ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ»

Παραγωγή ιντερφερόνης α2b από το σύστημα του χλωροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii*

Production of interferon α2b from green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

ΕΛΕΝΗ ΨΥΧΑΡΗ
Α.Μ.: 228009

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΙΩΡΓΟΣ ΔΙΑΛΛΙΝΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ ΡΟΥΣΣΗΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΟΣΜΑΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ
2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία» του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας κ. Γιώργου Διαλλινά.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την επιλογή του θέματος και την καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας κ. Γιώργο Διαλλινά για το συνεχές ενδιαφέρον του για την πορεία του πειραματικού μέρους της εργασίας μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας κ. Γιώργο Διαλλινά, τον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών κ. Ανδρέα Ρούσση, και τον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών κ. Κοσμά Χαραλαμπίδη, για το χρόνο που αφιέρωσαν να αναγνώσουν την παρούσα εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Κατερίνα Καλλιαμπάκου για την άψογη συνεργασία, την αστείρευτη υπομονή, τη σωστή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία Πατέλου για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Δημήτρη Σκληρό, κ. Γιώργο Καραλιά και κ. Φώτη Κομαΐτη για τη βοήθεια τους και την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους σε αυτή μου την προσπάθεια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 5
ABSTRACT 6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
1.1 Οι ιντερφερόνες 7
1.1.1 Τύποι ιντερφερονών 8
1.1.2 Επαγωγή ιντερφερονών 9
1.1.3 Λειτουργία ιντερφερονών 9
1.2.1 Η IFNα2b ως αντικός παράγοντας 12
1.2.2 Έκφραση της IFNα2b σε διάφορα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών 13
1.3 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 14
1.3.1 Συμβατικά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών 15
1.3.2 Έκφραση πρωτεϊνών σε διαγονιδιακά μικροφύκη 16
1.4 Τα φύκη 17
1.4.1 Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* 18
1.4.2 Χαρακτηριστικά του *C.reinhardtii* 19
1.4.3 Ο κυτταρικός κύκλος του *C.reinhardtii* 21
1.5 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του *C. reinhardtii* στην έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 22
1.5.1 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο χλωροπλάστη του *C.reinhardtii* 23
1.5.2 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα του *C.reinhardtii* 24
1.6 Τεχνικές μετασχηματισμού του *C. reinhardtii* 25
Στόχος της εργασίας 27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 28
2.1 Καλλιέργεια του *C.reinhardtti* c137 28
2.2 Σχεδιασμός της αλληλουχίας του γονιδίου της ιντερφερόνης IFNα2b για έκφραση στο *C.reinhardtti* c137 28
2.3 Πλασμίδια 29
2.4 Μετασχηματισμός *E.coli* 30
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 30
2.6 Κλωνοποίηση της ιντερφερόνης στον pChlamy_1 Vector 31
2.6.1 Επιλογή ενζύμων περιορισμού 31
2.6.2 Εισαγωγή στο αναγνωστικό πλαίσιο 31
2.6.3. Πέψεις πλασμιδίων 31
2.6.4 Απομόνωση DNA απο πηκτή αγαρόζης 32
2.6.5 Αντίδραση επανασύνδεσης (ligation) 32
2.6.6 Αποφωσφορυλίωση άκρων πλασμιδίου (αντίδραση CIAP) 33
2.6.7 Καθαρισμός προϊόντος PCR (PCR clean-up) 33
2.7 Μετασχηματισμός του *C.reinhardtii* 34
2.7.1 Ηλεκτροπόρωση 34
2.8 Colony PCR 35
2.9 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από τους μετασχηματισμένους κλώνους 36
2.9.1 Απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction) 36
2.9.2 Καθαρισμός ολικού RNA 37
2.9.3 Έλεγχος καθαρότητας RNA 38
2.9.4 Καθαρισμός RNA με χρήση όξινης φαινόλης 39
2.10 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων 40

2.10.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων με χρήση φασματοφωτόμετρου 40
2.10.2 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης 40
2.11 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) 41
2.12 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) 42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 45
3.1 Ανάπτυξη καλλιέργειας του *C.reinhardtti* c137 45
3.2 Σχεδιασμός της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b για έκφραση στο *C.reinhardtti* c137 47
3.3 Κλωνοποίηση της ιντερφερόνης IFNα2b στον pChlamy_1 Vector 49
3.4 Εισαγωγή της κωδικής αλληλουχίας της huIFNα2b στο γονιδίωμα του *C.reinhardtii* 57
3.5 Έκφραση του mRNA της huIFNα2b από το *C.reinhardtii* 66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη ιντερφερόνη IFNα2b, είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αντιικός παράγοντας, ο οποίος παράγεται στη βιομηχανία έως σήμερα από το βακτήριο *E.coli*. Ως προκαρυώτης, η *Escherichia coli* δεν έχει την ικανότητα να γλυκοσυλιώσει την ιντερφερόνη. Προκειμένου να έχει τον απαιτούμενο χρόνο ημιζωής στο αίμα των ασθενών η ιντερφερόνη IFNα2b γλυκοσυλιώνεται *in vitro* (προσθήκη πολυαιθυλενο-γλυκόλης). Έχει γίνει πλήθος προσπαθειών παραγωγής της από άλλα συστήματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, χωρίς όμως επιτυχία σε επίπεδο ανταγωνιστικότητας παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα.

Τα μικροφύκη είναι μια πολυποίκιλη ομάδα φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών με σημαντικές βιοτεχνολογικές δυνατότητες που τα καθιστούν ελκυστικά συστήματα έκφρασης φαρμακευτικών και βιοτεχνολογικών πρωτεϊνών. Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii,* όντας το φύκος-πρότυπο για μοριακές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες για πάνω από 60 χρόνια, διαθέτει την πιο εξελιγμένη μοριακή και γενετική εργαλειοθήκη ανάμεσα στα μικροφύκη. Μερικά από τα πλεονεκτήματά του είναι η γρήγορη ανάπτυξη, η ευκολία στο χειρισμό, η δυνατότητα αύξησης της κλίμακας παραγωγής σε βιοαντιδραστήρες, το χαμηλό κόστος καλλιέργειας και το γεγονός ότι θεωρείται ένας ασφαλής μικροοργανισμός (GRAS). Επιπλέον, η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τον πυρήνα του *C.reinhardtii* περιλαμβάνει τα πλεονεκτήματα των ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης, όπως η επαγόμενη έκφραση του διαγονιδίου, η αποτελεσματική αναδίπλωση σύνθετων πρωτεϊνών, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η έκκριση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια έκφρασης της IFNα2b από τον πυρήνα του *C.reinhardtii.* Το βελτιστοποιημένο γονίδιο της ανθρώπινης IFNα2b για το *C.reinhardtii* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pChlamy_1, με τον οποίο μετασχηματίστηκαν κύτταρα αγρίου τύπου *C.reinhardtii,* με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. Οι μετασχηματισμένες αποικίες που προέκυψαν ύστερα από επιλογή στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη Β, ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση του γονιδίου της IFNα2b με τη μέθοδο colony PCR. Στη συνέχεια, απομονώθηκε το mRNA των θετικών αποικιών και ανιχνεύθηκε η έκφραση του γονιδίου *ifn α2b* με τη μέθοδο real-time PCR. Από την αντίδραση αυτή προέκυψαν 3 αποικίες με υψηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA της IFNα2b. Τα αποτελέσματα της εργασίας ήταν ενθαρρυντικά για περαιτέρω μελέτη του παραπάνω συστήματος.

ABSTRACT

Human interferon IFNα2b is a widely used antivirus drug, which is nowdays produced by *Escherichia coli*. As a bacterium, *E.coli* is unable to glycosylate interferon. In order to have the requisite halflife in patient's blood, interferon is glycosylated *in vitro* (addition of poly-ethyleno glycol). There have been made lots of efforts to express interferon from other recombinant expression systems, however with no success for industrial production.

Microalgae are a diverse group of photosynthetic microorganisms with significant biotechnological possibilities, which make them attractive expression systems for pharmaceutical and biotechnological proteins. The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has been served as a model organism for over 60 years, and thus it offers the most prevalent molecular toolkit among the microalgae. Some of its advantages are its speed growth, ease to handle, ability to scale up, low cultivation cost, and the fact that it is regarded as safe (GRAS). Moreover, the expression of recombinant proteins from the nucleus of *C.reinhardtii* offers the advantages of eukaryotic expression systems, such as inducible transgene expression, correct folding of complex proteins, subcellular location and secretion of recombinant proteins, and post-translational modifications.

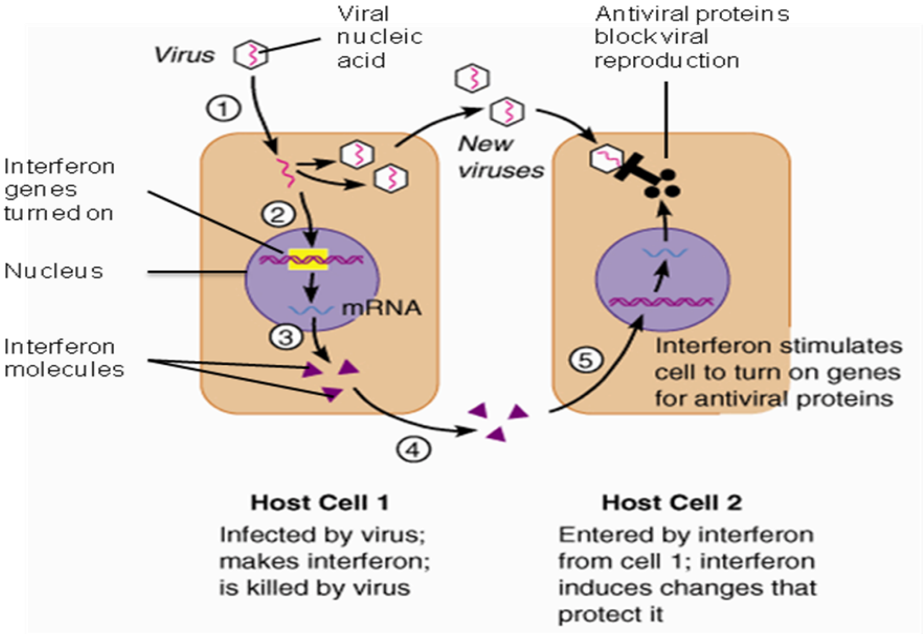
The present study is an effort to express human IFNα2b from the nucleus of *C.reinhardtii.* The optimized gene of human IFNα2b for *C. reinhardtii* was cloned into pChlamy_1 plasmid, with whom wild type cells of *C.reinhardtii* were transformed with, by electroporation. The transformed colonies that occurred by antibiotic resistance to hygromycin B, were checked for the insertion of the *ifn* gene by colony PCR. Subsequently, the mRNA of the positive colonies was extracted and the expression of the *ifn* gene was detected by real-time PCR. The results of this study were promising for further investigation of this expression system.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι ιντερφερόνες

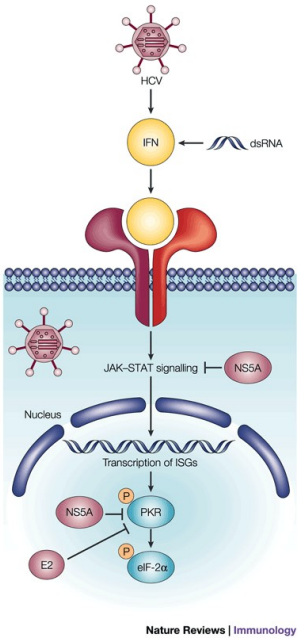
Οι ιντερφερόνες (interferons) είναι πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών που εκκρίνονται από πολλούς κυτταρικούς τύπους ως απόκριση στην παρουσία ιών κυρίως, αλλά και παθογόνων, όπως βακτήρια, παράσιτα ή και καρκινικά κύτταρα). (Fensterl and Sen 2009).

Οι ιντερφερόνες ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, γνωστή ως κυτοκίνες, μόρια που χρησιμοποιούνται στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, ώστε να πυροδοτήσουν τις προστατευτικές άμυνες του ανοσοποιητικού συστήματος. Ονομάστηκαν ιντερφερόνες για την ικανότητά τους να επεμβαίνουν ("interfere") στην αντιγραφή του ιού, προστατεύοντας τα κύτταρα από ιική μόλυνση. (Isaacs and Lindenmann 1957) Όλες οι ιντερφερόνες δρουν ως εκκρινόμενοι προσδέτες (ligands) συγκεκριμένων επιφανειακών υποδοχέων (receptors). Η πρόσδεσή τους στον υποδοχέα προκαλεί μια αλυσίδα γεγονότων που οδηγούν στη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων (interferon-stimulated genes, ISGs), των οποίων οι πρωτεΐνες έχουν αντιική δραστικότητα, καθώς επίσης και αντιμικροβιακές, αντιπολλαπλασιαστικές/αντικαρκινικές και ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Επαγωγή της ιντερφερόνης μετά από μόλυνση από ιό. (http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Immune_Systems.html)

Η αποτελεσματικότητα των ιντερφερονών στην αντιμετώπιση των ιικών μολύνσεων αντανακλάται από το πλήθος των ιικών γονιδίων που κωδικοποιούν για αναστολείς της επαγωγής τους ή/και της δράσης τους (Εικόνα 1.2). (Fensterl and Sen 2009).



Εικόνα 1.2 Αλληλεπίδραση του μονοπατιού της ιντερφερόνης τύπου Ι με τον ιό HCV.
(*Nature Reviews Immunology* 2, 675-687, September 2002)

1.1.1 Τύποι ιντερφερονών

Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από είκοσι διαφορετικά γονίδια ιντερφερονών. Η οικογένεια των ιντερφερονών απαρτίζεται από τρεις τύπους κυτοκινών : τύπου Ι, τύπου ΙΙ και τύπου ΙΙΙ ιντερφερόνες.

Τύπου Ι : οι ιντερφερόνες τύπου Ι στον άνθρωπο είναι οι IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ και IFN-ω. (Levy, Marié et al. 2011) Τα γονίδια των ιντερφερονών τύπου Ι είναι συντηρημένα και εδράζονται στο ίδιο χρωμόσωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι εξελίχθηκαν από το ίδιο γονίδιο με διπλασιασμό και διαφοροποίηση. Όλες οι ιντερφερόνες τύπου Ι προσδένονται σε ένα ειδικό σύμπλεγμα επιφανειακού κυτταρικού υποδοχέα, γνωστού ως υποδοχέα IFN-α/β (IFNAR), ο οποίος αποτελείται από τις υπομονάδες IFNAR1 και IFNAR2. Οι ιντερφερόνες τύπου Ι μπορούν να δράσουν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους.

Τύπου ΙΙ: οι ιντερφερόνες τύπου ΙΙ στον άνθρωπο απαρτίζονται μόνο από μια κυτοκίνη, την IFN-γ. Η IFN-γ προσδένεται στον υποδοχέα IFNGR, ο οποίος αποτελείται από τις υπομονάδες IFNGR1 και IFNGR2. (Pestka, Krause et al. 2004)

Τύπου ΙΙΙ: οι ιντερφερόνες τύπου ΙΙΙ στον άνθρωπο είναι οι IFN-λ1, IFN-λ2 και IFN-λ3 (προηγουμένως ονομάζονταν IL-29, IL- 28A, και IL-28B, αντίστοιχα) και IFN-λ4. Οι ιντερφερόνες τύπου ΙΙΙ προσδένονται σε ένα σύμπλοκο υποδοχέα που αποτελείται από την IL10R2 (καλείται και CRF2-4) και την IFNLR1 (καλείται και CRF2-12). Παρότι ανακαλύφθηκαν πιο πρόσφατα από τις ιντερφερόνες τύπου Ι και ΙΙ, έχει δειχθεί ότι ακολουθούν παρόμοια μονοπάτια μεταγωγής σήματος με τις ιντερφερόνες τύπου Ι και συγκλίνουν πιο πολύ φυλογενετικά, από ότι με την ιντερφερόνη τύπου ΙΙ. (Kotenko, Gallagher et al. 2003; Levy, Marié et al. 2011; Hermant and Michiels 2014) Οι ιντερφερόνες τύπου ΙΙΙ δρουν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα.

1.1.2 Επαγωγή ιντερφερονών

Η επαγωγή των ιντερφερονών τύπου Ι και ΙΙΙ προκαλείται κυρίως από ιούς (ιικές γλυκοπρωτεΐνες, ιικό RNA), αλλά και από άλλα μικροβιακά μόρια, όπως βακτηριακές ενδοτοξίνες (λιποπολυσακχαρίτες), βακτηριακά μαστίγια, μοτίβα CpG. Αυτά τα μόρια (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), καθώς και τα συστατικά από τα κατεστραμμένα κύτταρα (damage-associated molecular patterns, DAMPs), αναγνωρίζονται από ειδικούς μεμβρανικούς (Toll-like receptors, TLRs) και ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (RIG-I-like helicases, RLHs), γνωστούς ως pattern recognition receptors (PRRs), οι οποίοι πυροδοτούν την παραγωγή ιντερφερονών. Ιδιαίτερα τα ιικά νουκλεϊκά οξέα αναγνωρίζονται από κυτοπλασματικούς υποδοχείς, γνωστούς ως nucleotide-binding oligomerization domain receptors, ή NOD-like receptors (NLRs). Επίσης, άλλες κυτοκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες 1, 2 και 12, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor) και ο παράγοντας διέγερσης αποικιών (colony-stimulating factor), μπορούν να ενισχύσουν την παραγωγή ιντερφερονών. Αντίθετα, η IFN-γ (τύπου ΙΙ ιντερφερόνη) επάγεται μόνο από άλλες κυτοκίνες ή από μιτογόνα. (Malmgaard 2004)

Έκφραση ιντερφερονών των τύπων Ι και ΙΙΙ μπορεί να επαχθεί σχεδόν από όλους τους κυτταρικούς τύπους μετά από αναγνώριση των PAMPs. Αντίθετα, η έκφραση της ιντερφερόνης τύπου ΙΙ περιορίζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα Τ λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες (natural killer cells, NK). (Malmgaard 2004)

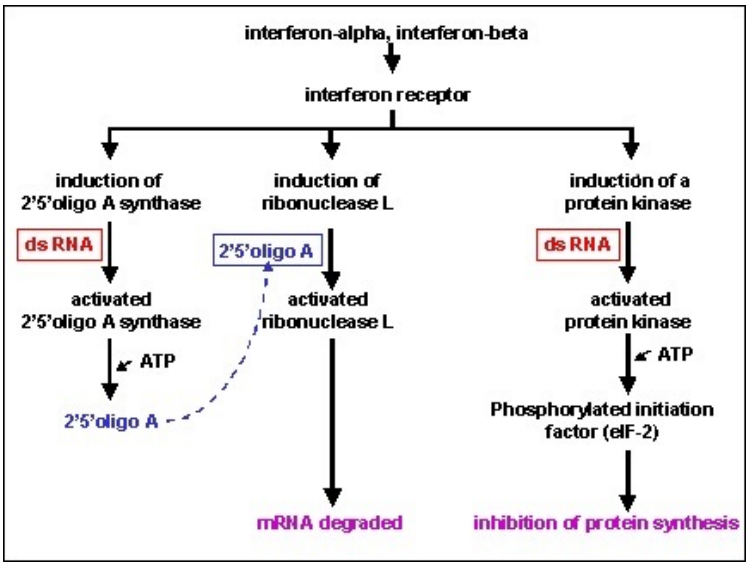
Συγκεκριμένα οι ιντερφερόνες τύπου Ι IFNα (alpha) και IFNβ (beta), παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα πλασμοκυτοειδή δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid Dendritic Cells, pDCs), τα οποία είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που κυκλοφορούν στο αίμα και βρίσκονται και στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τους ενδοσωμικούς υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors) 7 και 9, οι οποίοι ανιχνεύουν μονής έλικας RNA (ssRNA) και CpG DNA μοτίβα, αντίστοιχα. (Liu 2005; Uematsu and Akira 2007)

Τα pDCs δεν πρέπει να συγχέονται με τα συμβατικά δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs), τα οποία είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και εκκρίνουν ιντερλευκίνη 12 (IL-12). Επιπλέον, διακρίνονται μεταξύ τους με βάση συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες και διαφορετικούς ενδοσωμικούς υποδοχείς τύπου Toll (τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς TLR 2 και TLR 4). Επίσης, τα δενδριτικά κύτταρα βρίσκονται στο δέρμα (Langerhans cells) και τα επιθήλια της μύτης, των πνευμόνων, του στομάχου και των εντέρων, ενώ στο αίμα μπορεί να βρεθούν μόνο σε ανώριμη μορφή. (McKenna, Beignon et al. 2005)

1.1.3 Λειτουργία ιντερφερονών

Ένα κύτταρο μολυσμένο από ιό απελευθερώνει σωματίδια του ιού, τα οποία μπορούν να μολύνουν τα παρακείμενα κύτταρα. Ωστόσο, το μολυσμένο κύτταρο μπορεί να προειδοποιήσει τα γειτονικά κύτταρα για μια επικείμενη μόλυνση εκκρίνοντας ιντερφερόνη. Ως απόκριση στην ιντερφερόνη, τα κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ενός ενζύμου, γνωστό ως πρωτεϊνική κινάση R (protein kinase R, PKR). Αυτό το ένζυμο φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη, γνωστή ως eIF-2 (eukaryotic Initiation Factor 2), ως απόκριση σε μια νέα ιική μόλυνση. Ο φωσφορυλιωμένος eIF-2 σχηματίζει ένα ανενεργό σύμπλοκο με μια άλλη πρωτεΐνη, τον eIF2B (guanine

nucleotide exchange factor for elF-2), αναστέλλοντας την έναρξη της μετάφρασης. Ένα άλλο κυτταρικό ένζυμο, η RNAse L, επίσης επαγόμενο από ιντερφερόνη, καταστρέφει το RNA μειώνοντας περαιτέρω την πρωτεϊνοσύνθεση των ιικών και των ενδογενών γονιδίων. Η κατεσταλμένη πρωτεϊνοσύνθεση καταστρέφει και τον ιό και τα μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 1.3). Επιπλέον, οι ιντερφερόνες επάγουν την παραγωγή εκατοντάδων άλλων πρωτεϊνών με δράσεις κατά των ιών, τα γονίδια των οποίων αναφέρονται ως γονίδια επαγόμενα από ιντερφερόνη (interferon-stimulated genes, ISGs), τα οποία επάγονται μέσω του μονοπατιού JAK-STAT. Μία από τις δράσεις τους είναι η αύξηση της δραστικότητας της p53, η οποία σκοτώνει τα μολυσμένα κύτταρα προωθώντας την απόπτωση. Τέλος, οι ιντερφερόνες τύπου I και II μπορούν να πυροδοτήσουν και τα σηματοδοτικά μονοπάτια C3G/Rap1 και PI3K, ενώ μόνο οι ιντερφερόνες τύπου I το μονοπάτι MAPK, όλα με επιδράσεις κατά των ιών και του πολλαπλασιασμού των. (Platanias 2005)



Εικόνα 1.3 Αμυντικοί μηχανισμοί δράσης της ιντερφερόνης.

(http://www.microbiologybook.org/mhunt/interferon.htm)

Μια άλλη λειτουργία των ιντερφερονών είναι η αύξηση της έκφρασης των μορίων του συμπλέγματος κύριας ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC I και MHC II) και η αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος (immunoproteasome). Η αυξημένη αποδόμηση των ιικών πεπτιδίων από το πρωτεάσωμα αυξάνει την αντιγονοπαρουσίασή τους από το MHC I στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells), επαυξάνοντας την αναγνώριση και την εξάλειψη των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης, αύξηση της έκφρασης του MHC II, αυξάνει την αντιγονοπαρουσίαση στα Τ λεμφοκύτταρα βοηθούς (helper T cells), τα οποία απελευθερώνουν κυτοκίνες (ιντερφερόνες και ιντερλευκίνες) που σηματοδοτούν και συντονίζουν τη δραστηριότητα άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Όσον αφορά στην ιντερφερόνη γ (IFN-γ), αυτή ενεργοποιεί άμεσα τα μακροφάγα (macrophages) και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες (natural killer cells, NK). (Platanias 2005)

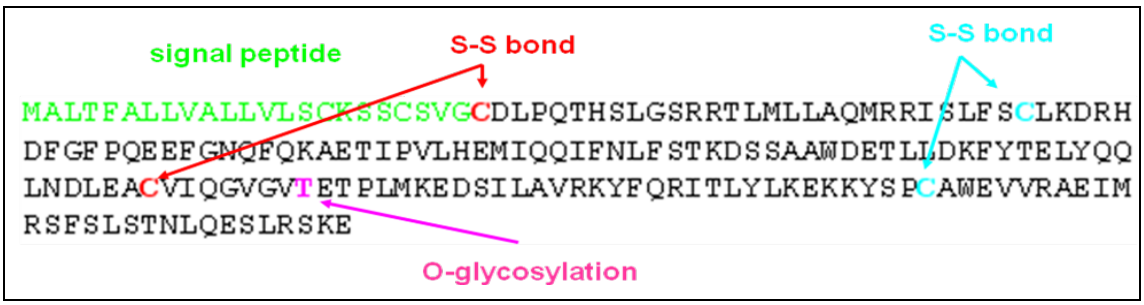
1.2 Η ιντερφερόνη alpha 2 b (IFNα2b)

Τα γονίδια των ιντερφερονών τύπου Ι του ανθρώπου εντοπίζονται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9p21). (Díaz, Pomykala et al. 1994) Ο γονιδιακός τόπος περιλαμβάνει 26 γονίδια, κανένα από τα οποία δε φέρει εσώνια, εκ των οποίων 1 κωδικοποιεί για την IFNβ, 1 κωδικοποιεί για την IFNω, 11 κωδικοποιούν για ψευδογονίδια και 13 κωδικοποιούν για την IFNα. Οι ιντερφερόνες τύπου IFNα είναι οι εξής: IFNα1, IFNα2, IFNα4, IFNα5, IFNα6, IFNα7, IFNα8, IFNα10, IFNα13, IFNα14, IFNα16, IFNα17, IFNα21. Ανάμεσα στα 13 IFNα γονίδια έχουν αναγνωριστεί 28 διαφορετικά αλληλόμορφα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους σε 1 έως 4 αμινοξέα, αλλά αναγνωρίζονται από τους ίδιους υποδοχείς και έχουν παρόμοιες βιολογικές δράσεις. Το μοριακό βάρος κάθε πρωτεΐνης ποικίλλει από 19-20 kD και αντιστοιχεί σε 165-166 αμινοξέα. Οι IFNα πρωτεΐνες έχουν ελαφρώς όξινο χαρακτήρα. (Adolf, Kalsner et al. 1991)

Η πρώτη ιντερφερόνη που χαρακτηρίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του ’80 ήταν η IFNα2, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βασική έρευνα για τη βιολογική δραστικότητα, τη δομή και το μηχανισμό δράσης των ιντερφερονών τύπου Ι. Επίσης, η IFNα2 ήταν η πρώτη ιντερφερόνη που παρήχθη για φαρμακευτική χρήση.

Οι τρεις κύριοι υποτύποι της IFNα2, οι οποίοι διαφέρουν στα αμινοξέα στις θέσεις 23 και 34, είναι οι IFNα2a (Lys-23, His-34), IFNα2b (Arg-23, His-34) και IFNα2c (Arg-23, Arg-34), με τον α2b να είναι το επικρατέστερο αλληλόμορφο. (Retnoningrum, Ningrum et al. 2010)

Η IFNα2b είναι ένα πολυπεπτίδιο 165 αμινοξέων (ώριμη πρωτεΐνη), αφού αποκοπεί το 23 αμινοξέων πεπτίδιο οδηγός της. Το μόριο της IFNα2b είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει το δισακχαρίτη γαλακτοσυλ-Ν-ακετυλογαλακτοσαμίνη (galactosyl-N-acetylgalactosamine, Gal-GalNAc) συνδεδεμένο με το οξυγόνο του καταλοίπου της θρεονίνης στη θέση 106 (Thr-106). (Adolf, Kalsner et al. 1991) Δυο δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ τεσσάρων κυστεϊνών στις θέσεις 1 και 98, και στις θέσεις 29 και 138. Ο δεσμός που σχηματίζεται στις θέσεις 1 και 98 δεν απαιτείται για τη βιολογική λειτουργία. Τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για τη βιολογική δραστικότητα είναι Leu30, Lys31, Arg33, His34, Phe36, Arg120, Lys121, Gln124, Tyr122, Tyr129, Lys131, Glu132, Arg144 και Glu146. Η αμινοξική αλληλουχία της IFNα2b, το πεπτίδιο οδηγός της, καθώς και οι θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών και της γλυκοσυλίωσης απεικονίζονται στην Εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4 Η αμινοξική αλληλουχία της ιντερφερόνης α2b του ανθρώπου (huIFNα2b). Με πράσινο απεικονίζεται το πεπτίδιο οδηγός (signal peptide), με κόκκινο και γαλάζιο οι δυο δισουλφιδικοί δεσμοί (S-S bonds) ανάμεσα στις κυστεΐνες

της πρωτεΐνης, και με ροζ η θέση της O-γλυκοζυλίωσης (O-glycosylation) στο κατάλοιπο της θρεονίνης.

Σε πειράματα κρυσταλλογραφίας, η IFNα2b υφίσταται ως ένα μη ομοιοπολικό διμερές, το οποίο συνδέεται με ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Κάθε μονομερές αποτελείται από πέντε α-έλικες (ονομάζονται από A έως E), οι οποίες συνδέονται με ένα βρόγχο AB, BC, CD και DE. Τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για τη δομική ακεραιότητα είναι οι Phe36, Tyr122 και Tyr129. Τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για την πρόσδεση στον υποδοχέα είναι ο βρόγχος AB (Arg22, Leu26, Phe27, Leu30, Lys31, Arg33 και His34), η έλικα B (Ser68), η έλικα C (Thr79, Lys83, Tyr85 και Tyr89), η έλικα D (Arg120, lys121, Gln124, Lys131 και Glu132), και η έλικα E (Arg144 και Glu146) (Asmana Ningrum 2014). Ωστόσο, η ενεργός μορφή της IFNα2b είναι μονομερής. Στην Εικόνα 1.5 φαίνεται η τρισδιάστατη δομή της IFNα2b.



Εικόνα 1.5 Η τρισδιάστατη δομή της IFNα2b.
(http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1RH2)

1.2.1 Η IFNα2b ως αντιικός παράγοντας

Οι αντιικές ιδιότητες της IFNα2b ανακαλύφθηκαν στο εργαστήριο του Charles Weissmann στο πανεπιστήμιο της Ζυρίχης. Σήμερα, η IFNα2b χρησιμοποιείται σαν αντιικό φάρμακο και κυκλοφορεί στην αγορά σε δυο σκευάσματα, με τα εμπορικά ονόματα PEG-Intron™ και Intron®A (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA). Το Intron-A αντιστοιχεί στην υδατοδιαλυτή IFNα2b πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 19,271 daltons η οποία παράγεται σε *E.coli*, ενώ το PEG-Intron™ είναι συνδεδεμένο *in vitro* με το μόριο της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Η ειδική δραστικότητα της ανασυνδυασμένης IFNα2b είναι περίπου 2.6 x 10^8 IU/mg πρωτεΐνης. Το Intron-A ενδείκνυται για θεραπεία σε οξυτενή κονδυλώματα (condylomata acuminata, CA), χρόνια ηπατίτιδα B και C, κακοήθες μελάνωμα και λέμφωμα non-Hodgkin's (follicular non-Hodgkin's lymphoma). Το φάρμακο χορηγείται με ενδοφλέβια ή υποδόρια ένεση. Η IFNα2b χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη ριμπαβιρίνη (ribavirin) για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας C. Ωστόσο, μερικές από τις αντενδείξεις του φαρμάκου Intron-A είναι τα συμπτώματα γρίπης, η μειωμένη όρεξη, η απώλεια βάρους, η αϋπνία, η απώλεια μαλλιών, οι αλλαγές στη διάθεση, η μειωμένη παραγωγή λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων και η εξασθενημένη μνήμη (Wang, Youngster et al. 2002).

Η ανασυνδυασμένη IFNα2b που παράγεται στην *E.coli* δεν διαθέτει τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της Ο-γλυκοσυλίωσης της φυσικής πρωτεΐνης και εξαιτίας του σύντομου χρόνου ημιζωής της (4-8 ώρες στους ανθρώπους), η θεραπεία αποτελείται από τρεις ενέσεις την εβδομάδα για περιόδους από μήνες έως χρόνια. Η σύζευξη της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στην ανασυνδυασμένη IFNα2b μειώνει σημαντικά την απομάκρυνσή της από το πλάσμα του αίματος, ώστε μια μόνο ένεση την εβδομάδα να είναι αρκετή. Καθώς όμως και οι δύο πρωτεΐνες προκύπτουν από βακτηριακή ζύμωση, απαιτείται αναδίπλωση στη φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης, μια διαδικασία που μπορεί να καταλήξει σε απώλεια της βιολογικής δραστικότητας και να πυροδοτήσει την παραγωγή αντισωμάτων, εάν παρουσιάζονται μερικώς αναδιπλωμένα μόρια μετά τη διαδικασία καθαρισμού. Επιπλέον, το μέγεθος και η θέση σύζευξης των μορίων PEG, μπορεί να εμποδίσει τη σύνδεση στον υποδοχέα, συμβάλλοντας στην περαιτέρω απώλεια της βιολογικής δραστικότητας (Ceaglio, Etcheverrigaray et al. 2010).

