που περιείχαν 200

mL MM έκαστη. Η επαγωγή διατηρήθηκε με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης σε τελική συγκέντρωση στη φιάλη 0,5% v/v. Με το πέρας 5 ημερών, το υγρό της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε (1500xg, 10 min, 4 °C) για την απομάκρυνση των κυττάρων.

2.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών και μέτρηση ενεργότητας παραγόμενου ενζύμου

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

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 25 µL δείγματος σε 1.225 µL διαλύματος Bradford και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm, μετά το πέρας 5 min.

Για την μέτρηση της ενεργότητας του παραγόμενου ενζύμου πραγματοποιούνταν αντιδράσεις με υπόστρωμα κατεχίνης 5 mM. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν στη συσκευή SpectraMax 250 της εταιρίας Molecular Devices (Εικόνα 2.8.) σε τελικό όγκο 250 µL (230 µL υπόστρωμα και 20 µL ένζυμο) και σε pH 7.0.



Εικόνα 2.8.: Συσκευή SpectraMax 250 της εταιρίας Molecular Devices.

2.3.4. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

Μετά από την παραγωγή της πρωτεΐνης, ακολουθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός της. Το περιεχόμενο των κυρίως καλλιιεργειών φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρα χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2 μm (Whatman, USA). Το φιλτραρισμένο διάλυμα συμπυκνώνεται 10 φορές σε συσκευή Amicon Stirred Cell 8400 με με χρήση φίλτρου Regenerated Cellulose διαμέτρου πόρων 5 kDa και με εφαρμογή πίεσης 50 psi σε τελικό όγκο 5 ml και 20 mL στην μικρής και μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια, αντιστοίχα. Το συμπυκνωμένο διάλυμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl (Talon Buffer). Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα τοποθετήθηκε σε ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich), η οποία επιτρέπει την ανταλλαγή του διαλύτη στο εσωτερικό και το εξωτερικό της πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης, δηλαδή μικρά μόρια διαλύτη δύνανται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη μέχρι αποκατάσταση της ισορροπίας στο σύστημα. Συνεπώς, μετά το τέλος της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο Talon buffer. Η μεμβράνη πριν τη χρήση βυθίστηκε σε βραστό απιονισμένο νερό για περίπου 30 min. Το σύστημα παρέμεινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου όγκου ($VP.\Delta. \geq 100 \times V_{\text{διαλ/τος πρωτεϊνών}}$), για περίπου 18 h σε θερμοκρασία 4 °C, υπό ήπια ανάδευση.

Περαιτέρω καθαρισμός πραγματοποιείται με χρήση στήλης ιοντικής συγγένειας μετάλλων τύπου Talon™ (Immobilized Metal – Ion Affinity Chromatography – IMAC) (εικόνα 7). Η ρητίνη της στήλης εμφανίζει έντονη συγγένεια με μια συστάδα από 6 αμινοξέα Ιστιδίνης (6-His Tag) τα οποία είναι σκοπίμως κωδικοποιημένα στο τέλος της ετερόλογα εκφραζόμενης πρωτεΐνης, επομένως κατακρατούνται μόνο οι επιθυμητές πρωτεΐνες από την ρητίνη, ενώ οι υπόλοιπες εκλούνται. Οι δεσμευμένη πρωτεΐνη εκλύεται με την διέλευση διαλύματος Talon - 100 mM Ιμιδαζόλιο (Imidazole) από την στήλη, με το Ιμιδαζόλιο να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα ιόντα της ρητίνης, αντικαθιστώντας έτσι την δεσμευμένη πρωτεΐνη, η οποία συλλέγεται.

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης στην στήλη πραγματοποιείται με τον εξής τρόπο:

1. Τοποθέτηση 4 ml ρητίνης στη πλαστική στήλη.
2. Έκπλυση της στήλης με υπερκάθαρο νερό προκειμένου να καθαριστεί η ρητίνη από το διάλυμα αποθήκευσης.
3. Εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 30 mL Talon Buffer.
4. Διέλευση δείγματος πρωτεϊνών – μόνο η επιθυμητή πρωτεΐνη συγκρατείται στην στήλη, ενώ όλες οι υπόλοιπες αποβάλλονται.
5. Έκπλυση της στήλης με 10 ml Talon buffer, με σκοπό την απομάκρυνση των εναπομεινάντων πρωτεϊνών.
6. Προσθήκη 5 ml Talon – Imidazol buffer 5 mM.
7. Προσθήκη 7 ml Talon – Imidazol buffer 100 mM, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με τα κατάλοιπα ιστιδίνης για την πρόσδεση στα ιόντα κοβαλτίου, απελευθερώνοντας έτσι τα προσδεδεμένα μόρια. Επανάληψη του βήματος.
8. Τέλος, ακολουθεί καθαρισμός της στήλης με προσθήκη 40 mL απιονισμένο νερό και αποθήκευση της ρητίνης σε διάλυμα 20% αιθανόλης στους 4°C.



Εικόνα 7: Στήλη βαρύτητας με ρητίνη Talon® ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου.

Όσον αφορά τις καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, ακουλούθησε περαιτέρω συμπύκνωση στην συσκευή Amicon σε τελικό όγκο 10 mL. Ο

βαθμός καθαρότητας της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.3.5. Ηλεκτροφόρηση SDS πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

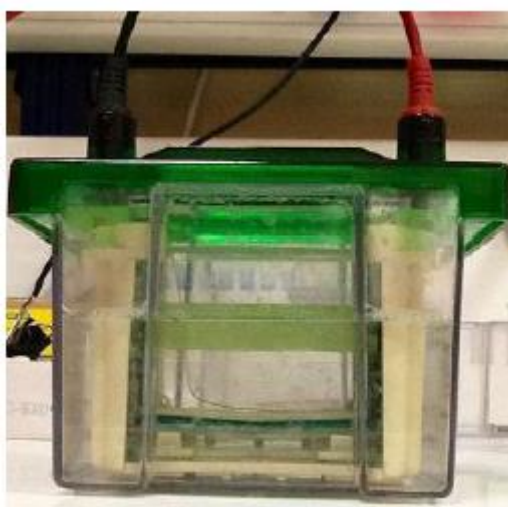
Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου SDS είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, κατά τη διέλευση τους μέσω των πόρων του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Το πολυακρυλαμίδιο είναι ένα αδρανές και σταθερό πολυμερές, το οποίο μπορεί να παρασκευαστεί επί τόπου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Δημιουργεί ένα πλέγμα από πολυμερικές αλυσίδες το οποίο διαθέτει πόρους από τους οποίους διέρχονται οι πρωτεΐνες κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Ο πολυμερισμός του επιτυγχάνεται με την παρουσία μιας χημικής ένωσης που παίζει το ρόλο του καταλύτη, του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate-APS) και ενός ενεργοποιητή, της N,N,N,'N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (- TEMED).

Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι ένα ανιονικό τασιενεργό που απαντάται πολύ συχνά σε πολλά προϊόντα καθαρισμού και υγιεινής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκτέλεση της τεχνικής καθώς προκαλεί λύση των δευτερευόντων πολυπεπτιδικών δεσμών και εξουδετερώνει τα τυχόν φορτία που εμφανίζονται. Αυτή η δράση έχει ως αποτέλεσμα την εκδίπλωση της πρωτεΐνης, εκμηδενίζοντας έτσι παρεμβολές που θα εμφανίζονταν λόγω διαφορετικού σχήματος. Παρόμοιο ρόλο διαδραματίζει και η ουσία β-Μερκαπτοαιθανόλη, η οποία προστίθεται στο διάλυμα φόρτωσης της SDS-PAGE και διασπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που προσδίδουν στην πρωτεΐνη την τριτοταγή της δομή. Για την περαιτέρω εκδίπλωση της πρωτεΐνης το δείγμα επωάζεται και σε υψηλές θερμοκρασίες για μερικά λεπτά. Κατά συνέπεια ο μόνος παράγοντας που καθορίζει την κινητικότητα μιας πρωτεΐνης στην πηκτή είναι το μοριακό της βάρος.

Για την εκτέλεση της τεχνικής χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου με διαφορετικό pH (ασυνεχής τεχνική): ένα πηκτώμα επιστοίβασης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα προς διαχωρισμό και ένα πηκτώμα ηλεκτροφόρησης (resolving gel) μέσα στο οποίο γίνεται ο εν λόγω διαχωρισμός. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι για την επίτευξη ενός "συγχρονισμού" στην εκκίνηση των πρωτεϊνών του δείγματος. Ο "συγχρονισμός" επιτυγχάνεται ως εξής: καθώς η γλυκίνη είναι μια αμφολυτική ένωση η οποία σε αυξημένα pH εμφανίζει αρνητική φόρτιση και σε χαμηλά, θετική. Με την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η γλυκίνη που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα εκτός της πηκτής στοίβασης και είναι αρνητικά φορτισμένη αρχίζει να κινείται προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου, παρασέρνοντας τα μόρια των πρωτεϊνών. Όταν όμως εισέρθει στην πηκτή στοίβασης το χαμηλότερο pH της πηκτής την οδηγεί προς την αμφοτερική μορφή της, με αποτέλεσμα το ηλεκτρικό πεδίο να ασκεί μικρότερη επιρροή πάνω της. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία ενός μετώπου γλυκίνης το οποίο έπεται ενός μετώπου πρωτεϊνών. Όταν το μέτωπο φτάσει στο πηκτώμα ηλεκτροφόρησης η γλυκίνη αποκτά ξανά το αρνητικό της φορτίο, λόγω του υψηλού pH του πηκτώματος, και λόγω του μικρού της μοριακού βάρους προσπερνά το πρωτεϊνικό μέτωπο το οποίο, λόγω του μεγέθους των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο δυσκίνητο. Κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες του δείγματος βρίσκονται στοιβαγμένες στην αρχή της πηκτής ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini – Protean 3 (BIORAD, Η.Π.Α.) (εικόνα 2.7.).



Εικόνα 2.7.: Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini – Protean 3 (BIORAD, Η.Π.Α.).

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζονται επί τόπου σε γυάλινη συναρμολογούμενη (διαφανής για παρατήρηση και μη-αγώγιμη για αποφυγή βραχυκυκλώσεων) μήτρα, που αποτελείται από δυο πλάκες διαστάσεων 101×73 mm και 101×83 mm, οι οποίες διατηρούνται σε απόσταση 1.5 mm από δυο μικρότερες πλάκες, η μήτρα ασφαρίζεται περιφερειακά με μεταλλικά κλιπ. Το κάτω άνοιγμα της μήτρας διατηρείται σφραγισμένο με ένα κομμάτι σπογγώδους ελαστικού σε ειδική διάταξη καθ' όλη την διάρκεια της πήξης του πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή παραμένει στην μήτρα αυτή και καθ' όλη την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Αρχικά, παρασκευάζεται η πηκτή ηλεκτροφόρησης (stacking gel) με ανάμειξη των συστατικών που φαίνονται στον πίνακα 2.16.

Τα συστατικά αναδεύονται ελαφρώς και στην συνέχεια διοχετεύονται στην μήτρα, αφήνοντας ένα κομμάτι ύψους περίπου 15 mm ελεύθερο για την περαιτέρω έγχυση της πηκτής επιστοίβασης. Μια προσθήκη μικρής ποσότητας νερού πάνω από την πηκτή συμβάλλει στην εξομάλυνση της εκτεθειμένης επιφάνειας, μειώνοντας τις αλλοιώσεις του σχήματος των πρωτεϊνικών λωρίδων λόγω ανομοιομορφίας της πηκτής. Ο πολυμερισμός διαρκεί περίπου 20-30 min.

Ακολουθεί η παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης (resolving gel), με ανάμειξη των συστατικών που φαίνονται στον πίνακα 2.16. Τα συστατικά αναδεύονται ελαφρώς και διοχετεύονται στην μήτρα, πληρώνοντας όλο τον κενό χώρο που είχε απομείνει. Στην συνέχεια τοποθετείται ειδική κτένα η οποία θα δημιουργήσει εσοχές (πηγάδια, wells) για την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή. Ο πολυμερισμός διαρκεί περίπου 20-30 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της πήξης, αφαιρείται προσεκτικά η ειδική κτένα, αποκαλύπτοντας τις εσοχές για τα δείγματα.

Πίνακας 2.16.: Σύσταση πηκτών για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Συστατικό	Stacking gel	Resolving gel
	<u>Ποσότητα</u>	<u>Ποσότητα</u>
Υπερκάθαρο νερό	1.75 mL	1.50 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα 0.75M Tris-HCl pH 8.8/0.2% SDS	4.7 mL	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 0.25 M Tris-HCl pH 6.8/0.2% SDS	-	1.9 mL
40% ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide) σε αναλογία 37.5:1	2.9 mL	0.38 mL
TEMED	15 µL	10 µL
APS (παρασκευασμένο επιτόπου, λόγω της αστάθειας του σε μορφή διαλύματος.)	90 µL	30 µL

Στην συνέχεια, η γυάλινη μήτρα αφαιρείται από την διάταξη που βρισκόταν κατά την διάρκεια της πήξης και τοποθετείται στο ηλεκτροφορητικό κελί, το οποίο πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Glycine/SDS pH 8.3. Το κελί ελέγχεται για διαρροές και εξετάζεται αν η στάθμη του ρυθμιστικού διαλύματος καλύπτει τα ηλεκτρόδια και τα εκτεθειμένα άκρα της πηκτής, ολοκληρώνοντας το κύκλωμα.

