



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΙΕΤΤΟΥ ΦΡΑΝΤΖΕΣΚΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΕΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ



*Σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας

ΑΘΗΝΑ, 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Δημήτριο Κέκο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ.Κέκο, που αποτέλεσε υπεύθυνο καθηγητή μου. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σκρέτα , υπεύθυνο του εργαστηρίου της Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο και με εμπιστεύτηκε για την ανάληψη του συγκεκριμένου θέματος.

Ανεκτίμητη κρίνεται η εμπειρία της παρούσας εργασίας λόγω της βοήθειας και ομαλής συνεργασίας με όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας. Θα ήθελα, συγκεκριμένα, να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδασκτορες και μεταδιδακτορικούς : Ηλία Μάτη, Μυρτώ Μίχου, Δάφνη Δεληβορία, Σταματία Μπέλλου, Στεφανία Πανούτσου για τις συμβουλές τους και την πολύτιμη βοήθεια τους σε όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στην διδάκτορα Δήμητρα Ζαραφέτα που αποτέλεσε σημαντικό στήριγμα για την περάτωση της διπλωματικής εργασίας, τόσο στις συμβουλές και στην καθοδήγηση της στο εργαστηριακό περιβάλλον όσο και στα επόμενα στάδια της παρούσας διπλωματικής.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στην οικογένεια μου για την στήριξη και τη βοήθεια που μου παρήχαν σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Περιεχόμενα

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Ευχαριστίες..... | 3 |
| Περίληψη..... | 7 |
| Abstract | 8 |
| ΕΝΟΤΗΤΑ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 9 |
| 1.1 Θερμοανθεκτικά ένζυμα..... | 9 |
| 1.2 Μέθοδοι έυρεσης θερμοανθεκτικών ενζύμων | 11 |
| 1.2.1 Κλασική μικροβιολογική προσέγγιση..... | 11 |
| 1.2.2 Πρωτεϊνική Μηχανική | 12 |
| 1.2.3 Μεταγονιδιοματική σάρωση | 13 |
| 1.3 Εστερολυτικά Ένζυμα..... | 14 |
| 1.4 Λιπάσες..... | 19 |
| 1.4.1 Πηγές των Λιπασών | 20 |
| 1.4.2 Παραγωγή λιπασών | 21 |
| 1.4.3 Αξιοποίηση των Λιπασών | 21 |
| 1.5 Εστεράσες..... | 23 |
| 1.5.1 Πηγές και Ιδιότητες των εστερασών | 23 |
| 1.5.2 Παραγωγή εστερασών | 25 |
| 1.5.3 Αξιοποίηση Εστερασών | 25 |
| 1.6 GDSL λιπάσες και εστεράσες..... | 26 |
| 1.6.1 Δομή και Ιδιότητες των GDSL λιπολυτικών ενζύμων | 26 |
| 1.6.2 Πηγές και εφαρμογές των GDSL λιπολυτικών ενζύμων..... | 27 |
| 1.7 Escherichia Coli ως ξενιστής οργανισμός..... | 28 |
| 1.7.1 Βακτηριακοί φορείς έκφρασης..... | 29 |
| 1.7.2 Υποκινητής..... | 31 |
| ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 33 |
| 2.1 Συσκευές – Όργανα | 33 |
| 2.2 Θρεπτικά Υλικά- Ρυθμιστικά Διαλύματα | 33 |
| 2.3 Επαγωγείς- Αντιβιοτικά- Αντισώματα..... | 34 |
| 2.5 Μοριακές Τεχνικές | 36 |
| 2.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)..... | 36 |
| 2.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης | 37 |
| 2.5.3 Πέψεις DNA | 38 |
| 2.5.4 Αντιδράσεις συνένωσης μορίων DNA (ligation) | 38 |
| 2.5.5 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων. | 39 |
| 2.6 Τεχνικές Ανάλυσης Πρωτεϊνών..... | 39 |
| 2.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) | 40 |
| 2.6.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250..... | 41 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot)..... | 41 |
| 2.6.4 Η μέθοδος Bradford | 42 |
| 2.7 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός | 43 |
| 2.8 Πρότυπες συνθήκες αντίδρασης..... | 43 |
| 2.9 Η μέθοδος χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (SEC)..... | 44 |
| 2.10 Πλασμιδιακοί φορείς..... | 44 |
| 2.11 Βακτηριακά στελέχη | 46 |
| ΕΝΟΤΗΤΑ 3:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 47 |
| 3.1Λειτουργία , κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου EstDZ4 | 47 |
| 3.1.1 Προέλευση και βιοπληροφορική ανάλυση της εξεταζόμενης αλληλουχίας..... | 47 |
| 3.1.2 Απομόνωση, κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου EstDZ4 | 53 |
| 3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου EstDZ4, καθαρισμός και χαρακτηρισμός της προκύπτουσας εστεράσης | 59 |
| 3.2.1 Κλωνοποίηση και Ετερόλογη έκφραση της EstDZ4 | 59 |
| 3.2.2 Παραγωγή και Καθαρισμός της EstDZ4..... | 62 |
| 3.2.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός της EstDZ4 | 67 |
| 3.2.3.1 Μελέτη εκλεκτικότητας του υποστρώματος της EstDZ4..... | 67 |
| 3.2.3.2 Εκλεκτικότητα σε υποστρώματα | 69 |
| 3.2.3.3 Εκλεκτικότητα ως προς τις συνθήκες pH | 71 |
| 3.2.3.4 Εκλεκτικότητα ως προς την τιμή της θερμοκρασίας..... | 72 |
| 3.2.3.5 Έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας του EstDZ4..... | 73 |
| 3.2.3.6 Μελέτη κινητικών σταθερών | 75 |
| ΕΝΟΤΗΤΑ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 76 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 78 |

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά την ανακάλυψη και το χαρακτηρισμό ενός νέου θερμοανθεκτικού ενζύμου με εστερολυτική δράση. Η γονιδιακή αλληλουχία που κωδικοποιεί το νέο ένζυμο προέκυψε μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης ενός μεταγονιδιωματικού δείγματος από θερμοπηγή της Ισλανδίας, με χρήση του προγράμματος ANASTASIA, το οποίο αναπτύχθηκε στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος Hotzyme. Πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο αποσκοπεί στην αποθήκευση, διαχείριση και ανάλυση μεταγονιδιωματικών δεδομένων που έχουν ληφθεί από θερμά περιβάλλοντα. Η εκπόνηση της εργασίας περιλαμβάνει την απομόνωση, τον έλεγχο της ενζυμικής συμπεριφοράς καθώς επίσης και τον βιοχημικό χαρακτηρισμό μιας νέας εστεράσης, την οποία ονομάσαμε EstDZ4, η οποία παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες (23% με την Extracellular lipase At5q55050 της κατηγορίας των GDSL).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την EstDZ4 επιλέχθηκε προς μελέτη, λόγω της υψηλής ομοιότητας (99%) με μια υποθετική πρωτεΐνη που φέρει τα χαρακτηριστικά των GDSL εστερασών και έχει εντοπιστεί σαν αλληλουχία στο γονιδίωμα του βακτηριακού στελέχους *Thiomonas sp*. Η απομόνωση της αλληλουχίας διενεργήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το μεταγονιδιωματικό δείγμα DNA, το γονίδιο εκφράστηκε ετερόλογα σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και απομονώθηκε η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Η βιοπληροφορική μελέτη της νέας αλληλουχίας έδειξε ότι πρόκειται για μια GDSL εστεράση στο αμινοτελικό άκρο της οποίας περιέχεται ένα πεπτιδίο οδηγός το οποίο και αφαιρέθηκε. Η αφαίρεση του πεπτιδίου οδηγού αύξησε σημαντικά τα επίπεδα παραγωγής του ενζύμου στον ξενιστή οργανισμό και κατέστησε εφικτή την απομόνωση του σε υψηλό βαθμό καθαρότητας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (SEC). Το ένζυμο ελέγχθηκε ως προς την εστερολυτική του δράση η οποία και επαληθεύτηκε. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και βιοχημικός χαρακτηρισμός της εστεράσης EstDZ4 όπου προσδιορίστηκαν τα βασικά βιοχημικά χαρακτηριστικά του νέου ενζύμου. Η EstDZ4 είναι μια εστεράση που παρουσιάζει εκλεκτικότητα σε υποστρώματα μεσαίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας με βέλτιστο το υπόστρωμα του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το καπριλικό οξύ (pnp-octanoate), όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της υδρόλυσης υποστρωμάτων εστέρων της παρανιτροφαινόλης με διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας λιπαρά οξέα. Η υδρόλυση αυτών των υποστρωμάτων που καταλύεται από την εστεράση EstDZ4 ακολουθεί το κινητικό μοντέλο Michaelis–Menten, εμφανίζοντας την υψηλότερη τιμή καταλυτικής απόδοσης $k_{cat}/K_M = 13.467 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ για το υπόστρωμα του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το καπριλικό οξύ. Τέλος, η εστεράση EstDZ4 παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους 75° C με χρόνο ημιζωής περίπου 6 h στην ίδια θερμοκρασία, και βέλτιστο pH δράσης 6,5, κάτι που την καθιστά ένα θερμοσταθερό εστερολυτικό ένζυμο.

Abstract

This particular assignment concerns the detection and characterization of a new thermostable enzyme with esterolytic activity. The DNA sequence, which encodes the novel enzyme, came up from bioinformatics analysis of a metagenomic sample taken from a hot spring in Iceland, using the final form of the program ANASTASIA, which was developed in the framework of the European research program HotZyme. It is about a project whose aim is to store, handle and analyze metagenomic sequencing data which were taken from hot springs. The elaboration of this assignment includes the isolation, the inspection of enzymic activity, as well as, the biochemical characterization of a new esterase called EstDZ4 esterase, which presents low homology in already characterized proteins (23% with Extracellular lipase At5q55050 of GDSL family).

The open reading frame, which encodes EstDZ4, was selected for extensive research due to a moderate similarity (99%), with a hypothetical protein which has the characteristics of GDSL esterases and was found as DNA sequence in the genome of the bacterial strain *Thiomonas sp.* The isolation of the sequence was conducted with Polymerase Chain Reaction (PCR) from the metagenomic DNA sample, this DNA sequence was expressed in *E.coli* and the protein encoded, was isolated. The bioinformatics research of the new sequence showed that it is about a GDSL esterase whose N-terminus signal sequence was discovered and removed. The removal of the signal sequence increased the production levels significantly and facilitated the purification of the enzyme using immobilized metal ion affinity (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC). The enzyme was confirmed to have esterolytic activity. Finally, a biochemical characterization of EstDZ4 was performed, where the basic biochemical characteristics of the new enzyme were determined. EstDZ4 is an esterase, which shows selectivity in medium carbon chain substrates and identically in pnp-octanoate, based on the results of the hydrolysis of paranitrophenol ester substrates with different carbon chain fatty acids. The hydrolysis of EstDZ4 follows the Michaelis-Menten kinetic model and exhibits the highest catalytic yield value $k_{cat} / K_M = 13,467 \text{ s}^{-1} * \text{mM}^{-1}$ for the paranitrophenol ester substrate with caprylic acid. Finally, esterase EstDZ4 presents optimal operation temperature of 75° C with half life of approximately 6 h at the same temperature, and optimal pH 6.5, which facilitated EstDZ4 a thermostable esterolytic enzyme.

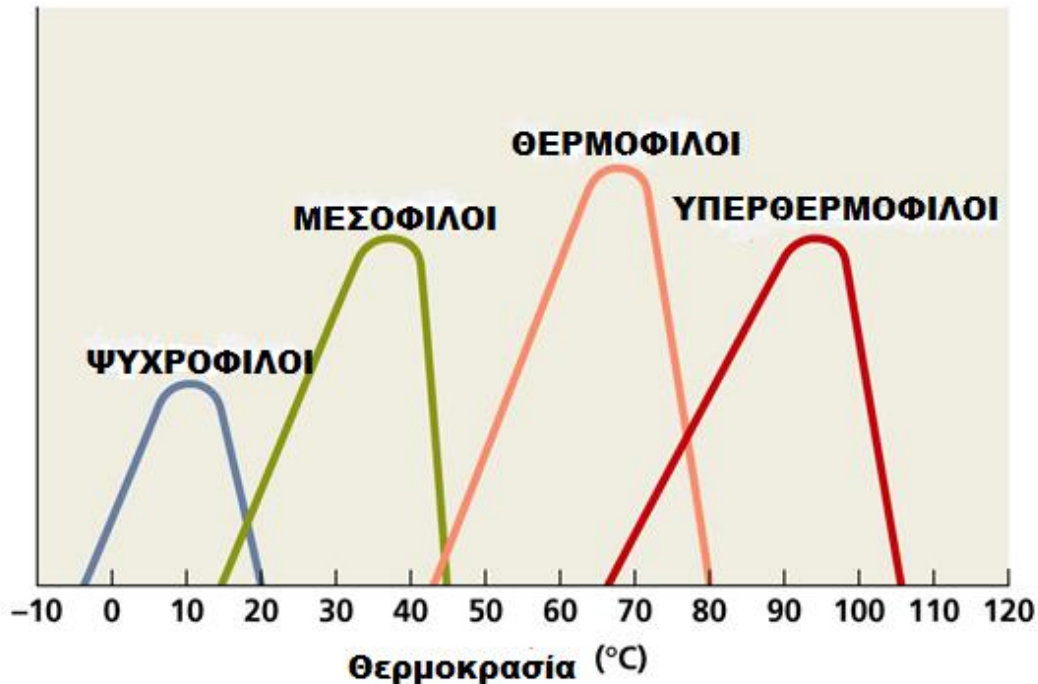
ΕΝΟΤΗΤΑ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Θερμοανθεκτικά ένζυμα

Οι ακραίες συνθήκες που επικρατούν στις βιομηχανικές διεργασίες όπως οι υψηλές θερμοκρασίες, οι υψηλές πιέσεις, η παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων κ.α πολλές φορές καθιστούν τη χρήση των ενζύμων απαγορευτική. Αυτός είναι και ο λόγος που τα τελευταία χρόνια η έρευνα στράφηκε στη απομόνωση ενζύμων από ακραία περιβάλλοντα, τα οποία φέρουν ιδιότητες όπως η θερμοσταθερότητα που επιτρέπουν τη χρήση τους στη βιομηχανία (Mc Cabe, 2011). Παράλληλα, άμεσος στόχος της γενετικής μηχανικής, που σχετίζεται με την παρέμβαση στις αλληλουχίες των γονιδίων των οργανισμών με σκοπό την βελτίωση των ιδιοτήτων τους, αλλά και της πρωτεϊνικής μηχανικής που έχει αντίστοιχο ρόλο για τις πρωτεΐνες, είναι η αξιοποίηση νέων τεχνικών για την εμπορική παραγωγή ενζύμων, βελτιωμένης σταθερότητας σε υψηλές θερμοκρασίες, ακραίες συνθήκες pH, οξειδωτικούς παράγοντες και οργανικούς διαλύτες. (Van den Burg, 2003)

Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανικό επίπεδο μπορεί να βασίζονται είτε σε ενζυμικές είτε σε χημικές μετατροπές. Ωστόσο, η προσέγγιση που χρησιμοποιείται συνθηθέστερα είναι η χημική καθώς στην ενζυμική εμφανίζονται σοβαρά προβλήματα που σχετίζονται με το υψηλό κόστος των ενζύμων καθώς επίσης και το αυξημένο λειτουργικό κόστος μιας ενζυμικής διεργασίας. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συντελούν στο υψηλό κόστος της ενζυμικής διεργασίας δεν είναι άλλος από το στάδιο της ψύξης. Αυτό το στάδιο καθίσταται απαραίτητο μιας και τα συμβατικά μεσόφιλα ένζυμα απενεργοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες. Κρίνεται αναγκαίο, λοιπόν, μέσω της ψύξης να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες συνθήκες για την επιβίωσή τους. Έτσι, δημιουργήθηκε ενδιαφέρον γύρω από τα θερμοανθεκτικά ένζυμα, καθώς η αντικατάσταση των χημικών μετατροπών με ενζυμικές μη ενεργοβόρες και μη κοστοβόρες μετατροπές θα οδηγήσει σε μια πιο πράσινη βιομηχανία με μειωμένα τοξικά απόβλητα, μειωμένο ενεργειακό «κόστος» και σε προϊόντα υψηλής καθαρότητας, μιας και τα ένζυμα δρουν στα υποστρώματά τους με υψηλή εξειδίκευση. (Haki & Rakshit, 2003), (Ward & Moo-Young, 1988)

Τα θερμοσταθερά ένζυμα έχουν απομονωθεί κυρίως από θερμοφίλους οργανισμούς και έχουν βρει μια σειρά από εμπορικές εφαρμογές λόγω της έμφυτης σταθερότητας τους. Με τον όρο «θερμόφιλος» χαρακτηρίζεται ένας οργανισμός με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης υψηλότερη των 45° C. Οι θερμοφίλοι οργανισμοί εντοπίζονται σε διάφορες εξωτικές, οικολογικές ζώνες της γης. Και οι θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες που προέρχονται από αυτούς έχουν την ικανότητα να διατηρούν την αναδίπλωση τους και κατ' επέκταση και την καταλυτική τους ικανότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. (Haki & Rakshit, 2003) (Zarafeta, 2017)



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 1 : Εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης και επιβίωσης μικροοργανισμών. Οι ψυχρόφιλοι οργανισμοί αναπτύσσονται και επιβιώνουν σε εύρος θερμοκρασιών -5°C -εως 20°C . Οι μεσόφιλοι οργανισμοί έχουν εύρος ανάπτυξης $15-45^{\circ}\text{C}$. Οι θερμοφιλοι οργανισμοί αναπτύσσονται και ζουν από $45-80^{\circ}\text{C}$. Τέλος, οι υπερθερμόφιλοι οργανισμοί αναπτύσσονται μεταξύ 65°C και 105°C (Mc Cabe, E., Ball J. & Hendricks C, 2011)

Εκτός από το προφανές πλεονέκτημα της θερμοανθεκτικότητας που εμφανίζουν οι θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες, το οποίο είναι η απαλοιφή του κόστους ψύξης των υλικών σε μια βιομηχανική διεργασία ενζυμικής μετατροπής, παρουσιάζουν ταυτόχρονα και μια πληθώρα άλλων πλεονεκτημάτων. Αρχικά, οι υψηλές θερμοκρασίες που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν χάρη στα ένζυμα αυτά μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από μεσόφιλους οργανισμούς στις βιοτεχνολογικές διεργασίες (Ward & Moo-Young, 1988). Ακόμη, η μείωση του ιξώδους των μιγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες συνεπάγεται την αύξηση του συντελεστή διάχυσης του υποστρώματος και κατ' επέκταση την αύξηση της απόδοσης στις διεργασίες υδρόλυσης. Επιπλέον, σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί και η αυξημένη δυνατότητα διάθεσης των υποστρωμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς επίσης και η μείωση του κόστους άντλησης των υδρών λόγω μειωμένου ιξώδους. Για τους παραπάνω λόγους, στη βιοτεχνολογία δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης νέων τεχνικών και προσεγγίσεων για την ανακάλυψη ακόμη περισσότερων θερμοανθεκτικών ενζύμων. Οι προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνουν τη μελέτη των θερμοφίλων οργανισμών και των πρωτεϊνών τους, τη μεταγονιδιοματική ανάλυση δεδομένων από θερμά περιβάλλοντα, καθώς και τον σχεδιασμό θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών, όπου θα μιλήσουμε για αυτές στο επόμενο κεφάλαιο. (López-López, Cerdán, & González Siso, 2014)

Μετά την απομόνωση του γονιδίου που κωδικοποιεί ένα θερμοφιλο ένζυμο, το δεύτερο και εξίσου σημαντικό βήμα είναι η κλωνοποίηση του και η ετερόλογη παραγωγή της πρωτεΐνης που εκφράζεται από αυτό. Η κλωνοποίηση των γονιδίων των

θερμοανθεκτικών ενζύμων και η παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους σε μεσόφιλους οργανισμούς αν και πραγματοποιείται σε πολλές περιπτώσεις επιτυχώς, μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα. Μεταξύ αυτών είναι η χρήση σπάνιων κωδικονίων που δεν επειτρέπουν την αποτελεσματική μεταφραση στον ξενιστή οργανισμό, η ανάγκη για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είτε η λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Επίσης, πολύπλοκα θερμοανθεκτικά ένζυμα που έχουν την ανάγκη για ομοιοπολικά δεσμευμένους συμπαράγοντες δεν μπορούν καν να παραχθούν σε μεσόφιλους οργανισμούς. (Turner et al., 2007) Αποτέλεσμα αυτών, είναι η μείωση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών ή τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτή η αναγκαιότητα για ανάπτυξη νέων στρατηγικών εύρεσης, απομόνωσης και ετερόλογης έκφρασης των θερμοανθεκτικών ενζύμων έτσι ώστε όλο και περισσότερες χημικές βιομηχανικές διεργασίες να μπορούν να αντικατασταθούν από ενζυμικές μετατροπές. (German & Ceccarelli, 2014)

1.2 Μέθοδοι εύρεσης θερμοανθεκτικών ενζύμων

Η ανάγκη παραγωγής ενζύμων με ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες σχετίζεται με μια πληθώρα αιτιών που έχουν αναφερθεί παραπάνω και αυτό επηρεάζεται τόσο από οικονομικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό αναζητείται η καταλληλότερη μέθοδος ανακάλυψης ενζύμων με υψηλή σταθερότητα σε διάφορες συνθήκες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανακάλυψη νέων ενζύμων με τελευταία την μεταγονιδιοματική μέθοδο πάνω στην οποία βασίστηκε και η παρούσα διπλωματική εργασία.

1.2.1 Κλασική μικροβιολογική προσέγγιση

Η προγενέστερη, ίσως, από τις στρατηγικές ανακάλυψης ενζύμων με ανθεκτικότητα σε ακραίες συνθήκες σχετίστηκε με την απομόνωση, καλλιέργεια και μελέτη των ακραιόφιλων οργανισμών εκείνων από τους οποίους παράγονται τα ένζυμα αυτά. Οι οργανισμοί, αυτοί, αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα που επικρατούν ακραίες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας ή pH. Είναι, λοιπόν, σύνηθες κυρίως για μικροοργανισμούς όπως τα αρχαία και τα βακτήρια που εντοπίζονται σε θερμοπηγές, ή ηφαιστειογενείς περιοχές, να διαθέτουν γονίδια τα οποία και κωδικοποιούν θερμοανθεκτικά ένζυμα. Στο παρελθόν επιχειρούνταν, η μεταφορά των οργανισμών αυτών στο εργαστήριο και η προσπάθεια καλλιέργειας και ανάπτυξης τους, αποσκοπώντας στην απομόνωση των ανθεκτικών, σε υψηλές θερμοκρασίες, πρωτεϊνών τους. Βέβαια, διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος αυτή δίνει φτωχά αποτελέσματα μιας και το 99% των οργανισμών που υπάρχουν στη φύση είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο μέσω των κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων, και έτσι αγνοείται ένα μεγάλο κομμάτι της βιοποικιλότητας. Για το λόγο αυτό, προέκυψε η αναγκαιότητα αναζήτησης και άλλων εναλλακτικών στρατηγικών. (Lorenz, Liebeton, Niehaus, & Eck, 2002)

1.2.2 Πρωτεϊνική Μηχανική

Η πρωτεϊνική μηχανική αποτελεί τον κλάδο εκείνο της βιοτεχνολογίας που έχει τη βάση του στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA . Με την ίδια λογική λοιπόν που στη βιολογία οι ερευνητές παρεμβαίνουν στην αλληλουχία γονιδίων ενός οργανισμού προκειμένου να βελτιώσουν τις ιδιότητές του ετσι και η πρωτεϊνική μηχανική παρεμβαίνει και εξελίσσει τις πρωτεΐνες ενός οργανισμού, ξεκινώντας από το DNA, σε νέους βιομηχανικούς καταλύτες. Η πρωτεϊνική μηχανική βασίστηκε σε δυο «εργαλεία», τον ορθολογικό πρωτεϊνικό σχεδιασμό και την κατευθυνόμενη εξέλιξη των πρωτεϊνών. Η πρώτη μέθοδος αποτελεί και την αρχαιότερη κατά σειρά η οποία έχει τη βάση της στην ανακάλυψη και μελέτη της τρισδιάστασης δομής των εκ φύσεως σταθερών ενζύμων. Η δεύτερη μέθοδος, που είναι μεταγενέστερη στηρίζεται στην δημιουργία βιβλιοθηκών μεσω τυχαίων μεταλλάξεων και στη συνέχεια στη σάρωση αυτων των βιβλιοθηκών για τον εντοπισμό των πρωτεϊνικών μεταλλάξεων με βελτιωμένες ιδιότητες. Τα βασικά χαρακτηριστικά των δυο κυριότερων «εργαλείων» της πρωτεϊνικής μηχανικής παρουσιάζονται επιγραμματικά στον Πίνακα 1.(Zarafeta, 2017)

Πίνακας 1: Οι τεχνολογίες πάνω στις οποίες βασίζεται η Πρωτεϊνική Μηχανική. Στον πίνακα αναφέρονται οι δυο πιο διαδεδομένες στρατηγικές και τα επιμέρους χαρακτηριστικά τους

| Ορθολογικός Πρωτεϊνικός Σχεδιασμός | Κατευθυνόμενη Εξέλιξη Πρωτεϊνών |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Αποτελεί την πρώτη μέθοδο πρωτεϊνικής μηχανικής• Βασίζεται στη χρήση μεταλλάξεων είτε τοπικών, είτε ολόκληρου του γονιδίου.• Στηρίχθηκε στην ανακάλυψη και την μελέτη της τρισδιάστασης δομής εκ φύσεως σταθερών ενζύμων και στην εκλογίκευση των ιδιοτήτων τους.• Βρίσκει μικρή εφαρμογή λόγω της αυξημένης | <ul style="list-style-type: none">• Αποτελεί εξέλιξη της προηγούμενης μεθόδου.• Βασίζεται σε λειτουργία δύο σταδίων:<ol style="list-style-type: none">1) Δημιουργία νεας βιβλιοθήκης μοριακής ποικιλότητας μέσω μεταλλαξιγένεσης2) Σάρωση της βιβλιοθήκης για την εύρεση μελών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά• Απαιτεί συμβατό σύστημα έκφρασης, ταχεία σάρωση και |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>μελέτης και κατανόησης που απαιτεί για το μελετούμενο ένζυμο.</p> | <p>καλή στρατηγική ανάλυσης.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Η εισαγωγή λαθών γίνεται είτε μέσω της εισαγωγής πρόσθετων στην αντίδραση είτε με την «αναδιοργάνωση» του DNA |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

1.2.3 Μεταγονιδιωματική σάρωση

Η σάρωση μεταγονιδιωματικών δειγμάτων για τον εντοπισμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά μπορεί να γίνει με δυο τρόπους. Ο ένας είναι η *in vivo* λειτουργική σάρωση βιβλιοθηκών έκφρασης που δημιουργούνται από το μεταγονιδιωματικό δείγμα και ο δεύτερος είναι η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης του μεταγονιδιωματικού δείγματος. (Purves & Sadava, 2003)

Τα στάδια που ακολουθούνται προκειμένου να επιτευχθεί η διαδικασία λειτουργικής σάρωσης ενός μεταγονιδιωματικού δείγματος είναι τα παρακάτω:

- *Κατασκευή ανασυνδυσμένης βιβλιοθήκης:* Το DNA του μεταγονιδιωματικού δείγματος κόβεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες και συνενώνεται με τον φορέα κλωνοποίησης.
- *Μεταφορά του ανασυνδυσμένου DNA σε κύτταρο- ξενιστή.* Η εισαγωγή της βιβλιοθήκης έκφρασης μετασχηματίζεται σε κατάλληλο ξενιστή.
- *Επιλογή και απομόνωση των μετασχηματισμένων κυττάρων ξενιστών:* Τα βακτήρια που προσέλαβαν το ανασυνδυσμένο DNA , επιλέγονται σε σχέση με εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει , πολλαπλασιάζονται και παράγουν αποικίες (βακτηριακούς κλώνους).
- *Επιλογή ενός από τους βακτηριακούς κλώνους με το επιθυμητό DNA.* Σε ένα κατάλληλα σχεδιασμένο πείραμα με χρήση ιχνηθετών , οι κλώνοι εκείνοι που παράγουν μια πρωτεΐνη με τις επιθυμητές ιδιότητες δίνουν έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο και έτσι μπορούν να ανιχνευτούν και να απομονωθεί το γονίδιο που φέρουν. (Raven & Tohnsin, 2003).

Η συνηθέστερη στρατηγική είναι η χρήση του *E. coli* ως οργανισμού έκφρασης που αναπτύσσεται σε τρυβλία με άγαρ. Στα τρυβλία, αυτά, περιέχεται το υπόστρωμα της ενζυμικής δράσης ,η οποία στοχεύεται, καθώς και ένας «δείκτης» ενζυμικής ενεργότητας που καθιστά ευδιάκριτη την αποικία από την οποία παράγεται το ενεργό ένζυμο (Uchiyama and Miyazaki 2009). Η *in vivo* λειτουργική σάρωση υπερυψηλού ρυθμού απόδοσης των μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έκφρασης έχει επιφέρει σειρά επιτυχημένων αποτελεσμάτων μεταξύ αυτών και θερμοσταθερές εστεράσες και κυτταρινάσες. (Zarafeta, Szabo, et al., 2016). Παρότι η μέθοδος, αυτή, επιφέρει

σημαντικά αποτελέσματα καθώς ο εντοπισμός των γονιδίων δεν στηρίζεται σε ομοιότητες με γνωστές δομές, ο σχεδιασμός συστημάτων ανάλυσης αποτελεί το βασικό τροχόπεδη της.(Cowan et al., 2005)

Εναλλακτικά, ένα μεταγονιδιωματικό δείγμα μπορεί να αλληλουχηθεί και να γίνει βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από την αλληλούχιση. Μέσω των βιοπληροφορικών εργαλείων γίνεται αναγνώριση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και πραγματοποιείται αντιστοίχιση με τις υποθετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούν. Αργότερα, αυτές οι υποθετικές πρωτεΐνες συγκρίνονται με ήδη χαρακτηρισμένες με βάση καθορισμένα κριτήρια δομής και λειτουργίας. Με τον τρόπο αυτόν εξάγεται μια λίστα πιθανών «γονιδίων –στόχων» των οποίων η απομόνωση συντελείται με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης από το μεταγονιδιωματικό δείγμα. (Streit & Schmitz, 2004)

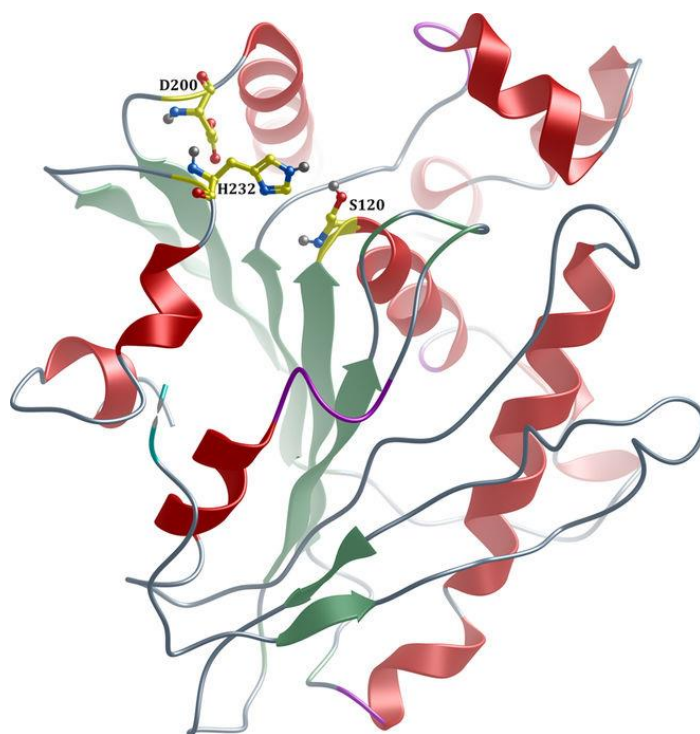
Η μεταγονιδιωματική προσέγγιση είναι φυσικό να έχει και μειονεκτήματα που μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Ένα από τα αρνητικά της μεθόδου σχετίζεται με την αναγκαιότητα για απομόνωση DNA από ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών ώστε να δομηθεί μια επαρκώς αντιπροσωπευτική μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη. Ακόμη, κατά την διάρρηξη των μικροοργανισμών σε μικρά κομμάτια με σκοπό την απομόνωση του γενετικού υλικού υπάρχει ο κίνδυνος λήψης χιμαρικών προϊόντων. Απαραίτητο, επίσης, κρίνεται να έχει απαλλαγεί το γενετικό υλικό από προσμείξεις, γιατί είναι πιθανό να δημιουργήσουν μελλοντικές δυσκολίες. Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η βιοπληροφορική ανάλυση βασίζεται σε ομοιότητα με ήδη αναγνωρισμένες αλληλουχίες περιορίζοντας έτσι την ανακάλυψη πρωτεϊνών με εξ'ολοκλήρου διαφορετικές αλληλουχίες και κατά συνέπεια λειτουργίες.(Zarafeta, 2017)

Συνοψίζοντας, είναι εμφανές το πλεονέκτημα της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης έναντι των άλλων μεθόδων στο ότι αυτή μπορεί να αναλύσει άμεσα μεγάλη μικροβιακή ποικιλότητα που δεν θα ήταν μελετίσιμη με άλλες μεθόδους. Οι μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες περιέχουν μεγάλο όγκο γενετικών πληροφοριών των οποίων η επεξεργασία πραγματοποιείται πιο εύκολα χάρη στα σύγχρονα εργαλεία. Αυτά καθιστούν την μεταγονιδιωματική ανάλυση μονόδρομο για τη μελέτη της βιοποικιλότητας.