1.2.2 Έκφραση της IFNα2b σε διάφορα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών

Πέρα από την έκφραση στην *Escherichia coli* (Voss, Falkner et al. 1994; Valente, Prazeres et al. 2004; Srivastava, Bhattacharaya et al. 2005; Rabhi-Essafi, Sadok et al. 2007; Tan, Ramanan et al. 2011), η IFNα2b έχει εκφραστεί και σε πολλά άλλα συστήματα, όπως ο *Streptomyces lividans* (Vallin, Pimienta et al. 2005), ο *Bacillus subtilis* (Kakeshita, Kageyama et al. 2011), ο *Lactococcus lactis* (Zhang, Zhong et al. 2010) και η *Yarrowia lipolytica* (Gasmi, Fudalej et al. 2011).

Όσον αφορά στις ζύμες, η ιντερφερόνη α2b παράγεται στον *S.cerevisiae* για ερευνητική χρήση από τρεις τουλάχιστον εταιρείες (P212121 Michigan USA, Abcam, SPEED BioSystems Maryland USA). Επιπλέον, όσον αφορά στην έκφραση της IFN a2b από την *Pichia pastoris*, έχουν γίνει αρκετές μελέτες, αλλά η υψηλότερη έκφραση μέχρι τώρα ήταν 600 mg/L (Shi, Wang et al. 2007; Ayed, Rabhi et al. 2008). Επίσης, έχει εκφραστεί ως χιμαιρική πρωτεΐνη με επίπεδα έκφρασης που δεν ξεπερνούσαν τα 500 mg/L (Huang, Chen et al. 2007; Ghosalkar, Sahai et al. 2008). Το κυριότερο πρόβλημα ήταν η παρουσία μιας ισομορφής της ιντερφερόνης με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, η οποία οφειλόταν είτε σε αδυναμία μιας πρωτεάσης να αφαιρέσει τα επιπλέον 11 αμινοξέα στο Ν-τελικό άκρο, είτε σε συσσώρευση/συσσωμάτωση της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια παραγωγής της σε βιοαντιδραστήρες ζύμωσης και η οποία δεν μπορούσε να εξαλειφθεί με τις τεχνικές καθαρισμού. Ο Wu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο ατελής σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών κατά την έκκριση της ιντερφερόνης στο υλικό ζύμωσης πυροδοτούσε την έντονη αποδόμηση και συσσωμάτωση της, καταλήγοντας σε απότομη μείωση της δραστικότητάς της στο βιοαντιδραστήρα (Wu, Ma et al. 2010). Ωστόσο, ο Salunkhe και οι συνεργάτες του κατάφεραν να μειώσουν την έκφραση της πρόσμειξης/ισομορφής, επιτυγχάνοντας το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης 300 g/L της ιντερφερόνης με τη σωστή διαμόρφωση (Salunkhe, Soorapaneni et al. 2010).

Όσον αφορά στα φυτά, η παραγωγή ενεργών ανθρώπινων ιντερφερονών έχει ήδη αναφερθεί. Αρχικά, το cDNA της ανθρώπινης ιντερφερόνης α κλωνοποιήθηκε με επιτυχία σε πρωτοπλάστες ρυζιού μέσω λιποσωμάτων με συχνότητα μετασχηματισμού 10% (Zhu, Hughes et al. 1994). Επίσης, σε αρκετές μελέτες έχει επιτευχθεί εισαγωγή των γονιδίων των ανθρώπινων ιντερφερονών α και β σε φυτά αγγουριάς και πατάτας και έχει ανιχνευθεί η αντιική δραστικότητα της εκφραζόμενης

πρωτεΐνης. (Arazi, Slutsky et al. 2001; Ohya, Matsumura et al. 2001). Επιπλέον, σε εναιωρήματα καλλιεργειών κάλου και τριχοειδών ρίζας δυο ποικιλιών καρότου (*Daucus carota)* επετεύχθη η υψηλότερη συσσώρευση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ιντερφερόνης α2b, η οποία επέδειξε την υψηλότερη τιμή αντιικής δραστικότητας σε εκχυλίσμα φυτικής πρωτεΐνης (12.8×10^3 IU/mg TSP)(Luchakivskaya, Olevinskaya et al. 2012). Επίσης, σε προγενέστερη μελέτη των ιδίων αναφέρθηκε ότι η δραστικότητα της ιντερφερόνης α2b στα νεαρά φύλλα του διαγονιδιακού καρότου ($\geq 50.79 \times 10^3$ IU/g FW, fresh weight) ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα πιο ώριμα, πιθανότατα λόγω της ευαισθησίας της πρωτεΐνης στην αποδόμηση.(Luchakivskaya, Kishchenko et al. 2011) Ωστόσο, τα υψηλότερα ποσοστά ιντερφερόνης α2β (≥3 mg/g FW, φύλλων καπνού) επετεύχθησαν με μετασχηματισμό των χλωροπλαστών φυτών καπνού (Arlen, Falconer et al. 2007). Τέλος, όσον αφορά στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας, η ιντερφερόνη α2β έχει παραχθεί με τη βοήθεια του συστήματος *Lemna* (ενός υδρόβιου φυτού) από την εταιρεία Biolex, USA.

Όσον αφορά σε κύτταρα θηλαστικών, η ανθρώπινη IFN α2b παράγεται από σταθερές κυτταρικές σειρές ανθρώπινων εμβρυονικών κυττάρων νεφρού (Human Embryonic Kidney, HEK-293 cells) από την εταιρεία SPEED BioSystems για ερευνητική χρήση. Επίσης, έχει εκφραστεί και σε μυελωματικά κύτταρα ποντικού (Murine Myeloma NSo Cells) (Rossmann, Sharp et al. 1996), καθώς και στο γάλα διαγονιδιακών ποντικών (Li, Liu et al. 2013).

Τέλος, η IFNα2 που εκφράστηκε από κύτταρα Sf9 του εντόμου *Spodoptera frugiperda* δεν παρουσίαζε την επιθυμητή γλυκοσυλίωση, είχαν επιδράσει πρωτεολυτικά ένζυμα και δεν είχε σχηματιστεί ένας δισουλφιδικός δεσμός (Sugyiama, Ahorn et al. 1993).

Κάθε σύστημα έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του και σε πολλά έγιναν προσπάθειες βελτίωσης της έκφρασης της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ιντερφερόνης, όπως βελτίωση κωδικονίων και χρήση ενδογενών υποκινητών, πεπτιδίων οδηγών και 5’ και 3’ μη-μεταφραζόμενων περιοχών. Ωστόσο, μόνο η *Escherichia coli* κρατά έως σήμερα τα σκήπτρα της παραγωγής σε βιομηχανικό επίπεδο.

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μονοκύτταρα φύκη όπως το *C.reinhardtii* μπορεί να αποτελούν ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης με πολλά πλεονεκτήματα.

1.3 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Περίπου το 40% των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών εμπορικής αξίας είναι μη γλυκοσυλιωμένες και εκφράζονται συνήθως σε βακτήρια (*Escherichia coli*). Οι γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες παράγονται συνήθως σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών, όπως τα κύτταρα ωοθηκών των χάμστερ (Chinese hamster ovary cells, CHO) ή σε ζύμες (*S. cerevisiae* ή *P.pastoris)*. Άλλα συστήματα παραγωγής πρωτεϊνών είναι οι καλλιέργειες κυττάρων εντόμων και τα διαγονιδιακά φυτά και ζώα.

Ο ιδανικός οργανισμός για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις: γρήγορη ανάπτυξη, υψηλή απόδοση της

πρωτεΐνης σε βιολογικά ενεργή μορφή, να θεωρείται γενικώς ασφαλής (έλλειψη ενδοτοξινών ή μολυσματικών παραγόντων, π.χ ιών), ευκολία στο χειρισμό, δυνατότητα αύξησης της κλίμακας παραγωγής, χαμηλό κόστος καλλιέργειας και απομόνωσης της πρωτεΐνης, ικανότητα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, καθώς και να υποστηρίζει τη σωστή αναδίπλωση και αλληλεπίδραση των υπομονάδων των πρωτεϊνών που αποτελούνται από περισσότερα του ενός πεπτίδια. Κάθε σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών έχει μοναδικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, συνεπώς η επιλογή του συστήματος έκφρασης εξαρτάται συχνά από την πρωτεΐνη. (Rasala and Mayfield 2011)

1.3.1 Συμβατικά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών

Τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης, εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξης των βακτηρίων, των υψηλών ποσοστών παραγωγής και της ευκολίας των γενετικών χειρισμών, είναι συχνά η μέθοδος που επιλέγεται για μικρές πρωτεΐνες και πεπτίδια. Ωστόσο, η χρήση τους είναι περιορισμένη, καθώς σαν προκαρυώτες δεν μπορούν να εκτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοσυλίωση, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πρωτεϊνική λειτουργία ή συνοχή των σύνθετων ανθρώπινων πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παράγονται συχνά σαν αδιάλυτα έγκλειστα σωμάτια, που πρέπει να καθαριστούν και να αναδιπλωθούν, διαδικασία που είναι ανεπαρκής και ακριβή. Τέλος, οι βακτηριακές ενδοτοξίνες μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα σε αυτά τα βήματα καθαρισμού, καθώς και στην εφαρμογή των πρωτεϊνών αυτών. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

Οι ζύμες, ως μονοκύτταροι ευκαρυώτες, συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα του βακτηριακού συστήματος με τα ευκαρυωτικά χαρακτηριστικά της γονιδιακής έκφρασης (συγκρότηση σύνθετων πρωτεϊνών, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις). Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο γλυκοσυλίωσης από των θηλαστικών, οδηγώντας συχνά σε υπεργλυκοσυλιωμένες ετερόλογες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις στον άνθρωπο. (Cereghino and Cregg 2000; Çelik and Çalık 2012)

Η χρήση των καλλιεργειών των κυττάρων θηλαστικών για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιδεικνύει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα μικροβιακά συστήματα: οι σύνθετες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες είναι σε μεγάλο βαθμό ταυτόσημες με τις πρωτότυπες ανθρώπινες, όσον αφορά στην αναδίπλωση και τις τροποποιήσεις. Επιπλέον, είναι συνήθως συμβατές με το κλινικό πλαίσιο και μπορούν να παραχθούν σε καθιερωμένα συστήματα καλλιέργειας με έκκριση στο θρεπτικό υλικό. Ωστόσο, οι καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών είναι συχνά δύσκολες στο χειρισμό, ειδικά σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας, ενώ τα κόστη υλικών και καλλιέργειας είναι ιδιαίτερα υψηλά, με ένα εύρος τιμών από 150$ έως 1000$ ανά γραμμάριο πρωτεΐνης πριν τον καθαρισμό. Τέλος, ο κίνδυνος μόλυνσης της απομονωμένης πρωτεΐνης από δυνητικά παθογόνους παράγοντες, όπως ιοί και prions, αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα αυτού του είδους καλλιέργειας. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

Τα διαγονιδιακά ζώα που παράγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στο γάλα τους, έχουν τελευταία κερδίσει την προσοχή. Ενώ όμως η παραγωγική διαδικασία αυτή καθεαυτή, θα μπορούσε να είναι εύκολη και οικονομική εφόσον το κοπάδι έχει

δημιουργηθεί, η καθιέρωση διαγονιδιακών ζώων παραμένει ιδιαίτερα χρονοβόρα και ακριβή.

Παρά το γεγονός ότι πρακτικώς όλες οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση παράγονται σε βακτήρια, ζύμες ή κύτταρα θηλαστικών, αρκετά κτηνιατρικά προϊόντα εκφράζονται σε συστήματα εντόμων σε συνδυασμό με φορείς βακυλοιών. Οι κυτταρικές σειρές εντόμων μπορούν να αναπτυχθούν οικονομικά και με σχετική ευκολία. Τα τελευταία 20 χρόνια, πολλές πρωτεΐνες, από διαλυτές έως μεμβρανοσυνδεόμενες, έχουν παραχθεί επιτυχώς με αυτό το σύστημα. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

Τα διαγονιδιακά φυτά προσφέρουν την ευκαιρία μιας οικονομικής και ασφαλούς παραγωγικής μεθόδου για λειτουργικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Ως ευκαρυώτες, έχουν τη δυνατότητα να εκτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, και η παραγωγή μπορεί να κλιμακωθεί για οποιαδήποτε ζήτηση χρησιμοποιώντας καθιερωμένες καλλιεργητικές τεχνικές ("molecular farming"). Παραδείγματα φαρμακευτικών πρωτεϊνών εκφρασμένων σε φυτά αποτελούν η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, η ανθρώπινη λευκωματίνη ορού (human serum albumin), οι ιντερφερόνες και η ερυθροποιητίνη. Ωστόσο, αρκετά μειονεκτήματα έχουν καθυστερήσει την οικονομική επιτυχία μέχρι τώρα: τα πρότυπα γλυκοσυλίωσης στα φυτά συχνά διαφέρουν από εκείνα στα θηλαστικά, οδηγώντας σε μειωμένη λειτουργικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ακόμα και σε ανοσοαπόκριση. Το δεύτερο πρόβλημα είναι η καλλιέργεια των διαγονιδιακών φυτών στον αγρό, καθώς τα θέματα ασφάλειας είναι αμφιλεγόμενα, ειδικά ενόψει του κινδύνου της γενετικής ροής μέσω της διαγονιδιακής γύρης, και της αμφισβητήσιμης συμμόρφωσης προς την καλή κατασκευαστική πρακτική (good manufacturing practice, GMP) αυτών των διαδικασιών. Έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα γενετικής ροής από διαγονιδιακά φυτά σε γηγενείς ποικιλίες, π.χ. στην περίπτωση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του *Bacillus thuringiensis* στον αραβόσιτο, και των γονιδίων που προσφέρουν αντίσταση στα ζιζανιοκτόνα στην ελαιοκράμβη (canola). Τρίτον, συνήθως χρειάζονται αρκετά χρόνια από τον αρχικό μετασχηματισμό μέχρι τον επιτυχή καθαρισμό της πρωτεΐνης, διάστημα μεγάλο σε σχέση με τον περιορισμένο χρόνο της προστασίας των πνευματικών δικαιωμάτων. Τέλος, η απομόνωση πρωτεϊνών από φυτά είναι επίπονη, καθώς δεν είναι δυνατή η έκκριση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

1.3.2 Έκφραση πρωτεϊνών σε διαγονιδιακά μικροφύκη

Κατά τα τελευταία χρόνια, τα μικροφύκη έχουν κερδίσει την προσοχή ως πιθανά συστήματα έκφρασης φαρμακευτικών και βιοτεχνολογικών πρωτεϊνών. Βασικά, τα ευκαρυωτικά μικροφύκη προσφέρουν όλα τα πλεονεκτήματα των διαγονιδιακών φυτών μαζί με τα ειδικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών, όπως η γρήγορη ανάπτυξη, το σύντομο διάστημα από το μετασχηματισμό στο προϊόν και η εύκολη κλιμάκωση της παραγωγής. Μικροφύκη όπως η *Chlorella*, ο *Haematococcus* και η *Dunaliella*, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή φυσικών προϊόντων, δεν περιέχουν τοξίνες ή ανθρώπινα παθογόνα, όπως ιούς και prions, και γενικά θεωρούνται ασφαλή (GRAS, Generally Recognized As Safe). Το γεγονός αυτό καθιστά τα φύκη ελκυστικά για την παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων, όπως π.χ. εδώδιμα εμβόλια. (Rasala and Mayfield 2015)

Σε αντίθεση με τα διαγονιδιακά φυτά, η καλλιέργεια μπορεί να επιτευχθεί σε βιοαντιδραστήρες, γεγονός που αποκλείει προβλήματα γενετικής ροής σε άλλους οργανισμούς. Στη σπάνια περίπτωση μιας μη επιθυμητής απελευθέρωσης, δεν υπάρχει κίνδυνος εξάπλωσης των διαγονιδιακών φυκών, καθώς τα εργαστηριακά στελέχη συνήθως περιέχουν αρκετές μεταλλάξεις, οι οποίες δεν επιτρέπουν την επιβίωση υπό φυσικές συνθήκες. Επιπλέον, εξαιτίας του μικρού χρόνου διπλασιασμού (π.χ. 8 ώρες στην περίπτωση του *C.reinhardtii*) και της δυνατότητας να επιτευχθούν υψηλές πυκνότητες κυττάρων σε φωτιζόμενους βιοαντιδραστήρες, η παραγόμενη βιομάζα σε δεδομένο τόπο και χρόνο είναι σημαντικά υψηλότερη από των φυτών. (Rasala and Mayfield 2015)

Τέλος, το κόστος παραγωγής είναι χαμηλό, καθώς το θρεπτικό υλικό για φωτοσυνθετικούς οργανισμούς περιέχει μόνο μερικά άλατα, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες των κυττάρων θηλαστικών. (Griesbeck, Kobl et al. 2006) Για την ακρίβεια, τα πλεονεκτήματα της φωτοσυνθετικής ανάπτυξης είναι δύο: πρώτον, τα κόστη των υλικών είναι μειωμένα σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών, και από οικονομική σκοπιά, αλλά και όσον αφορά στην ενέργεια. Δεύτερον, η απουσία μιας πηγής άνθρακα μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης από βακτήρια ή μύκητες, απλοποιώντας την παραγωγική διαδικασία και επιτρέποντας την κλιμάκωσής της. (Rasala and Mayfield 2015)

1.4 Τα φύκη

Τα φύκη είναι μια πολυποίκιλη ομάδα ευκαρυωτικών φωτοσυνθετικών οργανισμών, με εξέχοντα ρόλο στη δέσμευση του άνθρακα και την παραγωγή οξυγόνου. Δεν διαθέτουν ρίζες, φύλλα ή άλλους ιστούς χαρακτηριστικούς των ανώτερων φυτών.

Στα πράσινα φύκη ανήκουν τα Χλωρόφυτα (Chlorophytes) και τα Στρεπτόφυτα (Streptophyte algae), και περιέχουν τις χρωστικές χλωροφύλλη α και β, οι οποίες τους προσδίδουν τη χαρακτηριστική τους πράσινη απόχρωση. Τα πράσινα φύκη είναι μια ετερογενής ομάδα που εκτιμάται ότι απαρτίζεται από περισσότερα από 8000 είδη, και τα οποία μπορεί να είναι μονοκύτταρα (μικροφύκη) ή πολυκύτταρα (μακροφύκη), με ή χωρίς μαστίγια και να ζουν σε γλυκά νερά ή θαλάσσια ενδιαιτήματα, στο έδαφος ή ακόμα και στο χιόνι. (Rasala and Mayfield 2015)

Τα φύκη και τα προϊόντα τους χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη διατροφή (καροτενοειδή), στις ζωοτροφές, στη φαρμακευτική, την ιατρική και την κοσμετολογία, ακόμη ως βιοφίλτρα και βιοδείκτες, στην παραγωγή λιπασμάτων και βιοκαυσίμων και στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

Ωστόσο, τελευταία τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή ποικίλων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, όπως αντισώματα, ανοσοτοξίνες, αυξητικές ορμόνες, εμβόλια, πρωτεΐνες που δρουν στο έντερο (gut-active nutraceuticals), συμπληρώματα διατροφής και βιομηχανικά ένζυμα. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει στο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii,* όντας το πιο μελετημένο φύκος μέχρι στιγμής. (Mathieu-Rivet, Kiefer-Meyer et al. 2014)

1.4.1 Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Το *Chlamydomonas reinhardtii* (Εικόνα 1.6 και Εικόνα 1.7) είναι ένα μονοκύτταρο χλωροφύκος του γλυκού νερού, το οποίο έχει χρησιμεύσει τα τελευταία 60 χρόνια ως φύκος–πρότυπο για φυσιολογικές, μοριακές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες. Συνεπώς, τα μοριακά εργαλεία για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό είναι αρκετά αναπτυγμένα, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων για γενετικό μετασχηματισμό και ανασυνδυασμένη γονιδιακή έκφραση (http://www.chlamy.org/).

Το εργαστηριακό στέλεχος αγρίου τύπου c137 (mt+) απομονώθηκε το 1945 από τον Gilbert M. Smith, στη Μασσαχουσέτη της Αμερικής. Το όνομά του σημαίνει «αυτός που έχει ένα μανδύα». Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η ταξινομική κατάταξη του *C.reinhardtii.*

Πίνακας 1.1 Η ταξινομική κατάταξη του *C.reinhardtii.*

Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Φύλο	Chlorophyta
Κλάση	Chlorophyceae
Τάξη	Chlamydomonadales
Οικογένεια	Chlamydomonadaceae
Γένος	*Chlamydomonas*
Είδος	*C.reinhardtii*



Εικόνα 1.6 Το *Chlamydomonas reinhardtii.*

(http://www.chlamy.org/)



Εικόνα 1.7 Κύτταρα του *C.reinhardtii* σε οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 10x.

1.4.2 Χαρακτηριστικά του *C.reinhardtii*

Το *C.reinhardtii* έχει περιγραφεί εκτενώς από την Elizabeth Harris στο βιβλίο "*Chlamydomonas* as a Model Organism". (Harris 2001) Το κύτταρο αγρίου τύπου έχει διάμετρο 10 μm περίπου (ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου) και εσωκλείεται σε ένα κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται κυρίως από πλούσιες σε υδροξυπρολίνη γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες μοιάζουν με τις εξτενσίνες των φυτών. Τα βλαστικά κύτταρα είναι απλοειδή, με μέγεθος πυρηνικού γονιδιώματος 1.6 Mb περίπου, οργανωμένο σε 17 χρωμοσώματα, και με ποσοστό GC που φτάνει το 62%. Το πυρηνικό γονιδίωμα αλληλουχήθηκε το 2007 και βρέθηκε ότι κωδικοποιεί για 15.000 γονίδια περίπου. Ωστόσο, η τοπολογία των γονιδίων του (assembly) δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι περίπου 15.8 Kb, είναι ευθύγραμμο και περιέχει μόνο λίγα γονίδια: *cob* (κωδικοποιεί για το κυτόχρωμα b), *cox1* (κωδικοποιεί για την υπομονάδα 1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος), πέντε υπομονάδες της μιτοχονδριακής NADH αφυδρογονάσης, τα μιτοχονδριακά rRNAs και τρία tRNAs.

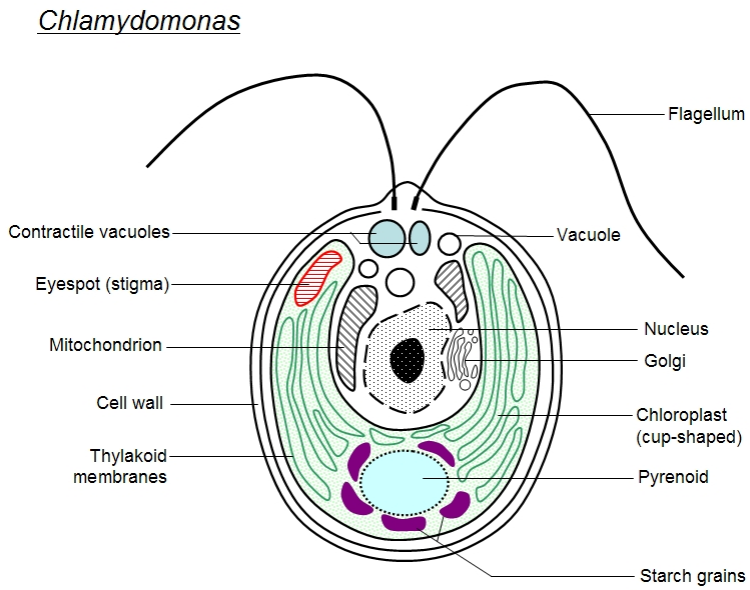
Ένας κυπελλοειδής χλωροπλάστης καταλαμβάνει το 66% του κυτταρικού χώρου και περιβάλλει μερικώς τον πυρήνα. Ένα διακριτό σωμάτιο εντός του χλωροπλάστη, το πυρηνοειδές, είναι η θέση δέσμευσης του διοξειδίου του άνθρακα και των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Το πυρηνοειδές περιβάλλουν σωμάτια αμύλου. Το γονιδίωμα του χλωροπλάστη είναι περίπου 200 Kb και φέρει γονίδια που παρουσιάζουν ομοιότητα με τα αντίστοιχα φυτικά γονίδια, ενώ η σειρά των γονιδίων διαφέρει σημαντικά από το πρότυπο των φυτών.

Δύο συσταλτά χυμοτόπια εντοπίζονται στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου, συμβάλλοντας στην ωσμορρύθμιση.

Δυο πρόσθια μαστίγια, μήκους 10 έως 12 μm, επιτρέπουν στο κύτταρο να κινείται μέσω διολίσθησης (Gliding motility). Τα μαστίγια εξέχουν από το κυτταρικό τοίχωμα

μέσω ειδικών περιοχών, που ονομάζονται κολάρο. Τα μαστίγια προκύπτουν από ένα ζεύγος βασικών σωματίων (basal bodies), τα οποία βρίσκονται ακριβώς κάτω από το κορυφαίο άκρο του κυττάρου, και πάνω από τον πυρήνα. Τα βασικά σωμάτια συνδέονται μεταξύ τους με μια γραμμωτή ίνα και επισυνάπτονται στα εγγύς άκρα τους με τέσσερις δέσμες μικροσωληνίσκων, οι οποίοι εκτείνονται εσωτερικά της πλασματικής μεμβράνης, γύρω από το πρόσθιο τμήμα του κυττάρου.

Το eyespot είναι μια δομή που λειτουργεί σαν αισθητήρας, ο οποίος επιτρέπει στα κινούμενα κύτταρα να προσανατολίζονται σε σχέση με το φως. Περιέχει καροτενοειδή και βρίσκεται εντός της μεμβράνης του χλωροπλάστη. Στη Εικόνα 1.8 φαίνεται η κυτταρική οργάνωση του *C.reinhardtii.*



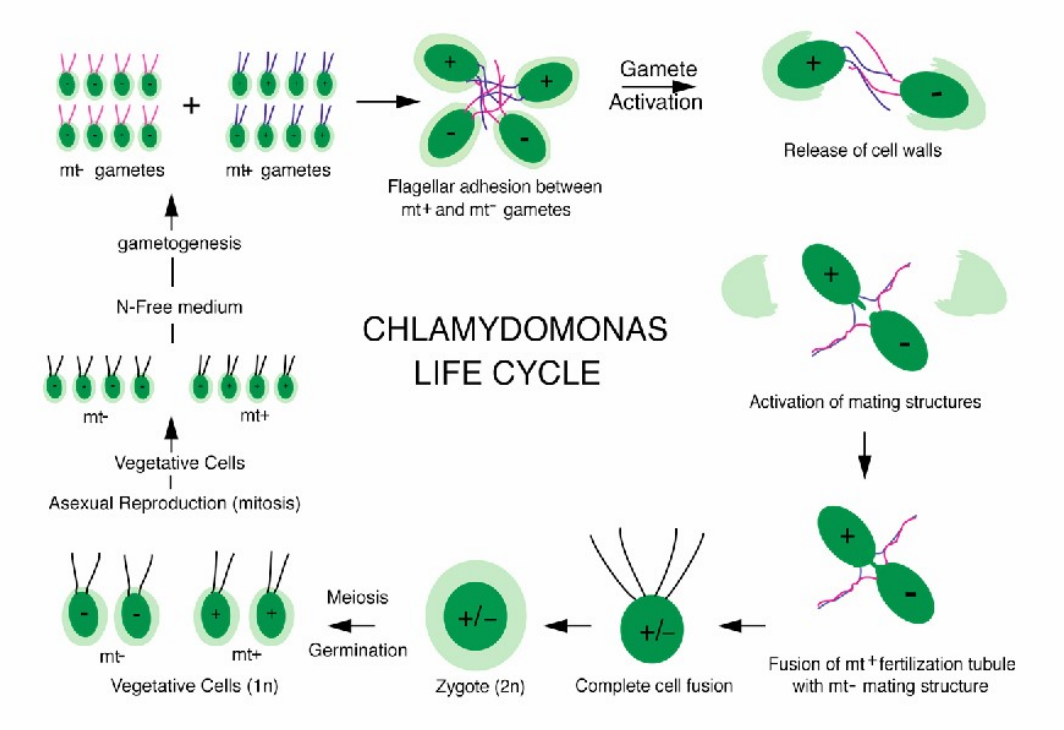
Εικόνα 1.8 Η κυτταρική οργάνωση του *C.reinhardtii.*
(http://www.chlamy.org/)

Το κύτταρο αγρίου τύπου αναπτύσσεται εύκολα σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υλικό, σε ελαφρώς όξινο pH (6.5), και δεν έχει απαιτήσεις για συμπλήρωμα βιταμινών ή άλλων παραγόντων. Το οξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα, επιτρέποντας την ανάπτυξη στο σκοτάδι. Άλλα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος δεν μπορούν να υποστηρίξουν ανάπτυξη στο σκοτάδι, ούτε διάφορα σάκχαρα, αιθανόλη, γλυκερόλη ή άλλες οργανικές ενώσεις. Για τα στελέχη αγρίου τύπου, η ανάπτυξη σε φως με ή χωρίς οξικό οξύ είναι ταχύτερη από αυτήν στο σκοτάδι. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι από 20 έως 25 ^{o}C. Σε θερμοκρασία 25 ^{o}C, σε θρεπτικό υλικό με τα απαραίτητα μέταλλα και με επαρκές φως (200–400 μEinsteins/m^{2}sec, φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία), μπορεί να επιτευχθεί ένας μέσος χρόνος διπλασιασμού από 5 έως 8 ώρες. (Harris 2001)

1.4.3 Ο κυτταρικός κύκλος του *C.reinhardtii*

Το βλαστικό κύτταρο αναπαράγεται αγενώς με διαίρεση: ο πρωτοπλάστης διαιρείται μιτωτικά για να σχηματίσει από 4 έως 8 ζωοσπόρια όμοια με το γονικό κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης τα μαστίγια απορροφώνται και εμφανίζονται ξανά στα θυγατρικά κύτταρα. Τα θυγατρικά κύτταρα περιβάλλονται από το γονικό κυτταρικό τοίχωμα και απελευθερώνονται ταυτόχρονα με την έκκριση ενός ειδικού λυτικού ενζύμου. (Harris 2001)

Το *C.reinhardtii* αναπαράγεται και εγγενώς. Σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε σεξουαλικά ενεργούς γαμέτες. Υπάρχουν δυο συζευκτικοί τύποι (mating types), ο (mt+) και ο (mt-), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους μόνο φυσιολογικά και όχι μορφολογικά. Οι γαμέτες συν και πλην αλληλεπιδρούν αρχικά κατά μήκος των μαστιγίων τους με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών αγλουτινίνης. Το ζευγάρωμα των μαστιγίων πυροδοτεί έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος, διαμεσολαβούμενο από cAMP. Το ζευγάρωμα ακολουθεί μια μορφολογική αλλαγή («ενεργοποίηση») στα άκρα των μαστιγίων και μια διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των δυο συντρόφων μέσω ενός ειδικού λυτικού ενζύμου. Η σύντηξη των δυο συντρόφων ξεκινά σε ειδικές δομές στο πρόσθιο άκρο των κυττάρων και συνεχίζεται πλευρικά από εμπρός προς τα πίσω. Το νεοσχηματισμένο διπλοειδές ζυγωτό παραμένει κινητικό για αρκετές ώρες σαν ένα κύτταρο με τέσσερα μαστίγια. Τα μετάγραφα του ζυγωτού εμφανίζονται μερικά λεπτά μετά τη γαμετική σύντηξη. Αρχίζει ο σχηματισμός του σκληρού και ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματος του ζυγοσπορίου, οι χλωροπλάστες αποσυντίθενται με απώλεια της χλωροφύλλης και λιπιδικά σωμάτια συσσωρεύονται τις επόμενες 4 με 6 ημέρες. Το κυτταρικό τοίχωμα του ζυγοσπορίου παρέχει προστασία ενάντια σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, και αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη, όπως και το βλαστικό κύτταρο. Τα ζυγοσπόρια μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα στο έδαφος για πολλά χρόνια. Ωστόσο, στο εργαστήριο χρειάζονται μόνο μερικές ημέρες για την ωρίμανση του ζυγοσπορίου, πριν την επαγωγή της βλάστησης με αποκατάσταση του αζώτου παρουσία φωτός. Ακολουθεί η διαδικασία της μείωσης και η απελευθέρωση τεσσάρων απλοειδών μειωτικών προϊόντων. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, μπορεί να συμβεί μιτωτική διαίρεση μετά τη μείωση και πριν το άνοιγμα του ζυγοσπορίου, με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν οκτώ αντί των τεσσάρων θυγατρικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξαρτάται από το στέλεχος. (Harris 2001) Ο κύκλος ζωής του *C.reinhardtii* απεικονίζεται στην Εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9 Ο κύκλος ζωής του *C.reinhardtii*
(http://www.chlamy.org/)

1.5 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του *C. reinhardtii* στην έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Το χλωροφύκος *C.reinhardtii* διαθέτει την πιο εξελιγμένη μοριακή και γενετική εργαλειοθήκη που έχει αναπτυχθεί για οποιοδήποτε φύκος. Έχουν αλληλουχηθεί και τα τρία γονιδιώματά του (πυρηνικό, χλωροπλαστικό και μιτοχονδριακό) και υπάρχουν διαθέσιμα πρωτόκολλα και φορείς μετασχηματισμού και για τα τρία γονιδιώματα. (Rasala and Mayfield 2015)

Επιπλέον, το *C. reinhardtii* είναι ένας απλοειδής ευκαρυωτικός οργανισμός με ένα χαρακτηρισμένο κύκλο ζωής. (Harris 2001) Συνεπώς, η γενετική μηχανική και η βελτίωση στελεχών μέσω διασταυρώσεων είναι εύκολες, γρήγορες και άμεσες.