Τα προς ανάλυση δείγματα όγκου 20 µL (1 - 5 µg πρωτεΐνης) αναμειγνύονται με 5 µL διαλύματος φόρτωσης (πίνακας 2.17) και ακολουθεί βρασμός για 5 - 7 min. Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα τοποθετούνται και 7 µL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, για τον προσδιορισμό του βάρους των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ένα από τα πηγάδια που έχουν δημιουργηθεί. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό 35 mA/πήκτωμα για περίπου 90 min.

Πίνακας 2.17.: Σύσταση διαλύματος φόρτωσης

Συστατικό	Ποσότητα
SDS	1 g
0,25 M Tris pH 6,8	5 mL
50% w/w γλυκερόλη	2.5 mL
Μερκαπτοαιθανόλη	2.5 mL
0,1% w/v κυανούν βρωμοφαινόλης	4 mL

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η βαφή της πηκτής για την εμφάνιση της θέσης των πρωτεϊνών. Η γυάλινη μήτρα αποσυναρμολογείται και η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά και επωάζεται σε διάλυμα 40% Μεθανόλη, 10% Οξικό οξύ και 50% dH₂O με χρωστική Coomassie Brilliant Blue (0.1%) για 15-20 λεπτά, υπό αργή ανάδευση. Η βαφή εισέρχεται στην πηκτή και προσδένεται στις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό της. Καθώς η βαφή σε αυτό το στάδιο είναι ομοιόμορφη οι βαμμένες πρωτεΐνες δεν ξεχωρίζουν ιδιαίτερα από την βαμμένη πηκτή. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιείται αποχρωματισμός με διάλυμα αποχρωματισμού σύστασης 20% Μεθανόλη, 10% Οξικό Οξύ και 70% dH₂O. Η βαφή που δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνη παρασύρεται γρηγορότερα από αυτή που είναι προσδεμένη με αποτέλεσμα να γίνεται εμφανής η παρουσία των πρωτεϊνών μέσα στην πηκτή. Η διαδικασία του αποχρωματισμού πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, σε συσκευή ανάδευσης. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεώνεται τακτικά μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής ευκρίνειας.

2.3.6. Βελτιστοποίηση καλλιιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού

Όπως αναφέρθηκε (παράγραφος 1.4.), ο χαλκός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση της μίας πρωτεΐνης με χαλκό στο ενεργό της κέντρο. Χαμηλές συγκέντρωσης χαλκού μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα ατελή

ανάπτυξη, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να επιφέρουν θανάτωση των κυττάρων.

Στις καλλιέργειες της *P. pastoris* πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης χαλκού στη κυτταρική ανάπτυξη και στην ενεργότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο MM σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού (πίνακας 2.17.) και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1.

Πίνακας 2.17: Συγκεντρώσεις διαλύματος CuSO_4 που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες.

Συγκέντρωσεις διαλύματος CuSO_4 (μM)
0
5
10
25
50
100

2.3.7. Απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoH

Όπως αναφέρθηκε για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του παραγόμενου ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (παράγραφος 2.3.5.).

Η *P. pastoris* έχει τη τάση να υπεργλυκοζυλιώνει τις πρωτεΐνες που παράγει. Συνεπώς, είναι πιθανό στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου να εμφανιστούν περισσότερες από μία ζώνες, οι οποίες μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές υπεργλυκοζυλιώσεις αυτές.

Για να προσδιοριστεί αν οι παραπάνω ζώνες που εμφανίζονται αφορούν διαφορετικές γλυκοζυλιώσεις του ενζύμου, χρησιμοποιείται το ένζυμο ενδογλυκοσιδάση H (EndoH). Το ένζυμο αυτό είναι μία ειδική ενδογλυκοσιδάση η οποία αφαιρεί ορισμένους ολιγοσακχαρίτες πλούσιους σε μαννόζη που

συνδέονται με το μόριο αζώτου της ασπαραγίνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. N glycosylation

Η απογλυκοζυλίωση πραγματοποιήθηκε μετά από συμπύκνωση 600 μL δείγματος σε 50 μL και παραμονή στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 1 h. Οι ποσότητες των συστατικών της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 2.18.

Πίνακας 2.18.: Συστατικά αντίδρασης απογλυκοζυλίωσης.

Συστατικό	Ποσότητα (μL)
Απομονωμένη πρωτεΐνη + Υπερκάθαρο νερό	9 + 1
Buffer Αντίδρασης	2
EndoH (0,3 mg/mL)	2
Υπερκάθαρο Νερό	6
Σύνολο	20

2.4. Βιοχημικός Χαρακτηρισμός

2.4.1. Ζυμογράφημα (Activity Staining)

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ζυμογράφημα με υπόστρωμα κατεχίνης 5 mM.

Για το σκοπό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS πηκτής πολυακρυλαμιδίου με όμοια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφος 2.3.5. Ωστόσο, κατά την εκτέλεση, δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος παράγοντας μετουσίωσης. Τα δείγματα δεν επωάστηκαν σε υψηλή θερμοκρασία πριν τη φόρτωση τους, ώστε να διατηρηθεί η δευτεροταγής δομή τους. Τα μόρια που διαχωρίστηκαν, επομένως, δεν διέφεραν μόνο σε μοριακή μάζα, αλλά και με βάση την περιοχή της εγκάρσιας διατομής τους. Έτσι, οι ηλεκτροφορητικές δυνάμεις επιδρούν διαφορετικά και εξαρτώνται από το σχήμα της συνολικής δομής.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε επώαση της πηκτής σε διάλυμα με pH 7.0 για 30 min με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε υπόστρωμα κατεχίνης 5 mM και το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h υπό ήπια ανάδευση. Η σύσταση του native gel και του διαλύματος φόρτωσης φαίνονται στον πίνακα 2.19.

2.4.2. Επιλεκτικότητα Υποστρώματος

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις χρησιμοποιώντας μια πληθώρα μονοφαινολικών,κατεχολικών και πολυφαινολικών υποστρώματων με σκοπό την εύρεση της δράσης του παραγώμενου ενζύμου και τον χαρακτηρισμό του ως τυροσινάση ή κατεχολοξειδάση.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 550 μ L με ποσότητα ενζύμου 50 μ L. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμομίξερ στους 40 °C με τελική συγκέντρωση υποστρώματος 2 mM. Μετά το πέρας περίπου 24 h, λήφθηκαν τα φάσματα των αντιδράσεων στο υπεριώδες και στο ορατό φάσμα (200 nm – 700 nm).

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- | | | |
|--------------------------|----------------------------|--|
| • Κατεχόλη | • Γουιακόλη | • 2, 5-
διυδροξυβενζοϊκό
οξύ |
| • Κατεχίνη | • Φερουλικό οξύ | |
| • Επίκατεχίνη | • Βανιλίνη | • Πυρογαλόλη |
| • Κερσετίνη | • Βανιλικό οξύ | • Γαλλικό οξύ |
| • L – ντοπαμίνη | • L- τυροσίνη | • 2,6,- DMP |
| • 4-
χλωροκατεχόλη | • Τυροσόλη | • ABTS |
| • Καφεϊκό οξύ | • Κουμαρικό οξύ | • L-τυροσίνη / L -
ντοπαμίνη (50
μM) |
| • Πρωτοκατεχουϊκό
οξύ | • OH- φενυλασσετικό
οξύ | |
| • Επινεφρίνη | • OH- βενζοϊκό οξύ | |
| | • Ρεσορκινόλη | |

2.4.3. Προσδιορισμός Βέλτιστης Θερμοκρασίας (T_{opt})

Για τον υπολογισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με υπόστρωμα κατεχίνη 5 mM σε pH 7.0. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 750 μ L με 60 μ L ένζυμο και ανάδευση 900 rpm σε διαφορετικές θερμοκρασίες (30 $^{\circ}$ C – 80 $^{\circ}$ C). Στα 15 min μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των αντιδράσεων στα 440 nm.

2.4.4. Προσδιορισμός Βέλτιστου pH (pH_{opt})

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με υπόστρωμα 4- χλωροκατεχόλη 5 mM σε διάφορες τιμές pH (3 – 9). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 42 $^{\circ}$ C και καταγραφόταν η κλίση του διαγράμματος απορρόφηση (στα 400 nm) – χρόνος στα 20 min και στα 40 min. Στο πίνακα 2.20. φαίνονται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε εύρος pH.

Πίνακας 2.20.: Διαλύματα για κάθε εύρος pH.

Διάλυμα	Εύρος pH
Disodium phosphate / Citric acid 0,2 M / 0,1 M	3 – 6
Monosodium phosphate / Disodium phosphate 0,1 M / 0,1 M	6 – 8
Tris / HCl 0,1 M	8 - 9

2.4.5. Θερμοκρασιακή σταθερότητα (Thermal Stability)

Για τον έλεγχο της σταθερότητας του ενζύμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες, διάλυμα ενζύμου επωάστηκε σε σταθερή θερμοκρασία (40, 50, 60, 70) για 5 h. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λαμβάνεται δείγμα και πραγματοποιείται αντίδραση με υπόστρωμα 4- χλωροκατεχόλη τελικού όγκου 250 μl με 20 μl διαλύματος ενζύμου. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν στους 43 °C και καταγραφόταν η κλίση του διαγράμματος απορρόφηση (στα 400 nm).

3. Αποτελέσματα

3.1. Ετερόλογη έκφραση

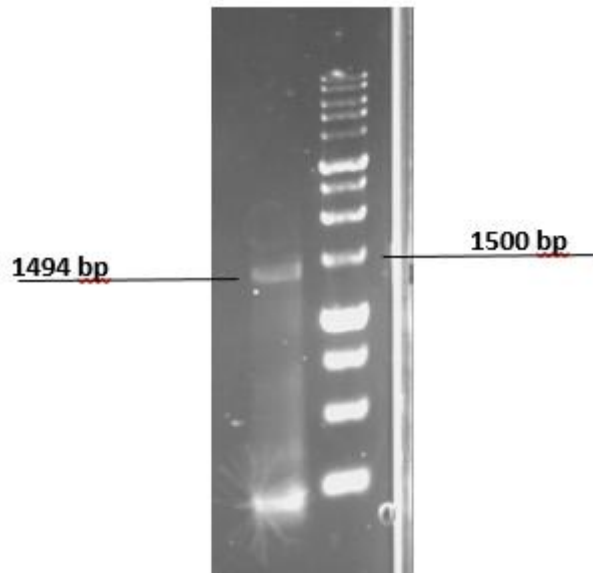
3.1.1. Ενίσχυση του γονιδίου MtOx60685 του *M. thermophila* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της αλληλούχισης του γονιδιώματος της *M. thermophila*, το γονίδιο MtOx60685 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 του γονιδιώματος του και συγκεκριμένα στη θέση 1676944-1678961. Το θεωρητικό βάρος της πρωτεΐνης είναι 43,5 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με άλλες χαρακτηρισμένες πολυφαινολοξειδάσες.

Το γονίδιο αποτελείται από 1494 bp συμπεριλαμβανομένου ενός εσωνίου μεγέθους 219 bp (Εικόνα 3.1.). Για την ενίσχυση του γονιδίου αυτού, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (παράγραφος 2.2.1.). Μετά το πέρας των ορισθέντων κύκλων αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (παράγραφος 2.2.2.). Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) ώστε να μπορούν να διακριθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των μορίων DNA έγινε με τη βοήθεια του βασικού δείκτη μοριακών μεγεθών κλιμακούμενου βήματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.1.: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου MtOx60685 με το ένα εσώνιό του (λεπτή γραμμή) και τα δύο εξώνια (κόκκινες γραμμές).



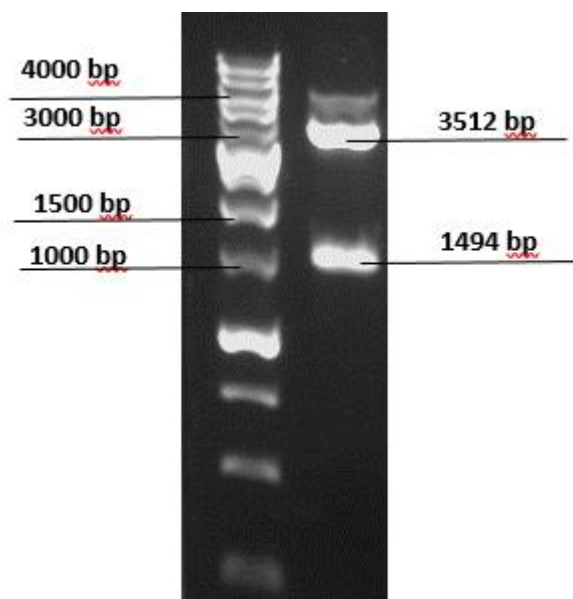
Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου MtOx60685. Αριστερά: προϊόν PCR. Δεξιά: HyperLadder™ I: 200-10,000 bp.

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR κατέδειξαν μια ζώνη λίγο χαμηλότερα από τις 1500 bp, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο MtOx60685 με μέγεθος 1494 bp, όπως αυτό υποδεικνύεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Παράλληλα, φαίνεται μία ζώνη λίγο χαμηλότερα από τις 400 bp, η οποία αντιστοιχεί σε παραπροϊόντα της PCR. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του επιθυμητού τμήματος DNA από πήκτωμα με τη χρήση του προπαρασκευασμένου αντιδραστήριου NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Γερμανία).

