Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή στο πλαίσιο του προγράμματος

“Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών”

Κατασκευή μεταγραφικών μονάδων για την ετερόλογη έκφραση προϊόντων υψηλής αξίας στο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Μπιμπέρα Τόνια

Οκτώβριος 2017

Ευχαριστίες

Είμαι ευγνώμων απέναντι στην υπεύθυνη της διατριβής μου Δρ. Έλενα Ναβακούδη. Ευχαριστώ για την καθοδήγηση, το χρόνο σας και την υποστήριξή σας σε όλα τα βήματα της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για την ευκαιρία που μου δώσατε να ασχοληθώ με ένα επιστημονικό πεδίο που έγκειται στα ενδιαφέροντά μου. Είμαι επίσης ευγνώμων απέναντι στην υπεύθυνη καθηγήτρια της πτυχιακής μου Δρ. Ευθυμία Τσαγρή για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών ΙΙ.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Σωτήρη Καμπράνη για την μεγάλη υποστήριξη του στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, τον Δρ. Κρίτωνα Καλαντίδη, για την καθοδήγησή του και τις συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και τον Δρ. Γανωτάκη, επίσης για την υποστήριξη του στην υλοποίηση των πειραμάτων της διατριβής μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Λευτέρη, από το εργαστήριο του κ. Καμπράνη και τον Χάρη από το εργαστήριο του κ. Γανωτάκη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Έυα για την ψυχολογική υποστήριξη και τις ευχάριστες ώρες των εργαστηριακών breaks, τον Αντώνη μου για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη του σε κάθε μου βήμα και την οικογένεια μου που πάντα είναι δίπλα μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη 6

Κεφάλαιο 1ο – Εισαγωγή

1.1. Υψηλής αξίας βιο-ενεργά μόρια 8

1.2. Τερπενοειδή 8

1.2.1. Δομή και βιοσύνθεση τερπενοειδών 8

1.2.2. Ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τερπενοειδών 10

1.3. Ταξόλη 10

1.3.1. Περιορισμοί στην παραγωγή ταξόλης 11

1.4. Λακκάσες 13

1.4.1. Δομή και λειτουργία του ενζύμου 13

1.4.2. Χρήσεις του ενζύμου της λακκάσης 14

1.5. Τα μικροφύκη ως βιοτεχνολογική πλατφόρμα 15

1.6. Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* 17

1.7. Στόχος της παρούσας εργασίας 20

Κεφάλαιο 2ο – Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Στελέχη 22

2.1.1. Βακτηριακά στελέχη 22

2.1.2. Στελέχη του *Chlamydomonas reinhardtii* 22

2.2. Θρεπτικά μέσα 23

2.2.1. Θρεπτικά μέσα - Βακτηριακή καλλιέργεια 23

2.2.2. Θρεπτικά μέσα - Καλλιέργεια *Chlamydomonas reinhardtii* 23

2.3. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασχηματισμό 24

2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* 25

2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 26

2.6. Τεχνικές κλωνοποίησης.....26

2.6.1. Περιοριστική πέψη πλασμιδιακού DNA 26

2.6.2. Ηλεκροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 27

2.6.3. Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....27

2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR 28

2.8. Βελτιστοποίηση των κωδικονίων της αλληλουχίας του γονιδίου TXS……. 29

2.9. Golden Braid 29

2.9.1. Domestication σε pUPD2 φορείς κλωνοποίησης 33

2.9.2. Κατασκευή ολοκληρωμένης μεταγραφικής μονάδας (GB TU Assembly) 33

2.9.3. Δημιουργία σύνθετών DNA κατασκευών μέσω δυαδικής συναρμολόγησης φορέων (GB Binary Assembly) 34

Κεφάλαιο 3ο – Αποτελέσματα

3.1. Κατασκευή κασέτας ετερόλογης έκφρασης για το μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *Chlamydomonas reinhardtii* 36

3.2. In silico σχεδιασμός των επιμέρους κατασκευών για το μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *C. reinhardtii* 37

3.3. Κατασκευή κασέτας έκφρασης των ενζύμων GGPPS και TXS – Πολλαπλασιασμός των τμημάτων DNA με PCR 41

3.4. Κατασκευή κασέτας έκφρασης της λακκάσης (CotA) 44

3.4.1. Βιβλιογραφική έρευνα για την επιλογή κατάλληλου γονιδίου λακκάσης.....44

3.4.2. Πολλάπλασιασμός του γονιδίου BlCotA με τεχνική PCR..... 46

3.5. Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA σε pUPD2 φορείς.....47

Κεφάλαιο 4ο – Συζήτηση 52

Παράρτημα I 55

Παράρτημα II 67

Βιβλιογραφία 70

Περίληψη

Η χρήση μεταβολικής μηχανικής στα μικροφύκη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις μέρες μας. Η αυξανόμενη ζήτηση, για την ανάπτυξη ασφαλέστερων και λιγότερο ακριβών μεδόδων για την παραγωγή υψηλής αξίας προϊόντων, αποτελεί πρόκληση για την επιστημονική έρευνα και η χρήση των ευκαρυωτικών μικροφυκών αναδύεται ως μια βιοτεχνολογική πλατφόρμα, που θα μπορούσε να εξυπηρετήσει αυτούς ακριβώς τους σκοπούς. Μέρος της έρευνας για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών σε μικροφύκη έχει καρποφορήσει και έχουν αναφερθεί ενθαρρυντικές εφαρμογές, όπως η ετερόλογη παραγωγή ανθρώπινης ορμόνης (HGH), αντισωμάτων, βιοκαυσίμων, κ.ά. Η ώθηση στην έρευνα προς τα μικροφύκη γεννάται από την ανάγκη για την ανάπτυξη πιο φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών.

Μεταξύ των μικροφυκών ξεχωρίζει το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, που είναι το πιο μελετημένο φύκος εδώ και πολλές δεκαετίες. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μεταβολική μηχανική του χλωροπλάστη του φύκους *C. reinhardtii* ώστε να εδραιώσει το φύκος ως πρωτογενή παραγωγό υψηλής αξίας προϊόντων. Συγκεκριμένα, θα επιχειρήσουμε δύο ανεξάρτητους μεταξύ τους μετασχηματισμούς:

Το πρώτο σκέλος, θα περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *C. reinhardtii* για την παραγωγή ταξαδιενίου, ένα πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης της ταξόλης. Η ταξόλη (Taxol) είναι ένα προϊόν φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιείται κυρίως σαν αντικαρκινικό φάρμακο. Μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η παραγωγή του από ανάσυνδυασμένα κύτταρα ζυμομύκητα και βακτηρίων, αλλά με χαμηλή απόδοση. Για την υλοποίηση της κατασκευής και των δύο κασετών ετερόλογης έκφρασης θα χρησιμοποιηθεί το σύστημα συναρμολόγησης Golden Braid. Σκοπός είναι η εισαγωγή του βιοσυνθετικού μονοπατιού για την παραγωγή ταξαδιενίου, εκμεταλλευόμενοι το πρόδρομο μόριο GGPP που παράγεται φυσικά στο χλωροπλάστη του *Chlamydomonas* και την ενίσχυση της παραγωγής του με εισαγωγή ενός γονιδίου συνθάσης GGPP, μαζί με το γονίδιο που κωδικοποιεί την συνθάση του ταξαδιενίου (TXS), η οποία θα χρησιμοποιήσει τη δεξαμενή GGPP σε ένα στάδιο αντιδράσεως για να δώσει το τελικό προϊόν.