Ακόμη, το *C. reinhardtii* αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα (χρόνος διπλασιασμού 5-8 ώρες) και μπορεί να φτάσει σε συγκεντρώσεις πάνω από 10^7 κύτταρα/ml. Καθώς το *C. reinhardtii* είναι φωτοσυνθετικός οργανισμός, οι απαιτήσεις του για θρεπτικά είναι ελάχιστες (μικρό κόστος καλλιέργειας). Τέλος, συγκαταλέγεται στους ασφαλείς μικροοργανισμούς (GRAS), γεγονός που το καθιστά ελκυστικό για την παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων. (Griesbeck, Kobl et al. 2006)

Επίσης, κοινή στρατηγική στη βιομηχανική παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι η στοχευμένη έκκριση στον περιπλασμικό ή εξωκυτταρικό χώρο. Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών στον περιπλασμικό χώρο παρουσιάζει μειωμένη έκθεση στη δράση των πρωτεασών, ευκολότερη παραλαβή από το υλικό καλλιέργειας, μειωμένη ανάδραση (inhibitory feedback) στη γενετική έκφραση και μπορεί να επιτρέψει συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες συνεχούς ροής/ανατροφοδότησης (perfusion-style). Επίσης, οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του ενδοπλασματικού

δικτύου και της συσκευής Golgi υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. (Lauersen, Berger et al. 2013) Σε μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίχθηκε ότι το *C.reinhardtii* διαθέτει N-γλυκάνες (sialylated N-glycans) παρόμοιες των θηλαστικών, χαρακτηριστικό που δε συναντάται σε άλλα φυτικά συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών.(Mamedov and Yusibov 2011) Επιπλέον, το *C.reinhardtii* συνθέτει πολύπλοκες ευθύγραμμες και διακλαδισμένες O-γλυκάνες συνδεδεμένες με υδροξυπρολίνη (Hyp-bound O-glycans) με ένα μίγμα από εξόζες και πεντόζες, για τις ενδογενείς πρωτεΐνες του κυτταρικού του τοιχώματος. Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί εάν η O-γλυκοζυλίωση στο *C.reinhardtii* παρομοιάζει το πρότυπο γλυκοσυλίωσης των θηλαστικών. (Bollig, Lamshöft et al. 2007)

Ωστόσο, η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στο *C. reinhardtii* παρουσιάζει μερικές δυσκολίες. Κατ'αρχάς, λόγω του υψηλού ποσοστού σε GC βάσεις (62%) και λόγω της προτίμησης του μικροφύκους προς διαφορετικές τριπλέττες του γενετικού κώδικα απ' ότι τα κύτταρα των θηλαστικών, η αλληλουχία του γονιδίου που πρόκειται να εκφραστεί στον πυρήνα ή το χλωροπλάστη, θα πρέπει να υποστεί βελτιστοποίηση των κωδικονίων της (codon optimization). (Fuhrmann, Oertel et al. 1999) Επιπλέον, επειδή υπάρχει διαφορά στην προτίμηση συγκεκριμένων κωδικονίων ανάμεσα στον πυρήνα και το χλωροπλάστη, απαιτείται η ανάλογη βελτιστοποίηση.

1.5.1 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο χλωροπλάστη του *C.reinhardtii*

Οι περισσότερες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν παραχθεί στο *C.reinhardtii* έχουν εκφραστεί στο χλωροπλάστη, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης που μπορεί να επιτευχθεί (2-20% TSP, total soluble protein). Η παραγωγή τους ωστόσο, ενέχει κάποιους περιορισμούς. Κατ'αρχάς, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στο χλωροπλάστη δεν μπορούν να εκκριθούν, πράγμα που σημαίνει ότι τα κύτταρα πρέπει να συλλεχθούν και να λυθούν ώστε να απομονωθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη. (Rasala, Muto et al. 2010).

Επιπλεόν, τα πράσινα φύκη προέκυψαν εξελικτικά από ένα ενδοσυμβιωτικό συμβάν, όπου ένας ευκαρυωτικός πρόγονος εκγλώβισε/ενσωμάτωσε ένα φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο, δημιουργώντας το χλωροπλάστη. Έτσι, οι χλωροπλάστες διαθέτουν συσκευή γονιδιακής έκφρασης προκαρυωτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των ριβοσωμάτων και των μεταφραστικών παραγόντων (translation factors). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα βακτήρια, ο χλωροπλάστης των φυκών διαθέτει μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών συνοδών (chaperones), ισομερασών (protein disulfide isomerases) και πεπτιδυλ-προπυλ-ισομερασών (peptidylprolyl isomerases, PPIases), οι οποίες βοηθούν στη συγκρότηση των σύνθετων πρωτεϊνών της φωτοσυνθετικής συσκευής. Συνεπώς, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται από το χλωροπλαστικό γονιδίωμα διαθέτουν δισουλφιδικούς δεσμούς, αλλά δεν είναι γλυκοσυλιωμένες. (Rasala and Mayfield 2015)

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί το παρακάτω παράδειγμα έκφρασης πρωτεϊνών από το χλωροπλάστη του *C. reinhardtii.* Το γεγονός ότι ο χλωροπλάστης των φυκών μπορεί να παράγει και να συναρμολογεί σύνθετες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες, όπως τα αντισώματα, αλλά διαθέτει μια μεταφραστική συσκευή προκαρυωτικής προέλευσης, προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία να παραχθούν καινούριες πρωτεΐνες, όπως οι ανοσοτοξίνες (immunotoxins). Οι ανοσοτοξίνες αποτελούνται από αντισώματα

συζευγμένα είτε χημικά, είτε γενετικά με ευκαρυωτικές τοξίνες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικές θεραπείες, στοχεύοντας και σκοτώνοντας ειδικά τα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, οι ανοσοτοξίνες δεν μπορούν να παραχθούν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως κύτταρα θηλαστικών ή ζύμες, διότι οι τοξίνες στοχεύουν τη συσκευή μετάφρασης των πρωτεϊνών, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επίσης, τα προκαρυωτικά συστήματα παραγωγής πρωτεϊνών, όπως η *E.coli*, αδυνατούν να αναδιπλώσουν σωστά σύνθετες πρωτεΐνες, όπως ολόκληρα αντισώματα ή τμήματά τους, καθιστώντας το χλωροπλάστη των φυκών μοναδικό σύστημα έκφρασης αυτών των χιμαιρικών πρωτεϊνών. (Tran, Van et al. 2013)

1.5.2 Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα του *C.reinhardtii*

Η έκφραση στον πυρήνα περιλαμβάνει τα πλεονεκτήματα των ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης, όπως η επαγόμενη έκφραση του διαγονιδίου, η αποτελεσματική αναδίπλωση σύνθετων πρωτεϊνών, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η έκκριση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και η γλυκοσυλίωση (αν και ενδέχεται να μην είναι ταυτόσημη με τη γλυκοσυλίωση των θηλαστικών). Ο πυρηνικός μετασχηματισμός συμβαίνει συνήθως με τυχαία ένθεση μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού. (Rasala and Mayfield 2015)

Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά λόγω της θέσης ένθεσης και του μηχανισμού αποσιώπησης που προωθείται από επιγενετικά φαινόμενα παρόμοια με αυτά των φυτών. Στο *C. reinhardtii* και σε άλλα φύκη, όπως και στα χερσαία φυτά, αποσιωπούμενα πολλαπλά αντίγραφα διαγονιδίων επιδεικνύουν υψηλά επίπεδα DNA μεθυλίωσης. Αντίθετα, τα μεμονωμένα αντίγραφα υπόκεινται σε αποσιώπηση χωρίς ανιχνεύσιμη μεθυλίωση κυτοσίνης (Rasala and Mayfield 2011).

Η αποσιώπηση γονιδίων αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *Chlamydomonas*, ωστόσο πρόσφατες μελέτες βοηθούν ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα. Ο Neupert et al. (2009) ανέπτυξε στελέχη με κατεστραμμένη αποσιώπηση γονιδίου χρησιμοποιώντας UV μεταλλαξιγένεση και επιλογή σε θρεπτικό υλικό που επιτρέπει υψηλότερη αντιβιοτική αντοχή ανάλογη της υψηλότερης έκφρασης του διαγονιδιακού προϊόντος, ώστε να επιλέξει στελέχη με αυξημένη συσσώρευση πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, τα πιο εντυπωσιακά επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης ήταν μόνο 0.2% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης (total soluble protein, TSP), συγκρινόμενα με το ποσοστό του 10% TSP που παράγεται από το χλωροπλάστη. Έχει αξιωθεί ότι η αποσιώπηση γονιδίου είναι δύσκολο να εξαλειφθεί, επειδή έχει εξελιχθεί ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια σε ενδοκυτταρικά παθογόνα ή ιούς. (Rosenberg, Oyler et al. 2008) (Neupert, Karcher et al. 2009)

Από τις 20 πρωτεΐνες βιομηχανικού ενδιαφέροντος που έχουν εκφραστεί στο *C.reinhardtii* (Rasala and Mayfield 2014), μόνο τρεις από αυτές εκφράστηκαν επιτυχώς από το πυρηνικό γονιδίωμα: α) μια ξυλανάση (Rasala, Lee et al. 2012), β) μια ice-binding protein (Lauersen, Vanderveer et al. 2013) και γ) η ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. 2009). Η ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO) είναι μια ορμόνη γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως, η οποία χρησιμοποιείται ως θεραπεία της αναιμίας που προκαλείται από νεφρική

ανεπάρκεια ή από αντικαρκινικές θεραπείες. Σήμερα, η EPO παράγεται σε κύτταρα θηλαστικών, και το κόστος της ξεπερνάει τα 2 εκατομμύρια $/kg. Ωστόσο, ο Eichler-Stahlberg και οι συνεργάτες του κατάφεραν να εκφράσουν την ανθρώπινη EPO από τον πυρήνα του *C. reinhardtii*, η οποία εκκρίθηκε στο υλικό καλλιέργειας σε συγκέντρωση 100μg/L, και με μοριακό βάρος παρόμοιο με της φυσικής πρωτεΐνης. (Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. 2009)

1.6 Τεχνικές μετασχηματισμού του *C. reinhardtii*

Το χλωροπλαστικό γονιδίωμα μπορεί να μετασχηματιστεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού χρησιμοποιώντας βομβαρδισμό με σωματίδια χρυσού ή βολφραμίου επικαλυμμένα με DNA. (Koop, Herz et al. 2007) Ο πυρηνικός μετασχηματισμός μπορεί επίσης να επιτευχθεί με βιολιστικό βομβαρδισμό, αλλά οι προτιμώμενες μέθοδοι είναι η ηλεκτροπόρωση (electroporation) ή η ανακίνηση με γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) χρησιμοποιώντας στέλεχος με ελαττωματικό κυτταρικό τοίχωμα. (León and Fernández 2007; Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. 2009) Καινούριες τεχνικές μετασχηματισμού, όπως το σύστημα ανασυνδυασμού Cre/lox, έχουν δειχθεί ότι ενεργούν επιτυχώς στον πυρηνικό μετασχηματισμό του *Chlamydomonas.* (Zschoernig 2007)

Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί γονίδια μάρτυρες, όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (Fuhrmann, Oertel et al. 1999) (Franklin, Ngo et al. 2002) και η λουσιφεράση (luciferase) (Mayfield and Schultz 2004) (Shao and Bock 2008), για τον έλεγχο της πυρηνικής και χλωροπλαστικής γονιδιακής έκφρασης. Τέλος, τεχνικές που έχουν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί σε φυτά, όπως ο μετασχηματισμός με *Agrobacterium tumefaciens*, έχουν δειχθεί ότι αποδίδουν και στο *Chlamydomonas.* (Kumar, Misquitta et al. 2004)

Προκειμένου να επιτευχθεί πυρηνική έκφραση, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι υποκινητές είναι αυτοί των γονιδίων *HSP70A* (κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη κατά του θερμικού στρες, heat shock protein), *psaD* (κωδικοποιεί για την υπομονάδα ΙΙ του ενεργού κέντρου του φωτοσυστήματος Ι) και *rbcS2* (κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ενζύμου RuBisCO). (Schroda, Beck et al. 2002) (Fischer and Rochaix 2001) (Berthold, Schmitt et al. 2002) Επίσης, έχει δειχθεί ότι χιμαιρικοί υποκινητές, όπως ο HSP70A/rbcS2, έχουν αυξήσει τα επίπεδα μεταγραφής (Schroda, Blöcker et al. 2000) (Wu, Hu et al. 2008). Επιπλέον, η τοποθέτηση ενδογενών εσωνίων στα διαγονίδια ενισχύει την έκφρασή τους. Το πρώτο εσώνιο του ενδογενούς γονιδίου *rbcS2* έχει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στην αύξηση έκφρασης του mRNA και τη συσσώρευση πρωτεΐνης, και τώρα χρησιμοποιείται συχνά για την ενίσχυση της έκφρασης ανασυνδυασμένων γονιδίων. (Lumbreras, Stevens et al. 1998) Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του πυρηνικού και χλωροπλαστικού μετασχηματισμού του *C. reinhardtii.*

Πίνακας 1.2 Σύγκριση πυρηνικής και χλωροπλαστικής γενετικής μηχανικής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *C. reinhardtii.* (Rasala and Mayfield 2014)

	Πυρήνας	**Χλωροπλάστης**
Μέθοδος μετασχηματισμού	Ηλεκτροπόρωση, βιολιστική, ανακίνηση με γυάλινα σφαιρίδια	Βιολιστική
Ενσωμάτωση γονιδίου	Μη ομόλογος ανασυνδυασμός	Ομόλογος ανασυνδυασμός
Επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεΐνης	Χαμηλά: έως 0.25% TSP	Υψηλά: 1-21% TSP
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση	Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, φωσφορυλίωση
Εντοπισμός πρωτεϊνών	Στόχευση σε: κυτόπλασμα, πυρήνα, χλωροπλάστη, ενδοπλασματικό δίκτυο, μιτοχόδρια, έκκριση	Παραμονή στο χλωροπλάστη
Μηχανισμός έκφρασης γονιδίων	Ευκαρυωτικός	Προκαρυωτικός
Επαγωγή έκφρασης μέσω	Θρεπτικών, χημικών, συνθηκών καλλιέργειας	Φωτός
Γονιδιακή αποσιώπηση	Πιθανή	Όχι πιθανή

Στόχος της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η έκφραση της ανθρώπινης ιντερφερόνης α2b στο χλωροφύκος *C.reinhardtii*. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η IFNα2b είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αντιικός παράγοντας, που παράγεται από ένα προκαρυωτικό σύστημα, ανίκανο να προσδώσει τη σωστή διαμόρφωση στην πρωτεΐνη. Αντίθετα, το σύστημα του ευκαρυωτικού χλωροφύκους *C.reinhardtii,* θα μπορούσε να υποστηρίξει την έκφραση της IFNα2b. Συνεπώς, η έκφραση της IFNα2b στοχεύθηκε στον πυρήνα του *C.reinhardtii,* καθώς απορρίφθηκε αυτόματα το ενδεχόμενο χλωροπλαστικής έκφρασης για μια γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, όσο ενθαρρυντικά και αν είναι τα ποσοστά διαλυτής πρωτεΐνης που έχουν σημειωθεί σε μελέτες ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Συνεπώς, η IFNα2b αναμένεται να γλυκοσυλιωθεί από το *C.reinhardtii,* καθώς το φύκος αυτό πραγματοποιεί O-γλυκοσυλίωση για τις ενδογενείς πρωτεΐνες του κυτταρικού του τοιχώματος (Bollig, Lamshöft et al. 2007)

Τα επιμέρους βήματα που ακολουθήθηκαν ώστε να επιτευχθεί ο τελικός στόχος ήταν η ανάπτυξη της καλλιέργειας του χλωροφύκους και η διερεύνηση αποδοτικού τρόπου μετασχηματισμού του.

Όσον αφορά στην καλλιέργειά του, δοκιμάστηκαν οι συνθήκες που προτείνονταν από τη βιβλιογραφία (φως, θερμοκρασία, αέρας, παροχή CO_2, ανάδευση) και τα θρεπτικά υλικά, με στόχο τη βέλτιστη ανάπτυξη με το μικρότερο κόστος. Επίσης, όσον αφορά στο μετασχηματισμό, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αποδοτικότερη μέθοδος για τον πυρηνικό μετασχηματισμό του χλωροφύκους είναι η ηλεκτροπόρωση. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pChlamy_1 και το αγρίου τύπου στέλεχος *C.reinhardtii* 137c από το GeneArt® *Chlamydomonas* Engineering Kit (Invitrogen). Μετά το μετασχηματισμό, αναμενόταν η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο πυρηνικό γονιδίωμα του *C.reinhardtii* μέσω ετερόλογου ανασυνδυασμού. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν με βάση την έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής (υγρομυκίνη Β) που φέρει ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της colony PCR. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της IFNα2b ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της Real-time quantitative PCR.

Όσον αφορά στο γονίδιο της ιντερφερόνης του ανθρώπου, λόγω της προτίμησης του χλωροφύκους προς διαφορετικές τριπλέττες του γενετικού κώδικα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία της IFNα2b υπέστη βελτιστοποίηση (codon optimization) και συντέθηκε *de novo*. Στην τελευταία προστέθηκαν ένα πεπτίδιο οδηγός (signal peptide) απαραίτητο για την έκκριση στον αποπλάστη και μια αλληλουχία που αντιστοιχούσε σε μία 3’ μη-μεταφραζόμενη περιοχή (3’ UTR), καθώς αυτή απουσίαζε από το πλασμίδιο. Πιο συγκεκριμένα, το πεπτίδιο οδηγός της IFNα2b, αντικαταστάθηκε από το πεπτίδιο οδηγό του ενδογενούς γονιδίου του ενζύμου της αρυλσουλφατάσης (*ars1*, arylsulfatase 1), το οποίο κωδικοποιεί για μια σουλφατάση που εντοπίζεται στον αποπλάστη. Τέλος, η αλληλουχία 3’ UTR που προτεινόταν από τον κατασκευαστή του πλασμιδίου βρέθηκε ότι ανήκει στο γονίδιο *rbcS2* (Rubisco small subunit) του μικροφύκους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια του *C.reinhardtti* c137

Το φύκος *Clamydomonas reinhardtti* c137 (στέλεχος αγρίου τύπου) καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό TAP (Tris-Acetate-Phosphate) σύμφωνα με τη συνταγή των (Gorman and Levine 1965), σε pH 6.5, στους 25 ºC υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση (150 rpm) και υπό συνεχή φωτισμό (λαμπτήρες φθορισμού Osram 36W/77 fluora και Philips 36W/15 red) σε απόσταση 50 cm από τις καλλιέργειες. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού φαίνεται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού TAP σε τρυβλία Petri, χρησιμοποιήθηκε άγαρ (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) σε συγκέντρωση 15g/L. Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού υλικού φαίνεται στο Παράρτημα. Τέλος, η αποθήκευση του *C. reinhardtii* (του στελέχους αγρίου τύπου και των μετασχηματισμένων αποικιών) επετεύχθη με ανακαλλιέργεια σε τρυβλία μία φορά το μήνα. Έγιναν πολλές προσπάθειες κρυοσυντήρησης με διαφορετικά κρυοπροστατευτικά υλικά (γλυκερόλη, DMSO), χωρίς όμως επιτυχία.

2.2 Σχεδιασμός της αλληλουχίας του γονιδίου της ιντερφερόνης IFNα2b για έκφραση στο *C.reinhardtti* c137

Η αλληλουχία (νουκλεοτιδική και αμινοξική) της ιντερφερόνης του ανθρώπου huIFNα2b ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων του NCBI με κωδικό NM000605, ενώ είναι καταχωρημένη και στη βάση δεδομένων Uniprot με κωδικό P01563.

Λόγω της προτίμησης του μικροφύκους προς διαφορετικές τριπλέττες του γενετικού κώδικα απ' ότι τα κύτταρα των θηλαστικών, η αλληλουχία του γονιδίου που κλωνοποιήθηκε υπέστη βελτιστοποίηση (codon optimization). Οι πληροφορίες αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων Codon Usage Database και τα κωδικόνια που προτιμώνται για κάθε αμινοξύ στον πυρήνα και το χλωροπλάστη του *C.reinhardtii* απεικονίζονται στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος.

Ωστόσο, κατά τη βελτιστοποίηση προέκυψαν πιθανές θέσεις ματίσματος (splice sites), αλληλουχίες δηλαδή που βρίσκονται στα όρια εξωνίου-εσωνίου και αναγνωρίζονται κατά το μάτισμα του mRNA, οι οποίες αφαιρέθηκαν. Οι θέσεις ματίσματος στο *C.reinhardtii* είναι παρόμοιες με των χερσαίων φυτών και των ανθρώπων. Η 5΄ θέση ματίσματος στο 5΄ (αριστερό) άκρο του εσωνίου περιλαμβάνει τη συντηρημένη αλληλουχία GT και η 3΄ θέση ματίσματος στο 3΄ (δεξί) άκρο του εσωνίου περιλαμβάνει τη συντηρημένη αλληλουχία AG. Επιπλέον, ειδικά για το *C.reinhardtii,* οι αλληλουχίες που ελέγχθηκαν ως θέσεις ματίσματος ήταν οι 5΄ AG**GT**G και 3΄ C**AG**G, σύμφωνα με τους (Labadorf, Link et al. 2010).

Η ανθρώπινη ιντερφερόνη IFNα2b διαθέτει το δικό της πεπτίδιο οδηγό για την έκκρισή της. Ωστόσο, επειδή η αναγνώρισή του από το *C.reinhardtii* ήταν αμφίβολη, το πεπτίδιο οδηγός αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από το πεπτίδιο οδηγό του ενζύμου αρυλσουλφατάση του *C.reinhardtii,* το οποίο οδηγεί την αρυλσουλφατάση στον περιπλασμικό χώρο του φύκους. Ο κωδικός του γονιδίου της αρυλσουλφατάσης (*ars1*, periplasmic arylsulfatase) στη βάση δεδομένων του NCBI είναι NW_001843572.

Επιπλέον, για την έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου στο *C.reinhardtii* ήταν απαραίτητη η προσθήκη μιας 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής (3΄ UTR) αμέσως μετά το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου της IFNα2b. Η 3' UTR που προτεινόταν από τον κατασκευαστή του πλασμιδίου φαίνεται στην Εικόνα 2.1.

CCGCTCCGTGTAAATGGAGGCGCTCGTTGATCTGAGCCTTGCCCCCTGACGA ACGGCGGTGGATGGAAGATACTGCTCTCAAGTGCTGAAGCGGTAGCTTAGC TCCCCGTTTCGTGCTGATCAGTCTTTTTCAACACGTAAAAAGCGGAGGAGTT TTGCAATTTTGTTGGTTGTAACGATCCTCCGTTGATTTTGGCCTCTTTCTCCA TGGGCGGGCTGGGCGTATTTGAAGCG

Εικόνα 2.1 Η 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή (3΄ UTR) που προτεινόταν από τον κατασκευαστή του πλασμιδίου για την έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου στο *C.reinhardtii.*

2.3 Πλασμίδια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμίδια:

Α) Το πλασμίδιο pChlamy_1 Vector.

Για τον πυρηνικό μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pChlamy_1 Vector, του GeneArt® *Chlamydomonas* Engineering Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Ο pChlamy_1 Vector δε διαθέτει θέση έναρξης της αντιγραφής για πολλαπλασιασμό στο *C.reinhardtii*. Επιπλέον, διαθέτει έναν υβριδικό υποκινητή (Hsp70A-RbcS2), ο οποίος υποστηρίζει συνεχή έκφραση της επιθυμητής αλληλουχίας, μια περιοχή με θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού (multiple cloning site), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη Β (*aph7*), υπό τον έλεγχο του υποκινητή της β2-τουμπουλίνης, για επιλογή στο *C.reinhardtii,* το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη για επιλογή στην *E.coli*, καθώς και τη θέση έναρξης της πλασμιδιακής αντιγραφής προερχόμενη από το πλασμίδιο pUC για πολλαπλασιασμό στην *E.coli*. Ο χάρτης του πλασμιδίου pChlamy_1 Vector απεικονίζεται στην Εικόνα 1 του Παραρτήματος. Η αλληλουχία του πλασμιδίου είναι διαθέσιμη στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.lifetechnologies.com.

Β) Το πλασμίδιο pUC57- IFNa2b- 3'UTR.

Η αλληλουχία της ιντερφερόνης (IFNa2b-3'UTR), η οποία συνετέθη από την εταιρεία Genescript (Genescript, Piscataway Township, USA), εστάλη κλωνοποιημένη στο πλασμίδιο pUC57 σε λυοφιλιωμένη μορφή. Η αναδιάλυση του λυοφιλιωμένου πλασμιδίου pUC57- IFNA2b- 3'UTR πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα έκλουσης (elution buffer) (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany). Το πλασμίδιο εστάλη για ανάγνωση της αλληλουχίας του (CeMIA SA, Λάρισα, Ελλάδα), για να διαπιστωθεί η σωστή σύνθεσή του.

2.4 Μετασχηματισμός *E.coli*

Για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων ακολούθησε μετασχηματισμός DH5a δεκτικών κυττάρων *E.coli* με τη βοήθεια θερμικού σοκ (Joseph Sambrook 1989), σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Σε σωλήνα eppendorf αναδεύονται 1μl πλασμιδίου (≈ 50ng συγκέντρωση) και 50μl DH5a δεκτικών κυττάρων *E.coli* και τοποθετούνται στον πάγο για 30 min.
- Κατόπιν ακολουθεί θερμικό σοκ για 1 min στους 42 ^{o}C και επανατοποθέτηση στον πάγο για 1-2 min.
- Προστίθενται 100μl θρεπτικού υλικού LB (Luria Bertani) και ο σωλήνας eppendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο των 37 ^{o}C για 40 min.
- Ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία με αμπικιλλίνη (200 μg/ml) και τοποθέτηση σε επωαστήρα στους 37 ^{o}C για 24h.
- Στη συνέχεια, οι αποικίες επιλέγονται με tip, εμβολιάζονται σε υγρές καλλιέργειες των 5 ml θρεπτικού υλικού LB και επωάζονται για 24h στους 30-37 ^{o}C υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση.
- Ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδίου με το πρωτόκολλο Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli* (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany).

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* με τη βοήθεια αλκαλικής λύσης και τον καθαρισμό του από μεμβράνη πυριτίου (silica membrane) χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli* (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany), το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

- Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρώνται στους 12000 rpm για 2 min. Κατόπιν, απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου συγκεντρωθούν όλα τα κύτταρα των καλλιεργειών σε ίζημα (pellet).
- Στη συνέχεια προστίθενται στους σωλήνες eppendorf 250μl διαλύματος επαναιώρησης (resuspension buffer, περιέχει RNase A) και ακολουθεί αναδιάλυση του ιζήματος.
- Προστίθενται 250μl διαλύματος λύσης (lysis buffer), ακολουθεί ανακίνηση του σωλήνα περίπου 10 φορές και τοποθέτηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Προστίθενται 300μl διαλύματος ουδετεροποίησης (neutralization buffer) και ακολουθεί ανακίνηση του σωλήνα περίπου 10 φορές. Με τα παραπάνω διαλύματα επιτυγχάνεται η αλκαλική λύση των βακτηρίων και η πέψη του RNA.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13000rpm για 10 min. Στα παραπάνω βήματα αποδιατάσσεται η μεμβράνη των βακτηρίων, ώστε να

απελευθερωθούν τα πλασμίδια (υπερκείμενο). Το ίζημα περιέχει πρωτεΐνες, γενωμικό DNA και τα υπολείμματα των κυττάρων των βακτηρίων.

- Το υπερκείμενο τοποθετείται σε στήλη διαχωρισμού μεμβράνης πυριτίου και φυγοκεντρείται στους 13000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται.
- Στη στήλη προστίθενται 500μl διαλύματος έκπλυσης (wash buffer AW, χρησιμοποιείται για απενεργοποίηση DNασών), το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία 50 ^{o}C, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται.
- Στη στήλη προστίθενται 600μl διαλύματος έκπλυσης (wash buffer A4), και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min, για να απορριφθεί τυχόν εναπομείναν διάλυμα.
- Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf και προστίθενται 50μl διαλύματος έκλουσης (elution buffer, 5mM Tris/HCl, pH 8.5). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min.
- Ο σωλήνας eppendorf, που τώρα περιέχει τα πλασμίδια, τοποθετείται σε πάγο.

2.6 Κλωνοποίηση της ιντερφερόνης στον pChlamy_1 Vector

2.6.1 Επιλογή ενζύμων περιορισμού

Για την ενσωμάτωση της αλληλουχίας IFNα2b- 3’ UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, τα οποία δεν αναγνώριζαν καμία θέση εντός της αλληλουχίας της IFNα2b, ούτε εντός της 3’ μη-μεταφραζόμενης περιοχής, ενώ αναγνώριζαν τις κατάλληλες θέσεις περιορισμού στον pChlamy_1 Vector. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NEBcutter V2.0, με το οποίο επιλέχθηκαν τα κατάλληλα ένζυμα.

2.6.2 Εισαγωγή στο αναγνωστικό πλαίσιο

Επειδή το εναρκτήριο ATG της αλληλουχίας της οποίας επιθυμείται η έκφραση παρέχεται από τον pChlamy_1 Vector, έγινε μελέτη ώστε η αλληλουχία της ιντερφερόνης IFNα2b να εισαχθεί στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.

2.6.3. Πέψεις πλασμιδίων

Το πλασμίδιο pUC57- IFNα2b- 3’UTR υπέστη διπλή πέψη (double digestion) με τα ένζυμα KpnI και NotI, η οποία απελευθέρωσε την αλληλουχία IFNα2b-3’ UTR από το υπόλοιπο πλασμίδιο. Ταυτόχρονα, το πλασμίδιο pChlamy_1 Vector υπέστη διπλή πέψη με τα ίδια ένζυμα, ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα και να επιτευχθεί η ένωση της αλληλουχίας IFNα2b-3’ UTR με το πλασμίδιο pChlamy_1.

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer BamHI) επιλέχθηκε έτσι ώστε να επιτρέπει τη δράση και των δυο ενζύμων στην ίδια αντίδραση. Για τις πέψεις των δυο πλασμιδίων σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ 5 μg πλασμιδίου
- ✓ buffer BamHI (10x) 6 μl
- ✓ KpnI 1.5 μl (10 units/μl)
- ✓ NotI 1.5 μl (10 units/μl)
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 60 μl

Οι πέψεις επωάστηκαν στους 37 ^oC για 2h.

2.6.4 Απομόνωση DNA απο πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο DNA extraction from agarose gels (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany), το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

- Το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από την πηκτή αγαρόζης με νυστέρι, μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf και ζυγίζεται. Για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης <2% προστίθενται 200μl διαλύματος πρόσδεσης (binding buffer). Το δείγμα επωάζεται στους 50 ^oC για 5-10 min, ενώ κάθε 2-3 min αναδεύεται (vortex), έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί πλήρως.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε στήλη διαχωρισμού μεμβράνης πυριτίου (silica membrane) και φυγοκεντρείται στους 13.000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται.
- Προστίθενται 350μl διαλύματος έκπλυσης (wash buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13.000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά για μεγαλύτερη απόδοση στην έκπλυση της στήλης.
- Η στήλη φυγοκεντρείται ακόμη μία φορά στους 13000 rpm για 1min, για να αφαιρεθεί πλήρως το διάλυμα έκπλυσης. Ακολουθεί επώαση της στήλης στους 70 ^oC για 2-5 min, για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα.
- Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf και προστίθενται 15-30μl διαλύματος έκλουσης (elution buffer, 5mM Tris/HCl, pH 8.5). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min. Για ανάκτηση τμημάτων DNA (>1000 bp), προτείνεται θέρμανση της στήλης στους 70 ^oC για 5 min και μετά φυγοκέντρηση.