Το τμήμα αυτό του DNA, το οποίο έφερε ισοτελή άκρα, εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt με αντίδραση συνένωσης (Παράγραφος 2.2.3.) και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα *E. coli* TOP10 (παράγραφος 2.2.6.1.).

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε με τη χρήση αντιβιοτικού καναμυκίνη, από τα οποία, στη συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με το πρωτόκολλο του GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Η επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI (Εικόνα

3.3.). Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

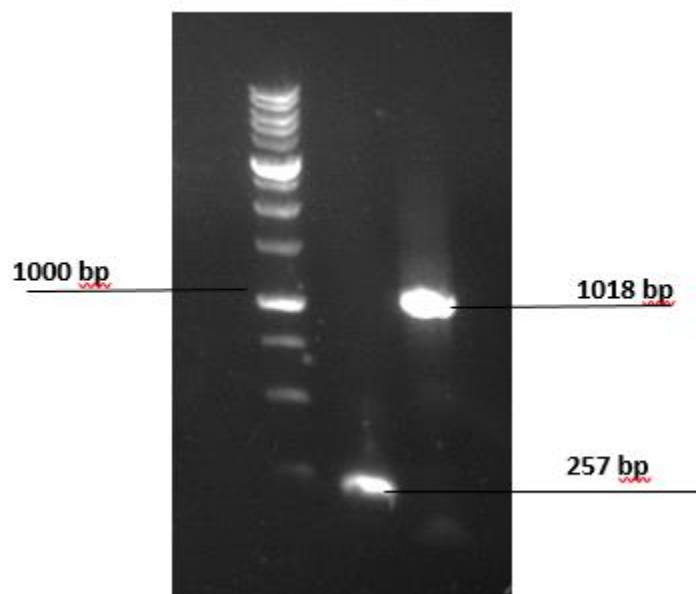


Εικόνα 3.3.: Diagnostic Digestion στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt (3512 bp) με το γονίδιο MtOx60685 (1494 bp).

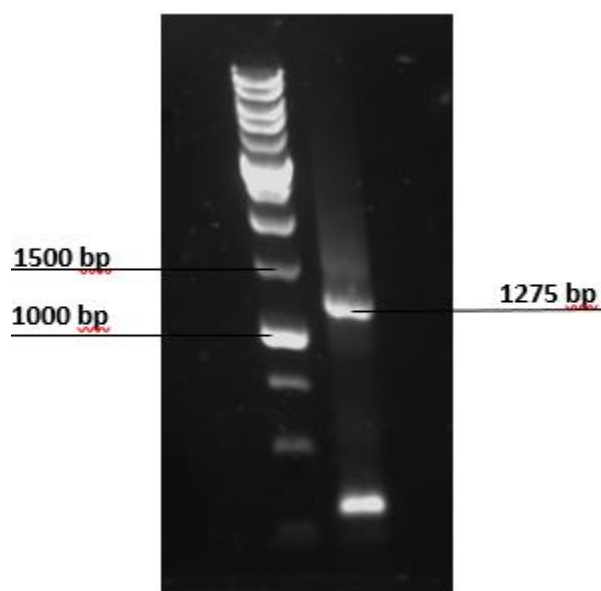
Στην Εικόνα 3.3. παρατηρείται μία ζώνη ανάμεσα στις 3000 bp και στις 4000 bp, η οποία αντιστοιχεί στο πλασμίδιο PCR Blunt (3512 bp). Επιπλέον, παρατηρείται μία ζώνη κοντά στις 1500 bp, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο MtOx60685 (1494 bp).

Αφού ταυτοποιήθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Επικάλυψης/ Επέκτασης (Splicing by Overlapping Extension PCR), ώστε να παραχθεί το γονίδιο που θα αποτελείται μόνο από τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1. Στα προϊόντα της SOE-PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 3.4.), απομόνωση των επιθυμητών περιοχών και καθαρισμός τους με το πακέτο NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Γερμανία). Στην συνέχεια, τα δύο εξώνια ενώθηκαν με άλλη αντίδραση PCR και έγινε επιβεβαίωση του προϊόντος της SOE-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.5.), απομόνωση του DNA

αυτού και ανασυνδυασμός στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt. Για τον πολλαπλασιασμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός τους σε *E. coli* TOP10, επιλογή των μετασχηματισμένων πλασμιδίων, απομόνωση αυτών και έλεγχος με πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



Εικόνα 3.4.: Προϊόντα αντιδράσεων *Overlapping PCR* για ενίσχυση των εξωνίων. Η θέση 1 αντιστοιχεί στο εσώνιο 1 με 257 bp ενώ η θέση 2 αντιστοιχεί στο εσώνιο 2 με 1018 bp.

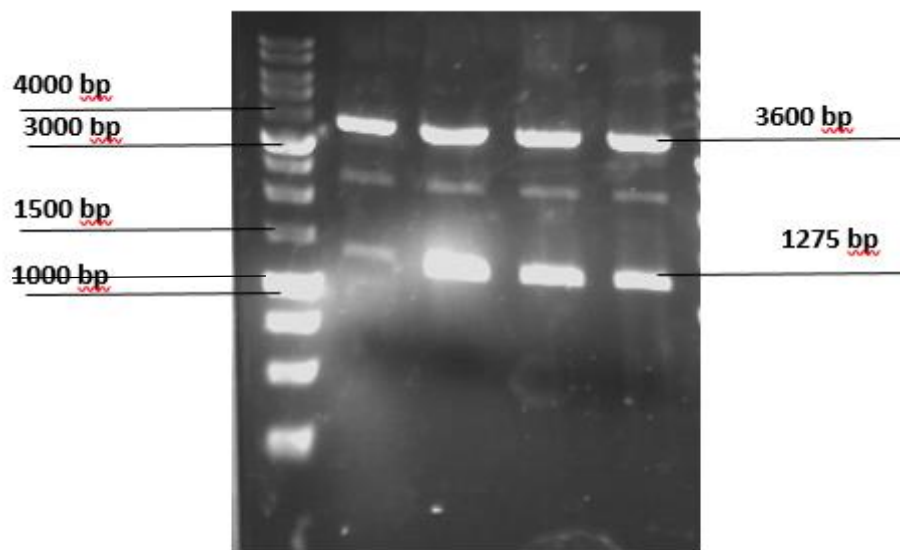


Εικόνα 3.5.: Προϊόντα της *SOE-PCR* (συνένωση εξονίων).

Στην Εικόνα 3.5. παρατηρείται μία ζώνη ανάμεσα στις 1000 bp και 1500 bp, η οποία αντιστοιχεί στο cDNA του MtOx60685 (1275 bp). Επιπλέον, παρατηρείται μία ζώνη χαμηλότερα από τις 600 bp, η οποία πιθανώς αντιστοιχεί σε παραπροϊόντα της PCR.

3.1.2. Ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA και μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli*.

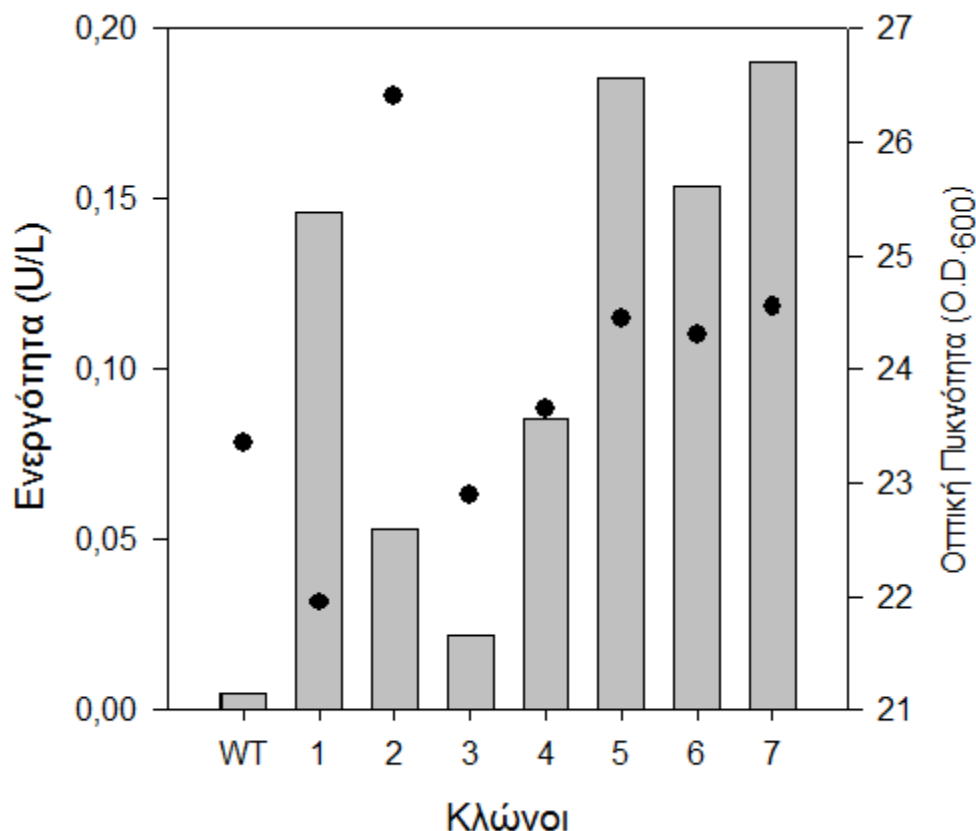
Τα ανασυνδρασμένα πλασμίδια PCR® Blunt που έφεραν το γονίδιο MtOx60685 υπέστησαν πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και XbaI. Η αλληλουχία του γονιδίου MtOx60685 που προέκυψε από τη δράση των περιοριστικών ενζύμων έφερε μονόκλωνα κολλώδη άκρα (sticky ends) και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pPICZaA (Invitrogen) που φέρει αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα (παράγραφος 2.2.3.2.). Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας συνένωσης, πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XbaI (Εικόνα 3.6.). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* TOP10 και επιλέχθηκαν μέσω του αντιβιοτικού ζεοσίνη. Στην συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA, το οποίο υπέψη πέψη (γραμμικοποίηση) με το περιοριστικό ένζυμο PmeI (παράγραφος 2.2.4.). Το πλέον γραμμικοποιημένο πλασμίδιο, απομονώθηκε από την αντίδραση πέψης με το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων της ζύμης *p. Pastoris* (παράγραφος 2.2.6.2.).



Εικόνα 3.6.: Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα στον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα *pPICZαA* (3598 bp) με το γονίδιο *MtOx60685* (1275 bp)

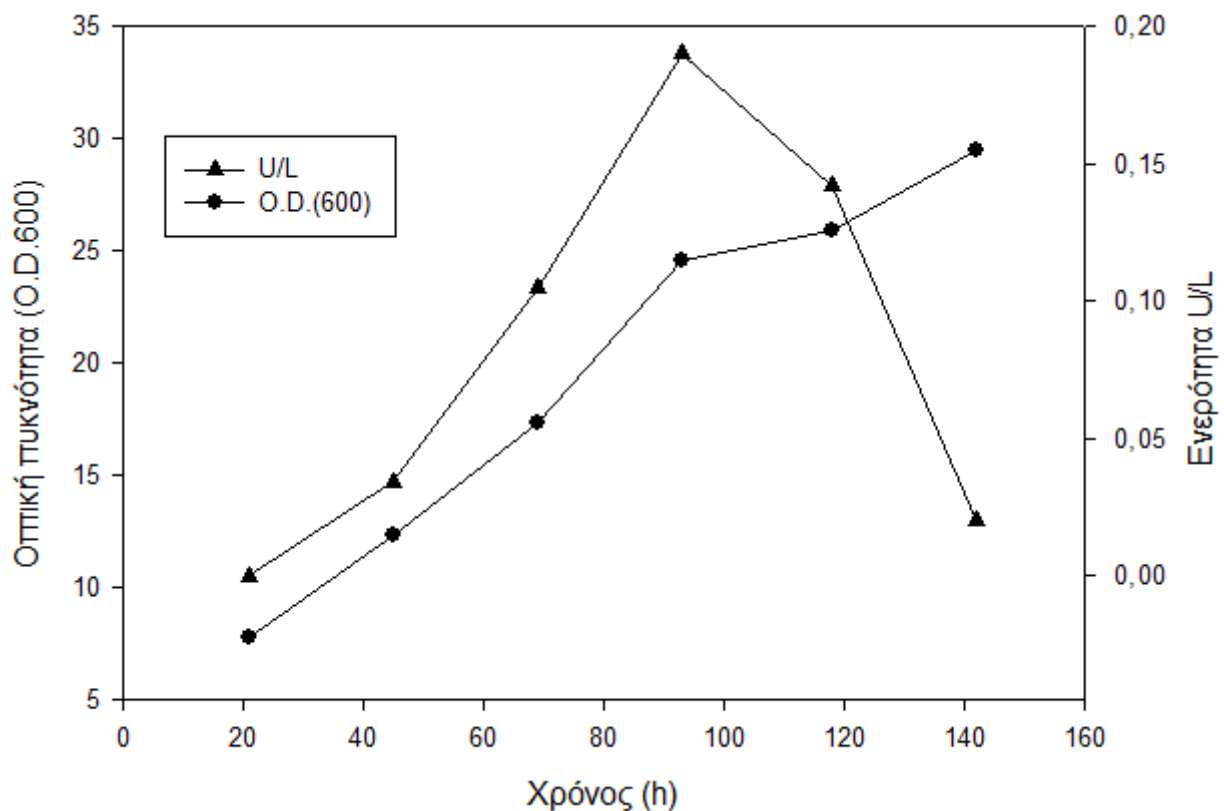
3.1.3. Επιλογή κλώνου για έκφραση και παραγωγή της *MtOx60685*

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου επιλέχθηκαν 7 κλώνοι με τους οποίους εμβολιάστηκαν 7 μικρής κλίμακας υγρές καλλιέργειες για 5 μέρες (παράγραφος 2.3.1.). Η επαγωγή της έκφρασης διατηρούνταν με καθημερινή προσθήκη μεθανόλης τελική συγκέντρωση 0.5% v/v. Κάθε 24 h πραγματοποιούνταν δειγματοληψία με σκοπό την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm (μέτρηση κυτταρικής ανάπτυξης), καθώς επίσης και στον έλεγχο της ύπαρξης και των επιπέδων παραγωγής της συνολικής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας κατεχολοξειδάσης με υπόστρωμα κατεχίνη 5 mM. Στο παρακάτω διάγραμμα (3.1) παρουσιάζεται η παραγωγή ενζύμου, σε Units/L, και η οπτική πυκνότητα για 7 διαφορετικούς κλώνους της *P. Pastoris* την 4^η μέρα καλλιέργειας. Ως αναφορά για την ενζυμική ενεργότητα έχει χρησιμοποιηθεί υγρό καλλιέργειας του φυσικού στελέχους της *P. pastoris* (WT).



