

Ετερόλογη έκφραση και παραγωγή νέων βιοκαταλυτών με ενεργότητα λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών

Ανδρέας Μαυράκης

Διπλωματική Εργασία

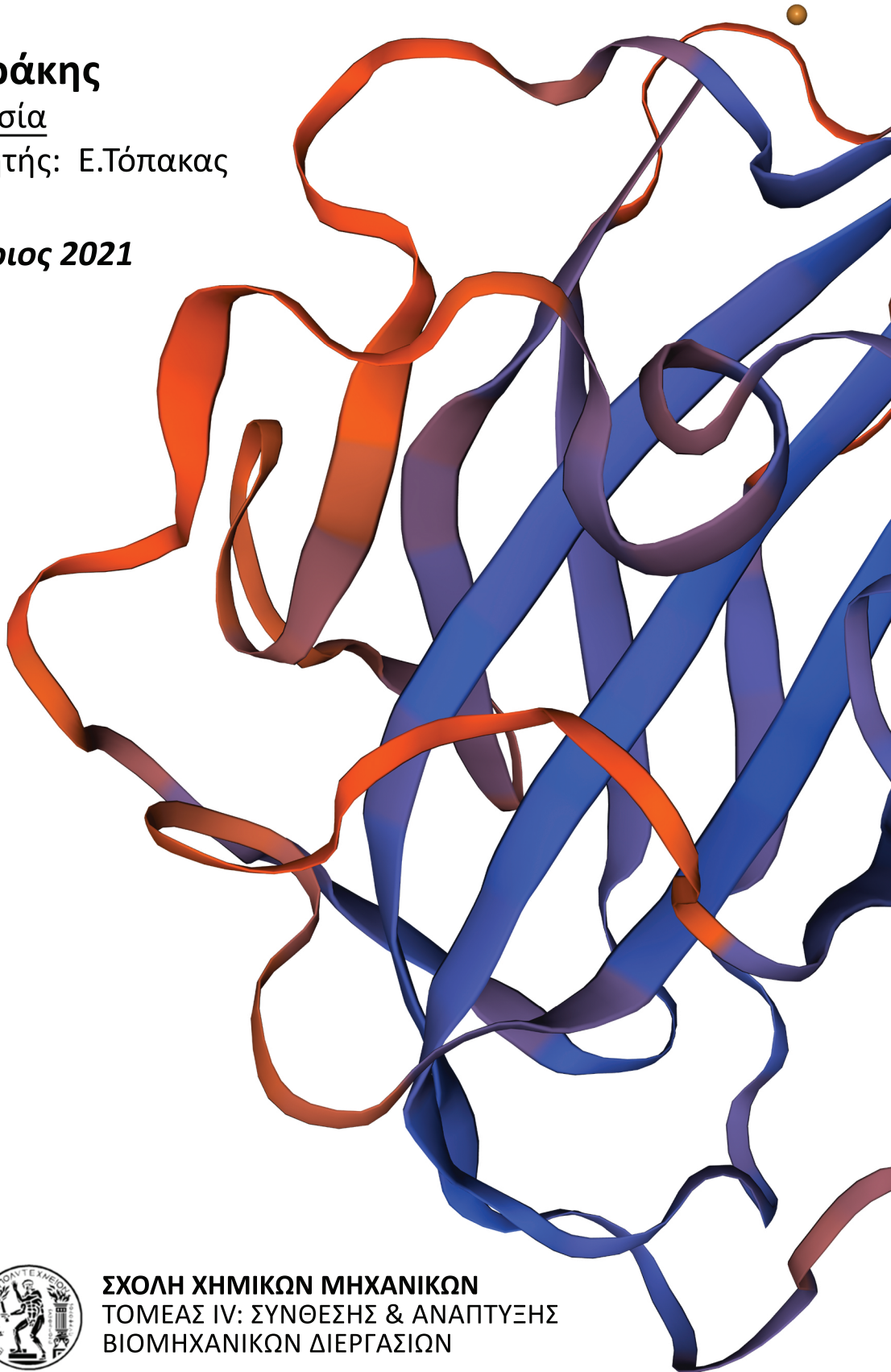
Επιβλέπων καθηγητής: Ε.Τόπακας

Αθήνα, Φεβρουάριος 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Ετερόλογη έκφραση και παραγωγή νέων βιοκαταλυτών με
ενεργότητα λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών

Ανδρέας Μαυράκης

Επιβλέπων Καθηγητής: Ε.Τόπακας

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ευάγγελος Τόπακας
Αναπληρωτής Καθηγητής

Διομή Μαμμά
Επίκουρη Καθηγήτρια

Αθανάσιος Παπαθανασίου
Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθήνα, 3 Μαρτίου 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Copyright ©—All rights reserved Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ'ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Υπεύθυνη Δήλωση

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην πτυχιακή εργασία. Επίσης έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η πτυχιακή εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για τις απαιτήσεις του προγράμματος σπουδών της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

.....

Ανδρέας Μαυράκης

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω προσωπικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ανθή Καρναούρη για την άψογη συνεργασία, την καθοριστική συμβολή αλλά και την αρωγή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Koag Choroizian για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις χρήσιμες υποδείξεις και την βοήθεια της σε όλη την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας στο εργαστήριο, όπως επίσης και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτρη Ζουράρη για την αρκετά σύντομη αλλά επωφελή συνεργασία μας. Με αφορμή την ολοκλήρωση αυτού του κύκλου σπουδών, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην οικογένεια μου για να την ευχαριστήσω βαθύτατα για την παρουσία της δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια. Ένα τελευταίο ευχαριστώ σε όλους εκείνους τους ανθρώπους που έκαναν αυτή τη διαδρομή πιο όμορφη.

Ανδρέας Μαυράκης

Αθήνα, 18 Φεβρουαρίου 2021

Περίληψη

Οι λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMOs) αποτελούν μια νέα κατηγορία ενζύμων που έχει ανακαλυφθεί μόλις την προηγούμενη δεκαετία. Ο ρόλος τους θεωρείται πολύ σημαντικός στην αποδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μέσω ενός μοναδικού οξειδοαναγωγικού μηχανισμού, με την ερευνητική κοινότητα να στρέφει ολοένα και περισσότερο την προσοχή της στις LPMOs. Αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η διάσπαση α -1,4' ή β -1,4' γλυκοζιτικών δεσμών και ο σχηματισμός προϊόντων με C1- ή C4-οξειδωμένα άκρα. Οι LPMOs μπορούν να αξιοποιηθούν σε αρκετές βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως η αύξηση της απόδοσης της αποδόμησης της βιομάζας από την συνεργητική τους δράση με άλλα υδρολυτικά ένζυμα σε βιομηχανικές συνθήκες που απαιτούν σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά και η παραγωγή νέων καινοτόμων υλικών όπως η νανοκυτταρίνη. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η ετερόλογη έκφραση, η απομόνωση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός μιας μη χαρακτηρισμένης LPMO της οικογένειας AA9 από το γονιδίωμα του θερμοφίλου μύκητα *M. Thermophila*. Ο μύκητας περιέχει μια μεγάλη ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν υδρολυτικά ένζυμα, αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 45-50 °C και κατά την ανάπτυξη του σε υποστρώματα λιγνινοκυτταρίνης εκκρίνει εξωκυτταρικά σε μεγάλα επίπεδα AA9 LPMOs. Η αλληλουχία MYCTH_110651, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που μελετάται σε αυτή την εργασία, ανασύρθηκε βιοπληροφορικά από σχετικές βάσεις δεδομένων και περιέχει την λειτουργική περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων CBM1 (Carbohydrate-Binding Module Family 1). Μετά από την βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας, ακολούθησε η ετερόλογη έκφραση του γονιδίου με τη χρήση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pGAPZaC στη ζύμη *P. pastoris* και την αξιοποίηση του υποκινητή GAP σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παράχθηκε σε μεγάλη ποσότητα και απομονώθηκε αποτελεσματικά σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε ίσο με 55 kDa με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, έναντι του θεωρητικού μοριακού βάρους 34 kDa. Το παραπάνω σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό πιθανών θέσεων Ο-γλυκοζυλίωσης συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η *P. pastoris* υπεργλυκοζυλιώνει την πρωτεΐνη. Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου με ηλεκτροφόρηση IEF-PAGE έδωσε τρεις πρωτεϊνικές ζώνες σε ένα εύρος τιμών pI 5.4-6.4, κάτι το οποίο αποδίδεται στις ισομορφές της πρωτεΐνης που δημιουργούνται από τα διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης της *P. pastoris* κατά την μεταμεταφραστική τροποποίηση. Από την ανάλυση προϊόντων της ενζυμικής δράσης σε δέκα πολυσακχαρίτες με χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων HPAE-PAD, η πρωτεΐνη εμφανίζει χαρακτηριστική ενεργότητα στο υπόστρωμα κυτταρίνης διογκωμένης με φωσφορικό οξύ PASC επιβεβαιώνοντας τη βιβλιογραφία όσον αφορά την συσχέτιση της περιοχής CBM1 των AA9 με την ενεργότητα σε κρυσταλλικά υποστρώματα κυτταρίνης. Συμπληρωματικά, η LPMO φαίνεται να έχει μόνο C1-οξειδωτική δράση στην κυτταρίνη καθιστώντας τη κατάλληλη για εφαρμογές απομόνωσης νανοκυτταρίνης. Η ειδική ενεργότητα της πρωτεΐνης υπολογίστηκε ίση με 3.19 U/g σε συνθήκες pH = 6, 40 °C στο υπόστρωμα 2,6-DMP παρουσία H₂O₂. Οι τιμές των μεγεθών που προσδιορίστηκαν βρίσκονται σε όμοια επίπεδα με αυτά άλλων χαρακτηρισμένων AA9 LPMOs μυκητιακής προέλευσης της βιβλιογραφίας.

Λέξεις κλειδιά: LPMO, AA9, *M.thermophila*, CBM1, ετερόλογη έκφραση, *P. pastoris*, απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, βιοχημικός χαρακτηρισμός

Abstract

Lytic Polysaccharide Monooxygenases (LPMOs) are a novel class of enzymes discovered recently in the previous decade. Their role is considered very important in the degradation of lignocellulose biomass through a unique redox mechanism of high scientific and industrial interest. The result of their action is the cleavage of α -1,4 'or β -1,4' glycosidic bonds and the formation of C1- or C4- oxidized products. LPMOs can be utilized in several biotechnological applications such as increasing the efficiency of biomass degradation due to their synergistic action with other hydrolytic enzymes in industrial conditions that require stability at high temperatures and the production of new innovative materials like nanocellulose. The objective of this thesis was the heterologous expression, purification and biochemical characterization of an uncharacterized LPMO of the AA9 family from the genome of the thermophilic fungus *M. Thermophila*. This fungus contains a wide variety of genes encoding hydrolytic enzymes, it marks optimal growth at temperatures of 45-50 °C and several genes encoding AA9 proteins are highly upregulated on lignocellulosic substrates. The MYCTH_110651 sequence, which encodes the protein, was bioinformatically retrieved and contains the functional domain CBM1 (Carbohydrate-Binding Module Family 1). Bioinformatics analysis of the sequence was followed by heterologous expression of the gene using recombinant pGAPZaC plasmid vectors in *P. pastoris* host by utilizing the GAP promoter with glucose as a main carbon source. The recombinant protein was produced in large quantities and effectively purified on an immobilized metal affinity chromatography column (IMAC). The molecular weight of the recombinant protein was determined 55 kDa by SDS-PAGE electrophoresis and the theoretical molecular weight was calculated 34 kDa. The above-mentioned in combination with the large number of possible O-glycosylation sites proves that *P. pastoris* hyperglycosylates the protein. The isoelectric point determination was held by IEF-PAGE electrophoresis and showed three protein bands in the range of 5.4-6.4 pI values. This is attributed to the protein isoforms generated by the different glycosylation patterns of *P. pastoris* during post-translational modification. From the analysis of products of enzymatic activity on ten polysaccharides by the HPAE-PAD chromatography method, the protein shows high levels of activity on the PASC (Phosphoric acid swollen cellulose) confirming the literature in regard to the association of the CBM1 region of AA9 with activity on crystalline cellulose substrates. Additionally, this LPMO appears to produce only C1-oxidized products on cellulose making it suitable for nanocellulose production applications. The specific activity of the protein was calculated 3.19 U/ g at pH = 6, 40 °C conditions on 2,6-DMP substrate in the presence of H₂O₂. The values of the above-determined properties are at similar levels to other biochemically characterized AA9 LPMOs of fungal origin in the literature.

Keywords: LPMO, AA9, *M.thermophila*, CBM1, heterologous expression, *P. pastoris*, recombinant protein purification, biochemical characterization

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	15
1.1 Ο <i>Myceliophthora thermophila</i> ως πηγή ενζύμων για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	15
1.1.1 Χαρακτηριστικά των θερμόφιλων μυκήτων	15
1.1.2 Ο ασκομύκητας <i>Myceliophthora thermophila</i>	16
1.1.3 Οι βιοκαταλύτες με δράση λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών ως μέρος του λιγνινοκυτταρινολυτικού συστήματος του <i>M. Thermophila</i>	17
1.2 Οι βιοκαταλύτες με ενεργότητα λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών (LPMOs)	18
1.2.1 Η δομή των LPMOs.....	21
1.2.2 Ο μηχανισμός καταλυτικής δράσης των LPMOs	26
1.2.3 Η οικογένεια AA9 των βιοκαταλυτών LPMOs.....	33
1.3 Βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές των LPMOs	36
1.3.1 Η συνεργιστική δράση των LPMOs ως μέρος ενζυμικών συστημάτων αποδόμησης της βιομάζας	36
1.3.2 Η συνεισφορά των LPMOs σε διεργασίες παραγωγής άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας.....	37
1.3.3 Οι LPMOs ως εργαλεία δομικής τροποποίησης της βιομάζας για την παραγωγή νέων καινοτόμων υλικών	38
1.4 Το σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών της ζύμης <i>Pichia pastoris</i>	39
1.4.1 Χαρακτηριστικά του συστήματος έκφρασης <i>P. pastoris</i>	39
1.4.2 Μετασχηματισμός της ζύμης <i>P. pastoris</i> και ο υποκινητής GAP.....	40
1.4.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στον ευκαρυωτικό οργανισμό <i>P. pastoris</i> ...	42

1.5	Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	45
2.	Βιοπληροφορική μελέτη.....	46
2.1	Εύρεση γονιδίου AA9 LPMO σε βάσεις δεδομένων	46
2.2	Πρόβλεψη του σηματοδοτικού πεπτιδίου της πρωτεΐνης.....	48
2.3	Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης.....	49
2.4	Πρόβλεψη χαρακτηριστικών μεγεθών της πρωτεΐνης.....	52
2.5	Πρόβλεψη θέσεων γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης.....	53
2.6	Σύνοψη αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης του γονιδίου	54
3.	Υλικά και μέθοδοι	55
3.1	Συσκευές & όργανα	55
3.2	Αντιδραστήρια	57
3.2.1	Εμπορικά ένζυμα	57
3.2.2	Εμπορικά αντιδραστήρια και kits απομόνωσης πλασμιδίων	57
3.2.3	Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers)	58
3.3	Μικροοργανισμοί, θρεπτικά μέσα και καλλιέργειες.....	59
3.3.1	Στελέχη μικροοργανισμών.....	59
3.3.2	Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών <i>E. coli</i> & <i>P. pastoris</i>	59
3.3.3	Καλλιέργειες κυττάρων	62
3.3.3.1	Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	62
3.3.3.2	Καλλιέργειες κυττάρων ζύμης <i>P. pastoris</i> wild type X-33	62
3.4	Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης	64
3.4.1	Ο πλασμιδιακός φορέας pGAPZaC (Invitrogen)	64
3.5	Μοριακές τεχνικές DNA	67

3.5.1	Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες	67
3.5.2	Μετασχηματισμός κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pGAPZaC.....	68
3.5.3	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	70
3.5.3.1	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με χρήση χλωριούχου ασβεστίου (CaCl ₂)	71
3.5.3.2	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με Θερμικό Σοκ (Heat Shock)	71
3.5.3.3	Επιλογή ανασυνδυασμένων στελεχών <i>E. coli</i> και ανάπτυξή τους για την απομόνωση ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA	72
3.5.3.4	Πέψη πλασμιδίων και ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση του επιτυχούς ανασυνδυασμού	72
3.5.4	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	74
3.5.4.1	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	75
3.5.4.2	Γραμμικοποίηση (Linearization) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGAPZaC.....	75
3.5.4.3	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης <i>P. pastoris</i> X33 με Ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation).....	76
3.6	Επιλογή ανασυνδυασμένου στελέχους, παραγωγή και απομόνωση ενζύμου	77
3.6.1	Δοκιμές ενεργότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό των μετασχηματισμένων στελεχών (plate assays)	77
3.6.2	Έκφραση σε προκαλλιέργειες και επιλογή τελικού κλώνου.....	79
3.6.3	Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης	81
3.6.4	Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου της καλλιέργειας <i>P. pastoris</i>	81
3.6.5	Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακινητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC).....	86
3.6.6	Ποσοτικός προσδιορισμός παραληφθείσας πρωτεΐνης.....	90
3.6.6.1	Χρωματομετρική μέθοδος Bradford.....	90
3.6.6.2	Φασματοσκοπική μέθοδος.....	91
3.7	Μέθοδοι ανάλυσης και βιοχημικού χαρακτηρισμού	92

3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	92
3.7.1.1 Απογλυκοζυλίωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	92
3.7.1.2 Ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE	94
3.7.1.3 Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	101
3.7.2 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης IEF-PAGE	102
3.7.3 Ανίχνευση ενζυμικής δράσης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών	103
3.7.3.1 Αρχή της χρωματογραφικής μεθόδου ΗΡΑΕ-PAD.....	104
3.7.3.2 Η πειραματική διάταξη της χρωματογραφίας ΗΡΑΕ-PAD	105
3.7.3.3 Χαρακτηριστικά υποστρωμάτων και η προετοιμασία τους πριν την δημιουργία διαλυμάτων ενζυμικών αντιδράσεων.....	105
3.7.3.4 Προετοιμασία και επώαση ενζυμικών αντιδράσεων.....	114
3.7.3.5 Ανάλυση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών.....	116
3.7.4 Φασματοφωτομετρική μέθοδος για την επιβεβαίωση της ύπαρξης ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	118

4. Αποτελέσματα.....121

4.1 Επιβεβαίωση της παραλαβής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	121
4.2 Ετερόλογη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα ζύμης <i>P. pastoris</i> X33 .	122
4.2.1 Δοκιμές ενεργότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό των μετασηματισμένων στελεχών (plate assays)	123
4.2.1.1 Δοκιμή καλλιέργειας σε τρυβλία παρουσία αντιβιοτικού (Zeocin Plate Assays).....	123
4.2.1.2 Δοκιμή ενεργότητας σε τρυβλία παρουσία υποστρωμάτων (PASC & DMP Plate Assays)	125
4.2.2 Έκφραση και προσδιορισμός της παραγωγικότητας των μετασηματισμένων στελεχών.....	126
4.3 Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης	128
4.3.1 Υπολογισμός συγκέντρωσης της απομονωμένης πρωτεΐνης	129
4.3.2 Έλεγχος των σταδίων απομόνωσης πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE.....	130

4.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του ανασυνδυασμένου ενζύμου LPMO	
AA9.....	132
4.4.1 Εύρεση του μοριακού βάρους της παραληφθείσας πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE	132
4.4.2 Έλεγχος του μοριακού βάρους της γλυκοζυλιωμένης και απογλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης.....	133
4.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για την εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου (IEF- PAGE).....	134
4.4.4 Ανίχνευση ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών	136
4.4.5 Επιβεβαίωση της ύπαρξης ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με φασματοφωτομετρική μέθοδο	143
4.4.6 Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας στο υπόστρωμα 2,6-DMP	147
5. Συμπεράσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων.....	149
Βιβλιογραφία.....	154

1. Εισαγωγή

1.1 Ο *Myceliophthora thermophila* ως πηγή ενζύμων για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

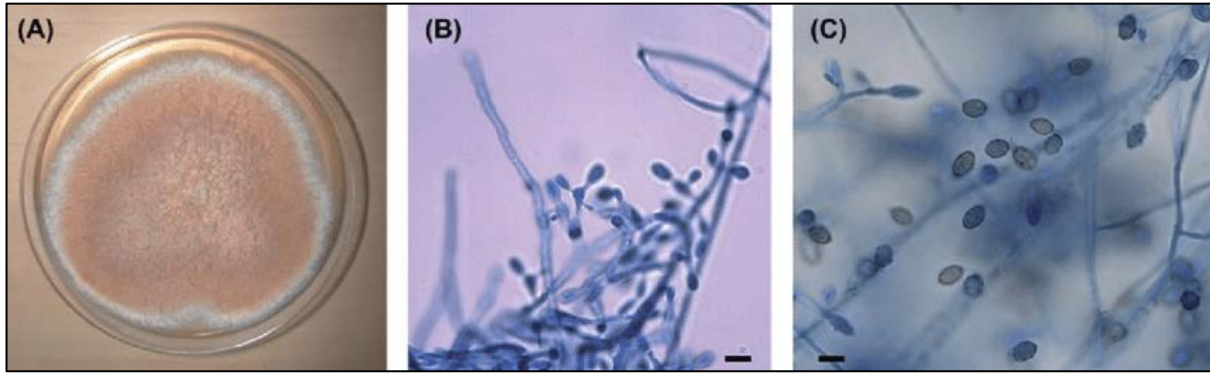
1.1.1 Χαρακτηριστικά των θερμόφιλων μυκήτων

Οι θερμόφιλοι μύκητες συγκαταλέγονται σε μια από τις πιο βασικές ομάδες μικροοργανισμών που αποικοδομούν της φυτική -λιγνινοκυτταρινούχο- βιομάζα, έχοντας αναπτύξει πολύπλοκα συστήματα προσαρμογής στο φυσικό τους περιβάλλον. Η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα περιλαμβάνει κυτταρίνη και ημικυτταρίνη συνδεδεμένη πολύ στενά με τη λιγνίνη (van Gool et al., 2013). Για την επίτευξη της αποικοδόμησης αυτών των υποστρωμάτων, οι μύκητες επιστρατεύουν υδρολυτικούς και οξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την έκκριση στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και τον συνεργειτισμό μιας ευρείας ποικιλίας ενζύμων, με την βιοτεχνολογική χρησιμότητα τους να αναγνωρίζεται εδώ και πολλά χρόνια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν μια δεξαμενή θερμοσταθερών ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τη φυτική βιομάζα με αυξημένους καταλυτικούς ρυθμούς αλλά και σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (Singh & Satyanarayana, 2011), μερικά εκ των οποίων έως και 70-80 °C (Margaritis & Merchant, 1986). Η ταχεία, αποτελεσματική και ισχυρή αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών της βιομάζας αποτελεί επί του παρόντος σημαντική πρόκληση για την αξιοποίησή τους στη βιομηχανία. Προαπαιτούμενο είναι η διαθεσιμότητα ενζύμων που υδρολύουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες σε ζυμώσιμα σάκχαρα σε συνθήκες κατάλληλες για βιομηχανική χρήση (Berka et al., 2011, Karnaouri et al., 2013). Η πλήρης σακχαροποίηση της βιομάζας των φυτών σε ζυμώσιμα σάκχαρα απαιτεί μεγάλους χρόνους αντίδρασης, κάτι που την καθιστά επιρρεπή σε μόλυνσεις (McClendon et al., 2012). Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν αυξάνοντας τη θερμοκρασία αντίδρασης. Ωστόσο, η εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών απαιτεί την ανάγκη για ένζυμα που είναι περισσότερο σταθερά σε αυτές τις συνθήκες σε σχέση με τα διαθέσιμα ένζυμα μεσόφιλων μυκήτων. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι υψηλές θερμοκρασίες βοηθούν στην διαλυτοποίηση ορισμένων συστατικών αλλά και τη μείωση του ιξώδους του πολτού της βιομάζας, τα θερμόφιλα ένζυμα αποκτούν ένα ακόμα πλεονέκτημα.

1.1.2 Ο ασκομύκητας *Myceliophthora thermophila*

Ο *Myceliophthora thermophila* (παλαιότερη ονομασία *Sporotrichum thermophile*, νεότερη ονομασία *Thermothelomyces thermophilus*) είναι ένας θερμόφιλος νηματοειδής ασκομύκητας και αποτελεί έναν πολύ ισχυρό κυτταρινολυτικό μικροοργανισμό που συνθέτει ένα πλήρες σύνολο ενζύμων απαραίτητων για την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών (Bhat et al., 1987). Συχνά εντοπίζεται στο έδαφος, σε χώμα ή φυτική βιομάζα προς αποσύνθεση και μπορεί να αναπτυχθεί σε διάμετρο έως και 9 cm μετά την επώαση 3 ημερών στους 45 °C σε εκχύλισμα βύνης ή ΥρSs Άγαρ ενώ οι ώριμες αποικίες του έχουν ανοιχτό καφέ χρώμα και μορφή σκόνης. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες μεταξύ 25-55 °C με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης να εντοπίζεται στους 45 °C (Domsch et al., 1993). Σε θρεπτικό υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη μπορεί να αναπτύσσεται με ρυθμούς 0.11 h⁻¹ (30 °C) και 0.23 h⁻¹ (50 °C). Η ικανότητα του να αναπτύσσεται με όμοιο ρυθμό χρησιμοποιώντας την κυτταρίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα 0.09 h⁻¹ (30 °C) και 0.16 h⁻¹ (50 °C), αποδεικνύει ότι αποτελεί έναν ισχυρό κυτταρινολυτικό μικροοργανισμό (Maheswari et al., 1987).

Το γονιδίωμα του *M. thermophila* έχει πρόσφατα αλληλουχηθεί και αναλυθεί πλήρως (Berka et al., 2011), επιτρέποντας την συστηματική εξέταση και ταυτοποίηση ενζύμων αλλά και των μηχανισμών του που σχετίζονται με την αποικοδόμηση της λινινοκυτταρίνης. Έχει μέγεθος 38.7 Mb, περιλαμβάνει περίπου 9500 γονίδια και είναι οργανωμένο σε συνολικά 7 χρωμοσώματα. Η γονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μεγάλου εύρους ενζύμων που του επιτρέπουν να αναπτύσσεται σε μια ποικιλία υποστρωμάτων και περιλαμβάνει πολλές κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και ένζυμα με βοηθητική ενεργότητα (auxiliary activity), καλύπτοντας έτσι το μεγαλύτερο μέρος των αναγνωρισμένων οικογενειών της βάσης δεδομένων CAZy (Carbohydrate-Active enZymes, <http://www.cazy.org>), που περιέχει ταξινομημένες πρωτεΐνες με ενεργότητα σε υδατάνθρακες. Οι περισσότερες από αυτές εκκρίνονται εξωκυτταρικά, καθώς περιέχουν σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης και μπορούν να υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις γλυκοζυλίωσης (Karnaouri et al., 2014). Οι πρωτεΐνες αυτές υπολογίζονται βιοπληροφορικά σε 683 με τουλάχιστον 200 εξ'αυτών να έχει ταυτοποιηθεί ότι συμμετέχουν αποκλειστικά σε ενζυμικές αντιδράσεις υδατανθράκων (CAZymes). Η ύπαρξη υψηλού περιεχομένου GC νουκελοτιδίων (Γουανίνη-Κυτοσίνη) σε περιοχές κωδικοποίησης των αλληλουχιών του *M. thermophila* συνδέεται πιθανώς με τον θερμόφιλο χαρακτήρα των πρωτεϊνών, λόγω της συσχέτισης του με τον σχηματισμό περισσότερων δισουλφιδικών δεσμών στο πεπτιδικό μόριο (Berka et al., 2011). Σε αρκετές περιπτώσεις, η προσθήκη μεμονωμένων κυτταρινολυτικών ενζύμων του *M. thermophila* σε τεχνητά μίγματα ενζύμων από διαφορετικούς μύκητες, έχει αυξήσει την απόδοση των προϊόντων της ενζυμικής δράσης (Rosgaard et al., 2006), κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε συνεργιστικό τρόπο δράσης μεταξύ τους (Zhang et al., 2013).



Εικόνα 1.1. Μορφολογία της ανάπτυξης αποικιών του *M. thermophila* σε τρυβλίο Petri (α), και μικροσκοπική (5 μm) απεικόνιση της μορφολογίας των κονιδίων του μύκητα σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (β), (γ). (Morio et al., 2011)

1.1.3 Οι βιοκαταλύτες με δράση λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών ως μέρος του λιγνινοκυτταρινολυτικού συστήματος του *M. Thermophila*

Μέχρι πρότινος, ως βασικά ένζυμα του μύκητα που συμμετέχουν στην αποδόμηση κυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα, θεωρούνταν οι ενδογλουκανάσες (endoglucanase, EG), οι κελλοβιοϋδρολάσες (cellulohydrolase, CBH) και οι β-γλυκοσιδάσες (β-glucosidase, βG), ενώ όσον αφορά την αποδόμηση της ημικυτταρίνης υπάρχει μια πληθώρα ενζύμων όπως οι ξυλανάσες, ξυλοσιδάσες, εστεράσες του φερουλικού οξέος, εστεράσες του οξικού οξέος, εστεράσες του γλυκουρονικού οξέος, μαννανάσες, αραβινάσες κ.α. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι ένζυμα που υπάγονται στην κατηγορία «βοηθητικών ενεργοτήτων» (AA-Auxiliary Activities), όπως η AA9 που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, εμφανίζουν ενεργότητα λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών (lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO) και έχουν ουσιαστική επίδραση όταν συνδυάζονται με κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες με υδρολυτική δράση (Karnaouri et al., 2017). Σήμερα, είναι γνωστό ότι παραπάνω από 30 γονίδια του *M. thermophila* κωδικοποιούν πρωτεΐνες με βοηθητικές ενεργότητες. Οι πρωτεΐνες που είχαν ταξινομηθεί παλαιότερα ως οικογένεια GH61 (glycoside hydrolases) λόγω ομοιότητας με τα ένζυμα που εμφανίζουν ενεργότητα ενδογλουκανάσης, σήμερα αποτελούν την οικογένεια AA9 στην βάση δεδομένων CAZy. Ο *M. thermophila* παρουσιάζει έναν εντυπωσιακό αριθμό ενζύμων AA9 που διαθέτουν περιοχές δέσμησης σε υδατάνθρακες (CBM-Carbohydrate binding modules). Παράδειγμα αποτελεί η μονάδα CBM1 που παρουσιάζει χαρακτηριστική λειτουργικότητα δέσμησης σε κρυσταλλικά υποστρώματα κυτταρίνης και εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ένζυμα μυκητιακής προέλευσης (Guillén et al., 2009), ενώ μάλιστα αποτελεί την χαρακτηριστική περιοχή που εμφανίζεται με την μεγαλύτερη συχνότητα στους μύκητες (Berka et al., 2011). Όσον αφορά τις αλληλουχίες οικογενειών LPMO του *M. Thermophila*, στην βάση δεδομένων CAZy καταγράφονται 22 αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με πιθανή δράση AA9, 4 αλληλουχίες για AA11, 1 αλληλουχία για AA13 και 3 αλληλουχίες για AA16 με χαρακτηριστική λειτουργικότητα δέσμησης CBM1. Την σημασία των πρωτεϊνών AA9 έχουν αναδείξει παλαιότερες μελέτες, όταν αυτές ήταν ταξινομημένες ακόμα ως GH61 ή ως ένζυμα με άγνωστη λειτουργία.

Μελετώντας την ανάπτυξη του *M. thermophila* σε πολυπλοκότερα υποστρώματα από τη γλυκόζη με βάση την ανάλυση μεταγράφων (transcriptomes) του, βρέθηκε ότι η ρύθμιση της έκφρασης οδήγησε σε αύξηση της ποσότητας πολλών εκκρινόμενων ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των AA και πρωτεϊνών με άγνωστη λειτουργία, υποδεικνύοντας τον κρίσιμο τους ρόλο στην αποικοδόμηση της λινινοκυτταρίνης. Σε σύγκριση με τον *Trichoderma reesei*, έναν μικροοργανισμό πρότυπο για την παραγωγή κυτταρινασών, ο *M. thermophila* έχει παρόμοια ομόλογα γονίδια πρωτεϊνών GH. Μια σημαντική διαφορά του *M. thermophila*, είναι ότι περιέχει σε σαφώς μεγαλύτερη έκταση γονίδια της οικογένειας GH61 (σήμερα AA9), αλλά λιγότερα των GH10 και GH11 οι οποίες κωδικοποιούν κυρίως ένζυμα με ενεργότητα διάσπασης της ξυλάνης. Το γεγονός ότι αυτός ο οργανισμός έχει διατηρήσει εξελικτικά μια διαφορετική σειρά γονιδίων AA9, υποδηλώνει την σημασία τους για την αποδόμηση της βιομάζας δρώντας πιθανώς σε πολλά υποστρώματα με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες (Berka et al., 2011). Η ανάλυση του γονιδιώματος του *M. thermophila*, ανέδειξε συνολικά 25 γονίδια LPMOs AA9, έναν εντυπωσιακό αριθμό συγκριτικά με ένζυμα άλλων οικογενειών (Karnaouri et al., 2014).

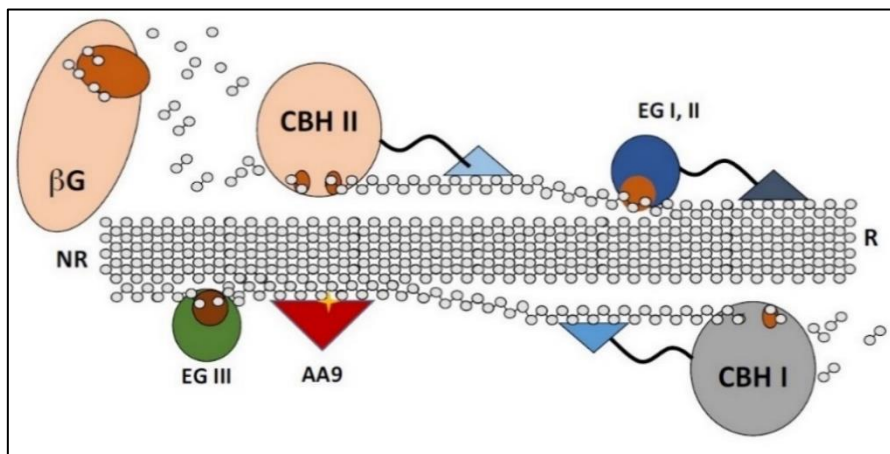
1.2 Οι βιοκαταλύτες με ενεργότητα λυτικής μονοοξυγενάσης των πολυσακχαριτών (LPMOs)

Οι λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMOs) είναι σχετικά νέα ένζυμα που έχουν ανακαλυφθεί στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας (Vaaje-Kolstad et al., 2010) και θεωρούνται πολύ σημαντικά τόσο από επιστημονικής όσο και από βιομηχανικής άποψης. Περιλαμβάνουν μια διαφορετική ομάδα ενζύμων που διαδραματίζουν έναν κομβικό, αλλά ακόμα όχι πλήρως διασαφηνισμένο, ρόλο στον αποπολυμερισμό βιοπολυμερών σακχάρων. Αν και τα πρώτα χρόνια, κύρια πηγή αυτών των ενζύμων αποτελούσαν οι μύκητες και τα βακτήρια, πλέον έχει διαπιστωθεί ότι οι LPMOs υπάρχουν σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες οργανισμών συμπεριλαμβανομένων ιών, ζώων και φυτών (Levasseur et al., 2013). Με τον όρο «λυτικές» προσδιορίζεται η ικανότητα τους να διασπούν και να απελευθερώνουν αλυσίδες πολυσακχαριτών, ενώ ως μονοοξυγενάσες καταλύουν την οξειδωση υποστρωμάτων με την ενσωμάτωση σε αυτά ενός ατόμου οξυγόνου μέσω μιας πληθώρας μεταβολικών μονοπατιών. Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές διεργασίες (redox enzymes) και έχουν ως κοινό γνώρισμα ένα μοναδικό τρόπο οξειδωτικής διάσπασης γλυκοζιτικών δεσμών μιας πληθώρας πολυμερικών υδατανθράκων με χρήση μοριακού οξυγόνου (O_2) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα μικρού μοριακού βάρους ως εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων (Hangasky et al., 2018). Οι LPMOs χαρακτηρίζονται και ως μεταλλοένζυμα, με τον οξειδωτικό τους μηχανισμό να περαιώνεται μέσω ενός δισθενούς μεταλλικού ιόντος συγκεκριμένης συναρμογής στο χώρο με τη βοήθεια κατάλοιπων ιστιδίνης που σχηματίζουν μια δομή τύπου «βραχίονα» (βραχίονας ιστιδίνης, histidine-brace) και δημιουργούν μια χαρακτηριστική καταλυτική επιφάνεια. Το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ένα ιόν χαλκού (Cu^{2+}) που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Kuusk et al.,

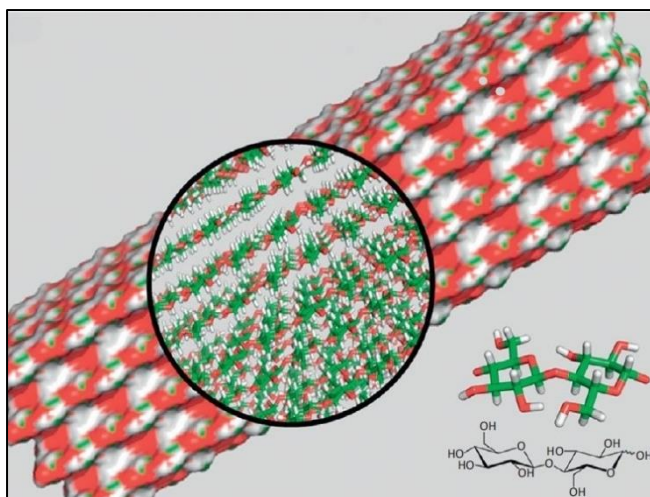
2018), ενώ ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι η αναδίπλωση της πεπτιδικής τους αλυσίδας με δευτεροταγή δομή β-πτυχωτού φύλλου όπως αυτή της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin-like β-sandwich fold) (Quinlan et al., 2011). Αν και ο πλήρης μηχανισμός δράσης τους δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, η δράση των LPMOs οδηγεί στην απελευθέρωση προϊόντων με C1 ή/και C4 οξειδωμένα άκρα. Οι LPMOs είναι γνωστές για την αποδόμηση διαφορετικών πολυσακχαριτών που πρωτίστως διαθέτουν α-1,4' ή β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς στη κύρια πολυμερική αλυσίδα που έχει ως βάση την γλυκόζη ή τη χιτίνη, ενώ πολλές LPMOs κυρίως με δράση C4, δρουν και σε ολιγοσακχαρίτες. Τα κυριότερα υποστρώματα που αποδομούν οι LPMOs είναι τα ακόλουθα: κυτταρίνη, χιτίνη, ξυλάνη, ξυλογλυκάνη, γλυκομαννάνη, β-γλυκάνη και άμυλο (Hemsworth et al., 2013). Η μεγάλη ποικιλία αλληλουχιών, η παρατηρούμενη διαφοροποίηση της εξειδίκευσης τους σε υποστρώματα όπως και το γεγονός ότι οι LPMOs απαντώνται σε πληθώρα οργανισμών στη φύση καταδεικνύουν ότι οι LPMOs μπορεί να εμπλέκονται και σε άλλες βιολογικές διεργασίες πέραν της αποδόμησης της βιομάζας, όπως η πέψη των τροφών και η λειτουργικότητα ιών και βακτηρίων (Paspaliari et al. 2015).

Για την καλύτερη κατανόηση του πλαισίου δράσης τους πρέπει να ανατρέξουμε στο παρελθόν, όταν η ύπαρξη των LPMOs ήταν ακόμα άγνωστη. Η ενζυμική αποδόμηση της κυτταρίνης μελετήθηκε πρώτη φορά λεπτομερώς με την απομόνωση και την ανάλυση των ενζύμων που εκκρίνουν μύκητες οι οποίοι καταστρέφουν βαμβακερά υλικά. Η έρευνα αυτή, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι διαφορετικοί τύποι υδρολυτικών ενζύμων πρέπει να δράσουν συνδυαστικά για την αποδόμηση της κυτταρίνης στο μονομερές δομικό στοιχείο της, την γλυκόζη. Στην πορεία, διαπιστώθηκε ότι απαιτούνται τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τύποι ενζύμων για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος, όμως ο συνδυασμός αυτών ήταν λιγότερο αποδοτικός συγκριτικά με την χρήση ενός μη διαχωρισμένου ενζυμικού μίγματος εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Παραδοσιακά, τέτοια ενζυμικά συστήματα διάσπασης πολυσακχαριτών περιέχουν πρωτεΐνες που διασπούν εσωτερικούς δεσμούς της υδατανθρακικής αλυσίδας (endo-acting enzymes) και ένζυμα που αποδομούν την αλυσίδα στους δεσμούς των ελεύθερων άκρων της (exo-acting enzymes). Οι βασικές κατηγορίες γνωστών υδρολυτικών ενζύμων της κυτταρίνης είναι οι ενδογλουκανάσες (EG), οι κελλοβιουδρολάσες (BH) και οι β-γλυκοσιδάσες (βG). Τα ένζυμα αυτά, είναι πλέον αποδεκτό, ότι δρουν συνεργιστικά για την αποτελεσματική υδρόλυση της βιομάζας. Παρά το γεγονός ότι αυτό το μοντέλο είναι κοινώς αποδεκτό, παραμένει δύσκολη η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο αυτά τα ένζυμα επιδρούν σε περιβάλλον υψηλής κρυσταλλικότητας. Η στενή και ισχυρή σύνδεση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργεί ένα συμπαγές κρυσταλλικό υπόστρωμα που δυσχεραίνει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων και αυξάνει τις ενεργειακές απαιτήσεις για την επίτευξη της διάσπασης του. Το 2010 διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη κάποιων ενζύμων τα οποία έως τότε θεωρούνταν υδρολάσες των γλυκοζιτών, ενισχύει και επιταχύνει σε μεγάλο βαθμό ενζυμικά μίγματα κλασικών κυτταρινασών και ημικυτταρινασών στην αποδόμηση της βιομάζας λειτουργώντας σε μια συνεργιστική δράση. Περαιτέρω μελέτες υπέδειξαν μια οξειδωτική δράση που συνδέεται με την ύπαρξη ενός μεταλλικού παράγοντα, η οποία δημιουργεί νέα ελεύθερα άκρα αλυσίδων σε κρυσταλλικές περιοχές, ανοίγοντας τον δρόμο για την δράση συμβατικών υδρολυτικών ενζύμων σε περιοχές πολυσακχαριτών που είναι

δυσπρόσιτες (Harris et al., 2010). Έτσι, αν και μέχρι πρότινος η διάσπαση γλυκοζιτικών δεσμών είχε αποδοθεί σχεδόν αποκλειστικά σε υδρολάσες, ανακαλύφθηκε μια νέα κατηγορία οξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχει άμεσα και εξειδικευμένα στον αποπολυμερισμό των πολυσακχαριτών, οι LPMOs. Με αφορμή την ανακάλυψη ότι οι οικογένειες ενζύμων GH61 και CBM33 είναι στην πραγματικότητα LPMOs, το 2013, έγινε επαναταξινόμηση των LPMOs και τοποθέτησή τους στις οικογένειες ενζύμων βοηθητικής ενεργότητας της βάσης δεδομένων CAZy. Η CAZy αποτελεί μια βάση δεδομένων που περιέχει ταξινομημένα μαζί με σχετικές πληροφορίες ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση, τον μεταβολισμό και την αναγνώριση σύνθετων υδατανθράκων. Όπως όλες οι οικογένειες της CAZy, κάθε οικογένεια AA περιέχει ένζυμα με όμοιες αμινοξικές αλληλουχίες ενός ή περισσότερων βιοχημικά χαρακτηρισμένων ενζύμων της κατηγορίας. Με αυτό τον τρόπο, εξασφαλίζεται ότι τα μέλη μιας δεδομένης οικογένειας μοιράζονται την ίδια τρισδιάστατη δομή. Οι οικογένειες AA της CAZy περιέχουν οξειδοαναγωγικά ένζυμα που πιθανώς εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των φυτικών κυττάρων μέσω της ικανότητας να βοηθούν τα συμβατικά υδρολυτικά ένζυμα δίνοντας τους πρόσβαση στους υδατάνθρακες που αποτελούν το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (Levasseur et al., 2013). Έως το 2019, οι LPMOs είχαν καταταχθεί στις έξι ακόλουθες οικογένειες AA: AA9-AA11 και AA13-AA15, ενώ πλέον σε αυτές εντάσσεται και η AA16 με βάση αρκετές δημοσιεύσεις (Filiatrault-Chastel et al., 2019). Πρέπει να σημειωθεί, ότι το ένζυμο που πρόκειται να μελετηθεί στην παρούσα εργασία ανήκει στην οικογένεια AA9. Μαζί με τα ένζυμα AA10 (τέως CBM33), οι AA9 (τέως GH61) ήταν αυτά που κίνησαν πρώτα το ενδιαφέρον των ερευνών και οδήγησαν στην ανακάλυψη των LPMOs.



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αποδόμησης της κυτταρίνης από την συνεργιστική δράση κυτταρινασών μαζί με LPMO AA9. Σε πρώτο στάδιο η LPMO διασπά στοχευμένα γλυκοζιτικούς δεσμούς στο υπόστρωμα υψηλής κρυσταλλικότητας δημιουργώντας πεδίο δράσης για τις ενδογλουκανάσες (EG). Αυτές προσβάλλουν περιοχές χαμηλής κρυσταλλικότητας διασπώντας εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς και δημιουργούν αλυσίδες με ελεύθερα αναγωγικά και μη άκρα. Σε αυτά τα άκρα των αλυσίδων κυτταρίνης δρουν οι κελλοβιουδρολάσες (CBH) απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Η απελευθέρωση του τελικού μονομερούς γλυκόζης προκύπτει από τη δράση ενζύμων β-γλυκοσιδάσης (βG) στο διμερές μόριο κελλοβιόζης (Johansen, 2016).



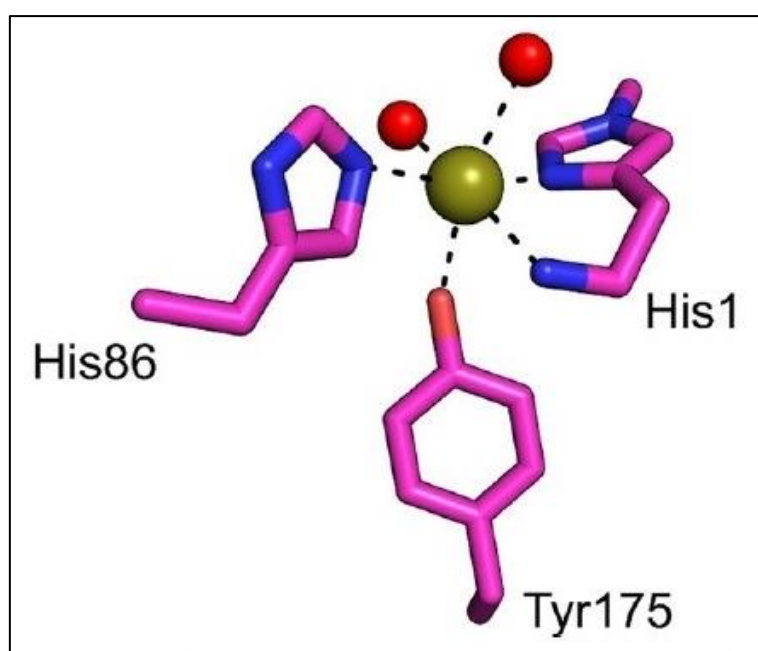
Εικόνα 1.3. Η κρυσταλλική δομή φυσικής διαμόρφωσης της κυτταρίνης. Πολλοί γραμμικοί πολυσακχαρίτες κυτταρίνης ενώνονται ισχυρά μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου δημιουργώντας μια συχνά απροσπέλαστη για τα υδρολυτικά ένζυμα, δομή υψηλής κρυσταλλικότητας. Δεξιά, παρουσιάζεται η δομική μονάδα της κυτταρίνης, η κελλοβιόζη, η οποία είναι ένας δισακχαρίτης β-D-γλυκόζης με γλυκοζιτικό δεσμό β-1,4' (Johansen, 2016)

1.2.1 Η δομή των LPMOs

Βασικό χαρακτηριστικό της δομής των LPMOs είναι ότι αποτελούνται από ένα δισθενές μεταλλικό ιόν χαλκού (Cu^{2+}), το οποίο έχει συγκεκριμένη συναρμογή στο χώρο που καθορίζεται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης που σχηματίζουν μια δομή τύπου «βραχίονα» (histidine brace). Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα μέσω των ατόμων αζώτου της ιστιδίνης (His). Πιο συγκεκριμένα, μια από τις δυο ιστιδίνες αποτελεί το αμινοτελικό άκρο (N-terminus) της ώριμης πρωτεΐνης, δηλαδή το πρώτο αμινοξύ της πεπτιδικής αλυσίδας με ελεύθερο αμιδικό άκρο μετά και την αφαίρεση του σηματοδοτικού πεπτιδίου (native signal peptide) κατά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Το παραπάνω κατάλοιπο (His1) συμβάλλει τόσο με την αμινοτελική αμινομάδα όσο και με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας του, ενώ η δεύτερη ιστιδίνη συμβάλλει μόνο με την πλευρική της αλυσίδα. Η δομή αυτή, σε ένα μεγάλο πλήθος LPMOs, χαρακτηρίζεται από την δημιουργία ενός επίπεδου καταλυτικού κέντρου στην επιφάνεια της δομής του ενζύμου, δηλαδή εκεί εντοπίζεται το μεταλλικό ιόν. Αντιθέτως, το ενεργό κέντρο των συμβατικών υδρολασών της κυτταρίνης διέπεται από μια διαφορετική γεωμετρία, στο εσωτερικό της οποίας υπάρχουν συντηρημένα καρβοξυλικά οξέα αμινοξέων που συμμετέχουν στην διάσπαση των δεσμών (Aachmann FL et al., 2012). Ειδικότερα, το ενεργό κέντρο των υδρολασών βρίσκεται εσωτερικά, σε μια σχισμή (cleft) του μορίου ή η θέση του μπορεί να έχει τη μορφή σήραγγας (tunnel), σε αντίθεση με τις LPMOs όπου το ενεργό κέντρο βρίσκεται επιφανειακά και είναι εκτεθειμένο στο διαλύτη (solvent-exposed). Στην διαφορά της μορφολογίας μεταξύ των καταλυτικών κέντρων αυτών των δυο κατηγοριών ενζύμων, είναι πιθανό να αποδίδεται η ιδιαίτερη ικανότητα των LPMOs να δρούν σε συμπαγείς και άκαμπτες κρυσταλλικές περιοχές υποστρωμάτων.

Σε συνδυασμό με τα αρωματικά κατάλοιπα ιστιδίνης, υπάρχουν και άλλα αμινοξικά κατάλοιπα στην αλληλουχία των LPMOs τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Ανάμεσα στις διαφορετικές οικογένειες AA των LPMOs παρατηρείται η παρουσία διαφορετικών αμινοξέων, τόσο σε περιοχές που βρίσκονται κοντά

στο ενεργό κέντρο, όσο και σε πιο απομακρυσμένες, μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά του. Παραδείγματος χάρη, όλα τα έως τώρα δομικά χαρακτηρισμένα ένζυμα των οικογενειών AA9, AA11 και AA13 διαθέτουν ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr), με το υδροξύλιο του να συμμετέχει στη συναρμογή του ιόντος χαλκού. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας AA10, διαθέτουν το αμινοξυ φαινυλαλανίνη (Phe) αντί της τυροσίνης, ενώ ένα κατάλοιπο αλανίνης (Ala) εντοπίζεται δίπλα στη μια από τις ιστιδίνες του ενεργού κέντρου (Hemsworth et al., 2013). Στα μόρια των οικογενειών AA9 και AA13 υπάρχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο γλουταμίνης (Gln) συνδεδεμένο με δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο τυροσίνης του ενεργού κέντρου. Ο συνδυασμός αυτός διαφοροποιεί τη δομή συναρμογής του ενεργού κέντρου των AA10 σε σχέση με άλλες οικογένειες, κάτι το οποίο ενδεχομένως συνδέεται με τη δράση των ενζύμων σε ένα πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων.



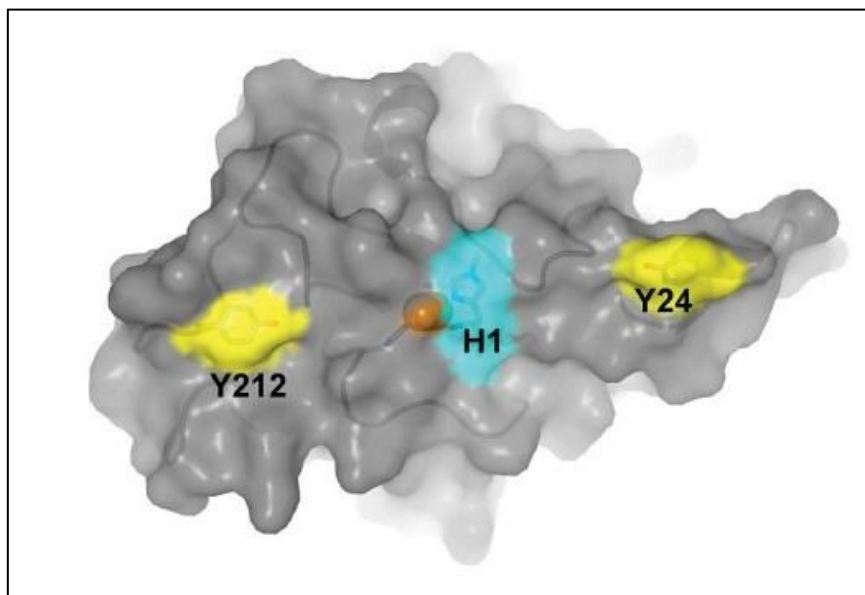
Εικόνα 1.4. Τρισδιάστατη δομή του καταλυτικού κέντρου μιας τυπικής LPMO. Τα δυο κατάλοιπα Ιστιδίνης (His1 και His86) σχηματίζουν το “βραχίονα ιστιδίνης” (Histidine Brace) και σε συνδυασμό με ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr175) δίνουν συγκεκριμένη συναρμογή στο άτομο χαλκού (χρυσή σφαίρα). Σε άλλες οικογένειες AA των LPMOs αντί της τυροσίνης μπορεί να είναι κάποιο άλλο αμινοξύ. Με μπλέ χρώμα διακρίνονται τα άτομα αζώτου των καταλοίπων ιστιδίνης, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται δυο μόρια νερού σε συναρμογή με το δισθενές ιόν χαλκού (Cu^{2+}). Όπως φαίνεται, η ιστιδίνη του αμινοτελικού άκρου (His1) συμβάλλει στη συναρμογή του χαλκού με την αμινομάδα της, ενώ οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι των πλευρικών ομάδων και των δυο καταλοίπων συμμετέχουν σε αυτή. Η συγκεκριμένη δομή ανήκει στο ένζυμο AA9 TaLPMO9A του μύκητα *Thermoascus aurantiacus* (Eijsink et al., 2019)

Παράλληλα, στον καταλυτικό μηχανισμό φαίνεται να συμβάλλει ένα συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο κοντά στο ιόν του χαλκού. Αυτό μπορεί να είναι γλουταμινικό οξύ (Glu), γλουταμίνη (Gln) ή τρυπτοφάνη (Try), που εντοπίζεται σε διαφορετικές θέσεις του μορίου των LPMOs και εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του ενεργού κέντρου με το συμπαράγοντα (O_2 ή H_2O_2) που απαιτείται για την δράση των LPMOs (Wang et al., 2018)

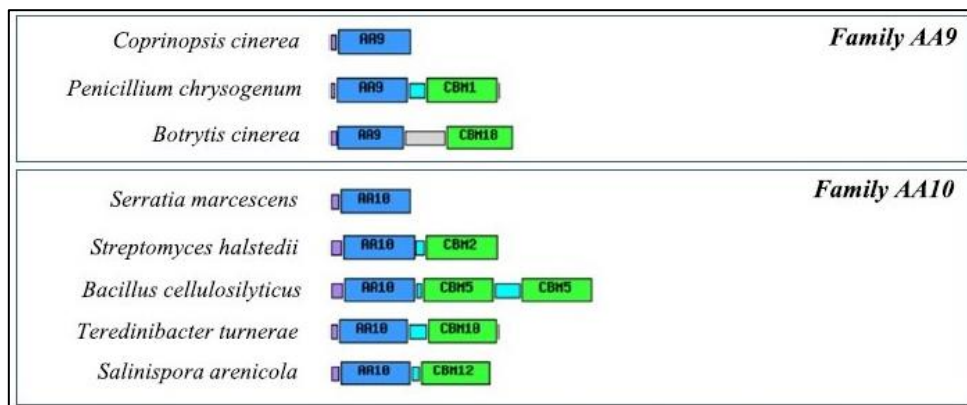
Οι LPMOs που προέρχονται από μύκητες εμφανίζουν μεθυλίωση του αμινοξέος His1, ως αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η έκφραση σε βακτήρια *E. coli* αλλά και στον ευκαρυωτικό οργανισμό *P. pastoris* παράγει πρωτεΐνες που δεν έχουν τη συγκεκριμένη μεθυλίωση. Πειράματα έχουν δείξει ότι αυτή η μεθυλίωση έχει μικρή, αν όχι μηδενική, επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου. Εικάζεται ότι ο ρόλος της μεθυλίωσης εμπλέκεται στην προστασία έναντι της αυτο-οξειδωτικής απενεργοποίησης των LPMOs (Petrovic et al., 2018).

Παρά τις όποιες διαφοροποιήσεις ανάμεσα τους, οι LPMOs διαθέτουν μια γενικευμένη δομή με κοινά χαρακτηριστικά, όπως η αναδίπλωση της πεπτιδικής τους αλυσίδας με δευτεροταγή δομή β-πτυχωτού φύλλου όμοια της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin-like β-sandwich fold) (Quinlan et al., 2011). Τα τμήματα β-πτυχωτών φύλλων (β-sheets) δημιουργούν ένα συντηρημένο καλούπι στο οποίο συνδέονται βρόγχοι (loops) που αποτελούν μη συντηρημένες περιοχές και ως εκ τούτου εμφανίζουν ετερογένεια ως προς το μήκος και τα αμινοξέα που περιλαμβάνουν. Αυτοί οι πεπτιδικοί βρόγχοι διαφορετικού μήκους στη δομή των LPMOs εμφανίζουν έντονη μεταβλητότητα και αποτελούν περιοχές που αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, ο βρόγχος "L2" είναι εξαιρετικά μεταβλητή περιοχή και θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την εξειδίκευση του ενζύμου και την εκλεκτικότητα ως προς την αναγνώριση του υποστρώματος (Vaaje-Kolstad et al., 2017). Για την πλήρη κατανόηση και περιγραφή του τρόπου δράσης των LPMOs απαιτείται εκτενέστερη αναζήτηση του τρόπου αλληλεπίδρασης και εξειδίκευσης μεταξύ υποστρώματος και πρωτεΐνης. Πρόσφατες μελέτες της κρυσταλλικής τους δομής, εντόπισαν ότι η πλειοψηφία των LPMOs διαθέτουν δομικές αυτοτελείς μονάδες/περιοχές CBM, διαφορετικές του καταλυτικού κέντρου, υπεύθυνες για την πρόσδεση των υδατανθρακικών υποστρωμάτων. Στην ύπαρξη των λειτουργικών περιοχών CBM συνηγορούν και οι βιοπληροφορικές αναλύσεις των αμινοξικών αλληλουχιών των LPMO. Η εξειδίκευση των ενζύμων σε διαφορετικά υποστρώματα σχετίζεται και με την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδέονται σε διαφορετικά υποστρώματα πολυσακχαριτών. Η ιδιότητά τους αυτή φαίνεται και στα διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά των περιοχών CBM της κάθε οικογένειας LPMO. Παραδείγματος χάρη, οι AA14 LPMOs δρουν στην ημικυτταρίνη που είναι προσδεμένη στην κυτταρίνη, κάτι στο οποίο ίσως να αποδίδεται η καμπυλωτή περιοχή CBM, ενώ οι AA9 δρουν στην κυτταρίνη και η διαμόρφωση της CBM περιοχής της είναι επίπεδη. Έτσι, παρά το γεγονός ότι και η οικογένεια AA9 εμφανίζει συντηρημένες αλληλουχίες στους πεπτιδικούς βρόγχους (L2, L3, LC, LS loops), τα πρωτεϊνικά της μόρια εμφανίζουν πιο επίπεδη επιφάνεια αλληλεπίδρασης CBM. Η δομή του ενζύμου TdAA15_A, αντιπροσωπευτική της νέας οικογένειας AA15, διαθέτει δυο κατάλοιπα τυροσίνης τοποθετημένα στην επιφάνεια αντιδιαμετρικά του καταλυτικού κέντρου. Αυτό το χαρακτηριστικό, πιθανολογείται ότι δίνει την δυνατότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων μεγαλύτερου μεγέθους, ενώ τέτοια αρωματικά κατάλοιπα έχουν ανιχνευθεί σε αντίστοιχη επιφάνεια δομών της οικογένειας AA9. Μελέτες στην πρωτεΐνη TtAA9_E και άλλες της οικογένειας AA9 καταδεικνύουν την σημασία των αρωματικών καταλοίπων που βρίσκονται στην περιοχή CBM για τη δέσμευση του ενζύμου στο υπόστρωμα (Harris et al., 2010). Αναφορικά με την οικογένεια AA11, η επιφάνεια του ενεργού κέντρου είναι ελαφρώς πιο κυρτή και δεν αποτελείται από αρωματικά κατάλοιπα. Αντίθετα, περιέχει υδρόφιλα

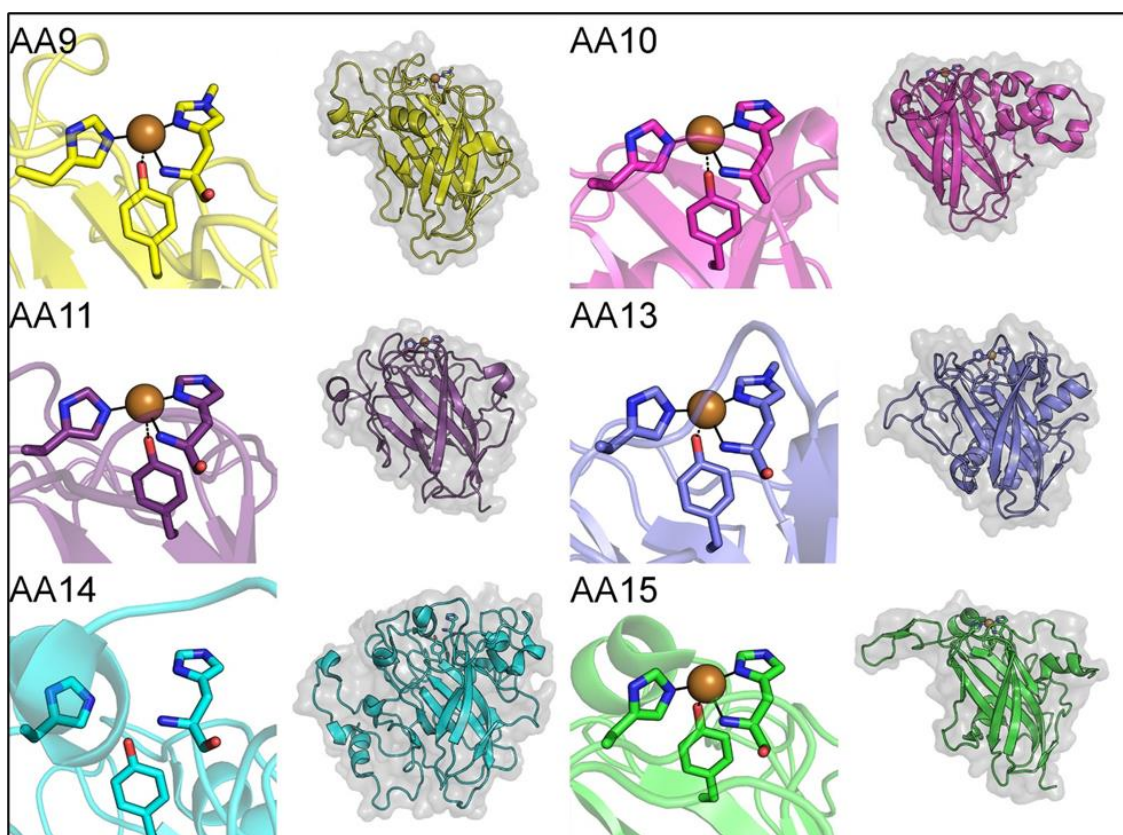
αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα με πολικές αλληλεπιδράσεις παρόμοια με την οικογένεια AA10 (Hemsworth et al., 2014). Κατά συνέπεια, αποτελεί κοινή πεποίθηση, ότι η πλειονότητα των LPMOs που δρα σε υποστρώματα υψηλής κρυσταλλικότητας, αλληλεπιδρά με αυτά μέσω CBM με σχετικά επίπεδες επιφάνειες και η πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με αρωματικά κατάλοιπα (π.χ. AA9) ή/και με πολικές αλληλεπιδράσεις με υδρόφιλα κατάλοιπα (π.χ. AA10, AA11). Δημοσίευση της ερευνητικής ομάδας Forsberg, Rohr et al. το 2014, προτείνει ότι η ενεργότητα των ενζύμων στα διαφορετικά υποστρώματα δεν καθορίζεται από την ικανότητα πρόσδεσης τους σε αυτά, αλλά από την διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου χαλκού. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός και η ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου στο υπόστρωμα δεν επηρεάζει την καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου, δηλαδή το ρυθμό οξειδωτικής διάσπασης του υποστρώματος. Αν και τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη συναρμογή του ιόντος χαλκού είναι συντηρημένα σε όλες τις LPMOs που έχουν μελετηθεί ως τώρα, δεν αποκλείεται ότι άλλα αμινοξέα που βρίσκονται σε πιο απομακρυσμένες θέσεις επηρεάζουν έμμεσα το ενεργό κέντρο του ενζύμου και ως εκ τούτου την καταλυτική του δράση και την ενεργότητα του σε διαφορετικά υποστρώματα.



Εικόνα 1.5 Απεικόνιση της επιφάνειας της τρισδιάστης δομής μιας AA9 LPMO. Με κίτρινο χρώμα διακρίνονται τα κατάλοιπα τυροσίνης (Y212 & Y24) αντιδιαμετρικά του ενεργού κέντρου που σχηματίζουν την επιφάνεια της λειτουργικής περιοχής πρόσδεσης υποστρώματος υδατάνθρακα (CBM). Η ιστοιδίνη His1 του ενεργού κέντρου διακρίνεται με κυανό χρώμα και το άτομο χαλκού έχει σφαιρικό σχήμα καφέ χρώματος, υποδεικνύοντας και την περιοχή του ενεργού κέντρου. Στο εσωτερικό του μορίου με έντονο γκρι χρώμα διακρίνονται κάποιοι πεπτιδικό βρόγχοι που πιθανώς σχετίζονται με την καταλυτική εξειδίκευση και την στερεοεκλεκτικότητα του ενζύμου (Frandsen & Lo Leggio, 2016)



Εικόνα 1.7 Παράδειγμα βιοπληροφορικής ανάλυσης των λειτουργικών περιοχών γονιδίων των ενζύμων LPMOs που ανήκουν στις οικογένειες AA9 και AA10. Όπως φαίνεται, οι περισσότερες αλληλουχίες διαθέτουν ποικίλες περιοχές πρόσδεσης με υδατάνθρακες (CBM) οι οποίες διακρίνονται με πράσινο χρώμα. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα καταλυτικά κέντρα κάθε οικογένειας, ενώ με κυανό χρώμα σηματοδοτούνται πεπτίδια πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης (Ser) και προλίνης (Pro) που αποτελούν σύνδεσμοι (linkers) μεταξύ των λειτουργικών ομάδων. Με μωβ χρώμα φαίνονται τα σηματοδοτικά πεπτίδια έκκρισης στην έναρξη της αλληλουχίας και με γκρι μη-αναγνωρισμένες περιοχές σύνδεσης. Ο οργανισμός προέλευσης του γονιδίου κάθε ενζύμου αναφέρεται αριστερά της αλληλουχίας. (Levasseur et al., 2013).