2.6.5 Αντίδραση επανασύνδεσης (ligation)

И È ια την επανασύνδεση (ligation) της αλληλουχίας IFNα2b-3’ UTR και του πλασμιδίου pChlamy_1 αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν οι παρακάτω ποσότητες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του πλασμιδίου και της αλληλουχίας στην πηκτή αγαρόζης. Σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ pChlamy_1 Vector 0.5 μl (200 ng πλασμιδίου)

- ✓ η αλληλουχία IFNα2b-3’ UTR 7 μl
- ✓ buffer 2 μl
- ✓ T4 DNA Ligase (TakaRa) (350 units/μl) 1 μl
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 20 μl

Για την αντίδραση ελέγχου (control) σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ pChlamy_1 Vector 0.5 μl (200 ng πλασμιδίου)
- ✓ buffer 2 μl
- ✓ T4 DNA Ligase (TakaRa) (350 units/μl) 1 μl
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 20 μl

Οι σωλήνες επωάστηκαν στους 4 ^oC για μια νύχτα (overnight). Με τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων μετασχηματίστηκαν DH5a δεκτικά κύτταρα *E.coli* και επωάστηκαν στους 37 ^oC για 24 h.

2.6.6 Αποφωσφορυλίωση άκρων πλασμιδίου (αντίδραση CIAP)

Για την αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδίου, αντίδραση CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική φωσφατάση της εταιρείας Fermentas (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA). Με βάση τα αποτελέσματα από τον έλεγχο του πλασμιδίου και της αλληλουχίας IFNα2b-3’ UTR στην πηκτή αγαρόζης, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν οι παρακάτω ποσότητες. Σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ Ευθύγραμμο πλασμίδιο pChlamy_1 Vector 8 μl **(**1 pmol)
- ✓ Αλκαλική φωσφατάση 2.5 μl
- ✓ Buffer CIAP 10X 5 μl
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 50 μl

Το μίγμα επωάστηκε στους 37 ^oC για 1h και το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στους 75^oC για 10 min.

2.6.7 Καθαρισμός προϊόντος PCR (PCR clean-up)

Για τον καθαρισμό του προϊόντος της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο PCR clean-up (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany), το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

- Για 1 όγκο δείγματος προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος πρόσδεσης (binding buffer) (π.χ. για 50μl αντίδρασης PCR προστίθενται 100 μl διαλύματος πρόσδεσης).
- Το δείγμα μεταφέρεται σε στήλη διαχωρισμού και φυγοκεντρείται στους 13000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται.
- Προστίθενται 350μl διαλύματος έκπλυσης (wash buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min. Το υγρό που πέρασε από τη στήλη απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά για μεγαλύτερη απόδοση στην έκπλυση της στήλης.

- Η στήλη φυγοκεντρείται ακόμη μία φορά στους 13000 rpm για 1 min, για να αφαιρεθεί πλήρως το διάλυμα έκπλυσης. Ακολουθεί επώαση της στήλης στους 70 ºC για 2-5 min, για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα.
- Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf και προστίθενται 15-30μl διαλύματος έκλουσης (elution buffer, 5mM Tris/HCl, pH 8.5). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στους 13000 rpm για 1 min. Για ανάκτηση τμημάτων DNA (>1000 bp), προτείνεται θέρμανση της στήλης στους 70 ºC για 5 min και μετά φυγοκέντρηση.

2.7 Μετασχηματισμός του *C.reinhardtii*

Για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR πρέπει να βρίσκεται σε ευθύγραμμη μορφή, για μεγαλύτερη απόδοση του μετασχηματισμού. Για το λόγο αυτό, το πλασμίδιο υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού XmnI. Για την πέψη του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ 2 μg πλασμιδίου
- ✓ Buffer Tango (10x) 5 μl
- ✓ XmnI 2 μl (20 U/μl)
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 50 μl

Η πέψη επωάστηκε στους 37 ºC για 2h.

2.7.1 Ηλεκτροπόρωση

Για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* ακολουθήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης (electroporation). Το *C.reinhardtii* μετασχηματίστηκε τελικώς, σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο που ακολουθεί. Για την ηλεκτροπόρωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Gene Pulser II, της εταιρείας Bio-Rad. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Το *C.reinhardtii c137* εμβολιάζεται σε υγρή καλλιέργεια TAP των 5 ml, και επωάζεται στους 25 ºC υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση (150 rpm) και υπό συνεχή φωτισμό για 3 ημέρες. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 750 nm και αναμένεται οπτική πυκνότητα OD_{750nm}=0.6. Από την καλλιέργεια εμβολιάζεται σε φλάσκα TAP των 40 ml ποσότητα τέτοια, ώστε η οπτική πυκνότητα να είναι OD_{750nm}=0.06. Μετά από μια μέρα επώασης (24h) αναμένεται να επιτευχθεί OD_{750nm}=0.3-0.5. Εάν η καλλιέργεια δεν έχει φτάσει σε OD_{750nm}=0.3, επωάζεται ακόμη 3-4 ώρες, ώστε να προκύψει άλλη μια διαίρεση. Η καλλιέργεια πρέπει να βρίσκεται σε εκθετικό στάδιο ανάπτυξης και όχι σε στατικό.
- Για μια ηλεκτροπόρωση, 15 ml από την παραπάνω καλλιέργεια φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία δωματίου στους 2.500 rpm για 10 min.

Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250 μl θρεπτικού υλικού TAP- 40 mM sucrose.

- Στα κύτταρα προστίθενται 1 έως 2μg ευθύγραμμου πλασμιδίου. Το μίγμα του μετασχηματισμού μεταφέρεται σε κυβέττα (cuvette) ηλεκτροπόρωσης διαμέτρου 2 mm και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Πριν την ηλεκτροπόρωση, η κυβέττα χτυπάται ελαφρά για να ανακατευτεί το μίγμα και να μην υπάρχουν καθιζάνοντα κύτταρα.
- Ακολουθεί η ηλεκτροπόρωση, με τις εξής παραμέτρους:
  Voltage: 400V, Capacity: 200μF, Resistance: infinity
- Μετά την ηλεκροπόρωση, το μίγμα διαιρείται σε 2 κλάσματα των 125 μl και εμβολιάζεται σε υγρές καλλιέργειες των 5 ml θρεπτικού υλικού (TAP-40 mM sucrose). Ακολουθεί 24 h επώαση στους 25 ºC υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση (150 rpm) και συνεχή φωτισμό, ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν.
- Την επόμενη ημέρα, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία δωματίου στους 2.500 rpm για 10 min. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 150 μl θρεπτικού υλικού (TAP-40 mM sucrose) και επιστρώνεται σε τρυβλία TAP-hygromycin (40 μg/ml hyg), για την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται στο θάλαμο επώασης στους 25 ºC υπό συνεχή φωτισμό. Οι μετασχηματισμένες αποικίες αναμένεται να αναπτυχθούν σε 7-10 ημέρες.

2.8 Colony PCR

Για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων κλώνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος colony PCR, όπως προτεινόταν από το GeneArt® Chlamydomonas Engineering Kit. Για αυτή την αντίδραση δεν απαιτείτο απομόνωση DNA. Μια μικρή ποσότητα από κάθε αποικία επιλέχθηκε με την άκρη ενός tip και προστέθηκε σε 19 μl ddH_2O και 1 μl NaOH (1M) σε ειδικό σωλήνα eppendorf του PCR. Ακολούθησε βρασμός στους 95 ºC για 30 min για τη λύση των κυττάρων. Από τα λυμένα αυτά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε 1 μl ως μήτρα για την αντίδραση PCR.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Oligoanalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies), ρυθμίζοντας τις συνθήκες σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Taq DNA πολυμεράσης (QIAGEN, Hilden, Germany). Η θερμοσταθερή αυτή πολυμεράση παράγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus.* Η ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία παρουσιάζει χρόνο ημιζωής 10min στους 97 ºC, 60min στους 94 ºC, ενώ μπορεί να πολυμερίσει 2–4 kb/min στους 72°C. Εφόσον το τμήμα της αλληλουχίας που ενίσχυσαν οι εκκινητές ήταν 315bp, ο χρόνος επιμήκυνσης στους 72 ºC ήταν 30 sec. Οι εκκινητές της ιντερφερόνης IFNα2b για την colony PCR φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Οι εκκινητές της ιντερφερόνης IFNα2b για την colony PCR.

IFN-F1	5’ CCGCATCTCGCTGTTCTCCTG 3’	Tm=66.6 ºC
IFN-R1	5’ GTGATGCGCTGGAAGTACTTG 3’	Tm=63.3 ºC

Για την αντίδραση PCR σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ Μήτρα DNA 1 μl
- ✓ Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM) 0.7 μl.
- ✓ Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 0.7 μl.
- ✓ Μίγμα dNTPs (10 mM) 0.7 μl.
- ✓ 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 μl.
- ✓ Taq DNA πολυμεράση (2 units/μl) 1 μl.
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 25 μl.

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

- ✓ Βήμα 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94 ºC για 3 min
- ✓ Βήμα 2: Αποδιάταξη στους 94 ºC για 30 sec
- ✓ Βήμα 3: Υβριδισμός εκκινητών στους 59 ºC για 30 sec
- ✓ Βήμα 4: Επιμήκυνση στους 72 ºC για 30 sec
- ✓ Επανάληψη βημάτων 2-4 για 33 κύκλους
- ✓ Βήμα 5: Τελική επιμήκυνση στους 72 ºC για 5 min

2.9 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από τους μετασχηματισμένους κλώνους

Οι μετασχηματισμένες αποικίες αναπτύχθηκαν με σκοπό να απομονωθεί και να καθαριστεί το ολικό RNA τους. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

2.9.1 Απομόνωση ολικού RNA (RNA extraction)

Οι μετασχηματισμένες αποικίες εμβολιάστηκαν από τρυβλίο σε 5 ml (TAP – hygromycin 20 μg/ml) καλλιέργεια. Επίσης, σε 5 ml καλλιέργεια TAP εμβολιάστηκε και το *C.reinhardtii* c137 αγρίου τύπου, ως δείγμα ελέγχου (negative control). Μετά από επώαση 72 h, οι αποικίες εμβολιάστηκαν σε καλλιέργεια των 50 ml προς επώαση για 72 h. Για την απομόνωση του ολικού RNA των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI Reagent (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή, με μόνη προσθήκη τη διαδικασία λειοτρίβησης με έμβολο και άμμο (0.025g) κατά τη φάση ομογενοποίησης, για τη λύση των κυττάρων. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

Πρωτόκολλο TRI Reagent

Ομογενοποίηση

- Οι καλλιέργειες των 50ml μεταφέρονται σε σωλήνες falcon των 15ml και υπόκεινται σε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε 3000 x g για 5 min, μέχρι να συγκεντρωθούν όλα τα κύτταρα σε ίζημα (pellet). Τέλος, το ίζημα μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf για ευκολότερο χειρισμό.
- Προστίθεται αποστειρωμένη άμμος 0.025 g σε κάθε σωλήνα eppendorf.
- Προστίθενται 250 μl TRI Reagent και τα κύτταρα λειοτριβώνται με τη βοήθεια εμβόλου (ομογενοποίηση). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα δείγματα υφίστανται ανάδευση (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση (short spin).
- Προστίθενται ακόμη 750μl TRI Reagent σε κάθε δείγμα (συνολικά 1 ml TRI Reagent για 50-100 mg) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4 ºC σε 12000 x g για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

Διαχωρισμός φάσης

- Προστίθενται 200 μl χλωροφορμίου και τα δείγματα ανακινούνται έντονα για 15 sec. Κατόπιν, επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4 ºC σε 12000 x g για 15 min. Ανακτάται η υδατική φάση (υπερκείμενο, περιέχει RNA) και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf.

Κατακρήμνιση RNA

- Προστίθεται 0.5 ml ισοπροπανόλης 100% ανά ml TRI Reagent και τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4 ºC σε 12000 x g για 10 min. Απορρίπτεται η υδατική φάση.

Πλύση RNA

- Προστίθεται 1 ml αιθανόλης 75% ανά ml TRI Reagent, ακολουθεί σύντομη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4 ºC σε 7500 x g για 5 min. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, έως ότου εξατμιστεί η αιθανόλη.

Αναδιάλυση RNA

- Προστίθενται 50 μl ddH_2O (Rnase-free water) και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 ºC (overnight).
- Την επόμενη ημέρα, το ίζημα αναδιαλύεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ολικού RNA σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop.

2.9.2 Καθαρισμός ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα συνοδεύεται από πιθανή μόλυνση με γενωμικό DNA. Για την αποφυγή λήψης ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, κατά τη μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA. Η

διαδικασία που ακολουθείται (Dnase treatment) βασίζεται σε ένζυμα που καταστρέφουν το DNA, αφήνοντας ανέπαφο το RNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται TURBO™ Dnase (Lifetechnologies, Carlsbad, California, USA) και είναι η γενετικά τροποποιημένη μορφή της DNase I του παγκρέατος του βοδιού, με μεγαλύτερη δραστικότητα από το συμβατικό ένζυμο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις DNA. Η TURBO™ Dnase είναι μια ενδονουκλεάση που υδρολύει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε μονόκλωνο και δίκλωνο DNA, καθώς και σε υβρίδια RNA:DNA. Στην αντίδραση προστέθηκε και το αντιδραστήριο RNaseOUT™ (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), το οποίο είναι ένας ισχυρός μη ανταγωνιστικός αναστολέας ριβονουκλεασών και χρησιμοποιείται για να αποφευχθεί η αποδόμηση του RNA σε διαδικασίες όπως η σύνθεση cDNA, η RT-PCR, και η *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση. Η RNaseOUT™ είναι μια όξινη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~52 kDa, η οποία λειτουργεί ανασταλτικά έναντι των ριβονουκλεασών RNase A, RNase B και RNase C. Για την αντίδραση καθαρισμού του ολικού RNA από γενωμικό DNA σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ Δείγμα RNA: 12 μg
- ✓ Turbo Dnase (2 units/μl) (Lifetechnologies): 6 μl
- ✓ Turbo Dnase buffer 10x: 5 μl
- ✓ RNaseOUT™: 1 μl
- ✓ ddH_2O (Rnase-free) έως τελικό όγκο 50 μl

Το μίγμα επωάζεται στους 37 ^oC για 2 h.

Μετά το πέρας της επώασης, μια μικρή ποσότητα της αντίδρασης (2 μl) επωάστηκε με 1 μl διαλύματος απενεργοποίησης DNάσης (stop solution) και 8 μl ddH_2O στους 75 ^oC για 10 min, με σκοπό να απενεργοποιηθεί το ένζυμο TURBO™ Dnase (Dnase inactivation) και να ελεγχθεί η απόδοση του καθαρισμού.

2.9.3 Έλεγχος καθαρότητας RNA

Για τον έλεγχο καθαρότητας του RNA από γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκε έλεγχος με PCR για να ανιχνευθεί τυχόν εναπομείναν DNA στα δείγματα. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 1 μl από την αντίδραση απενεργοποίησης DNάσης και οι εκκινητές που ενισχύουν μια περιοχή του γονιδίου *18S rDNA* του *C.reinhardtii*, μήκους 487 bp, οι οποίοι φαίνονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Οι εκκινητές του γονιδίου *18S rDNA* του *C.reinhardtii* για την PCR ελέγχου.

18S F1	5’ –GAAACTGCGAATGGCTC- 3’	Tm= 58.2 ^oC
18S R1	5’ –CTGCTGGCACCAGACTTGC-3’	Tm= 65.6 ^oC

Για την αντίδραση PCR σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ Μήτρα νουκλεϊκών οξέων 1 μl
- ✓ Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM) 0.7 μl.
- ✓ Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 0.7 μl.
- ✓ Μίγμα dNTPs (10 mM) 0.7 μl.

- ✓ 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 μl.
- ✓ Taq DNA πολυμεράση (2 units/μl) 1 μl.
- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 25 μl.

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

- ✓ Βήμα 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94 ºC για 3 min
- ✓ Βήμα 2: Αποδιάταξη στους 94 ºC για 30 sec
- ✓ Βήμα 3: Υβριδισμός εκκινητών στους 57 ºC για 30 sec
- ✓ Βήμα 4: Επιμήκυνση στους 72ºC για 30 sec
- ✓ Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 κύκλους
- ✓ Βήμα 5: Τελική επιμήκυνση στους 72ºC για 5 min

Εάν τα δείγματα είναι καθαρά (από DNA), ακολουθεί καθαρισμός τους με τη διαδικασία του καθαρισμού των νουκλεϊκών οξέων με όξινη φαινόλη. Εάν τα δείγματα δεν είναι καθαρά, ακολουθεί επιπλέον επώαση με Dnase, έλεγχος με PCR και έπειτα καθαρισμός.

2.9.4 Καθαρισμός RNA με χρήση όξινης φαινόλης

Εφόσον τα δείγματα ήταν απαλλαγμένα από γενωμικό DNA ακολούθησε ο καθαρισμός τους με όξινη φαινόλη. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- Στα δείγματα RNA με Dnase προστίθενται 150μl ddH_2O έως τα 200μl.
- Προστίθεται ίσος όγκος (200μl) όξινης φαινόλης (AppliChem, Darmstadt, Germany), τα δείγματα αναδεύονται καλά (vortex) και φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία δωματίου στους 13.000 rpm για 10 min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και ογκομετρείται. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στους 13.000 rpm για 8 min. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στους 13.000 rpm για 4 min, για να απορριφθεί τυχόν εναπομείναν χλωροφόρμιο. Το δείγμα ογκομετρείται.
- Προστίθεται μισός όγκος οξικού αμμωνίου CH_3COONH_4 (7.5M) και ακολουθεί ανάδευση (vortex).
- Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης 100% και ακολουθεί ανάδευση (vortex).
- Τα δείγματα τοποθετούνται στους -80 ºC (overnight) σε όρθια θέση.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στους 4 ºC στους 13.000 rpm για 20 min.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 50 μl αιθανόλης 75%. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στους 4 ºC στους 13.000 rpm για 7 min.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα δείγματα ξηραίνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

- Προστίθενται 18 μl ddH_2O, τα δείγματα αναδιαλύονται και αποθηκεύονται στους -80 ^oC.
- Την επόμενη ημέρα, προσδιορίζεται η συγκέντρωση τους σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop.

2.10 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

2.10.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων με χρήση φασματοφωτόμετρου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop. Αναλύοντας 1 μl δείγματος, το φασματόμετρο Nanodrop μπορεί να δώσει τα εξής δεδομένα:

- τη συγκέντρωση των επιθυμητών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA),
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης OD260/280) και
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς ουσίες, όπως EDTA, υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης OD260/230).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρθηκε 1 μl ddH_2O στην υποδοχή της συσκευής για τον μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρθηκε στην υποδοχή της συσκευής, η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους OD260/OD280 και OD260/OD230. Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD260/280 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0, ενώ ο δείκτης OD260/230 πρέπει να κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, μεταξύ 2.0-2.2.

2.10.2 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών/ριβονουκλεϊκών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA/RNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους των. Το εύρος των μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής.

2. Η αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml και αναμιγνύεται καλά.

3. Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση, αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (glycerol 30% & bromophenol blue 0.25% (6x)), στα «πηγαδάκια» που σχηματίστηκαν.

4. Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.

Πίνακας 2.3 Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	**Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων νουκλεϊκών οξέων (kb)**
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2	0.1-5

2.11 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Κατά την αντίδραση αυτή, το RNA που απομονώθηκε από τις καλλιέργειες του *C.reinhardtii* (αγρίου τύπου και μετασχηματισμένες) μεταγράφηκε σε cDNA (complementary DNA) με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase, RT). Το ένζυμο αυτό συναντάται στη φύση κυρίως σε ρετροϊούς και μπορεί να μετατρέπει το μονής έλικας γενωμικό RNA των ιών σε διπλής έλικας cDNA, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή προκαλώντας μακροπρόθεσμη μόλυνση. Συνεπώς το ένζυμο διαθέτει τρεις διαδοχικές βιοχημικές δράσεις: α) της DNA πολυμεράσης που εξαρτάται από RNA, β) της ριβονουκλεάσης Η (RNase H), η οποία διασπά το RNA του διπλού υποστρώματος RNA/DNA, και γ) της DNA πολυμεράσης που εξαρτάται από DNA.

Η ανασυνδυασμένη αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript® II (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι μια DNA πολυμεράση που συνθέτει συμπληρωματική έλικα DNA από μονής έλικας RNA, DNA, ή από υβρίδιο RNA/DNA. Το ένζυμο αυτό έχει τροποποιηθεί γενετικά με εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο της RNase H, ώστε να μειωθεί η δραστικότητά της και να εξαλειφθεί η αποδόμηση των μορίων RNA κατά τη σύνθεση της πρώτης έλικας cDNA.

Στην παρούσα αντίδραση, η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκίνησε την αντιγραφή από τον εκκινητή oligodT (dT_{12-18}), ο οποίος υβριδίζει με την αλληλουχία πολύ(Α) (polyA tail) των mRNAs των δειγμάτων. Η διαδικασία παρατίθεται παρακάτω:

Σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα εξής:

- ✓ RNA 0.8 μg
- ✓ Μίγμα dNTPs (2.5mM): 4 μl
- ✓ oligodT_{12-18} primer: 1 μl

- ✓ ddH_2O έως τελικό όγκο 12 μl

Στη συνέχεια το RNA αποδιατάχθηκε με θέρμανση στους 65 ^oC για 6 min, οπότε και πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός εκκινητή-RNA. Το δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

Ακολουθεί η προσθήκη στο eppendorf:

- ✓ 5x First-Strand Buffer: 4 μl
- ✓ DTT (0.1M): 2 μl
- ✓ Rnase out (40 units/μl): 1 μl
- ✓ SuperScriptTM II RT (200 units/μl): 1 μl

Ακολούθησε επώαση στους 42 ^oC για 60 min και τέλος, η αντίστροφη μεταγραφάση απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 70 ^oC για 15 min.

2.12 Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA, η οποία δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης (συσσώρευση των προϊόντων της PCR), καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέτρηση των επίπεδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της φάσης αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Κατά τις φάσεις της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου υπάρχει διπλής έλικας DNA, η SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του cDNA που υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης PCR και από την απόδοση της αντίδρασης. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης PCR. Λόγω αυτού του φαινόμενου είναι αναγκαίος ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Οι εκκινητές για την αλληλουχία της ιντερφερόνης IFNα2b σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, Darmstadt), ενώ ελέγχθηκαν μέσω του αλγορίθμου blastn στις δημόσιες βάσεις δεδομένων και επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υβριδίζουν και με άλλα γονίδια του *C.reinhardtii*. Επιπλέον, τα ζεύγη εκκινητών για το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης *cblp* (house-keeping gene) που επιλέχθηκαν, έχουν

χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και σε άλλες μελέτες (Chang, Moseley et al. 2005; Pootakham, Gonzalez-Ballester et al. 2010; Cordero, Couso et al. 2011). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4 Οι εκκινητές των γονιδίων της *ifn* και του *cblp* για την qPCR.

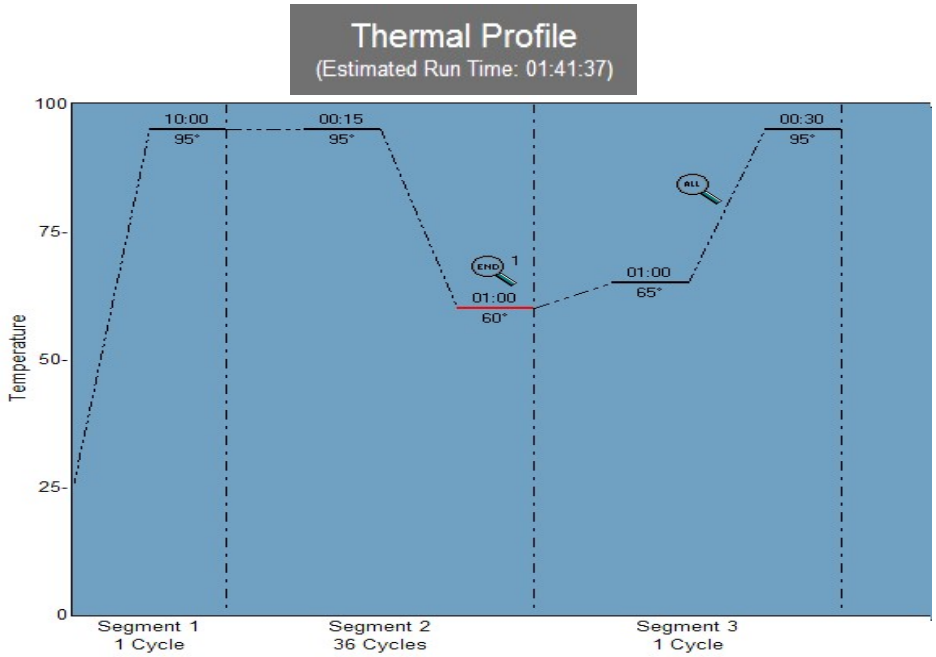
qPCR-IFNF1	5’ CCGCATCTCGCTGTTCTCCTG 3’	Tm=66.6 ºC
qPCR-IFNR3	5’ TCGTGCTGAACAGGTTGAAGATC 3’	Tm=64.7 ºC
qPCR-IFNF3	5’ TGTTCAGCACGAAGGACAGC 3’	Tm=64.8 ºC
qPCR-IFNR1	5’ GTGATGCGCTGGAAGTACTTG 3’	Tm=63.3 ºC
CBLP-F1	5’ CTTCTCGCCCATGACCACC 3’	Tm=64.5 ºC
CBLP-R1	5’ GCCCACCAGGTTGTTCTTCAG 3’	Tm=65.2 ºC
CBLP-F2	5’ CCACCCAGTCCTCCATCAAGA 3’	Tm=65.4 ºC
CBLP-R2	5’ CGCGGCTGGGCATTTACA 3’	Tm=65.4 ºC

Για την εκτέλεση της μεθόδου qPCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro3005P. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλακέτα ειδική για αυτή τη χρήση.

Για μια τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμίχθηκαν:

- ✓ 2x Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche): 5 μl
- ✓ cDNA (χρησιμεύει ως μήτρα): 1 μl
- ✓ Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5 μM): 1 μl

Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA χρησιμοποιήθηκε το ενδογενές γονίδιο *cblp*, το οποίο έχει σταθερή έκφραση. (Chang, Moseley et al. 2005; Pootakham, Gonzalez-Ballester et al. 2010) Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις της qPCR για κάθε cDNA που αντιστοιχεί σε μία μετασχηματισμένη αποικία. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και τα στάδια της αντίδρασης φαίνονται στην Εικόνα 2.2:



Εικόνα 2.2 Στάδια και θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αντίδρασης qPCR και της αποδιάταξης που ακολουθεί.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε στο πρόγραμμα Excel.

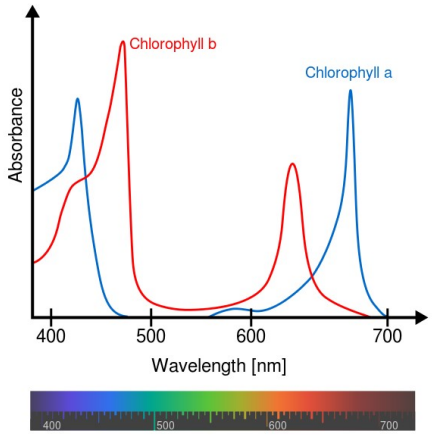
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη καλλιέργειας του *C.reinhardtti* c137

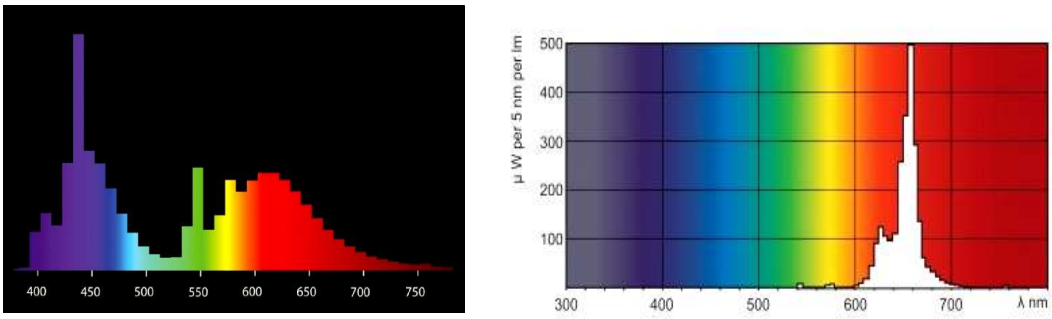
Εφόσον το *C.reinhardtii* διαθέτει χλωροφύλλες a και b με φάσμα απορρόφησης στα μήκη κύματος 450 nm και 630 nm (Vejrazka, Janssen et al. 2011), κρίθηκαν κατάλληλοι οι λαμπτήρες φθορισμού Osram 36W/77 fluora και Philips 36W/15 red, με εκπομπή φωτός στα παραπάνω μήκη κύματος, για την καλύτερη ανάπτυξή του. Το φάσμα απορρόφησης του φωτός για τις χλωροφύλλες a και b φαίνεται στην Εικόνα 3.1, ενώ η εκπομπή των λαμπτήρων φθορισμού απεικονίζεται στην Εικόνα 3.2.

Επιπλέον, για να μειωθεί η εξάτμιση του υγρού καλλιέργειας, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25 ºC και οι λαμπτήρες τοποθετήθηκαν σε απόσταση 50 cm από τις καλλιέργειες.

Στην Εικόνα 3.3 φαίνεται η διάταξη του θαλάμου επώασης και στην Εικόνα 3.4 φαίνονται οι υγρές καλλιέργειες του φύκους, καθώς και η στερεή καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri. Οι υγρές καλλιέργειες προφυλάσσονταν από το εξωτερικό περιβάλλον με πώμα από ύφασμα γεμισμένο με υδρόφοβο βαμβάκι και καλύπτονταν από αλουμινόχαρτο. Το πώμα επέτρεπε την ανταλλαγή αερίων, χωρίς να μολύνεται η καλλιέργεια από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 3.1 Φάσμα απορρόφησης του φωτός με μέγιστες τιμές για την χλωροφύλλη a περίπου στα 430nm και 660nm και για τη χλωροφύλλη b περίπου στα 460nm και 640nm.



Εικόνα 3.2 Εκπομπή του λαμπτήρα Osram 36W/77 fluora (αριστερή εικόνα) και του λαμπτήρα Philips 36W/15 red (δεξιά εικόνα).



Εικόνα 3.3 Η διάταξη του θαλάμου επώασης του *C.reinhardtti*.



Εικόνα 3.4 Υγρές καλλιέργειες του *C.reinhardtti* των 5 ml και 40 ml και στερεή καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri (από αριστερά προς δεξιά).

