



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

«Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός μίας λακκάσης του θερμόφιλου μύκητα  
*Myceliophthora thermophila* – χρήση της σε εφαρμογές βιοτεχνολογικού  
ενδιαφέροντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μάνος Νικόλαος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Επ. Καθηγητής, τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΤΟΠΑΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ, Επ. Καθηγητής, τμήμα Χημικών Μηχανικών,  
ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2015

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία αποτελεί το εργαστηριακό μέρος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία» του Βιολογικού τμήματος (ΕΚΠΑ) το οποίο διεξάγεται από τους: Α.Δ.Καραγκούνη (Καθηγήτρια), Γ.Διαλλίνας (Καθηγητής) και Δ.Χατζηνικολάου (Επ.Καθηγητής). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών (ΕΜΠ) υπό την επίβλεψη του Ε.Τόπακα (Επ. Καθηγητής).

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγήτρια Α.Δ. ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ

Καθηγητής Γ. ΔΙΑΛΛΙΝΑΣ

Επ. Καθηγητής Δ. ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λακκάσες (EC 1.10.3.2) αποτελούν μία οικογένεια οξειδοαναγωγικών ενζύμων τα οποία καταλύουν την οξείδωση αρωματικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Λόγω των ιδιοτήτων τους όπως η χημική σταθερότητα, η ικανότητα κατάλυσης αναβολικών και καταβολικών διεργασιών αλλά και η οικολογική φύση της αντίδρασης παρουσιάζουν μεγάλο εύρος εφαρμογών στη βιοτεχνολογία. Ο *Myceliophthora thermophila* είναι ένας θερμοφίλος μύκητας ο οποίος αποικοδομεί ταχύτατα την κυτταρινούχο βιομάζα, γεγονός που οφείλεται στα ισχυρά ενζυμικά συστήματα που διαθέτει (ενδογλουκανάσες, εξωγλουκανάσες, λακκάσες, ξυλανάσες κλπ.). Ο συγκεκριμένος μύκητας έχει μεγάλη σημασία για τη βιοτεχνολογία διότι από αυτόν έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων που βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια ετερόλογης έκφρασης μίας λακκάσης του *Myceliophthora thermophila* χρησιμοποιώντας το σύστημα της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris*. Το γονίδιο που επιλέχτηκε προς ανάλυση είχε συνολικό μέγεθος 2093 ζ.β. και οργανώνεται σε 3 εξόνια μεγέθους 258, 1498, 197 ζ.β. τα οποία διακόπτονται από 2 ιντρόνια μεγέθους 58 και 82 ζ.β. Η αφαίρεση των ιντρονίων έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR. Ακολούθησε ενσωμάτωση του γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης και μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης *Pichia pastoris*. Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε από την ετερόλογη έκφραση στα κύτταρα της ζύμης εξετάστηκε για την ικανότητα οξείδωσης του χημικού μορίου ABTS και του ασκορβικού οξέος. Στον τομέα των βιοτεχνολογικών εφαρμογών επιλέχθηκε η χρήση της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila* για τον πολυμερισμό ορισμένων αρωματικών ενώσεων. Εξετάστηκε το σύνολο των παραγόντων που επηρεάζουν την αντίδραση όπως η αναλογία ενζύμου-υποστρώματος, η θερμοκρασία, το pH και ο χρόνος. Η αξιολόγηση των πολυμερών έγινε με λήψη φασμάτων στο ορατό-υπεριώδες αλλά και λήψη φασμάτων στο υπέρυθρο.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b><u>1.Εισαγωγή</u></b> .....	7
1.1 Ο θερμόφιλος μύκητας <i>Myceliophthora thermophila</i> ( <i>Sporotrichum thermophile</i> )....	9
1.2 Λακκάσες – Λειτουργία και δομή .....	10
1.3 Εφαρμογές των λακκασών στη βιοτεχνολογία.....	12
1.3.1 Επεξεργασία χρωστικών .....	13
1.3.2 Διεργασίες βιοεξυγείανσης.....	13
1.3.3 Χημικές μετατροπές για τρόφιμα και φάρμακα.....	14
1.3.4 Δημιουργία πολυμερών με ξεχωριστές ιδιότητες.....	14
1.4 Ετερόλογη έκφραση λακκασών: Το σύστημα της <i>Pichia pastoris</i> .....	16
1.4.1 Η ζύμη <i>Pichia pastoris</i> .....	16
1.4.2 Μεταβολισμός της μεθανόλης από την <i>Pichia pastoris</i> , ο υποκινητής AOX1...	17
1.4.3 Ετερόλογη έκφραση στην <i>Pichia pastoris</i> .....	18
Στόχος της δυπλωματικής εργασίας.....	20
<b><u>2.Υλικά και μέθοδοι</u></b> .....	22
2.1 Μικροοργανισμοί.....	23
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	23
2.2.1 Ανάπτυξη του μύκητα <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	23
2.2.2 Ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.2.3 Ανάπτυξη της μεθυλότροφης ζύμης <i>Pichia pastoris</i> .....	24
2.3 Προετοιμασία των επιδεκτικών προς μετασχηματισμό κυττάρων.....	25
2.3.1. Επιδεκτικά κύτταρα <i>Escherichia coli</i> Top10.....	26
2.3.2. Επιδεκτικά κύτταρα <i>Pichia pastoris</i> (x33).....	26
2.4 Μοριακές μέθοδοι.....	27
2.4.1 Απομόνωση ολικού DNA από τον μύκητα <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	27
2.4.2 Ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 - Η μέθοδος της επικαλυπτόμενης PCR...	27
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
2.4.4 Απομόνωση ζώνης (τμήματος DNA) από πήκτωμα αγαρόζης.....	31
2.4.5 Συνένωση μορίων DNA με την T4 λιγάση (ligation).....	32
2.4.5.1 pCR® Blunt (Invitrogen).....	33
2.4.5.2 pPICZα A,B,C (Invitrogen).....	34
2.4.6 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού.....	35
2.4.7 Μέθοδοι μετασχηματισμού επιδεκτικών κυττάρων.....	37
2.4.7.1 Μετασχηματισμός μέσω θερμικής καταπόνησης (Heat shock).....	37

2.4.7.2 Μετασηματισμός μέσω ηλεκτροδιάτρησης (Electroporation).....	37
2.4.8 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> - Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA.....	38
2.5 Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών.....	38
2.5.1 Απομόνωση της παραγόμενης πρωτεΐνης από καλλιέργειες της <i>Pichia</i> <i>pastoris</i> .....	39
2.5.2 Συμπύκνωση και εξισορρόπηση της πρωτεΐνης.....	39
2.5.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου.....	40
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	41
2.5.4.1 Εμφάνιση των πρωτεϊνών με την Coomassie Blue G-250.....	42
2.5.4.2 Εμφάνιση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver staining).....	42
2.5.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	43
2.6 Δοκιμές ενζυμικής ενεργότητας.....	43
2.6.1 Εκτίμηση ενζυμικής ενεργότητας με το υπόστρωμα ABTS.....	43
2.6.2 Δοκιμή ενζυμικής ενεργότητας σε υπόστρωμα ασκορβικού οξέος.....	45
2.7 Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	46
2.7.1 Λήψη φασμάτων στο υπεριώδες-ορατό (UV-vis).....	46
2.7.2 Λήψη φασμάτων απορρόφησης στο υπέρυθρο (FTIR).....	46
2.8 Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης.....	47
2.9 Αντιδράσεις πολυμερισμού αρωματικών ενώσεων με χρήση της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	48
2.9.1. Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου.....	49
2.9.2. Επίδραση του χρόνου.....	49
2.9.3. Επίδραση του pH.....	49
2.9.4. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	50
<u>3.Αποτελέσματα</u> .....	51
3.1 Αναζήτηση γονιδίων υπεύθυνων για τις λακκάσες στο γονιδίωμα του <i>Myceliophthora</i> <i>thermophila</i> .....	52
3.2 Δομή και χαρακτηριστικά του γονιδίου Lac2063133.....	54
3.3 Ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 από γενωμικό DNA του <i>Myceliophthora thermophila</i> και αφαίρεση των ιντρονίων.....	55
3.3.1 Απομόνωση του γονιδίου Lac2063133.....	55
3.3.2 Αφαίρεση των ιντρονίων με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης PCR.....	57

3.4 Ενσωμάτωση του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPicZαA και μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης <i>Pichia pastoris</i> .....	59
3.4.1 Ενσωμάτωση του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPicZαA.....	59
3.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης <i>Pichia pastoris</i> .....	61
3.5 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης Lac2063133 από τα μετασχηματισμένα κύτταρα <i>Pichia pastoris</i> .....	61
3.5.1 Θεωρητικά χαρακτηριστικά της εκκρινόμενης πρωτεΐνης.....	61
3.5.2 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης.....	62
3.5.3 Ενεργότητα της πρωτεΐνης Lac2063133.....	64
3.6 Πολυμερισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση της εμπορικής λακκάσης του <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	65
3.6.1 Πολυμερισμός της κατεχόλης.....	65
3.6.1.1 Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση.....	65
3.6.1.2 Επίδραση του χρόνου στην αντίδραση πολυμερισμού.....	66
3.6.1.3 Επίδραση του pH στην αντίδραση πολυμερισμού .....	67
3.6.1.4 Επίδραση της Θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού .....	68
3.6.2 Αξιολόγηση του πολυμερούς.....	69
3.6.2.1 Φάσματα απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες (Uv-Vis).....	69
3.6.2.2 Φάσματα απορρόφησης στο υπέρυθρο (FT-IR).....	70
3.6.2.3 Διαλυτότητα του πολυμερούς.....	71
3.6.3 Πολυμερισμός άλλων φαινολικών ενώσεων.....	72
<u>4. Συμπεράσματα συζήτηση</u> .....	75
<u>5. Αναφορές – Βιβλιογραφία</u> .....	83
<u>6. Παραρτημα</u> .....	90
Παράρτημα Α - Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133.....	92
Παράρτημα Β - Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133 χωρίς τα ιντρόνια.....	95
Παράρτημα Γ – Πίνακας απορροφήσεων των χαρακτηριστικών χημικών δεσμών (FTIR)....	99

Κεφάλαιο 1

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια έχει αυξήσει σημαντικά τις απαιτήσεις για νέα ένζυμα με βελτιωμένες ιδιότητες. Ένα πλήθος από διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες απαιτούν ένζυμα τα οποία παραμένουν ενεργά σε ακραίες συνθήκες, με τη θερμοκρασία να αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους. Συγκεκριμένα τα θερμοανθεκτικά ένζυμα έχουν ελκύσει το ενδιαφέρον διότι η συντριπτική πλειοψηφία των βιοτεχνολογικών διεργασιών πραγματοποιείται σε αυξημένες θερμοκρασίες. Οι αυξημένες θερμοκρασίες προσφέρουν σημαντικό πλεονέκτημα στις βιοτεχνολογικές διεργασίες καθώς περιορίζουν τις πιθανότητες εξωγενούς μόλυνσης από μεσόφιλους μικροοργανισμούς (Becker *et al.*, 1997).

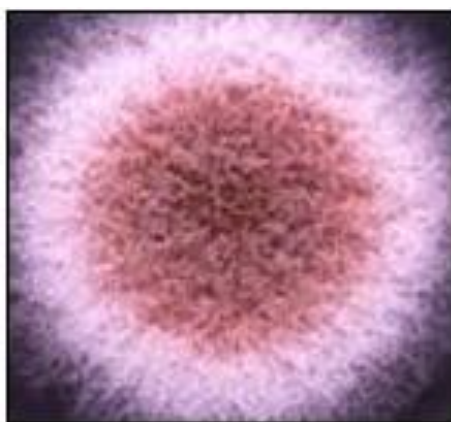
Μέχρι σήμερα ένα σύνολο ενζύμων έχει απομονωθεί από μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν σταθερότητα ακόμα και σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν αυτές της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης του οργανισμού προέλευσής τους (Saboto *et al.*, 1999). Ένζυμα όπως οι αμυλάσες, ξυλανάσες, κυτταρινάσες, χιτινάσες, πρωτεάσες και λιπάσες χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανικές διαδικασίες επεξεργασίας αμύλου, ξύλου και χαρτιού, στην επεξεργασία του πετρελαίου και την παραγωγή χημικών ενώσεων ακόμα και στα τρόφιμα με την παραγωγή αμινοξέων (Haki *et al.*, 2003). Συνολικά η έρευνα για την εύρεση νέων ενζύμων φαίνεται πως έχει εστιαστεί στα υπερθερμόφιλα αρχαία ή βακτήρια που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 100°C. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών να αγνοηθούν για αρκετά χρόνια λόγω των λιγότερο ακραίων θερμοκρασιών ανάπτυξής τους.

Οι θερμόφιλοι μύκητες που αναπτύσσονται στο εύρος των 20-55°C διαθέτουν ένα εξαιρετικό οπλοστάσιο ενζύμων το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πλήθος βιοτεχνολογικών διεργασιών με έμφαση στην οικολογία, διεργασίες που ανήκουν στην «πράσινη» βιοτεχνολογία. Επιπλέον, τα ένζυμα που προέρχονται από θερμόφιλους οργανισμούς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευελιξία στις συνθήκες pH και θερμοκρασίας που απαιτούνται στη βιομηχανία, σε αντίθεση με ένζυμα από υπερθερμόφιλους οργανισμούς τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα στις συνήθεις θερμοκρασίες των βιοτεχνολογικών εφαρμογών (50-65°C) (Maheshwari *et al.*, 2000). Επομένως η εξερεύνηση των ενζυμικών συστημάτων των θερμόφιλων μυκήτων αποτελεί έναν από τους ελκυστικότερους τομείς της βιοτεχνολογίας για την εύρεση νέων ενζύμων και την εφαρμογή τους στη βιομηχανία.



### 1.1 Ο θερμόφιλος μύκητας *Myceliophthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*)

Οι θερμόφιλοι μύκητες αποτελούν τη βασικότερη ομάδα μικροοργανισμών οι οποίοι ευθύνονται για την αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας (Cooney *et al.*, 1964). Ανάμεσα σε αυτούς, ο *Myceliophthora thermophila* τράβηξε την προσοχή καθώς ήταν δυνατό να αποικοδομεί ταχύτατα την κυτταρίνη παράγοντας 4 φορές περισσότερες κυτταρινάσες από τον *Trichoderma viride*, ένα μεσόφιλο μύκητα ο οποίος έχει εξαιρετική ικανότητα στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης (Bhat *et al.*, 1987). Ο *Myceliophthora thermophila* (*Sporotrichum thermophile*) είναι ένας θερμόφιλος ασκομύκητας ο οποίος έχει αναφερθεί στο παρελθόν με διαφορετικά ονόματα, όπως *Thielavia heterothallica*, *Chrysosporium thermophilum* και *Corynascus heterothallicus*. Η ονομασία *Myceliophthora thermophila* αναφέρεται στο εγγενές στάδιο ανάπτυξης του μύκητα (τελομορφή) ενώ η ονομασία *Sporotrichum thermophile* στο αγενές στάδιο ανάπτυξης (αναμορφή). Η απομόνωση του *Myceliophthora thermophila* είναι εύκολη από θερμαινόμενες φυτικές βιομάζες που βρίσκονται σε αποικοδόμηση, όπως φύλλα ή άχυρο. Αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 45-50°C με τη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης να φτάνει τους 55°C. Ο ρυθμός ανάπτυξης σε θρεπτικά υποστρώματα με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκόζη είναι 0.11 h<sup>-1</sup> στους 30°C και 0.23 h<sup>-1</sup> στους 50°C. Η δυνατότητα να χρησιμοποιεί κυτταρίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα είναι εντυπωσιακή με το ρυθμό ανάπτυξης να είναι 0.09 h<sup>-1</sup> στους 30°C και 0.16 h<sup>-1</sup> στους 50°C, χρόνοι οι οποίοι μπορούν να συγκριθούν με αυτούς της ανάπτυξης σε υπόστρωμα γλυκόζης (Semeniuk *et al.*, 1966; Maheshwari *et al.*, 1987; Maheshwari *et al.*, 2000). Οι καλλιέργειες με επώαση 2 έως 4 ημερών έχουν λευκό χρώμα το οποίο αλλάζει σταδιακά σε καστανό γεγονός που οφείλεται στον σχηματισμό και τη γήρανση των σπορίων (Εικόνα 1.1).

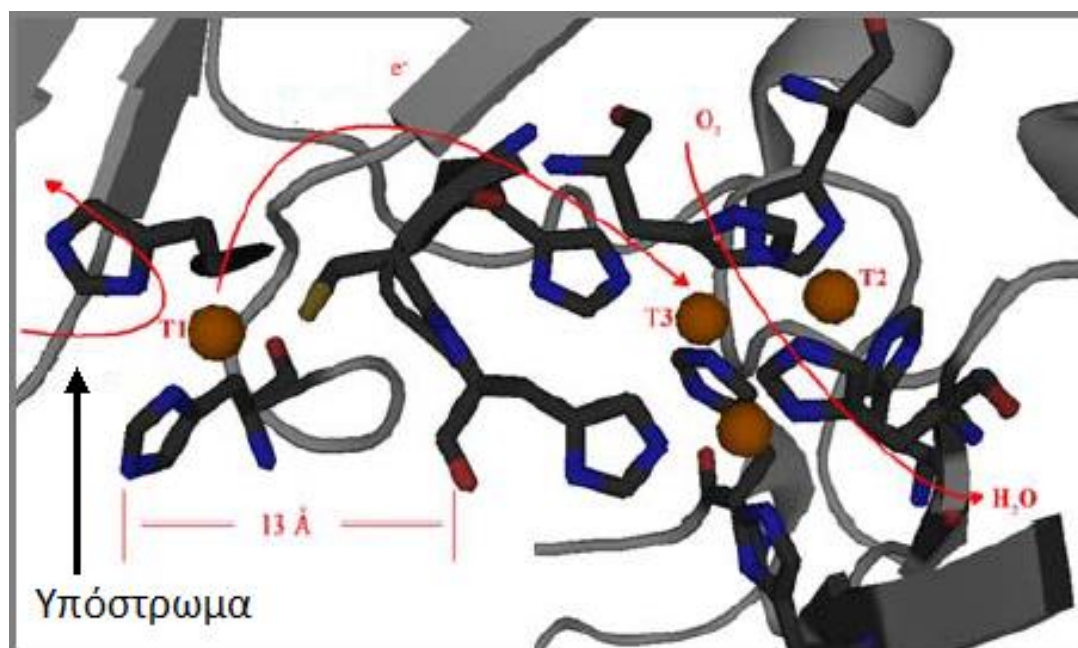


**Εικόνα 1.1** – Ανάπτυξη του μύκητα *Myceliophthora thermophila* σε τρυβλίο PDA (Potato Dextrose Agar). Η ώριμη καλλιέργεια παρουσιάζει χαρακτηριστικό καστανό χρώμα το οποίο οφείλεται στην ανάπτυξη των σπορίων (<http://www.gefor.4t.com/hongos/myceliophthorathermophila.html>).

Ο μύκητας παράγει ένα μεγάλο εύρος θερμοανθεκτικών ενζύμων (ενδο-εξωγλουκανάσες, κυτταρινάσες, εστεράσες ξυλανάσες κ.α.) τα οποία παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 55 °C. Από το σύνολο αυτών των ενζύμων οι λακκάσες παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω των ξεχωριστών τους ιδιοτήτων γεγονός που επιτρέπει την χρήση τους σε πλήθος βιοτεχνολογικών διεργασιών.

## 1.2 Λακκάσες – Λειτουργία και δομή

Οι λακκάσες (EC 1.10.3.2) αποτελούν μια ομάδα οξειδοαναγωγικών ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από εύρος υποστρωμάτων (π.χ, φαινόλες, αρωματικές ή αλειφατικές αμίνες), με το οξυγόνο να αποτελεί τον τελευταίο αποδέκτη ηλεκτρονίων. Ανήκουν στην οικογένεια των οξειδασών που διαθέτουν πολλαπλά ιόντα χαλκού (MCO - multi copper oxidases) μαζί με την οξειδάση του ασκορβικού (EC 1.10.3.3), τη φερροξειδάση - σερουλοπλασμίνη (EC 1.16.3.1) και την νιτρική ρεδουκτάση (EC 1.7.2.1)- (Mot *et al.*, 2012). Η πρώτη αναφορά για αυτά τα ένζυμα έγινε το 1883 από τον Yoshida (Yoshida *et al.*, 1883).



**Εικόνα 1.2** – Το ενεργό κέντρο των λακκασών. Η οξείδωση του υποστρώματος πραγματοποιείται στον χαλκό τύπου 1 (T1) με ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου σε νερό η οποία πραγματοποιείται στο τριπυρηνικό σύμπλεγμα των χαλκών τύπου 2 και 3 (T2 και δύο T3) - (Giardina *et al.*, 2010).

Τα τέσσερα ιόντα χαλκού που περιέχονται στις λακκάσες οργανώνονται σε δύο ομάδες οι οποίες σχηματίζουν το ενεργό κέντρο (Εικόνα 1.2). Ο χαλκός τύπου 1 (T1) είναι ο

πρώτος αποδέκτης του ηλεκτρονίου από το υπόστρωμα και αποτελεί τον χαλκό ο οποίος δίνει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στο ένζυμο. Ο χαλκός τύπου 2 (T2) και οι δύο χαλκοί τύπου 3 (T3) σχηματίζουν τη δεύτερη δομή του ενεργού κέντρου (TNC – trinuclear cluster) στην οποία γίνεται η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό (Jeon *et al.*, 2012). Ο διαχωρισμός των χαλκών στους τύπους (1-3) γίνεται με βάση τις διαφορετικές τιμές απορρόφησης τους στο ορατό.

Οι λακκάσες βρίσκονται σε πολλούς οργανισμούς όπως μύκητες, φυτά, έντομα και βακτήρια και εκτελούν διαφορετικές αναβολικές ή καταβολικές διεργασίες. Ο καταβολισμός της λιγνίνης από τους μύκητες, η σύνθεση της λιγνίνης από τα φυτά, η σύνθεση του χιτίνουσκελετού από τα έντομα και η σπορίωση των βακτηρίων αποτελούν βασικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται οι λακκάσες (Cañas *et al.*, 2010). Ανάμεσα στις διαφορετικές λακκάσες υπάρχουν συντηρημένα μοτίβα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση των ιόντων χαλκού με κυριότερα τα κατάλοιπα ιστιδίνης (Εικόνα 1.3).

<i>B. subtilis</i> CotA	100	VKTVV <b>HL</b> HGGVTP	112	148	AILWY <b>HD</b> HAMALT	160
<i>B. pumilus</i>	98	VKTVV <b>HL</b> HGGVTP	110	146	CTLWY <b>HD</b> HAMALT	158
<i>G. forsetii</i>	120	AESIV <b>HW</b> HGLHVS	132	160	GTW <b>FHP</b> PHRHT	172
<i>M. tractuosa</i>	118	EESIV <b>HW</b> HGMHVP	130	158	GTW <b>FHP</b> PHGRT	170
<i>S. linguale</i>	156	EESNI <b>HW</b> HGLLVP	168	156	NMAWY <b>HP</b> HPHEKT	168
<i>E. coli</i> CueO	96	EETTL <b>HW</b> HGLEVP	108	136	ATCW <b>FHP</b> HQHGKT	148
<i>S. pristinaespiralis</i>	108	VPVSL <b>HP</b> HGVDYD	120	162	GYWHY <b>HD</b> HVVGTD	174
<i>S. griseus</i> EpoA	97	VDASL <b>HV</b> HGVDYD	109	151	GYWHY <b>HD</b> HVVGTD	163
<i>T. versicolor</i>	59	KSTSI <b>HW</b> HGFFQK	71	104	GTFWY <b>HS</b> HLSTQY	116
<i>M. thermophila</i>	131	NGTSI <b>HW</b> HGLHQK	143	176	GTSWY <b>HS</b> HFSAQY	188
<i>R. vernificera</i>	54	YGLTI <b>HW</b> HGVKQP	66	99	GTLWW <b>HA</b> HSWTR	111
<i>Cucurbita</i> AsOX	55	EGVVI <b>HW</b> HGILQR	67	99	GTFFY <b>HG</b> HLMQR	111
<i>B. subtilis</i> CotA	414	PTRGTH <b>PIHL</b> HLVSFR	429	488	YVW <b>HCH</b> ILEHEDYDMMR	504
<i>B. pumilus</i>	414	PTRGTH <b>PIHL</b> HLVQFR	429	488	YVW <b>HCH</b> ILEHEDYDMMR	504
<i>G. forsetii</i>	472	MMQMP <b>HPVHI</b> HQLQFN	487	538	FLY <b>HCH</b> NLEHEDMGMMR	555
<i>M. tractuosa</i>	477	MMQMP <b>HPVHI</b> HQVQFN	492	543	FVY <b>HCH</b> NLEHEDMGMMR	559
<i>S. linguale</i>	418	KGDEP <b>HPMHL</b> HGTFFQ	433	474	FVF <b>HCH</b> NLEHEDDGMMML	492
<i>E. coli</i> CueO	448	GDMML <b>HPFH</b> IHGTFQFR	463	496	YMA <b>HCH</b> LLEHEDTGMMML	512
<i>S. pristinaespiralis</i>	247	HGEYY <b>HTFHM</b> HGHRWA	252	295	W <b>MYHCH</b> VQSHSDMGAG	311
<i>S. griseus</i> EpoA	226	HGEFY <b>HTFHI</b> HGHRWA	241	284	W <b>MYHCH</b> VQSHSDMGAG	300
<i>T. versicolor</i>	395	APGAP <b>HPFHL</b> HGHAF	405	449	WFL <b>HCH</b> IDFHLEAGFAV	465
<i>M. thermophila</i>	469	PFTLP <b>HPMHL</b> HGHDFY	484	542	WLF <b>HCH</b> IAWHVSGGLGV	558
<i>R. vernificera</i>	428	GAATS <b>HPMHL</b> HGFNFY	443	492	WFL <b>HCH</b> FERHTTEGMAT	508
<i>Cucurbita</i> AsOX	440	NLSET <b>HPWHL</b> HGHDFW	455	503	WAF <b>HCH</b> IEPHLHMGMGV	519

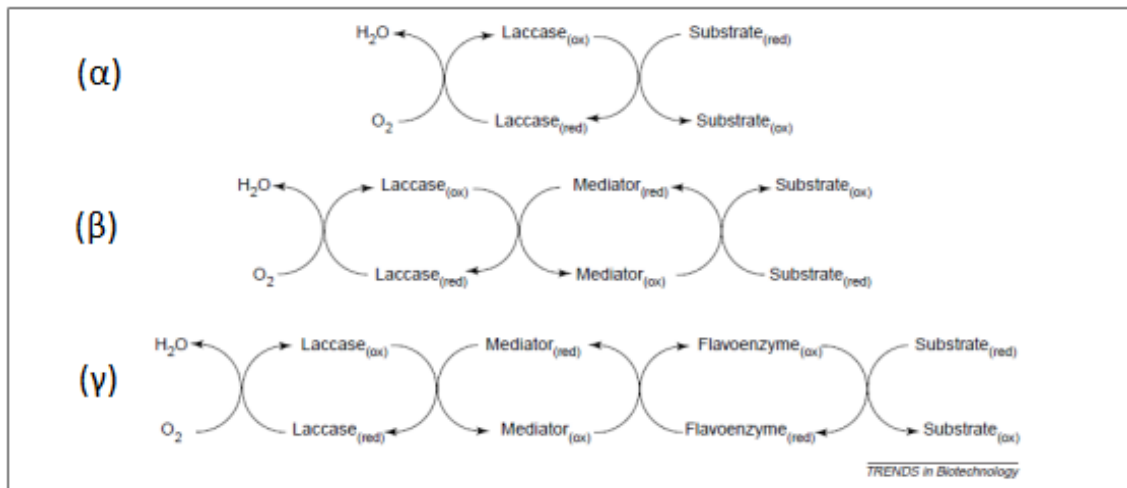
**Εικόνα 1.3** – Ομοπαράθεση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών από διαφορετικές λακκάσες (μυκήτων, φυτών και βακτηρίων). Φαίνονται οι αλληλουχίες για τα 4 μοτίβα δέσμευσης του χαλκού στα οποία υπάρχει μεγάλη συντήρηση στα κατάλοιπα ιστιδίνης (Reiss *et al.*, 2013).

Από το σύνολο των διαθέσιμων λακκασών από τους διαφορετικούς οργανισμούς, οι μυκητιακές λακκάσες έχουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον καθώς έχουν το μεγαλύτερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Jeon *et al.*, 2012). Η πλειοψηφία των μυκητιακών λακκασών είναι εξωκυτταρικές σφαιρικές πρωτεΐνες μεγέθους 60-70 kDa με όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) κοντά στο pH 4. Διαθέτουν 4-10 σημεία γλυκοζυλίωσης με αποτέλεσμα να γλυκοζυλιώνονται σε βαθμό 10-25% (σπάνια υπερβαίνει το 30%), γεγονός που τους προσφέρει μεγάλη σταθερότητα (Giardina *et al.*, 2010; Mot *et al.*, 2012). Το υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η δυνατότητα εφαρμογής αναβολικών και καταβολικών διεργασιών, η σταθερότητα των μυκητιακών λακκασών καθώς και η οικολογική φύση της αντίδρασης (χρήση οξυγόνου και παραγωγή νερού) καθιστά τα ένζυμα αυτά ιδανικά για την εφαρμογή πλήθους βιοτεχνολογικών διεργασιών. Στην επόμενη παράγραφο γίνεται προσπάθεια να παρουσιαστούν σύντομα ορισμένες από τις εφαρμογές των λακκασών στη βιοτεχνολογία.

### **1.3 Εφαρμογές των λακκασών στη βιοτεχνολογία**

Οι λακκάσες παρουσιάζουν ενεργότητα σε ένα εξαιρετικό εύρος φυσικών υποστρωμάτων (φαινόλες, πολυφαινόλες, ανιλίνες, αμίνες, υποκατεστημένες φαινόλες, οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που περιέχουν μέταλλα κ.α.) γεγονός το οποίο αποτελεί τον κύριο λόγο για τον οποίο τα ένζυμα αυτά εφαρμόζονται σε πλήθος βιοτεχνολογικών διεργασιών. Επιπλέον, με χρήση μικρών μορίων που λειτουργούν ως διαμεσολαβητές των αντιδράσεων οξείδωσης (mediators) είναι δυνατή η οξείδωση ενώσεων οι οποίες δεν αποτελούν φυσικό υπόστρωμα για το ένζυμο. Για το σύστημα αυτό (Laccase-mediator system, LMS) προσφέρονται πάνω από 100 χημικές ενώσεις οι οποίες επεκτείνουν τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών (Kunamneni *et al.*, 2008). Στην Εικόνα 1.4 παρουσιάζεται σχηματικά η δράση των λακκασών για την οξείδωση των υποστρωμάτων με χρήση ή όχι των χημικών διαμεσολαβητών.

Εκτός από τις φυσιολογικές τους λειτουργίες (αποικοδόμηση λιγνίνης, δημιουργία χιτινοσκελετού, μορφογένεση κλπ.) οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος διαφορετικών διεργασιών για την τροποποίηση και παραγωγή υλικών αλλά και στον τομέα την βιοεξυγείανσης. Στις επόμενες υποπαραγράφους περιγράφονται συνοπτικά οι εφαρμογές των λακκασών στους τομείς των τεχνητών χρωστικών, της βιοεξυγείανσης, των τροφίμων, των φαρμάκων και των πολυμερών.