Το δεύτερο σκέλος, περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια λακκάση (BlCotA) βακτηριακής προέλευσης. Οι λακκάσες είναι ένζυμα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποδόμηση φαινολικών ενώσεων λόγω της οξειδωτικής τους δράσης. Σημαντικό ρόλο θα μπορούσε να παίξει μια τετοια ικανότητα ειδικά στις μεσογειακές χώρες, όπως η Ελλάδα, όπου το περιβάλλον επιβαρύνεται σημαντικά από τα λύματα των ελαιοτριβείων (OMW) που φέρουν μεγάλο φορτίο φαινολικών ρύπων.

Κεφάλαιο 1ο

Εισαγωγή

1.1. Υψηλής αξίας βιο-ενεργά μόρια

Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και τη βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχοντων τεχνικών για την παραγωγή υψηλής αξίας βιο-ενεργών μορίων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο από τη φαρμακευτική και την αγροτική βιομηχανία όσο και από τη βιομηχανία τροφίμων, μεγαλώνει όλο και περισσότερο, στις μέρες μας. Στα πλαίσια της αποδοτικότερης παραγωγής τέτοιων προιόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από μικροοργανισμούς και φυτά, έχει επιστρατευθεί η χρήση της μεταβολικής μηχανικής και της συνθετικής βιολογίας πέρα από κλασικές βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Μία κατηγορία τέτοιων μορίων αποτελούν τα τερπενοειδή, τα οποία αποτελούν προιόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Η πρόοδος στην τροποποίηση των μεταβολικών οδών σε μικροοργανισμούς για τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, έχει πλέον να παρουσίασει ορισμένα πολύ επιτυχημένα παραδείγματα όπως η γενετική τροποποίηση του ζυμομύκητα για εμπορική παραγωγή ενός προδρόμου μορίου του φαρμάκου, κατά της ελονοσίας, αρτεμισινίνη. Αυτό το έργο ξεκίνησε από την ομάδα του Keasling που πέτυχε την παραγωγή αρτεμισινικού οξέος στον *S. cerevisiae*. Με την κατασκευή του ενδογενούς μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος και την υπερέκφραση της συνθάσης του αμορφαδιενίου και της μονοοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 (CYP71AV1) από το φυτό *Artemisia annua*, το αμορφα-4,11-διένιο μετατράπηκε σε αρτεμισινικό οξύ σε αντίδραση οξείδωσης τριών σταδίων (Ro και Keasling, 2006). Η αρτεμισινίνη παράγεται τώρα σε βιομηχανική κλίμακα από τη Sanofi.

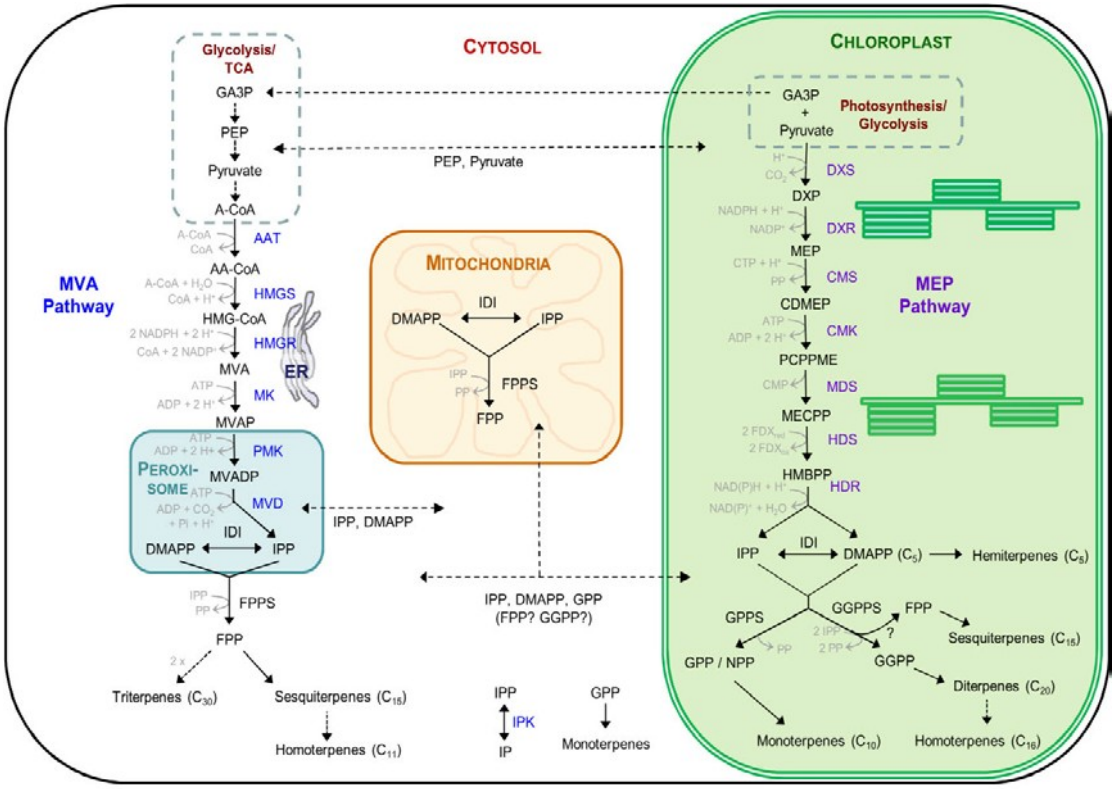
1.2. Τερπενοειδή

1.2.1. Δομή και βιοσύνθεση τερπενοειδών

Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που συντίθεται από τα φυτά. Παρά την αξιοσημείωτη χημική και λειτουργική ποικιλομορφία τους, όλα τα τερπενοειδή προέρχονται από τα ίδια πρόδρομα μόρια που περιλαμβάνουν πέντε άτομα άνθρακα: το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και τον διφωσφορικό διμεθυλαλλυλεστέρα (DMAPP) (Vickers et al., 2014). Αυτά τα ισομερή παράγονται από δύο διακριτά μεταβολικά μονοπάτια: το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA pathway) και το μεθυλό-ερυθριτολικό-φωσφατιδικό μονοπάτι (methyl-erythritol-phosphate pathway, MEP)(*Εικ*.1). Το μονοπάτι MEP τυπικά βρίσκεται σε προκαρυώτες και σε

πλαστίδια των φωτοσυνθετικών οργανισμών ενώ το MVA μονοπάτι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα κυρίως σε ευκαρυώτες, αρχαία και σε μερικά βακτήρια.