3.2 Σχεδιασμός της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b για έκφραση στο *C.reinhardtti* c137

Λόγω της προτίμησης του χλωροφύκους προς διαφορετικές τριπλέττες του γενετικού κώδικα από αυτές των θηλαστικών, η νουκλεοτιδική αλληλουχία της ανθρώπινης IFNα2b υπέστη βελτιστοποίηση για την καλύτερη έκφρασή της. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση τον Πίνακα 2 του Παραρτήματος, όπου φαίνονται τα προτιμώμενα κωδικόνια του πυρήνα του *C.reinhardtii*. Ωστόσο, επειδή οι αλλαγές ήταν πολλές και θα ήταν χρονοβόρο να προκύψουν με σημειακές μεταλλάξεις, η αλληλουχία συντέθηκε *de novo* (Genescript, Piscataway Township, USA). Ωστόσο, κατά τη βελτιστοποίηση προέκυψαν μια 5' και μια 3' θέσεις ματίσματος, οι οποίες αφαιρέθηκαν. Στην πρώτη περίπτωση (5' θέση ματίσματος), χρησιμοποιήθηκε το κωδικόνιο GTA (για την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη Val (V)), ενώ στη δεύτερη περίπτωση (3' θέση ματίσματος) παρέμεινε το αρχικό, καθώς δεν υπήρχαν άλλα διαθέσιμα κωδικόνια (στο γλουταμινικό οξύ Gln (Q) αντιστοιχούν μόνο δυο κωδικόνια). Στην Εικόνα 3.5 στη δεύτερη σειρά, παρουσιάζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία της ανθρώπινης IFNα2b, χωρίς το πεπτίδιο οδηγό της, όπου σημειώνονται οι τριπλέττες νουκλεοτιδίων, οι οποίες υπέστησαν βελτιστοποίηση. Στην πρώτη σειρά φαίνεται η βελτιστοποιημένη αλληλουχία της ιντερφερόνης α2b για το *C.reinhardtii*, ενώ στην τρίτη σειρά φαίνεται η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης.

```
tgcgacctgcctcagacccacagcctgggtagccgccggaccctgatgctcctggcacagatgcgccgg
tgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcacagatgaggaga
 C  D  L  P  Q  T  H  S  L  G  S  R  R  T  L  M  L  L  A  Q  M  R  R

atcagcctgttctcctgcctcaaggaccgccacgactttggctttccccaggaggagtttggcaaccag
atctctcttttctcctgcttgaaggacagacatgactttggatttccccaggaggagtttggcaaccag
 I  S  L  F  S  C  L  K  D  R  H  D  F  G  F  P  Q  E  E  F  G  N  Q

ttccagaaggctgagaccatccctgtcctccacgagatgatccagcagatcttcaacctcttcagcacc
ttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcagatcttcaatctcttcagcaca
 F  Q  K  A  E  T  I  P  V  L  H  E  M  I  Q  Q  I  F  N  L  F  S  T

aaggacagctcggctgcttgggacgagaccctcctggacaagttctacaccgagctctaccagcagctg
aaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaattctactgaactctaccagcagctg
 K  D  S  S  A  A  W  D  E  T  L  L  D  K  F  Y  T  E  L  Y  Q  Q  L

aacgacctggaggcctgcgtgatccaggggtgggggtgaccgagacgcccctgatgaaggaggactcc
aatgacctggaagcctgtgtgatacaggggtgggggtgacagagactcccctgatgaaggaggactcc
 N  D  L  E  A  C  V  I  Q  G  V  G  V  T  E  T  P  L  M  K  E  D  S

attctggctgtgcgcaagtacttccagcggatcaccctctacctgaaggagaagaagtacagcccttgc
attctggctgtgaggaaatacttccaaaagaatcactctctatctgaaagagaagaaatacagcccttgt
 I  L  A  V  R  K  Y  F  Q  R  I  T  L  Y  L  K  E  K  K  Y  S  P  C

         gta                                                    caa
gcctgggaggtggtccgcgcagagatcatgcggagcttttcgctgtccaccaacctgcaggagagcctg
gcctgggaggttgtcagagcagaaatcatgagatctttctttgtcaacaaacttgcaagaaagtttta
 A  W  E  V  V  R  A  E  I  M  R  S  F  S  L  S  T  N  L  Q  E  S  L

cgctcgaaggagtaa
agaagtaaggaatga
 R  S  K  E  -
```

Εικόνα 3.5 Η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της ιντερφερόνης α2b του ανθρώπου (huIFNα2b), χωρίς το πεπτίδιο οδηγό της. Στην πάνω σειρά φαίνεται η βελτιστοποιημένη αλληλουχία με τις απαραίτητες αλλαγές, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το εκάστοτε αμινοξύ που προτιμάται από τον πυρήνα του *C.reinhardtii*. Στη μεσαία σειρά φαίνεται η αλληλουχία της ανθρώπινης IFNα2b, και τα κωδικόνια που υπέστησαν αλλαγή απεικονίζονται με πράσινο. Στην τελευταία σειρά απεικονίζονται τα αμινοξέα που αντιστοιχούν σε κάθε κωδικόνιο. Στα κόκκινα σημεία, οι αλλαγές των κωδικονίων δημιουργούσαν θέσεις ματίσματος, οπότε για την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (V)(aggtg- 5' θέση ματίσματος) χρησιμοποιήθηκε το κωδικόνιο GTA, ενώ το γλουταμινικό οξύ (Q) (cagg- 3' θέση ματίσματος) επιλέχθηκε να παραμείνει ως έχει στην ανθρώπινη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Επειδή το πεπτίδιο οδηγός της ιντερφερόνης του ανθρώπου δεν είναι γνωστό αν αναγνωρίζεται από το *C.reinhardtii*, αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από το πεπτίδιο οδηγό του ενδογενούς γονιδίου της αρυλσουλφατάσης (*ars1*), η οποία οδηγείται στον περιπλασμικό χώρο. Το ένζυμο αρυλσουλφατάση (arylsulfatase ή aryl-sulfate sulfohydrolase, κωδικοποιείται από τα γονίδια *ars1* και *ars2*) παράγεται σε συνθήκες έλλειψης θείου για να διευκολύνει την αξιοποίηση των εξωγενών εστεροποιημένων θειικών αλάτων καταλύοντας την παρακάτω αντίδραση υδρόλυσης: H_2O + Aryl-O-SO^{3-}→ Aryl-OH + SO^{4-} + H^+. (Hostos et al. 1988) Επιπλέον, το μοτίβο A-H-A στο τέλος του πεπτιδίου οδηγού, έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζεται επιτυχώς από πεπτιδάση και αποκόπτεται ελευθερώνοντας την ώριμη πρωτεΐνη. (Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. 2009; Rasala, Lee et al. 2012) Το μέγεθος του πεπτιδίου οδηγού *ars1* είναι 26 αμινοξέα. Η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού της αρυλσουλφατάσης (*ars1* signal peptide) φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 3.6.

```
atgcatgcacgcaagatgggtgccctcgcggtgctcgccgtcgcttgcctcgcggcagtggcatcggtt
 M  H  A  R  K  M  G  A  L  A  V  L  A  V  A  C  L  A  A  V  A  S  V
gcgcatgcg

 A  H  A
```

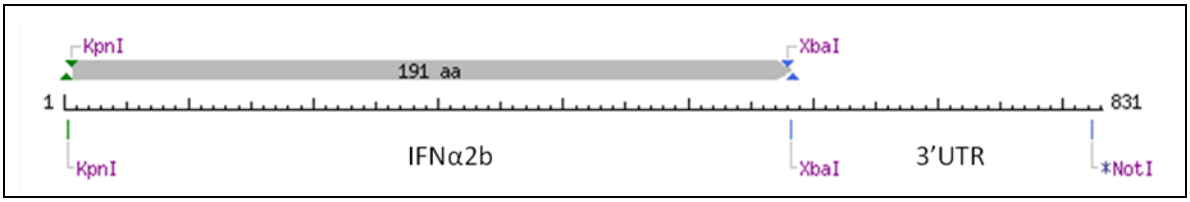
Εικόνα 3.6 Η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού του ενζύμου της αρυλσουλφατάσης (*ars1* signal peptide).

Επίσης, για την καλύτερη έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου στο *C.reinhardtii,* προτεινόταν από τον κατασκευαστή του πλασμιδίου η προσθήκη μιας αλληλουχίας 3'UTR, η οποία μετά από αναζήτησή της στη βάση δεδομένων του NCBI, βρέθηκε ότι αντιστοιχεί στην 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή (3΄UTR) του γονιδίου *rbcS2* του *C.reinhardtii,* που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ενζύμου RuBiSco και εδράζεται στον πυρήνα. Η καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5 διφωσφορικής ριβουλόζης (RuBiSco) είναι το ένζυμο που καταλύει τη δέσμευση του άνθρακα κατά τη φωτοσύνθεση αλλά και την απελευθέρωση του CO_2 κατά τη φωτοαναπνοή. Δύο γονίδια που κωδικοποιούν για μια μικρή (small chain, S, περίπου 13.000 Da) και μια μεγάλη (large chain, L, περίπου 55.000 Da) υπομονάδα του ενζύμου, εντοπίζονται στα χερσαία φυτά, τα φύκη, τα κυανοβακτήρια και τα φωτότροφα και χημειοαυτότροφα πρωτεοβακτήρια. Το ολοένζυμο συγκροτείται από 8 μεγάλες και 8 μικρές υπομονάδες (περίπου 540,000 Da). Στα φύκη, το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα (*rbcL*) εδράζεται στο χλωροπλάστη, ενώ το γονίδιο που

κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα (*rbcS*) εντοπίζεται στον πυρήνα. (Goldschmidt-Clermont 1986)

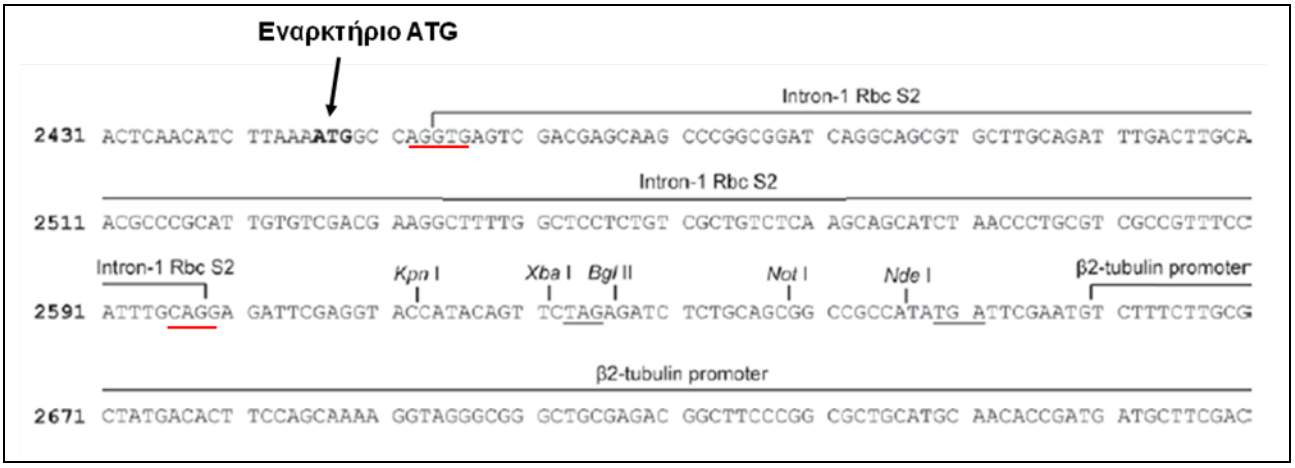
3.3 Κλωνοποίηση της ιντερφερόνης IFNα2b στον pChlamy_1 Vector

Για την έκφραση της ιντερφερόνης στο *C.reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pChlamy_1. Για την εισαγωγή της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ώστε να μην αναγνωρίζουν καμία θέση εντός της αλληλουχίας της IFNα2b, ούτε εντός της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής και επιπλέον να αναγνωρίζουν τις κατάλληλες θέσεις περιορισμού στο πλασμίδιο pChlamy_1. Συνεπώς, επιλέχθηκαν τα ένζυμα περιορισμού KpnI, XbaI και NotI, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.7. Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού XbaI τοποθετήθηκε σκοπίμως πριν την 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή, ώστε μελλοντικά να μπορεί να κλωνοποιείται στη θέση της ιντερφερόνης οποιοδήποτε άλλο γονίδιο προς μελέτη, χωρίς να χρειάζεται κάθε φορά σύνθεση και της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής.



Εικόνα 3.7 Η αλληλουχία της IFNα2b-3'UTR με τις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού KpnI, XbaI και NotI για ένθεση στο πλασμίδιο pChlamy_1. Τα ένζυμα δεν αναγνωρίζουν καμία αλληλουχία εντός του γονιδίου της ιντερφερόνης, ή εντός της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής (3'UTR).

Ακόμη, το πλασμίδιο pChlamy_1 επιτρέπει τη συνεχή έκφραση της επιθυμητής αλληλουχίας υπό το μεταγραφικό έλεγχο του υβριδικού υποκινητή Hsp70A-RbcS2. Επίσης, φέρει το εναρκτήριο ATG σε κατάλληλο πλαίσιο έναρξης μετάφρασης (Kozak frame) για την έκφραση της επιθυμητής αλληλουχίας, γεγονός που επιβάλλει την εισαγωγή της κωδικής αλληλουχίας στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. Συνεπώς, για να εισαχθεί η IFNα2b στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο προστέθηκε ένα νουκλεοτίδιο (κυτοσίνη) (Εικόνα 3.9). Επίσης, το εσώνιο (Intron-1 RbcS2) που ακολουθεί μετά το εναρκτήριο ATG, αποκόπτεται κατά τη διαδικασία του ματίσματος και συντελεί στην καλύτερη έκφραση της επιθυμητής αλληλουχίας καταστέλλοντας άλλες πιθανές θέσεις ματίσματος. Στη συνέχεια, υπάρχει η θέση αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (multiple cloning site), όπου λαμβάνει χώρα η ένθεση της επιθυμητής αλληλουχίας. Τέλος, διατίθενται και πιθανά κωδικόνια τερματισμού, τα οποία όμως δε χρησίμευσαν στην παρούσα μελέτη. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 3.8 και 3.9) απεικονίζεται η θέση ένθεσης στο πλασμίδιο, πριν και μετά το μάτισμα, αντίστοιχα.

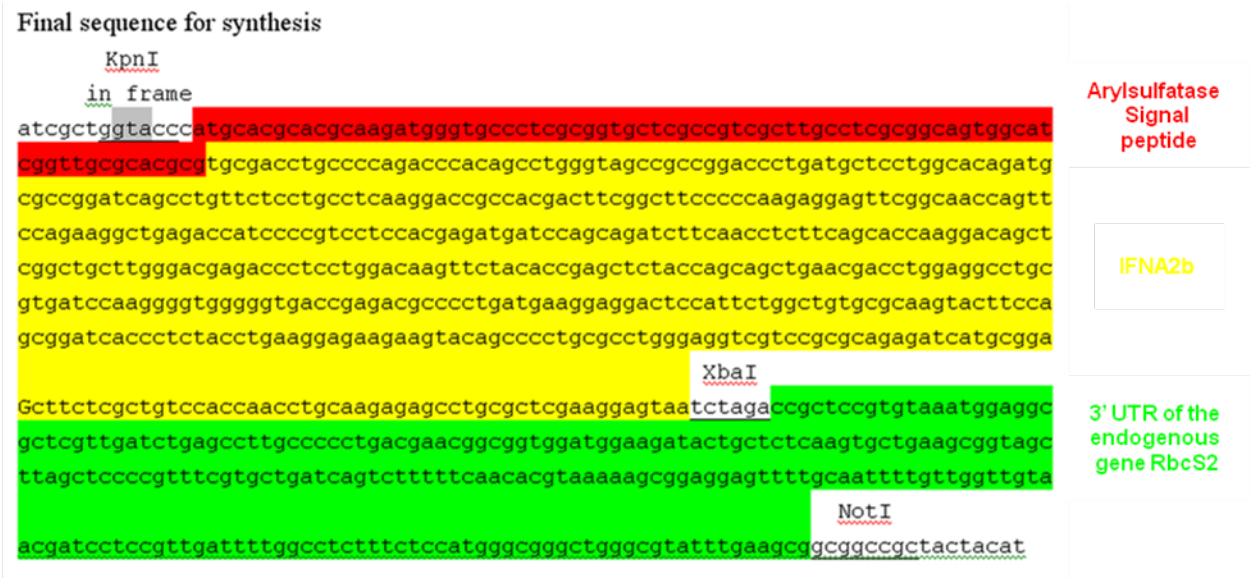


Εικόνα 3.8 Η θέση ένθεσης του γονιδίου στον pChlamy_1 πριν το μάτισμα. Στην εικόνα φαίνεται το εναρκτήριο ATG, ακολουθεί το εσώνιο Intron-1 RbcS2 και τέλος η θέση αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (multiple cloning site), όπου έλαβε χώρα η ένθεση της IFNα2b. Με κόκκινο χρώμα έχουν υπογραμμιστεί οι 5' (aggtg) και 3' (cagg) θέσεις ματίσματος του εσωνίου. Με απλή υπογράμμιση φαίνονται πιθανά κωδικόνια τερματισμού.



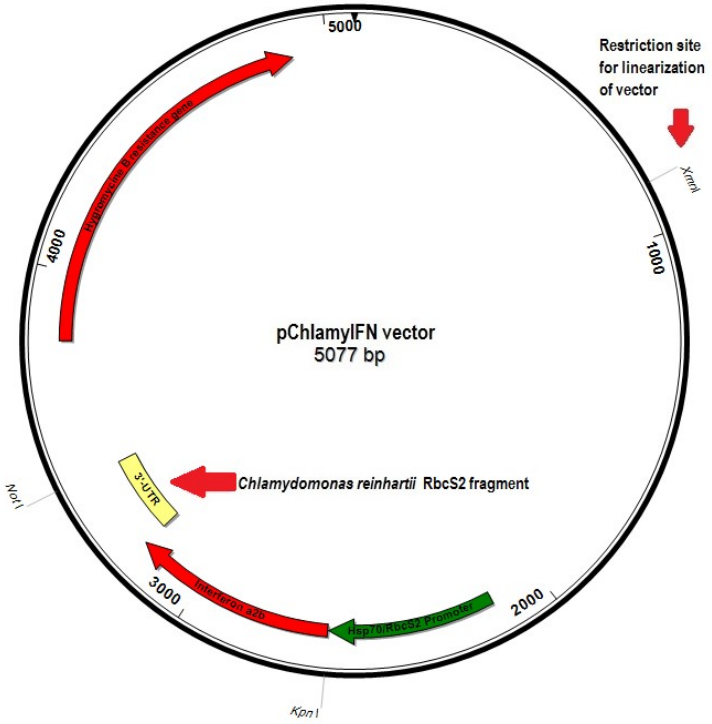
Εικόνα 3.9 Η αμινοτελική περιοχή της κωδικοποιούμενης επιθυμητής αλληλουχίας (IFNα2b-3'UTR) μετά την ένθεση στο πλασμίδιο pChlamy_1 και το μάτισμα του εσωνίου Intron-1 RbcS2. Στην εικόνα φαίνεται το εναρκτήριο ATG, καθώς και το πλαίσιο Kozak (θέση -3: πουρίνη (A/G) και θέση +4: G) που το πλαισιώνει. Επίσης, το ένζυμο περιορισμού KpnI αναγνωρίζει την υπογραμμισμένη αλληλουχία και τη διακόπτει στο σημείο που υποδεικνύει το βέλος, ανάμεσα στις δυο κυτοσίνες. Με κόκκινο απεικονίζεται το πεπτίδιο οδηγός της αρυλσουλφατάσης. Τέλος, για να εισαχθεί η αλληλουχία στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο προστέθηκε μία κυτοσίνη (μπλε χρώμα).

Συνοψίζοντας, η αλληλουχία της ιντερφερόνης του ανθρώπου, υπέστη βελτιστοποίηση των κωδικονίων της, αφαίρεση των θέσεων ματίσματος που προέκυπταν κατά τη βελτιστοποίηση, προσθήκη του πεπτιδίου οδηγού της αρυλσουλφατάσης για έκκριση στον περιπλασμικό χώρο και προσθήκη της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής (3΄UTR) του ενδογενούς γονιδίου *rbcS2* για καλύτερη έκφραση. Επιπλέον, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ένθεσή της στο πλασμίδιο pChlamy_1 και προστέθηκε μια κυτοσίνη πριν την αλληλουχία της, ώστε να τοποθετηθεί στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο του πλασμιδίου. Η τελική αλληλουχία προς σύνθεση φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.10 Η τελική αλληλουχία της ιντερφερόνης IFNα2b μετά την βελτιστοποίηση των κωδικονίων, την αφαίρεση των θέσεων ματίσματος, την αντικατάσταση του πεπτιδίου οδηγού, την προσθήκη της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής και την τοποθέτηση στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. Με κόκκινο απεικονίζεται το πεπτίδιο οδηγός της αρυλσουλφατάσης, με κίτρινο η αλληλουχία της IFNα2b και με πράσινο η 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του ενδογενούς γονιδίου *rbcS2*. Επιπλέον, με υπογράμμιση καταδεικνύονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού KpnI, XbaI και NotI αντίστοιχα.

Στη συνέχεια φαίνεται ο χάρτης του πλασμιδίου pChlamy_1 μετά την εισαγωγή της αλληλουχίας της IFNα2b-3'UTR (Εικόνα 3.11).

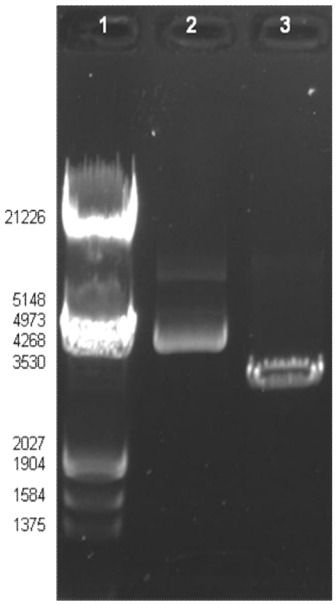


Εικόνα 3.11 Ο χάρτης του πλασμιδίου pChlamy_1 μετά την εισαγωγή της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR. Στο χάρτη απεικονίζονται η θέση και το μέγεθος του

υποκινητή Hsp70A-RbcS2, του γονιδίου της IFNα2b και της 3'UTR, καθώς και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη Β. Επίσης, σημειώνονται οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού KpnI και NotI για την ένθεση στο πλασμίδιο, καθώς και η θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού XmnI για την ευθυγράμμιση του πλασμιδίου για την ηλεκτροπόρωση (περιγραφή παρακάτω).

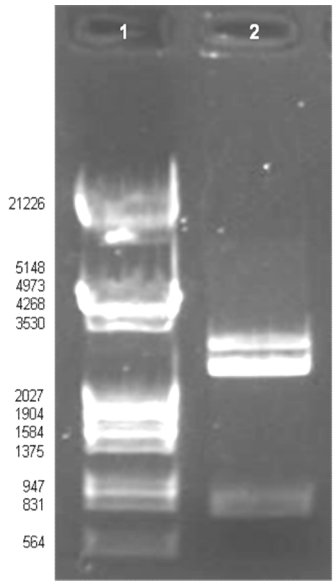
Για την ένθεση της αλληλουχίας της ιντερφερόνης στο πλασμίδιο pChlamy_1, καταρχάς αποκτήθηκε η αλληλουχία από το πλασμίδιο pUC57-IFNα2b-3'UTR και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pChlamy_1.

Συνεπώς, για την κλωνοποίηση της IFNα2b-3'UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1 πραγματοποιήθηκαν οι διπλές πέψεις (KpnI/NotI) των δυο πλασμιδίων (pUC57-IFNα2b-3'UTR και pChlamy_1 Vector) ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα με τα άκρα της αλληλουχίας προς ένθεση. Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pUC57-IFNα2b-3'UTR υπέστη πέψη, αρχικά με το ένζυμο περιορισμού NotI, και στη συνέχεια με το ένζυμο KpnI, ώστε να αποκτηθεί η αλληλουχία IFNα2b-3'UTR, όπως φαίνεται στις παρακάτω Εικόνες 3.12 και 3.13.



Εικόνα 3.12
Στήλη 1: Τμήμα του Lambda DNA/EcoR I/Hind III marker (Minotech)
Στήλη 2: pUC57-IFNα2b-3'UTR (3.564bp)
Στήλη 3: Πέψη του pUC57-IFNα2b-3'UTR με το ένζυμο περιορισμού NotI (linearization).

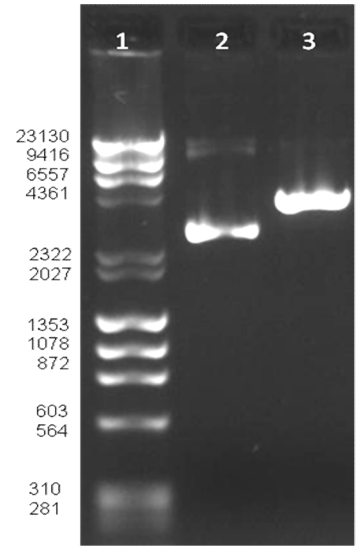
Στην Εικόνα 3.12 φαίνεται το αποτέλεσμα της πέψης του ευθύγραμμου πλέον πλασμιδίου pUC57-IFNα2b-3'UTR (στήλη 3) σε σύγκριση με το κυκλικό πλασμίδιο (στήλη 2), σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (1%). Στη συνέχεια, στην ίδια πέψη προστέθηκε και το ένζυμο περιορισμού KpnI, και το αποτέλεσμα φαίνεται στην Εικόνα 3.13.



Εικόνα 3.13
Στήλη 1: Τμήμα του Lambda DNA/EcoR I/Hind III marker (Minotech)
Στήλη 2: Πέψη του pUC57-IFNα2b-3'UTR με τα ένζυμα KpnI/ NotI.

Στην Εικόνα 3.13, η παρουσία δυο ζωνών στη θέση που έπρεπε να είναι το πλασμίδιο pUC57, υποδηλώνει ότι ένα από τα δύο ή και τα δυο ένζυμα δεν έχουν λειτουργήσει σωστά. Ωστόσο, η ζώνη του ελεύθερου πλέον πλασμιδίου εμφανίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος (2710bp). Επιπλέον, αν και αχνή, η ζώνη της ιντερφερόνης εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (861 bp).

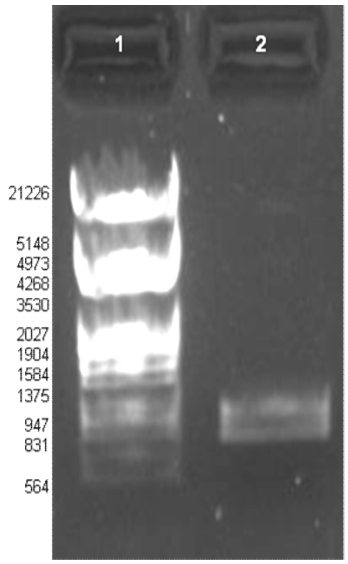
Παράλληλα με την πέψη του pUC57-IFNα2b-3'UTR, και το πλασμίδιο pChlamy_1 υπέστη διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού KpnI και NotI, ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα με τα άκρα της αλληλουχίας της IFNα2b. Στην Εικόνα 3.14 φαίνεται το αποτέλεσμα της πέψης του πλασμιδίου pChlamy_1, σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (1%).



Εικόνα 3.14
Στήλη 1: λDNA-HindIII/ ΦX-HaeIII marker
Στήλη 2: pChlamy_1
Στήλη 3: Πέψη του pChlamy_1 (4.283bp) με τα ένζυμα KpnI και NotI.

Στην Εικόνα 3.14 φαίνεται το αποτέλεσμα της διπλής πέψης του πλασμιδίου pChlamy_1 με τα ένζυμα περιορισμού KpnI και NotI (στήλη 3), σε σύγκριση με το κυκλικό πλασμίδιο (στήλη 2), σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (1%). Η ζώνη του πλασμιδίου pChlamy_1 (+KpnI/NotI) εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (4.283bp).

Στη συνέχεια, ολόκληρες οι ποσότητες των πέψεων του pUC57-IFNα2b-3'UTR και του pChlamy_1 υπέστησαν ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.2%), απ' όπου και αφαιρέθηκαν η ζώνη των 861bp, η οποία αντιστοιχεί στην αλληλουχία της ιντερφερόνης, καθώς και η ζώνη των 4.283 bp, η οποία αντιστοιχεί στο πλασμίδιο pChlamy_1, αντίστοιχα. Ακολούθησε έκλουση από την αγαρόζη και απομόνωση των DNAs, σύμφωνα με το πρωτόκολλο DNA extraction from agarose gels (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετά την απομόνωση τα DNAs ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%), όπως φαίνεται και στις Εικόνες 3.15 και 3.16.

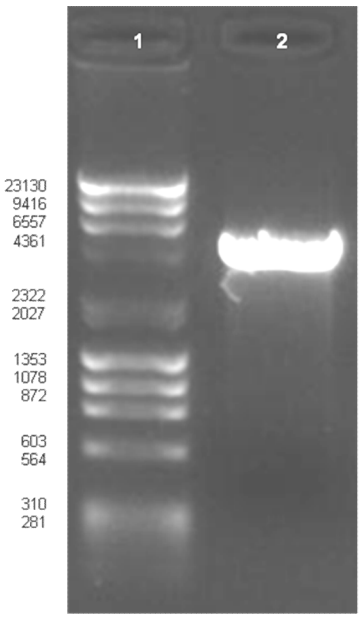


Εικόνα 3.15

Στήλη 1: Τμήμα του Lambda DNA/EcoR I/Hind III marker (Minotech)

Στήλη 2: Έλεγχος της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR μετά τον καθαρισμό από την πηκτή αγαρόζης.

Στην Εικόνα 3.15 φαίνεται το αποτέλεσμα του καθαρισμού της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR από την αγαρόζη από την οποία απομονώθηκε. Η ζώνη εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (861bp).



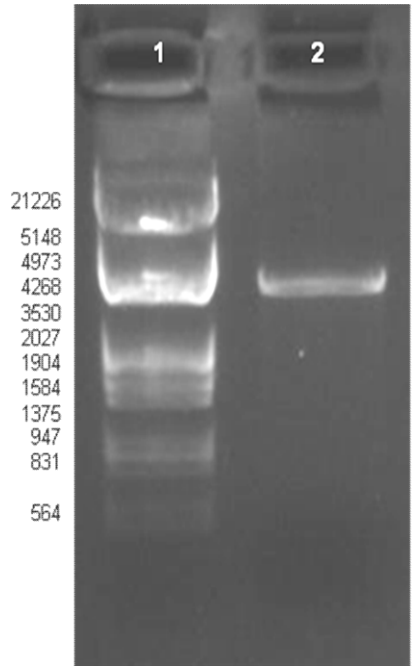
Εικόνα 3.16

Στήλη 1: λDNA-HindIII/ ΦΧ-HaeIII marker

Στήλη 2: Έλεγχος του pChlamy_1 μετά τον καθαρισμό από την πηκτή αγαρόζης.

Στην Εικόνα 3.16 φαίνεται το αποτέλεσμα του καθαρισμού του πλασμιδίου pChlamy_1 από την αγαρόζη από την οποία απομονώθηκε. Η ζώνη εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (ζώνη 4.283 bp).

Κατόπιν, επιχειρήθηκε η κλωνοποίηση της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1 με αντίδραση επανασύνδεσης (ligation). Για να έχει πιθανότητες μια κλωνοποίηση να είναι επιτυχής, πρέπει το τρυβλίο της αντίδρασης ελέγχου να έχει λιγότερες αποικίες συγκριτικά με το τρυβλίο της κλωνοποίησης. Στην πρώτη προσπάθεια, η κλωνοποίηση της αλληλουχίας IFNα2b-3'UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1 δεν επετεύχθη, διότι πιθανόν το πλασμίδιο κυκλοποιήθηκε χωρίς να ενσωματώσει την αλληλουχία, λόγω ίσως ατελούς πέψης. Συνεπώς, ακολούθησε αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδίου με την αντίδραση CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase). Στη συνέχεια, ακολούθησε ο καθαρισμός του πλασμιδίου με το πρωτόκολλο PCR clean-up (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany), και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.17.

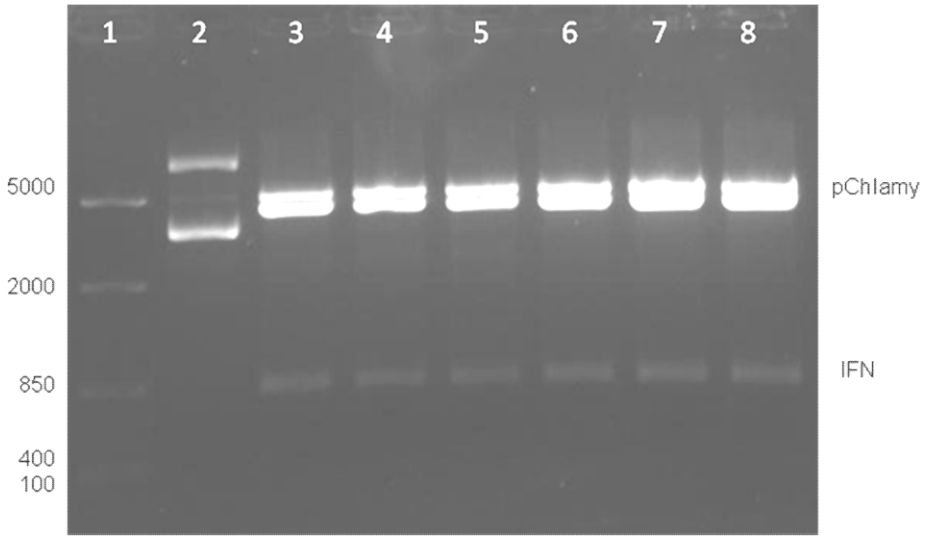


Εικόνα 3.17
Στήλη 1: Τμήμα του Lambda DNA/EcoR I/Hind III marker (Minotech)
Στήλη 2: Έλεγχος του pChlamy_1 μετά τον καθαρισμό του από την αντίδραση CIAP.

Στην Εικόνα 3.17 φαίνεται ότι η ζώνη του πλασμιδίου pChlamy_1 εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (4.283bp), μετά τον καθαρισμό του από την αντίδραση CIAP.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε ξανά η κλωνοποίηση της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b-3'UTR στο πλασμίδιο pChlamy_1, και ακολούθησε μετασχηματισμός DH5a δεκτικών κυττάρων *E.coli* με τις αντιδράσεις επανασύνδεσης. Καθώς στο τρυβλίο της αντίδρασης ελέγχου δεν προέκυψαν αποικίες, επιλέχθηκαν τυχαία έξι αποικίες από το τρυβλίο της κλωνοποίησης, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια για 12 ώρες, απομονώθηκε το

πλασμιδιακό DNA και ελέγχθηκε με διπλή πέψη με τα ένζυμα KpnI/NotI, για να βεβαιωθεί ότι επρόκειτο για τους επιθυμητούς κλώνους. (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18
Στήλη 1: Fastruler marker (Middle Range DNA Ladder, Fermentas)
Στήλη 2: pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (5077 bp)
Στήλες 3-8: Πέψεις των 6 πλασμιδίων pChlamy-IFNα2b-3'UTR με KpnI/NotI.

Στην Εικόνα 3.18 φαίνεται το αποτέλεσμα της διπλής πέψης των πλασμιδίων pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (στήλες 3-8) που προέκυψαν από τις 6 τυχαία επιλεγμένες αποικίες, σε σύγκριση με ένα από τα έξι πλασμίδια pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (στήλη 2), σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (1%). Πράγματι, όπως ήταν αναμενόμενο, το κυκλικό πλασμίδιο είχε άλλη κινητική σε σύγκριση με τα πλασμίδια που υπέστησαν πέψη. Επίσης, η ζώνη του πλασμιδίου pChlamy_1 (+KpnI/NotI) εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (4.283bp), όπως και η ζώνη του τμήματος IFNα2b-3'UTR (μέγεθος 861bp).