**Εικόνα 1.4** – Στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές οι λακκάσες είναι δυνατό να οξειδώσουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Οι αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με άμεση επαφή ενζύμου-υποστρώματος (α) αλλά και με έμμεση επαφή με χρήση χημικών διαμεσολαβητών (β και γ)(Riva *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Επεξεργασία χρωστικών

Το σύνολο των τεχνητών χρωστικών που προέρχονται από τη βιομηχανία αποτελεί σημαντικό τοξικό ρύπο για το περιβάλλον. Ορισμένες λακκάσες έχει βρεθεί ότι είναι δυνατό να τροποποιούν τις χρωστικές αυτές ώστε να καταναλώνονται από μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα την αποτοξικοποίηση των ρύπων (Shraddha *et al.*, 2011). Σε μία αντίθετη κατεύθυνση, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι πολυμερή ορισμένων ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μελάνια. Για παράδειγμα, ανιλίνη η οποία πολυμερίστηκε μέσω της λακκάσης του *Trametes versicolor* χρησιμοποιήθηκε ως μελάνι για εκτύπωση σε κοινό εκτυπωτή (Junker *et al.*, 2014). Εκτός από τη σύνθεση φιλικών προς το περιβάλλον χρωστικών, είναι δυνατό να επιτευχθεί βαφή υφασμάτων με ενσωμάτωση φλαβονοειδών στις ίνες των υφασμάτων μέσω της δράσης των λακκασών (Jeon *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Βιοεξυγείανση

Οι υγροί ρύποι που προέρχονται από βιομηχανικές διεργασίες της επεξεργασίας του πετρελαίου καθώς και ρύποι από καύσεις και την επεξεργασία ξύλου περιέχουν μεγάλο ποσοστό αρωματικών ενώσεων (π.χ. πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες-PAHs). Επιπλέον χημικές ουσίες των οποίων έγινε αλόγιστη χρήση τα περασμένα χρόνια (κυρίως εντομοκτόνα) προκάλεσαν σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Επομένως οι λακκάσες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σε διαδικασίες βιοεξυγείανσης τροποποιώντας χημικές

ενώσεις όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια σε λιγότερο τοξικές ή και σε μη τοξικές μορφές. Στη βιομηχανία χαρτιού η απομάκρυνση της λιγνίνης και η λεύκανση γίνεται με χλωριωμένα χημικά τα οποία θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από δράση των λακκασών (Shraddha *et al.*, 2011). Επιπλέον, η απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων από υγρά απόβλητα είναι δυνατή με πολυμερισμό τους μέσω των λακκασών και στη συνέχεια καταβύθισής τους (Majeau *et al.*, 2010).

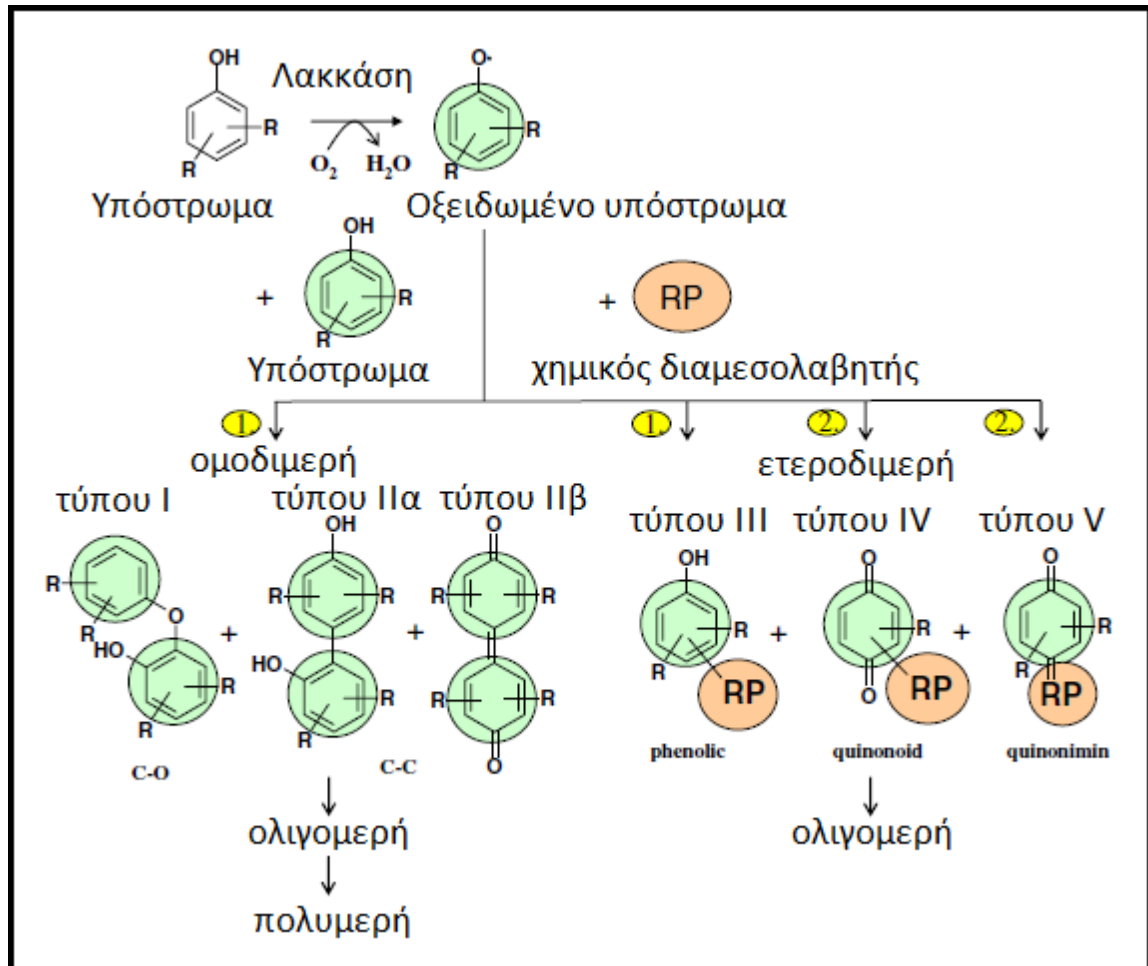
### 1.3.3 Χημικές μετατροπές για τρόφιμα και φάρμακα

Στον τομέα της οργανικής χημείας, οι λακκάσες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την χημική τροποποίηση, τον διμερισμό φαινολών και στεροειδών την δημιουργία δεσμών άνθρακα-αζώτου ή δημιουργία σύνθετων φυσικών προϊόντων. Επιπλέον, ολιγομερισμός φυσικών φαινολών μπορεί να προσφέρει νέες ενώσεις με ενισχυμένες ιδιότητες. Για παράδειγμα, η ρουτίνη και η κατεχίνη έχουν πολυμεριστεί επιτυχώς με λακκάσες παράγοντας χημικά μόρια τα οποία έχουν ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στον τομέα των τροφίμων, εκτός από την παραγωγή ισχυρών αντιοξειδωτικών οι λακκάσες χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων φαινολών κατά την επεξεργασία χυμών, κρασιού και μύρας καθώς και στη δημιουργία πηκτινών (Shraddha *et al.*, 2011). Στη φαρμακευτική, οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση νέων ενώσεων με βελτιωμένες ιδιότητες. Ο ολιγομερισμός ενώσεων όπως οι αμινοκινόνες, κοινά αντιβιοτικά ή αντιφλεγμονώδη προσφέρουν νέες ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρότερη δράση (Kunamneni *et al.*, 2008).

### 1.3.4 Δημιουργία πολυμερών με ξεχωριστές ιδιότητες

Στον τομέα των πολυμερών είναι πρακτικά αδύνατο να καταγραφούν όλες οι πιθανές εφαρμογές για τις λακκάσες. Τα πολυμερή βρίσκονται σε όλους τους τομείς της καθημερινότητας. Πολυμερή της κατεχόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ημιαγώγιμα υλικά ή βιοαιθητήρες, πολυμερή της ανιλίνης ως υλικά για ελαφριές οργανικές μπαταρίες, πολυμερή του γαλλικού οξέος για μονωτικά υλικά με μεγάλη θερμική και μηχανική αντοχή, πολυμερή της 1-ναφθόλης για δημιουργία πλαστικών και λάστιχου. Επιπλέον, προσφέρεται η δυνατότητα για δημιουργία ετεροπολυμερών (Εικόνα 1.5) ή την τροποποίηση ήδη υπάρχοντων πολυμερών για την ενίσχυση των ιδιοτήτων τους (Kunamneni *et al.*, 2008; Shraddha *et al.*, 2011; Nabid *et al.*, 2010; Aktas *et al.*, 2001; Nabid *et al.* 2005; Lopez *et al.*,

2013). Λαμβάνοντας υπόψη το τεράστιο εύρος αρωματικών ενώσεων καθώς και την εφαρμογή του συστήματος LMS (laccase-mediator system) που επεκτείνει την ικανότητα οξειδώσεων διαφορετικών υποστρωμάτων είναι προφανές ότι οι συνθετικές διεργασίες μέσω λακκασών και η παραγωγή νέων υλικών είναι αμέτρητες (Mikolasch *et al.*, 2009).



**Εικόνα 1.5** – Ο μηχανισμός διμερισμού, ολιγομερισμού και πολυμερισμού αρωματικών ενώσεων με τη χρήση λακκασών. Ανάλογα με τις συνθήκες και την ύπαρξη ή όχι χημικού διαμεσολαβητή (mediator) πραγματοποιούνται διαφορετικές αντιδράσεις σύνδεσης (C-C, C-O) και παραγωγή διαφορετικών προϊόντων (Mikolasch *et al.*, 2009).

Με δεδομένο το εκπληκτικό εύρος εφαρμογών που παρουσιάζουν οι λακκάσες και τις δυνατότητες που προσφέρουν τα νέα υλικά είναι επόμενο να υπάρχει εξαιρετική ζήτηση για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Η παραγωγή τους από φυσικές πηγές δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες της αγοράς επομένως είναι απαραίτητη η ετερόλογη υπερέκφρασή τους. Επιπλέον, η αναζήτηση νέων λακκασών και η μελέτη των ιδιοτήτων τους μπορεί να διευκολυνθεί μέσω της ετερόλογης έκφρασης. Επομένως χρησιμοποιούνται συστήματα

υπερέκφρασης βακτηρίων, φυτών και μυκήτων ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε διεργασίας.

#### 1.4 Ετερόλογη έκφραση λακκασών. Το σύστημα της *Pichia pastoris*

Από τις αρχές της δεκαετίας του 90 η ετερόλογη έκφραση των λακκασών αποτέλεσε βασικό τομέα έρευνας. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα έκφρασης όπως βακτήρια (*Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*), φυτά (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Lycopersicon esculentum*), ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia methalonica*) και νηματοειδείς μύκητες (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*) (Piscitelli *et al.*, 2010). Τα συστήματα ετερόλογης έκφρασης των βακτηρίων προσφέρουν εύκολο και γρήγορο χειρισμό, τα φυτά προσφέρουν τη δυνατότητα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ενώ οι νηματοειδείς μύκητες παράγουν εξωκυτταρικά αξιοσημείωτα μεγάλες ποσότητες της ετερόλογα εκφραζόμενης πρωτεΐνης (έως 920 mg/l). Οι ζύμες συγκεντρώνουν πλεονεκτήματα από όλες τις προηγούμενες ομάδες προσφέροντας την ευκολία της γενετικής τροποποίησης σε συνδυασμό με την ιδιότητα εφαρμογής μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών ή γλυκοζυλίωση καθώς και την παραγωγή της πρωτεΐνης σε ικανοποιητικά επίπεδα. Οι χαμηλές απαιτήσεις σε χρόνο και προσπάθεια τις καθιστούν ιδανικά συστήματα ετερόλογης έκφρασης για τις λακκάσες.

##### 1.4.1 Η ζύμη *Pichia pastoris*

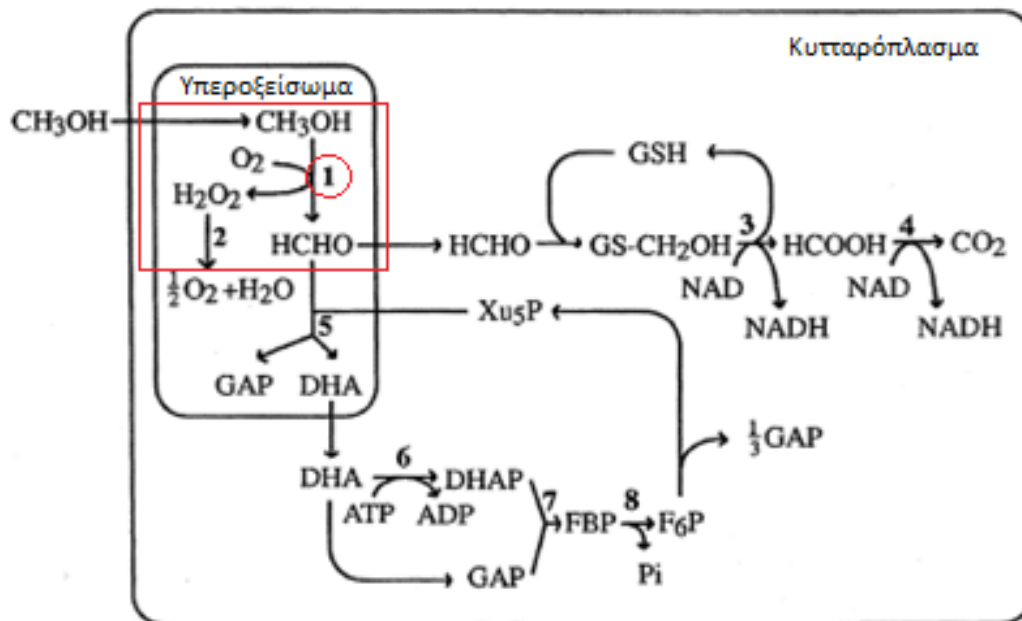
Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμο σύστημα για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για τη βιομηχανική παραγωγή. Η ικανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε μεγάλες συγκεντρώσεις (πάνω από 130g ξηρής βιομάζας ανά λίτρο υγρής καλλιέργειας) επιτρέπει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών, ποσότητες που πλησιάζουν το 1 g/l καλλιέργειας. Επιπλέον ο οργανισμός προσφέρει ευελιξία στις συνθήκες ανάπτυξης (pH, αερισμός, ποσότητα πηγής άνθρακα) οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν για την αύξηση της παραγωγής αλλά και την βελτιστοποίηση των συνθηκών για την παραγωγή ενεργής πρωτεΐνης (Wegner *et al.*, 1990; Macauley *et al.*, 2005). Τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει η *Pichia pastoris* είχαν ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη χρήση του μικροοργανισμού για την ετερόλογη έκφραση πλήθους πρωτεϊνών και τελικά την



τυποποίηση του συστήματος έκφρασης σε εμπορικό kit (Invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit).

#### 1.4.2 Μεταβολισμός της μεθανόλης από την *Pichia pastoris*, ο υποκινητής AOX1

Η *Pichia pastoris* ως μεθυλότροφος οργανισμός έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOX) η οποία καταλύει το πρώτο βήμα για τον μεταβολισμό της μεθανόλης, οξειδώνοντάς την σε φορμαλδεΐδη με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Εικόνα 1.6). Υπάρχουν δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της αλκοολικής οξειδάσης, τα AOX1 και AOX2. Η πλειοψηφία του ενζύμου παράγεται από το AOX1, το οποίο ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής ανάλογα με την διαθεσιμότητα των διαφορετικών πηγών άνθρακα. Η ύπαρξη της γλυκόζης καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου, ωστόσο απουσία γλυκόζης ο υποκινητής AOX1 δεν ενεργοποιείται. Η ύπαρξη της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του υποκινητή.



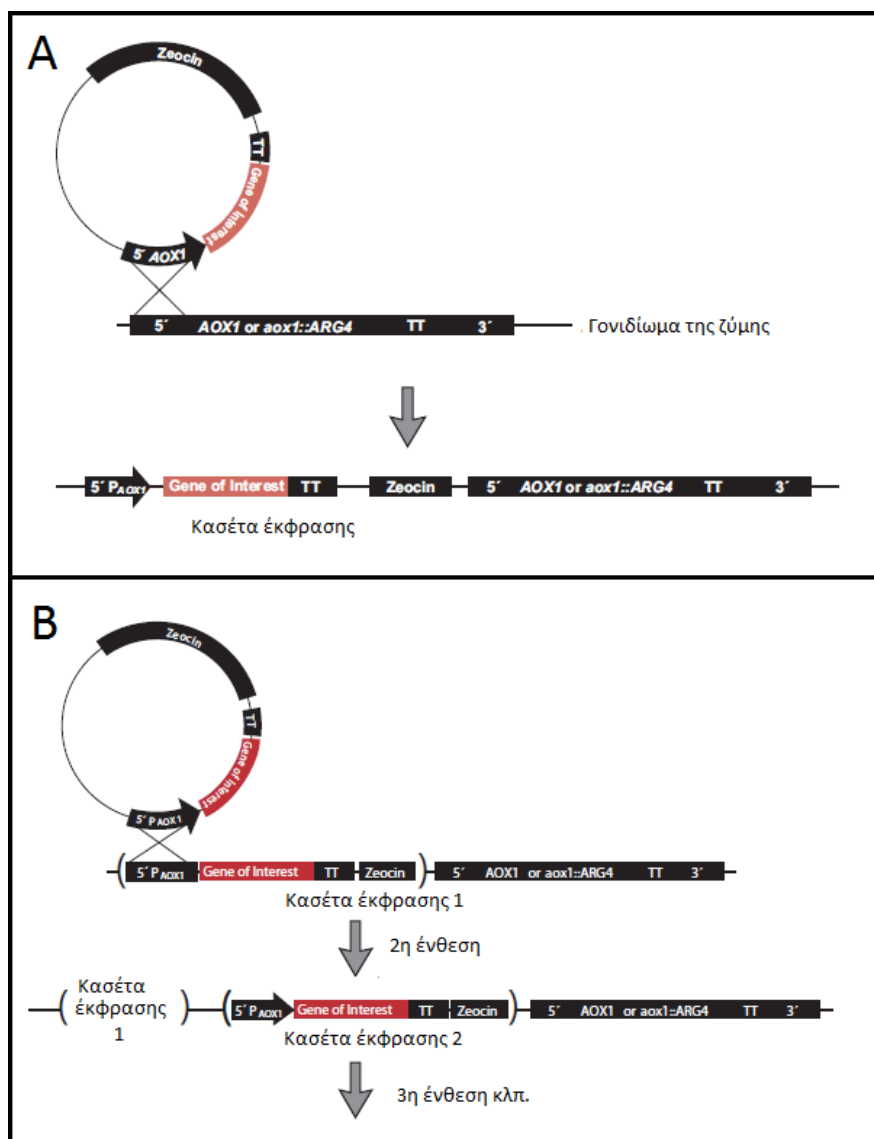
**Εικόνα 1.6** – Ο μεταβολισμός της μεθανόλης από την ζύμη *Pichia pastoris*. Η αλκοολική οξειδάση (1) καταλύει το πρώτο βήμα της οξείδωσης της μεθανόλης σε φορμαλδεΐδη με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο αποτοξικοποιείται με δράση της καταλάσης (2) (Cereghino *et al.*, 2000).

Οι ιδιότητες του υποκινητή AOX1 τον καθιστούν ιδανικό για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Αποτελεί έναν ισχυρό υποκινητή ο οποίος επάγεται με την προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο ως μοναδική πηγή άνθρακα. Επομένως η γενετική τροποποίηση της *Pichia pastoris* στοχεύει κατά κύριο λόγο στον ομόλογο ανασυνδυασμό

ενός ξένου φορέα με το DNA της ζύμης και την ενσωμάτωση ή αντικατάσταση του γονιδίου AOX1 από το ξένο γονίδιο (Cereghino *et al.*, 2000).

#### 1.4.3 Ετερόλογη έκφραση στη *Pichia pastoris*

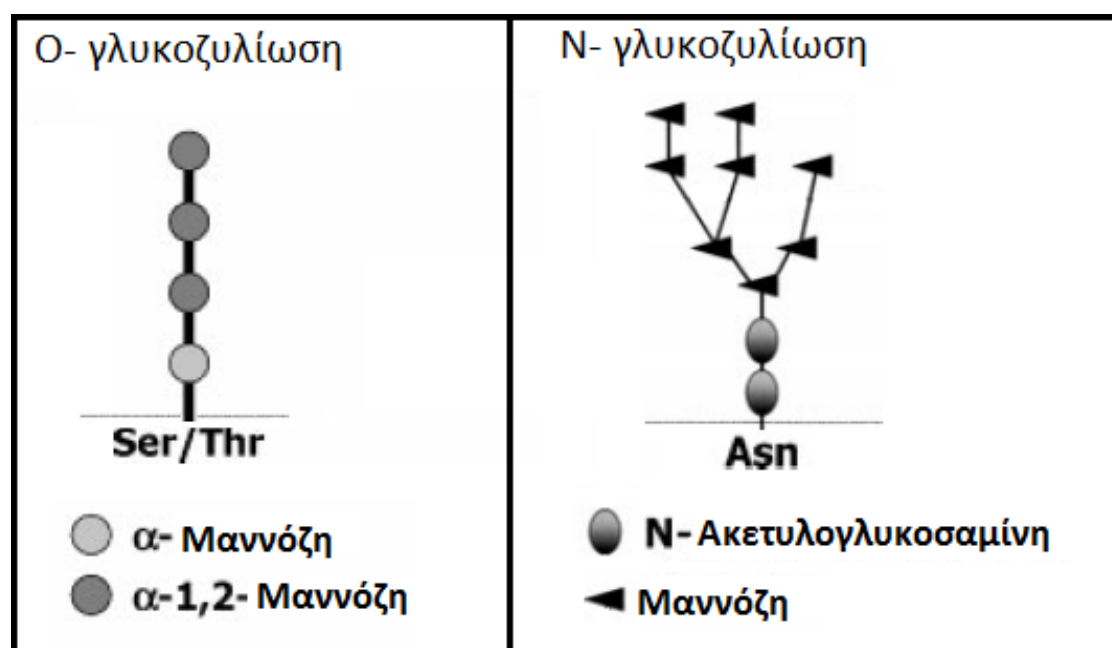
Η ετερόλογη έκφραση οποιασδήποτε πρωτεΐνης στη *Pichia pastoris* ακολουθεί τρία βήματα: (1) εισαγωγή του γονιδίου ενδιαφέροντος σε ένα φορέα έκφρασης, (2) ενσωμάτωση του φορέα με ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονιδίωμα της ζύμης και (3) επιλογή των κυττάρων που εκφράζουν το επιθυμητό γονίδιο. Ένα πλήθος από φορείς έκφρασης έχουν αναπτυχθεί για την ετερόλογη έκφραση στην *Pichia pastoris* ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διεργασίας.



**Εικόνα 1.7** – Γενετική τροποποίηση της *Pichia pastoris* με ενσωμάτωση του φορέα έκφρασης στο γονιδιωματικό DNA. Η ενσωμάτωση γίνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στον υποκινητή AOX1 (A). Η

ενσωμάτωση πολλαπλών αντιγράφων ή και διαφορετικών κασσετών έκφρασης είναι δυνατή (B) (Invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit).

Οι φορείς αυτοί ενσωματώνονται στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού παράγοντας έτσι σταθερά μετασχηματισμένους κλώνους (Εικόνα 1.7-A). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία γενετικής τροποποίησης επιτρέπει γεγονότα πολλαπλών ενθέσεων, τα οποία συμβαίνουν σε μικρό ποσοστό (1-10%) και βελτιώνουν την παραγωγή της πρωτεΐνης (Εικόνα 1.7-B) (Daly *et al.*, 2005). Επιπλέον, ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιείται είναι δυνατή η εσωκυτταρική ή εξωκυτταρική παραγωγή της πρωτεΐνης. Η έκκριση της παραγόμενης πρωτεΐνης στο θρεπτικό μέσο είναι συνήθως επιθυμητή καθώς διευκολύνει τις μετέπειτα διεργασίες για την απομόνωση και τον καθαρισμό της. Σήμερα είναι διαθέσιμα πολλά διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διεργασίας τα οποία συνήθως προσφέρουν τρόπους απομόνωσης των μετασχηματισμένων κλώνων με συμπλήρωση κάποιας αυξοτροφίας ή ακόμα και στελέχη με ανενεργά γονίδια (όπως στελέχη που δεν παράγουν πρωτεάσες – Protease deficient strains). Τέλος, η *Pichia pastoris* εφαρμόζει όλες τις ανώτερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, πρωτεολυτική επεξεργασία και O- ή N- γλυκοζυλίωση.



**Εικόνα 1.8** – Η O- και N- γλυκοζυλίωση στην *Pichia pastoris*. Το πρότυπο γλυκοζυλίωσης διαφέρει από τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και χρησιμοποιεί κυρίως κατάλοιπα μαννόζης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει σημαντικά το μοριακό βάρος των ετερόλογα εκφραζόμενων πρωτεϊνών, ανάλογα με τις διαθέσιμες θέσεις για την ενσωμάτωση των σακχάρων. (Daly *et al.*, 2005; Macauley *et al.*, 2005).

Η γλυκοζυλίωση στην *Pichia pastoris* (Εικόνα 1.8) συμβαίνει σε μικρότερο βαθμό από ότι στον *Saccharomyces cerevisiae*. Η Ο- γλυκοζυλίωση γίνεται αποκλειστικά με κατάλοιπα μαννόζης ενώ η Ν- γλυκοζυλίωση περιέχει 2 κατάλοιπα Ν-ακετυλογλυκοσαμίνης και 8 κατάλοιπα μαννόζης (Bretthauer *et al.*, 1999; Cereghino *et al.*, 2000; Macauley *et al.*, 2005). Επομένως οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες ενδέχεται να παρουσιάσουν σημαντική αύξηση στο μοριακό βάρος (kDa) ανάλογα με τις πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης στην ετερόλογα εκφραζόμενη πρωτεΐνη.

### **Στόχος της Διπλωματικής Εργασίας**

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση μία πρωτεΐνης του *Myceliophthora thermophila* που παρουσιάζει ομολογία με τις λακκάσες. Ο συγκεκριμένος ασκομύκητας έχει προσφέρει πληθώρα ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία, και επομένως η ανάλυση του γονιδιώματός του μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση καινοτόμων ενζύμων. Η αλληλουχία του γονιδιώματος του είναι γνωστή και καταχωρημένη στο διαδίκτυο με αποτέλεσμα να καταγραφούν πλήθος πρωτεϊνών με άγνωστη λειτουργία. Σε αυτή την εργασία και μετά από ανάλυση ενός συνόλου αλληλουχιών που παρουσίαζαν ομοιότητα με λακκάσες στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila* επιλέχθηκε το γονίδιο Lac2063133 το οποίο βιβλιογραφικά καταγράφεται ως μία πρωτεΐνη που μοιάζει με λακκάση (laccase-like protein). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης PCR αφαιρέθηκαν τα ιντρόνια του γονιδίου και ακολούθησε ενσωμάτωση στον φορέα έκφρασης pPICZαA και ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *Pichia pastoris* με σκοπό την αναγνώριση της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Ένας επόμενος στόχος ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε αντιδράσεις πολυμερισμού φαινολικών ενώσεων με σκοπό την παραγωγή διαφορετικών υλικών σε σύγκριση με την εμπορικά διαθέσιμη λακκάση από τον *Myceliophthora thermophila*. Με σκοπό να εξεταστούν οι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης σχεδιάστηκε ένα σύνολο από πειράματα όπου μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας ενζύμου-υποστρώματος, η επίδραση του χρόνου, η επίδραση της θερμοκρασίας καθώς και η επίδραση του pH στην αντίδραση πολυμερισμού. Η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν οι λακκάσες για τον πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων είναι ένας νέος τομέας στον οποίο χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα ένζυμα και αποτελεί έναν καινοτόμο κλάδο της βιοτεχνολογίας για την παραγωγή πληθώρας υλικών. Η μεθοδολογία αυτή είναι φιλική προς το περιβάλλον (χρήση του οξυγόνου από τα ένζυμα με μόνο παραπροϊόν το

νερό) και προσφέρει μεγάλο αριθμό επιλογών στην κατασκευή καινοτόμων υλικών. Τα υλικά αυτά είναι πιθανό να παρουσιάσουν ξεχωριστές ιδιότητες και επομένως να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή χρωστικών, βιοπλαστικών, οργανικών μπαταριών χαμηλού βάρους, μονωτικών υλικών κ.α.

Κεφάλαιο 2

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Μικροοργανισμοί

Τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- i) Ο θερμόφιλος μύκητας *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 (*Sporotrichum thermophile*), ο οποίος προμηθεύτηκε από την εταιρεία DSMZ (DSMZ No:1799, Γερμανία).
- ii) Το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* TOP10 [γονότυπος: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)*7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*] της Invitrogen.
- iii) Η μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris*, στέλεχος X33 (γονότυπος: άγριος τύπος, φαινότυπος: Mut<sup>+</sup>) της Invitrogen.

## 2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό. Η αποστείρωση τους έγινε σε αυτόκαυστο στους 121 °C, για 20 λεπτά, υπό πίεση 0,1 mPa. Τα θερμοευαίσθητα υλικά, όπως τα αντιβιοτικά και οι βιταμίνες αποστειρώθηκαν με διήθηση από φίλτρα σύριγγος με πόρους διαμέτρου 0,2 μm, και προστέθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα μετά την πτώση της θερμοκρασίας στους 30-40 °C.

### 2.2.1 Ανάπτυξη του μύκητα *Myceliophthora thermophila*

Για την ανάπτυξη του ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila* χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (PDA):

3,9% (w/v) άγαρ από ζυμό πατάτας και δεξτρόζη (PDA)

Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα:

1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 g/l εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) γλυκόζη, pH 5,0

### 2.2.2 Ανάπτυξη του βακτηρίου *Escherichia coli*

Οι καλλιέργειες των βακτηριακών κυττάρων έγιναν στο θρεπτικό υπόστρωμα Luria Bertani. Η σύσταση του θρεπτικού τροποποιήθηκε σε συνθήκες φυσιολογικής ή χαμηλής αλατότητας ανάλογα με τις απαιτήσεις της καλλιέργειας.

Υγρό θρεπτικό LB (Luria Bertani):

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4

Στερεό θρεπτικό LB (Luria Bertani):

LB + 1,5% (w/v) άγαρ

Στις διεργασίες επιλογής μετασηματισμένων κλώνων μέσω αντιβιοτικού έγινε προσθήκη 50 µg/ml καναμυκίνης

Υγρό θρεπτικό LS-LB (χαμηλής αλατότητας LB):

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4

Στερεό θρεπτικό LS-LB):

LS-LB + 1,5% (w/v) άγαρ

Τα θρεπτικά χαμηλής αλατότητας χρησιμοποιήθηκαν για διεργασίες επιλογής μέσω του αντιβιοτικού ζεοσίνη το οποίο παρουσιάζει ευαισθησία σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 25 µg/ml ζεοσίνης.

### 2.2.3 Ανάπτυξη της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris*

Για την ανάπτυξη της ζύμης χρησιμοποιήθηκαν πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων, ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων, όπως παραγωγή βιομάζας, έλεγχος των μετασηματισμένων στελεχών και επαγωγή της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης.

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium):

1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη

YPD-άγαρ:

YPD + 2% (w/v) άγαρ

YPDS (Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium):

YPD με προσθήκη σορβιτόλης σε τελική συγκέντρωση 1M

YPDS-άγαρ:



YPDS + 2% (w/v) άγαρ

Αντίστοιχα με τις καλλιέργειες των βακτηρίων σε διεργασίες επιλογής μέσω αντιβιοτικού έγινε προσθήκη 25 µg/ml ζεοσίνης.

MD (Minimal Dextrose medium)-άγαρ:

1,34% (w/v) yeast nitrogen base (YNB), 2% (w/v) δεξτρόζη,  $4 \times 10^{-5}$  % (w/v) βιοτίνη και 1,5% (w/v) άγαρ

MM (Minimal Methanol medium)-άγαρ:

1,34% (w/v) YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % (w/v) βιοτίνη, 0,5% (v/v) μεθανόλη και 1,5% (w/v) άγαρ, 2 mM ABTS, 0,025g/l  $\text{CuSO}_4$

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για τη λειτουργία του ενζύμου. Το ABTS αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου και παράγει έγχρωμο προϊόν, όπως θα αναφερθεί παρακάτω (βλ. παρ 2.6.1).