Τα τερπενοειδή ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα που περιέχουν στον σκελετό τους. Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου (IPP) που κατασκευάζουν την ένωση, μπορούν να χωριστούν ως ημιτερπένια (C5), μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15) και διτερπένια (C20).



Εικόνα 1: Το κυτταροπλασματικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA pathway) και το μεθυλό-ερυθριτολικό-φωσφατιδικό μονοπάτι (MEP pathway) στα φυτά παράγουν αμφότερα τα πρόδρομα μόρια C5: διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και διφωσφορικό διμεθυλαλλυλεστέρα (DMAPP). Αυτά συμπυκνώνονται ενζυμικά για να παράγουν (C10) GPP, (C15) FPP και (C20) GGPP για την παραγωγή ισοπρενοειδών. Οι κατηγορίες ισοπρενοειδών ομαδοποιούνται με βάση τον αριθμό των ανθράκων. Τα ισοπρενοειδή υψηλότερης τάξης συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών δεν περιλαμβάνονται στην εικόνα (Vickers et al., 2014).

1.2.2. Ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τερπενοειδών

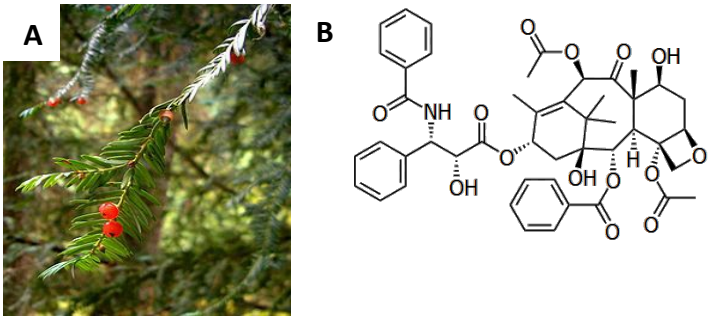
Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες ενζύμων που εμπλέκονται στην επιμήκυνση και την κυκλοποίηση του ανθρακικού σκελετού των τερπενίων. Η πρώτη είναι οι προνυλ-διφωσφορικές συνθάσες (prenyl-transferases), οι οποίες καταλύουν τη συμπύκνωση των DMAPP, GPP (geranyl-pyrophosphate) και FPP (farnesyl-pyrophosphate) με ένα ή περισσότερα μόρια IPP.

Η δεύτερη είναι οι συνθάσες τερπενίων (TPS) ή κυκλάσες. Δύο από τις κύριες αιτίες της ποικιλομορφίας των τερπενίων είναι ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών συνθασών τερπενίων και το γεγονός ότι μερικές από αυτές μπορούν να παράγουν πολλαπλά προϊόντα (Degenhardt et al., 2009). Οι τερπενικές κυκλάσες σχηματίζουν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που παρουσιάζουν ένα διατηρημένο μοτίβο πλούσιο σε ασπαρτικό οξύ (DDxxD) που σχετίζεται με τη δέσμευση ιόντων μετάλλων. Χρησιμοποιούν GPP, FPP ή GGPP ως υποστρώματα και καταλύουν το σχηματισμό προϊόντων μονο-, σεσκι- ή διτερπενίων.

Σύνθετα μόρια τερπενίων που περιέχουν επιπρόσθετες λειτουργικές ομάδες λαμβάνονται με περαιτέρω χημικές τροποποιήσεις, όπως οξείδωση, μεθυλίωση, ακετυλίωση, εποξείδωση του βασικού τερπενικού σκελετού κ.α.

1.3. Ταξόλη

Η ταξόλη (paclitaxel) είναι ένα σύνθετης δομής τερπενοειδές που πρώτη φορά απομονώθηκε από το φυτό *Taxus brevifolia* (έλατο του Ειρηνικού) (Wani et al., 1971). Χρησιμοποιείται ως φάρμακο κυρίως για τη θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου, αλλά και σε άλλες ασθένειες όπως η στένωση στεφανιαίας αορτής, στην πολυκυστική νόσο των νεφρών και στη νόσο Alzheimer (Walker and Croteau 2001; Croteau et al., 2006) (*Εικ.* 2). Ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου στηρίζεται στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης των ευκαρυωτικών κυττάρων μέσω του παρεμποδισμού προαγωγής του κυτταρικού κύκλου πέρα από τη φάση G2. Αυτο συμβαίνει επειδή η ταξόλη προάγει τη συνένωση των μικροσωληνίσκων από τα διμερή της τουμπουλίνης και τη σταθεροποίησή τους, εμποδίζοντας έτσι τον αποπολυμερισμό τους (Ajikumar et al., 2008). Επομένως, δρά παρεμποδίζοντας ουσιαστικά την κυτταροδιαίρεση στα καρκινικά κύτταρα και επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων (Rao et al., 1992).



Εικόνα 2: **Α.** *Το δέντρο Taxus brevifolia (έλατο του Ειρηνικού),* **Β.** Ο χημικός τύπος της ταξόλης.

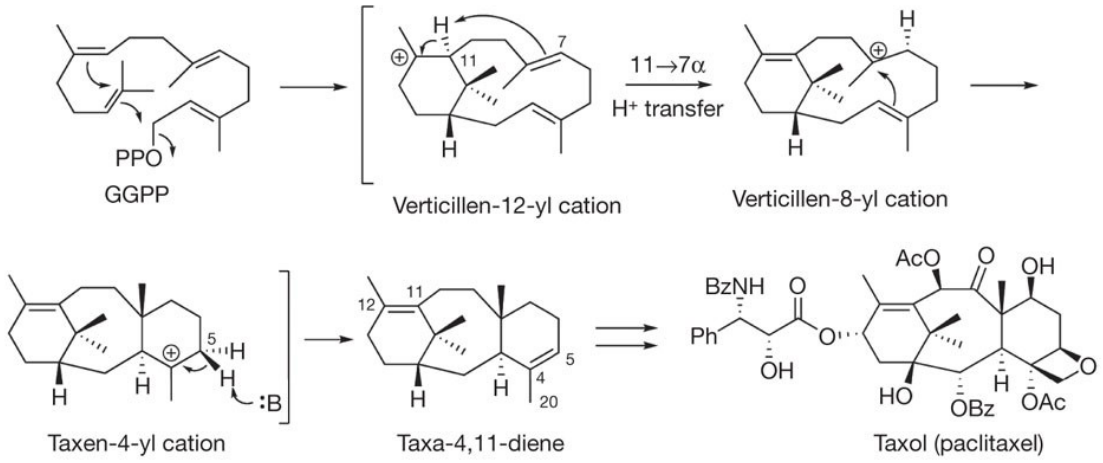
1.3.1. Περιορισμοί στην παραγωγή της ταξόλης