1.3 Εστερολυτικά Ένζυμα

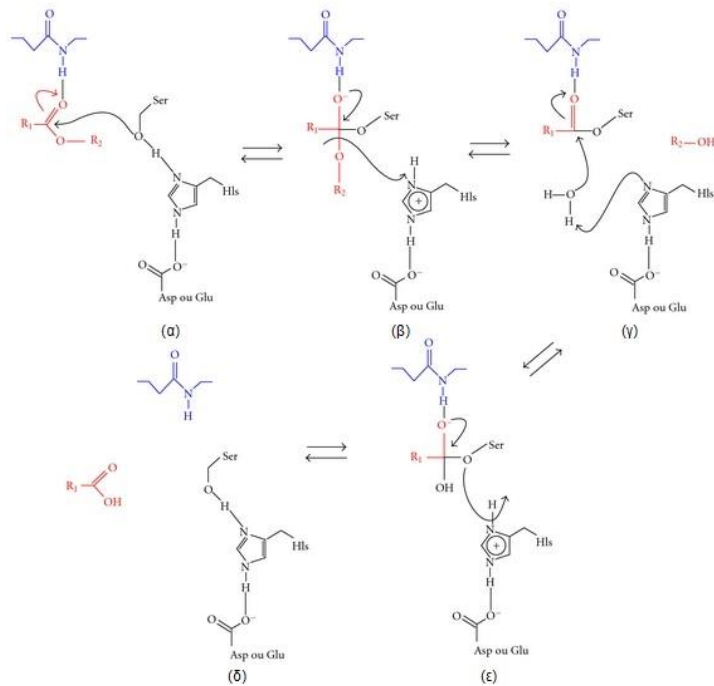
Τα λιπολυτικά ένζυμα είναι μέλη της οικογένειας των α/β υδρολασών και περιλαμβάνουν δυο ομάδες, τις πραγματικές λιπάσες και τις εστεράσες (καρβοξυλεστεράσες) που διαφέρουν ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Και οι δυο τύποι ενζύμων καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση ενός εστερικού δεσμού μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας αλκοολικής ομάδας στο νερό. Σε οργανικούς διαλύτες ή σε μη υδατικά μέσα μπορούν επίσης να καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση τον σχηματισμό, δηλαδή, εστερικού δεσμού με μετεστεροποίηση ή εστεροποίηση. Οι προαναφερθείσες αντιδράσεις εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, όπως η τεχνολογία βιοντίζελ, η βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών αγροχημικών κ.α (Bornscheuer and Kazlauskas 2006)

Αυτές οι ομάδες ενζύμων μοιράζονται μικρή ομοιότητα ως προς την πρωτοταγή δομή τους αλλά η τριτοταγής τους δομή είναι εξαιρετικά συντηρημένη. Ακολουθούν την τυπική αναδίπλωση των α/β υδρολασών με οκτώ β πτυχωτά φύλλα, όλα παράλληλα εκτός από το αντιπαράλληλο δεύτερο που συνδέεται μέσω μιας α έλικας. Το ενεργό κέντρο τους που βρίσκεται στην α έλικα, περιέχει μια καταλυτική τριάδα αμινοξέων που είναι πάντα διατεταγμένα στην ίδια σειρά κατά μήκος της αλληλουχίας: σερίνη (Ser), ασπαρτικό (Asp) ή γλουταμικό (Glu) και ιστοιδίνη (His) με την καταλυτική σερίνη να είναι ενσωματωμένη στο συντηρημένο μοτίβο Gly-X-Ser-X-Gly. (Arpigny & JAEGER, 1999). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τρισδιάστατης δομής που περιγραφηκε παραπάνω αποτελεί η εστεράση EstDZ2 που απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 2: Η τρισδιάστατη μορφή της EstDZ2 εστεράσης. Τα αμινοξέα Ser120, Asp200 και His232, που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο απεικονίζονται ως ράβδοι και σφαίρες. (Zarafeta, Moschidi et al. 2016)

Ο καταλυτικός μηχανισμός είναι κοινός σε κάθε λιπάση και εστεράση. Αρχικά, η καταλυτική σερίνη δεσμεύει τον άνθρακα του καρβονυλίου από τον δεσμό του λιπιδικού εστέρα. Έτσι, κατασκευάζεται ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, σταθεροποιημένο από τα καταλυτικά κατάλοιπα His και Asp/Glu. Το αλκοολικό συστατικό του εστερικού δεσμού διασπάται και η εστεροποίηση του οξέος στην καταλυτική σερίνη σχηματίζει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο. Έπειτα, ένα μόριο νερού υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο σχηματίζοντας ένα νέο τετραεδρικό ενδιάμεσο απελευθερώνοντας ως προϊόν ακυλοομάδες. Σε μια αντίδραση εστεροποίησης το μόριο νερού αντικαθίσταται από μια αλκοόλη (ή έναν εστέρα). Παρακάτω εμφανίζεται σχηματικά ο μηχανισμός υδρόλυσης που περιγράφηκε. (Schloss & Handelsman, 2003).



Εικόνα 3 : Μηχανισμός αντίδρασης υδρόλυσης εστερικών δεσμών καταλυόμενων από εστεράσες και λιπάσες. Η καταλυτική τριάδα και το νερό εμφανίζονται με μαύρο χρώμα, τα κατάλοιπα οξυανίου είναι μπλε, και το υπόστρωμα είναι κόκκινο. (α) Νουκλεοφιλική προσβολή του υδροξυλίου σερίνης στον άνθρακα του καρβονυλίου του εστερικού δεσμού, (β) τετραεδρικό ενδιάμεσο, (γ) ενδιάμεσο ακυλο-ενζύμου και υδρόλυση με νερό, (δ) τετραεδρικό ενδιάμεσο, (ε) ελεύθερο ένζυμο. (Ribeiro, Coelho & Freire, 2011)

Οι λιπάσες και οι εστεράσες είναι απανταχού παρούσες και μπορούν να εντοπιστούν σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς, αλλά οι περισσότερες βιομηχανικές λιπάσες είναι μικροβιακής προέλευσης. Τα βακτηριακά λιπολυτικά ένζυμα ταξινομήθηκαν σε οκτώ οικογένειες, από I έως VII σύμφωνα με τις αμινοξικές αλληλουχίες τους και τις βιολογικές τους ιδιότητες στα πλαίσια μελέτης. (Arpigny & JAEGER, 1999). Αυτή η ταξινόμηση εξακολουθεί να είναι η πιο συνήθης αναφορά για την εκχώρηση ενός ανακαλυφθέντος ενζύμου σε μια οικογένεια. Ωστόσο, η εξέλιξη της βιοτεχνολογίας και η ανακάλυψη αλλά και ο χαρακτηρισμός νέων ενζύμων οδήγησε στη δημιουργία νέων οικογενειών. Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται οι μέχρι τώρα γνωστές στην βιβλιογραφία οικογένειες εστερολυτικών ενζύμων .

Πίνακας 2: Κατάλογος των αμινοξικών αλληλουχιών που υπακούουν στο συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο GXSXG, και είναι το χαρακτηριστικότερο των έως τώρα ορισμένων οικογενειών λιπολυτικών ενζύμων με προσθήκη των μεταγενέστερα χαρακτηρισμένων εστερασών

| Οικογένεια Λιπολυτικών Ενζύμων | Χαρακτηριστικό Αμινοξικό Μοτίβο | Αναφορά |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Family I | GHSQG | (Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family II | GDSL | Arpigny and Jaeger 1999) |

| | | |
|----------------------|--------|-------------------------------------------------|
| Family III | GXSMG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family IV | GDSAGG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family V | GXSMGG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family VI | GFSQG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family VII | GESAG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| Family VIII | GGSVG | Arpigny and Jaeger 1999) |
| PhaZ7(Family IX) | AHSMG | (Braaz, Handrick et al.2003) |
| EstD(Family X) | GHSLG | (Levisson, van der Oost et al. 2007) |
| LipG(Family XI) | GHSLGG | (Lee, Oh et a;.,2006) |
| LipEH166(Family XII) | GHSLG | (Kim, Oh et al. 2009) |
| Est30(Family XIII) | GLSLGG | (Montoro-Garcia, Martinez-Martinez eta al.2009) |
| EstA3(Family XIV) | GHSMG | (Elend, Schmeisser et al. 2006) |
| EstA | GHSMG | (Chu, He et al.2008) |
| VLip509 | GHSLGG | (Park, Kim et al. 2007) |
| EstD2 | GHSLGG | (Lee, Hong et al.2010) |
| EstZ3, EstGK1 | XHSQX | (Bayer, Kumert et al 2010) |
| FLS18 | AHGGMG | (Hu, Fu et al. 2010) |
| EML3L4 | GHSQG | (Jeon, Kim et al 2011) |
| EstWSD | GHSQG | (Wang, Wang et al.2013) |
| EstLiu | GFSAG | (Rahman, Culsum et al 2016) |
| Family XV | GHSAG | (Zarafeta, Moschidi et al.2016) |

Υπάρχουν διάφορα κριτήρια για τη διάκριση μεταξύ λιπασών και εστερασών. Αρχικά, τα δυο αυτά ένζυμα διαφέρουν ως προς την προτίμηση του υποστρώματος. Οι εστεράσες υδρολύουν μόνο τους υδατοδιαλυτούς εστέρες λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (<12 άτομα άνθρακα) ενώ οι λιπάσες παρουσιάζουν εκλεκτικότητα στους

εστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (> 12 άτομα άνθρακα) με μικρή υδατοδιαλυτότητα. Επίσης, μια ακόμη διαφοροποίηση των δυο ειδών λιπολυτικών ενζύμων έγκειται στο γεγονός ότι ενώ οι εστεράσες ακολουθούν την κλασική κινητική Michaelis-Menten, οι περισσότερες λιπάσες διαθέτουν ένα «κάλυμμα» ή βρόχο που καλύπτει το ενεργό κέντρο και το άνοιγμά του οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου. (Zarafeta, Moschidi et al.2016) Η παρουσία ενός κινητού «καλύματος» είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα των λιπασών και εξηγεί την ιδιότητά τους, γνωστή ως «διεπιφανειακή ενεργοποίηση».(Akoh, Huang,& Shaw2004). Αυτή η ιδιότητα στηρίζεται στο ότι η δραστηριότητα των λιπασών πυροδοτείται από την επαφή τους με τη διεπιφάνεια λιπιδίου-νερού. Εκείνη η επαφή, θεωρείται, ότι είναι και η αιτία της διάνοιξης του «καλύματος». Μια τέτοια ιδιότητα δεν είναι φανερή στις εστεράσες.(Nardini & Dijkstra, 1999)

Οι λιπάσες και οι εστεράσες είναι ένζυμα που μπορούν να αντέξουν στις αντίξοες συνθήκες των βιομηχανικών βιομετατροπών, όπου συχνά υποβάλλονται σε πολύ αλκαλικές ή πολύ όξινες τιμές pH, οργανικούς διαλύτες και υψηλές θερμοκρασίες. Εκτός αυτού, έχουν καθορισμένα χαρακτηριστικά χήμειο-, στέρεο και τοποεκλεκτικότητας που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ορισμένες εφαρμογές όπως η σύνθεση οπτικά καθαρών ενώσεων. Η καταλυτική ευελιξία, η ευρωστία και η υψηλή εξειδίκευση τους προσελκύουν τεράστια προσοχή και τις καθιστούν μια εξαιρετική επιλογή βιομηχανικών βιοκαταλυτών.(Zarafeta, Szabo, et al., 2016)

Πολλά λιπολυτικά ένζυμα όπως οι εστεράσες και οι λιπάσες προέρχονται από ακραιόφιλους οργανισμούς, οργανισμούς δηλαδή που είναι προσαρμοσμένοι να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες (θερμόφιλα), χαμηλές θερμοκρασίες (ψυχρόφιλα), υψηλή συγκέντρωση αλάτων (αλόφιλα) ή υψηλή πίεση (βαρόφιλα). Τα ένζυμα τους έχουν εξελιχθεί ώστε να είναι λειτουργικά υπο τέτοιες ακραίες συνθήκες, στις οποίες τα μεσόφιλα ομόλογα τους δεν θα μπορούσαν να λειτουργήσουν. (Smyth, Perfumo, McClean, Marchant & Banat, 2010). Οι ιδιότητες των λιπολυτικών ενζύμων που προέρχονται από αυτούς τους οργανισμούς είναι πάρα πολλές. Οι γνωστές λιπάσες και εστεράσες έχουν διαφορετικούς συνδυασμούς εξειδίκευσης υποστρώματος, θερμοκρασία λειτουργίας, εύρος pH λειτουργίας, θερμοσταθερότητα, αντοχή σε οργανικούς διαλύτες και δραστηριότητα υπο την παρουσία διάφορων ενεργοποιητών και αναστολέων. Οι πιο πολύτιμες ιδιότητες τους που καθορίζουν τις δυνατότητες τους ως βιομηχανικούς βιοκαταλύτες αναφέρονται παρακάτω:

- ✓ Δραστηριότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και θερμοανθεκτικότητα
- ✓ Δραστηριότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες
- ✓ Δραστηριότητα σε αλκαλικά pH
- ✓ Δραστηριότητα – σταθερότητα παρουσία οργανικών διαλυτών
- ✓ Αντοχή παρουσία αλάτων
- ✓ Υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα
- ✓ Χημειοεκλεκτικότητα και Τοποεκλεκτικότητα
- ✓ Δραστηριότητα παρουσία ενεργοποιητών και αναστολέων

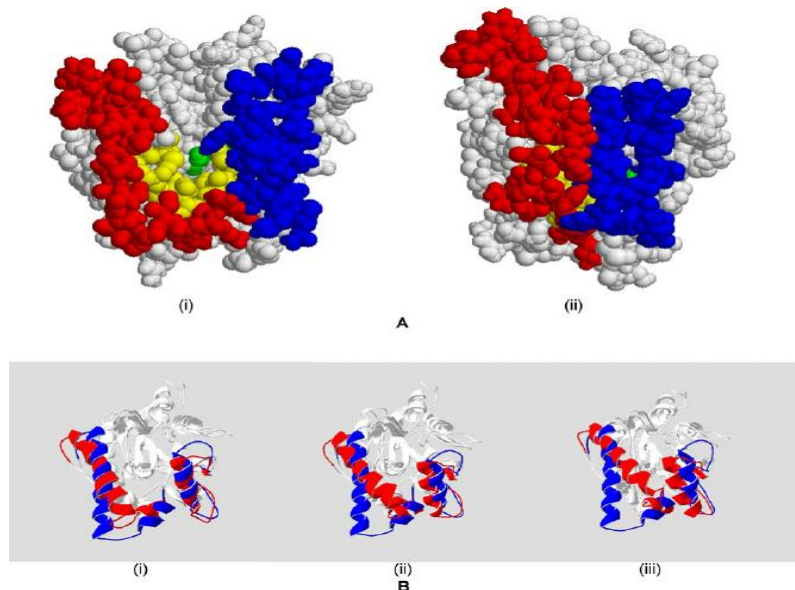


Εικόνα 4: Φυσικοχημικές ιδιότητες βιομηχανικών λιπολυτικών ενζύμων. Στη εικόνα εμφανίζονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά των λιπολυτικών ενζύμων που τα διακρίνουν από τις άλλες κατηγορίες ενζύμων. (Slack, J.2001)

1.4 Λιπάσες

Οι λιπάσες αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές ομάδες βιοκαταλυτών για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Για αυτό το λόγο, η υψηλής καθαρότητας παραγωγή μικροβιακών λιπασών απαιτεί όχι μόνο την αποτελεσματική υπερέκφραση των αντίστοιχων γονιδίων αλλά και την λεπτομερή κατανόηση των μοριακών μηχανισμών τους. (Deng, Zhang, Sun, Liang & Hu, 2016)

Οι λιπάσες βρέθηκαν στο κέντρο του ενδιαφέροντος γιατί παρατηρήθηκε ότι παραμένουν καταλυτικά ενεργές στους οργανικούς διαλύτες και αυτό αποτέλεσε την αφορμή για την αξιοποίησή τους σαν ιδανικά εργαλεία για την οργανική χημεία. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν αξίζει να αναφερθεί η υψηλή τους δυνατότητα διάθεσης χάρη στην πληθώρα πηγών από τις οποίες μπορούν να παραχθούν. Η συνολική παραγωγή τους αγγίζει υψηλά ποσοστά γιατί προέρχονται από πολλούς μικροβιακούς οργανισμούς (διάφορα είδη βακτηρίων και μυκητών). Ακόμη, έχει μελετηθεί η κρυσταλλική τους δομή και αυτό δίνει τη δυνατότητα ορθολογικού σχεδιασμού νέων ενζύμων. Ένα επιπλέον ιδιαίτερος σημαντικό θετικό χαρακτηριστικό των λιπασών έναντι άλλων ενζύμων είναι ότι εμφανίζουν εξαιρετική τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα. Εν κατακλείδι, ίσως το κυρίαρχο πλεονέκτημα τους έναντι άλλων ενζύμων είναι ότι δεν απαιτούν την ύπαρξη συμπαραγόντων και δεν καταλύουν παράπλευρες αντιδράσεις. (López-López et al., 2014)



Εικόνα 5: Η συμπεριφορά του κινητού «καλύματος». Η εικόνα (A) αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα προσομοίωσης. Η δομή στα αριστερά (i) είναι η εκδοχή με το «κάλυμα» ανοιχτό όπου και αποκαλύπτεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αντίθετα η δομή στα δεξιά είναι η εκδοχή με το κάλυμα κλειστό όπου δεν υπάρχει δυνατότητα προσέγγισης του ενεργού κέντρου. Τα αμινοξέα που έχουν χρώμα μπλέ και κόκκινο αποτελούν αμινοξέα του καλύματος στις δύο πλευρές, ενώ τα κίτρινα τα αμινοξέα που τα συνδέουν. Με πράσινο αναπαραριστάται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η εικόνα (B) αντιπροσωπεύει την εξέλιξη της δομής του κρυσταλλικού σκελετού με το χρόνο. Με μπλε αντιπροσωπεύεται η ανοιχτή κρυσταλλική δομή και με κόκκινο η θέση του καλύματος έπεται από 3(i), 7(ii) 10 (iii) ns.(Cherkuvada, Sechasayee,Raghunathan & Pennathur, (2005)

1.4.1 Πηγές των Λιπασών

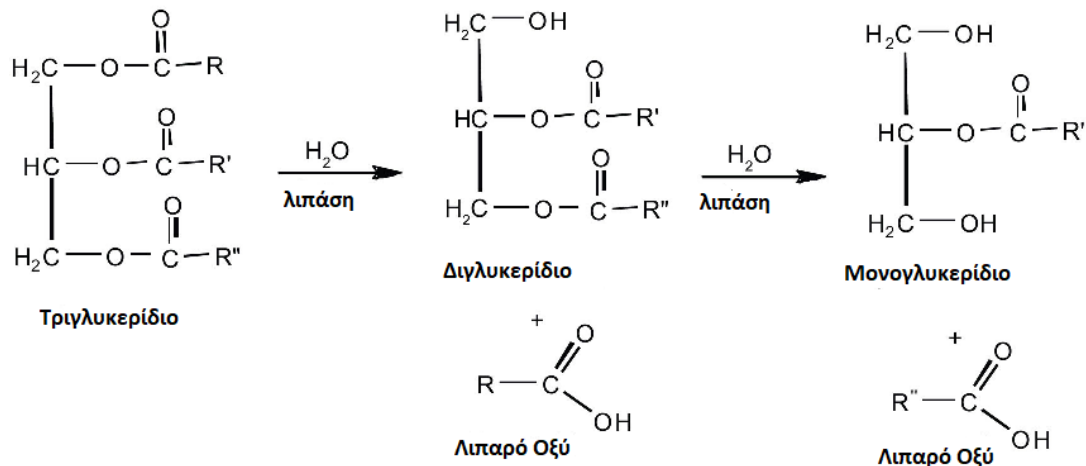
Πολλές μικροβιακές λιπάσες έχουν απομονωθεί συμπεριλαμβανομένων και ακραιόφιλων λιπασών τόσο από θερμοφίλους όσο και από ψυχρόφιλους οργανισμούς. Οι λιπάσες είναι ένζυμα προερχόμενα τόσο από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς όσο και μικροοργανισμούς. Πηγές προέλευσης τους, που έχουν βρεθεί ύστερα από διάφορες έρευνες, μπορεί να είναι οι νηματοειδής μήκυτες, οι ζυμομήκυτες αλλά και τα βακτηριδία. Η απομόνωση και μελέτη των λιπασών από τις παραπάνω πηγές έδωσε και σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες τους. Βρέθηκε, συγκεκριμένα, υψηλή επιλεκτικότητα τόσο σε φυσικά όσο και σε τεχνητά υποστρώματα αλλά και ο σημαντικός τους ρόλος ως βιοκαταλύτες σε υδρολυτικές διεργασίες. Η λίστα των μικροοργανισμών από τους οποίους έχουν απομονωθεί λιπάσες είναι αρκετά μεγάλη. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί που αποτελούν κύρια πηγή λιπασών και από του οποίους έχουν απομονωθεί περισσότερα από ένα διαφορετικά είδη. Κάποια παραδείγματα των μικροοργανισμών αυτών είναι: *Fusarium solani*, *Pseudomonas putida*, *Candida rugosa*, *Magnaporthe grisea*, *Coletotrichum capsici*. (Boonmahome & Mongkolthanaruk, 2013)

1.4.2 Παραγωγή λιπασών

Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την απομόνωση μιας λιπάσης, σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, είναι συνήθως η υπερέκφραση του αντίστοιχου επιθυμητού γονιδίου που την κωδικοποιεί. Οι λιπάσες από ορισμένα είδη (κυρίως βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas*) απαιτούν την λειτουργική βοήθεια περίπου 30 διαφορετικών κυτταρικών πρωτεϊνών, προκειμένου να ανακληθούν από το υπερκείμενο της καλλιέργειας μέσω της οποίας παράγονται. Σε μια ενζυμικά ενεργή κατάσταση έχει παρατηρηθεί ότι η αναδίπλωση και η έκκριση είναι πολύ εξειδικευμένες διαδικασίες που συνήθως δεν λειτουργούν σε ετερόλογους ξενιστές, μιας και ο ρόλος ενός μηχανισμού μπορεί να δυσχεραίνει την παραγωγή του ενζύμου στον ετερόλογο ξενιστή από το να συμβάλλει σε αυτή. Επίσης, μια άλλη εξίζου σημαντική διαδικασία είναι η μεταφορά τους καθώς οι λιπάσες ως εξωκυτταρικά ένζυμα απαιτείται να μεταφερθούν μέσω της βακτηριακής μεμβράνης για να φτάσουν στον τελικό τους προορισμό. (López-López et al., 2014). Σε ότι αφορά τα υποστρώματα είναι ιδιαίτερα εκλεκτικές και αυτό τους το χαρακτηριστικό συντελεί στην ακρίβεια της παραγωγής τους και στην υψηλή καθαρότητα του τελικού προϊόντος, γιατί η μελέτη της εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα δίνει τη δυνατότητα διαμόρφωσης ευνοϊκών συνθηκών για την επίτευξη ενζύμου υψηλής ενεργότητας. Συγκεκριμένα, η μελέτη της εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα έδωσε τη δυνατότητα εμβάθυνσης στην διαδικασία παραγωγής τους και κατά συνέπεια σε αύξηση της καθαρότητας των παραγόμενων ενζύμων. Από την άλλη, συχνά αντιμετωπίζονται προβλήματα κατά την παραγωγή λιπασών. Το πιο συχνό πρόβλημα που καλείται να φέρει σε πέρας κανείς κατά την παραγωγή λιπασών είναι η δημιουργία «πρωτεϊνικών εγκλείστων». Αυτά γίνονται αντιληπτά όταν, τα αυξημένα επίπεδα μιας ετερόλογης πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά, οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα λειτουργικής διαλυτής πρωτεΐνης. Η αιτία ανάπτυξης τους σχετίζεται με εσφαλμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης που συντελεί στη δημιουργία των δομών αυτών. Η επίλυση του προβλήματος και η αντιμετώπιση του περιλαμβάνει την επαναδιάλυση της πρωτεΐνης με αβέβαια, ωστόσο, αποτελέσματα ως προς την αποκατάσταση της δράσης της. Σε κάθε περίπτωση, γίνεται αντιληπτό ότι η παραγωγή των λιπασών είναι μια διαδικασία που απαιτεί σχολαστικό έλεγχο σε κάθε στάδιο της διεργασίας. (Colleen.& Borden, 2005)

1.4.3 Αξιοποίηση των Λιπασών

Η εμπορική χρήση των λιπασών είναι μια υπόθεση δισεκατομμυρίων η οποία περιλαμβάνει μια ποικιλία διαφορετικών εφαρμογών στον τομέα των απορρυπαντικών και στην παραγωγή συστατικών τροφίμων και φαρμάκων. (Henrik, Baptistal, Mard, Petersen, Sebastiano & Vaz, 1995). Άμεσος στόχος των βιοτεχνολόγων είναι ο εντοπισμός και η απομόνωση νέων γονιδίων λιπάσης για τη δημιουργία βελτιωμένων λιπασών συγκριτικά με τις υπάρχουσες. Στόχος, επίσης, από βιοτεχνολογική άποψη είναι η εξέλιξη των εξαιρετικά εναντιοεκλεκτικών λιπασών οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη ζήτηση. (Saxena, Davidson, Sheoran, & Giri, 2003)(Jaeger & Eggert, 2002)



Εικόνα 6 : Ο δραστήριος ρόλος των λιπασών. Στην εικόνα φαίνεται η υδρόλυση τριγλυκεριδίων προς δι- και μόνογλυκερίδια και ο ρόλος των λιπασών σε όλες τις φάσεις της αντίδρασης.(Chhabra,2013)

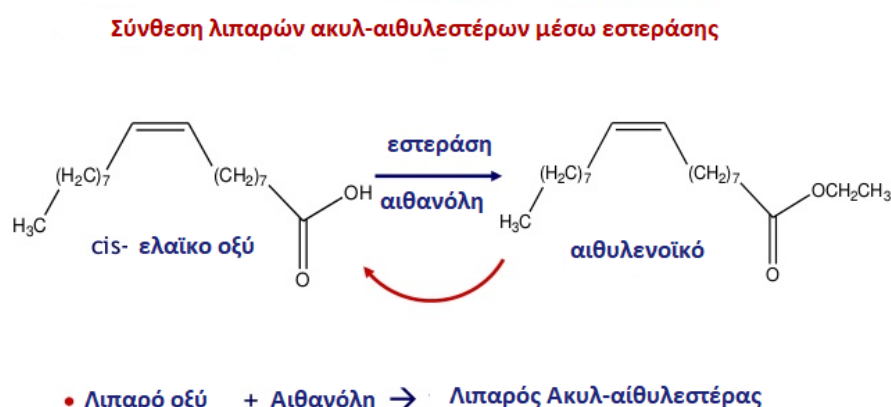
Οι λιπάσες βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς οι οποίοι και διευρύνονται συνεχώς. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότεροι τομείς στους οποίους χρησιμοποιούνται οι λιπάσες.

- **Βιοπολυμερή** (πολυφαινόλες, πολυσακχαρίτες, πολυεστέρες). Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ως καταλύτες για την πολυμερική σύνθεση λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας τους. Δομικά πολύπλοκα μονομερή με πολύ λειτουργικές δραστικές ομάδες πολυμερίζονται με ενζυμική κατάλυση υψηλής απόδοσης χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες από διαφορετικές πηγές. (Henrik, Baptistal, Mard, Petersen, Sebastiano & Vaz, 1995).
- **Βιοντίτζελ.** Το υψηλό κόστος παραγωγής του βιοντίτζελ σε βιομηχανικό επίπεδο οδήγησε στην ανάγκη κατάστροφης νέων στρατηγικών. Η ακινητοποίηση λιπάσης (από την οικογένεια μικροοργανισμών *Thermogens*) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του προϊόντος ακόμα και μετά από επαναλαμβανόμενη χρήση. Ακόμη, η κυταροπλασματική υπερέκφραση της λιπάσης (από τον μικροοργανισμό *Rhizopus oryzae* στον ξενιστή *S. Cerevisiae*) με κατάψυξη, απόψυξη και ξήρανση σε αέρα οδήγησε σε καταλύτη που καταλύει την μεθανόλυση σε σύστημα χωρίς διαλύτη.
- **Αγροχημικά.** Πολλές κατηγορίες λιπασών αξιοποιούνται για την υδρόλυση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Επίσης, μια ακόμη εφαρμογή που βρίσκουν οι λιπάσες σε σχέση με τα αγροχημικά προϊόντα είναι η αξιοποίησή τους για την εκτίμηση της μεταβολικής ανθεκτικότητας κατά των εντομοκτόνων. (Panda and Gowrishankar 2005)
- **Καλλυντικά και αρώματα.** Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι λιπάσες και στην βιομηχανία καλλυντικών και αρωμάτων. Ο ρόλος τους στην απελευθέρωση του φερουλικού εστέρα της πεντανόλης είναι ιδιαίτερος σημαντικός για εφαρμογές τόσο στη βιομηχανία αρωμάτων όσο και στην κοσμητολογία. (Panda and Gowrishankar 2005)

1.5 Εστεράσες

Αντίθετα με τις λιπάσες που είναι ένζυμα που έχουν μια υδρόφοβη περιοχή που καλύπτει το ενεργό κέντρο τους και παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς υποστρώματα μακρών αλυσίδων λιπαρών οξέων, οι εστεράσες έχουν διαφορετικές ιδιότητες.

Οι εστεράσες καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων και κατέχουν εξέχουσα θέση στην διαμόρφωση του ρυθμού των αντιστρεπτών αντιδράσεων σε συνάρτηση με την θερμοδυναμική της εκάστοτε αντίδρασης. Αυτό σημαίνει ότι η οργανική φάση ευνοεί τον σχηματισμό εστέρα που μπορεί να υδρολυθεί στην υδατική φάση από το ίδιο ένζυμο. (Panda & Gowrishankar, 2005)



Εικόνα 7: Σύνθεση λιπαρού ακυλ-αιθυλ-εστέρα καταλυόμενη από εστεράση (Wade,2010)

1.5.1 Πηγές και Ιδιότητες των εστερασών

Οι εστεράσες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων είτε στο περίπλασμα των gram αρνητικών βακτηριακών κυττάρων. Επίσης, μπορούν να συνδεθούν με την μεμβράνη ή να εκκριθούν. Αυτά τα τόσο ευπροσάρμοστα ένζυμα παρουσιάζουν μια πληθώρα λειτουργιών. Ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων των εστερασών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της μεταβολικής δραστηριότητας, της κυτταρικής βιωσιμότητας και της ακεραιότητας των μεμβρανών των βακτηρίων. (Liu et al., 2001). Οι ιδιότητες αυτής της κατηγορίας ενζύμων είναι αρκετές. Αρχικά, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω όπως και όλα τα λιπολυτικά ένζυμα εμφανίζουν υψηλή τόπο- και στέρεο-εκλεκτικότητα, γεγονός που τις καθιστά χρήσιμους βιοκαταλύτες στις διεργασίες παραγωγής οπτικά ενεργών ουσιών στην βιομηχανία των ευγενών χημικών. Επιπρόσθετα, κατά γενική ομολογία αποτελούν ιδιαίτερος σταθερά ένζυμα και δεν απαιτούν συμπράγοντες. Όλα αυτά συντελούν στην ανάδειξη των εστερασών σε πρωταγωνιστικά ένζυμα για τη βιομηχανία.