Εικόνα 1.6. Αντιπροσωπευτικές κρυσταλλικές δομές όλων των οικογενειών LPMO (AA9-11 και AA13-15). Σε κάθε οικογένεια, αριστερά διακρίνεται η κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου και δεξιά η κρυσταλλική δομή όλου του πρωτεϊνικού μορίου. Κάθε οικογένεια παρουσιάζει το αναγνωρίσιμο στήριγμα καταλοίπων ιστιδίνης (His-brace) (αναπαράσταση ραβδού), που αποτελείται από την ιστιδίνη του N-άκρου (His1) και μια δεύτερη ιστιδίνη οι οποίες συντονίζουν την θέση του χαλκού (Cu) στον χώρο. Το ενεργό κέντρο συμπληρώνεται με ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr), που σε αρκετές περιπτώσεις αντικαθίσταται με άλλα όπως η φαινυλαλανίνη (Phe) σε μερικές AA10 LPMOs. Οι LPMOs διαθέτουν μια κοινή δευτεροταγή δομή β-πτυχωτού φύλλου, η οποία παρουσιάζεται ως βέλη (αναπαράσταση "cartoon"). Το γκρι χρώμα δείχνει χλωροπληρωτικά την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Το καταλυτικό κέντρο χαλκού (καφέ χρώμα) εντοπίζεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματα στο άνω μέρος της δομής.

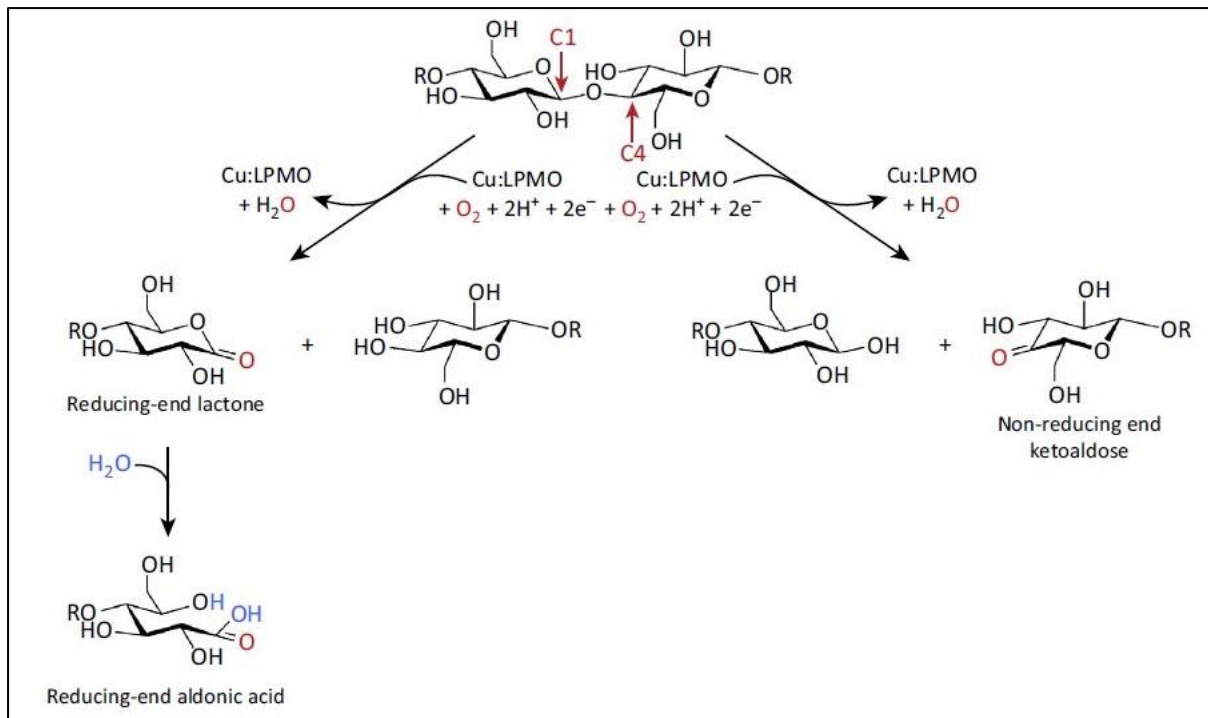
1.2.2 Ο μηχανισμός καταλυτικής δράσης των LPMOs

Ο καταλυτικός μηχανισμός των LPMOs αποτελεί το κέντρο πολλών επιστημονικών ερευνών, χωρίς ακόμα να έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Οι LPMOs απαντώνται σε αφθονία στη φύση και καταλύουν μια ισχυρή οξειδωτική αντίδραση στην οποία εμπλέκονται πολλαπλοί παράγοντες που είναι δύσκολο να ελεγχθούν. Αν και ένας γενικευμένος μηχανισμός δράσης των LPMOs δεν έχει ακόμα επαληθευτεί, τα έως τώρα δεδομένα δείχνουν ότι για την κατάλυση, εκτός από το ενεργό κέντρο χαλκού του ενζύμου και το πολυσακχαριτικό υπόστρωμα, απαιτείται ένας αναγωγικός παράγοντας -συνήθως- μικρού μοριακού βάρους ως δότης ηλεκτρονίων και η παρουσία οξυγόνου (O_2) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ως συμπαραγόντες. Η καταλυτική δράση των LPMOs ξεκινάει με την αναγωγή του ιόντος χαλκού του ενεργού κέντρου από $Cu(II)$ σε $Cu(I)$ από τον εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων. Στη συνέχεια, το ένζυμο αντιδράει με O_2 ή H_2O_2 για τον σχηματισμό μιας δραστηκής μορφής-ρίζας οξυγόνου (ROS) (π.χ. $\cdot O^{-2}$ ή $\cdot OH$) που έχει την ικανότητα να σχηματίζει ένα υδροξύλιο στον C1 ή C4 άνθρακα ενός γλυκοζιτικού δεσμού (Walton et al., 2016). Η ενεργοποίηση του οξυγόνου πιθανώς πραγματοποιείται με μεταφορά του ηλεκτρονίου του χαλκού στο διοξυγόνο (O_2) και την πρόσδεση του O_2 στην $Cu(I)$ -LPMO (Kjaergaard et al., 2014).

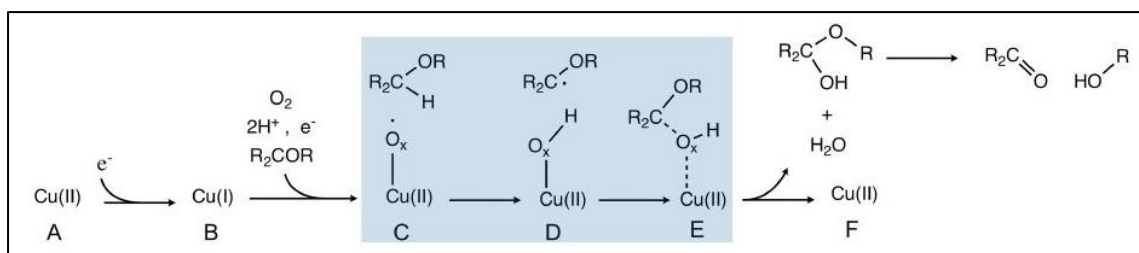
Πρέπει να σημειωθεί, ότι το ισοζύγιο αυτού του υποθετικού μηχανισμού ενεργότητας μονοοξυγενάσης περιλαμβάνει τη συμμετοχή δυο ηλεκτρονίων. Όμως, είναι ακόμα ασαφές πως ένα μονοατομικό ενεργό κέντρο χαλκού επιτελεί μια αντίδραση με δυο ηλεκτρόνια (Walton et al., 2016). Γνωστές χαρακτηρισμένες μονοοξυγενάσες με μονοατομικό ενεργό κέντρο χαλκού που καταλύουν οξειδώσεις υποστρωμάτων με δυο ηλεκτρόνια όπως οι GO (οξειδάση της γαλακτόζης) και AmO (αμινική οξειδάση), περιέχουν στις δομές τους λειτουργικές ομάδες ή ενδομοριακές περιοχές οξειδοαναγωγικά ενεργές που επιτρέπουν στο ένζυμο την σταθεροποίηση των ριζών που σχηματίζονται κατά την κατάλυση (Kjaergaard et al., 2014). Τέτοιες περιοχές δεν έχουν ανιχνευθεί με βεβαιότητα στις LPMO πρωτεΐνες, κάτι που αυξάνει το ενδιαφέρον στο πεδίο της βιοοργανικής χημείας. Παρ' όλα αυτά, έχει προταθεί πως στις LPMOs υπάρχουν φορτισμένα αμινοξέα πλησίον του ενεργού κέντρου που μπορεί να παίξουν το ρόλο της «προσωρινής» αποθήκευσης του δεύτερου ηλεκτρονίου μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ή και να βοηθήσουν στη σταθεροποίηση των σχηματιζόμενων ριζών. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκαν LPMOs με ένα δεύτερο μεταλλικό ιόν χαλκού που επιτελεί ακριβώς την ίδια λειτουργία, δηλαδή αποθηκεύει το δεύτερο ηλεκτρόνιο με έναν μηχανισμό επονομαζόμενο ως “hole-hopping” (Fowler et al., 2019).

Ο καταλυτικός κύκλος των LPMOs περιέχει την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από τον C1 ή C4 άνθρακα του υποστρώματος, που ακολουθείται από την υδροξυλίωση του μέσω ενός μηχανισμού που η LPMO λαμβάνει οξυγόνο και το ενσωματώνει στον άνθρακα του σακχάρου (oxygen-rebound mechanism) ως ένα ένζυμο με ενεργότητα μονοοξυγενάσης. Τελικό αποτέλεσμα της κατάλυσης είναι η διάσπαση ενός γλυκοζιτικού δεσμού (α -1,4' ή β -1,4') και η δημιουργία ενός C1- ή C4- οξειδωμένου σακχάρου μαζί με τον σχηματισμό ενός μορίου νερού. Η δράση των LPMOs αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά σε ένα ένζυμο της οικογένειας AA10 (τέως CBP21) του βακτηρίου *Serratia marcescens*. Αποδείχθηκε ότι το ένζυμο αξιοποιεί την παρουσία ενός αναγωγικού μορίου μικρού μεγέθους και σε συνδυασμό

με έναν μεταλλικό παράγοντα προκαλεί την οξειδωτική διάσπαση χιτίνης, αποδίδοντας ολιγοσακχαρίτες με ένα αλδονικό οξύ στο αναγωγικό τους άκρο (Harris et al., 2010). Το ένζυμο TaAA9 ήταν η πρώτη LPMO που ανιχνεύθηκε ότι οξειδώνει C1 και C4 άκρα πολυσακχαριτών (Quinlan et al., 2011). Έτσι, σήμερα είναι βέβαιο, ότι οι LPMOs προκαλούν την διάσπαση αλυσίδων με την οξείδωση του C1 ή C4 άνθρακα του σακχαρικού δακτυλίου. Η C1-οξείδωση παράγει διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με μια λακτόνη ή εν συνεχεία αλδονικό οξύ στο αναγωγικό τους άκρο, ενώ η C4-οξείδωση παράγει μια κετοαλδόζη στο άκρο του ολιγοσακχαρίτη.



Εικόνα 1.8 Τα προϊόντα οξειδωμένων πολυσακχαριτών της καταλυτικής δράσης των LPMOs. Η καταλυτική δράση των LPMOs οδηγεί στην αποκοπή αλυσίδων πολυσακχαριτών και την παραγωγή οξειδωμένων προϊόντων. Η οξείδωση στον C1 άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας λακτόνης, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε αλδονικό οξύ με την προσθήκη ενός μορίου νερού. Η οξείδωση στον C4 άνθρακα οδηγεί στον σχηματισμό μιας κετοαλδόζης στο μη αναγωγικό άκρο του σακχαρικού δακτυλίου. (Hemsworth et al., 2015).



Εικόνα 1.9 Πιθανά στάδια της δράσης των LPMOs ως μονοοξυγενάσες με συμπαράγοντα το O_2 . Ένα ηλεκτρόνιο εξωτερικού αναγωγικού παράγοντα ανάγει τον χαλκό της LPMO από Cu(II) σε Cu(I) (A,B). Προσθήκη μοριακού οξυγόνου, $2H^+$ και ενός επιπλέον ηλεκτρονίου παρουσία κατάλληλου υποστρώματος οδηγεί στον σχηματισμό μιας δραστικής μορφής οξυγόνου (ROS) και καταλήγει στο οξειδωμένο προϊόν και το νερό (F). (Η ROS σκόπιμα δεν προσδιορίζεται και υποδεικνύεται ως O_x). Η άντληση υδρογόνου H^+ και η επακόλουθη υδροξυλίωση μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς του οξυγόνου (oxygen rebound mechanism) σχηματίζει ενδιάμεσα προϊόντα (C,D). Αν και οι λεπτομέρειες της μεταφοράς ηλεκτρονίων και οξυγόνου δεν έχουν επαληθευτεί, η αντίδραση μεταξύ (B) και (F) είναι ισοσταθμισμένη, όμως αυτό δεν ισχύει για τα ενδιάμεσα προϊόντα C,D,E. Ο σχηματισμός του τελικού προϊόντος πραγματοποιείται αυθόρμητα με αποβολή ενός μορίου νερού. (Tandrup et al., 2018)

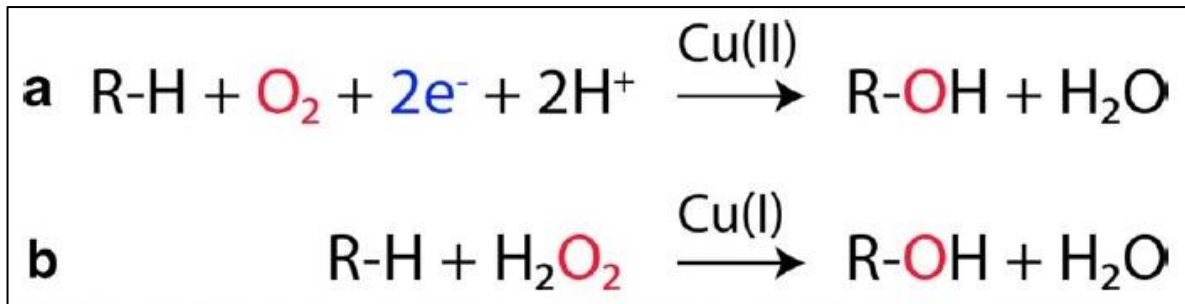
Αναγωγικοί παράγοντες ως δότες ηλεκτρονίων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ενώσεις που λειτουργούν ως αναγωγικοί παράγοντες των LPMOs οι οποίοι δίνουν ηλεκτρόνια για την αναγωγή του ενεργού κέντρου χαλκού και την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου. Γενικότερα, οι LPMOs έχουν την δυνατότητα να αξιοποιούν μια πληθώρα ενώσεων ως δότες ηλεκτρονίων υπό την προϋπόθεση αυτό να είναι επιτρεπτό ηλεκτροχημικά, δηλαδή το δυναμικό αναγωγής του ιόντος χαλκού του ενεργού κέντρου τους να είναι υψηλότερο από εκείνο του δότη ηλεκτρονίων. Εκτός από μόρια μικρού μοριακού βάρους όπως το ασκροβικό οξύ, έχει αποδειχθεί ότι διάφορες μορφές της λιγνίνης έχουν τον ρόλο του δότη ηλεκτρονίων. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιήσουν φαινολικές ενώσεις, λιγνίνη, φως ή να προμηθευτούν ηλεκτρόνια από την δράση άλλων ενζύμων, με την επιλογή του δότη να σχετίζεται συνήθως με το είδος του μικροοργανισμού του ενζύμου και το πλαίσιο στο οποίο δρά. Παραδείγματος χάρη, οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί περιέχουν LPMOs που κατά κύριο λόγο αξιοποιούν το φως για αναγωγή του χαλκού, ενώ οι LPMOs των σαπροφυτικών μυκήτων, όπως ο *M. Thermophila*, αξιοποιούν ότι είναι διαθέσιμο στο περιβάλλον τους όπως η λιγνίνη και άλλες φαινολικές ενώσεις. Αναφορικά με την λιγνίνη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα κλάσματα λιγνίνης με μικρότερο μοριακό βάρος και με περισσότερες δραστικές ομάδες αρωματικών υδροξυλίων (-OH), καθώς περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ομάδων, είναι πιο ενεργά από οξειδοαναγωγικής άποψης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο αποδοτικά ως δότες ηλεκτρονίων για τις LPMOs (Muraleedharan et al., 2018). Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της ενζυμικής οξείδωσης της λιγνοκυτταρίνης και πιθανώς θα βελτιώσουν την εξερεύνηση νέων φιλικών προς το περιβάλλον διαδρομών για την αξιοποίηση της βιομάζας σε μια κυκλική οικονομία. Ο ρόλος των ενζύμων της αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης (CDH), ως ενδογενείς οξειδοαναγωγικοί παράγοντες που παρέχουν ηλεκτρόνια στις LPMOs αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα το οποίο ενδεχομένως υποδηλώνει και έναν άλλου είδους συνεργιστικό μεταξύ ενζύμων για την αποικοδόμηση υποστρωμάτων των πολυσακχαριτών. Οι CDHs καταλύουν με δυο ηλεκτρόνια την οξείδωση

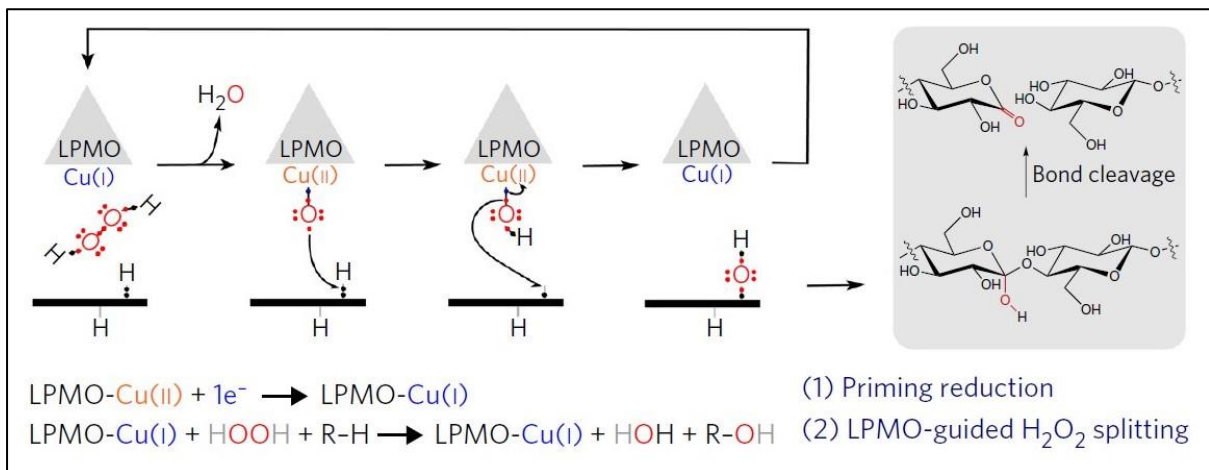
της κελλοβιοζης σε κελλοβιολακτόνη, ενώ παράλληλα παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία οξυγόνου ως μοναδικό δέκτη ηλεκτρονίου (Loose et al., 2016).

Συμπαράγοντες O₂ και H₂O₂, η ενεργότητα υπεροξυγενάσης και η δράση του ενζύμου απουσία υποστρώματος

Ένα εξίσου γνωστό και σημαντικό χαρακτηριστικό της δράσης των LPMOs, είναι ότι απουσία υποστρώματος ανάγουν το οξυγόνο (O₂) με δυο ηλεκτρόνια, παράγουν ως τελικό προϊόν υπεροξειδίο (H₂O₂). Με δεδομένη αυτή την δράση, του γεγονότος ότι οι LPMOs τείνουν να εκφράζονται σε αφθονία από μύκητες μαζί με ένζυμα που παράγουν υπεροξειδίο αλλά και των ενδείξεων ότι οι LPMOs πιθανώς ενεργοποιούνται από το φως, καθώς και της ασάφειας του μηχανισμού συμμετοχής του δεύτερου ηλεκτρονίου, ερευνητές αξιολόγησαν την πιθανότητα οι LPMOs να έχουν ενεργότητα υπεροξυγενάσης με συμπαράγοντα το H₂O₂. Πράγματι, το 2018 έδειξαν ότι το υπεροξειδίο μπορεί να οδηγήσει σε αντιδράσεις LPMO ανεξάρτητα από την παρουσία του οξυγόνου, καταναλώνοντας υπεροξειδίο σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με το υπόστρωμα, ενώ απαιτείται μόνο μια αρχική αναγωγή του ενεργού κέντρου χαλκού για την εκτέλεση πολλαπλών καταλυτικών κύκλων. Δοκιμές υπό αερόβιες συνθήκες (200-250 mM O₂ στο διάλυμα αντίδρασης) με διαφορετικές συγκεντρώσεις προστιθέμενου υπεροξειδίου έδειξαν ότι το ενσωματωμένο οξυγόνο στο οξειδωμένο υπόστρωμα προήλθε από το υπεροξειδίο ακόμα και παρουσία οξυγόνου σε δεκαπλάσια επίπεδα συγκέντρωσης από αυτά του υπεροξειδίου. Επιπρόσθετα, έρευνες έδειξαν ότι η παρουσία της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP - horseradish peroxidase), η οποία επίσης καταναλώνει υπεροξειδίο, ανταγωνίζεται και δρα παρεμποδιστικά για την δράση των LPMOs. Αν και έως σήμερα τα κινητικά δεδομένα δράσης των LPMOs είναι αρκετά περιορισμένα λόγω και των προϊόντων υψηλής κρυσταλλικότητας που συνήθως παράγονται, οι καταλυτικοί ρυθμοί των LPMOs κινούνται σε γενικά χαμηλά επίπεδα, ενώ με χρήση H₂O₂ είναι μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τη χρήση O₂ ως συμπαράγοντα (ενδεικτικά, H₂O₂: k_{cat} = 4.2 min⁻¹, O₂: k_{cat} = 0.3 min⁻¹). Από την οπτική του καταλυτικού μηχανισμού, όπως προαναφέρθηκε, οι O₂-αντιδράσεις απαιτούν σε κάθε καταλυτικό κύκλο την αναγωγή του ενεργού κέντρου με τον τρόπο μεταφοράς του απαιτούμενου δεύτερου ηλεκτρονίου να μην έχει να ερμηνευθεί απόλυτα. Αντιθέτως, οι H₂O₂-αντιδράσεις δεν απαιτούν δεύτερο ηλεκτρόνιο, ενώ το ενεργό κέντρο χαλκού ανάγεται μόνο μια φορά στην έναρξη της δράσης και μπορεί να υποστηρίξει την εκτέλεση πολλαπλών καταλυτικών κύκλων μέχρι να οξειδωθεί ξανά. Όλα τα παραπάνω ενισχύουν το επιχείρημα, ότι ο σχηματισμός υπεροξειδίου είναι ο παράγοντας που καθορίζει τον καταλυτικό ρυθμό (rate-limiting factor) μεταξύ του οξυγόνου, του αναγωγικού παράγοντα ή του ίδιου του ενζύμου (Bissaro et al., 2017), ενώ υποδεικνύουν ότι πιθανώς οι LPMOs έχουν μεγαλύτερη προτίμηση στο υπεροξειδίο ως συμπαράγοντα οδηγώντας σε ενεργότητα υπεροξυγενάσης. Σε κάθε περίπτωση, ο ακριβής μηχανισμός δράσης που πρόκειται να συμβεί στη φύση αποτελεί μια συνάρτηση πολλών μεταβλητών όπως ο τύπος του αναγωγικού παράγοντα, οι συγκεντρώσεις των O₂ και H₂O₂, το είδος του υποστρώματος και οι συνθήκες αντίδρασης, ενώ το αν κάποιος από τους δυο συμπαράγοντες αξιοποιείται πιο αποδοτικά παραμένει ακόμα αντικείμενο αναζήτησης.



Εικόνα 1.11 Οι χημικές εξισώσεις αντίδρασης των LPMOs ως μονοοξυγενάσες (a) και υπεροξυγενάσες (b). Η ένδειξη Cu(I)/Cu(II) δείχνει τον βαθμό οξειδωσης του χαλκού του ενεργού κέντρου πριν την έναρξη του καταλυτικού κύκλου. Η αντίδραση μονοοξυγενάσης παρουσία O₂ απαιτεί τη μεταφορά δυο ηλεκτρονίων σε κάθε καταλυτικό κύκλο. Η αντίδραση υπεροξυγενάσης παρουσία H₂O₂ απαιτεί μόνο μια αρχική αναγωγή του χαλκού η οποία ενεργοποιεί την LPMO για την εκτέλεση πολλαπλών καταλυτικών κύκλων (Tandrup et al., 2018)



Εικόνα 1.10 Υποθετικός μηχανισμός οξειδωτικής δράσης των LPMOs σε πολυσακχαρίτες παρουσία H₂O₂. Η δράση ξεκινά με μια “εναρκτήρια” αναγωγή του ενεργού κέντρου από Cu(II) σε Cu(I) (priming reduction). Εν συνεχεία, το ενεργό κέντρο αλληλεπιδρά με το υπεροξείδιο παρουσία του υποστρώματος (μάυρη οριζόντια γραμμή). Η αντίδραση οδηγεί στην απελευθέρωση ενός μορίου νερού και την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων που μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από το υπόστρωμα. Μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει δραστικές ρίζες το υπόστρωμα αποκτά ένα υδροξύλιο και οδηγείται προς διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού του υδροξυλιωμένου άνθρακα. Παράλληλα, γίνεται αναγέννηση της ανηγμένης Cu(I)-LPMO έχοντας διατηρήσει το ηλεκτρόνιο της εναρκτήριας αναγωγής και μπορεί να εισέλθει σε ένα νέο καταλυτικό κύκλο, κάτι που διαφοροποιεί το μηχανισμό των LPMOs συγκριτικά με τη χρήση O₂ αντί H₂O₂. (Bissaro et al., 2017)

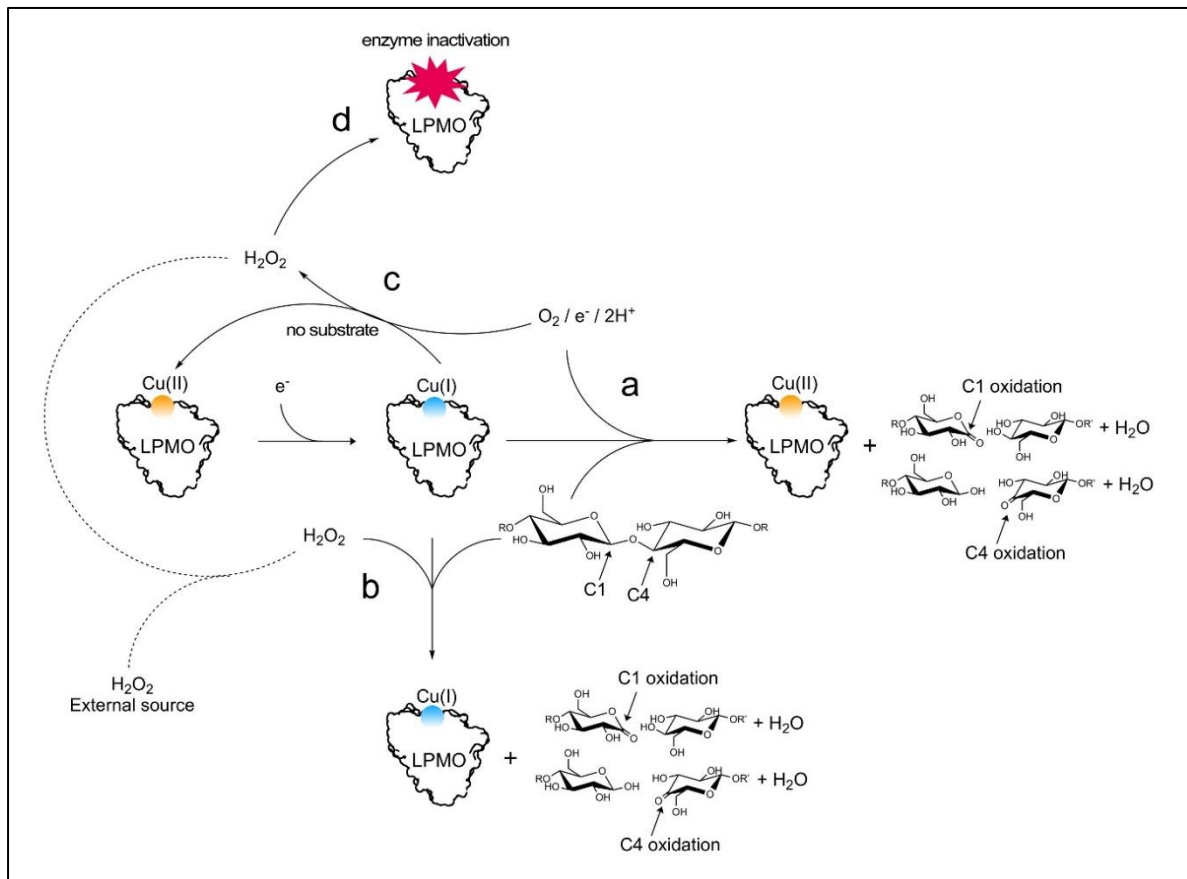
Αλληλεπίδραση με υποστρώματα: αυτοοξειδωση και στερεοεκλεκτικότητα

Οι βέλτιστες συνθήκες κατάλυσης ενός ενεργού και σταθερού συστήματος LPMO επιτυγχάνεται όταν η παροχή ηλεκτρονίων γίνεται με ρυθμό κατάλληλο της συγκέντρωσης του ενζύμου και του αριθμού των ενεργών κέντρων, δηλαδή των μορίων του ενζύμου που βρίσκονται προσδεδεμένα στο υποστρώμα (Loose et al., 2016). Η αντίδραση απαιτεί αυστηρό έλεγχο του βιολογικού συστήματος για την αποτροπή επιβλαβών και μη αντιστρεπτών οξειδώσεων, που μπορούν να οδηγήσουν στην απενεργοποίηση των LPMOs. Οι LPMOs είναι επιρρεπείς στην αυτοκαταλυτική οξειδωτική απενεργοποίηση ανεξάρτητα της O_2 - ή H_2O_2 - αντίδρασης. Ο βαθμός της απενεργοποίησης εξαρτάται από τον τύπο των υποστρωμάτων και την συγκέντρωσή τους. Τα δεδομένα δείχνουν ότι αυτός ο τύπος της βλάβης πραγματοποιείται όταν μια ανηγμένη LPMO (Cu(I)) βρίσκεται σε ένα διάλυμα που μπορεί να αντιδράσει με O_2 ή H_2O_2 απουσία υποστρώματος, το οποίο κανονικά θα ήταν ο στόχος των παραγόμενων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Αυτό σημαίνει ότι οι ROS θα αντιδράσουν με κάτι άλλο, όπως κοντινές πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων της πρωτεΐνης όπως έχει παρατηρηθεί πειραματικά. Σε αυτή την κατεύθυνση, έχει αποδειχθεί ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος και η παρουσία λειτουργικών περιοχών δέσμησης υδατανθράκων (CBMs) στις πρωτεΐνες βελτιώνουν την ανθεκτικότητα των LPMOs στην απενεργοποίησή τους, ενώ η σταθερότητα του μορίου μειώνεται σε περίπτωση μεταλλάξεων σε κατάλοιπα της επιφάνειας που συμβάλλει στη δέσμηση υποστρωμάτων (Courtade et al., 2018). Επιπρόσθετα, υπάρχει ο ισχυρισμός, ότι ο βαθμός της αυτοοξειδωτικής βλάβης επηρεάζεται και από τον τύπο του υποστρώματος. Είναι ξεκάθαρο ότι η δέσμηση υποστρώματος βοηθά στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των LPMOs. Η δέσμηση του υποστρώματος παρέχει έναν στερεοχημικό περιορισμό στο ενεργό κέντρο ο οποίος οδηγεί στον ακριβή χωρικό προσανατολισμό της δραστικής μορφής οξυγόνου που απαιτείται για την οξείδωση του υποστρώματος, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τις πιθανότητες οξείδωσης του ενζύμου. Ένας δομικός παράγοντας που πιθανώς σχετίζεται με την προστασία του ενζύμου από την αυτοοξειδωση είναι η ύπαρξη μεθυλίωσης του N-άκρου του πεπτιδικού μορίου, όπως έχει επισημανθεί προηγουμένως (Petronic et al., 2018). Για την επίτευξη σταθερών LPMO-αντιδράσεων χωρίς απενεργοποίηση του ενζύμου είναι απαραίτητη η διαμόρφωση συνθηκών υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος κατά τις οποίες το ένζυμο θα βρίσκεται προσδεδεμένο κατά το μεγαλύτερο διάστημα της αντίδρασης. Τροφοδοσία της αντίδρασης με υπεροξειδίο με υψηλότερο ρυθμό από αυτόν που μπορούν να αξιοποιήσουν οι LPMOs οδηγεί σε συσσώρευσή του και μπορεί να προκαλέσει αρνητικές συνέπειες, όπως η απενεργοποίηση του ενζύμου. Όμοια αποτελέσματα είναι δυνατό να προκύψουν απουσία υποστρώματος, όταν οι LPMOs παράγουν H_2O_2 από O_2 . Έτσι, ανάλογα με τις συνθήκες, η σταδιακή αύξηση των επιπέδων H_2O_2 μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα αυτο-οξειδωσης (Müller et al., 2018).

Οι τρόποι πρόσδεσης των διαφορετικών υποστρωμάτων στις LPMOs επιφέρουν και διαφοροποίηση των διαμορφώσεων των καταλυτικών κέντρων τους. Έτσι, διαφορετικά υποστρώματα μπορούν ενδεχομένως να επηρεάσουν την δραστικότητα του ενεργού κέντρου χαλκού και μέσω των χωρικών περιορισμών που προαναφέρθηκαν, να δίνουν συγκεκριμένο προσανατολισμό στην δραστική μορφή οξυγόνου (ROS) οδηγώντας σε αποτελεσματική καταλυτική δράση. Ο παραπάνω μηχανισμός, που επηρεάζεται στο

μεγαλύτερο βαθμό από τη δομή και τα αμινοξικά κατάλοιπα των λειτουργικών περιοχών του ενζύμου, δημιουργεί ένα είδος στερεοεκλεκτικότητας που εξειδικεύει κάθε LPMO όσον αφορά το σε ποιά υποστρώματα θα εμφανίσει ενεργότητα, σε τι έκταση και τι προϊόντα θα δώσει (οξείδωση του C1- η/και C4- άνθρακα). Στην περίπτωση των LPMOs που παράγουν και C1- και C4- οξειδωμένα προϊόντα, η στερεοεκλεκτικότητα καθορίζει την αναλογία οξείδωσης C1:C4 (Hangalsky et al., 2018).

Μια σύνοψη των καταλυτικών μηχανισμών των LPMOs παρουσιάζεται στην ακόλουθη φωτογραφία:



Εικόνα 1.12 Σχήμα του βασικού καταλυτικού μηχανισμού των LPMOs. Αρχικά, για την δράση των LPMOs απαιτείται η ενεργοποίηση του καταλυτικού κέντρου με αναγωγή του χαλκού από Cu(II) (κίτρινη σφαίρα) σε Cu(I) (μπλε σφαίρα) με παροχή 1e⁻ από έναν αναγωγικό παράγοντα. Ανάλογα τις συνθήκες μετά την αναγωγή του Cu υπάρχουν τρία βασικά μονοπάτια αντίδρασης που μπορούν να ακολουθήσουν: (a) δράση μονοοξυγενάσης παρουσία O₂, (b) δράση υπεροξυγενάσης παρουσία H₂O₂, (c) παραγωγή H₂O₂ από O₂ απουσία υποστρώματος. Οι LPMOs είναι γνωστό ότι αποικοδομούν διαφορετικούς πολυσακχαρίτες διασπώντας κυρίως α-1,4' ή β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς πολυμερών με βάση τη γλυκόζη ή τη χιτίνη, αποδίδοντας σάκχαρα με C1 ή C4 άκρα και ένα μόριο νερού. Για την δράση μονοοξυγενάσης (a) απαιτείται σε κάθε καταλυτικό κύκλο η αναγωγή του ενεργού κέντρου χαλκού, αφού μετά την παραγωγή των προϊόντων έχει επανέλθει στην αδρανή του μορφή Cu(II). Αντιθέτως, ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξυγενάσης (b) μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές διατηρώντας την αρχική ανηγμένη κατάσταση του χαλκού Cu(I) μετά το τέλος κάθε καταλυτικού κύκλου. Η δράση απουσία υποστρώματος παράγει H₂O₂, η αύξηση της συγκέντρωσής του οποίου μπορεί να οδηγήσει σε αναντίστροφη βλάβη του ενεργού κέντρου και απενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης με αυτοοξείδωση των LPMOs (d). (Tandrup et al., 2018)

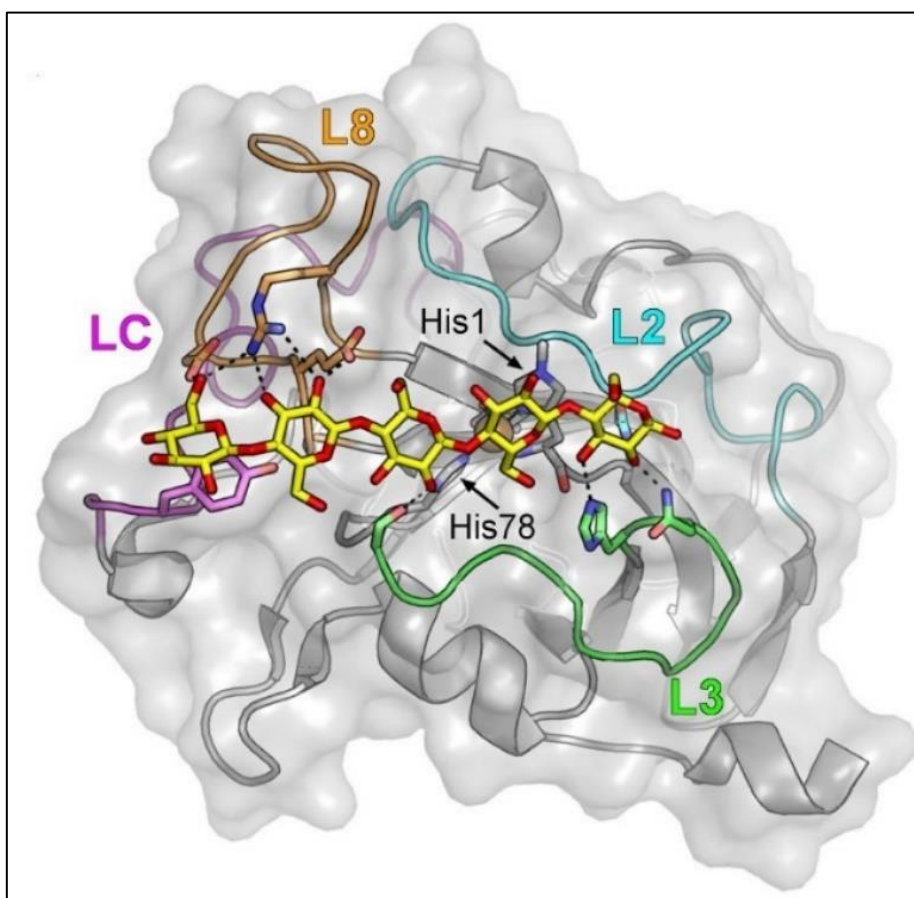
1.2.3 Η οικογένεια AA9 των βιοκαταλυτών LPMOs

Η οικογένεια AA9 είναι μια από τις οικογένειες LPMOs της βάσης δεδομένων CAZy που ανήκουν στην κατηγορία των ενζύμων βοηθητικής ενεργότητας (AA). Μέχρι σήμερα η CAZy περιέχει 622 υποθετικές αλληλουχίες AA9 εκ των οποίων οι 30 είναι βιοχημικά χαρακτηρισμένες και 17 έχουν λυθεί κρυσταλλογραφικά. Όπως προαναφέρθηκε, κάθε οικογένεια στην CAZy περιέχει μόρια με μεγάλη ομοιότητα στην τριτοταγή δομή, καθώς εμφανίζουν ομοιότητες στην πρωτοταγή αλληλουχία με τουλάχιστον ένα ήδη βιοχημικά χαρακτηρισμένο ένζυμο της οικογένειας. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας AA9, είχαν ταξινομηθεί παλαιότερα ως οικογένεια GH61 (glycoside hydrolases), καθώς εμφάνιζαν μικρή ενεργότητα ενδογλουκανάσης (Harris et al., 2010) με τον μηχανισμό και τη λειτουργία τους ως LPMOs να είναι άγνωστοι έως το 2013. Τα δυο βασικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών AA9 είναι η δράση τους στην κυτταρίνη, τόσο σε αδιάλυτους όσο και σε διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες, ενώ είναι γνωστές για την ποικιλομορφία και την αφθονία τους στα γονιδιώματα μυκήτων, καθώς εμφανίζονται σε μεγαλύτερο αριθμό αναλογικά με άλλες οικογένειες ενζύμων AA (Levasseur et al., 2013). Η προσθήκη των ενζύμων AA9 σε ενζυμικά μίγματα μαζί με άλλα κυτταρινολυτικά ένζυμα οδηγεί σε μεγάλη αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης της κυτταρίνης αποδεικνύοντας την συνεργιστική τους δράση. Αυτή η αύξηση αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην άμεση αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών AA9 με την κρυσταλλική κυτταρίνη μέσω της επίπεδης επιφάνειας του ενεργού κέντρου τους. Έχει προταθεί ότι διασπών τις κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης καθιστώντας εύκολη την πρόσβαση υδρολυτικών ενζύμων (Vaaje-Kolstad et al., 2010). Συμπληρωματικά, πρωτεΐνες της οικογένειας AA9, ήταν από τις πρώτες LPMOs στις οποίες μελετήθηκε η συνεργιστική δράση σε οξειδοαναγωγικό επίπεδο με τις αφυδρογονάσες της κελλοβιόζης (CDH) που παράγονται εξίσου από μύκητες. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός αναφέρει ότι οι CDHs λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων ανάγοντας τον χαλκό του ενεργού κέντρου των LPMOs όταν μια AA9 είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια της κυτταρίνης με τρόπο όπου η άμεση πρόσβαση στο χαλκό από αναγωγικούς παράγοντες μικρού μοριακού βάρους είναι περιορισμένη. Επιπλέον, αυτός ο συνεργισμός πιθανώς αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης των AA9, κατά τον οποίο η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου συμβαίνει μόνο όταν τα δύο ένζυμα έρχονται σε κοντινή απόσταση με την επιφάνεια του υποστρώματος αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία επικίνδυνων μορφών δραστικού οξυγόνου απουσία υποστρώματος. Στην περίπτωση της CDH ο ρυθμός με τον οποίο προσφέρονται ηλεκτρόνια είναι «ελεγχόμενος» και έτσι αποτρέπεται η όποια δημιουργία ROS που μπορούν να απενεργοποιήσουν το ένζυμο. Ωστόσο, οι CDH δεν παράγονται από όλους τους μύκητες που κωδικοποιούν AA9, οδηγώντας σε υποθέσεις για άλλες πηγές ηλεκτρονίων όπως η λιγνίνη. Μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της λιγνίνης και της αύξησης της μετατροπής της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα σε αντιδράσεις που εκτελούνται με προσθήκη AA9 ενζύμων (Dimarogona et al., 2012).

Οι AA9 μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με άλλες οικογένειες LPMOs όπως το ένα άτομο χαλκού και η διατήρηση των κατάλοιπων ιστιδίνης που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο χαλκού, η δομή β-πτυχωτού φύλλου, η μεθυλίωση στο κατάλοιπο ιστιδίνης του αμινοτελικού

άκρου της αλληλουχίας, η ικανότητα παραγωγής C1- και C4- οξειδωμένων προϊόντων και η παραγωγή υπεροξειδίου απουσία υποστρώματος. Όσον αφορά το ενεργό κέντρο των LPMOs και το τρίτο κατάλοιπο που συμμετέχει στο σχηματισμό του, στις AA9 αυτό είναι ένα συντηρημένο αμινοξύ τυροσίνης που αλληλεπιδρά με τον χαλκό του ενεργού κέντρου μέσω του φαινολικού υδροξυλίου του, ενώ συντηρημένο κατάλοιπο γλουταμίνης (Gln) φαίνεται ότι διατηρεί τη θέση του με σχηματισμό δεσμού υδρογόνου (Frandsen et al., 2016). Μόνο ένα 3% πρωτεϊνών AA9 περιέχει ένα κατάλοιπο φαινυλαλανίνης αντί της τυροσίνης. Ένα μεγάλο ποσοστό γονιδίων AA9, περιέχουν μαζί με την αλληλουχία κωδικοποίησης της καταλυτικής δράσης, μια λειτουργική περιοχή πρόσδεσης πολυσακχαριτών (CBM), με ένα συνδετικό πεπτιδίο (linker) να μεσολαβεί μεταξύ τους. Ένα από τα χαρακτηριστικά που εντοπίζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων της οικογένειας AA9, είναι ότι περιοχές με επικουρικές λειτουργίες όπως η CBM1 εντοπίζονται κοντά στο C-άκρο του πεπτιδίου, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τον κρίσιμο ρόλο της ιστιδίνης του N-άκρου στο ενεργό κέντρο των LPMOs (Levasseur et al., 2013).

Παρά το γεγονός ότι έχουν ίδια τρισδιάστατη δομή και αρχιτεκτονική ενεργού κέντρου χαλκού, οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών AA9 εμφανίζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους σε ποσοστό έως και 70%, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής καταλυτικής δράσης. Αυτή η ποικιλομορφία των αλληλουχιών επηρεάζει την διαμόρφωση του χαρακτηριστικού επίπεδου καταλυτικού κέντρου των AA9. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των βρόγχων που βρίσκονται κοντά σε αυτή την επιφάνεια είναι πιθανό ότι ρυθμίζουν την πρόσδεση και τον προσανατολισμό των υποστρωμάτων καθορίζοντας την στερεοεκλεκτικότητα των ενζύμων (Hemsworth et al., 2013). Πέραν των L2 και L3 βρόγχων που εμφανίζονται και σε άλλες οικογένειες LPMO (AA10, AA11, AA13), οι AA9 φαίνονται να είναι οι μόνες που περιέχουν και άλλους βρόγχους όπως οι LC, LS και L8. Αυτοί πιθανώς έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση κρυσταλλικής κυτταρίνης όπως έδειξε ένα μοντέλο αλληλεπίδρασης μιας AA9 του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* (Wu et al., 2013). Οι AA9 έχουν χαρακτηριστεί ως ένζυμα που δρουν σε μη διαλυτά υποστρώματα τόσο στην κυτταρίνη όσο και σε άλλους κελλοολιγосακχαρίτες. Τα γνωστά υποστρώματα ήδη βιοχημικά χαρακτηρισμένων ενζύμων της οικογένειας AA9 είναι η κυτταρίνη και ημικυτταρίνες όπως η ξυλογλουκάνη, η γλυκομαννάνη και η β-γλυκάνη. Η δράση τους ανιχνεύεται είτε σε C1- είτε σε C4- άκρα σακχάρων, ενώ αρκετές AA9 πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα δράσης και στα δυο άκρα (Lo Leggio et al., 2015). Με βάση την παραπάνω ιδιότητα, ερευνητές ταξινόμησαν τις AA9 LPMOs σε τρεις υποκατηγορίες (PMO-1,2,3 αντίστοιχα) σε μια προσπάθεια να συσχετίσουν φυλογενετικά την στερεοεκλεκτικότητα με μια υψηλή ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών σε συγκεκριμένες περιοχές, δίνοντας έμφαση στα επίπεδα αρωματικά κατάλοιπα κοντά στην επιφάνεια του ενεργού κέντρου. Αυτά θεωρείται ότι είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα, όπως συμβαίνει στις περιοχές δέσμευσης υδατανθράκων CBMs, σε αντίθεση με άλλες οικογένειες όπως η AA10, που διαθέτει υδρόφοβες ομάδες για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα υποστρώματα. Ωστόσο, έρευνες έδειξαν ότι η AA9 LPMO9H του *Podospora anserina*, η οποία είχε ταξινομηθεί ως PMO-2 με βάση την αλληλουχία της, αποδείχθηκε ότι έχει ενεργότητα PMO-3 συνιστώντας ότι η εξέταση μόνο της αλληλουχίας πιθανώς δεν είναι επαρκής για την πρόβλεψη της στερεοεκλεκτικότητας (Bennati-Granier et al. 2015).



Εικόνα 1.13 Η άνω όψη της LsAA9_A LPMO σε ένα σύμπλοκο με το υπόστρωμα κελλοπεντόζη (κίτρινο χρώμα). Οι βρόγχοι που αλληλεπιδρούν για την πρόσδεση του υποστρώματος επισημαίνονται με ξεχωριστά χρώματα: LC (μωβ), L2 (κυανό), L3 (πράσινο), L8 (πορτοκαλί) ρυθμίζοντας την εξειδίκευση και την στερεοεκλεκτικότητα της AA9 LPMO καθορίζοντας ποιο γλυκοζιτικό δεσμό του υποστρώματος θα διασπάσει αλλά και αν θα αποδόσει C1- ή C4- οξειδωμένο προϊόν. Κάτω από την κελλοπεντόζη υποδεικνύεται η επίπεδη επιφάνεια του ενεργού κέντρου με τα δυο κατάλοιπα ιστιδίνης (His1 και His78, γκρι χρώμα) που προσανατολίζουν τον χαλκό (πορτοκαλί) στο χώρο. Στο βάθος διακρίνεται η δομή β-πτυχωτού φύλλου με απεικόνιση βέλους γκρι χρώματος. (Tandrup et al., 2018)

1.3 Βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές των LPMOs

Η εξάντληση των πεπερασμένων ορυκτών πόρων και η επιβάρυνση που επιφέρει η χρήση τους στο αποτύπωμα άνθρακα από την ανθρώπινη δραστηριότητα δημιουργεί την ανάγκη για εξεύρεση νέων πρώτων υλών και ανανεώσιμων πόρων που αναμένεται να είναι φιλικό προς το περιβάλλον με βελτιωμένες ιδιότητες, όπως η βιοαποικοδομησιμότητα. Σε αυτά τα πλαίσια, η βιομάζα αποτελεί μια από τις κυριότερες ανανεώσιμες πηγές οργανικής ύλης, με την αποδοτική αξιοποίηση της σε πολλούς τομείς να αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις έως και σήμερα. Σε αυτή την κατεύθυνση, ένας τρόπος για την υδρόλυση της βιομάζας και την παραλαβή σακχάρων σε αξιοποιήσιμη μορφή αποτελεί η επεξεργασία της με κατάλληλα ένζυμα. Όπως έχει σημειωθεί, οι LPMOs αποτελούν τα μόνα οξειδοαναγωγικά ένζυμα που αλληλεπιδρούν άμεσα με υποστρώματα πολυσακχαριτών, συνδυάζοντας υδρολυτικές και οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Επομένως, προσφέρουν νέες προοπτικές όσον αφορά τον σχεδιασμό αποδοτικών βιοτεχνολογικών διεργασιών για την αποδόμηση της βιομάζας με σκοπό την μετατροπή της σε ζυμώσιμα σάκχαρα, τα οποία εν συνεχεία μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως βιοκαύσιμα 2ης γενιάς και βιοπλαστικά. Τα συστήματα θερμόφιλων και θερμοσταθερών ενζύμων, όπως οι LPMOs, απαρτίζουν σήμερα έναν πολύ σημαντικό ρόλο σε ένα πλήθος βιομηχανικών διεργασιών λόγω της υψηλής τους απόδοσης σε υψηλές για τα δεδομένα θερμοκρασίες, ενώ η χρήση τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές εμφανίζει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον. Εκτός από τα γενικά πλεονεκτήματα της χρήσης βιοκαταλυτών έναντι της αποκλειστικά χημικών μέσων, η χρήση ενζύμων για τον σχηματισμό επιθυμητών προϊόντων σε υψηλές θερμοκρασίες είναι προτιμητέα. Σε τέτοιες συνθήκες ο κίνδυνος μόλυνσης είναι μικρός, ενώ το σύστημα οδηγείται σε χαμηλότερα ιξώδη, υψηλότερους ρυθμούς μεταφοράς μάζας, ταχύτερες αντιδράσεις και υψηλότερη διαλυτότητα τόσο των υποστρωμάτων όσο και των προϊόντων. Όλα τα παραπάνω συνεισφέρουν σε μεγάλη μείωση του συνολικού κόστους αυτών των διεργασιών (Bruins et al., 2001).

1.3.1 Η συνεργιστική δράση των LPMOs ως μέρος ενζυμικών συστημάτων αποδόμησης της βιομάζας

Η πολύ σημαντική ικανότητα των LPMOs να δρουν συνεργιστικά με ένα μεγάλο εύρος (ημι)κυτταρινολυτικών ενζύμων (ξυλανάσες, ενδογλουκανάσες, κελλοβιοϋδρολάσες, β-γλυκοσιδάσες κ.α.) για την ενίσχυση της απόδοσης ζυμώσιμων σακχάρων από πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία (Bissaro et al., 2018). Σήμερα, οι LPMOs αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι εμπορικών ενζυμικών συστημάτων για την αποτελεσματική αποικοδόμηση της βιομάζας (Müller et al., 2015), ενώ έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να αυξήσουν έως και δέκα φορές την απόδοση της δράσης υδρολυτικών ενζύμων (Johansen, 2016). Η βοηθητική ενεργότητα αυτών των

ενζύμων όταν συμπεριλαμβάνονται σε ενζυμικά «κοκτέιλ» αυξάνει την παραγωγή επιτρέπει την μείωση της συνολικής ποσότητας των ενζύμων που περιέχονται σε αυτά, χαμηλώνει το συνολικό κόστος της διεργασίας και την καθιστά οικονομικά πιο εφικτή (Harris et al., 2010). Διαφορετικές διεργασίες προεπεξεργασίας (pretreatment) παράγουν βιομάζα με διαφορετική σύσταση και ιδιότητες σε κάθε περίπτωση, η οποία επηρεάζει την απόδοση των LPMOs στο στάδιο αποδόμησης της. Μια μελέτη έδειξε ότι η ενισχυτική δράση μιας AA9, κατά την προσθήκη της σε ένα μείγμα κυτταρινασών του μικροοργανισμού *Trichoderma reesei*, ήταν υψηλότερη σε υπόστρωμα αμύλου καλαμποκιού το οποίο είχε υποστεί προεπεξεργασία με οργανικούς διαλύτες (organosolv). Η απόδοση απελευθέρωσης ζυμώσιμων σακχάρων ήταν κατά 25%, ενώ η απόδοση στο ίδιο υπόστρωμα όταν προεπεξεργάστηκε με ατμό αυξήθηκε κατά 14%, συγκριτικά με την μη προεπεξερασμένη βιομάζα (Hu et al., 2014).

1.3.2 Η συνεισφορά των LPMOs σε διεργασίες παραγωγής άλλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι LPMOs πιθανώς συνεισφέρουν θετικά μέσω της οξειδωτικής δράσης τους σε διεργασίες ζύμωσης, πέρα από την παραγωγή βιοαιθανόλης, που χρησιμοποιούν σάκχαρα λιγνινοκυτταρινούχου προέλευσης ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Οι LPMOs παράγουν μια ποσότητα οξειδωμένων σακχάρων που μπορεί να φτάσει έως και το 10% του συνόλου των ζυμώσιμων σακχάρων. Πρόσφατα αξιολογήθηκε η παραγωγή γαλακτικού οξέως (lactic acid) με την συνεισφορά LPMOs. Αποδείχθηκε ότι η παρουσία τους αυξάνει στο σχηματισμό οξειδωμένων σακχάρων τα οποία εν συνεχεία καταναλώνονται από μικροοργανισμούς βακτηρίων που παράγουν το επιθυμητό προϊόν. Μια σημαντική παράμετρος σε διεργασίες που συμμετέχουν οι LPMOs είναι η επαρκής παροχή οξυγόνου. Για την αποφυγή ανταγωνιστικών φαινομένων μεταξύ των μικροοργανισμών και των οξειδοαναγωγικών ενζύμων όσον αφορά την κατανάλωση οξυγόνου και την μεγιστοποίηση της παραγωγής γαλακτικού οξέως προτιμήθηκε η στρατηγική SHF. Στην SHF ή υδρόλυση της βιομάζας και η ζύμωση πραγματοποιούνται ξεχωριστά σε δυο διακριτά στάδια, αντίθετα με τη στρατηγική SSF, κατά την οποία υπόστρωμα, μικροοργανισμοί και υδρολυτικά ένζυμα βρίσκονται στον ίδιο αντιδραστήρα με την σακχαροποίηση του υποστρώματος και την ζύμωση να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα (Müller et al., 2017). Μια άλλη διεργασία στην οποία φαίνεται να συμμετέχουν αποτελεσματικά οι LPMOs αποτελεί η παραγωγή ωφέλιμων ενώσεων, όπως το γλυκονικό οξύ, ή σακχάρων με πρεβιοτικό δυναμικό, δηλαδή οξειδωμένων σακχάρων που αξιοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων και καταναλώνονται από προβιοτικούς μικροοργανισμούς της εντερικής χλωρίδα του ανθρώπου (Dibner and Buttin, 2002).

1.3.3 Οι LPMOs ως εργαλεία δομικής τροποποίησης της βιομάζας για την παραγωγή νέων καινοτόμων υλικών

Λόγω της ιδιαίτερης δράσης τους, οι LPMOs δύνανται να αξιοποιηθούν σε πολλές διεργασίες που σχετίζονται με την δομική τροποποίηση της βιομάζας. Οι LPMOs με C1-οξειδωτική δράση έχουν την ικανότητα να εισάγουν καρβοξυλικές ομάδες σε υποστρώματα κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (Hu et al., 2016), όπως φαίνεται και στον μηχανισμό της εικόνας 1.8 κατά τον οποίο τα C1-οξειδωμένα σάκχαρα καταλήγουν να αποκτήσουν δομή αλδονικού οξέως. Με την εισαγωγή μιας καρβοξυλικής ομάδας προστίθεται μια αρνητική φόρτιση στο άκρο της αλυσίδας του πολυσακχαρίτη και με αυτόν τον τρόπο οι LPMOs μπορούν να προωθήσουν την διαδικασία παραγωγής ινιδίων προς σχηματισμό νανοκυτταρίνης σε μορφή νανοκρυστάλλων (CNCs, Cellulose Nanocrystals) ή σε μορφή νανοϊνών (Cellulose Nanofibers). Εκτός από τα κλασικά υδρολυτικά ένζυμα που κατέχουν βασικό ρόλο στην αφαίρεση άμορφων συστατικών κυτταρίνης συμμετέχοντας στον σχηματισμό των ινιδίων της, ολοένα και περισσότερες μελέτες στρέφουν την προσοχή τους στην αξιοποίηση των LPMOs και άλλων ενζύμων βοηθητικής ενεργότητας. Μια δημοσίευση του 2018 αναφέρει ότι ο συνδυασμός μιας AA9 με C1-ενεργότητα μαζί με μια ενδογλουκανάση και α-ξυλανάση οδηγούν στον σχηματισμό σταθεροποιημένων νανοϊνιδίων με ενισχυμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η υψηλή τιμή του ζ-δυναμικού (zeta potential) και της οπτικής διαπερατότητας, ενώ παράλληλα το υλικό διατηρεί τη θερμική σταθερότητά του (Hu et al., 2018). Επομένως, η κατεργασία για την παραγωγή νανοκυτταρίνης με χρήση των LPMOs μπορεί να υποκαταστήσει άλλες επεξεργασίες με δαπανηρά και μη φιλικά προς το περιβάλλον χημικά μέσα, εξαλείφοντας την ανάγκη μηχανικής επεξεργασίας της κυτταρίνης, ενώ ταυτόχρονα καθιερώνει πράσινες ενζυμικές διεργασίες με υψηλή εκλεκτικότητα για την απόκτηση υλικών με προσαρμοζόμενες ιδιότητες. Σχετικές εφαρμογές ενζύμων θα μπορούσαν ενδεχομένως να επεκταθούν για την επεξεργασία ινών στην βιομηχανία.

Μια ακόμη σημαντική δυνατότητα που παρέχει η χρήση των LPMOs είναι η ικανότητα τους να τροποποιούν επιφανειακές ιδιότητες του μορίου ενός υδατάνθρακα με τρόπο που τον καθιστά επιδεικτικό στη συνέχεια για την προσθήκη ενώσεων υπό μορφή διακλαδώσεων στην πολυμερική του αλυσίδα (polymer grafting modification). Η πρόσφατη πρωτοποριακή εργασία των Wang et al. το 2018 που εφαρμόστηκε στη χιτίνη, αναφέρει ότι μια AA11 LPMO του μύκητα *Fusarium fujikuroi* είναι σε θέση να εισάγει μια καρβοξυλική ομάδα στο υπόστρωμα υπό ήπιες συνθήκες ενζυμικής οξείδωσης σε υδατικό διάλυμα, χωρίς να προκαλέσει μεταβολή της κρυσταλλικότητας των ινών του. Αυτή η μελέτη ανοίγει τον δρόμο για την παραγωγή νέων και καινοτόμων λειτουργικών νανοϋλικών, με πολλαπλές εφαρμογές όπως η χρήση τους ως βάσεις-ικριώματα (scaffolds) για την δημιουργία νανοαισθητήρων, βιολογικών ιχνηθετών και πεπτιδίων. Με όμοιες διαδικασίες είναι εφικτή η τροποποίηση των επιφανειακών ιδιοτήτων της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης για την απόδοση οξειδωμένων προϊόντων με γνωστές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Sprangler et al., 2003) και άλλων τροποποιημένων υλικών (Wohlhauser et al., 2018). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μια LPMO του *Neurospora crassa* έχει αναφερθεί ότι εισάγει ομάδες καρβοξυλίου κυρίως σε περιοχές υψηλής κρυσταλλικότητας που εντοπίζονται στην επιφάνεια των ινιδίων

κυτταρίνης (Eibinger et al., 2014). Το παραπάνω προσφέρει μεγάλη προοπτική όσον αφορά τον σχεδιασμό διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στον ίδιο αντιδραστήρα (one-pot reactions) με μεγάλη εκλεκτικότητα για την παραγωγή υλικών με προέλευση τη βιομάζα (bio-based materials).

1.4 Το σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών της ζύμης *Pichia pastoris*

1.4.1 Χαρακτηριστικά του συστήματος έκφρασης *P. pastoris*

Η *Pichia pastoris* είναι μια μεθυλότροφη ζύμη που ανήκει στην κατηγορία των ασκομύκητων. Ένας από τους πιο σημαντικούς κλάδους της γενετικής μηχανικής είναι η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας βιολογικά συστήματα έκφρασης. Το σύστημα έκφρασης της ζύμης *P. pastoris* είναι ένα από τα πιο δημοφιλή και τυπικά εργαλεία για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στη μοριακή βιολογία. Συνολικά, τα οφέλη της παραγωγής πρωτεϊνών από το σύστημα *P. pastoris* περιλαμβάνουν την σωστή αναδίπλωση (στο ενδοπλασματικό δίκτυο), τις κατάλληλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (πχ. γλυκοζυλίωση) και έκκριση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, ενώ τα κύτταρα της ζύμης μπορούν να συνθέσουν με επιτυχία πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (Cregg, 2007). Επιπλέον, λόγω της περιορισμένης παραγωγής ενδογενών εκκρινόμενων πρωτεϊνών, το σύστημα έκφρασης *P. pastoris* διευκολύνει τον καθαρισμό της εκκρινόμενης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από το υπερκείμενο του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης. Ο μεθυλότροφος ζυμομύκητας διακρίνεται ως ένα σύστημα έκφρασης που αναπτύσσεται σε μεγάλη κλίμακα, έχει διαθέσιμους ισχυρούς και αυστηρά ρυθμιζόμενους επαγωγείς έκφρασης (όπως ο GAP και AOX1) και δίνει την δυνατότητα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων (g/L) με σχετική τεχνικά ευκολία αλλά και χαμηλότερο κόστος από άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, τόσο εσωκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών έκκρισης (Barr et al., 1992). Οι δυο κύριοι επαγωγείς του συστήματος, ο υποκινητής GAP της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) και ο υποκινητής AOX1 της αλκοολικής οξειδάσης (AOX), ενεργοποιούνται και εμφανίζουν τα βέλτιστα επίπεδα έκφρασης καταβολίζοντας ως πηγή άνθρακα γλυκόζη και μεθανόλη αντίστοιχα (Cereghino et al., 2002). Η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, μπορεί να ελεγχθεί και να βελτιστοποιηθεί σχετικά εύκολα ανάλογα με το στέλεχος έκφρασης, αλλά και της πρωτεΐνης στόχου, καθώς εξαρτάται από παράγοντες όπως η πηγή άνθρακα, ο αερισμός, ο χρόνος, η θερμοκρασία, το pH και ο ρυθμός ανάδευσης κατά την επώαση. Ως ένα αξιόπιστο σύστημα ετερόλογης έκφρασης, μπορεί να προσλάβει ξένο γραμμικό DNA με υψηλή απόδοση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού για την δημιουργία σταθερών ανασυνδυασμένων στελεχών που

επιτρέπουν την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων της πρωτεΐνης στόχου. Συγκριτικά με τα βακτηριακά συστήματα, απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες (σε επίπεδο μg) του πλασμιδίου. Ο αριθμός των μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* (1000) είναι υψηλότερος από τα μετασηματισμένα κύτταρα *P. pastoris* (100) ανά μg πλασμαδιακού DNA (S. Wu & Letchworth, 2004). Αν και σε περιορισμένο αριθμό, τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται για τον ανασυνδυασμό της *P. Pastoris* διαθέτουν κάποια γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των επιτυχώς μετασηματισμένων στελεχών, τα γονίδια των οποίων είναι: *his4* (βιοσύνθεση L-ιστιδίνης), *arg4* (βιοσύνθεση L-αργινίνης) και *shble* (ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη) (Cereghino & Cregg, 1999). Ως ευκαρυωτικός οργανισμός, επιτελεί πολύπλοκες και σημαντικές διεργασίες παρέχοντας τη δυνατότητα παραγωγής διαλυτών, σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που έχουν υποστεί όλες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτούνται για τη λειτουργικότητά της. Βασικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν η γλυκοζυλίωση των εξωκυτταρικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών στο πεπτιδικό μόριο. Στα πλεονεκτήματα του συστήματος κατατάσσεται η υψηλή ομοιότητα γλυκοζυλίωσης με τα κύτταρα των θηλαστικών αλλά και ότι συνήθως δεν υπεργλυκοζυλιώνει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες συγκριτικά με άλλες ζύμες όπως ο *S.cerevisiae*. Η έκφραση οποιουδήποτε ανασυνδυασμένου γονιδίου στην *P. pastoris* έχει τρεις φάσεις: (α) Εισαγωγή νέου γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης και κλωνοποίηση (β) μετασηματισμός και εισαγωγή του κλωνοποιημένου φορέα εντός του γονιδιώματος του ξενιστή *P. pastoris* και (γ) έλεγχος και επιλογή του στελέχους που εκφράζει σωστά το γονίδιο και παράγει σε μεγάλη ποσότητα την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (Macaulay - Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005).

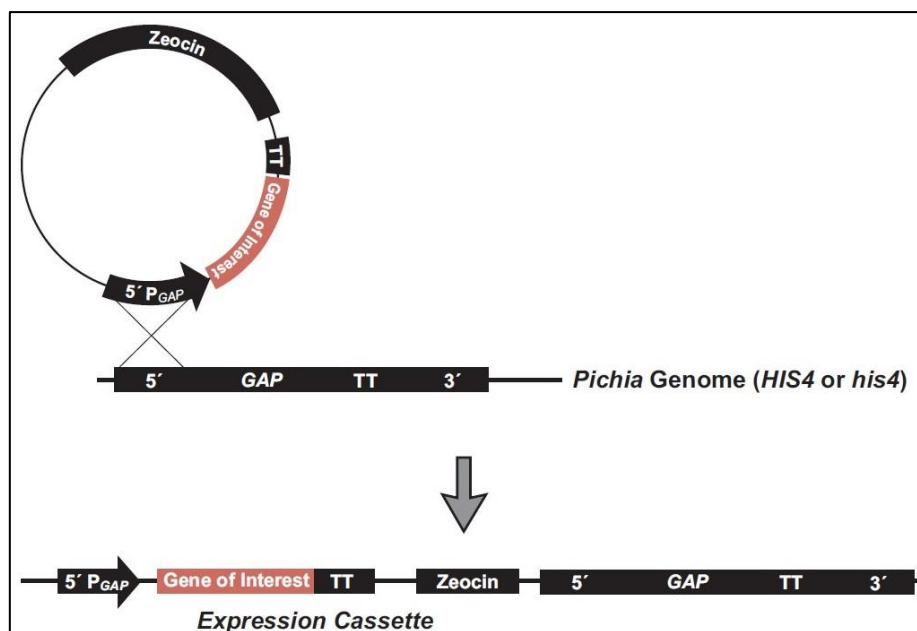
1.4.2 Μετασηματισμός της ζύμης *P. pastoris* και ο υποκινητής GAP

Ο υποκινητής GAP ανήκει στους υποκινητές συνεχούς έκφρασης που επιτρέπει την έκφραση πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα στο σύστημα της ζύμης *P. pastoris*. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GAPDH η έκφραση της οποίας οδηγεί στην παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ανάλογα με την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται (Waterham et al., 1997). Το ένζυμο GAPDH συμμετέχει στην κατάλυση του έκτου σταδίου της γλυκόλυσης συμβάλλοντας στην διάσπαση της γλυκόζης ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται με χρήση του υποκινητή GAP είναι ελαφρώς μεγαλύτερα συγκριτικά με αυτά που επιτυγχάνει ο υποκινητής της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 και επιπρόσθετα προσφέρει το πλεονέκτημα της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και απουσία της τοξικής μεθανόλης που απαιτεί ο AOX1.