Διάγραμμα 3.1.: Ενζυμική ενεργότητα κατεχολοξειδάσης για 7 διαφορετικούς κλώνους της *P. pastoris*, καθώς και για το φυσικό στέλεχος και η οπτική πυκνότητα την 4^η καλλιέργειας.

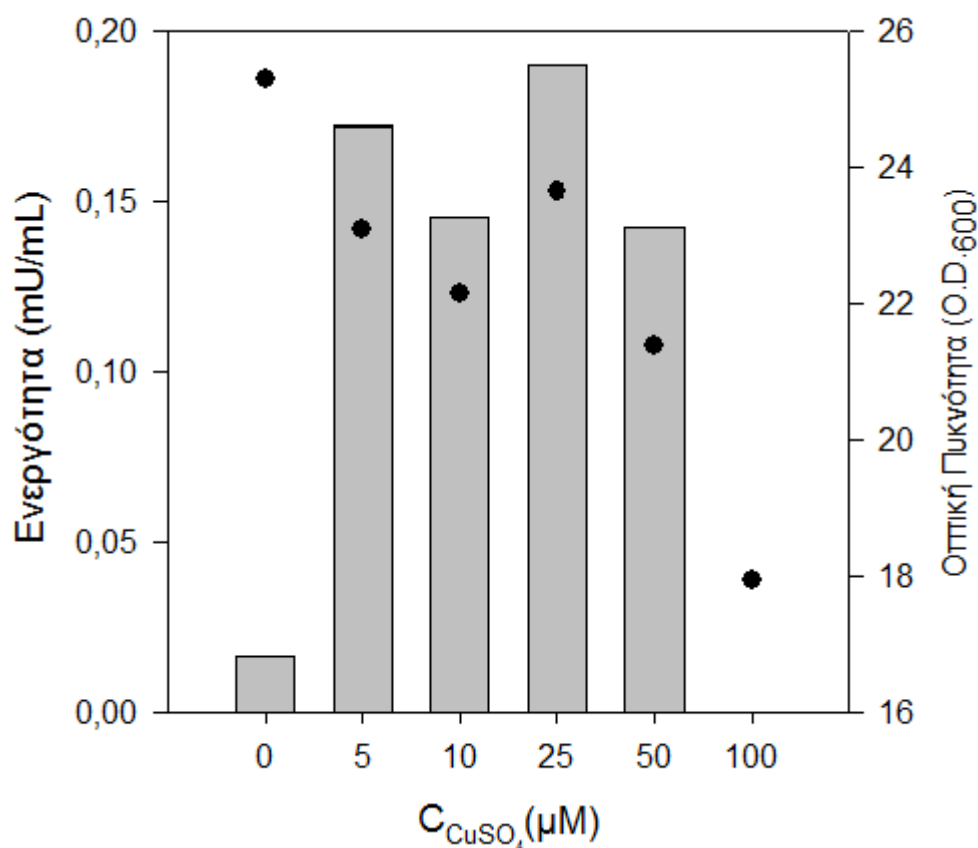
Από το διάγραμμα 3.1. παρατηρείται ότι όλοι οι κλώνοι την πρώτη μέρα δεν παρουσιάζουν σχεδόν καθόλου ενεργότητα. Με τη πάροδο του χρόνου η ενεργότητα αυξάνεται με ανάλογους ρυθμούς και για τους 4 κλώνους με το φυσικό στέλεχος να παρουσιάζει ελάχιστη ενεργότητα. Τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης (σε U/L) παρουσιάζει ο κλώνος #7 τη 4^η μέρα καλλιέργειας. Συνεπώς, αυτός ο κλώνος επιλέχθηκε για τον εμβολιασμό μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας (1 L) για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στο Διάγραμμα 3.2 φαίνεται η ενεργότητα κατεχολοξειδάσης σε συνάρτηση με τον χρόνο καλλιέργειας και την αντίστοιχη κυτταρική ανάπτυξη στο υγρό καλλιέργειας (50 mL) μιας φιάλης 250 mL. Το μέγιστο της ενζυμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε την 4η ημέρα.



Διάγραμμα 3.2.: Διάγραμμα παραγωγής MtOx από τη *p. Pastoris*.

3.1.4. Βελτιστοποίηση καλλιιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση των καλλιιεργειών ως προς τη συγκέντρωση χαλκού, καλλιιεργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού εμβολιάστηκαν με τον κλώνο #7 (παράγραφος 2.3.6.). Στο διάγραμμα 3.3. φαίνεται η μετρούμενη ενεργότητα κατεχολοξειδάσης (σε mU/mL) και η κυτταρική ανάπτυξη στο υγρό καλλιιεργειας (50 mL) μιας φιάλης 250 mL συναρτήση των διαφόρων συγκεντρώσεων χαλκού.



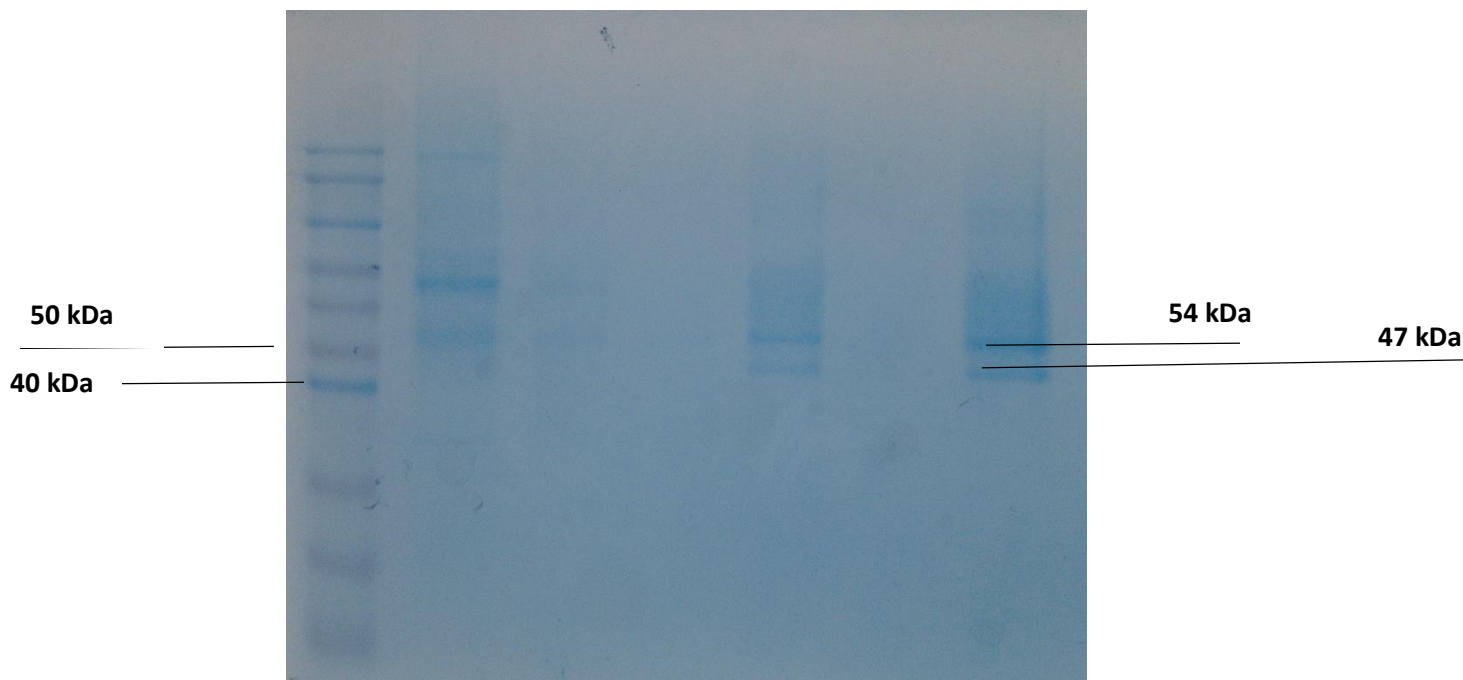
Διάγραμμα 3.3.: Ενεργότητα κατεχολοξειδάσης σε mU/mL και κυτταρική ανάπτυξη συναρτήση διαφόρων συγκεντρώσεων χαλκού.

Από το διάγραμμα 3.3. γίνεται αντιληπτό ότι μέγιστη ενεργότητα παρουσιάζεται για συγκέντρωση χαλκού 25 μM . Μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη παρατηρείται για μηδενική συγκέντρωση χαλκού, ωστόσο παρατηρείται πολύ μικρή ενεργότητα. Για συγκεντρώσεις χαλκού μεγαλύτερες ή μικρότερες από 25 μM παρατηρείται μείωση της ενεργότητας ενώ σε συγκέντρωση 100 μM δεν παρατηρείται καθόλου ενεργότητα.

3.1.5. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεΐνης

Μετά το πέρας του χρόνου καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της πρωτεΐνης με φυγοκέντρηση κάθε καλλιέργειας για το διαχωρισμό των κυττάρων και του εξωκυτταρικού υγρού. Από το εξωκυτταρικό υγρό απομονώθηκε και καθαρίστηκε η πρωτεΐνη με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.4. Στην Εικόνα 3.7.

παρουσιάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με το απομονωμένο ανασυνδυασμένο ένζυμο.

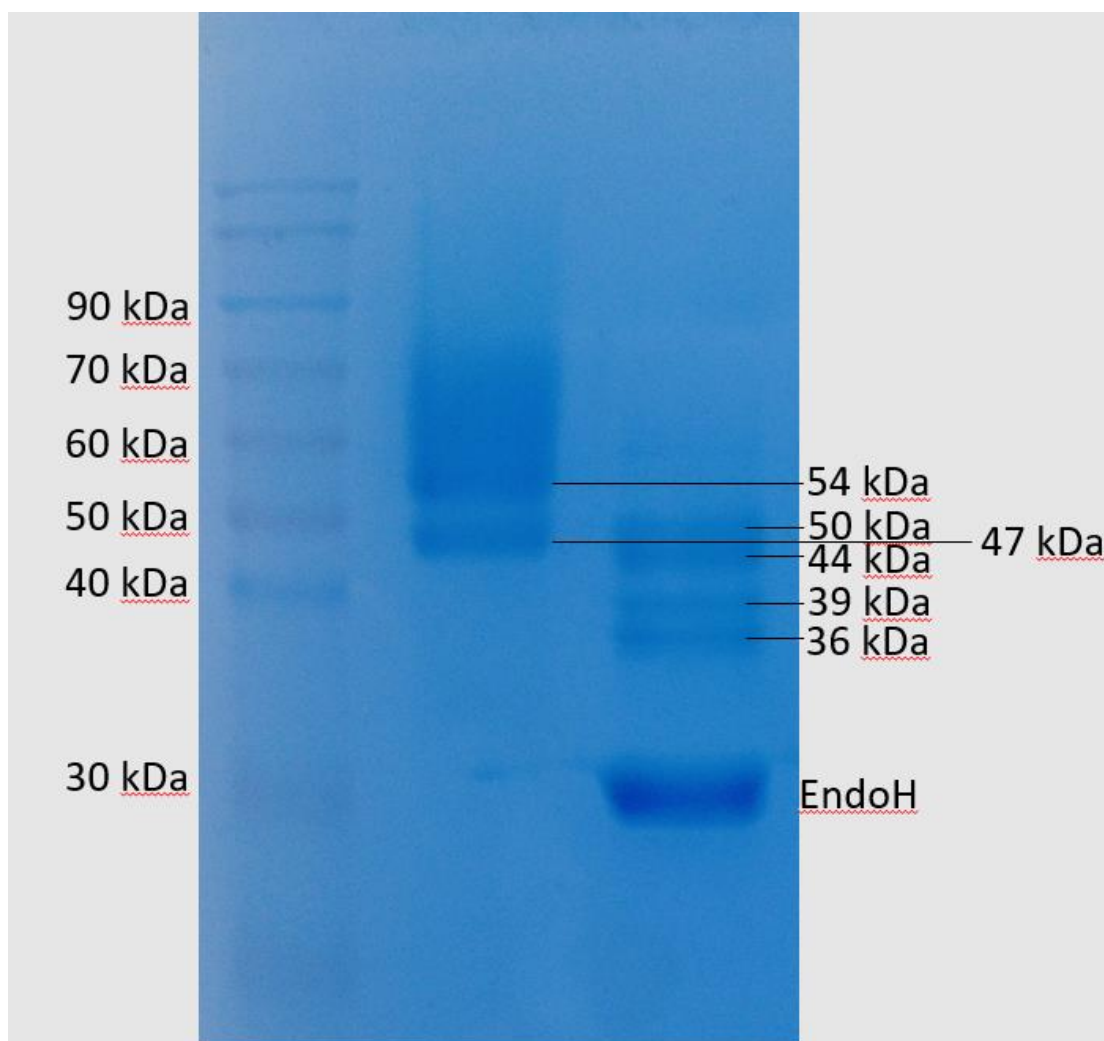


Εικόνα 3.7.: Ηλεκτροφόρηση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης σε πήκτωμα SDS.