Αυτοί οι χρήσιμοι βιοκαταλύτες συναντώνται στα φυτά, στα ζώα αλλά και στους μικροοργανισμούς. Η παρουσία τους, αυτή, σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που μπορούν να δεχτούν αποδεικνύουν ότι οι εστεράσες εξελίχθηκαν έτσι ώστε να καθιστούν τις πηγές

του άνθρακα αξιοποιήσιμες από τους οργανισμούς από τους οποίους παράγονται, συμμετέχοντας σε πολλά καταλυτικά μονοπάτια. (Bornscheuer, 2002)

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται ενδεικτικά μια λίστα μικροοργανισμών από τους οποίους έχουν απομονωθεί εστεράσες καθώς επίσης και η οικογένεια στην οποία αυτές ανήκουν (Arpigny & JAEGER, 1999).

Πίνακας 3: Λίστα μικροοργανισμών -πηγών χαρακτηρισμένων εστερασών και οικογένεια που έχει ταξινομηθεί κάθε στεράση που προέρχεται από τον εκάστοτε μικροοργανισμό.

| Οικογένεια εστερασών | Πηγή προέλευσης |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| II | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>Aeromonas salmonicida</i> • <i>Pseudomonas entomophila</i> • <i>Bacillus thuringiensis</i> • <i>Xanthomonas vesicatoria</i> |
| III | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptomyces exfoliates</i> • <i>Kineococcus radiotolerans</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Moraxella sp.</i> • <i>Thermobifida fusca</i> |
| IV | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Burkholderia sp.</i> • <i>Ralstonia solanacearum</i> • <i>Bacillus subtilis</i> |
| V | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Psychrobacter immobilis</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Moraxella sp.</i> • <i>Salmonella typhimurium</i> • <i>Enterobacter sp.</i> |
| VI | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Spirulina platensis</i> • <i>Anabaena variabilis</i> • <i>Polaromonas sp JS666</i> • <i>Xanthomonas campestris</i> |
| VII | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Arthrobacter oxydans</i> • <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |

| | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptomyces coelicolor</i> • <i>Bacillus pumilus</i> |
| VIII | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Arthrobacter aureescens</i> • <i>Saccharopolyspora erythraea</i> • <i>Pseudomonas syringae</i> • <i>Streptomyces anulatus</i> |

1.5.2 Παραγωγή εστερασών

Επειδή οι τομείς της βιοτεχνολογίας στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή οι εστεράσες είναι πολλοί, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εκτεταμένη παραγωγή τους.

Διαφορετικές πηγές αποδίδουν διαφορετικές εστεράσες. Επειδή, λοιπόν, οι οργανισμοί από τους οποίους είναι εφικτή η απομόνωση μιας εστεράσης είναι πολλοί, παράγονται εστεράσες με ποικιλία ιδιοτήτων. Έτσι, δεν υπάρχει γενίκευση στο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν παρόμοιες εστεράσες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζονται δυσκολίες στη σύγκριση των παραγωγικών διαδικασιών, καθώς δεν αξιοποιούνται τα ίδια υποστρώματα για να φανούν χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από αυτά, όπως ο χρόνος. Ακόμη, η ακρίβεια της δοκιμής είναι μια άλλη πτυχή εξαρτώμενη από τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές μέτρησης, δηλαδή, την ηλεκτροχημική, φωτομετρική κ.α. Συνεπώς, το γεγονός, ότι οι εστεράσες παράγονται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους από πολλές διαφορετικές πηγές έχει ως αποτέλεσμα την όχι επιθυμητή σε κάθε περίπτωση καθαρότητα. (Panda & Gowrishankar, 2005)

1.5.3 Αξιοποίηση Εστερασών

Οι τομείς στους οποίους αξιοποιούνται οι εστεράσες είναι πολλοί και καλύπτουν μεγάλο εύρος των σημερινών βιομηχανιών. Οι κυριότερες εφαρμογές παρουσιάζονται παρακάτω.

➤ Βιομηχανία Τροφίμων

Οι εστεράσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αρωματικών ενώσεων από λιπαρά οξέα. Έτσι βρίσκουν εφαρμογή στη γαλακτοβιομηχανία, στη βιομηχανία παραγωγής κρασιού, χυμών φρούτων, μπίρας και αλκοολούχων ποτών. Με τελικό στόχο τη μετατροπή λιπών και ελαίων χαμηλής αξίας σε προϊόντα υψηλής αξίας οι εστεράσες όπως και οι λιπάσες χρησιμοποιούνται για την ιδιότητα τους να καταλύουν την αντίδραση της μετεστεροποίησης. Συγκεκριμένες εστεράσες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση του λιπαρού γάλακτος με σκοπό την ενίσχυση της γεύσης στην παρασκευή τυροκομικών προϊόντων, άλλες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή

γλυκαντικού σιροπιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη έχοντας τον ρόλο των υδρολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση του αμύλου. (Panda and Gowrishankar 2005)

➤ Βιομηχανία Φαρμάκων

Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι εστέραςες και στη βιομηχανία φαρμάκων , τα οποία είναι ιδιαίτερος χρήσιμα στην θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχονται μπορεί να έχουν συμμετοχή στην παραγωγή φαρμάκων που σχετίζονται με ασθένειες όπως η αρθρίτιδα, η εμμηνόρροια, ο πυρετός αλλά και σημαντικές εφαρμογές σε αντιφλεγμονώδη φάρμακα. (Jaeger & Eggert ,2002)

➤ Βιομηχανία Εντομοκτόνων

Οι φωσφοτριεστέρες , όπως ποικίλες συνθετικές οργανοφωσφορικές ενώσεις έχουν ευρείες εφαρμογές ως εντομοκτόνα. Τα υπολείμματα όμως των ενώσεων αυτών προκαλούν τοξικότητα στο περιβάλλον . Ο ρόλος των εστερασών στο κομμάτι αυτό ενέχεται στην αποικοδόμηση των οργανοφωσφορικών ενώσεων.(Bornsheuer and Kazlauskas,2006)

1.6 GDSL λιπάσες και εστεράσες

1.6.1 Δομή και Ιδιότητες των GDSL λιπολυτικών ενζύμων

Πολλές οικογένειες λιπασών και εστερασών κατέχουν το συντηρημένο πενταπεπτίδιο με μοτίβο GX SXG που συμμετέχει στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου με την καταλυτική σερίνη να βρίσκεται στη θέση τρία. Ωστόσο, δεν έχουν όλα τα λιπολυτικά ένζυμα αυτό το κοινό μοτίβο. Μια υποοικογένεια ενζύμων, ήδη χαρακτηρισμένη από το 1999 , παρουσιάζει ένα διαφορετικό μοτίβο. Τα GDSL ένζυμα έχουν την ενεργή σερίνη κοντά στον αμινοτελικό άκρο. (Akoḥ, Lee, Liaw, Huang, & Shaw, 2004). Τα ένζυμα που συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια II των λιπολυτικών ενζύμων δεν παρουσιάζουν το συμβατικό πενταπεπτίδιο Gly-X-Ser-X-Gly αλλά παρουσιάζουν ένα μοτίβο Gly-Asp-Ser- (Leu) [GDS (L)] το οποίο περιέχει την καταλυτική σερίνη. Σύμφωνα με,το άρθρο “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties” των Arprigny και Jaeger όπου μελετήθηκαν 53 αλληλουχίες βακτηριακών λιπασών και εστερασών, συγκρίθηκαν με διατηρημένα και χαρακτηρισμένα μοτίβα και ταξινομήθηκαν με βάση τις βιολογικές τους ιδιότητες και τα γενικά χαρακτηριστικά τους, βρέθηκε ότι η εστεράση που προερχόταν από τον μικροοργανισμό *Streptomyces scabies* συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των GDSL εστερασών λόγω της υψηλής ομοιότητας που παρουσιάζει το ένζυμο όχι μόνο στην περιοχή των λειτουργικά σημαντικών αμινοξέων αλλά σε ολόκληρη την αλληλουχία με την ήδη χαρακτηρισμένη GDSL εστεράση από τον μικροοργανισμό *Aeromonas Hydrophila*. (Arpigny & JAEGER, 1999)

Η κρυσταλλική δομή του ίδιου ενζύμου από τον *Streptomyces scabies* (Arpigny & JAEGER, 1999) έδειξε, επίσης ότι το καταλυτικό του κέντρο έχει μια

ιδιαίτερη αρχιτεκτονική διότι σχηματίζει μια καταλυτική διάδα αντι για τριάδα. Συγκεκριμένα, η οξίνη πλευρική αλυσίδα που ο ρόλος της είναι να σταθεροποιεί το θετικό φορτίο της ιστιδίνης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο, αντικαθίσταται από ένα σκελετό καρβονυλίου που βρίσκεται τρεις θέσεις πριν από την ίδια ιστιδίνη. Η ίδια ακριβώς δομή έχει παρατηρηθεί και σε ένα άλλο ένζυμο με παρόμοιο GDSL μοτίβο όπου εμφανίζεται μια καταλυτική τριάδα στην οποία ένα ασπαρτικό αμινοξύ βρίσκεται τρεις θέσεις πριν από την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου. Οι πρωτεΐνες αυτές που ανήκουν στην δεύτερη οικογένεια ενζύμων, έχουν μια α/β πτυχή που διαφέρει από την αντίστοιχη πτυχή της οικογένειας των α/β υδρολασών. (Ling, 2008)

| | Block I | Block II | Block III | Block V |
|---------------------------------------|---------------|--------------------|--------------|-----------------------|
| <i>Carica papaya</i> CpEst | LFIFGDSLVDNNG | FPNGRWSGRIVDPFI | IYMFYIGANDYL | LC SYQRGYMFFDGRHNAEKT |
| <i>Jacaranda mimosifolia</i> ABY59947 | FFIFGDSLVDNNG | GPTGRFSNGKITVDVI | IYSVGVGSNDYL | PCQNRDEYLFWDFAFHPTAA |
| <i>Capsicum annuum</i> AAZ23955 | YFIFGDSLVDNNG | GPTGRFSNGKITVDVI | IYSIGLGSNDYL | PCPNRNEYLFWDFAFHPTAA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> AAK96511 | LFTFSDSYDAGN | YPNGKFSGDGHI VDPFI | LFMIYIGTEDYL | LCEYQRSYFFFDGRHNTKA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> NP_188037 | LFTFSDSYDAGN | YPNGKFSGDGHI VDPFI | LFMIYIGTEDYL | LCEYQRSYFFFDGRHNTKA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> ABB90255 | LFTFSDSYDAGN | YPNGKFSGDGHI VDPFI | LFMIYIGTEDYL | LCEYQRSYFFFDGRHNTKA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> AAD25773 | LFTFSDSNFDAGN | DPNGKFSGGLIAPDFL | VFMIYIGANDYL | LCEYQRSYLFDDGRHNTKA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> AAD25774 | LFTFSDSNFDAGN | DPKGFSDGKIVDPFI | VFMISIGMEDYY | LCEYQRSYLFYDARHNTKA |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> NP_188038 | LFTFSDSYDVG N | DPSGRWSGDGHI VDPFV | IYMNIGAEDYL | LC SYQKSFLLFFDGRHNTKT |
| <i>Ricinus communis</i> BBF44580 | FFIFGDSIFDPGN | HPTGRLSGRLIPDFI | VYLMNMGNDHF | KCEBPSKYVYFDGGHNTAAT |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> NP_198915 | LFVFGDSVFDAGN | SPTGRVSDGRLIPDFI | VYLFHIGLNDYQ | LCENVTDLVFFDFPHLTKA |
| <i>Hevea brasiliensis</i> AAP37470 | IFNFSDSNSETGG | RSTGRVSDGRLIIPDFI | LYTFDIGNDLT | SGACPSVRVNWGGAHYTEAA |
| | * * * * * | ..* : * : * | :: : : * : * | * : : * * : * |

Εικόνα 8: Πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας πολλών αμινοξέων τεσσάρων πεπτιδικών τμημάτων GDSL εστερασών με διατηρημένες περιοχές άλλων ομόλογων φυτικών εστερασών από άλλες οικογένειες που βρέθηκαν μέσω του εργαλείου NCBI.(Abdelkafi et al., 2009)

Ένα επίσης νέο στοιχείο που ήρθε στην επιφάνεια για την δεύτερη οικογένεια των λιπολυτικών ενζύμων υποστηρίζει ότι τα ένζυμα αυτής της οικογένειας έχουν καρβοξυτελική περιοχή που περικλείει το ένα τρίτο της συνολικής τους αμινοξικής αλληλουχίας και είναι παρόμοιο με αυτό μιας πρόσφατα αναγνωρισμένης οικογένειας ενζύμων βακτηριακής προέλευσης και λοιμογόνου δράσης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται σε περίπου 12 β φύλλα που σχηματίζουν έναν υδατικό πόρο στην εξωτερική μεμβράνη. Το αμινοτελικό άκρο διέρχεται μέσω του πόρου αυτού και σε ορισμένες περιπτώσεις απελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό μέσω μιας ειδικής πρωτεολυτικής διεργασίας. (Arpigny & JAEGER, 1999)

1.6.2 Πηγές και εφαρμογές των GDSL λιπολυτικών ενζύμων

Οι εφαρμογές των GDSL λιπασών και εστερασών είναι αρκετές .Οι τομείς στους οποίους αξιοποιούνται εξαρτώνται από τους μικροοργανισμούς από τους οποίους προέρχονται και από τις ιδιότητες που παρουσιάζουν. (Okamura et al., 2010)

Οι μικροβιακές λιπάσες που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια εμφανίζουν μεγάλη υδρολυτική δραστηριότητα σε πολλά υποστρώματα. Υδρολύουν, επίσης, πολλούς αρωματικούς εστέρες και υποστρώματα πρωτεασών. Ακόμη, οι ιδιότητες τους να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα όπου απελευθερώνουν ελεύθερα λιπαρά οξέα στο τελευταίο βήμα της *in vivo* βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία λιπών, ελαίων και αρωμάτων. (Deng, Zhang, Sun, Liang, & Hu, 2016) Άλλες GDSL λιπάσες μικροβιακής προέλευσης συναντώνται στο περίπλασμα που αποτελεί μια μεγάλη πηγή φωσφολιπιδίων όπως η φωσφοτριγλυκερόλη. Αυτού του είδους οι λιπάσες με γνωστότερη την TAP (Purves& Sadava, 2003) αν και δεν είναι φυσική πρωτεάση, εμφανίζει πρωτεολυτικές ιδιότητες για τα αμινοξέα και τα

παράγωγα τους. Έτσι είναι χρήσιμη στη σύνθεση λυσοφωσφολιπιδίων που είναι σημαντικά στη βιομηχανία τροφίμων και της αρτοποιίας. (Ling, 2008)

Οι GDSL λιπάσες και εστεράσες που προέρχονται από φυτά εμπλέκονται στην αποικοδόμηση σύνθετων πολυσακχαριτών. Η ακετυλίωση των ξυλανών με αυτά τα ένζυμα μπορεί να έχει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και συγκεκριμένα στην αρτοβιομηχανία με αύξηση της βιοδιασπασιμότητας των ξυλανών. Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση των ακετυλοξυλανών ενισχύοντας τις παραπάνω αντιδράσεις. Τέλος, συνεισφέρουν στην διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών σε συνεργασία με άλλα ένζυμα όπως οι ξυλανάσες και οι κυτταρινάσες.(Abdelkafi et al., 2009)

1.7 Escherichia Coli ως ξενιστής οργανισμός

Είναι αναμφισβήτητο ότι η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μικροβιακά συστήματα έχει εξελίξει τη βιοχημεία. Κάθε ερευνητής που επιχειρεί να ασχοληθεί με ένα νέο θέμα θα χρειαστεί μια νέα «καθαρή» πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα που είναι απαραίτητη για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό, την χρήση της σε βιομηχανικές διεργασίες και την ανάπτυξη των εμπορικών αγαθών.

Η επιλογή του κυττάρου ξενιστή του οποίου ο μηχανισμός πρωτεϊνικής σύνθεσης θα παράγει την επιθυμητή πρωτεΐνη είναι το βήμα που θα σηματοδοτήσει όλη τη διαδικασία. Ο οργανισμός είναι τόσο σημαντικός ώστε να ορίζει την τεχνολογία που απαιτείται για την κάθε περίπτωση, καθορίζει δηλαδή παράγοντες όπως ο εξοπλισμός που απαιτείται, οι μέθοδοι καθώς επίσης και τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν. Μεταξύ των μικροοργανισμών που μπορούν να αποτελούν κύτταρα ξενιστές είναι τα βακτήρια, οι ζύμες, τα μονοκύτταρα άλγη και οι νηματοειδείς μύκητες.(Shuler & Kargi, 2002)

Τα οφέλη από την χρήση του *E.coli* ως συστήματος έκφρασης είναι ευρέως γνωστά. Αρχικά, έχει πολύ ταχύ ρυθμό ανάπτυξης. Είναι γνωστό ότι σε βέλτιστες συνθήκες και σε ευνοϊκό μέσο ανάπτυξης ο χρόνος διπλασιασμού του *E.coli* είναι μόλις 20 λεπτά. Αυτό σημαίνει ότι μια καλλιέργεια που εμβολιάστηκε με αραιώση 1/100 από την αρχική κορεσμένη καλλιέργεια μπορεί να φτάσει την στατική φάση ανάπτυξης σε λίγες ώρες. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να προσδώσει ένα μεταβολικό βάρος στον μικροοργανισμό δημιουργώντας μια σημαντική μείωση της παραγωγής. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του *E.coli* είναι ότι έχει καλλιέργειες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας που επιτυγχάνονται εύκολα ($1 \cdot 10^3$ βιώσιμα βακτήρια). Δεν μπορεί βέβαια να παραληφθεί ότι η εκθετική φάση σε περίπλοκα συστήματα οδηγεί σε πυκνότητες όχι και τόσο υψηλές. Ένα αναντίρρητο θετικό στοιχείο του μικροοργανισμού αυτού είναι ότι μέσω αυτού μπορούν να κατασκευαστούν πλούσια και πολύπλοκα μέσα από εύκολα διαθέσιμα και φθηνά συστατικά. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και ότι ο μετασχηματισμός με εξωγενές DNA είναι γρήγορος και εύκολος, τόσο που ο πλασμιδιακός μετασχηματισμός μπορεί να γίνει ακόμα και σε 5 λεπτά. (German & Ceccarelli, 2014)

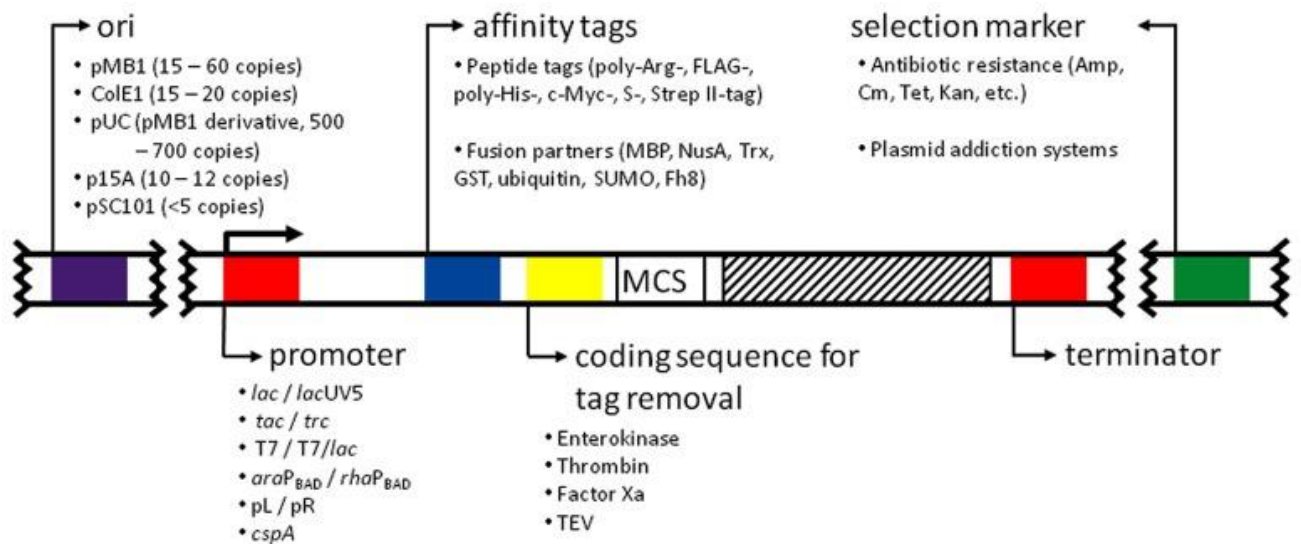
Δεν μπορούν, βέβαια, να παραληφθούν και τα μειονεκτήματα που εμφανίζει το *E.coli* ως ξενιστής. Ένα από τα σημαντικότερα είναι η αδυναμία που εμφανίζει ως προς τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Εκτός αυτού, εμφανίζει και αδυναμία ως

προς την έκκριση των πρωτεϊνών. Αυτή η αδυναμία εξηγείται από το γεγονός ότι αυξημένα επίπεδα μιας ετερόλογης πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένα επίπεδα λειτουργικής διαλυτής πρωτεΐνης. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται είτε λόγω πρωτεολυτικής αποδόμησης, ως απόρροια της αυξημένης ποσότητας ξένης ως προς το κύτταρο πρωτεΐνης και αποκρίνεται με θερμικό σοκ, είτε λόγω σχηματισμού αδιάλυτων δομών γνωστών ως «πρωτεϊνικά έγκλειστα» που οφείλονται σε εσφαλμένη αναδίπλωση πρωτεΐνης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των δομών αυτών. Η επαναδιάλυση του πρωτεϊνικού εγκλείστου πιθανότατα να αποκαταστήσει τη δράση της πρωτεΐνης, αν και αποτελεί μια επίπονη διαδικασία. Η επίλυση των προβλημάτων αυτών περιλαμβάνει τεχνικές όπως προσθήκη στην πρωτεΐνη σήματος αλληλουχίας, με χρήση πρωτεϊνών μεταφορέων, χρήση κυττάρων με μεταλλαγμένη εξωτερική μεμβράνη και περίβλημα γενικότερα και τέλος έκφραση πρωτεϊνών που καταστρέφουν την εξωτερική μεμβράνη.(Zarafeta, Kissas, et al., 2016)

1.7.1 Βακτηριακοί φορείς έκφρασης

Η επιλογή των πλασμιδίων που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως ο υποκινητής που φέρουν, οι πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης κ.α. Τα στοιχεία που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής σε ότι αφορά την επιλογή πλασμιδίων τα οποία εν συνεχεία θα εισαχθούν σε κύτταρα-ξενιστές είναι ο αριθμός των αντιγράφων του πλασμιδίου, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στόχου, η φύση του παραγόμενου προϊόντος καθώς επίσης και παράγοντες εκλεκτικότητας όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή των κυττάρων εκείνων στα οποία έχει εισαχθεί.

Είναι λογικό, κατά την ετερόλογη έκφραση γονιδίων για την παραγωγή πρωτεϊνών στόχων να είναι επιθυμητή η όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Έτσι επιλέγονται πλασμίδια με μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Κατά αναλογία θα συμπεραίναμε ότι υψηλή ποσότητα πλασμιδίου ισούται με την παραγωγή περισσότερης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, καθώς πολλές μονάδες έκφρασης βρίσκονται στο κύτταρο. Ωστόσο, η υψηλή ποσότητα πλασμιδίου μπορεί να επιβάλλει ένα μεταβολικό βάρος που μειώνει τον βακτηριακό ρυθμό ανάπτυξης και μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια του πλασμιδίου και κατ' επέκταση ο αριθμός των υγιών κυττάρων για την σύνθεση της πρωτεΐνης να μειωθεί. (German & Ceccareli, 2014).



Εικόνα 9: Η «ανατομία» ενός φορέα έκφρασης, Στην εικόνα εμφανίζονται τα κυριότερα μέρη ενός φορέα Αρχικά παρουσιάζεται ο αριθμός αντιγράφων του φορέα ανάλογα με το πλασμίδιο, ο υποκινητής οι περιοχές «συγγένειας», οι παράγοντες επιλογής, ο καταστολέας (Rosano&Ceccareli,2014)

Εξαιρετικής σημασίας στοιχείο του πλασμιδίου αποτελεί ο υποκινητής. Ο ρόλος του είναι διπλός, καθώς, από τη μια απαιτείται να είναι ισχυρός προκειμένου να επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα έκφρασης και από την άλλη πρέπει να ρυθμίζεται εντός στενών πλαισίων.(Sørensen & Mortensen, 2005) Υπάρχουν δυο ειδών υποκινητές που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται, οι χημικοί και οι θερμικοί. Σε ότι αφορά τους χημικούς, τα προβλήματα που συχνά αντιμετωπίζονται σχετίζονται με το αυξημένο κόστος των επαγωγέων. Από την άλλη πλευρά, οι θερμικοί υποκινητές εμφανίζουν προβλήματα θερμικής υστέρησης και εμφάνισης θερμικού σοκ.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα πλασμίδια διαθέτουν παράγοντες εκλεκτικότητας. Συγκεκριμένα, πρόκειται είτε για γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε δεδομένο αντιβιοτικό είτε για γονίδια που εκφράζουν αυξότροφους παράγοντες. Σε κάθε περίπτωση επιβιώνουν οι επιθυμητοί και μόνο συνδυασμοί φορέα-ξενιστή. Παρόλ' αυτά και στις δυο τεχνικές ενέχεται ο κίνδυνος ακόμα και αν χαθεί το πλασμίδιο από το κύτταρο να υπάρχει πληθώρα γονιδιακού προϊόντος που εξασφαλίζει την αντίσταση στον παράγοντα επιλογής. Ιδιαίτερως σε μεγάλου όγκου καλλιέργειες τα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο είναι δυνατό να προστατέψουν εκείνα που δεν το διαθέτουν. Αυτή, λοιπόν, η ανάγκη οδήγησε σε ειδικά διαμορφωμένες τεχνικές που εξασφαλίζουν θανάτωση του κυττάρου όταν αυτό χάσει το πλασμίδιο (Baneyx, 1999). Επιπλέον, τεχνικές που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί είναι η χρήση γονιδίων για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης ή κάποιας άλλης δομής η οποία και προσκολλάται στην επιθυμητή πρωτεΐνη και συνεισφέρει στην ανάκτηση της. Στην εξαιρετική περίπτωση όπου η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι τοξική για το κύτταρο, χρησιμοποιούνται ειδικές σηματοδοτικές αλληλουχίες για την έκκριση της εκτός του κυτταροπλάσματος.(Hannig & Makrides, 1998)

1.7.2 Υποκινητής

Το βασικότερο στους προκαρυωτικούς επαγωγείς είναι δίχως αμφιβολία ο επαγωγέας *lac*, που αποτελεί το στοιχείο κλειδί του οπερονίου της λακτόζης. Η λακτόζη προκαλεί επαγωγή στο σύστημα και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πρωτεΐνης. Ωστόσο, η επαγωγή είναι δύσκολη παρουσία εύκολα μεταβολιζόμενων πηγών άνθρακα όπως τα φυσικά σάκχαρα. Αν η λακτόζη και η γλυκόζη είναι παρούσες η έκφραση από τον *lac* επαγωγέα δεν είναι ολοκληρωτικά επαγόμενη μέχρι η γλυκόζη να χρησιμοποιηθεί. Για να επιτευχθεί η έκφραση παρουσία της γλυκόζης παρουσιάστηκε ο *lac UV5* επαγωγέας μέσω του οποίου μειώνεται αλλά δεν ελαχιστοποιείται η ευαισθησία της ρύθμισης του καταβολισμού.

Ένας άλλος υποκινητής ο T7 που συναντάται στα pET πλασμίδια είναι επίσης πολύ δημοφιλής για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Σε αυτό το σύστημα το επιθυμητό γονίδιο κλωνοποιείται πριν, από ένα υποκινητή που αναγνωρίζεται από τον φάγο T7. (IBA, 2012) Η έκφραση βασίζεται στην χρήση τροποποιημένων κυττάρων τα οποία κωδικοποιούν την T7 RNA πολυμεράση η οποία ρυθμίζεται από τον T7 υποκινητή μέσω του επαγωγέα Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside (IPTG) που αποτελεί ανάλογο της λακτόζης. Συγκεκριμένα, στα περισσότερα συστήματα στο κύτταρο και στο πλασμίδιο υπάρχει ο αναστολέας *lacI*, ο οποίος απουσία επαγωγέα σχηματίζει τετραμερή που αναστέλλουν την λειτουργία του χειριστή *lac*. Με την προσθήκη του IPTG, αυτός προσδένεται στο τετραμερές και ξεκινάει η μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης. Το βασικό επίπεδο πρωτεϊνικής παραγωγής, το οποίο είναι ένα από τα μειονεκτήματα του συγκεκριμένου συστήματος έκφρασης, μηδενίζεται με την προσθήκη της T7 λυσοζύμης η οποία είναι αναστολέας της αντίστοιχης RNA πολυμεράσης. Για την έκφραση της λυσοζύμης εισάγεται στο κύτταρο το πλασμίδιο pLys από το οποίο και γίνεται η παραγωγή της λυσοζύμης.

Αν και ο *lac* υποκινητής είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος, το επίπεδο της μεταγραφής από αυτόν τον υποκινητή εξαρτάται από τον γονότυπο και τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου ξενιστή λόγω της ενδογενούς συγκέντρωσης μοριών καταστολέα *lac*. Αυτές οι αδυναμίες του υποκινητή αυτού οδήγησαν στην ανάγκη μελέτης και άλλων συστημάτων ετερόλογης έκφρασης.

Ένα από αυτά τα συστήματα είναι και ο υποκινητής tetA. Η ισχύς του είναι συγκρίσιμη με την μεταλλαγμένη μορφή *lacUV5* του *lac* υποκινητή αλλά τα επίπεδα έκφρασης τροποποιημένων κυττάρων στο πλασμίδιο pASK75 και των παραγώγων του είναι σημαντικά υψηλότερα. Ακόμα, το σύστημα του προμώτορα tet είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητο από το στέλεχος *E.coli*, με το οποίο χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε συνδυασμό. Έτσι, το στέλεχος μπορεί να επιλεγεί ανεξάρτητα από τον υποκινητή σύμφωνα με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά ανάπτυξης όπου επιτυγχάνεται υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Ένα ακόμη θετικό στοιχείο του υποκινητή tetA είναι ότι λειτουργεί αποτελεσματικά ακόμη και όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ένα όχι πλούσιο μέσο, αποτελώντας έτσι ένα κατάλληλο σύστημα για παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μεγάλης κλίμακας.

Επιπροσθέτως, αξίζει να αναφερθεί ότι ο επαγωγέας ανυδροτετρακυκλίνη (ATc) που χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης στο πλασμίδιο pASK75 μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλή συγκέντρωση και αυτό το καθιστά πολύ οικονομικό συγκριτικά με τον αντίστοιχο επαγωγέα IPTG. Τέλος, το άνυδρο παράγωγο

ανδροτετρακυκλίνη (ATc) προσδένεται πιο ισχυρά στον καταστολέα tet σε σχέση με τον φυσικό επαγωγέα Tc.(Skerra, 1994)

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Συσκευές – Όργανα

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση του συνόλου των πειραμάτων καταγράφονται παρακάτω κατά αλφαβητική σειρά:

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

2.2 Θρεπτικά Υλικά- Ρυθμιστικά Διαλύματα

- Διάλυμα χρώσης Coomassie: 50% μεθανόλη, 40% ακετόνη και $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/mL Coomassie Brilliant Blue R-250
- Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής μετά από χρώση με Coomassie (Destain): 50% μεθανόλη, 40% H₂O και 10% ακετόνη
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου(Running Buffer): 15,1 g Tris-Base, 94g γλυκίνη και προσθήκη νερού μέχρι τελικού

όγκου 950 mL. Έπειτα, προστίθενται και 50 mL διαλύματος SDS 10% w/v . Το παραγόμενο διάλυμα είναι 5 φορές πυκνότερο από την επιθυμητή τιμή συγκέντρωσης και για το λόγο αυτό γίνεται αραιώση 1:5.