BMGY (Buffered Glycerol complex medium):

1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM ΡΔ φωσφορικών, pH 6,0, 1,34% (w/v) YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % (w/v) βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη

BMMY (Buffered Methanol complex medium):

1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη,  $4 \times 10^{-5}$  % (w/v) βιοτίνη, 0,5% (v/v) μεθανόλη, , 100 mM ΡΔ φωσφορικών, pH 6,0, 1,34% (w/v) YNB, 0,025g/l  $\text{CuSO}_4$

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και του YNB που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες ήταν οι εξής:

ΡΔ φωσφορικών: 132 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M, 868 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M, pH 6,0

Διάλυμα YNB: 34 g/l YNB χωρίς θειικό αμμώνιο και αμινοξέα, 100 g/l θειικό αμμώνιο

### **2.3 Προετοιμασία των επιλεκτικών προς μετασχηματισμό κυττάρων**

Ο μετασχηματισμός τόσο των βακτηριακών κυττάρων όσο και της ζύμης έγινε με χρήση κατάλληλα επεξεργασμένων κυττάρων. Τα επιλεκτικά προς μετασχηματισμό κύτταρα προετοιμάστηκαν με τις διαδικασίες που αναφέρονται παρακάτω:

### 2.3.1. Επιδεκτικά κύτταρα *Escherichia coli* Top10:

- Ανάπτυξη 1 αποικίας *Escherichia coli* (Top 10) σε 5 ml LB, 37°C, 180 rpm, 16 ώρες (προκαλλιέργεια)
- Εμβολιασμός 100 ml LB με 1ml από την προκαλλιέργεια, 37 °C, 180 rpm έως ότου το OD<sub>600</sub> να πάρει τιμή 0,4-0,8 (2-4 ώρες)
- 30 λεπτά επώαση σε πάγο
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 1500 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 12 ml στείρου MgCl<sub>2</sub> (4 °C)
- Νέα φυγοκέντρηση 1500 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 4 ml στείρου CaCl<sub>2</sub> (4 °C)
- 20 λεπτά επώαση σε πάγο
- Προσθήκη 1,9ml γλυκερόλης 50%, μοίρασμα των κυττάρων σε Eppendorf (~100 μl) και φύλαξη στους -80 °C μέχρι την χρήση τους

Τα κύτταρα που προετοιμάστηκαν με την παραπάνω διεργασία χρησιμοποιήθηκαν σε μετασχηματισμούς μέσω θερμικής καταπόνησης (heat shock) για τον πολλαπλασιασμό πλασμιδιακών φορέων.

### 2.3.2. Επιδεκτικά κύτταρα *Pichia pastoris* (x33):

- Εμβολιασμός υγρών καλλιιεργειών YPD (2-4) όγκου 50 ml (σε κωνικές φιάλες 250 ml) με μικρή ποσότητα κυττάρων *Pichia pastoris*, 30 °C, 200 rpm, 16 ώρες (προκαλλιέργεια)
- Χρήση 10 ml από τις προκαλλιέργειες για τον εμβολιασμό 2 θρεπτικών μέσων YPD όγκου 300 ml (σε κωνικές φιάλες 1000 ml), 30 °C, 200 rpm έως ότου το OD<sub>600</sub> να πάρει τιμή 1,3-1,5 (2-4 ώρες)
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση σε 300 ml υπερκάθου νερού (millQ-H<sub>2</sub>O), θερμοκρασίας 4 °C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 150 ml υπερκάθου νερού (millQ-H<sub>2</sub>O), θερμοκρασίας 4 °C
- Νέα φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά

- Επαναδιάλυση σε 12 ml σορβιτόλης 1M, θερμοκρασίας 4 °C
- φυγοκέντρηση 5000 g, 5 λεπτά
- Τελική επαναδιάλυση των κυττάρων σε σορβιτόλη 1M, θερμοκρασίας 4 °C έως τελικού όγκου 1,5 ml
- Άμεση χρήση των κυττάρων. Τα κύτταρα από την συγκεκριμένη διεργασία δεν αποθηκεύονται προς μελλοντική χρήση

Τα κύτταρα που προετοιμάστηκαν με την παραπάνω διεργασία χρησιμοποιήθηκαν σε μετασχηματισμούς μέσω ηλεκτρικού παλμού (ηλεκτροδιάτρηση).

## 2.4 Μοριακές μέθοδοι

Το σύνολο των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την ετερόλογη έκφραση του επιθυμητού γονιδίου στην *Pichia pastoris* παρουσιάζονται συνοπτικά στα επόμενα υποκεφάλαια.

### 2.4.1 Απομόνωση ολικού DNA από τον μύκητα *Myceliophthora thermophila*

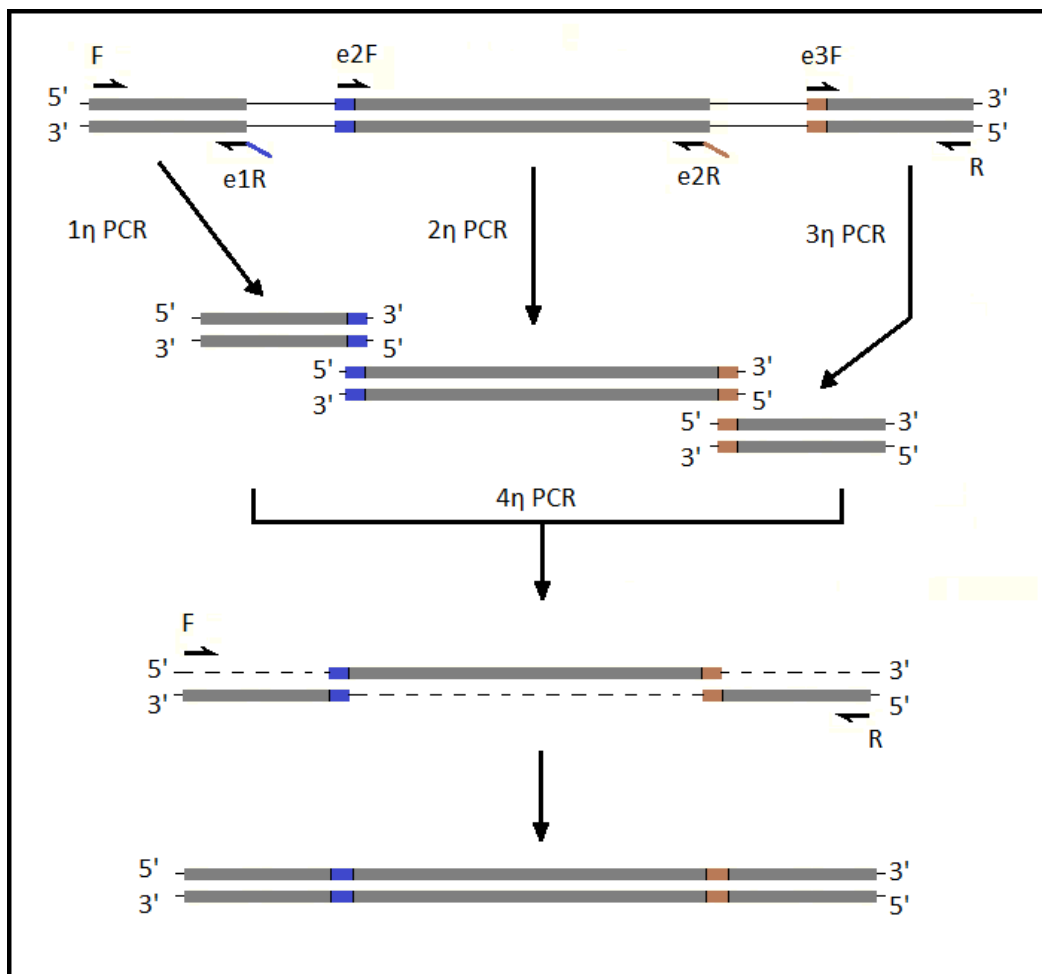
Η απομόνωση του γενομικού DNA από τον *Myceliophthora thermophila* έγινε με χρήση της μεθόδου επεξεργασίας με υγρό άζωτο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του θερμόφιλου μύκητα σε τρυβλία PDA (potato dextrose agar). Μετά από ανάπτυξη του μύκητα για 24 ώρες έγινε απομόνωση των σπορίων με χρήση αποστειρωμένου-απιονισμένου νερού και εμβολιασμός υγρών καλλιεργειών με σκοπό την παραγωγή βιομάζας. Η βιομάζα συλλέχτηκε με φυγοκέντρηση των καλλιεργειών και καθαρίστηκε με διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε η επεξεργασία ενός μέρους της βιομάζας με υγρό άζωτο και η κονιορτοποίηση μέχρι την παραγωγή ~100mg κατεστραμμένου μυκηλίου. Η ποσότητα αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή του τυποποιημένου πακέτου χημικών αντιδραστηρίων της Sigma – Aldrich, GenElute™ Plant, Genomic DNA Miniprep Kit και την απομόνωση καθαρού DNA.

### 2.4.2 Ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 - Η μέθοδος της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR (overlapping PCR)

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή TC-512 της εταιρείας TECHNE (Η.Π.Α.). Η ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου (Lac 2063133) έγινε με μία απλή PCR χρησιμοποιώντας το γενωμικό DNA του *Myceliophthora thermophila* ως DNA-μήτρα. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KOD Hot Start (Novagen), μια πολυμεράση που προέρχεται από τον οργανισμό *Thermococcus kodakarensis*. Πρόκειται για

πολύ αποδοτικό θερμοσταθερό ένζυμο για PCR δοκιμές, με υψηλή ταχύτητα επιμήκυνσης και εξαιρετική πιστότητα αντιγραφής. Έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης (proofreading), που εξασφαλίζει τη διόρθωση λαθών.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR (overlapping PCR) η οποία αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου PCR. Με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών είναι δυνατό να γίνει συνένωση διαφορετικών τμημάτων DNA που προέρχονται από διαφορετικές αντιδράσεις PCR. Η λογική της μεθόδου παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1. Στη συγκεκριμένη εργασία η μέθοδος της επικαλυπτόμενης PCR χρησιμοποιήθηκε για την αφαίρεση των ιντρονίων από το γονίδιο Lac2063133.



**Εικόνα 2.1** - Η επικαλυπτόμενη αντίδραση PCR. Με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητικών μορίων είναι δυνατή η συνένωση διαφορετικών τμημάτων DNA.

Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην επικαλυπτόμενη αντίδραση PCR

Το γονίδιο Lac2063133 αποτελείται από 3 εξόνια. Για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητος ο σχεδιασμός τριών ζευγών εκκινητών. Τα ονόματα των εκκινητών υποδεικνύουν την περιοχή πρόσδεσής τους στο γονίδιο (πχ. e1R - exon 1 reverse).

Αλληλουχία εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
MtLac2063133F (32 ζ.β.)	GC <b>GAA TTC</b> GGA ACT CTT GTC CAT GAT GAA CAG	56 °C
MtLac2063133R (29 ζ.β.)	GC <b>TCT AGA</b> TGA CCG GAA TCC TCA CTA TCC	55 °C

Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού EcoRI και XbaI. Οι θέσεις αυτές προστέθηκαν ανοδικά των εκκινητών (5' άκρο) και έχουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία ένθεσης του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPICZαA.

Αλληλουχία των ειδικών για την επικαλυπτόμενη PCR εκκινητών:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
MtLac2063133e1R (37 ζ.β.)	<b>AAG GCC GTG CCA ATG</b> CAT GCT AAG GTT CCG GTC ATT C	55 °C
MtLac2063133e2F (21 ζ.β.)	CAT TGG CAC GGC CTT TCT CAG	56 °C
MtLac2063133e2R (40 ζ.β.)	<b>CAG ATC GTT TCC ATG C</b> CCA TGA TCA TGT GTG CCA GAA TGT G	56 °C
MtLac2063133e3F (21 ζ.β.)	GCA TGG AAA CGA TCT GGG TGG	56 °C

Με πράσινο σημειώνονται τα τμήματα των εκκινητών που αιωρούνται και είναι υπεύθυνα για την συνένωση των μορίων DNA στην επικαλυπτόμενη PCR.

Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές MtLac2063133F και MtLac2063133R πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του Πίνακα 2.1 για την απομόνωση της επιθυμητής αλληλουχίας από το γενωμικό DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 διαφορετικές αντιδράσεις PCR για την απομόνωση των εξονίων χρησιμοποιώντας τις ποσότητες του Πίνακα 2.2.

Η αντίδραση για την ενίσχυση του γονιδίου μαζί με τα ιντρόνια έγινε με βάση το πρωτόκολλο της KOD πολυμεράσης ακολουθώντας τον κύκλο: Αποσιάταξη στους 95 °C για 20 sec, υβριδοποίηση στους 50 °C για 10 sec και επέκταση στους 70 °C για 40 sec. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 95 °C για 120 sec ενώ η τελική επέκταση στους 68 °C για 60 sec όπου η KOD παρουσιάζει τη μέγιστη επιδιορθωτική ικανότητα.

**Πίνακας 2.1:** Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 τελικού όγκου 50  $\mu$ l

Γενομικό DNA	2 $\mu$ l
Υπερκάθαρο νερό	32 $\mu$ l
Ρυθμιστικό διάλυμα KOD πολυμεράσης	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (25mM)	3 $\mu$ l
Εκκινητής F	1 $\mu$ l
Εκκινητής R	1 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
KOD πολυμεράση	1 $\mu$ l

**Πίνακας 2.2:** Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των εξονίων τελικού όγκου 50  $\mu$ l

Γενομικό DNA	1 $\mu$ l
Υπερκάθαρο νερό	33 $\mu$ l
Ρυθμιστικό διάλυμα KOD πολυμεράσης	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (25mM)	3 $\mu$ l
Εκκινητής F	1 $\mu$ l
Εκκινητής R	1 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
KOD πολυμεράση	1 $\mu$ l

Οι συνθήκες της PCR ήταν κοινές για τον πολλαπλασιασμό των τριών εξονίων με μόνη διαφορά τον χρόνο επέκτασης: Αποδιάταξη στους 95 °C για 20 sec, υβριδοποίηση στους 50°C για 10sec και επέκταση στους 70 °C για 30 sec (εξόνιο 2) ή 10 sec (εξόνια 1 και 3). Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 95 °C για 120 sec και η τελική επέκταση στους 68 °C για 60 sec. Τέλος, στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την συνένωση των εξονίων μέσω της επικαλυπτόμενης PCR.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τη συνένωση των εξονίων ήταν: Αποδιάταξη στους 95 °C για 20 sec, υβριδοποίηση στους 50 °C για 10 sec και επέκταση στους 70 °C για 50 sec. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 95 °C για 120 sec ενώ η τελική επέκταση στους 68 °C για 60 sec.

**Πίνακας 2.3:** Αντίδραση PCR για την συνένωση των εξονίων, τελικού όγκου 50  $\mu$ l

Εξόνια 1,2 και 3	1 $\mu$ l από το καθένα
Υπερκάθαρο νερό	31 $\mu$ l
Ρυθμιστικό διάλυμα KOD πολυμεράσης	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (25mM)	3 $\mu$ l
Εκκινητής F	1 $\mu$ l
Εκκινητής R	1 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
KOD πολυμεράση	1 $\mu$ l

#### 2.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της επιτυχίας των αντιδράσεων PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πηκτωμάτων (0,5 – 1%). Οι μάρτυρες μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι fastgene 100bp και fastgene 1kbp DNA ladder της Nippon genetics. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων DNA κάτω ακτινοβολία UV έγινε προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) κατά την προετοιμασία του πηκτώματος. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

TBE (10X): 108 g/l Tris base, 55 g/l βορικό οξύ, 40 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,0

ΡΔ δείγματος ηλεκτροφόρησης (Loading Buffer): 900  $\mu$ l γλυκερόλη 50% (v/v), 100  $\mu$ l μπλέ της βρωμοφαινόλης 10X

#### 2.4.4 Απομόνωση ζώνης (τμήματος DNA) από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης προσφέρει την δυνατότητα απομόνωσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Η διαδικασία περιλαμβάνει τομή του πηκτώματος στο σημείο που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία και στη συνέχεια καθαρισμό του DNA. Στη συγκεκριμένη εργασία τα τμήματα του πηκτώματος αγαρόζης κόπηκαν με χρήση νυστεριού και στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με το τυποποιημένο πακέτο χημικών αντιδραστηρίων Macherey-Nagel, Nucleospin Gel Clean up kit.

#### 2.4.5 Συνένωση μορίων DNA με την T4 λιγάση (ligation)

Το ένζυμο T4 λιγάση προσφέρει την δυνατότητα συνένωσης μορίων DNA με ισοτελή «τυφλά» άκρα ή μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα. Και στις δύο περιπτώσεις το ένζυμο καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων DNA. Στην παρούσα εργασία έγινε συνένωση του προϊόντος της PCR (με «τυφλά» άκρα) στον πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt (Invitrogen) σύμφωνα με την αντίδραση του Πίνακα 2.4. Σε επόμενο στάδιο έγινε συνένωση του γονιδίου μετά από ενζυμική πέψη (κολλώδη άκρα) στο πλασμίδιο pPICZαA (Invitrogen) χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ενθέματος, καθώς και αντιδράσεις ελέγχου σύμφωνα με τις ποσότητες που αναφέρονται στον Πίνακα 2.5. Τα χαρακτηριστικά των πλασμιδιακών φορέων αναφέρονται στις παραγράφους 2.4.5.1 και 2.4.5.2.

**Πίνακας 2.4:** Αντίδραση συνένωσης μορίων DNA με την T4 λιγάση τελικού όγκου 10 μl. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 16 °C για 2 ώρες.

Φορέας έκφρασης pCR® Blunt	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης	1 μl
Υπερκάθαρο νερό	2 μl
Επιθυμητό γονίδιο	5 μl
T4 λιγάση	1 μl

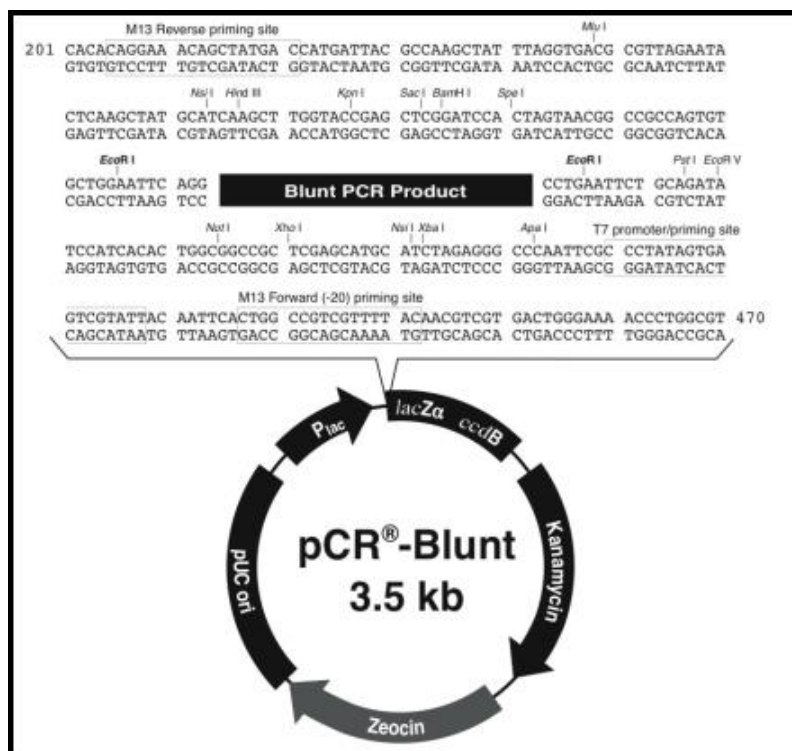
**Πίνακας 2.5:** Αντιδράσεις συνένωσης του γονιδίου Lac2063133 και του φορέα έκφρασης pPICZαA τελικού όγκου 20 μl

	Αναλογία όγκων 1:3	Αναλογία όγκων 1:7	Αντίδραση ελέγχου 1	Αντίδραση ελέγχου 2
ΡΔ T4 λιγάσης	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Υπερκάθαρο νερό	13 μl	9 μl	16 μl	17 μl
Επιθυμητό γονίδιο	3 μl	7 μl	-	-
Πλασμίδιο pPICZαA	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
T4 λιγάση	1 μl	1 μl	1 μl	-



### 2.4.5.1 pCR® Blunt (Invitrogen)

Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας έχει σχεδιαστεί για τον εύκολο μετασχηματισμό και επιλογή βακτηριακών κυττάρων. Τα χαρακτηριστικά του συνοψίζονται στην Εικόνα 2.2. Το πλασμίδιο προσφέρεται από την εταιρία σε γραμμική μορφή με τυφλά άκρα, γεγονός που επιτρέπει την απευθείας ένθεση αλληλουχιών DNA που προέκυψαν από την PCR αντίδραση. Το σημείο ένθεσης του ξένου DNA βρίσκεται ανάμεσα στον υποκινητή Plac και το γονίδιο lacZα. Επιπλέον, το γονίδιο lacZα βρίσκεται σε μεταγραφική σύντηξη με το ccdB (control of cell death) το οποίο είναι θνησιγόνο γονίδιο. Επομένως όταν γίνεται σύνδεση ενός τμήματος DNA στο πλασμίδιο διακόπτεται η έκφραση της αλληλουχίας lacZα-ccdB, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μόνο τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Αντίθετα, πλασμίδια που δεν δέχτηκαν το ξένο DNA προκαλούν τον θάνατο των βακτηριακών κυττάρων που μετασχημάτισαν. Εκτός αυτών, ο πλασμιδιακός φορέας pCR® Blunt περιέχει και δύο γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και ζεοσίνη.

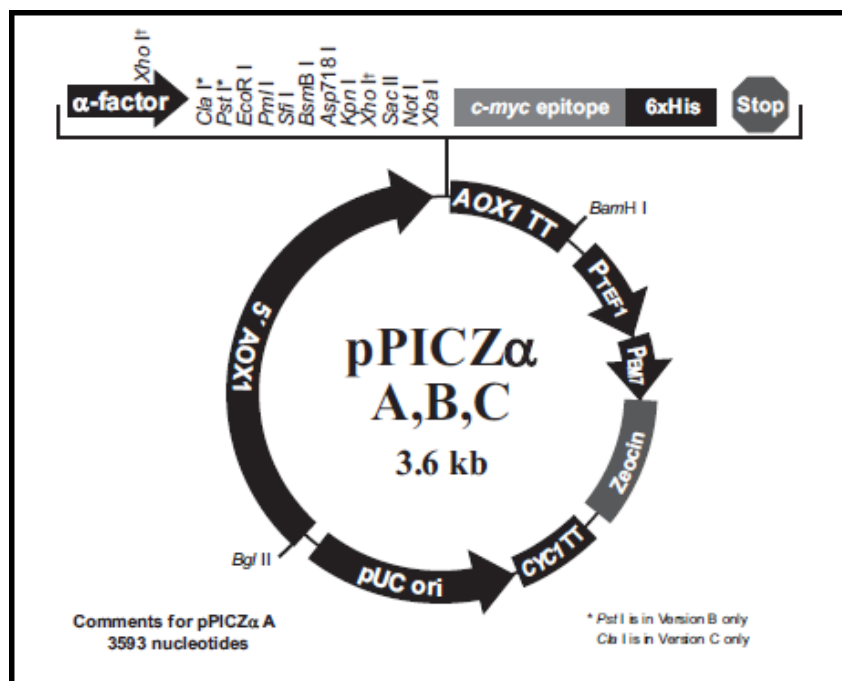


Εικόνα 2.2 - Ο πλασμιδιακός φορέας pCR®-Blunt της Invitrogen (3512 ζ.β.). Διακρίνονται (α) η θέση έναρξης της αντιγραφής (pUC ori), (β) τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και ζεοσίνη. (γ) το σημείο ένθεσης του ξένου DNA ανάμεσα στον υποκινητή Plac και το γονίδιο θανάτου ccdB (σε σύντηξη με το LacZα), το οποίο επιτρέπει την εύκολη επιλογή των ανασυνδυασμένων στελεχών (Invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit).

#### 2.4.5.2 pPICZα A,B,C (Invitrogen)

Η Εικόνα 2.3 περιλαμβάνει συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά των φορέων pPICZα A,B,C. Τα μεγέθη των φορέων είναι: pPICZα A (3593 ζ.β.), pPICZα B (3597 ζ.β.) και pPICZα C (3598 ζ.β.). Τα πλασμίδια αυτά έχουν σχεδιαστεί ώστε να επιτρέπουν την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον μεθυλότροφο ζυμομύκητα *Pichia pastoris* αλλά και την έκκριση τους στον εξωκυττάριο χώρο με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας  $\alpha$ -factor της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*.

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση του φορέα pPICZα A (3593 ζ.β.). Ο μετασχηματισμός της ζύμης με αυτή τη διαδικασία είναι σταθερός καθώς γίνεται ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο γενετικό υλικό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (5' AOX1) που περιέχεται στον πλασμιδιακό φορέα. Επιπλέον, στο πλασμίδιο υπάρχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη, καθώς επίσης κι ένας επίτοπος του c – myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) και έξι αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης (His), τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό τους με τη χρήση στηλών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.



**Εικόνα 2.3** - Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZαC της Invitrogen (3593 ζ.β.). Διακρίνονται: (α) η θέση έναρξης της αντιγραφής (pUC ori), (β) ο υποκινητής του γονιδίου AOX1 (942 bp) (γ) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (δ) το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σηματοδοτική αλληλουχία ( $\alpha$ -factor) για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης (ε) η περιοχή με τα πολλαπλά σημεία κλωνοποίησης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (στ) το γονίδιο κωδικοποίησης του c-myc

επίτοπου (c-myc epitope) για την ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το αντίστοιχο αντίσωμα, και (ζ) το γονίδιο κωδικοποίησης έξι συνεχόμενων καταλοίπων ιστιδίνης (6×His) για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση στηλών ιοντοαταλλακτικής χρωματογραφίας (Invitrogen EasySelect™Pichia Expression Kit).

#### 2.4.6 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Ο φυσιολογικός ρόλος των ενζύμων περιορισμού είναι η προστασία των βακτηριακών κυττάρων από ξένο DNA. Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA (4-8 ζ.β.) και την κόβουν αφήνοντας ισοτελή ή κολλώδη άκρα. Επομένως τα ένζυμα αυτά βρίσκουν τεράστια βιοτεχνολογική εφαρμογή καθώς επιτρέπουν την κοπή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε καθορισμένα σημεία. Υπάρχει τεράστια ποικιλία ενζύμων περιορισμού που προέρχονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα των εταιριών TAKARA BIO Inc. και Neb (new England biolabs) που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6.

**Πίνακας 2.6:** Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν

Ένζυμο περιορισμού	Όργανισμός προέλευσης	Αλληλουχία κοπής
EcoRI	<i>Escherichia coli (PY13)</i>	5'...G <sup>▼</sup> AATTC...3' 3'...CTTAA <sup>▲</sup> G...5'
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'...T <sup>▼</sup> CTAGA...3' 3'...AGATC <sup>▲</sup> T...5'
PmeI	<i>Pseudomonas mendocina</i>	5'...GTTT <sup>▼</sup> AAAC...3' 3'...CAAAT <sup>▲</sup> TTG...5'

Τα ένζυμα EcoRI και XbaI (TAKARA) χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pPICZαA (Πίνακας 2.7) αλλά και την πέψη του γονιδίου Lac2063133 (Πίνακας 2.8). Με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα γεγονός το οποίο επέτρεψε την προσανατολισμένη ένθεση του Lac2063133 στο πλασίδιο pPICZαA. Το ένζυμο περιορισμού PmeI (Neb) χρησιμοποιήθηκε για τη γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (Πίνακας 2.9), διαδικασία η οποία βελτιώνει την απόδοση μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης στην ζύμη *Pichia pastoris*.

**Πίνακας 2.7:** Αντίδραση διπλής πέψης του πλασμιδίου pPICZαA τελικού όγκου 30 μl

Πλασμίδιο pPICZαA	5 μl
Υπερκάθαρο νερό	19 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου XbaI (10x)	3 μl
EcoRI	1,5 μl
XbaI	1,5 μl

Το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο έγινε η αντίδραση επιλέχθηκε με βάση τα δεδομένα που προσέφερε η εταιρία (TAKARA) για διπλή πέψη με τα συγκεκριμένα ένζυμα. Η αντίδραση συνεχίστηκε για 3 ώρες στους 37°C όπου και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν βέλτιστη δράση.

**Πίνακας 2.8:** Αντίδραση διπλής πέψης του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου pCR® Blunt τελικού όγκου 30 μl

Ανασυνδυσμένο πλασμίδιο pCR® Blunt	5 μl
Υπερκάθαρο νερό	19 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου XbaI (10x)	3 μl
EcoRI	1,5 μl
XbaI	1,5 μl

**Πίνακας 2.9:** Αντίδραση γραμμικοποίησης του πλασμιδίου pPICZαA τελικού όγκου 100 μl

Ανασυνδυσμένο πλασμίδιο pPICZαA	70 μl
Υπερκάθαρο νερό	18 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου PmeI (10x)	10 μl
PmeI	2 μl

#### 2.4.7 Μέθοδοι μετασχηματισμού επιδεκτικών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων έγινε με θερμική καταπόνηση (Heat shock) ενώ ο μετασχηματισμός των κυττάρων ζύμης έγινε με τη μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης (Electroporation).

##### 2.4.7.1 Μετασχηματισμός μέσω θερμικής καταπόνησης (Heat shock)

Η σύντομη έκθεση των επιδεκτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* σε αυξημένη θερμοκρασία κάνει την μεμβράνη των κυττάρων πιο ρευστή και κατά συνέπεια παροδικά διαπερατή σε ξένο DNA. Στη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλασμιδίου σε 100 μl επιδεκτικών κυττάρων Top10
- Επώαση 30 λεπτών στον πάγο
- **Θερμική καταπόνηση στους 42 °C** για 1,5 λεπτό
- Άμεση προσθήκη 200 μl θρεπτικού LB, επώαση στους 37 °C για 1 ώρα
- Εμβολιασμός τρυβλίων με κατάλληλο αντιβιοτικό

Σε επόμενο στάδιο γίνεται η συλλογή των ανθεκτικών κλώνων και η καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ώστε να γίνει απομόνωση του πλασμιδίου.

##### 2.4.7.2 Μετασχηματισμός μέσω ηλεκτροδιάτρησης (Electroporation)

Με λογική παρόμοια με αυτή του θερμικού σοκ, η σύντομη έκθεση των επιδεκτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων *Pichia pastoris* σε ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη γεγονός που επιτρέπει την διέλευση ξένου DNA στο κύτταρο. Η διεργασία έχει υψηλή απόδοση ( $10^3 - 10^4$  κύτταρα/μg γραμμικού DNA) αλλά απαιτεί λεπτό χειρισμό και μεγάλη προσοχή. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Γραμμικοποίηση του πλασμιδίου με το ενζυμο PmeI και καθαρισμός του γραμμικού DNA με το Nucleospin Gel Clean up kit της Macherey-Nagel. Η τελική

έκλουση του DNA από το kit έγινε με υπερκάθαρο νερό ώστε να μην υπάρχουν άλατα στο διάλυμα γεγονός που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στο ατάδιο εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου

- Ανάμιξη 80 ml επιδεκτικών κυττάρων *Pichia pastoris* με το γραμμικό πλασμίδιο και ήπια ανάδευση με πιπέτα. Μεταφορά σε ειδική κυβέτα για ηλεκτροδιάτρηση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά
- Μεταφορά την κυψελίδα στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης GENE PULSER της BIORAD και εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού
- Άμεση προσθήκη 1 ml παγωμένης σορβιτόλης 1M και μεταφορά του διαλύματος σε falcon. Επώαση στους 30 °C για 2 ώρες
- Εμβολιασμός σε τρυβλία YPDS που περιέχουν το αντιβιοτικό ζεοσίνη
- Επώαση στους 30 °C για 3-10 ημέρες μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών αποικιών

Ακολούθησε ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών αποικιών σε νέα τρυβλία YPDS με ζεοσίνη. Στη συνέχεια οι ανθεκτικοί κλώνοι που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή και την ενεργότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο Lac2063133.