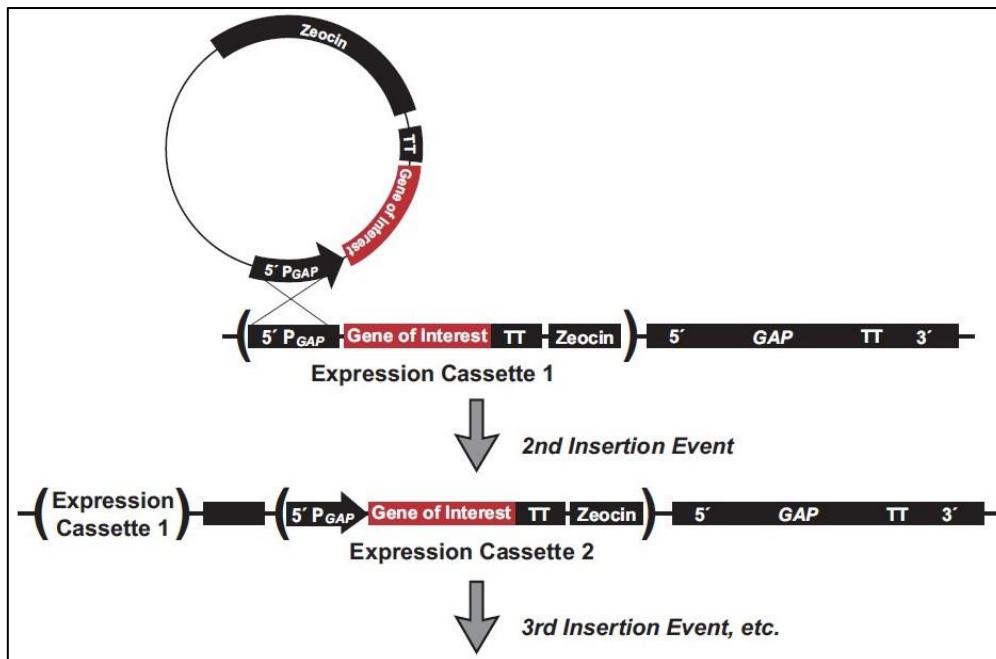
Το γραμμικό DNA μπορεί να παράγει σταθερά μετασηματισμένα κύτταρα *P. pastoris* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ του πλασμιδιακού DNA και περιοχές του γονιδιώματος του κυττάρου που εμφανίζουν ομολογία (Cregg et al., 1989). Έτσι, η ενσωμάτωση της αλληλουχίας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο χρωμόσωμα της ζύμης πραγματοποιείται με ομόλογο ανασυνδυασμό στην συντηρημένη περιοχή 5' GAP της αλληλουχίας του υποκινητή GAP του χρωμοσώματος της *P. pastoris*. Με αυτόν τον τρόπο τα

ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν την δυνατότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε θρεπτικά μέσα παρουσία γλυκόζης ως πηγής άνθρακα.

Κατά την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου μετασχηματισμού, είναι πιθανή η εισαγωγή πολλαπλών πλασμιδιακών DNA με αποτέλεσμα την δημιουργία μετασχηματισμένων στελεχών *P. pastoris* πολλαπλών αντιγράφων (Multi-Copy). Η διαδικασία αυτή είναι αυθόρμητη και εντοπίζεται σε ποσοστό που κυμαίνεται σε 1-10% του συνόλου των μετασχηματισμών με εισαγωγή ενός μόνο αντιγράφου πλασμιδιακού DNA (Single-Copy) (Daly et al., 2005). Η εισαγωγή των πολλαπλών αντιγράφων λαμβάνει χώρα διαδοχικά στην ίδια περιοχή του υποκινητή. Επιπρόσθετα, η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του ανασυνδυασμένου γονιδίου σε ένα μόνο κύτταρο συνήθως αποτελεί πλεονέκτημα έναντι ενός single-copy μετασχηματισμένου κυττάρου, καθώς αυτό υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να συνεπάγεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου και άρα μεγαλύτερη παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η ανίχνευση τέτοιων ανασυνδυασμένων κλώνων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δοκιμές που βασίζονται σε συγκεκριμένο πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen η οποία προμηθεύει το πλασμίδιο pGAPZaC.



Εικόνα 1.14 Απεικόνιση του ομόλογου ανασυνδυασμού, στην περιοχή του υποκινητή GAP, του γονιδίου (Expression Cassette) που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών με την ενσωμάτωση ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pGAPZaC (Single Copy) στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. (Invitrogen)



Εικόνα 1.15. Απεικόνιση του ομόλογου ανασυνδυασμού, στην περιοχή του υποκινητή GAP, του γονιδίου (Expression Cassette) που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών με την ενσωμάτωση κατά σειρά πολλαπλών ανασυνδυασμένων πλασμιδίου pGAPZac (Multi Copies) στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. (Invitrogen)

1.4.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στον ευκαρυωτικό οργανισμό *P. pastoris*

Το σύστημα έκφρασης της μεθυλότροφης ζύμης *P. pastoris* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες για την δημιουργία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών λόγω της ικανότητας της, ως ευκαρυωτικός οργανισμός, να εκτελεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), εκκρίνοντας στη συνέχεια την πρωτεΐνη εξωκυτταρικά στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας στην οποία αναπτύσσεται. Βασικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και η γλυκοζυλίωση για την σωστή αναδίπλωση και τον σχηματισμό της δομής του πεπτιδικού μορίου στο χώρο, αλλά και η αποκοπή του σηματοδοτικού πεπτιδίου της εκκρινόμενης πρωτεΐνης.

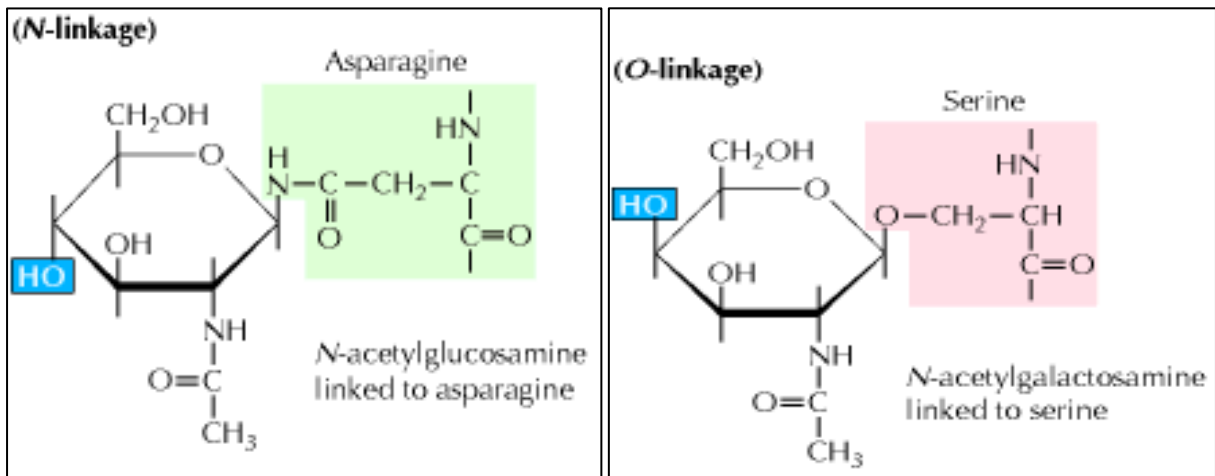
Όπως προαναφέρθηκε, οι LPMOs που προέρχονται από μύκητες εμφανίζουν μεθυλίωση του καταλοίπου His1. Όμως, η έκφραση στον οργανισμό *P. pastoris* παράγει μη μεθυλιωμένες LPMOs. Έτσι, η ετερόλογη έκφραση της μελετούμενης LPMO που ανήκει στον μύκητα *M. thermophila* και παράχθηκε ετερόλογα στην ζύμη *P. pastoris*, δεν αναμένεται να έχει την συγκεκριμένη μεθυλίωση. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ρόλος της μεθυλίωσης δεν καθορίζει την ενεργότητα του ενζύμου. Συνεπώς, η επιλογή της ετερόλογης έκφρασης σε αυτό το σύστημα για την μελέτη του ενζύμου δεν αναμένεται να δημιουργήσει προβλήματα, όμως αυτή η παράμετρος θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν για τυχόν παρατηρήσεις που ενδέχεται να προκύψουν. Όσον αφορά το σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης, η ακριβής

αποκοπή του είναι μείζονος σημασίας για την ενεργότητα του ενζύμου, καθώς το επόμενο αμινοξύ μετά από το σηματοδοτικό πεπτιδίο, δηλαδή το αμινοξύ του N-άκρου του πεπτιδίου, είναι ένα κατάλοιπο His1 που συμμετέχει στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του.

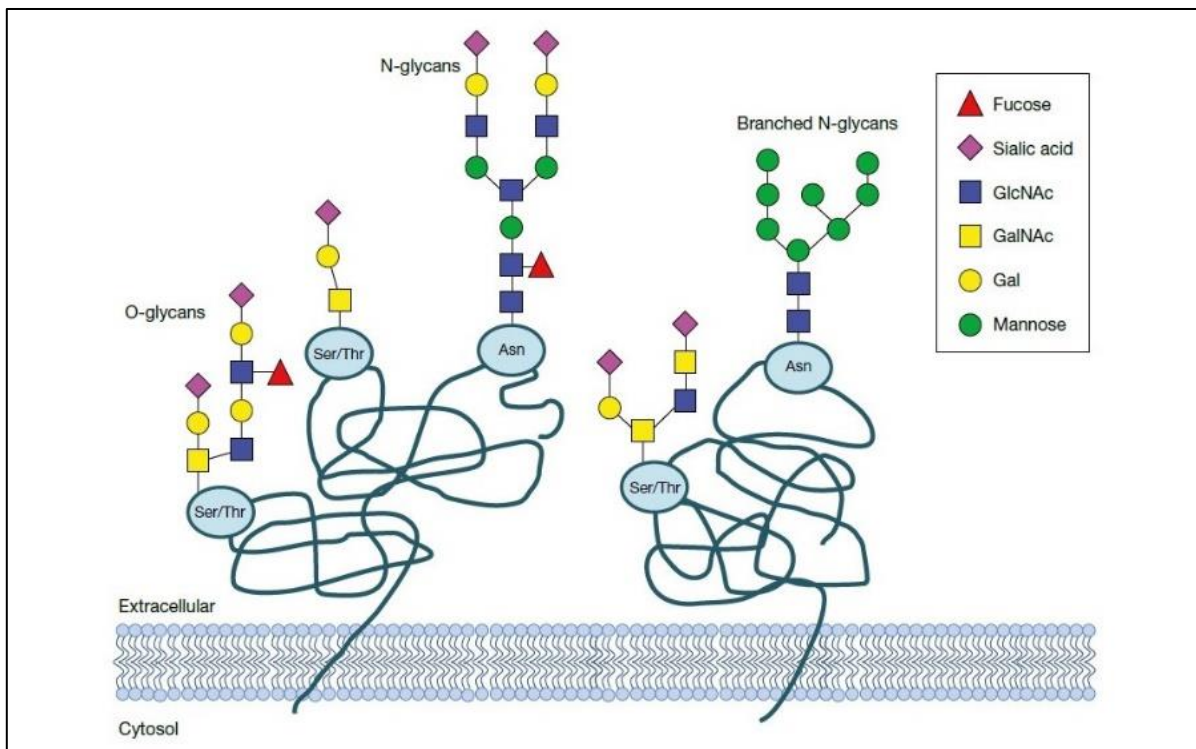
Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες που επιτελούνται κατά την μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η γλυκοζυλίωση των εξωκυτταρικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών με ομοιοπολική σύνδεση ολιγοσακχαριτικών τμημάτων σε πλευρικές αλυσίδες συγκεκριμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών, μέσα από ένα σύνθετο μονοπάτι ενζυμικών αντιδράσεων προς σχηματισμό γλυκοπρωτεϊνών. Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών είναι καθοριστική για την διασφάλιση της σωστής αναδίπλωσης της πεπτιδικής αλυσίδας αλλά και για την σταθερότητά του μορίου τους. Έχει συνδεθεί στη βιβλιογραφία με την αυξημένη θερμοσταθερότητα του ενζύμου, ωστόσο η υπερ-γλυκοζυλίωση πολλές φορές δύναται να δημιουργήσει πρόβλημα, καθώς, παραδείγματος χάρη, τα σάκχαρα μπορεί να προσδεθούν σε κάποιο σημείο που είναι κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Είναι μια ενζυμική διαδικασία που συνδέει σάκχαρα ή ομάδες σακχάρων (γλυκάνες) σε πρωτεΐνες με σχηματισμό γλυκοζιτικών δεσμών. Το πλήρες πρότυπο αυτών των τροποποιήσεων πραγματοποιείται από μια συγχρονισμένη δράση πληθώρας γλυκοζυλιωτικών ενζύμων στο σύστημα Golgi και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο βαθμός της γλυκοζυλίωσης μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τον αριθμό των θέσεων γλυκοζυλίωσης που διαθέτει όπως επίσης και από τους μηχανισμούς έκφρασης και την λειτουργία των εξειδικευμένων ενζύμων γλυκοζυλίωσης του εκάστοτε κυτταρικού συστήματος έκφρασης. Οι δυο κύριοι μηχανισμοί γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών είναι η σύνδεση σε αυτές γλυκανών με O- και N-γλυκοζυλίωση.

Στην O-γλυκοζυλίωση σάκχαρα προστίθενται διαδοχικά στο οξυγόνο του υδροξυλίου ενός κατάλοιπου σερίνης (Ser) ή θρεονίνης (Thr) της πρωτεΐνης. Συνήθως το πρώτο μόριο που συνδέεται με την πρωτεΐνη είναι η N-ακετυλογλυκοσαμίνη (GlcNAc) με τον συγκεκριμένο τύπο σύνδεσης να λαμβάνει το όνομα της από τον σχηματισμό γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ του οξυγόνου της ομάδας υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης και ενός ατόμου άνθρακα της GlcNAc.

Η N-γλυκοζυλίωση αποτελεί τον πιο συχνό τύπο γλυκοζυλίωσης, αφού δημιουργεί το 90% των παραγόμενων γλυκοπρωτεϊνών. Για την δημιουργία N - γλυκοζυλιώσεων, ολιγοσακχαρίτες προσκολλούνται στο αμιδικό άζωτο του κατάλοιπου ασπαραγίνης (Asn) με N-γλυκοζιτικό δεσμό, εντός της ακολουθία συναίνεσης Asn - X - Ser / Thr (όπου το X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από Προλίνη) (Schwarz & Aebi 2011). Όπως και στην O-γλυκοζυλίωση, συνήθως το πρώτο μόριο που συνδέεται με την πρωτεΐνη είναι η N-ακετυλογλυκοσαμίνη (GlcNAc). Η σύνδεση προκύπτει από τον αρχικό σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα N-ακετυλογλυκοσαμίνης (GlcNAc) με το άτομο αζώτου της ελεύθερης αμινομάδας -NH₂ του αμινοτελικού άκρου του αμινοξέως ασπαραγίνη (N-συνδεδεμένη γλυκοπρωτεΐνη).



Εικόνα 1.16 Αντιπροσωπευτική εικόνα O- και N- γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών. Σε αυτές διακρίνεται η O- και N- σύνδεση του σακχάρου γλυκάνης στα αμινοξικά κατάλοιπα Σερίνης/Θρεονίνης και Ασπαραγίνης αντίστοιχα.



Εικόνα 1.17 Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού των γλυκοζιτικών δεσμών N- και O- Γλυκοζυλίωσης μεταξύ ενός σακχάρου γλυκάνης και ενός αμινοξέως Ασπαραγίνης και Σερίνης ή Θρεονίνης αντίστοιχα.

1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την ανίχνευση του γονιδίου που κωδικοποιεί μια μη χαρακτηρισμένη λυτική μονοοξυγενάση των πολυσακχαριτών (LPMO) της οικογένειας AA9 από το γονιδίωμα του θερμόφιλου μύκητα *M. Thermophila* και την ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *P. pastoris*. Εν συνεχεία, η εργασία αποσκοπεί στην παραγωγή σε σύστημα αναδευόμενων φιαλών, τον καθαρισμό και την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μετά την επιτυχή απομόνωσή της, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη πρόκειται να μελετηθεί με σκοπό τον χαρακτηρισμό βιοχημικών ιδιοτήτων της όπως η ανίχνευση της καταλυτικής ενεργότητας σε διαφορετικά υποστρώματα πολυσακχαριτών αλλά και άλλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων της. Σε αυτό αναμένεται να συμβάλει επικουρικά η βιοπληροφορική μελέτη της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, μέσω της οποίας είναι δυνατή η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών και η πρόβλεψη θεωρητικών μεγεθών που σχετίζονται με την μελετούμενη LPMO.

Η επίτευξη αυτού του σκοπού πιθανώς να οδηγήσει στην παραγωγή ενός ενζύμου με χαρακτηρισμένες ιδιότητες και ενεργότητα LPMO. Λόγω της αρκετά πρόσφατης ανακάλυψης αυτής της κατηγορίας ενζύμων και του σύνθετου μηχανισμού δράσης τους σε λινινοκυταρινούχα υποστρώματα, τα τελευταία χρόνια οι LPMOs αξιολογούνται από την επιστημονική κοινότητα ως ένζυμα υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Σε αυτή την κατεύθυνση κινείται και η παρούσα διπλωματική εργασία με την μελέτη μιας μη χαρακτηρισμένης αλληλουχίας LPMO. Δεδομένου του πλαισίου δράσης τους, οι LPMOs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές για την δημιουργία νέων καινοτόμων υλικών όπως η νανοκυτταρίνη, ενώ λόγω της μεγάλης σταθερότητας των ενζύμων των θερμόφιλων μυκήτων, η αξιοποίηση τους σε διεργασίες βιομηχανικής κλίμακας ενδέχεται να δώσει νέες προοπτικές για την αποδοτικότερη αξιοποίηση της βιομάζας σε παραγωγικούς τομείς όπως αυτοί των βιοκαυσίμων και των υλικών.

2. Βιοπληροφορική μελέτη

2.1 Εύρεση γονιδίου AA9 LPMO σε βάσεις δεδομένων

Η αναζήτηση του γονιδίου της πρωτεΐνης που πρόκειται να μελετηθεί έγινε με σκοπό την εύρεση μιας μη χαρακτηρισμένης LPMO που εμφανίζει C1-οξειδωτική ή C4-οξειδωτική δράση. Αυτές που καταλύουν την οξείδωση του C4 άκρου ενός σακχάρου εμφανίζουν κυρίως δράση σε ολιγοσακχαρίτες, ενώ αυτές που καταλύουν την οξείδωση του C1 άκρου συνήθως αξιοποιούνται επικουρικά σε εφαρμογές που σχετίζονται με την απομόνωση νανοκυτταρίνης. Μια ακόμη παράμετρος για την αναζήτηση του γονιδίου ήταν η προέλευση της πρωτεΐνης από τον μικροοργανισμό *M. thermophila*, καθώς ο συγκεκριμένος μύκητας όπως έχει επισημανθεί προηγουμένως παράγει πολλά θερμόφιλα ένζυμα, ενώ υπάρχει εκτεταμένη εμπειρία από την μελέτη του κυτταρινολυτικού και ημικυτταρινολυτικού του συστήματος.

Η εύρεση των υποψήφιων LPMO αλληλουχιών του *M. thermophila* πραγματοποιήθηκε στην CAZy. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η CAZy αποτελεί μια βάση δεδομένων που περιέχει ταξινομημένα μαζί με σχετικές πληροφορίες ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση, τον μεταβολισμό και την αναγνώριση σύνθετων υδατανθράκων. Η ταξινόμηση των αλληλουχιών γίνεται με βάση την πρόβλεψη βιοπληροφορικών εργαλείων που στηρίζονται στην πρωτοταγή αλληλουχία και χρησιμοποιούν την παραδοχή ότι η ομοιότητα στη λειτουργία μεταξύ πρωτεϊνών προκύπτει από την ομοιότητα στη δομή, η οποία με την σειρά της απορρέει από την ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας. Έτσι, αυτές οι αλληλουχίες γονιδίων θεωρητικά παράγουν τα ένζυμα που αναφέρονται στην CAZy, εκτός από τις περιπτώσεις όπου τελικά αυτές έχουν χαρακτηριστεί. Μετά την πρόσφατη ανακάλυψη ότι τα μέλη των οικογενειών CBM33 (νυν AA10) και GH61 (νυν AA9), είναι στην πραγματικότητα LPMOs, η CAZy περιλαμβάνει μια νέα κατηγορία βοηθητικών ενζύμων (Auxiliary Activities) στην οποία ομαδοποιεί τις οικογένειες των LPMOs και άλλων οξειδοαναγωγικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διάσπαση της λιγνινοκυτταρίνης (Levasseur et al., 2013). Η CAZy απαριθμεί αλληλουχίες LPMO που ανήκουν στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *M. thermophila* και ταξινομούνται στην ομάδα βοηθητικών ενζύμων (AA, Auxiliary Activity). Η αναζήτηση στο γονιδίωμά του έδωσε συνολικά τριάντα ενζυμικές αλληλουχίες που ανήκουν σε συνολικά τέσσερις οικογένειες με γνωστή δράση AA. Ειδικότερα, είκοσι τρεις αλληλουχίες ανήκουν στην οικογένεια AA9, τέσσερις στην AA11, μία στην AA13 και τρεις στην AA16).

Εν συνεχεία, με βάση την δημοσίευση των Berka et al. το 2011, της γενομικής ανάλυσης του *M. Thermophila*, πραγματοποιήθηκε εύρεση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν εξωκυτταρικά εκκρινόμενες LPMO όταν ο μύκητας αναπτύσσεται σε λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, καταλήγοντας στις πρωτεΐνες GH61, δηλαδή την σημερινή οικογένεια AA9 της CAZy. Από τις αλληλουχίες AA9 που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί έγινε η επιλογή αυτής με την κωδική ονομασία MYCTH_110651 στην CAZy και κωδικό γονιδίου στη βάση δεδομένων GenBank: AEO54509.1. Το ένζυμο αυτό περιέχει την λειτουργική περιοχή

πρόσδεσης υδατανθράκων CBM1 (Carbohydrate-Binding Module Family 1), η οποία εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε μύκητες και προσδίδει χαρακτηριστική λειτουργικότητα σύνδεσης με την κυτταρίνη. Με βάση τον αριθμό EC (Enzyme Commission number), οι LPMOs με C1-οξειδωτική δράση ταξινομούνται στην κατηγορία EC 1.14.99.54 (lytic cellulose monoxygenase (C1-hydroxylating)).

Η ιστοσελίδα MycoCosm-Genome Portal του Ινστιτούτου JGI (Joint Genome Institute) (<https://mycoCosm.jgi.doe.gov/Spoth2/Spoth2.home>) αποτελεί μια βάση δεδομένων που περιέχει όλες τις έως σήμερα γνωστές πληροφορίες όσον αφορά το γονιδίωμα του μύκητα *M. thermophila* (*T. thermophilus* ATCC 42464).

Από την βάση δεδομένων MycoCosm, το γονίδιο του ενζύμου εντοπίζεται στο πέμπτο χρωμόσωμα του γονιδιώματος του *M. Thermophila* και έχει μήκος 1873 νουκλεοτιδίων (bp). Περιέχει έξι εξώνια και το μετάγραφο του γονιδίου μετά την μεταγραφή και την αφαίρεση των εσωνίων έχει μήκος 1336 bp. Η κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου μεταξύ του κωδικωνίου έναρξης και λήξης αποτελείται συνολικά από 909 νουκλεοτίδια (bp) και συνεπώς η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται από 303 αμινοξέα (aa). Η πρωτεΐνη έχει την κάτωθι αμινοξική αλληλουχία σε μορφή FASTA:

>jgi|Spoth2|110651|Spoth1.estExt_fgfnesh1_kg.C_20587

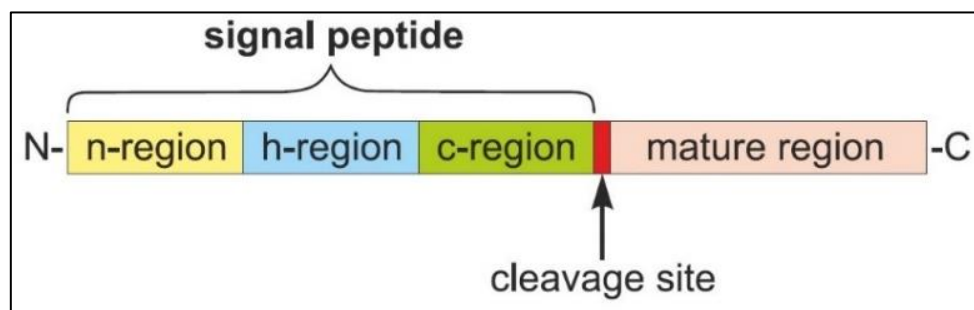
```
MKGLLGAAALSLAVSDVSAHYIFQQLTTGGVKHAVVYQYIRKNTNYNPVTDLTSNDLRCNVGATGAGTD
TVTVRAGDSFTFTDTPVYHQGPTSIYMSKAPGSASDYDGGSGWFKIKDWGADFSSGQATWTLASDYT
ATIPECIPP GDYLLRIQQLGIHNPWPAGIPQFYISCAQITVTGGGSANPGPTVSIPGAFKETDPGYTVNIYN
NFHNYTVPGRAVFTCNNGSGGNNGGSNPVTTTTTTTTRPSTSTAQSQPSSSPTSPSSCTVAKWGQCGG
QGYSGCTVCAAGSTCQKTNDYYSQCL
```

Μετά την εύρεση της πεπτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της ομοιότητας της με άλλες γνωστές αλληλουχίες με χρήση του υπολογιστικού αλγορίθμου BLAST που παρέχεται από το Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI, National Center for Biotechnology Information). Ο υπολογιστικός αλγόριθμος BLAST (Altschul et al., 1990) στοιχίζει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων με καταχωρημένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων και εξάγει το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους. Ειδικότερα, η αλληλουχία MYCTH_110651 αρχικά στοιχίστηκε με ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων Non-reductant protein sequences του BLAST, η οποία συγκεντρώνει αλληλουχίες από άλλες βάσεις δεδομένων, όπως η GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) και η SwissProt (<https://www.uniprot.org/>). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης ανέδειξαν ως αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ομοιότητα δυο αλληλουχίες της οικογένειας GH61 (νυν AA9) που ανήκουν σε μύκητες οι οποίοι διακρίνονται από την ικανότητα τους στην αποδόμηση της βιομάζας. Αυτές είναι η KAB5559570.1 του μύκητα *Coniochaeta sp. 2T2.1* σε ποσοστό 68.38% (percent identity) και η XP003651868.1 του θερμόφιλου μύκητα *Thermothielavioides terrestris NRRL 8126* σε ποσοστό 74.39%. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση μόνο στην βάση PDB (Protein Data Bank) (<https://www.rcsb.org/>) για την εύρεση όμοιων γονιδίων με λυμένες κρυσταλλογραφικά δομές. Οι επικρατέστερες δομές της στοιχίσης αλληλουχιών ανήκουν σε δυο LPMOs, την

PchGH61D του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* σε ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας 41.40% και την NcLPMO9F του μύκητα *Neurospora crassa* σε ποσοστό 39.07%. Οι μελέτες της δομής και του χαρακτηρισμού των δυο παραπάνω ενζύμων παραθέτουν στοιχεία για την ύπαρξη περιοχών δέσμευσης της κυτταρίνης όμοιες με αυτές της CBM1. Από την ανάλυση των προϊόντων της PchGH61D φαίνεται αυτή να έχει μόνο C1- οξειδωτική δράση (Wu et al., 2013), ενώ η NcLPMO9F C1- και C4- οξειδωτική δράση σε υποστρώματα κυτταρίνης αλλά και άλλα όπως η ξυλογλυκάνη (Borisova et al., 2015, Kracher et al., 2019). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί, ότι η αλληλουχία που αναλύθηκε στον αλγόριθμο Blast δεν περιείχε το σηματοδοτικό πεπτιδίο, η εύρεση του οποίου αναλύεται στην επόμενη ενότητα, καθώς αυτό αφαιρείται κατά την εξωκυτταρική έκκριση της πρωτεΐνης και δεν συμπεριλαμβάνεται στην τελική της δομή.

2.2 Πρόβλεψη του σηματοδοτικού πεπτιδίου της πρωτεΐνης

Το σηματοδοτικό πεπτιδίο (signal peptide) ή αλληλουχία έκκρισης είναι μια πεπτιδική αλληλουχία μήκους 25-30 αμινοξέων που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο (N-terminal) των σχηματιζόμενων πρωτεϊνών και φέρει πληροφορίες σχετικά με το μονοπάτι και τον προορισμό έκκρισης της πρωτεΐνης. Η βασική δομή ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου περιλαμβάνει κατά σειρά τρεις περιοχές: τη θετικά φορτισμένη N-περιοχή, την υδρόφοβη-H περιοχή και την ουδέτερη αλλά πολική C-περιοχή. Η τελευταία περιλαμβάνει μια περιοχή αποκοπής, στην οποία μια πεπτιδάση αποκόπτει και αφαιρεί το σηματοδοτικό πεπτιδίο σε κάποιο στάδιο της έκκρισης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (von Heijne, 1983, 1985). Στην παρούσα διπλωματική η αξιοποίηση του σηματοδοτικού πεπτιδίου αποτελεί μέρος της στρατηγικής εξωκυτταρικής έκκρισης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με σκοπό την αποτελεσματικότερη απομόνωσή της από το μέσο ανάπτυξης.



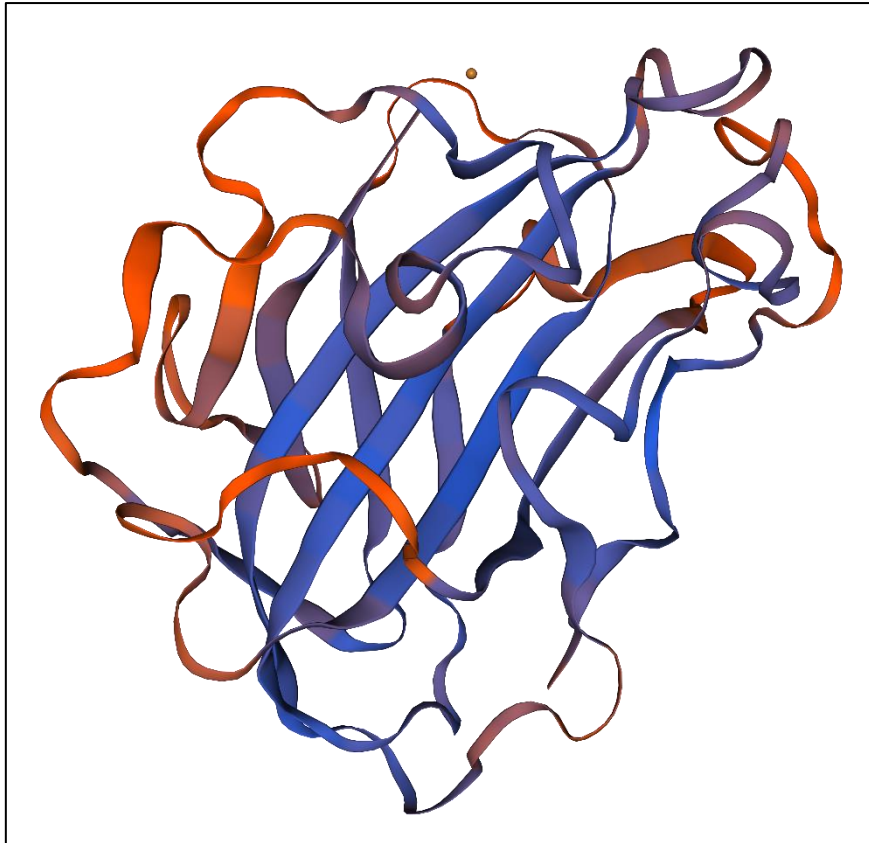
Εικόνα 2.1. Μια τυπική δομή σηματοδοτικού πεπτιδίου εξωκυτταρικά εκκρινόμενης πρωτεΐνης. (Burdukiewicz et al. 2018)

πρωτεϊνών γνωστής τρισδιάστατης δομής που είναι καταχωρημένες σε ένα πλήθος βάσεων δεδομένων και στη συνέχεια εντοπίζει τις ομόλογες αλληλουχίες, δηλαδή τις αλληλουχίες με μεγάλο βαθμό ομοιότητας προς την άγνωστη αλληλουχία. Με βάση την αρχή ότι η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης καθορίζει μονοσήμαντα τη δομή της, αλληλουχίες με μεγάλη ομοιότητα θα έχουν κατά βάση παρόμοια δομή. Έτσι, το υπολογιστικό εργαλείο μοντελοποιεί την τρισδιάστατη δομή της μελετούμενης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τη δομή της ομόλογης της σαν πρότυπο (template). Από το σύνολο των ομόλογων αλληλουχιών, διακρίνει αυτές με την μεγαλύτερη ομοιότητα και εξάγει χρήσιμες τιμές, όπως το ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας, για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων της προβλεπόμενης τρισδιάστατης δομής.

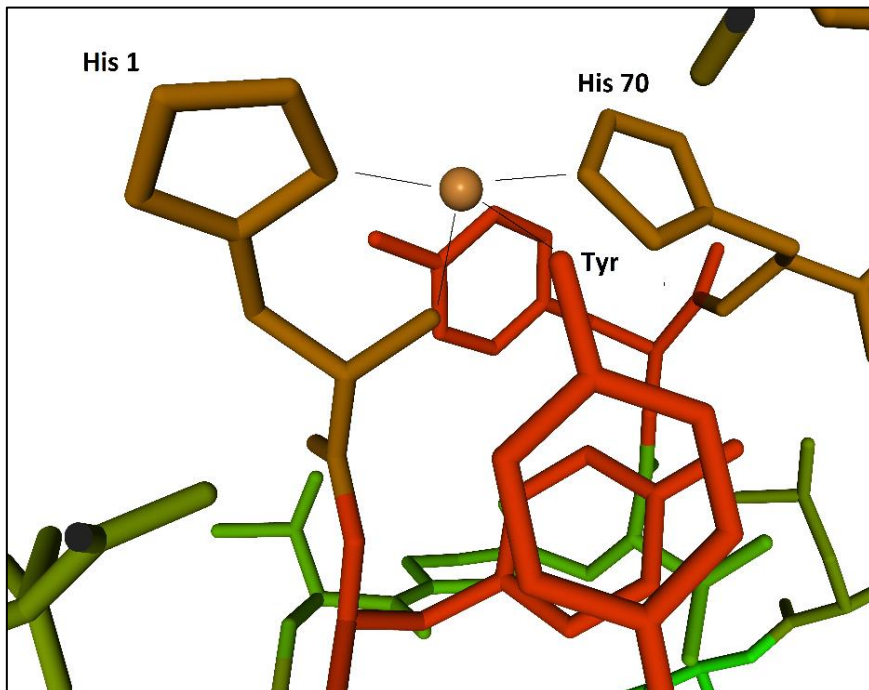
Η πρόγνωση της τρισδιάστατης δομής της αλληλουχίας MYCTH_110651 έγινε με βάση την αλληλουχία της εξωκυτταρικά εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Η εξωκυτταρικά εκκρινόμενη πρωτεΐνη δεν περιλαμβάνει το σηματοδοτικό πεπτιδίο έκκρισης, ενώ επιπρόσθετα για την εξυπηρέτηση ορισμένων σταδίων στα πλαίσια της ετερόλογης έκφρασης, στο τέλος της αλληλουχίας έχει προστεθεί μια αλληλουχία που περιέχει τον c-myc επίτοπο και έξι αμινοξέα ιστιδίνης (6xHis). Έτσι η τελική αλληλουχία της εκκρινόμενης πρωτεΐνης διαμορφώνεται ως εξής:

```
HYIFQQLTTGGVKNHAVYQYIRKNTNYNSPVTDLTSNDLRCNVGATGAGTDTVTVRAGDSFTFTTDTDPVY
HQGPTSIYMSKAPGSASDYDGGSGWFKIKDWGADFSSGQATWTLASDYATIPCEIPPGDYLLRIQQLGI
HNPWPAGIPQFYISCAQITVTGGGSANPGPTVSIPGAFKETDPGYTVNIYNNFHNHYVPGPAVFTCNCS
GGNNGGGSNPVTTTTTTTTTRPSTSTAQSQPSSSPTSPSSCTVAKWGQCGGQGYSGCTVCAAGSTCQKT
NDYYSQCLFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
```

Η μοντελοποίηση της τρισδιάστατης δομής της μελετούμενης LPMO AA9 βασίστηκε στην δομή της NcLPMO9F, μιας AA9 LPMO του μύκητα *Neurospora crassa*, η οποίας παρουσίασε τον μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας με την αλληλουχία (περίπου 39%). Στην εικόνα 2.3 που ακολουθεί απεικονίζεται το σύνολο της δομής της πρωτεΐνης, στην οποία διακρίνεται άμεσα η δευτεροταγής δομή β-πτυχωτού φύλλου με μπλέ χρώμα στο κέντρο του μορίου, ενώ στο άνω μέρος ως πορτοκαλί σφαίρα απεικονίζεται το μόριο χαλκού Cu^{2+} του ενεργού κέντρου. Όπως φαίνεται, το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης βρίσκεται σε μια επίπεδη επιφάνεια είναι εκτεθειμένο στον διαλύτη και όχι σε κάποια σχισμή-τσέπη στο εσωτερικά της τρισδιάστατης δομής που περιορίζει την έκθεση του, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα για τις LPMO και ιδιαίτερα των AA9. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των LPMOs είναι η συμμετοχή ενός αμινοξέως ιστιδίνης του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό φαίνεται στην τρισδιάστατη δομή ως η έναρξη της πεπτιδικής αλυσίδας κοντά στο μόριο χαλκού. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο της LPMO. Σε αυτό διακρίνεται άμεσα η δομή τύπου «βραχίονα» που σχηματίζεται από την συμμετοχή δυο κατάλοιπων ιστιδίνης (His1 και His70) και προσδίδει συγκεκριμένη συναρμογή στο χώρο στον μόριο χαλκού του ενεργού κέντρο. Τέλος, σε αυτή τη δομή φαίνεται να συμμετέχει και ένα κατάλοιπο τυροσίνης, όπως και σε αρκετές άλλες LPMO AA9.



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση “cartoon” της τρισδιάστατης δομής της μελετούμενης LPMO AA9 με την αλληλουχία *MYCTH_110651*.



Εικόνα 2.4 Τρισδιάστατη απεικόνιση του ενεργού κέντρου της LPMO. Στη συναρμογή του μορίου χαλκού (πορτοκαλί χρώμα) διακρίνεται η συμμετοχή των δυο κατάλοιπων ιστοιδίνης (καφε χρώμα), ενώ πιθανώς σε αυτή συμμετέχει και ένα κατάλοιπο τυροσίνης (κόκκινο χρώμα) που εντοπίζεται κοντά στο μόριο χαλκού.

2.4 Πρόβλεψη χαρακτηριστικών μεγεθών της πρωτεΐνης

Το μοριακό βάρος (MW), το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) αποτελούν χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης. Η γνώση της τάξης μεγέθους του μοριακού βάρους της μελετούμενης πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE, ενώ η τιμή του συντελεστή μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται για την εύρεση της συγκέντρωσης του διαλύματος της απομονωμένης πρωτεΐνης με φασματοφωτομετρική μέτρηση της απορρόφησης του στα 280 nm. Τα αμινοξέα, και κατ'επέκταση τα πρωτεϊνικά μόρια, διαθέτουν πλευρικές ομάδες όπως καρβοξυλομάδες και αμινομάδες που ιοντίζονται, με το φορτίο τους να εξαρτάται από την τιμή του pH. Το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης είναι η τιμή του pH κατά την οποία το συνολικό φορτίο της είναι μηδενικό. Στο σημείο αυτό η πρωτεΐνη εμφανίζει την ελάχιστη τιμή διαλυτότητας της, καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ευνοούνται έναντι των αλληλεπιδράσεων νερού-πρωτεΐνης, λόγω της ουδέτερης φόρτισης του μορίου. Επιπρόσθετα, ένα διάλυμα με pH ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης είναι κατάλληλο για την κρυστάλλωση και την καταβύθισή της. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης δείχνει πόσο φως απορροφά μια πρωτεΐνη σε ένα ορισμένο μήκος κύματος εκπομπής και καθορίζεται στο μεγαλύτερο βαθμό από τον αριθμό των αμινοξέων Τυροσίνη, Τρυπτοφάνη, Κυστεΐνη σε μια πεπτιδική αλυσίδα.

Οι παραπάνω φυσικοχημικές ιδιότητες υπολογίστηκαν με χρήση του υπολογιστικού εργαλείου βιοπληροφορικής ανάλυσης ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) το οποίο προσφέρεται στην ιστοσελίδα του server ExPASy (Expert Protein Analysis System) του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (SIB). Ο υπολογισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων έγινε με βάση την αλληλουχία της εξωκυτταρικά εκκρινόμενης πρωτεΐνης, όπως αυτή παρουσιάζεται στην προηγούμενη ενότητα.

Το εργαλείο ProtParam υπολόγισε ότι το πεπτίδιο της ώριμης πρωτεΐνης συνολικά 307 αμινοξέων έχει μοριακό βάρος (MW) ίσο με 34.284 kDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI) ίσο με 5.95. Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας της πρωτεΐνης σε νερό και μήκος κύματος 280 nm υπολογίστηκε με βάση την παραδοχή ότι τα κατάλοιπα κυστεΐνης δεν απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος και ισούται με $51340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.5 Πρόβλεψη θέσεων γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης

O-Γλυκοζυλίωση

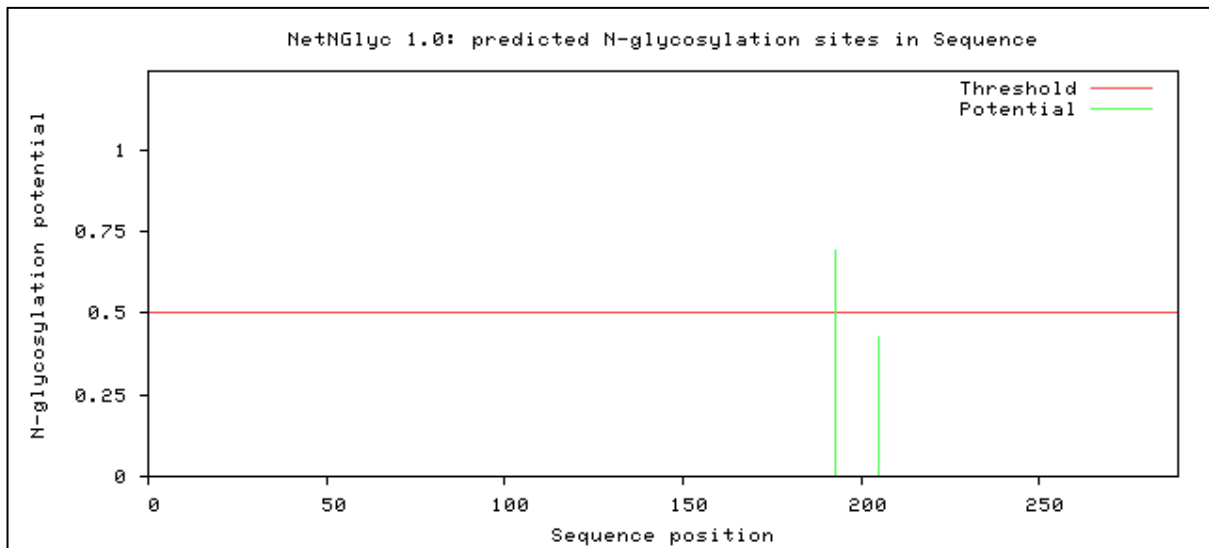
Ο Server NetOGlyc 4.0 του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Δανίας (D.T.U.) αποτελεί ένα υπολογιστικό εργαλείο νευρωνικών δικτύων συνδεδεμένων με βάσεις δεδομένων που προβλέπει τις θέσεις O-γλυκοζυλίωσης (τύπου O-GalNAc) σε κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) ή σερίνης (Ser). Αρχικά, ο NetOGlyc 4.0 εξάγει μια λίστα με πιθανές θέσεις O-γλυκοζυλίωσης στην ακολουθία μαζί με τις βαθμολογίες εμπιστοσύνης της πρόβλεψης. Οι θέσεις με βαθμολογία υψηλότερη του ορίου (threshold) 0.5 επισημαίνονται με την ένδειξη “#POSITIVE” και προβλέπονται ως θέσεις O-γλυκοζυλίωσης. Πρέπει να σημειωθεί, ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ θέσεων O-γλυκοζυλίωσης με άλλες γειτονικές θέσεις γλυκοζυλίωσης δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Επιπλέον, το μοντέλο έχει περιορισμένη ικανότητα πρόβλεψης της εξειδικευμένης δράσης O-γλυκοζυλιωτικών ενζύμων (όπως το GAINAC-Ts) στα επιμέρους πεπτίδια-υποστρώματα. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα πρέπει να ερμηνευθούν ως μια θετική πρόβλεψη της πιθανότητας ύπαρξης της τροποποίησης παρά ως βεβαιότητα αυτής.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μελετούμενης πεπτιδικής αλληλουχίας δίνουν συνολικά 24 θέσεις O-γλυκοζυλίωσης και συγκεκριμένα στα αμινοξέα 64, 188, 226, 234, 238 έως 245, 248 έως 251, 254, 257 έως 262, 264, 265, 267, 280, 283, 289, 290, 294 και 299.

N-Γλυκοζυλίωση

Ο Server NetNglyc 1.0 του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Δανίας (D.T.U.) αποτελεί ένα υπολογιστικό εργαλείο εννέα νευρωνικών δικτύων συνδεδεμένων με βάσεις δεδομένων που προβλέπει τις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης σε κατάλοιπα ασπαραγίνης (Asn) που συμμετέχουν στην αλληλουχία με μορφή Asn-Xaa-Ser/Thr, τριπεπτίδιο απαραίτητο για την ύπαρξη τέτοιας τροποποίησης. Το αμινοξύ Xaa μετά την ασπαραγίνη δεν μπορεί να είναι προλίνη, καθώς είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει στερεοχημικά την N-γλυκοζυλίωση της ασπαραγίνης. Ο αλγόριθμος εντοπίζει τις πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης, υπολογίζει την πιθανότητα ύπαρξης N-γλυκοζυλίωσης, ενώ δίνει τον αριθμό των νευρωνικών δικτύων που συμφωνούν σε αυτό το αποτέλεσμα (Jury Agreement). Το παραπάνω σκορ, σε συνδυασμό με την πιθανότητα της ύπαρξης της τροποποίησης να υπερβαίνει όριο (threshold) του 0.5, αποτελούν κριτήρια για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της πρόβλεψης.

Για την μελετούμενη πεπτιδική αλληλουχία ο NetNGlyc 1.0 ανιχνεύει δυο πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης, εκ των οποίων η μια είναι τελικά αποδεκτή καθώς πληρεί τα κριτήρια. Η θέση αυτή εντοπίζεται στο 193^ο αμινοξύ της αλληλουχίας με πιθανότητα 0.6934, με όλα τα νευρωνικά δίκτυα να συμφωνούν σε αυτό το αποτέλεσμα (Jury Agreement: 9/9).



Εικόνα 2.5. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του NetNGlyc 1.0 λαμβάνονται σε μορφή διαγράμματος. Στον κάθετο άξονα είναι η πιθανότητα ύπαρξης N-γλυκοζυλίωσης, ενώ στον οριζόντιο άξονα είναι η θέση του αμινοξέως στην οποία λαμβάνει χώρα. Το αποδεκτό όριο (threshold) φαίνεται με κόκκινο χρώμα, ενώ με πράσινο απεικονίζεται η πιθανότητα κάθε θέσης.

2.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης του γονιδίου

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης του γονιδίου που κωδικοποιεί την έκφραση της μελετούμενης LPMO πρωτεΐνης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά μελετούμενης πρωτεΐνης LPMO που υπολογίστηκαν κατά την βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου της

Χαρακτηριστικά της μελετούμενης πρωτεΐνης LPMO AA9	
Κωδικός Mycoscosm JGI	110651
Κωδικός GenBank	AEO54509.1
Όνομα CAZy	MYCTH_110651
Οικογένειες πρωτεϊνών CAZy	AA9 (EC 1.14.99.54), CBM1 (EC 1.14.99.54)
Προέλευση γονιδιώματος	Myceliophthora thermophila
Περιοχή (Χρωμόσωμα)	chromosome_1:5810866-5812738
Μήκος γονιδίου (μετάφραση)	1873 bp
Μήκος γονιδίου (μεταγραφή)	1336 bp
Αριθμός εξωνίων	6
Κωδικοποιούσα αλληλουχία (CDS)	909 bp
Αριθμός αμινοξέων	303 aa
Σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης	MKGLLGAAALSLAVSDVSA (19 aa)
Θεωρητικό μοριακό βάρος (MW)	34.28 kDa
Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI)	5.95
Συντ. μοριακής απορροφητικότητας (ϵ)	$51340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Περιοχές N-Γλυκοζυλίωσης	1
Περιοχές O-Γλυκοζυλίωσης	24

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Συσκευές & όργανα

Κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές και όργανα:

Για την αποστείρωση θρεπτικών, κωνικών φιαλών και tips πιπετών:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave MLS της εταιρείας SANYO

Για την επώαση κυτταρικών καλλιεργειών:

- Περιστρεφόμενος Επωαστήρας (30-300 rpm) ZHWY-211C (ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd, Κίνα)

Για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*:

- Συσκευή Ηλεκτροδιάτρησης Micropulser™ Electroporator (BIO-RAD, (Η.Π.Α.)

Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης:

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης Easigel H1-set (Scie-plas, Μεγάλη Βρετανία)

Για τον καθαρισμό των ενζυμικών εναιωρημάτων και την απομόνωση πρωτεϊνών:

- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης διαλυμάτων Stirred Cell Model 8400, 400 mL και μεμβράνες PM 10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.)
- Στήλη βαρύτητας (BIO-RAD, Η.Π.Α.) με ρητίνη Talon® ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (Clontech, Η.Π.Α.)

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών SDS-PAGE:

- Συσκευή Ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis System (BIO-RAD, Η.Π.Α.)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS Low Speed Laboratory Shaker (Labnet, Μεγάλη Βρετανία)

Για την ηλεκτροφόρηση IEF-PAGE:

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης PhastSystem (Pharmacia, Σουηδία)

Για την προετοιμασία και την ανάλυση των δοκιμών ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών:

- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία)
- Σύστημα χρωματογραφίας HPLC-PAD (Thermoscientific, Η.Π.Α.), με τις επιμέρους μονάδες:
 - Σύστημα αντλίας-μικροεπεξεργαστή GS50 Gradient Pump
 - Αναλυτική στήλη Dionex CarboPac PA1 (250 mm x 4 mm) με προστήλη
 - Αμπερομετρικός ανιχνευτής παλμού (PAD) με ηλεκτρόδιο χρυσού

Φυγόκεντροι:

- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Brinkmann, Γερμανία)
- Φυγόκεντρος 4239R (ALC International, Μεγάλη Βρετανία)
- Φυγόκεντρος J2-21 (Beckmann Coulter, Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος TJ-6 (Beckmann Coulter, Η.Π.Α.)

Συσκευές φωτομέτρησης:

- Φωτόμετρο Microplate SPECTRAMax™ 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.)
- Φωτομετρο UV/Vis του οίκου Hitachi UV 2000.

Ζυγοί:

- Ζυγός Mark 2060 (BEL Engineering, Ιταλία)
- Ζυγός Mark 4065 (BEL Engineering, Ιταλία)
- Ζυγός Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH, Γερμανία)

Άλλες Συσκευές:

- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού ($R=18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.)
- pH μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Τυπικά εργαστηριακά όργανα όπως Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL πιπέτες pasteur, ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, γυάλινα μπουκάλια, τρυβλία, erppendorf tubes, αναδευτήρες vortex

3.2 Αντιδραστήρια

3.2.1 Εμπορικά ένζυμα

Η χρήση εμπορικών ενζύμων έλαβε χώρα σε διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας όπως αναφέρεται παρακάτω.

Πέψη για απομόνωση γονιδίου από τον πλασμιδιακό φορέα:

- Περιοριστική ενδονουκλεάση *Bst*BI (20 U/μL) (New England Biolabs, Η.Π.Α.)
- Περιοριστική ενδονουκλεάση *Xba*I (15 U/μL) (Takara Bio Inc., Ιαπωνία)

Πέψη για γραμμικοποίηση πλασμιδίου:

- Περιοριστική ενδονουκλεάση *Bln*I (*Avr*II) (10 U/μL) (Takara Bio Inc., Ιαπωνία)

Απογλυκοζυλίωση απομονωμένων πρωτεϊνών:

- Ανασυνδασμένη γλυκοσιδάση O-Glycosidase (O-Glycosidase & Neuraminidase Bundle) (40.000 U/μL) (New England Biolabs, Η.Π.Α.)
- Ανασυνδασμένη γλυκοσιδάση *Endo*H (500 U/μL) (New England Biolabs, Η.Π.Α.)

3.2.2 Εμπορικά αντιδραστήρια και kits απομόνωσης πλασμιδίων

Για την απομόνωση των ανασυνδασμένων πλασμιδίων από βακτηριακά κύτταρα *E. coli*:

- Plasmid DNA Purification Kit: NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Γερμανία)

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση γραμμικοποιημένων πλασμιδίων:

- Linearized Plasmid Purification Kit: Nucleospin Gel Clean Up (Macherey-Nagel, Γερμανία)

Για την απογλυκοζυλίωση των απομονωμένων πρωτεϊνών:

- Endoglycosidase Reaction Buffer Pack (New England Biolabs, Η.Π.Α.)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης φασματοφωτομετρικά:

- Αντιδραστήριο σακχάρου για τη μέθοδο GOD/PAP-LQ (Biosis, Ελλάδα)

Για την ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης φασματοφωτομετρικά με αντιδραστήριο Bradford:

- Bradford - Solution for Protein Determination (A6932) (AppliChem GmbH, Γερμανία)

3.2.3 Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Σε αυτόν δεν συμπεριλαμβάνονται τα ρυθμιστικά διαλύματα των εμπορικών kits που χρησιμοποιήθηκαν, το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και IEF-PAGE, όπως επίσης και τα ρυθμιστικά διαλύματα φόρτωσης και ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, τα οποία αναφέρονται στην αντίστοιχη ενότητα.

Πίνακας 3.1. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση (M)
Potassium Phosphate	6	K ₂ HPO ₄	0.1
		KH ₂ PO ₄	0.1
Tris-HCl	7.5 - 9.5	Tris-HCl	0.1
		HCl	Πυκνό Διάλυμα
Πυκνό Talon 10X	8	Tris-HCl	0.5
		NaCl	3
Οξικό Νάτριο-Οξικό Οξύ (Sodium Acetate-Acetic Acid)	3.5 - 5.5	Sodium Acetate	0.1
		Acetic Acid	0.1
Bis-Tris	5.5 - 7.5	Bis-tris methane	0.1

3.3 Μικροοργανισμοί, θρεπτικά μέσα και καλλιέργειες

3.3.1 Στελέχη μικροοργανισμών

***Escherichia coli* στέλεχος TOP10 (Invitrogen, Η.Π.Α.):** Πρόκειται για βακτηριακά κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGAPZaC. Στην συνέχεια έγινε απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων για την παραλαβή πολλαπλών αντιγράφων του πλασμιδίου.

***Pichia pastoris* στέλεχος X-33 (Invitrogen, Η.Π.Α.):** Τα κύτταρα ζύμης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασηματισμό τους με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pGAPZaC και στην συνέχεια την επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης για την παραγωγή και απομόνωση του ανασυνδυασμένου ενζύμου.

3.3.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών *E. coli* & *P. pastoris*

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μικροοργανισμών παρασκευάστηκαν αρχικά με διάλυση των συστατικών σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο σε συνθήκες 121 °C, 0.1 mPa για 20 min. Στην περίπτωση που το θρεπτικό περιείχε γλυκόζη, αυτή αποστειρωνόταν σε ξεχωριστό μπουκάλι σε μορφή σκόνης. Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα αντιβιοτικά, η προσθήκη τους πραγματοποιούταν πάντα μετά την αποστείρωση και αφού το θρεπτικό μέσο είχε ψυχθεί σε θερμοκρασίες περίπου 50-60 °C. Η ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου των κυτταρικών καλλιεργειών *E. coli* πραγματοποιήθηκε με υδατικό διάλυμα 0.1 M NaOH. Η ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου YPD των καλλιεργειών *P. pastoris* πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 1 M Potassium Phosphate Buffer ($K_2HPO_4 + H_2K_2O_4P$) μέχρι τελικής σύστασης 10% v/v Buffer – 90% v/v θρεπτικό μέσο YPD.

Παρακάτω ακολουθούν πίνακες με τη σύσταση όλων των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού ανάλογα με το είδος της καλλιέργειας.

Πίνακας 3.2. Σύσταση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E. coli* σε υγρές και στερεές καλλιέργειες

<i>E. coli</i>		
Υγρές Καλλιέργειες		
LB (Luria Bertani)	Τρυπτόνη	1% w/v
	Εκχύλισμα Ζύμης	0.5% w/v
	NaCl	1% w/v
	pH	7.4
LS-LB (Low Salt - Luria Bertani)	Τρυπτόνη	1% w/v
	Εκχύλισμα Ζύμης	0.5% w/v
	NaCl	0.5% w/v
	pH	7.4
Στερεές Καλλιέργειες		
LB ή LS-LB	+ Άγαρ 1.5 % w/v	
Θρεπτικό LB ή LS-LB Παρουσία Αντιβιοτικού		
Ζεοσίνη	25 µg/ml Θρεπτικού	
Στρεπτομυκίνη	100 µg/ml Θρεπτικού	

Πίνακας 3.3. Σύσταση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *P. pastoris* σε υγρές και στερεές καλλιέργειες.

<i>P. pastoris</i>		
Υγρές Καλλιέργειες		
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium)	Εκχύλισμα Ζύμης	1% w/v
	Πεπτόνη	2% w/v
	Γλυκόζη	2% w/v
	pH	6
	Potassium Phosphate Buffer pH 6	10 % v/v
Στερεές Καλλιέργειες		
YPD	+ 2% w/v Άγαρ	
YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium)	YPD + 1M Σορβιτόλη + 2% w/v Άγαρ	
MM (Minimal Medium)	Yeast Nitrogen Base (YNB)	1.34% w/v
	Αμινοξέα	0.005% w/v
	Γλυκόζη	0.5 % w/v
	Άγαρ	1.5% w/v
Θρεπτικό YPD ή YPDS Παρουσία Αντιβιοτικού		
Ζεοσίνη	100 µg/ml Θρεπτικού	

3.3.3 Καλλιέργειες κυττάρων

3.3.3.1 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Όπως αναφέρεται στον πίνακα θρεπτικών μέσων, οι καλλιέργειες για την ανάπτυξη των στελεχών TOP10 του μικροοργανισμού *E. coli* πραγματοποιούνται σε θρεπτικό μέσο LB ή LS-LB. Στην περίπτωση που στο θρεπτικό απαιτείται παρουσία αντιβιοτικού ζεοσίνης (Zeocin), τότε χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο χαμηλής αλατότητας (LS-LB) καθώς η παρουσία αλάτων σε υψηλά επίπεδα ενδέχεται να απενεργοποιήσει την δράση του αντιβιοτικού.

Στερεές Καλλιέργειες *E. coli*

Οι στερεές καλλιέργειες παρασκευάζονται σε τρυβλία Petri με την εισαγωγή θρεπτικού μέσου στο οποίο έχει προστεθεί άγαρ. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επίστρωση του εναιωρήματος ανασυνδυασμένων *E. coli* (transformation mix) κατάλληλης συγκέντρωσης. Η διάρκεια επώασης ανέρχεται σε περίπου 16 ώρες, ενώ στη συνέχεια τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο χαμηλής θερμοκρασίας 4°C.

Υγρές Καλλιέργειες *E. coli*

Οι υγρές καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα σε αποστειρωμένους σωλήνες (falcon) μιας χρήσης όγκου 25 mL, για κάθε αποικία μεμονωμένα σε 5 ml θρεπτικού LS-LB παρουσία αντιβιοτικού ζεοσίνης. Η επώαση γίνεται σε περιστρεφόμενους αναδευτήρες για περίπου 16 ώρες στους 37 °C και 180 rpm.

3.3.3.2 Καλλιέργειες κυττάρων ζύμης *P. pastoris* wild type X-33

Στερεές Καλλιέργειες *P. pastoris*

Μετά την διαδικασία του μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιήθηκε επίστρωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο YPD-Άγαρ παρουσία του αντιβιοτικού Ζεοσίνη για την ανάπτυξη των στελεχών σε στερεές καλλιέργειες. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C για 3-4 ημέρες. Το παραπάνω είχε σκοπό την ανίχνευση των στελεχών που είχαν μετασχηματιστεί επιτυχώς και την διαλογή ορισμένων εξ'αυτών.

Στη συνέχεια, οι επιλεγμένες αποικίες, αναπτύχθηκαν εκ νέου σε στερεές καλλιέργειες, με την ίδια διαδικασία, για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Ζεοσίνης (500, 1000 και 2000 µg/ml) με σκοπό την ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών με πολλαπλά αντίγραφα.

Υγρές Καλλιέργειες

Για την φύλαξη των επιλεχθέντων ανασυνδυασμένων στελεχών για μεγάλα χρονικά διαστήματα (στοκ δείγματα) στους -20 °C και -80 °C, έγινε ανάπτυξη μονών αποικιών σε θρεπτικό YPD για περίπου 16 ώρες στους 30 °C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα YPD που περιέχει 15% v/v Γλυκερόλη, έτσι ώστε η τελική οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD_{600nm}) να είναι περίπου στην τιμή 50-100 η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $2.5-5.0 \times 10^9$ κύτταρα/mL.

Οι υγρές προκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, στις οποίες έγινε εμβολιασμός μεμονωμένα των επιλεχθέντων μετασχηματισμένων αποικιών σε 50 ml θρεπτικό YPD με 10% v/v 1M Potassium Phosphate Buffer. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικούς αναδευτήρες (180 rpm) στους 30 °C μέχρι να έχει την επιθυμητή οπτική πυκνότητα. Υγρές καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου πραγματοποιήθηκαν με εμβολιασμό κατάλληλου όγκου από την προκαλλιέργεια σε θρεπτικό YPD 400 mL σε κωνική φιάλη όγκου 2L. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε ίδιες συνθήκες (180 rpm, 30 °C) μέχρι να αναπτυχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση πρωτεΐνης.

3.4 Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του πλασμιδιακού φορέα pGAPZaC (Invitrogen, Η.Π.Α.). Ο πλασμιδιακός φορέας παραλήφθηκε ανασυνδυασμένος με κατάλληλη αλληλουχία που κωδικοποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης LPMO AA9. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του βακτηριακού στελέχους TOP10 του μικροοργανισμού *E. coli* με σκοπό τον πολλαπλασιασμό και την παραλαβή πολλαπλών αντιγράφων του πλασμιδίου. Μετά την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGAPZaC, αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης *P. pastoris* X-33 με σκοπό την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

3.4.1 Ο πλασμιδιακός φορέας pGAPZaC (Invitrogen)

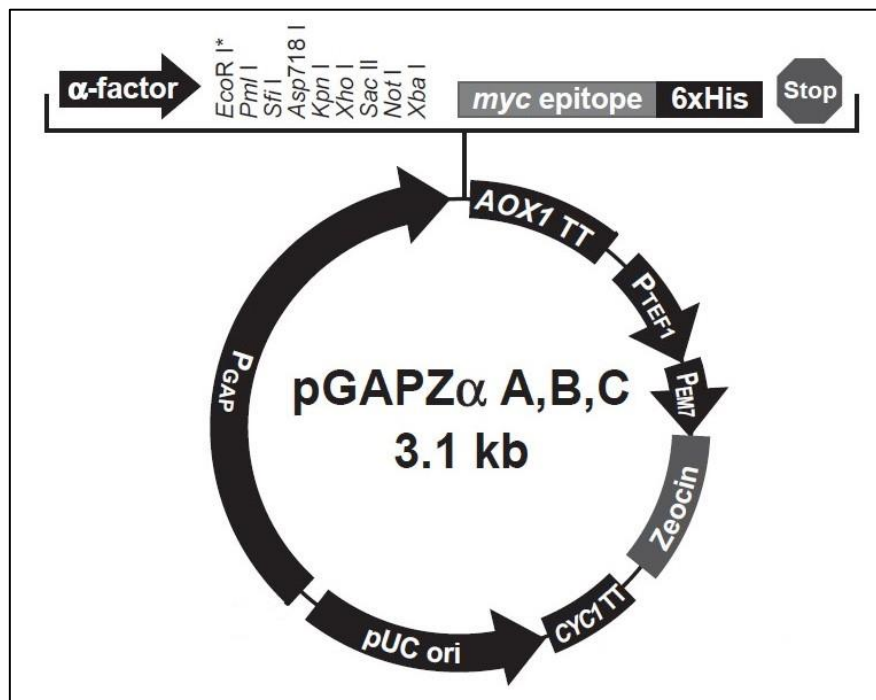
Ο πλασμιδιακός φορέας pGAPZaC έχει μέγεθος 3152 bp και βάρος περίπου 4 ng. Αποτελεί έναν φορέα ο οποίος επιτρέπει την έκφραση πρωτεϊνών χωρίς τη χρήση μεθανόλης ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο. Το παραπάνω χαρακτηριστικό του προτιμάται στην περίπτωση παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα κατά την οποία γίνεται χρήση κυττάρων ζύμης *P. pastoris* ως συστήματος έκφρασης. Παράλληλα με την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ο φορέας pGAPZaC επιτρέπει την εξωκυτταρική έκκριση αυτών αφού περιέχει την σηματοδοτική αλληλουχία α -factor από τον *S. cerevisiae*.

Ο πλασμιδιακός φορέας pGAPZaC περιέχει αλληλουχίες που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες όσον αφορά τόσο τον μετασχηματισμό σε άλλους μικροοργανισμούς όσο και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Περιέχει πλήθος αλληλουχιών αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, μερικές εκ των οποίων αξιοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για την γραμμικοποίηση του πλασμιδίου και τον ανασυνδυασμό του. Ο φορέας είναι σχεδιασμένος ώστε να εισάγονται σε αυτόν τμήματα DNA με κολλώδη άκρα.