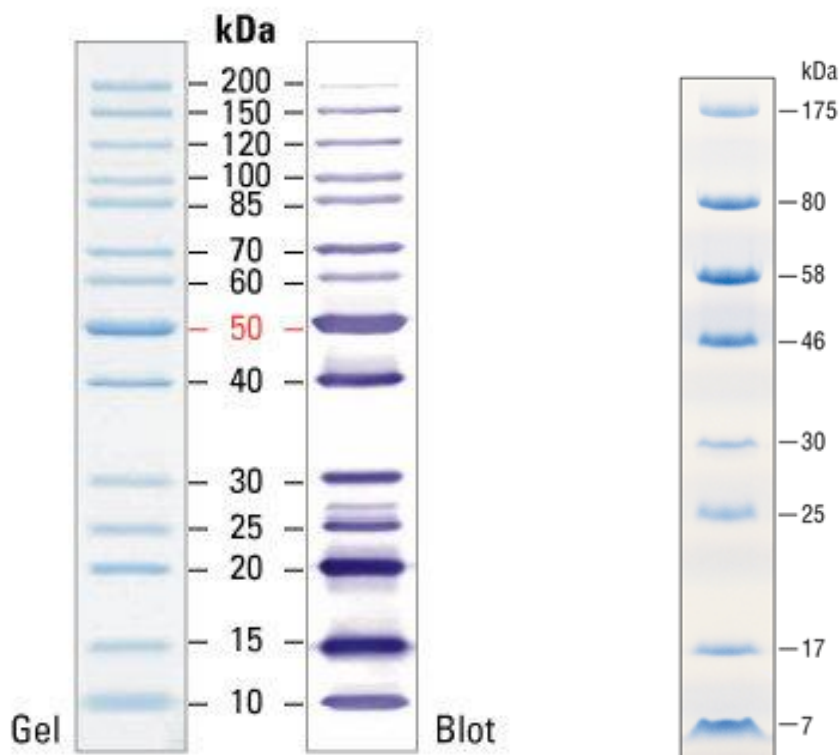
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη (Transfer Buffer) : 0,025M Tris Base και 0,192 M γλυκίνη αραιώνονται σε αναλογία 1:10. 100 mL/L του παραπάνω διαλύματος αναμιγνύονται με 200 mL/ L μεθανόλης και 700 mL/ L απιονισμένου νερού.
- Διάλυμα φόρτωσης μειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (6X): Προστίθενται 3 mL Tris-HCL 1M pH=6,8 , 1mg μπλέ της βρωμοθυμόλης , 1,5 mL γλυκερόλης, 0,6 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 100 μL β-μερκαπτοαιθανόλη και τέλος προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 10 mL.
- Διάλυμα φόρτωσης μειγμάτων σε πήκτη αγαρόζης (loading buffer): Προστίθενται 3mL γλυκερόλη 30% , 25 mg μπλέ της βρωμοθυμόλης και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 mL.
- Διαλύματα καθαρισμού NPI: Σε αυτά τα διαλύματα ποικίλει η συγκέντρωση της ιμιδαζόλης που προστίθενται σε διάλυμα 50mM NaH₂PO₄ ,300 mM NaCl . Για διάλυμα καθαρισμού NPI-40 προστίθεται για παράδειγμα ιμιδαζόλη συγκέντρωσης 40mM. Συνήθως , αυτά τα διαλύματα επειδή παρασκευάζονται για μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων αρχικά παρασκευάζεται το πυκνότερο και με διαδοχικές αραιώσεις προκύπτουν τα λιγότερο πυκνά.
- Θρεπτικό Υλικό (LB): 10 g/L τρυπτόνη, 10 g/L NaCl , 5 g/L εκχύλισμα ζύμης και απιονισμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Στην περίπτωση που απαιτείται η παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθενται και 15 g/L άγαρ.

2.3 Επαγωγείς- Αντιβιοτικά- Αντισώματα

- Στον κύκλο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δυο επαγωγείς ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Έτσι έγινε χρήση τόσο του επαγωγέα Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside (IPTG) όσο και του επαγωγέα anhydrotetracycline (ATc).
- Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε σχετίζεται και αυτό με τον εκάστοτε πλασμιδιακό φορέα. Έτσι, για κύτταρα που έφεραν το πλασμίδιο το pET28a(+) το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν καναμικίνη συγκέντρωσης 50μg/mL (kan50). Στην περίπτωση των κυττάρων που έφεραν το πλασμίδιο pASK75 το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη με τελική συγκέντρωση 100μg/ml (Amp).
- Το αντίσωμα του οποίου έγινε χρήση ήταν Anti-His , με συζευγμένη υπεροξειδάση χρένου (HRP conjugated) με συγκέντρωση 1/6000.

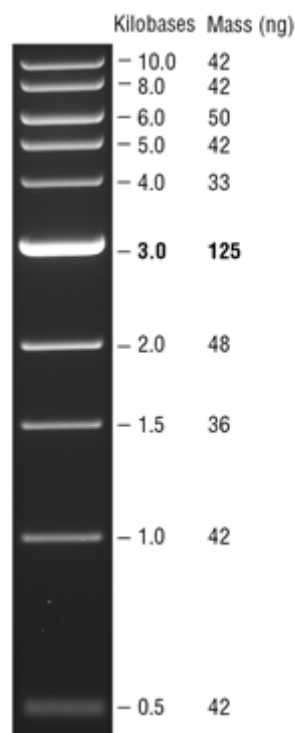
2.4 Διαλύματα Πρότυπων Πρωτεϊνών –DNA

Σε ότι αφορά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκαν δυο πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175), της New England Biolabs. Σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα SDS-PAGE band profile of the Page- Ruler unstained protein Ladder (10-200), της Thermo Fisher Scientific.



Εικόνα 10: Πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών. Στα αριστερά εμφανίζεται το πρότυπο διάλυμα Prestained Protein Marker και στα δεξιά το Page Ruler Unstained Protein Ladder.

Σχετικά με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το διάλυμα πρότυπων βάσεων DNA 1 kb DNA Ladder από της New England Biolabs Inc.



Εικόνα 11: Πρότυπο διάλυμα βάσεων DNA, αποτελεί το χρησιμοποιηθέν πρότυπο διάλυμα βάσεων, 1 kb DNA ladder

2.5 Μοριακές Τεχνικές

2.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις PCR έλαβαν χώρα σε θερμοκυκλωτή και με τελικό όγκο με 50μL. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν καθορισμένοι που σχεδιαστηκαν για την επιλογή του γονιδίου *estDZ4* και περιλάμβαναν θέσεις περιορισμού για τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και XhoI. Ακόμη, στον εμπρόσθιο εκκινητή είχε προστεθεί ένας γληθέτης έξι ιστιδίων (His-tag) ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε τόσο στις τεχνικές καθαρισμού όσο και στην ανίχνευση της πρωτεΐνης μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης Western που θα αναλυθεί εκτενώς αργότερα. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης οι ποσότητες των αντιδρώντων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Πίνακας 4: Υλικά και απαιτούμενοι όγκοι στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού όγκου 50 μl.

| Υλικά | Όγκοι (μL) |
|---------------------------------|------------|
| 5x Q5 Reaction Buffer | 10 |
| dNTPs ,10 μM | 1 |
| Q5 υψηλής πιστότητας πολυμεράση | 0.5 |

| | |
|-----------------------------|------|
| DNA εκμαγείο (is3lip2) | 1 |
| Υπερκαθαρό Νερό | 32.5 |
| Εμπρόσθιος Εκκινητής, 10μM | 2.5 |
| Ανάστροφος Εκκινητής , 10μM | 2.5 |

Ο λόγος που επιλέχθηκε Q5 πολυμεράση, η οποία είναι υψηλής πιστότητας είναι λόγω της διορθωτικής της ικανότητας σε λάθη που γίνονται κατά την αντιγραφή αποφεύγοντας έτσι την πιθανότητα εισαγωγής μετάλλαξης κατά την αντιγραφή.

Όλες οι διαγνωστικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης που έλαβαν χώρα περιείχαν ως εκμαγείο ποσότητα κυτταρικής καλλιέργειας που προήλθε από τον εμβολιασμό αποικίας που προέκυψε μετά την αντίδραση συνένωσης μορίων DNA, τεχνική που θα περιγραφεί εκτενώς παρακάτω. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε αυτό το εκμαγείο ήταν για να απόσαφηνιστεί αν οι κλώνοι που είχαν επιλεγεί περιείχαν το γονίδιο στόχο. Σε κάποιες από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση η οποία δεν προσφέρει τη μέγιστη ακρίβεια στο στάδιο της αντιγραφής, κάτι που, βέβαια, στην φάση αυτή δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα του πειράματος.

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση και ο έλεγχος αλληλουχιών DNA απαιτεί την ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αγαρόζης. Αυτό αποτελείται από 1% αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και προσθήκη 5 μL βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και να του δίνει φθορισμό παρουσία υπεριώδους φωτός. Το διάλυμα, εν συνεχεία, μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και καθώς επανέρχεται στην θερμοκρασία δωματίου στερεοποιείται. Οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με ειδικό χτενάκι το οποίο εμβαπτίζεται στο υγρό διάλυμα και αφαιρείται από αυτό όταν έχει σταθεροποιηθεί. Η πλήρωση των θέσεων φόρτωσης πραγματοποιείται με μείγμα από το δείγμα φόρτωσης και ρυθμιστικό διάλυμα. Για κάθε 10 μL δείγματος φόρτωσης αντιστοιχούν 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος και το τελικό διάλυμα φορτώνεται σε κάποια από τις θέσεις φόρτωσης στην πηκτή. Για την εκτίμηση του μεγέθους των αλληλουχιών του DNA που βρίσκονται στα δείγματα , σε μια από τις θέσεις φόρτωσης προστίθενται 5 μL από κάποια πρότυπο δείγμα μορίων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V για χρονικό διάστημα 45 min.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρεται πάνω σε λάμπα εκπομπής υπεριώδους φωτός. Μέσω αυτής γίνονται εμφανή τα τμήματα DNA που λήφθηκαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης καθώς επίσης και το μέγεθος αυτών με τη βοήθεια του μεγέθους του πρότυπου δείγματος. Αν επιθυμείται η απομόνωση μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται σε συγκεκριμένο ύψος, το οποίο και καθορίζεται από το πρότυπο δείγμα πρωτεϊνών (ladder), αυτή μπορεί να κοπεί με ξυράφι στην περιοχή όπου εμφανίζεται.

2.5.3 Πέψεις DNA

Για τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν ο τελικό όγκος της αντίδρασης ήταν 40 μL . Ως περιοριστικά ένζυμα επιλέχθηκαν τα XbaI και XhoI σε ρυθμιστικό διάλυμα NEB 2.1. Ο χρόνος της αντίδρασης ήταν 30 min και η θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε ήταν οι 37° C. Το μείγμα παρασκευάζεται ως εξής:

10 μL DNA

1 μL από κάθε περιοριστικό ένζυμο

4 μL ρυθμιστικό διάλυμα (NEB 2.1)

24 μL υπερκαθαρό νερό

2.5.4 Αντιδράσεις συνένωσης μορίων DNA (ligation)

Στις αντιδράσεις αυτές ο στόχος δεν ήταν άλλος από την συνένωση διαφορετικών κομματιών DNA και συγκεκριμένα των γονιδίων με τον πλασμιδιακό φορέα. Η κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 15 μL . Βιβλιογραφικά, για τη μέγιστη απόδοση ο μοριακός λόγος γονιδίου: φορέα είναι επιθυμητό να είναι 3:1. Η επίτευξη, όμως, του λόγου αυτού απαιτεί γνώση της συγκέντρωσης DNA τόσο του γονιδίου όσο και του πλασμιδιακού φορέα, κάτι που για τεχνικούς λόγους δεν είναι γνωστό. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιούνται τρεις αντιδράσεις με λόγους όγκων γονιδίου –φορέα 1-3, 1-1, 3-1 από τις οποίες καλύπτονται ικανοποιητικά οι πιθανότητες ο μοριακός λόγος να προσεγγίζει το 3-1. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκυκλωτή σε θερμοκρασία 16° C και για χρονικό διάστημα 4h. Στη συνέχεια για χρονικό διάστημα 10 min παραμένει στους 60° C για την απενεργοποίηση της λιγάσης. Η λιγάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η T4 DNA λιγάση με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα εμπλουτισμένο με τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Οι αναλογίες των όγκων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις συνένωσης ήταν οι εξής:

Πίνακας 5 : Υλικά και απαιτούμενοι όγκοι για τις αντιδράσεις συνένωσης μορίων

| Αναλογία Γονιδίου-Φορέα | 1-1 | 3-1 | 1-3 |
|------------------------------------------|------------|------------|------------|
| Πλασμιδιακός φορέας (μL) | 6 | 2 | 6 |
| Γονίδιο (μL) | 6 | 6 | 2 |
| Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (μL) | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Λιγάση (μL) | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| Υπερκαθαρό νερό (μL) | 0,9 | 4,9 | 4,9 |

2.5.5 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων όπως πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων περιλαμβάνει δυο διαδικασίες, το θερμικό σοκ και τον μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Η τεχνική του θερμικού σοκ χρησιμοποιήθηκε στα κύτταρα BL21(DE3) καθώς επίσης και στα DH5α αλλά και στα Origami2(DE3) όταν απομονώθηκε το πλασμίδιο pASK75. Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης από την άλλη χρησιμοποιήθηκε στα Origami2(DE3) από τις αντιδράσεις συνένωσης χάρη στην μεγάλη απόδοση που εμφανίζουν.

2.5.5.1 Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ

Τα χημικός επιδεκτικά κύτταρα μεταφέρονται στον πάγο για κάποια λεπτά. 100 μ L από τα κύτταρα αναμιγνύονται με 1 μ L DNA και αφήνονται στον πάγο για 10 min. Το μίγμα μετά το πέρας των 10 λεπτών τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C. Εκεί παραμένει για 5 sec και στη συνέχεια επανατοποθετείται στον πάγο όπου και παραμένει για 2 min. Στη συνέχεια προστίθεται 1mL LB και το μίγμα τοποθετείται για 1h υπο συνεχή ανάδευση στους 37° C. Με το πέρας της μιας ώρας το μείγμα απλώνεται σε τρυβλία αγαρόζης τα οποία περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό LB και κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37° C για τουλάχιστον 16 ώρες ώστε να σχηματιστούν αποικίες.

2.5.5.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης

Τα ηλεκτροεπιδεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Origami2(DE3). Τοποθετήθηκαν σε πάγο και από αυτά 50 μ L αναμίχθηκαν με 1 μ L γονίδιο. Αναδεύτηκαν ήπια και επώαστηκαν στον πάγο για περίπου 30 min. Έπειτα, το μείγμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης που έχει ψυχθεί και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροδιάτρηση. Με το πέρας της ηλεκτροδιάτρησης που έλαβε χώρα κάποια δευτερόλεπτα προστίθενται 500 μ L LB και το μείγμα μεταφέρθηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα όπου και παρέμεινε για 1h σε θερμοκρασία 37° C. Έπειτα από την μία ώρα ακολούθησε επίστρωση του μείγματος όπως στο θερμικό σοκ σε τρυβλία είτε καναμικύνης είτε αμπικιλίνης αναλόγως με το πλασμίδιο και επώαση στους 37° C για τον σχηματισμό αποικιών.

2.6 Τεχνικές Ανάλυσης Πρωτεϊνών

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη που παράγεται είναι η επιθυμητή καθώς επίσης και πόσο αποτελεσματικά παράγεται αλλά και πόσο καθαρό είναι το τελικό προϊόν χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένες τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών οι οποίες και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:

2.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή διαχωρίζει τις πρωτεΐνες κυρίως με βάση το μοριακό τους βάρος. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται ένας αξιόπιστος έλεγχος για την παρουσία ή όχι μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα αλλά και πλήθος των διαφορετικών πρωτεϊνών που περιέχονται στο διάλυμα αυτό. Συγχρόνως, επειδή μαζί με τα προς εξέταση διαλύματα ηλεκτροφορούνται και πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της υπο μελέτη πρωτεΐνης. Οι αρχές της μεθόδου αυτής για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βασίζονται αρχικά στην ιδιότητα των πόρων της πηκτής να επιτρέπει πιο γρήγορα την διέλευση των πρωτεϊνών χαμηλότερου μοριακού βάρους και έπειτα στο γεγονός ότι δυο πρωτεΐνες που έχουν ίδιο μοριακό βάρος λόγω διαφορετικής τεταρτοταγούς δομής, διαπερνούν με διαφορετική ταχύτητα τους πόρους της πηκτής. Προς αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται στην πρωτοταγή της δομή με προσθήκη απορρυπαντικού Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) στην πηκτή αλλά και με θέρμανση των δειγμάτων στους 100° C παρουσία διάλυμα φόρτωσης που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη σαν αποδιατακτικούς παράγοντες. Ακόμα, ένας άλλος σπουδαίος ρόλος που διαδραματίζει το SDS στη διαδικασία είναι ότι με τη θέρμανση του διαλύματος στους 100°C, αυτό προσδένεται ισχυρά στην πρωτεΐνη και της προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο ώστε κατά την ηλεκτροφόρηση να κινηθεί προς τον θετικό πόλο.

Η πηκτή, ωστόσο, δεν έχει ενιαία σύσταση και ιδιότητες αλλά αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτές με διαφορετική σύσταση και χρησιμότητα. Η πρώτη είναι η πηκτή επιστοιβάσης η οποία όπως λέει και το όνομα της «στοιβάζει», φέρει δηλαδή στο ίδιο ύψος τις διαφορετικές πρωτεΐνες ώστε εισερχόμενες στην πηκτή να έχουν την ίδια αφετηρία. Η δεύτερη πηκτή είναι εκείνη του διαχωρισμού στην οποία και πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Οι συγκεντρώσεις των πηκτών ποικίλουν ανάλογα με τις ανάγκες των διαλυμάτων. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν πηκτές συγκέντρωσης 12% v/v.

Προετοιμασία δειγμάτων

Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή αυτά αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται στους 100°C για 10 min.

Παρασκευή πηκτής

Πίνακας 6 :Υλικά και απαιτούμενη όγκοι για την Παρασκευή της πηκτής επιστοιβάσης και της πηκτής διαχωρισμού κατά την προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

| | Πηκτή Επιστοιβάσης | Πηκτή διαχωρισμού |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|
| dH ₂ O (ml) | 5,4 | 3,3 |
| Acrylamide-bisacrylamide (mL) | 1,3 | 4 |
| 1M Tris-HCl pH 6,8 (mL) | 1 | 2,5 |
| 10% w/v SDS (μL) | 80 | 100 |

| | | |
|--------------|----|-----|
| 10% APS (μL) | 80 | 100 |
| TEMED (μL) | 8 | 4 |

Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού. Αυτή τοποθετείται ανάμεσα σε ειδικές γυάλινες πλάκες μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του ύψους της κάθε πλάκας. Στη συνέχεια, συμπληρώνεται το υπόλοιπο με απιονισμένο νερό. Η προσθήκη νερού αποσκοπεί στην αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων στην επιφάνεια της πηκτής. Μόλις παρατηρηθεί πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού αφαιρείται προσεκτικά το νερό και προστίθεται η πηκτή επιστοίβασης. Πριν από τον πολυμερισμό της πηκτής επιστοίβασης προστίθεται ειδικό χτενάκι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις φόρτωσης. Με τον πολυμερισμό της πηκτής επιστοίβασης, αφαιρείται το χτενάκι.

Οι γυάλινες πλάκες που περιέχουν τις πηκτές μεταφέρονται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής σε άμεση επαφή με το πήκτωμα και έπειτα, φορτώνεται αρχικά διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, προκειμένου να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών βαρών των άγνωστων πρωτεϊνών στο διάλυμα και στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση στα 120 V και 1000mA μέχρι το διάλυμα των πρότυπων πρωτεϊνών να φτάσει στο τέλος της πηκτής. Η ακόλουθη επεξεργασία της πηκτής και η ανάλυση της εξαρτάται με τη μέθοδο που κρίνεται σε κάθε περίπτωση καταλληλότερη. Μπορεί να γίνει χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 ή επεξεργασία με Western Blot. Οι διαδικασίες περιγράφονται εκτενώς παρακάτω.

2.6.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη η εμφάνιση της προ ανάλυση πρωτεΐνης αλλά και των υπόλοιπων πρωτεϊνών που ενδέχεται να υπάρχουν στο δείγμα. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα που έχει το Coomassie να προσδέχεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό γίνεται έλεγχος τόσο του αν υπάρχει η προς εξέταση πρωτεΐνη, σε τι βαθμό συγκέντρωσης και σε τι βαθμό καθαρότητάς.

Μετά την ηλεκτροφόρηση με ειδική πλαστική σπάτουλα ανοίγουν οι δυο γυάλινες πλάκες και με μεγάλη προσοχή αφαιρείται το κομμάτι της πηκτής επιστοίβασης. Η πηκτή διαχωρισμού που έχει παραμείνει εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης για περίπου 30 min. Στη συνέχεια, ακολουθούν δυο με τρεις πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού (destain) μέχρι να εμφανίζονται μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών.

2.6.3 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πρόσδεση των αντισωμάτων σε διάφορα επίτοπα που εσκεμένα έχουν προστεθεί στην αλληλουχία της υπο ελέγχου πρωτεΐνης. Η τεχνική αυτή προσφέρει μεγάλη ακρίβεια για την πιθανότητα παραγωγής ή μη της

επιθυμητής πρωτεΐνης και πληροφορίες για την ύπαρξη προϊόντων αποδόμησης είτε λόγω προβλημάτων έκφρασης είτε λόγω πρωτεόλυσης.

Η διαδικασία που ακολουθείται στη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης περιγράφεται παρακάτω. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την κοπή από την πηκτή του μέρους που αποτελεί την πηκτή επιστοιβάσης, το υπόλοιπο κομμάτι (πηκτή διαχωρισμού), εμβαπτίζεται σε transfer buffer για 15 min. Στόχος μας είναι η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε ειδική μεμβράνη. Η ειδική μεμβράνη τοποθετείται σε μεθανόλη για 15 sec, έπειτα σε καθαρό νερό για 2 min και στη συνέχεια σε transfer buffer για 15 min. Κατόπιν, στην συσκευή μεταβίβασης τοποθετούνται τρία ειδικά χαρτιά που έχει προηγηθεί η εμβάπτιση τους σε transfer buffer, από πάνω τοποθετείται η πηκτή, στη συνέχεια η μεμβράνη και τέλος άλλα τρία χαρτιά τα οποία έχουν εμβαπτιστεί όπως και τα πρώτα τρία σε transfer buffer. Η συσκευή μεταβίβασης σφραγίζεται και ρυθμίζεται στα 12 V για 55 min. Με το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, λαμβάνεται η μεμβράνη και τοποθετείται σε διάλυμα γάλακτος 5% σε TBS-Tween και παραμένει εκεί για 1h. Ο λόγος που πραγματοποιείται αυτό είναι οι πρωτεΐνες του γάλακτος να προσδεθούν στην υπόλοιπη επιφάνεια της μεμβράνης όπου δεν έχουν μεταφερθεί πρωτεΐνες από τη γέλη και να μην επιτρέψουν τη μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος αργότερα στη μεμβράνη (blocking). Η μεμβράνη, έπειτα, ξεπλένεται με TBS-Tween και εμβαπτίζεται στο αντίσωμα Anti-His για 1h.

Το συγκεκριμένο αντίσωμα που χρησιμοποιείται εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς μια τα επίτοπα ιστιδινών. Επειδή, λοιπόν, και στο γονίδιο *estDZ4* έχει προστεθεί ο ιχνηθέτης των έξι ιστιδινών που εκφράζονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι εφικτός ο εντοπισμός με μεγάλη ακρίβεια της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ύστερα από την 1 h όπου η μεμβράνη είναι εμβαπτισμένη στο αντίσωμα, ακολουθούν πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με TBS-Tween και στη συνέχεια η μεμβράνη διαβρέχεται από 1 mL λουμινόλη και 1 mL υπεροξειδίου του υδρογόνου διαδοχικά. Το υπεροξειδίου του υδρογόνου αποσυντίθεται παρουσία συζευγμένων δομών στο αντίσωμα όπως η υπεροξειδάση του χρένου (HPR) και ενεργοποιεί με τη σειρά του την λουμινόλη, η οποία τοποθετείται πάνω στο φωτογραφικό φιλμ ή σε σκοτεινό θάλαμο. Στο φιλμ ή στην κάμερα ανίχνευσης εμφανίζεται το αποτύπωμα της πρωτεΐνης στην οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα, μιας και στο σημείο αυτό εκπέμπεται φως.

2.6.4 Η μέθοδος Bradford

Πρόκειται για μια μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού ενός ενζύμου, της οποίας η αρχή στηρίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 εμφανίζεται με δυο μορφές μια ερυθρή και μια κυανή και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 και 595 nm αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, όταν η χρωστική προσδεθεί στα βασικά και αρωματικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, η ερυθρή μορφή μετατρέπεται σε κυανή. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εν συνεχεία πραγματοποιείται ο υπολογισμός της ποσότητας των δειγμάτων με άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και για την μετέπειτα μέτρηση των δειγμάτων περιγράφεται παρακάτω:

- Ανάμειξη 1500 μ L Coomassie Reagent (thermo kit) με 30 μ L δείγμα και 30 μ L νερό διπλά αποστειρωμένο (υπερκαθαρό) σαν τυφλό δείγμα.

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Φωτομέτρηση στα 595 nm.

2.7 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου συνοδεύτηκε από μια σειρά αντιδράσεων υδρόλυσης σε διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά για τον προσδιορισμό των βιοχημικών χαρακτηριστικών του. Η ενεργότητα του ενζύμου εκφράζεται είτε ως σχετική είτε ως ειδική σε units/mg ενζύμου. Με την έννοια του unit ορίζουμε το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1μmole γλυκόζης ανά λεπτό στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας τόσο της σχετικής όσο και της ειδικής, πραγματοποιείται χρήση της μεθόδου του Δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο δινιτροσαλικυλικό οξύ και τα ελεύθερα ημιακεταλικά υδροξύλια των αναγωγικών σακχάρων. Η δημιουργία του συμπλόκου απαιτεί θέρμανση πάνω από 70° C και ανιχνεύεται με φωτομέτρηση στα 540 nm.

Ως 100% ορίζεται η τιμή της μέγιστης απορρόφησης και η σχετική ενεργότητα υπολογίζεται με βάση αυτή. Σχετικά με την ενεργότητα σε units χρησιμοποιείται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης ώστε να γίνει μετατροπή της τιμής απορρόφησης που λήφθηκε από την υδρόλυσης του εκάστοτε υποστρώματος σε ποσό γλυκόζης.

Η αντιστοιχία μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης εκφράζεται με τον νόμο Lambert- Beer μέσω του οποίου προβλέπεται γραμμική σχέση μεταξύ των δυο μεγεθών με βάση τη σχέση:

$$A=\epsilon*b*c$$

Όπου A: απορρόφηση

ε: μοριακή απορροφητικότητα (1/mole/cm)

c: συγκέντρωση (M)

b: μήκος κυψελίδας

Η παραπάνω σχέση ισχύει για συγκεντρώσεις μέχρι 0,01M. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκύπτουν σημαντικές αποκλίσεις γιατί γίνεται επικάλυψη των ηλεκτρονιακών νεφών των μορίων της ουσίας .

2.8 Πρότυπες συνθήκες αντίδρασης

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις πρότυπες συνθήκες για το ένζυμο που ήταν θερμοκρασία 75° C και pH 6,5. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν phosphate Na₂HPO₄–NaH₂PO₄ και το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε με συγκέντρωση 2μg/mL. Σαφώς, είναι πιθανό ανάλογα με την παράμετρο που εξετάζεται κάθε φορά να αλλάζει κάποια από τις παραπάνω πρότυπες συνθήκες .