2.4.8 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα *Escherichia coli* - Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *Escherichia coli* έγινε μετά από καλλιέργειες μικρής κλίμακας σε 5 ml θρεπτικού LB με χρήση του τυποποιημένου πακέτου χημικών αντιδραστηρίων της Fermentas, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit.

Για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA ένα δείγμα καθαρού πλασμιδιακού DNA όγκου 10 μl (300 – 500 ng) εστάλη στην εταιρεία VBC – Biotech Services GmbH (Αυστρία). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης έγινε με τη βοήθεια των εργαλείων της βιοπληροφορικής (βλ. παρ 2.8).

## 2.5 Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών

Η υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τα μετασχηματισμένα στελέχη της *Pichia pastoris* έγινε σε υγρές καλλιέργειες BMGY και BMMY όγκου 50 ml. Σε πρώτο στάδιο η ζύμη αναπτύχθηκε στο υπόστρωμα BMGY που περιέχει ως μοναδική πηγή άνθρακα τη

γλυκερόλη με σκοπό την αύξηση της βιομάζας. Στη συνέχεια έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση και επαναδιάλυσή τους στο θρεπτικό υλικό BMMY. Ο όγκος της καλλιέργειας BMGY που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των κυττάρων ήταν τέτοιος ώστε η οπτική πυκνότητα στη νέα καλλιέργεια BMMY να είναι ίση με τη μονάδα ( $OD_{600} = 1$ ). Στα θρεπτικά υποστρώματα BMMY μοναδική πηγή άνθρακα αποτέλεσε η μεθανόλη η οποία επάγει την έκφραση της Lac2063133. Η προσθήκη της μεθανόλης γινόταν ανά 24 ώρες σε τελική συγκέντρωση 0,5% (v/v) έως το τέλος των καλλιεργειών (6 ημέρες).

#### 2.5.1 Απομόνωση της παραγόμενης πρωτεΐνης από καλλιέργειες της *Pichia pastoris*

Ο σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας για την ετερόλογη έκφραση της Lac2063133 έγινε με βάση τον πλασμιδιακό φορέα pPICZαA. Σημαντική ιδιότητα αυτού του φορέα είναι η ύπαρξη του παράγοντα έκκρισης από τον *Saccharomyces cerevisiae* (a factor). Η ύπαρξη αυτού του παράγοντα προκαλεί έκκριση της παραγόμενης από την *Pichia pastoris* πρωτεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο, δηλαδή στο θρεπτικό υπόστρωμα. Επομένως για να πραγματοποιηθεί η απομόνωση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των κυττάρων με φυγοκέντρηση και η απομόνωση του υπερκείμενου της καλλιέργειας. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στα 5000 g για 20 λεπτά. Τα διαλύματα που απομονώθηκαν μετά την φυγοκέντρηση διηθήθηκαν υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά ηθμούς διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κυτταρικά θραύσματα ή κύτταρα που παρέμειναν στο διάλυμα.

#### 2.5.2 Συμπύκνωση και εξισορρόπηση της πρωτεΐνης

Η συμπύκνωση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συσκευής υπερδιήθησης Stirred Cell Model 8400 και μεμβράνες PM-10 (Amicon, Millipore, Η.Π.Α.). Η συσκευή εφαρμόζει πίεση και ανάδευση στο διάλυμα ενώ η μεμβράνη συγκρατεί μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της με τα μικρότερα μόρια να διαφεύγουν μαζί με το διάλυμα. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν ηθμοί οι οποίοι επιτρέπουν την διέλευση μορίων με μέγεθος μικρότερο από 10 kDa. Η διαδικασία συμπύκνωσης συνεχίστηκε μέχρι τα διαλύματα να αποκτήσουν τελικό όγκο 10 ml.

Τα συμπυκνωμένα διαλύματα περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη Lac2063133 αλλά και ένα σύνολο από άλλες πρωτεΐνες της ζύμης *Pichia pastoris*. Ο διαχωρισμός τους πραγματοποιήθηκε με διέλευση των διαλυμάτων από στήλη ακινητοποιημένου μετάλλου στην οποία δεσμεύονται οι πρωτεΐνες που φέρουν την αλληλουχία έξι συνεχόμενων

καταλοίπων ιστιδίνης (His tag). Για να πραγματοποιηθεί η διεργασία αυτή ήταν απαραίτητη η εξισσορόπηση των συμπυκνωμένων πρωτεϊνών στο νέο διαλύτη, το ρυθμιστικό διάλυμα Talon. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Talon είναι:

Ρυθμιστικό διάλυμα Talon: 0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Η εξισσορόπηση έγινε με τη μέθοδο της διαπίδυσης από ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, πόροι διαμέτρου 25 mm, Sigma-Aldrich). Η μέθοδος στηρίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης. Οι ημιπερατές μεμβράνες επιτρέπουν την ανταλλαγή των μικρών μορίων του διαλύτη μέχρι την αποκατάσταση της ισορροπίας στο σύστημα. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές μεμβράνες κυτταρίνης και βυθίστηκαν σε περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος Talon (3 λίτρα) για 24 ώρες στους 4 °C, υπό ήρεμη ανάδευση.

2.5.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός της Lac2063133 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε η σήμανση με έξι συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης (histidine tag). Η σήμανση αυτή αποτελεί μία τροποποίηση που προέρχεται από τον φορέα έκφρασης pPICZαA (βλ. παρ 2.4.5.2). Οι πλευρικές ομάδες αυτών των αμινοξέων είναι δυνατό να αλληλεπιδράσουν με δισθενή ιόντα μετάλλων και να προκαλέσουν έτσι αντιστρεπτή δέσμευση της πρωτεΐνης σε ειδικές στήλες ρητίνης ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Για την απομόνωση της Lac2063133 χρησιμοποιήθηκε στήλη ρητίνης-κοβαλτίου. Συνοπτικά η διαδικασία προετοιμασίας της στήλης και τα βήματα καθαρισμού της πρωτεΐνης περιγράφονται παρακάτω:

- Προσθήκη του υλικού χρωματογραφίας (ρητίνη-κοβάλτιο) στην πλαστική στήλη. Έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα Talon (3 όγκους της στήλης) ώστε να γίνει το «πακετάρισμα» της στήλης.
- Προσθήκη του διαλύματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η Lac2063133 δεσμεύεται στη στήλη ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκκλούνται.
- Ξέπλυμα της στήλης με 10 ml ΡΔ ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί μη-ειδικά στη στήλη.



- Χρήση 5 ml διαλύματος ιμιδαζόλιου 5 mM ώστε να ξεκινήσει η αποκόλληση Lac2063133 από τη στήλη.
- Χρήση 7 ml διαλύματος ιμιδαζόλιου 100 mM (x2) για αποκόλληση της Lac2063133 από τη στήλη.

Τα διαλύματα έκπλυσης του κάθε σταδίου από την προσθήκη του διαλύματος των πρωτεϊνών και μετά συλλέχθηκαν σε διαφορετικά δοχεία. Τα διαλύματα ιμιδαζόλιου που χρησιμοποιήθηκαν για την αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τη στήλη (5mM και 100mM) παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα Talon. Μετά το τέλος της διαδικασίας, η ρητίνη εκπλύθηκε διαδοχικά με ρυθμιστικό διάλυμα και απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο και να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση. Η αποθήκευση της στήλης έγινε στους 4 °C σε διάλυμα αιθανόλης 20% (v/v).

#### 2.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με χρήση της μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα SDS (θειικό δωδεκυλικό νάτριο). Με λογική αντίστοιχη αυτή της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, η μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία πλέγματος από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου μέσω του οποίου κινούνται και διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες βάσει του μοριακού βάρους τους. Για την προετοιμασία δύο πήκτωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα του Πίνακα 2.10.

**Πίνακας 2.10:** Οι ποσότητες για την προετοιμασία 2 πήκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

Πήκτωμα επιστοιβάξης (Stacking gel) 4 %		Πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving gel) 12,5 %	
Υπερκάθαρο Νερό	3,0 ml	Υπερκάθαρο Νερό	3,5 ml
0,25M Tris/SDS 0.2% (pH 6,8)	3,75 ml	0.75M Tris/SDS 0.2% (pH 8.8)	9,4 ml
40% bis – acrylamide (30:1)	0,75 ml	40% bis – acrylamide (30:1)	5,8 ml
TEMED	20 μl	TEMED	30 μl
10% APS	60 μl	10 % APS	90 μl

Για την προετοιμασία της ηλεκτροφόρησης 15 µl δείγματος αναμίχθηκαν με 7 µl ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος και ακολούθησε βρασμός για 5- 7 λεπτά. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Pink prestained protein marker της Nippon genetics. Η σύσταση του διαλύματος φόρτωσης των δειγμάτων και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης ήταν:

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample buffer): 3,55 ml 0,25M Tris Base pH 6,8, 1,8 ml Γλυκερόλη 50% (v/v), 1,8 ml β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0,71 g SDS, 2,85 ml μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1 % (w/v)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer): 3,03 g/l Tris-base, 14,4 g/l γλυκίνη, 1 g/l SDS, pH 8,3

#### 2.5.4.1 Εμφάνιση των πρωτεϊνών με την Coomassie Blue G-250

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE έγινε με εφαρμογή χρώσης στις πρωτεΐνες. Ο χρωματισμός έγινε με επώαση της πηκτής σε διάλυμα της Coomassie G-250 για 30 λεπτά με ήπια ανάδευση. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε με σταδιακό αποχρωματισμό της πηκτής. Τα διαλύματα για τη χρώση των πρωτεϊνών με την Coomassie Blue G-250 ήταν:

Χρωματισμός πηκτής: 0,4% (w/v) Coomassie G-250, 400 ml μεθανόλη, 100 ml οξικό οξύ, 500 ml dH<sub>2</sub>O

Αποχρωματισμός πηκτής: 200 ml μεθανόλη, 100 ml οξικό οξύ, 700 ml dH<sub>2</sub>O

#### 2.5.4.2 Εμφάνιση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver staining)

Η χρώση των πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο χρώσης των πηκτωμάτων η οποία είναι ποιο περίπλοκη από τη χρώση με Coomassie G-250 αλλά έχει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Στερέωση των πρωτεϊνών στην πηκτή με διάλυμα μεθανόλης 50% και οξικού οξέος 12% για 90 λεπτά
- Απομάκρυνση του οξικού με σταδιακές πλύσεις. Δύο πλύσεις 20 λεπτών με 50% αιθανόλη και μία πλύση 30 λεπτών με 30% αιθανόλη
- Επώαση της πηκτής σε διάλυμα Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0,02% για 3-5 λεπτά. Ξέπλυμα της πηκτής με απιονισμένο νερό (x3)

- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  0,2% και φορμαλδεΐδης 0,075% για 20 λεπτά. Ξέπλυμα της πηκτής με απιονισμένο νερό (x2)
- Εμφάνιση των πρωτεϊνών με διάλυμα  $\text{NaCO}_3$  6%, φορμαλδεΐδης 0,05% και  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  0,02%
- Διακοπή της εμφάνισης με το αρχικό διάλυμα διάλυμα μεθανόλης 50% και οξικού οξέος 12%

#### 2.5.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η εκτίμηση της ποσότητας των πρωτεϊνών στα διαλύματα έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, με αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο απορροφά στα 595 nm και η σύγκριση της μετρούμενης τιμής γίνεται με τις τιμές απορρόφησης που προκύπτουν από μία πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης (BSA).

Η διαδικασία είναι εξαιρετικά απλή και γρήγορη. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ανάμειξη 25 μl δείγματος και 1250 μl αντιδραστηρίου Bradford, επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση των τιμών απορρόφησης στα 595 nm.

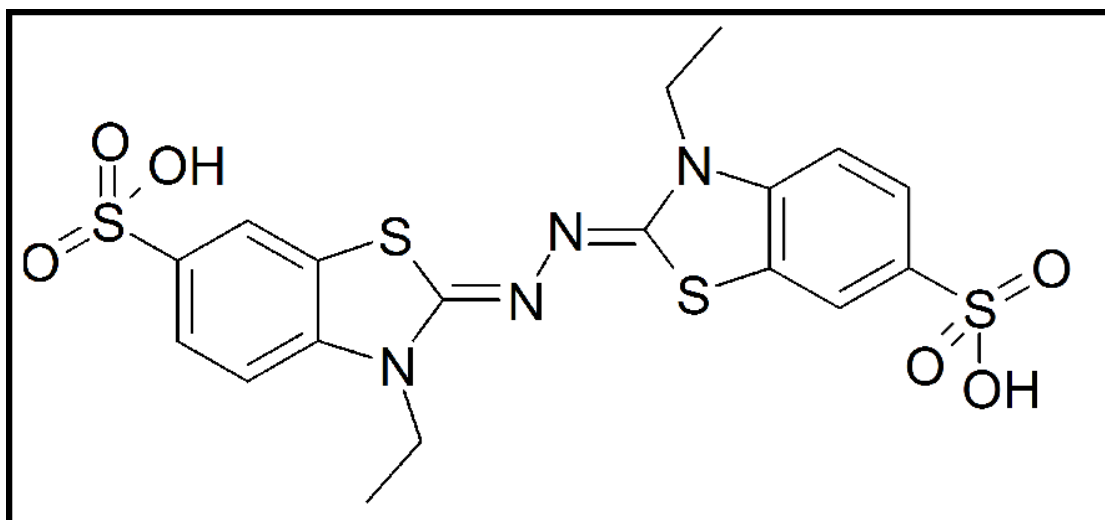
## 2.6 Δοκιμές ενζυμικής ενεργότητας

Οι μέθοδοι που περιγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της ενεργότητας της Lac2063133. Ωστόσο, η ανάλυση με βάση το υπόστρωμα ABTS χρησιμοποιήθηκε και για τη μέτρηση της ενεργότητας της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila* (novozymes 51003). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 °C. Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος στη μονάδα του χρόνου (λεπτό).

#### 2.6.1 Εκτίμηση ενζυμικής ενεργότητας με το υπόστρωμα ABTS

Η χημική ένωση ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) – Εικόνα 2.4] είναι ένα μόριο με μεγάλη εφαρμογή σε αναλύσεις κινητικής οξειδωτικών ενζύμων. Η οξειδωμένη μορφή του μορίου παρουσιάζει χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα η

απορρόφηση του οποίου μετράται στα 420 nm. Η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των Unit της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila* (νονοzymes 51003) αλλά και για τον έλεγχο της δυνατότητας της Lac2063133 να οξειδώνει το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι αντιδράσεις για τον υπολογισμό της ενεργότητας της λακκάσης νονοzymes 51003 πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ποσότητες του Πίνακα 2.11 ενώ ο έλεγχος της ενεργότητας της λακκάσης Lac2063133 έγινε σύμφωνα με τις ποσότητες του Πίνακα 2.12. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακέτα στο φωτόμετρο SpectraMAX250 microplate reader (molecular devices – Η.Π.Α.).



**Εικόνα 2.4** - Η χημική δομή του ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]. Η ανηγμένη μορφή του μορίου είναι άχρωμη σε αντίθεση με την οξειδωμένη μορφή η οποία παρουσιάζει πράσινο χρώμα που φωτομετρείται στα 420 nm.

Ο υπολογισμός των Unit των ενζύμων έγινε με χρήση του νόμου Lambert-Beer:  $A = \epsilon \cdot b \cdot C$  όπου:

A = Απορρόφηση. Για το ABTS έγινε μέτρηση στα 420nm

$\epsilon$  = σταθερά η οποία εξαρτάται από την ουσία. Για το ABTS είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι  $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = Απόσταση που διανύει η δέσμη του φωτός στο δείγμα

C = Συγκέντρωση προϊόντος

Συνολικά τα Unit υπολογίστηκαν με τον τύπο:

$$Unit / Lt = \frac{C}{t} \cdot \alpha ρ α ι ω σ η$$

Όπου το C υπολογίζεται από τον τύπο Lambert-Beer, t=0 χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά και αραιώση η αραιώση του ενζύμου στον τελικό όγκο της αντίδρασης.

**Πίνακας 2.11:** Αντίδραση οξείδωσης του ABTS για τον καθορισμό των Unit της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης *Myceliophthora thermophila*. Τελικός όγκος 250 μl

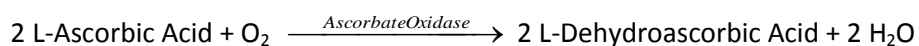
Ρυθμιστικό διάλυμα Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – κιτρικού οξέος pH 4,5	230 μl
ABTS (25mM)	10 μl
Λακκάση (novozymes 51003)	10 μl

**Πίνακας 2.12:** Αντιδράσεις οξείδωσης του υποστρώματος ABTS τελικού όγκου 250μl

Ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού νατρίου – τρυγικού οξέος pH5	200 μl
ABTS (20mM)	25 μl
Πρωτεϊνικό διάλυμα	25 μl

#### 2.6.2 Δοκιμή ενζυμικής ενεργότητας σε υπόστρωμα ασκορβικού οξέος

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της ικανότητας της Lac2063133 να οξειδώνει ασκορβικό οξύ. Η μοριακή αναλογία της αντίδρασης είναι:



Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν της Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) και στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης που παρουσιάζεται στα 245 nm κατά την οξείδωση του ασκορβικού. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ασκορβικού οξέος 0,5 mM το οποίο παρασκευάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 5,6). Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες του Πίνακα 2.13.

**Πίνακας 2.13:** Αντιδράσεις οξείδωσης του ασκορβικού οξέος τελικού όγκου 1ml

	Δείγμα	Μάρτυρας
Διάλυμα ασκορβικού οξέως 0.5mM	1 ml	1 ml
Πρωτεϊνικό διάλυμα	100 μl	-
Επώαση 5 λεπτών στην επιθυμητή θερμοκρασία και λήξη της αντίδρασης με προσθήκη αραιού HCl		
HCl (200 mM)	3 ml	3 ml
Πρωτεϊνικό διάλυμα	-	100 μl

## 2.7 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας σε καθορισμένα μήκη κύματος, όπως μετρήσεις κυττάρων (600 nm) μετρήσεις με τη μέθοδο Bradford (595 nm) μετρήσεις με τη μέθοδο DNS (420 nm) και μετρήσεις στο UV (280 nm) πραγματοποιήθηκαν στο φωτόμετρο S-22 UV/vis spectrophotometer της Boeco (Γερμανία). Για τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένα φωτόμετρα, ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων.

### 2.7.1 Λήψη φασμάτων στο υπεριώδες-ορατό (UV-vis)

Η λήψη φασμάτων στο εύρος υπεριώδους – ορατού (200-700 nm) έγινε στο φασματοφωτόμετρο U-2900 spectrophotometer της Hitachi (Ιαπωνία). Η μέθοδος αξιοποιήθηκε κατά τη μελέτη των αντιδράσεων πολυμερισμού από την εμπορικά διαθέσιμη λακκάση της *nonozymes*. Κατά τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ειδική κυβέτα που δεν απορροφά στο υπεριώδες.

### 2.7.2 Λήψη φασμάτων απορρόφησης στο υπέρυθρο (FTIR)

Η μέθοδος FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) στηρίζεται στην καταγραφή των απορροφήσεων που παρουσιάζονται στο υπέρυθρο οι οποίες οφείλονται στις κάμψεις και δονήσεις των χημικών δεσμών των μορίων. Τα φάσματα που λαμβάνονται από το φωτόμετρο επεξεργάζονται σε H/Y και παρέχουν ένα τύπο «αποτυπώματος» για την ουσία υπό μελέτη. Οι τιμές που καταγράφονται είναι χαρακτηριστικές για τους διαφορετικούς τύπους των χημικών δεσμών και υπάρχουν πίνακες στους οποίους γίνεται αντιστοίχιση των απορροφήσεων σε συγκεκριμένες χημικές ομάδες (Silverstein *et al.*,

1981). Οι μετρήσεις υπερύθρου βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στην αξιολόγηση πολυμερών, σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους όπως NMR, TGA, GC/MS, LC/MS, UV/Vis. 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Η λήψη του υπεριώδους φάσματος είναι δυνατή για δείγματα τα οποία βρίσκονται σε στερεά και υγρή μορφή. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε καταγραφή υπέρυθρων φαρμάτων σε στερεά δείγματα πολυμερών. Η προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση έγινε με ομογενοποίηση μικρής ποσότητας του πολυμερούς σε βρωμιούχο κάλιο (KBr) και στη συνέχεια εφαρμογή πίεσης σε ειδική συσκευή ώστε να δημιουργηθούν ταμπλέτες. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο Nicolet Magna-IR 560 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) από όπου λήφθηκαν τα φάσματα στο εύρος των 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα EssentialFTIR το οποίο είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο.

## 2.8 Εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης

Ο σχεδιασμός της πειραματικής διεργασίας στο μοριακό επίπεδο (μελέτη γονιδίων στο DNA του *Myceliophthora thermophila*, σχεδιασμός εκκινητών κλπ.), η πρόβλεψη των χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης (μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο, θέσεις γλυκοζυλίωσης) αλλά και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων (ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης) έγινε με χρήση ενός συνόλου από προγράμματα βιοπληροφορικής τα οποία είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο.

- Η βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση γονιδίων που κωδικοποιούν πιθανές λακκάσες στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464.
- Από τη βάση δεδομένων της Uniprot (The UniProt Consortium 2015; <http://www.uniprot.org>) έγινε η απομόνωση των αλληλουχιών γνωστών λακκασών με τις οποίες έγινε η αναζήτηση στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila*.
- Η μετάφραση αλληλουχιών DNA σε πρωτεΐνες έγινε με το εργαλείο ExPASy translate tool (<http://web.expasy.org/translate>; Gasteiger *et al.*, 2003).
- Η αναζήτηση γνωστών δομικών μοτίβων στις πρωτεΐνες έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων της pfam (<http://pfam.xfam.org>; Finn *et al.*, 2014).

- Η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών στις διαφορετικές οικογένειες των multi-copper οξειδασών έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων Lcced (<http://www.lcced.uni-stuttgart.de/cgi-bin/LccED1.2/index.pl>; Sirim *et al.*, 2011).
- Ο έλεγχος για την ύπαρξη πεπτιδίου οδηγού στις πρωτεΐνες έγινε με το πρόγραμμα SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Petersen *et al.*, 2011).
- Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου Lac2063133 ανασύρθηκε από την διαθέσιμη ιστοσελίδα για τον *Myceliophthora thermophila* (<http://genome.jgi.doe.gov/Spoth2/Spoth2.home.html>; Nordberg *et al.*, 2014).
- Ο σχεδιασμός των εκκνητών έγινε με το πρόγραμμα oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>; Kibbe *et al.*, 2007). Το πρόγραμμα παρείχε όλες τις απαραίτητες πληροφορίες (σημείο τήξεως των εκκνητών, πιθανή εσωτερική συμπληρωματικότητα).
- Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προήλθαν από την αλληλούχιση του γονιδίου με το γονίδιο αγρίου τύπου έγινε με το πρόγραμμα ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>; Larkin *et al.*, 2007).
- Η πρόβλεψη του μοριακού βάρους και του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης έγινε με το εργαλείο ExPASy mw/Pi ([http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi); Gasteiger *et al.*, 2005).
- Η πρόβλεψη των περιοχών της πρωτεΐνης στις οποίες είναι δυνατή η O- ή N-γλυκοσυλίωση έγινε με χρήση των εργαλείων NetOGlyc και NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>; Steentoft *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2004).

## 2.9 Αντιδράσεις πολυμερισμού αρωματικών ενώσεων με χρήση της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila*

Οι παράμετροι που επηρεάζουν τον πολυμερισμό των αρωματικών ενώσεων εξετάστηκε πραγματοποιώντας ένα σύνολο από αντιδράσεις, χρησιμοποιώντας το μόριο της κατεχόλης. Το μόριο της κατεχόλης αποτελεί την απλούστερη σε χημική δομή αρωματική ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις ενζυμικού πολυμερισμού.



Επιπλέον η κατεχόλη ήταν η πρώτη χημική ένωση που παρουσίασε εμφανή αποτελέσματα πολυμερισμού (ίζημα πολυμερούς) και επομένως επιλέχθηκε για να εξεταστεί το σύνολο των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης. Στα επόμενα υποκεφάλαια αναφέρονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των διαφορετικών παραμέτρων. Η λακκάση που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις ήταν η λακκάση του *Myceliophthora thermophila* που έχει χαρακτηριστεί από τον Berka και τους συνεργάτες του (Berka *et al.*, 1997).

#### 2.9.1. Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου

Η τυπική αντίδραση για τον έλεγχο της επίδρασης της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης ήταν:

Όγκος αντίδρασης: V=25 ml

Ανάδευση για αερισμό: 200 rpm

Χρόνος: 24 ώρες

Ποσότητα κατεχόλης : 0,0625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) : CH<sub>3</sub>COONa - pH =5

Θερμοκρασία : 25 °C

Ποσότητα λακκάσης : x unit/ml, όπου x οι διαφορετικές τιμές του ενζύμου που εξετάστηκαν

#### 2.9.2. Επίδραση του χρόνου

Η τυπική αντίδραση για τον έλεγχο της επίδρασης του χρόνου στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης ήταν:

Όγκος αντίδρασης: V=25 ml

Ανάδευση: 200 rpm

Χρόνος: 3,6 ή 24 ώρες

Ποσότητα κατεχόλης : 0,0625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - pH=6

Θερμοκρασία : 45 °C

Ποσότητα λακκάσης : 88,8 Unit/ml

#### 2.9.3. Επίδραση του pH

Η τυπική αντίδραση για τον έλεγχο της επίδρασης του pH στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης ήταν:

Όγκος αντίδρασης: V=25 ml

Ανάδευση: 200 rpm

Χρόνος 24 ώρες

Ποσότητα κατεχόλης : 0,0625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και κίτρικό οξύ για τις τιμές pH 3-5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  για τις τιμές pH 6-7

Θερμοκρασία : 45 °C

Ποσότητα λακκάσης : 88,8 Unit/ml

#### 2.9.4. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η τυπική αντίδραση για τον έλεγχο της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης ήταν:

Όγκος αντίδρασης: V=25 ml

ανάδευση: 200 rpm

Χρόνος: 24 ώρες

Ποσότητα κατεχόλης : 0,0625 g

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - pH=6

Θερμοκρασία : 30,40,50 ή 60 °C

Ποσότητα λακκάσης : 88,8 Unit/ml

Κεφάλαιο 3

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Αναζήτηση γονιδίων υπεύθυνων για τις λακκάσες στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila*

Η αναζήτηση γονιδίων που κωδικοποιούν πιθανές λακκάσες στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila* έγινε με χρήση πρωτεϊνικών αλληλουχιών από γνωστές λακκάσες. Από τη βάση δεδομένων της Uniprot (βλ παρ. 2.8) επιλέχθηκαν οι λακκάσες του Πίνακα 3.1 για τις οποίες υπάρχουν δεδομένα στο επίπεδο της πρωτεΐνης ή ακόμα και βιβλιογραφικές αναφορές.

**Πίνακας 3.1:** Οι λακκάσες από τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων της Uniprot

A/α	Οργανισμός	Κωδικός στη Uniprot	Υπαρξη στο επίπεδο της πρωτεΐνης	Αναφορές
1	<i>Trametes versicolor</i>	Q12718	Ναι	Ong <i>et al.</i> , 1997; Piontek <i>et al.</i> , 2002
2	<i>Trametes hirsuta</i>	Q02497	Ναι	Kojima <i>et al.</i> , 1990
3	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Q9Y780	Ναι	Hoegger <i>et al.</i> , 2004
4	<i>Coriolopsis trogii</i>	Q9HDQ0	Ναι	Colao <i>et al.</i> , 2003

Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών απομονώθηκαν από την Uniprot σε μορφή FASTA και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση στο γονιδίωμα του *Myceliophthora thermophila* η οποία έγινε με τον αλγόριθμο BLAST του NCBI στο επίπεδο της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης ήταν η εύρεση έξι αλληλουχιών οι οποίες παρουσίασαν το υψηλότερο σκορ κατά τη διαδικασία ομοπαράθεσης. Στη συνέχεια εξετάστηκε το σύνολο των αλληλουχιών για την ύπαρξη ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF), την ύπαρξη εξονίων καθώς και την ύπαρξη σηματοδοτικής αλληλουχίας (signal peptide). Η ύπαρξη του πεπτιδίου οδηγού αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η πρωτεΐνη εκκρίνεται εξωκυτταρικά, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τη φύση των μυκητιακών λακκασών (εξωκυτταρικά ένζυμα) και ήταν ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την επιλογή του γονιδίου προς ανάλυση. Για την αναγνώριση των δομικών μοτίβων που υπήρχαν στις αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων της rfam ενώ με τη βάση δεδομένων της Lcced έγινε η κατηγοριοποίηση των λακκασών στις αντίστοιχες οικογένειες (βλ παρ. 2.8). Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

**Πίνακας 3.2:** Τα γονίδια του *Myceliophora thermophila* που κωδικοποιούν πιθανές λακκάσες

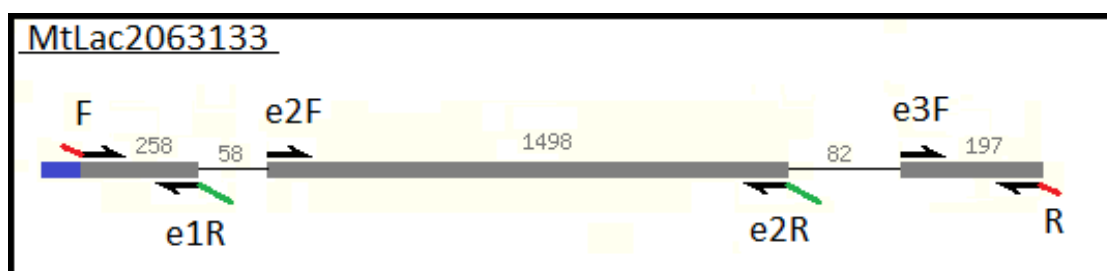
A/α	Γονίδιο	Κωδικός NCBI	Μέγεθος (χιλιάδες ζ.β.)	Αριθμός εξονίων
1	extracellular laccase lcc1	XP 003663741.1	2.5	6
2	Copper binding domain- containing laccase	XP 003659843.1	2.3	5
3	Hypothetical protein MYCTH 2300167	XP 003661125.1	1.9	3
4	Laccase like protein (Lac2063133)	XP 003664404.1	2.1	3
5	Multicopper oxidase	XP 003666430.1	2.6	6
6	Hypothetical protein MYCTH 2112160	XP 003665280.1	0.9	3

A/α	ORF	Υπαρξη μοτίβων δέσμευσης χαλκού (pfam)	Οικογένεια (Lcced)	Πεπτίδιο οδηγός	Αναφορές
1	Ναι	3 τύποι (T1,T2,T3)	H Family B1	Ναι (θέση 21/22)	Berka <i>et al.</i> , 1997
2	Ναι	3 τύποι (T1,T2,T3)	H Family B1	Όχι	-
3	Όχι	-	-	-	-
4	Ναι	3 τύποι (T1,T2,T3)	H Family F1	Ναι (θέση 20/21)	-
5	Όχι	-	-	-	-
6	Ναι	2 τύποι (T1,T3)	H Family B1	Όχι	-

Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την ανάλυση επιλέχθηκε το γονίδιο Lac2063133. Το συγκεκριμένο γονίδιο παρουσίασε μικρό αριθμό εξονίων γεγονός το οποίο επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου της επικαλυπτόμενης PCR (overlapping PCR), ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, μοτίβα δέσμωσης χαλκού των τριών τύπων (T1,T2,T3) καθώς και σηματοδοτική αλληλουχία (πεπτιδίο οδηγό). Σύμφωνα με την ιστοσελίδα <http://genome.jgi.doe.gov/Spoth2> που περιλαμβάνει όλες τις γνωστές πληροφορίες για τον *Myceliophthora thermophila* το γονίδιο βρίσκεται στο τέταρτο χρωμόσωμα και αναφέρεται ως μία πρωτεΐνη που μοιάζει με λακκάση (laccase-like protein).