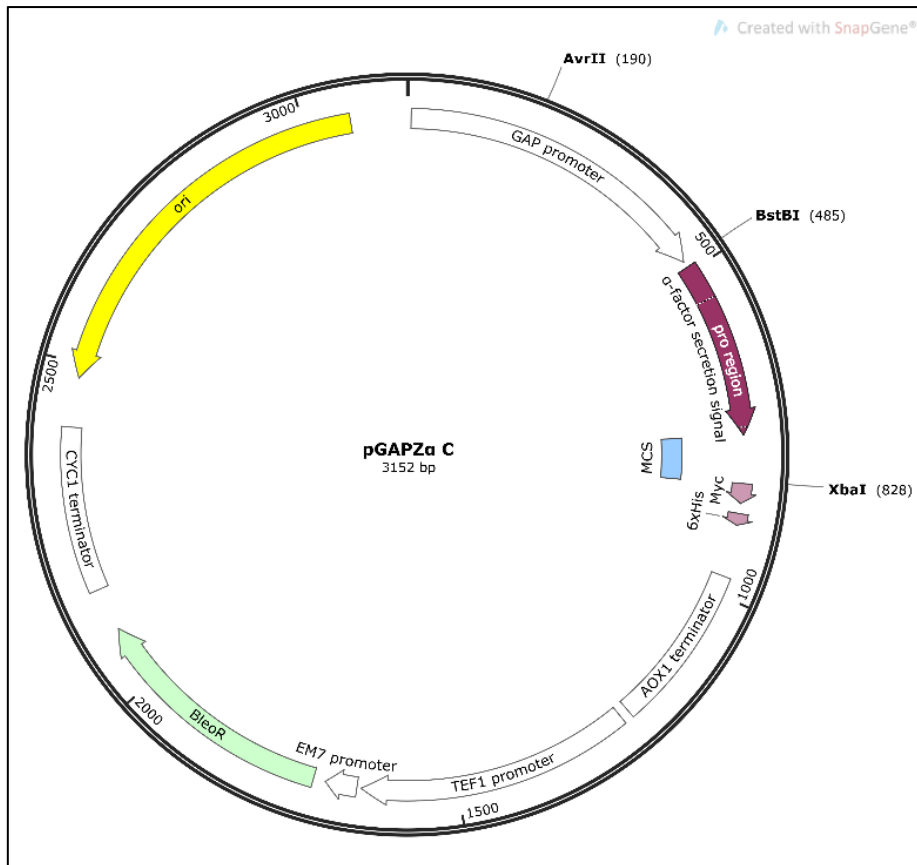
Όπως προαναφέρθηκε το πλασμίδιο παραλήφθηκε ανασυνδυασμένο με την αλληλουχία έκφρασης της πρωτεΐνης. Για την πέψη του πλασμιδίου, με σκοπό τον ανασυνδυασμό του χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bst*BI και *Xba*I, των οποίων οι αλληλουχίες αναγνώρισης εντοπίζονται στη θέση 485 και 828 του πλασμιδίου αντίστοιχα. Έτσι, η αλληλουχία έκφρασης τοποθετήθηκε στην περιοχή που περιβάλλεται από τις αλληλουχίες αναγνώρισης των δυο αυτών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Επιπρόσθετα, για την γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με πέψη πριν τη διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης, χρησιμοποιείται η ενδονουκλεάση περιορισμού *Bln*I (*Avr*II) με την αλληλουχία που αναγνωρίζει και δρά να εντοπίζεται στην θέση 190, εντός της αλληλουχίας του υποκινητή GAP. Ο υποκινητής GAP (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) επάγει την έκφραση του γονιδίου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, ευνοώντας την παραγωγή της σε μεγάλη κλίμακα. Στο πλασμίδιο εντοπίζεται ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, το οποίο αξιοποιείται για τον άμεσο εντοπισμό ανασυνδυασμένων στελεχών. Επιπρόσθετα, περιέχει αλληλουχία που

κωδικοποιεί έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης (6xHis), τα οποία επιτρέπουν την απομόνωση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι κατά τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου rGAPZαC, η περιοχή της σηματοδοτικής αλληλουχίας έκκρισης α-factor δεν συμπεριλαμβάνεται στο τελικό πλασμίδιο. Όπως έχει προαναφερθεί, η σηματοδοτική αλληλουχία αφού οδηγήσει το πεπτιδικό μόριο στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αποκόπτεται από κατάλληλα ένζυμα κατά την εφαρμογή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Με βάση τη βιβλιογραφία (Gaber et al., 2020), η περιοχή του α-factor ορισμένες φορές δεν κόβεται σωστά στη ζύμη *P. pastoris* από την πρωτεάση Ste13, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια γειτονικών αμινοξέων, όπως αυτό της ιστιδίνης στη θέση ένα του πεπτιδίου (θέση 19 της αμινοξικής αλληλουχίας). Αυτό το κατάλοιπο ιστιδίνης είναι πολύ σημαντικό για την δράση των LPMOs καθώς αποτελεί ένα από τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη συναρμογή του ενεργού κέντρου τους, με αποτέλεσμα να είναι κομβικής σημασίας για την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, προς αποφυγή λαθών, επλέχθηκε η εκ των προτέρων αφαίρεση της αλληλουχίας α-factor από την πλασμιδιακή αλληλουχία. Έτσι, στην τελική αλληλουχία που εκφράζεται υπάρχει μόνο το native σηματοδοτικό πεπτίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης (Native Signal Peptide-SignalP), το οποίο θα οδηγήσει την πρωτεΐνη μετά την έκφραση της, προς έκκριση στο υπερκείμενο των κυττάρων, γεγονός που καθιστά εύκολη τη συλλογή της.



Εικόνα 3.1 Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα rGAPZαC. Παρουσιάζονται οι βασικές περιοχές αλληλουχιών όπως ο υποκινητής GAP, το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Ζεοσίνη, το γονίδιο κωδικοποίησης έξι κατάλοιπων ιστιδίνης (6xHis), αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών και η σηματοδοτική αλληλουχία α-factor η οποία έχει αφαιρεθεί μετά τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου και αντικατασταθεί από το native signal peptide της LPMO αλληλουχίας.



Εικόνα 3.2 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGAPZaC όπως αυτός παρουσιάζεται στο πρόγραμμα SnapGene®. Σε αυτόν διακρίνονται επακριβώς οι θέσεις των διαφόρων περιοχών αλλά και οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BstBI, XbaI & AvrII οι οποίες χρησιμοποιούνται για πέψη του πλασμιδίου, ενώ ως BleoR ορίζεται μια εναλλακτική ονομασία του αντιβιοτικού Ζεοσίνη. Το πλασμίδιο έχει συνολικό μέγεθος 3152 bp (ζεύγη βάσεων) και η αρίθμηση των βάσεων ξεκινάει από την έναρξη της αλληλουχίας του υποκινητή GAP.

3.5 Μοριακές τεχνικές DNA

3.5.1 Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες είναι από τα πλέον απαραίτητα εργαλεία στη μοριακή βιολογία και τις τεχνολογίες του ανασυνδυασμένου DNA. Είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA μήκους τεσσάρων έως οκτώ νουκλεοτιδίων και δρουν διασπώντας αυτές σε χαρακτηριστικά σημεία. Η αποκοπή των αλυσίδων στις χαρακτηριστικές αλληλουχίες αναγνώρισης γίνεται με κατάλυση της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που συνδέει δυο νουκλεοτίδια σε μια αλυσίδα. Επακόλουθο αυτής της δράσης είναι η αποκοπή των ασθενών δεσμών υδρογόνου μεταξύ δυο συμπληρωματικών αζωτούχων βάσεων των δυο αλυσίδων του DNA και η αποκοπή της δίκλωνης DNA αλληλουχίας αναγνώρισης. Οι περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες παράγονται κυρίως από βακτήρια και αποτελούν μέρος ενός μηχανισμού άμυνας από την εισβολή ξένου-ετερόλογου προς αυτά DNA. Ένα κύτταρο μεθυλιώνει τα νουκλεοτίδια του δικού του DNA σε περιοχές αναγνώρισης περιοριστικών ενδοκνουκλεασών για να το διακρίνει από το ξένο DNA. Οι τροποποιήσεις αυτές εμποδίζουν την δράση των περιοριστικών ενδοκνουκλεασών του κυττάρου-ξενιστή πάνω στο δικό του μεθυλιωμένο DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες *Bst*bl, *Xba*l και *Bln*l (*Avr*ll) και οι αντιδράσεις πέψης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των εταιρειών από τις οποίες προμηθεύτηκαν. Οι ενδοκνουκλεάσες *Bst*bl και *Xba*l χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη απομονωμένων πλασμιδίων με σκοπό την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού τους έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η ενδοκνουκλεάση *Bln*l (*Avr*ll) χρησιμοποιήθηκε για την γραμμικοποίηση (Linearization) με πέψη του πλασμιδίου pGAPZαc με σκοπό να διευκολύνει τον ανασυνδυασμό και την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα της ζύμης κατά το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση.

Πίνακας 3.4. Οι περιοριστικές ενδοκνουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την πέψη του πλασμιδίου, οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται, οι εταιρείες αλλά και η αλληλουχία πέψης

Περιοριστική Ενδοκνουκλεάση	Οργανισμός Προέλευσης	Προμηθευτής	Αλληλουχία Πέψης
<i>Bst</i> bl	<i>Bacillus stearothermophilus</i> B225	New England Biolabs (Η.Π.Α.)	5'... T T C G A A ... 3' 3'... A A G C T T ... 5'
<i>Xba</i> l	<i>Xanthomonas badrii</i>	Takara Bio Inc. (Ιαπωνία)	5'... T C T A G A ... 3' 3'... A G A T C T ... 5'
<i>Bln</i> l (<i>Avr</i> ll)	<i>Brevibacterium linens</i>	Takara Bio Inc. (Ιαπωνία)	5'... C C T A G G ... 3' 3'... G G A T C C ... 5'

Πίνακας 3.5. Συνθήκες, συστατικά και διεργασία των επιμέρους αντιδράσεων πέψης για τις περιοριστικές ενδονουκλεασες BstbI, XbaI και BlnI (AvrII)

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	BstbI και XbaI	BlnI (AvrII)
Διεργασία	Πέψη για απομόνωση γονιδίου και έλεγχο σε πήκτωμα αγαρόζης	Πέψη για γραμμικοποίηση πλασμιδίου προς μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i> με ηλεκτροδιάτρηση
Συνθήκες Αντίδρασης	1 h, 37 ° C	1 h, 37 ° C
Σύσταση Αντίδρασης Πέψης		
Δείγμα Πλασμιδιακού Φορέα	5 μL	5 μL
Ρυθμιστικό Διάλυμα 10X	2 μL	2 μL
Ένζυμο Περιορισμού	1 μL BstbI & 1 μL XbaI	1 μL
Υπερκάθαρο Νερό	11 μL	11 μL
Συνολικός Όγκος Αντίδρασης	20 μL	20 μL

3.5.2 Μετασχηματισμός κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα pGAPZαC

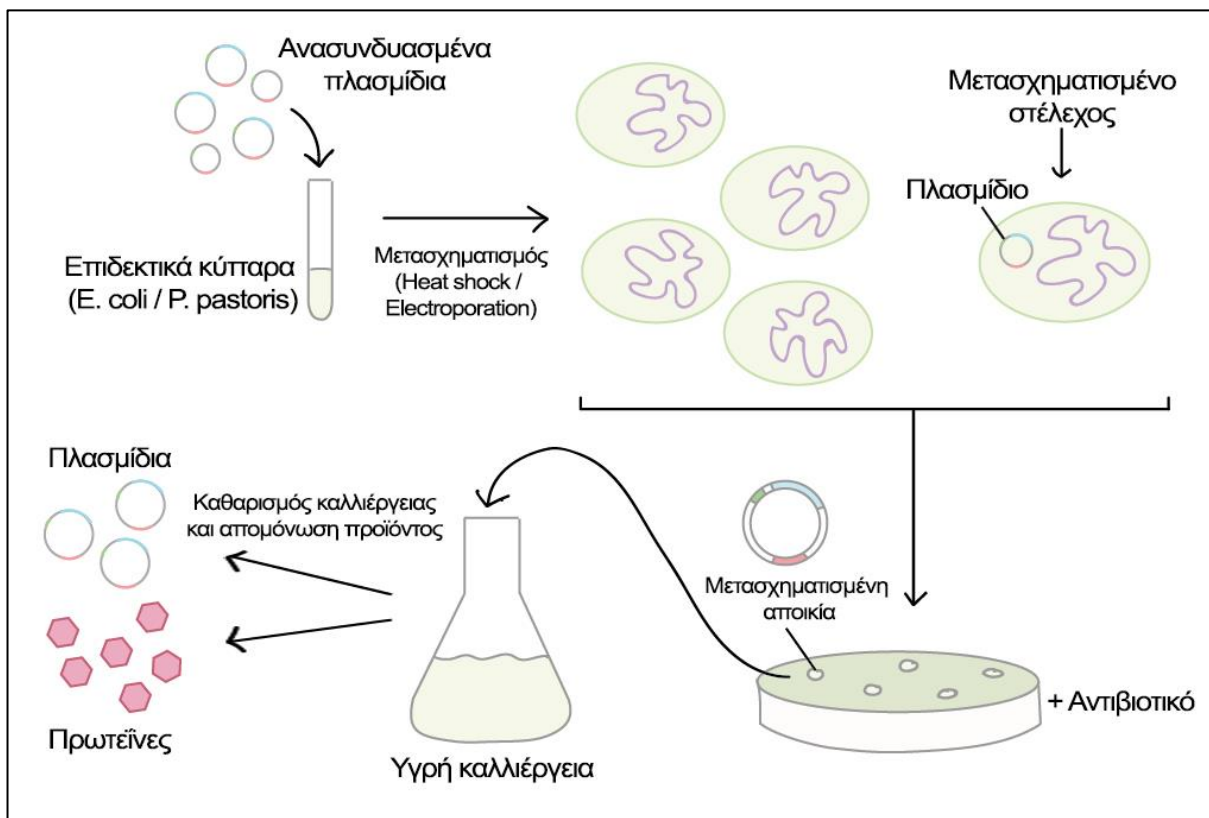
Ο μετασχηματισμός κυττάρων αποτελεί μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού σε κύτταρα ξενιστές. Ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς μετασχηματισμού, ο οποίος υλοποιείται στην παρούσα διπλωματική, είναι η χρήση πλασμιδίων τα περιέχουν το ξένο γενετικό υλικό. Τα πλασμίδια εισάγονται στο εσωτερικό επιδεκτικών κυττάρων και συχνά, ανάλογα των μικροοργανισμών, ενσωματώνονται στο γονιδίωμα τους. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται επιδεκτικά, καθώς έχουν καταστεί παροδικά διαπερατά από μακρομόρια έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία.

Όσον αφορά τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGAPZαC και την παραλαβή πολλαπλών αντιγράφων τους. Αρχικά τα κύτταρα *E. coli* επεξεργάστηκαν κατάλληλα με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) για να καταστούν επιδεκτικά και μετασχηματίστηκαν με την μέθοδο της θερμικής καταπόνησης (Heat Shock transformation).

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα ζύμης *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με σκοπό την απομόνωση και την μελέτη της. Για την

δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών *P. pastoris*, τα κύτταρα αυτά έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία μετασχηματίστηκαν με ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation).

Η συνήθης διαδικασία που ακολουθείται ξεκινάει με την ανάμειξη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα επιδεκτικά κύτταρα (transformation mix) και την διαδικασία μετασχηματισμού. Μετά το πέρας του μετασχηματισμού, πραγματοποιείται έλεγχος για τον εντοπισμό και την επιλογή των στελεχών που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς. Αυτό πραγματοποιείται με χρήση του κριτηρίου ύπαρξης ανθεκτικότητας των κυττάρων σε αντιβιοτικά. Η ικανότητα αυτή προσδίδεται στα κύτταρα από το εισαγόμενο πλασμίδιο που φέρει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας. Έτσι, γίνεται ανάπτυξη του transformation mix σε στερεή καλλιέργεια παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Σε αυτή πρόκειται να αναπτυχθούν μόνο αποικίες που περιέχουν το πλασμίδιο, δηλαδή που έχουν μετασχηματιστεί επιτυχώς. Ορισμένες από αυτές επιλέγονται και αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου. Οι καλλιέργειες αυτές καθαρίζονται και απομονώνεται το προϊόν τους, το οποίο στην περίπτωση των *E. coli* είναι τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και στην περίπτωση των κυττάρων *P. pastoris* είναι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Στο διάγραμμα που ακολουθεί περιγράφεται η παραπάνω διαδικασία, ενώ αναλύεται εκτενέστερα στις επόμενες ενότητες και για τους δυο μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική.



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση της διαδικασίας από τον μετασχηματισμό μέχρι την έκφραση του επιλεγμένου ανασυνδυασμένου κλώνου. Περιλαμβάνει το στάδιο του μετασχηματισμού, την ανίχνευση και επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών σε στερεές καλλιέργειες και την ανάπτυξη τους σε υγρές καλλιέργειες για την παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος

3.5.3 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*

Ο μικροοργανισμός *E. coli* είναι ένα αρνητικό κατά gram βακτήριο και ένας από τους πλέον κατανοητούς οργανισμούς σήμερα, όσον αφορά τη δομή και τις λειτουργίες του. Είναι ένας οργανισμός πρότυπο στην βακτηριακή φυσιολογία και τη γενετική, ενώ αποτελεί ένα βασικό εργαλείο στη μοριακή γενετική, δεδομένου ότι εμπλέκεται σε ένα πλήθος γενετικών διεργασιών σε βιολογικά συστήματα. Το *E. coli* προτιμάται στην πλειοψηφία των τεχνικών γενετικής κλωνοποίησης ως ξενιστής, λόγω της υψηλής σποτελεσματικότητας που τον διακρίνει όσον αφορά την εισαγωγή ξένων μορίων DNA στο εσωτερικό των κυττάρων του. Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ύπαρξης των πλασμιδίων στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων, τα οποία αποτελούν τμήματα DNA διαχωρισμένα από τα χρωμοσώματα που έχουν την δυνατότητα να αναπαράγονται αυτόνομα και να μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες (Cronan, 2014).

Μια από τις πιο συνηθισμένες πρακτικές επαγωγής της επιδεκτικότητας των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* στον μετασχηματισμό πραγματοποιείται χημικά μέσα. Περιλαμβάνει την επεξεργασία του *E. coli* με υψηλής συγκέντρωσης ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) (και μαγνησίου (Mg^{2+})) η οποία συνδυάζεται με θερμοκρασιακούς χειρισμούς (θερμική καταπόνηση - heat shock). Η μέθοδος αυτή εμφανίζεται ιδιαίτερα αποδοτική σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ικανότητα μετασχηματισμού υπολογίζεται περίπου σε $0.5-2 \times 10^7$ ανά μg πλασμιδίου, δηλαδή μετασχηματίζεται επιτυχώς ένα στο ένα εκατομμύριο κύτταρα. Παρά το γεγονός ότι η επιδεκτικότητα των επεξεργασμένων *E.coli* είναι γενικά χαμηλή συγκριτικά με άλλα στελέχη, παραμένει χρήσιμη καθώς τα μετασχηματισμένα στελέχη μπορούν να ανιχνευθούν με κατάλληλους δείκτες όπως τα αντιβιοτικά. Η επεξεργασία με χημικά μέσα έχει σκοπό την αύξηση του δυναμικού των κυττάρων όσον αφορά την δέσμευση του DNA στην κυτταρική τους επιφάνεια (Shuler & Kargi, 2002). Αυτό επιτυγχάνεται με πρόσδεση των κατιόντων ασβεστίου στην αρνητικά φορτισμένη εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του *E. coli*. Αν και υψηλά υδρόφιλο μόριο, το πλασμιδιακό DNA που διέπεται από αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων του, έλκεται στα κυτταρικά τοιχώματα μετά την αλλαγή του φορτίου τους λόγω της ύπαρξης των ιόντων ασβεστίου. Πλέον, τα βακτηριακά κύτταρα είναι επιδεκτικά και στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της θερμικής καταπόνησης (heat shock) για την διέλευση του πλασμιδίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Καθώς τα επιδεκτικά κύτταρα διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες ($\sim 4^\circ\text{C}$) τοποθετούνται σε περιβάλλον με θερμοκρασία 42°C για σύντομο χρονικό διάστημα. Με αυτό τον τρόπο τα βακτηριακά κύτταρα εκτίθενται άμεσα σε ένα μεγάλο θερμοκρασιακό δυναμικό που αναπτύσσεται μεταξύ του εξωτερικού (42°C) και του εσωτερικού (4°C), το οποίο οδηγεί τα πλασμιδία στον ενδοκυτταρικό χώρο επιτυγχάνοντας τον μετασχηματισμό. Όταν τα κύτταρα ψυχθούν, η ισορροπία αποκαθίσταται και πλέον οι κυτταρικοί πόροι των *E. coli* δεν μπορούν να δεχτούν πλασμίδια. Στη συνέχεια, τα μετασχηματισμένα στελέχη ανιχνεύονται με ανάπτυξη του κυτταρικού δείγματος (transformation mix) σε στερεή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικού.

3.5.3.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* με χρήση χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2)

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*, αρχικά επιλέγεται μια βακτηριακή αποικία από τρυβλίο στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί στερεή καλλιέργεια *E. coli* TOP10 με θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη. Η αποικία αυτή εμβολιάστηκε σε 5 mL θρεπτικού μέσου LB παρουσία αντιβιοτικού (στρεπτομυκίνη) για να αναπτυχθεί σε υγρή προκαλλιέργεια. Η επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) διήρκησε περίπου 16 ώρες, στους 37 °C. Ακολούθως, από την προκαλλιέργεια λήφθηκε 1 mL για εμβολιασμό σε 100 mL θρεπτικού LB (χωρίς αντιβιοτικό) σε κωνική φιάλη όγκου 250 mL. Η καλλιέργεια αυτή αφέθηκε για επώαση υπό ανάδευση (180 rpm), στους 37 °C μέχρι η οπτική πυκνότητα της στα 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) να κυμαίνεται από 0.4 έως 0.8, δηλαδή για χρονική διάρκεια επώασης περίπου 2 ωρών. Αυτό το εύρος οπτικής πυκνότητας εξασφαλίζει, με βάση το πρωτόκολλο, ότι υπάρχουν αρκετά κύτταρα για να γίνει σωστά η χημική προετοιμασία και ο μετασχηματισμός σε επόμενο βήμα. Η κωνική φιάλη της υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε πάγο, όπου παρέμεινε για 30 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (1500xg, 5 λεπτά, 4 °C) και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 12 mL αποστειρωμένου παγωμένου διαλύματος 0.1 M MgCl_2 . Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε 4 mL αποστειρωμένου παγωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 . Το κυτταρικό εναίωμα τοποθετήθηκε στους 4 °C για περίπου 16 ώρες, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης του μετασχηματισμού μετέπειτα. Η φύλαξη των βακτηριακών κυττάρων γίνεται στους -80 °C μετά από προσθήκη 1.9 mL διαλύματος γλυκερόλης 50% w/w στο εναίωμα και την δημιουργία κλασμάτων όγκου 0.1 mL σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου Eppendorf (Eppendorf tubes).

3.5.3.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με Θερμικό Σοκ (Heat Shock)

Το διάλυμα με τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα που προέκυψαν από την κατεργασία με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) οδηγούνται προς μετασχηματισμό με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGAPZaC που φέρουν κλωνοποιημένο το γονίδιο της πρωτεΐνης LPMO. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παραλήφθηκε λυοφυλιωμένο (με βάρος περίπου 4 μg) από την εταιρεία Invitrogen (Η.Π.Α.). Για την προετοιμασία του, αφέθηκε να ενυδατωθεί σε 500 μL υπερκάθαρου νερού για 1-2 λεπτά και διατηρήθηκε στην κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Αρχικά, το κλάσμα του εναίωματος των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* TOP10 που περιέχεται σε μικρούς σωλήνες τύπου Eppendorf (10 μL stock διαλύματος των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων ανά Eppendorf tube) αφήνεται να ξεπαγώσει από τους -80 °C ομαλά σε πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται προσθήκη όγκου 1 μL πλασμιδιακού DNA σε κάθε Eppendorf tube με ήπια ελικοειδή κίνηση με σκοπό την αποφυγή διάρρηξης

των κυττάρων και το μίγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμική καταπόνηση (heat shock) των κυττάρων με τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή Thermomixer στους 42 °C για 1-2 λεπτά και η αντίδραση επανατοποθετείται άμεσα στον πάγο. Στο μίγμα προστίθενται 200 μL θρεπτικού μέσου LB και αφήνεται για επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.

3.5.3.3 Επιλογή ανασυνδυασμένων στελεχών *E. coli* και ανάπτυξή τους για την απομόνωση ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA

Μετά το τέλος τη διαδικασίας μετασχηματισμού, ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο Petri που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο LS-LB παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη και επώαζεται για περίπου 16 ώρες στους 37 °C. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στην στερεή καλλιέργεια διέπονται από ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό και κατά συνέπεια τα στελέχη τους έχουν ανασυνδυαστεί επιτυχώς. Από αυτό το τρυβλίο, επιλέχθηκαν 5-10 μεμονωμένες αποικίες, κάθε μια μεταφέρθηκε ξεχωριστά σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LS-LB-Ζεοσίνη σε σωλήνα τύπου Falcon και ακολούθησε επώαση τους υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο επωαστήρα (200 rpm, 16 ώρες, 37 °C). Μετά το τέλος της επώασης τα βακτηριακά κύτταρα παραλαμβάνονται έπειτα από φυγοκέντρηση (1500xg, 10 λεπτά) και απόρριψη του εναιωρήματος. Μετά την παραλαβή των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με του Plasmid DNA Purification Kit: NucleoSpin® Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel (Γερμανία).

3.5.3.4 Πέψη πλασμιδίων και ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση του επιτυχούς ανασυνδυασμού

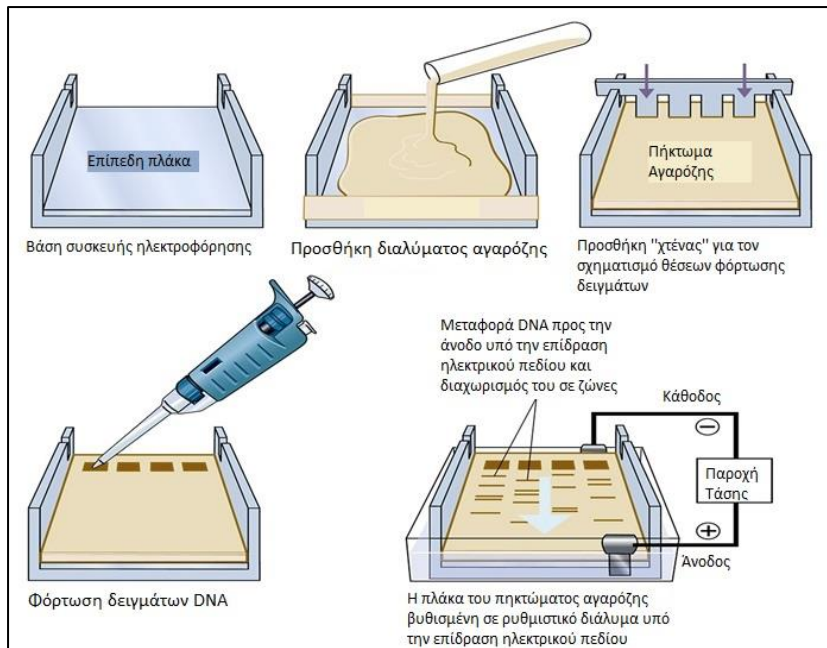
Με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας του ανασυνδυασμού πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα BstBI & XbaI της εταιρείας Takara Bio Inc. (Ιαπωνία) και ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αγαρόζης. Η πέψη του πλασμιδίου λαμβάνει χώρα στις συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης των δυο περιοριστικών ενδονουκλεασών, οι οποίες συμπίπτουν με τα άκρα του γονιδίου όπως αναλύεται στο κεφάλαιο 3.4.1 και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με βάση την σύσταση και τις συνθήκες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.5.1.

Η μέθοδος βασίζεται στην ομοιόμορφη αρνητική φόρτιση των μορίων DNA, λόγω του ιοντισμού των φωσφορικών τους ομάδων. Το DNA εισάγεται σε ένα οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης, ενός φυσικού πολυσακχαρίτη, και υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια DNA μετακινούνται προς το την άνοδο, δηλαδή τον θετικό πόλο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Βασικοί παράγοντες του διαχωρισμού των μορίων αποτελούν η σύσταση και η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης, η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση του πεδίου (volts/cm

πηκτώματος) και ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Όσο μεγαλύτερη η πυκνότητα σε αгарόζη, τόσο μικρότεροι οι πόροι του πηκτώματος με αυτή να κυμαίνεται από 0.7% w/v για μεγάλα μόρια DNA μέχρι 2% w/v για μικρά, ενώ η εφαρμοζόμενη τάση καθορίζει την ταχύτητα κίνησης των μορίων και κατά συνέπεια του διαχωρισμού. Ακόμη, μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει την ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA είναι η στερεοδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων, καθώς ένα άκοπο πλασμίδιο θα τρέξει πιο αργά από ένα κομμένο (single cut, γραμμικό) επειδή θα παρουσιάζει υπερελίκωση. Στην παρούσα ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, το DNA που ελέγχθηκε είναι γραμμικό, καθώς απομονώθηκε μετά από την διαδικασία της πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Κατά την πειραματική διαδικασία, για την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης αρχικά προστέθηκαν σε κωνική φιάλη 0.5 g (1% w/v) αгарόζης σε 50 mL διαλύματος 1 × TBE (Tris-borate-EDTA). Το TBE αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, διαθέτει υψηλή ιοντική ισχύ και χρησιμοποιείται γενικά για διαχωρισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους. Η σύσταση του TBE (10X) είναι 54 g/L Tris base, 27.5 g/L βορικό οξύ, 20 mL/L, 0.5 M EDTA, pH 8.0. Η τήξη της αгарόζης πραγματοποιήθηκε με βρασμό για περίπου 2 λεπτά. Το διάλυμα αφέθηκε για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία της αгарόζης να φτάσει τους 60 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν μερικά mL (~2-3 mL) ειδικής χρωστικής Midori Green (Advance) της εταιρείας Nippon Genetics (Ιαπωνία), η οποία δεσμεύεται στο DNA. Το Midori Green παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και αποτελεί μια μη καρκινογόνο εναλλακτική του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτές αгарόζης. Εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν είναι προσδεμένο σε DNA ή RNA (~530nm) όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270nm).

Το διάλυμα της αгарόζης, αφού αναδεύθηκε, απλώθηκε προσεκτικά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόστηκε η κατάλληλη «χτένα» για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης. Αφού το πήκτωμα στερεοποιήθηκε, βυθίστηκε σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1×TBE και αφαιρέθηκε η «χτένα». Σε κάθε οπή τοποθετήθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 60 – 80 Volts για 1 ώρα περίπου και στη συνέχεια, με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) διακρίθηκαν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν. Ο προσδιορισμός του μεγέθους, της ποσότητας αλλά και της ποιότητας του DNA, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλου μοριακού δείκτη (Hyperladder™ I: 200 bp-10 kb, Bioron, Η.Π.Α.). Η εύρεση του μεγέθους γραμμικών μορίων DNA (bp-base pairs) έγινε έπειτα από σύγκριση της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας με αυτήν των πρότυπων μορίων DNA γνωστού μεγέθους του μοριακού δείκτη. Εφόσον απαιτείται, ο ίδιος μοριακός δείκτης επιτρέπει τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA με βάση τη φωτεινότητα της ζώνης που διαχωρίστηκε, καθώς για κάθε σχηματιζόμενη ζώνη πρότυπων μορίων DNA επισημαίνεται και η μάζα (ng/5μL) που αντιστοιχεί σε αυτά.



Εικόνα 3.4 Η διαδικασία προετοιμασίας και εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.5.4 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Για την εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων στα κύτταρα *P. pastoris* ακολουθούνται τρία στάδια, αυτό της προετοιμασίας επιδεκτικών κυττάρων, της γραμμικοποίησης των πλασμιδιακών φορέων και στη συνέχεια το στάδιο του μετασχηματισμού. Το πρώτο στάδιο έχει ως στόχο την προετοιμασία των κυττάρων για την διαδικασία μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση. Κατά το στάδιο αυτό γίνεται επεξεργασία των κυττάρων με κρυσπροστατευτικές ενώσεις όπως η σορβιτόλη, οι οποίες αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια νερού επηρεάζοντας τον σχηματισμό κρυστάλλων και προστατεύοντας το κύτταρο από οσμωτικά φαινόμενα. Έτσι, προστατεύεται η κυτταρική μεμβράνη και διατηρείται ανέπαφη η κυτταρική δομή στις χαμηλές θερμοκρασίες που υποβάλλεται το κύτταρο κατά την διεξαγωγή του μετασχηματισμού. Η γραμμικοποίηση του πλασμιδίου, όπως έχει προαναφερθεί, πραγματοποιείται με την δράση μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης και αποσκοπεί στην αύξηση της ικανότητας μετασχηματισμού λόγω ευνοϊότερου σχήματος του μεταφερόμενου πλασμιδίου. Όσον αφορά την τεχνική μετασχηματισμού, εφαρμόζεται αυτή της ηλεκτροδιάτρησης (Electroporation).

Η ηλεκτροδιάτρηση αξιοποιεί το γεγονός ότι η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως ένας ηλεκτρικό εμπόδιο-μονωτής που αποτρέπει τη διέλευση ρεύματος (πλην των ιοντικών διόδων του). Όταν οι μεμβράνες υποβληθούν σε ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης, αυξάνεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα τους και προκαλείται η προσωρινή διάσπασή τους με σχηματισμό πόρων μέσα από τους οποίους μπορούν να διέλθουν μακρομόρια. Πιο συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης με τιμή που υπερβαίνει ένα ενεργειακό κατώφλι (electric magnitude threshold) που σχετίζεται με τη διηλεκτρική σταθερά του, οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης γίνονται παροδικά διαπερατοί (40-120 nm) με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εισαγωγή εξωγενούς πλασμιδιακού DNA στο εσωτερικό του κυττάρου.

Κατά την ηλεκτροδιάτρηση το γραμμικοποιημένο πλασμιδιο καταλήγει στον τελικό προορισμό του διαπερνώντας και την πυρηνική μεμβράνη του ευκαρυωτικού κυττάρου και τελικά ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του. Το κλείσιμο των πόρων της μεμβράνης επέρχεται με φυσικές διαδικασίες με την πάροδο του χρόνου, με την διατήρηση των κυττάρων στους 0 °C να δίνει την δυνατότητα επιβράδυνσης αυτού του αυθόρμητου φαινομένου. Η μέθοδος έχει ικανότητα μετασχηματισμού $10^3 - 10^4$ κύτταρα/μg γραμμικού DNA, χωρίς να καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα της *P. pastoris* και αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο μετασχηματισμού κυττάρων (Potter, 2003).

3.5.4.1 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Η προετοιμασία των επιδεκτικών κυττάρων ζύμης πραγματοποιήθηκε την ίδια ημέρα με τον μετασχηματισμό τους. Για την δημιουργία επιδεκτικών-ηλεκτροδεκτικών κυττάρων απαιτείται πρώτα η καλλιέργεια κυττάρων ζύμης *P. pastoris* X33 και εν συνεχεία η κατάλληλη επεξεργασία τους με σορβιτόλη. Έτσι, αρχικά τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν σε μικρή καλλιέργεια με 50 mL θρεπτικό υλικό YPD σε κωνική φιάλη 250 mL. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε περιστρεφόμενο επωαστήρα (180 rpm, περίπου 20 ώρες, 30 °C). Στη συνέχεια, ελήφθησαν 10 mL από την καλλιέργεια αυτή και εμβολιάστηκαν σε νέα καλλιέργεια με 250 mL θρεπτικό μέσο YPD σε κωνική φιάλη όγκου 1L. Η νέα καλλιέργεια επώαστηκε στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD_{600nm}) να ισούται με 1.3 – 1.6 (περίπου 3 ώρες), όπως ορίζει το πρωτόκολλο. Τότε, το περιεχόμενο της καλλιέργειας όγκου 250 mL υπέστη 4 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1500xg, 5 λεπτά, 4 °C) και αντίστοιχες επαναιωρήσεις του κυτταρικού ιζήματος με προψυγμένο υπερκάθαρο νερό. Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλύθηκε με 250 mL προψυγμένου υπερκάθαρου νερού και μετά την δεύτερη με 150 mL αυτού. Η τρίτη επαναδιάλυση του ιζήματος πραγματοποιήθηκε σε 12 mL προψυγμένου και αποστειρωμένου διαλύματος 1 M σορβιτόλης. Η τέταρτη και τελευταία επαναιώρηση έγινε με το ίδιο διάλυμα μέχρι τελικό όγκο κυτταρικού διαλύματος περίπου 1.5 mL. Έπειτα, τα κύτταρα παρέμειναν σε πάγο (4°C) μέχρι να υποβληθούν σε μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση. Οι κωνικές φιάλες, το θρεπτικό μέσο YPD και το διάλυμα σορβιτόλης είχαν αποστειρωθεί θερμικά πριν την χρησιμοποίησή τους.

3.5.4.2 Γραμμικοποίηση (Linearization) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pGAPZaC

Όπως έχει προαναφερθεί, το ανασυνδυασμένο πλασμιδιο pGAPZaC περιέχει αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η γραμμικοποίηση (linearization) του πλασμιδίου με πέψη πραγματοποιείται σε μοναδική θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BlnI (AvrII) της εταιρείας Takara Bio Inc. (Ιαπωνία), η οποία εντοπίζεται στην αλληλουχία του υποκινητή GAP και συγκεκριμένα στην θέση 190 με βάση τον χάρτη του

πλασμιδίου pGAPZaC. Η αντίδραση πέψης, της οποίας η σύσταση αναφέρεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των μοριακών τεχνικών, πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37 °C. Στη συνέχεια το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο καθαρίστηκε με χρήση του Nucleospin Gel Clean Up Kit της εταιρείας Macherey-Nagel (Γερμανία) και εφαρμογή του αντίστοιχου πρωτοκόλλου. Σημειώνεται, ότι στο τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου έγινε χρήση αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού για την έκλουση του πλασμιδιακού DNA από την στήλη καθαρισμού του Kit, αντί για ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, για την αποφυγή προσθήκης αλάτων που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν πρόβλημα στο προς ηλεκτροδιάτρηση διάλυμα.

3.5.4.3 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης *P. pastoris* X33 με ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation)

Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων ζύμης με ηλεκτροδιάτρηση, αρχικά αναμείχθηκαν 80 μL του εναιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* X33 με 30 μL του διαλύματος του γραμμικού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pGAPZaC που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την LPMO. Το παραπάνω μίγμα μεταφέρθηκε σε προψυγμένη ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 0.2 cm, η οποία είχε αποστειρωθεί με διάλυμα 70 % αιθανόλης, και αφέθηκε για επώαση στους 4 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε ο μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση στη συσκευή MicroPulser® Electroporator της εταιρείας Biorad (Η.Π.Α.) με εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού με βάση το εργοστασιακό πρόγραμμα Pic (2 kV για 4 ms). Αμέσως μετά έγινε προσθήκη 1 mL διαλύματος 1 M σορβιτόλης, το μείγμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 mL) και αφέθηκε για επώαση στους 30 °C για 1-2 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε επιστροφή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό YPDS παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη σε τρυβλίο Petri και επώαστηκε για 3-4 ημέρες στους 30 °C.

Αφού γίνει η επιλογή των επιθυμητών αποικιών, αυτές αναπτύσσονται μεμονωμένα σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο YPD για περίπου 16 ώρες στους 30 °C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση και επαναιωρούνται σε διάλυμα YPD, το οποίο περιέχει 15% v/v Γλυκερόλη έτσι ώστε η τελική οπτική πυκνότητα στα 600nm να είναι περίπου 50 με 100, που ισοδυναμεί περίπου με $2.5 - 50 \times 10^9$ κύτταρα/mL. Έτσι δημιουργείται ένα stock καλλιέργειας ανασυνδυασμένων στελεχών *P. pastoris* X33, που μπορεί να φυλαχθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -80 °C.

3.6 Επιλογή ανασυνδυασμένου στελέχους, παραγωγή και απομόνωση ενζύμου

3.6.1 Δοκιμές ενεργότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό των μετασχηματισμένων στελεχών (plate assays)

Μετά το πέρας του μετασχηματισμού της ζύμης *P. pastoris* και της επώασης των κυττάρων σε τρυβλία παρουσία αντιβιοτικού (ζεοσίνης) σχηματίστηκε πλήθος αποικιών οι οποίες είχαν λάβει επιτυχώς το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA. Κάθε αποικία αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό ανασυνδυασμένο κλώνο *P. pastoris*, με τις ιδιότητες κάθε κλώνου να εμφανίζουν μικρές αλλά σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του, λόγω του τρόπου ενσωμάτωσης του ξένου DNA στο γονιδίωμά τους ή πιθανών μεταλλάξεων κατά τον πολλαπλασιασμό του. Η επιλογή του κλώνου που θα διακριθεί ως κατάλληλότερος για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης βασίζεται στα κριτήρια της μέγιστης παραγωγικότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, αλλά και της ενεργότητας αυτής.

Για την επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετά τον μετασχηματισμό αρχικά πραγματοποιήθηκαν δυο είδη μελετών. Η πρώτη αφορά την ανίχνευση των στελεχών που περιέχουν πολλαπλά πλασμίδια (multi-copy) και πραγματοποιείται με ανάπτυξη των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό YPD παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικού ζεοσίνη (500, 1000, 2000 µg/ml). Η δεύτερη αποτελεί μια δοκιμή ενεργότητας σε τρυβλία παρουσία κατάλληλου υποστρώματος (Plate assays) που μπορεί να διασπαστεί από τη δράση του ενζύμου. Το παράγωγο της ενζυμικής δράσης μπορεί να ανιχνευθεί άμεσα και εύκολα με αλλαγή του χρώματος του.

Οι παραπάνω δοκιμές ενδέχεται να αποδειχθούν χρήσιμες για την επιλογή του τελικού κλώνου καθώς στη συνέχεια, ένας αριθμός αποικιών από αυτές τις αναλύσεις εκφράζεται σε υγρές καλλιέργειες μικρού όγκου. Κατά την ανάπτυξη τους μετράται η παραγωγικότητα κάθε στελέχους ως προς την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και πραγματοποιείται η τελική επιλογή κλώνου για έκφραση σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Δοκιμές-screening για την ανίχνευση μετασχηματισμένων στελεχών multi-copy παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη (Zeocin Plate Assays)

Για την ανίχνευση στελεχών *P. pastoris* που έχουν μετασχηματιστεί με πολλαπλά πλασμίδια (multi-copy), 24 μετασχηματισμένα στελέχη εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό YPD-Άγαρ παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Έτσι, κάθε αποικία αναπτύχθηκε ξεχωριστά σε θρεπτικό YPD με 500, 1000 και 2000 µg/ml ζεοσίνη. Οι στερεές καλλιέργειες αφέθηκαν για επώαση 24 ώρες στους 30 °C και μετά έγινε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των σχηματισμένων αποικιών.

Δοκιμές-screening σε τρυβλία στο πολυσακχαρικό υπόστρωμα PASC (PASC Plate Assays)

Αυτό το assay στηρίζεται στην ανίχνευση της δράσης οξειδωτικής διάσπασης των LPMOs στο υπόστρωμα πολυσακχαρίτη PASC. Κύτταρα από τις μετασχηματισμένες αποικίες *P. pastoris* που υποβλήθηκαν στην δοκιμασία με το αντιβιοτικό ζεοσίνη, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MM (minimal medium) με 0.5% PASC (phosphoric acid swollen cellulose). Στα τρυβλία αυτά έγινε επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων γονιδίων μέσω του υποκινητή GAP παρουσία γλυκόζης για την ανάπτυξη των καλλιεργειών και εξωκυτταρική έκκριση των πρωτεϊνών. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) εμβολιάστηκε ένα μη ανασυνδυασμένο στέλεχος *P. pastoris* X3. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30 °C για 24 ώρες και ακολούθησαν τα παρακάτω:

1. Επίστρωση των τρυβλίων με 10 mL διαλύματος χρωστικής Congo Red 1% w/v και επώαση 15 λεπτών.
2. Απόρριψη του διαλύματος Congo Red και προσθήκη ~10 mL διαλύματος 1M NaCl (διάλυμα αποχρωματισμού).
3. Επώαση για 5 min και επανάληψη του προηγούμενου βήματος (αποχρωματισμός) μέχρι να εμφανιστούν ορατές κηλίδες γύρω από τις ανασυνδυασμένες αποικίες, οι οποίες αν αφεθούν στον αέρα, οξειδώνονται και γίνονται σκουρόχρωμες και πιο ευδιάκριτες.

Οι κηλίδες αυτές μαρτυρούν τη δράση του ενζύμου και συνεπώς υποδεικνύουν τις ανασυνδυασμένες αποικίες ζύμης, αλλά και την ενεργότητα είτε άμεσα των πρωτεϊνών που εκφράζουν είτε έμμεσα όσον αφορά την ποσότητα παραγωγής.

Η χρωστική Congo Red αλληλεπιδρά με τους πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, όπως το υπόστρωμα PASC. Αποδίδουν ένα έντονο κόκκινο χρώμα αφήνοντας χωρίς χρώση τις περιοχές που περιέχουν διασπασμένους ολιγοσακχαρίτες από την δράση ενζύμων με ενεργότητα κυτταρινάσης ή ημικυτταρινάσης.

Δοκιμές-screening σε τρυβλία στο υπόστρωμα 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) (DMP Plate Assays)

Αυτό το assay στηρίζεται στην ανίχνευση της δράσης υπεροξυγενάσης των LPMOs στο υπόστρωμα DMP. Ομοίως με τις προαναφερόμενες δοκιμές, τα 20 μετασχηματισμένα στελέχη μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MM (minimal medium) με υπόστρωμα 2 mM 2,6-DMP. Το υπόστρωμα είχε αποστειρωθεί προηγουμένως περνώντας από αποστειρωμένο φίλτρο. Όπως και στη δοκιμή με το υπόστρωμα PASC, κατά την επώαση των στερεών καλλιεργειών επάγεται η έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου μέσω του υποκινητή GAP παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των καλλιεργειών για την παραγωγή και την έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) εμβολιάστηκε ένα μη ανασυνδυασμένο στέλεχος *P. pastoris* X33. Η επώαση έγινε σε σκοτεινό μέρος στους 30 °C για 24 ώρες. Για την επαγωγή και ανίχνευση

της δράσης της LPMO προστίθεται μια σταγόνα διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 1 mM και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο στους 30 °C. Ως αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου αναμένεται να έχουν σχηματιστεί ορατές ζώνες προϊόντων περιμετρικά των ανασυνδυασμένων αποικιών.

3.6.2 Έκφραση σε προκαλλιέργειες και επιλογή τελικού κλώνου

Από τις 20 αποικίες των καλλιιεργειών στα plate assays που σχηματίστηκαν σε τρυβλία έγινε επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών της ζύμης *P. pastoris* που αναμένεται να έχουν την μεγαλύτερη παραγωγικότητα, η οποία θα ποσοτικοποιηθεί με την ανάπτυξη και την έκφραση των αποικιών σε υγρές προκαλλιέργειες. Κάθε επιλεγμένο στέλεχος εμβολιάστηκε μεμονωμένα σε 50 mL θρεπτικό YPD σε γυάλινες κωνικές φιάλες όγκου 250 mL και επώαστηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα υπό ανάδευση 180 rpm για περίπου 48 ώρες στους 30 °C. Παράλληλα, εμβολιάστηκε με όμοιο τρόπο ένα μη ανασυνδυασμένο στέλεχος *P. pastoris* ως δείγμα ελέγχου (control sample). Καθώς ο μικροοργανισμός ζύμης *P. pastoris* αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες, είναι σημαντικό τουλάχιστον τα 3/4 του όγκου της κωνικής φιάλης στην οποία αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός να αποτελείται από αέρα. Γι' αυτό το λόγο προκύπτει η αναλογία 50 mL υγρή καλλιέργεια σε κωνική φιάλη 250 mL και αντίστοιχα στη συνέχεια στις καλλιέργειες 400 mL σε κωνική φιάλη 2 L. Η επιλογή του θρεπτικού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen (Η.Π.Α.) με σκοπό την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών βάσει του υποκινητή GAP που επάγει την έκφρασή τους παρουσία γλυκόζης. Το θρεπτικό περιείχε 10% v/v ρυθμιστικό διάλυμα 1M Potassium Phosphate με σκοπό την διατήρηση της καλλιέργειας σε pH = 6, τιμή που θεωρείται η βέλτιστη για τη μεγιστοποίηση της έκφρασης. Η παραπάνω καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα και για ένα μη μετασχηματισμένο στέλεχος X33 της ζύμης *P. pastoris*, που δεν περιέχει το γονίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης AA9. Μετά το πέρας κατάλληλου χρόνου επώασης έγινε δειγματοληψία των προκαλλιιεργειών. Η δειγματοληψία πραγματοποιείται με σκοπό την μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης αλλά και του επιπέδου έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης των επιλεγμένων μετασχηματισμένων στελεχών. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με απομόνωση της κυτταρικής μάζας του δείγματος και φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 600nm, ενώ η ποσοτική μέτρηση του ανασυνδυασμένου ενζύμου γίνεται με την μέθοδο Bradford.

Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε αυτό το στάδιο έγινε με τη μέθοδο Bradford, η οποία αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη χρωματομετρική μέθοδο φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Η μέθοδος αναλύεται εκτενέστερα στην ενότητα 2.6.8 στην οποία παρουσιάζονται οι δυο μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διπλωματική. Βασίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με

κατάλληλο αντιδραστήριο χρωστικής ένωσης προς παραγωγή προϊόντος που μεταβάλλει το χρώμα του δείγματος. Η ποσότητα του προϊόντος προσδιορίζεται με φωτομέτρηση του δείγματος στα 595 nm και είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Κατά την πειραματική διαδικασία, πραγματοποιείται ανάμειξη 1.25 mL αντιδραστηρίου της μεθόδου Bradford με 30 μ L πρωτεϊνικού δείγματος. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση και φωτομέτρηση του δείγματος μετά από 1-2 λεπτά. Στις μετρήσεις χρησιμοποιείται και ένα δείγμα ελέγχου (control sample) μιας καλλιέργειας μη ανασυνδυασμένου στελέχους *P. pastoris* X33 και ένα τυφλό δείγμα (blank sample) που περιέχει μόνο απιονισμένο νερό.

Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με φασματοφωτομετρική μέθοδο

Για την μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης, αρχικά ελήφθη δείγμα όγκου 1 mL από το θρεπτικό μέσο. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού (υπερεκείμενο δείγμα) και τη συλλογή των κυττάρων (ίζημα). Αυτά επαναιωρήθηκαν με κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού σε αναλογία αραιώσης 1:50 (20 μ L δείγμα, 980 μ L Νερό). Ο λόγος αραιώσης σχετίζεται με τα όρια ανίχνευσης του φωτόμετρου στο οποίο μετράται η οπτική πυκνότητα. Στην περίπτωση που το αρχικό κυτταρικό δείγμα είναι πολύ πυκνό, τότε αυτό θα πρέπει να αραιωθεί σε βαθμό που η τιμή της OD_{600nm} δεν θα ανέρχεται άνω της μονάδας. Παράλληλα η αραιώση δεν θα πρέπει να είναι τόσο μεγάλη ώστε η τιμή OD_{600nm} να είναι χαμηλότερη του 0.1, τιμή η οποία δεν μπορεί να δώσει ασφαλή και ακριβή αποτελέσματα για την κυτταρική συγκέντρωση στο δείγμα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων στα 600nm (OD_{600nm}) για την εύρεση της κυτταρικής συγκέντρωσης στο δείγμα. Ως τυφλό δείγμα (blank sample) χρησιμοποιήθηκε 1 mL νερού, ενώ η πραγματική κυτταρική συγκέντρωση στην προκαλλιέργεια υπολογίζεται από τον λόγο αραιώσης του δείγματος.

Ο υπολογισμός της κυτταρικής συγκέντρωσης στην προκαλλιέργεια αξιοποιείται για την εύρεση του συνολικού όγκου που πρέπει να εξαχθεί από αυτήν στην προκειμένη χρονική στιγμή ανάπτυξης και να εμβολιαστεί σε θρεπτικό για τη δημιουργία της κύριας καλλιέργειας. Η επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων κατά την έναρξη της καλλιέργειας ορίζεται ίση με $OD_{600nm} = 1$. Επιπρόσθετα, η κυτταρική συγκέντρωση είναι γραμμικά ανάλογη της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας OD_{600nm} , συνεπώς η τιμή OD_{600nm} μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο νόμο αραιώσης. Έτσι, εαν γνωρίζουμε τον όγκο της κύριας καλλιέργειας και την οπτική πυκνότητα της μικρής καλλιέργειας τη δεδομένη χρονική στιγμή, μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε τον απαιτούμενο όγκο που πρέπει να παραληφθεί από την μικρή και να εμβολιαστεί στη μεγάλη καλλιέργεια. Αυτό γίνεται με βάση το νόμο αραιώσης: $C_1V_1 = C_2V_2$ με τους δείκτες 1 και 2 να υποδεικνύουν την μικρή και μεγάλη καλλιέργεια αντίστοιχα. Ως C ορίζεται η κυτταρική συγκέντρωση κάθε καλλιέργειας σε δεδομένη χρονική στιγμή, ενώ ως V_2 ο όγκος της κύριας καλλιέργειας. Ο απαιτούμενος όγκος από την προκαλλιέργεια που πρέπει να εισαχθεί στο θρεπτικό υλικό της κύριας καλλιέργειας συμβολίζεται με V_1 .

3.6.3 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες, εμβολιάζεται η μετασχηματισμένη αποικία που επιλέχθηκε σε θρεπτικό μέσο YPD με 10% v/v ρυθμιστικό διάλυμα 1M Potassium Phosphate. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος της κωνικής φιάλης στην οποία γίνεται η καλλιέργεια είναι 2 L με τον συνολικό όγκο της καλλιέργειας να είναι 400 mL. Τα 400 mL προκύπτουν από τον εμβολιασμό όγκου από την προκαλλιέργεια, ο οποίος υπολογίστηκε στο πρηγούμενο στάδιο από το νόμο αραιώσης, σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού YPD – Buffer, ώστε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στην έναρξη της καλλιέργειας να ισούται με την μονάδα ($OD_{600nm} = 1$). Τα κύτταρα της ζύμης παραμένουν για επώαση υπό ανάδευση σε περιστροφικούς επωαστήρες σε συνθήκες 180 rpm, 30 °C. Η αναλογία όγκου αέρα-θρεπτικού μέσου εντός της κωνικής φιάλης παραμένει σε επίπεδα άνω των 3/4 με σκοπό την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών αερισμού. Μετά το πέρας συνολικά 4 ημερών και αφού τα αποτελέσματα της δειγματοληψίας κρίθηκαν ικανοποιητικά, η καλλιέργεια διακόπηκε με σκοπό τον καθαρισμό της και την απομόνωση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης.

Καθ'όλη την διάρκεια της καλλιέργειας, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πραγματοποιούταν δειγματοληψία για μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης και της παραγωγικότητας της καλλιέργειας, με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε στην προκαλλιέργεια (χρήση Control και Blank δείγματος, φυγοκέντρηση, διαχωρισμός κυτταρικής μάζας-θρεπτικού υλικού, μέτρηση οπτικής πυκνότητας κυττάρων, ποσοτική μέτρηση πρωτεΐνης).

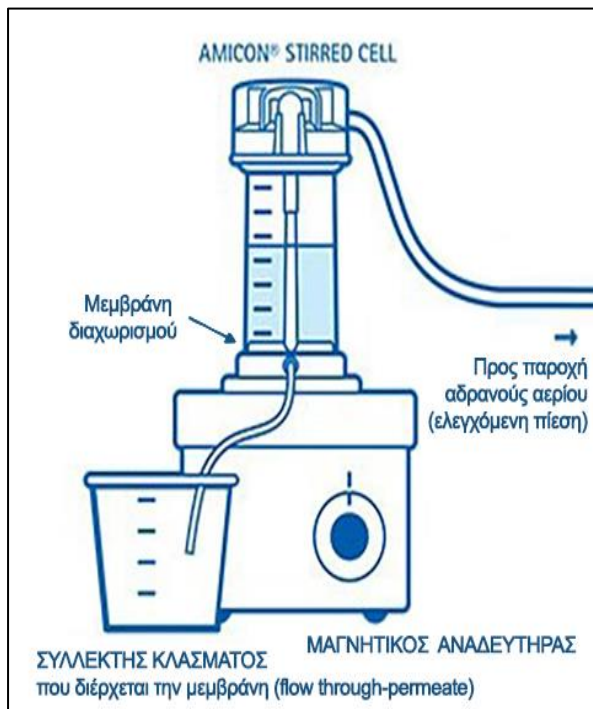
3.6.4 Διήθηση, συμπύκνωση και εξισορρόπηση του υπερκείμενου της καλλιέργειας *P. pastoris*

Διήθηση και συμπύκνωση του συλλεχθέντος υγρού της καλλιέργειας

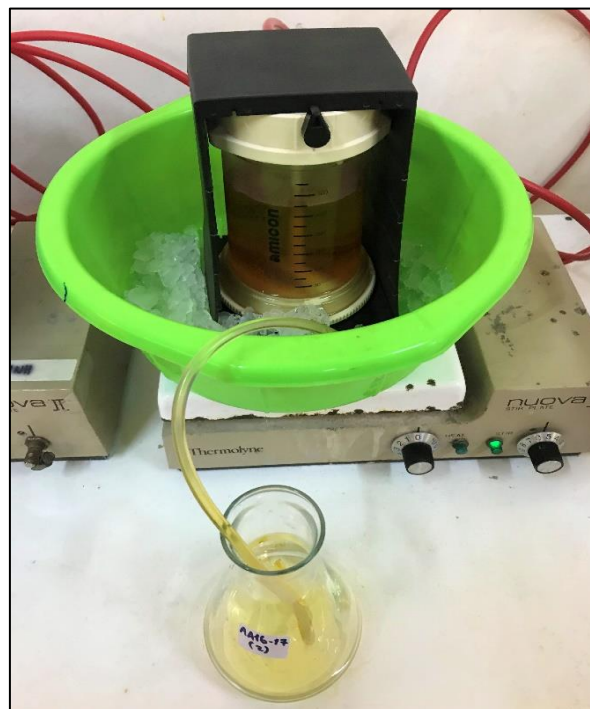
Η τεχνική της υπερδιήθησης πρωτεϊνών (Ultrafiltration) με χρήση ημιπερατών μεμβρανών εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό σωματιδίων και διαλυτών μορίων μικρού μεγέθους και μοριακού βάρους από ένα ρευστό, οδηγώντας στην συμπύκνωση του με αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων που περιέχονται σε αυτό. Η αρχή του διαχωρισμού στηρίζεται στον διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθος τους από την ημιπερατή μεμβράνη υπό την άσκηση πίεσης. Γενικότερα, ρόλος των μεμβρανών αποτελεί η συγκρότηση μορίων μεγαλύτερων από την διάμετρο των πόρων τους, ενώ παράλληλα τα μικρότερα μόρια διέρχονται από αυτές και διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Τα συστήματα φυγοκέντρησης που περιλαμβάνουν μεμβράνες υπερδιήθησης είναι κατάλληλα για την απομάκρυνση σακχάρων, νουκλεοτιδίων, μη υδατικών διαλυτών και άλλων σωματιδίων χαμηλού μοριακού βάρους (Reis et al., 2010).

Το πρωτεϊνικό δείγμα μεταβιβάζεται στο κατακόρυφο κυλινδρικό δοχείο της συσκευής υπερδιήθησης, στον πυθμένα της οποίας βρίσκεται η μεμβράνη διαχωρισμού. Η συσκευή είναι τοποθετημένη πάνω σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης μέσα σε πάγο, ενώ στο άνω μέρος της είναι συνδεδεμένη με παροχή αδρανούς αερίου (Άζωτο). Η παροχή του αερίου ρυθμίζεται σε επίπεδα πίεσης κοντά στα 50 psi (3.4 atm) και αποσκοπεί στην άσκηση κατακόρυφης δύναμης στην επιφάνεια του ρευστού για την υπερνίκηση της ωσμωτικής πίεσης που αναπτύσσεται. Αυτό εξασφαλίζει την ροή των μορίων του διηθήματος από την μεμβράνη, με την τιμή της πίεσης να καθορίζει και τον ρυθμό της ροής. Η μαγνητική ανάδευση διασφαλίζει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό, αφού λειτουργεί αποτρεπτικά για φαινόμενα συσσώρευσης μορίων στην μεμβράνη που θα προκαλούσαν φράξιμο των πόρων της και μείωση του ρυθμού ροής. Παράλληλα ο ρυθμός ανάδευσης είναι ήπιος κάτι το οποίο σε συνδυασμό με τις χαμηλές θερμοκρασίες διεξαγωγής του διαχωρισμού, με χρήση πάγου, διασφαλίζει ότι τα πρωτεϊνικά μόρια δεν θα μετουσιωθούν-αδρανοποιηθούν.

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, μετά το πέρας της επώασης της καλλιέργειας, το περιεχόμενο της φυγοκεντρήθηκε (1500xg, 10 λεπτά, 4 °C) για την απομάκρυνση των κυττάρων που περιέχονται στο ίζημα και την συλλογή του υπερκείμενου υγρού στο οποίο περιέχονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Στο συλλεχθέν υπερκείμενο υγρό, εκτός από τις πρωτεΐνες LPMOs, περιέχονται και άλλα συστατικά όπως το θρεπτικό μέσο, προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της ζύμης. Όλα τα παραπάνω πρέπει να απομακρυνθούν με σκοπό την τελική απομόνωση των πρωτεϊνών AA9. Αρχικά, το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό, χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8 και 0.2 μm (polyethersulfone, Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters), για την απομάκρυνση τυχόντων κυτταρικών θραυσμάτων. Το διάλυμα που παραλήφθηκε, συμπυκνώθηκε με τη χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 με μεμβράνες polyethersulfone PM-10 (Amicon Millipore, Η.Π.Α.), οι οποίες επιτρέπουν την διέλευση μακρομορίων μοριακού βάρους μικρότερου από 10 kDa. Η πρωτεΐνη που πρόκειται να απομονωθεί έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa και έτσι πρόκειται να συγκρατηθεί από την μεμβράνη. Μετά τη λήξη της υπερδιήθησης, το αρχικό διάλυμα έχει διαχωριστεί σε δυο κλάσματα. Το ένα κλάσμα είναι αυτό που διήλθε από τις μεμβράνες (permeate) και εν συνεχεία απορρίπτεται καθώς δεν περιέχει την προς απομόνωση πρωτεΐνη. Το άλλο κλάσμα αποτελεί το συμπυκνωμένο διάλυμα που παρακρατήθηκε (retentate) εντός της συσκευής από τις μεμβράνες και περιέχει πρωτεΐνες μοριακού βάρους άνω των 10 kDa, συμπεριλαμβανομένης της AA9.



Εικόνα 3.6. Σχέδιο της διάταξης υπερδιήθησης της Amicon®, στο οποίο διακρίνεται η παροχή αδρανούς αερίου, ο κατακόρυφος κυλινδρικός υποδοχέας του δείγματος, ο μαγνητικός αναδευτήρας και ο σωλήνας απόρριψης του εξερχόμενου από τις μεμβράνες διηθήματος. (Amicon® Stirred Cell setup, Millipore)



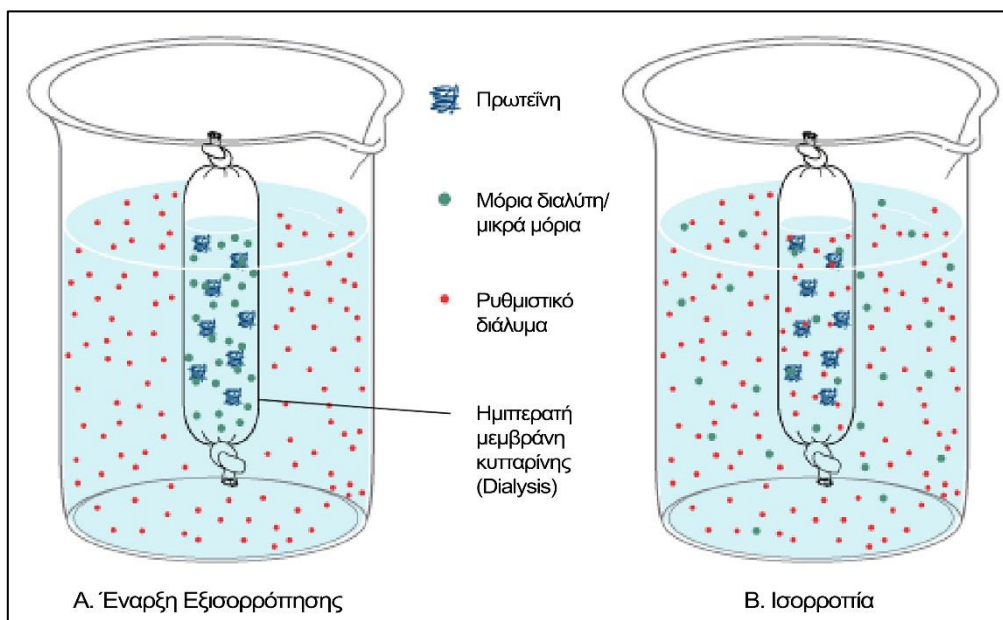
Εικόνα 3.5. Η πειραματική διάταξη υπερδιήθησης κατά την πειραματική διαδικασία συμπύκνωσης του πρωτεϊνικού δείγματος.

Εξισορρόπηση του συμπυκνωμένου δείγματος πρωτεϊνών

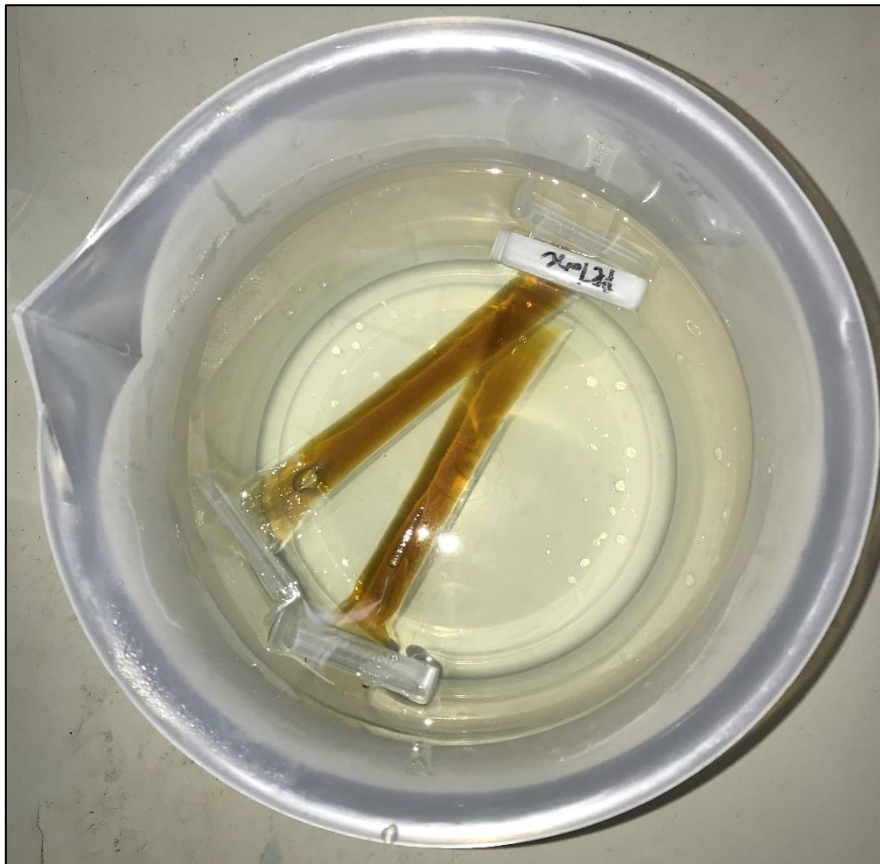
Μετά την συμπύκνωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη υπερδιήθησης, το διάλυμα υποβλήθηκε σε εξισορρόπηση με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Talon. Η εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, πόροι διαμέτρου 25 mm, Sigma-Aldrich). Η μεμβράνη κυτταρίνης βυθίστηκε σε απιονισμένο νερό υπό βρασμό για 30 λεπτά και στη συνέχεια μορφοποιήθηκε σε σχήμα σωλήνα ο οποίος πληρώθηκε με το πρωτεϊνικό διάλυμα μέχρι το 1/3 του όγκου του. Το σύστημα βυθίστηκε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος Talon και παρέμεινε εκεί για τουλάχιστον 16 ώρες στους 4 °C. Ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος Talon είναι συνήθως 100 φορές μεγαλύτερος του προς εξισορρόπηση διαλύματος, με τον λόγο των δυο όγκων να καθορίζει αναλογικά και τον βαθμό καθαρισμού εφόσον το σύστημα φτάσει σε ισορροπία.