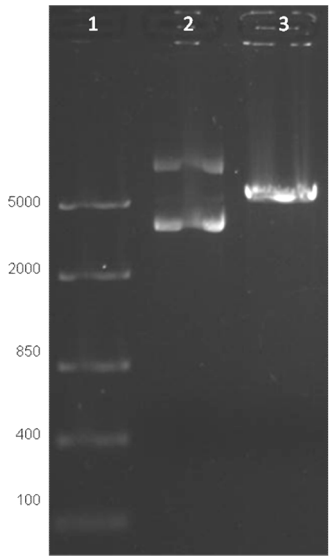
Στη συνέχεια, έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας (sequencing) (CeMIA SA, Λάρισα, Ελλάδα) για να βεβαιωθεί ότι ο κλώνος που θα χρησιμοποιείτο για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου, προκειμένου να ακολουθήσει μετασχηματισμός του *C.reinhardtii*, ήταν σωστός.

3.4 Εισαγωγή της κωδικής αλληλουχίας της huIFNα2b στο γονιδίωμα του *C.reinhardtii*

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για όσες ετερόλογες πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί με επιτυχία από τον πυρήνα του *C.reinhardtii,* η εισαγωγή του αντίστοιχου γονιδίου έχει επιτευχθεί με μη ομόλογο ανασυνδυασμό. Μια αποτελεσματική μεθοδολογία μετασχηματισμού που χρησιμοποιείται στο μη ομόλογο ανασυνδυασμό είναι η ηλεκτροπόρωση, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, για

το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pChlamy_1, το οποίο υποστηρίζει την ισχυρή και συνεχή έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης μέσω του υβριδικού υποκινητή Hsp70A-RbcS2 και η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων επετεύχθη με βάση την ανθεκτικότητα τους στην υγρομυκίνη Β. Στη συνέχεια, οι μετασχηματισμένοι κλώνοι ελέγχθηκαν με PCR για να ανιχνευθεί η ένθεση του γονιδίου.

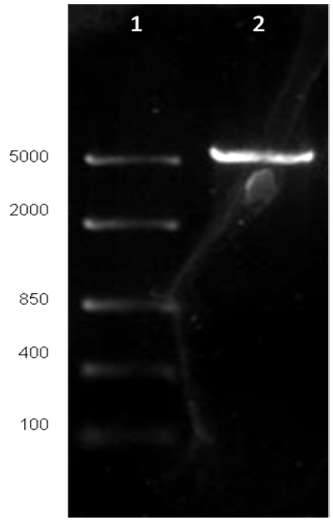
Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου η κωδική αλληλουχία της IFNα2b να εισαχθεί στο γονιδίωμα του *C.reinhardtii* με μη ομόλογο ανασυνδυασμό, το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού XmnI (Εικόνα 3.19), επειδή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kindle 1990), η απόδοση του μη ομόλογου πυρηνικού μετασχηματισμού του *C.reinhardtii* είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιείται ευθύγραμμο πλασμίδιο, παρά όταν χρησιμοποιείται υπερελικωμένο.
Το ένζυμο XmnI αναγνωρίζει μια μόνο θέση περιορισμού μακριά από την περιοχή στην οποία βρίσκονται κλωνοποιημένες οι αλληλουχίες των οποίων επιθυμείται η έκφραση στο *C. reinhardtii*, όπως φαίνεται και στο χάρτη του πλασμιδίου (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.19
Στήλη 1: Fastruler marker (Middle Range DNA Ladder, Fermentas)
Στήλη 2: pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR
Στήλη 3: Πέψη του pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR με το ένζυμο περιορισμού XmnI.

Στην Εικόνα 3.19 φαίνεται το αποτέλεσμα της πέψης του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (στήλη 3) με το ένζυμο περιορισμού XmnI, με σκοπό την ευθυγράμμισή του, σε σύγκριση με το κυκλικό πλασμίδιο (στήλη 2), σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (1%). Όπως ήταν αναμενόμενο, το κυκλικό πλασμίδιο είχε άλλη κινητική σε σύγκριση με το ευθύγραμμο πλασμίδιο και η ζώνη του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (+XmnI) εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (5077 bp).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της πέψης, και ακολούθησε έλεγχος του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%), ώστε να διαπιστωθεί η ποιότητα του DNA που θα χρησιμοποιείτο στην ηλεκτροπόρωση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20.



Εικόνα 3.20
Στήλη 1: Fastruler marker (Middle Range DNA Ladder, Fermentas)
Στήλη 3: Έλεγχος του pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR μετά τον καθαρισμό από την πέψη με το ένζυμο XmnI.

Στην Εικόνα 3.20 φαίνεται ότι η ζώνη του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (+XmnI) εμφανίστηκε στο σωστό μέγεθος (5077 bp), μετά τον καθαρισμό του από την πέψη με το ένζυμο XmnI.

Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων του *C.reinhardtii*, το πλασμίδιο διαθέτει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη Β (hygromycin B), υπό τον έλεγχο του υποκινητή της β2-τουμπουλίνης (β2- tubulin). Το συγκεκριμένο γονίδιο της υγρομυκίνης Β (*aph7*) ανήκει στο βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* και ανασυνδυάστηκε με σκοπό τη χρήση του ως δείκτης στο *C.reinhardtii*. Το αντιβιοτικό υγρομυκίνη Β είναι μια φωσφοτρανσφεράση αμινογλυκοζιτών (aminoglycoside phosphotransferase), η οποία εμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, σταθεροποιώντας τη ριβοσωμική θέση υποδοχής του tRNA. (Berthold, Schmitt et al. 2002)

Στο σημείο αυτό, για να διαπιστωθεί εάν ήταν επαρκής η συγκέντρωση του αντιβιοτικού για την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ευαισθησίας του *C.reinhardtii* στην υγρομυκίνη Β. Η ευαισθησία του αγρίου τύπου *C.reinhardtii* c137 στην υγρομυκίνη Β ελέγχθηκε επωάζοντας το σε τρυβλία TAP με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 μg/mL). Η επώαση διήρκεσε μια εβδομάδα, όσο χρονικό διάστημα παρέρχεται μέχρι να εμφανιστούν οι μετασχηματισμένες αποικίες. Τα κύτταρα αγρίου τύπου

C.reinhardtii c137 αναπτύσσονταν στα τρυβλία TAP με συγκέντρωση 10 μg/mL hyg, σε διάστημα μιας εβδομάδας. Το αποτέλεσμα αυτό εξηγήθηκε από το γεγονός ότι η υγρομυκίνη Β είναι φωτοευαίσθητη, συνεπώς έχασε τη δραστικότητά της κατά την επώαση στο φως σε διάστημα μιας εβδομάδας, οπότε ένας αριθμός κυττάρων αγρίου τύπου επιβίωσε της επώασης με υγρομυκίνη Β. Σε συγκεντρώσεις υγρομυκίνης Β μεγαλύτερες ή ίσες των 30 μg/mL δεν αναπτύσσονταν αποικίες. Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε να γίνεται η επιλογή των κλώνων σε τρυβλία TAP με συγκέντρωση 40 μg/mL hyg, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη κυττάρων αγρίου τύπου και συνεπώς η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στην επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων του *C.reinhardtii*.

Για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* προτεινόταν η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης (electroporation) ως η αποδοτικότερη, σύμφωνα με το GeneArt® Chlamydomonas Engineering Kit. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί υψηλότερη απόδοση μετασχηματισμού με την ηλεκτροπόρωση, παρά με τη μέθοδο glass bead (ανακίνηση με γυάλινα σφαιρίδια), σε κύτταρα *C.reinhardtii* χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. (Shimogawara, Fujiwara et al. 1998). Όσον αφορά στο μετασχηματισμό κυττάρων αγρίου τύπου με φυσιολογικό κυτταρικό τοίχωμα, ενδείκνυνται εξίσου και οι δυο μέθοδοι. Το στέλεχος αγρίου τύπου *C.reinhardtii* c137 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είχε κυτταρικό τοίχωμα.

Συνεπώς, για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* ακολουθήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του GeneArt® Chlamydomonas Engineering Kit, προτείνονταν οι παράμετροι: (τάση) Voltage: 600V, (χωρητικότητα) Capacity: 50μF, (αντίσταση) Resistance: infinity (μη προσδιορισμένη) και κυβέττα ηλεκτροπόρωσης των 0.4 cm. Καθώς διατίθετο κυβέττα των 0.2 cm, εφαρμόστηκε τάση μισής έντασης, δηλαδή 300V, σύμφωνα με το γενικό οδηγό βελτιστοποίησης της ηλεκτροπόρωσης (General Optimization Guide for Electroporation, www.btxonline.com). Παρόλα αυτά, δεν προέκυπταν μετασχηματισμένες αποικίες, καθιστώντας την τροποποίηση των παραμέτρων της μεθόδου αναγκαία.

Από μια εκτενή έρευνα στη βιβλιογραφία (Lin, Kwan et al. 2010; Rasala, Lee et al. 2012), προέκυψε μια πληθώρα παραμέτρων προς δοκιμή, όπως η τάση, η χωρητικότητα, η αντίσταση, ο χρόνος, το πλήθος των κυττάρων και η προσθήκη βοηθητικού DNA.

Σύμφωνα με τους (Jeon, Suresh et al. 2013), κρίσιμη παράμετρος για τον επιτυχή μετασχηματισμό ήταν ο χρόνος εφαρμογής της τάσης (time constant) κατά τη διάρκεια της ηλεκτροπόρωσης να είναι ~ 27 ms. Για να επιτευχθεί αυτός ο χρόνος δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες τάσης, χωρητικότητας και αντίστασης. Μετά από διαδοχικές δοκιμές, οι συνθήκες που παρουσίαζαν χρόνο εφαρμογής ~ 27 ms ήταν οι Α και Β, που φαίνονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Οι παράμετροι της ηλεκτροπόρωσης που δοκιμάστηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Παράμετροι	A	B
Voltage (V)	400	400
Capacity (μF)	200	800
Resistance (Ω)	infinity	50

Επίσης, έπρεπε να διευκρινιστεί εάν η συγκέντρωση των κυττάρων επηρέαζε το χρόνο εφαρμογής των συνθηκών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις κυττάρων χ και χ/2.

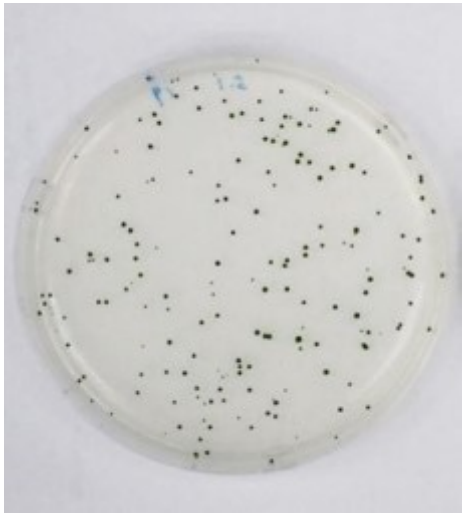
Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, προτεινόταν η προσθήκη DNA σπέρματος σολωμού (salmon sperm) ως βοηθητικό DNA (carrier DNA). (Shimogawara, Fujiwara et al. 1998; Meslet-Cladière and Vallon 2011). Όντως, για κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε επιπλέον ηλεκτροπόρωση, όπου προστέθηκαν 4μl DNA σπέρματος σολωμού (Sigma) συγκέντρωσης (9-11mg/ml), αφού αποδιατάχθηκε με βρασμό για 10 min και κατόπιν τοποθετήθηκε σε πάγο για τουλάχιστον 5 min.

Μετά την ηλεκτροπόρωση, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, τα κύτταρα επωάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό (TAP-40 mM sucrose), και 24 ώρες αργότερα επιστρώθηκαν σε τρυβλία TAP-hygromycin (40 μg/ml hyg), ακολούθησε επώαση και μία εβδομάδα αργότερα άρχισαν να φαίνονται οι μετασχηματισμένες αποικίες.

Από τις παραπάνω δοκιμές προέκυψαν τα εξής:

I. Μόνο στην περίπτωση A προέκυψαν μετασχηματισμένες αποικίες, άρα οι καταλληλότερες συνθήκες για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* με ηλεκτροπόρωση ήταν : τάση 400V, χωρητικότητα 200 μF και αντίσταση μη προσδιορισμένη.
II. Επειδή ο χρόνος εφαρμογής της τάσης στη δοκιμή B ήταν επίσης 27 ms, εκτιμήθηκε ότι η παράμετρος αυτή δεν ήταν η μόνη που επηρέαζε την έκβαση του μετασχηματισμού.
III. Ακόμη, όσον αφορά στην προσθήκη βοηθητικού DNA, οι μετασχηματισμένες αποικίες που προέκυπταν από ηλεκτροπόρωση με DNA από σπέρμα σολωμού ήταν λιγότερες σε αριθμό από τις αποικίες που προέκυπταν από ηλεκτροπόρωση χωρίς προσθήκη DNA από σπέρμα σολωμού.
IV. Όσον αφορά στο πλήθος των κυττάρων, όπως ήταν αναμενόμενο, η συγκέντρωσή τους δεν επηρέαζε το χρόνο εφαρμογής των συνθηκών.

Συμπερασματικά, για το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii,* οι κατάλληλες συνθήκες ήταν: τάση 400V, χωρητικότητα 200 μF και αντίσταση μη προσδιορισμένη, χωρίς την προσθήκη βοηθητικού DNA. Τέλος, στην Εικόνα 3.21 φαίνονται οι μετασχηματισμένες αποικίες του *C.reinhardtii.*



Εικόνα 3.21 Μετασχηματισμένες αποικίες *C.reinhardtii*.

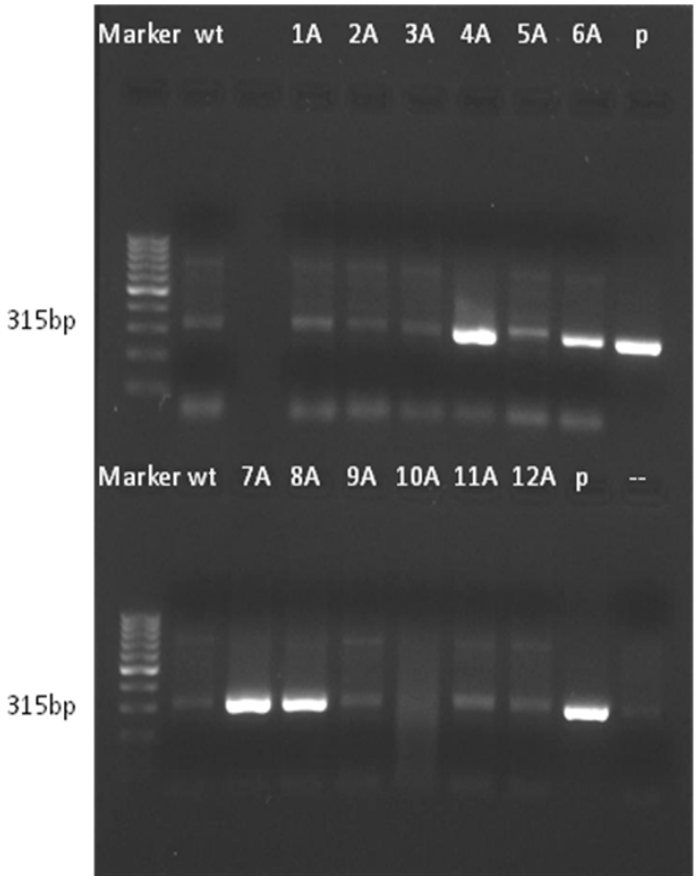
Οι αποικίες που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* ως ανθεκτικές στην υγρομυκίνη Β, ελέγχθηκαν για το εάν είχαν ενσωματώσει το γονίδιο της ιντερφερόνης *ifn* α2b, διότι μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να είχε εισαχθεί μόνο το γονίδιο της υγρομυκίνης Β. Ο έλεγχος των αποικιών επετεύχθη με τη μέθοδο της colony PCR, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2. Το τμήμα DNA που ενισχύθηκε είχε μέγεθος 315 bp και απεικονίζεται στην Εικόνα 3.22.

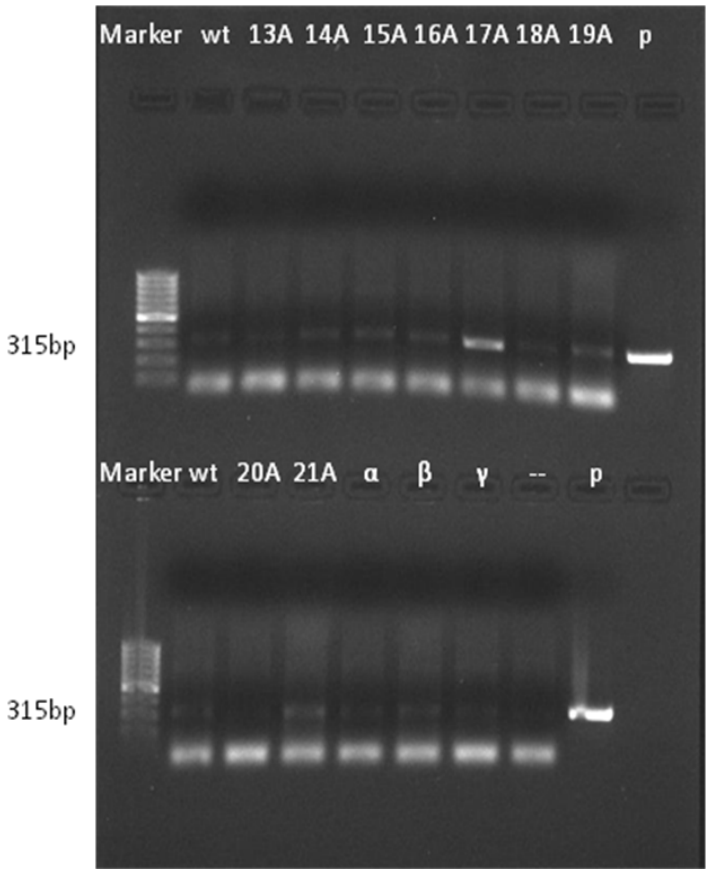
CGA**GGTACC**CATGCACGCCCGCAAGATGGGCGCGCTGGCGGTGCTGGCGGTGGCCTGCCTGG
CGGCGGTGGCCTCGGTGGCGCACGCC**TGC**GACCTGCCCCAGACCCACTCCCTGGGCAGCCGC
CGCACGCTGATGCTGCTGGCCCAGATGCGCCGCATCTCGCTGTTCTCCTGCCTGAAGGACCG
CCACGACTTCGGCTTCCCCCAAGAGGAGTTCGGCAACCAGTTCCAGAAGGCGGAGACCATCC
CGGTGCTGCACGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCTGTTCAGCACGAAGGACAGCTCGGCC
GCGTGGGACGAGACCCTGCTGGACAAGTTCTACACGGAGCTGTACCAGCAGCTGAACGACCT
GGAGGCCTGCGTGATCCAAGGCGTGGGCGTGACCGAGACGCCCCTGATGAAGGAGGACAGCA
TCCTGGCGGTGCGCAAGTACTTCCAGCGCATCACCCTGTACCTGAAGGAGAAGAAGTACTCG
CCGTGCGCCTGGGAGGTAGTGCGCGCGGAGATCATGCGCTCGTTCTCGCTGTCGACGAACCT
GCAAGAGTCCCTGCGCTCGAAGGAGTAA**TCTAGA**CCGCTCCGTGTAAATGGAGGCGCTCGTT
GATCTGAGCCTTGCCCCCTGACGAACGGCGGTGGATGGAAGATACTGCTCTCAAGTGCTGAA
GCGGTAGCTTAGCTCCCCGTTTCGTGCTGATCAGTCTTTTTCAACACGTAAAAAGCGGAGGA
GTTTTGCAATTTTGTTGGTTGTAACGATCCTCCGTTGATTTTGGCCTCTTTCTCCATGGGCG
GGCTGGGCGTATTTGAAGCG**GCGGCCGC**CATATGATTCGAATGTCTTTCTTGCGCTATGACA

Εικόνα 3.22 Το τμήμα DNA της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b που ενισχύθηκε κατά τον έλεγχο με τη μέθοδο της colony PCR. Με γαλάζιο χρώμα φαίνεται ο εκκινητής IFN-F1 και με κίτρινο χρώμα ο εκκινητής IFN-R1, ενώ με γκρι χρώμα απεικονίζεται το τμήμα της ιντερφερόνης που ενισχύουν, με μέγεθος 315bp. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού KpnI (GGTACC), XbaI (TCTAGA) και NotI (GCGGCCGC). Με κόκκινο χρώμα (TGC) απεικονίζεται το πρώτο κωδικόνιο της ιντερφερόνης, μετά το πεπτίδιο οδηγό *ars1*.

Στην Εικόνα 3.22 φαίνεται το τμήμα DNA της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b που ενισχύθηκε κατά τον έλεγχο με τη μέθοδο της colony PCR. Το τμήμα αυτό βρίσκεται περίπου στο μέσον της αλληλουχίας, η οποία ξεκινά με το κωδικόνιο TGC που έχει επισημανθεί με κόκκινο χρώμα. Προηγουμένως βρίσκεται το πεπτίδιο οδηγός της αρυλσουλφατάσης (*ars1*), από τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού KpnI έως το κωδικόνιο TGC, και ανάμεσα στις θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού XbaI και NotI, βρίσκεται η 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *rbcS2*.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της colony PCR, από την ηλεκτροπόρωση (A), ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (1%), και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.23.

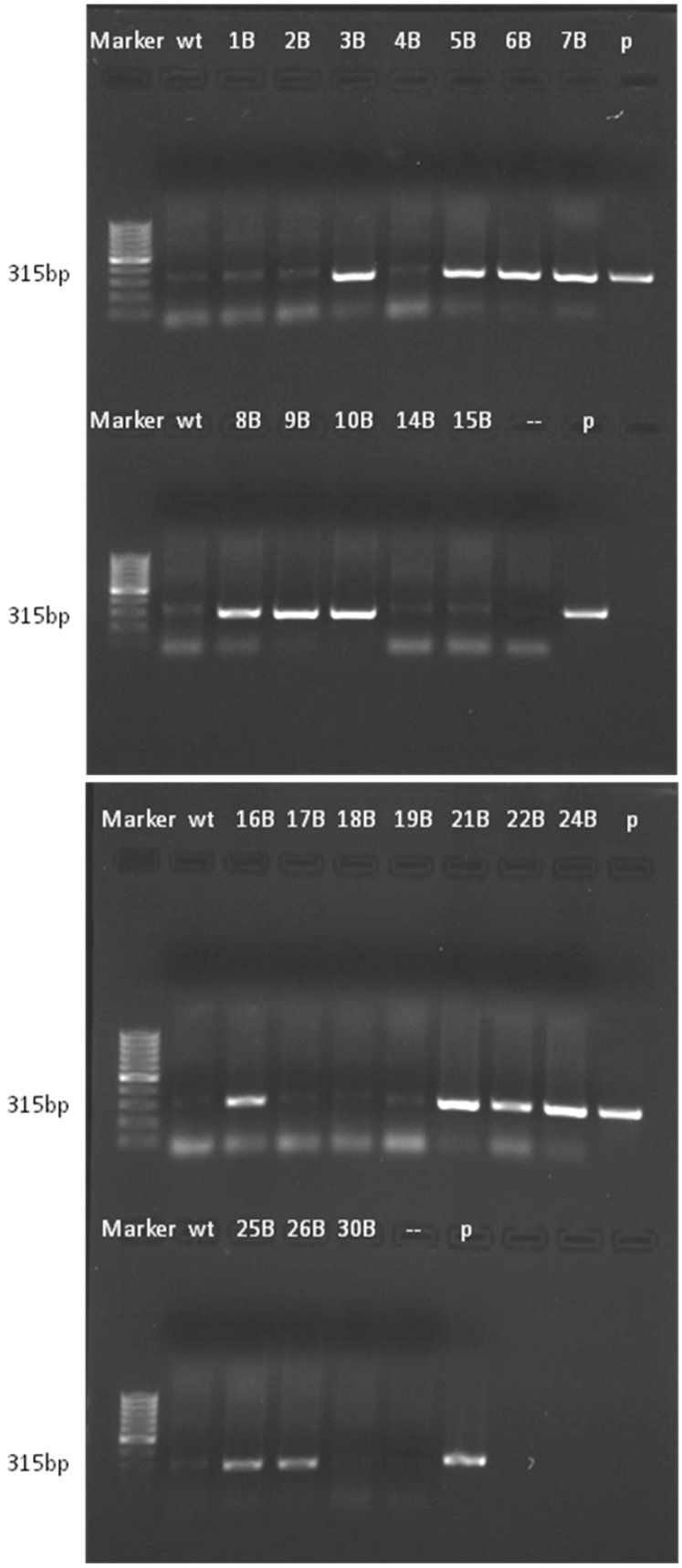




Εικόνα 3.23

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της Colony PCR των μετασχηματισμένων αποικιών με pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (+XmnI), από την ηλεκτροπόρωση (A). Οι αποικίες 4A, 6A, 7A, 8A και πιθανώς και η 17A, έδωσαν σαφή ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος (315bp). Οι αποικίες 1A και 19A, οι οποίες εμφάνιζαν αχνή ζώνη και δεν προέκυπτε εάν είναι σαφώς θετικές, αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Οι αποικίες α,β,γ εμφανίστηκαν μετά από μια εβδομάδα από τις υπόλοιπες 21, γι' αυτό και δεν αριθμήθηκαν. Με wt (wild type) απεικονίζεται το αγρίου τύπου c137, με p απεικονίζεται το πλασμίδιο που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας, ενώ το – αντιστοιχεί στην αντίδραση ελέγχου (χωρίς DNA), για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μόλυνσης. Ως δείκτης μοριακού βάρους (Marker) χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder (life Technologies).

Στην Εικόνα 3.23 φαίνονται τα προϊόντα της colony PCR, από την ηλεκτροπόρωση (A). Από τις 24 αποικίες που προέκυψαν από την επιλογή στην υγρομυκίνη B, προέκυψαν 5 αποικίες που φαίνεται να έχουν ενσωματώσει το γονίδιο της ιντερφερόνης (ποσοστό 20.8%). Επειδή όμως δεν ήταν σίγουρη η ένθεση ολόκληρου του γονιδίου, ή και το εάν είχε ενσωματωθεί σε θέση όπου επιτρέπεται η έκφρασή του, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί και δεύτερη ηλεκτροπόρωση (B), ώστε να προκύψουν περισσότεροι κλώνοι προς έλεγχο της έκφρασης. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας colony PCR που ακολούθησε φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της Colony PCR των μετασχηματισμένων αποικιών με pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR (+XmnI), από την

ηλεκτροπόρωση (Β). Οι αποικίες 3Β, 5Β, 6Β, 7Β, 8Β, 9Β, 10Β, 16Β, 21Β, 22Β, 24Β, 25Β και 26Β έδωσαν σαφή ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος (315bp). Κάποιες αποικίες ενώ αναπτύχθηκαν αρχικά, στη συνέχεια δεν ήταν δυνατό να ανακαλλιεργηθούν, γι' αυτό και η αρίθμηση δεν είναι συνεχής. Με wt (wild type) απεικονίζεται το αγρίου τύπου c137 , με p απεικονίζεται το πλασμίδιο που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας, ενώ το – αντιστοιχεί στην αντίδραση ελέγχου (χωρίς DNA), για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μόλυνσης. Ως δείκτης μοριακού βάρους (Marker) χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

Στην Εικόνα 3.24 φαίνονται τα προϊόντα της colony PCR, από την ηλεκτροπόρωση (Β). Από τις 22 αποικίες που προέκυψαν από την επιλογή στην υγρομυκίνη Β, προέκυψαν 13 αποικίες που φαίνεται να έχουν ενσωματώσει το γονίδιο της ιντερφερόνης (ποσοστό 59%).

Συνοψίζοντας από τα αποτελέσματα της colony PCR, προέκυψαν 18 θετικές για το γονίδιο της ιντερφερόνης αποικίες σε σύνολο 46 αποικιών που ελέγχθηκαν. Οι 18 συνολικά θετικές αποικίες (και οι αμφίβολες 1Α και 19Α) κρίθηκαν αρκετές, ώστε να προχωρήσουν σε απομόνωση RNA και έλεγχο της έκφρασης της ιντερφερόνης.

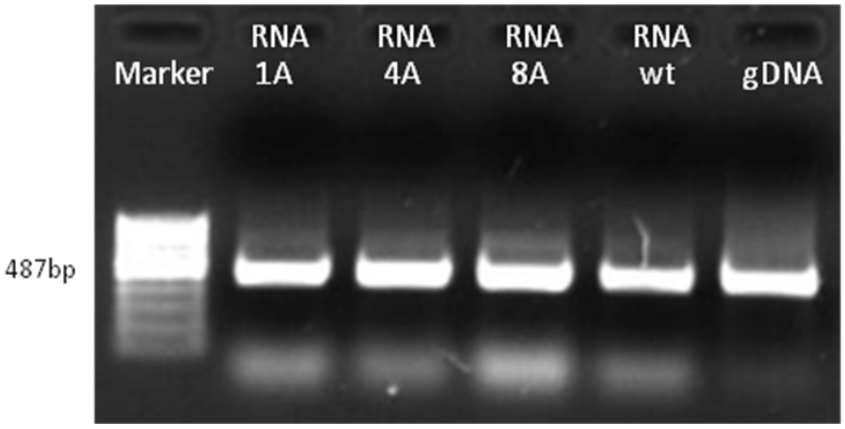
3.5 Έκφραση του mRNA της huIFNα2b από το *C.reinhardtii*

Για να ελεγχθεί η έκφραση του mRNA της IFNα2b από το *C.reinhardtii,* αρχικά αναπτύχθηκαν οι αποικίες που βρέθηκαν θετικές στον έλεγχο της colony PCR με ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό. Κατά τη διαδικασία αυτή δεν επετεύχθη η ανακαλλιέργεια των αποικιών 17Α και 22Β. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν επιτυχώς στο στερεό υπόστρωμα επιλέχθηκαν προκειμένου να ελεγχθούν για την έκφραση του mRNA της IFNα2b. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια των αποικιών σε υγρό θρεπτικό υλικό και απομόνωση του ολικού RNA, ακολούθησε καθαρισμός του RNA από το DNA και παραγωγή cDNA με χρήση εκκινητών που αναγνωρίζουν πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα. Ο έλεγχος της έκφρασης του mRNA της IFNα2b πραγματοποιήθηκε με αντίδραση PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών, ενώ τα επίπεδα των μεταγράφων ποσοτικοποιήθηκαν με τη μεθοδο qPCR.

Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των θετικών αποικιών στην υγρή καλλιέργεια επιτεύχθηκε σε συγκεντρώσεις υγρομυκίνης Β χαμηλότερες (20 μg/ml hyg) σε σχέση με αυτές στις οποίες αναπτύχθηκαν στη στερεή καλλιέργεια (40 μg/ml hyg). Ως δείγμα ελέγχου (negative control) χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια *C.reinhardtii* c137 αγρίου τύπου. Επιπλέον, οι καλλιέργειες επωάστηκαν 72 ώρες σε καλλιέργειες των 5 ml, οι οποίες στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε καλλιέργειες των 50 ml για άλλες 72 ώρες, ώστε να επιτευχθεί μεγάλος αριθμός κυττάρων στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Για την απομόνωση του ολικού RNA των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI Reagent (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), το οποίο διευκολύνει την ομογενοποίηση των κυττάρων και το μετέπειτα διαχωρισμό του RNA, από το DNA και τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, η απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα, συνοδεύεται συχνά από μόλυνση με γενωμικό DNA, το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί πριν πραγματοποιηθεί η κατασκευή cDNA. Συνεπώς, απαιτείτο ο καθαρισμός του RNA με χρήση του ενζύμου DNase (RNase-free). Μετά την απενεργοποίηση της DNase, ακολούθησε έλεγχος της καθαρότητας του RNA με PCR, κατά τον οποίο με ειδικούς εκκινητές ενισχύθηκαν τα γονίδια *18S rDNA* του *C.reinhardtii*, τα οποία συναντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα σε ολόκληρο το γονιδίωμα, (ή/και το γονίδιο της *ifn* α2b). Η ύπαρξη ανιχνεύσιμου DNA στα δείγματα του RNA που χρησιμοποιήθηκαν για παρασκευή cDNA, θα οδηγούσε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, αφού το γονίδιο της *ifn* α2b δεν περιέχει εσώνια.