Στην Εικόνα 3.7. παρατηρούνται δύο ζώνες, μία περίπου στα 54 kDa και μία περίπου στα 47 kDa, όπου είναι και το θεωρητικό βάρος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Η ζώνη στα 54 kDa, καθώς επίσης και διάφορες ζώνες που εμφανίζονται πάνω από τα 54 kDa θεωρείται ότι ανήκουν σε διαφορετικές γλυκοζυλιώσεις της πρωτεΐνης.

3.1.6. Απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoH

Στην εικόνα 3.7., όπως αναφέρθηκε, παρατηρούνται παραπάνω από μία ζώνες, οι οποίες θεωρείται ότι αντιστοιχούν σε διαφορετικές γλυκοζυλιώσεις της πρωτεΐνης. Για τη διαπίστωση της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιείται απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoH με τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.8. Στην Εικόνα 3.8. φαίνεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με το απομονωμένο ανασυνδυασμένο ένζυμο (κέντρο) και το απογλυκοζυλιωμένο ένζυμο (δεξιά).



Εικόνα 3.8.: Ηλεκτροφόρηση απογλυζολιωμένου ενζύμου.

Στην εικόνα 3.8. παρατηρείται ότι οι ζώνες που εμφανιζόντουσαν πάνω από τα 54 kDa ενώθηκαν σε μία ζώνη στα 50 kDa. Ωστόσο, εμφανίστηκαν τρεις ζώνες χαμηλότερα από τα 47 kDa. Οι ζώνες αυτές είναι πιθανόν να αντιστοιχούν σε πρωτεϊολύματα. Παράλληλα, φαίνεται και μία ζώνη περίπου στα 30 kDa που αντιστοιχεί στο ένζυμο EndoH.

3.1.7. Ζυμογράφημα (Activity Staining)

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του παραγόμενου ενζύμου πραγματοποιήθηκε ζυμογράφημα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο

2.4.1. Στην εικόνα 3.9. φαίνεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με το απομονωμένο ένζυμο (αριστερά) και αντίδραση απογλυκοζυλίωσης (δεξιά).



Εικόνα 3.9.: Ζυμογράφημα απομονωμένου ενζύμου (αριστερά) και απογλυκοζυλιωμένου ενζύμου (δεξιά).

Στην εικόνα 3.9. παρατηρείται ότι οι διαφορετικές γλυκοζυλιώσεις διατηρούν την ενεργότητα τους. Επιπλέον, γίνεται φανερό ότι μετά την απογλυκοζυλίωση από με το ένζυμο EndoH η ζώνη που αντιστοιχεί στη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει εξακολουθεί να διατηρεί την ενεργότητα της, ενώ για τις υπόλοιπες ζώνες που εμφανίζονται στην Εικόνα 3.8. δεν παρατηρείται ενεργότητα. Συνεπώς, ενισχύεται η πεποίθηση ότι αντιστοιχούν σε πρωτεϊόλυματα.

3.2. Χαρακτηρισμός της ανασυνδιασμένης κατεχολοξειδάσης

3.2.1. Επιλεκτικότητα Υποστρώματος

Από τα διαφορετικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (παράγραφος 2.4.2.) υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου παρατηρήθηκε στη 4- χλωροκατεχόλη σε αντίθεση με τη

κατεχόλη στην οποία παρατηρήθηκε πολύ μικρή ενεργότητα. Υψηλή ενεργότητα παρατηρήθηκε επίσης και στη κατεχίνη και στη γουαιακόλη, ενώ μετά από μεγάλο διάστημα αντίδρασης παρατηρήθηκε πολυμερισμός της L- ντοπαμίνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλή ενεργότητα στην L- τυροσίνη μετά από προσθήκη L- ντοπαμίνης, ενώ στη σκέτη L- τυροσίνη παρατηρήθηκε μικρότερη ενεργότητα. Αρκετή ενεργότητα παρατηρήθηκε στη βανιλίνη, στη πυρογαλλόλη και στην υδροκινόνη. Ελάχιστη ενεργότητα παρατηρήθηκε στην επινεφρίνη, στο φερουλικό οξύ, στο καφεϊκό οξύ, στο βανιλλικό οξύ, στο πρωτοκατεχουϊκό οξύ καθώς και στη τυροσόλη, στο 2,6- DMP, στο γαλλικό οξύ και στη ρεζορκινόλη. Μηδενική ενεργότητα παρατηρήθηκε στο υδροξυβενζοϊκό και στο υδροξυφαινυλοξικό οξύ, στο κουμαρικό οξύ, στο 2,6- διυδρόξυβενζοϊκό, στη κρεσόλη

Τα παραπάνω συμπεράσματα συνοψίζονται στον πίνακα 3.1., στον οποίο εμφανίζονται τα υποστρώματα κατηγοριοποιημένα με βάση τους υποκαταστάτες του βενζοϊκού δακτυλίου και φαίνεται η ενεργότητα που παρατηρήθηκε σε καθένα από αυτά. Στον πίνακα 3.2. φαίνονται οι δομές των υποστρωμάτων στα οποία παρουσιάστηκε πολύ ή αρκετή ενεργότητα. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν για τις αντιδράσεις με τη 4- χλωροκατεχόλη και με την κατεχίνη (διαγράμματα 3.4. και 3.5., αντίστοιχα).

Πίνακας 3.1.: Παρατηρούμενη ενεργότητα σε κάθε υπόστρωμα (+++: μεγάλη ενεργότητα, ++: αρκετή ενεργότητα, +: λίγη ενεργότητα και -: καθόλου ενεργότητα)

Υπόστρωμα	Παρατηρούμενη Ενεργότητα	Υποκαταστάτες βενζοϊκού δακτυλίου
Κατεχόλη	+	2- OH
Κατεχίνη	+++	2- OH (πολυφαινόλη)
Επικατεχίνη	+++	2- OH (πολυφαινόλη)
Κερσετίνη	++	2- OH (πολυφαινόλη)
L- ντοπαμίνη	+	2- OH (πολυφαινόλη)
4- χλωροκατεχόλη	+++	2-OH + 1- Cl (πολυφαινόλη)
Καφεϊκό	+	2- OH (πολυφαινόλη)
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	+	2- OH (πολυφαινόλη)
Επινεφρίνη	+	2- OH (πολυφαινόλη)
Γουαιακόλη	+++	1- OH + 1- OCH ₃ (μονοφαινόλη)
Φερουλικό	+	1- OH + 1- OCH ₃ (μονοφαινόλη)
Βανιλίνη	++	1- OH + 1- OCH ₃ (μονοφαινόλη)
Βανιλικό οξύ	+	1- OH + 1- OCH ₃ (μονοφαινόλη)
Τυροσόλη	+	1- OH (μονοφαινόλη)
Κουμαρικό οξύ	-	1- OH (μονοφαινόλη)
ο- κρεσόλη	-	1- OH + 1- CH ₃ (μονοφαινόλη)
2,6,- DMP	+	1- OH + 2- OCH ₃ (μονοφαινόλη)
Γαλλικό οξύ	+	3- OH (πολυφαινόλη)
Πυρογαλλόλη	+	3- OH (πολυφαινόλη)
Υδροκινόνη	++	2- OH (πολυφαινόλη)
Ρεσορκινόλη	+	2- OH (πολυφαινόλη)
L- τυροσίνη	++	1- OH (μονοφαινόλη)
L- τυροσίνη + L- ντοπαμίνη	++	

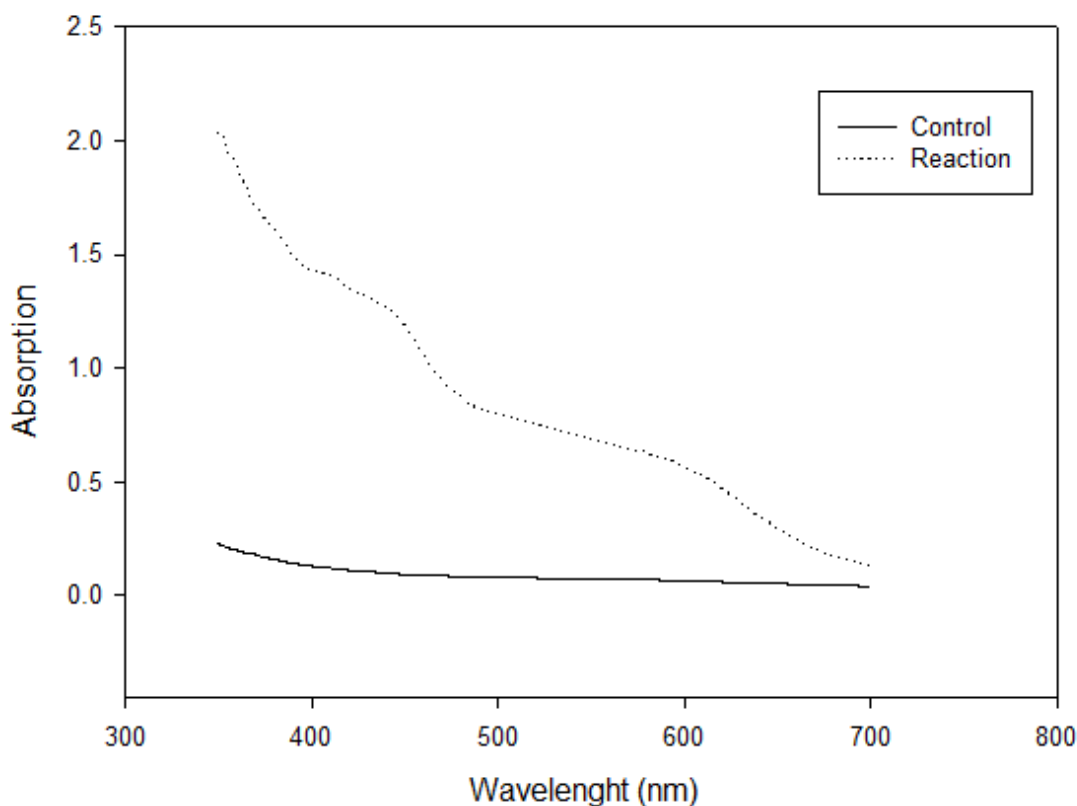
Πίνακας 3.2.: Υποστρώματα και αντίστοιχες δομές στα οποία παρατηρήθηκε πολύ ή αρκετή ενεργότητα.

Υπόστρωμα	Δομή	Υπόστρωμα	Δομή
Κατεχίνη		Υδροκινόνη	
Επίκατεχίνη		L- τυροσίνη	
Κερσετίνη		4 – χλωροκατε- χόλη	
Γουιακόλη		Βανιλίνη	
L – ντοπαμίνη			

Από τους πίνακες 3.1. και 3.2. μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι το ανασυνδυασμένο ένζυμο δρα ως κατεχολοξειδάση. Ωστόσο, αυτό αποτελεί ένα ποιοτικό συμπέρασμα και

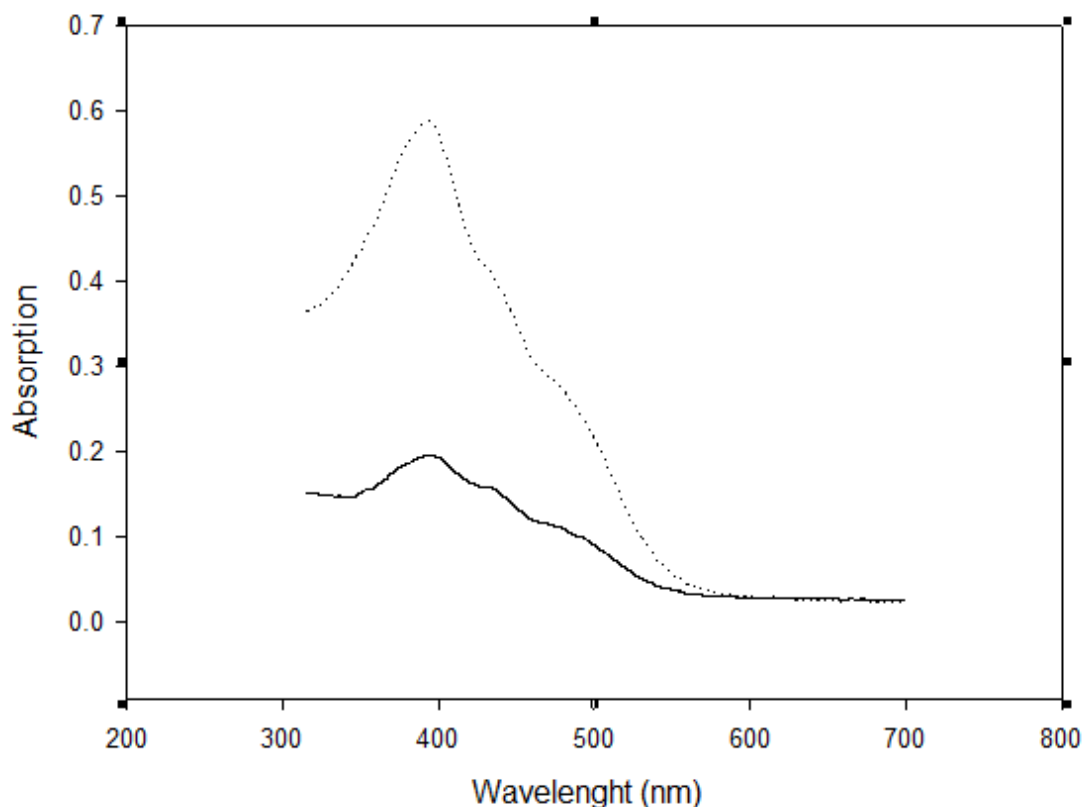
για να διεξαχθεί κάποιο ορθότερο πόρισμα θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μελέτη των κινητικών των αντιδράσεων.