Η τεχνική της εξισορρόπησης (Dialysis) αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού που έχει στόχο την απομάκρυνση μικρών ανεπιθύμητων μορίων από το διάλυμα και παράλληλα οδηγεί στην μεταβολή της σύστασης του διαλύτη των πρωτεϊνών εισάγοντας μόρια ενός άλλου ρυθμιστικού διαλύματος. Έτσι, επιτυγχάνεται ταυτόχρονα ο περαιτέρω καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος αλλά και η αλλαγή του ρυθμιστικού συστήματος κάτι το οποίο

αξιοποιείται σε εφαρμογές που ακολουθούν του καθαρισμού, όπως η ηλεκτροφόρηση και η απομόνωση με χρωματογραφική στήλη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης, κατά την οποία μικρά μόρια δύναται να διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη και να μεταφέρονται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε χαμηλότερης συγκέντρωσης μέχρι αποκατάστασης της ισορροπίας στο σύστημα, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια συγκρατώνται από την μεμβράνη στην πλευρά του δείγματος. Στην ισορροπία η συγκέντρωση των μικρών σωματιδίων είναι περίπου ίδια εντός και εκτός της μεμβράνης, με τα μόρια του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης να ακολουθούν την αντίστροφη πορεία. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση των μικρών μορίων που δεν είχαν απομακρυνθεί κατά το προηγούμενο στάδιο μειώνεται σε αποδεκτά επίπεδα και η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος αυξάνεται. Τα μόρια αυτά είναι κυρίως άλατα, πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους και άλλα μόρια διαλυτών τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν για την εξυπηρέτηση των επόμενων σταδίων της απομόνωσης. Ο απαιτούμενος χρόνος για την επίτευξη της εξισορρόπησης είναι συνάρτηση των παραγόντων που επηρεάζουν τον ρυθμό της διάχυσης των μορίων, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των μορίων, η επιφάνεια των ημιπερατών μεμβρανών αλλά και η αναλογία διαλύτη εξισορρόπησης-πρωτεϊνικού δείγματος. Παρά το γεγονός ότι η διεξαγωγή της εξισορρόπησης σε ανώτερη θερμοκρασία των 4 °C θα οδηγούσε στην επίσπευση της διαδικασίας, η θερμοκρασία αυτή επιλέγεται με σκοπό την διασφάλιση της θερμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης. Έτσι η εξισορρόπηση διαρκεί αρκετές ώρες και χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος (Harcum, 2008).



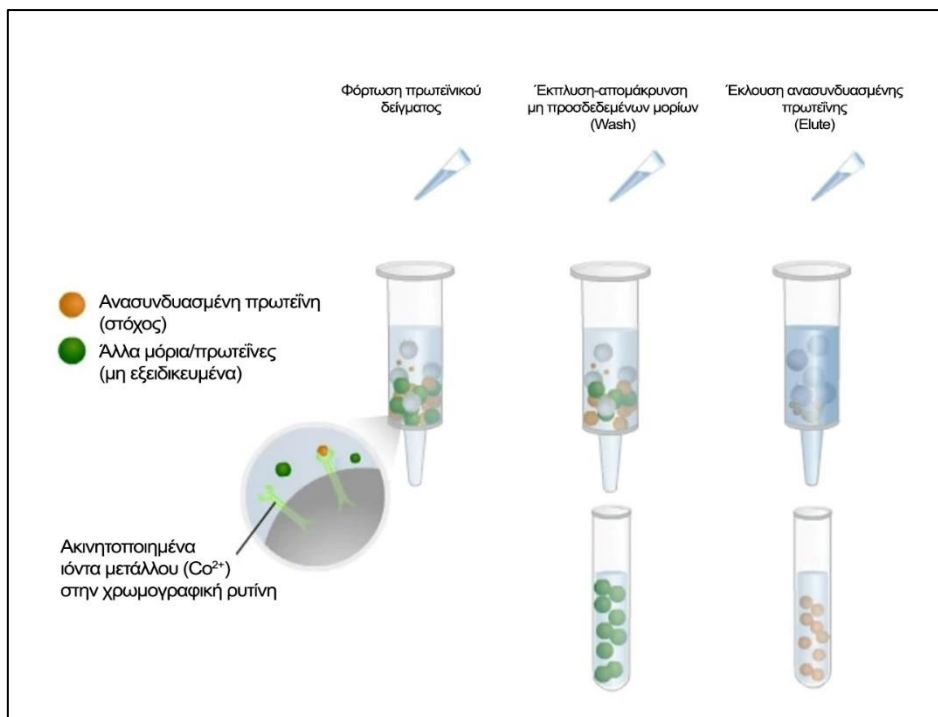
Εικόνα 3.7. Απεικόνιση της διαδικασίας εξισορρόπησης (Dialysis) με την μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης. Με βάση το φαινόμενο της ώσμωσης λόγω διαφοράς δυναμικού συγκέντρωσης, τα μικρά μόρια του πρωτεϊνικού δείγματος διαχέονται στο διάλυμα διαπερνώντας της μεμβράνης μέχρι την αποκατάσταση της ισορροπίας (equilibrium).



Εικόνα 3.8. Η διάταξη εξισορρόπησης κατά την πειραματική διαδικασία. Στη μέση διακρίνεται η ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης, διαμορφωμένη σε σωληνοειδές σχήμα, που περιέχει το πρωτεϊνικό δείγμα καφέ χρώματος βυθισμένη στο αραιό ρυθμιστικό διάλυμα Talon.

3.6.5 Απομόνωση ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

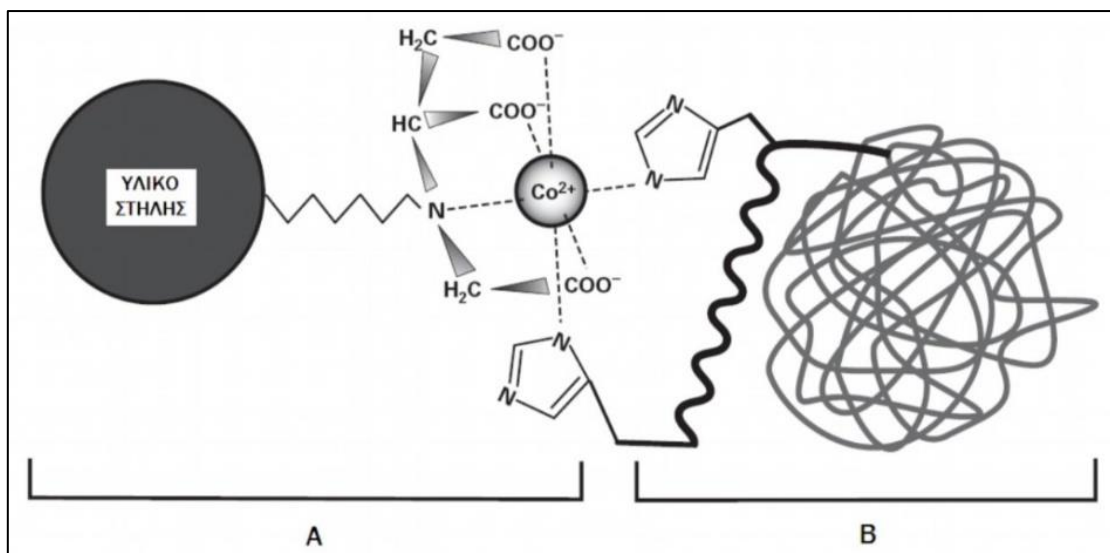
Η χρωματογραφία συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου αποτελεί μια μέθοδο που αξιοποιεί την αντιστρεπτή και εκλεκτική αλληλεπίδραση μεταξύ ορισμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών και ιόντων μετάλλων που βρίσκονται ακίνητοποιημένα σε στήλες ρητίνης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι εξειδικευμένες καθώς ο ακίνητοποιημένος προσδέτης (ligand) είναι επιλεγμένος με σκοπό να προσροφά μόρια με χαρακτηριστικά που διέπουν τον προς απομόνωση αναλύτη. Κατά συνέπεια, όταν το προς διαχωρισμό πρωτεϊνικό διάλυμα προστίθεται σε κάθετη στήλη (στήλη βαρύτητας), οι πρωτεΐνες στόχοι προσδένονται στην ρητίνη και τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος απομακρύνονται έπειτα από έκλυση με κατάλληλο διαλύτη. Ακολουθώς για την απελευθέρωση της πρωτεΐνης από την ρητίνη και την συλλογή της πραγματοποιείται έκλυση με άμεση ή σταδιακή αλλαγή της σύστασης του διαλύτη έκλυσης. Η αλλαγή αυτή γίνεται με προσθήκη συστατικών τα οποία ανταγωνίζονται και τελικά αντικαθιστούν τις πρωτεΐνες όσον αφορά το σχηματισμό δεσμού στη ρητίνη, καθώς διέπονται από μεγαλύτερη συγγένεια με τον προσδέτη της ρητίνης. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το ιόν που είναι ακίνητοποιημένο, πλευρικές ομάδες διαφορετικών αμινοξέων όπως η ιστιδίνη, η κυστεΐνη και η τρυπτοφάνη εμπλέκονται στην δημιουργία δεσμών με αυτά το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη. Πρωτεϊνικά μόρια, όπως αυτό της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης AA9, τα οποία φέρουν στην αλληλουχία τους έξι συνεχόμενα αμινοξέα ιστιδίνης (6 x His-tag), έχουν την ιδιότητα λόγω του αρνητικού τους φορτίου να προσδένονται σε θετικά φορτισμένα ιόντα μετάλλου (Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) όταν βρίσκονται σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα μεταλλικά κατιόντα είναι ακίνητοποιημένα πάνω σε κατάλληλο οργανικό πολυμερές υλικό. Αυτές οι μήτρες ρητίνης διαθέτουν στα άκρα τους ιονισμένες καρβοξυλικές ομάδες που συγκρατούν τα μεταλλικά ιόντα. Τα προσανατολίζουν στον τρισδιάστατο χώρο με τρόπο κατά τον οποίο δυο πλευρικές ομάδες ιστιδίνης προσδένονται χημικά σε αυτό, με την πλευρική ομάδα της ιστιδίνης είναι ένας ιμιδαζολικός δακτύλιος που περιέχει δυο άτομα αζώτου. Υπενθυμίζεται, ότι οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα αμινοξέα ιστιδίνης τοποθετήθηκαν στο ανασυνδυσασμένο γονίδιο της πρωτεΐνης LPMO, με σκοπό την εξυπηρέτηση της διαδικασίας απομόνωσης της σε στήλη. Έτσι, στο συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η μοναδική που περιέχει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης (6 x His-tag), με αποτέλεσμα να είναι και η μόνη με ικανότητα ισχυρής πρόσδεσης στη στήλη. Για την διακοπή της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-ιόντος γίνεται προσθήκη ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Η δομή του μορίου του αποτελείται από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο ο οποίος παρουσιάζει όμοια δομή με την πλευρική ομάδα της ιστιδίνης. Επομένως, το ιμιδαζόλιο δρα ανταγωνιστικά για τον σχηματισμό δεσμών καταλαμβάνοντας τις θέσεις πρόσδεσης στο ηλεκτροθετικό ιόν κοβαλτίου (Co^{2+}) και απελευθερώνοντας τα προσδεμένα πρωτεϊνικά μόρια (Bornhorst & Falke, 2000, Block et al., 2009)



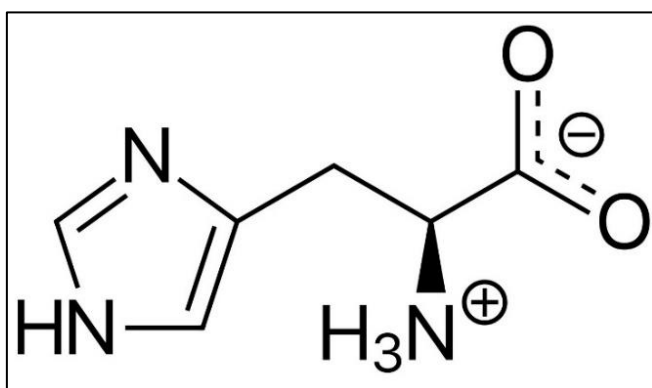
Εικόνα 3.9. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας. Αρχικά γίνεται φόρτωση του πρωτεϊνικού δείγματος και πρόσδεση των μορίων στη μήτρα ρητίνης. Ακολούθως τα υπόλοιπα συστατικά εκπλένονται και απομακρύνονται. Στο τελικό στάδιο γίνεται συλλογή των πρωτεϊνών με διαλύτη έκλυσης που περιέχει Ιμιδαζόλιο (Pierce Protein Methods, Thermofischer Scientific)



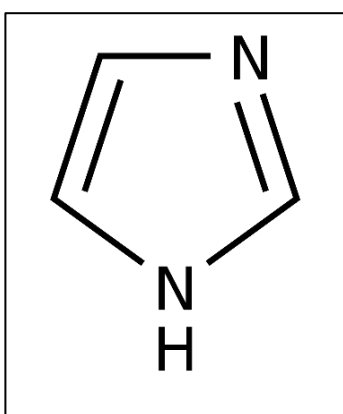
Εικόνα 3.10 Στήλη βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) πληρωμένη με ρητίνη Talon® ακίνητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου (Clontech, Η.Π.Α) κατά τη διάρκεια καθαρισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (IMAC). Η ρητίνη διακρίνεται με ρόζ χρώμα στο κάτω μέρος της στήλης.



Εικόνα 3.12 Μηχανισμός χηλικής πρόσδεσης των αμινοξέων ιστιδίνης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης AA9 με το κατίον κοβαλτίου του πληρωτικού υλικού της στήλης.



Εικόνα 3.11 Η μοριακή δομή αμινοξέως ιστιδίνη. Σε αυτό διακρίνεται η πλευρική του ομάδα η οποία αποτελείται από έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο



Εικόνα 3.13 Η μοριακή δομή του Ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο αποτελείται από μια ένωση δακτυλίου ο οποίος περιέχει δυο μόρια αζώτου. Η δομή του είναι παρόμοια με την πλευρική ομάδα του αμινοξέως ιστιδίνη με αποτέλεσμα να δρα ανταγωνιστικά με αυτήν όσον αφορά την πρόσδεση στα κατιόντα Κοβαλτίου του πληρωτικού υλικού της στήλης IMAC.

Για την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης AA9 από το συμπυκνωμένο υπερκείμενο της καλλιέργειας ζύμης *P. pastoris*, έγινε χρήση στήλης βαρύτητας (Biorad, Η.Π.Α.) πληρωμένη με όγκο 4 mL (CV: Column Volume) ρητίνης ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου Talon® Metal Affinity Resin (Clontech, Η.Π.Α). Ο όγκος (CV) της σταθερής φάσης της στήλης καθορίζει τους όγκους της κινητής φάσης που πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατά την εξισορρόπηση της στήλης αλλά και την έκλυση των πρωτεϊνών.

Η διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρήση της στήλης περιλαμβάνει κατά σειρά την εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης, την φόρτωση του δείγματος, την έκπλυση για την απομάκρυνση των μη επιθυμητών πρωτεϊνικών μορίων, την έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και την εκ νέου εξισορρόπηση της μήτρας.

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα καθαρισμού ήταν τα εξής:

1. Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης με χρήση αραιού ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1X (10 % v/v). Η αναλογία όγκων της μήτρας της στήλης/διαλύματος για εξισορρόπηση ορίζεται περίπου σε 1:20. Συνεπώς για όγκο CV = 4 mL της ρητίνης απαιτήθηκαν 200 mL αραιού διαλύματος Talon (1X). Για την εξισορρόπηση χρησιμοποιήθηκαν 12 mL Talon 1X, δηλαδή περίπου 3 όγκοι CV, που ισούται με τον όγκο της σταθερής φάσης στη στήλη.
2. Φόρτωση του συμπυκνωμένου διαλύματος για πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα κατιόντα Κοβαλτίου Co^{2+} .
3. Έκπλυση με 50 mL ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1X, δηλαδή περίπου 10 όγκους CV, για την απομάκρυνση μη επιθυμητών πρωτεϊνικών μορίων τα οποία δεν προσδέονται στην ρητίνη.
4. Έκπλυση με όγκο 5 mL διαλύματος Talon 1X με χαμηλή συγκέντρωση σε Ιμιδαζόλιο (5 mM). Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται τυχόν πρωτεΐνες οι οποίες ενδέχεται να είναι ελαφρά προσδεμένες στη στήλη.
5. Έκλυση πρωτεϊνών με 7 mL διαλύματος Talon 1X με υψηλή συγκέντρωση σε Ιμιδαζόλιο (100 mM). Σε αυτό το στάδιο απελευθερώνονται και συλλέγονται οι εκλυόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, καθώς οι θέσεις πρόσδεσης τους στη στήλη πληρώνονται από μόρια Ιμιδαζολίου του διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης.
6. Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης με έκπλυση με περίπου 20 όγκους CV (80 mL) ρυθμιστικό διάλυμα Talon, για την απομάκρυνση του Ιμιδαζολίου και αποθήκευση της στήλης σε διαλυμα αιθανόλης 20% (v/v) στους 4 °C.

Τέλος, μετά την συλλογή της, η καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εξισοροποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 30 mM pH = 8 με την ίδια μέθοδο που εφαρμόστηκε προηγουμένως, δηλαδή με την μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, πόροι διαμέτρου 25 mm, Sigma Aldrich) και φυλάσσεται στους 4 °C.

Η επιβεβαίωση της ύπαρξης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο εκλουόμενο δείγμα του βήματος 5 πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 280nm (OD_{280nm}) όλων των δειγμάτων αμέσως μετά την συλλογή τους. Επιπρόσθετα, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα, ο βαθμός καθαρότητας της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

3.6.6 Ποσοτικός προσδιορισμός παραληφθείσας πρωτεΐνης

Καθόλη την διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός δείγματος χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι: η μέθοδος Bradford και η φασματοσκοπική μέθοδος με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η πρώτη εφαρμόστηκε κατά κύριο λόγο για την λήψη μιας ένδειξης του επιπέδου της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα εναιωρήματα που ελήφθησαν από δειγματοληψία στις υγρές καλλιέργειες, ενώ η δεύτερη εφαρμόστηκε για την μέτρηση του δείγματος μετά τον καθαρισμό και την εξαγωγή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που παράχθηκε.

3.6.6.1 Χρωματομετρική μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του επιπέδου της πρωτεϊνικής έκφρασης στις υγρές προκαλλιέργειες (Κεφ. 3.6.2). Αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη χρωματομετρική μέθοδο φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα της όξινης χρωστικής ένωσης Coomassie G-250 Dye να προσδέεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά κατάλοιπα αμινοξέων (όπως η Αργινίνη, η Λυσίνη και η Ιστιδίνη) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις αμινομάδες τους και δεσμούς van der Waals με τις καρβοξυλικές τους ομάδες. Η πρόσδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος-συμπλόκου μπλε χρώματος. Αυτό οδηγεί σε μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης του διαλύματος, δηλαδή τη μεταβολή του χρώματος του από καφέ-κόκκινο (μέγιστη απορρόφηση στα 465 nm) σε μπλέ (μέγιστη απορρόφηση στα 610 nm). Το φάσμα απορρόφησης του ιοντικού δεσμού που σχηματίζεται εμφανίζει μέγιστο στα 595 nm, με την ένταση του έγχρωμου προϊόντος να είναι προσεγγιστικά ανάλογη της ποσότητας των σχηματιζόμενων δεσμών και άρα της ποσότητας της πρωτεΐνης. Η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μπορεί να βρεθεί από την τιμή απορρόφησης του διαλύματος στα 595 nm και τη χρήση πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με προσθήκη του διαλύματος Bradford σε πρότυπα πρωτεϊνικά διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (όπως η αυτό της αλβουμίνης ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin-BSA)) στις ίδιες συνθήκες και την μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm (OD_{595nm}). Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίστηκε ίση με $Y = 1.4X$, όπου Y η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε g/L και X η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm. Τέλος, για τον έλεγχο των μετρήσεων με τη μέθοδο Bradford, στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν έγινε χρήση δείγματος ελέγχου (control sample) μιας

καλλιέργειας μη ανασυνδυασμένου στελέχους *P. pastoris* X33 και ενός τυφλού δείγματος (blank sample) που περιέχει απιονισμένο νερό αντί πρωτεϊνικού διαλύματος.

3.6.6.2 Φασματοσκοπική μέθοδος

Η φασματοσκοπική μέθοδος αποτελεί μια σύντομη, μη καταστρεπτική μέθοδος και απαιτεί μικρή ποσότητα του δείγματος. Κατά την εφαρμογή της, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα μπορεί να προσδιοριστεί με βάση την μέτρηση της απορρόφησης του πρωτεϊνικού διαλύματος στην περιοχή του υπεριώδους φωτός (100 - 400 nm) και πιο συγκεκριμένα στη συχνότητα 280 nm. Η συχνότητα αυτή προσφέρει υψηλή εκλεκτικότητα, καθώς αυτή απορροφάται αποκλειστικά από τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα τα κατάλοιπα Τρυπτοφάνης και Τυροσίνης, ενώ σε πολύ μικρότερο βαθμό από δισουλφιδικούς δεσμούς εάν αυτοί υφίστανται. Έτσι, η Μοριακή Απορροφητικότητα (Extinction Coefficient) στα 280nm (ϵ_{280nm}) μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια απευθείας από την αμινοξική αλληλουχία, μέγεθος το οποίο μαζί με την οπτική απορρόφηση (OD_{280nm}) αξιοποιείται για την εύρεση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο δείγμα. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μέτρηση της απορρόφησης του πρωτεϊνικού δείγματος στα 280 nm με τη χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm και έπειτα μηδενισμό της μέτρησης με το ίδιο διάλυμα απουσία πρωτεΐνης, δηλαδή το διάλυμα Talon buffer 1x στο οποίο βρίσκεται. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα υπολογίζεται με τη βοήθεια του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου:

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{OD_{280nm} \times MW}{\epsilon_{280nm}}$$

Όπου ϵ : Μοριακή Απορροφητικότητα ή Μοριακός Συντελεστής Απόσβεσης (Molar Extinction Coefficient) ($M^{-1} cm^{-1}$), **MW**: το Μοριακό Βάρος της μετρούμενης πρωτεΐνης και **OD_{280nm}** : η οπτική απορρόφηση στα 280 nm.

Η τιμή της Μοριακής Απορροφητικότητας ϵ υπολογίζεται με τη χρήση του προγράμματος ProtParam του ExPASy ή εναλλακτικά με τη χρήση του ακόλουθου τύπου (Gill et al., 1989, Pace et al., 1995): $\epsilon_{280nm} = 5500W + 1490Y + 125$

Όπου **W**: ο συνολικός αριθμός αμινοξέων Τρυπτοφάνης (Trp), **Y**: ο συνολικός αριθμός αμινοξέων Τυροσίνης (Tyr) και **C**: ο συνολικός αριθμός αμινοξέων Κυστεΐνης (Cys).

3.7 Μέθοδοι ανάλυσης και βιοχημικού χαρακτηρισμού

3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

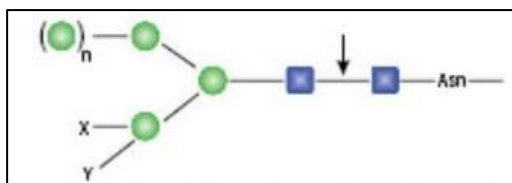
3.7.1.1 Απογλυκοζυλίωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1.7.3, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών μορίων που παραλαμβάνονται μετά την διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης τους. Το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να υπολογιστεί βιοπληροφορικά, ενώ με όμοια μέσα είναι εφικτή η πρόβλεψη των θέσεων γλυκοζυλίωσης στο σύστημα έκφρασης της ζύμης *P. pastoris* με σχετικά υψηλά ποσοστά επιτυχίας.

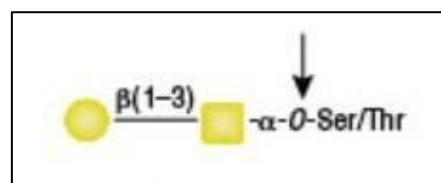
Ένας από τους λόγους που το δείγμα απομονωμένων πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE είναι ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών μετά τον διαχωρισμό τους, ενώ επιπλέον αποτελεί έναν τρόπο για την επιβεβαίωση ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει το αναμενόμενο μοριακό βάρος και συνεπώς έχει παραχθεί αποτελεσματικά. Για τον ορθό προσδιορισμό του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθούν από αυτή τα σάκχαρα που έχουν προστεθεί κατά την γλυκοζυλίωση. Για το σκοπό αυτό, πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα επεξεργάζονται με ειδικά αντιδραστήρια απογλυκοζυλίωσης που περιέχουν ένζυμα τα οποία διασπών υδρολυτικά συγκεκριμένους γλυκοζιτικούς δεσμούς απομακρύνοντας το μεγαλύτερο μέρος των προσδεμένων σακχάρων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δυο kits της εταιρείας New England Biolabs (Η.Π.Α.). Το ένα kit περιέχει το ένζυμο Ο-Γλυκοσιδάση (Endo- α -N-Acetylogalactosaminidase) και το άλλο kit με την ονομασία EndoH περιέχει το ένζυμο Ενδογλυκοσιδάση-Η. Το ένζυμο Ο-Γλυκοσιδάση καταλύει εξειδικευμένα την υδρόλυση του δεσμού μεταξύ του αμινοξέως Σερίνης/Θρεονίνης και του σακχάρου Γλυκάνη της Ο-συνδεδεμένης γλυκοπρωτεΐνης.

Η Ενδογλυκοσιδάση-Η καταλύει εξειδικευμένα την υδρόλυση του γλυκοζιτικού δεσμού του σχηματισμένου δισακχαρίτη γλυκανών ο οποίος είναι ενωμένος με το αμινοξύ Ασπαραγίνη. Κατά την πειραματική διαδικασία για την απογλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών του δείγματος ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των εμπορικών προϊόντων της εταιρείας.



Εικόνα 3.14 Σχηματική αναπαράσταση ενός N-συνδεδεμένου πολυσακχαρίτη στο αμινοξύ Ασπαραγίνη. Τα τετράγωνα μόρια μπλε χρώματος αναπαριστούν δυο σάκχαρα γλυκάνης, ενώ τα κυκλικά πράσινα σάκχαρα μαννόζης. Το βέλος δείχνει τον δεσμό στον οποίο δρά υδρολυτικά η Ενδογλυκοσιδάση-H.



Εικόνα 3.15 Σχηματική αναπαράσταση ενός O-συνδεδεμένου πολυσακχαρίτη στο αμινοξύ Σερίνη/Θρεονίνη. Το τετράγωνο μόριο αναπαριστά ένα σάκχαρο γλυκάνης. Το βέλος δείχνει τον δεσμό στον οποίο δρά υδρολυτικά η O-γλυκοσιδάση.

Για την απογλυκοζυλίωση των N-συνδεδεμένων πολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε το kit EndoH. Το ενζυμικό παρασκεύασμα της Ενδογλυκοσιδάσης-H αραιώθηκε με απιονισμένο νερό σε δυο διαφορετικές αναλογίες 1:10 και 1:100. Αυτό πραγματοποιήθηκε επειδή το μοριακό βάρος της Ενδογλυκανάσης-H είναι σε όμοια επίπεδα με το θεωρητικά αναμενόμενο της LPMO (~30 kDa) και πιθανώς οι ζώνες των δυο ενζύμων να συμπίπτουν στο πήκτωμα. Στην μεγαλύτερη αραιώση 1:100 αναμένεται να μην δημιουργείται αυτό το πρόβλημα, καθώς μικρότερη ποσότητα του ενζύμου δεν θα διακρίνεται έντονα στο πήκτωμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κατά σειρά τα εξής βήματα:

1. Δημιουργία διαλύματος αποδιάταξης γλυκοπρωτεΐνης τελικού όγκου 10 μ L. Αυτό αποτελείται από 7 μ L του διαλύματος πρωτεΐνης, 1 μ L ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης γλυκοπρωτεϊνών (10X Glycoprotein Denaturing Buffer) και απιονισμένο νερό 2 μ L. Ο όγκος του διαλύματος προκύπτει ανάλογα με την συγκέντρωση του με σκοπό να περιέχει 1-20 μ g πρωτεΐνης, ενώ προστίθεται όγκος νερού μέχρι την συμπλήρωση τελικού όγκου διαλύματος 10 μ L.
2. Το διάλυμα αποδιάταξης επωάζεται για 10 λεπτά στους 100 $^{\circ}$ C.
3. Στο διάλυμα γίνεται προσθήκη 2 μ L του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (10X GlycoBuffer 3), 2 μ L του διαλύματος EndoH (1:10 και 1:100 αντίστοιχα) και συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος (6 μ L) απιονισμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 20 μ L.
4. Το διάλυμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37 $^{\circ}$ C σε Thermomixer.

Για την απογλυκοζυλίωση των O-συνδεδεμένων πολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε το kit του ενζύμου O-Γλυκοσιδάσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κατά σειρά τα εξής βήματα:

1. Δημιουργία διαλύματος αποδιάταξης γλυκοπρωτεΐνης τελικού όγκου 10 μ L. Αυτό αποτελείται από 7 μ L του διαλύματος πρωτεΐνης, 1 μ L ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης γλυκοπρωτεϊνών (10X Glycoprotein Denaturing Buffer 3) και απιονισμένο νερό 2 μ L. Ο όγκος του διαλύματος προκύπτει ανάλογα με την

συγκέντρωση του με σκοπό να περιέχει 1-20 µg πρωτεΐνης, ενώ προστίθεται όγκος νερού μέχρι την συμπλήρωση τελικού όγκου διαλύματος 10 µL.

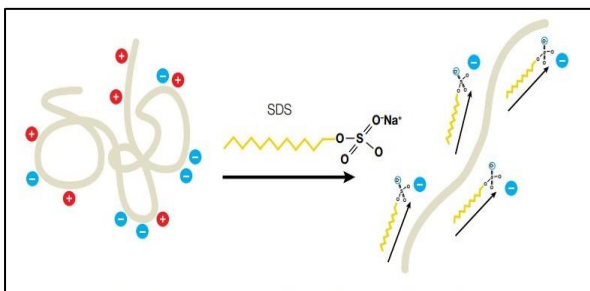
2. Το διάλυμα αποδιάταξης επωάζεται για 10 λεπτά στους 100 °C.
3. Στο διάλυμα γίνεται προσθήκη 2µL του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης (10X GlycoBuffer 2), 2 µL του διαλύματος 10% NP-40, 2 µL Νευραμινιδάσης (Neuraminidase), 1 µL του ενζυμικού διαλύματος Ο-Γλυκοσιδάσης και συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος (2 µL) απιονισμένου νερού μέχρι τελικό όγκο 20 µL.
4. Το διάλυμα επωάζεται για 4 ώρες στους 37 °C σε Thermomixer.

3.7.1.2 Ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE

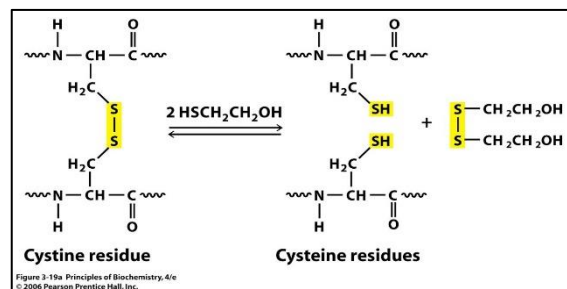
Όπως έχει αναλυθεί στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (κεφάλαιο 3.5.3.4), ο όρος ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων όταν αυτά βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, σε κατάλληλο μέσο, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. Σε ένα ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες κινούνται προς τον πόλο που έχει το αντίθετο φορτίο. Ο ρυθμός της κίνησης αυτής καθορίζεται από μια σύνθετη σχέση μεταξύ των φυσικών χαρακτηριστικών του συστήματος ηλεκτροφόρησης και των πρωτεϊνών. Μερικοί από τους σημαντικότερους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση είναι η ισχύς του πεδίου, το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, η ιοντική ισχύς αλλά και οι ιδιότητες του μέσου από το οποίο διέρχεται το μόριο όπως το ιξώδες και το μέγεθος πόρων του.

Συνηθέστερη μέθοδος για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ενός πρωτεϊνικού δείγματος αποτελεί η ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), η οποία δημοσιεύτηκε πρώτη φορά το 1970 (Laemmli, 1970). Η μέθοδος αυτή διαχωρίζει τις πρωτεΐνες πρωτίστως με βάση την μάζα τους. Βασικό χαρακτηριστικό αυτής αποτελεί η χρήση του θειϊκού δωδεκυλικού νατρίου (SDS), το οποίο δρα ως ανιοντικό απορρυπαντικό, αποδιατάσσοντας και φορτίζοντας αρνητικά τις πρωτεΐνες. Ο όρος απορρυπαντικό, χρησιμοποιείται λόγω της δομής των μορίων αυτής της κατηγορίας, η οποία αποτελείται από μια πολική-υδρόφιλη ομάδα και μια μη πολική-υδρόφοβη ομάδα. Τα μόρια του SDS συνδέονται μη ομοιοπολικά με τις πεπτιδικές αλυσίδες σχηματίζοντας μικύλλια με τις πρωτεΐνες, προκαλώντας τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών μεταξύ τους αλλά και την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής τους επιτυγχάνοντας έτσι την διαλυτοποίησή τους. Στο αποτέλεσμα αυτό συμβάλλει και η παρουσία αναγωγικών παραγόντων, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη, δημιουργώντας αποδιατακτικές συνθήκες με την αναγωγή των ενδομοριακών και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δυο ομάδες – SH αμινοξέων κυστεΐνης της ίδιας ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με την αποδιάταξη των πρωτεϊνών να ολοκληρώνεται με θέρμανση του δείγματος. Έτσι, εξασφαλίζεται ότι το πρωτεϊνικό μόριο στο οποίο συνδέεται το SDS, θα έχει αρνητικό φορτίο

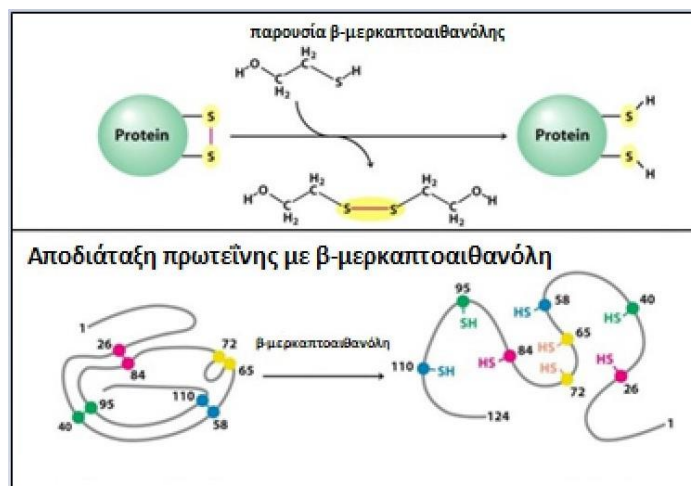
σε μια ευρεία κλίμακα pH, υπερκαλύπτοντας το ενδογενές θετικό φορτίο του, που είναι πολύ μικρό κατά απόλυτη τιμή συγκριτικά με το αρνητικό φορτίο του συνδεδεμένου SDS. Επιπρόσθετα, η αποδιάταξη του πολυπεπτιδίου αλλάζει την δομή του από ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο σχήμα, σε ένα ευθύγραμμο-ραβδοειδές σχήμα. Μια εξίσου σημαντική δράση του SDS είναι ότι προσδίδει ίδια αναλογία φορτίου ανά μάζα για όλες τις πρωτεΐνες του μίγματος, καθώς τα ανιόντα του SDS συνδέονται με σταθερό λόγο περίπου 1.4 g SDS ανά 1 g πρωτεΐνης (στοιχειομετρικά 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα). Τα παραπάνω, οδηγούν στο αποτέλεσμα ότι ο ρυθμός μεταφοράς όλων των πρωτεϊνών μέσα στο πήκτωμα διαχωρισμού εξαρτάται στο μεγαλύτερο βαθμό από το μέγεθος τους, δηλαδή την μάζα τους, με την κινητικότητα των πολυπεπτιδίων να είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Έτσι, επιτρέπεται η εκτίμηση του μοριακού τους βάρους μετά το πέρας του διαχωρισμού.



Εικόνα 3.16 Η επίδραση του SDS στην διαμόρφωση και το φορτίο της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.17. Ο μηχανισμός της αντίδρασης της β-μερκαπτοαιθανόλης για την διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού που ενώνει δυο αμινοξέα κυστεΐνης.



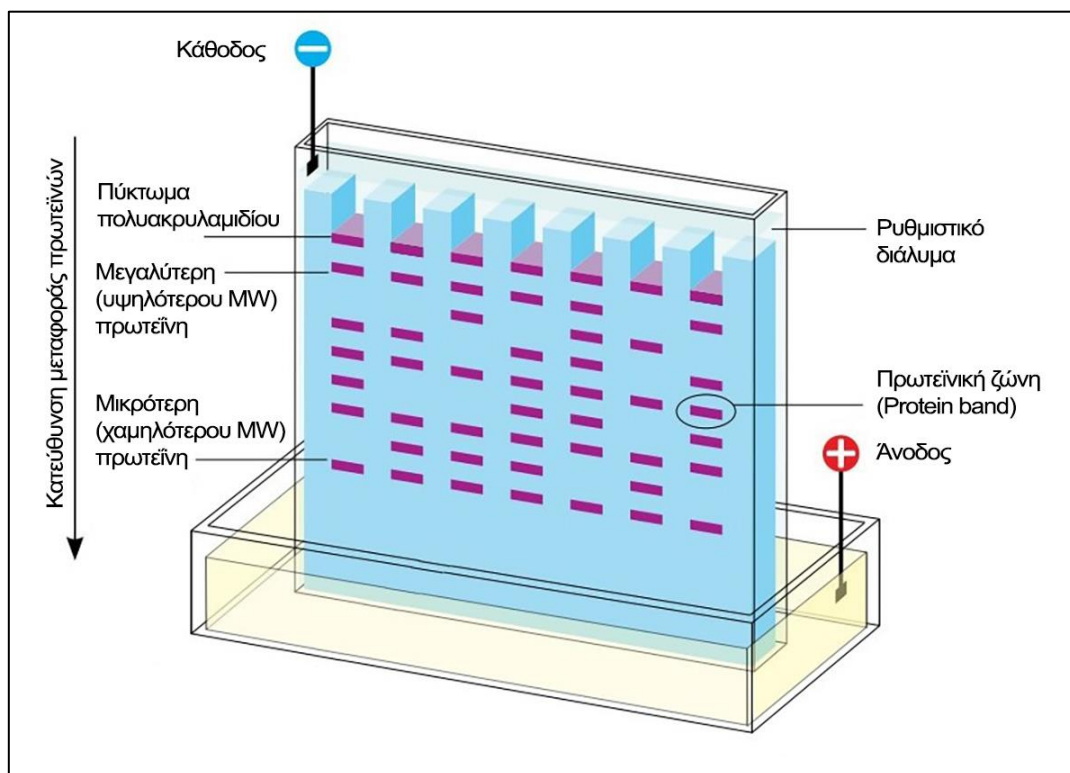
Εικόνα 3.18 Η δράση της β-μερκαπτοαιθανόλης για την διάσπαση των διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μιας πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα αυτής είναι η αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του μορίου και η μετατροπή του σε μια γραμμική αλυσίδα

Στην ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου λειτουργεί σαν ένα κόσκινο που διαχωρίζει τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατά την κίνηση των πρωτεϊνών υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, η δομή των πόρων του πηκτώματος επιτρέπουν σε μόρια μικρότερου μεγέθους να διέρχονται ταχύτερα σε σχέση με άλλα μεγαλύτερου μεγέθους. Το πολυακρυλαμίδιο είναι μια χημικά αδρανής ένωση, μη αγώγιμη, υδρόφιλη, σταθερή σε μεγάλα εύρη pH, ιοντικής ισχύος και θερμοκρασιών, ενώ καλύπτει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με ένα εύρος μεγέθους μεταξύ 5-250 kD. Επιπρόσθετα, είναι διαφανής για οπτικό εντοπισμό σε συχνότητες μεγαλύτερες των 250 nm. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν το πολυακρυλαμίδιο ιδανικό για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών καθώς η μήτρα αυτή δεν αλληλεπιδρά με διαλύτες και εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με βαφές για τον εντοπισμό πρωτεϊνών (Garfin, 2009). Το πήκτωμα του παράγεται με αντίδραση πολυμερισμού ελευθέρων ριζών κατά την ανάμειξη μονομερών και διμερών ακρυλαμιδίου με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πολυμερικού δικτύου εγκάρσιων διακλαδώσεων ενωμένων μεταξύ τους με σταυροδεσμούς (cross-linked). Ο παραπάνω πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία του APS (υπερθειικό άλας αμμωνίου) και του TEMED (N,N,N',N' – τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη). Το TEMED έχει τον ρόλο του καταλύτη της πολυμερικής αντίδρασης προωθώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών APS. Το πήκτωμα PAGE έχει μικρότερους πόρους σχετικά με άλλα πορώδη υλικά που χρησιμοποιούνται ως πηκτώματα όπως η αγαρόζη και έτσι κρίνεται ιδανικό για τον διαχωρισμό της πλειονότητας των πρωτεϊνών και άλλων μικρότερων νουκλεϊκών οξέων. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν καθορίζεται και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος αποτελούν έμμεση συνάρτηση της περιεκτικότητας του ακρυλαμιδίου στο διάλυμα παραγωγής του, όντας αντιστρόφως ανάλογο αυτής. Η επιλογή της κατάλληλης περιεκτικότητας ανάλογα με το προς διαχωρισμό δείγμα είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία της μεθόδου.

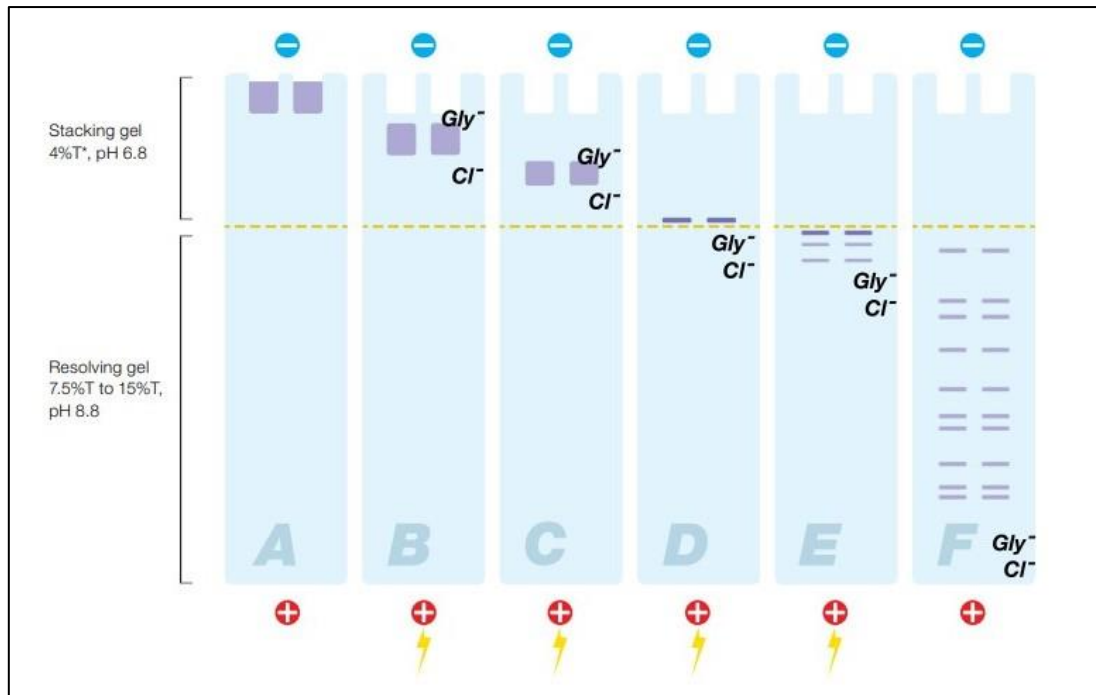
Κατά την κάθετη ηλεκτροφόρηση, μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) σε όλο το χώρο της συσκευής, το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το άνω και κάτω μέρος του πηκτώματος. Εν συνεχεία, διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης. Ακολούθως, το δείγμα φορτώνεται σε ειδικά διαμορφωμένες θέσεις (οπές φόρτωσης) στο άνω μέρος του πηκτώματος. Στο άνω μέρος του πηκτώματος βρίσκεται η κάθοδος (πόλος αρνητικού φορτίου), ενώ στο κάτω μέρος η άνοδος (πόλος θετικού φορτίου). Έτσι το σύμπλοκο πρωτεΐνης-SDS αρνητικού φορτίου θα κινηθεί με κατεύθυνση προς τα κάτω, δηλαδή προς τον πόλο αντίθετου φορτίου. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους κινούνται με ευκολία διαμέσου του πηκτώματος φτάνοντας σε χαμηλότερα σημεία του, ενώ οι μεγαλύτερες εντοπίζονται στο άνω μέρος, πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης-φόρτωσης. Στο τέλος της διαδικασίας αναμένεται να έχουν σχηματιστεί διαφορετικές ζώνες πρωτεϊνών (protein bands) κατά μήκος του πηκτώματος, όπου κάθε μια θα περιέχει πρωτεΐνες όμοιου μοριακού βάρους, με την ένταση της κάθε ζώνης να αποτελεί και μια ποιοτική ένδειξη της ποσότητας των πρωτεϊνών που περιέχονταν στο δείγμα. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες θα εμφανιστούν με χρώση του πηκτώματος με κατάλληλες ενώσεις. Μαζί με το πρωτεϊνικό δείγμα υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση και ένα πρότυπο δείγμα με

πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) για τον προσδιορισμό του άγνωστου μοριακού βάρους των πρωτεϊνών του δείγματος που ερευνάται.

Σε αντίθεση με το πήκτωμα αγαρόζης, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι ασυνεχής. Στην κάθετη ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο, το οποίο ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μετέπειτα, όταν οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο, το επονομαζόμενο και ως πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel). Το πήκτωμα επιστοίβαξης αποτελείται από πόρους μεγάλων διαστάσεων, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους μετατοπίζονται με τον ίδιο ρυθμό μέχρι να φτάσουν στο σημείο όριο των δυο πηκτωμάτων, όπου και παρατάσσονται σχηματίζοντας όλα μαζί μια ζώνη. Στη συνέχεια, τα μόρια διέρχονται στο πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο αποτελείται από μικρότερους πόρους, με αποτέλεσμα να ξεκινάει ο διαχωρισμός τους ανάλογα με το μοριακό βάρους τους.



Εικόνα 3.19. Σχηματική απεικόνιση των βασικών στοιχείων κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών σε SDS-PAGE.



Εικόνα 3.20. Σχηματική απεικόνιση της πορείας διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατά μήκος του ηλεκτώματος επιστοίβαξης και του ηλεκτώματος διαχωρισμού.

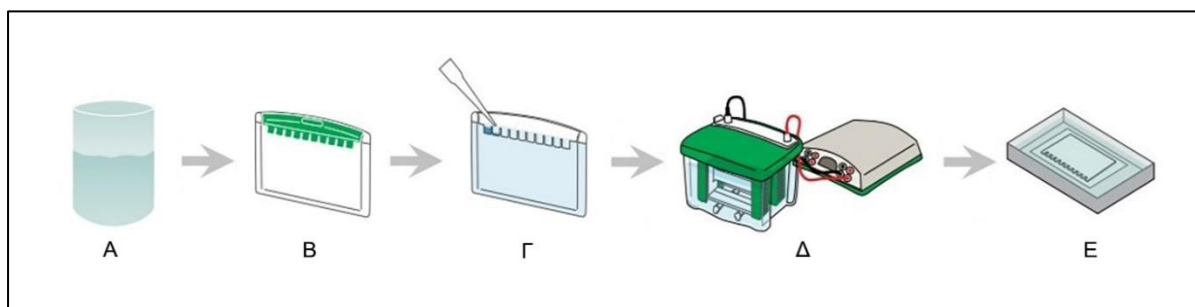
Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση της συσκευής ηλεκτροφόρησης Mini-Protean 3 της εταιρείας BIORAD (Η.Π.Α.) και για την εκτέλεση της διαδικασίας ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Ένα ζεύγος γυάλινων πλακών (10.1 cm x 7.3 cm και 10.1 cm x 8.3), αφού καθαρίστηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης, ενώθηκαν με τη βοήθεια δυο μεταλλικών σφικτήρων και σταθεροποιήθηκαν στη συσκευή.
2. Παρασκευή του ηλεκτώματος διαχωρισμού (resolving gel) περιεκτικότητας ακρυλαμίδιου 10% με ανάμειξη των συστατικών του και έκχυση του ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες μέχρι πλήρωσης ύψους 1.5 cm από τον πυθμένα. Εκεί αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά. [Στάδιο A]
3. Παρασκευή και έκχυση του ηλεκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel) περιεκτικότητας 4% σε ακρυλαμίδιο, σε όγκο περίπου ίσο με το μισό του ηλεκτώματος διαχωρισμού, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Αφού εκχυθεί το διάλυμα, τοποθετείται ειδική “χτένα” με σκοπό τον σχηματισμό οπών φόρτωσης των δειγμάτων. Το διάλυμα αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά. [Στάδιο A & B]
4. Στερέωση των γυάλινων πλακών στα ειδικά δοχεία της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης και προσθήκη στη συσκευή 400 - 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (gel running buffer). Σε αυτό το σημείο η “χτένα” απομακρύνεται προσεκτικά.

5. Φόρτωση των δειγμάτων στις οπές φόρτωσης, αφού αυτά έχουν υποστεί κατάλληλη προετοιμασία. Κάθε δείγμα έχει όγκο 15 μL και η προετοιμασία του πραγματοποιείται με προσθήκη 7 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και στη συνέχεια ακολουθεί βρασμός για 5-7 λεπτά. [Στάδιο Γ]

Εκτός από τα δείγματα, στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου γίνεται φόρτωση 5 – 7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Prestained Protein Ladder - Mid-range molecular weight (10-175 kDa), Abcam PLC, Ηνωμένο Βασίλειο) το οποίο χρησιμοποιείται ως οδηγός για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της προς διερεύνηση πρωτεΐνης.

6. Ηλεκτροφόρηση του δείγματος με τροφοδοσία σταθερού ρεύματος 35 mA/πήκτωμα για περίπου 1 ώρα. Επιλέγεται το ρεύμα να είναι σταθερό και όχι εναλλασσόμενο καθώς απαιτείται σταθερή πολικότητα στα άκρα του πηκτώματος με βάση τις αρχές λειτουργίας της ηλεκτροφόρησης. [Στάδιο Δ]
7. Χρωματισμός και αποχρωματισμός του πηκτώματος για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. [Στάδιο Ε]



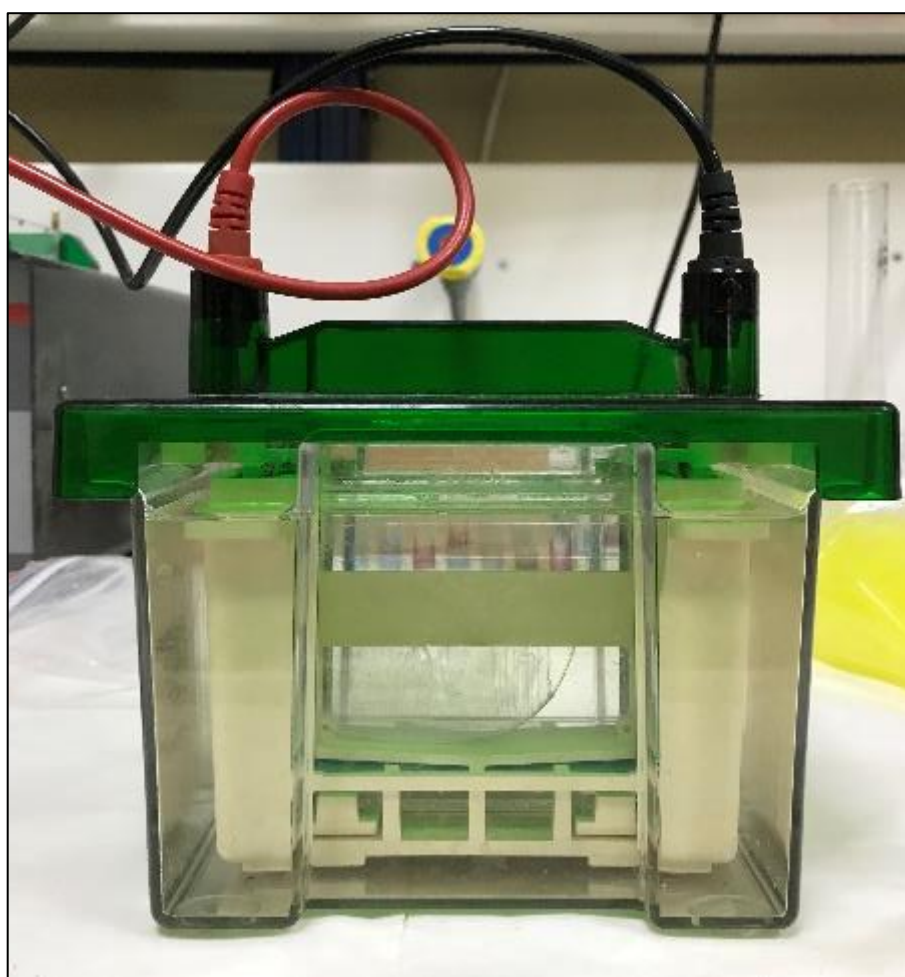
Εικόνα 3.21 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE

Πίνακας 3.6. Σύσταση πηκτωμάτων Επιστοιβαξης και Διαχωρισμού για την χρήση τους σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Πήκτωμα Επιστοιβαξης 4% (Stacking Gel)		Πήκτωμα Διαχωρισμού 10% (Resolving Gel)	
Υπερκάθαρο Νερό	3.0 mL	Υπερκάθαρο Νερό	4.6 mL
0.25 M Tris/SDS 0.2% (pH 6.8)	3.75 mL	0.25 M Tris/SDS 0.2% (pH 8.8)	9.4 mL
40% bis-acrylamide (30:1)	0.75 mL	40% bis-acrylamide (30:1)	4.7 mL
TEMED	20 μL	TEMED	30 μL
10% APS	60 μL	10% APS	90 μL

Πίνακας 3.7. Σύσταση Ρυθμιστικών Διαλυμάτων Φόρτωσης και Ηλεκτροφόρησης για την χρήση τους σε ηλεκτροφόρηση SDS -PAGE

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης (Sample Loading Buffer)		Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Gel Running Buffer)	
0.25 M Tris Base pH 6.8	3.55 mL (0.75 M)	Tris-base	3.03 g/L (0.25 M)
Glycerol 50% (v/v)	1.8 mL	Glycine	14.4 g/L
SDS	0.71 g (0.2% w/v)	SDS	1 g/L (0.2% w/v)
β – mercaptoethanol	1.8 mL	pH	8.3
Bromophenol blue 0.1% (w/v)	2.85 mL		



Εικόνα 3.22. Η διάταξη ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE την στιγμή που τίθεται σε λειτουργία. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται με παροχή ρεύματος σταθερής τάσης από δυο καλώδια. Στο κέντρο της διάταξης, διακρίνεται το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στο άνω μέρος του διακρίνονται με κόκκινο και μπλέ χρώμα οι οπές φόρτωσης των δειγμάτων. Το χρώμα οφείλεται στα επιμέρους δείγματα τα οποία έχουν τοποθετηθεί. Το ρευστό που υπάρχει σε όλο τον υπόλοιπο όγκο της διάταξης είναι το Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Από αυτό το χρονικό σημείο και μετά, ξεκινάει η μετακίνηση των δειγμάτων προς τα κάτω και ο διαχωρισμός τους σε ζώνες.

3.7.1.3 Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η χρώση των πρωτεϊνών με σκοπό την εμφάνιση όλων των σχηματισμένων ζωνών για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τις περιεχόμενες πρωτεΐνες του μίγματος και τα μοριακά τους βάρη. Η χρώση πραγματοποιείται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία εμφανίζει ως χαμηλότερο όριο ανίχνευσης τα 8 ng πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και κατά κύριο λόγο σε κατάλοιπα Αργινίνης (Arg) με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος. Όπως έχει προαναφερθεί, ένα από τα χαρακτηριστικά του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου είναι η χαμηλή συγγένεια με διαλύματα χρωστικών που χρησιμοποιούνται για την χρώση πρωτεϊνών, έτσι αυτές δεν θα κατακρατηθούν στο πήκτωμα, αλλά μόνο στα πρωτεϊνικά μόρια που περιέχονται σε αυτό.

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε στο πήκτωμα αποτελείται από δυο βήματα:

1. Χρωματισμός: Το πήκτωμα αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκε προσεκτικά σε διάλυμα χρώσης (Staining Solution) Coomassie Brilliant Blue G-250 και αφέθηκε εκεί για 20 λεπτά.
2. Αποχρωματισμός: Στη συνέχεια, εμβάπτιστηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) μέχρι οι ζώνες των πρωτεϊνών να καταστούν ευδιάκριτες. Ενδέχεται, να απαιτείται ανανέωση του διαλύματος αποχρωματισμού.

Καθ'όλη τη διάρκεια χρωματισμού – αποχρωματισμού το πήκτωμα ανακινείται σε ειδική συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία) και μένει μακριά από το φως.

Πίνακας 3.8. Σύσταση Διαλυμάτων Χρώσης και Αποχρωματισμού για την εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων

Διάλυμα Χρώσης (Staining Solution)		Διάλυμα Αποχρωματισμού (Destaining Solution)	
Υπερκάθαρο Νερό	500 mL	Υπερκάθαρο Νερό	700 mL
Methanol	400 mL	Methanol	200 mL
Acetic Acid	100 mL	Acetic Acid	100 mL
Coomassie G-250	0.4 % w/v		

3.7.2 Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης IEF-PAGE

Η ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric Focusing-IEF) αποτελεί μια τεχνική ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Όπως έχει προαναφερθεί, το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης είναι το pH στο οποίο το μόριο είναι ουδέτερα φορτισμένο, δηλαδή έχει μηδενικό συνολικό φορτίο. Η μέθοδος λαμβάνει χώρα σε οριζόντιο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE). Η αρχή της μεθόδου IEF-PAGE βασίζεται στην εξάρτηση του φορτίου μιας πρωτεΐνης από το pH στο οποίο βρίσκεται. Σε pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού της σημείου, η πρωτεΐνη πρόκειται να έχει συνολικά θετική φόρτιση, ενώ σε pH μεγαλύτερο του ισοηλεκτρικού της σημείου αρνητική φόρτιση, με το ύψος του φορτίου να είναι ανάλογο της διαφοράς μεταξύ των δυο. Το πήκτωμα της μεθόδου IEF-PAGE, διέπεται κατά μήκος από μια γραμμικά μεταβαλλόμενη βαθμίδωση του pH με χρήση αμφολυτών. Με αυτό τον τρόπο, όταν ένα πρωτεϊνικό μόριο βρεθεί στο πήκτωμα παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, αυτό πρόκειται να κινηθεί προς κατεύθυνση ανάλογη του φορτίου του, δηλαδή προς τον πόλο αντίθετου φορτίου. Η φόρτωση του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται στο μέσο του πηκτώματος δηλαδή στο σημείο που ισοδυναμεί με pH = 7. Κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται προς τη θέση στην οποία το pH ισούται με το ισοηλεκτρικό τους σημείο με αποτέλεσμα εκεί να ακινητοποιηθούν. Αυτό συμβαίνει καθώς σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη έχει ουδέτερη φόρτιση και πλέον δεν ασκείται πάνω της καμία δύναμη από το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Έτσι, σχηματίζονται πρωτεϊνικές ζώνες στο σημείο που διαθέτει pH ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο των μορίων που περιέχουν. Η ανίχνευση της τιμής του pH κατά μήκος του πηκτώματος πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρηση πρότυπου δείγματος μορίων γνωστών ισοηλεκτρικών σημείων παράλληλα με την ηλεκτροφόρηση του δείγματος που αναλύεται. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου αλλά και ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των μορίων ενός πρωτεϊνικού δείγματος.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία για την εφαρμογή της μεθόδου IEF-PAGE έγινε χρήση της συσκευής PhastSystem της εταιρείας Pharmacia (Σουηδία) με προπαρασκευασμένες πηκτές πολυακρυλαμιδίου που περιείχαν αμφολύτες οι οποίες κάλυπταν περιοχή pH από 3.0 έως 9.0. Η εστίαση των αμφολυτών και η μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ως πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστών ισοηλεκτρικών χρησιμοποιήθηκε το Broad pI Kit της ίδιας εταιρείας με εύρος pH 3.5-9.3. Τέλος, όπως και στη μέθοδο SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος για την ανίχνευση των σχηματισμένων πρωτεϊνικών ζωνών με διαλύματα που αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3.9 Σύσταση Διαλυμάτων Χρώσης και Αποχρωματισμού για την εμφάνιση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα των ηλεκτροφορήσεων

Διάλυμα Χρώσης (Staining Solution)		Διάλυμα Αποχρωματισμού (Destaining Solution)	
Υπερκάθαρο Νερό	600 mL	Υπερκάθαρο Νερό	600 mL
Methanol	300 mL	Methanol	300 mL
Acetic Acid	100 mL	Acetic Acid	100 mL
CuSO ₄	0.1 % w/v		
Phast Gel Blue R	0.02 % w/v		

3.7.3 Ανίχνευση ενζυμικής δράσης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών

Με σκοπό την ανίχνευση των υποστρωμάτων στα οποία η μελετούμενη AA9 LPMO εμφανίζει ενεργότητα αλλά και την επιβεβαίωση της προβλεπόμενης βιοπληροφορικά C1-οξειδωτικής της δράσης, μέσα από την ανάλυση των οξειδωμένων προϊόντων τους, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε δέκα υποστρώματα πολυσακχαριτών. Από αυτούς τους πολυσακχαρίτες οι πέντε έχουν ως δομική μονάδα την γλυκόζη και είναι οι ακόλουθοι: Κυτταρίνη διογκωμένη σε φωσφορικό οξύ PASC (Phosphoric Acid Swollen Cellulose), Άμυλο (Starch), Καρβοξυ-μεθυλοκυτταρίνη CMC (Carboxymethyl Cellulose), β-Γλυκάνη (β-Glucan), ενώ δοκιμή πραγματοποιήθηκε και στη Χιτίνη (Chitin) η δομική μονάδα της οποίας διαφέρει μόνο κατά εναν υποκαταστάτη από την γλυκόζη. Οι υπόλοιποι πέντε πολυσακχαρίτες ανήκουν στην κατηγορία των ημικυτταρινών, είναι διακλαδωμένα πολυμερή, διαθέτουν ως δομικές μονάδες πληθώρα C5 και C6 μονοσακχαριτών και είναι οι ακόλουθοι: Γλυκομαννάνη (Glucomannan), Γαλακτομαννάνη (Galactomannan), Ξυλογλυκάνη (Xyloglucan), Αραβινοξυλάνη Σίτου (Wheat Arabinoxylan) και Ξυλάνη Οξιιάς (Beechwood Xylan).

Οι δοκιμές ανίχνευσης ενεργότητας της LPMO στα υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία των πολυσακχαριτών με την δημιουργία διαλυμάτων ενζυμικών αντιδράσεων οι οποίες περιείχαν το ένζυμο AA9, το πολυσακχαρικό υποστρώμα, ασκορβικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων απαραίτητων για την δράση του ενζύμου και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Reaction Buffer). Συμπληρωματικά δημιουργήθηκαν τυφλά δείγματα αντιδράσεων (blank), με ίδιες ποσότητες όπως στις ενζυμικές αντιδράσεις, με την διαφορά ότι αυτές περιείχαν υπερκάθαρο νερό αντί του ενζυμικού διαλύματος. Τα διαλύματα των ενζυμικών αντιδράσεων επώαστηκαν σε κατάλληλες συνθήκες και χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν ποιοτικά με την χρωματογραφική μέθοδο ΗΡΑΕ- PAD για την ανάλυση και την ανίχνευση C1- και C4- οξειδωμένων προϊόντων ολιγοσακχαριτών από την ενζυμική δράση των LPMOs. Ιδιαίτερα για την ανάλυση C1- οξειδωμένων προϊόντων, η μέθοδος κρίνεται ιδανική, καθώς σε αλκαλικό pH η ισορροπία μεταξύ της λακτόνης και του αλδονικού οξέος μετατοπίζεται έντονα προς το οξύ, τα μόρια του οποίου είναι σταθερά,

αρνητικά φορτισμένα ($pK_a \approx 3.5$) και διαχωρίζονται εύκολα από τα εγγενή προϊόντα (Westereng et al., 2016).

3.7.3.1 Αρχή της χρωματογραφικής μεθόδου ΗΡΑΕ-PAD

Οι υδατάνθρακες είναι ενώσεις που η ανάλυση τους εμφανίζει δυσκολίες σε κοινές χρωματογραφικές μεθόδους καθώς είναι πολύ πολικές, έχουν όμοια δομικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, ενώ δεν έχουν κατάλληλες χρωμοφόρες πλευρικές ομάδες. Έτσι, ο αποτελεσματικός διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται με χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων (High-Performance Anion-Exchange chromatography-HPAE) συζευγμένη με αμπερομετρικό ανιχνευτή παλμού (Pulse Electrochemical Detector-PAD) με ηλεκτρόδιο χρυσού. Η χρωματογραφία ΗΡΑΕ-PAD είναι αποδεδειγμένα αποτελεσματική για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση μεγάλου εύρους υδατανθράκων που περιέχει μικρούς μονοσακχαρίτες μέχρι διακλαδωμένους ολιγοσακχαρίτες και μεγάλους γραμμικούς πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένων ισομερών και ομοπολυμερών αυτών οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς το μήκος. Η χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού εναλλαγής ανιόντων (HPAE) αξιοποιεί την ελαφρώς όξινη φύση των υδατανθράκων, οι ομάδες υδροξυλίων των οποίων, ιονίζονται μερικώς σε αλκαλικούς διαλύτες έκλουσης με υψηλό pH (>12) μεγαλύτερο της σταθεράς διάστασής τους pK_a και έτσι τα σάκχαρα μπορούν να διαχωριστούν ως ανιόντα. Αυτό πραγματοποιείται με χρήση κατάλληλης σταθερής φάσης στη χρωματογραφική στήλη. Η σταθερή φάση αποτελείται από ένα πολυμερικό, μικροπορώδες (10 μm) υλικό ρητίνης με ικανότητα ανιοντοεναλλαγής, καθώς στην επιφάνεια του είναι συνδεδεμένα κατιοντικά μόρια. Λόγω των ιδιαίτερων συνθηκών της μεθόδου, το υλικό της στήλης πρέπει να διέπεται από υψηλή αντοχή σε ακραίες τιμές pH και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες σε συνθήκες πίεσης άνω του 4000 psi (28 MPa). Όσον αφορά την κινητή φάση, αυτή αποτελείται από διαλύτη έκλουσης που διατηρεί σταθερά υψηλό pH, ενώ βαθμιδωτά μεταβάλλει την συγκέντρωση κάποιου συστατικού του αυξάνοντας την ιοντική ισχύ της κινητής φάσης. Έτσι, ο διαχωρισμός των μορίων βασίζεται στο φορτίο του σχηματισμένου ανιοντικού σακχάρου, το οποίο καθορίζεται έμμεσα από χαρακτηριστικά της δομής τους όπως ο βαθμός πολυμερισμού, οι ομάδες υδροξυλίων, ανωμερικοί άνθρακες κ.α. Κατά την φόρτωση του δείγματος τα ανιόντα απορροφούνται στην στατική φάση σχηματίζοντας δεσμούς κατά μήκος της στήλης σε θέσεις ανάλογες του φορτίου τους. Όσο πιο μεγάλο το φορτίο τόσο πιο ισχυρός ο σχηματιζόμενος δεσμός ανιόντος - στατικής φάσης και τόσο πιο σύντομη η διαδρομή των μορίων εντός της στήλης μέχρι τον σχηματισμό του δεσμού. Στη συνέχεια, με την βαθμιδωτή αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύτη έκλουσης, η ισχύς των σχηματισμένων δεσμών υπερνικάται, μόρια του διαλύτη καταλαμβάνουν τις θέσεις αυτές και έτσι τα υδατανθρακικά μόρια απελευθερώνονται και εκλούνται σταδιακά προς τον συζευγμένο αμπερομετρικό ανιχνευτή παλμού (PAD). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο χρυσού το οποίο αλληλεπιδρά ηλεκτροχημικά με τα σάκχαρα του αναλύτη παρουσία διαλύτη υψηλής αλκαλικότητας. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή, οι υδατάνθρακες προσροφούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρυσού και οξειδώνονται κάτι που οδηγεί σε ανίχνευσή τους λόγω του

δυναμικού που αναπτύσσεται. Από την δράση αυτή λαμβάνεται μια παλμική κυματομορφή τριών βημάτων με βάση την οποία ταυτοποιείται ποιοτικά αλλά και μετράται ποσοτικά το κάθε οξειδωμένο σάκχαρο. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής είναι κατάλληλος για την μέθοδο ΗΡΑΕ καθώς εμφανίζει χαμηλά όρια ανίχνευσης (μέχρι επίπεδα συγκέντρωσης μM) και υψηλή εκλεκτικότητα σε τιμές υψηλού pH κατά τις οποίες πραγματοποιείται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Αλληλεπιδρά μόνο με ηλεκτρονεργά είδη και δεν επηρεάζεται από άλλα είδη μορίων του αναλύτη που παρεμβάλλονται και δεν μπορούν να οξειδωθούν ή αναχθούν. Στο τέλος της χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνεται ένα διάγραμμα κορυφών που προκύπτουν από το δυναμικό ανίχνευσης (nC) συναρτήσει του χρόνου έκλουσης (elution time-minutes) με τις κορυφές αυτές να αντιστοιχούν στους επιμέρους υδατάνθρακες του διαλύματος.