### 3.2 Δομή και χαρακτηριστικά του γονιδίου Lac2063133

Η απομόνωση της αλληλουχίας του γονιδίου προς ανάλυση έγινε από τη βάση δεδομένων του *Myceliophthora thermophila* (βλ παρ. 2.8). Το γονίδιο έχει συνολικό μέγεθος 2093 ζ.β. και αποτελείται από 3 εξόνια μεγέθους 258, 1498, 197 ζ.β. τα οποία διακόπτονται από 2 ιντρόνια μεγέθους 58 και 82 ζ.β. (Εικόνα 3.1). Για την εφαρμογή της επικαλυπτόμενης PCR σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών (βλ. παρ 2.4.2) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα oligocalc (βλ παρ. 2.8).



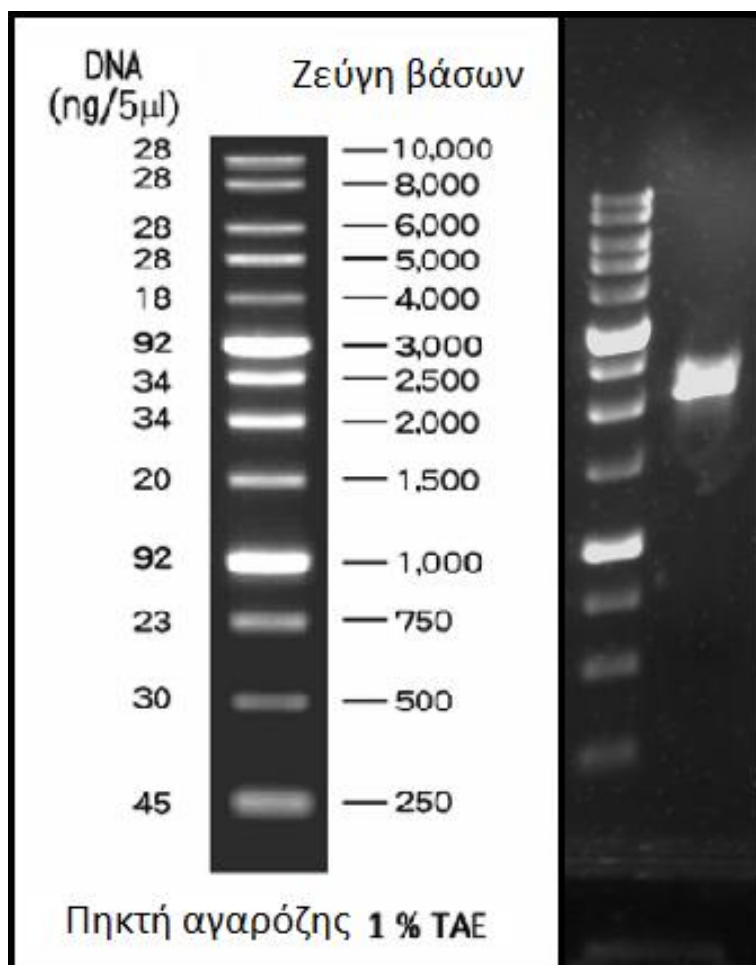
**Εικόνα 3.1** – Η δομή του γονιδίου Lac2063133 συνολικού μεγέθους 2093 ζ.β. Τα 3 εξόνια μεγέθους 258, 1498, 197 ζ.β. διακόπτονται από 2 ιντρόνια μεγέθους 58 και 82 ζ.β. Με μπλέ χρώμα παρουσιάζεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο οδηγό. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα αιωρούμενα τμήματα που περιέχουν τις θέσεις περιορισμού ενώ με πράσινο χρώμα τα αιωρούμενα τμήματα που σχεδιάστηκαν για την συνένωση των εξονίων.

Σημαντικά χαρακτηριστικά κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών αποτελούν i) οι θέσεις περιορισμού για την ένθεση του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPICZαA ii) τα αιωρούμενα τμήματα (overhangs) για την συνένωση των εξονίων iii) η παράλειψη του πεπτιδίου οδηγού (χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας έκκρισης α-factor του *Saccharomyces cerevisiae*) iv) η παράλειψη του κωδικονίου λήξης και v) ο σχεδιασμός των εκκινητών ώστε να υπάρχει μεταγραφική συνέχεια μετά την εισαγωγή στον φορέα έκφρασης pPICZαA (in frame).

### 3.3 Ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 από γενομικό DNA του *Myceliophthora thermophila* – Αφαίρεση των εξονίων με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR

#### 3.3.1 Απομόνωση του γονιδίου Lac2063133

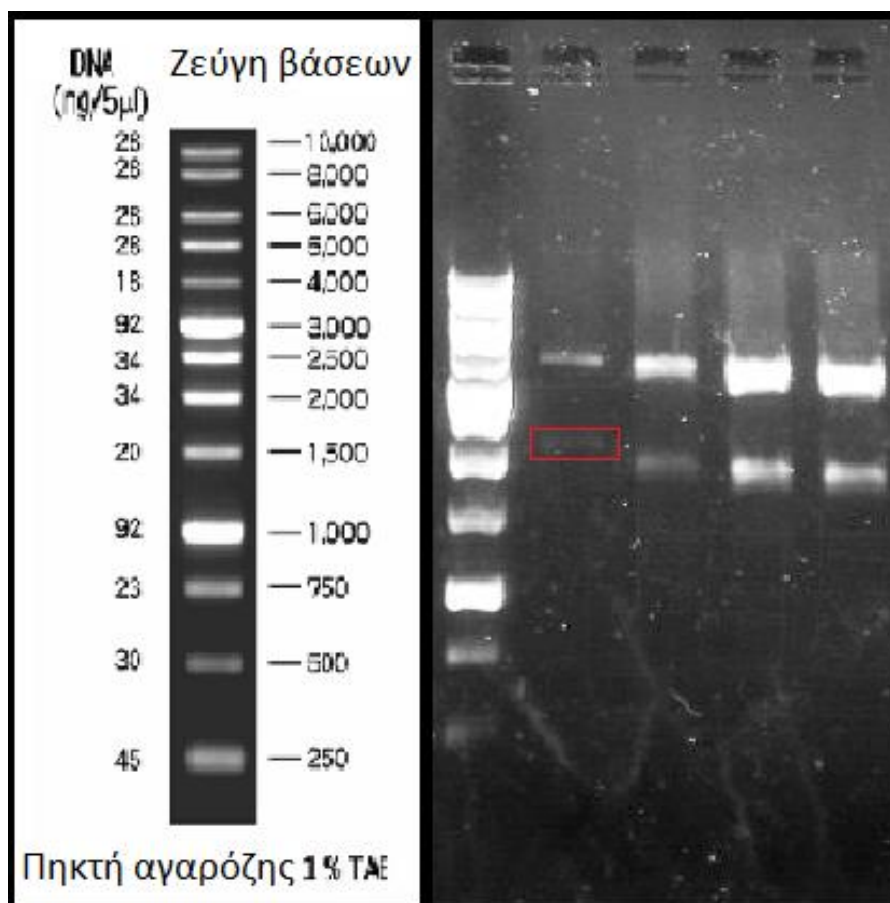
Η ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 μαζί με τα ιντρόνια έγινε με χρήση των εκκινητών MtLac2063133F και MtLac2063133R (βλ. παρ 2.4.2). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση-καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος μεγέθους 2048 ζευγών βάσεων. Το καθαρισμένο προϊόν παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2.



**Εικόνα 3.2** – Ηλεκτροφόρηση του καθαρισμένου προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133. Το γονίδιο μαζί με τα ιντρόνια έχει μέγεθος 2048 ζ.β.

Ο έλεγχος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε με την PCR και η αντιστοίχισή του με το γονίδιο Lac2063133 έγινε μέσω αλληλούχισης. Αρχικά το γονίδιο ενσωματώθηκε στον φορέα pCR® Blunt της Invitrogen με δράση της T4 λιγάσης (βλ παρ 2.4.5). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του πλασμιδίου με χρήση των βακτηριακών

κυττάρων *Escherichia coli* Top10. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (βλ παρ 2.4.7.1). Οι ανθεκτικοί κλώνοι αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB όγκου 5ml από τις οποίες έγινε η απομόνωση του πλασμιδίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη μίας μικρής ποσότητας του πλασμιδίου ώστε να εξεταστεί η ποιότητα του πλασμιδίου που απομονώθηκε πριν την αλληλούχισή του Εικόνα 3.3. Το στάδιο αυτό αποτέλεσε ένα στάδιο ελέγχου ώστε να επιβεβαιωθεί η ένθεση του επιθυμητού τμήματος DNA στον φορέα έκφρασης.



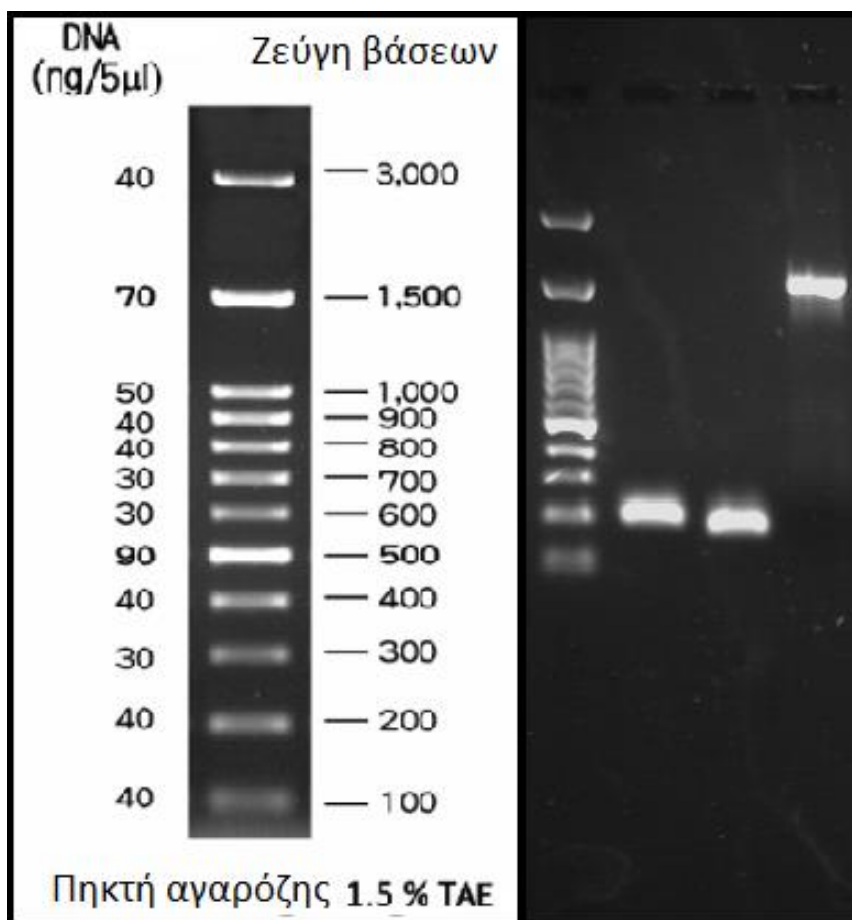
**Εικόνα 3.3** – Διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της σωστής ένθεσης του γονιδίου Lac2063133, πριν την αποστολή του για αλληλούχιση. Με κόκκινο σημειώνεται το γονίδιο που περιέχει ιντρόνια. Στα υπόλοιπα δείγματα το γονίδιο δεν περιέχει ιντρόνια. Η ζώνη των ~3.500 ζ.β. αντιστοιχεί στον φορέα έκφρασης.

Επαρκής ποσότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εστάλη στην εταιρεία VBC – Biotech Services GmbH (Αυστρία) για αλληλούχιση, η οποία επιβεβαίωσε την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου. Η σύγκριση των πληροφοριών της αλληλούχισης με τα δεδομένα για το αγρίου τύπου γονίδιο έγινε με ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών με το πρόγραμμα ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007). Αναλυτικά η σύγκριση των αλληλουχιών βρίσκεται στο Παράρτημα Α.



### 3.3.2 Αφαίρεση των ιντρονίων με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR

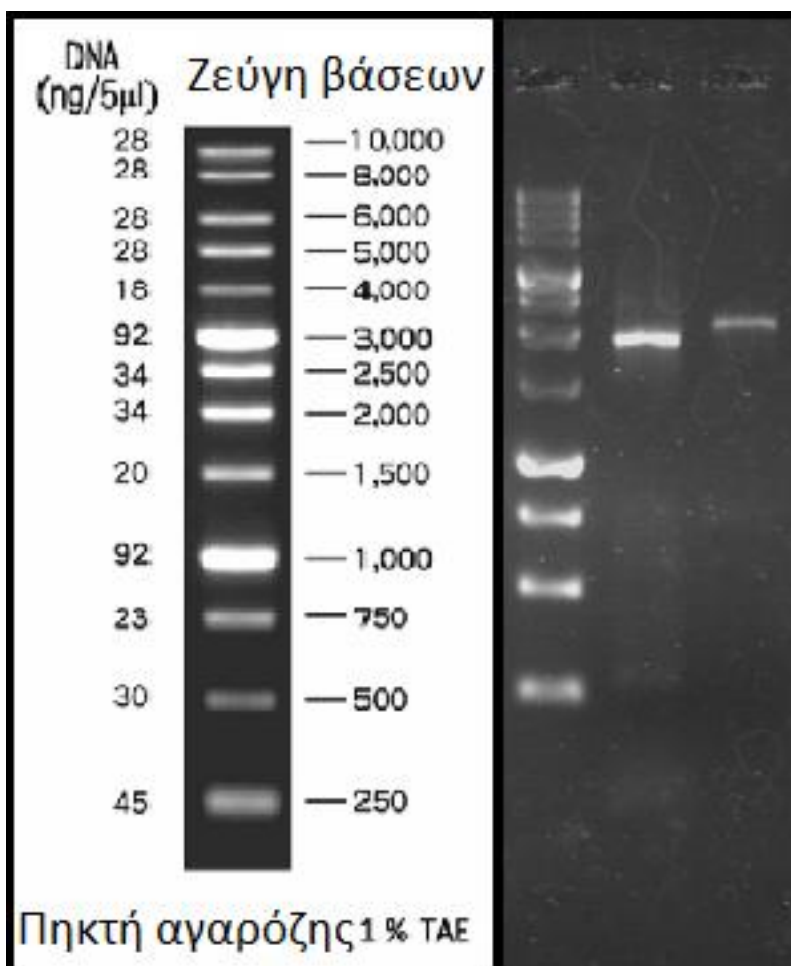
Η απομόνωση των εξονίων έγινε πραγματοποιώντας τρεις διαφορετικές αντιδράσεις με χρήση των διαφορετικά ζευγών εκκινητών που σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης PCR (βλ παρ 2.4.2). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR® Blunt που περιείχε το γονίδιο Lac2063133 ως DNA μήτρα. Αντίστοιχα με την ενίσχυση του γονιδίου Lac2063133 πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του κάθε εξονίου ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας φαίνονται στην Εικόνα 3.4.



**Εικόνα 3.4** – Τα εξόνια του γονιδίου Lac2063133 μετά από την ενίσχυση με τα 3 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Στην πρώτη θέση παρουσιάζεται το πρώτο εξόνιο μεγέθους 221 ζ.β., στη δεύτερη θέση το τρίτο εξόνιο μεγέθους 201 ζ.β. και στην τρίτη θέση το δεύτερο ιντρόνιο μεγέθους 1514 ζ.β.

Ακολούθησε συνένωση των εξονίων με μια τελευταία αντίδραση PCR. Τα επικαλυπτόμενα τμήματα των εξονίων επέτρεψαν την σύνδεση των διαφορετικών τμημάτων DNA. Η αντίδραση έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν στα άκρα του γονιδίου (MtLac2063133F και MtLac2063133R). Το προϊόν μετά από απομόνωση και καθαρισμό

ηλεκτροφορήθηκε σε σύγκριση με το γονίδιο Lac2063133 που περιείχε τα ιντρόνια. Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται η μικρή αλλαγή του μεγέθους του γονιδίου μετά την αφαίρεση των ιντρονίων, μείωση που αντιστοιχεί σε 140 ζεύγη βάσεων (ιντρόνιο 1 - 58 ζ.β. και ιντρόνιο 2 - 82 ζ.β.).



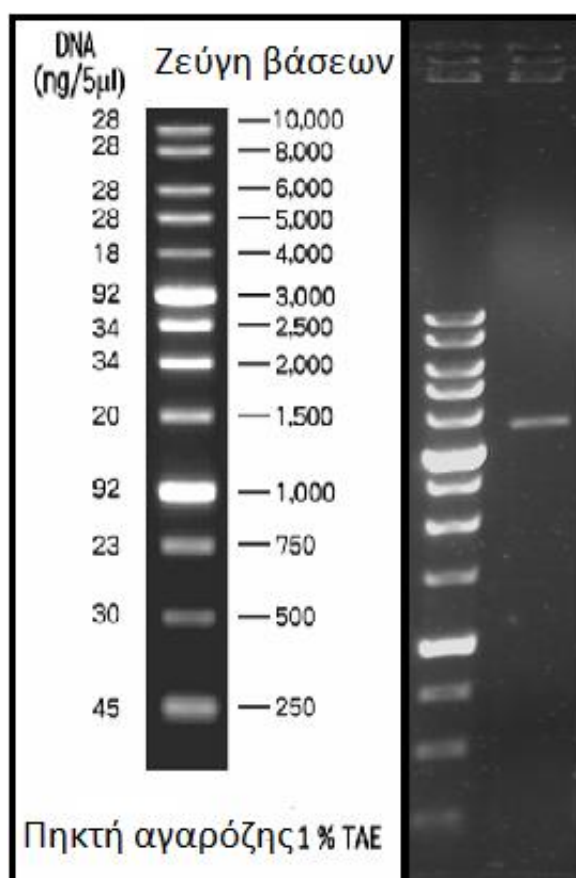
**Εικόνα 3.5** – Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της επικαλυπτόμενης PCR. Στην πρώτη θέση παρουσιάζεται το γονίδιο που δεν περιέχει τα ιντρόνια. Στη δεύτερη θέση για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται το γονίδιο μαζί με τα ιντρόνια. Η διαφορά του μεγέθους αντιστοιχεί σε 140 ζ.β.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με αυτή της αξιολόγησης του γονιδίου Lac2063133 που περιείχε τα ιντρόνια, το προϊόν της επικαλυπτόμενης PCR ενσωματώθηκε στον φορέα έκφρασης pCR® Blunt με δράση της T4 λιγάσης και πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* Top10. Ποσότητα του πλασμιδίου εστάλη προς αλληλούχιση και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση με το γονίδιο αγρίου τύπου για να επαληθευθεί η αφαίρεση των ιντρονίων. Στο Παράρτημα Β παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της στοίχισης το οποίο επιβεβαίωσε ότι τα προϊόν της επικαλυπτόμενης PCR δεν περιείχε τα ιντρόνια.

### 3.4 Ενσωμάτωση του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPicZαA και μετασχηματισμός κυττάρων της ζύμης *Pichia pastoris*

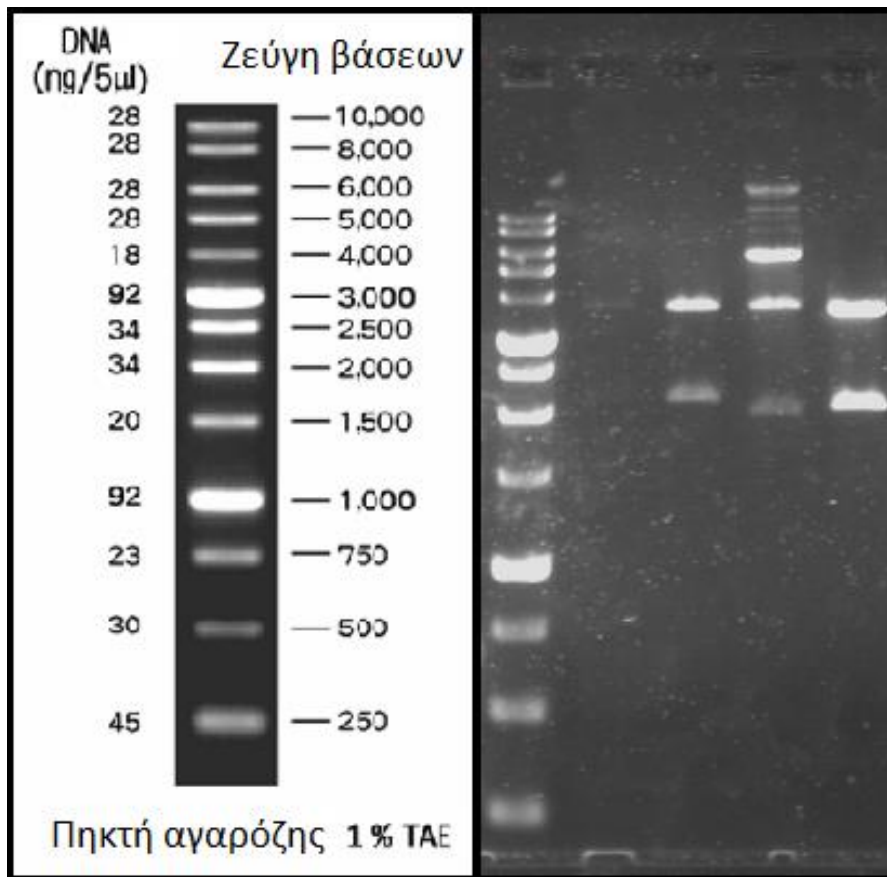
#### 3.4.1 Ενσωμάτωση του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pPicZαA

Η ένθεση στο πλασμίδιο pPICZαA έγινε χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI. Επομένως για την απομόνωση του πλασμιδίου με κολλώδη άκρα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός του γραμμικού pPICZαA. Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται το καθαρισμένο προϊόν της διπλής πέψης του φορέα έκφρασης pPICZαA.



**Εικόνα 3.6** – Το πλασμίδιο pPICZαA μετά την επεξεργασία με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI. Τα κολλώδη άκρα που σχηματίστηκαν έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην προσανατολισμένη ένθεση του γονιδίου Lac2063133 στον φορέα έκφρασης.

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCR® Blunt ώστε να απομονωθεί το γονίδιο σε γραμμική μορφή με κολλώδη άκρα. Στην Εικόνα 3.7 φαίνεται το αποτέλεσμα της πέψης δύο διαφορετικών πλασμιδίων pCR® Blunt. Το ένα περιείχε το γονίδιο με τα ιντρόνια ενώ το δεύτερο περιείχε το γονίδιο χωρίς τα ιντρόνια ώστε να είναι δυνατή η συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων.



**Εικόνα 3.7** – Διπλή πέψη του αναδυνδασμένου πλασμιδίου pCR® Blunt για την απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου. Στις πρώτες δύο θέσεις παρουσιάζονται αντιδράσεις που αντιστοιχούν στο γονίδιο με τα ιντρόνια. Η ζώνη των ~3.500 ζ.β. αντιστοιχεί στο πλασμιδιακό φορέα pCR® Blunt ενώ το μικρότερο τμήμα ~2000 ζ.β. στο γονίδιο με τα ιντρόνια. Στις δύο τελευταίες θέσεις παρουσιάζονται οι αντιδράσεις που αντιστοιχούν στο γονίδιο χωρίς τα ιντρόνια. Τα τμήματα DNA στην 3<sup>η</sup> θέση τα οποία υπερβαίνουν τα 4000 ζ.β. αντιστοιχούν στις διαφορετικές υπερελικώσεις του άκοπου πλασμιδίου.

Η ζώνη που αντιστοιχούσε στο επιθυμητό γονίδιο Lac2063133 χωρίς τα ιντρόνια απομονώθηκε και καθαρίστηκε ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αντίδραση συνένωσης με το pPICZαA. Για τη συνένωση γονιδίου και φορέα έκφρασης πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενθέματος καθώς και αντιδράσεις ελέγχου (βλ. παρ 2.4.5). Το προϊόν της κάθε αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* Top10. Η επιλογή των ανθεκτικών κλώνων έγινε με το αντιβιοτικό ζεοσίνη. Όπως ήταν αναμενόμενο τα προϊόντα από τις αντιδράσεις ελέγχου δεν έδωσαν ανθεκτικούς κλώνους καθώς δεν περιείχαν το λειτουργικό κυκλικό πλασμίδιο. Στη συνέχεια οι αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pPICZαA χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας του ανασυνδασμένου φορέα.

### 3.4.2 Μετασηματισμός κυττάρων της ζύμης *Pichia pastoris*

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μετασηματισμού της *Pichia pastoris* είναι απαραίτητη η γραμμικοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα ώστε να επιτευχθεί είσοδος του ξένου DNA στα κύτταρα της ζύμης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZαA με το ένζυμο περιορισμού PmeI. Αποτέλεσμα της αντίδρασης ήταν η παραγωγή μεγάλης ποσότητας γραμμικού DNA με ισοτελή («τυφλά») άκρα. Το προϊόν καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας υπερκάθαρο νερό για την τελική έκπλυση του DNA. Το βήμα αυτό ήταν απαραίτητο για την απομόνωση του γραμμικού πλασμιδίου σε διάλυμα χωρίς άλατα, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει πρόβλημα στην διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης.

Ακολούθησε ηλεκτροδιάτρηση επιδεικτικών κυττάρων *Pichia pastoris* (βλ παρ 2.4.7.2) και απομόνωση των ανθεκτικών κλώνων με χρήση του αντιβιοτικού ζεοσίνη. Στη συνέχεια τα ανθεκτικά στελέχη αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με τα θρεπτικά μέσα MD (Minimal Dextrose medium) και MM (Minimal Methanol medium) τα οποία περιείχαν ABTS ώστε να ελεγχθεί σε πρώτο στάδιο η παραγωγή και ενεργότητα της πρωτεΐνης. Κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη δεν παρουσίασε ικανότητα οξειδωσης του ABTS, χημικό μόριο στο οποίο οι λακκάσες παρουσιάζουν μεγάλη ενεργότητα.

## 3.5 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης Lac2063133 από τα μετασηματισμένα κύτταρα *Pichia pastoris*

### 3.5.1 Θεωρητικά χαρακτηριστικά της εκκρινόμενης πρωτεΐνης

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα για την αλληλουχία του πλασμιδίου pPICZαA αλλά και την αλληλουχία του γονιδίου Lac2063133 πραγματοποιήθηκε έλεγχος των θεωρητικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης. Το μήκος της πρωτεΐνης υπολογίστηκε σε 746 αμινοξέα η αλληλουχία των οποίων παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8. Στην αλληλουχία περιλαμβάνονται τα αμινοξέα του πεπτιδίου οδηγού καθώς και τα αμινοξέα της σήμανσης με ιστιδίνη.

Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο βρίσκεται στο pH 5 και το μοριακό βάρος στα 82 kDa, δεδομένα που προέρχονται από το πρόγραμμα ExPASy mw/Pi (ακριβείς τιμές pI/Mw: 4.97 / 82324.69) (βλ παρ. 2.8). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πιθανών θέσεων O- ή N- γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τα προγράμματα NetOglyc και NetNglyc (βλ παρ. 2.8). Στον Πίνακα 3.3 συνοψίζονται τα θεωρητικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης.

```

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV AVLPFSNSTN
NGLLFINTTI ASIASIAAKE EGVSLKREA EAEFGTLVHD EQFIPDHILR VSVAQVPSAC
ENREDDVVNG TSPGPAILHL PGARTWIRVY NDMNDRNLSM HWHGLSQRFA PFSDBGTPSAT
QWPIPPGHFF DYEILTEPED AGTYFYHSHV GMAALSCTGP LIVEDCGSSP YHYDDERILL
FQDHFQKSDL EMIQGLTSTQ FTWTGETRGI LLNGRQVSPN QAAVQGRPGE ASGFFGSHRF
SNFRAGDGTS NSWGIRGDD QIEPPTDCTL PVIDVEPGKT YRLRFIGATG LSLTMTMGFED
HNDLTIQVD GSEYNAPVTV DHIQLGGGQR FDVLLRKTAKTA EELRCNGDKT TYFLQFETRD
RPDPYRGYGV LRYNLGTPVP AAPTTPALTL PAEVNNWLEY TFQPLHPSSS LSPTAEVTR
RVILEAEQKI DPATGRLVWK LAHMTWTDMS RDKPVLVDIY ERGEAAMPDY AAALTNYGWD
PATKLFPAKK DEVLEIVIQN TGSHYSGASG IVETHPFHAH GQHFYDVGSG PGKYDPEANN
AKLASLGYRP IKRDTTMVYR YGEGKVAPGE PAGWRWRMK MNNPGVWVMH CHILAHMIMG
METIWWVGDA EDIVTIPLSV SQNYFTYGGG VYGNDRHAPV VYHYFDDTNK CCAAGAGDSE
DSGHLEQKLI SEEDLNSAVD HHHHHH

```

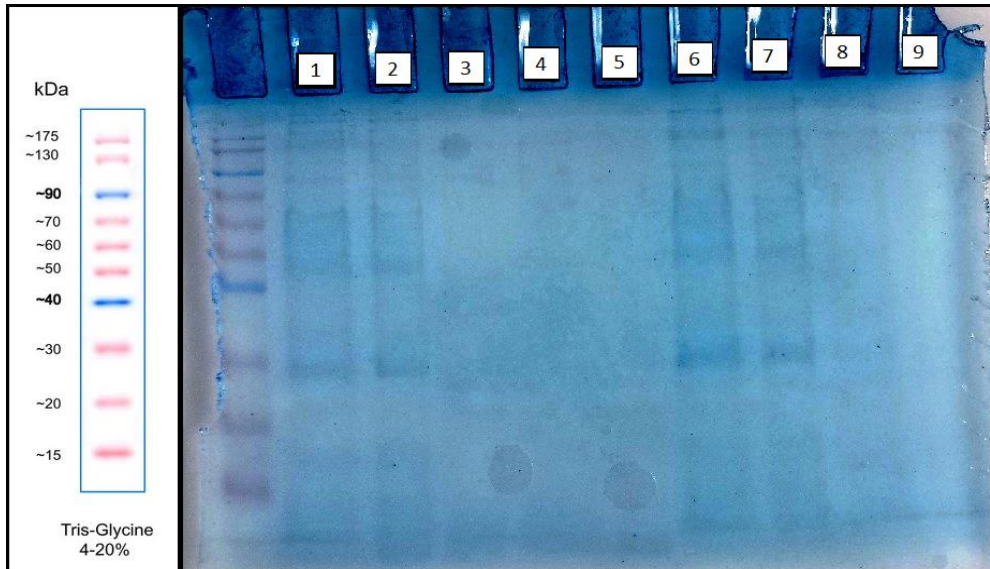
**Εικόνα 3.8** – Η αλληλουχία των 746αα που εκφράζονται από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZαA. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία του παράγοντα έκκρισης του *Saccharomyces cerevisiae* (a-factor) ενώ με μπλε χρώμα σημειώνεται η σήμανση των 6 καταλοίπων ιστιδίνης (Histidine tag).