2.9 Η μέθοδος χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (SEC)

Οι διαδικασίες υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) εκμεταλλεύονται στήλες διαχωρισμού με μέσες διαμέτρους μικρότερες από 5-40 μm . Ωστόσο, αυτού του είδους οι στήλες χρησιμοποιούνται σε συστήματα υψηλής πίεσης (400 bar) συχνά με οργανικούς διαλύτες και γενικά περιορίζονται σε χαμηλές φορτίσεις δειγμάτων. Για την παροχή ενός περισσότερο βιοσυμβατού διαχωρισμού βιοπολυμερών υψηλής διακριτικής ικανότητας, συμπεριλαμβανομένων, ίσως και αποκλειστικά των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC). (Cutler P., 2004)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης(SEC) είναι μια μορφή χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που εκμεταλλεύεται την υψηλή ανάλυση που επιτυγχάνεται από σταθερές φάσεις μικρής διαμέτρου. Αρχικά, αναπτύχθηκε για πρωτεΐνες και διαθέτει υψηλή ικανότητα φόρτωσης, και σε βιοσυμβατά συστήματα υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος, και σε υψηλής ταχύτητας ροής και διαθεσιμότητας στατικές φάσεις στους πιο συνήθεις τρόπους χρωματογραφίας (π.χ. ανταλλαγή ιόντων, διήθηση πηκτώματος, αντίστροφη φάση και συγγένεια). Το σύστημα καθιστά δυνατό τον επαναλαμβανόμενο διαχωρισμό με την ενσωμάτωση ενός υψηλού επιπέδου αυτοματισμού, συμπεριλαμβανομένων των αυτόματων δειγματοληπτών, του ελέγχου προγράμματος κλίσης και της συλλογής κορυφών. Εκτός από τις πρωτεΐνες, η μέθοδος εφαρμόζεται και σε άλλα είδη βιολογικών δειγμάτων που περιλαμβάνουν ολιγονουκλεοτίδια και πλασμίδια. (Wall D.& Loughran S.,2008)

Η μέθοδος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης περιλαμβάνει μια ειδικά διαμορφωμένη διάταξη αποτελούμενη από δυο στήλες. Τα διαλύματα των δειγμάτων περιέχουν γενικά 5-10 μg πρωτεΐνης ανά mL. Ωστόσο, και πολύ μικρότερες ποσότητες της τάξης μερικών pg μπορούν να αναλυθούν. Αρχικά, ξεκινάμε με προγράμματα έκλουσης που περιλαμβάνουν τη διέλευση 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος απαλλαγμένο από άλατα. Δεδομένου ότι ο «κενός όγκος» (ό όγκος δηλαδή, του ρυθμιστικού που απαιτείται από την έναρξη μέχρι να ξεκινήσει η έκλουση του μη προσροφόμενου υλικού από το κάτω μέρος της στήλης) είναι περίπου 0,75 mL, εξασφαλίζονται περίπου 3 κενοί όγκοι. Ανάλογα, με το είδος της πρωτεΐνης που πρόκειται να περάσει από τη στήλη χρησιμοποιούνται είτε ρυθμιστικά διαλύματα με κλιμακωτές βαθμίδες συγκεντρώσεις με τα οποία γίνονται εναλλαγές στις πλύσεις, είτε ουδέτερα ρυθμιστικά διαλύματα με την ιδιότητα να παρέχουν ένα περιβάλλον υψηλής ιοντικής ισχύος για να αποφεύγονται ιοντικές αλληλεπιδράσεις.(Andrews, Taylor, & Owen, 1985)

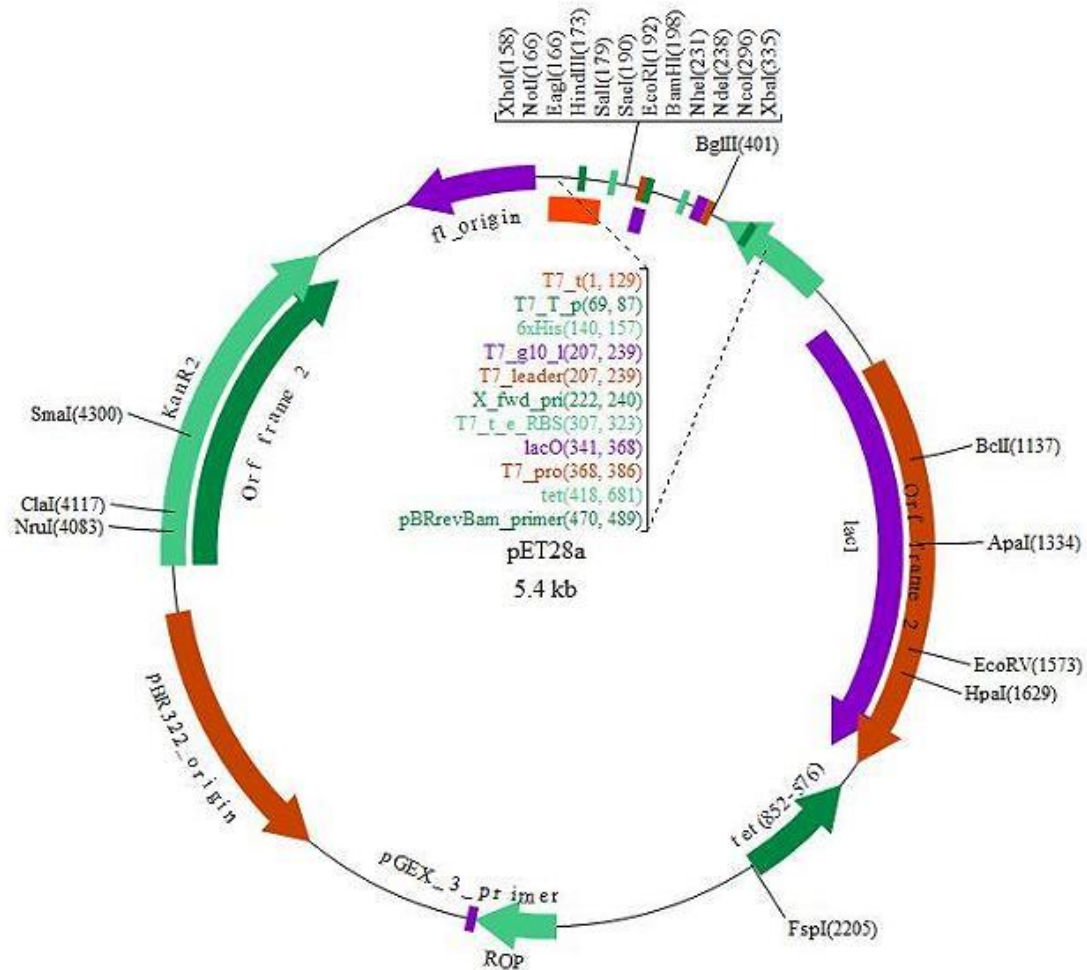
2.10 Πλασμιδιακοί φορείς

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δυο είδη πλασμιδιακών φορέων έκφρασης.

pET-28a(+)

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το pET-28a(+) πλασμίδιο. Αυτό περιέχει μια αλληλουχία γονιδίων με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (kan50). Εκτός των άλλων στο πλασμίδιο περιέχεται και γονίδιο *lacI* που αποτελεί μέρος του γονιδίου *lac* καθώς και ένας T7 υποκινητής. Ως γνωστό το *lacI* υπο φυσιολογικές συνθήκες αναστέλλει τη μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης, οπότε ο υποκινητής δεν λειτουργεί και δεν

πραγματοποιείται η έκφραση του γονιδίου-στόχου. Η προσθήκη Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside (IPTG), που έχει ρόλο ανάλογο με αυτόν της λακτόζης, ευνοεί την προσδεσή του πάνω στον αναστολέα *lacI* και επιτρέπει την παραγωγή της T7 RNA πολυμεράσης και αρα την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης.

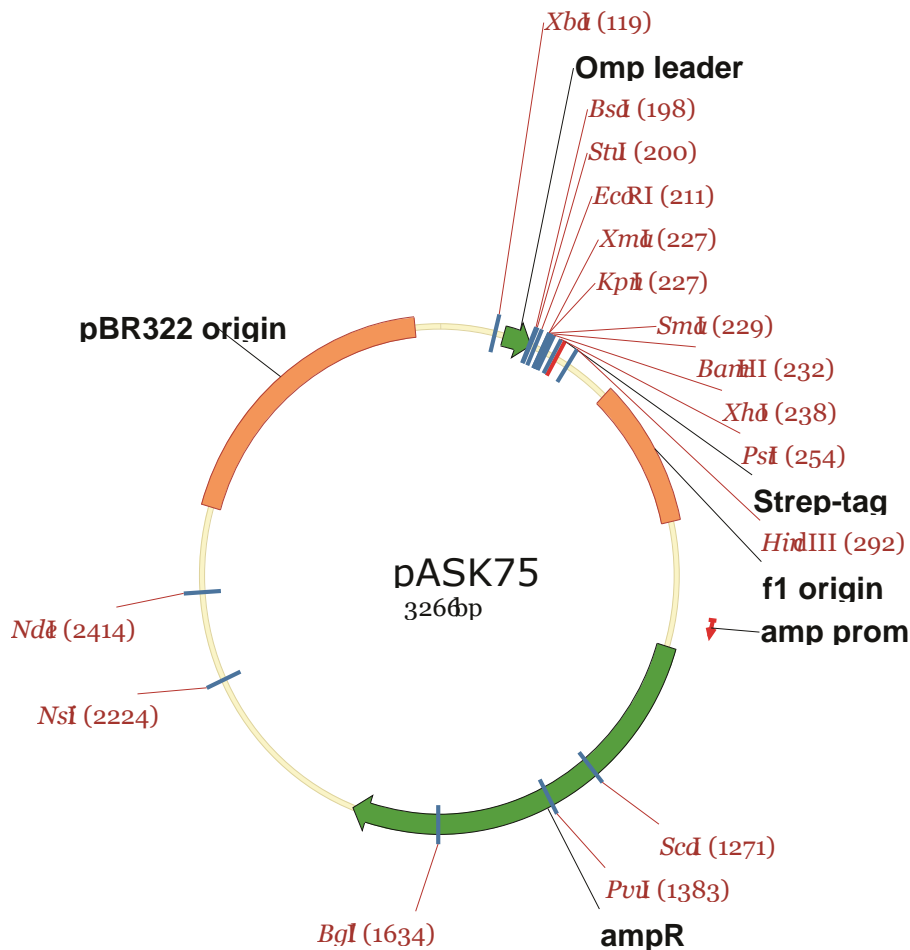


Εικόνα 12: Χάρτης πλασμιδίου pET-28a(+) (Okay,2011)

pASK 75

Το πλασμίδιο pASK75 ως φορέας έκφρασης αναπτύχθηκε για τη σύνθεση ξένων πρωτεϊνών σε *Escherichia coli* υπό μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή *tetA*. Η στενή ρύθμιση επιτεύχθηκε με τοποθέτηση του δομικού γονιδίου για τον καταστολέα *tet*, ως μεταγραφική σύντηξη, μετά από το γονίδιο κωδικοποίησης της βήτα-λακταμάσης (*bla*) στο ίδιο πλασμίδιο. Η ισχυρή έκφραση του ξένου γονιδίου επάγεται εύκολα με την προσθήκη ανυδροτετρακυκλίνης (ATc) σε χαμηλή συγκέντρωση. Χρησιμοποιώντας την παραγωγή ενός ανασυνδυασμένου θραύσματος F (ab) ποντικού ανοσοσφαιρίνης ως παράδειγμα, το σύστημα αποδείχθηκε ότι λειτουργεί ανεξάρτητα από το υπόβαθρο ξενιστή-στελέχους και ότι είναι εξαιρετικά καλά κατασταλαμένο απουσία του επαγωγέα. Συνεπώς, αντιπροσωπεύει μια οικονομική και ανεξάρτητη εναλλακτική λύση σε κατασκευάσματα προαγωγέα επαγόμενα από IPTG. Πρόσθετα χαρακτηριστικά του pASK75 περιλαμβάνουν αλληλουχία σήματος και πολλαπλή θέση

κλωνοποίησης που ακολουθείται από περιοχή που κωδικοποιεί το πεπτίδιο αλληλουχίας με συμβατά άκρα ως προς την αλληλουχία Strep του πλασμιδίου για να διευκολύνει τον καθαρισμό μιας βακτηριακά παραγόμενης πρωτεΐνης.



Εικόνα 13: Χάρτης πλασμιδίου pAsk75 (Biovector Inc)

2.11 Βακτηριακά στελέχη

- ✓ BL21(DE3): Χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου, μιας και έχουν τη δυνατότητα να κωδικοποιούν την T7 RNA πολυμεράση.
- ✓ DH5a: Χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα, αποθήκευσης, προκειμένου να διαπιστωθεί ότι εισάγεται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει την πρωτεΐνη στόχο στον ξενιστή.
- ✓ Origami2(DE3). Αποτελούν και αυτά κύτταρα έκφρασης με την ιδιότητα ότι περιέχουν αρκετές μεταλλάξεις στις θειορεδοξίνες και τις αναγωγάσες της γλουταθειόνης. Αυτά ευνοούν το σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. (Camarero, Kimura, Woo, Shekhtman, & Cantor, 2007) ,(Larsen, Bornscheuer, & Hult, 2008)

ΕΝΟΤΗΤΑ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Λειτουργία , κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου *EstDZ4*

3.1.1 Προέλευση και βιοπληροφορική ανάλυση της εξεταζόμενης αλληλουχίας

Το εργαλείο μέσω του οποίου δόθηκε η ευκαιρία μελέτης της αλληλουχίας στόχου *estDZ4* όπως αυτή ονομάστηκε η οποία προέκυψε από μεταγονιδιωματολογικό δείγμα είναι το «ANASTASIA» το οποίο και τέθηκε υπο δοκιμή κατά τη διάρκεια του έργου HotZyme, που αποτελεί ερευνητικό πρόγραμμα με στόχο την ανακάλυψη νέων, θερμοανθεκτικών υδρολασών από θερμα περιβάλλοντα μέσω μεταγονιδιωματολογικής ανάλυσης. Το εργαλείο «ANASTASIA» χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο σαν σύστημα αποθήκευσης και διαχείρισης μεταγονιδιωματολογικών δεδομένων αλληλουχιών που είχαν ληφθεί από οκτώ απομακρυσμένες θερμοπηγές με απώτερο στόχο την ανίχνευση νέων και θερμοσταθερών ενζύμων βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Η πρώτη έκδοση της πλατφόρμας εγκαταστάθηκε σε διακομιστή του Πανεπιστημίου της Κοπεγχάγης με την ονομασία «Helios» με την δυνατότητα να παρέχει πρόσβαση τόσο στα δεδομένα όσα και στα εργαλεία σχολιασμού προκειμένου να προβλεφθούν αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε θερμοσταθερά ένζυμα πιθανής υδρολυτικής δραστηριότητας που θα μπορούσαν μετέπειτα να επαληθευτούν στο εργαστήριο. Αυτή η πρώτη έκδοση είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση δυο νέων ενζύμων ενισχυμένης θερμοσταθερότητας. Η τελική έκδοση του οδήγησε στην ανίχνευση του ενζύμου *EstDZ4*. Συγκεκριμένα, τα πρωτογενή δεδομένα από κάθε μεταγονιδιωματολογικό δείγμα του HotZyme εισήχθησαν στον διακομιστή Helios και συνδέθηκαν με την ANASTASIA καθιστώντας τα έτσι άμεσα διαθέσιμα τόσο για λήψη όσο και για ανάλυση. Η επιλογή της αλληλουχίας *estDZ4* ως υποψήφιου γονιδίου με πιθανή εστερολυτική δραστηριότητα προέκυψε από την εφαρμογή της «υστερα από συναρμολόγηση» ροής εργασίας με βάση τα δεδομένα συναρμολόγησης του δείγματος Is2 που λήφθηκαν από ισλανδική θερμοπηγή η οποία είχε θερμοκρασία τη στιγμή δειγματοληψίας 85° C.

Από το γενετικό υλικό που παραλήφθηκε έγινε επιλογή ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης . Η αμινοξική αλληλουχία αυτού εμφανίζει 23% ομοιότητα με μια λιπάση που ανήκει στην κατηγορία των GDSL λιπασών. Συγκεκριμένα πρόκειται για μια εστεράση. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν με την εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας στο πρόγραμμα Uniprot Blast P. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται μια λίστα χαρακτηρισμένων ενζύμων που έχουν καταχωρηθεί στο πρόγραμμα Uniprot Blast P. καθώς επίσης και το ποσοστό της ομολογίας που παρουσιάζουν με την αμινοξική αλληλουχία που εισήχθη.

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------------------|
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A15q55050; AltName: Full=Extracellular lipase A15q55050; Flags: Precursor | 58.9 | 58.9 | 84% | 3e-08 | 23% | Q9FIA1.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A11q74460; AltName: Full=Extracellular lipase A11q74460; Flags: Precursor | 56.6 | 56.6 | 84% | 2e-07 | 24% | Q9CA68.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q31540; AltName: Full=Extracellular lipase A12q31540; Flags: Precursor | 53.9 | 53.9 | 51% | 1e-06 | 23% | Q9SIQ3.1 |
| RecName: Full=Uncharacterized protein in trpE-trpG intergenic region; Flags: Precursor | 52.4 | 52.4 | 32% | 5e-06 | 34% | P40604.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q31550; AltName: Full=Extracellular lipase A12q31550; Flags: Precursor | 51.6 | 51.6 | 51% | 7e-06 | 22% | Q9SIQ2.3 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A11q58430; AltName: Full=Extracellular lipase A11q58430; Flags: Precursor | 47.0 | 47.0 | 49% | 2e-04 | 21% | Q9C648.1 |
| RecName: Full=Esterase EstP; AltName: Full=Autotransporter esterase EstP; AltName: Full=Palmitoyl-CoA hydrolase; Flags: Precursor | 46.6 | 46.6 | 32% | 3e-04 | 31% | Q88QS0.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q40250; AltName: Full=Extracellular lipase A12q40250; Flags: Precursor | 45.4 | 45.4 | 39% | 6e-04 | 23% | Q9SI26.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase EXL2; AltName: Full=Family II extracellular lipase 2; Short=Family II lipase EXL2; Flags: Precursor | 42.4 | 42.4 | 44% | 0.005 | 22% | Q94CH7.1 |
| RecName: Full=Esterase EstA; AltName: Full=Autotransporter esterase EstA; Flags: Precursor | 40.8 | 40.8 | 36% | 0.021 | 29% | Q33407.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q24560; AltName: Full=Extracellular lipase A12q24560; Flags: Precursor | 38.5 | 38.5 | 18% | 0.079 | 26% | Q9SJA9.2 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q30310; AltName: Full=Extracellular lipase A12q30310; Flags: Precursor | 37.7 | 37.7 | 52% | 0.16 | 19% | O22927.1 |
| RecName: Full=GDSL esterase/lipase A12q30220; AltName: Full=Extracellular lipase A12q30220; Flags: Precursor | 36.2 | 36.2 | 43% | 0.54 | 19% | O22918.1 |

Εικόνα 14 : Αποτελέσματα ως προς την ομοιότητα που εμφανίζει το ένζυμο με βάση το πρόγραμμα Uniprot Blast P.

Specific hits: **Triacylglycerol_lipase_like**

Non-specific hits: PLN03156, Lipase_GDSL

Superfamilies: **SGNH_hydrolase super-family**

Multi-domains: COG3240

Search for similar domain architectures [?] Refine search [?]

| Name | Accession | Description | Interval | E-value |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| + Triacylglycerol_lipase_like | cd01847 | Triacylglycerol lipase-like subfamily of the SGNH hydrolases, a diverse family of lipases and ... | 58-439 | 5.89e-45 |
| + PLN03156 | PLN03156 | GDSL esterase/lipase; Provisional | 311-438 | 7.37e-04 |
| + Lipase_GDSL | pfam00657 | GDSL-like Lipase/Acylhydrolase; | 312-438 | 2.49e-03 |
| + COG3240 | COG3240 | Phospholipase/lecithinase/hemolysin [Lipid transport and metabolism, General function ... | 37-442 | 1.45e-26 |

Blast search parameters

Data Source: Live blast search RID = YUJSW75R015

User Options: Database: CDSEARCH/odd v3.14 Low complexity filter: no Composition Based Adjustment: yes E-value threshold: 0.01 Maximum number of hits: 500

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.*43(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A et al. (2009), "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.", *Nucleic Acids Res.*37(D)205-10.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W)327-331.

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
 NCBI | NLM | NIH

Εικόνα 15 : Αποτελέσματα ως προς την κατηγορία στην οποία ανήκει το ένζυμο με βάση την αμνοξική αλληλουχία με βάση το πρόγραμμα Uniprot Blast P.

Ωστόσο, εξετάστηκαν και τα αποτελέσματα ως προς την ομοιότητα και σε άλλες βάσεις δεδομένων. Παρακάτω φαίνεται η εικόνα που λήφθηκε από την εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας στην πλατφόρμα NR BlastP που παραθέτει με τη σειρά λίστα ενζύμων που εμφανίζουν ομοιότητα με την αντίστοιχη αλληλουχία, ποσοστό ομοιότητας καθώς επίσης και τον μικροοργανισμό από όπου έχει προέλθει το εκάστοτε καταχωρημένο ένζυμο. Το ποσοστό της ομοιότητας άγγιξε το 99% με μια υποθετική εστεράση ή λιπάση που εμφανίζεται στον μικροοργανισμό *Thiomonas sp.*

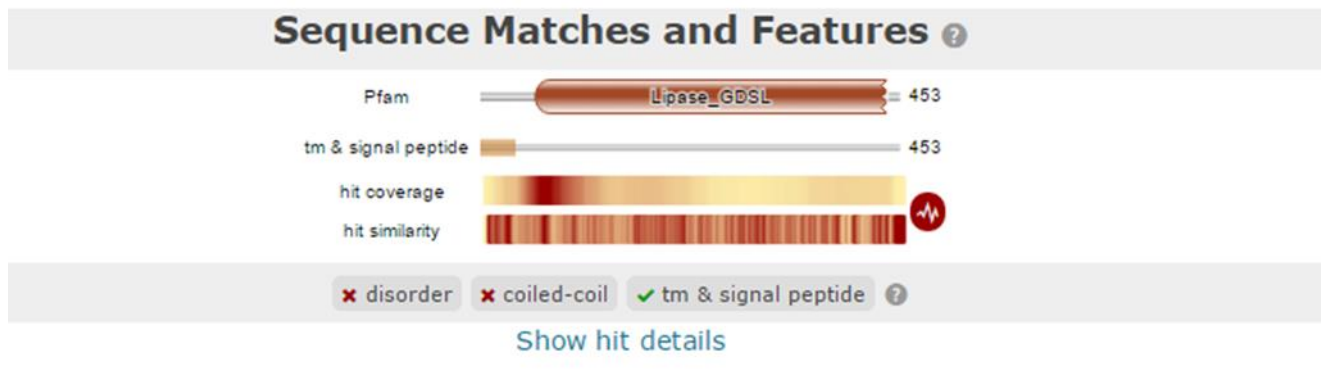
Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> putative lipase / esterase protein [Thiomonas sp. CB3] | 882 | 882 | 98% | 0.0 | 99% | CQR41430.1 |
| <input type="checkbox"/> lipase/esterase [Thiomonas intermedia] | 855 | 855 | 98% | 0.0 | 96% | WP_013122531.1 |
| <input type="checkbox"/> esterase [Thiomonas bhubaneswarensis] | 710 | 710 | 98% | 0.0 | 85% | WP_055449659.1 |
| <input type="checkbox"/> MULTISPECIES: hypothetical protein [Thiomonas] | 694 | 694 | 97% | 0.0 | 88% | WP_013105090.1 |
| <input type="checkbox"/> esterase [Thiomonas sp. FB-Cd] | 456 | 456 | 97% | 5e-155 | 56% | WP_031408799.1 |
| <input type="checkbox"/> hypothetical protein [Thiomonas sp. FB-6] | 443 | 443 | 94% | 8e-151 | 59% | WP_018914423.1 |
| <input type="checkbox"/> hypothetical protein [Ferrovum sp. Z-31] | 430 | 430 | 94% | 1e-144 | 50% | WP_062187707.1 |
| <input type="checkbox"/> hypothetical protein [Ferrovum myxofaciens] | 429 | 429 | 94% | 2e-144 | 50% | WP_051862148.1 |
| <input type="checkbox"/> putative lipase / esterase protein [Thiomonas sp. CB2] | 401 | 401 | 97% | 8e-134 | 59% | CDW94614.1 |

Εικόνα 16: Αποτελέσματα από την εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας στην πλατφόρμα NR BlastP για την εύρεση του πιθανού οργανισμού από τον οποίο προήλθε

Για επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε, τέλος, η βάση δεδομένων HMMER. Αυτή η βάση δεδομένων δίνει πληροφορίες τόσο για την οικογένεια που ανήκει το ένζυμο όσο και για την φυλογενετική ομοιότητα που εμφανίζει η αλληλουχία με άλλους μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έμοιαζαν κατά μεγάλο βαθμό με οσα έχουν προηγηθεί. Το πρόγραμμα έδειξε ότι το ένζυμο ανήκει ,πιθανότατα, στην κατηγορία των GDS1 λιπασών εστερασών και πιθανότατα προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *Thiomonas intermedia*.



Εικόνα 17: Αποτελέσματα από την εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας στην πλατφόρμα HMMER για την εύρεση του είδους του ενζύμου

Significant Query Matches (265) in uniprotrefprot (v.2015-06-24) [Customize](#)

| Target | Species | E-value |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------|
| > D5WY84_THIK1 | Thiomonas intermedia (strain K12) | 4.2e-278 |
| > I0HLD0_RUBGI | Rubrivivax gelatinosus (strain NBRC 100245 / IL144) | 1.2e-43 |
| > Q8Y1V9_RALSO | Ralstonia solanacearum (strain GMI1000) | 6.5e-30 |
| > B2UGG6_RALPJ | Ralstonia pickettii (strain 12J) | 2.1e-29 |
| > A2SCH2_METPP | Methylibium petroleiphilum (strain PM1) | 1.9e-27 |
| > Q21UY3_RHOFT | Rhodoferrax ferrireducens (strain ATCC BAA-621 / DSM 15236 / T118) | 3.6e-27 |
| > Q12FI0_POLSJ | Polaromonas sp. (strain JS666 / ATCC BAA-500) | 1.9e-23 |
| > H0PRM9_9RHOO | Azoarcus sp. KH32C | 4.6e-19 |
| > Q13UK1_BURXL | Burkholderia xenovorans (strain LB400) | 4.9e-19 |
| > W0V0Q9_9BURK | Janthinobacterium agaricidamnorum NBRC 102515 = DSM 9628 | 1.3e-17 |
| > H8L0N3_FRAAD | Frateriuria aurantia (strain ATCC 33424 / DSM 6220 / NBRC 3245 / NCIMB 13370) | 3.4e-16 |
| > G0A8P9_COLFT | Collimonas fungivorans (strain Ter331) | 3.8e-16 |
| > B2JDE1_BURP8 | Burkholderia phymatum (strain DSM 17167 / STM815) | 4.0e-15 |

Εικόνα 18: Αποτελέσματα από την εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας στην πλατφόρμα HMMER για την εύρεση της φυλογενετικής ομοιότητας με άλλους μικροοργανισμούς

Αφού λήφθηκε μια εικόνα σχετικά με την κατηγορία των πρωτεϊνών με την οποία εμφανίζει ομοιότητες το υπο εξέταση ένζυμο, η αμινοξική αλληλουχία εισήχθη στην πλατφόρμα υπολογισμού πρωτεϊνικών παραμέτρων ProtParam ExPASy. Από εκεί λήφθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Number of amino acids: 453

Molecular weight: 46227.8

Theoretical pI: 5.22

Amino acid composition:

CSV format

| | | |
|---------|----|-------|
| Ala (A) | 60 | 13.2% |
| Arg (R) | 4 | 0.9% |
| Asn (N) | 31 | 6.8% |
| Asp (D) | 11 | 2.4% |
| Cys (C) | 7 | 1.5% |
| Gln (Q) | 31 | 6.8% |
| Glu (E) | 4 | 0.9% |
| Gly (G) | 47 | 10.4% |
| His (H) | 2 | 0.4% |
| Ile (I) | 13 | 2.9% |
| Leu (L) | 40 | 8.8% |
| Lys (K) | 8 | 1.8% |
| Met (M) | 7 | 1.5% |
| Phe (F) | 18 | 4.0% |
| Pro (P) | 32 | 7.1% |
| Ser (S) | 38 | 8.4% |
| Thr (T) | 50 | 11.0% |
| Trp (W) | 5 | 1.1% |
| Tyr (Y) | 14 | 3.1% |
| Val (V) | 31 | 6.8% |
| Pyl (O) | 0 | 0.0% |
| Sec (U) | 0 | 0.0% |
| (B) | 0 | 0.0% |
| (Z) | 0 | 0.0% |
| (X) | 0 | 0.0% |

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 15

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 12

Εικόνα 19: Αποτελέσματα από την εύρεση διαφορών ενζυμικών παραμέτρων μέσω του προγράμματος ProtParam ExPASy

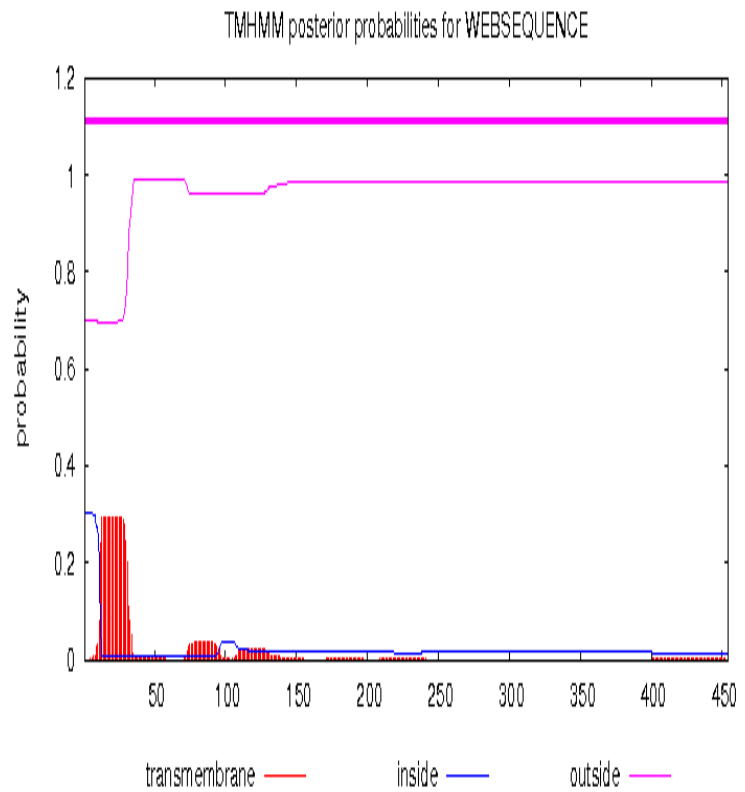
Προβλέπεται, λοιπόν, ότι η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 47,2kDa (46,2 kDa πριν την προσθήκη της εξαιστιδίνης) και ισοηλεκτρικό σημείο pI ίσο με 5,22. Εκτός των άλλων δίνονται πληροφορίες και για το ποσοστό του κάθε αμινοξέος στην πρωτεΐνη.

Τέλος, μέσω της πλατφόρμας TMHMM λαμβάνονται πληροφορίες για την ύπαρξη διαμεμβρανικών περιοχών στο υπο εξέταση ένζυμο. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω:

```

# WEBSEQUENCE Length: 454
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 7.44029
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 6.07859
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.30178
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 454

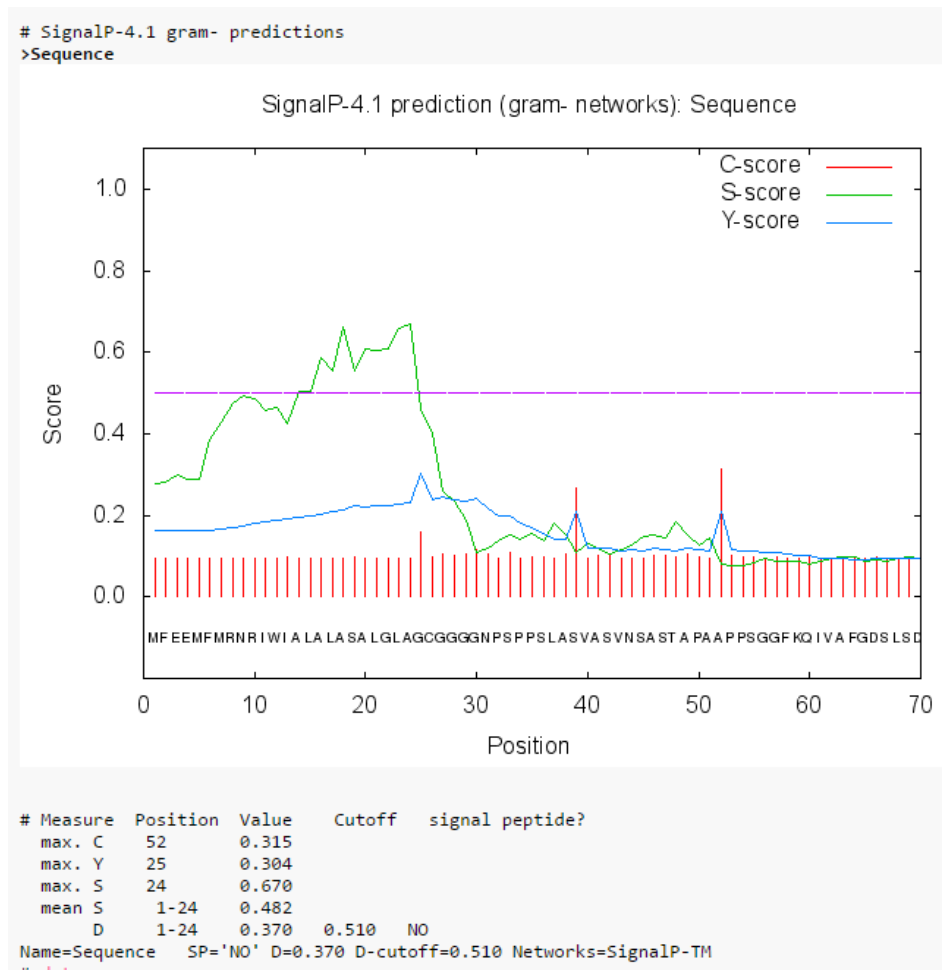
```



ppmtogif: computing colormap... ppmtogif: 5 colors found

Εικόνα 20: Έλεγχος για την ύπαρξη διαμεμβρανικής έλικας στην αμινοξική αλληλουχία μέσω της πλατφόρμας TMHMM.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μέσω της παραπάνω πλατφόρμας, έδειξαν ότι υπάρχει 30% πιθανότητα να υπάρχει μια διαμεμβρανική περιοχή. Η παρουσία αυτής συνεπάγεται ότι ολόκληρη η πρωτεΐνη θα βρίσκεται στο εξωκυτταρικό χώρο. Η διαμεμβρανική έλικα στον αρχικό οργανισμό προέλευσης στοχεύει στην διατήρηση της πρωτεΐνης πάνω στη μεμβράνη. Βέβαια, στην περίπτωση αυτή η πιθανότητα είναι μικρή.



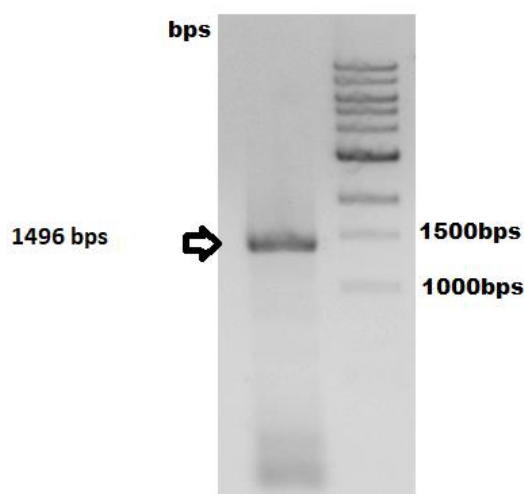
Εικόνα 21: Έλεγχος για την ύπαρξη πεπτιδίου οδηγού στην αμινοξική αλληλουχία μέσω του προγράμματος Signal P.