3.7.3.2 Η πειραματική διάταξη της χρωματογραφίας ΗΡΑΕ-PAD

Τα υδατανθρακικά προϊόντα της ενζυμικής δράσης αναλύθηκαν ποιοτικά σε σύστημα χρωματογραφίας το οποίο αποτελείται από το σύστημα αντλίας-μικροεπεξεργαστή GS50 Gradient Pump για τη μεταφορά του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση) συνδεδεμένο με μια αναλυτικής στήλης Dionex CarboPac PA1 (250 mm x 4 mm) εφοδιασμένης με προστήλη, ενώ τέλος η στήλη είναι συζευγμένη με αμπερομετρικό ανιχνευτή παλμού (PAD) με ηλεκτρόδιο χρυσού. Όλες οι επιμέρους μονάδες του συστήματος χρωματογραφίας είναι της εταιρείας Thermoscientific (Η.Π.Α.), ενώ χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chromeleon 7.0 για τον έλεγχο και την ρύθμιση των μεταβλητών λειτουργίας του συστήματος αλλά και την λήψη των διαγραμμάτων της ανάλυσης. Η στήλη Dionex CarboPac PA1 μπορεί να διαχωρίσει αποτελεσματικά μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και ορισμένους πολυσακχαρίτες με χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων υψηλού pH (High-pH Anion-Exchange chromatography-HRAE).

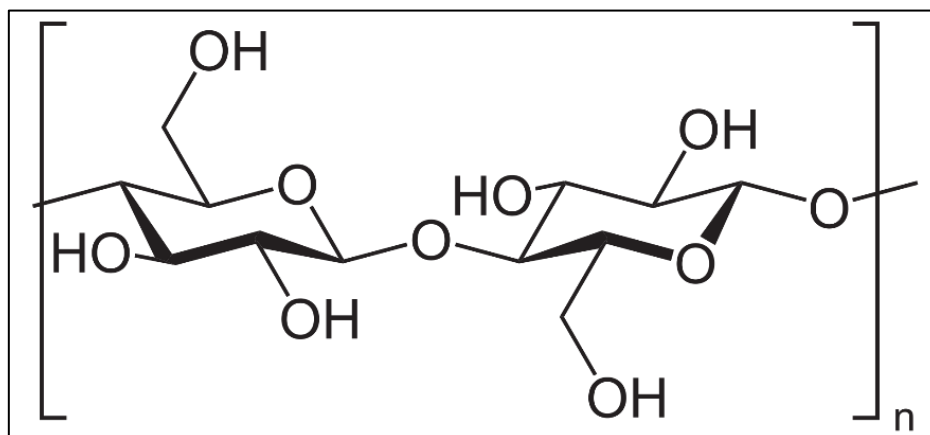
3.7.3.3 Χαρακτηριστικά υποστρωμάτων και η προετοιμασία τους πριν την δημιουργία διαλυμάτων ενζυμικών αντιδράσεων

PASC – Διογκωμένη σε φωσφορικό οξύ κυτταρίνη (Phosphoric Acid Swollen Cellulose)

Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές μόριο το οποίο αποτελείται από χιλιάδες β-ανωμερή D-γλυκόζης, ενωμένα μεταξύ τους με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Για τον σχηματισμό του δεσμού το δεύτερο μόριο γλυκόζης αντιστρέφεται κατά μήκος του οριζόντιου άξονα ώστε οι ομάδες υδροξυλίων των ανθράκων που σχηματίζουν δεσμό να έρθουν στην ίδια διεύθυνση. Ο β-1,4' γλυκοζιτικός δεσμός αναπτύσσεται μεταξύ του ανωμερικού άνθρακα (C1) του ενός μορίου γλυκόζης και του υδροξυλίου (-OH) του C4 άνθρακα του άλλου μορίου γλυκόζης με αποβολή ενός μορίου νερού. Με βάση τα παραπάνω, δομική μονάδα της κυτταρίνης αποτελεί το διμερές κελλοβιόζη. Μεταξύ των

γραμμικών πολυμερικών αλυσίδων κυτταρίνης αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου με αποτέλεσμα την συνένωση πολλών αλυσίδων προς σχηματισμό μικροϊνιδίων κυτταρίνης.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος Avicel PH-101, Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Το διάλυμα PASC 5% w/v παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας ως βάση το Avicel®, με βάση το πρωτόκολλο (Wood et al., 1988). Το Avicel® αποτελεί μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC) σε μορφή σκόνης, δηλαδή κυτταρίνης μερικώς αποπολυμερισμένης έπειτα από επεξεργασία με όξινη υδρόλυση. Αρχικά 4 g μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης διαλύονται προσθήκη 100 mL φωσφορικού οξέως σε στάδια και την διάσπαση με μηχανικά μέσα των στερεών κρυστάλλων για την αποτελεσματική διάλυση. Στη συνέχεια το διάλυμα Avicel-φωσφορικού οξέως αναδεύεται στους 4 °C για 1 ώρα, μετά προστίθενται 1900 mL κρύου (~4°C) υπερκάθαρου νερού και η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμα 1 ώρα. Το τελικό διάλυμα όγκου 2 L διηθείται για την εξαγωγή του PASC, το οποίο στην συνέχεια εκπλένεται κατά σειρά με τέσσερις όγκους υπερκάθαρου νερού, δυο όγκους διαλύματος 1% NaHCO₃ (παρασκευασμένο εξίσου με υπερκάθαρο νερό) και τρεις όγκους υπερκάθαρου νερού. Τέλος, το PASC συλλέγεται και αναμειγνύεται με 300 mL υπερκάθαρου νερού.



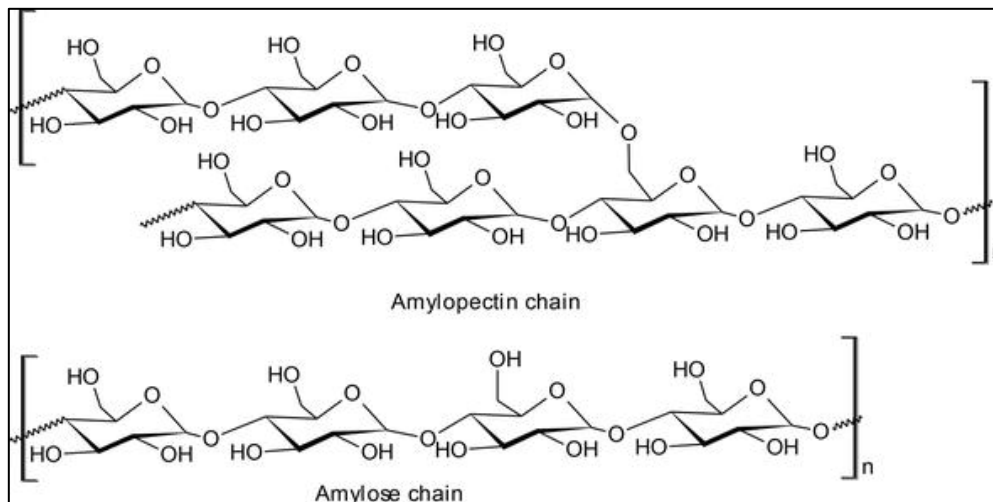
Εικόνα 3.23 Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της κυτταρίνης, η οποία αποτελείται από μόρια D-γλυκόζης ενωμένα με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Άμυλο (Starch)

Το άμυλο είναι ένας ομοπολυμερής πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης. Εντοπίζεται στη φύση σε σφαιρική μορφή η οποία αποτελείται από δυο είδη πολυμερικών μορίων, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Το περίβλημα της σφαίρας αποτελείται από αμυλοπηκτίνη ενώ στο εσωτερικό της περιέχονται τα μόρια αμυλόζης. Η αμυλόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές το οποίο αποτελείται από α-ανωμερή D-γλυκόζης ενωμένα με α-1,4' γλυκοζιτικό δεσμό. Έτσι, η ειδοποιός διαφορά με το πολυμερές γραμμικό μόριο της κυτταρίνης είναι ότι ο δεσμός σχηματίζεται μεταξύ α-ανωμερών D-γλυκόζης, ενώ στην κυτταρίνη μεταξύ β-ανωμερών D-γλυκόζης. Η αμυλοπηκτίνη είναι ένα διακλαδωμένο πολυμερές με την κύρια αλυσίδα της να έχει την δομή της Αμυλόζης, ενώ κάθε περίπου 25

μονομερή Γλυκόζης περιέχει διακλαδώσεις όμοιων γραμμικών αλυσίδων οι οποίες συνδέονται με α -1,6' γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Για την παρασκευή διαλύματος αμύλου συγκέντρωσης 1% w/v πραγματοποιείται διάλυση 1 g αμύλου σε 10 mL υπερκάθαρου νερού θερμοκρασίας δωματίου (~25 °C) το οποίο προστίθεται σε 70 mL υπερκάθαρου νερού θερμοκρασίας 70 °C υπό ταυτόχρονη ανάδευση. Το διάλυμα αναδεύεται για 5 λεπτά στους 70 °C, ενώ περιέχεται σε μπουκάλι καλυμμένο εξωτερικά προς αποφυγή της έκθεσης του διαλύματος στο φως. Μετά το τέλος της ανάδευσης συμπληρώνεται υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

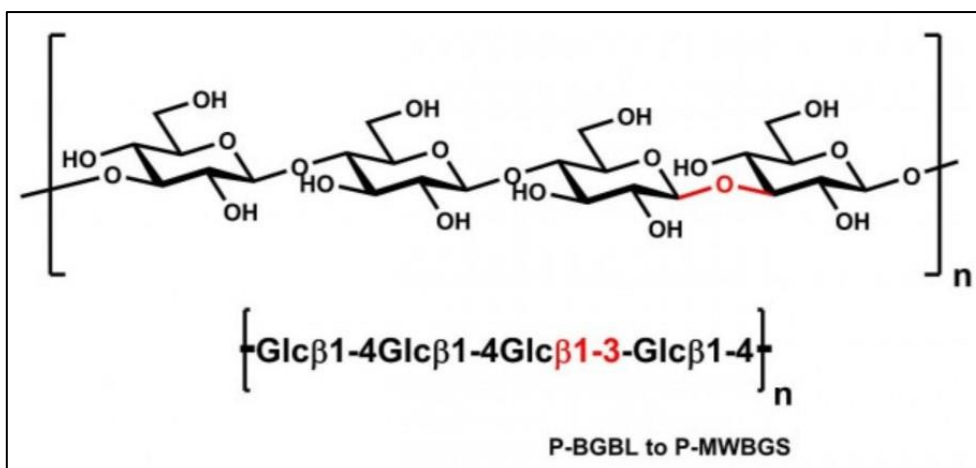


Εικόνα 3.24 Η δομή των μορίων αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης που σχηματίζουν το άμυλο. Η κύρια αλυσίδα των πολυμερών αποτελείται από μονομερή D-γλυκόζης συνδεδεμένα με α -1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ οι διακλαδώσεις στο μόριο της αμυλοπηκτίνης σχηματίζουν α -1,6' γλυκοζιτικούς δεσμούς.

β -Γλυκάνη (β -Glucan)

Η β -γλυκάνη, που χρησιμοποιήθηκε για την δοκιμή υποστρωμάτων, είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονομερή β -D-γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους κατά κύριο λόγο με β -1,4' αλλά και σε χαμηλότερη συχνότητα β -1,3' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-BGBM.

Για την παρασκευή διαλύματος β -γλυκάνης 1% w/v έγινε προσθήκη 1 g στερεού υποστρώματος σε ποτήρι ζέσεως όγκου 120 mL και ενυδατώνεται με 5 mL διαλύματος 95% αιθανόλη. Σε αυτό προστίθενται 90 mL υπερκάθαρου νερού και στη συνέχεια αφού καλυφθεί η επιφάνεια του ποτηριού ζέσεως, το έντονα ιξώδες ρευστό που έχει δημιουργηθεί αναδεύεται ισχυρά μέχρι να επέλθει βρασμός (~120 °C). Σε αυτό το σημείο η θέρμανση διακόπτεται και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι την πλήρη διάλυση της β -Γλυκάνης (~10 λεπτά). Τέλος, προστίθεται υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

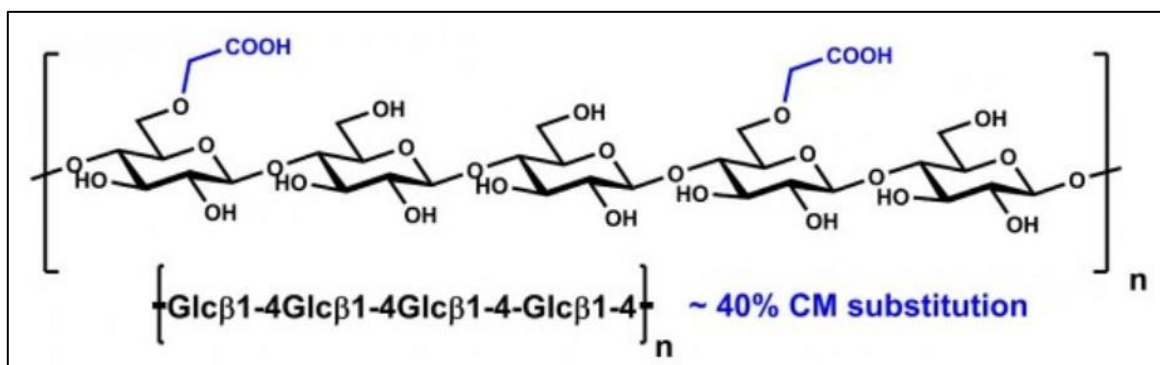


Εικόνα 3.25 Η επαναλαμβανόμενη δομή του γραμμικού πολυμερούς μορίου της β-γλυκάνης. Σε αυτό διακρίνονται οι β-1,4' και β-1,3' γλυκοζιτικοί δεσμοί που ενώνουν μονομερή D-γλυκόζης

CMC – Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (Carboxymethyl Cellulose)

Το υπόστρωμα CMC είναι ένα παράγωγο κυτταρίνης που προκύπτει με προσθήκη καρβοξυμεθυλομάδων (-CH₂-COOH) για τον σχηματισμό δεσμών με ομάδες υδροξυλίων με περίπου το 40% των μονομερών γλυκόζης. Όπως και στο πολυμερές της κυτταρίνης, τα μονομερή του CMC συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το CMC αποτελεί ένα συνθετικό υπόστρωμα, το οποίο λόγω των προστιθέμενων πολικών ομάδων υποκαταστατών μετατρέπει την κυτταρίνη σε διαλύτη στο νερό και χημικά ενεργή προσδίδοντας του ανιοντικό χαρακτήρα.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Merck (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία Carboxymethylcellulose, Sodium Salt, Low Viscosity. Για την δημιουργία διαλύματος 1% w/v πραγματοποιείται προσθήκη 1 g CMC με αργό ρυθμό σε 100 mL υπερκάθαρου νερού και αναδεύεται για 30 λεπτά. Εν συνεχεία τοποθετείται σε υψηλή θερμοκρασία (120 °C) για 20 λεπτά με σκοπό την πλήρη διάλυση του πολυσακχαρίτη. Πραγματοποιείται έλεγχος για πιθανή μεταβολή του όγκου του διαλύματος και εάν απαιτείται ογκομετρείται μέχρι τα 100 mL.

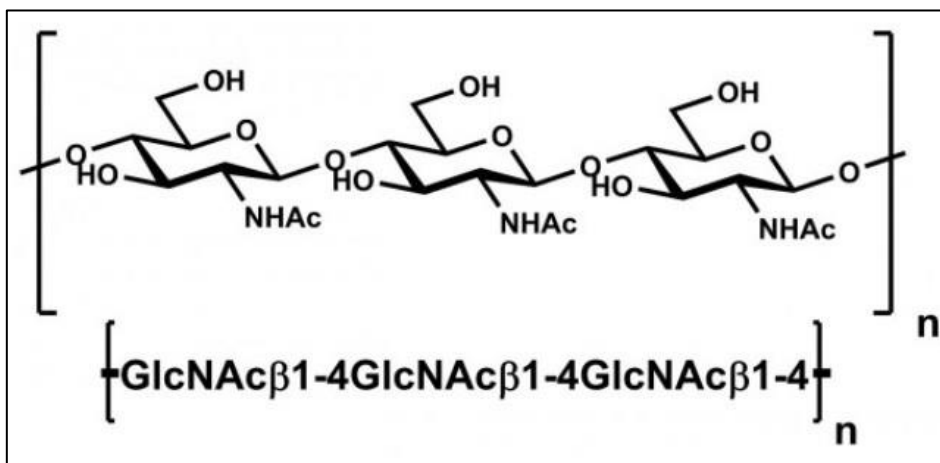


Εικόνα 3.26 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς CMC. Σε αυτό διακρίνονται οι β-1,4' γλυκοζιτικοί δεσμοί που ενώνουν μονομερή D-γλυκόζης καθώς και οι υποκαταστάτες καρβοξυ-μεθυλομάδων στις διακλαδώσεις του πολυμερούς.

Χιτίνη (Chitin)

Η χιτίνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονομερή ακετυλογλυκοζαμίνης τα οποία είναι συνδεδεμένα με σχηματισμό β-1,4' γλυκοζιτικών δεσμών. Η δομή της εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με αυτή της κυτταρίνης καθώς τα μόρια ακετυλογλυκοζαμίνης είναι παράγωγα της γλυκόζης. Η δομή του μονομερούς διαφέρει με αυτή της γλυκόζης μόνο ως προς το είδος του υποκαταστάτη του C2 άνθρακα. Ο C2 άνθρακας στο μόριο της γλυκόζης έχει ως πλευρική ομάδα μια ομάδα υδροξυλίου (-OH), ενώ στο μόριο της ακετυλογλυκοζαμίνης έχει υποκατασταθεί με μια ομάδα ακετυλαμίνης (-NHCOCH₃ ή -NHAc). Η ύπαρξη αυτής της πλευρικής ομάδας στα μονομερή της χιτίνης αυξάνει την ισχύ των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ευθύγραμμων πολυμερικών μορίων με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μηχανικής αντοχής της πολυμερικής μήτρας της χιτίνης.

Για την προετοιμασία διαλύματος 1% w/v διαλύεται 1 g χιτίνης σε 80 mL υπερκάρου νερού και θερμαίνονται μέχρι το σημείο ζέσεως. Στη συνέχεια, η θέρμανση διακόπτεται και το διάλυμα αναδεύεται για 1 ώρα. Μετά την ανάδευση συμπληρώνεται υπερκάρου νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL.



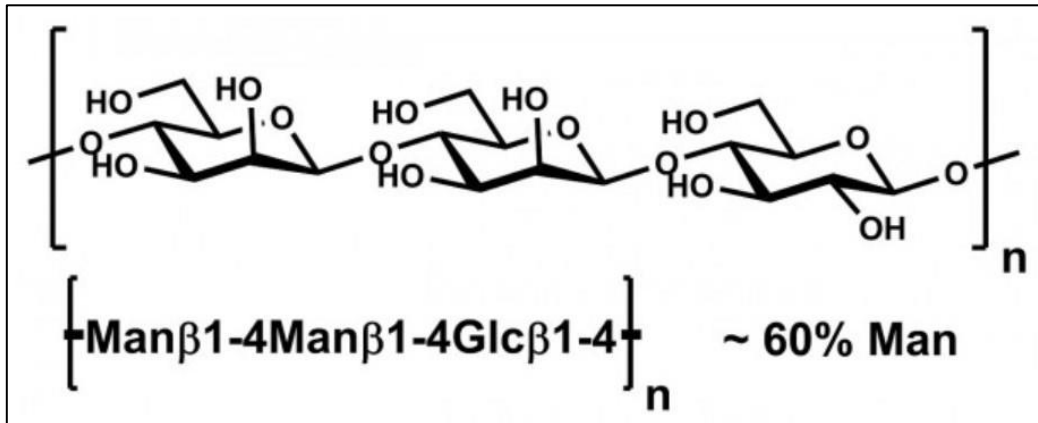
Εικόνα 3.27 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της χιτίνης. Σε αυτό διακρίνονται οι β-1,4' γλυκοζιτικοί δεσμοί που ενώνουν μονομερή ακετυλογλυκοζαμίνης.

Γλυκομαννάνη (Glucomannan)

Η γλυκομαννάνη αποτελεί ένα γραμμικό ετεροπολυμερές ημικυτταρίνης. Αποτελείται από γραμμικά συνδεδεμένα μόρια μονοσακχαριτών D-μαννόζης και D-γλυκόζης ενωμένα με β-1,4' γλυκοζιτικό δεσμό σε αναλογία 60% μαννόζη / 40% γλυκόζη. Σε πολύ μικρό ποσοστό και ανάλογα την προέλευση, το πολυμερές ενδέχεται να εμφανίζει διακλαδώσεις κατά τις οποίες ομάδες ακετυλίου συνδέονται με μονομερή της κύρια αλυσίδας σχηματίζοντας β-1,6' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η παρουσία αυτών των υποκαταστατών αυξάνει την διαλυτότητα του στο νερό.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-GLCML. Το διάλυμα γλυκομαννάνης 1% w/v παρασκευάζεται με διάλυση 1 g υποστρώματος σε 6 mL 95

% καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια προστίθενται 90 mL υπερκάθαρου νερού και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι το σημείο ζέσεως. Στο σημείο αυτό η θέρμανση διακόπτεται και το διάλυμα αναδεύεται για 20 λεπτά, μέχρι να ογκομετρηθεί με υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL

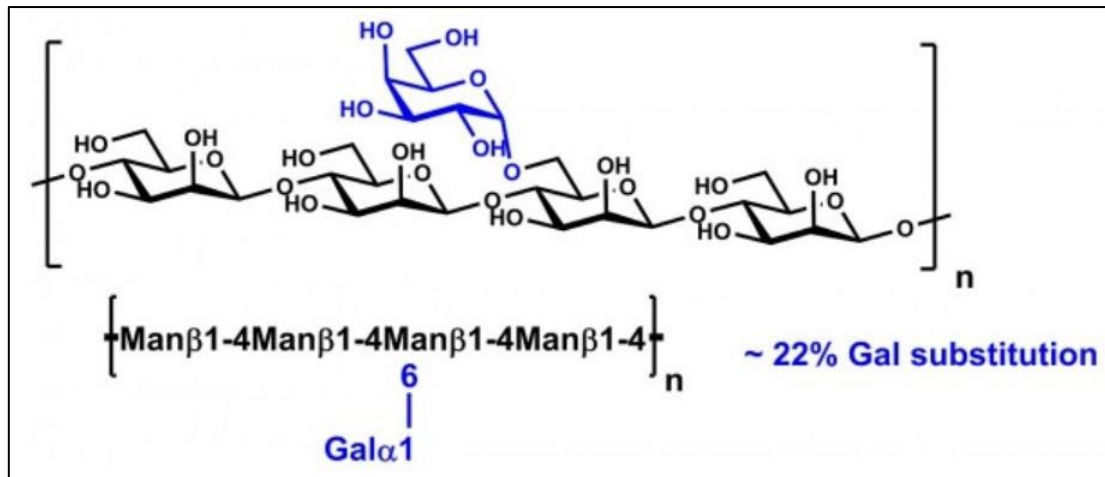


Εικόνα 3.28 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της γλυκομαννάνης. Σε αυτό διακρίνονται οι β-1,4' γλυκοζιτικοί δεσμοί που ενώνουν μονομερή μαννόζης και γλυκόζης.

Γαλακτομαννάνη (Galactomannan)

Η γαλακτομαννάνη είναι ένα ετεροπολυμερές που ανήκει στην κατηγορία των ημικυτταρινών. Η κύρια αλυσίδα του πολυμερούς αποτελείται από μονοσακχαρίτες μαννόζης ενωμένους με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ ένα μέρος αυτών έχει ως υποκαταστάτες μόρια γαλακτόζης με σχηματισμό α-1,6' γλυκοζιτικών δεσμών. Η αναλογία των μονοσακχαριτών στο μόριο υπολογίζεται περίπου σε 21% γαλακτόζη / 79% μαννόζη.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-GALMH. Για την παρασκευή διαλύματος γαλακτομαννάνης 0.5 % w/v έγινε προσθήκη 0.5 g στερεού υποστρώματος σε ποτήρι ζέσεως όγκου 120 mL και ενυδατώνεται με 2 mL διαλύματος 95% αιθανόλη. Σε αυτό προστίθενται 90 mL υπερκάθαρου νερού. Για την πλήρη ενυδάτωση του στερεού ακολουθεί ήπια ανάδευση 10 λεπτών και αποθήκευση του για περίπου 12 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια αφού καλυφθεί με η επιφάνεια του ποτηριού ζέσεως, το έντονα ιξώδες ρευστό που έχει δημιουργηθεί αναδεύεται ισχυρά μέχρι να επέλθει βρασμός (~120 °C). Σε αυτό το σημείο η θέρμανση διακόπτεται και η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι την πλήρη διάλυση της γαλακτομαννάνης (~20 λεπτά). Τέλος, προστίθεται υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

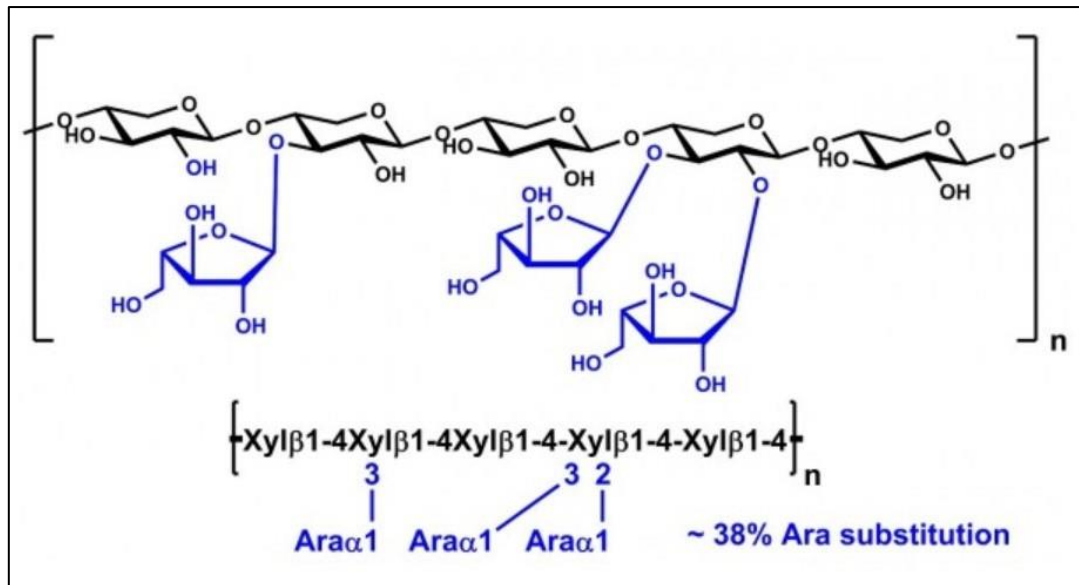


Εικόνα 3.29 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της γαλακτομαννάνης. Η γραμμική αλυσίδα του μορίου αποτελείται από μονοσακχαρίτες μαννόζης ενωμένους μεταξύ τους με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ διακλαδώσεις υποκαταστατών γαλακτόζης συνδέονται στη γραμμική αλυσίδα με α-1,6' γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Αραβινοξυλάνη Σίτου (Wheat Arabinoxylan)

Η αραβινοξυλάνη σίτου είναι ένα διακλαδωμένο ετεροπολυμερές μόριο το οποίο αποτελείται από τις πεντόζες ξυλόζη και αραβινόζη, ενώ ανήκει στην κατηγορία των ημικυτταρινών. Σχηματίζεται από μια γραμμική πολυμερική αλυσίδα μονοσακχαριτών ξυλόζης ενωμένων με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς και περιέχει διακλαδώσεις αφού πολλές μονάδες του πολυμερούς είναι συνδεδεμένα με μόρια αραβινόζης σχηματίζοντας 1-3' και 1-2' γλυκοζιτικούς δεσμούς ως μοναδικοί υποκαταστάτες. Η αναλογία μονοσακχαριτών στο μόριο της είναι 38 % αραβινόζη / 62 % ξυλόζη.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-WAXYM. Για την παρασκευή διαλύματος αραβινοξυλάνης σίτου 1% w/v, διαλύεται 1 g υποστρώματος σε 80 mL υπερέκαθαρο νερό θερμοκρασίας 80 °C και αναδέυεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι το σημείο ζέσεως και το διάλυμα διατηρείται εκεί για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια η θέρμανση σταματάει και το διάλυμα αφήνεται για περίπου 12 ώρες υπό ανάδευση σε μπουκάλι καλυμμένο εξωτερικά για αποφυγή έκθεσης στο φως. Τέλος, το διάλυμα ογκομετρείται με υπερέκαθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

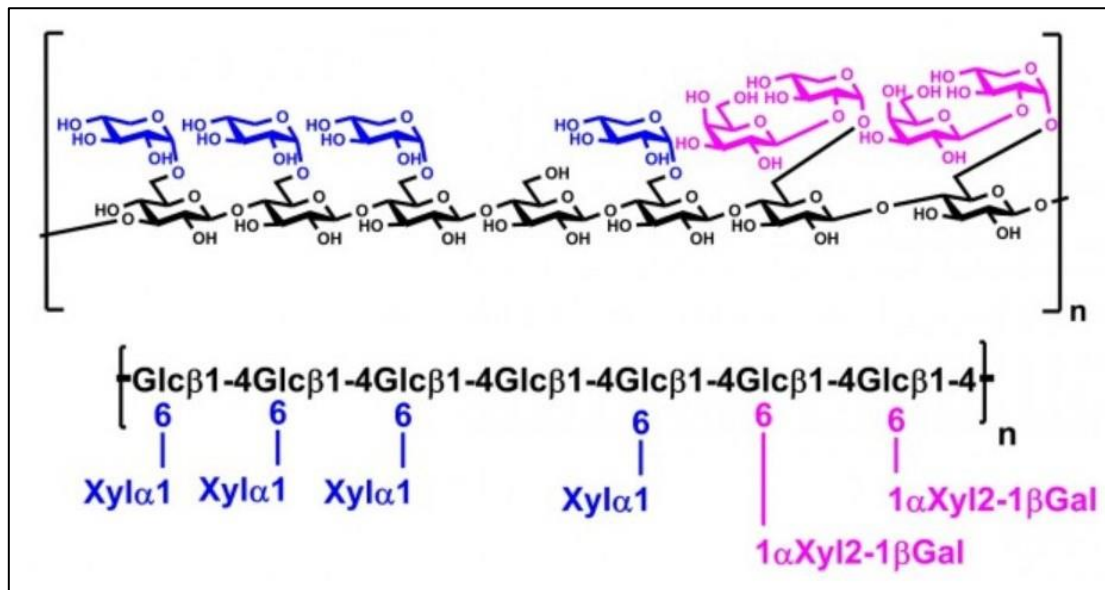


Εικόνα 3.30 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της αραβινοξυλάνης σίτου. Η γραμμική αλυσίδα του μορίου αποτελείται από πεντόζες ξυλόζης ενωμένες με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ υποκαταστάτες αραβινόζης συνδέονται με τον C2 ή C3 άνθρακα των πεντοζών.

Ξυλογλυκάνη (Xyloglucan)

Η ξυλογλυκάνη ανήκει στην κατηγορία των ημικυτταρινών και αποτελεί έναν διακλαδωμένο ετεροπολυμερή πολυσακχαρίτη. Η κύρια αλυσίδα απαρτίζεται από διαδοχικά συνδεδεμένα μόρια D-γλυκόζης με σχηματισμό β-1,4' γλυκοζιτικών δεσμών, τα οποία σχηματίζουν διακλαδώσεις με μονοσακχαρίτες ξυλόζης συνδεδεμένες με α-1,6' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αρκετοί υποκαταστάτες ξυλόζης ενώνονται με μόρια γαλακτόζης αναπτύσσοντας β-1,2' γλυκοζιτικούς δεσμούς επεκτείνοντας έτσι την διακλαδωμένη αλυσίδα του πολυμερούς. Συχνά ακολουθούνται από μόρια γαλακτόζης με εκ νέου σχηματισμό β-1,2' γλυκοζιτικών δεσμών. Η αναλογία μονοσακχαριτών στο μόριο είναι της τάξης 34 % ξυλόζη / 45 % γλυκόζη / 17 % γαλακτόζη, ενώ ενδέχεται να περιέχονται και άλλοι μονοσακχαρίτες όπως αραβινόζη σε μικρότερα ποσοστά.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-XYGLN. Το διάλυμα ξυλογλυκάνης 1% w/v δημιουργείται με διάλυση 1 g υποστρώματος σε 80 mL υπερκάθαρου νερού θερμοκρασίας 80 °C. Το διάλυμα αναδέυεται για 10 λεπτά σε αυτή τη θερμοκρασία και στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία μέχρι το σημείο ζέσεως στο οποίο και παραμένει για 1-2 λεπτά. Στο σημείο αυτό η θέρμανση σταματάει και το διάλυμα αφήνεται περίπου 12 ώρες για ανάδευση σε δοχείο καλυμμένο εξωτερικά για την προστασία του διαλύματος από την έκθεση του στο φως. Έπειτα, γίνεται προσθήκη υπερκάθαρου νερού μέχρι τα 100 mL.

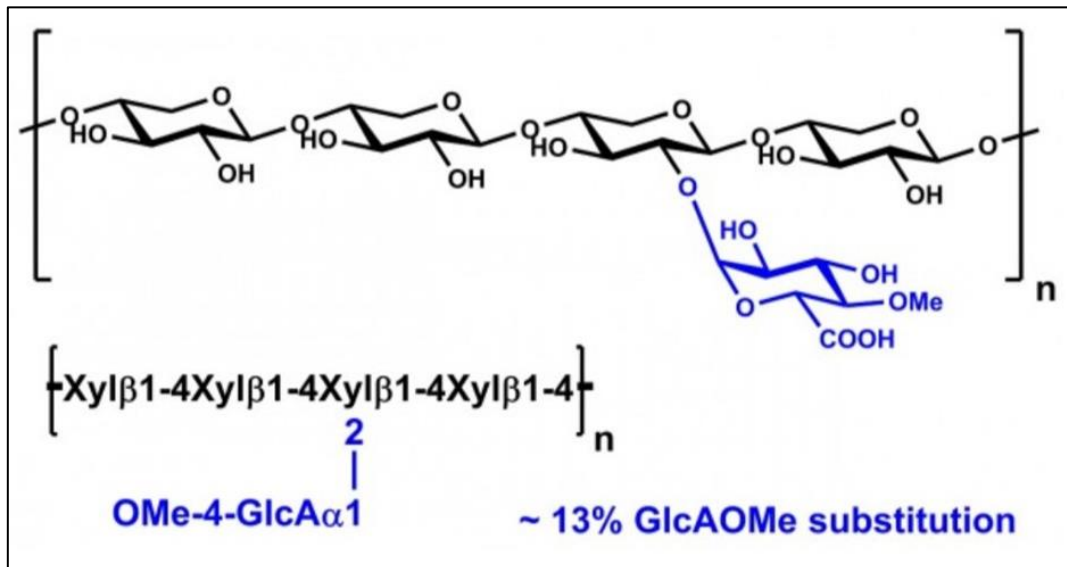


Εικόνα 3.31 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της ξυλογλυκάνης. Η γραμμική αλυσίδα του μορίου αποτελείται από μονοσακχαρίτες D-γλυκόζης ενωμένους με β 1-4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ υποκαταστάτες ξυλόζης που συχνά ακολουθούνται από μόρια γαλακτόζης συνδέονται στη γραμμική αλυσίδα με α 1-6' γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Ξυλάνη Οξιάς (Beechwood Xylan)

Η ξυλάνη οξιάς αποτελείται είναι ένα διακλαδωμένο ετεροπολυμέρες σάκχαρο της κατηγορίας των ημικυτταρινών, την κύρια αλυσίδα του οποίου σχηματίζουν μόρια ξυλόζης ενωμένα με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι διακλαδώσεις του μορίου προκύπτουν με ένωση ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος (GlcAOMe) με ένα μόριο ξυλόζης της κύριας αλυσίδας με σχηματισμό α-1,2' γλυκοζιτικού δεσμού. Η συχνότητα εμφάνισης των υποκαταστατών αυτών είναι περίπου 13% με αποτέλεσμα η αναλογία των μονοσακχαριτών του πολυμερούς να υπολογίζεται περίπου σε 85.6 % ξυλόζη / 8.7 % γλυκουρονικό οξύ. Το εναπομένειαν ποσοστό συμπληρώνεται από άλλα σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα όπως η αραβινόζη.

Για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας, έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος της εταιρείας Megazyme (Η.Π.Α.) με εμπορική ονομασία P-XYLNBE-10G. Για την παρασκευή διαλύματος με τελική συγκέντρωση υποστρώματος 1 % w/v, αρχικά διαλύονται 0.5 g ξυλάνης σε 40 mL υπερκάθαρου νερού θερμοκρασίας 80 °C και αφήνονται υπό ανάδευση για 10 λεπτά σε αυτή τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, ακολουθεί βρασμός για 2 λεπτά. Το διάλυμα αφήνεται για περίπου 12 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ το μπουκάλι στο οποίο περιέχεται είναι καλυμμένο εξωτερικά προς αποφυγή της έκθεσης τους διαλύματος στο φως. Τέλος, στο διάλυμα προστίθεται υπερκάθαρο νερό μέχρι τελικού όγκου 50 mL.



Εικόνα 3.32 Η επαναλαμβανόμενη δομή του πολυμερούς της ξυλάνης οξιάς. Η γραμμική αλυσίδα του μορίου αποτελείται από πεντόζες ξυλόζης ενωμένες με β-1,4' γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ υποκαταστάτες γλυκουρονικού οξέως είναι συνδεδεμένοι μέσω α-1,2' γλυκοζιτικών δεσμών

3.7.3.4 Προετοιμασία και επώαση ενζυμικών αντιδράσεων

Κάθε ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 mL, με τις αναλογίες συστατικών που αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες, έτσι ώστε στον τελικό όγκο της αντίδρασης να περιέχεται υπόστρωμα σε συγκέντρωση 0.25% w/v με αναλογία περίπου 24 mg Ενζύμου ανά 1 g Υποστρώματος. Με βάση το παραπάνω αλλά και την συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε αντίδραση υποστρώματος. Κάθε αντίδραση αποτελείται από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 0.1 M (reaction buffer), το διάλυμα υποστρώματος (αρχικής συγκέντρωσης 0.5, 1 ή 5% ανάλογα το υπόστρωμα), το ενζυμικό διάλυμα (3 mg/ml) και διάλυμα ασκορβικού οξέως 200 mM. Έτσι, σε κάθε διάλυμα περιέχονται 0.06 mg ενζύμου, 2.5 mg Υποστρώματος. Αφού δημιουργήθηκαν οι όγκοι αντιδράσεων 1 mL για κάθε υπόστρωμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες 1.5 mL τύπου Eppendorf, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση υπο ανάδευση σε συσκευή Thermomixer σε συνθήκες 1100 rpm, 50 °C για 24 ώρες. Ακολουθούν οι πίνακες 3.10, 3.11 και 3.12 με τη σύσταση των ενζυμικών αντιδράσεων για κάθε υπόστρωμα, τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος και των συνθηκών επώασης των αντιδράσεων κατά την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 3.10 Σύσταση ενζυμικών αντιδράσεων τελικού όγκου 1 mL με τις συγκεντρώσεις συστατικών για κάθε υπόστρωμα. Κάτω από κάθε συστατικό, αριστερά διακρίνεται ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση του πειράματος και δεξιά η τελική συγκέντρωση του κάθε συστατικού στην αντίδραση.

Συστατικά Αντίδρασης	Ένζυμο 3 mg/ml		Υπόστρωμα		Ασκορβικό Οξύ 200 mM		Reaction Buffer 0.1 M	
	V (μL)	% w/v	V (μL)	% w/v	V (μL)	C (mM)	V (μL)	C (M)
Υποστρώματα (w/v)								
Starch 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
Beechwood Xylan 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
CMC 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
Wheat Arabinoxylan 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
Xyloglucan 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
Chitin 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
B-Glucan 1%	20	0.006	250	0.25	10	2	720	0.72
PASC 5%	20	0.006	50	0.25	10	2	920	0.92
Glucomannan 0.5%	20	0.006	500	0.25	10	2	470	0.47
Galactomannan 0.5%	20	0.006	500	0.25	10	2	470	0.47

Πίνακας 3.11 Σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ενζυμικής αντίδρασης 0.1 M (reaction buffer)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ενζυμικής Αντίδρασης (Reaction Buffer) 0.1 M	
Sodium Acetate	0.1 M
Acetic Acid	0.1 M
pH	5.5

Πίνακας 3.12 Συνθήκες επώασης των ενζυμικών αντιδράσεων σε υποστρώματα πολυσακχαριτών

Συνθήκες Επώασης Ενζυμικών Αντιδράσεων	
Θερμοκρασία	50 °C
Ρυθμός ανάδευσης	1100 rpm
Διάρκεια Επώασης	24 ώρες

3.7.3.5 Ανάλυση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης σε υποστρώματα πολυσακχαριτών

Μετά τη λήξη της επώασης των αντιδράσεων, τα δείγματα προετοιμάστηκαν κατάλληλα πριν την ανάλυση τους με χρωματογραφία ΗΡΑΕ-PAD. Αρχικά θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 100 °C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (10 λεπτά, 4 °C, 10500 rpm). Το υπερκείμενο υγρό των δειγμάτων υπέστη καθαρισμό με εμβολιασμό σε φίλτρα πόρων 0.45 μm.

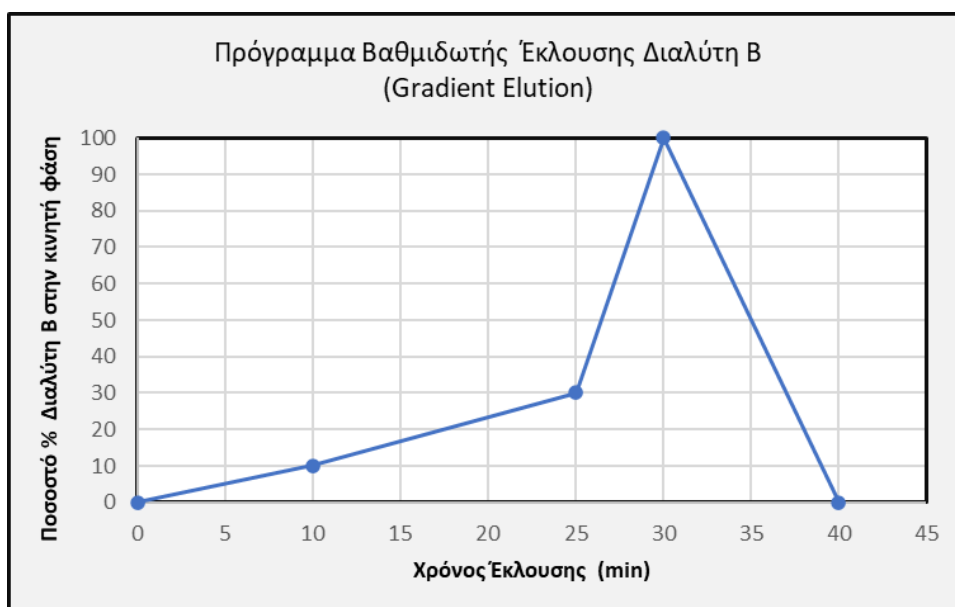
Τα καθαρισμένα δείγματα περιέχουν απελευθερωμένους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής δράσης στα υποστρώματα πολυσακχαριτών. Η ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε με την τεχνική βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) με χρήση προγράμματος, το οποίο μεταβάλλει τις συγκεντρώσεις των δυο διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση σε ορισμένα χρονικά διαστήματα για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό του δείγματος. Ο διαλύτης Α είναι διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH – Sodium Hydroxide) συγκέντρωσης 100 mM, ενώ ο διαλύτης Β περιέχει 100 mM NaOH μαζί με 1M οξικού νατρίου (CH₃COONa ή NaOAc Sodium Acetate). Η έκλουση ξεκινάει με την κινητή φάση να περιέχει 100% Διαλύτη Α, ο οποίος διέπεται από χαμηλή ιοντική ισχύ, με αποτέλεσμα την έκλουση συστατικών που συγκρατούνται ασθενέστερα στη στήλη. Στη συνέχεια, προστίθεται βαθμιδωτά διαλύτης Β αυξάνοντας την συγκέντρωση του οξικού νατρίου κάτι που συνεπάγεται σταδιακή άυξηση της ιοντικής ισχύος της κινητής φάσης. Αυτό έχει αποτέλεσμα την πλήρωση θέσεων της στατικής φάσης από ανιόντα του διαλύτη και την βαθμιδωτή έκλουση ενώσεων οι οποίες συγκρατούνταν ισχυρότερα στη στήλη. Καθ' όλη τη διάρκεια της έκλουσης η συγκέντρωση του NaOH παραμένει σταθερή. Αυτό συμβαίνει επειδή είναι σημαντικό να διατηρηθεί η σταθερότητα της γραμμή βάσης (baseline) του διαλύτη έκλουσης σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, ενώ το NaOAc δεν μπορεί να το εξασφαλίσει καθώς δεν έχει ρυθμιστική ικανότητα σε υψηλές τιμές pH. Η συγκέντρωση 100 mM NaOH του διαλύτη Α διατηρεί το pH του διαλύτη έκλουσης σταθερό σε τιμή ίση με 13.

Πριν την έναρξη της ανάλυσης οι διαλύτες παρασκευάστηκαν με υπερκάθαρο νερό και ο διαλύτης Β φιλτραρίστηκε με διήθηση υπο κενό φίλτρο πόρων 0.2 μm για την εξασφάλιση μεγαλύτερης καθαρότητας σε περίπτωση προσμιόξεων. Στη συνέχεια οι διαλύτες υπόκεινται σε απαέρωση, διαδικασία απαραίτητη για την απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων όπως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες και προκαλούν αλλαγές στην τιμή της πίεσης στο κύκλωμα ροής, η οποία πρέπει να παραμένει πάντα σταθερή. Η απαέρωση πραγματοποιήθηκε με διαβίβαση αζώτου στο δοχείο και διαρκεί 5 λεπτά για κάθε διαλύτη. Στη συνέχεια, πριν την φόρτωση του πρώτου δείγματος η στήλη εξισορροπείται με έκλουση διαλύτη Α για 30 λεπτά με ρυθμό ροής 1 mL /min και πίεση 1180 psi. Οι δυο τιμές αυτές διατηρούνται καθόλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ξεκίνησε η σειριακή φόρτωση δειγμάτων για την ανάλυση τους. Το πρόγραμμα έκλουσης για την ανάλυση κάθε δείγματος είχε διάρκεια 40 λεπτών, ενώ μεταξύ διαδοχικών δειγμάτων, γινόταν εμβολιασμός της στήλης με υπερκάθαρο νερό για καθαρισμό τυχών υπολειμμάτων του προηγούμενου δείγματος. Για κάθε υπόστρωμα αναλύθηκε ένα δείγμα ενζυμικής αντίδρασης και ένα τυφλό (blank) δείγμα που δεν περιείχε ένζυμο. Έτσι για κάθε υπόστρωμα πολυσακχαρίτη εξάχθηκε ένα διάγραμμα που περιέχει τις κορυφές αυτού το ζεύγους

δειγμάτων με σκοπό την ανίχνευση κορυφών που υποδηλώνουν την ύπαρξη προϊόντων ολιγοσακχαριτών.

Πίνακας 3.13 Χαρακτηριστικά στοιχεία της χρωματογραφικής ανάλυσης. Σύσταση διαλυτών έκλουσης, πίεση στο κύκλωμα ροής, ροή και χρόνος έκλουσης

Διαλύτης Α	100 mM NaOH
Διαλύτης Β	100 mM NaOH, 1 M CH ₃ COONa
Ροή Έκλουσης	1 mL/min
Χρόνος Έκλουσης	40 λεπτά
Πίεση στο κύκλωμα ροής	≈ 1180 psi



Διάγραμμα 3.1 Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της χρωματογραφικής ανάλυσης, με το ποσοστό του διαλύτη Β στη ροή της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια του χρόνου έκλουσης.

3.7.4 Φασματοφωτομετρική μέθοδος για την επιβεβαίωση της ύπαρξης ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

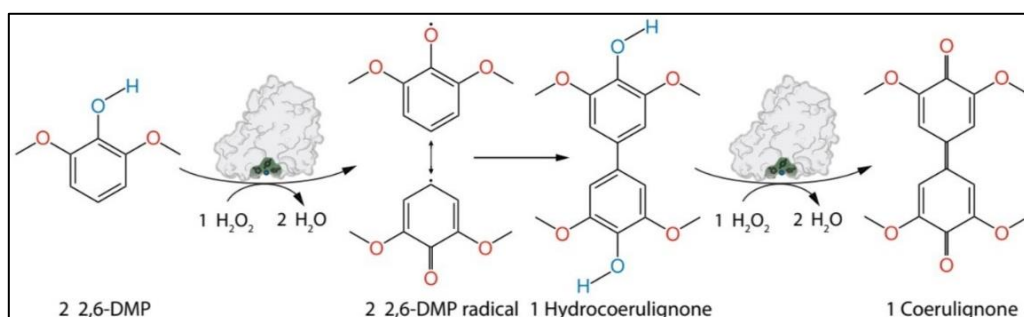
Οι λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (LPMOs) δημιουργούν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων με την διάσπαση δεσμών πολυμερικών υποστρωμάτων κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και χιτίνης οδηγώντας σε προϊόντα με C1- ή C4- οξειδωμένα άκρα. Η ανάλυση των προϊόντων, τόσο για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση τους όσο και για την μελέτη της ενεργότητας των LPMOs, πραγματοποιείται κυρίως με HPLC-MS ή άλλες παρεμφερείς χρωματογραφικές μεθόδους ενώ δοκιμάζονται και άλλοι μέθοδοι όπως η NMR (μόνο για ταυτοποίηση) ή η ανάλυση πολυσακχαριτών σε gel ηλεκτροφόρησης. Οι περισσότερες από τις παραπάνω μεθόδους είναι χρονικά δαπανηρές, ενώ σε αρκετές από αυτές απαιτείται σύνθετη προετοιμασία των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αρκετοί πειραματικοί περιορισμοί και προκλήσεις όσον αφορά την αποτελεσματική ανάλυση όλων των προϊόντων. Μια από αυτές αποτελεί η ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μόνο των διαλυτών μορίων, δηλαδή αυτών με μικρό μοριακό βάρος και χαμηλό βαθμό πολυμερισμού. Το παραπάνω, σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα του μηχανισμού αντίδρασης, αλλά και τις πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, όπως η αυτοοξείδωση του ενζύμου, έχουν ως αποτέλεσμα την δυσκολία εξαγωγής αποτελεσμάτων κυρίως όσον αφορά την κινητική των LPMOs.

Με σκοπό τον γρήγορο και αποτελεσματικό έλεγχο μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά την διάρκεια της έκφρασης, της απομόνωσης αλλά και του χαρακτηρισμού της αναπτύχθηκε μια νέα φασματοφωτομετρική μέθοδος ανάλυσης (Beslmayr et al., 2018). Βασίζεται στην ανίχνευση χρωμοφόρων προϊόντων οξείδωσης του συνθετικού υποστρώματος 2,6-διμεθοξυφαινόλη (2,6 dimethoxyphenol ή 2,6 DMP) από την καταλυτική δράση των LPMOs παρουσία H_2O_2 . Αυτή η δράση εξαρτάται άμεσα από την παρουσία του καταλυτικού χαλκού στο ενεργό κέντρο όπως επίσης και από ολόκληρη δομή του ενζύμου. Έτσι, όσο η LPMO παραμένει σταθερή και ενεργή, παίρνει ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα 2,6-DMP με ρυθμό ανάλογο της οξείδωσης του που οδηγεί στην αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης. Το παραπάνω σηματοδοτεί ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει επεξεργαστεί και αναδιπλωθεί αποτελεσματικά κατά την ετερόλογη έκφραση της από την *P. pastoris* και επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενεργότητας της. Κατά συνέπεια, η συγκεκριμένη μέθοδος παρά το γεγονός ότι δεν ανιχνεύει ενεργότητα σε υποστρώματα πολυσακχαριτών, αξιοποιείται από πολλούς ερευνητές για την μελέτη της ενεργότητας του ενζύμου όπως και την εύρεση σταθερών πρόσδεσης υποστρώματος - ενζύμου αλλά και της σταθερότητας του σε διάφορες συνθήκες pH και θερμοκρασίας.

Όπως επισημάνθηκε, η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στην πρόσφατη ανακάλυψη αντιδράσεων στις οποίες οι LPMOs αξιοποιούν ως συμπάραγοντα το υπεροξείδιο του υδρογόνου όπως οι υπεροξυγενάσες, οι υπεροξειδάσες και άλλα ένζυμα (Bissaro et al., 2017). Ο μηχανισμός δράσης της LPMO στη συγκεκριμένη μέθοδο εμφανίζει αρκετή ομοιότητα με τον καταλυτικό μηχανισμό της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP - horseradish peroxidase). Το πρωτόκολλο της ανάλυσης χρησιμοποιεί το 2,6-DMP ως ένα χρωμογόνο οργανικό υπόστρωμα το οποίο, παρουσία υπεροξειδίου (H_2O_2) ως συμπάραγοντας,

μετατρέπεται ενζυμικά σε ένα προϊόν που μπορεί να μετρηθεί φασματοσκοπικά, αφού χρωματίζει το διάλυμα αντίδρασης και απορροφά συγκεκριμένες συχνότητες του φωτός. Το 2,6-DMP είναι μια φαινολική ένωση η οποία περιέχει δυο υποκαταστάτες -O-CH₃ (methoxy groups) στις θέσεις 2 και 6 του βενζολικού δακτυλίου και μια ομάδα υδροξειδίου (-OH) στη θέση 1 του δακτυλίου. Η ενζυμική αντίδραση είναι ομογενής αφού πραγματοποιείται με διαλυτά υποστρώματα. Η μέθοδος έχει αρκετά υψηλή ευαισθησία καθώς έχει χαμηλά όρια ανίχνευσης σε σχέση με άλλες δοκιμές (assays) που έχουν αναπτυχθεί κατά καιρούς. Επιπλέον, εμφανίζει σταθερότητα σε ένα ικανοποιητικό εύρος pH (4-8) και θερμοκρασιών.

Ο προτεινόμενος συμβατικός μηχανισμός της αντίδρασης στον οποίο βασίζεται το πρωτόκολλο ξεκινάει με την ενεργοποίηση του ενεργού κέντρου της LPMO, το οποίο αποτελείται από ένα μόριο χαλκού. Η αδρανής κατάσταση (resting state) του ενζύμου, βρίσκει το μόριο χαλκού στην οξειδωμένη μορφή Cu(II) (ή Cu²⁺). Ο αναγωγικός παράγοντας μετατρέπει την μορφή αυτή σε καταλυτικά ενεργή με αναγωγή του μορίου χαλκού σε Cu(I) (ή Cu⁺) με αποτέλεσμα στη συνέχεια το ενεργό κέντρο να προσδένεται με τον συμπαράγοντα, δηλαδή ένα μόριο υπεροξειδίου. Ειδικότερα, το μόριο χαλκού του ενεργού κέντρου της LPMO ανάγεται από το 2,6 DMP και μετατρέπεται από δισθενές κατιόν Cu(II) σε Cu(I). Αυτό οδηγεί στην καταλυτική ενεργοποίηση του μορίου και την πρόσδεση του υπεροξειδίου H₂O₂. Έτσι, το πρώτο στάδιο της αντίδρασης οδηγεί στο σχηματισμό νερού από το υπεροξείδιο και την δημιουργία ελευθέρων ριζών 2,6 DMP (2,6 DMP radical) με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ρίζας να εντοπίζεται στο οξυγόνο της θέσης 1 του δακτυλίου. Στη συνέχεια οι ελεύθερες ρίζες διμερίζονται ταχιάως προς σχηματισμό του διμερούς Hydrocoerulignone, το οποίο ως διμερές του 2,6 DMP περιέχει από μια ομάδα υδροξυλίου στο άκρο κάθε αρωματικού δακτυλίου. Αυτό έχει ως συνέπεια την επανάληψη της καταλυτικής δράσης με όμοιο τρόπο, δηλαδή την οξείδωση των άκρων που περιέχουν τις ομάδες υδροξυλίου και τον σχηματισμό νερού από τα μόρια υπεροξειδίου. Αποτέλεσμα της οξειδωτικής δράσης είναι ο σχηματισμός Coerulignone με δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ των δακτυλίων του διμερούς. Το μόριο αυτό αποτελεί το τελικό προϊόν της αντίδρασης και έχει πολύ υψηλό συντελεστή μοριακής απορρόφησης ($\epsilon_{469} = 53.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Έτσι, χρωματίζει το διάλυμα αντίδρασης δίνοντας την δυνατότητα μέτρησης του φασματοσκοπικά σε μήκος κύματος 469 nm. Η στοιχειομετρία της συνολικής αντίδρασης είναι 1:1 μεταξύ του 2,6-DMP και υπεροξειδίου H₂O₂.



Εικόνα 3.33 Ο καταλυτικός μηχανισμός αντίδρασης του ενζύμου LPMO στον οποίο βασίζεται το πρωτόκολλο ανάλυσης. Σε αυτό διακρίνεται η δημιουργία ελευθέρων ριζών με οξείδωση του υποστρώματος 2,6 DMP και αναγωγή του υπεροξειδίου H₂O₂ προς σχηματισμό νερού. Ακολουθεί ο ταχύς διμερισμός των ελευθέρων ριζών και η μετατροπή του διμερούς στο χρωμοφόρο τελικό προϊόν Coerulignone με τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό και την συμμετοχή υπεροξειδίου.

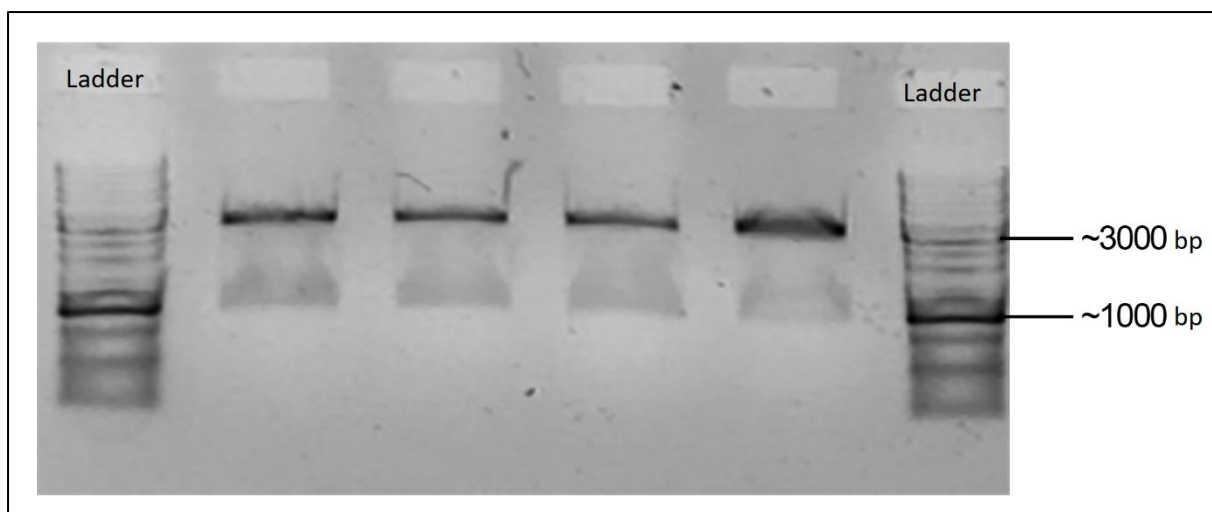
Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε κατά την πειραματική διαδικασία για την μέτρηση της ενεργότητας υπεροξυγενάσης των μελετούμενων ενζύμων είναι το ακόλουθο:

1. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 116 mM (Sodium Acetate buffer) συγκέντρωσης με pH = 6. Παρασκευή stock διαλύματος 5 mM Υπεροξειδίου (H₂O₂) και stock διαλύματος 100 mM 2,6 DMP με υπερκάθαρο νερό. Όλα τα διαλύματα διατηρούνται σε πάγο (4 °C.)
2. Ανάμειξη 170 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 25 μL stock διαλύματος 2,6 DMP και 5 μL stock διαλύματος H₂O₂. Το διάλυμα αφήνεται για επώαση 15 λεπτά στους 40 °C.
3. Προσθήκη 50 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης σε θερμοστατημένο υποδοχέα δείγματος του φασματοφωτόμετρου. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης για 10 λεπτά στους 40 °C. Στο μετρούμενο δείγμα αντίδρασης συνολικού όγκου 250 μL, περιέχονται 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα, 10 mM 2,6 DMP, 100 μM H₂O₂. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται δείγμα ίδιας σύστασης που περιέχει Tris-HCl 30 mM αντί του ενζύμου.
4. Υπολογισμός της ενεργότητας υπεροξυγενάσης του μελετούμενου ενζύμου με χρήση του συντελεστή μοριακής απορρόφησης στα 469 nm $\epsilon_{469\text{nm}} = 53.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, της απορρόφησης του τελικού χρωμοφόρου προϊόντος, του όγκου αντίδρασης και της αραιώσης του ενζύμου.

4. Αποτελέσματα

4.1 Επιβεβαίωση της παραλαβής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά τον μετασηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την μελετούμενη πρωτεΐνη LPMO AA9 (CAZy: MYCTH_110651, GenBank: AEO54509.1) ακολούθησε επιλογή μετασηματισμένων στελεχών *E. coli* και ανάπτυξη τους σε υγρές καλλιέργειες για την απομόνωση και παραλαβή πολλαπλών αντιγράφων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με την ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την LPMO ακολούθησε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BstbI και XbaI για την αποκοπή της αλληλουχίας του γονιδίου από το πλασμίδιο και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Από την βιοπληροφορική ανάλυση η κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου, δηλαδή αυτή που εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα κατά τον ανασυνδυασμό του, έχει μήκος 909 bp, ενώ το πλασμίδιο pGAPZaC έχει μήκος περίπου 3152 bp. Το παραπάνω, με την προϋπόθεση της επιτυχούς παραλαβής και πέψης των πλασμιδίων, συνεπάγεται ότι μετά από την υποβολή του πηκτώματος αγαρόζης σε υπεριώδη ακτινοβολία, θα αναμένεται η ανίχνευση μορίων DNA σε αυτές τις δυο περιοχές μήκους νουκλεοτιδίων. Αυτό πράγματι επιβεβαιώνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα, όπως αποτυπώνονται στο πήκτωμα που ακολουθεί συνοδεία του πρότυπου διαλύματος μορίων DNA γνωστού μήκους. Στο πήκτωμα έγινε φόρτωση δυο πρότυπων δειγμάτων με μόρια γνωστού μήκους εκατέρωθεν τεσσάρων θέσεων στις οποίες έγινε φόρτωση του δείγματος μετά την πέψη που περιέχει το πλασμίδιο και την κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου. Όπως φαίνεται και στις τέσσερις θέσεις εμφανίζονται δυο ζώνες, μια σε ύψος περίπου 3000 βάσεων (bp) και μια σε ύψος περίπου 1000 bp, οι οποίες αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα pGAPZaC και το γονίδιο αντίστοιχα.



Εικόνα 4.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Στο πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση εμφανίζονται δυο ζώνες, μια που αντιστοιχεί στο πλασμίδιο pGAPZaC σε περίπου 3000 bp και μια που αντιστοιχεί στο γονίδιο σε περίπου 1000 bp.

4.2 Ετερόλογη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα ζύμης *P. pastoris* X33

Η διαδικασία ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου της μελετούμενης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, μετά την εύρεση του γονιδίου της LPMO, αποτελείται από ορισμένα βασικά στάδια. Αρχικά, οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pGAPZαC εισάγονται σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* TOP10 για τον μετασχηματισμό τους με θερμικό σοκ (Heat Shock), την εύρεση και ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων και την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.3 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Το δεύτερο στάδιο, στο οποίο αναφέρεται η παράγραφος 3.5.4, περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων ζύμης *P. pastoris* X33 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (Electroporation), ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται η εύρεση των μετασχηματισμένων στελεχών με ανάπτυξη τους σε θρεπτικό YPD σε τρυβλία, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.2. Τα μετασχηματισμένα στελέχη υποβλήθηκαν σε δοκιμές στερεών καλλιιεργειών σε τρυβλία (plate assays), με τις διαδικασίες που αναφέρονται στην παράγραφο 3.6.1. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ζεοσίνη για την ανίχνευση πιθανού μετασχηματισμού με πολλαπλά πλασμιδιακά αντίγραφα (multi-copy). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή για την ανίχνευση της ενεργότητας των μετασχηματισμένων στελεχών σε κατάλληλα υποστρώματα (PASC & DMP). Μετά από αυτές τις δοκιμές γίνεται διαλογή ενός αριθμού κλώνων για έκφραση τους σε προκαλλιέργειες, κατά την διάρκεια των οποίων πραγματοποιείται μέτρηση των υγρών καλλιιεργειών όσον αφορά την παραγωγικότητα σε κύτταρα και ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.



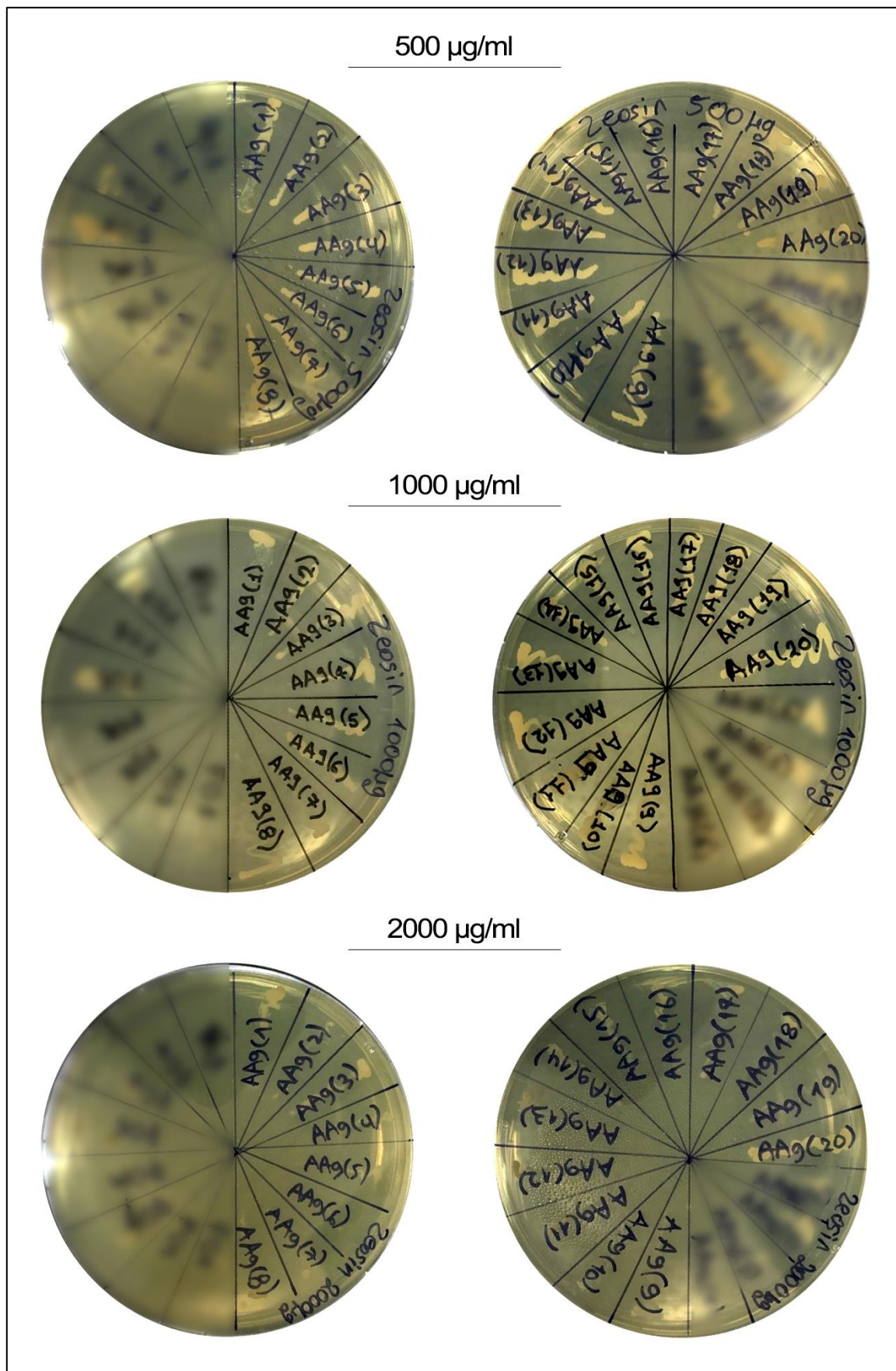
Εικόνα 4.2. Στερεή καλλιέργεια σε τρυβλίο petri του μίγματος κυττάρων *P. pastoris* μετά τον μετασχηματισμό σε θρεπτικό YPD-αντιβιοτικό ζεοσίνη. Με κύκλο επισημαίνονται οι ανεπτυγμένες αποικίες ζύμης. Η ανάπτυξή τους οφείλεται στην ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, γεγονός που αποδεικνύει τον επιτυχή μετασχηματισμό τους.