**Πίνακας 3.3:** Θεωρητικά χαρακτηριστικά της ετερόλογα εκφραζόμενης πρωτεΐνης

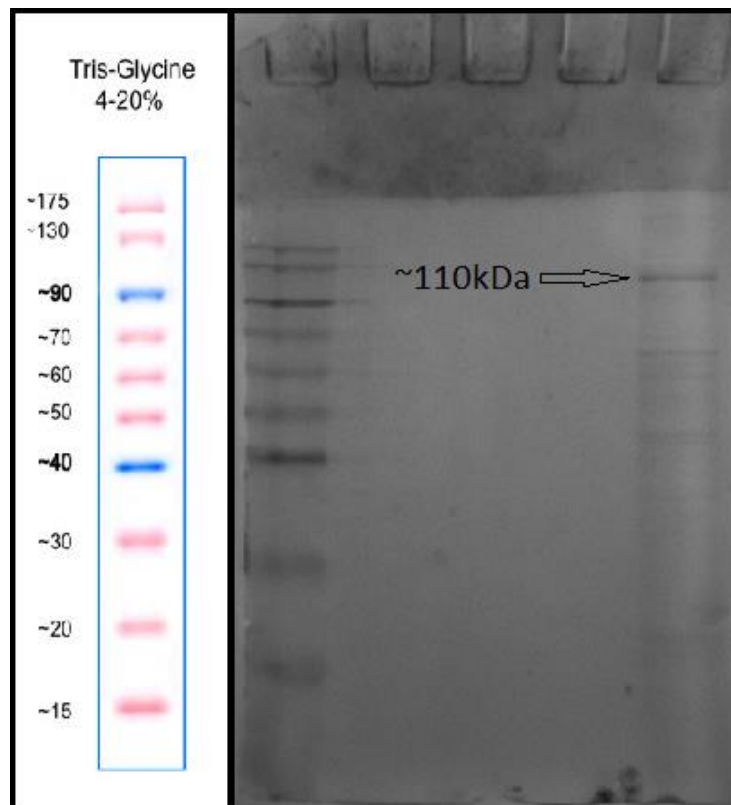
Πρωτεΐνη	Μήκος	Μοριακό βάρος	Ισοηλεκτρικό σημείο	Ο-γλυκοζυλίωση	N-γλυκοζυλίωση
Lac2063133	746 αα	82 kDa	pH 5	10 πιθανές θέσεις	4 πιθανές θέσεις

### 3.5.2 Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης

Με σκοπό την απομόνωση της πρωτεΐνης Lac2063133 πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες των ανθεκτικών κλώνων σε θρεπτικά μέσα BMGY (Buffered Glycerol complex medium) και BMMY (Buffered Methanol complex medium). Οι καλλιέργειες BMGY ήταν υπεύθυνες για την παραγωγή βιομάζας η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών BMMY. Στις καλλιέργειες όπου μοναδική πηγή άνθρακα αποτελούσε η μεθανόλη (BMMY) έγινε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης η οποία εκκρίθηκε εξωκυτταρικά. Ακολούθησε διαχωρισμός των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό με φυγοκέντρηση και διήθηση του υπερκείμενου. Η διήθηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαδοχικά φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2 μm (Pall Supor Membrane Disc Filters, Pall Filters) (βλ παρ. 2.5.1). Το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 10 ml (βλ παρ. 2.5.2) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) (βλ παρ. 2.5.4). Στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης μετά από χρώση με την Coomassie Blue.



**Εικόνα 3.9** – Ηλεκτροφόρηση συνολικών πρωτεϊνών από 4 διαφορετικά στελέχη που εκφράζουν την πρωτεΐνη Lac2063133. Στις θέσεις 1-4 και 6-9 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες από 4 διαφορετικά στελέχη σε διάστημα 2 και 4 ημερών. Στη θέση 5 χρησιμοποιήθηκε δείγμα ελέγχου από καλλιέργεια 4 ημερών της ζύμης αγρίου τύπου.



**Εικόνα 3.10** – Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης μετά από προσπάθεια καθαρισμού με στήλη ιοντοανταλλαγής. Το μοριακό βάρος ήταν περίπου 110 kDa, ωστόσο παρουσιάστηκαν πολλαπλές ζώνες, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή καταστροφή της πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της ηλεκτροφόρησης η ετερόλογη έκφραση ήταν επιτυχής, με τις μετασχηματισμένες καλλιέργειες να εκκρίνουν εξωκυτταρικά μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης. Ωστόσο οι πολλαπλές ζώνες που παρουσιάστηκαν υποδηλώνουν τεμαχισμό της πρωτεΐνης. Ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Στην Εικόνα 3.10 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του καθαρισμού. Η χρώση της πηκτής πραγματοποιήθηκε με νιτρικό άργυρο (silver staining).

Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα ExPASy mw/Pi ήταν 82 kDa. Ωστόσο παρατηρήθηκε αύξηση του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης, γεγονός που οφείλεται στην υπεργλυκοζυλίωση της από την *Pichia pastoris*. Το τελικό μοριακό βάρος της Lac2063133 προσεγγίζει τα 110kDa.

### 3.5.3 Ενεργότητα της πρωτεΐνης Lac2063133

Η πρωτεΐνη Lac2063133 έχει καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων του *Myceliophthora thermophila* ως μία οξειδάση χαλκού που μοιάζει με λακκάση (multicopper laccase-like protein). Σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προέκυψαν μετά την επεξεργασία της πρωτεϊνικής αλληλουχίας από τις βάσεις δεδομένων rfam και Lcced (βλ παρ 3.1) πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας της Lac2063133 στα υποστρώματα ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] και ασκορβικό οξύ (βλ παρ 2.6).

Οι αντιδράσεις ελέγχου της ενεργότητας έγιναν χρησιμοποιώντας τα διαλύματα της πρωτεΐνης από τις καλλιέργειες των ανασυνδυασμένων κυττάρων *Pichia pastoris*, πριν και μετά την συμπύκνωσή της καθώς και μετά από τον καθαρισμό της. Οι αντιδράσεις οξείδωσης του ABTS πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακέτα. Για τις αντιδράσεις του δείγματος-μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά διαλύματα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί βρασμός 30 λεπτών. Σε κανένα από τα διαλύματα δεν παρατηρήθηκε οξείδωση του ABTS.

Οι αντιδράσεις οξείδωσης του ασκορβικού οξέος έγιναν ακολουθώντας το πρωτόκολλο της Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) το οποίο στηρίζεται στη μείωση της απορρόφησης που παρουσιάζεται στα 245 nm κατά την οξείδωση του ασκορβικού. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε εύρος θερμοκρασιών (20-50°C). Ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 245 nm. Για καμία από τις αντιδράσεις δεν παρουσιάστηκε σαφής ένδειξη που να υποδηλώνει οξείδωση του ασκορβικού οξέος από την πρωτεΐνη Lac2063133.



### 3.6 Πολυμερισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση της λακκάσης του *Myceliophthora thermophila*

Η εμπορικά διαθέσιμη λακκάση του *Myceliophthora thermophila* η οποία έχει χαρακτηριστεί από τον Berga και τους συνεργάτες του χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό ενός εύρους φαινολικών ενώσεων (βλ παρ. 2.9). Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθορισμός των Unit του ενζύμου (novozymes 51003) χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα ABTS (βλ παρ 2.6.1). Για τις αντιδράσεις του «τυφλού» δείγματος χρησιμοποιήθηκε ένζυμο το οποίο απενεργοποιήθηκε μετά από βρασμό 30 λεπτών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλακέτα στους 30°C για 20 λεπτά. Χρησιμοποιώντας τον τύπο των Lambert-Beer τα Unit του εμπορικού ενζύμου υπολογίστηκαν σε 1.712.571 Unit/ml.

#### 3.6.1 Πολυμερισμός της κατεχόλης

Χρησιμοποιώντας το μόριο της κατεχόλης πραγματοποιήθηκε ένα εύρος αντιδράσεων για τον έλεγχο των διαφορετικών παραμέτρων που επηρεάζουν την αντίδραση πολυμερισμού (βλ παρ. 2.9). Η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εξετάστηκε με βάση την ποσότητα του πολυμερούς που απομονώθηκε στην κάθε περίπτωση. Οι αντιδράσεις έγιναν σε όγκο 25 ml χρησιμοποιώντας κωνικές φιάλες των 100 ml και ανάδευση 200 rpm ώστε να γίνεται παροχή οξυγόνου στο διάλυμα. Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της λακκάσης.

Η απομόνωση και το ζύγισμα του πολυμερούς έγινε με μεταφορά των αντιδράσεων σε falcon και φυγοκέντρηση στα 5000 g για 20 λεπτά ώστε να καταβυθιστεί το πολυμερές. Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλύθηκε με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1-1,5 ml και μεταφέρθηκε σε erpendorfs ώστε να είναι δυνατή η λυοφυλίωση του πολυμερούς. Μετρώντας την διαφορά βάρους των erpendorfs πριν και μετά τη λυοφυλίωση καθορίστηκε το βάρος του πολυμερούς.

##### 3.6.1.1 Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση

Ο έλεγχος της επίδρασης των Unit του ενζύμου στον πολυμερισμό της κατεχόλης έγινε με ένα σύνολο αντιδράσεων. Το εύρος που εξετάστηκε ήταν 5 έως 8900 Unit στο σύνολο της αντίδρασης. Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται οι ποσότητες του πολυμερούς που απομονώθηκαν. Η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα και την αύξηση της παραγωγής του πολυμερούς χωρίς όμως η σχέση αυτή να είναι γραμμική. Για τον σκοπό

των συγκεκριμένων πειραμάτων αλλά και την οικονομική χρήση του ενζύμου η χρήση 88,8 Unit/ml θεωρήθηκε η καταλληλότερη και επιλέχθηκε για τις υπόλοιπες αντιδράσεις.

**Πίνακας 3.4:** Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης.

Unit λακκάσης στην αντίδραση (25ml)	Unit λακκάσης ανά ml	Ποσότητα πολυμερούς
5	0,2	Αδυναμία ζυγίσματος
220	8,8	Αδυναμία ζυγίσματος
440	17,6	<1 mg
2220	88,8	4,6 mg
4440	177,6	5,8 mg
8900	356	10,3 mg

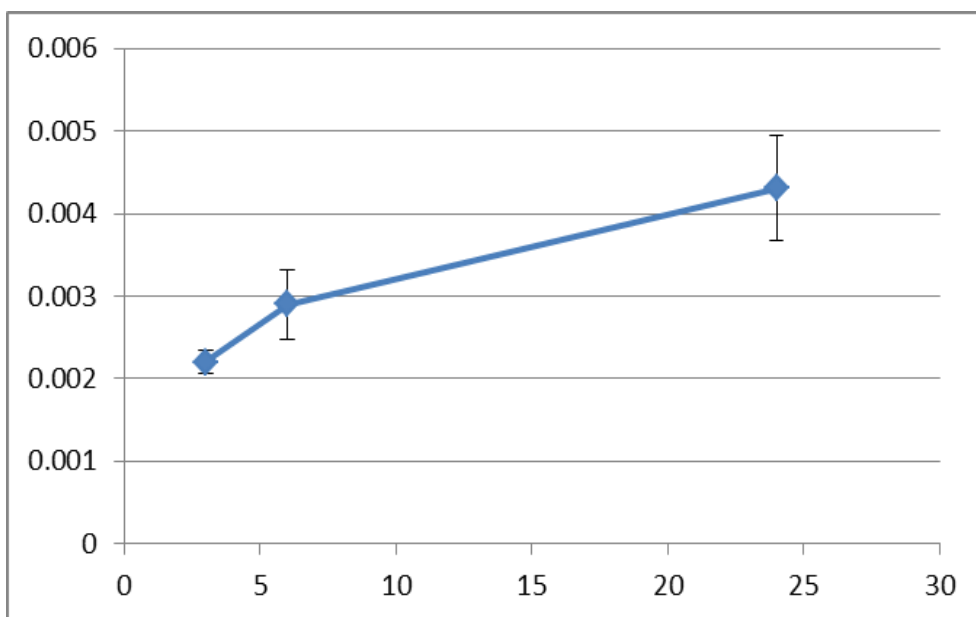
#### 3.6.1.2 Επίδραση του χρόνου στην αντίδραση πολυμερισμού

Η επίδραση του χρόνου στον πολυμερισμό της κατεχόλης εξετάστηκε με ένα σύνολο αντιδράσεων στα διαστήματα 3, 6 και 24 ωρών. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της διεργασίας.

**Πίνακας 3.5:** Επίδραση του χρόνου στην παραγωγή του πολυμερούς κατεχόλης

Χρόνος	Ποσότητα πολυμερούς (g στα 25 ml)	Τυπική απόκλιση (SD)
3 ώρες	0,0022	$1,414 \times 10^{-4}$
6 ώρες	0,0029	$4,243 \times 10^{-4}$
24 ώρες	0,0043	$6,364 \times 10^{-4}$

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.11 η παραγωγή του πολυμερούς αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο η αύξηση δεν είναι ανάλογη με τον χρόνο γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην καταστροφή του ενζύμου με την πάροδο του χρόνου.



**Εικόνα 3.11** – Η επίδραση του χρόνου στην παραγωγή του πολυμερούς. Στον οριζόντιο άξονα φαίνεται ο χρόνος σε ώρες ενώ στον κάθετο άξονα η ποσότητα του πολυμερούς σε γραμμάρια.

Για τον ευκολότερο σχεδιασμό των πειραματικών διεργασιών επιλέχθηκε η χρήση των 24 ωρών για τις αντιδράσεις πολυμερισμού όπου παρουσιάζεται η μέγιστη απόδοση.

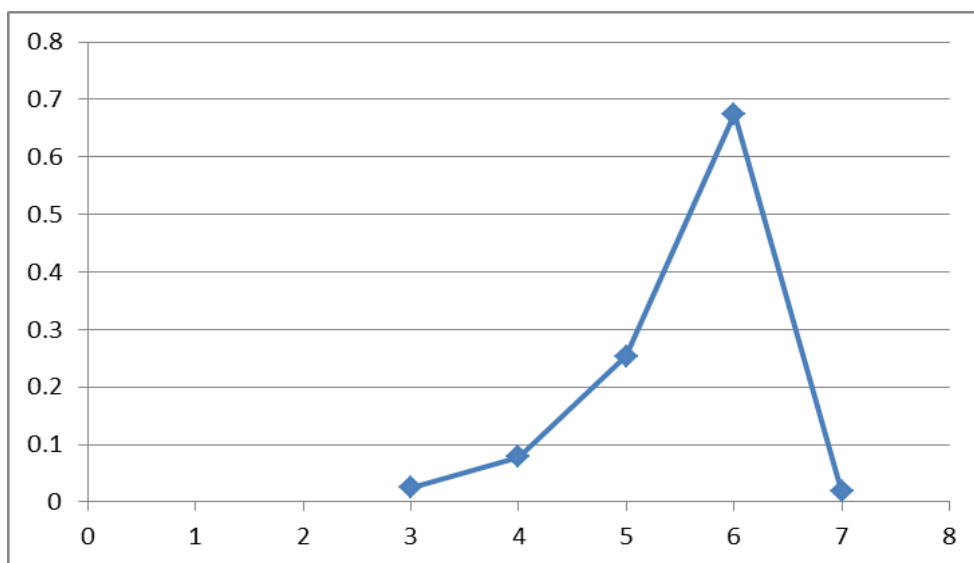
### 3.6.1.3 Επίδραση του pH στην αντίδραση πολυμερισμού

Ο έλεγχος της επίδρασης του pH στην αντίδραση πολυμερισμού έγινε με χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων στο εύρος 3-7. Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της διαδικασίας.

**Πίνακας 3.6:** Επίδραση του pH στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης

pH	Ποσότητα πολυμερούς (mg/ml)	Τυπική απόκλιση (SD)
3	0,025	$4,95 \times 10^{-4}$
4	0,079	$4,24 \times 10^{-4}$
5	0,254	$9,19 \times 10^{-4}$
6	0,675	$19,09 \times 10^{-4}$
7	0,018	$2,12 \times 10^{-4}$

Στην Εικόνα 3.12 παρουσιάζεται το διάγραμμα που προέκυψε από τα παραπάνω δεδομένα. Οι τυπικές αποκλίσεις είχαν εξαιρετικά μικρές τιμές και δεν φαίνονται στο διάγραμμα.



**Εικόνα 3.12** – Η επίδραση του pH στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι τιμές pH που εξετάστηκαν ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές του πολυμερούς που απομονώθηκε σε mg/ml.

Από τα συγκεκριμένα πειράματα βγαίνει ξεκάθαρα το συμπέρασμα ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε βέλτιστο βαθμό στην τιμή pH-6. Η πληροφορία αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με το βέλτιστο pH δράσης της λακκάσης γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο πολυμερισμός είναι αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου.

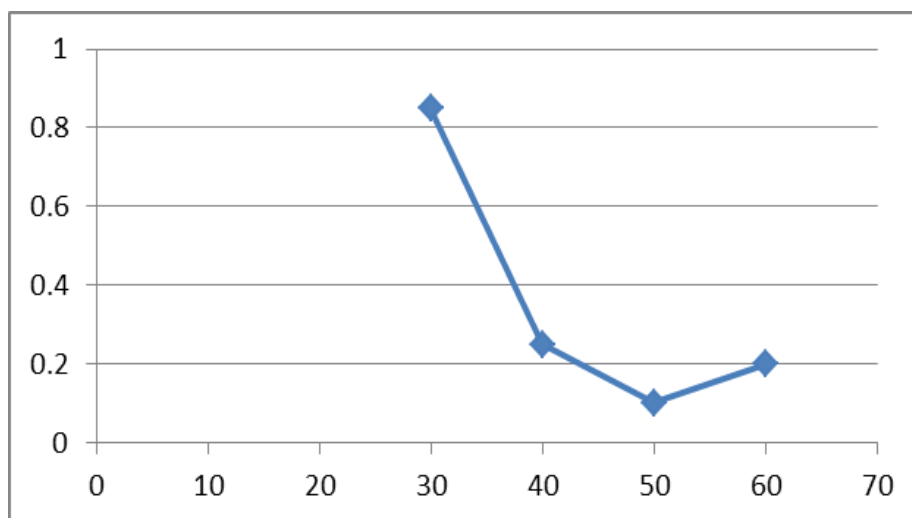
#### 3.6.1.4 Επίδραση της Θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού έγινε στο εύρος των 30-60°C. Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διεργασίας.

**Πίνακας 3.7:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού

Θερμοκρασία	Ποσότητα πολυμερούς (mg στα 14ml)	Τυπική απόκλιση (SD)
30oC	0.85	0.000636
40oC	0.25	0.000636
50oC	0.1	0
60oC	0.2	0.000283

Στην Εικόνα 3.13 παρουσιάζεται το διάγραμμα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αντίδραση πολυμερισμού της κατεχόλης. Και σε αυτή την περίπτωση οι τιμές της τυπικής απόκλισης ήταν πολύ μικρές με αποτέλεσμα να μην φαίνονται στο διάγραμμα.



**Εικόνα 3.13** – Η μεταβολή στην απόδοση της αντίδρασης πολυμερισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι τιμές της θερμοκρασίας που εξετάστηκαν ενώ στον κάθετο άξονα το βάρος του πολυμερούς που απομονώθηκε σε mg.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα η βέλτιστη θερμοκρασία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι οι 30 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία το ένζυμο φαίνεται να παρουσιάζει τη μέγιστη σταθερότητα και άρα παραμένει περισσότερο χρόνο ενεργό ώστε να συνεχίσει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια να συνεχιστεί η διαδικασία του πολυμερισμού. Η μικρή αύξηση που παρατηρήθηκε στους 60 °C οφείλεται πιθανότατα σε φαινόμενα αυτό-οξειδωσης της κατεχόλης και σχηματισμό πολυμερούς.

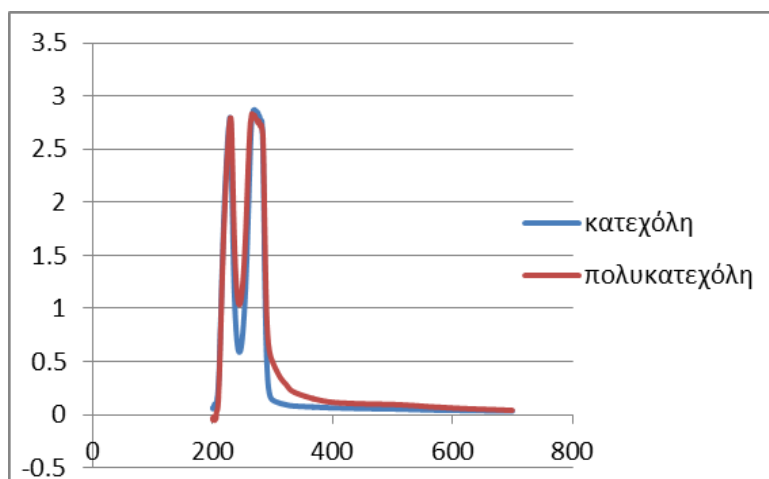
### 3.6.2 Αξιολόγηση του πολυμερούς

Η επιτυχία των αντιδράσεων πολυμερισμού αξιολογήθηκε με βάση τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και ορατό (Uv-Vis) (βλ παρ 2.7.1) καθώς και φάσματα απορρόφησης στο υπέρυθρο με τη μέθοδο FT-IR (βλ παρ 2.7.2). Τα φάσματα αυτά προσέφεραν τις βασικότερες πληροφορίες για την επιβεβαίωση του πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων.

#### 3.6.2.1 Φάσματα απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες (Uv-Vis)

Οι μετρήσεις στο εύρος του ορατού-υπεριώδους (200-700 nm) έγιναν χρησιμοποιώντας το διάλυμα των αντιδράσεων. Λήφθηκαν τα φάσματα για τις αντιδράσεις

πολυμερισμού αλλά και για τις αντιδράσεις ελέγχου οι οποίες περιείχαν απενεργοποιημένο ένζυμο. Πριν τη μέτρηση των δειγμάτων έγινε καταγραφή της απορρόφησης του ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα (baseline), η οποία αφαιρέθηκε αυτόματα από τις τιμές των φασμάτων. Οι μετρήσεις έγιναν στο φασματοφωτόμετρο U-2900 spectrophotometer της Hitachi (Ιαπωνία). Στην Εικόνα 3.14 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα των μετρήσεων.

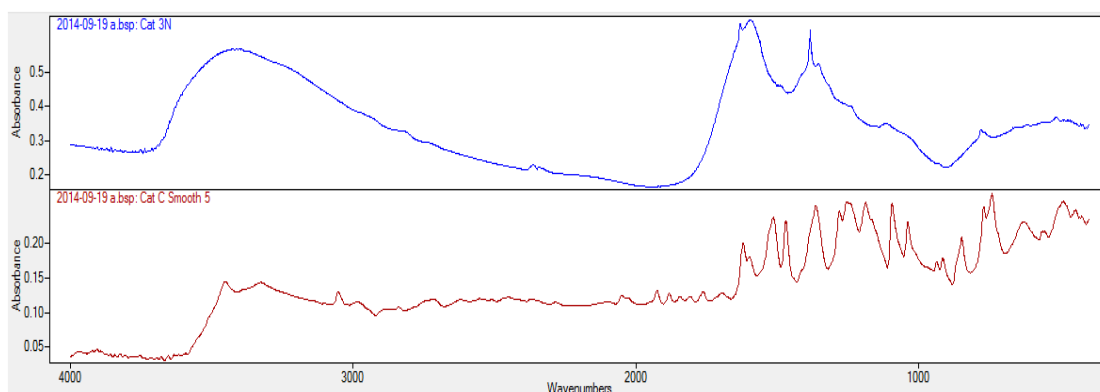


**Εικόνα 3.14** – Τα φάσματα απορρόφησης των αντιδράσεων πολυμερισμού της κατεχόλης στο ορατό-υπεριώδες. Σε σχέση με την αντίδραση ελέγχου το διάλυμα της πολυκατεχόλης παρουσιάζει αύξηση στις τιμές απορρόφησης στο εύρος 240-250 nm καθώς και στα 300-360 nm.

### 3.6.2.2 Φάσματα απορρόφησης στο υπέρυθρο (FT-IR)

Οι μετρήσεις απορρόφησης στο υπεριώδες έγιναν χρησιμοποιώντας στερεά δείγματα του πολυμερούς και του μονομερούς. Για την απομόνωση του πολυμερούς οι αντιδράσεις φιλτραρίστηκαν υπό κενό χρησιμοποιώντας ηθμούς whatman 0,45 μm. Το πολυμερές στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε ποτήρια ζέσεως όπου πραγματοποιήθηκε η λυοφυλίωσή του. Μικρή ποσότητα του πολυμερούς και του μονομερούς (~1 μg) ομογενοποιήθηκε με KBr για την κατασκευή ταμπλετών (βλ παρ 2.7.2) και τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης. Στην Εικόνα 3.15 παρουσιάζονται σε σύγκριση τα φάσματα απορρόφησης στο υπέρυθρο του μονομερούς και του πολυμερούς.

Σύμφωνα με τη μέθοδο FTIR οι διαφορετικοί χημικοί δεσμοί παρουσιάζουν χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα του υπέρυθρου (Παράρτημα Γ). Οι κορυφές που παρουσιάζονται στο εύρος  $3200-3550\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται στους δεσμούς υδροξυλίου (O-H). Οι κορυφές στα  $1620\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται στους διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα (C=C) και οι κορυφές στα  $1360\text{ cm}^{-1}$  στους δεσμούς άνθρακα-υδρογόνου (C-H). Οι σημαντικότερες κορυφές είναι αυτές που παρουσιάζονται στο πολυμερές στα  $1120\text{ cm}^{-1}$  και  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές αυτές οφείλονται στους αιθερικούς δεσμούς (C-O-C) η ύπαρξη των οποίων επιβεβαιώνει τον πολυμερισμό της κατεχόλης.



**Εικόνα 3.15** – Τα φάσματα απορρόφησης της πολυκατεχόλης και της κατεχόλης στο υπέρυθρο. Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο πολυμερές ενώ η κόκκινη στο μονομερές. Η σταθερή δομή του πολυμερούς παρουσιάζει ένα φάσμα με λιγότερες και πιο ομαλές κορυφές σε σύγκριση με το φάσμα του μονομερούς όπου παρουσιάζονται πολλές δονήσεις και κάμψεις δεσμών οι οποίες δίνουν την χαρακτηριστική εικόνα με τις πολλές κορυφές.

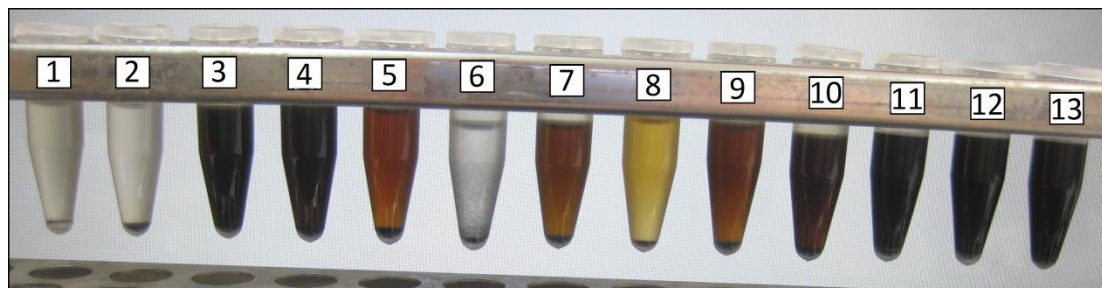
### 3.6.2.3 Διαλυτότητα του πολυμερούς

Οι διαλύτες του Πίνακα 3.8 χρησιμοποιήθηκαν για την επαναδιάλυση του πολυμερούς της κατεχόλης. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο από πολικούς και μη-πολικούς διαλύτες, ωστόσο το πολυμερές επαναδιαλύθηκε μόνο σε η,η-διμεθυλφορμαμίδιο και DMSO.

**Πίνακας 3.8:** Διαλυτότητα της πολυκατεχόλης

Διαλύτης	Αποτέλεσμα
Νερό	όχι
ΡΔ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH-6	όχι
Μεθανόλη	όχι
Αιθανόλη	όχι
Οξικό οξύ	όχι
Ακετονιτρίλιο	όχι
Εξάνιο	όχι
DMSO	ναι
η,η διμεθυλφορμαμίδιο	ναι
NaOH 1N	χαμηλή
Ακετόνη	όχι
Τετραυδροφουράνιο	όχι
Μεθυλ-αίθυλ-κετόνη	όχι

Στην Εικόνα 3.16 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επαναδιάλυσης στο σύνολο των παραπάνω ουσιών. Στην βάση των Eppendorf φαίνεται το ίζημα του πολυμερούς.



**Εικόνα 3.16** – Η διαλυτότητα της πολυκατεχόλης. 1:Νερό, 2:ΡΔ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH-6, 3:μεθανόλη, 4:αιθανόλη, 5:οξικό οξύ, 6:εξάνιο, 7:ακετόνη, 8:ακετονιτρίλιο, 9:μεθυλ-αίθυλ-κετόνη, 10:τετραυδροφουράνιο, 11:NaOH 1N, 12:n,n-διμεθυλφορμαμίδιο και 13:DMSO.

### 3.6.3 Πολυμερισμός άλλων φαινολικών ενώσεων

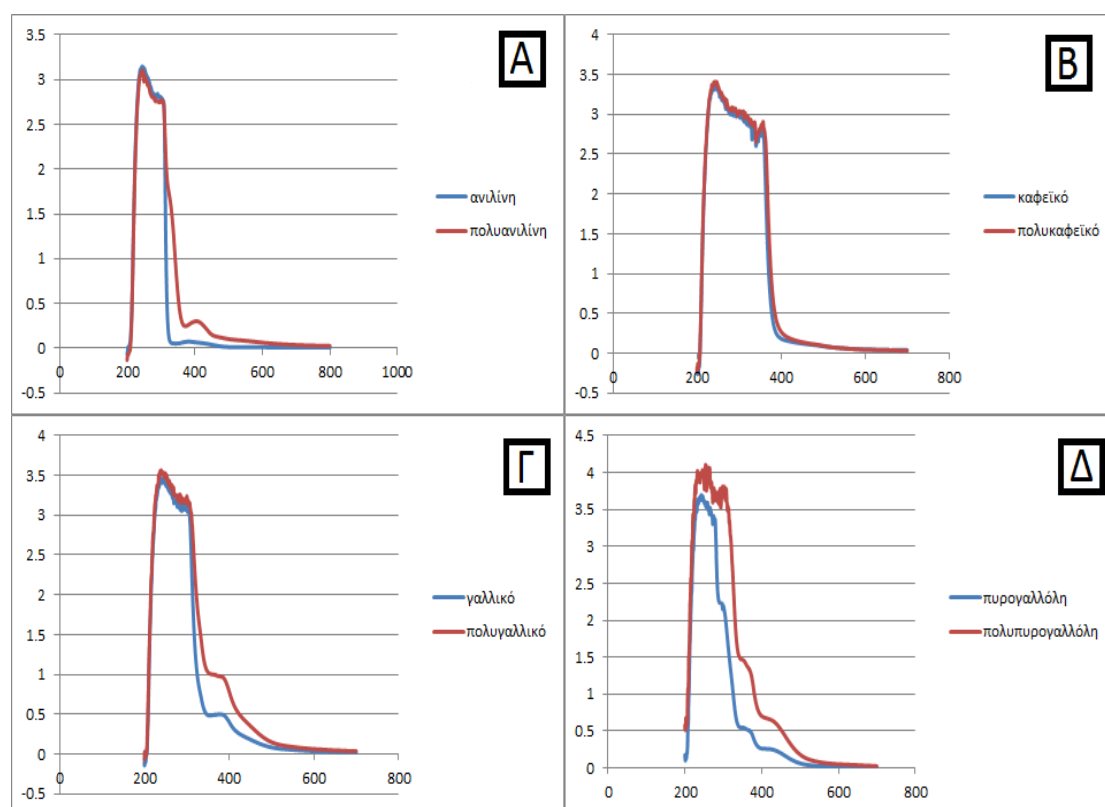
Εκτός από την κατεχόλη χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο από φαινολικές ενώσεις στις οποίες εφαρμόστηκε η διαδικασία πολυμερισμού με την λακκάση του *Myceliophthora thermophila*. Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται συνοπτικά οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιτυχία του πολυμερισμού κρίθηκε με βάση την ικανότητα απομόνωσης του πολυμερούς μετά από φυγοκέντρηση. Ωστόσο να σημειωθεί ότι σε ορισμένες ενώσεις παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διμερισμό ή ολιγομερισμό και κατά συνέπεια αδυναμίας της απομόνωσης του πολυμερούς με μία απλή φυγοκέντρηση.