Ωστόσο, κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί αν η πρωτεΐνη περιέχει κάποιο πεπτίδιο οδηγό (signal sequence). Αυτός ήταν και ο λόγος που η αμινοξική αλληλουχία εισήχθη στην πλατφόρμα signal P. Πράγματι, φαίνεται ότι η εξεταζόμενη πρωτεΐνη περιέχει πεπτίδιο οδηγό στο αμινοτελικό άκρο της που εκτείνεται από το 1^ο μέχρι και το 32^ο αμινοξύ. Αυτή η αλληλουχία χρησιμεύει πιθανότατα στην έκκριση του ενζύμου στον εξωτερικό χώρο του κυττάρου ώστε να συναντήσει το υπόστρωμα (Camarero et al., 2007). Συγκεκριμένα, η αλληλουχία με πεπτίδιο οδηγό στο αμινοτελικό άκρο που βρίσκεται στις περισσότερες πρωτεΐνες που έχουν την τάση να εκκρίνονται, χρησιμεύει για να ξεκινήσει η εξαγωγή μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (στους προκαρυώτες) ή του ενδοπλασματικού δικτύου (στους ευκαρυώτες)(Biophysics & Physics, 1986)

3.1.2 Απομόνωση, κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου EstDZ4

Το γονιδιωματικό δείγμα που λήφθηκε επεξεργάστηκε και απομονώθηκε το επιθυμητό γονίδιο μέσω της διαδικασίας PCR . Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ' Q5 High –Fidelity DNA Polymerase' Το αποτέλεσμα ελέγχθηκε με

ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η εικόνα που ακολουθεί αποδεικνύει ότι υπάρχει μια ξεκάθαρη ζώνη στο ύψος που αναμέναμε που αντιστοιχεί στο μέγεθος της αλληλουχίας DNA του γονιδίου *estDZ4*.



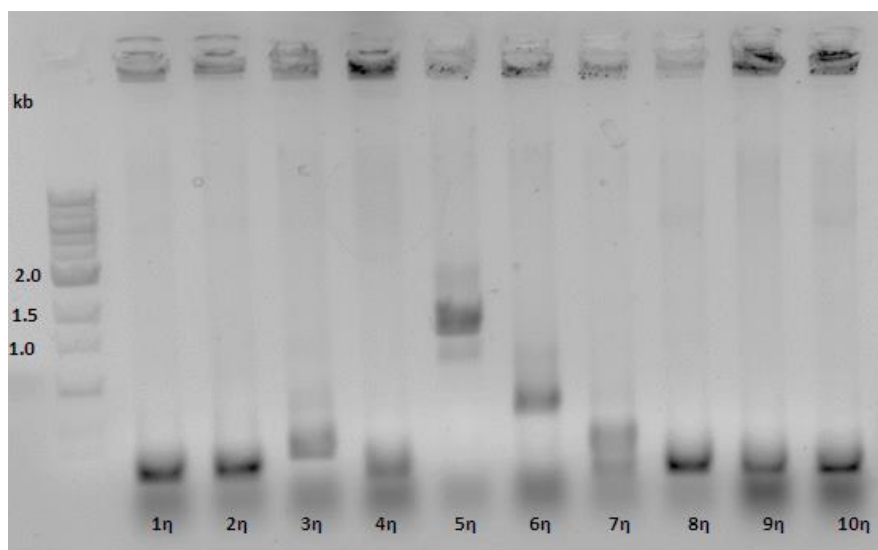
Εικόνα 22: Η απεικόνιση της *estDZ4* σε πηκτή αγαρόζης. Η μπάνα που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου *estDZ4* είναι στο αναμενόμενο ύψος μεταξύ 1500 και 1000 bps.

Η επιβεβαίωση για την ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου στο δείγμα PCR που αξιοποιήθηκε στην γέλη οδήγησε στο επόμενο βήμα που ήταν ο καθαρισμός του υπόλοιπου προϊόντος που είχε προκύψει από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pET-28a (+) χρησιμοποιώντας ως περιοριστικά ένζυμα XbaI και XhoI και ρυθμιστικό διάλυμα 2.1, σύμφωνα με το πρωτόκολλο New England Biolabs. Σκοπός της πέψης είναι η δημιουργία συμβατών άκρων ώστε να είναι εφικτή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στο πλασμίδιο. Το μείγμα έμεινε στους 37° C για 2h. Με την πάροδο της πέψης προέκυψε ένα διάλυμα αποτελούμενο από το πλασμίδιο και την κομμένη αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή θεωρήθηκε αναγκαίο να απομακρυνθεί καθώς η παρουσία της στο διάλυμα θα δημιουργούσε πρόβλημα στην εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στο πλασμίδιο μας, θα δρούσε ανταγωνιστικά σε σχέση με το γονίδιο-στόχο και συνεπώς θα μείωνε την απόδοση της επιθυμητής αντίδρασης. Συνεπώς, η απομάκρυνση της αλληλουχίας αυτής έγινε με το πρωτόκολλο 'plasmid DNA purification (Macharey-Nagal GmbH & C0.KG)'.

Την διαδικασία της απομάκρυνσης της κομμένης αλληλουχίας ακολούθησε η διαδικασία της συνένωσης με αντίδραση λιγάσης. Βάσει των αναλογιών που καθορίζονται από το πρωτόκολλο της συνένωσης γονιδίων με αντίδραση λιγάσης βρέθηκαν οι απαιτούμενοι όγκοι των προς ανάμειξη ουσιών. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 16° C για 16h. Τα διαλύματα που είχαν υποστεί αντίδραση συνένωσης με λιγάση αναμίχθηκαν με κύτταρα BL21 που είχαν υποστεί προεργασία για να γίνουν χημικώς επιδεκτικά έτσι προέκυψαν τα κύτταρα BL21(DE3). Αυτά ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80° C. Πραγματοποιήθηκαν 6 αντιδράσεις για κάθε δείγμα λιγάσης που είχε παρασκευαστεί την προηγούμενη ημέρα (1:1, 1:1c, 1:3

,1:3c ,3:1 , 3:1c) . Σε κάθε μια αντίδραση προστέθηκαν 80 μ L κύτταρα BL21(DE3) και 20 μ L από το εκάστοτε δείγμα της λιγάζης. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροδιάτρηση με τη βοήθεια κυψελίδων ηλεκτροδιάτρησης. Την ηλεκτροδιάτρηση ακολούθησε ανάδευση για 1h στους 37° C, αφού είχε προστεθεί 0,5 mL LB. Τα κύτταρα ύστερα από την ανάδευση επώαστηκαν σε τρυβλία και αφέθηκαν για 16h στους 37° C. Από το τρυβλίο που είχε τις περισσότερες αποικίες σε σύγκριση με το αντίστοιχο «τυφλό» επιλέχθηκαν 10 αποικίες. Αυτές εμβολιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια (5 mL LB, 50 μ g/mL kan50) και αφέθηκαν στους 37° C υπο ανάδευση ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε δείγμα των καλλιέργειων και πραγματοποιήθηκε διαγνωστική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης (diagnostic PCR). Το προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση υπέστη ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης για να ελεγχθεί ποιες από τις 10 αποικίες που επιλέχθηκαν περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Το αποτέλεσμα είναι εκείνο που απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 23: Αποτελέσματα από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 10 διαφορετικών αποικιών αφού έχει προηγηθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Στην οριζόντια σειρά κάθε δείγμα έχει ονομαστεί με τον αριθμό της αποικίας από την οποία προήλθε. Η 5^η αποικία εμφανίζει μπάντα στο αναμενόμενο ύψος της γέλης αγαρόζης και είναι αυτή που έχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Η αποικία που περιέχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδίου ακολουθώντας το πρωτόκολλο της διαγνωστικής αντιδράσης PCR. Από το δείγμα που προέκυψε λήφθηκαν 800 μ L που αναμίχθηκαν με 1000 μ L αποστειρωμένης γλυκερόλης 50% v/v και αποθηκεύτηκαν στους -80° C . Η ιδιότητα της γλυκερόλης να προστατεύει τις μεμβράνες του κυττάρου από τους κρύσταλλους του πάγου που δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες ήταν και ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε στην ανάμειξη πριν την αποθήκευση. Τέλος, για επιβεβαίωση προετοιμάστηκε ακόμα μια ηλεκτροφόρηση σε πήκτη για να διαβεβαιωθεί αν το άδειο πλασμίδιο pET-28a(+) (1500kb) θα εμφανιστεί πιο πάνω στην πήκτη από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET28a(+)-EstDZ4 (6000kb). Τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα.

Για την υπερέκφραση του επιθυμητού γονιδίου, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη σε κύτταρα έκφρασης Origami2(DE3). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιείχε το επιθυμητό γονίδιο σε όγκο 10 μ L αναμίχθηκε με όγκο κυττάρων 100 μ L. Το μείγμα υπέστη θερμικό σοκ (10 min στους 0°C , 50 sec στους

40°C, 2 min στους 0°C) και έπειτα αναμίχθηκε με 500 µL LB και αφέθηκε υπο ανάδευση για 1 h στους 37° C. Με το πέρας της μιας ώρας το διάλυμα απλώθηκε υπο στείρες συνθήκες σε τρυβλίο που περιείχε αντιβιοτικό κανομικίνης 50µg/mL (kan50). Ύστερα από 16 ώρες ελέγχθηκε για τις προκύπτουσες αποικίες. Ωστόσο, δεν είχε αναπτυχθεί καμία αποικία. Η διαδικασία του θερμικού σοκ επαναλήφθηκε αρκετές φορές αλλάζοντας σε κάθε περίπτωση κάποια από τις συνθήκες για να προσδιοριστεί η αιτία που οδηγούσε στην μη ανάπτυξη αποικιών. Έτσι, έγινε δοκιμασία με νεότερα τρυβλία κανομικίνης, νέο υγρό θρεπτικό υλικό σε σύγκριση πάντα με τα αρχικώς χρησιμοποιούμενα, μεγαλύτερος όγκος κυττάρων κ.α. Τα αποτελέσματα, όμως, πάλι δεν ήταν τα επιθυμητά. Οι ανεπιτυχείς προσπάθειες εισαγωγής του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα κύτταρα Origami2(DE3) οδήγησαν στην ανάγκη ελέγχου της δυνατότητας εισαγωγής του πλασμιδίου αυτού σε άλλου είδους κύτταρα.

Πράγματι, η δοκιμασία έγινε με κύτταρα DH5a και Origami2(DE3), παράλληλα με την διαδικασία του θερμικού σοκ στους αρχικούς όγκους και για τις δυο καλλιέργειες. Τα δυο τρυβλία έπειτα από επώαση για 16 h είχαν διαφορετική εικόνα. Συγκεκριμένα, στο τρυβλίο με τα κύτταρα DH5a υπήρχαν ξεκάθαρες αποικίες, γεγονός που ερμηνεύεται με τον επιτυχή μετασχηματισμό των κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στα κύτταρα σε αντίθεση με το τρυβλίο με τα κύτταρα Origami2(DE3) όπου δεν αναπτύχθηκαν αποικίες.

Το αποτέλεσμα αυτό δημιούργησε την υποψία για παραγωγή τοξικής πρωτεΐνης και αυτό γιατί στα μεν DH5a κύτταρα στα οποία δε γίνεται πρωτεϊνοσύνθεση της πρωτεΐνης στόχου υπήρχαν ξεκάθαρες αποικίες ενώ στα κύτταρα Origami2(DE3) που αποτελούν κύτταρα έκφρασης δεν υπήρχαν αποικίες.

Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν άλλα κύτταρα με ενσωματωμένο πλασμίδιο (BL21- plyss) και σ αυτά να γίνει προσπάθεια μετασχηματισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε για άλλη μια φορά θερμικό σοκ σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα από τη προσθήκη LB και την ανάδευση για μία ώρα στους 37° C το μείγμα απλώθηκε υπο στείρες συνθήκες σε τρυβλίο που περιείχε δύο αντιβιοτικά αυτή τη φορά (κανομικίνη 50µg/ mL στη οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο pET28a(+)) και χλωροφενικόλη Cm40 40µg/mL στην οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο plyss). Το τρυβλίο επώαστηκε για 16 h για την ανάπτυξη των αποικιών.

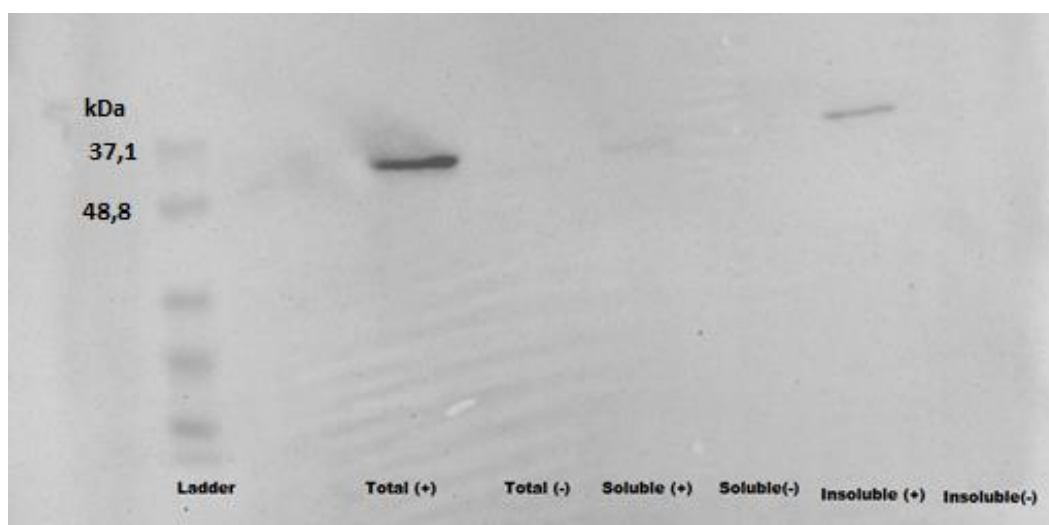
Στη συνέχεια επιλέχθηκε μια απομονώμενη αποικία και εμβολιάστηκε σε 5 mL υγρού θρεπτικού υλικού που περιείχε 50 µg/mL κανομικίνης και η ίδια συγκέντρωση χλωροφενικόλη (Cm40). Η υγρή καλλιέργεια επώαστηκε για 22 h στους 37°C. Με το πέρας των 22 ωρών, λήφθηκαν 50 µL και αναμείχθηκαν με 5 mL LB, 50 µg/mL και 40 µg/mL χλωραμφελικόλης. Αυτό πραγματοποιήθηκε δυο φορές για δυο υγρές καλλιέργειες που επώαστηκαν υπο ήπια ανάδευση στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει στο 0,4-0,5 στα 600nm. Αυτό διήρκεσε περίπου 3h και 10 min. Αργότερα, στη μια από τις δυο υγρές καλλιέργειες προστέθηκε 0,2mM IPTG για υπερέκφραση και στη συνέχεια πάλι υπο ήπια ανάδευση στους 37° C. Για να γίνει κανονικοποίηση των κυττάρων και στις δυο καλλιέργειες, προστέθηκε τόσος όγκος και από τις δυο καλλιέργειες ώστε τα δυο τελικά δείγματα να έχουν και τα δυο τρεις βαθμούς οπτική πυκνότητας (3 OD).

Τα δείγματα αυτά φυγοκεντρίθηκαν στα 6000g για 1 min και απορρίφθηκε το υπερκείμενο ενώ το κυτταρικό ίζημα διαλύθηκε σε 300 µL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Το επόμενο βήμα δεν ήταν άλλο από την διάνοιξη των κυτταρικών μεμβρανών

με χρήση υπερήχων. Η διαδικασία της διάνοιξης πραγματοποιήθηκε σε μεσαία ένταση για 10sec, και επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Το στάδιο της διάνοιξης διαδέχθηκε το στάδιο της συλλογής 100μL όγκου και από τα δυο αρχικά δείγματα (total) και στη συνέχεια η εκ νέου φυγοκέντριση του υπόλοιπου τμήματος στα 12.000g για 15min. Ύστερα από την φυγοκέντριση λήφθηκαν 100 μL από το υπερκείμενο (soluble) από κάθε δείγμα ενώ το κυτταρικό διάλυμα σε κάθε περίπτωση επαναδιαλύθηκε με 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (insoluble). Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των δειγμάτων ως προς την διαλυτότητα της πρωτεΐνης σχετίζεται με το πρωτόκολλο καθαρισμού το οποίο θα ακολουθηθεί. Τελικά ,τα δείγματα που θα οδηγηθούν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και στη συνέχεια στην μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) ήταν :

- Total (ολικό, + IPTG)
- Total (ολικό, - IPTG)
- Soluble (Υπερκείμενο +IPTG)
- Soluble (Υπερκείμενο -IPTG)
- Insoluble (Κυτταρικό υπόλειμα+IPTG)
- Insoluble (Κυτταρικό υπόλειμα -IPTG)



Εικόνα 24: Αποτελέσματα ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και επεξεργασίας του τζελ με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 23 η πρωτεΐνη παράγεται στο μέγεθος που αναμέναμε (μεταξύ 37.1-48.8 kDa Mr=47,2kDa που αποτελεί το προβλεπόμενο μοριακό βάρος) και επίσης μόνο στα δείγματα (+) που είχε προστεθεί ο επαγωγέας IPTG, δηλαδή σε εκείνα τα δείγματα που παράγουν την επιθυμητή πρωτεΐνη σε αντίθεση με τα που φέρουν κενό πλασμίδιο (-). Μια ακόμη παρατήρηση είναι ότι η πρωτεΐνη εμφανίζεται ξεκάθαρα στο ολικό δείγμα και μικρότερο δείγμα εμφανίζεται στο αδιάλυτο κομμάτι ενώ μια ακόμα πιο αχνή ζώνη εμφανίζεται στο διαλυτό κομμάτι, που σημαίνει ότι παράγεται σε μορφή αδιάλυτων συσσωμάτων. Μια πιθανή αιτία για την εμφάνιση της πρωτεΐνης στο κυτταρικό υπόλειμα θα μπορούσε να θεωρηθεί η

λανθασμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια η δημιουργία έγκλειστων μορίων με καμία βιολογική δράση.

Δεν θα προβούμε , ωστόσο, απευθείας στον καθαρισμό της πρωτεΐνης μας αλλά θα γίνει προσπάθεια ενσωμάτωσης του πλασμιδίου στα κύτταρα έκφρασης Origami2(DE3) που όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω ευνοούν τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών προσδίδοντας έτσι στην τελική τριτοταγή δομή την μέγιστη σταθερότητα που είναι και το επιθυμητό, και εν συνεχεία αν είναι εφικτή η απομόνωση της πρωτεΐνης από το κυτταρικό κυτταρόπλασμα.

Αν και έγιναν προσπάθειες για δημιουργία Origami2(DE3) κυττάρων με ενσωματωμένο το πλασμίδιο plyss και στη συνέχεια ενσωμάτωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET28-EstDZ4 σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω για τα κύτταρα BL21(DE3), οι αποκίες δεν αναπτύχθηκαν. Επιχειρήθηκε, ακολούθως, η δημιουργία ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων Origami2(DE3). Σε τρυβλίο με ήδη ανεπτυγμένες αποικίες κυττάρων Origami2(DE3) με ενσωματωμένο το πλασμίδιο plyss, επιλέχθηκε μια και εμβολιάστηκε υγρή καλλιέργεια (5 mL LB, 40μg/mL Cm40 και η αποικία). Έπειτα εφαρμόστηκαν τα βήματα του πρωτοκόλλου για την δημιουργία ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων (e.c. Origami2(DE3) plyss). Στα κύτταρα αυτά επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET28a (+)-EstDZ4. Το εγχείρημα αυτό δεν στέφθηκε με επιτυχία.

3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση του γονιδίου EstDZ4, καθαρισμός και χαρακτηρισμός της προκύπτουσας εστεράσης

3. 2.1 Κλωνοποίηση και Ετερόλογη έκφραση της EstDZ4

Ύστερα από μια σειρά ανεπιτυχών προσπαθειών να γίνει μετασχηματισμός Origami2DE3 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET28a (+)-EstDZ4 αποφασίστηκε να γίνει επιλογή και έλεγχος άλλου πλασμιδιακού φορέα. Όπως παρατηρήθηκε, νωρίτερα, ακόμα και αν παράγεται ενεργή πρωτεΐνη δεν παράγεται κατά πλειοψηφία στο υδατοδιαλυτό κομμάτι του κυττάρου, και κατ'έκταση παραμένει κατά μεγάλο ποσοστό προσδεδεμένη στο κυτταρικό υπόλλειμα. Όπως, αναφέρθηκε και νωρίτερα μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης έγινε γνωστό ότι το ένζυμο περιλαμβάνει πεπτιδίο οδηγό. Ο ρόλος αυτού του πεπτιδίου δεν είναι βέβαιο ότι συμβάλει στην έκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα και κατ'έκταση στον ξενιστή. Θεωρήθηκε, λοιπόν, αναγκαίο να ελεγχθεί κατά πόσο η αφαίρεση του πεπτιδίου αυτού θα επηρεάσει την έκφραση του επιθυμητού ενζύμου και την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης όχι ,πλέον, στο κυτταρικό υπόλλειμα αλλά στο υπερκείμενο. Η απόφαση αυτή οδήγησε στην ανάγκη για μια εκ νέου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το νέο πλασμίδιο που θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας έκφρασης επιλέχθηκε να είναι το pASK75 που έχει θέσεις διάνοιξης από τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και XhoI. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν νέοι εκκινητές. Ο ένας από τους δυο σχεδιαστηκε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι συμπληρωματικός στο κομμάτι της αλληλουχίας που ακολουθεί μετά την αλληλουχία SS (signal sequence). Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα η εν λόγω αλληλουχία υποβοηθά την έκκριση της πρωτεΐνης στο εξωτερικό του κυττάρου. Αυτό όμως έχει λογική στον ίδιο τον οργανισμό και όχι στην περίπτωσή μας όπου η πρωτεΐνη εκφράζεται σε ετερόλογο οργανισμό. Έτσι πιθανότητα αυτή η ακολουθία να δημιουργεί πρόβλημα στην έκφραση της πρωτεΐνης και ο μικροοργανισμός *E. Coli* που χρησιμοποιείται ως ξενιστής να επιδιώκει είτε την απομάκρυνση είτε την αποικοδόμησή του. Για το λόγο αυτό , λοιπόν, αποφασίστηκε να πάρουμε και τις δυο περιπτώσεις, και αυτή στην οποία δεν έχει αφαιρεθεί το πεπτιδίο οδηγός αλλά και εκείνη στην οποία έχει αφαιρεθεί. Συνεπώς, χρειάστηκαν και διαφορετικοί εμπρόσθιοι εκκινητές για κάθε μια από τις δυο περιπτώσεις. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Forward primer EstDZ4 Δss

XbaI

(5' –

AAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGTCCGTGGCGAGTGTGAATTCGGCC-
3')

Forward primer EstDZ4

XbaI (5'-

pAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGTTTGAGGAGATGTTTCATGCGG -3')

Reversed primer His

XhoI (5'-

AAAAAAActcgagTTAgtgggtggtggtggtggtggtggtggtgTTGCGAAATCCAGCCAAAACCC-
3')

Στις παραπάνω αλληλουχίες τα τμήματα που είναι υπογραμμισμένα αποτελούν τις αλληλουχίες περιορισμού ενώ η διπλή υπογράμμιση σηματοδοτεί την αλληλουχία που κωδικοποιεί το επίτοπο της εξαισιτιδίνης.

Ακολούθησε πρωτόκολλο (Taq polymerase). Το ένα δείγμα περιείχε τον forward primer EstDZ4 Δss ως εμπρόσθιο εκκινητή και τον reversed primer EstDZ4 His ως ανάστροφο εκκινητή και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης γι αυτό το δείγμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 72° C. Το δεύτερο δείγμα περιείχε τον forward primer EstDZ4 και τον reversed primer EstDZ4 His ως εμπρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή αντίστοιχα και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης γι αυτό το δείγμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 71° C. Οι τελικοί όγκοι και στα δύο δείγματα ήταν τα 100 μL. Στη συνέχεια, η επιτυχής αντίδραση ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά την ηλεκτροφόρηση καθαρίστηκαν βάσει πρωτοκόλλου. Στην συνέχεια, κατέστη αναγκαία η ενσωμάτωση του γονιδίου στο νέο πλέον πλασμιδίο, pASK75 μέσω της πέψης DNA. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πέψη ήταν τα XbaI και XhoI αποσκοπώντας στην δημιουργία συμβατών άκρων. Η πέψη διήρκεσε για 2h στους 37° C. Αφαιρέθηκε όπως και στην προηγούμενη πέψη η κομμένη αλληλουχία του πλασμιδίου και στα δείγματα μετά την πέψη πραγματοποιήθηκε και πάλι ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Και σ' αυτή την περίπτωση προέκυψαν οι αναμενόμενες ζώνες οι οποίες και κόπηκαν με ξυράφι στα σημεία όπου βρίσκονταν και τα δυο δείγματα από πηκτή επαναδιαλύθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 43° C.

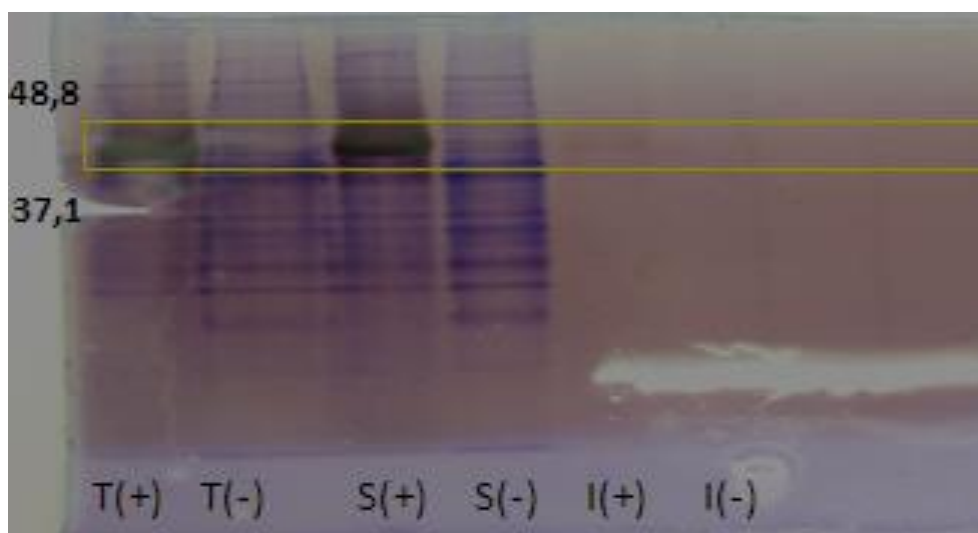
Την διαδικασία της πέψης, ακολούθησε η διαδικασία της συνένωσης με αντίδρασης λιγάσης. Και σ' αυτή την περίπτωση όλα ακολούθησαν βάσει πρωτοκόλλου και για τα δυο δείγματα (SS και ΔSS). Τα διαλύματα των δυο δειγμάτων ύστερα από την διαδικασία συνένωσης με αντίδραση λιγάσης αφέθηκαν για 1h στους 37° C και εν συνεχεία ακολούθησε θερμικό σοκ και ενσωμάτωση σε κύτταρα Mc1061 μέσω ηλεκτροδιάτρησης, ανάδευση για 1h στους 37°C και προσθήκη 500μL υγρού θρεπτικού υλικού και επώαση σε τρυβλία.

Από τα τρυβλία οι περισσότερες αποικίες σε συγκριτικά με τα τρυβλία που περιείχαν την αντίστοιχη τυφλή αντίδραση βρέθηκαν στις αναλογίες 1:3 και 3:1 στα δείγματα ΔSS μόνο. Από αυτές επιλέχθηκαν τρεις αποικίες από κάθε τρυβλίο και εμβολιάστηκαν υγρές αποικίες (5 mL LB και 100μg/mL του νέου αντιβιοτικού (Amp), στο οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο μας. Ακολούθως, οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37° C ύπο ήπια ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει στο 0,4-0,5 στα 600 nm. Παράλληλα, δείγμα των καλλιεργειών αποτέλεσε DNA εκμαγείο για διαγνωστική αντίδραση πολυμεράσης. Τα προκύπτοντα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης για να εντοπιστούν οι κλώνοι που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα της πηκτής ενέδειξαν τις αποικίες με το επιθυμητό πλασμίδιο. Από αυτές επιλέχθηκε μια και ακολούθησε το πρωτόκολλο για καθαρισμό (minipreps). Από τα προϊόντα του καθαρισμού λήφθηκαν 2μL που αναμίχθηκαν με 100 μLκυττάρων Origami2(DE3). Ακολούθησε και πάλι θερμικό σοκ, προσθήκη υγρού θρεπτικού υλικού, ήπια ανάδευση για μία ώρα και τελικά επώαση σε τρυβλία με αντιβιοτικό αμπικιλίνης 50μg/mL.

Αναπτύχθηκαν αυτή τη φορά κάποιες μικρές αποικίες από τις οποίες επιλέχθηκαν δυο και εμβολιάστηκαν σε υγρές αποικίες που επωάστηκαν στους 37° C υπο ήπια ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει το 0,4-0,5 OD στα 600 nm. Απαιτούνται περίπου 5h. Ακολούθως, προστέθηκε επαγωγέας ATc συγκέντρωσης 0,2μg/mL , και επώαση για 16 h. Στα δείγματα, έπειτα, έγινε αραιώση και κανονικοποίηση για την εξασφάλιση ότι κάθε δείγμα έχει δυο βαθμούς οπτικής πυκνότητας, ώστε να ελέγχεται ακριβώς ίση ποσότητα κυττάρων ελέγχου και από τις δυο καλλιέργειες. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε παραγωγή σε μικρού όγκου καλλιέργεια τελικού όγκου 5mL. Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στα 6000 g για 1 min με απόρριψη του υπερκείμενου και έπειτα επαναδιάλυση των υπολλειμάτων με 300 μl PBS ρυθμιστικού διαλύματος. Την επαναδιάλυση διαδέχθηκε η διάνοιξη των κυτταρικών μεμβρανών σε ειδικό μηχάνημα στη μέτρια ένταση για 3 επαναλήψεις των 10sec. Η υπερθέρμανση αποφεύγεται για λόγους που έχουν προαναφερθεί. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν 100 μL για το ολικό (total) δείγμα. Το υπόλοιπο φυγοκεντρίθηκε στα 12000 g για 15 min. 100 μL από το υπερκείμενο συλλέχθηκαν για το υπερκείμενο (soluble δείγμα). Τέλος, το κυτταρικό διάλυμα επαναδιαλύθηκε σε 100 μL PBS και αποτέλεσε το κυτταρικό υπόλλειμα (insoluble δείγμα).

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζυμογράφημα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω.

Όπως είναι εμφανές , προκύπτει μια ξεκάθαρη ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης-στόχου της οποία το μοριακό βάρος είναι 47,2 kDa η οποία και περιέχεται σχεδόν στο διαλυτό κλάσμα. Αυτό αποτελεί και την επιδιωκόμενη συνθήκη για τον ευκολότερο και πιο επιτυχημένο καθαρισμό του ενζύμου, χρησιμοποιώντας ως μέθοδο απομόνωσης τη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, όπως θα δούμε παρακάτω.



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου της EstDZ4. Τα δείγματα που έχουν το σύμβολο (+) είναι δείγματα του εσωκυτταρικού υλικού που περιέχουν πλασμίδιο με το γονίδιο για την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου. Τα δείγματα με σύμβολο (-) είναι δείγματα του εσωκυτταρικού υλικού με κενό πλασμίδιο

Φαίνεται, λοιπόν, πως η αφαίρεση του πεπτιδίου οδηγού συντέλεσε στην αποτελεσματική παραγωγή του ενζύμου στα επιθυμητά κύτταρα αλλά και στην αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα των βακτηρίων και όχι στο κυτταρικό υπόλειμμα. Ύστερα από τον επιτυχή καθαρισμό της καλλιέργειας μικρού όγκου είναι πλέον εφικτό να διεξαχθεί απομόνωση του ενζύμου από μεγάλο όγκο καλλιέργειας.