Η απομόνωση της ταξόλης από το *Taxus brevifolia* αποτελεί περιοριστικό παράγοντα λόγω των τεράστιων ποσοτήτων φλοιού του *Taxus* που χρειάζονται. Η περιεκτικότητα σε ταξόλη του ξηρού εσωτερικού φλοιού του *Taxus brevifolia*, όπου κυρίως βρίσκεται η ουσία, είναι πολύ μικρή (0,01-0,03%). Αυτό σήμαινει πως για την απομόνωση 1 kg ταξόλης χρειάζονται σχεδόν 10 τόνοι φλοιού, που θα λαμβάνονταν από 2 έως 3 χιλιάδες δέντρα τα οποία έτσι θα καταστρέφονταν. Με τη μεγάλη ζήτηση του φαρμάκου, υπολογίσθηκε ότι κάθε χρόνο θα έπρεπε να κόβονται 360 χιλιάδες δέντρα, πράγμα αδύνατο καθώς πρόκειται για ένα σχετικά σπάνιο δέντρο που βρίσκεται σε απόμακρες περιοχές, δεν σχηματίζει μεγάλες συστάδες και έτσι δεν είναι εύκολη η δημιουργία φυτειών του (Environmental Protection Agency (EPA), 2004).

Για τους παραπάνω λόγους, οι επιστήμονες αναζήτησαν διαφορετικούς τρόπους για τη σύνθεση της ταξόλης. Η πολυπλοκότητα της χημικής δομής της ένωσης καθιστά απαγορευτική από οικονομική άποψη την πλήρη χημική της σύνθεση σε βιομηχανικό επίπεδο. Ως εκ τούτου, πολλοί ερευνητές έχουν εφαρμόσει πληθώρα προσεγγίσεων για εναλλακτική και οικονομική παραγωγή ταξόλης. Η πρόοδος των τεχνολογιών ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε στην ανάπτυξη της μεταβολικής μηχανικής, ως βιώσιμη λύση για την παραγωγή φαρμακευτικά σημαντικών φυσικών προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα. Η παρασκευή, μέσω πρόδρομων μορίων, της ταξόλης για την αύξηση της παραγωγής παρουσιάζεται σαν μια εναλλακτική μέθοδος και σε συνδυασμό με τη γενετική μηχανική των φυτών, καθώς και των μικροβίων μπορεί να επιφέρει αρκετά θετικά αποτελέσματα.

Το ταξαδιένιο είναι διτερπένιο, πρόδρομο μόριο της ταξόλης και παράγεται ενζυματικά από το μόριο GGPP με τη δράση της συνθάσης ταξαδιενίου (TXS) (*Εικ.* 3). Σήμερα παραγεται βιοτεχνολογικά από τη ζύμη και τα βακτήρια, ωστόσο, αυτοί οι οργανισμοί παρέχουν στη βιομηχανία φαρμάκου ανεπαρκείς ποσότητες για την περαιτέρω σύνθεση της ταξόλης. Παραγωγή ταξαδιενίου σε κλίμακα γραμμαρίων (1 g/L) έχει αναφερθεί το 2010 με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων κυττάρων *E. coli* (Ajikumar et al., 2010).

Λόγω των συνεχώς αυξανόμενων θανάτων που συνδέονται με τον καρκίνο σε όλο το κόσμο, η ανάγκη να βρεθεί μια φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτική μέθοδος για την παραγωγή ταξαδιενίου θεωρείται επιτακτική .

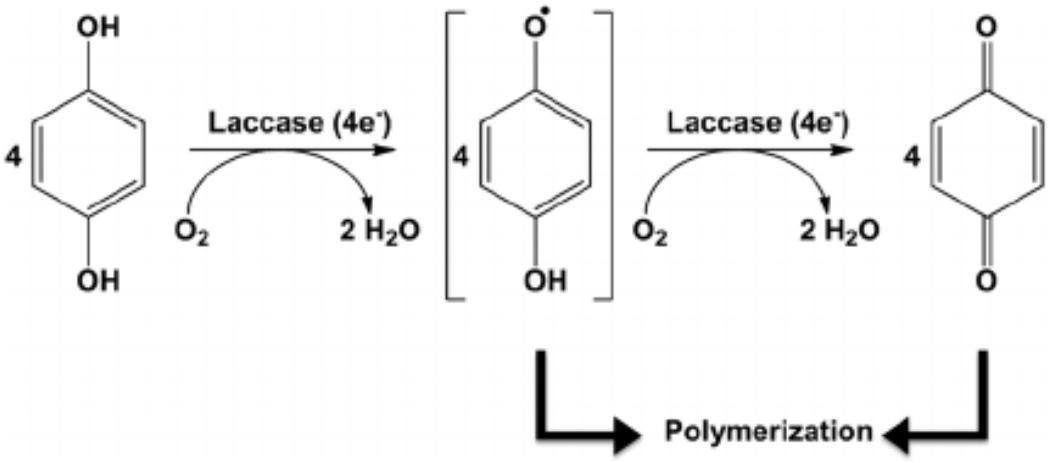


Εικόνα 3: Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της συνθάσης του ταξαδιενίου (TXS). Για την παρασκευή ταξόλης από ταξαδιένιο υπάρχουν πολλά ενζυματικά βήματα (δηλώνονται με διπλό βέλος). (Köksal et al., 2010).

1.4. Λακκάσες

1.4.1. Δομή και λειτουργία του ενζύμου λακκάση

Μια άλλη κατηγορία βιοενεργών μορίων αποτελούν αδιαμφισβήτητα τα ένζυμα. Οι λακκάσες (EC1.10.3.2) είναι ευρέως κατανεμημένες μεταξύ μυκήτων, ανώτερων φυτών, εντόμων και βακτηρίων και ανήκουν στις πολυ-χαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες (Roth and Spiess 2015). Η δομή τους αποτελείται από τέσσερα ενεργά κέντρα, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα ιόν χαλκού (Cu^{2+}). Τα τέσσερα ιόντα Cu^{2+} κατανέμονται σε διαφορετικές θέσεις και ταξινομούνται σε τρεις τύπους, Τ1, Τ2 και Τ3. Ο τύπος χαλκού Τ1 εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, ο τύπος Τ2 ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο, ενώ ο τύπος Τ3 (που αποτελείται από 2 ιόντα Cu^{2+}) είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου (Palmer et al. 2001). Στα ενεργά αυτά κέντρα πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών συστατικών μέσω μιας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό με παράλληλη μετατροπή του υποστρώματος.