**Πίνακας 3.9:** Πολυμερισμός φαινολικών ενώσεων

Ένωση	Απομόνωση πολυμερούς
Πυρογαλλόλη	ναι
Γαλλικό οξύ	ναι
Καφεϊκό οξύ	όχι
Ανιλίνη	όχι
Κατεχίνη	ναι
Υδροκινόνη	όχι
Κερσετίνη	όχι

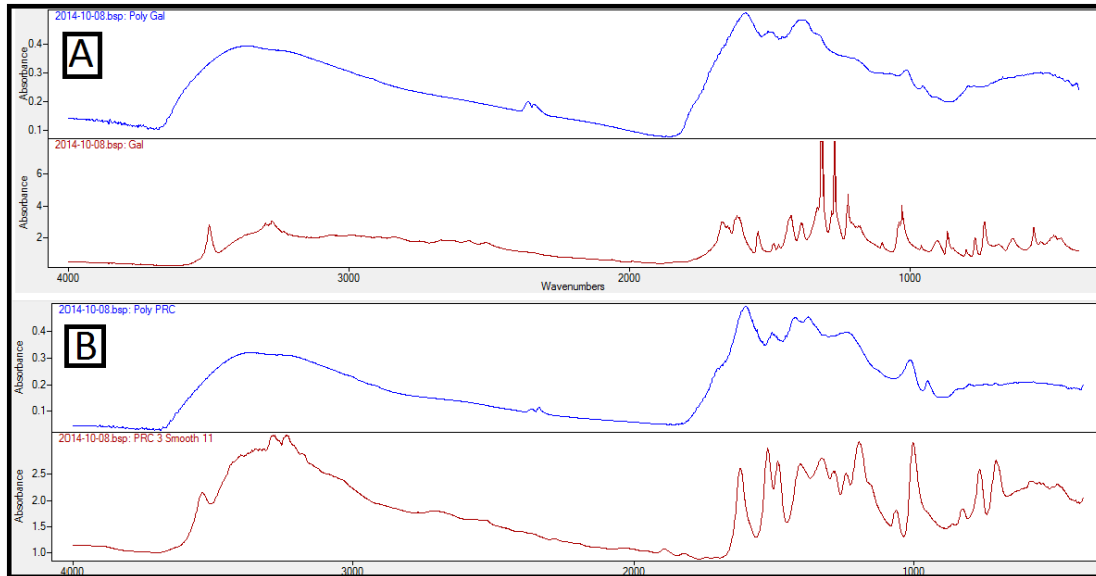


Στην Εικόνα 3.17 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες για τις αντιδράσεις πολυμερισμού της ανιλίνης, του καφεϊκού οξέος, του γαλλικού οξέως και της πυρογαλλόλης. Να σημειωθεί ότι μόνο στις περιπτώσεις του γαλλικού οξέος και της πυρογαλλόλης ήταν δυνατή η απομόνωση πολυμερούς. Ο πολυμερισμός του καφεϊκού δεν ήταν δυνατός, ενώ στην περίπτωση της ανιλίνης όπου δεν ήταν δυνατή η απομόνωση πολυμερούς παρουσιάστηκε αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm. Η παρατήρηση αυτή πιθανότατα οφείλεται τον ολιγομερισμό ή διμερισμό της ανιλίνης, ουσίες οι οποίες δεν είναι δυνατό να απομονωθούν με μία απλή φυγοκέντρηση.



**Εικόνα 3.17** – Τα φάσματα απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες για τις αντιδράσεις πολυμερισμού (Α) της ανιλίνης, (Β) του καφεϊκού οξέος, (Γ) του γαλλικού οξέως και (Δ) της πυρογαλλόλης. Στις περιπτώσεις Α,Γ και Δ παρατηρήθηκε αύξηση των απορροφήσεων σε ορισμένα μήκη κύματος μετά τον πολυμερισμό των ενώσεων. Ωστόσο στην περίπτωση Β του καφεϊκού οξέος οι καμπύλες απορρόφησης των αντιδράσεων ταυτίστηκαν.

Στην Εικόνα 3.18 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης υπέρυθρου των πολυμερών του γαλλικού οξέος και της πυρογαλλόλης. Σε όλες τις περιπτώσεις το πολυμερές παρουσιάζει ένα πιο ομαλό φάσμα το οποίο οφείλεται στην σταθερή δομή του, σε αντίθεση με το μονομερές όπου υπάρχουν πολλές κορυφές που οφείλονται στις κάμψεις και δονήσεις των δεσμών.



**Εικόνα 3.18** – Τα φάσματα απορρόφησης των μονομερών και πολυμερών του γαλλικού οξέος και της πυρογαλλόλης στο υπέρυθρο. Και στις δύο περιπτώσεις η κόκκινη καμπύλη αντιπροσωπεύει το μονομερές και η μπλε το πολυμερές.(A) Η μέτρηση για το γαλλικό οξύ (B) Η μέτρηση για την πυρογαλλόλη.

Κεφάλαιο 4

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λόγω των ξεχωριστών ιδιοτήτων τους, τη μεγάλη σταθερότητα καθώς και το εύρος των εφαρμογών τους, οι λακκάσες αποτελούν μια εντυπωσιακή ομάδα οξειδοαναγωγικών ενζύμων με χρησιμότητα στη βιοκατάλυση. Ανάλογα με τις συνθήκες των πειραματικών διεργασιών είναι δυνατό να καταλύσουν αντιδράσεις καταβολισμού αλλά και αντιδράσεις σύνθεσης-αναβολισμού. Σήμερα είναι γνωστό ένα τεράστιο εύρος από αρωματικές ενώσεις οι οποίες οξειδώνονται από τις λακκάσες. Ωστόσο με χρήση μικρών χημικών μορίων (διαμεσολαβητές - mediators) είναι δυνατό να επεκταθούν οι εφαρμογές των λακκασών σε υποστρώματα τα οποία δεν οξειδώνονται φυσιολογικά από αυτές. Το μεγάλο εύρος υποστρωμάτων σε συνδυασμό με την φιλική προς το περιβάλλον φύση αυτών των ενζύμων (οξείδωση υποστρώματος με ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου σε νερό) έχει αυξήσει σημαντικά το ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε διαφορετικά πεδία της βιοτεχνολογίας όπως επεξεργασία ξύλου στις χαρτοβιομηχανίες, αποτοξικοποίηση συνθετικών βαφών, χημική τροποποίηση ενώσεων στη φαρμακευτική και τα τρόφιμα καθώς και σε διεργασίες βιοεξυγείανσης.

Ο αριθμός των βιοτεχνολογικών εφαρμογών των λακκασών θα συνεχίσει να αυξάνεται καθώς ανακαλύπτονται σταδιακά νέα πεδία στα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η κατεύθυνση προς τη σύνθεση διμερών, ολιγομερών ή και πολυμερών με νέες ιδιότητες αποτελεί τον πιο ελκυστικό τομέα, καθώς είναι δυνατή η κατασκευή υλικών με ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική ικανότητα, ηλεκτρική αγωγιμότητα, μηχανική και θερμική αντοχή κ.α. Κατά κύριο λόγο, οι λακκάσες που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις διεργασίες είναι οι μυκητιακές λακκάσες γεγονός το οποίο οφείλεται στο ισχυρό οξειδοαναγωγικό δυναμικό που παρουσιάζουν σε σχέση με τις λακκάσες από φυτά, έντομα ή βακτήρια. Συγκεκριμένα, οι θερμοανθεκτικές λακκάσες από θερμοφίλους μύκητες παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των βιοτεχνολογικών διεργασιών πραγματοποιείται σε αυξημένες θερμοκρασίες.

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε αναζήτηση γονιδίων που κωδικοποιούν πιθανές λακκάσες στο γονιδίωμα του θερμοφίλου ασκομύκητα *Myceliophthora thermophila*. Ο μύκητας αυτός παρουσιάζει μεγάλη ικανότητα στην αποικοδόμηση κυτταρινούχου βιομάζας και είναι γνωστό ότι παράγει πλήθος θερμοανθεκτικών ενζύμων. Οι μελέτες στους θερμοφίλους οργανισμούς εστιάζουν στην εύρεση ενζύμων τα οποία θα ικανοποιούν τις βασικές συνθήκες για την εφαρμογή τους σε βιοτεχνολογικές διεργασίες, όπως θερμική αντοχή, ικανοποιητική απόδοση στις συνθήκες δράσης και μεγάλο χρόνο ημιζωής σε

συνθήκες αποθήκευσης. Ωστόσο η παραγωγή των ενζύμων από φυσικές πηγές δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες της βιομηχανίας. Επομένως είναι απαραίτητη η ετερόλογη υπερέκφραση σε κατάλληλους οργανισμούς για την απομόνωση των πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες, γεγονός που επιτρέπει τόσο την εφαρμογή τους σε βιοτεχνολογικές διεργασίες όσο και τον χαρακτηρισμό νέων ενζύμων.

Το σύστημα της μεθυλότροφης ζύμης *Pichia pastoris* αποτελεί ένα χρήσιμο και οικονομικά αποδοτικό εργαλείο για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια οι δημοσιεύσεις που αφορούν στη χρήση αυτού του συστήματος για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών έχει αυξηθεί σημαντικά διότι η ζύμη συγκεντρώνει πλεονεκτήματα όπως εύκολος χειρισμός και γενετική τροποποίηση, ασφάλεια (μη παθογόνος), σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών καθώς και σωστές ευκαρυωτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το γονίδιο που επιλέχθηκε προς ανάλυση στη συγκεκριμένη εργασία (Lac2063133) ενσωματώθηκε σε κατάλληλο φορέα έκφρασης (pPICZαA) και υπερεκφράστηκε στη ζύμη *Pichia pastoris*. Χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα έγινε επιτυχής ετερόλογη έκφραση του γονιδίου Lac2063133 του *Myceliophthora thermophila*. Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης υπολογίστηκε σε 82kDa, ωστόσο η πρωτεΐνη που απομονώθηκε είχε αυξημένο μοριακό βάρος (~110kDa) το οποίο οφείλεται στη γλυκοζυλίωσή της από την *Pichia pastoris*. Οι λακκάσες είναι από τη φύση τους ένζυμα με μεγάλο βαθμό γλυκοζυλίωσης, τροποποίηση η οποία τους προσφέρει μεγάλη σταθερότητα. Συγκεκριμένα στην πρωτεΐνη υπό μελέτη υπήρχαν συνολικά 14 θέσεις για πιθανή γλυκοζυλίωση (O- και N- ) γεγονός που δικαιολογεί την αύξηση του μοριακού βάρους που παρατηρήθηκε. Επιπλέον, στις ηλεκτροφορήσεις πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρατηρήθηκαν ορισμένες ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους αποτέλεσμα το οποίο υποδηλώνει προβλήματα στην υπερέκφραση που μπορεί να οφείλονται σε φαινόμενα πρωτεόλυσης.

Η πρωτεΐνη που μελετήθηκε είναι καταχωρημένη στην ιστοσελίδα του *Myceliophthora thermophila* (<http://genome.jgi.doe.gov/Spoth2/Spoth2.home.html>; Gene2063133 - Adrian Tsang, 2011-03-04) ως μία οξειδάση με πολλαπλά ιόντα χαλκού που μοιάζει με λακκάση (laccase like multicopper oxidase). Τα δεδομένα από τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν επιβεβαιώνουν την ύπαρξη των τριών μοτίβων δέσμευσης του χαλκού (T1 χαλκός, T2 χαλκός και δύο T3 χαλκοί) στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη εκκρίνεται εξωκυτταρικά λόγω της ύπαρξης ενός πεπτιδίου οδηγού. Η ταυτοσημία (identity) με τις γνωστές λακκάσες δεν ξεπέρασε το 25%, ωστόσο τα δεδομένα της ανάλυσης υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη που

μελετήθηκε είναι μία πιθανή λακκάση. Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων της Lcced η πρωτεΐνη κατηγοριοποιήθηκε σε μία οικογένεια στην οποία ανήκουν επίσης φυτικές και μυκητιακές οξειδάσες του ασκορβικού οξέος. Επομένως πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ενεργότητα της πρωτεΐνης στο υπόστρωμα ABTS το οποίο οξειδώνεται από τις λακκάσες καθώς και στην ικανότητα οξείδωσης του ασκορβικού οξέος. Και στις δύο περιπτώσεις δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση ενεργότητας της πρωτεΐνης. Σε ορισμένες δημοσιεύσεις αναφέρονται προβλήματα υπερέκφρασης στη ζύμη *Pichia pastoris* που οφείλονται σε φαινόμενα πρωτεόλυσης ή ακόμα και στην ύπαρξη σπάνιων κωδικονίων στην αλληλουχία που υπερεκφράζεται με αποτέλεσμα την εξάντληση των αντίστοιχων αμινοάκυλο-tRNA και πρόωρη λήξη της μετάφρασης (Daly *et al.*, 2005). Επιπλέον, υπάρχουν δημοσιεύσεις που αποδεικνύουν τη συσχέτιση της ποσότητας χαλκού στο θρεπτικό υπόστρωμα και της έκφρασης μίας λακκάσης από τον *Rychnororus coccineus* στον *Aspergillus oryzae* και τον *Saccharomyces cerevisiae* (Hoshida *et al.*, 2005). Ο χαλκός είναι απαραίτητος για τη λειτουργία της πρωτεΐνης αλλά και τη σωστή αναδίπλωσή της. Τα δεδομένα αυτά μας κατευθύνουν σε ορισμένες δοκιμές ή πειραματισμούς που μπορούν να γίνουν με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Σε πρώτη φάση είναι δυνατό να γίνει πειραματισμός με την ποσότητα του χαλκού που περιέχεται στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης της ζύμης αλλά και δοκιμές με άλλα υποστρώματα που οξειδώνονται από τις 4 οικογένειες των οξειδάσων με πολλά κατάλοιπα χαλκού (MCOs – multi copper oxidases). Για την αντιμετώπιση της πρωτεόλυσης είναι δυνατή η χρήση διαφορετικών στελεχών της ζύμης *Pichia pastoris*, όπως στελέχη τα οποία δεν διαθέτουν πρωτεάσες (protease deficient strains) ενώ για τον έλεγχο της ύπαρξης σπάνιων κωδικονίων και για το αν επηρεάζουν την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης χρειάζεται εκ νέου βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου.

Στον τομέα των πολυμερισμών, χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη λακκάση lcc1 του *Myceliophthora thermophila* η οποία χαρακτηρίστηκε από τον Berka και τους συνεργάτες του (1997). Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η ελάχιστη ποσότητα ενζύμου η οποία προσέφερε μετρήσιμα αποτελέσματα ώστε να μειωθεί το κόστος της διεργασίας. Ωστόσο ήταν δυνατή η συλλογή των δεδομένων για τις βέλτιστες συνθήκες πολυμερισμού από τη συγκεκριμένη λακκάση. Η μεγαλύτερη απόδοση στις αντιδράσεις πολυμερισμού ήταν σε τιμή pH:6. Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου (Berka *et al.*, 1997), παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνει ότι ο πολυμερισμός είναι αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου. Επιπλέον, δεδομένα από αντίστοιχες μελέτες έδειξαν ότι η συγκεκριμένη λακκάση διατηρεί πάνω από το 75% της ενεργότητάς της στο εύρος pH 5-7,5 (Hollmann *et al.*, 2008). Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού ήταν η χαμηλότερη

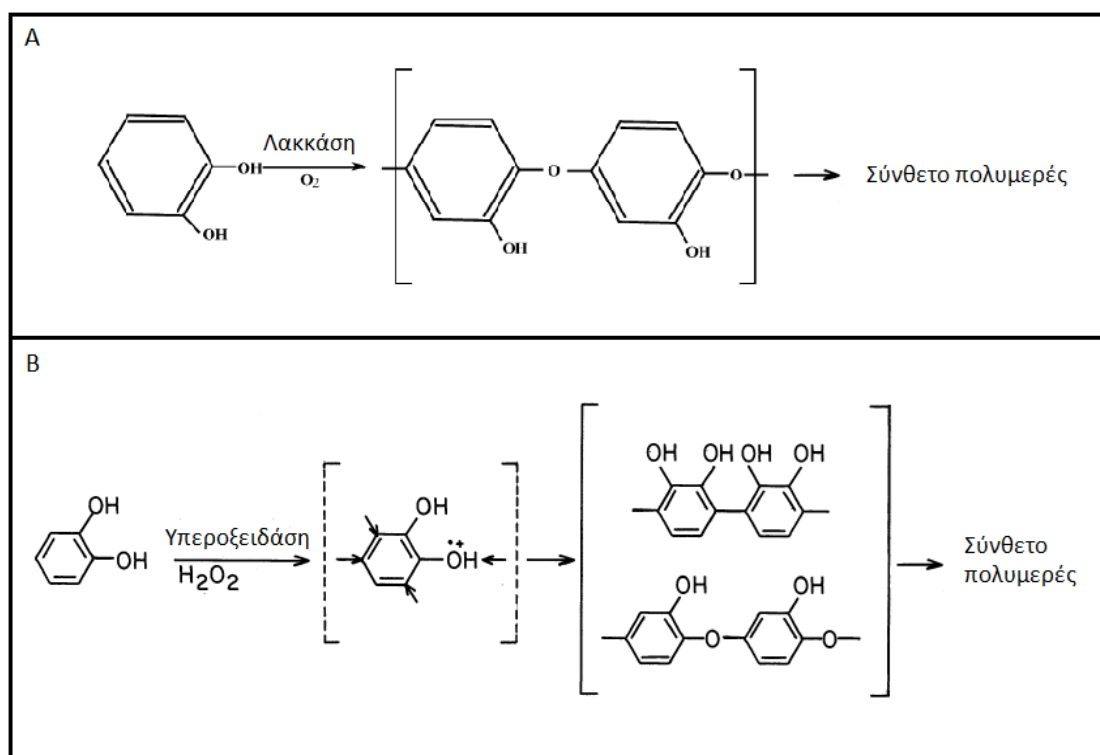
από αυτές που εξετάστηκαν (30 °C). Η θερμοκρασία αυτή δεν είναι η βέλτιστη για τη δράση του ενζύμου, ωστόσο επιτρέπει την αύξηση του χρόνου ημιζωής του ενζύμου και επομένως την αύξηση της οξειδωσης του υποστρώματος και του πολυμερισμού των αρωματικών ενώσεων. Δεδομένα από άλλες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι η ικανότητα πολυμερισμού από τη λακκάση *Icc1* του *Myceliophthora thermophila* αυξήθηκε με τη μείωση των θερμοκρασιών (Hollmann *et al.*, 2008). Τα φάσματα απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες συμφωνούν με αποτελέσματα από άλλες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε λακκάση από *Aspergillus* (Sun *et al.*, 2013) αλλά στην περίπτωση του φάσματος απορρόφησης στο υπέρυθρο υπάρχουν διαφορές οι οποίες πιθανότατα οφείλονται στον διαφορετικό τρόπο πολυμερισμού της κατεχόλης. Να σημειωθεί ότι το μόριο της κατεχόλης είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί σε πολλές διαφορετικές θέσεις και επομένως να επηρεαστεί η δομή του πολυμερούς και να σχηματιστούν περίπλοκα μακρομόρια (Dubey *et al.*, 1998).

Από τα υποστρώματα που εξετάστηκαν, στα μισά ήταν δυνατή η απομόνωση πολυμερούς με φυγοκέντρηση. Ωστόσο η αδυναμία απομόνωσης πολυμερούς δεν σημαίνει αδυναμία πολυμερισμού. Όπως ήδη αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι λακκάσες είναι δυνατό να καταλύσουν αντιδράσεις διμερισμού ή ολιγομερισμού ορισμένων ενώσεων, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η απομόνωση των προϊόντων με μία απλή φυγοκέντρηση. Επιπλέον, πολυμερή ορισμένων φαινολικών ενώσεων (π.χ. ανιλίνη) είναι υδατοδιαλυτά με αποτέλεσμα χρειάζονται επιπλέον βήματα για την απομόνωσή τους. Επομένως είναι απαραίτητη η χρήση πιο εξειδικευμένων μεθόδων για τον έλεγχο του διμερισμού, ολιγομερισμού ή πολυμερισμού (π.χ. υγρή φασματοσκοπία υπέρυθρου – FTIR) καθώς και τον διαχωρισμό των προϊόντων (π.χ. υγρή χρωματογραφία – HPLC).

Στη συγκεκριμένη εργασία αποδείχθηκε η δυνατότητα πολυμερισμού ορισμένων φαινολικών ενώσεων με τη λακκάση του *Myceliophthora thermophila*. Το επόμενο στάδιο στον συγκεκριμένο τομέα είναι η χρήση πιο εξειδικευμένων μεθόδων για την αξιολόγηση των πολυμερών (όπως φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού - NMR) οι οποίες θα προσφέρουν λεπτομέρειες για τη δομή των πολυμερών και κατά συνέπεια για τον μηχανισμό της αντίδρασης. Τέλος, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη άλλων ιδιοτήτων των πολυμερών, όπως η θερμική αντοχή, μηχανική αντοχή, αντιοξειδωτική ικανότητα κλπ. ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα της χρήσης αυτών των υλικών στους διαφορετικούς τομείς που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή (βλ. παρ 1.3).

Η δυνατότητα των εφαρμογών των λακκασών σε διαδικασίες σύνθεσης αποτελεί ένα καινούργιο τομέα της βιοτεχνολογίας στον οποίο υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον. Ιδιαίτερα στη φαρμακευτική υπάρχουν δημοσιεύσεις που αναφέρουν δημιουργία

ετεροδιμερών τα οποία παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιβιοτική δράση από τα κοινά αντιβιοτικά (Mikolasch *et al.*, 2009). Επομένως έχει μεγάλη σημασία να μελετηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τον τρόπο πολυμερισμού των ενώσεων και να ελεγχθεί ο μηχανισμός ώστε να περιοριστούν τα παραπροϊόντα αλλά και να αυξηθεί η απόδοση των αντιδράσεων. Από τη συγκεκριμένη εργασία λήφθηκαν αποτελέσματα για τον πολυμερισμό της κατεχόλης που δείχνουν ότι ο τρόπος πολυμερισμού εξαρτάται και από το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της φαρματοσκοπίας υπερύθρου για πολυμερή κατεχόλης που παρασκευάστηκαν με δράση λακκάσης και με δράση υπεροξειδάσης (αποτελέσματα από πειράματα συνεργατών στο εργαστήριο – Zerva *et al.*, 2015) παρουσίασαν μεγάλες διαφορές, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα στον διαφορετικό τρόπο πολυμερισμού της κατεχόλης (δημιουργία διαφορετικών δεσμών, C-C, C-O). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από δημοσιεύσεις που προτείνουν τον μηχανισμό του πολυμερισμού της κατεχόλης (Εικόνα 4.1) με χρήση λακκασών και υπεροξειδασών (Aktas *et al.*, 2003; Dubay *et al.*, 1998).



**Εικόνα 4.1** – Προτεινόμενοι μηχανισμοί για τον πολυμερισμό της κατεχόλης με χρήση (A) λακκασών (Aktas *et al.*, 2003) και (B) υπεροξειδασών (Dubay *et al.*, 1998). Η χρήση διαφορετικών ενζύμων φαίνεται να καταλύει διαφορετικούς τρόπους πολυμερισμού του ίδιου χημικού μορίου.

Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η χρήση διαφορετικών διαμεσολαβητών (mediators) σε αντιδράσεις πολυμερισμού με λακκάση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών προϊόντων από τα ίδια αντιδραστήρια



(Kunamneni *et al.*, 2008). Το εύρος των διαθέσιμων χημικών διαμεσολαβητών είναι τεράστιο (>100 ενώσεις) με ενώσεις που προέρχονται από φυσικές πηγές (πχ. καταβολισμός λιγνίνης) όπως η βανιλίνη αλλά και τεχνητές ενώσεις όπως το ABTS. Η αντιστοίχιση των χημικών διαμεσολαβητών με συγκεκριμένους τρόπους πολυμερισμού (αν υπάρχει) θα προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη βελτιστοποίηση και τον έλεγχο των αντιδράσεων σύνθεσης με χρήση των λακκασών.

Γνωρίζοντας πλέον τη χρησιμότητα των λακκασών στις διαφορετικές βιοτεχνολογικές διεργασίες είναι επόμενο να πραγματοποιηθούν μελέτες γενετικής και πρωτεϊνικής μηχανικής με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων των ενζύμων. Για παράδειγμα μπορεί να απαιτούνται λακκάσες με ευρύτερες συνθήκες δράσης θερμοκρασίας και pH ή μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Αντίστοιχα, μπορεί να χρειάζεται μείωση ή αύξηση της εξειδίκευσης των λακκασών για συγκεκριμένα υποστρώματα, ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας. Αν και η ύπαρξη των λακκασών είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες, μόνο πρόσφατα ξεκίνησε η κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους και της σύνθετης δομής τους καθώς και η δυνατότητα χρήσης τους σε μεγάλο εύρος βιομηχανικών διεργασιών. Η οικολογική φύση των ενζύμων αυτών, των οποίων η δράση έχει ως μοναδικό παραπροϊόν το νερό, τα καθιστά εξαιρετικά εργαλεία για την «πράσινη βιοτεχνολογία» και αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά η χρήση τους σε όλους τους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως τα τρόφιμα, η φαρμακευτική βιομηχανία, η σύνθεση πολυμερών και οι διεργασίες βιοεξυγείανσης.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκε σε δύο σκέλη. Στο πρώτο σκέλος πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση του γονιδίου Lac2063133, γονίδιο για το οποίο δεν υπάρχουν πληροφορίες στο επίπεδο της πρωτεΐνης. Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila*. Ανώτερος στόχος ήταν να αξιολογηθεί η ικανότητα χρήσης της πρωτεΐνης Lac2063133 για τον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων, πειραματική διαδικασία η οποία θα γεφύρωνε τα δύο σκέλη της εργασίας. Γενικά η συγκεκριμένη δουλειά προσέφερε τα εξής συμπεράσματα:

1) Ως προς τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η αλληλουχία του γονιδίου Lac2063133 ήταν γνωστή και καταχωρημένη στο διαδίκτυο χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργία της εκφραζόμενης από αυτό πρωτεΐνης. Για τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακκασών, έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της δυνατότητας χρήσης των λακκασών για τον

πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων, τομέα για τον οποίο υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων.

2) Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε επιβεβαίωσε την ικανότητα αφαίρεσης των ιντρονίων του γονιδίου Lac2063133 μέσω της επικαλυπτόμενης αντίδρασης PCR και την επιτυχή ετερόλογη έκφραση στη ζύμη *Pichia pastoris*. Στον τομέα των πολυμερισμών, αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία χρησιμοποιώντας δεδομένα από έναν αριθμό διαφορετικών δημοσιεύσεων που επιτρέπει την γρήγορη αξιολόγηση της ικανότητας πολυμερισμού ξεχωριστών αρωματικών ενώσεων με χρήση διαγραμμάτων απορρόφησης στο φάσμα υπεριώδους, ορατού και υπέρυθρου. Η μεθοδολογία αυτή δεν προσφέρει κάποια νέα κατεύθυνση στον πολυμερισμό των αρωματικών ενώσεων με χρήση λακκασών, αλλά αποτελεί προσπάθεια βελτιστοποίησης των αντιδράσεων πολυμερισμού σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

3) Το αποτέλεσμα της ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου Lac2063133 ήταν η παραγωγή μίας πρωτεΐνης με άγνωστη ενεργότητα. Η μελέτη της λειτουργίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αποτελεί τομέα μελλοντικής έρευνας για το εργαστήριο βιοτεχνολογίας του τμήματος Χημικών μηχανικών (ΕΜΠ). Στον τομέα του πολυμερισμού φαινολικών ενώσεων με χρήση της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης του *Myceliophthora thermophila* τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμερισμός είναι αποτέλεσμα δράσης της λακκάσης και οι βασικότερες συνθήκες που επηρεάζουν την αντίδραση ήταν η θερμοκρασία και το pH. Η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων έδειξε ότι είναι δυνατός ο ενζυμικός πολυμερισμός ενός μεγάλου εύρους αρωματικών ενώσεων.

Κεφάλαιο 5

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Aktas N., Cicek H., Unal A.T., Kibarer G., Kolankaya N. and Tanyolac A. (2001)** Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology* 80: 29-36.

**Aktas Nahit and Abdurrahman Tanyolac. (2003)** Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology* 87: 209–214.

**Aktas Nahit and Abdurrahman Tanyolac. (2003)** Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22: 61–69.

**Babot Esteban D., Alejandro Rico, Jorge Rencoret, Lisbeth Kalum, Henrik Lund, Javier Romero, Josu C. del Rvo, Angel T. Martvnez, Ana Gutierrez. (2011)** Towards industrially-feasible delignification and pitch removal by treating paper pulp with *Myceliophthora thermophila* laccase and a phenolic mediator. *Bioresource Technology* 102: 6717–6722.

**Becker, P., (1997)** Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl. Microb. Biotechnol.* 48: 184–190.

**Berka Randy M., Palle Schneider, Elizabeth J. Golightly, Stephen H. Brown, Mark Madden, Kimberly M. Brown, Torben Halkier, Kristine Mondorf, Feng Xu. (1997)** Characterization of the Gene Encoding an Extracellular Laccase of *Myceliophthora thermophila* and Analysis of the Recombinant Enzyme Expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and environmental microbiology*: p. 3151–3157

**Berka RM, Grigoriev IV, Otilar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, Ishmael N, John T, Darmond C, Moisan MC, Henrissat B, Coutinho PM, Lombard V, Natvig DO, Lindquist E, Schmutz J, Lucas S, Harris P, Powlowski J, Bellemare A, Taylor D, Butler G, de Vries RP, Allijn IE, van den Brink J, Ushinsky S, Storms R, Powell AJ, Paulsen IT, Elbourne LD, Baker SE, Magnuson J, Laboissiere S, Clutterbuck AJ, Martinez D, Wogulis M, de Leon AL, Rey MW, Tsang A. (2011)** Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol.* Oct 2;29(10):922-7.

**Bhat K. M. and Ramesh Maheshwari. (1987)** *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation, and cellulase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(9):2175.

**Bohlin Christina, Leif J. Jonsson, Robyn Roth, and Williem H. Van Zyl. (2006)** Heterologous Expression of *Trametes versicolor* Laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 129–132.

**Bretthauer RK, Castellino FJ. (1999)** Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 193–200.

**Cañas Ana I., Susana Camarero. (2010)** Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694–705.

**Cereghino Joan Lin and James M. Cregg. (2000)** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews 24: 45-66.

**Ceylan Hasan, Senol Kubilay, Nahit Aktas, Nurettin Sahiner. (2008)** An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). Bioresource Technology 99: 2025-2031.

**Colao M.C.h., Garzillo A.M., Buonocore V., Schiesser A., Ruzzi M. (2003)** Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii* Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:153-158.

**Cooney, D. G., and R. Emerson. (1964)** Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

**Daly Rachel and Milton T. W. Hearn. (2005)** Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of molecular recognition 18: 119–138.

**Dubey Shipra, Dan Singh, and R. A. Misra. (1998)** Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). Enzyme and Microbial Technology 23:432–437.

**Faure Emilie, Celine Falentin-Daudre, Christine Jerome, Joel Lyskawa, David Fournier, Patrice Woisel, Christophe Detrembleur. (2013)** Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. Progress in Polymer Science 38 236– 270.

**Finn Robert D., Alex Bateman, Jody Clements, Penelope Coggill, Ruth Y. Eberhardt, Sean R. Eddy, Andreas Heger, Kirstie Hetherington, Liisa Holm, Jaina Mistry, Erik L. L. Sonnhammer, John Tate and Marco Punta. (2014)** Pfam: the protein families database. D222–D230 Nucleic Acids Research, Vol. 42, Database issue

**Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.** ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.

**Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2003)** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607

**Giardina Paola, Vincenza Faraco, Cinzia Pezzella, Alessandra Piscitelli, Sophie Vanhulle, Giovanni Sannia. (2010)** Laccases: a never-ending story. Cell. Mol. Life Sci. 67:369–385.

**Güresir Murat, Nahit Aktas, Abdurrahman Tanyolaç. (2005)** Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. Process Biochemistry 40 1175–1182.