4.2.1 Δοκιμές ενεργότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό των μετασχηματισμένων στελεχών (plate assays)

4.2.1.1 Δοκιμή καλλιέργειας σε τρυβλία παρουσία αντιβιοτικού (Zeocin Plate Assays)

Για την δοκιμή με αντιβιοτικό, είκοσι μετασχηματισμένα στελέχη *P. pastoris* εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό YPD-Άγαρ παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη. Κάθε αποικία αναπτύχθηκε ξεχωριστά σε θρεπτικό YPD για τρεις συγκεντρώσεις αντιβιοτικού ζεοσίνη 500, 1000 και 2000 $\mu\text{g/ml}$ και οι στερεές καλλιέργειες αφήθηκαν για επώαση 24 ώρες στους 30 °C.

Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων αποικιών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού μετά το πέρας μιας ημέρας παρουσιάζονται στην εικόνα 4.3 που ακολουθεί. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι σε συγκέντρωση αντιβιοτικού 500 $\mu\text{g/ml}$, όλα τα μετασχηματισμένα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά και σε μεγάλη έκταση μετά το πέρας μιας ημέρας. Η ανάπτυξη αυτή είναι αναμενόμενη δεδομένου ότι όλα τα στελέχη είναι μετασχηματισμένα, δηλαδή περιέχουν τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη ζεοσίνη. Για συγκέντρωση αντιβιοτικού 1000 $\mu\text{g/ml}$, παρατηρείται μικρή μείωση της ανάπτυξης ορισμένων αποικιών, συγκριτικά με την συγκέντρωση 500 $\mu\text{g/ml}$. Σε συγκέντρωση αντιβιοτικού 2000 $\mu\text{g/ml}$, υπάρχει σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη της πλειονότητας των αποικιών σε σχέση με τις αντίστοιχες αποικίες με 500 $\mu\text{g/ml}$ και 1000 $\mu\text{g/ml}$ αντιβιοτικού. Οι αποικίες (1), (3) και (20) εμφανίζουν ανάπτυξη αισθητά μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες, γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα στελέχη αυτά έχουν πιθανότατα μετασχηματιστεί με πολλαπλά αντίγραφα (multi-copy).

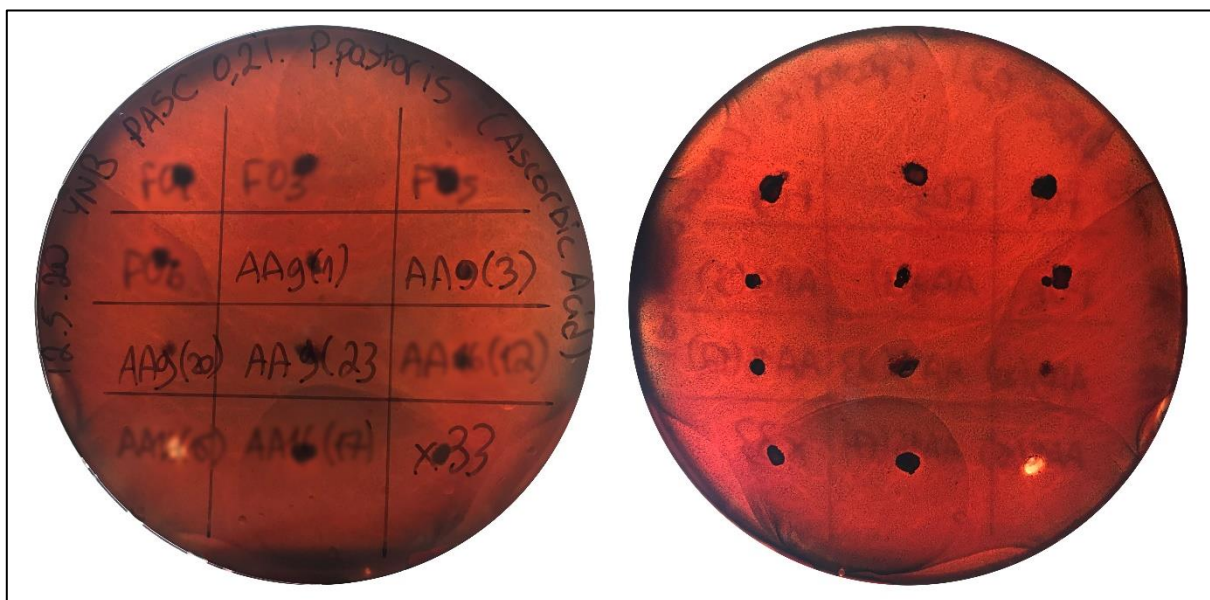


Εικόνα 4.3. Zeocin Plate Assays: Αποτελέσματα δοκιμών ανάπτυξης μετασηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* σε θρεπτικό YPD παρουσία του αντιβιοτικού ζεοσίνη σε συγκέντρωση 500, 1000 και 2000 µg/ml. Οι στερεές καλλιέργειες αφέθηκαν για επώαση 24 ώρες στους 30 °C.

4.2.1.2 Δοκιμή ενεργότητας σε τρυβλία παρουσία υποστρωμάτων (PASC & DMP Plate Assays)

Για την ανίχνευση ποιοτικά της ενεργότητας των παραγόμενων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κάθε μετασχηματισμένου στελέχους *P. pastoris* πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στα υποστρώματα PASC και 2,6-DMP. Όσον αφορά το PASC, η ανίχνευση ενεργότητας του ενζύμου για τη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών του υποστρώματος πολυσακχαρίτη, έγινε με ανάπτυξη κάθε στελέχους σε θρεπτικό μέσο MM παρουσία 0.5 % w/v PASC. Στο οργανικό υπόστρωμα 2,6-DMP, πραγματοποιείται ανίχνευση ενεργότητας με ανάπτυξη κάθε στελέχους σε θρεπτικό μέσο MM παρουσία 2 mM 2,6-DMP. Η επώαση είχε διάρκεια μιας ημέρας στους 30 °C και για τις δυο δοκιμές.

Στα αποτελέσματα των δοκιμών, τόσο για το PASC όσο και για το 2,6-DMP, δεν εμφανίστηκε σε κανένα στέλεχος κάποια σαφής ορατή ένδειξη που να υποδεικνύει μέσω της δημιουργίας προϊόντος την ύπαρξη ενζυμικής ενεργότητας. Το παραπάνω, δεν σημαίνει απαραίτητα την μη ύπαρξη ενεργότητας στους μετασχηματισμένους κλώνους. Αντιθέτως, αποτελεί ένα πιθανό αποτέλεσμα καθώς συνήθως οι LPMOs επιδρούν σε κρυσταλλικές περιοχές παράγοντας πολύ μικρή ποσότητα διαλυτών σακχάρων και η ενεργότητά τους μπορεί να ανιχνευθεί καλύτερα με άλλες πιο σύνθετες μεθόδους. Με βάση τα παραπάνω, δεν ήταν εφικτή η διάκριση κάποιου μετασχηματισμένου στελέχους *P. pastoris* που παράγει ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.



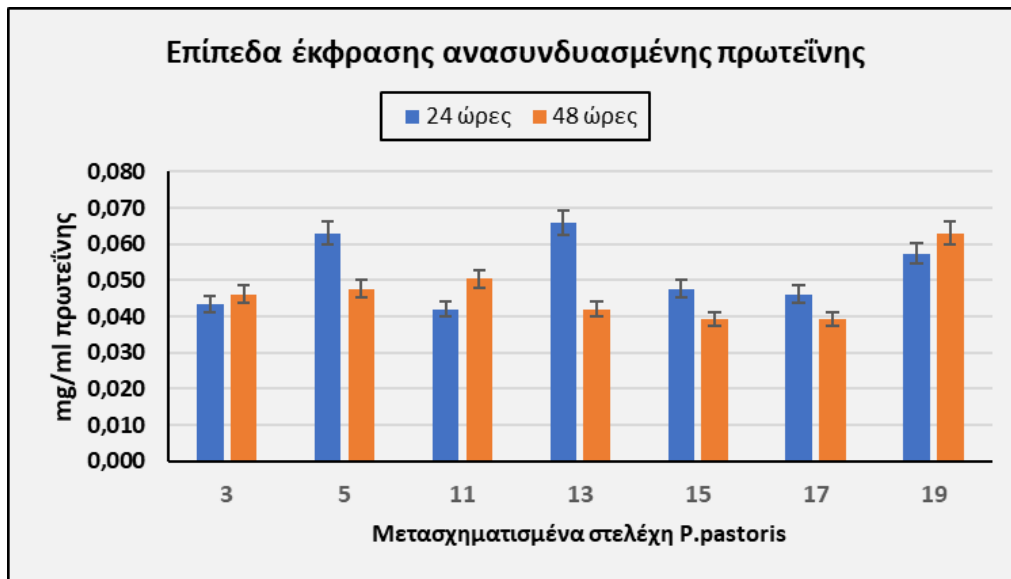
Εικόνα 4.4 Οι δυο όψεις του τρυβλίου Petri στο οποίο πραγματοποιήθηκε το assay με το υπόστρωμα PASC. Όπως διακρίνεται δεξιά στα σημεία που αφορούν τα στελέχη του ενζύμου AA9 (1, 3, 20, 23) δεν εμφανίζεται κάποια ορατή περιοχή περιμετρικά της οπής (μαύρο χρώμα) που έλαβε χώρα η αντίδραση, όπως θα αναμενόταν κανονικά με βάση το πρωτόκολλο σε περίπτωση ύπαρξης ενζυμικής ενεργότητας. Το παραπάνω δεν σημαίνει ότι το μελετούμενο ένζυμο δεν εμφανίζει ενεργότητα στο συγκεκριμένο πολυσακχαρικό υπόστρωμα, αλλά ότι το συγκεκριμένο assay δεν έχει εφαρμογή στην συγκεκριμένη περίπτωση.

4.2.2 Έκφραση και προσδιορισμός της παραγωγικότητας των μετασχηματισμένων στελεχών

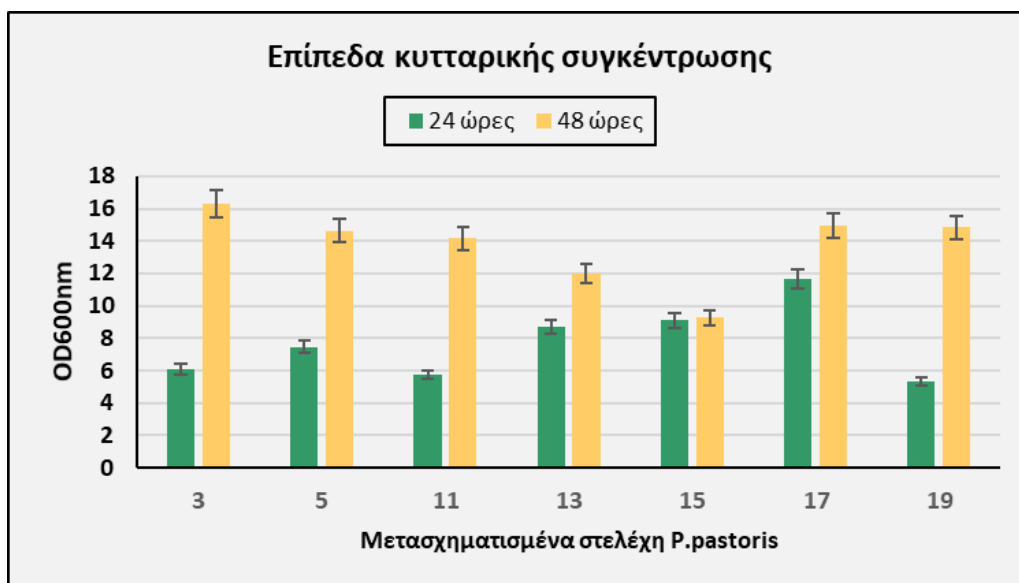
Μετά τον μετασχηματισμό των κυττάρων ζύμης και την πραγματοποίηση των δοκιμών plate assays σε μετασχηματισμένα στελέχη *P. pastoris*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παραγωγικότητας όσον αφορά την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με έκφραση των στελεχών σε υγρές καλλιέργειες. Ο έλεγχος υλοποιήθηκε για επτά μετασχηματισμένα στελέχη που επιλέχθηκαν τυχαία και ανήκουν σε όλο το εύρος των αποτελεσμάτων των δοκιμών σε αντιβιοτικό. Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε 50 ml θρεπτικού μέσου YPD (pH = 6) σε κωνική φιάλη 250 ml και επώαστηκαν υπό ανάδευση 180 rpm στους 30 °C. Πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες θρεπτικού μέσου σε διάστημα 24 και 48 ωρών για τον προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης και της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με μεθόδους που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.6.2. Από την ανάλυση προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στα Διαγράμματα 4.1 και 4.2.

Το στέλεχος (19) της ζύμης *P. pastoris* εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα πρωτεϊνικής έκφρασης σε διάρκεια δυο ημερών, ενώ είχε φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη. Συγκριτικά με άλλα στελέχη των οποίων η παραγωγή πρωτεΐνης σημείωσε πτώση κατά τη δεύτερη μέρα, το στέλεχος (19) εμφάνιζε σταθερά αυξητική τάση παραγωγής. Κατά συνέπεια, κρίθηκε κατάλληλο για να αναπτυχθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα με σκοπό την παραγωγή και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Μετά την επιλογή του στελέχους, οι προκαλλιέργειες επαναλήφθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη και την συλλογή κατάλληλου όγκου κυττάρων για την δημιουργία υγρών καλλιεργειών μεγαλύτερου όγκου. Πιο συγκεκριμένα, με τον ίδιο τρόπο δημιουργήθηκαν διπλές καλλιέργειες του επιλεγμένου στελέχους σε 50 mL θρεπτικό YPD η κάθε μια. Μετά από επώαση 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος στα 600nm. Η τιμή της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων για το σύνολο της καλλιέργειας ανήλθε σε $OD_{600nm} = 7.56$. Με βάση τον νόμο της αραιώσης, για όγκο 400 mL της κύριας καλλιέργειας έγινε συλλογή 52.9 mL από τις διπλές καλλιέργειες συνολικού όγκου 100 mL.



Διάγραμμα 4.1 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μεταξύ μετασηματισμένων στελεχών P. pastoris σε χρόνο ανάπτυξης 24 και 48 ωρών.



Διάγραμμα 4.2 Σύγκριση των επιπέδων κυτταρικής συγκέντρωσης μεταξύ μετασηματισμένων στελεχών P. pastoris σε χρόνο ανάπτυξης 24 και 48 ωρών με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600 nm.

4.3 Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης

Το μετασηματισμένο στέλεχος *P. pastoris* που επιλέχθηκε με βάση την βέλτιστη παραγωγικότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου. Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.3, το στέλεχος αναπτύχθηκε πρώτα σε μικρές υγρές καλλιέργειες 50 mL για μια ημέρα και έπειτα σε μεγάλες καλλιέργειες 500 ml θρεπτικού YPD υπό αερόβιες συνθήκες και ανάδευση 180 rpm, στους 30 °C. Μετά από τέσσερις ημέρες η ανάπτυξη της καλλιέργειας διακόπηκε, αφού προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί δειγματοληψία και τα αποτελέσματα της ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης κρίθηκαν ικανοποιητικά. Ακολούθησε η απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται στα κεφάλαια 3.6.4 και 3.6.5. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε έπειτα από φυγοκέντρηση του υγρού περιεχομένου της καλλιέργειας και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διήθηση υπό κενό την οποία διαδέχθηκε συμπύκνωση σε συσκευή υπερδιήθησης με μεμβράνες PM-10. Σε αυτό το στάδιο έγινε συλλογή και του κλάσματος που διήλθε από τις μεμβράνες (permeate-flow through). Ακολούθως, το συμπυκνωμένο δείγμα εξισορροπήθηκε με την τεχνική Dialysis σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon με ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης με πόρους διαμέτρου 25 nm. Το διάλυμα οδηγήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) με ρητίνη που περιείχε ιόντα κοβαλτίου για την απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης. Η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη συλλέχθηκε από τη στήλη με διαδοχικές εκπλύσεις διαλύματος Talon με Ιμιδαζόλιο. Σε κάθε στάδιο, έγινε συλλογή δείγματος για την ανίχνευση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης φασματοσκοπικά στα 280 nm. Το κλάσμα που εκλούστηκε με διάλυμα Talon-Ιμιδαζόλιο 100 mM ήταν το μοναδικό που εμφάνισε υψηλή τιμή απορρόφησης ($OD_{280nm} = 2$) επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη πρωτεΐνης σε αυτό. Τα επιμέρους κλάσματα που συλλέχθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE για τον έλεγχο της διαδικασίας στα διάφορα στάδια της απομόνωσης με στήλη IMAC. Το διάλυμα της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης μετά την απομόνωση είχε όγκο 5 mL, ενώ ο τελικός του όγκος διαμορφώθηκε σε 6 mL μετά από νεα εξισορρόπηση με την τεχνική Dialysis σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8, στο οποίο έγινε και η τελική αποθήκευση του ενζύμου σε stock διάλυμα.

Πίνακας 4.1 Αποτελέσματα μετρήσεων απορρόφησης στα 280 nm των κλασμάτων που συλλέχθηκαν έπειτα από διαδοχικές εκπλύσεις με διάλυμα Talon-Ιμιδαζολίου κλιμακούμενης συγκέντρωσης κατά την απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης από την στήλη IMAC. Όπως φαίνεται, η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη κατά την πρώτη έκπλυση (A) με διάλυμα συγκέντρωσης 100 mM Ιμιδαζολίου που εμφανίζει κατά πολύ μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης.

Αποτελέσματα απορρόφησης στα 280 nm		
5 mM Ιμιδαζόλιο	100 mM Ιμιδαζόλιο (A)	100 mM Ιμιδαζόλιο (B)
0.253	2	0.119



Εικόνα 4.5 Οι κωνικές φιάλες στις οποίες έλαβε χώρα η ανάπτυξη προκαλλιέργειών όγκου 50 mL του επιλεγθέντος στελέχους.

4.3.1 Υπολογισμός συγκέντρωσης της απομονωμένης πρωτεΐνης

Η συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο τελικό διάλυμα μετά την απομόνωση της και την τελική εξισορρόπηση σε Talon, έγινε φασματομετρικά με τη μέθοδο του κεφαλαίου 3.6.6.2. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OD_{280nm}) δείγματος του διαλύματος στα 280nm, ενώ ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Tris-HCl 30 mM. Η οπτική απορρόφηση του διαλύματος προσδιορίστηκε ίση με $OD_{280} = 4.27$.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος υπολογίζεται από τον κάτωθι τύπο:

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{OD_{280nm} \times MW}{\epsilon_{280nm}}$$

Όπου ϵ : η Μοριακή Απορροφητικότητα ή Μοριακός Συντελεστής Απόσβεσης (Molar Extinction Coefficient) ($M^{-1} cm^{-1}$), MW : το Μοριακό Βάρος της μετρούμενης πρωτεΐνης και OD_{280nm} : η οπτική απορρόφηση στα 280 nm.

Το θεωρητικό μοριακό βάρος και η μοριακή απορροφητικότητα της πρωτεΐνης στα 280 nm υπολογίστηκαν βιοπληροφορικά με βάση την προβλεπόμενη δομή του πρωτεϊνικού μορίου και είναι ίσα με: $MW = 34284.65$ kDa και $\epsilon_{280nm} = 51340$ $M^{-1} cm^{-1}$. Η συγκέντρωση της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα όγκου 6 mL υπολογίζεται ίση με 2.85 mg/mL, συνεπώς απομονώθηκαν συνολικά 17.1 mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η παραγωγικότητα της καλλιέργειας του μετασηματισμένου στελέχους *P. pastoris* σε θρεπτικό μέσο YPD ανέρχεται σε 42.75 mg ανασυνδυασμένου ενζύμου / L καλλιέργειας.

4.3.2 Έλεγχος των σταδίων απομόνωσης πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE αποτελεί μια μέθοδο για την εύρεση του μοριακού βάρους ενός πρωτεϊνικού μορίου, ενώ παράλληλα μπορεί να δώσει μια ποιοτική ένδειξη που δύναται να χρησιμοποιηθεί συγκριτικά όσον αφορά την συγκέντρωση της περιεχόμενης πρωτεΐνης μεταξύ δυο εξεταζόμενων δειγμάτων. Η μέθοδος επιτυγχάνει τον διαχωρισμό των μορίων ενός δείγματος με βάση το μοριακό τους βάρος καθώς το δείγμα ρέει κατακόρυφα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μέσα σε ένα πορώδες δίκτυο πολυακρυλαμιδίου, όπως αναλύεται εκτενώς στο κεφάλαιο 3.7.1.2.

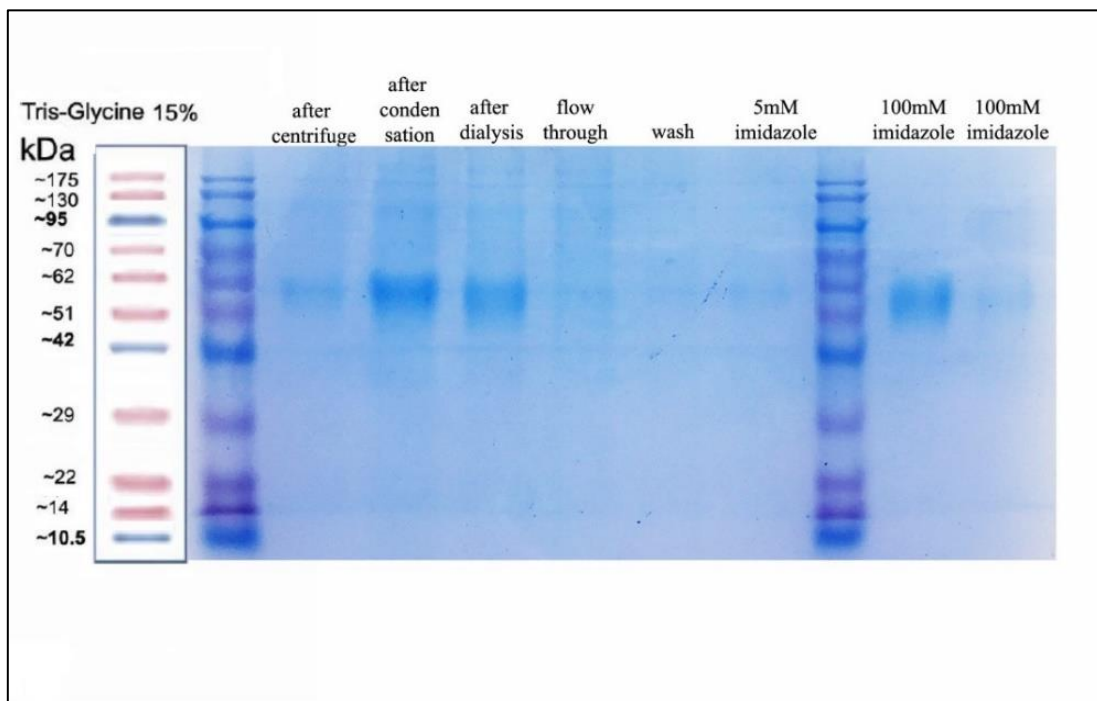
Στο στάδιο του καθαρισμού της καλλιέργειας και της απομόνωσης της πρωτεΐνης, η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αξιοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της ύπαρξης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα διάφορα στάδια που μεσολαβούν από την παραγωγή της μέχρι και την παραλαβή της μετά την απομόνωσή της.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στα ακόλουθα στάδια:

- Λήψη υπερκείμενου υγρού μετά την φυγοκέντρηση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πριν τον καθαρισμό της (after centrifuge).
- Λήψη δείγματος μετά το πέρας της υπερδιήθησης από το συμπυκνωμένο διάλυμα (after condensation), αλλά και από το κλάσμα που διαχωρίστηκε διερχόμενο από τις μεμβράνες (flow through).
- Μετά την πρώτη εξισορρόπηση με ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης με ρυθμιστικό διάλυμα Talon (after dialysis).
- Κατά την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από την χρωματογραφική στήλη συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) ελήφθη δείγμα από ρευστό που εκλούεται κατά την έκπλυση με ρυθμιστικό Talon (wash), αλλά και δείγματα κατά την έκπλυση με ρυθμιστικό Talon με συγκέντρωση Ιμιδαζολίου 5 mM και 100 mM.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρηση παρουσιάζεται στην εικόνα 4.6. Σε αυτό, τέσσερα από τα μελετούμενα δείγματα φαίνεται ότι διαθέτουν από μια μοναδική πρωτεϊνική ζώνη (protein band). Οι ζώνες βρίσκονται στο ίδιο ύψος, στην περιοχή μοριακού βάρους 51-62 kDa. Στα δείγματα, μετά την συμπύκνωση (after condensation), μετά την εξισορρόπηση (after dialysis), αλλά και στην πρώτη έκλυση με ρυθμιστικό Talon 100 mM Ιμιδαζόλιο οι ζώνες έχουν όμοια ένταση, μεγαλύτερη από την ζώνη του υπερκείμενου της καλλιέργειας μετά τη φυγοκέντρηση (after centrifuge). Η εμφάνιση μοναδικών ζωνών για κάθε δείγμα καθώς και το γεγονός ότι αυτές βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο μοριακού βάρους επιβεβαιώνει τόσο την ύπαρξη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, όσο και την καθαρότητα της στο δείγμα. Όσον αφορά την ένταση των ζωνών, δεδομένου ότι κάθε πρωτεϊνικό δείγμα έχει ίδιο όγκο, η ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης

της σε αυτό. Έτσι, η διαφορά πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μεταξύ δυο δειγμάτων θα αποτυπώνεται στην διαφορά χρωματικής έντασης των δυο αντίστοιχων ζωνών τους. Με βάση το παραπάνω, επιβεβαιώνεται η επιτυχία της συμπύκνωσης με υπερδιήθηση καθώς υπάρχει σημαντική διαφορά στην ένταση των ζωνών μεταξύ του δείγματος πριν (after centrifuge) και μετά από αυτή (after condensation), το οποίο υποδηλώνει αύξηση της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος. Η απώλεια πρωτεΐνης στο στάδιο της υπερδιήθησης (flow through) αλλά και της απομόνωσης σε χρωματογραφική στήλη (wash & 5 mM Imidazole) είναι μηδαμινή, καθώς οι ζώνες στα αντίστοιχα δείγματα είναι οριακά ανιχνεύσιμη. Τέλος, από την σύγκριση των πήκτωμάτων έκπλυσης με διάλυμα Talon και Ιμιδαζολίου, φαίνεται ότι σχεδόν όλη η ποσότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης αποδεσμεύτηκε από την στήλη κατά την πρώτη έκλυση με 100 mM Ιμιδαζόλιο, όπως επιβεβαιώνεται και από την απορρόφηση των δειγμάτων στα 280 nm του πίνακα 4.1.

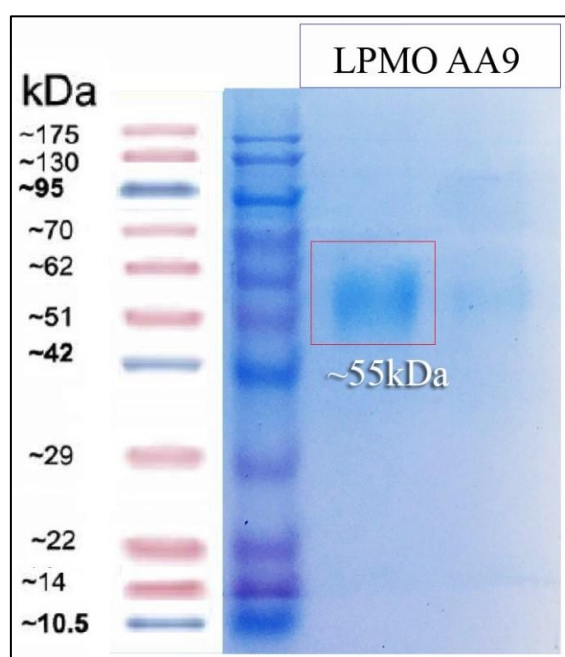


Εικόνα 4.6. Η εμφάνιση των διαχωρισμένων πρωτεϊνικών ζωνών στο πήκτωμα SDS-PAGE. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε ένα δείγμα, ενώ αριστερά διακρίνεται ένα πρότυπο δείγμα πρωτεϊνών (ladder) γνωστού μοριακού βάρους για την ανίχνευσης του μοριακού βάρους των μελετούμενων πρωτεϊνών

4.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του ανασυνδυασμένου ενζύμου LPMO AA9

4.4.1 Εύρεση του μοριακού βάρους της παραληφθείσας πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE

Μετά την απομόνωση και την παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE για την εύρεση του μοριακού της βάρους. Στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπως αυτά αποτυπώνονται στην εικόνα 4.7, διακρίνεται ο σχηματισμός μιας ζώνης σε μοριακό βάρος που ισοδυναμεί περίπου με 55 kDa. Η ύπαρξη μιας μοναδικής ζώνης δείχνει την καθαρότητα του διαλύματος με την ύπαρξη ενός μόνο πρωτεϊνικού μορίου που έχει αυτό το μοριακό βάρος. Με βάση το βιοπληροφορικά υπολογισμένο θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης στα 34.28 kDa, το μοριακό βάρος των 55 kDa που ανιχνεύεται στο πήκτωμα είναι κατά πολύ μεγαλύτερο. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα δυο μοριακά βάρη είναι αναμενόμενη, καθώς η παραληφθείσα πρωτεΐνη είναι γλυκοζυλιωμένη, κάτι το οποίο δεν λαμβάνεται υπόψιν κατά την βιοπληροφορική ανάλυση. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ο βαθμός και το είδος της γλυκοζυλίωσης και κατά συνέπεια η προσέγγιση του μοριακού βάρους των προστιθέμενων πολυσακχαριτών δεν μπορεί να προβλεφθεί βιοπληροφορικά, ενώ όσον αφορά τις πρωτεΐνες που παραλήφθηκαν είναι πιθανό να εμφανίζονται διακυμάνσεις ανάμεσα τους ως προς τη γλυκοζυλίωση. Για αυτό το λόγο, με σκοπό τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους πριν την γλυκοζυλίωση, ένα πρωτεϊνικό δείγμα υπόκειται στη συνέχεια σε απογλυκοζυλίωση και εκ νέου ηλεκτροφόρηση.

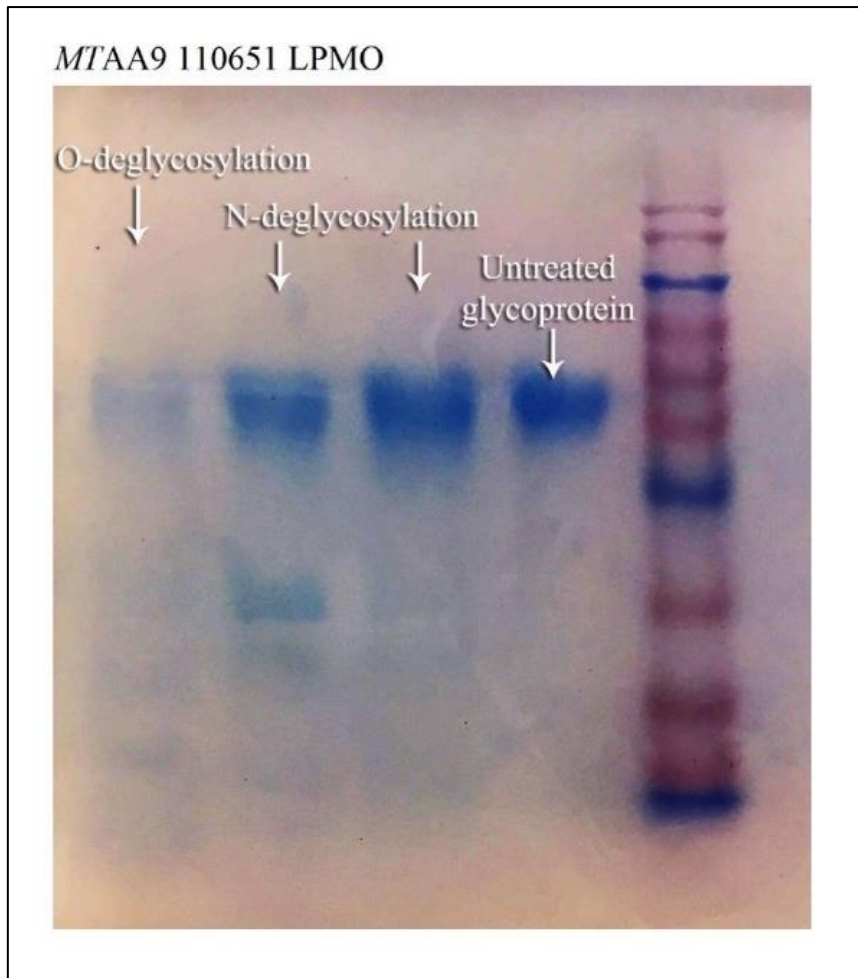


Εικόνα 4.7 Αποτέλεσμα της ανάλυσης του μοριακού βάρους της παραληφθείσας πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE. Σε αυτό διακρίνεται μια πρωτεϊνική ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 55 kDa.

4.4.2 Έλεγχος του μοριακού βάρους της γλυκοζυλιωμένης και απογλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της ύπαρξης και του βαθμού των O- ή N- γλυκοζυλιώσεων κατά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ευκαρυωτικών κυττάρων ζύμης *P. pastoris* που αυξάνουν το μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού μορίου με την προσθήκη σακχάρων σε αυτό. Για την εφαρμογή της μεθόδου έγινε ταυτόχρονα έλεγχος τεσσάρων δειγμάτων. Ένα δείγμα με επεξεργασία O-απογλυκοζυλίωσης (O-deglycosilation), δυο δείγματα με επεξεργασία N-απογλυκοζυλίωσης (N-deglycosilation) (1:10 και 1:100) και ένα μη επεξεργασμένο δείγμα της παραληφθείσας πρωτεΐνης (Untreated glycoprotein).

Από τα αποτελέσματα στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης δεν φαίνεται ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία απογλυκοζυλίωσης έχει εφαρμογή σε αυτή την περίπτωση ενζύμου. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.8, οι σχηματισμένες πρωτεϊνικές ζώνες των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε απογλυκοζυλίωση βρίσκονται στο ίδιο ύψος με το μη επεξεργασμένο δείγμα πρωτεΐνης. Στην O-απογλυκοζυλίωση εμφανίζονται πρωτεϊνικές ζώνες αρκετά χαμηλής έντασης στα 55 kDa αλλά και σε χαμηλότερα μοριακά βάρη, οι οποίες είναι ενδεικτικές της απογλυκοζυλίωσης. Όμως, παρά την βεβαιότητα της ύπαρξης O-γλυκοζυλίωσης σε ένα ένζυμο που έχει παραχθεί με ετερόλογη έκφραση από έναν ευκαρυωτικό οργανισμό που επιτελεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η ζύμη *P. pastoris*, τα αποτελέσματα δεν προσφέρονται για περαιτέρω συμπεράσματα και πιθανώς απαιτείται βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της αντίδρασης. Όσον αφορά την N-απογλυκοζυλίωση δεν αναμενόταν κάποια σημαντική διαφορά από το γλυκοζυλιωμένο ένζυμο καθώς βιοπληροφορικά εντοπίζετα μονο μια θέση αυτής της γλυκοζυλίωσης, συνεπώς δεν επηρεάζει το μοριακό βάρος του μορίου σε σημαντικό βαθμό. Ανάμεσα στα δυο δείγματα N-απογλυκοζυλίωσης, αυτό που τοποθετείται αριστερά περιέχει μια δεύτερη ζώνη με χαμηλότερο μοριακό βάρος (περίπου στα 30 kDa). Αυτό είναι αναμενόμενο και οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο δείγμα διαθέτει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (1:10) το ένζυμο N-απογλυκοζυλίωσης μοριακού βάρους 29 kDa, έναντι αυτής που διακρίνεται δεξιά στην οποία η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ μικρότερη (1:100) και δεν σχηματίζει ευδιάκριτη ζώνη.

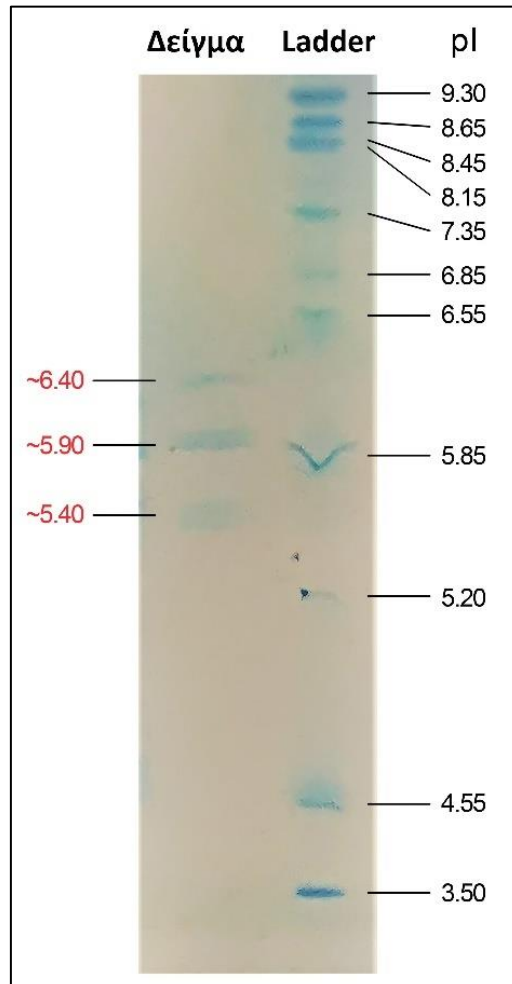


Εικόνα 4.8. Αποτελέσματα της εμφάνισης των πρωτεϊνικών ζωνών στο πήκτωμα SDS-PAGE για τον έλεγχο O- και N- γλυκοζυλίωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

4.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για την εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου (IEF-PAGE)

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης έγινε με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (IEF-PAGE). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στην εικόνα 4.9 και έδειξαν τρεις ζώνες που αντιστοιχούν σε ισοηλεκτρικά σημεία με τιμές 5.4, 5.9 και 6.4. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο και οφείλεται ύπαρξη πολλαπλών προτύπων γλυκοζυλίωσης από το σύστημα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της ζύμης *P. pastoris*. Με αυτό τον τρόπο κατά την ετερόλογη έκφραση παράγονται ισομορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που έχουν ίδια δομή αλλά διαφέρουν μόνο στον αριθμό και τον τύπο των γλυκανών που έχουν προστεθεί σε αυτές κατά την γλυκοζυλίωση τους. Η ετερογένεια ως προς τον τρόπο

γλυκοζυλίωσης αποτυπώνεται σε μικρή διαφοροποίηση του ισοηλεκτρικού σημείου των περιεχόμενων πρωτεϊνικών μορίων. Ο υπολογισμός του θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου ίσο με 5.95 επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης καθώς βρίσκεται εντός του εύρους pI που προσδιορίστηκε στο πήκτωμα.



Εικόνα 4.9 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης IEF-PAGE. Δεξιά διακρίνεται το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστών ισοηλεκτρικών σημείων (Ladder) και αριστερά η ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού δείγματος. Σε αυτό διακρίνονται οι τρεις ζώνες που σχηματίστηκαν σε τιμές pI 5.4, 5.9 και 6.4

4.4.4 Ανίχνευση ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών

Η ανίχνευση των υποστρωμάτων στα οποία η AA9 LPMO της αλληλουχίας MYCTH_110651 εμφανίζει ενεργότητα, αλλά και η διερεύνηση του είδους της οξειδωτικής δράσης της πραγματοποιήθηκε με την διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων σε δέκα υποστρώματα πολυσακχαριτών. Κάθε ενζυμική αντίδραση περιείχε το ένζυμο, το υπόστρωμα, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ασκορβικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για την δράση των LPMOs. Μετά την επώαση των αντιδράσεων, τα δείγματα αναλύθηκαν ποιοτικά ως προς το είδος των σχηματισμένων οξειδωμένων προϊόντων με την μέθοδο της χρωματογραφίας εναλλαγής ιόντων (HPLC-PAD). Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά δείγματα (blank) ίδιας σύστασης που δεν περιέχουν το ένζυμο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για κάθε υπόστρωμα αποτυπώνονται σε ένα διάγραμμα κορυφών που προκύπτουν από το δυναμικό ανίχνευσης (nC) συναρτήσει του χρόνου έκλυσης (elution time-minutes), με τις κορυφές αυτές να αντιστοιχούν στους επιμέρους υδατάνθρακες του προς ανάλυση διαλύματος. Ο χρόνος έκλυσης είναι χαρακτηριστικός κάθε ένωσης, καθώς η μέθοδος διαχωρισμού της χρωματογραφίας βασίζεται στο φορτίο κάθε σχηματιζόμενου ανιοντικού σακχάρου, το οποίο εξαρτάται έμμεσα από τα δομικά του χαρακτηριστικά, όπως ο βαθμός πολυμερισμού, οι ομάδες υδροξυλίων κ.α.

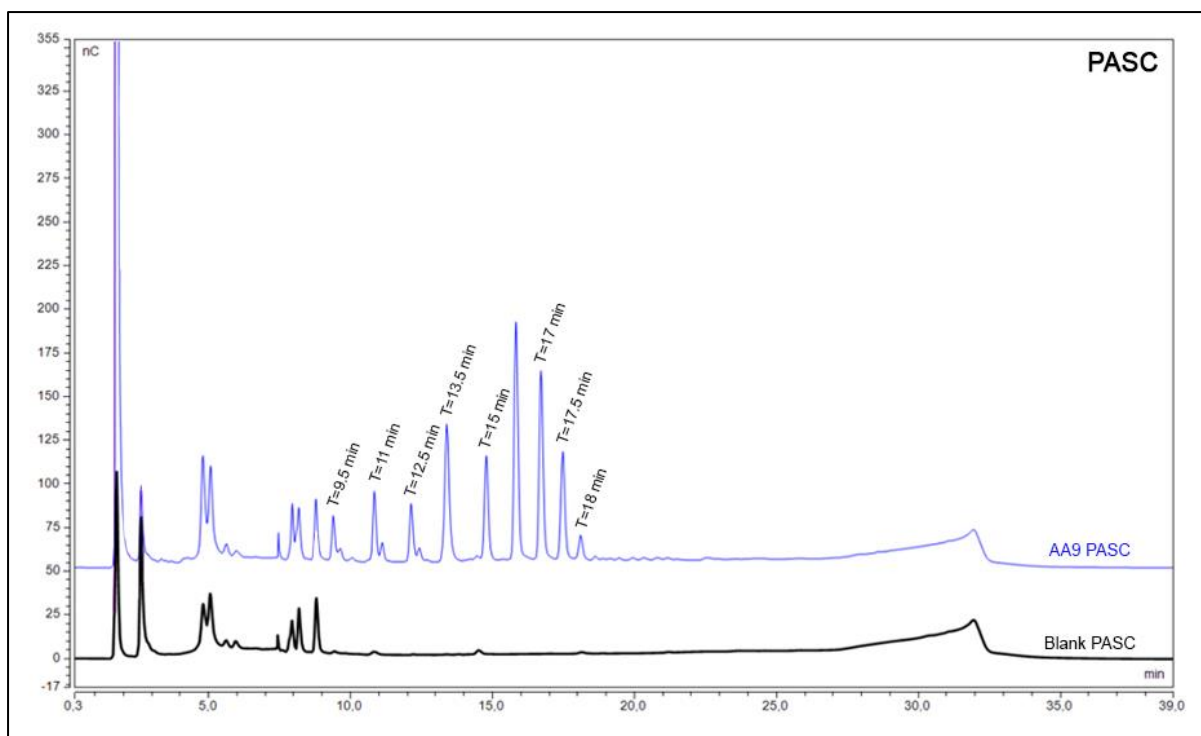
Η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν αποσκοπεί στην ποσοτικοποίηση και την ταυτοποίηση των οξειδωμένων προϊόντων της ενζυμικής δράσης, αλλά περιορίζεται στην ανίχνευση δυο χαρακτηριστικών, αυτών της ύπαρξης ενζυμικής ενεργότητας στο υπο δοκιμή υπόστρωμα και του είδους της οξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης που ερευνάται. Κατά συνέπεια, στα διαγράμματα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διερευνάται σε πρώτο χρόνο η εμφάνιση χαρακτηριστικών κορυφών που δεν σχηματίζονται στο τυφλό δείγμα, οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη προϊόντων, δηλαδή την ύπαρξη ενεργότητας της LPMO στο εκάστοτε υπόστρωμα. Στη συνέχεια, μελετάται ο χρόνος έκλυσης στον οποίο εμφανίζεται η κάθε κορυφή. Στην αρχή, ως είθισται, εκλούνται ολιγοσακχαρίτες που δεν σχετίζονται με την δράση των ενζύμων αφού εμφανίζονται και στο διάγραμμα του τυφλού δείγματος αλλά, ενώ στη συνέχεια ακολουθούν οι οξειδωμένοι ολιγοσακχαρίτες. Από αυτούς πρώτα σχηματίζονται οι κορυφές για τα C1-οξειδωμένα προϊόντα και στη συνέχεια σε διακριτούς χρόνους ακολουθούν τα C4-οξειδωμένα προϊόντα, ενώ τέλος, σε περίπτωση που υπάρχουν, εκλούνται προϊόντα που διέπονται ταυτόχρονα από C1 και C4 οξείδωση. Ειδικότερα, όσον αφορά μόνο τα υποστρώματα με βάση την κυτταρίνη (ή την γλυκόζη), σε χρόνο έκλυσης περίπου μεταξύ 12.5-17 min αναμένονται κορυφές για τα C1-οξειδωμένα σάκχαρα, ενώ μεταξύ 20-30 min αναμένεται η έκλυση των C4-οξειδωμένων σακχάρων (Isaksen et al., 2014).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στη συνέχεια υπο μορφή διαγραμμάτων έκλυσης για κάθε υπόστρωμα. Η καμπύλη μαύρου χρώματος αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα με την καμπύλη μπλε χρώματος να ανήκει στη δράση του ενζύμου AA9. Κάθε κορυφή έκλυσης που δεν εμφανίζεται στο αντίστοιχο διάγραμμα του τυφλού δείγματος επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα ή αναφέρεται ο χρόνος έκλυσης της. Όπως παρατηρείται

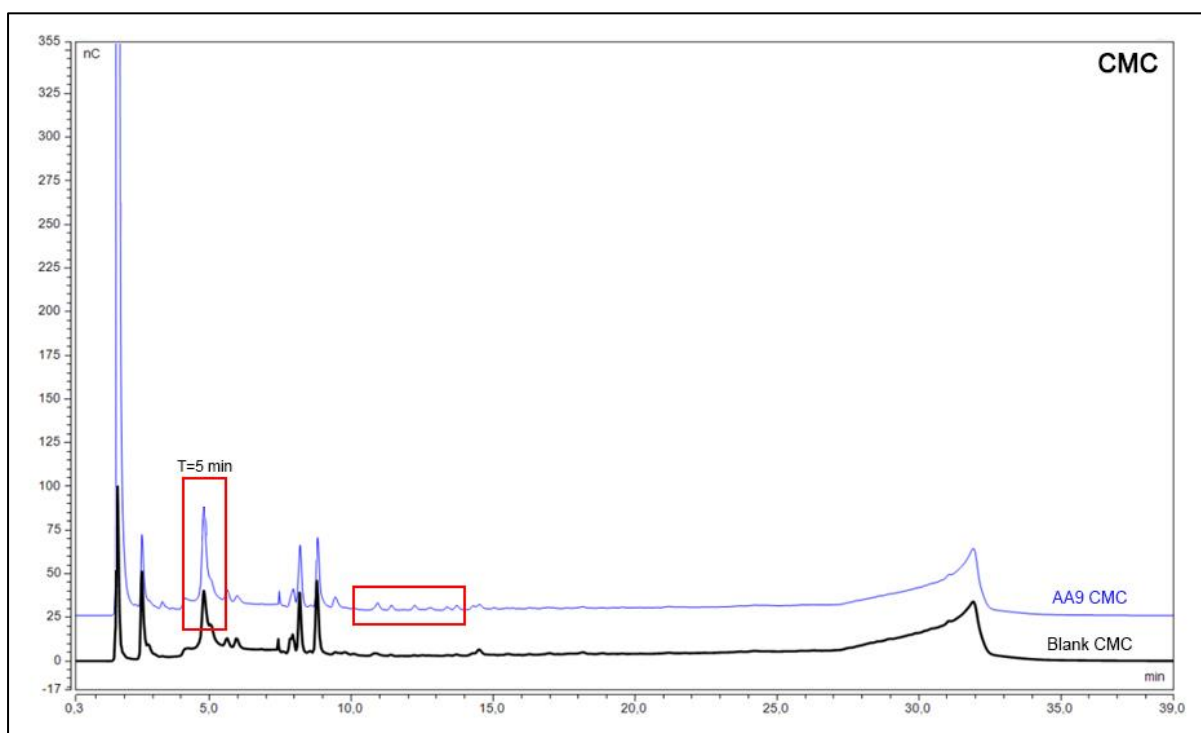
στα διαγράμματα, τέτοιες κορυφές σχηματίζονται στα αποτελέσματα της ανάλυσης των υποστρωμάτων PASC, CMC, ξυλογλυκάνη και άμυλο. Όμως, μόνο στο υπόστρωμα PASC εντοπίζονται κορυφές στην χρονική περιοχή που αντιστοιχεί σε προϊόντα C1-οξειδωτικής δράσης, ενώ πουθενά δεν υπάρχει ένδειξη C4-οξειδωμένων προϊόντων. Έτσι, οι υπόλοιπες αντίστοιχες κορυφές ανήκουν σε άλλα σάκχαρα και προϊόντα με χρόνους έκλυσης μικρότερους των 12.5 min, όπως για παράδειγμα η γλυκόζη η οποία εκλύεται σε χρόνο 5 min.

Ειδικότερα, στο υπόστρωμα PASC, κυτταρίνη διογκωμένη με φωσφορικό οξύ, εντοπίζεται με βεβαιότητα πολύ ισχυρή δράση της AA9 LPMO με σχηματισμό τεσσάρων κορυφών εντός του εύρους των C1-οξειδωμένων προϊόντων σε χρόνους 13.5, 15, 16, 17 min. Όσον αφορά το υπόστρωμα της ξυλογλυκάνης, υπάρχουν δυο κορυφές σε χρόνους 5 και 11 min που ίσως αντιστοιχεί σε κάποιο προϊόν. Στα αποτελέσματα της ανάλυσης του δείγματος του υποστρώματος CMC σχηματίζονται οριακά πολύ μικρές κορυφές σε χρόνους έκλυσης οξειδωμένων προϊόντων και συνεπώς δεν αξιολογείται ότι εντοπίζεται ενεργότητα της LPMO σε αυτό. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα έκλυσης του δείγματος του αμύλου υπάρχει μια πιθανή κορυφή εντός της περιοχής C1-οξειδωμένων προϊόντων σε χρόνο 15.5 min. Η ενεργότητα στο άμυλο έχει επιβεβαιωθεί για τις LPMOs της οικογένειας AA13 και δεν αποτελεί σύνηθες υπόστρωμα ενεργότητας των AA9, χωρίς αυτό όμως να αποκλείει ότι δεν υπάρχει κάποια AA9 με δράση στο άμυλο. Τέλος, στα εναπομείναντα υποστρώματα χιτίνη, β-γλυκάνη, αραβινοξυλάνη σίτου, γλυκομαννάνη, γαλακτομαννάνη και ξυλάνη οξιάς δεν διακρίνεται καμία κορυφή διαφορετική από το αντίστοιχο τυφλό δείγμα.

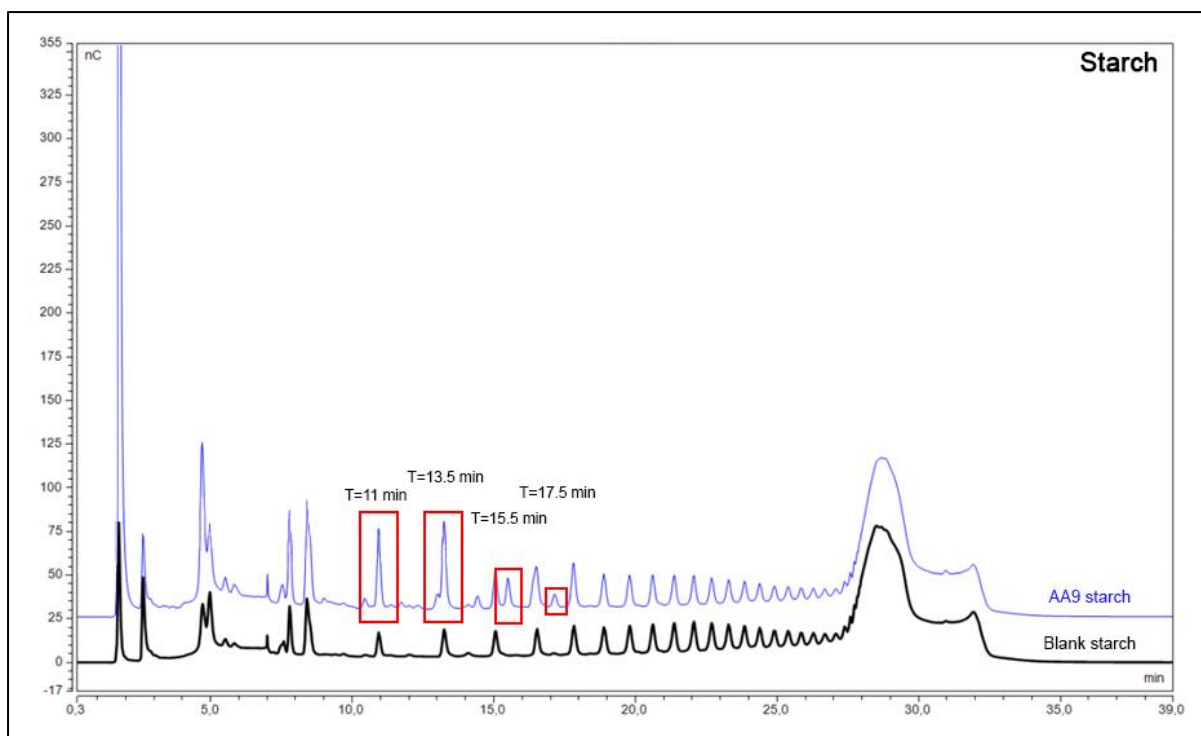
Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το μελετούμενο ένζυμο LPMO έχει ισχυρή ενεργότητα στο υπόστρωμα επεξεργασμένης κυτταρίνης με φωσφορικό οξύ – PASC. Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων όσον αφορά την ενεργότητα του ενζύμου στα πιθανά υποστρώματα απαιτείται περαιτέρω έρευνα, όπως η ταυτοποίηση των παραγόμενων προϊόντων με μεθόδους φασματομετρίας μάζας (MS). Όσον αφορά την εξειδίκευση της οξειδωτικής δράσης, τα αποτελέσματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι το μελετούμενο ένζυμο έχει αποκλειστικά C1-οξειδωτική δράση.



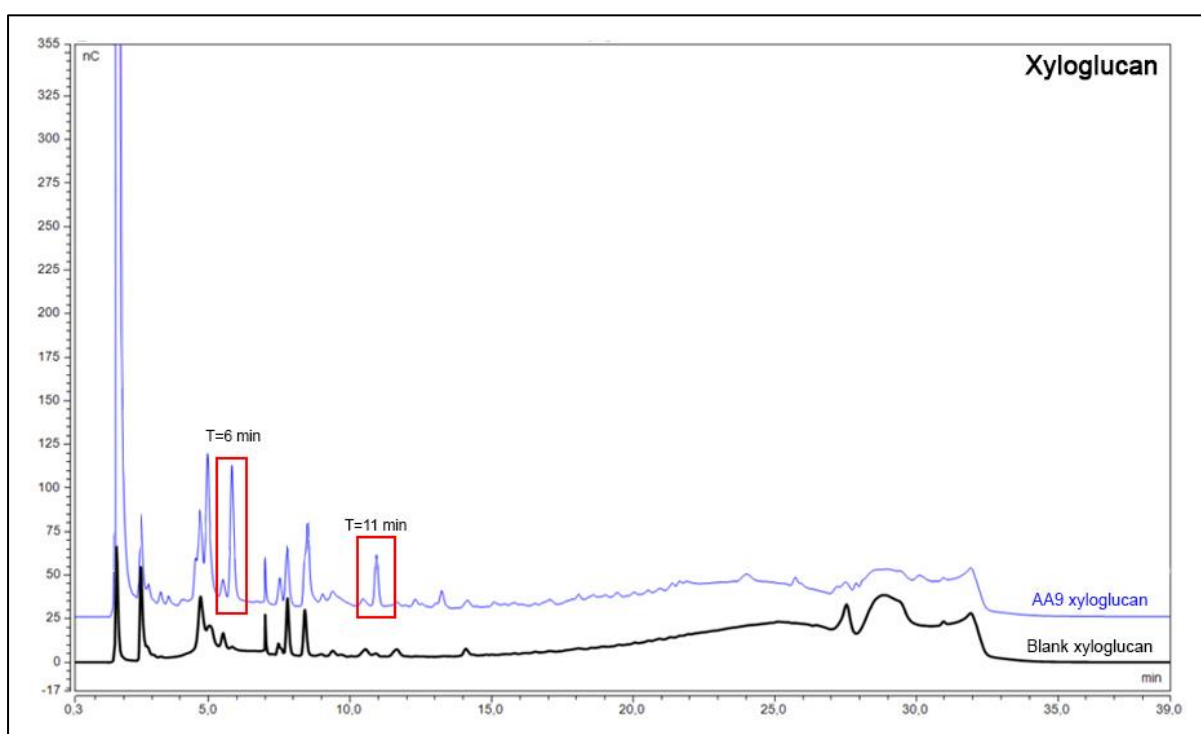
Διάγραμμα 4.3 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης προϊόντων στο υπόστρωμα PASC.



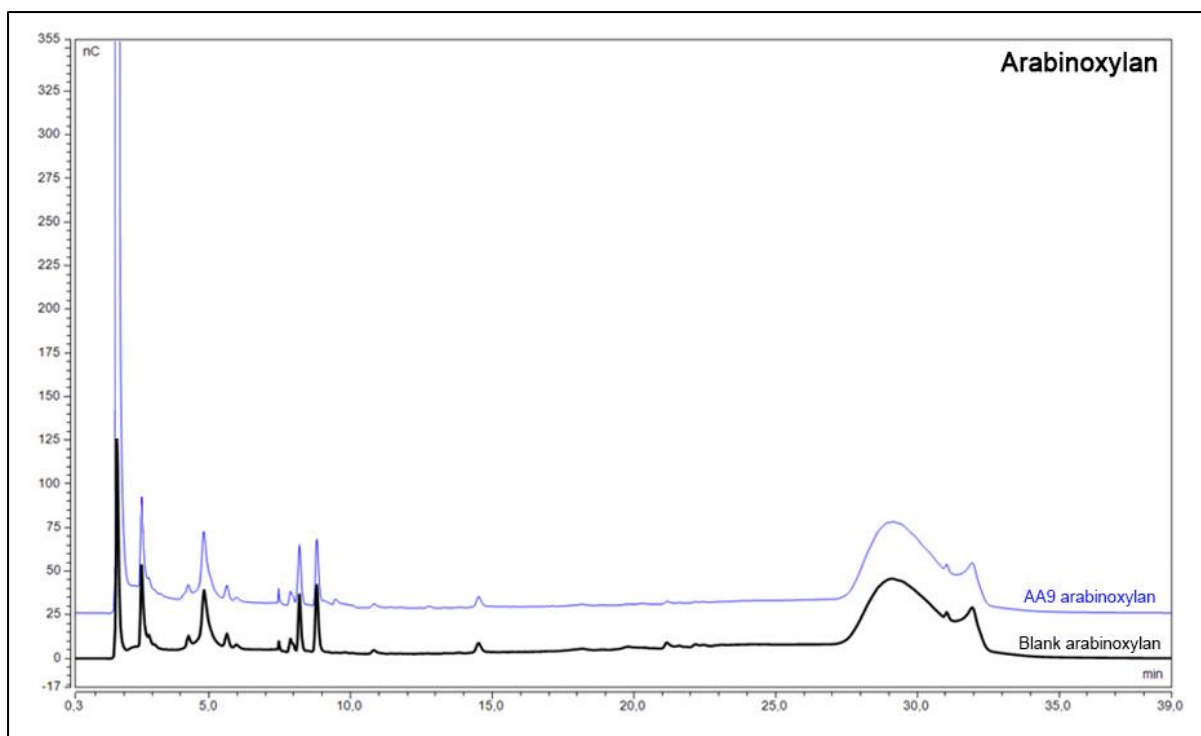
Διάγραμμα 4.4 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα CMC.



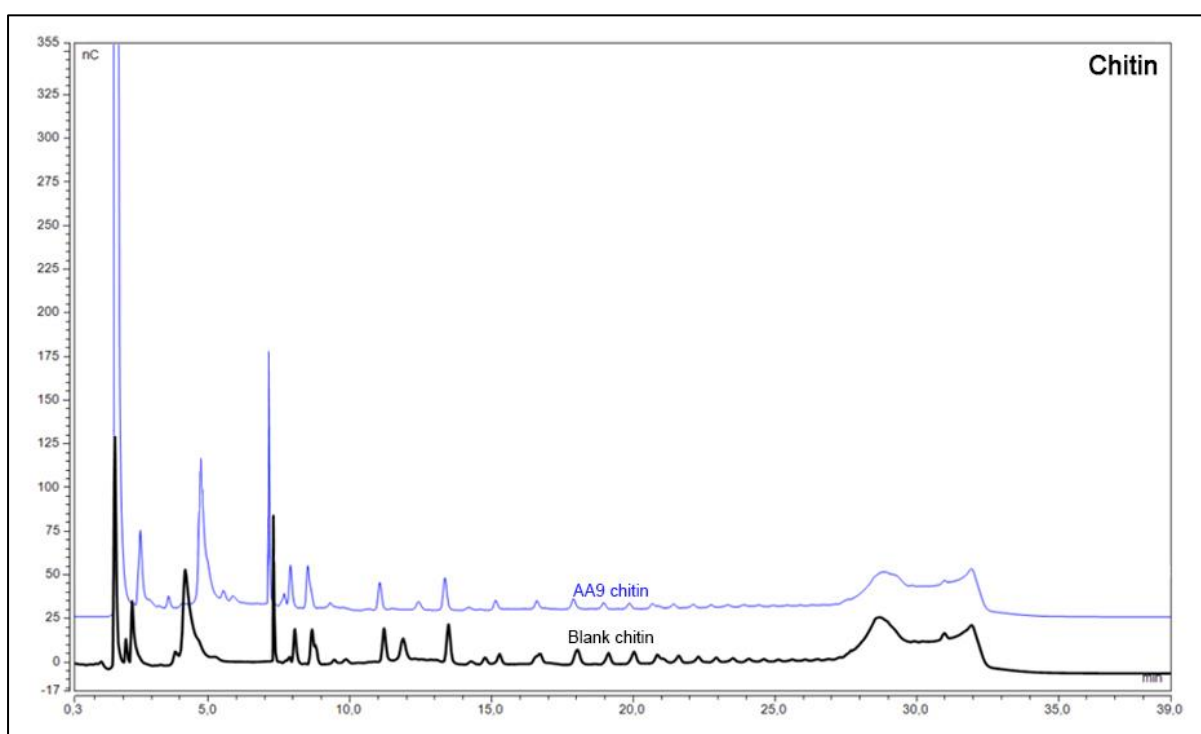
Διάγραμμα 4.5 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα ξυλογλυκάνη.



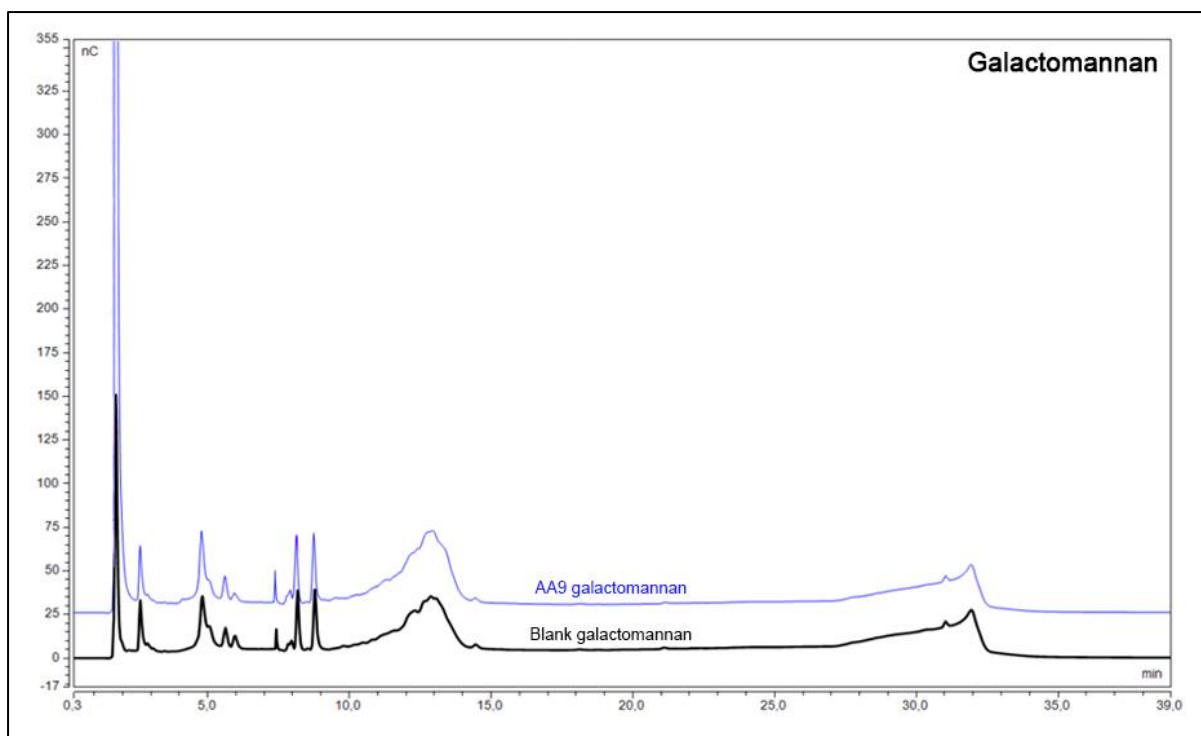
Διάγραμμα 4.6 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα άμυλο.