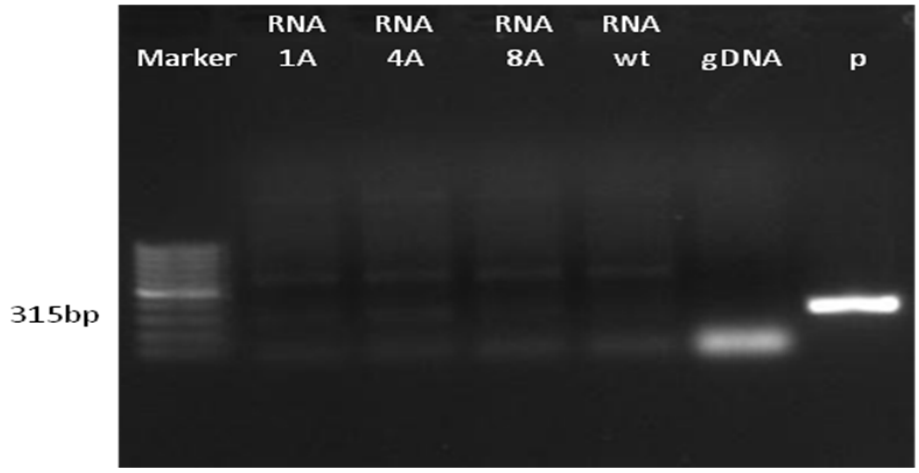
Ο έλεγχος της καθαρότητας των δειγμάτων RNA μετά την επωάση με DNase έδειξε την ύπαρξη DNA. Στην Εικόνα 3.25 φαίνονται ενδεικτικά 4 δείγματα RNA, στα οποία υπήρχε αρκετή ποσότητα DNA. Ομοίως ελέγχθηκαν και οι υπόλοιπες αποικίες.



Εικόνα 3.25

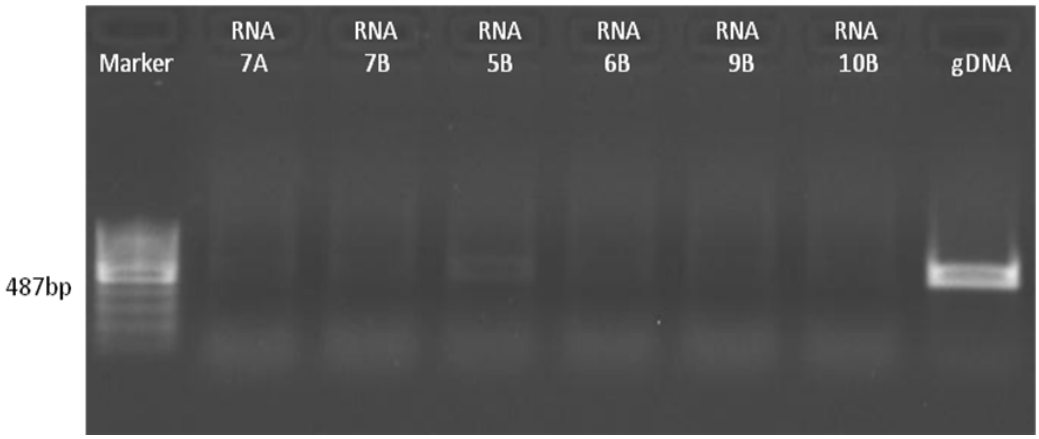
Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων RNA (αποικίες 1A, 4A, 8A και wt) για παρουσία DNA, μετά από επώαση με Dnase (χρησιμοποιήθηκε τμήμα της αντίδρασης, στο οποίο η DNase απενεργοποιήθηκε). Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 487bp) του γονιδίου *18S rDNA* του *C.reinhardtii*. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν ζώνη που αντιστοιχεί σε ανιχνεύσιμα επίπεδα DNA. Με wt RNA απεικονίζεται το RNA του c137, ενώ με gDNA (genomic) απεικονίζεται το γενωμικό DNA που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

Η επώαση με DNase συνεχίστηκε, έως ότου να μην ανιχνευόταν πλέον DNA στα δείγματα, όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 3.26, Εικόνα 3.27 και Εικόνα 3.28)



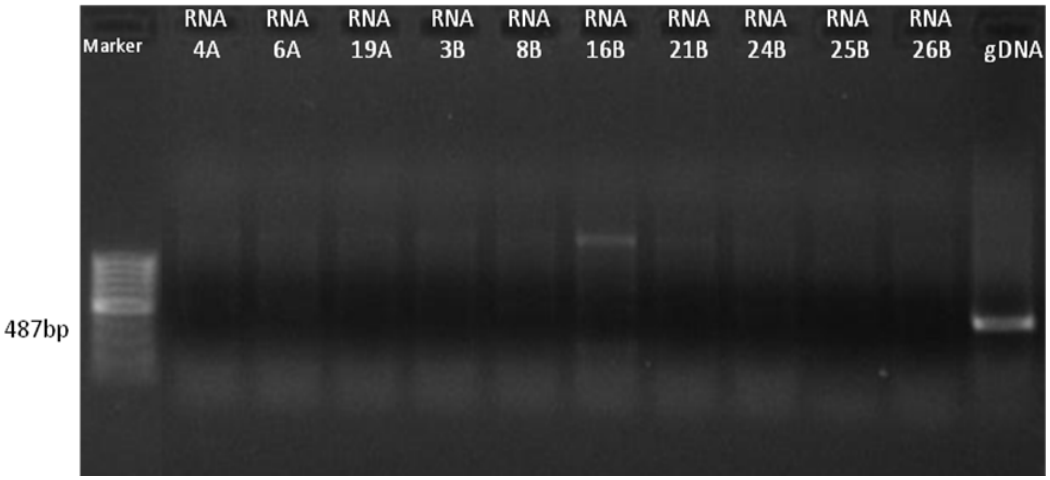
Εικόνα 3.26

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων RNA (αποικίες 1A, 4A, 8A και wt) για παρουσία DNA, μετά από επώαση με Dnase (χρησιμοποιήθηκε τμήμα της αντίδρασης, στο οποίο η DNase απενεργοποιήθηκε). Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 315bp) για το γονίδιο της ιντερφερόνης. Δεν ανιχνεύθηκε DNA στα δείγματα. Με wt RNA απεικονίζεται το RNA του c137, με gDNA απεικονίζεται το γενωμικό DNA που λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ με p απεικονίζεται το πλασμίδιο που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).



Εικόνα 3.27

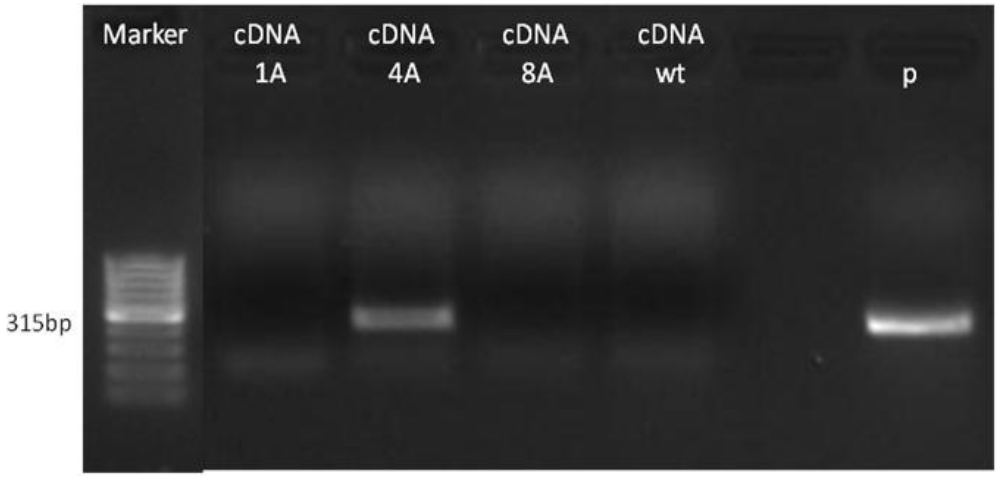
Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων RNA (αποικίες 7A, 7B, 5B, 6B, 9B, 10B) για παρουσία DNA, μετά από επώαση με Dnase (χρησιμοποιήθηκε τμήμα της αντίδρασης, στο οποίο η DNase απενεργοποιήθηκε). Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 487bp) του γονιδίου *18S rDNA* του *C.reinhardtii*. Δεν ανιχνεύθηκε DNA στα δείγματα. Με gDNA (genomic) απεικονίζεται το γενωμικό DNA που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).



Εικόνα 3.28

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων RNA (αποικίες 4A, 6A, 19A, 3B, 8B, 16B, 21B, 24B, 25B, 26B) για παρουσία DNA, μετά από επώαση με Dnase (χρησιμοποιήθηκε τμήμα της αντίδρασης, στο οποίο η DNase απενεργοποιήθηκε). Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 487bp) του γονιδίου *18S rDNA* του *C.reinhardtii*. Δεν ανιχνεύθηκε DNA στα δείγματα. Με gDNA (genomic) απεικονίζεται το γενωμικό DNA που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

Τα δείγματα RNA που δεν περιείχαν πλέον DNA, καθαρίστηκαν με όξινη φαινόλη. Η όξινη φαινόλη χρησιμοποιείται γιατί δίνει τη δυνατότητα να καθαριστεί ποσοτικά το RNA από την υδατική φάση. Μετά τον καθαρισμό των RNAs, ακολούθησε η κατασκευή cDNA με μήτρα τα RNAs, εκκινητή τον oligodT (dT_{12-18}), και χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου RT, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2. Εφόσον ο πολυμερισμός ξεκίνησε με τον εκκινητή oligodT (dT_{12-18}), ο οποίος υβριδίζει με τις πολυαδενυλιωμένες ουρές (polyA tail) των mRNAs, τα cDNAs που προέκυψαν αντιστοιχούσαν στα πυρηνικά μετάγραφα των κυττάρων, τα οποία εκφράζονταν τη δεδομένη στιγμή που έγινε η απομόνωση του RNA. Ακολούθως, με χρήση αντίδρασης PCR με μήτρα τα cDNAs και κατάλληλους εκκινητές που ενίσχυαν το γονίδιο της ιντερφερόνης, έγινε ο έλεγχος για το εάν κάποιος κλώνος εξέφραζε το γονίδιο *ifn α2b*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνα 3.29, Εικόνα 3.30, Εικόνα 3.31 και Εικόνα 3.32.

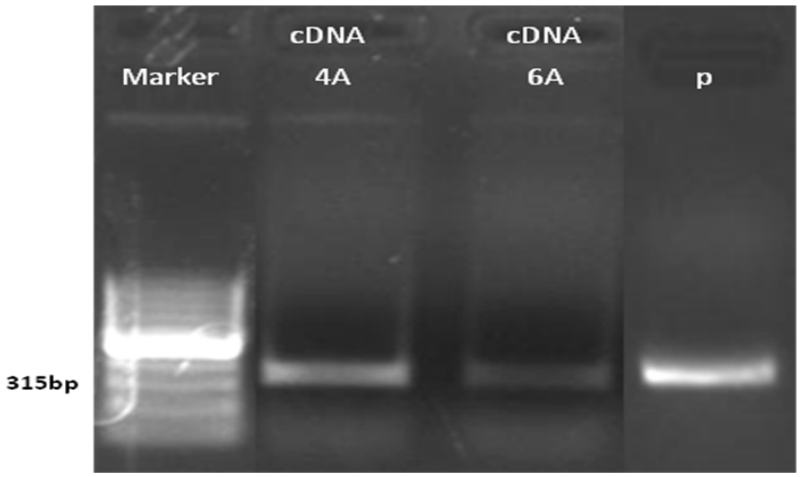


Εικόνα 3.29

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων cDNAs των αποικιών 1A, 4A, 8A και wt. Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 315bp) για το γονίδιο της ιντερφερόνης *ifn α2b*. Η αποικία 4A ήταν σαφώς θετική. Με p απεικονίζεται το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR, που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

Στην Εικόνα 3.29 φαίνεται το αποτέλεσμα της PCR με μήτρα τα cDNAs των αποικιών 1A, 4A, 8A και wt, κατά την οποία ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου *ifnα2b.* Η αποικία 4A εμφάνισε ζώνη ίδιου μεγέθους με του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR, γεγονός που σήμαινε ότι η αποικία αυτή εξέφραζε το γονίδιο της ιντερφερόνης, το οποίο μεταγραφόταν από τον πυρήνα του *C.reinhardtii.*

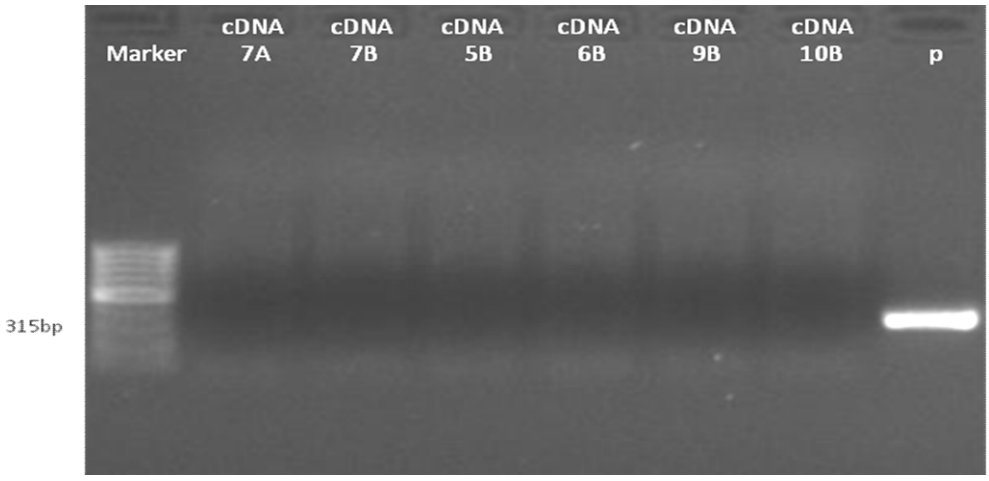
Επιπλέον, για τον έλεγχο φαινομένων αποσιώπησης (RNA silencing) απομονώθηκε RNA από την αποικία 4A και 6 μήνες μετά την πρώτη απομόνωση. Μετά από 6 μήνες ανακαλλιέργειας, ανιχνεύθηκε στο cDNA η έκφραση του γονιδίου της *ifn α2b*, οπότε δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα σίγησης του RNA (Εικόνα 3.30).



Εικόνα 3.30

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων cDNAs των αποικιών 4A (μετά από 6 μήνες ανακαλλιέργειας) και 6A. Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 315bp) για το γονίδιο της ιντερφερόνης *ifn α2b*. Οι αποικίες 4A και 6A ήταν σαφώς θετικές. Με p απεικονίζεται το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR, που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

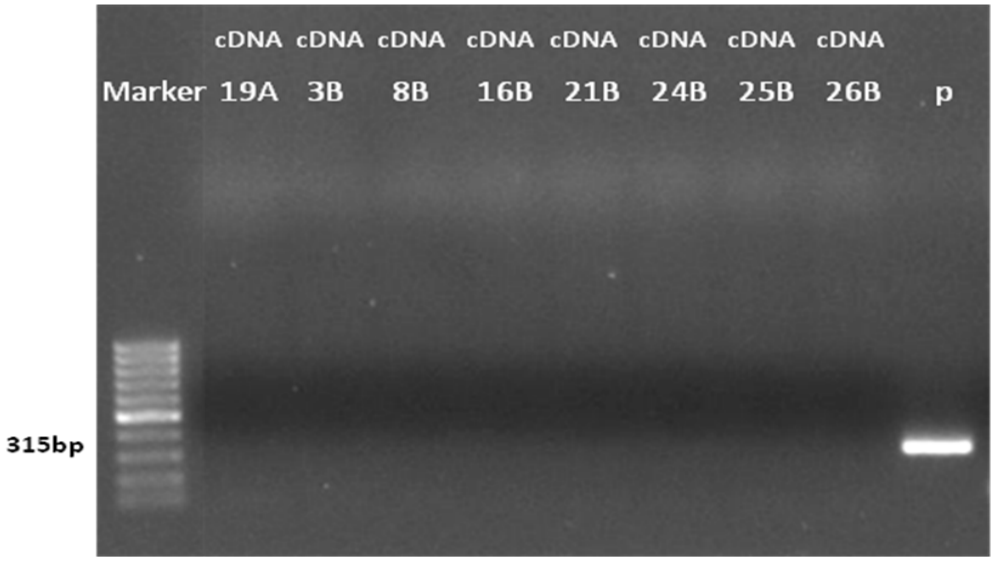
Στην Εικόνα 3.30 φαίνεται το αποτέλεσμα της PCR με μήτρα τα cDNAs των αποικιών 4A και 6A κατά την οποία ενισχύθηκε το γονίδιο της *ifnα2b*. Στην προκειμένη αντίδραση, οι αποικίες 4A και 6A εμφάνισαν ζώνη μεγέθους 300bp περίπου, που αντιστοιχούσε στο μέγεθος του τμήματος DNA του γονιδίου της ιντερφερόνης που ενίσχυσαν οι εκκινητές IFN-F1/IFN-R1, γεγονός που σήμαινε ότι οι αποικίες αυτές εξέφραζαν το γονίδιο της ιντερφερόνης, το οποίο μεταγραφόταν από τον πυρήνα του *C.reinhardtii*.



Εικόνα 3.31

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων cDNAs των αποικιών 7A, 7B, 5B, 6B 9B, 10B. Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 315bp) για το γονίδιο της ιντερφερόνης *ifn α2b*.

Καμία αποικία δε φάνηκε να είναι θετική. Με p απεικονίζεται το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR, που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).



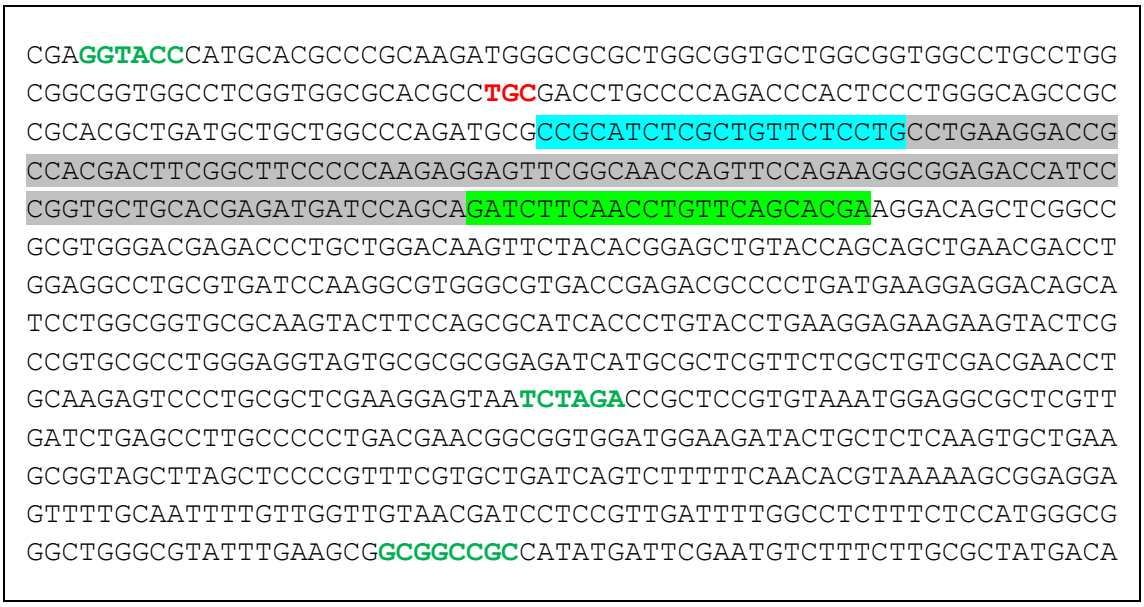
Εικόνα 3.32

Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της PCR των δειγμάτων cDNAs των αποικιών 19A, 3B, 8B, 16B, 21B, 24B, 25B, 26B. Η αντίδραση PCR ενίσχυσε τμήμα DNA (μεγέθους 315bp) για το γονίδιο της ιντερφερόνης *ifn α2b*. Καμία αποικία δε φάνηκε να είναι θετική. Με p απεικονίζεται το πλασμίδιο pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR, που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο Generuler 100bp DNA ladder. (life Technologies).

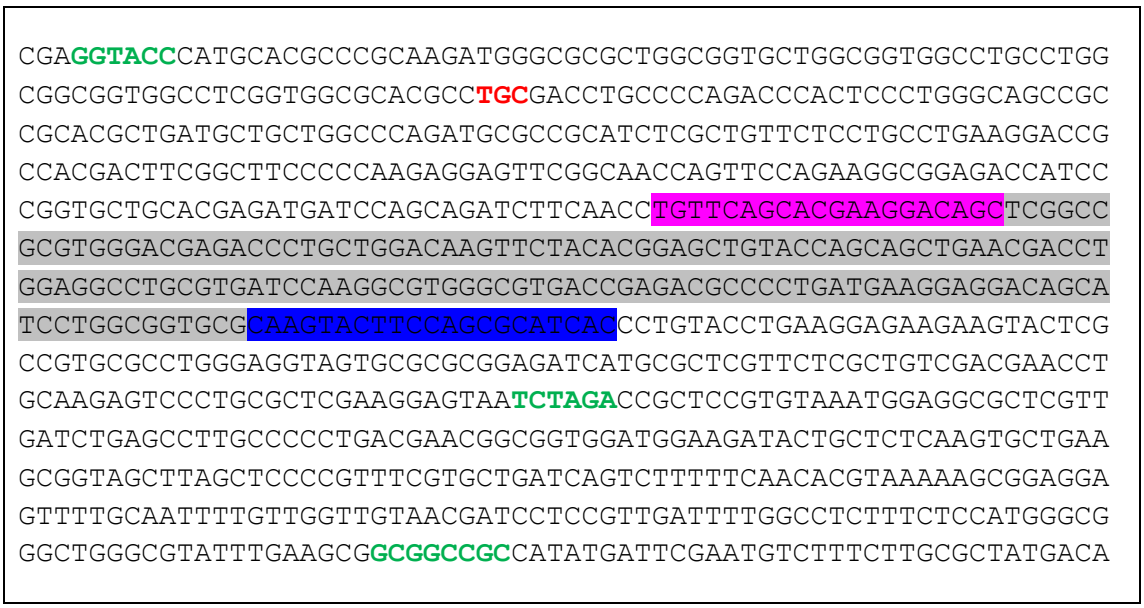
Στις Εικόνες 3.31 και 3.32, καμία αποικία δεν εμφάνισε ζώνη ίδιου μεγέθους με του πλασμιδίου pChlamy_1-IFNα2b-3'UTR. Επειδή στην παραπάνω αντίδραση PCR δε χρησιμοποιήθηκε κάποιο ενδογενές γονίδιο αναφοράς, δεν αποκλείστηκε το ενδεχόμενο κάποια από τις υπόλοιπες αποικίες να εξέφραζε το γονίδιο *ifn α2b*. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος qPCR προκειμένου να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ιντερφερόνης *ifn α2b* σε σχέση με ένα ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης (house-keeping gene). Το ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να είναι το *cblp*, διότι βρίσκεται στο γονιδίωμα του *C.reinhardtii* σε ένα μοναδικό αντίγραφο και επιδεικνύει σταθερή έκφραση. Το γονίδιο *cblp* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη ανάλογη της βήτα υπομονάδας των G πρωτεϊνών (GTPases που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος των κυττάρων, υδρολύοντας το γουανοσινοτριφωσφορικό οξύ (GTP) σε γουανοσινοδιφωσφορικό οξύ (GDP)) των θηλαστικών, της μύγας των φρούτων και των ζυμών, και το προϊόν του έχει οριστεί ως «Chlamydomonas beta subunit-like polypeptide» (Cblp) (Chang, Moseley et al. 2005; Pootakham, Gonzalez-Ballester et al. 2010). Για την ενίσχυση του γονιδίου *cblp* επιλέχθηκαν δυο ζεύγη εκκινητών, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες, και οι οποίοι ενίσχυαν διαφορετικού μεγέθους αλληλουχία του

γονιδίου, ώστε να υπάρχει αναλογία με τα τμήματα DNA που ενίσχυαν οι εκκινητές του γονιδίου *ifn α2b*.

Για την εκτέλεση της qPCR σχεδιάστηκαν δυο ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών για το γονίδιο της ιντερφερόνης, οι οποίοι ενίσχυσαν διαφορετικό τμήμα της αλληλουχίας, διαφορετικού μεγέθους (Εικόνες 3.33 και 3.34), ώστε να υπάρχει περιθώριο επιλογής για την αξιολόγησή τους.

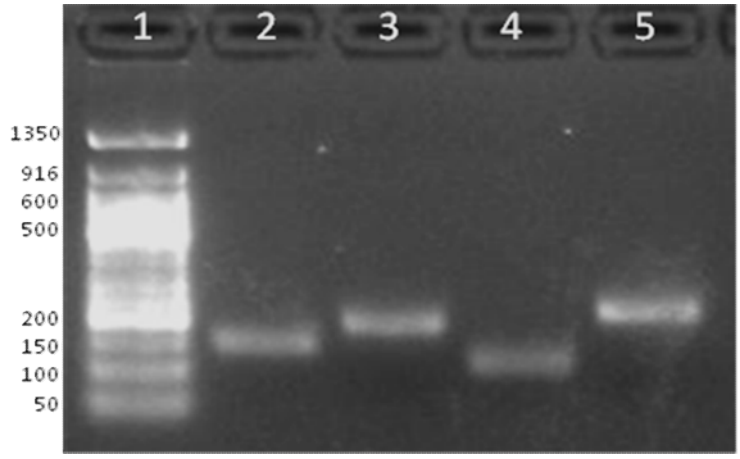


Εικόνα 3.33 Το τμήμα DNA της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b που ενισχύθηκε κατά τον έλεγχο με τη μέθοδο της qPCR. Με γαλάζιο χρώμα φαίνεται ο εκκινητής qPCR-IFNF1, ενώ με πράσινο ανοικτό χρώμα φαίνεται ο εκκινητής qPCR-IFNR3. Το τμήμα της ιντερφερόνης που ενισχύουν απεικονίζεται με γκρι χρώμα και έχει μέγεθος 143bp. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού KpnI (GGTACC), XbaI (TCTAGA) και NotI (GCGGCCGC). Με κόκκινο χρώμα (TGC) απεικονίζεται το πρώτο κωδικόνιο της ιντερφερόνης, μετά το πεπτίδιο οδηγό *ars1*.



Εικόνα 3.34 Το τμήμα DNA της αλληλουχίας της ιντερφερόνης IFNα2b που ενισχύθηκε κατά τον έλεγχο με τη μέθοδο της qPCR. Με ροζ χρώμα φαίνεται ο εκκινητής qPCR-IFNF3, ενώ με μπλε χρώμα φαίνεται ο εκκινητής qPCR-IFNR1. Το τμήμα της ιντερφερόνης που ενισχύουν απεικονίζεται με γκρι χρώμα και έχει μέγεθος 184bp. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού KpnI (GGTACC), XbaI (TCTAGA) και NotI (GCGGCCGC). Με κόκκινο χρώμα (TGC) απεικονίζεται το πρώτο κωδικόνιο της ιντερφερόνης, μετά το πεπτίδιο οδηγό *ars1*.

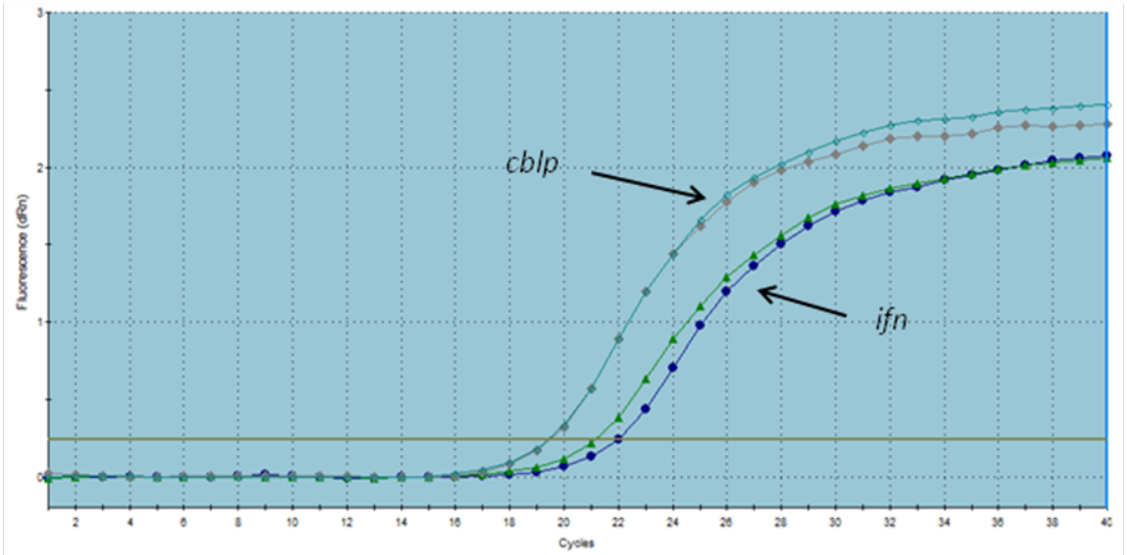
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA, με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *cblp* που προέκυψαν από την qPCR. Στη συνέχεια, έχοντας ως δεδομένη την έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης από την αποικία 4Α, πραγματοποιήθηκε qPCR για τον έλεγχο της καταλληλότητας των εκκινητών **(**Εικόνα 3.35).



Εικόνα 3.35
Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτής αγαρόζης των προϊόντων της qPCR της αποικίας 4Α, με δυο ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου της ιντερφερόνης και του ενδογενούς γονιδίου σταθερής έκφρασης *cblp*, αντίστοιχα.
Στήλη 1: 50bp ladder Biolabs
Στήλη 2: το ζεύγος εκκινητών IFN F1-R3 ενισχύει τμήμα 143bp.
Στήλη 3: το ζεύγος εκκινητών IFN F3-R1 ενισχύει τμήμα 184bp.
Στήλη 4: το ζεύγος εκκινητών CBLP F1-R1 ενισχύει τμήμα 105bp.
Στήλη 5: το ζεύγος εκκινητών CBLP F2-R2 ενισχύει τμήμα 220bp.

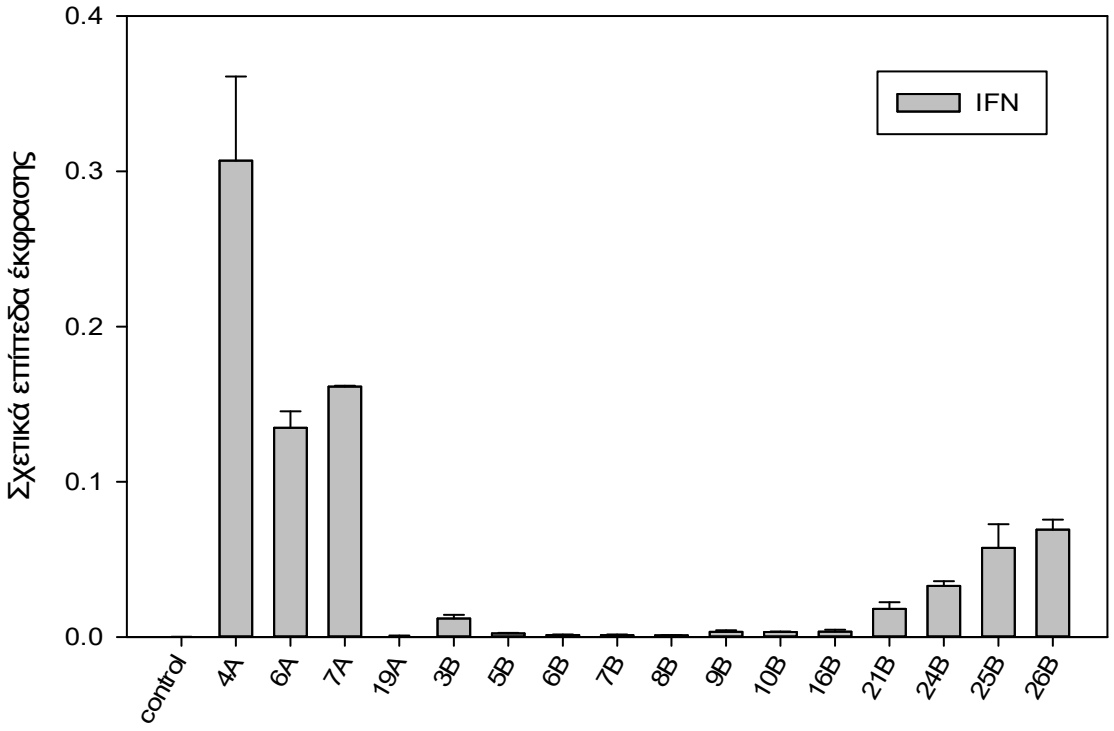
Στην Εικόνα 3.35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου της απόδοσης των εκκινητών για την αντίδραση της qPCR. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα, τα προϊόντα που προέκυψαν ήταν ειδικά για την εκάστοτε αντίδραση, με τις ζώνες να εμφανίζονται στο αναμενόμενο μέγεθος και χωρίς την εμφάνιση παραπροϊόντων. Με βάση την απόδοση της αντίδρασης qPCR έγινε επιλογή των ζευγών εκκινητών IFN F3-R1 και CBLP F1-R1. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η έκφραση των γονιδίων *ifn* και *cblp*.