Εικόνα 4: Μηχανισμός οξείδωσης φαινολικών ενώσεων από το ένζυμο λακκάση.

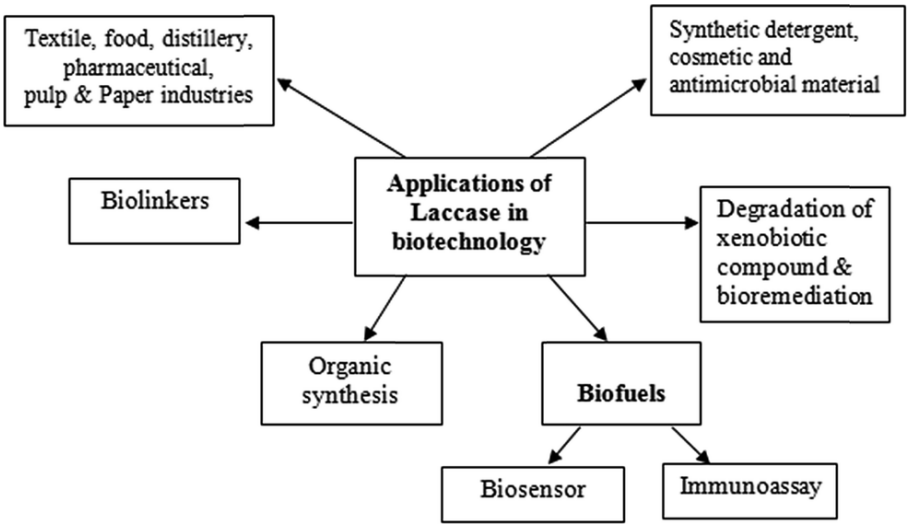
Οι λακκάσες ως ένζυμα παρουσιάζουν υψηλή θερμική αντοχή και αποτελούν τα κύρια ένζυμα για την κατάλυση της οξείδωσης πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικών συστατικών (Thurston, 1994; Minussi et al., 2002). Υποστρώματα των λακκασών είναι διάφορες ο- και p-διφαινόλες, πολυφαινόλες. Με την οξειδωτική τους δράση προάγουν και τον πολυμερισμό αρωματικών μορίων όπως π.χ. κατά τη σύνθεση της λιγνίνης. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδροξυλομάδων της λιγνίνης πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και το σχηματισμό ριζών, οι οποίες δύναται να πολυμεριστούν ή να οδηγήσουν σε αποπολυμερισμό (Thurston, 1994; Minussi et al., 2002). Το δυναμικό οξειδοαναγωγής τους ποικίλει ανάλογα με την προέλευσή τους (μύκητες, φυτά, βακτήρια).

Σε γενικές γραμμές, οι λακκάσες των μυκήτων παίζουν ρόλο στην απόδομηση αρωματικών ουσιών όπως η λιγνίνη, ενώ αυτες των φυτών έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σύνθεσης της λιγνίνης (Pezzella et al., 2015; Roth and Spiess 2015). Η φυσιολογική λειτουργία των βακτηριακών λακκασών παραμένει ασαφής, αλλά πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο ανάλογο με αυτές των μυκήτων (Martins, Durão et al., 2015).

1.4.2. Χρήσεις του ενζύμου της λακκάσης

Ο μικρός αριθμός ουσιών που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αλλά και η υψηλή οξειδωτική του δράση (10-100 φορές μεγαλύτερη από τη δράση άλλων ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες), καθιστούν τις λακκάσες ιδανικά ένζυμα για την αποδόμηση αρωματικών ενώσεων (Belitz, 2006). Αυτές οι ιδιότητες, σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που δέχονται και των αντιδράσεων που καταλύουν, κατατάσσει τις λακκάσες σε εξαιρετικής σημασίας βιομηχανικά ένζυμα. Αξιοσημείωτο, επίσης, για τη χρήση τους ως βιοκαταλύτες είναι και το πλεονέκτημά τους ότι δεν απαιτούν δαπανηρούς συμπαράγοντες όπως NADH ή NADPH σε αντίθεση με πολλές άλλες οξειδοαναγωγάσες.

Οι ιδιότητες των λακκασών βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία σε μια πληθώρα διεργασιών όπως: επεξεργασία του χαρτοπολτού (βιομηχανία χάρτου), λεύκανση χρωστικών ουσιών (κλωστοϋφαντουργία), απορρύπανση, βιοαποκατάσταση και αποτοξίνωση από ξενοβιοτικά, οργανική σύνθεση κ.ά (Pezzella et al., 2010). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη σύνθεση φυσικών προϊόντων όπως οι χρωστικές ουσίες και τα αντιοξειδωτικά μέσα από τον διμερισμό φαινολικών και μη φαινολικών οξέων.



Εικόνα 5: Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των ενζύμων με ενεργότητα λακκάσης. (*Royal Society of Chemistry)*

1.5. Τα μικροφύκη ως βιοτεχνολογική πλατφόρμα

Τα μικροφύκη αποτελούν μια ομάδα μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών που καταλαμβάνουν υδάτινα και χερσαία ενδιαιτήματα. Επί του παρόντος, τα μικροφύκη έχουν ερευνηθεί εμπορικά κυρίως για συστατικά που παράγουν φυσικά, όπως οι χρωστικές β-καροτένιο και ασταξανθίνη, πολυμερή αλάτων αλγινικού οξέος και καρραγενάνης κ.α. (Steinbrenner and Sandmann, 2006; Curtain, 2000). Επίσης, υπάρχουν αρκετές έρευνες που έχουν προσπαθήσει να ενισχύσουν τη παραγωγή υψηλής αξίας προϊόντων που συνθέτουν τα μικροφύκη όπως για παράδειγμα: η παραγωγή ωμεγα-3 λιπαρών οξέων όπως το DHA (docosahexanoic acid) και το EPA (eicosapentaenoic acid) από το είδος *Phaeodactylum tricornutum* (Hamilton et. al., 2014).

Η μεταβολική μηχανική των μικροφυκών δημιουργεί μεγάλες προκλήσεις στις μέρες μας λόγω της αυξανόμενης ζήτησης για ασφαλέστερες και οικονομικά αποδοτικότερες μεθόδους για μεγάλης κλίμακας παραγωγή υψηλής αξίας βιοενεργών μορίων. Ως αυτότροφοι οργανισμοί με φυσική σύσταση σε προστιθέμενης αξίας φυσικά προϊόντα, τα μικροφύκη δύνανται να αποτελέσουν βιώσιμη πηγή πρωτεϊνών και άλλων μεταβολιτών με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους τομείς της εφαρμοσμένης έρευνας και της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας.