3.2.2 Παραγωγή και Καθαρισμός της EstDZ4

Πρίν ξεκινήσει η απομόνωση του ενζύμου από μεγάλο όγκο καλλιέργειας πραγματοποιείται αρχικά ένας δοκιμαστικός καθαρισμός προς αποφυγή λαθών, αποσκοπώντας σε καλύτερη εξοικείωσης με τα στάδια της διαδικασίας για παραγωγή υψηλής καθαρότητας ενζύμου.

Από κύτταρα Origami2(DE3) pASK75- EstDZ4 που βρίσκονταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80°C με λεπτό ρύγχος που είχε περάσει πριν από αιθανόλη και είχε καεί για να εξασφαλιστούν οι στείρες συνθήκες ακουμπάμε στην επιφάνεια των κυττάρων και στη συνέχεια σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Το τρυβλίο μένει στους 37°C για 16-20 ώρες μέχρι να αναπτυχθούν αποικίες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος εμβολιάστηκε αποικία σε 5 mL υγρού θρεπτικού υλικού στο οποίο έχουν προστεθεί 100μg/mL αμπικιλίνης. Η υγρή καλλιέργεια αφήνεται να επωαστεί για 16 h υπο ήπια ανάδευση στους 37°C . Στη συνέχεια, 50 mL από την καλλιέργεια αυτή εμβολιάστηκαν σε νέο θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό. Η νέα καλλιέργεια παρέμεινε στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει μεταξύ 0,4 και 0,5 (στα 600 nm), μετά περίπου από 6,5h. Ακολούθως, προστέθηκαν 0,2μg/mL επαγωγέα ανυδροτετρακυκλίνης (ATc) και ξεκίνησε η πρωτεϊνοσύνθεση. Σε αυτή τη φάση η καλλιέργεια επωάζεται στους 25°C για 16h. Ο λόγος που επιλέχθηκε χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης από ότι συνήθως είναι ότι στη φάση αυτή επιδιώκεται η ηπιότερη παραγωγή πρωτεΐνης ώστε να επιτευχθεί καλύτερης ποιότητας ένζυμο. Μια υψηλότερη θερμοκρασία ενδεχομένως θα επιβάρυνε μεταβολικά το κύτταρο και ίσως αυτό κόστιζε στο τελικό αποτέλεσμα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

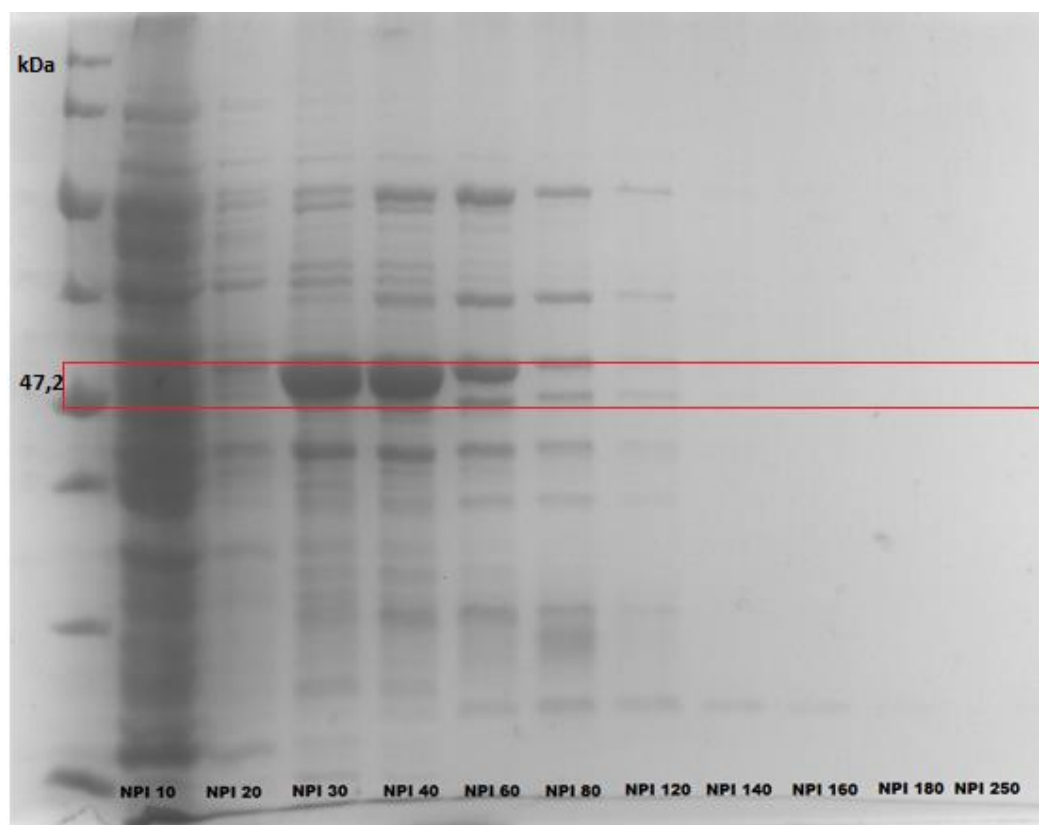
Ύστερα από το πέρας των 16 h η καλλιέργεια διαχωρίστηκε σε 4 δοχεία (erpendrfs) των 1500 mL, ενώ ο αρχικός της όγκος ήταν 5 mL. Το περιεχόμενο κάθε δοχείου φυγοκεντρείται στα 6000g για 1min και έπειτα γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επαναδιάλυση με 300 mL NP1-10 των κυτταρικών υπολειμάτων. Την επαναδιάλυση ακολούθησε θραύση των κυττάρων 3 φορές για 10 sec στη μεσαία ένταση. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντριση στη μέγιστη ταχύτητα για 15 sec. Συλλέγεται το υπερκείμενο.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στον καθαρισμό της πρωτεΐνης ήταν χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η πρωτεΐνη που θα καθαριστεί περιέχει μια αλληλουχία 6 ιστιδινών. Η ύπαρξη των ιστιδινών έχει ως συνέπεια την πρόσδεση τους σε ιόντα νικελίου. Ύστερα από αυτή την συνένωση δημιουργείται ένα σύμπλοκο, το οποίο και ακινητοποιείται στο φίλτρο στήλης πολυπροπυλενίου. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο συγκρατεί τη πρωτεΐνη πάνω στα σωματίδια ριτίνης. Έκτος από τη στήλη πολυπροπενίου που προαναφέρθηκε, για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν και διαλύματα ιμιδαζόλης διαφόρων συγκεντρώσεων. Η ιμιδαζόλη στα διάφορα διαλύματα ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες που περιέχει η πρωτεΐνη ως προς την πρόσδεση στα ιόντα νικελίου. Συνεπώς, η στήλη δέχθηκε 5mL NP1-10 εισάχθηκε το φίλτρο και ξεπλήθηκε. Από την στήλη, έπειτα διέρχεται το δείγμα στο

όποιο έχουν προστεθεί 500 μl beats Ni και στη συνέχεια μια σειρά διαλυμάτων ιμιδαζόλης.(NPI-10,20,30,40,60,80,120,140,160,180, 250) .

Ύστερα από κάθε έκλυση συλλέχθηκε το προϊόν της εκάστοτε πλύσης και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για να εξακριβωθεί τότε γίνεται η έκλυση της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν είναι ενδεικτικά τόσο για την καθαρότητα της πρωτεΐνης ύστερα από τον καθαρισμό όσο και για το ποσοστό απομάκρυνσης της σε κάθε πλύση. Σύμφωνα με την εικόνα της πηκτής που απεικονίζεται παρακάτω φαίνεται ότι στις εκλύσεις με διάλυμα συγκέντρωσης μέχρι και 40 mM έχει απομακρυνθεί όλη σχεδόν η ποσότητα της πρωτεΐνης. Η μπάνα της πρωτεΐνης εμφανίζεται έντονη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος και όσο διαπερνούν από τη στήλη διαλύματα υψηλότερων συγκεντρώσεων τόσο πιο αχνή γίνεται η μπάνα της πρωτεΐνης, μέχρι που εξαφανίζεται εντελώς. Αυτό μας οδηγεί στο να επιλέξουμε τα διαλύματα NPI-20 Και NPI-30 και για την έκλυση το NPI-250, που διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωση της ιμιδαζόλης στο κάθε διάλυμα με το πρώτο να έχει συγκέντρωση ιμιδαζόλης 20mM το άλλο 30 mM και το τελευταίο 250 mM.



Εικόνα 26: Προϊόντα καθαρισμού του ενζύμου EstDZ4 δειγμάτων κλιμακούμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζόλης όπως προκύπτουν με ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)

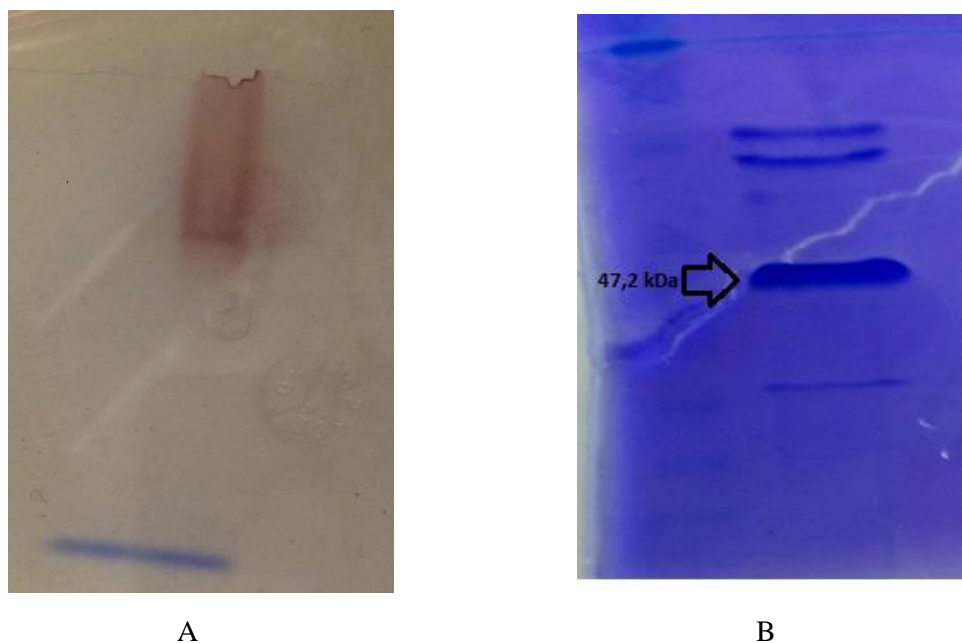
Η διαδικασία του καθαρισμού, επαναλήφθηκε για μεγάλου όγκου καλλιέργεια . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν παραπλήσια με εκείνη για την μικρού όγκου καλλιέργεια. Οι διαφοροποιήσεις σχετίζονται με τις ποσότητες όσο και με την διαδικασία καθαρισμού πριν την εισαγωγή στην στήλη. Ετοιμάστηκαν δυο μεγάλες υγρές καλλιέργειες των 500 mL με 5 mL καλλιέργειας μικρού όγκου ,που είχε

ληφθεί από αποικία τρυβλίου όπως περιγράφηκε και παραπάνω και 100 µg/ml αμπικιλίνης.

Αυτές παρέμειναν υπο ανάδευση στους 37° C για 6h. Έπειτα, προστέθηκε ο επαγωγέας ανυδροτετρακυκλίνη ATc σε συγκέντρωση 0,2µg/mL και οι καλλιέργειες αφέθηκαν για παραγωγή πρωτεΐνης στους 25° C υπό ήπια ανάδευση για 16h. Τα δείγματα μοιράστηκαν σε ειδικά δοχεία φυγοκέντρισης και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση τους στους 4° C και σε ταχύτητα 4000 g για 15 min. Απορρίπτεται το διαλυτό κομμάτι και το μη διαλυτό επαναδιαλύεται με 10 ml NPI-10 μέχρι να είναι διαλυμένο κάθε μικρό κομμάτι. Τα δυο δείγματα ενώνονται πλέον σε ένα, το οποίο υφίσταται θραύση των κυττάρων που περιέχει, 4 φορές για 15 sec στη μέγιστη ένταση.

Εν συνεχεία πραγματοποιείται μια ακόμα φυγοκέντριση στα 10.000g αυτή τη φορά και στον ίδιο χρόνο και θερμοκρασία με την προηγούμενη φυγοκέντριση. Συλλέγεται το υπερκείμενο και αναμιγνύεται με 0,5mL σφαιρίδια αγαρόζης με νικέλιο και οδηγείται σε ανάδευση για 1h για να συνδεθούν ισχυρά τα σφαιρίδια αυτά με το δείγμα υπερκείμενου που τα είχαμε αναμείξει. Έπειτα, το δείγμα εισάγεται στη στήλη η οποία έχει πρώτα ξεπλυθεί με NPI-10. Η στήλη ξεπλένεται με 5ml NPI-30 όπως και NPI-40 και τέλος με 250 ml NPI-250 όπου και παραλαμβάνεται.

Η πρωτεΐνη που παραλαμβάνεται περιέχει ποσότητα ιμιδαζόλης. Για την απομάκρυνση αυτής το δείγμα θα υποστεί φιλτράρισμα σε στήλη αφαλάτωσης. Το προκύπτον δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυμίδιου ενώ μελετήθηκε και με ζυμογράφημα.



Εικόνα 27: Ανάλυση ζυμογραφήματος και SDS-PAGE του προϊόντος καθαρισμού της EstDZ4. (Διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών : Prestained Protein Marker , Broad Range (7-175 kDa), New England Biolabs Inc.) (A) Ζυμογράφημα του ενζύμου EstDZ4 ύστερα από διαδικασία καθαρισμού (B) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή του ενζύμου EsTDZ4 αμέσως μετά τον καθαρισμό του. Και στις δύο εικόνες οι ζώνες παρουσιάζονται στο ύψος που σχετίζεται με το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και όχι το πειραματικό.

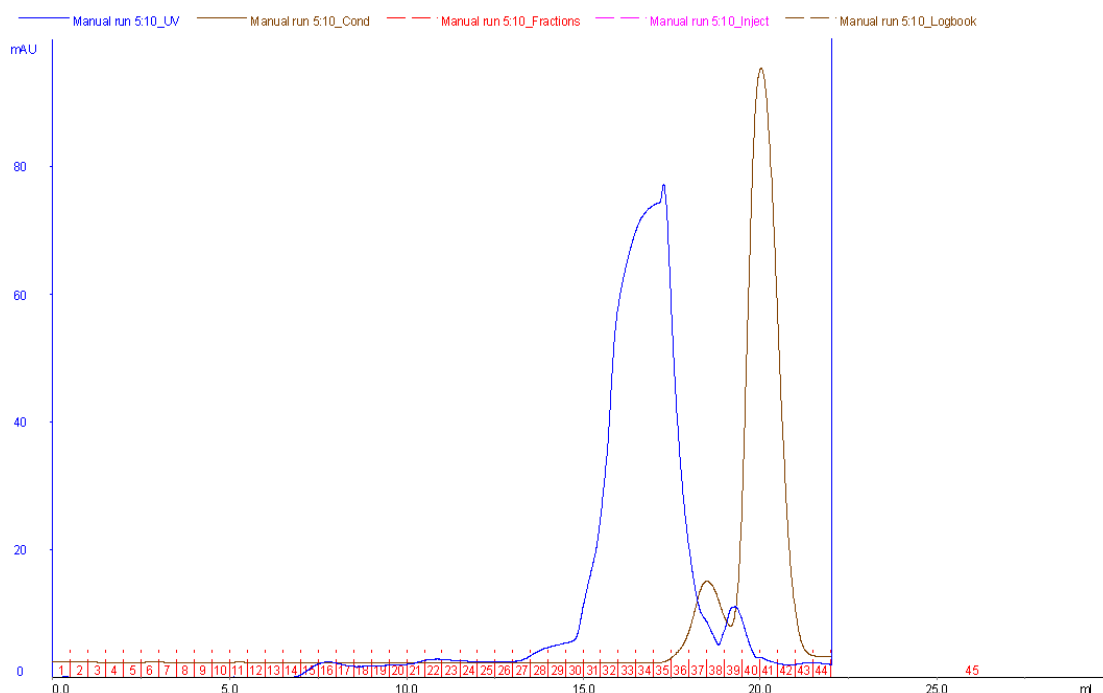
Η εικόνα που πήραμε όπως είναι αντιληπτό δεν είναι η καλύτερη δυνατή γιατί όπως απεικονίζεται και στις δυο προηγούμενες εικόνες η πρωτεΐνη δεν έχει καθαρίσει

πλήρως, αλλά υπάρχουν ξεκάθαρες ζώνες σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη από το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης -στόχου.

Η εικόνα αυτή της πηκτής αλλά και του ζυμογραφήματος επιτάσσει την χρήση μιας ακόμα πιο αποτελεσματικής μεθόδου καθαρισμού της πρωτεΐνης όπως η χρωματογραφία μοριακής διήθησης SEC.

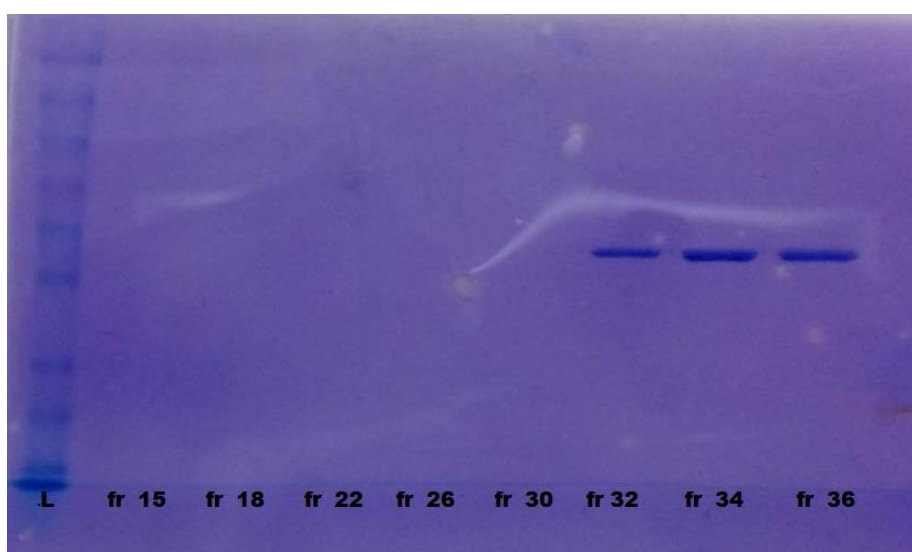
Η μέθοδος αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να απομακρύνουμε οποιοδήποτε στοιχείο ξένο ως προς την πρωτεΐνη μας παραλαμβάνοντας την απολύτως καθαρή. Έτσι παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 και μετρήθηκε ώστε να έχει $\text{pH}=6,5$ που αποτελεί ιδανικό pH για την ανάπτυξη του ενζύμου. Αφού παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα υπέστη φιλτράρισμα υπο κενό προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στην συσκευή της SEC. Συγκεκριμένα, ο ρόλος που διαδραματίζει το ρυθμιστικό διάλυμα σχετίζεται με το ξέπλυμα της στήλης πριν εισαχθεί με ένεση το ένζυμο. Ύστερα από τη διαδικασία του ξέπλυματος εισάγεται το ένζυμο ακολουθώντας σχολαστικά τα βήματα της διαδικασίας. Μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή παρατηρείται η πορεία διέλευσης του ρυθμιστικού διαλύματος και του ενζύμου από την στήλη. Εκεί όπου παρατηρήθηκαν κορυφές συλλέχθηκαν τα δείγματα.

Για ασφάλεια συλλέχθηκαν δείγματα και από κάποια κλάσματα πριν και μετά τος σημείο που εμφανίζεται η κορυφή της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Η εικόνα της SEC απεικονίζεται παρακάτω.

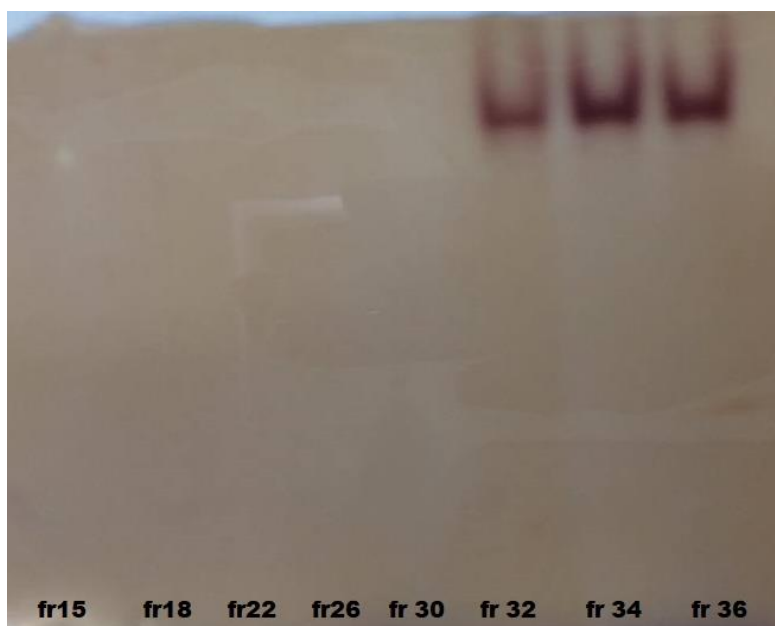


Εικόνα 28 : Το γράφημα που προέκυψε από τον καθαρισμό του ενζύμου με τη μέθοδο SEC. Η κορυφή υποδεικνύει την παρουσία του ενζύμου, η έκλουση του οποίου από τη στήλη GE Superdex 75 10/300 GL έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 20 mM pH 6,5,4 °C, ταχύτητα ροής: 0,5 mL/min)

Είναι εμφανές ότι μεταξύ των κλασμάτων 30 και 37 εμφανίζεται η κυανή κορυφή η οποία και υποδηλώνει την παρουσία του εξεταζόμενου ενζύμου. Εν συνεχεία, αφού διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα 31,32,33,34,35 και 36 περιείχαν το ένζυμο αποφασίστηκε να αποθηκευτούν ορισμένα από αυτά καθώς επίσης και κάποια από τα αρχικά και να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου για επιβεβαίωση τόσο της παρουσίας του ενζύμου όσο και της καθαρότητας που τελικά επιτευχθηκε . Εκτός της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου διενεργήθηκε και ζυμογράφημα . Τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω.



Εικόνα29: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ύστερα από καθαρισμό του ενζύμου EstDZ4 με τη μέθοδο SEC. Η παρουσία της μπλε ζώνης υποδεικνύει την παρουσία του ενζύμου στο δεδομένο κλάσμα. Στα κλάσματα 15,18,22,26,30 που προηγούνται της κορυφής δεν εμφανίζεται μπλε ζώνη. Στα κλάσματα 32, 34,36 που βρίσκονται στα κλάσματα που συλλέχθηκαν ύστερα από την εμφάνιση της κορυφής παρατηρείται ξεκάθαρη μπλε ζώνη. (Διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών: Prestained Protein Marker , Broad Range (7-175 kDa), New England Biolaps Inc.)



Εικόνα 30: Ζυμογράφημα ύστερα από καθαρισμό του ενζύμου EstDZ4 με τη μέθοδο SEC. Εκεί που εμφανίζεται η έντονη καφέ μπάνα είναι εκεί όπου εντοπίζεται και το ένζυμο. Στα κλάσματα 15,18,22,26,30 που συλλέχθηκαν πριν την εμφάνιση κορυφής δεν εντοπίζεται παρουσία ενζύμου. Στα κλάσματα 32,34,36 που συλλέχθηκαν έπειτα από την δημιουργία

κορυφής εμφανίζεται ξεκάθαρη καφέ ζώνη. Prestained Protein Marker , Broad Range (7-175 kDa), New England Biolabs Inc.)

Η πρωτεΐνη που παραλάβαμε εντελώς καθαρή πια έπρεπε να μετρηθεί ως προς την συγκέντρωση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford μέσω της οποίας βρέθηκε πρωτεΐνη συγκέντρωσης $c=0,2\text{mg/ml}$. Στη συνέχεια στο 1,5mL καθαρής πρωτεΐνης προστέθηκε 1,5 mL διαλύματος γλυκερόλης 50% και αποθηκεύτηκε στους -20°C .

3.2.3 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός της EstDZ4

Αφού επετεύχθει ο καθαρισμός του ενζύμου και ήταν πλέον απαλλαγμένο από οποιαδήποτε πρόσθετη ουσία ήταν έτοιμο για χαρακτηρισμό. Ο χαρακτηρισμός περιλαμβάνει την εύρεση του ιδανικού, για το ένζυμο, υποστρώματος, του ιδανικού pH στο οποίο μεγιστοποιείται η ενεργότητα του καθώς επίσης και της βέλτιστης θερμοκρασίας παρουσία της οποίας επιτυγχάνεται επίσης υψηλή τιμή σχετικής ενεργότητας.

Ο χαρακτηρισμός ενός βιομηχανικού ενζύμου, εκτός των άλλων, περιλαμβάνει και την μελέτη της θερμοανθεκτικότητας που παρουσιάζει, αφού αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες με βιομηχανική αξία. Τέλος, προσδιορίζεται το κινητικό μοντέλο στο οποίο υπακούει το ένζυμο.

3.2.3.1 Μελέτη εκλεκτικότητας του υποστρώματος της EstDZ4

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω μέσω των βιοπληροφορικών εργαλείων το προς χαρακτηρισμό ένζυμο φαίνεται να ανήκει στην οικογένεια των λιπολυτικών ενζύμων και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια των GDSL λιπασών και εστερασών

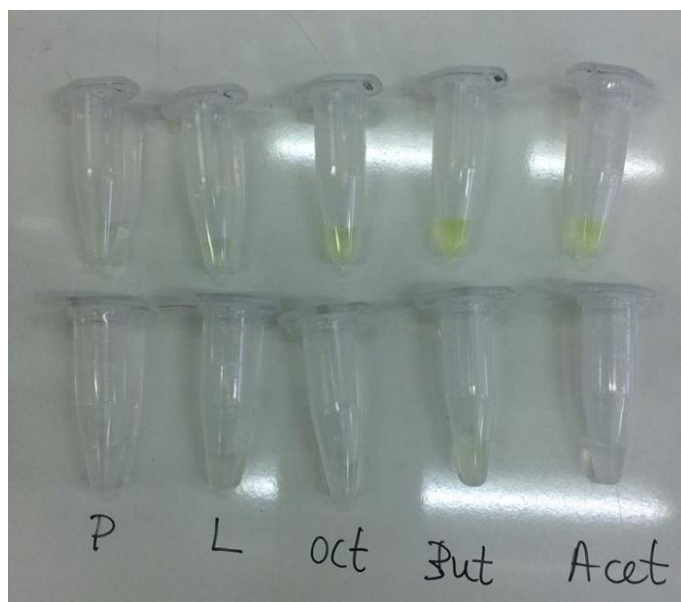
εμφανίζοντας υψηλή ομοιότητα με μια χαρακτηρισμένη λιπάση. Πριν διενεργηθεί, λοιπόν, βιοχημικός χαρακτηρισμός κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστεί το είδος του ενζύμου.

Γνωρίζουμε, έχοντας ανατρέξει στο απαιτούμενο θεωρητικό υπόβαθρο ότι οι εστεράσες διαφέρουν από τις λιπάσες στην προτίμηση σε υποστρώματα, με τις εστεράσες να επιλέγουν μικρότερης αλυσίδας υποστρώματα έναντι των λιπασών που δείχνουν προτίμηση σε μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες.

Έπειτα, λοιπόν, από τον καθαρισμό του ενζύμου διενεργήθηκε ένας έλεγχος προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν είναι εστεράση ή λιπάση. Το ένζυμο σε συγκέντρωση 0,2mg/ml προστέθηκε στα υποστρώματα :

- Εστερας παρανιτροφαινόλης με παλμιτικό οξύ
- Εστερας παρανιτροφαινόλης με καπρικό οξύ
- Εστερας παρανιτροφαινόλης με καπριλικό οξύ
- Εστερας παρανιτροφαινόλης με βουτυρικό οξύ
- Εστερας παρανιτροφαινόλης με οξικό οξύ

Όλα συγκέντρωσης 2mM. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και τυφλά δείγματα που αντι του ενζύμου περιείχαν διπλά απιονισμένο νερό για να αποφευχθούν παρανοήσεις ως προς την ενεργότητα λόγω αυτουδρόλυσης του υποστρώματος. Τελικά, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη ενεργότητα εμφανίζεται σε μικρές ανθρακικές αλυσίδες και συνεπώς πρόκειται για μια εστεράση.



Εικόνα 31: Αποτελέσματα από εισαγωγή δείγματος του ενζύμου σε διαφορετικά υποστρώματα για έλεγχο της ενεργότητας. Η πάνω σειρά περιέχει τα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί το ένζυμο ενώ η κάτω σειρά τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα που περιείχα διπλά απιονισμένο νερό.

3.2.3.2 Εκλεκτικότητα σε υποστρώματα

Προκειμένου να βρούμε το κατάλληλο υπόστρωμα στο οποίο έχει προτίμηση η πρωτεΐνη μας πραγματοποιήσαμε δυο διαφορετικά πειράματα. Τα υπο εξέταση υποστρώματα ήταν υποστρώματα του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, συγκεκριμένα ήταν τα εξής:

- Οξικός (Pnp-acetate C=2)
- Βουτυρικός (Pnp-butyrate C=4)
- Καπριλικός (Pnp-octanoate C=8)
- Λαυρινικός (Pnp-laurate C=12)
- Παλμιτικός (Pnp-palmitate C=16)

Στην πρώτη δοκιμασία που πραγματοποιήσαμε μετρήθηκε η απορρόφηση των υποστρωμάτων σε διάλυμα που περιείχαν δείγματα 1 και 2.

Το δείγμα 1 αποτελούνταν από: (sol1)

1. Gum Arabic (0,055g/50mL)
2. TritonX-100 (0,222g/50 mL)
3. Tris-HCl 20mM pH=8

Το δείγμα 2 αποτελούνταν από :

Για κάθε υπόστρωμα προστέθηκαν :

9,5μL δείγμα 1

85,5 μl δείγμα 2

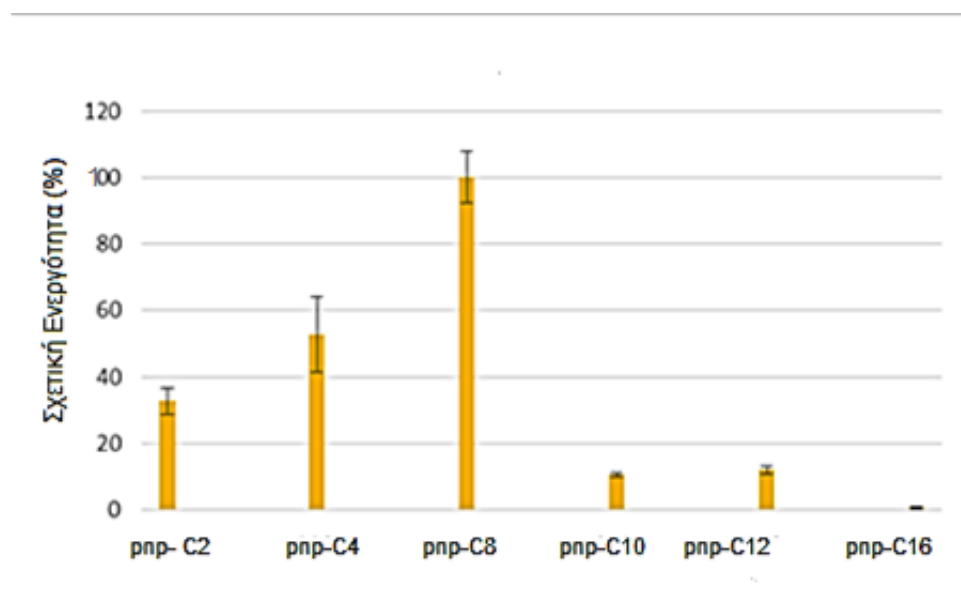
50 μL υπόστρωμα

Η αντίδραση διήρκησε 30 min και το κάθε δείγμα μετρήθηκε ως προς την απορρόφηση στα 410 nm. Όπως είναι λογικό για κάθε υπόστρωμα υπήρξε και τυφλό δείγμα στο οποίο δεν υπήρχε ένζυμο αλλά το δείγμα 2. Το pnp-Butyrate εμφανίζει την μεγαλύτερη απορρόφηση.