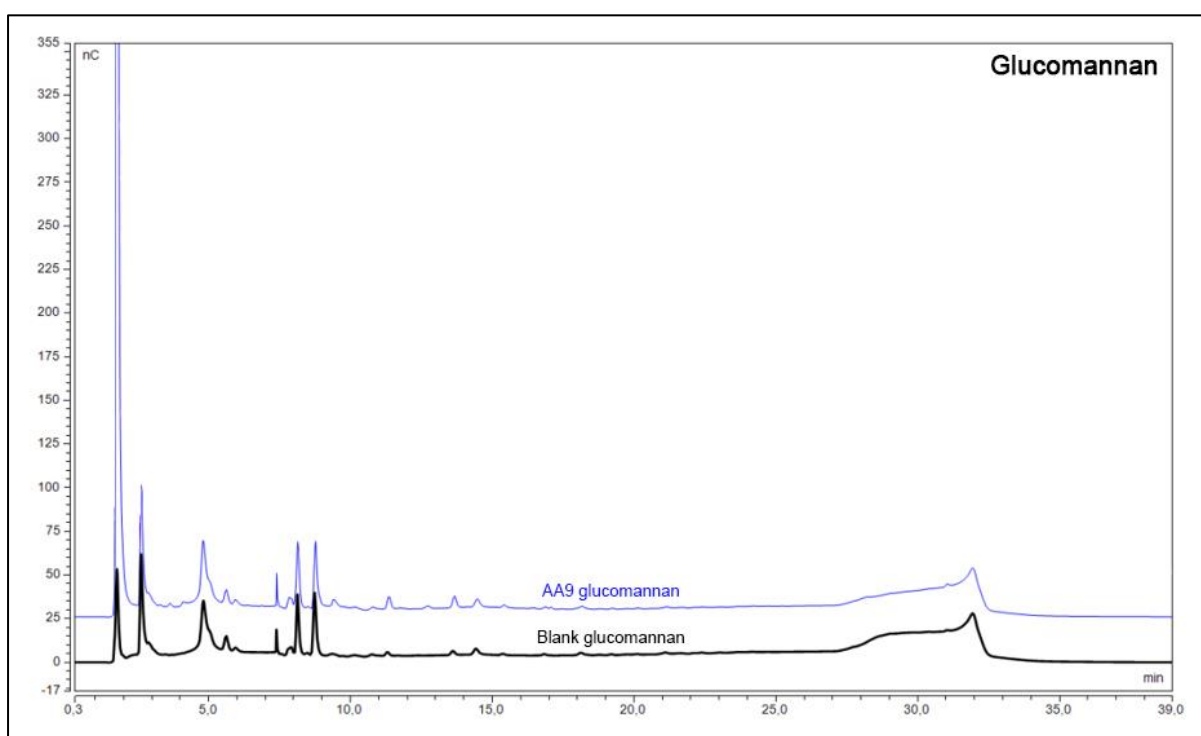
Διάγραμμα 4.7 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα αραβινοξυλάνη σίτου.



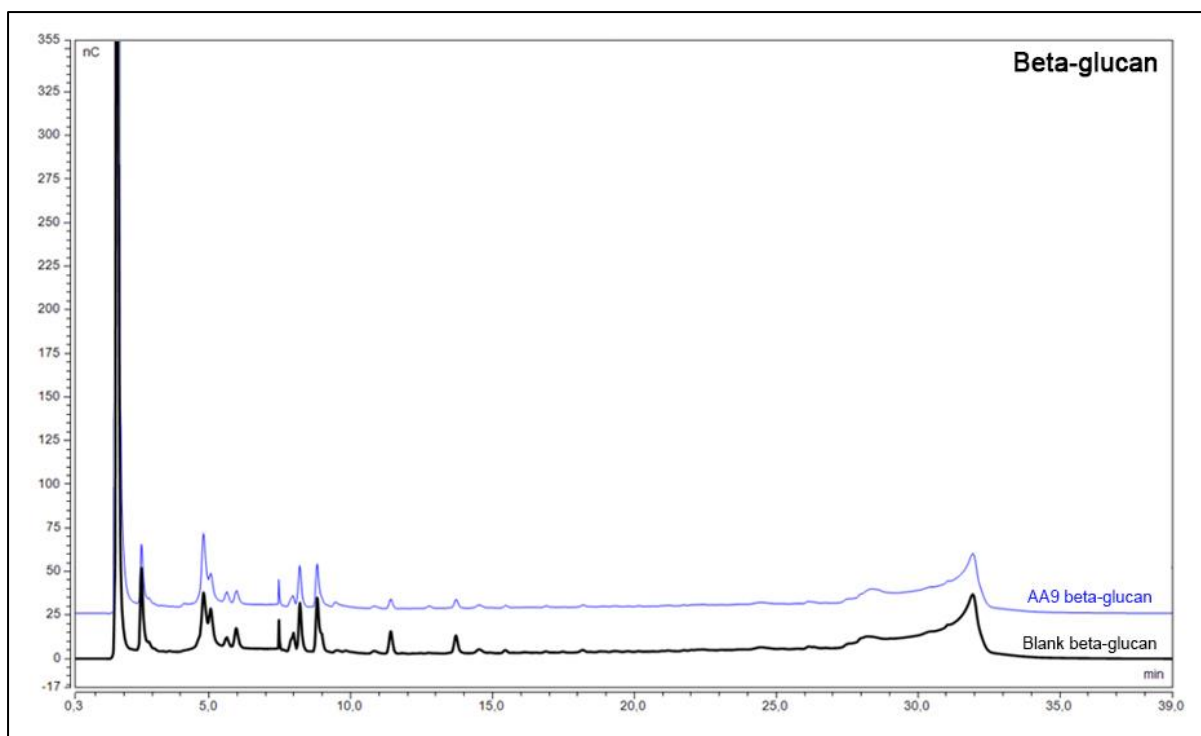
Διάγραμμα 4.8 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα χιτίνη.



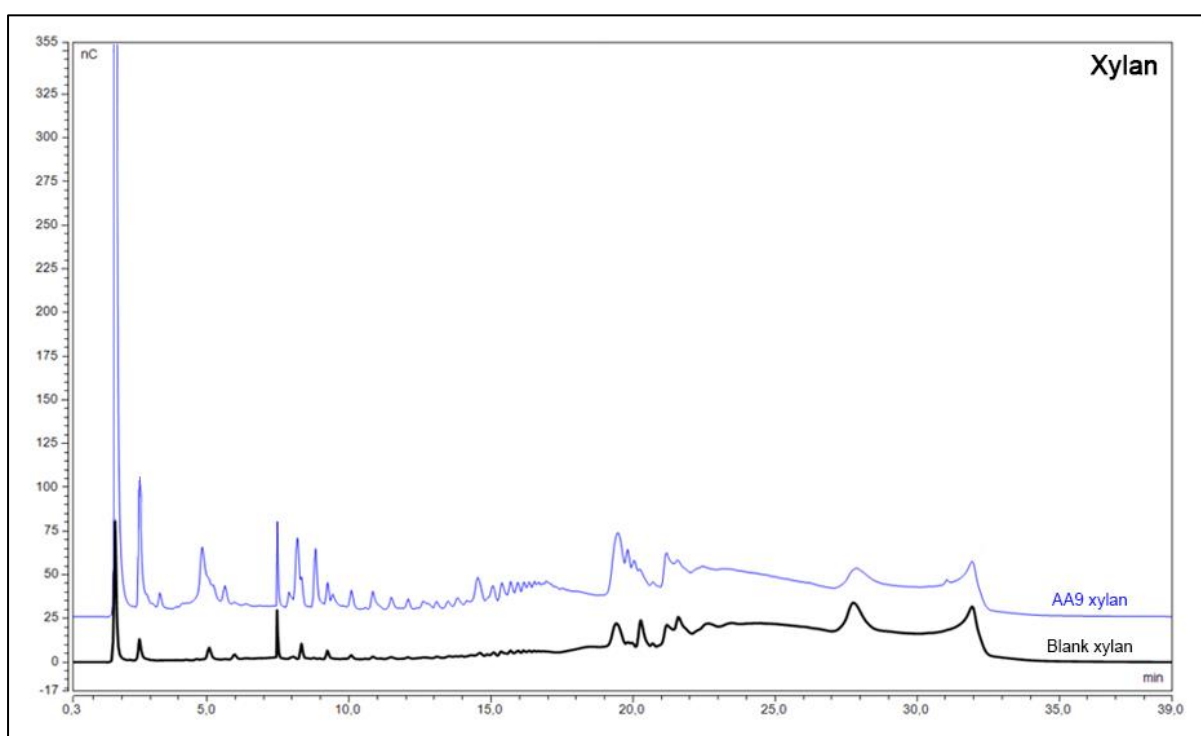
Διάγραμμα 4.9 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα γαλακτομαννάνη.



Διάγραμμα 4.10 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα γλυκομαννάνη.



Διάγραμμα 4.11 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα β-γλυκάνη.



Διάγραμμα 4.12 Αποτελέσματα της ανάλυσης ΗΡΑΕ-PAD των προϊόντων της ενζυμικής δράσης στο υπόστρωμα ξυλάνη.

4.4.5 Επιβεβαίωση της ύπαρξης ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με φασματοφωτομετρική μέθοδο

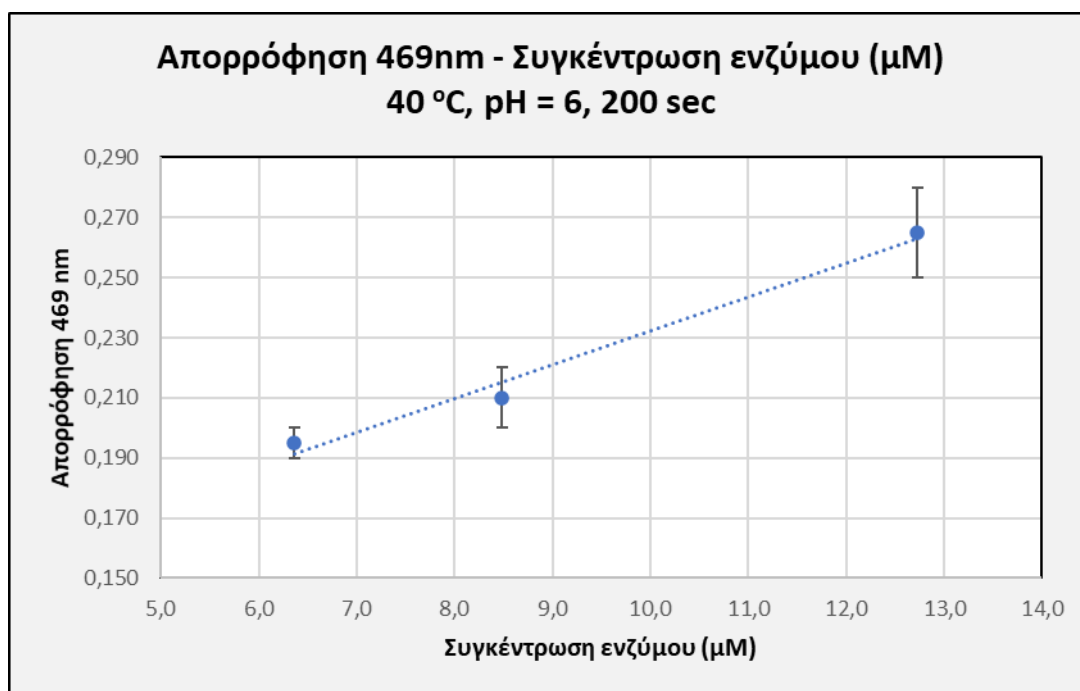
Η επιβεβαίωση της ύπαρξης ενζυμικής ενεργότητας της ανασυνδυασμένης LPMO πραγματοποιήθηκε στο σύνθετο υπόστρωμα 2,6-DMP με μια φασματοφωτομετρική μέθοδο που εκμεταλλεύεται την ιδιότητα υπεροξυγενάσης της LPMO, δηλαδή την ικανότητα της να δέχεται ηλεκτρόνια από ένα μόριο-δότη, παρουσία H_2O_2 ως συμπαράγοντα. Έτσι, η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει γρήγορα και αποτελεσματικά την ποσότητα παραγόμενου προϊόντος από την καταλυτική δράση της LPMO στο υπόστρωμα 2,6-DMP. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να συνδεθεί με την μέτρηση της ενεργότητας σε υποστρώματα πολυσακχαριτών, όμως αποτελεί έναν κλασικό τρόπο μέτρησης της ενεργότητας υπεροξυγενασών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο βιοχημικό χαρακτηρισμό των LPMOs.

Κατά την πειραματική διαδικασία έγινε προσδιορισμός της καμπύλης απορρόφησης παραγόμενου προϊόντος σε συνάρτηση με το χρόνο με μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος σε πολλές χρονικές στιγμές για συνολική διάρκεια αντίδρασης 10 λεπτών. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τέσσερα δείγματα με διπλές αντιδράσεις, ένα τυφλό δείγμα και τρία δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου γνωστής αναλογίας, όπως αναφέρεται στον πίνακα 4.2. Το τυφλό δείγμα αντί για ένζυμο περιείχε το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 30 mM.

Στις καμπύλες αντίδρασης που ελήφθησαν από την φωτομέτρηση των δειγμάτων σε χρονική διάρκεια 10 λεπτών εντοπίζεται η φάση της αντίδρασης, όπου υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ συγκέντρωσης προϊόντος και χρόνου. Αυτή η ευθεία αντιστοιχεί στην γραμμική περιοχή (linear range) ή φάση σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state phase) της αντίδρασης του ενζύμου. Εκεί ο ρυθμός της καταλυτικής δράσης είναι σταθερός και μπορεί να υπολογιστεί αφού ισούται με την κλίση της ευθείας V_0 (moles παραγόμενου προϊόντος/sec). Για την εξαγωγή της συσχέτισης μεταξύ της απορρόφησης των προϊόντων και της συγκέντρωσης του ενζύμου επιλέγεται ο χρόνος 200 sec = 3.33 min και λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 469nm (OD_{469nm}) και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων κάθε δείγματος. Για τα τρία ζεύγη τιμών Απορρόφησης OD_{469nm} –Συγκέντρωσης ενζύμου πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρόμηση με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων για την εξαγωγή της βέλτιστης ευθείας που προσαρμόζεται στα δεδομένα. Η ευθεία που προκύπτει καταδεικνύει την συσχέτιση των αποτελεσμάτων απορρόφησης της μεθόδου με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αποδεικνύεται ότι η μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας στο υπόστρωμα 2,6-DMP έχει εφαρμογή στο μελετούμενο ένζυμο και επιβεβαιώνει-ανιχνεύει την ύπαρξη ενεργότητας στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Πρέπει να σημειωθεί, ότι παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των σημείων της καμπύλης είναι πολύ μικρός για την εξαγωγή στατιστικά ασφαλών συμπερασμάτων, η μέθοδος είναι καλά χαρακτηρισμένη και συνεπώς δεν αναμένονται σημαντικές διαφοροποιήσεις των αποτελεσμάτων σε άλλες συγκεντρώσεις.

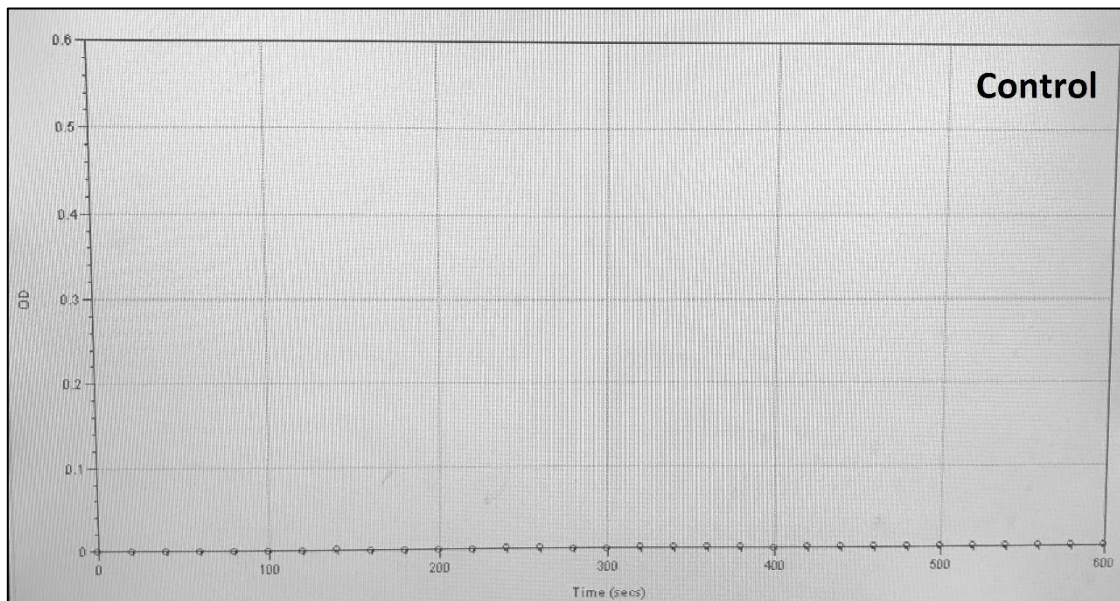
Πίνακας 4.2. Συγκέντρωση ενζύμου (μM) και τιμή απορρόφησης στα 469 nm κάθε δείγματος σε χρόνο αντίδρασης 200 sec.

Αριθμός Δείγματος	Συγκέντρωση ενζύμου (μM)	Απορρόφηση ($\text{OD}_{469\text{nm}}$)
1	12.73	0.265
2	8.48	0.210
3	6.36	0.195

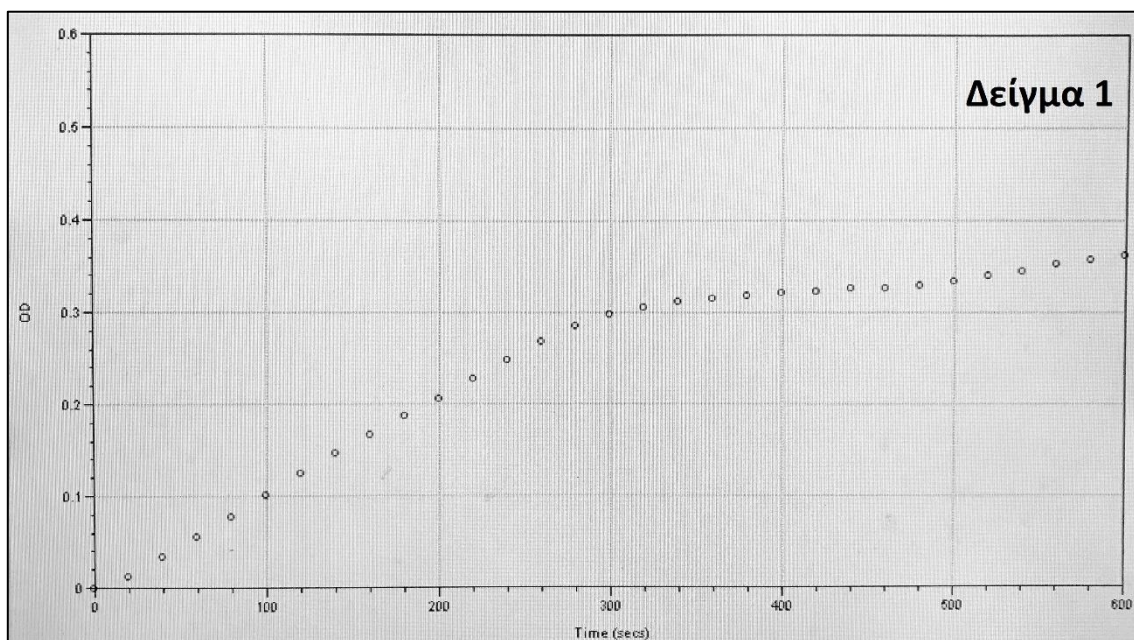


Διάγραμμα 4.13. Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων για την συσχέτιση της απορρόφησης στα 469nm με τη συγκέντρωση του ενζύμου (μM)

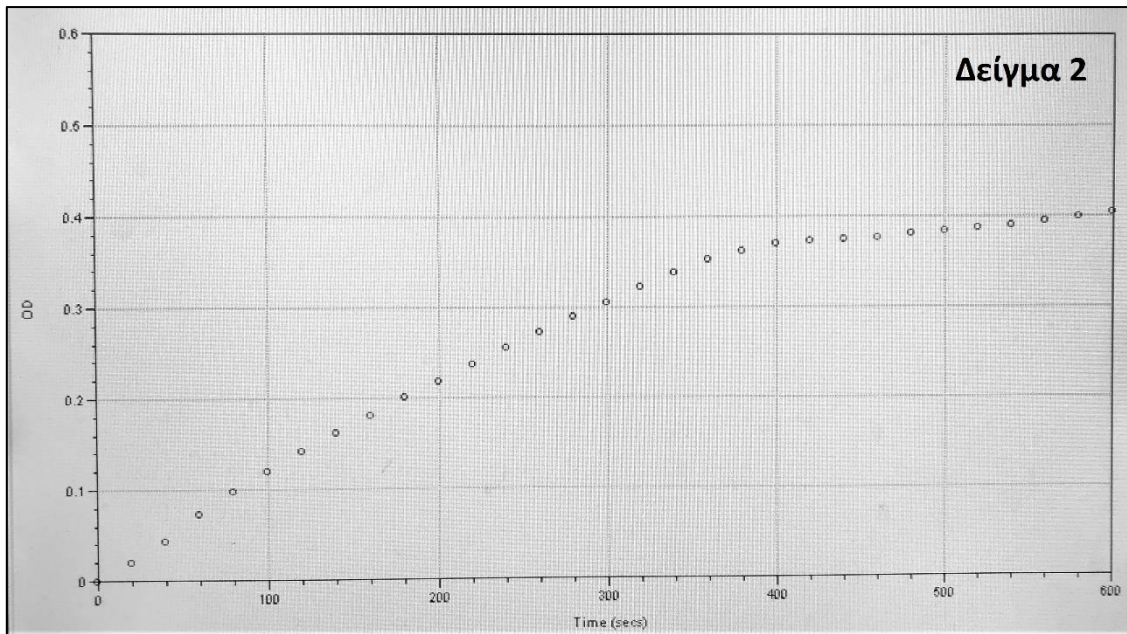
Ενδεικτικά, παρατίθενται οι καμπύλες απορρόφησης στα 469 nm συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για την μια από τις δυο αντιδράσεις κάθε δείγματος.



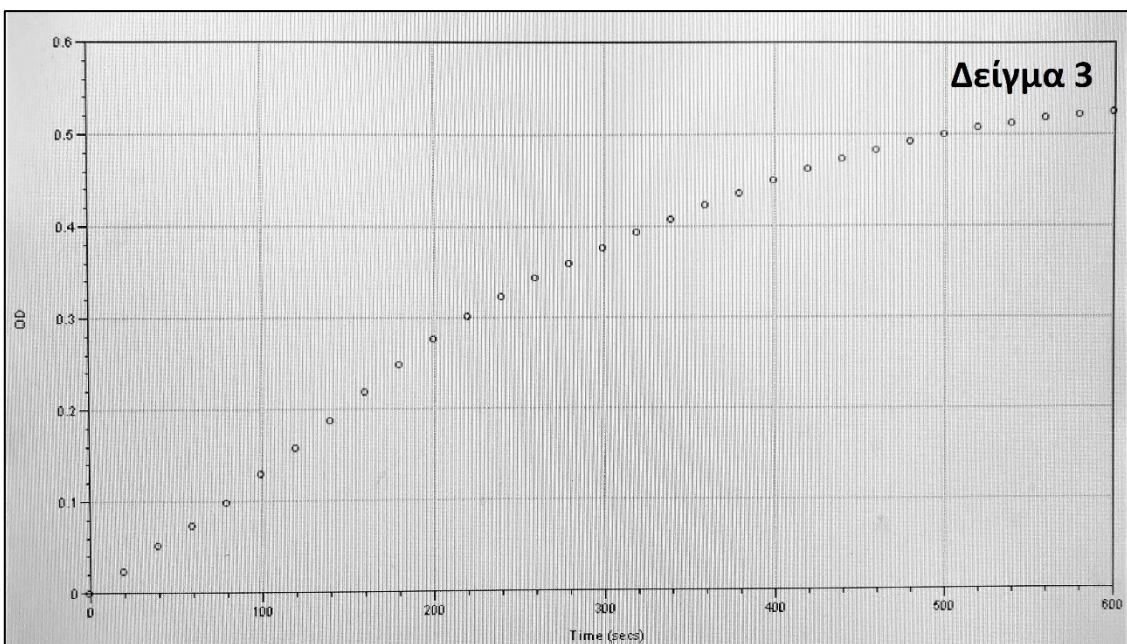
Διάγραμμα 4.14 Αποτελέσματα καμπύλης Απορρόφησης στα 469 nm για συνολικό χρόνο αντίδρασης 600 sec του τυφλού δείγματος.



Διάγραμμα 4.15 Αποτελέσματα καμπύλης Απορρόφησης στα 469 nm για για συνολικό χρόνο αντίδρασης 600 sec του δείγματος (1).



Διάγραμμα 4.17 Αποτελέσματα καμπύλης Απορρόφησης στα 469 nm για για συνολικό χρόνο αντίδρασης 600 sec του δείγματος (2).



Διάγραμμα 4.16 Αποτελέσματα καμπύλης Απορρόφησης στα 469 nm για για συνολικό χρόνο αντίδρασης 600 sec του δείγματος (3).

4.4.6 Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας στο υπόστρωμα 2,6-DMP

Η ενεργότητα της LPMO υπολογίζεται με βάση την μετρούμενη απορρόφηση στα 469 nm σε χρόνο αντίδρασης 200 sec και συνθήκες αντίδρασης 40 °C, pH = 6. Μονάδα μέτρησης της ενεργότητας είναι το Unit και 1 Unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τον σχηματισμό 1 μmol οξειδωμένου προϊόντος ανά λεπτό στις συγκεκριμένες συνθήκες. Η ενεργότητα του ενζύμου στο υπόστρωμα 2,6-DMP παρουσία υπεροξειδίου στις παραπάνω συνθήκες αντίδρασης υπολογίστηκε ίση με 0.00056 Units, ενώ η ειδική ενεργότητα ίση με 3.19 Units/g.

Η διαδικασία υπολογισμού έχει ως εξής:

- Αρχικά υπολογίζεται η συγκέντρωση του οξειδωμένου προϊόντος C με το νόμο Lambert-Beer: $C = \frac{A}{\epsilon l}$ όπου C σε mol/L, A = 0.27 η απορρόφηση του δείγματος (1) στα 469nm, $\epsilon = 53200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ η μοριακή απορροφητικότητα του οξειδωμένου προϊόντος και l = 0.67 cm το μήκος της οπτικής διαδρομής στην κυψελίδα:

$$C = \frac{A}{\epsilon l} = \frac{0.265}{53200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0.67 \text{ cm}} = 7.435 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$$

- Σε συνολικό όγκο αντίδρασης 250 μL η ποσότητα του οξειδωμένου προϊόντος σε μmol ισούται με:

$$7.435 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times 250 \mu\text{L} = 0.00186 \mu\text{mol} \text{ ανά } 50 \mu\text{L} \text{ ενζυμικού stock διαλύματος}$$

- Η απορρόφηση μετρήθηκε σε χρόνο αντίδρασης 200 sec = 3.33 min και έτσι η ενεργότητα σε Units των 50 μL ενζυμικού stock διαλύματος ισούται με:

$$0.00186 \mu\text{mol} \times (3.33 \text{ min})^{-1} = 0.00056 \text{ Units}$$

Η ενεργότητα του ενζύμου εκφρασμένη ανά ml ενζυμικού stock διαλύματος ισούται με:

$$0.00056 \text{ Units} \times V_{\text{ενζύμου}}^{-1} = 0.00057 \text{ Units} \times (50 \mu\text{L})^{-1} = 0.01116 \text{ Units/mL}$$

Η ειδική ενεργότητα (specific activity) του ενζύμου εκφράζεται σε Units ανά g ενζύμου και υπολογίζεται με βάση τα περιεχόμενα g ενζύμου στην αντίδραση. Η συγκέντρωση του ενζυμικού stock διαλύματος υπολογίστηκε στην ενότητα 4.3.1 ίση με C = 3.5 mg/ml. Έτσι η ειδική ενεργότητα του ενζύμου (Units/g) ισούται με:

$$0.01137 \frac{\text{Units}}{\text{mL}} \times \left(3.5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)^{-1} = 3.19 \text{ Units/g}$$

5. Συμπεράσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση στον μικροοργανισμό *P. pastoris*, η απομόνωση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης LPMO της οικογένειας AA9 με προέλευση τον θερμοφίλο μύκητα *M. Thermophila*. Έχει παρατηρηθεί ότι αυτός ο μύκητας εκφράζει σε μεγάλη κλίμακα και εκκρίνει εξωκυτταρικά πρωτεΐνες AA9 όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας (Berka et al., 2011). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία MYCTH_110651 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ανασύρθηκε βιοπληροφορικά έπειτα από κατάλληλη αναζήτηση στη βάση δεδομένων Genome Portal του ινστιτούτου JGI που περιέχει όλες τις έως σήμερα γνωστές πληροφορίες όσον αφορά το γονιδίωμα του *M. Thermophila*. Η αλληλουχία περιέχει την λειτουργική περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων CBM1 (Carbohydrate-Binding Module Family 1) που εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό σε αλληλουχίες μυκήτων και έχει συνδεθεί στη βιβλιογραφία με χαρακτηριστική λειτουργικότητα δέσμευσης κρυσταλλικών υποστρωμάτων κυτταρίνης σε μια επίπεδη επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου.

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων ζύμης *P. pastoris* και εν συνεχεία η ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρήση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pGAPZaC (Invitrogen), μετά την επιτυχή παραλαβή αντιγράφων του από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* TOP10. Η επιτυχημένη κλωνοποίηση του πλασμιδίου, η ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την LPMO και ο επιτυχημένος πολλαπλασιασμός στα βακτηριακά κύτταρα ελέγχθηκε έπειτα από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BstBI και XbaI για την αποκοπή της αλληλουχίας του γονιδίου από το πλασμίδιο και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Για την επιλογή κατάλληλου στελέχους ζύμης *P. pastoris* με σκοπό την παραγωγή και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στερεών καλλιεργειών σε τρυβλία (plate assays) παρουσία των υποστρωμάτων PASC και 2,6-DMP για την ανίχνευση της ενεργότητας αλλά και παρουσία αντιβιοτικού ζεοσίνης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας των στελεχών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης ενός αριθμού αυτών των στελεχών σε υγρές προκαλλιέργειες για την μέτρηση της παραγωγικότητας σε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και την παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Στα plate assays και των δυο υποστρωμάτων δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα για κάποιο στέλεχος, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην φύση της ενεργότητας μεγάλου μέρους των LPMOs που δρουν τοπικά σε περιοχές υψηλής κρυσταλλικότητας χωρίς να παράγουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών προϊόντων. Παρά την ανάπτυξη περιορισμένου πλήθους στελεχών με αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, η επιλογή του τελικού κλώνου βασίστηκε αποκλειστικά στις δοκιμές ανίχνευσης της βέλτιστης παραγωγικότητας ως προς την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η υψηλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό σηματοδοτεί την εισαγωγή πολλαπλών αντιγράφων ανασυνδυασμένου πλασμιδίου κατά τον μετασχηματισμό ενός στελέχους και δυνητικά μεγαλύτερη ικανότητα πρωτεϊνικής έκφρασης. Αυτό πρακτικά δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται στην συγκεκριμένη περίπτωση καθώς το επιλεχθέν στέλεχος δεν εμφάνισε

την μέγιστη ανθεκτικότητα, όμως ήταν από τα μόνα που είχαν σταθερά αυξητική τάση ανάπτυξης και παραγωγής σε διάρκεια 48 ωρών, ενώ εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Έτσι, σε αυτή την περίπτωση η ανθεκτικότητα στην ζεοσίνη κρίνεται ότι πιθανώς δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα όσον αφορά την παραγωγικότητα. Αυτό επιβεβαιώθηκε ακολούθως από την επιτυχή παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, όπως επίσης με αυτό τον τρόπο αποδεικνύονται στην πράξη τα πλεονεκτήματα της χρήσης του μικροοργανισμού *P. pastoris* ως φορέα ετερόλογης έκφρασης. Σε αυτά συγκαταλέγεται η ικανότητα επαγωγής της έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα, μέσω του υποκινητή GAP, παρουσία γλυκόζης ως πηγής άνθρακα σε ένα απλό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όπως το YPD, αλλά και τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενδογενών πρωτεϊνών της ζύμης οι οποίες εκκρίνονται εξωκυτταρικά. Το παραπάνω οδήγησε στην απομόνωση και παραλαβή μεγάλης ποσότητας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας όπως αυτό αποτυπώθηκε στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) των δειγμάτων που ελήφθησαν στα διάφορα στάδια που μεσολαβούν κατά τη διάρκεια καθαρισμού της καλλιέργειας και απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τέλος, όσον αφορά την ετερόλογη έκφραση στην ζύμη *P. pastoris*, η επιλογή της ως έναν ευκαρυωτικό οργανισμό που έχει την ικανότητα να επιτελεί όλες τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οδήγησε στην παραλαβή σταθερών, σωστά αναδιπλωμένων και γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνικών μορίων, όπως προκύπτει από τις μετέπειτα δοκιμές ενεργότητας. Η *P. pastoris* έχει αξιοποιηθεί με επιτυχία σε πληθώρα περιπτώσεων ετερόλογης έκφρασης LPMOs μυκητιακής προέλευσης με λειτουργική περιοχή CBM1, όπως η AN1602 του ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* (Jagadeeswaran et al., 2018), η PaLPMO9H του *Podospora anserina* (Chloé Bennati-Granier et al., 2015), η HiLPMO9H του *Heterobasidion irregulare* (Liu et al., 2017) και η NcLPMO9E του *Neurospora crassa* (Koskela et al., 2019).

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά την απομόνωση της υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και το μοριακό βάρος της προσδιορίστηκε ίσο με περίπου 55 kDa, ενώ το θεωρητικό μοριακό βάρος είχε υπολογιστεί βιοπληροφορικά ίσο με 34.28 kDa, με χρήση του προγράμματος ProtParam. Όπως προαναφέρθηκε, αυτό είναι αναμενόμενο και οφείλεται στην δυνατότητα της *P. pastoris* να γλυκοζυλιώνει τις παραγόμενες πρωτεΐνες προσθέτοντας σε αυτές ολιγοσακχαρίτες-γλυκάνες, αυξάνοντας το μοριακό βάρος τους. Με χρήση των υπολογιστικών εργαλείων NetOGlyc 4.0 και NetNGlyc 1.0 προβλέφθηκαν βιοπληροφορικά 24 πιθανές θέσεις O- και 1 θέση N- γλυκοζυλίωσης. Στη συνέχεια, δείγμα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υποβλήθηκε σε αντίδραση O- και N-απογλυκοζυλίωσης με χρήση εμπορικών ενζύμων και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE για την εύρεση του μοριακού βάρους του μη γλυκοζυλιωμένου πρωτεϊνικού μορίου. Η ηλεκτροφόρηση δεν έδωσε αποτελέσματα από τα οποία μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα σχετικά με τον βαθμό O-γλυκοζυλίωσης, ενώ σχετικά με την N-γλυκοζυλίωση δεν εμφανίζεται κάποια διαφορά στο μοριακό βάρος, όπως αναμενόταν λόγω μιας μοναδικής θέσης γλυκοζυλίωσης αυτού του τύπου. Παρ' όλα αυτά η διαφορά κατά περίπου 20 kDa μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σχέση με το θεωρητικά υπολογισμένο μοριακό βάρος μπορεί να αποδοθεί σε υπεργλυκοζυλίωση O-τύπου σε συνδυασμό με την πρόβλεψη μεγάλου αριθμού πιθανών θέσεων αυτού του τύπου γλυκοζυλίωσης. Όμοια

αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε αντίστοιχες περιπτώσεις ετερόλογης έκφρασης AA9 LPMOs μυκητιακής προέλευσης σε *P. pastoris* όπως οι HiLPMO9H και HiLPMO9I του *Heterobasidion irregulare* με μοριακά βάρη ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 75 kDa και 60 kDa, αλλά θεωρητικά μοριακά βάρη 32.5 kDa και 30.7 kDa αντίστοιχα (Liu et al., 2017) ή της AN1602 του *Aspergillus nidulans* με μοριακό βάρος απομονωμένης πρωτεΐνης 70 kDa έναντι θεωρητικά υπολογισμένου 36.7 kDa (Jagadeeswaran et al., 2018). Ενδεικτικά, δυο ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες της ίδιας κατηγορίας με λειτουργική περιοχή CBM1 και μοριακό βάρος σε όμοια επίπεδα με την μελετούμενη LPMO είναι η GtLPMO9B του *Gloeophyllum trabeum* με 50 kDa (Hegnar et al., 2019) και η NcLPMO9E του *Neurospora crassa* με 43 kDa (Koskela et al., 2019).

Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (IEF-PAGE). Στο πήκτωμα εμφανίστηκαν συνολικά τρεις ζώνες σε τιμές pI 5.4, 5.9 και 6.4. Ο σχηματισμός περισσότερων από μια ζωνών σε ένα εύρος pI 5.4-6.4, αποδίδεται στην ύπαρξη γλυκομορφών, ή εναλλακτικά ισομορφών της πρωτεΐνης, δηλαδή πρωτεϊνικών μορίων με ίδια δομή που διαφέρουν μόνο στον αριθμό και τον τύπο των γλυκανών που έχουν προστεθεί σε αυτά κατά την γλυκοζυλίωση τους. Οι ισομορφές μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης προκύπτουν από τα διαφορετικά πρότυπα γλυκοζυλίωσης από το σύστημα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της ζύμης *P. pastoris* (Herscovics & Orlean, 1993). Τόσο κατά τον σχηματισμό N-γλυκανών όσο και κατά τον σχηματισμό O-γλυκανών, μερικά από τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό ανταγωνίζονται για το ίδιο παροδικό υπόστρωμα ολιγοσακχαρίτη κατά την διάρκεια των διαδοχικών σταδίων παραγωγής μιας γλυκάνης. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα αυτών των ενζύμων, και των διαφόρων τύπων διαθέσιμων ολιγοσακχαριτών δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον ανάμεσα σε ομάδες κυττάρων προκαλώντας μικρές παραλλαγές στις σχηματιζόμενες γλυκάνες. Έτσι, οι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούν ένα εγγενώς ετερογενές μείγμα γλυκομορφών. Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο υπολογίστηκε βιοπληροφορικά με το πρόγραμμα ProtParam ίσο με 5.95. Η τιμή αυτή βρίσκεται εντός της περιοχής των σχηματισμένων ζωνών στην ισοηλεκτρικής εστίασης IEF-PAGE επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Πρωτεΐνες όπως αυτή, με τιμή ισοηλεκτρικού σημείου μικρότερη του 7, διέπονται από όξινο χαρακτήρα και συνολικά αρνητική επιφανειακή φόρτιση σε τιμές ουδέτερου pH. Παρόμοια τιμή ισοηλεκτρικού σημείου (pI μεταξύ 4.2 και 4.7) έχει βρεθεί σε μια AA9 LPMO με την ονομασία PsLPMOA του μύκητα *Pestalotiopsis sp.* μετά από ετερόλογη έκφραση σε *P. pastoris* (Patel et al., 2016).

Η ανίχνευση των υποστρωμάτων στα οποία η AA9 LPMO εμφανίζει ενεργότητα και η διερεύνηση του είδους της οξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των παραγόμενων προϊόντων από την ενζυμική αντίδραση σε δέκα διαφορετικά υποστρώματα πολυσακχαριτών με την χρωματογραφική μέθοδο ΗΡΑΕ-PAD. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης, το ένζυμο που μελετάται έχει χαρακτηριστική δράση στο υπόστρωμα κυτταρίνης-PASC. Στα υπόλοιπα υποστρώματα δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ενεργότητας και απαιτείται περαιτέρω έρευνα, όπως η ταυτοποίηση πιθανών προϊόντων με φασματομετρικές μεθόδους μάζας, για την πλήρη διασαφήνιση της ενζυμικής δράσης. Όσον αφορά τον προσδιορισμό του είδους της οξειδωτικής δράσης, η ανάλυση των προϊόντων από το υπόστρωμα PASC καταδεικνύει την ύπαρξη αποκλειστικά C1-οξειδωτικής δράσης. Όπως

προαναφέρθηκε, από τα βιοπληροφορικά δεδομένα είναι γνωστό ότι η αλληλουχία του ενζύμου διαθέτει μια λειτουργική περιοχή CBM1. Περίπου το 20% των μυκητιακών AA9 LPMOs περιέχουν CBM1 (Harris et al., 2010), ενώ μέχρι σήμερα, μόνο λίγες τέτοιες μυκητιακές AA9 LPMOs έχουν χαρακτηριστεί. Η CBM1 έχει συνδεθεί με χαρακτηριστική λειτουργικότητα δέσμησης κρυσταλλικών υποστρωμάτων κυτταρίνης. LPMOs που διαθέτουν CBM1 φαίνεται πως διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα αποδόμησης κυτταρίνης υψηλής κρυσταλλικότητας συγκριτικά με αυτές που δεν διαθέτουν τη λειτουργική περιοχή (Bennati-Granier et al., 2015; Crouch et al. 2016). Από τα ήδη βιοχημικά χαρακτηρισμένα ένζυμα της οικογένειας AA9 γνωστά υποστρώματα στα οποία έχει ανιχνευθεί ενεργότητα είναι η κυτταρίνη και ημικυτταρίνες όπως η ξυλογλυκάνη, η γλυκομαννάνη και η β-γλυκάνη (Lo Ieggio et al., 2015). Όμως, με βάση τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά λειτουργικότητας των ενζύμων με CBM1, επιβεβαιώνεται η ανίχνευση της δράσης του ενζύμου στην κυτταρίνη, ενώ είναι αναμενόμενη η μη ύπαρξη ενεργότητας σε πιο άμορφα υποστρώματα όπως αυτά των ημικυτταρινών (ξυλάνη, αραβινοξυλάνη, γλυκομαννάνη, γαλακτομαννάνη, ξυλογλυκάνη, β-γλυκάνη). Πολλές αναφορές στην βιβλιογραφία επιχειρούν την συσχέτιση της περιοχής CBM1 με τον καθορισμό της στερεοεκλεκτικότητας και του είδους της οξειδωτικής δράσης του ενζύμου χωρίς ξεκάθαρα αποτελέσματα, ενώ σε ήδη χαρακτηρισμένες AA9 LPMOs έχουν ανιχνευτεί και οι τρεις πιθανές οξειδωτικές δράσεις (C1- ή C4- ή C1-/C4-). Έτσι, η ανίχνευση της C1-οξειδωτικής δράσης του ενζύμου πιθανώς δεν συνδέεται με την ύπαρξη του CBM1, όμως αυτή του η δράση το καθιστά κατάλληλο για την αξιοποίηση του σε εφαρμογές παραγωγής νανοκυτταρίνης.

Η σωστή αναγνώριση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων προϊόντων αποτελούν την βάση για την ανίχνευση της ενεργότητας των LPMOs και απαιτούν μεθόδους φασματομετρίας μάζας (MS) αλλά και χρωματογραφικές μεθόδους (HPLC), όπως αυτή που εφαρμόστηκε στην παρούσα διπλωματική. Οι απαιτήσεις, η πολυπλοκότητα και η διάρκεια αυτών των μεθόδων δεν επιτρέπουν την ευρεία εφαρμογή τους στην μελέτη των LPMOs. Για την εν μέρει αντικατάσταση των παραπάνω μεθόδων, αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μια απλή και γρήγορη φασματοφωτομετρική μέθοδο που μπορεί να αξιοποιηθεί στην μελέτη μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από το στάδιο της έκφρασης μέχρι τον βιοχημικό χαρακτηρισμό. Η μέθοδος βασίζεται στην ενζυμική οξείδωση του υποστρώματος 2,6-DMP παρουσία H_2O_2 που στηρίζεται στην δράση υπεροξυγενάσης της LPMO και η ανίχνευση της ενεργότητας μπορεί να συσχετιστεί με τη σταθερότητα, την απενεργοποίηση ή και την πρόσδεση του ενζύμου στο υπόστρωμα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιβεβαιώθηκε η επιτυχής εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου αλλά και η ύπαρξη ενεργότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μετά την απομόνωση της. Παράλληλα έγινε εξαγωγή της καμπύλης βαθμονόμησης για την υπολογισμό της απορρόφησης (ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του προϊόντος) σε σχέση με την συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση. Τέλος, με αυτή τη μέθοδο η ειδική ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε ίση με 3.19 U/g σε συνθήκες 40 °C και pH = 6. Η τιμή αυτή, αν και χαμηλότερη, φαίνεται να είναι σε όμοια τάξη μεγέθους με αντίστοιχες ενεργότητες LPMOs της βιβλιογραφίας που προσδιορίστηκαν με την ίδια μέθοδο. Ενδεικτικά, η AA9 MtC1LPMO του *M. thermophila* έχει ειδική ενεργότητα 17.1 U/g (Guo et al., 2020), ενώ οι

LPMO9c, LPMO9E, LPMO9J του *Neurospora crassa* έχουν κατά σειρά ειδική ενεργότητα 31, 22 και 13 U/g (Breslmayr et al., 2018).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η επιτυχημένη κλωνοποίηση, η ετερόλογη έκφραση, η παραγωγή και η απομόνωση ενός ενζύμου μυκητιακής προέλευσης με ενεργότητα LPMO. Το ένζυμο παράγεται επιτυχημένα στο ευκαρυωτικό σύστημα ζύμης *P. pastoris* και μπορεί να ανακτηθεί με ευκολία από το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας μέσω ενός σταδίου χρωματογραφίας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η δράση του ενζύμου στην κυτταρίνη και η C1-οξειδωτική του δράση επιβεβαιώθηκε έπειτα από δοκιμές ενεργότητας σε διάφορα υποστρώματα και την ανάλυση των σχηματισμένων προϊόντων με χρωματογραφική μέθοδο εναλλαγής ιόντων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση της ύπαρξης ενεργότητας του ενζύμου με μια πρόσφατη φασματοφωτομετρική μέθοδο που εκμεταλλεύεται την ιδιότητα υπεροξυγενάσης των LPMOs κατά την οποία δέχεται ηλεκτρόνια από ένα μόριο-δότη παρουσία H_2O_2 .

Βιβλιογραφία

- Aachmann, F. L., Sorlie, M., Skjak-Braek, G., Eijsink, V. G. H. and Vaaje-Kolstad, G.** (2012) 'NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), pp. 18779–18784. doi: [10.1073/pnas.1208822109](https://doi.org/10.1073/pnas.1208822109).
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H.** (2019) 'SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks', *Nature Biotechnology*, 37(4), pp. 420–423. doi: [10.1038/s41587-019-0036-z](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990) 'Basic local alignment search tool', *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Barr KA, Hopkins SA and Sreerishna K** (1992) 'Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*.' , 12, pp. 48–51.
- Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., Fanuel, M., Ropartz, D., Rogniaux, H., Gimbert, I., Record, E. and Berrin, J.-G.** (2015) 'Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*' , *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), p. 90. doi:[10.1186/s13068-015-0274-3](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0274-3).
- Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M.-C., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Lombard, V., Natvig, D. O., Lindquist, E., Schmutz, J., Lucas, S., Harris, P., Powlowski, J., Bellemare, A., Taylor, D., Butler, G., de Vries, R. P., Allijn, I. E., van den Brink, J., Ushinsky, S., Storms, R., Powell, A. J., Paulsen, I. T., Elbourne, L. D. H., Baker, S. E., Magnuson, J., LaBoissiere, S., Clutterbuck, A. J., Martinez, D., Wogulis, M., de Leon, A. L., Rey, M. W. and Tsang, A.** (2011) 'Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*' , *Nature Biotechnology*, 29(10), pp. 922–927. doi: [10.1038/nbt.1976](https://doi.org/10.1038/nbt.1976).
- Bhat KM, Maheshwari R.** (1987) 'Sporotrichum thermophile: growth, cellulose degradation, and cellulase activity.' , *Applied Environmental Microbiology*, 53, pp. 2175–82.
- Bissaro, B., Røhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. and Eijsink, V. G. H.** (2017) 'Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂' , *Nature Chemical Biology*, 13(10), pp. 1123–1128. doi: [10.1038/nchembio.2470](https://doi.org/10.1038/nchembio.2470).
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. and Schäfer, F.** (2009) 'Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)' , in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 439–473. doi: [10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5).

- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (2004) 'Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence', *PROTEOMICS*, 4(6), pp. 1633–1649. doi: [10.1002/pmic.200300771](https://doi.org/10.1002/pmic.200300771).
- Bornhorst, J. A. and Falke, J. J.** (2000) '[16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 245–254. doi: [10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8).
- Bradford, M. M.** (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Breslmayr, E., Hanžek, M., Hanrahan, A., Leitner, C., Kittl, R., Šantek, B., Oostenbrink, C. and Ludwig, R.** (2018) 'A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monoxygenase', *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), p. 79. doi: [10.1186/s13068-018-1063-6](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6).
- Bruins, M. E., Janssen, A. E. M. and Boom, R. M.** (2001) 'Thermostables and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(2), pp. 155–186. doi: [10.1385/ABAB:90:2:155](https://doi.org/10.1385/ABAB:90:2:155).
- Burdukiewicz, M., Sobczyk, P., Chilimoniuk, J., Gagat, P. and Mackiewicz, P.** (2018) 'Prediction of Signal Peptides in Proteins from Malaria Parasites', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), p. 3709. doi: [10.3390/ijms19123709](https://doi.org/10.3390/ijms19123709).
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C. and Cregg, J. M.** (2002) 'Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*', *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), pp. 329–332. doi: [10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0).
- Cereghino, G.** (1999) 'Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis', *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), pp. 422–427. doi: [10.1016/S0958-1669\(99\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00004-X).
- Courtade, G., Forsberg, Z., Heggset, E. B., Eijsink, V. G. H. and Aachmann, F. L.** (2018) 'The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monoxygenase promote localized cellulose oxidation', *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), pp. 13006–13015. doi: [10.1074/jbc.RA118.004269](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004269).
- Cregg, J. M.** (2007) 'Introduction', in Cregg, J. M. (ed.) *Pichia Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 1–10. doi: [10.1007/978-1-59745-456-8_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-456-8_1).
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A.** (1989) 'Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*.', *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), pp. 1316–1323. doi: [10.1128/MCB.9.3.1316](https://doi.org/10.1128/MCB.9.3.1316).
- Cronan, J. E.** (2014) '*Escherichia coli* as an Experimental Organism', in John Wiley & Sons Ltd (ed.) *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. a0002026.pub2. doi: [10.1002/9780470015902.a0002026.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002026.pub2).

Crouch, L. I., Labourel, A., Walton, P. H., Davies, G. J. and Gilbert, H. J. (2016) 'The Contribution of Non-catalytic Carbohydrate Binding Modules to the Activity of Lytic Polysaccharide Monooxygenases', *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), pp. 7439–7449. doi: [10.1074/jbc.M115.702365](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702365).

Daly, R. and Hearn, M. T. W. (2005) 'Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production', *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), pp. 119–138. doi: [10.1002/jmr.687](https://doi.org/10.1002/jmr.687).

Dibner, J. J. and Buttin, P. (2002) 'Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism', *Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), pp. 453–463. doi: [10.1093/japr/11.4.453](https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453).

Dimarogona, M., Topakas, E., Olsson, L. and Christakopoulos, P. (2012) 'Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*', *Bioresource Technology*, 110, pp. 480–487. doi: [10.1016/j.biortech.2012.01.116](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.116).

Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. (1980) *Compendium of soil fungi*. London ; New York: Academic Press.

Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig, R., Plank, H. and Nidetzky, B. (2014) 'Cellulose Surface Degradation by a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and Its Effect on Cellulase Hydrolytic Efficiency', *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), pp. 35929–35938. doi: [10.1074/jbc.M114.602227](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602227).

Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B. and Vaaje-Kolstad, G. (2019) 'On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)', *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), p. 58. doi: [10.1186/s13068-019-1392-0](https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0).

Filiatrault-Chastel, C., Navarro, D., Haon, M., Grisel, S., Herpoël-Gimbert, I., Chevret, D., Fanuel, M., Henrissat, B., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A. and Berrin, J.-G. (2019) 'AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes', *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), p. 55. doi: [10.1186/s13068-019-1394-y](https://doi.org/10.1186/s13068-019-1394-y).

Fowler, Claire. A., Sabbadin, F., Ciano, L., Hemsworth, G. R., Elias, L., Bruce, N., McQueen-Mason, S., Davies, G. J. and Walton, P. H. (2019) 'Discovery, activity and characterisation of an AA10 lytic polysaccharide oxygenase from the shipworm symbiont *Teredinibacter turnerae*', *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), p. 232. doi: [10.1186/s13068-019-1573-x](https://doi.org/10.1186/s13068-019-1573-x).

Frandsen, K. E. H. and Lo Leggio, L. (2016) 'Lytic polysaccharide monooxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes', *IUCrJ*, 3(6), pp. 448–467. doi: [10.1107/S2052252516014147](https://doi.org/10.1107/S2052252516014147).

Gaber, Y., Rashad, B., Hussein, R., Abdelgawad, M., Ali, N. S., Dishisha, T. and Várnai, A. (2020) 'Heterologous expression of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)', *Biotechnology Advances*, 43, p. 107583. doi: [10.1016/j.biotechadv.2020.107583](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107583).

Garfin, D. E. (2009) 'Chapter 29 One-Dimensional Gel Electrophoresis', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 497–513. doi: [10.1016/S0076-6879\(09\)63029-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63029-9).

Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989) 'Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data', *Analytical Biochemistry*, 182(2), pp. 319–326. doi: [10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7).

Guillén, D., Sánchez, S. and Rodríguez-Sanoja, R. (2010) 'Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), pp. 1241–1249. doi: [10.1007/s00253-009-2331-y](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2331-y).

Guo, X., Sang, J., Chai, C., An, Y., Wei, Z., Zhang, H., Ma, L., Dai, Y., Lu, F. and Liu, F. (2020) 'A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* C1 and its characterization in cleavage of glycosidic chain of cellulose', *Biochemical Engineering Journal*, 162, p. 107712. doi: [10.1016/j.bej.2020.107712](https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107712).

Hangasky, J. A., Iavarone, A. T. and Marletta, M. A. (2018) 'Reactivity of O₂ versus H₂O₂ with polysaccharide monooxygenases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), pp. 4915–4920. doi: [10.1073/pnas.1801153115](https://doi.org/10.1073/pnas.1801153115).

Harcum, S. (2008) 'Purification of protein solutions', in *Biologically Inspired Textiles*. Elsevier, pp. 26–43. doi: 10.1533/9781845695088.1.26.

Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S. and Lo Leggio, L. (2010) 'Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family', *Biochemistry*, 49(15), pp. 3305–3316. doi: [10.1021/bi100009p](https://doi.org/10.1021/bi100009p).

Hegnar, O. A., Petrovic, D. M., Bissaro, B., Alfredsen, G., Várnai, A. and Eijsink, V. G. H. (2018) 'pH-Dependent Relationship between Catalytic Activity and Hydrogen Peroxide Production Shown via Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Gloeophyllum trabeum*', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by E. R. Master, 85(5), pp. e02612-18, /aem/85/5/AEM.02612-18.atom. doi: [10.1128/AEM.02612-18](https://doi.org/10.1128/AEM.02612-18).

Hemsworth, G. R., Davies, G. J. and Walton, P. H. (2013) 'Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases', *Current Opinion in Structural Biology*, 23(5), pp. 660–668. doi: [10.1016/j.sbi.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.006).

Herscovics, A. and Orlean, P. (1993) 'Glycoprotein biosynthesis in yeast', *The FASEB Journal*, 7(6), pp. 540–550. doi: [10.1096/fasebj.7.6.8472892](https://doi.org/10.1096/fasebj.7.6.8472892).

Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., Gourlay, K. and Saddler, J. N. (2014) 'Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass', *Energy Environ. Sci.*, 7(7), pp. 2308–2315. doi: [10.1039/C4EE00891J](https://doi.org/10.1039/C4EE00891J).

Hu, J., Tian, D., Renneckar, S. and Saddler, J. N. (2018) 'Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase', *Scientific Reports*, 8(1), p. 3195. doi: 10.1038/s41598-018-21016-6 .

Jagadeeswaran, G., Gainey, L. and Mort, A. J. (2018) 'An AA9-LPMO containing a CBM1 domain in *Aspergillus nidulans* is active on cellulose and cleaves cello-oligosaccharides', *AMB Express*, 8(1), p. 171. doi: [10.1186/s13568-018-0701-5](https://doi.org/10.1186/s13568-018-0701-5).

Johansen, K. S. (2016) 'Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases', *Biochemical Society Transactions*, 44(1), pp. 143–149. doi: [10.1042/BST20150204](https://doi.org/10.1042/BST20150204).

Karnaouri, A., Muraleedharan, M. N., Dimarogona, M., Topakas, E., Rova, U., Sandgren, M. and Christakopoulos, P. (2017) 'Recombinant expression of thermostable processive MtEG5 endoglucanase and its synergism with MtLPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates', *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), p. 126. doi: [10.1186/s13068-017-0813-1](https://doi.org/10.1186/s13068-017-0813-1).

Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I. and Christakopoulos, P. (2014) 'Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*', *Frontiers in Microbiology*, 5. doi: [10.3389/fmicb.2014.00281](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281).

Karnaouri, A., Antonopoulou, I., Zerva, A., Dimarogona, M., Topakas, E., Rova, U. and Christakopoulos, P. (2019) 'Thermophilic enzyme systems for efficient conversion of lignocellulose to valuable products: Structural insights and future perspectives for esterases and oxidative catalysts', *Bioresource Technology*, 279, pp. 362–372. doi: [10.1016/j.biortech.2019.01.062](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.062).

Koskela, S., Wang, S., Xu, D., Yang, X., Li, K., Berglund, L. A., McKee, L. S., Bulone, V. and Zhou, Q. (2019) 'Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres', *Green Chemistry*, 21(21), pp. 5924–5933. doi: [10.1039/C9GC02808K](https://doi.org/10.1039/C9GC02808K).

Laemmli, U. (1970) 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4'. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.

Liu, B., Olson, Å., Wu, M., Broberg, A. and Sandgren, M. (2017) 'Biochemical studies of two lytic polysaccharide monooxygenases from the white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* and their roles in lignocellulose degradation', *PLOS ONE*. Edited by D. Cullen, 12(12), p. e0189479. doi: [10.1371/journal.pone.0189479](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189479).

Johansen, K. S. (2016) 'Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation', *Trends in Plant Science*, 21(11), pp. 926–936. doi: [10.1016/j.tplants.2016.07.012](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.012).

Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, S. D., Xu, F., Hemsworth, G. R., Walton, D. J., Young, N. A., Davies, G. J., Walton, P. H., Johansen, K. S., Hodgson, K. O., Hedman, B. and Solomon, E. I. (2014) 'Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), pp. 8797–8802. doi: [10.1073/pnas.1408115111](https://doi.org/10.1073/pnas.1408115111).

Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H., Sørli, M. and Väljamäe, P. (2018) 'Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide

monooxygenase', *Journal of Biological Chemistry*, 293(2), pp. 523–531. doi: [10.1074/jbc.M117.817593](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817593).

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (2013) 'Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes', *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), p. 41. doi: [10.1186/1754-6834-6-41](https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41).

Loose, J. S. M., Forsberg, Z., Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Ludwig, R., Eijsink, V. G. H. and Vaaje-Kolstad, G. (2016) 'Activation of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases with cellobiose dehydrogenase: Activation of Bacterial LPMOs with CDH', *Protein Science*, 25(12), pp. 2175–2186. doi: [10.1002/pro.3043](https://doi.org/10.1002/pro.3043).

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. and Harvey, L. M. (2005) 'Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system', *Yeast*, 22(4), pp. 249–270. doi: [10.1002/yea.1208](https://doi.org/10.1002/yea.1208).

Bhat, K. M. and Maheshwari, R. (1987) 'Sporotrichum thermophile Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity', *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), pp. 2175–2182. doi: [10.1128/AEM.53.9.2175-2182.1987](https://doi.org/10.1128/AEM.53.9.2175-2182.1987).

Margaritis, A., Merchant, R. F. J. and Yaguchi, M. (1986) 'Thermostable Cellulases from Thermophilic Microorganisms', *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), pp. 327–367. doi: [10.3109/07388558609150799](https://doi.org/10.3109/07388558609150799).

McClendon, S. D., Batth, T., Petzold, C. J., Adams, P. D., Simmons, B. A. and Singer, S. W. (2012) 'Thermoascus aurantiacus is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions', *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), p. 54. doi: [10.1186/1754-6834-5-54](https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-54).

Moses, V., Hatherley, R. and Tastan Bishop, Ö. (2016) 'Bioinformatic characterization of type-specific sequence and structural features in auxiliary activity family 9 proteins', *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), p. 239. doi: [10.1186/s13068-016-0655-2](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0655-2).

Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B. et al. The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol Biofuels* 11, 209 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1199-4>

Müller, G., Várnai, A., Johansen, K. S., Eijsink, V. G. H. and Horn, S. J. (2015) 'Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions', *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), p. 187. doi: [10.1186/s13068-015-0376-y](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0376-y).

Müller, G., Kalyani, D. C. and Horn, S. J. (2017) 'LPMOs in cellulase mixtures affect fermentation strategies for lactic acid production from lignocellulosic biomass: LPMOs Affect Fermentation Strategies', *Biotechnology and Bioengineering*, 114(3), pp. 552–559. doi: [10.1002/bit.26091](https://doi.org/10.1002/bit.26091).

Muraleedharan, M. N., Zouraris, D., Karantonis, A., Topakas, E., Sandgren, M., Rova, U., Christakopoulos, P. and Karnaouri, A. (2018) 'Effect of lignin fractions isolated from different

biomass sources on cellulose oxidation by fungal lytic polysaccharide monooxygenases', *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), p. 296. doi: [10.1186/s13068-018-1294-6](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1294-6).

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) 'How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein', *Protein Science*, 4(11), pp. 2411–2423. doi: [10.1002/pro.5560041120](https://doi.org/10.1002/pro.5560041120).

Paspaliari, D. K., Loose, J. S. M., Larsen, M. H. and Vaaje-Kolstad, G. (2015) '*Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase', *FEBS Journal*, 282(5), pp. 921–936. doi: [10.1111/febs.13191](https://doi.org/10.1111/febs.13191).

Patel, I., Kracher, D., Ma, S., Garajova, S., Haon, M., Faulds, C. B., Berrin, J.-G., Ludwig, R. and Record, E. (2016) 'Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCI6', *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), p. 108. doi: [10.1186/s13068-016-0520-3](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0520-3).

Petrović, D. M., Bissaro, B., Chylenski, P., Skaugen, M., Sørli, M., Jensen, M. S., Aachmann, F. L., Courtade, G., Várnai, A. and Eijsink, V. G. H. (2018) 'Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation: Role of Histidine Methylation in Fungal LPMOs', *Protein Science*, 27(9), pp. 1636–1650. doi: [10.1002/pro.3451](https://doi.org/10.1002/pro.3451).

Potter, H. (2003) 'Transfection by Electroporation', *Current Protocols in Molecular Biology*, 62(1). doi: [10.1002/0471142727.mb0903s62](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62).

Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jorgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G. J. and Walton, P. H. (2011) 'Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), pp. 15079–15084. doi: [10.1073/pnas.1105776108](https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108).

Reese, E. T. (1956) 'A microbiological process report; enzymatic hydrolysis of cellulose', *Applied Microbiology*, 4(1), pp. 39–45.

Reis, R. V. and Zydny, A. L. (2010) 'Protein Ultrafiltration', in Flickinger, M. C., *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 515. doi: [10.1002/9780470054581.eib515](https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib515).

Rosgaard, L., Pedersen, S., Cherry, J. R., Harris, P. and Meyer, A. S. (2006) 'Efficiency of New Fungal Cellulase Systems in Boosting Enzymatic Degradation of Barley Straw Lignocellulose', *Biotechnology Progress*, 22(2), pp. 493–498. doi: [10.1021/bp050361o](https://doi.org/10.1021/bp050361o).

Shuler, M. L. and Kargi, F. (2002) *Bioprocess engineering: basic concepts*. 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall (Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences).

Schwarz, F. and Aebi, M. (2011) 'Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation', *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), pp. 576–582. doi: [10.1016/j.sbi.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.005).

Singh, B. (2016) 'Myceliophthora thermophila syn. Sporotrichum thermophile : a thermophilic mould of biotechnological potential', *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), pp. 59–69. doi: [10.3109/07388551.2014.923985](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923985).

Singh, B. and Satyanarayana, T. (2011) 'Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications', *Process Biochemistry*, 46(7), pp. 1391–1398. doi: [10.1016/j.procbio.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.009).

Spangler, D., Rothenburger, S., Nguyen, K., Jampani, H., Weiss, S. and Bhende, S. (2003) 'In Vitro Antimicrobial Activity of Oxidized Regenerated Cellulose Against Antibiotic-Resistant Microorganisms', *Surgical Infections*, 4(3), pp. 255–262. doi: [10.1089/109629603322419599](https://doi.org/10.1089/109629603322419599).

Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T.-B. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Levery, S. B. and Clausen, H. (2013) 'Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology', *The EMBO Journal*, 32(10), pp. 1478–1488. doi: [10.1038/emboj.2013.79](https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79).

Tandrup, T., Frandsen, K. E. H., Johansen, K. S., Berrin, J.-G. and Lo Leggio, L. (2018) 'Recent insights into lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)', *Biochemical Society Transactions*, 46(6), pp. 1431–1447. doi: [10.1042/BST20170549](https://doi.org/10.1042/BST20170549).

Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H. (2010) 'An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides', *Science*, 330(6001), pp. 219–222. doi: [10.1126/science.1192231](https://doi.org/10.1126/science.1192231).

Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J. S., Bissaro, B. and Eijsink, V. G. (2017) 'Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases', *Current Opinion in Structural Biology*, 44, pp. 67–76. doi: [10.1016/j.sbi.2016.12.012](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012).

van Gool, M. P., van Muiswinkel, G. C. J., Hinz, S. W. A., Schols, H. A., Sinitsyn, A. P. and Gruppen, H. (2013) 'Two novel GH11 endo-xylanases from Myceliophthora thermophila C1 act differently toward soluble and insoluble xylans', *Enzyme and Microbial Technology*, 53(1), pp. 25–32. doi: [10.1016/j.enzmictec.2013.03.019](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.019).

Walton, P. H. and Davies, G. J. (2016) 'On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases', *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, pp. 195–207. doi: [10.1016/j.cbpa.2016.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.001).

Wang, B., Johnston, E. M., Li, P., Shaik, S., Davies, G. J., Walton, P. H. and Rovira, C. (2018) 'QM/MM Studies into the H₂O₂-Dependent Activity of Lytic Polysaccharide Monooxygenases: Evidence for the Formation of a Caged Hydroxyl Radical Intermediate', *ACS Catalysis*, 8(2), pp. 1346–1351. doi: [10.1021/acscatal.7b03888](https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03888).

- Wang, D., Li, J., Salazar-Alvarez, G., McKee, L. S., Srivastava, V., Sellberg, J. A., Bulone, V. and Hsieh, Y. S. Y.** (2018) 'Production of functionalised chitins assisted by fungal lytic polysaccharide monooxygenase', *Green Chemistry*, 20(9), pp. 2091–2100. doi: [10.1039/C8GC00422F](https://doi.org/10.1039/C8GC00422F).
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. and Cregg, J. M.** (1997) 'Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter', *Gene*, 186(1), pp. 37–44. doi: [10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0).
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T.** (2018) 'SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes', *Nucleic Acids Research*, 46(W1), pp. W296–W303. doi: [10.1093/nar/gky427](https://doi.org/10.1093/nar/gky427).
- Westereng, B., Arntzen, M. Ø., Aachmann, F. L., Várnai, A., Eijsink, V. G. H. and Agger, J. W.** (2016) 'Simultaneous analysis of C1 and C4 oxidized oligosaccharides, the products of lytic polysaccharide monooxygenases acting on cellulose', *Journal of Chromatography A*, 1445, pp. 46–54. doi: [10.1016/j.chroma.2016.03.064](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.064).
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K. L., Appel, R. D. and Hochstrasser, D. F.** (1998) 'Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server', in Link, A. J., *2-D Proteome Analysis Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp. 531–552. doi: [10.1385/1-59259-584-7:531](https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531).
- Wohlhauser, S., Delepierre, G., Labet, M., Morandi, G., Thielemans, W., Weder, C. and Zoppe, J. O.** (2018) 'Grafting Polymers from Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Properties, and Applications', *Macromolecules*, 51(16), pp. 6157–6189. doi: [10.1021/acs.macromol.8b00733](https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00733).
- Wood, T. M. and Bhat, K. M.** (1988) 'Methods for measuring cellulase activities', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 87–112. doi: [10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1).
- Wu, M., Beckham, G. T., Larsson, A. M., Ishida, T., Kim, S., Payne, C. M., Himmel, M. E., Crowley, M. F., Horn, S. J., Westereng, B., Igarashi, K., Samejima, M., Ståhlberg, J., Sandgren, M. and Eijsink, V. G. H.** (2013) 'Crystal Structure and Computational Characterization of the Lytic Polysaccharide Monooxygenase GH61D from the Basidiomycota Fungus *Phanerochaete chrysosporium*', *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), pp. 12828–12839. doi: [10.1074/jbc.M113.459396](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459396).
- Wu, S. and Letchworth, G. J.** (2004) 'High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol', *BioTechniques*, 36(1), pp. 152–154. doi: [10.2144/04361DD02](https://doi.org/10.2144/04361DD02).
- Zhang, J., Pakarinen, A. and Viikari, L.** (2013) 'Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp', *Bioresource Technology*, 129, pp. 302–307. doi: [10.1016/j.biortech.2012.11.064](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.064).