Επιπλέον, είναι πιθανό το ενδεχόμενο να μην έχει βρεθεί το υπόστρωμα στο οποίο το ανασυνδυασμένο ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα του.



Διάγραμμα 3.4.: Μέτρηση της απορρόφησης αντίδρασης με υπόστρωμα 4- χλωροκατεχόλη συναρτήσει του μήκους κύματος.

Από το διάγραμμα 3.4. παρατηρείται ότι το προϊόν παρουσιάζει διαφορετικές κορυφές (στα 400 nm, στα 445 nm, στα 490 nm και στα 600nm). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή πολλών και διαφορετικών προϊόντων.

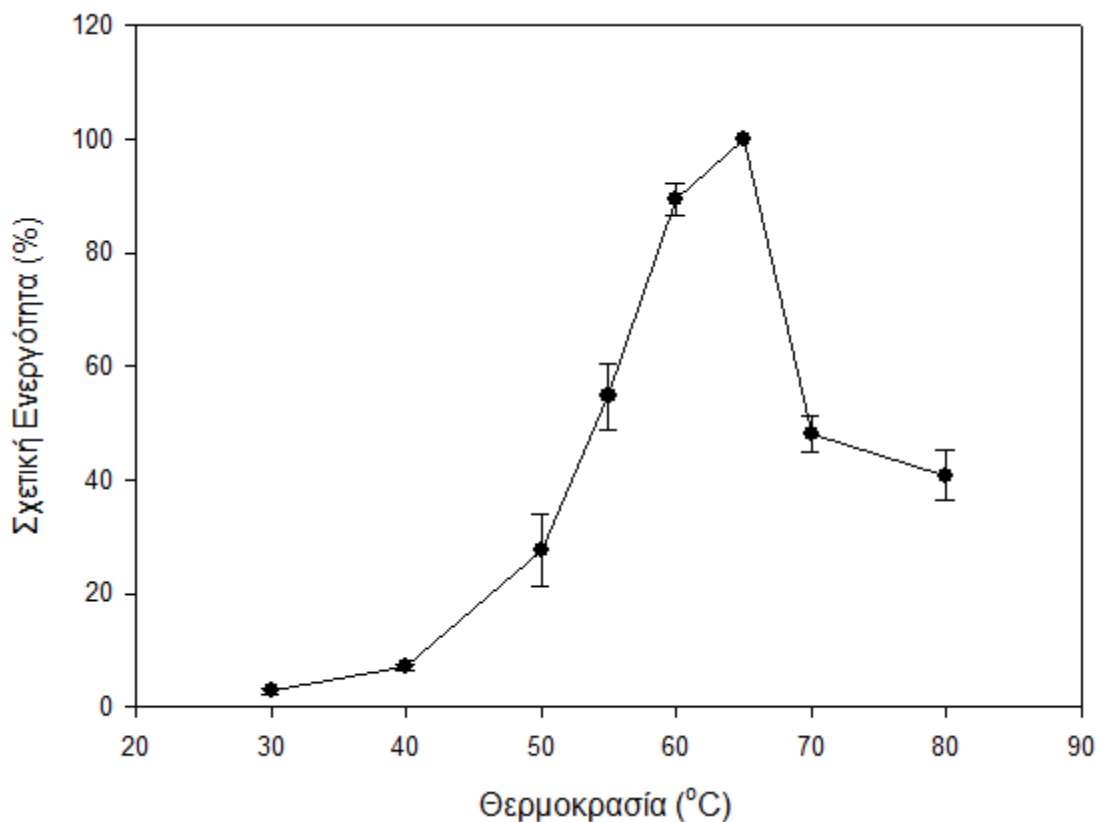


Διάγραμμα 3.5.: Μέτρηση της απορρόφησης αντίδρασης με υπόστρωμα κατεχίνη συναρτήσει του μήκους κύματος.

Στο διάγραμμα 3.5. παρατηρείται μία νέα κορυφή στα 400 nm, καθώς και μία γενικότερη αύξηση της απορρόφησης από τα 570 nm.

3.2.2. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης των ανασυνδυασμένων ενζύμων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της ενεργότητας τους στο θερμοκρασιακό εύρος 30–80 °C, σε αντιδράσεις οξείδωσης κατεχίνης 5 mM για 15 min σε pH 7.0. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η σχετική ενεργότητα (%), θεωρώντας το 100% τη μέγιστη ενεργότητα, δηλαδή την ενεργότητα στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης. Κατεσκευάστηκε διάγραμμα (3.6.) συνάρτησης της σχετικής ενεργότητας με τη θερμοκρασία.

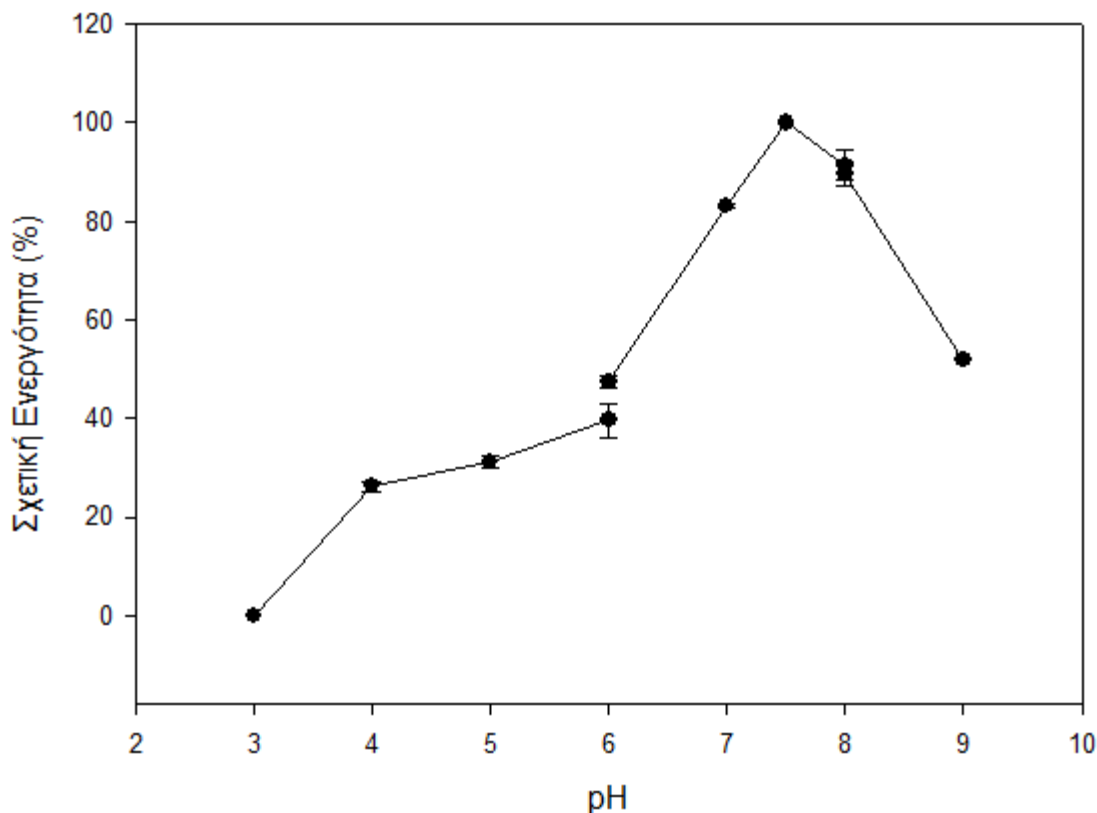


Διάγραμμα 3.6.: Σχετική ενεργότητα ενζύμου συναρτήση της θερμοκρασίας.

Παρατηρείται ότι η βέλτιστη ενεργότητα επιτυγχάνεται για την θερμοκρασία των 65 °C. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει, επίσης, με την θερμοφιλή φύση της *M. thermophila* η οποία αναπτύσσεται με βέλτιστο ρυθμό σε θερμοκρασίες 45-50 °C. Παρατηρείται ότι αύξηση της θερμοκρασίας για 5 °C επιφέρει σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.

3.2.3. Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης

Ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH δράσης των ανασυνδυασμένων ενζύμων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της ενεργότητάς τους στους 42 °C σε αντιδράσεις με υπόστρωμα 4- χλωροκατεχόλη 5 mM σε διάφορες τιμές pH (3 – 9). Ομοίως με πριν, κατασκευάστηκε διάγραμμα (3.7) της σχετικής ενεργότητας συναρτήση του pH, θεωρώντας το 100% τη μέγιστη ενεργότητα, δηλαδή την ενεργότητα στο βέλτιστο pH δράσης.

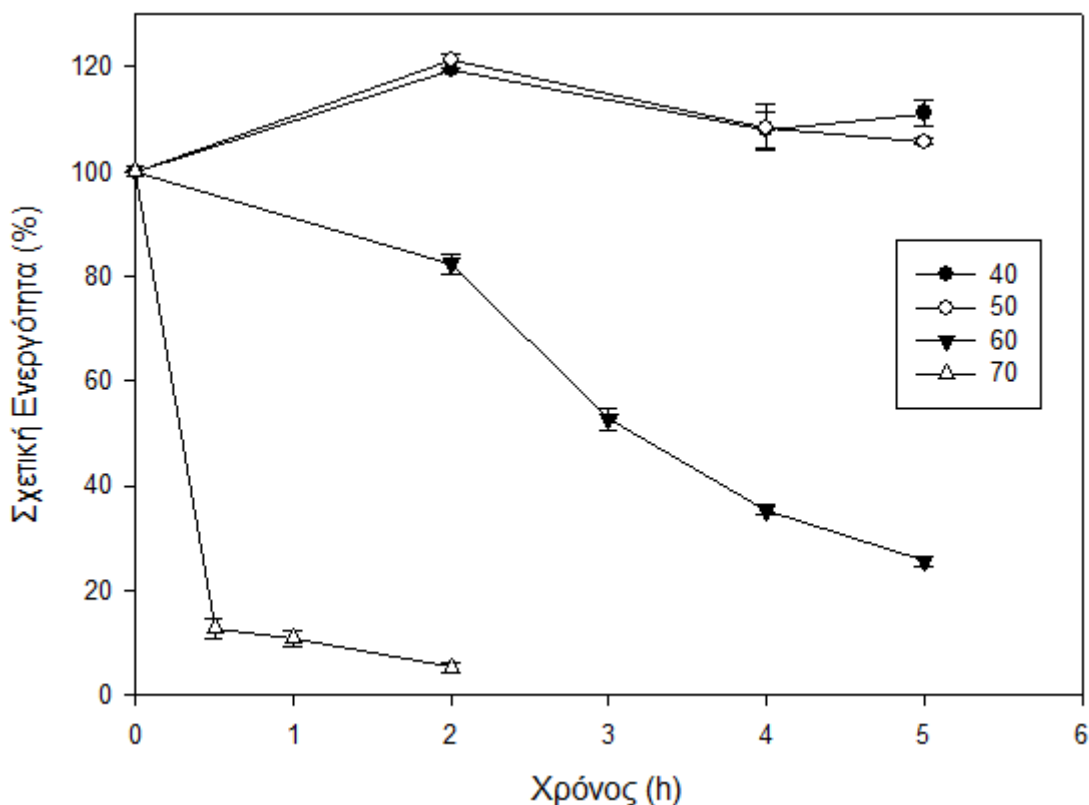


Διάγραμμα 3.7.: Σχετική ενεργότητα ενζύμου συναρτήση του pH.

Παρατηρείται ότι το βέλτιστο pH δράσης συναντάται στο buffer Sodium Phosphate με pH 7.5. Ωστόσο, φαίνεται μεγάλο ποσοστό της ενεργότητας του (~80%) να διατηρείται και σε κοντινές περιοχές pH (7 ή 8). Η ενεργότητα του ενζύμου είναι ικανοποιητική και στις τιμές pH 6.0 ή 9.0 (~40% ή ~50%, αντίστοιχα), ωστόσο μειώνεται δραστικά σε τιμές pH χαμηλότερες του 6, παρουσιάζοντας μηδενική ενεργότητα στη τιμή pH 3.0.