Σε σύγκριση με άλλες διαδεδομένες βιοτεχνολογικές πλατφόρμες όπως το βακτήριο *Escherichia coli* και ο σακχαρομύκητας, τα μικροφύκη προσφέρουν κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως:

α) η χαμηλού κόστους καλλιέργεια τους, λόγω της της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας (χρήση ηλιακής ενέργειας και διοξειδίου του άνθρακα) και των απλών θρεπτικών μέσων που απαιτούν για την ανάπτυξή τους,

β) η μη παθογονικότητα. Χαρακτηρίζονται γενικά ως ασφαλείς για τον άνθρωπο οργανισμοί (GRAS) όπως το είδος *Chlamydomonas reinhardtii*. Έτσι, τα προϊόντα που προέρχονται από αυτά είναι απόλυτα ασφαλή για την ανθρώπινη υγεία επειδή δεν προκαλούν αλλεργίες,

γ) λόγω του (β) δεν υπάρχει ανάγκη εκτεταμένου καθαρισμού των προϊόντων τους, με αποτέλεσμα να γίνεται οικομομικότερη η βιομηχανική τους εκμετάλλευση. Μάλιστα έχει προταθεί και η χρήση ολόκληρου του οργανισμού σε φαρμακευτικά σκευάσματα,

δ) η ύπαρξη του χλωροπλάστη ως ένα αυτόνομο βιοσυνθετικό και αποθηκευτικό οργανίδιο με το δικό του μικρό γονιδιακό σύστημα που μοιάζει με τα προκαρυωτικά κύτταρα. Η χρήση του χλωροπλάστη για την έκφραση διαγονιδίων σε σχέση με τη χρήση του πυρήνα του μικροφύκους, προσφέρει το πλεονέκτημα της κατ' επιλογήν και όχι τυχαίας θέσης ένθεσης των γονιδίων στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, ενώ παράλληλα υπόσχεται υψηλότερη έκφραση των γονιδίων (α) λόγω έλλειψης μηχανισμών γονιδιακής σίγησης και (β) λόγω πολλαπλού αριθμού αντιγραφων του χλωροπλαστικού χρωμοσώματος. Επιπλέον, η συσσώρευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ένα οργανίδιο όπου σχηματίζονται μεν δισουλφιδικοί δεσμοί αλλά είναι περιορισμένες οι γλυκοζυλιώσεις, συνεισφέρει, πιθανώς, στην μέγιστη λειτουργικότητα του παραγόμενου προιόντος,

ε) η ευρύτερη βιοσυνθετική τους ικανότητα, λόγω της ευκαρυωτικής τους φύσης (σε σύγκριση με τα βακτήρια).

Για όλους τους παραπάνω λόγους τα ευκαρυωτικά μικροφύκη πλεονεκτούν σημαντικά ως σύστημα μεταβολικής μηχανικής για την παραγωγή σημαντικών προϊόντων τόσο για την ανθρώπινη υγεία και διατροφή όσο και για το περιβάλλον.

Η πρόκληση επομένως έγκειται στην εφαρμογή στρατηγικών μεταβολικής μηχανικής τόσο για την ενίσχυση των φυσικών χαρακτηριστικών των μικροφυκών (Klein-Marcuschamer et al., 2013) όσο και για την επέκταση σε επίπεδο νέων προϊόντων που δύνανται να παραχθούν από αυτά. Η ανάπτυξη της συνθετικής βιολογίας αναζωπύρωσε παγκοσμίως το ενδιαφέρον για τον γενετικό χειρισμό των μικροφυκών τόσο στον επιστημονικό όσο και στον βιομηχανικό κόσμο. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την εμφάνιση σύγχρονων γενετικών

εργαλείων όπως οι υποκινητές, τα γονίδια επιλογής, τα συστήματα επεξεργασίας γονιδίων κ.α. υπόσχονται σήμερα σημαντική πρόοδο στον τομέα της βιοτεχνολογίας των μικροφυκών.

1.6. Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

Το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* ξεχωρίζει, ως το πιο μελετημένο φύκος εδώ και πολλές δεκαετίες. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο φωτοσυνθετικό οργανισμό με έναν ελεγχόμενο σεξουαλικό κύκλο (Proschold, Harris et al., 2005). Μπορεί να υιοθετήσει έναν αναερόβιο μεταβολισμό, παράγοντας αέριο υδρογόνο και μεταβολίτες όπως μυρμηκικό οξύ και αιθανόλη. Η χλαμυδομονάδα προσεγγίζει περισσότερο τα φυτικά κύτταρα και αυτό την καθιστά ένα ισχυρό σύστημα για τη μελέτη πολλών μοριακών και κυτταρικών διεργασιών. Το μικροφύκος αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα, διπλασιάζεται κάθε 5-8 ώρες και μπορεί να αυξηθεί σε πυκνότητα άνω των 10^7 κυττάρων/ml (Rasala and Mayfield, 2014).

Περιέχει ένα μοναδικό μεγάλο χλωροπλάστη που καταλαμβάνει πάνω από το 40% του όγκου των κυττάρων. Ο χλωροπλάστης έχει σχήμα κυπελλοειδές και βρίσκεται δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια των διαδικασιών μετασχηματισμού (βαλιστικά ή ανάδευση με γυάλινα σφαιρίδια) υπάρχει σχετικά μεγάλη πιθανότητα τραυματισμού των τριών συμπιεσμένων μεμβρανών (της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της διπλής μεμβράνης του χλωροπλάστη) έτσι ώστε το DNA να εισαχθεί στο οργανίδιο.

Ο χλωροπλάστης περιέχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα το cpDNA (203.395 bp) (Maul et al., 2002) σε περίπου 80 αντίγραφα. Οι μεταγραφικοί και μεταφραστικοί μηχανισμοί του μοιάζουν με προκαρυωτικού τύπου. Αντίθετα με το πλούσιο σε GC πυρηνικό γονιδίωμα (61%), το γονιδίωμα του χλωροπλάστη έχει περιεκτικότητα GC περίπου 35% (Specht, Karunanithi et al., 2017). Γενικά, τα γονίδια είναι διατεταγμένα με απόσταση κατά μέσο όρο 0,7 kb μεταξύ τους. Το χρωμόσωμα διαθέτει δύο αντίγραφα μιας ανεστραμμένης αλληλουχίας (~22,211 bp, Inverted Repeats), τα οποία χωρίζονται από δύο σχεδόν εξίσου μεγέθους μοναδικές περιοχές των 80,873 και 78,100 bp. Η διάταξη των γονιδίων μέσα στην ανεστραμμένη επανάληψη είναι κυρίως προκαρυωτικής δομής, αλλά υπάρχουν και γονίδια ευκαρυωτικής δομής, με τη τυπική δομή των εξωνίων-εσωνίων (Maul et al., 2002).