**Gupta R., E. Jung and S. Brunak. (2004)** Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation.

**Haki G.D., Rakshit S.K. (2003)** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology* 89 17–34.

**Hoegger P.J., Navarro-Gonzalez M., Kilaru S., Hoffmann M., Westbrook E.D., Kues U. (2004)** The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr. Genet.* 45:9-18.

**Hollmann Frank, Yosephine Gumulya, Christoph Tolle, Andreas Liese and Oliver Thum.** Evaluation of the Laccase from *Myceliophthora thermophila* as Industrial Biocatalyst for Polymerization Reactions. *Macromolecules* 41, 8520-8524.

**Hoshida H, Fujita T, Murata K, Kubo K, Akada R. (2008)** Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69:1090-7.

**Jeon Jong-Rok, Petr Baldrian, Kumarasamy Murugesan and Yoon-Seok Chang.** Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial Biotechnology* 5(3), 318–332.

**Junker Katja, Reinhard Kissnerb, Boris Rakvin, Zengwei Guo, Martin Willeke, Stephan Busato, Thomas Weber, Peter Walde. (2012)** The use of *Trametes versicolor* laccase for the polymerization of aniline in the presence of vesicles as templates. *Enzyme and Microbial Technology* 55 (2014) 72– 84.

**Kibbe WA. (2007)** 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'.

**Kojima Y., Tsukuda Y., Kawai Y., Tsukamoto A., Sugiura J., Sakaino M., Kita Y. (1990)** Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* 265:15224-15230.

**Kunamneni Adinarayana, Susana Camarero, Carlos García-Burgos, Francisco J Plou, Antonio Ballesteros and Miguel Alcalde. (2008)** Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7:32.

**Kurisawa Motoichi, Joo Eun Chung, Hiroshi Uyama and Shiro Kobayashi. (2003)** Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin). *Macromolecular Bioscience* 3, 758–764.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

**Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007)** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

**López Juvencio, José M. Hernández-Alcántara, Pedro Roquero, Carmina Montiel, Keiko Shirai, Miquel Gimeno, Eduardo Bárzana. (2013)** *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward apolyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97: 100– 105.

**Maheshwari R., Kamalam P.T. and Balasubramanyam P.V. (1987)** The biogeography of thermophilic fungi. *Current science* Vol 56.No4.

**Maheshwari Ramesh, Girish Bharadwaj and Mahalingeshwara K. Bhat. (2000)** Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 461–488.

**Majeau Josie-Anne, Satinder K. Brar, Rajeshwar Dayal Tyagi. (2010)** Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101 2331–2350.

**Macauley-Patrick Sue, Mariana L. Fazenda, Brian McNeil and Linda M. Harvey. (2005)** Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.

**Mikolasch Annett and Frieder Schauer. (2009)** Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:605–624.

**Mot A. C. and R. Silaghi\_Dumitrescu. (2012)** Laccases: Complex architectures for one electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)* Vol. 77, No. 12, pp. 1395\_1407.

**Nabid M. R., R. Sedghi, P. R. Jamaat, N. Safari, A. A. Entezami. (2006)** Synthesis of Conducting Water-Soluble Polyaniline with Iron(III) Porphyrin. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 102: 2929–2934.

**Nabid Mohammad Reza, Zahra Zamiraei, Roya Sedghi and Shidokht Nazari. (2010)** Synthesis and characterization of poly(catechol) catalyzed by porphyrin and enzyme. *Polym. Bull.* 64:855–865.

**Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, Dubchak I. (2014)** The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res.* 42(1):D26-31.

**Ong E., Pollock W.B., Smith M. (1997)** Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196:113-119.

**Petersen Thomas Nordahl, Soren Brunak, Gunnar von Heijne & Henrik Nielsen. (2011)** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions *Nature Methods*, 8:785-786.

**Piontek K., Antorini M., Choinowski T. (2002)** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277:37663-37669.

**Piscitelli Alessandra, Cinzia Pezzella, Paola Giardina, Vincenza Faraco and Sannia Giovanni. (2010)** Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1:4, 252-262.

**Reiss Renate, Julian Ihssen, Michael Richter, Eric Eichhorn, Boris Schilling, Linda Thony-Meyer. (2013)** Laccase versus Laccase-like Multi-Copper Oxidase: A comparative study of

similar enzymes with diverse substrate spectra. PLoS ONE 8(6): e65633. doi:10.1371/journal.pone.0065633.

**Riva Sergio. (2006)** Laccases: blue enzymes for green chemistry. TRENDS in Biotechnology Vol.24 No.5.

**Saboto, D., Nucci, R., Rossi, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Lakowicz, J., (1999)** The  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. Biophys. Chem. 81,23–31.

**Semeniuk G., Carmichael J. W. (1966)** *Sporotrichum thermophile* in north America. Canadian Journal of Botany 44(1): 105-108.

**Shraddha, Ravi Shekher, Simran Sehgal, Mohit Kamthania, and Ajay Kumar. (2011)** Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Research, Article ID 217861, 11 pages doi:10.4061/2011/217861.

**Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; and Morrill, T.C. (1981)** Spectrometric Identification of Organic Compounds. 4th ed. New York: John Wiley and Sons QD272.S6 S55.

**Sirim Demet, Florian Wagner, Lei Wang, Rolf D Schmid and Jurgen Pleiss. (2011)** The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases .Database, Article ID bar006.

**Steenft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. (2013)** Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J, 32(10):1478-88.

**Sun Xuejiao, Rubing Bai, Ya Zhang, Qiang Wang, Xuerong Fan, Jiugang Yuan, Li Cui and Ping Wang. (2013)** Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. Appl Biochem Biotechnol 171:1673–1680.

**The UniProt Consortium. (2015)** UniProt: a hub for protein information Nucleic Acids Res. 43: D204-D212.

**Topakas E, Moukouli M, Dimarogona M, Christakopoulos P. (2012)** Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*, Appl Microbiol Biotechnol 94:399–411.

**Wegner, G. (1990)** Emerging applications of the methylotrophic yeasts. FEMS Microbiol. Rev. 7, 279-283.

**Yoshida H. (1883)** Chemistry of lacquer (Urushi). J Chem Soc 43:472–86.

**Zerva A., P.Christakopoulos, E.Topakas. (2015)** Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. Enzyme and Microbial Technology, Volumes 75–76, Pages 49–56.



**Zhang AiJuan, He Jian, Guan Ying, Li ZhanYong, Zhang YongJun and Zhu Julian X. (2012)**  
Oxidative polymerization of hydroquinone using deoxycholic acid supramolecular template.  
Sci China Chem May Vol.55 No.5.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Παράρτημα Α - Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133.

Παράρτημα Β - Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133 χωρίς τα ιντρόνια.

Παράρτημα Γ – Πίνακας απορροφήσεων των χαρακτηριστικών χημικών δεσμών (FTIR)

## Παράρτημα Α

Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133. Τα δεδομένα για το γονίδιο αγρίου τύπου προέρχονται από τη βάση δεδομένων του *Myceliophthora thermophila* (<http://genome.jgi.doe.gov/Spoth2/Spoth2.home.html>) ενώ τα δεδομένα για το ενισχυμένο γονίδιο προέρχονται από την αλληλούχιση του DNA. Με κόκκινο φαίνονται οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων EcoRI και XbaI που καθορίζουν την αρχή και τέλος του ενισχυμένου γονιδίου.

```

WT          -ATGTTACTTTTCGAAACTATCTATTC-----TGCTTGC-CAAATGGCTGTCCGT-TGC 50
Sample     GGWGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGA 60
           *  *  *      *  *  *      *      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

WT          TGTGTAT--GC-----CGGAACTCTTGTCCATGATGAACAGTTCATCCC 92
Sample     TGGATATCTGCAGAATTTCAGCGCAATTCGGAACTCTTGTCCATGATGAACAGTTCATCCC 120
           **   ***   **                               *****

WT          GGACCATATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAGAACCGGAAGA 152
Sample     GGACCATATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAGAACCGGAAGA 180
           *****

WT          CGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGGCTGCCATACACTTGCTTCCTGGCGTAGGAC 212
Sample     CGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGGCTGCCATACACTTGCTTCCTGGCGTAGGAC 240
           *****

WT          TTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGGAACCTTAGCATGGTGAGTAGAGCAGC 272
Sample     TTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGGAACCTTAGCATGGTGAGTAGAGCAGC 300
           *****

WT          GCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTGGCACGGCCTTT 332
Sample     GCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTGGCACGGCCTTT 360
           *****

WT          CTCAGCGATTTCGCCCCGTTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCGC 392
Sample     CTCAGCGATTTCGCCCCGTTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCGC 420
           *****

WT          CCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATCTGACCGAACCAGAAGACGCAGGGACATACTTCT 452
Sample     CCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATCTGACCGAACCAGAAGACGCAGGGACATACTTCT 480
           *****

WT          ACCATTACACAGTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGACT 512
Sample     ACCATTACACAGTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGACT 540
           *****

WT          GTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCCAAGACCCTTCC 572
Sample     GTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCCAAGACCCTTCC 600
           *****

WT          AGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGGCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGCG 632
Sample     AGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGGCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGCG 660
           *****

WT          AGACACGGGGTATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCCAGG 692
Sample     AGACACGGGGTATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCCAGG 720
           *****

WT          GCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCGG 752
Sample     GCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCGG 780
           *****

WT          GTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCAA 812
Sample     GTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCAA 840
           *****

WT          CTGACTGCACTCTCCCGGTCATCGATGTCGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTCA 872

```

Sample CTGACTGCACTCTCCCGGTCATCGATGTCGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTCA 900  
\*\*\*\*\*

WT TTGGTGCCACAGGCCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAACGATCTCACTA 932  
Sample TTGGTGCCACAGGCCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAAC----- 950  
\*\*\*\*\*

WT TTGTTTAGGTCGACGGCAGCGAGTACAATGCGCCGGTAACGGTTGACCATATCCAGCTCG 992  
Sample -----

WT GCGGAGGTCAACGTTTCGACGTTCTTCTCCGCACCAAGACGGCCGAGGAGCTCAGATGCA 1052  
Sample -----

WT ACGGCGACAAGACCACCTATTTCTGCAATTTGAAACCCGCGATCGTCCCGATCCCTACC 1112  
Sample -----

WT GCGGCTATGGCGTCTTACGGTATAATCTCGGCACTCCGGTCCCGCCGCCCCACGACTC 1172  
Sample -----

WT CGGCGCTCACTCTCCCGCCGAAGTCAACAACCTGGCTGGAATACACTTTCAGCCACTTC 1232  
Sample -----

WT ATCCTTCGAGCAGCTTGTCTCCACGGCCGAAGAGGTCACCCGCGCGTCATTCTCGAAG 1292  
Sample -----CACCCGCGCGTCATTCTCGAAG 973  
\*\*\*\*\*

WT CCGAGCAAAAGATCGACCCTGCAACCGGTCGCCTTGTCTGGAAGCTCGCGCACATGACCT 1352  
Sample CCGAGCAAAAGATCGACCCTGCAACCGGTCGCCTTGTCTGGAAGCTCGCGCACATGACCT 1033  
\*\*\*\*\*

WT GGACTGACATGTCACGCGACAAGCCGGTCTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGGCCG 1412  
Sample GGACTGACATGTCACGCGACAAGCCGGTCTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGGCCG 1093  
\*\*\*\*\*

WT CCATGCCGGACTATGCCGCGGCGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGT 1472  
Sample CCATGCCGGACTATGCCGCGGCGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGT 1153  
\*\*\*\*\*

WT TCCCCGGAAGAAAGACGAGGTGCTCGAGATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACA 1532  
Sample TCCCCGGAAGAAAGACGAGGTGCTCGAGATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACA 1213  
\*\*\*\*\*

WT GCGGTGCCAGCGCATCGTCGAGACGCACCCCTTCCACGCCACGGTCAGCACTTCTACG 1592  
Sample GCGGTGCCAGCGCATCGTCGAGACGCACCCCTTCCACGCCACGGTCAGCACTTCTACG 1273  
\*\*\*\*\*

WT ATGTGGGCAGTGGGCCCGCAAGTACGATCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCT 1652  
Sample ATGTGGGCAGTGGGCCCGCAAGTACGATCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCT 1333  
\*\*\*\*\*

WT TGGGATACCGCCAATCAAGCGGACACGACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGCAAGG 1712  
Sample TGGGATACCGCCAATCAAGCGGACACGACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGCAAGG 1393  
\*\*\*\*\*

WT TGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAGGGCGTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCG 1772  
Sample TGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAGGGCGTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCG 1453  
\*\*\*\*\*

WT TGTGGATGGTGCCTGTACATTCTGGCACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTGA 1832  
Sample TGTGGATGGTGCCTGTACATTCTGGCACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTGA 1513  
\*\*\*\*\*

WT TGTCTCATTTGCGTAGCTTGTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTT 1892  
Sample TGTCTCATTTGCGTAGCTTGTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTT 1573  
\*\*\*\*\*

WT TCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTTCGGAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTG 1952  
Sample TCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTTCGGAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTG 1633  
\*\*\*\*\*

WT TCTGTGAGCCAGAACTACTTACATACGGCGGACGCTTACGGAAATGATACACACGCC 2012  
Sample TCTGTGAGCCAGAACTACTTACATACGGCGGACGCTTACGGAAATGATACACACGCC 1693

```

*****
WT          CCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACACGAACAAATGTTGTGCGCGGGGGCCGGGGAT 2072
Sample      CCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACACGAACAAATGTTGTGCGCGGGGGCCGGGGAT 1753
*****

WT          AGTGAGGATTCCGGTCA-CTAA----- 2093
Sample      AGTGAGGATTCCGGTCACTAGAGCCCTGAATTCAGCACAACCTGGCGCCGTTACTAGTG 1813
*****

WT          -----
Sample      GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGCGTCACCTAAAT 1873

WT          -----
Sample      AGCTGGCGTAWACAKGTCMAACGGCSG 1900

```

Σημείωση: Η τελευταία βάση C πριν το κωδικόνιο λήξης TAA αφαιρέθηκε κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών ώστε το γονίδιο να έρθει σε μεταγραφική συμφωνία με το πλασμίδιο pPICZαA. Η έλλειψη αυτή συμπληρώθηκε από την αλληλουχία της θέσης περιορισμού του ενζύμου XbaI. Η τριπλέτα CAC αντικαταστάθηκε με την τριπλέτα CAT, κωδικόνια που αντιστοιχούν στο ίδιο αμινοξύ (ιστιδίνη).

## Παράρτημα Β

Ομοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου Lac2063133 αγρίου τύπου και της αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου Lac2063133 χωρίς τα ιντρόνια. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων EcoRI και XbaI αλλά και τα κενά που αντιστοιχούν στα ιντρόνια του γονιδίου.

### Παράρτημα Β.1 – Πρώτο ιντρόνιο

```
WT          ATGTTACTTT----CGAA----ACTATCTATTCTGCTTGC-CAAATGGCTGTCCGT-TGC 50
Forward     -----ACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGA-TGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGA 54
           *** *      ****      *   ****      *** ** * *   ** * * * * *

WT          TGTGTAT--GC-----CGGAACCTTTGTCCATGATGAACAGTTCATCC 91
Forward     TGGATATCTGCAGAATTCAGGGCGAATTCGGAACCTTTGTCCATGATGAACAGTTCATCC 114
           **  ***  **                               *****

WT          CGGACCATATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAACCGGGAAG 151
Forward     CGGACCATATTCTCAGGGTATCCGTTGCCAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAACCGGGAAG 174
           *****

WT          ACGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGCCTGCCATACACTTGCCTCCCTGGCGTAGGA 211
Forward     ACGTTGTCGTCAACGGGACCTCACCGGGCCTGCCATACACTTGCCTCCCTGGCGTAGGA 234
           *****

WT          CTTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGAACCTTAGCATGGTGAGTAGAGCAG 271
Forward     CTTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAATGACCGAACCTTAGCATG----- 281
           *****

WT          CGCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCACTGATGAGACTCGCAGCATTTGGCAGGCCTT 331
Forward     -----CATTGGCAGGCCTT 296
           *****

WT          TCTCAGCGATTCGCCCGTCTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCG 391
Forward     TCTCAGCGATTCGCCCGTCTCTCCGACGGGACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCG 356
           *****

WT          CCCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATTCGACCGAACCCAGAAGACGCAGGGACATACTTC 451
Forward     CCCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATTCGACCGAACCCAGAAGACGCAGGGACATACTTC 416
           *****

WT          TACCATTACACGTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGAC 511
Forward     TACCATTACACGTGGGCATGCAGGCGCTGAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGAC 476
           *****

WT          TGTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCCAAGACCACTTC 571
Forward     TGTGGATCATCACCGTACCCTACGACGACGAGCGAATACTGCTATTCCAAGACCACTTC 536
           *****

WT          CAGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGGCCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGC 631
Forward     CAGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGGCCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGC 596
           *****

WT          GAGACACGGGATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCAG 691
Forward     GAGACACGGGATCTTACTGAACGGCAGGGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCAG 656
           *****

WT          GGCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCG 751
Forward     GGCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTTTGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGCG 716
           *****

WT          GGTGATGGCACCTCCAACCTCCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCA 811
Forward     GGTGATGGCACCTCCAACCTCCTGGGATGGGATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCA 776
           *****

WT          ACTGACTGCACTCTCCCGTTCATCGATGTCGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTC 871
Forward     ACTGACTGCACTCTCCCGTTCATCGATGTCGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTC 836
           *****
```

WT ATTGGTGCCACAGCCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAAACGATCTCACT 931  
Forward ATTGGTGCCACAGCCTGTCCCTTTTGACGATGGGTTTCGAGGATCACAAACGATCTCACT 896  
\*\*\*\*\*

WT ATTGTTTCAGGTCGACGGCAGCGAGTACAATGCGCCGGTAACGGTTGACCATATCCAGCTC 991  
Forward ATTGTTTCAGGTCGACGGCAGCG----- 918  
\*\*\*\*\*

WT GCGGGAGGTCAACGTTTCGACGTCTTCTCCGCACCAAGACGGCCGAGGAGCTCAGATGC 1051  
Forward -----

WT AACGGCGACAAGACCACCTATTTCTGCAATTTGAAACCCGCGATCGTCCCGATCCCTAC 1111  
Forward -----

WT CGGGGCTATGGCGTCTTACGGTATAATCTCGGCACTCCGGTCCCCGCCGCCCCACGACT 1171  
Forward -----

WT CCGGGCTCACTCTCCCGCCGAAGTCAACAACCTGGCTGGAATACACTTTCAGCCACTT 1231  
Forward -----

WT CATCCTTCGAGCAGCTTGCTCTCCACGGCCGAAGAGGTCACCCGCCGCTCATTCTCGAA 1291  
Forward -----

WT GCCGAGCAAAGATCGACCCTGCAACCCGGTCGCCTTGCTCTGGAAGCTCGCGCACATGACC 1351  
Forward -----

WT TGGACTGACATGTACGCGACAAGCCGGTGCTAGTCGACATATACGAGCGGGGAGGCC 1411  
Forward -----

WT GCCATGCCGGACTATGCCCGGGCTGACCAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTG 1471  
Forward -----

WT TTCCCGCGAAGAAAGACGAGGTGCTCGAGATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTAC 1531  
Forward -----

WT AGCGGTGCCAGCGGCATCGTCGAGACGCCCCCTTCCACGCCACGGTCAGCACTTCTAC 1591  
Forward -----

WT GATGTGGGCAGTGGGCCCGCAAGTACGATCCCAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGC 1651  
Forward -----

WT TTGGGATACCGGCCAATCAAGCGGGACACGACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAG 1711  
Forward -----

WT GTGGCGCCCGCGAGCCGGCCGGTGGAGGGCTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGC 1771  
Forward -----

WT GTGTGGATGGTGCCTGTACATTCTGGCACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTG 1831  
Forward -----

WT ATGTCTCATTGCGTAGCTTGCTGCTTTGCCGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTT 1891  
Forward -----

WT CTCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTCCGAGACGCCGAGGACATCGTCACAATCCGTT 1951  
Forward -----

WT GTCTGTGAGCCAGAACTACTTCACATACGGCGGCAGCGTCTACGGAAATGATACACACGC 2011  
Forward -----

WT CCCAGAGGTTTATCACTATTTCCGACGACACGAACAAATGTTGTGCCGCGGGGCCGGGA 2071



Forward -----  
 WT TAGTGAGGATTCCGGTCACTAA 2093  
 Forward -----

**Παράρτημα Β.2 – Δεύτερο ιντρόνιο**

WT ATGTTACTTTCGAAACTATCTATTCTGCTTGCCAAATGGCTGTCCGTTGCTGTGTATGCC 60  
 rev -----

WT GGAACCTCTGTCCATGATGAACAGTTCATCCCGGACCATATTCTCAGGGTATCCGTTGCC 120  
 rev -----

WT CAGGTGCCCTCGGCTTGCAGAACCGGGAAGACGTTGTCTCAACGGGACCTCACCGGGG 180  
 rev -----

WT CCTGCCATACACTTGCTTCTGGCGCTAGGACTTGGATCCGTGTCTACAATGACATGAAT 240  
 rev -----

WT GACCGGAACCTTAGCATGGTGTAGAGCAGCGCTTCTGTACTCATGGAATGCACGGGCA 300  
 rev -----

WT CTGATGAGACTCGCAGCATTGGCAGGCCTTTCTCAGCGATTCCGCCCGTTCTCCGACGG 360  
 rev -----

WT GACACCATCCGCAACGCAATGGCCCATACCGCCCGGGCACTTCTTCGACTACGAAATTCT 420  
 rev -----

WT GACCGAACCAGAAGACGCAGGGACATACTTCTACCATTACACGTGGGCATGCAGGGCGCT 480  
 rev -----

WT GAGCTGCACCGGGCCCTTGATCGTGGAGGACTGTGGATCATCACCGTACCACTACGACGA 540  
 rev -----

WT CGAGCGAATACTGCTATTCCAAGACCACTTCCAGAAGAGCGATCTCGAAATGATTCAAGG 600  
 rev -----

WT CCTGACGTCAACGCAGTTCACGTGGACCGGCGAGACACGGGTATCTTACTGAACGGCAG 660  
 rev -----

WT GGGCGTCTCGCCGAACCAAGCAGCCGTCCAGGGCCGACCAGGCGAAGCCAGCGGCTTCTT 720  
 rev -----

WT TGGAAGCCACCGTTTCTCAAATTTCCGCGGGGTGATGGCACCTCCAACCTCTGGGATGG 780  
 rev -----

WT GATACGTGGCGATGATCAGATCGAACCTCCAACCTGACTGCACTCTCCCGGTCATCGATGT 840  
 rev -----

WT CGAGCCGGGCAAGACTTACCGGCTCCGCTTCATTGGTGCCACAGGCTGTCCCTTTTGAC 900  
 rev -----

WT GATGGGTTTCGAGGATCACAACGATCTCACTATTGTTTCAGGTCGACGGCAGCGAGTACAA 960  
 rev -----

WT TGCGCCGTAACGGTTGACCATATCCAGCTCGGCGGAGGTCAACGTTTTCGACGTTCTTCT 1020  
 rev -----

WT CCGCACCAAGACGGCCGAGGAGCTCAGATGCAACGGCGACAAGACCACCTATTTCTCTGCA 1080  
rev -----

WT ATTTGAAACCCGCGATCGTCCCGATCCCTACCGCGGTATGGCGTCTACGGTATAATCT 1140  
rev -----

WT CGGCACTCCGGTCCCGCCGCCCCACGACTCCGGCGCTCACTCTCCCGGCCGAAGTCAA 1200  
rev -----GRAAGTCAA 9  
\*\*\*\*\*

WT CAACTGGCTGGAATACACTTTCCAGCCACTTCATCCTTCGAGCAGCTTGTCTCCACGGC 1260  
rev CAACTGGCTGGAATACACTTTCCAGCCACTTCATCCTTCGAGCAGCTTGTCTCCACGGC 69  
\*\*\*\*\*

WT CGAAGAGGTCACCCGCGCGTCAATTCTCGAAGCCGAGCAAAAGATCGACCCTGCAACCGG 1320  
rev CGAAGAGGTCACCCGCGCGTCAATTCTCGAAGCCGAGCAAAAGATCGACCCTGCAACCGG 129  
\*\*\*\*\*

WT TCGCCTTGCTGGAAGCTCGCGCACATGACCTGGACTGACATGTCACGCGACAAGCCGGT 1380  
rev TCGCCTTGCTGGAAGCTCGCGCACATGACCTGGACTGACATGTCACGCGACAAGCCGGT 189  
\*\*\*\*\*

WT GCTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGCCGCATGCCGGACTATGCCGCGCGCTGAC 1440  
rev GCTAGTCGACATATACGAGCGCGGGGAGCCGCATGCCGGACTATGCCGCGCGCTGAC 249  
\*\*\*\*\*

WT CAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGTTCCCGCGAAGAAAGACGAGGTGCTCGA 1500  
rev CAACTACGGCTGGGATCCGGCAACGAAGCTGTTCCCGCGAAGAAAGACGAGGTGCTCGA 309  
\*\*\*\*\*

WT GATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACAGCGGTGCCAGCGGCATCGTCGAGACGCA 1560  
rev GATTGTGATCCAGAACACGGGATCGCACTACAGCGGTGCCAGCGGCATCGTCGAGACGCA 369  
\*\*\*\*\*

WT CCCCTTCCACGCCACGGTCAGCACTTCTACGATGTGGCAGTGGGCCCGGCAAGTACGA 1620  
rev CCCCTTCCACGCCACGGTCAGCACTTCTACGATGTGGCAGTGGGCCCGGCAAGTACGA 429  
\*\*\*\*\*

WT TCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCTTGGGATACCGGCCAATCAAGCGGGACAC 1680  
rev TCCCGAGGCCAATAACGCCAAGCTGGCGAGCTTGGGATACCGGCCAATCAAGCGGGACAC 489  
\*\*\*\*\*

WT GACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAGGTGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAG 1740  
rev GACAATGGTGTACCGGTACGGCGAAGGCAAGGTGGCGCCCGGCGAGCCGGCCGGGTGGAG 549  
\*\*\*\*\*

WT GGCCTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCGTGTGGATGGTGCATGTACATTTCTGGC 1800  
rev GGCCTGGAGGATGAAGATGAACAATCCTGGCGTGTGGATGGTGCATGTACATTTCTGGC 609  
\*\*\*\*\*

WT ACACATGATCATGGGTGAGTATATTAACCTGATGTCTCATTTGCGTAGCTTGTGCTTTGC 1860  
rev ACACATGATCATGGG----- 624  
\*\*\*\*\*

WT CGGATGGCATTGCTGACATGAGGCTGTGTTCTCAGGCATGGAACGATCTGGGTGGTCG 1920  
rev -----CATGGAACGATCTGGGTGGTCG 647  
\*\*\*\*\*

WT GAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTGTCTGTGAGCCAGAACTACTTCACATACG 1980  
rev GAGACGCCGAGGACATCGTCACAATTCGGTTGTCTGTGAGCCAGAACTACTTCACATACG 707  
\*\*\*\*\*

WT GCGGCAGCGTCTACGAAATGATACACAGCCCCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACA 2040  
rev GCGGCAGCGTCTACGAAATGATACACAGCCCCAGAGGTTTATCACTATTTTCGACGACA 767  
\*\*\*\*\*

WT CGAACAAATGTTGTGCCGCGGGGCCGGGGATAGTGAGGATTCGGGTCA-CTAA----- 2093  
rev CGAACAAATGTTGTGCCGCGGGGCCGGGGATAGTGAGGATTCGGGTCACTAGAGCCCT 827  
\*\*\*\*\* \*\*

WT -----  
rev GAATTCCAGCACACTGGCGCGCTTACTAGTGGATCCGAGCTCCGTACCAAGCTTGATGC 887

Παράρτημα Γ

Πίνακας απορροφήσεων των χαρακτηριστικών χημικών ομάδων στο υπέρυθρο οι οποίες οφείλονται σε έκταση (stretch) ή κάμψη (bending) των χημικών δεσμών. (<http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html>).

Χαρακτηριστική ομάδα	Τύπος δόνησης	Απορρόφηση (cm <sup>-1</sup> )	Ένταση
<b>Αλκοόλες</b>			
O-H	(έκταση δεσμού, H-δεσμευμένο)	3200-3600	Ισχυρή, πλατιά κορυφή
O-H	(έκταση, ελεύθερα H)	3500-3700	Ισχυρή, στενή
C-O	έκταση	1050-1150	Ισχυρή
<b>Αλκάνια</b>			
C-H	έκταση	2850-3000	Ισχυρή
-C-H	κάμψη	1350-1480	Ποικίλει
<b>Αλκένια</b>			
=C-H	έκταση	3010-3100	Μέτρια
=C-H	κάμψη	675-1000	Ισχυρή
C=C	έκταση	1620-1680	Ποικίλει
<b>Αλκύλ-αλογονίδια</b>			
C-F	έκταση	1000-1400	Ισχυρή
C-Cl	έκταση	600-800	Ισχυρή
C-Br	έκταση	500-600	Ισχυρή
C-I	έκταση	500	Ισχυρή
<b>Αλκίνια</b>			
C-H	έκταση	3300	Ισχυρή, στενή κορυφή
-C≡C-	έκταση	2100-2260	Ποικίλει, δεν παρουσιάζεται σε συμμετρικά αλκίνια
<b>Αμίνες</b>			
N-H	έκταση	3300-3500	Μέτρια (οι πρωτοταγείς αμίνες παρουσιάζουν 2 κορυφές; οι δευτεροταγείς παρουσιάζουν 1 αρκετά ασθενή κορυφή)
C-N	έκταση	1080-1360	Μέτρια-ασθενής
N-H	κάμψη	1600	Μέτρια
<b>Αρωματικοί</b>			

δεσμοί			
C-H	έκταση	3000-3100	Μέτρια
C=C	έκταση	1400-1600	Μέτρια-ασθενής, πολλαπλές κορυφές
<b>Καρβονύλια</b>			
C=O	έκταση	1670-1820	Ισχυρή
<b>Αιθέρες</b>			
C-O	έκταση	1000-1300 (1070-1150)	Ισχυρή
<b>Νιτρίλια</b>			
CN	έκταση	2210-2260	Μέτρια
<b>Νιτρικά</b>			
N-O	έκταση	1515-1560 & 1345-1385	Ισχυρή, δύο κορυφές

Απορροφήσεις χημικών ομάδων που περιέχουν καρβονύλια (C=O)			
Χαρακτηριστική ομάδα	Τύπος δόνησης	Απορρόφηση (cm <sup>-1</sup> )	Ένταση
<b>Καρβονύλια</b>			
C=O	έκταση	1670-1820	Ισχυρή
(Η σύζευξη μετατοπίζει τις απορροφήσεις σε χαμηλότερα μήκη κύματος)			
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>			
C=O	έκταση	1700-1725	Ισχυρή
O-H	έκταση	2500-3300	Ισχυρή, πλατιά κορυφή
C-O	έκταση	1210-1320	Ισχυρή
<b>Αλδεύδες</b>			
C=O	έκταση	1740-1720	Ισχυρή
=C-H	έκταση	2820-2850 & 2720-2750	Μέτρια, δύο κορυφές
<b>Αμίδια</b>			
C=O	έκταση	1640-1690	Ισχυρή
N-H	έκταση	3100-3500	Μη υποκατεστημένα αμίδια παρουσιάζουν δύο κορυφές
N-H	κάμψη	1550-1640	
<b>Ανυδρίτες οξέος</b>			
C=O	έκταση	1800-1830 & 1740-1775	Δύο κορυφές
<b>Εστέρες</b>			

C=O	έκταση	1735-1750	Ισχυρή
C-O	έκταση	1000-1300	Δύο ή περισσότερες κορυφές
<b>Κετόνες</b>			
ακυκλικές	έκταση	1705-1725	Ισχυρή
κυκλικές	έκταση	3-membered - 1850 4-membered - 1780 5-membered - 1745 6-membered - 1715 7-membered - 1705	Ισχυρή
α,β-μη- υποκατεστημένες	έκταση	1665-1685	Ισχυρή
Άκυλ-κετόνες	έκταση	1680-1700	Ισχυρή