3.2.4. Μελέτη θερμικής σταθερότητας ενζύμου

Η μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες 40–70 °C, όπου έγινε επώαση του ενζύμου για 5 h και ανά τακτά χρονικά διαστήματα μετρίονταν η εναπομείνασα ενζυμική ενεργότητα με την προαναφερθείσα αντίδραση (Παράγραφος 2.4.5). Στο επόμενο διάγραμμα (3.8.) παρουσιάζεται η μείωση της εναπομείνασας ενεργότητας του ανασυνδυασμένου ενζύμου.



Διάγραμμα 3.8.: Εναπομένουσα ενεργότητα του προϊόντος της *P. pastoris* ύστερα από επώαση σε διάφορες θερμοκρασίες.

Από το διάγραμμα 3.8. παρατηρείται ότι η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σταθερή μετά το πέρας των 5 h μετά από επώαση στους 40 °C και στους 50 °C. Μετά από επώαση για 24 h σε αυτές τις θερμοκρασίες η εναπομένουσα ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε στο 91% για τους 40 °C και στο 40% για τους 50 °C. Παράλληλα, παρατηρείται σημαντική μείωση της ενεργότητας μετά από επώαση στους 60 °C χάνοντας περίπου το 75% της ενεργότητας μετά το πέρας των 5 h, ενώ στους 70 °C από τη πρώτη μισή ώρα χάνεται το 90% της ενεργοτητάς.

4. Συμπεράσματα

Στη σημερινή εποχή, τα θερμοάντοχα ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, διότι καθίστανται κατάλληλα σε βιομηχανικές διεργασίες, οι οποίες απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες. Οι θερμοφιλοι οργανισμοί αποτελούν μια σημαντική πηγή αυτών των ενζύμων. Ο *M. thermophila* είναι ένας θερμοφίλος αερόβιος μύκητας, ο οποίος παράγει μια πληθώρα θερμοάντοχων ενζύμων, τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Μία κατηγορία αυτών των ενζύμων είναι οι πολυφαινολοξειδάσες, οι οποίες είναι οξειδάσες που περιέχουν ιόντα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο και καταλύουν την οξειδωση μιας μεγάλης ποικιλίας φαινολικών υποστρωμάτων, που είναι η κύρια αιτία που τις καθιστά ελκυστικές για δεκάδες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση ενός γονιδίου του μύκητα *M. thermophila*, το οποίο κωδικοποιεί μια κατεχολοξειδάση. Το γονίδιο ενισχύθηκε ποσοτικά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης. Οι δύο κωδικοποιούσες περιοχές του λήφθηκαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επικάλυψης / επέκτασης. Έπειτα, το γονίδιο αυτό τοποθετήθηκε στον φορέα pPICZaA και μεταφέρθηκε στα επιδεκτικά κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Ως ευκαρυωτικός οργανισμός, η ζύμη *P. pastoris* έχει τα πλεονεκτήματα των ανώτερων ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης, όπως είναι η ικανότητα πραγματοποίησης μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες είναι σημαντικές για την επεξεργασία των πρόδρομων πρωτεϊνικών μορίων, τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και τη γλυκοζυλίωση.

Άλλες τυροσινάσες που έχουν εκφραστεί στη ζύμη *P. pastoris* είναι η τυροσινάση από το φυτό *Camellia sinensis* (Hai-Hang Li et al., 2009) και η τυροσινάση από το μύκητα *Trichoderma reesei* (Markku Saloheimo et al., 2007), η οποία εκφράστηκε και στο φυσικό στέλεχος, ενώ παρουσίασε υψηλότερη ενεργότητα όταν εκφράστηκε ετερόλογα. Η τυροσινάση από το *C. sinensis* εκφράστηκε ετερόλογα τόσο στη ζύμη *P. pastoris*, όσο και σε βακτηριακά στελέχη *E. coli*, παρουσιάζοντας πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην ζύμη. Ένας από τους πιθανούς λόγους για τη χαμηλή έκφραση σε συστήματα έκφρασης *P. pastoris* είναι η χαμηλή συγκέντρωση του αντιβιοτικού (100 µg/mL Zeocin), η οποία οδηγεί σε μικρό αριθμό αντιγράφων των μετασχηματισμένων κυττάρων (Hai-Hang Li et al., 2009). Εκτός από τη ζύμη *P. pastoris* ως ξενιστές για την έκφραση

πολυφαινολοξειδασών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα συστήματα. Η μυκητιακής προέλευσης κατεχολοξειδάση από τον *Aspergillus oryzae* εκφράστηκε ετερόλογα στο μύκητα *T. reesei*, εξωκυτταρικά όπως και η MtOx60685 (Kristiina Kruus et al., 2009). Η βακτηριακή τυροσινάση από το *Bacillus megaterium* εκφράστηκε σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21 (Fishman et al., 2010), ενώ η τυροσινάση από το βακτήριο *Streptomyces castaneoglobisporus* εκφράστηκε στο βακτήριο *Streptomyces lividans* (M. Sugiyama et al., 1996).

Η παραγόμενη πρωτεΐνη MtOx60685 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα βιοπληροφορικά με τη χαρακτηρισμένη κατεχολοξειδάση από το μύκητα *A. oryzae*. Η κατεχολοξειδάση αυτή παρουσίασε ενεργότητα σε υπόστρωμα 4-tert-βουτιλοκατεχόλη, ωστόσο δεν παρουσίασε ενεργότητα στην L- τυροσίνη και στην L- ντοπαμίνη, σε αντίθεση με την MtOx60685 (Kristiina Kruus et al., 2009). Ομοίως με την MtOx60685, η πρωτεΐνη από τον θερμόφιλο μύκητα *Chaetomium thermophile* παρουσίασε υψηλή ενεργότητα στην κατεχίνη και στην υδροκινόνη, ωστόσο παρουσίασε ελάχιστη ενεργότητα στην L- ντοπαμίνη (Tadashi Ishigami & Yuzo Yamada, 1986). Η -επίσης μυκητιακής προέλευσης- τυροσινάση από το *T. reesei* παρουσίασε και αυτή ενεργότητα στα υποστρώματα L- τυροσίνη και L- ντοπαμίνη (Markku Saloheimo et al., 2007). Το μεγάλο ενδιαφέρον για την MtOx60685, επομένως, έγκειται στο γεγονός ότι σε καμία από τις χαρακτηρισμένες τυροσινάσες δεν έχει παρατηρηθεί ενεργότητα σε τόσο μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, καθώς επίσης και αξιοσημείωτη ενεργότητα στην 4- χλωροκατεχόλη και στη κατεχίνη.

Η MtOx60685 παρουσιάζει την υψηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (65 °C σε pH 7.0) σε σχέση με άλλες χαρακτηρισμένες πολυφαινολοξειδάσες, αποτελέσματα λογικό καθώς προέρχεται από θερμόφιλο μύκητα. Ομοίως, η πρωτεΐνη από το θερμόφιλο μύκητα *C. thermophile* παρουσιάζει επίσης βέλτιστη δράση σε υψηλή θερμοκρασία (55 °C), ωστόσο μικρότερη συγκριτικά με την MtOx60685 (Tadashi Ishigami & Yuzo Yamada, 1986). Δύο άλλες μυκητιακής προέλευσης τυροσινάσες από τον μύκητα *Trametes* sp. MS39401 (P-1 και P-2) παρουσιάζουν μέγιστη δράση σε θερμοκρασία 55°C και σε pH 5.0 (Motoda, 1999). Η βακτηριακής προέλευσης τυροσινάση από το *B. megaterium* παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε χαμηλότερη θερμοκρασία συγκριτικά με τους μύκητες (50 °C) (Fishman et al., 2010). Οι χαρακτηρισμένες από φυτά τυροσινάσες παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες (30 °C – 40 °C).

Η μελέτη της θερμικής σταθερότητας του ενζύμου, έδειξε ότι η ενεργότητα της MtOx60685 παραμένει σταθερή στους 40 °C και στους 50 °C μετά το πέρας 5 h, ενώ στους 60 °C παραμένει ικανοποιητική μετά το πέρας των 2 h. Ομοίως, η κατεχολοξειδάση από το θερμόφιλο μύκητα *C. thermophile* παραμένει σταθερή μέχρι τους 55 °C για μισή ώρα (Tadashi Ishigami & Yuzo Yamada, 1986), ενώ στις τυροσινάσες από το μύκητα *Trametes* sp. MS39401, η ενεργότητα διατηρείται μέχρι τους 60 °C για την P-1 και μέχρι τους 50 °C για την P-2 για μισή ώρα (Motoda, 1999). Η κατεχολοξειδάση από το μύκητα *A. oryzae* παρουσιάζει σταθερότητα επίσης μέχρι τους 60 °C για 2 h.

Πολλές τυροσινάσες μυκητιακής προέλευσης έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα pH. Παραδείγματος χάριν η τυροσινάση από τον *A. bisporus* παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα σε pH 6.5, οι τυροσινάσες από το *Neurospora crassa* και από το *Aspergillus flavipes* σε pH 6–7 και από το *Pycnoporus sanguineus* σε pH 6.5–7 (Markku Saloheimo et al., 2007). Η κατεχολοξειδάση του *A. oryzae* παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε pH 5.6 (Kristiina Kruus et al., 2009) και η πρωτεΐνη από το μύκητα *C. thermophile* σε pH 5.0 (Tadashi Ishigami & Yuzo Yamada, 1986). Οι δύο πολυφαινολικές οξειδάσες (P-1 και P-2) από τον μύκητα *Trametes* sp. MS39401 παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε εύρος pH 4.5–5.0 στους 45°C (Motoda, 1999). Η MtOx60685, αντίθετα, παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε ελαφρώς βασικό pH (7.5) και επιπλέον διατηρεί την ενεργότητα της (~80%) σε υψηλότερο pH (8.0).

4.1. Προτάσεις για το μέλλον

Με βάση την γνώση που αποκομίστηκε από την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας προτείνεται η περαιτέρω διερεύνηση των εξής σημείων:

- ❖ Περαιτέρω μελέτη για την εύρεση του φυσικού υποστρώματος της MtOx60685
- ❖ Μελέτη σε μεγαλύτερο βάθος της κινητικής της δράσης της MtOx60685 στα υποστρώματα
- ❖ Περαιτέρω μελέτη για την επίδραση της L- ντοπαμίνης στην οξείδωση της L- τυροσίνης καθώς και σε άλλα υποστρώματα. Προσδιορισμός της βέλτιστη συγκέντρωσης L- ντοπαμίνης.
- ❖ Προσδιορισμός του προϊόντος ή των προϊόντων της αντίδρασης με υπόστρωμα τη 4- χλωροκατεχόλη μέσω MS και NMR.
- ❖ Μελέτη του εύρους pH δράσης (pH stability)
- ❖ Εύρεση κρυσταλλικής δομής πρωτεΐνης
- ❖ Μελέτη διαφόρων παρεμποδιστών της δράσης του ανασυνδυασμένου ενζύμου
- ❖ Με τα εργαλεία της πρωτεϊνικής μηχανικής να επιτευχθεί και δράση μονοοξυγενάσης για το ένζυμο.

5. Βιβλιογραφία

1. **Ahmed S.R., Lutes A.T. and Barbari T.A.** 2006. Specific capture of target proteins by oriented antibodies bound to tyrosinase-immobilized Protein A on a polyallylamine affinity membrane surface. *J Mem Sci*, 311-321
2. **Anghileri A., Lantto R., Kruus K., Arosio C. and Freddi G.** 2007. Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides on chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *J Biotechnol*, **127**: 508-519.
3. **Atlow S.C., Bonadonna-Aparo L. & Klibanov A.** 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **26(6)**: 599–603
4. **Baranowitz S.A.** 1928. Methods for treating wounds using melanin and related substances.
5. **Barbari T.A. and Ahmed S.R.** 2006. Affinity membrane for capture of a target biomolecule and formation thereof by site-directed immobilization of a capture molecule. *United States Patent*. US 2006/0292680 A1. 10.08.10.
6. **Battaini G., Monzani E., Casella L., Lonardi E., Tepper A.W., Canters G.W. & Bubacco L.** 2002. Tyrosinase-catalyzed oxidation of fluorophenols. *J Biol Chem*, **277**: 44606-44612
7. **Bell A.A. and Wheeler M.H.** 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol*, **24**: 411–451
8. **Benedict C.V. and Picciano P.T.** Method for making dopa-containing bioadhesive proteins from tyrosine-containing proteins. *Eur. Patent. EP*, 0242656 A2. 87.02.04.
9. **Bergman P.J., McKnight J., Novosad A., Charney S., Farrelly J., Craft D., Wulderk M., Jeffers Y., Sadelain M., Hohenhaus A.E., et al.** 2003. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res*, **9(4)**: 1284–1290
10. **Bi J.L. and Felton G.W.** 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J Chem Ecol*, **21**: 1511– 1530
11. **Borthakur D., Lamb J.W. and Johnston A.W.** 1987. Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required