Η ετερόλογη έκφραση προιόντων στον χλωροπλάστη αντί στον πυρήνα φέρει μερικά σημαντικά πλεονεκτήματα όπως: α) η αποφυγή χρήσης αντιβιοτικών εξαιτίας της διαθεσιμότητας μεταλλαγμένων στελεχών του χλωροφύκους που στερούνται φωτοσυνθετικής ικανότητας και που επανέρχονται στον φαινότυπο wt με συμπλήρωση με

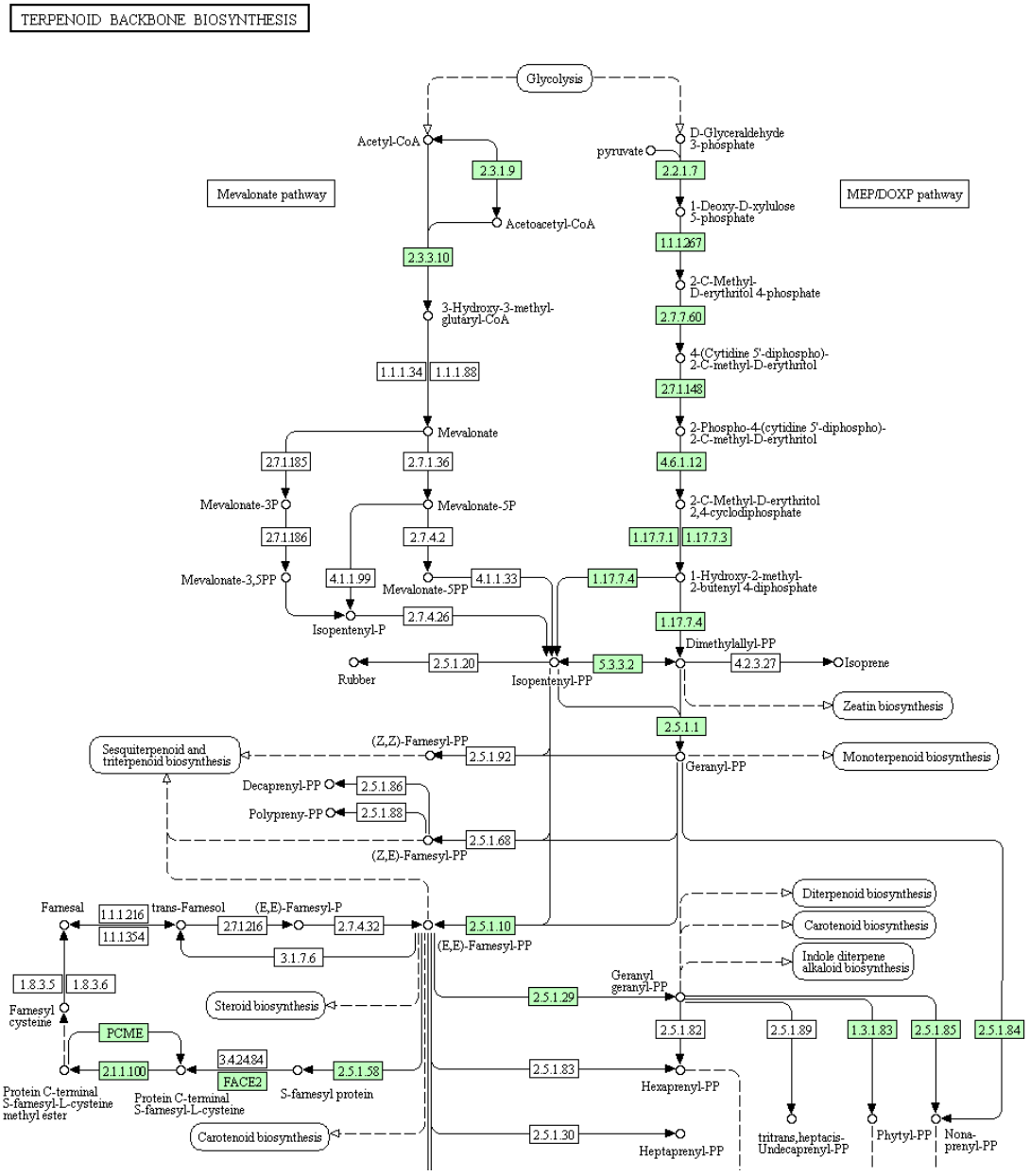
κατάλληλο γονίδιο επιλογής, β) πολλές φορές υψηλότερες αποδόσεις παραγωγής λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων του cpDNA.

Μέχρι στιγμής, μια ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, αντικαρκινικές ανοσοτοξίνες, ανθρώπινα αντισώματα, αιθανόλη και υδρογόνο (ως βιοκαύσιμα) έχουν παραχθεί με την επεξεργασία του χλωροπλαστικού DNA του *C. reinhardtii* (Rasala et al., 2010; Baltz et al., 2014; Xu et al., 2014).

Πίνακας 1: Ανασυνδυασμένα προϊόντα ύστερα από μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του μικροφύκους Chlamydomonas reinhardtii (Gong et al., 2011).

Recombinant product and functions	Expressed in	Expression level achieved
HSV8-lsc and HSV8-scFv, a human IgA anti-herpes monoclonal, large single-chain (lsc) antibody, and a single-chain fragment variable (scFv) antibody	*C. reinhardtii* chloroplast	0.5% TSP in the chloroplast
Foot and mouth disease virus (FMDV) VP1 fused to cholera toxin B subunit (CTB), facilitates the production of a new and safer FMDV mucosal vaccine	*C. reinhardtii* chloroplast	3% TSP
Human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	*C. reinhardtii* chloroplast	0.43–0.67% TSP
Human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65), key autoantigen in type I diabetes; important marker for the prediction and diagnosis of type I diabetes	*C. reinhardtii* chloroplast	0.25–0.3% TSP
D2 fibronectin binding domain of *Staphylococcus aureus* fused with the cholera toxin B subunit (CTB); stable algae-based oral vaccine	*C. reinhardtii* chloroplast	0.7% TSP
Full-length IgG1 human monoclonal antibody (mAb), against anthrax protective antigen 83 (PA83); potentially blocks the effects of anthrax toxin	*C. reinhardtii* chloroplast	100 μg of purified protein per 1 g of dry algal biomass
High mobility group protein B1 (HMGB1); mediates a number of important functions involved in wound healing, has the potential to enhance the effectiveness of some anticancer therapies	*C. reinhardtii* chloroplast	2.5% TSP
Bovine mammary-associated serum amyloid (M-SAA); stimulates the production of mucin in the gut, acting in the prophylaxis of bacterial and viral infections	*C. reinhardtii* chloroplast	5% TSP

Ο χλωροπλάστης της χλαμυδομονάδας θα μπορούσε δυνητικά να λειτουργήσει και ως βιοτεχνολογική πλατφόρμα παραγωγής τερπενοειδών, καθώς διαθέτει το μεταβολικό μονοπάτι MEP, το οποίο συμμετέχει στη βιοσύνθεση των τερπενίων (*Εικ.* 6). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα μικροφύκη διαθέτουν και τα δύο μονοπάτια βιοσύνθεσης τερπενοειδών (MVA και MEP) όπως τα ανώτερα φυτά αλλά έχει παρατηρηθεί ότι αυτό εξαρτάται και από το γένος του μικροφύκους. Στη περίπτωση της χλαμυδομονάδας, η οποία ανήκει στα χλωροφύκη δεν εντοπίζεται το MVA μονοπάτι (Kempinski et al., 2015; Sasso et al., 2012).