Οι αποικίες 1Α και 8Α δεν επετεύχθη να ανακαλλιεργηθούν έως τη διαδικασία της qPCR. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα, όπου τα επίπεδα έκφρασης της ιντερφερόνης εμφανίζονται κανονικοποιημένα σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου *cblp*, ενώ ενδεικτικά παρουσιάζονται οι καμπύλες πολλαπλασιασμού του γονιδίου *ifn α2b* της αποικίας 4Α και του ενδογενούς γονιδίου σταθερής έκφρασης *cblp* (Εικόνα 3.36 Α και Β).



Εικόνα 3.36 Α

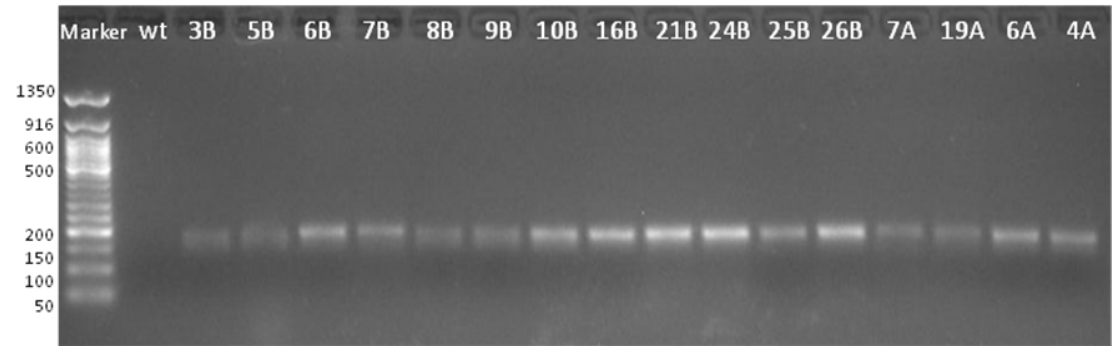
Καμπύλες πολλαπλασιασμού (amplification curves) του γονιδίου *ifn α2b* της αποικίας 4Α και του ενδογενούς γονιδίου σταθερής έκφρασης *cblp*. Εμφανίζονται 2 τεχνικές επαναλήψεις.



Εικόνα 3.36 Β
Αποτελέσματα της RT-qPCR ανάλυσης. Οι αποικίες 4Α, 6Α και 7Α φάνηκε να έχουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ιντερφερόνης. Τα επίπεδα έκφρασης της *ifn α2b* κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *cblp*.

Στην Εικόνα 3.36 Β φαίνονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των αποικιών, σε σχέση με την έκφραση του ενδογενούς γονιδίου *cblp*. Με τη μέθοδο qPCR ανιχνεύτηκαν και άλλες αποικίες που εξέφραζαν το γονίδιο της ιντερφερόνης σε χαμηλότερα επίπεδα. Η αποικία 4Α παρουσίασε τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης ιντερφερόνης, ωστόσο αξιόλογα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν και οι αποικίες 6Α και 7Α. Τέλος, οι αποικίες 25Β και 26Β, φάνηκε επίσης ότι εξέφραζαν την IFNα2b, σε χαμηλά επίπεδα.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της αντίδρασης RT-qPCR υπέστησαν ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) για να ελεγχθεί το μέγεθος του παραγόμενου προϊόντος (Εικόνα 3.37).



Εικόνα 3.37
Στήλη 1: 50bp ladder Biolabs
Στήλες 2-18 : Προϊόντα της real-time PCR (με το ζεύγος εκκινητών IFN F3-R1) των μετασχηματισμένων αποικιών και του αγρίου τύπου (wt) για τον έλεγχο έκφρασης της ιντερφερόνης.

Συμπερασματικά, προέκυψαν τουλάχιστον τρεις αποικίες οι οποίες φάνηκε ότι εξέφραζαν το γονίδιο της *ifn* από τον πυρήνα του *C.reinhardtii* σε ικανοποιητικά επίπεδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μικροφύκη είναι μια πολυποίκιλη ομάδα φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών με σημαντικές βιοτεχνολογικές δυνατότητες. Τα τελευταία χρόνια, τα μικροφύκη έχουν κερδίσει την προσοχή ως πιθανά συστήματα έκφρασης φαρμακευτικών και βιοτεχνολογικών πρωτεϊνών. Το χλωροφύκος *C.reinhardtii,* όντας το φύκος-πρότυπο για μοριακές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες για πάνω από 60 χρόνια, διαθέτει την πιο εξελιγμένη μοριακή και γενετική εργαλειοθήκη ανάμεσα στα μικροφύκη. Μερικά από τα πλεονεκτήματά του είναι η γρήγορη ανάπτυξη, η ευκολία στο χειρισμό, η δυνατότητα αύξησης της κλίμακας παραγωγής σε βιοαντιδραστήρες, το χαμηλό κόστος καλλιέργειας και το γεγονός ότι θεωρείται ένας ασφαλής μικροοργανισμός (GRAS). Επιπλέον, η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα του *C.reinhardtii* περιλαμβάνει τα πλεονεκτήματα των ευκαρυωτικών συστημάτων έκφρασης, όπως η επαγόμενη έκφραση του διαγονιδίου, η αποτελεσματική αναδίπλωση σύνθετων πρωτεϊνών, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η έκκριση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η ανθρώπινη ιντερφερόνη IFNα2b, από την άλλη, είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αντιικός παράγοντας, ο οποίος παράγεται στη βιομηχανία έως σήμερα από το βακτήριο *E.coli*. Ως προκαρυώτης, η *E.coli* δεν έχει την ικανότητα να γλυκοσυλιώσει την ιντερφερόνη και να της προσδώσει τη φυσική της διαμόρφωση, με αποτέλεσμα η ιντερφερόνη να γλυκοσυλιώνεται *in vitro* (προσθήκη πολυαιθυλενο-γλυκόλης) προκειμένου να έχει τον απαιτούμενο χρόνο ημιζωής στο αίμα των ασθενών. Έχει γίνει πλήθος προσπαθειών παραγωγής της από άλλα συστήματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, χωρίς όμως επιτυχία σε επίπεδο ανταγωνιστικότητας παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη εύρεσης άλλων συστημάτων έκφρασης για μια τόσο σημαντική θεραπευτική πρωτεΐνη.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η έκφραση της ανθρώπινης IFNα2b από τον πυρήνα του *C.reinhardtii.* Το μικροφύκος συνδέει τα πλεονεκτήματα της ευκαρυωτικής έκφρασης με τις δυνατότητες αύξησης της κλίμακας παραγωγής ως φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός. Επίσης, η IFNα2b αναμένεται να γλυκοσυλιωθεί από το *C.reinhardtii,* καθώς το ίδιο πραγματοποιεί Ο-γλυκοσυλίωση για τις ενδογενείς πρωτεΐνες του κυτταρικού του τοιχώματος (Bollig, Lamshöft et al. 2007). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια έκφρασης ιντερφερόνης από τον πυρήνα του *C.reinhardtii.*

Η υλοποίηση του στόχου περιελάμβανε αφενός τη βελτιστοποίηση και την κλωνοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ανθρώπινης ιντερφερόνης σε κατάλληλο φορέα έκφρασης για το φύκος και αφετέρου την καλλιέργεια, το μετασχηματισμό του *C.reinhardtii* και τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της ιντερφερόνης.

Το πρώτο σκέλος του στόχου ολοκληρώθηκε με επιτυχία ως προς το κατασκευαστικό του τμήμα και αναμένεται η αξιολόγησή του με βάση την έκφραση της ιντερφερόνης και τον εντοπισμό της στον περιπλασμικό χώρο του φύκους. Επιπλέον, ο σχεδιασμός του τελικού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης εξασφαλίζει τη δυνατότητα αντικατάστασης του γονιδίου της ιντερφερόνης με οποιοδήποτε άλλο

επιθυμητό γονίδιο, χωρίς να είναι ανάγκη να συντεθεί εκ νέου η 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή. Όσον αφορά στο δεύτερο σκέλος, η καλλιέργεια του *C.reinhardtii* επετεύχθη με επιτυχία για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο εργαστήριο, ενώ για το μετασχηματισμό απαιτήθηκε να αναπτυχθεί καινούριο πρωτόκολλο. Επιπλέον, υπάρχουσες τεχνολογίες (colony PCR, χρήση TRI Reagent για απομόνωση RNA) ελέγχθηκαν για την καταλληλότητα της εφαρμογής τους και όπου απαιτήθηκε πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση.

Από την παρούσα εργασία αποκτήθηκαν τρεις αποικίες των οποίων τα επίπεδα του mRNA που αντιστοιχούν στην έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης ήταν συγκρίσιμα με τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς (*cblp*). Επιπλέον, για μια από αυτές τις αποικίες και για διάστημα 6 μηνών, ελέγχθηκε η έκφραση του mRNA της ιντερφερόνης, και δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα σίγησης (Εικόνα 3.29 και Εικόνα 3.30).

Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε αντίστοιχα με τις τρεις επιτυχημένες μελέτες έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση πυρηνικής έκφρασης από το *C.reinhardtii.* Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν: α) μια ξυλανάση (Rasala, Lee et al. 2012), β) μια ice-binding protein (Lauersen, Vanderveer et al. 2013) και γ) η ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (Eichler-Stahlberg, Weisheit et al. 2009).

Πιο συγκεκριμένα, και στις τρεις μελέτες έγινε βελτιστοποίηση των κωδικονίων των αλληλουχιών προς έκφραση, σύμφωνα με την προτίμηση του *C.reinhardtii*. Όσον αφορά στις ρυθμιστικές αλληλουχίες, στην περίπτωση της ξυλανάσης και της ανθρώπινης ερυθροποιητίνης χρησιμοποιήθηκε ο υβριδικός υποκινητής Hsp70A/RbcS2, το πρώτο εσώνιο του γονιδίου *rbcS2* εντός της 5' μη-μεταφραζόμενης περιοχής, καθώς και η 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *rbcS2,* όπως και στην παρούσα εργασία. Επίσης, στην περίπτωση της ξυλανάσης χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο οδηγός του γονιδίου *ars1* της αρυλσουλφατάσης του *C.reinhardtii* για έκκριση στο υλικό καλλιέργειας, όπως και στην παρούσα εργασία, ενώ στην περίπτωση της ανθρώπινης ερυθροποιητίνης χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο οδηγός του γονιδίου *ars2* της αρυλσουλφατάσης του *C.reinhardtii.* Και στις δύο μελέτες οι πρωτεΐνες εκκρίθηκαν με επιτυχία στο υλικό καλλιέργειας, αφού αναγνωρίστηκε και αφαιρέθηκε το εκάστοτε πεπτίδιο οδηγός. Ωστόσο, αν και δε μελετήθηκαν εκτενώς οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, η ξυλανάση και η ice-binding protein που παρήχθησαν από το *C.reinhardtii* βρέθηκαν να είναι λειτουργικές.

Τα βήματα που στη συνέχεια πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να αξιολογηθεί το σύστημα του *C.reinhardtii* ως προς την παραγωγή της ιντερφερόνης είναι ο έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης και η αποκοπή του πεπτιδίου οδηγού (με ανοσοστύπωση τύπου western), ο υποκυτταρικός εντοπισμός της (*in situ* υβριδισμός), οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που φέρει η πρωτεΐνη (mass spectrometry), καθώς και η ενεργότητά της (interferon activity assay).

Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *C.reinhardtii* που φέρει ελαττωματικό κυτταρικό τοίχωμα (cell wall deficient mutant), ώστε να είναι δυνατή η έκλουση της ιντερφερόνης στο υλικό καλλιέργειας και η απομόνωσή της από αυτό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Για το θρεπτικό υλικό TAP παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα τρία αρχικά διαλύματα (stock solutions): 1) TAP-salts, 2) Phosphate solution και 3) Hutner's trace elements solution. Συγκεκριμένα για το διάλυμα Hutner's, ακολουθήθηκε ειδική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού TAP φαίνεται στον Πίνακα 1. Η ρύθμιση του pH (6.5-6.8), έγινε με την προσθήκη οξικού οξέος. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού TAP προστέθηκε άγαρ (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) σε συγκέντρωση 15g/l. Μετά την παρασκευή του, το θρεπτικό υλικό TAP αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 1 Η σύσταση του θρεπτικού υλικού TAP

Διαλύματα	**Όγκος**	**Συστατικά**	**Συγκέντρωση**
Tris base		$H_2NC(CH_2OH)_3$	2.42 g/L
TAP-salts	25ml	NH_4Cl	15.00 g/L
		$MgSO_4 *7H_2O$	4.00 g/L
		$CaCl_2 *2H_2O$	2.00 g/L
Phosphate solution	1ml	K_2HPO_4	28.80 g/100ml
		KH_2PO_4	14.40 g/100ml
Hutner's trace elements solution	1ml	$Na_2EDTA *2 H_2O$	5.00 g/100ml
		$ZnSO_4 *7H_2O$	2.20 g/100ml
		H_3BO_3	1.14 g/100ml
		$MnCl_2 *4H_2O$	0.50 g/100ml
		$FeSO_4 *7H_2O$	0.50 g/100ml
		$CoCl_2 *6H_2O$	0.16 g/100ml
		$CuSO_4 *5H_2O$	0.16 g/100ml
		$(NH_4)_6Mo_7O_{24} *4H_2O$	0.11 g/100ml
Glacial acetic acid	1ml	$C_2H_4O_2$	
Total	1L		

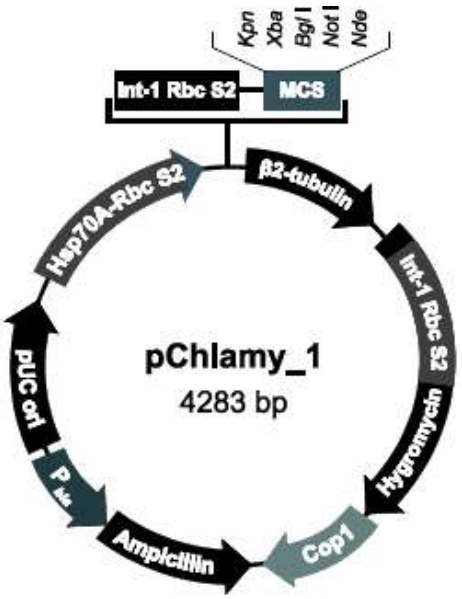
Το διάλυμα Hutner's παρασκευάστηκε ως εξής: αρχικά παρασκευάστηκαν χωριστά τα διαλύματα των αλάτων, το διάλυμα του θειικού σιδήρου απαιτείται να είναι φρέσκο κάθε φορά. Στη συνέχεια, θερμάνθηκαν σε θερμοκρασία ≥ 80 ºC και ακολούθησε ανάμιξη όλων των διαλυμάτων, εκτός του EDTA. Πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH του EDTA με τη χρήση διαλύματος KOH, ώστε να αποκτήσει pH

6.5-6.8, στη συνέχεια προστέθηκε στο μίγμα των αλάτων, και ακολούθησε ρύθμιση του pH του τελικού διαλύματος σε τιμή 6.5-6.8. Το διάλυμα σε αυτό το σημείο έπρεπε να έχει χρώμα πράσινο ανοικτό. Το διάλυμα επωάστηκε για 1-2 εβδομάδες στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, ανακινώντας το μια φορά την ημέρα, έως ότου αποκτήσει μωβ χρώμα. Στη συνέχεια αποστειρώθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 ºC.

Πίνακας 2 Τα προτιμώμενα κωδικόνια για κάθε αμινοξύ με φθίνουσα σειρά, στον πυρήνα και το χλωροπλάστη του *C.reinhardtii*.

Αμινοξέα	**Κωδικόνια πυρήνα**	**Κωδικόνια χλωροπλάστη**
Gly (G)	GGC	GGT
	GGG	GGA
	GGT	GGC
	GGA	GGG
Glu (E)	GAG	GAA
	GAA	GAG
Asp (D)	GAC	GAT
	GAT	GAC
Val (V)	GTG	GTT
	GTC	GTA
	GTT	GTG
	GTA	GTC
Ala (A)	GCC	GCT
	GCG	GCA
	GCT	GCC
	GCA	GCG
Arg (R)	CGC	CGT
	CGG	AGA
	CGT	CGC
	AGG	CGA
	CGA	AGG
	AGA	CGG
Gln (Q)	CAG	CAA
	CAA	CAG
Ser (S)	AGC	TCA
	TCG	TCT
	TCC	AGT
	TCT	AGC
	TCA	TCG
	AGT	TCC
His (H)	CAC	CAT
	CAT	CAC
Lys (K)	AAG	AAA
	AAA	AAG
Asn (N)	AAC	AAT

	AAT	AAC
Met (M)	ATG	ATG
Ile (I)	ATC	ATT
	ATT	ATC
	ATA	ATA
Thr (T)	ACC	ACA
	ACG	ACT
	ACT	ACC
	ACA	ACG
Trp (W)	TGG	TGG
Cys (C)	TGC	TGT
	TGT	TGC
Tyr (Y)	TAC	TAT
	TAT	TAC
Leu (L)	CTG	TTA
	CTC	CTT
	CTT	CTA
	TTG	CTG
	CTA	TTG
	TTA	CTC
Phe (F)	TTC	TTT
	TTT	TTC
Pro (P)	CCC	CCA
	CCG	CCT
	CCT	CCC
	CCA	CCG
End	TAA	TAA
	TGA	TAG
	TAG	TGA



Features of pChlamy_1
4283 nucleotides

Ampicillin resistance gene (*bla*):	199–1059 (c)*
bla promoter:	1060–1111 (c)
pUC origin:	1157–1830
Hsp70A-Rbc S2:	1950–2445
Intron-1 Rbc S2:	2454–2598
Multiple cloning site:	2608–2650
β2-tubulin promoter:	2660–2972
Hygromycin resistance (*aph7*):	2973–4119
Intron-1 Rbc S2:	3060–3204
Cop1:	4120–4283

*(c): complementary strand

Εικόνα 1 Ο χάρτης του πλασμιδίου pChlamy_1 Vector. Στην εικόνα παρουσιάζονται ο υβριδικός υποκινητής (Hsp70A-RbcS2), ο οποίος υποστηρίζει συνεχή έκφραση της επιθυμητής αλληλουχίας, ακολουθεί το εσώνιο (Intron-1 RbcS2), το οποίο συμβάλλει στην καλύτερη έκφραση του επιθυμητού γονιδίου, πριν την περιοχή με θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού (multiple cloning site), όπου θα κλωνοποιηθεί το επιθυμητό γονίδιο. Στη συνέχεια, ακολουθούν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη Β (*aph7*), στο οποίο περιέχεται ένα ακόμη εσώνιο (Intron-1 RbcS2), υπό τον έλεγχο του υποκινητή της β2-τουμπουλίνης (β2- tubulin), για επιλογή στο *C.reinhardtii.* Το στοιχείο *cop1* αντιστοιχεί στην 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της χλαμυοψίνης (chlamyopsin gene, *cop*), το οποίο κωδικοποιεί για την πιο άφθονη πρωτεΐνη του eyespot του *C.reinhardtii*. Ακολουθεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη (*bla*) με τον υποκινητή του (bla promoter) για επιλογή στην *E.coli*, και η θέση έναρξης της πλασμιδιακής αντιγραφής προερχόμενη από το πλασμίδιο pUC (pUC origin) για πολλαπλασιασμό στην *E.coli*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adolf, G. R., I. Kalsner, et al. (1991). "Natural human interferon-alpha 2 is O-glycosylated." Biochemical Journal **276**(Pt 2): 511-518.

2. Arazi, T., S. G. Slutsky, et al. (2001). "Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits." Journal of Biotechnology **87**(1): 67-82.

3. Arlen, P. A., R. Falconer, et al. (2007). "Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-α2b." Plant biotechnology journal **5**(4): 511-525.

4. Asmana Ningrum, R. (2014). "Human Interferon Alpha-2b: A Therapeutic Protein for Cancer Treatment." Scientifica **2014**: 8.

5. Ayed, A., I. Rabhi, et al. (2008). "High level production and purification of human interferon α2b in high cell density culture of Pichia pastoris." Enzyme and Microbial Technology **42**(2): 173-180.

6. Berthold, P., R. Schmitt, et al. (2002). "An Engineered Streptomyces hygroscopicus aph 7″ Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii." Protist **153**(4): 401-412.

7. Bollig, K., M. Lamshöft, et al. (2007). "Structural analysis of linear hydroxyproline-bound O-glycans of Chlamydomonas reinhardtii—conservation of the inner core in Chlamydomonas and land plants." Carbohydrate Research **342**(17): 2557-2566.

8. Ceaglio, N., M. Etcheverrigaray, et al. (2010). "Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate." Journal of Biotechnology **146**(1–2): 74-83.

9. Çelik, E. and P. Çalık (2012). "Production of recombinant proteins by yeast cells." Biotechnology Advances **30**(5): 1108-1118.

10. Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris.

11. Chang, C.-W., J. L. Moseley, et al. (2005). "The LPB1 Gene Is Important for Acclimation of Chlamydomonas reinhardtii to Phosphorus and Sulfur Deprivation." Plant Physiology **138**(1): 319-329.

12. Cordero, B. F., I. Couso, et al. (2011). "Enhancement of carotenoids biosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from Chlorella zofingiensis." Applied Microbiology and Biotechnology **91**(2): 341-351.

13. Díaz, M. O., H. M. Pomykala, et al. (1994). "Structure of the Human Type-I Interferon Gene Cluster Determined from a YAC Clone Contig." Genomics **22**(3): 540-552.

14. Eichler-Stahlberg, A., W. Weisheit, et al. (2009). "Strategies to facilitate transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii." Planta **229**(4): 873-883.

15. Fensterl, V. and G. C. Sen (2009). "Interferons and viral infections." BioFactors **35**(1): 14-20.

16. Fischer, N. and J. D. Rochaix (2001). "The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Molecular Genetics and Genomics **265**(5): 888-894.

17. Franklin, S., B. Ngo, et al. (2002). "Development of a GFP reporter gene for Chlamydomonas reinhardtii chloroplast." The Plant Journal **30**(6): 733-744.

18. Fuhrmann, M., W. Oertel, et al. (1999). "A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in Chlamydomonas reinhardtii†." The Plant Journal **19**(3): 353-361.

19. Gasmi, N., F. Fudalej, et al. (2011). "A molecular approach to optimize hIFN α2b expression and secretion in Yarrowia lipolytica." Applied Microbiology and Biotechnology **89**(1): 109-119.

20. Ghosalkar, A., V. Sahai, et al. (2008). "Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant Pichia pastoris using three different secretion signals." Protein Expression and Purification **60**(2): 103-109.

21. Goldschmidt-Clermont, M. (1986). "The two genes for the small subunit of RuBP Carboxylase/oxygenase are closely linked in Chlamydomonas reinhardtii." Plant Molecular Biology **6**(1): 13-21.

22. Gorman, D. S. and R. P. Levine (1965). "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardi." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **54**(6): 1665-1669.

23. Griesbeck, C., I. Kobl, et al. (2006). "Chlamydomonas reinhardtii." Molecular Biotechnology **34**(2): 213-223.

24. Harris, E. H. (2001). "CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**(1): 363-406.

25. Hermant, P. and T. Michiels (2014). "Interferon-λ in the Context of Viral Infections: Production, Response and Therapeutic Implications." Journal of Innate Immunity **6**(5): 563-574.

26. Hostos et al. (1988). "Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from Chlamydomonas reinhardtii." The Journal of Cell Biology **106**(1): 29-37.

27. Huang, Y.-S., Z. Chen, et al. (2007). "Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon-α2b fusion protein expressed in Pichia pastoris." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **67**(2): 301-308.

28. Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). Virus Interference. I. The Interferon.

29. Jeon, K., A. Suresh, et al. (2013). "Highly efficient molecular delivery into Chlamydomonas reinhardtii by electroporation." Korean Journal of Chemical Engineering **30**(8): 1626-1630.

30. Joseph Sambrook, E. F. F., Tom Maniatis, , Ed. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

31. Kakeshita, H., Y. Kageyama, et al. (2011). "Propeptide of Bacillus subtilis amylase enhances extracellular production of human interferon-α in Bacillus subtilis." Applied Microbiology and Biotechnology **89**(5): 1509-1517.

32. Kindle, K. L. (1990). "High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(3): 1228-1232.

33. Koop, H.-U., S. Herz, et al. (2007). The genetic transformation of plastids. Cell and Molecular Biology of Plastids. R. Bock, Springer Berlin Heidelberg. **19:** 457-510.

34. Kotenko, S. V., G. Gallagher, et al. (2003). "IFN-[lambda]s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.

35. Kumar, S. V., R. W. Misquitta, et al. (2004). "Genetic transformation of the green alga—Chlamydomonas reinhardtii by Agrobacterium tumefaciens." Plant Science **166**(3): 731-738.

36. Labadorf, A., A. Link, et al. (2010). "Genome-wide analysis of alternative splicing in Chlamydomonas reinhardtii." BMC Genomics **11**: 114-114.

37. Lauersen, K., T. Vanderveer, et al. (2013). "Ice recrystallization inhibition mediated by a nuclear-expressed and -secreted recombinant ice-binding protein in the microalga Chlamydomonas reinhardtii." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(22): 9763-9772.

38. Lauersen, K. J., H. Berger, et al. (2013). "Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in Chlamydomonas reinhardtii." Journal of Biotechnology **167**(2): 101-110.

39. León, R. and E. Fernández (2007). Nuclear Transformation of Eukaryotic Microalgae. Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. R. León, A. Galván and E. Fernández, Springer New York. **616:** 1-11.

40. Levy, D. E., I. J. Marié, et al. (2011). "Induction and Function of Type I and III Interferon in Response to Viral Infection." Current opinion in virology **1**(6): 476-486.

41. Li, H., Q. Liu, et al. (2013). "Expression of biologically active human interferon alpha 2b in the milk of transgenic mice." Transgenic Research **22**(1): 169-178.

42. Lin, H., A. L. Kwan, et al. (2010). "Synthesizing and Salvaging NAD⁺: Lessons Learned from <italic>Chlamydomonas reinhardtii</italic>." PLoS Genet **6**(9): e1001105.

43. Liu, Y.-J. (2005). "IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors." Annual Review of Immunology **23**(1): 275-306.

44. Luchakivskaya, Y., O. Kishchenko, et al. (2011). "High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (Daucus carota L.) plants." Plant Cell Reports **30**(3): 407-415.

45. Luchakivskaya, Y. S., Z. M. Olevinskaya, et al. (2012). "Obtaining of hairy-root, callus and suspenison cell cultures of carrot (Daucus carota L.) able to accumulate human interferon alpha-2b." Cytology and Genetics **46**(1): 15-20.

46. Lumbreras, V., D. R. Stevens, et al. (1998). "Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron." The Plant Journal **14**(4): 441-447.

47. Malmgaard, L. (2004). Journal of Interferon & Cytokine Research **24**(8): 439-454.

48. Mamedov, T. and V. Yusibov (2011). "Green algae Chlamydomonas reinhardtii possess endogenous sialylated N-glycans." FEBS Open Bio **1**: 15-22.

49. Mathieu-Rivet, E., M.-C. Kiefer-Meyer, et al. (2014). "Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals." Frontiers in Plant Science **5**: 359.

50. Mayfield, S. P. and J. Schultz (2004). "Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for Chlamydomonas reinhardtii chloroplast." The Plant Journal **37**(3): 449-458.

51. McKenna, K., A.-S. Beignon, et al. (2005). "Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity." Journal of Virology **79**(1): 17-27.

52. Meslet-Cladière, L. and O. Vallon (2011). "Novel Shuttle Markers for Nuclear Transformation of the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii." Eukaryotic Cell **10**(12): 1670-1678.

53. Neupert, J., D. Karcher, et al. (2009). "Generation of Chlamydomonas strains that efficiently express nuclear transgenes." The Plant Journal **57**(6): 1140-1150.

54. Ohya, K., T. Matsumura, et al. (2001). "Expression of Two Subtypes of Human IFN-α in Transgenic Potato Plants." Journal of Interferon & Cytokine Research **21**(8): 595-602.

55. Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunological Reviews **202**(1): 8-32.

56. Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-386.

57. Pootakham, W., D. Gonzalez-Ballester, et al. (2010). "Identification and Regulation of Plasma Membrane Sulfate Transporters in Chlamydomonas." Plant Physiology **153**(4): 1653-1668.

58. Rabhi-Essafi, I., A. Sadok, et al. (2007). "A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon α as a GST-fusion protein in E.coli." Protein Engineering Design and Selection **20**(5): 201-209.

59. Rasala, B. and S. Mayfield (2015). "Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses." Photosynthesis Research **123**(3): 227-239.

60. Rasala, B. A., P. A. Lee, et al. (2012). "Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in Chlamydomonas reinhardtii by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide." PLoS ONE **7**(8): e43349.

61. Rasala, B. A. and S. P. Mayfield (2011). "The microalga Chlamydomonas reinhardtii as a platform for the production of human protein therapeutics." Bioengineered Bugs **2**(1): 50-54.

62. Rasala, B. A., M. Muto, et al. (2010). "Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii." Plant biotechnology journal **8**(6): 719-733.

63. Retnoningrum, D. S., R. A. Ningrum, et al. (2010). "Construction of synthetic open reading frame encoding human interferon alpha 2b for high expression in Escherichia coli and characterization of its gene product." Journal of Biotechnology **145**(2): 193-198.

64. Rosenberg, J. N., G. A. Oyler, et al. (2008). "A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution." Current Opinion in Biotechnology **19**(5): 430-436.

65. Rossmann, C., N. Sharp, et al. (1996). "Expression and Purification of Recombinant, Glycosylated Human Interferon Alpha 2b in Murine Myeloma NSo Cells." Protein Expression and Purification **7**(4): 335-342.

66. Salunkhe, S., S. Soorapaneni, et al. (2010). "Strategies to maximize expression of rightly processed human interferon α2b in Pichia pastoris." Protein Expression and Purification **71**(2): 139-146.

67. Schroda, M., C. F. Beck, et al. (2002). "Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in Chlamydomonas." The Plant Journal **31**(4): 445-455.

68. Schroda, M., D. Blöcker, et al. (2000). "The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas." The Plant Journal **21**(2): 121-131.

69. Shao, N. and R. Bock (2008). "A codon-optimized luciferase from Gaussia princeps facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga Chlamydomonas reinhardtii." Current Genetics **53**(6): 381-388.

70. Shi, L., D. Wang, et al. (2007). "Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris." Protein Expression and Purification **54**(2): 220-226.

71. Shimogawara, K., S. Fujiwara, et al. (1998). "High-Efficiency Transformation of Chlamydomonas reinhardtii by Electroporation." Genetics **148**(4): 1821-1828.

72. Srivastava, P., P. Bhattacharaya, et al. (2005). "Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in Escherichia coli." Protein Expression and Purification **41**(2): 313-322.

73. Sugyiama, K., H. Ahorn, et al. (1993). "Expression of human interferon-α2 in Sf9 cells." European Journal of Biochemistry **217**(3): 921-927.

74. Tan, J. S., R. N. Ramanan, et al. (2011). "Enhanced production of periplasmic interferon alpha-2b by Escherichia coli using ion-exchange resin for in situ removal of acetate in the culture." Biochemical Engineering Journal **58–59**(0): 124-132.

75. Tran, M., C. Van, et al. (2013). "Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(1): E15–E22.

76. Uematsu, S. and S. Akira (2007). "Toll-like Receptors and Type I Interferons." Journal of Biological Chemistry **282**(21): 15319-15323.

77. Valente, C. A., D. M. F. Prazeres, et al. (2004). "Translational Features of Human Alpha 2b Interferon Production in Escherichia coli." Applied and Environmental Microbiology **70**(8): 5033-5036.

78. Vallin, C., E. Pimienta, et al. (2005). "Streptomyces as a host for the secretion of heterologous proteins for the production of biopharmaceuticals." Journal of Business Chemistry **2**(3): 107-111.

79. Vejrazka, C., M. Janssen, et al. (2011). "Photosynthetic efficiency of Chlamydomonas reinhardtii in flashing light." Biotechnology and Bioengineering **108**(12): 2905-2913.

80. Voss, T., E. Falkner, et al. (1994). "Periplasmic expression of human interferon-alpha 2c in Escherichia coli results in a correctly folded molecule." Biochemical Journal **298**(Pt 3): 719-725.

81. Wang, Y.-S., S. Youngster, et al. (2002). "Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications." Advanced Drug Delivery Reviews **54**(4): 547-570.

82. Wu, D., D. Ma, et al. (2010). "Incomplete formation of intramolecular disulfide bond triggers degradation and aggregation of human consensus interferon-α mutant by Pichia pastoris." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(6): 1759-1767.

83. Wu, J., Z. Hu, et al. (2008). "Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by a chimeric promoter in Chlamydomonas reinhardtii." Chinese Journal of Oceanology and Limnology **26**(3): 242-247.

84. Zhang, Q., J. Zhong, et al. (2010). "Improvement of human interferon alpha secretion by Lactococcus lactis." Biotechnology Letters **32**(9): 1271-1277.

85. Zhu, Z., K. Hughes, et al. (1994). "Expression of human α-interferon cDNA in transgenic rice plants." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **36**(2): 197-204.

86. Zschoernig, M. H. a. B. (2007). "Construction of modular tandem expression vectors for the green alga Chlamydomonas reinhardtii using the Cre/lox-system." BioTechniques **43**(3): 324, 326, 328