- for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol Gen Genet*, **207(1)**: 155–160
12. **Bubacco L., Van Gastel M., Groenen E.J., Vijgenboom E. and Canters G.W.** 2003. Spectroscopic characterization of the electronic changes in the active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase upon binding of transition state analogue inhibitors. *J Biol Chem*, **278**: 7381–7389
 13. **Chen T., Vazquez-Duhalt R., Wu C.F., Bentley W.E. and Payne G.F.** 2001. Combinatorial screening for enzyme-mediated coupling. Tyrosinase-catalyzed coupling to create protein-chitosan conjugates. *Biomacromolecules*, **2**: 456-462
 14. **Chen Y.T., Stockert E., Tsang S., Coplan K.A. and Old L.J.** 1995. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92(18)**: 8125–8129
 15. **Coyne V.E. and Al-Harthi L.** 1992. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*, **58(9)**: 2861–2865
 16. **Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E. and Hendrickson W.A.** 1998. Crystal structure of a functional unit from *Octopus hemocyanin*. *J Mol Biol*, **278(4)**: 855–870
 17. **de Faria R.O., Moure V.R., Lopes de Almeida Amazonas M.A., Krieger N. & Mitchell D.A.** 2007. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol Biotechnol*, **45**: 287–294
 18. **Demolliens A., Boucher C., Durocher Y., Jolicoeur M., Buschmann M.D. and De Crescenzo G.** 2008. Tyrosinase-catalyzed synthesis of a universal coil-chitosan bioconjugate for protein immobilization. *Bioconjug Chem*, **19**: 1849-1854
 19. **Dervall B.J.** 1961. Phenolase and peptic enzyme activity in the chocolate spot disease of beans. *Nature*, **189**: 311
 20. **Durán N., Marcato P., Alves O., Souza D. and Esposito E.** 2000. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology* 2005, 3:8
 21. **Eicken C., Zippel F., Büldt-Karentzopoulos K. and Krebs B.** 1998. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Lett*, **436(2)**: 293–299

22. **Ercili Cura D., Lille M., Partanen R., Kruus K., Buchert J. and Lantto R.** 2010. Effect of *Trichoderma reesei* tyrosinase on rheology and microstructure of acidified milk gels. *Int Dairy J*, **20**: 830-837
23. **Faccio G., Kruus K., Saloheimo M. and Thöny-Meyer L.** 2012. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, **47(12)**:1749–1760
24. **Fronk P., Hartmann H., Bauer M., Solem E., Jaenicke E., Tenzer S. and Decker H.** 2015. Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chem*, **183**: 49–57
25. **Gasparetti C., Faccio G., Arvas M., Buchert J., Saloheimo M. and Kruus K.** 2009. Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol*, **86**: 213–226
26. **Gelder V. CW, Flurkey WH, Wichers HJ.** 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45(7)**: 1309-1323
27. **Gentschev P., Moller N. and Krebs B.** 2000. New functional models for catechol oxidases, *Inorganica Chimica Acta*, 300–302 & 442–452
28. **Goldfeder M., Kanteev M., Isaschar-Ovdat S., Adir N. and A. Fishman.** 2014. Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nat. Commun*, **5**: 4505
29. **Hakulinen N., Gasparetti C., Kaljunen H., Kruus K. and Rouvinen J.** 2013. The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *J Biol Inorg Chem*, **18(8)**: 917-29
30. **Halaouli S., Record E., Casalot L., Hamdi M., Sigoillot J., Asther M. and Lomascolo M.** 2005. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 580–589
31. **Himmelwright R.S., Eickman N.C., LuBien C.D., Lerch K. and Solomon E.I.** 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J Am Chem Soc*, **102**: 7339–7344

32. Ikeda K., Masujima T., Suzuki K. and Sugiyama M. 1996. Cloning and sequence analysis of the highly expressed melaninsynthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **45**: 80-85
33. Ismaya W. T., Rozeboom H. J., Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J. and Dijkstra B. W. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. 2011. *Biochemistry*, **50**: 5477–5486
34. Ismaya W.T., Rozeboom H.J., Weijn A., Mes J.J., Fusetti F., Wichers H.J. and Dijkstra B.W. 2011. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, **50(24)**: 5477–5486
35. Itoh S., Kumei H., Taki M., Nagatomo S., Kitagawa T. and Fukuzumi S. 2001. Oxygenation of phenols to catechols by a (μ - η^2 : η^2 - peroxo) dicopper(II) complex: mechanistic insight into the phenolase activity of tyrosinase. *J Am Chem Soc*, **123(27)**: 6708–6709
36. Jacobson E.S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev*, **13(4)**: 708–717
37. Jolley R.L.Jr., Evans L.H., Makino N. and Mason H.S. 1974. Oxytyrosinase, *J Biol Chem*, **249(2)**: 335–345
38. Jus S., Stachel I., Fairhead M., Meyer M., Thöny-Meyer L. and Guebitz G.M. 2012. Enzymatic cross-linking of gelatine with laccase and tyrosinase. *Biocatal Biotransfor*, **30**: 86-95
39. Kaintz C., Molitor C., Thill J., Kampatsikas I., Michael C., Halbwirth H. and Rompel A. 2014. Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Lett*, **588**: 3417-3426
40. Kang G.D., Lee K.H., Ki C.S., Nahm J.H. and Park Y.H. 2004. Silk fibroin/chitosan conjugate crosslinked by tyrosinase. *Macromol Research*, **12**: 534-539
41. Karim F. and Fakhruddin A.N.M. 2012. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. *Rev Environ Sci Biotech*, In press

42. **Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C. and Krebs B.** 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*, **5(12)**: 1084–1090
43. **Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J. C. and Krebs B.** 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**: 1084–1090
44. **Lantto R., Heine E., Freddi G., Lappalainen A., Miettinen-Oinonen A., Niku-Paavola M.L. and Buchert J.** 2005. Enzymatic modification of wool with tyrosinase and peroxidase. *J Textile Institute*, **96**: 109-116
45. **Lantto R., Puolanne E., Kruus K., Buchert J. and Auutio K.** 2007. Tyrosinase-aided protein cross-linking: effects on gel formation of chicken breast myofibrils and texture and water-holding of chicken breast meat homogenate gels. *J Agric Food Chem*, **55**: 1248-1255
46. **Lerch K. and Ettinger L.** 1972. Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur J Biochem*, **31(3)**: 427–437
47. **Liao J.C., Gregor P., Wolchok J.D., Orlandi F., Craft D., Leung C., Houghton A.N. and Bergman P.J.** 2006. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun*, **6**: 8
48. **Marino S.M., Fogal S., Bisaglia M., Moro S., Scartabelli G., De Gioia L., Spada A., Monzani E., Casella L., Mammi S. & Bubacco L.** 2011. Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. *Arch Biochem Biophys*, **505**: 67-74
49. **Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H. and Inlow J.K.** 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J Inorg Biochem*, **100(1)**: 108–123
50. **Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H. and Sugiyama M.** 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem*, **281(13)**: 8981– 8990
51. **Melo G.A., Shimizu M.M. and Mazzafera P.** 2006. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, **67(3)**: 277–285.

52. **Motoba S.** 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Trametes* sp. MS39401. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87(2)**: 197-143
53. **Motoda S.** 1979a. Properties of polyphenol oxidase from *Alternaria tenuis*. *J Ferment Technol*, **57(2)**: 79–85
54. **Motoda S.** 1979b. Purification and some properties of polyphenol oxidase from *Alternaria tenuis*. *J Ferment Technol*, **57(2)**: 71–78
55. **Muñoz-Muñoz J.L., Garcia-Molina F.J., Varón R., García-Ruiz P.A., Tudela J., García-Cánovas F.G. and Rodríguez-López J.N.** 2010b. Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life*, **62(7)**: 539–547
56. **Nakamura T., Sho S. and Ogura Y.** 1966. On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *J Biochem*, **59(5)**:481–486
57. **Onwulata C.I. and Tomasula P.M.** 2008. Gelling properties of tyrosinase-treated dairy proteins. *Food Bioprocess Tech*, **2010(3)**: 554-560
58. **Pajot H.F., Fariña J.I. & de Figueroa L.I.C.** 2011. Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. *Int Biodeterior Biodegrad*, **65**: 1199-1207
59. **Rompel A., Büldt-Karentzopoulos K., Molitor C. and Krebs B.** 2012. Purification and spectroscopic studies on catechol oxidase from lemon balm (*Melissa officinalis*). *Phytochemistry*, **81**: 19–23
60. **Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Büldt-Karentzopoulos K., Dillinger R., Tucek F., Witzel H. and Krebs B.** 1999a. Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J Biol Inorg Chem*, **4(1)**: 56–63
61. **Sanchez-Amat A. and Solano F.** 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic *Marine alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem Biophys Res Commun*, **240(3)**: 787-792
62. **Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S. & Govindwar S.P.** 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J Taiwan Inst Chem E*, **42**: 138-157

63. **Selamat M.J., Bakar J. and Nazamid S.** 2002. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J Sci Food Agric*, **82(5)**: 559–566
64. **Selinheimo E., Autio K., Kruus K. and Buchert J.** 2007. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J Agric Food Chem*, **55**: 6357-6365
65. **Selinheimo E., Lampila P., Mattinen M.L. and Buchert J.** 2008. Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *J Agric Food Chem*, **56**: 3118-3128
66. **Sendovski M., Kanteev M., Ben-Yosef V.S., Adir N. and Fishman A.** 2011. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J Mol Biol*, **405(1)**: 227–237
67. **Sendovski M., Kanteev M., BenYosef V.S., Adirb N. and Fishmana A.** 2010. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Structural Biology and Crystallization Communications*, **(66)**: 1101–1103
68. **Sjoblad R. & Bollag J.** 1981. Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. *Soil biochemistry*, :113–152
69. **Slaga T.J. & Zhao J.** 2003. Processing method for manufacturing black tea and an improved black tea. *United States Patent US*, **721(9)**: 438
70. **Solem E., Tuczek F. & Decker H.** 2016. Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angewandte Chemie*, **55**: 1-6
71. **Soler-Rivas C., Arpin N., Olivier J.M. & Wichers H.J.** 1997. Activation of tyrosinase in *Agaricus bisporus* strains following infection by *Pseudomonas tolaasii* or treatment with a tolaasin-containing preparation. *Mycol Res*, **101(3)**: 375–382
72. **Solomon E.I., Chen P., Metz M., Lee S.-K. & Palmer, A.E.** 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40(24)**: 4570–4590
73. **Solomon E.I., Sundaram U.M. & Machonkin T.E.** 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev*, **96**: 2563–2606

74. **Subramanian N., Venkatesh P., Ganguli S. & Sinkar V.P.** 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J Agric Food Chem*, **47(7)**: 2571–2578
75. **Sugumaran M.** 1995. A caution about the azide inhibition of enzymes associated with electrophilic metabolites. *Biochem Biophys Res Commun*, **212(3)**: 834–839
76. **Tadashi I. and Yuzo Y.** 1986. Purification and properties of polyphenol oxidase from *Chaetomium Thermophile*, a thermophilic fungus. *The journal of General and Applied Microbiology*, **32(4)**: 293-301
77. **Takasaki S., Kawakishi S., Murata M. and Homma S.** 2001. Polymerisation of gliadin mediated by mushroom tyrosinase. *Lebensm Wiss Technol*, **34**: 507-512
78. **Tatsuma T., Komori K., Yeoh H. and Oyama N.** 2000. Disposable test plates with tyrosinase and β -glucosidases for cyanide and cyanogenic glycosides. *Anal Chim Acta*, **408**: 233-240
79. **Van Rensburg W.J., Ferreira D., Malan E. & Steenkamp J.A.** 2000. Tyrosinase catalysed biphenyl construction from flavan-3-ol substrates. *Phytochemistry*, **53(2)**: 285-92
80. **Wada S., Ichikawa H. & Tatsumi K.** 1993. Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnol Bioeng*, **42**: 854-858
81. **Walker J.R. & Ferrar P.H.** 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **15**: 457–498
82. **Warner J.C. & Stoler E.J.** 2011. Color composition containing an aromatic compound and tyrosinase. *United States Patent*, Appl. US 2011/0113571 A1
83. **Westerholm-Parvinena A., Selinheimoa E., Boera H., Kalkkinenb N., Mattinena M. and Saloheimoa M.** 2007. Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in *Pichia pastoris*: Isotopic labeling and physicochemical characterization. *Protein Expression and Purification*, **55(1)**: 147-158
84. **Yamada K., Akiba Y., Shibuya T., Kashiwada A., Matsuda K. & Hirata M.** 2008. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. *Biotechnol Prog*, **21**: 823-829

85. **Yamada K., Aoki T., Ikeda N., Hirata M., Hata Y., Higashida K. and Nakamura Y.** 2008. Application of chitosan solutions gelled by melB tyrosinase to water-resistant adhesives. *J Appl Polym Sci*, **107**: 2723-2731
86. **Yi-Liang W., Li-Ping P., Si-Li Y. and Hai-Hang L.** 2009. Cloning, microbial expression and structure–activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis*. *Journal of Biotechnology*, **145(1)**: 66-72
87. **Yoruk R. & Marshall M.R.** 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J Food Biochem*, **27(5)**: 361–422
88. **Zekiri F., Molitor C., Mauracher S.G., Michael C., Mayer R.L., Gerner C. and Rompel A.** 2014. Purification and characterization of tyrosinase from walnut leaves (*Juglans regia*). *Phytochemistry*, **101**: 5–15
89. **Zhu M. & Phillipson, J.D., Greengrass, P.M., Bowery N.E and Cai Y.** 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein? *Phytochem*, **44(3)**: 441-7