Ωστόσο, επειδή η πρώτη δοκιμασία υποστρωμάτων ήταν για να πάρουμε μια πρώτη εικόνα ως προς την εκλεκτικότητα της πρωτεΐνης μας πραγματοποιήθηκε νέα δοκιμασία. Στην δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί δίσκοι με μικρές όμοιες κυκλικές εσοχές όγκου 120 μL. Αρχικά , παρασκευάστηκε ένα μείγμα που περιείχε 630 μL buffer (Tris-HCl 20mM pH=8) 70 μL από το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά και αυτά αναδεύτηκαν ελαφρώς και μοιράστηκαν σε 6 κυκλικές υποδοχές σε όγκο 95 μL στην καθεμία. Στις τρεις πρώτες προστέθηκαν και από 1μg/mL αραιωμένου ενζύμου (αραίωση 1/200, 0,001μg/100μL αντίδρασης) ενώ στις τρεις επόμενες τα 100 μL αντίδρασης συμπληρώθηκαν με 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-

HCl 20mM pH=8 . Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 5 min και ύστερα τα δείγματα εισάχθηκαν στο Tecan Safire² (Maggelan v6.00) όπου και εξετάστηκαν ως προς την απορρόφηση.

Ο λόγος που έχουμε τυφλά δείγματα είναι για να προσεγγιστεί η απορρόφηση που οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία του ενζύμου. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε κάθε αντίδραση πραγματοποιείται πανομοιότυπη 3 φορές για να μειωθεί το σφάλμα. Εκτός αυτού για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα ολόκληρο το πείραμα έτσι όπως περιγράφηκε παραπάνω πραγματοποιήθηκε τρεις φορές και το αποτέλεσμα ως προς την εκλεκτικότητα του υποστρώματος αποτελεί τον μέσο όρο και των τριών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές πειραματικές ημέρες.



Εικόνα 32 : Έλεγχος δραστηριότητας του κυτταρικού υλικού βακτηρίων που παράγουν την EstDZ4 έναντι των συνθετικών υποστρωμάτων εστέρων παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Όπως είναι εμφανές και από τις τρεις επαναλήψεις του πειράματος ως προς την εκλεκτικότητα του υποστρώματος μεγαλύτερη προτίμηση εμφανίζει το ενζυμό μας ως προς το υπόστρωμα του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το καπριλικό οξύ (rnp-octanoate). Ο λόγος που εμπιστευόμαστε περισσότερο αυτή τη μέθοδο από την προηγούμενη είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι ίδιες συνθήκες για κάθε

υπόστρωμα και λήφθηκαν κατά μέσο όρο τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που φαίνονται παραπάνω..

3.2.3.3 Εκλεκτικότητα ως προς τις συνθήκες pH

Ύστερα από την εύρεση του κατάλληλου υποστρώματος έχει σειρά η εύρεση του βέλτιστου pH για το ένζυμό μας. Ωστόσο, πριν από την διαδικασία εύρεσης της βέλτιστης τιμής pH αναγκαία κρίνεται η επιβεβαίωση ότι εργαζόμαστε στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου η σχέση χρόνου απορρόφησης είναι γραμμική για να έχει νόημα η μέτρηση μας. Έτσι, διεξάγεται μια σύντομη δοκιμασία. Σε 720 μl buffer (Tris-HCl 20mM, pH=8) προστίθενται 2mM (80 μL) διαλύματος παρανιτροφαινόλης με το καπριλικό οξύ pnp-octanoate . Από το μείγμα λαμβάνονται 95 μl και αναμιγνύονται με 5 μL αραιωμένου ενζύμου 1/200 συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Παράλληλα, παρασκευάστηκε και τυφλό δείγμα που αντί για ένζυμο περιείχε ίσο όγκο από ρυθμιστικό διάλυμα. Τα διαλύματα αφέθηκαν να αντιδράσουν για 5 min και ύστερα μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 410nm. Η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε για τον διπλάσιο χρόνο. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα :

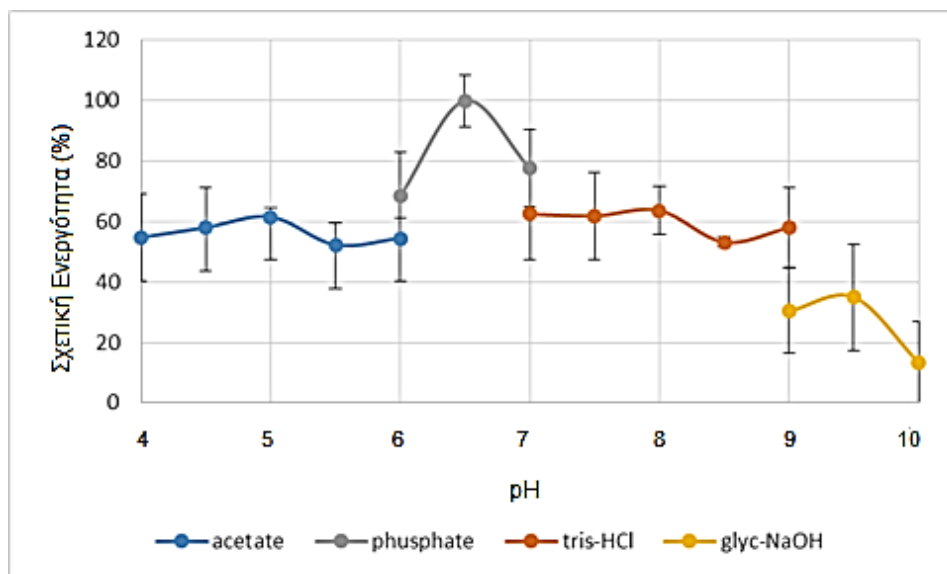
Πίνακας 7: Επιβεβαίωση της γραμμικής σχέσης μεταξύ χρόνου και μετρούμενης απορρόφησης στην αντίδραση του ενζύμου

| Χρόνος Αντίδρασης | Απορρόφηση |
|-------------------|------------|
| 5 min | 0,570 |
| 10 min | 1,090 |

Είναι , λοιπόν, εμφανές ότι εργαζόμαστε στο γραμμικό κομμάτι και μπορούμε να συνεχίσουμε με την εύρεση του βέλτιστου pH.

Το pH μετρήθηκε σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 4 και 10. Για τιμές pH από 4-6 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (acetate). Από 6-7 επιλέχθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (phosphate), για το εύρος 7-9 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20mM και τέλος, για τιμές 9-10 ρυθμιστικό διάλυμα glycine NaOH. Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα για κάθε τιμή pH από 4 μέχρι και 10 ανά 0,5 παρασκευάζονταν διαφορετικό και επειδή υπήρχαν τιμές που άνηκαν στα όρια της αλλαγής ρυθμιστικού διαλύματος παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα ακόμα και για τις επικαλυπτόμενες τιμές, με αποτέλεσμα να παρασκευαστούν συνολικά 11 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η τιμή του βέλτιστου pH ήταν παρόμοια με εκείνη των υποστρωμάτων και σε αυτή την περίπτωση αραιώνεται το δείγμα του ενζύμου σε αναλογία 1:200, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Στις τρεις πρώτες αντιδράσεις συμπληρώνονται 5 μL αραιωμένου ενζύμου 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ενώ στις υπόλοιπες τρεις από 5 μL από το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την μέτρηση που πραγματοποιείται κάθε φορά. Η αντίδραση διήρκεσε 5 min. Η διαδικασία αυτή

πραγματοποιήθηκε 5 εργαστηριακές μέρες από τις οποίες προέκυψε ένα τελικό διάγραμμα pH το οποίο και απεικονίζεται παρακάτω.



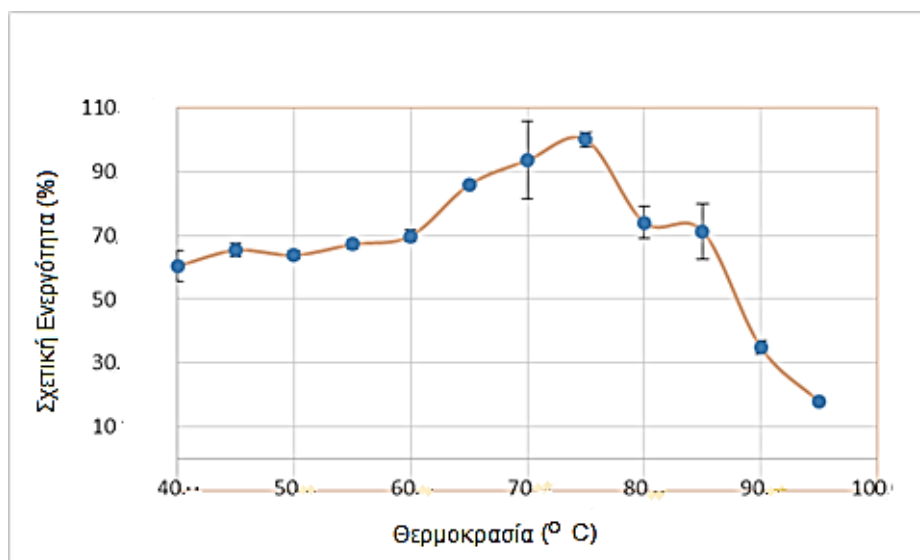
Εικόνα 33: Μελέτη της επίδρασης του pH στην σχετική ενεργότητα της EstDZ4. Η επίδραση του pH μετρήθηκε στην βασική αντίδραση στους 45° C για 5 λεπτά, σε τιμές pH που κυμαίνονταν από 4 έως 10 με χρήση των ρυθμιστικών διαλυμάτων που φαίνονται στο διάγραμμα. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσω όρων.

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, η βέλτιστη τιμή pH αντιστοιχεί σε τιμή 6,5. Ωστόσο, μεταξύ των τιμών 5-7 η ενεργότητα του ενζύμου βρίσκεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα.

3.2.3.4 Εκλεκτικότητα ως προς την τιμή της θερμοκρασίας

Με τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής pH κατέστη αναγκαίο να βρεθεί και η ιδανική τιμή θερμοκρασίας για την οποία το ένζυμο εμφανίζει την υψηλότερη ενεργότητα. Το εύρος των προς εξέταση θερμοκρασιών ήταν 40° C-95° C. Με την ίδια λογική που ακολουθήθηκε και προηγουμένως παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα για κάθε θερμοκρασία μεταξύ των δυο ακραίων τιμών που προαναφέρθηκαν ανα 5° C. Τα ρυθμιστικά διαλύματα αυτά προέκυψαν από διάλυμα φωσφορικού νατρίου με το βέλτιστο pH. Το καθένα παρέμεινε για 15 min σε υδατόλουτρο σταθερής προεπιλεγμένης θερμοκρασίας που ήταν και η επιθυμητή όπου έπρεπε να φτάσει. Ύστερα ελέγχθηκε κάθε ρυθμιστικό ως προς το pH αν είχε διατηρήσει την τιμή 6,5. Οι αντιδράσεις είναι έτοιμες να ξεκινήσουν. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα πειράματα ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας απαιτεί την διεξαγωγή της πεντάλεπτης αντίδρασης στην θερμοκρασία αυτή και όχι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκαν τα μηχανήματα που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τα οποία μπορούν να κρατήσουν σταθερή θερμοκρασία αλλά και να φτάσουν σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες.

Αναμιγνύονται 756 μL ρυθμιστικό διάλυμα με 84 μL υποστρώματος (pnp-8) για 6 αντιδράσεις και 114 από αυτά εισάγονται στο μηχάνημα για λίγα λεπτά για να πιάσουν την θερμοκρασία πριν εισαχθεί το ένζυμο. Μετά από λίγα λεπτά εισάγονται και 6 μL αραιωμένου ενζύμου $1\mu\text{g}/\text{mL}$ στις τρεις από τις 6 αντιδράσεις και στις υπόλοιπες όπως πάντα για την παρασκευή τυφλών, 6 μL buffer. Αναμένουμε 5 min για την αντίδραση και ύστερα μετράμε απορρόφηση στο Tecan Safire² (Maggelan v6.00). Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε 3 ακόμα εργαστηριακές ημέρες και το τελικό διάγραμμα θερμοκρασίας με βάση τους μέσους όρους όλων των τιμών είναι αυτό που ακολουθεί.



Εικόνα 34: Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην σχετική ενεργότητα της EstDZ4. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην εστερολυτική δράση του ενζύμου μετρήθηκε στη βασική αντίδραση σε θερμοκρασιακό εύρος 25 με 70° C και pH 6,5. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Βάσει του παραπάνω διαγράμματος κρίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου είναι οι 75° C. Το ένζυμο, φαίνεται βέβαια να εμφανίζει υψηλές τιμές ενεργότητας για ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 40° C μέχρι και 85° C. Μετά από την θερμοκρασία των 85° C παρατηρείται απότομη πτώση της ενεργότητας του ενζύμου.

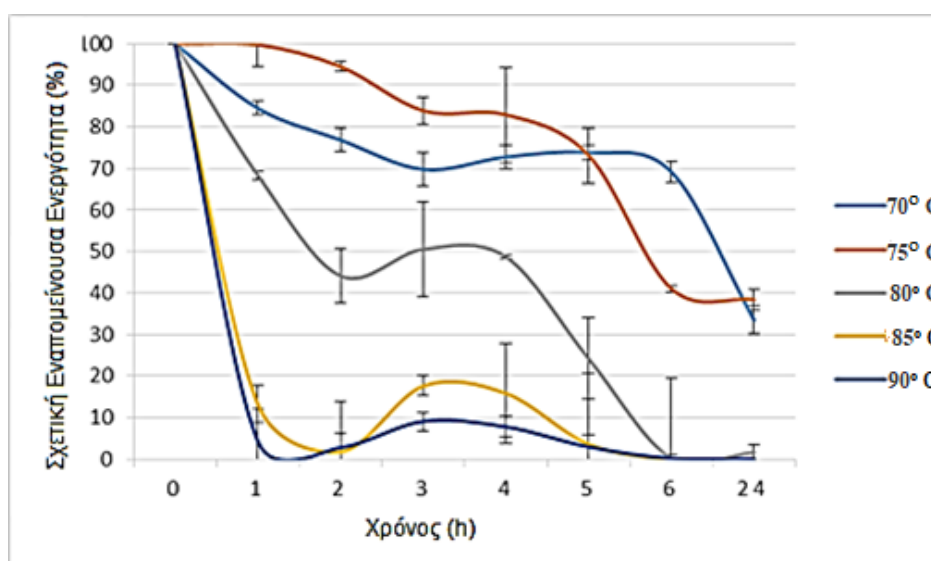
3.2.3.5 Έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας του EstDZ4

Μια ακόμη παράμετρος που είναι σημαντική για τον χαρακτηρισμό του ενζύμου πέρα από τις βέλτιστες συνθήκες δράσης του, είναι και η θερμοανθεκτικότητα του δηλαδή το, κατά πόσο το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του όταν υποβάλλεται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε ίδια υψηλή θερμοκρασία.

Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ώστε να γίνει η μελέτη της θερμοανθεκτικότητας του ενζύμου ήταν οι 70° C, 75° C, 80° C, 85° C, 90° C. Τοποθετείται ποσότητα αραιωμένου ενζύμου $1\mu\text{g}/\text{ml}$ σε κάθε μια από τις παραπάνω

θερμοκρασίες σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=6,5 και της θερμοκρασίας των 75° που βρέθηκε η βέλτιστη για το ένζυμο που μελετήθηκε. Ανα μία ώρα λαμβάνονταν δείγμα από την ποσότητα του ενζύμου που είχε τοποθετηθεί υπο θέρμανση και παρουσία υποστρώματος και ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιούνται η αντίδραση όπως και παραπάνω. Η αντίδραση διήρκεσε για 5 min στους 75° C και στη συνέχεια οι τριπλές δειγμάτων με τα αντίστοιχα τυφλά τους φωτομετρήθηκαν. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με δειγματοληψία ανα μία ώρα για τις πρώτες 6 ώρες και έπειτα λήφθηκε πάλι δείγμα στις 24 h. Κατά αυτόν τον τρόπο μετρήθηκε η εναπομένουσα ενεργότητα . Ως 100% ορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου που δεν έχει επωαστεί σε κάποια θερμοκρασία .

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Εικόνα 35: Μελέτη Θερμοσταθερότητας ανθεκτικότητας της EstDZ4. Η Θερμοσταθερότητα του ενζύμου αξιολογήθηκε με μετρήσεις της εναπομένουσας ενεργότητας του μετά από επώαση του στους 70,75,80,85 και 90 μέχρι και 24 ώρες. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στον μέσο όρο των ανεξάρτητων πειραμάτων τριπλής επανάληψης και το σφάλμα στην τυπική απόκλιση αυτών των μέσων όρων.

Η εικόνα που λαμβάνεται από το παραπάνω γράφημα είναι ότι για τους 75°C που αποτελεί και την βέλτιστη θερμοκρασία η ενεργότητα διατηρείται σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 6 ώρες . Μετά παρατηρείται μια απότομη πτώση της ενεργότητας που αγγίζει ένα ποσοστό κοντα στο 30% της εναπομένουσας ενεργότητας μετά το πέρας των 24 ωρών. Μια σχετικώς παρόμοια εικόνα εμφανίζει το ένζυμο και στους 70° C όπου διατηρεί την ενεργότητα του μέχρι τις 6 ώρες ενώ στις 24 ώρες έχει απομείνει το 20% της ενεργότητας του. Στους 80° C το ένζυμο εμφανίζει από τις πρώτες ώρες μια αισθητή μείωση της ενεργότητας στο μισό περίπου και μέχρι τις 24 ώρες δεν υπάρχει εναπομένουσα ενεργότητα. Στους 85° και 90° C ,τέλος, ήδη από την πρώτη ώρα δεν εμφανίζεται εναπομένουσα ενεργότητα.

3.2.3.6 Μελέτη κινητικών σταθερών

Για να ολοκληρωθεί ο βασικός βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου έγινε προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων της παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα που διαφέρουν ως προς το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας που καταλύεται από την νέα εστεράση .

Συγκεκριμένα, για διαφορετικές συγκεντρώσεις της EstDZ4 κλιμακούμενες ξεκινώντας από 0,1mM και καταλήγοντας σε 1mM με βήμα 0,1 μετρήσαμε την ενεργότητα του ενζύμου στην αντίδραση υδρόλυσης της παρανιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Έπειτα, παραστήσαμε γραφικά τα δεδομένα της ενεργότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο για να εντοπίσουμε την εκθετική φάση ανάπτυξης και στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα δεδομένα της ενεργότητας του ενζύμου για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα που άνηκαν στην εκθετική φάση.

Η υδρόλυση των υποστρωμάτων από το ένζυμο EstDZ4 ακολουθεί κινητικό μοντέλο κατά Michaelis-Menten. Η υψηλότερη τιμή καταλυτική αποδοτικότητα (k_{cat}/k_m) βρέθηκε για το υπόστρωμα pnp-octanoate (καπριλικός εστέρας) όπου η τιμή του είναι $k_{cat}/k_m=13.466,57 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης υδρόλυσης εστέρων παρανιτροφαινόλης με διαφορετικά λιπαρά οξέα που καταλύεται από την εστεράση EstDZ4.

| Εστέρας pNP | K_M (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$) |
|--------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Καπριλικός (C8) | 0,3±0,1 | 155,5±6,9 | 4.110 | 13.467 |
| Βουτυρικός (C4) | 0,5±0,1 | 97,6±3,4 | 1.857 | 3.969 |

Παρατηρείται ότι αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας συνεπάγεται με μείωση της καταλυτικής αποδοτικότητας ενώ για ανθρακική αλυσίδα με μήκος μεγαλύτερο των 10 ανθράκων το ένζυμο δεν είναι ενεργό. Οι κινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με τη χρήση του εργαλείου Graphpad Prism 5.

ΕΝΟΤΗΤΑ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης ενός μεταγονιδιωματικού δείγματος που προήλθε από ισλανδική περμποπή που βρισκονταν στους 85° C, έγινε η ανακάλυψη του ενζύμου EstDZ4. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε ως πιθανό γονίδιο για εστερολυτική δράση λόγω ομοιότητας με γνωστά ένζυμα που άνηκαν στην κατηγορία των GDSL εσταρασών. Η εξακρίβωση της εστερολυτικής δράσης έγινε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής διατριβής κατά την οποία βρέθηκαν σημαντικές πληροφορίες που σχετίζονται με το εν λόγω ένζυμο. Η βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγονιδιωματικού δείγματος DNA, οδήγησε στην επιλογή ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης που υποβλήθηκε σε εκτενέστερη μελέτη. Το δεδομένο δείγμα εμφάνισε χαμηλή ομολογία (23%) με μια χαρακτηρισμένη GDSL λιπάση και η περαιτέρω μελέτη απέδειξε ότι εμφανίζει 99% ομοιότητα με ένζυμο που ανήκει στην κατηγορία των GDSL εστερασών και λιπασών και έχει βρεθεί στο βακτηριακό στέλεχος του *Thiomonas sp* μικροοργανισμού. Επίσης, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης έγινε εντοπισμός πεπτιδίου οδηγού που περιέχεται στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Η μετέπειτα κλωνοποίηση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και η έκφραση του ενζύμου που κωδικοποιεί σε βακτηριακό στέλεχος *E.coli* επιτεύχθηκε ύστερα από μια σειρά ανεπιτυχών προσπαθειών που σχετίζονταν με την παρουσία του πεπτιδίου οδηγού. Η απομάκρυνση της συγκεκριμένης αμινοξικής αλληλουχίας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγόμενης ποσότητας διαλυτού ενζύμου και την δυνατότητα έκφρασης του στον ξενιστή. Στη συνέχεια διενεργήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός σύμφωνα με τον οποίο η πρωτεΐνη-στόχος που εξετάστηκε βρέθηκε να είναι μια εστεράση και όχι λιπάση. Η εξακρίβωση της οικογένειας λιπολυτικών ενζύμων από την οποία προέρχεται το ένζυμο πραγματοποιήθηκε με πειράματα εκλεκτικότητας υποστρώματος. Ανάλογα με την εκλεκτικότητα ως προς μια σειρά υποστρωμάτων μικρής και μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας θα γίνονταν εμφανές το είδος του ενζύμου. Βρέθηκε ότι όπως και όλες οι εστεράσες δείχνει προτίμηση σε μικρότερες προς μεσαίες ανθρακικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ως προς την εκλεκτικότητα σε υποστρώματα βρέθηκε ότι υψηλότερη ενεργότητα εμφανίζει το ένζυμο παρουσία του υποστρώματος του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το καπριλικό οξύ (pnp-octanoate) ενώ η ενεργότητα διατηρείται σε αρκετά καλά επίπεδα παρουσία του υποστρώματος του εστέρα της παρανιτροφαινόλης με το βουτυρικό οξύ (pnp-butyrate). Η αύξηση του αριθμού των ανθράκων στο υπόστρωμα προκαλεί αισθητή μείωση της ενεργότητας. Η βέλτιστη τιμή pH στην οποία δρα το ένζυμο είναι pH 6,5. Σε αυτή την τιμή το ένζυμο φαίνεται να σημειώνει υψηλές ενεργότητες ενώ εξίσου καλή απόδοση φαίνεται να έχει και για τιμές pH 6 και 7. Εκτός των τιμών αυτών το ένζυμο δεν δρα σε ικανοποιητικό βαθμό. Σε ότι αφορά την θερμοκρασία, η βέλτιστη τιμή που βρέθηκε σύμφωνα με τα πειράματα που έγιναν για το ένζυμο ήταν εκείνη των 75° C. Αναντίρρητα, εξίσου καλά θα μπορούσαμε να πούμε ότι δρα το ένζυμο και στην θερμοκρασία των 70° C ενώ σχετικά υψηλή ενεργότητα εμφανίζεται και στην θερμοκρασία των 80° C. Η μελέτη της θερμοσταθερότητας του ενζύμου έδειξε ότι στους 75° C μέχρι το περας των 6 πρώτων ωρών η ενεργότητα διατηρείται σε πολύ καλά επίπεδα. Ωστόσο, μετά το πέρας των 24 ωρών υπάρχει 30% εναπομείνουσα ενεργότητα. Την ίδια τάση εμφανίζει το ένζυμο και στην θερμοκρασία των 70° C, ενώ η ενεργότητα στους 80° C εμφανίζει πτωτική τάση από τις πρώτες ώρες. Από κινητικής άποψης, η υδρόλυση των εστέρων παρανιτροφαινόλης με διάφορα λιπαρά οξέα που καταλύεται από το ένζυμο EstDZ4 εμφανίζει μέγιστη καταλυτική απόδοση k_{cat}/K_M για το υπόστρωμα του εστέρα με το

καπριλικό οξύ. Καλή τιμή παρουσιάζεται και για το υπόστρωμα του εστέρα με το βουτυρικό οξύ ενώ για υποστρώματα του εστέρα με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας το ένζυμο φάνηκε να μην είναι ενεργό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelkafi, S., Ogata, H., Barouh, N., Fouquet, B., Lebrun, R., Pina, M., ... Carrière, F. (2009). Identification and biochemical characterization of a GDSL-motif carboxylester hydrolase from *Carica papaya* latex. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(11), 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2009.06.002>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walten, P., (2011). Essential cell Biology , 4th Edition. *Garland Science*
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., & Shaw, J. F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 534–552. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>
- Andrews, a T., Taylor, M. D., & Owen, a J. (1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J Chromatogr*, 348(1), 177–185. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92451-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92451-3)
- Arpigny, J. L., & JAEGER, K.-E. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 1(1), 177–183. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430177>
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Biophysics, T., & Physics, T. (1986). © IR L Press Limited , Oxford , England ., 14(11), 4683–4690.
- Boonmahome, P., & Mongkolthananuk, W. (2013). Lipase-Producing Bacterium and its Enzyme Characterization. *Journal of Life Sciences and Technologies*, 1(4), 196–200. <https://doi.org/10.12720/jolst.1.4.196-200>
- Bornscheuer, U. T. (2002). "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis." *FEMS microbiology reviews* 26(1): 73-81.
- Bornscheuer, U. T. and R. J. Kazlauskas (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, John Wiley & Sons
- Camarero, J. A., Kimura, R. H., Woo, Y. H., Shekhtman, A., & Cantor, J. (2007). Biosynthesis of a fully functional cyclotide inside living bacterial cells. *ChemBioChem*, 8(12), 1363–1366. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700183>
- Cherukuvada, S., Sechasayee, A., Raghunathan, K., Pennathur, G. (2005). Evidence of a Double -Lid Movement in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS Computational Biology*
- Chhabra, N. (2013). Digestion of lipids-A quick version. *Biochemistry for Medics*
- Colleen, B., C. & Borden, V., M. (2005). *Science for Life*, 2nd Edition. Prentice Hall College Publishers
- Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., & Wittwer, P. (2005). Metagenomic gene discovery: Past, present and future. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.001>

- Cutler, P.,(2004). Protein Purification Protocols, 2nd Edition.*Humana Press*
- Deng, D., Zhang, Y., Sun, A., Liang, J., & Hu, Y. (2016). Functional Characterization of a Novel Marine Microbial GDSL Lipase and Its Utilization in the Resolution of (\pm)-1-Phenylethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(1), 75–93. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-1980-4>
- Rainmund(2014).Pancreatic lipase. <https://gr.depositphotos.com/96671956/stock-photo-molecular-structure-of-pancratic-lipase.html>
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- Hannig, G., & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 54–60. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01155-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01155-4)
- Henrik W. Anthonsenl, Ant6nio Baptista, Finn Drablprsl, Paulo Martel', Steffen B. Petersen',*,M aria Sebastiiiio2 and Louis Vaz.(1995). Lipases and EsterasesQ a review of thei sequence, strusture and evolution. *Elsevier Schience*
- IBA. (2012). Expression and purification of proteins using 6x Histidine -tag A comprehensive manual. *IBA Solutions For Life Sciences*, (October), 1–36.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)
- Larsen, M. W., Bornscheuer, U. T., & Hult, K. (2008). Expression of Candida antarctica lipase B in Pichia pastoris and various Escherichia coli systems. *Protein Expression and Purification*, 62(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.07.012>
- Ling, H. (2008). Sequence analysis of GDSL lipase gene family in Arabidopsis thaliana. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.763.767>
- Liu, A. M. F., Somers, N. A., Kazlauskas, R. J., Brush, T. S., Zocher, F., Enzelberger, M. M., ... Schmid, R. D. (2001). Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: Lipases from Bacillus thermocatenulatus and Ophiostoma piliferum, esterases from Pseudomonas fluorescens and Streptomyces diastatochromogenes. *Tetrahedron Asymmetry*, 12(4), 545–556. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(01\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(01)00072-6)
- L6pez-L6pez, O., Cerd6n, M. E., & Gonz6lez Siso, M. I. (2014). New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Current Protein & Peptide Science*, 15(5), 445–55. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140228153801>
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., & Eck, J. (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: Accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 572–577. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00345-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00345-2)
- Mangoni, G.A.(2003). Enzyme Kinetics: A modern Approach. *Wiley Interscience*
- Mader, S.(1999). Bilogy: Inquiry into Life,9th Edition. *McGraw -Hill Companies*

- Mc Cabe, E., Ball, J. & Hendricks, C. (2011). Thermophiles. *Science Rules*
- Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999). ??? hydrolase fold enzymes: The family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 732–737. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00037-8)
- Okamura, Y., Kimura, T., Yokouchi, H., Meneses-Osorio, M., Katoh, M., Matsunaga, T., & Takeyama, H. (2010). Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. *Marine Biotechnology*, 12(4), 395–402. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9226-x>
- Okay, S. (2011). Development of Recombinant Vaccines Composed of PLPE and OMPH from *Pasteurella Multocida*. *Research Gate*
- Panda, T., & Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 160–169. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1840-y>
- Phosphosite Plus.(2011).D esterase. <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=4117&showAllSites=true>
- Postlethwait, J.& Hopson, J.(2006). Modern Biology, 1st Edition . *Holt, Rinehart and Winston Publishers*
- Purves, B.& Sadava, D.(2003). Life : The Science of Biology, 7th Edition. *W.H. Freeman Company*
- Querol, E., Perez-Pons, J. A., & Mozo-Villarias, A. (1996). Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Engng.*, 9(3), 265–271.
- Ribeiro, B.D., Coehlo, M.A. & Freire, D.M. (2011). Production and Use of Lipases in Bioenergy. A review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *ResearchGate*, 5-8 https://www.researchgate.net/publication/51517987_Production_and_Use_of_Lipases_in_Bioenergy_A_Review_from_the_Feedstocks_to_Biodiesel_Production.
- Rosano, L.G.& Ceccareli, E., A.(2014). Recombinant protein expression in *Escherichia Coli*: Advances And Challenges. *Frontiers in Microbiology*
- Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A., & Giri, B. (2003). Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39(2), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00068-2)
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 303–310. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00067-3)
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>
- Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, 151(1–2), 131–135. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90643-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90643-2)

- Slack, J. (2001). *Essential Developmental Biology*. Blackwell Science Ltd
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1(1ii), 1–6. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>
- Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6, 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-9>
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- Wall, D., Loughran, S., (2008). *Protein Chromatography, Methods and Protocol*, 2nd Edition. Humana Press
- Wade, L., G. (2010). *Organic Chemistry*, 7th Edition, Chapter 21. Pearson Education
- Ward, O. P., & Moo-Young, M. (1988). Thermostable enzymes. *Biotechnology Advances*, 6(1), 39–69. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(88\)90573-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(88)90573-3)
- Zarafeta, D. (2017). *Επιλογή για χαρακτηρισμός θερμοανθεκτικών υδρολυτικών ενζύμων από μεταγονιδιωμιακές βιβλιοθήκες οργανισμών από ακραία περιβάλλοντα.*
- Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergsdottir, S. R., Ladoukakis, E., Isupov, M. N., ... Kollisis, F. N. (2016). Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146454>
- Zarafeta, D., Szabo, Z., Moschidi, D., Phan, H., Chrysina, E. D., Peng, X., ... Skretas, G. (2016). EstDZ3: A new esterolytic enzyme exhibiting remarkable thermostability. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01779>