Εικόνα 6: Ένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τερπενοειδών στο μικροφύκος *C. reinhardtii (πράσινο χρώμα). (Kegg pathways)*

1.7. Στόχος της παρούσας εργασίας

Το αντικείμενο αυτής της εργασίας είναι η μεταβολική μηχανική του χλωροπλάστη του μικροφύκους *C. reinhardtii* για την ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Συγκεκριμένα, ο σκοπός του έργου είναι διττός: πρόκειται για την ετερόλογη έκφραση i) της συνθάσης του ταξαδιενίου (TXS) σε συνδυασμό με την έκφραση της συνθάσης GGPP με σκοπό την παραγωγή ταξαδιενίου σε ικανοποιητική ποσότητα ώστε να εξασφαλιστεί βιώσιμη παραγωγή του αντικαρκινικού φαρμάκου ταξόλη, και ii) του ενζύμου λακκάση, το οποίο λειτουργεί σαν οξειδάση φαινολικών ενώσεων έχοντας ως απώτερο σκοπό τη βιοαποκατάσταση μολυσμένων υδάτων (π.χ. απόβλητα ελαιοτριβείων). Και οι δύο κατευθύνσεις έχουν σημαντικές επιπτώσεις σε οικονομικό, κοινωνικό και περιβαλλοντικό επίπεδο καθώς α) η ταξόλη (paclitaxel) είναι ένα φυτικό παράγωγο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου και β) ο τομέας του ελαιολάδου που ευδοκιμεί στις μεσογειακές χώρες όπως η Ελλάδα αντιμετωπίζει ανεπιθύμητες παρενέργειες που οφείλονται στις ποσότητες των λυμάτων των ελαιοτριβείων (OMW) που φέρουν ένα μεγάλο φορτίο φαινολικών ρύπων. Η σωστή επεξεργασία αυτών των λυμάτων δημιουργεί παγκόσμιες ανησυχίες. Οι λακκάσες είναι ένζυμα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια σε φαινολικές ουσίες είτε in vivo είτε ex vivo για να αποκαταστήσουν τα υδάτινα περιβάλλοντα από αυτούς τους ρύπους.

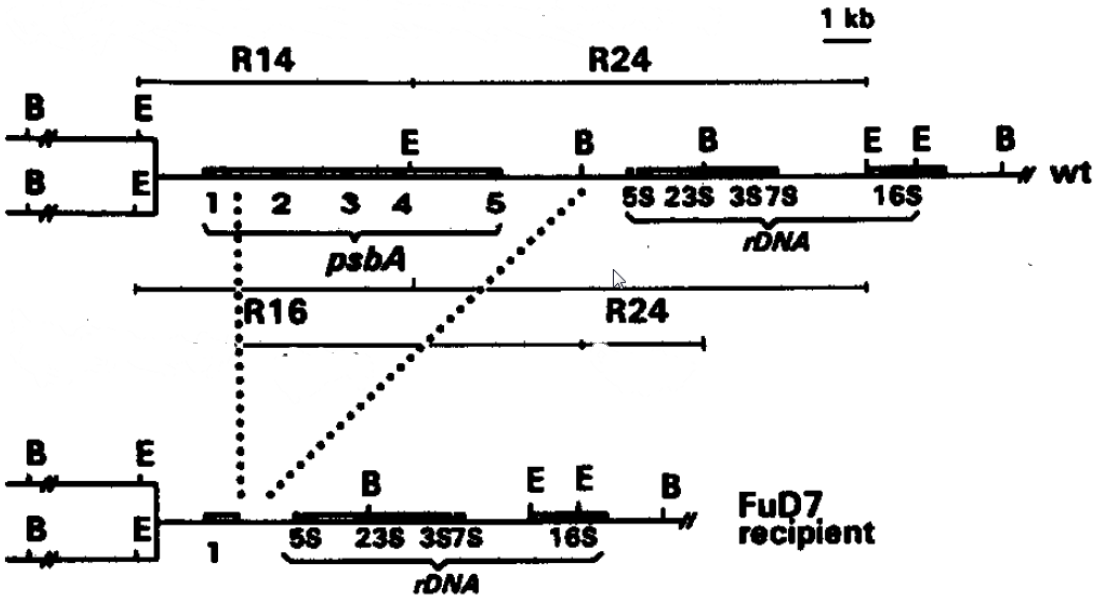
Κεφάλαιο 2ο

Υλικά και μέθοδοι

2.1. Στελέχη

2.1.1. Βακτηριακά στελέχη – Το στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* DH10B προέρχεται από το στέλεχος MC1061 (Grant *et al*.,1990) και διαθέτει κάποιες χρησιμές ιδότητες, όπως, υψηλή απόδοση μετασχηματισμού, την ικανότητα ανάληψης και σταθερής διατήρησης μεγάλων πλασμιδίων, την έλλειψη συστημάτων περιορισμού εξαρτώμενων από τη μεθυλίωση (MDRS) καθώς και την επιλογή μετασχηματισμένης αποικίας βάση της α-συμπλήρωσης του γονιδίου lacZ. Το στέλεχος DH10B έχει γονότυπο: F^- endA1 $deoR^+$ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 ϕ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str^R λ^-.

2.1.2. Στελέχη του μικροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii* – Το στέλεχος FuD7 που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από wt στέλεχος της χλαμυδομονάδας στο οποίο δημιουργήθηκε μια έλλειψη 8 kb στο cpDNA. Η έλλειψη βρίσκεται στην μια ανεστραμμένη αλληλουχία του cpDNA και ξεκινάει από την αρχή του πρώτου εσωνίου του γονιδίου psbA κσι εκτείνεται εώς και την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Το στέλεχος FuD7 είναι ανίκανο να φωτοσυνθέσει καθώς το psbA γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη D1 που συμμετέχει στο σύμπλοκο του φωτοσυστήματος II.



Εικόνα 7: Η έλλειψη που διαθέτει το στέλεχος FuD7 του *C. reinhardtii* σε σχέση με το wild type. Η έλλειψη ξεκινάει από την αρχή του πρώτου εσωνίου του γονιδίου psbA και περιλαμβάνει όλο το γονίδιο συν την 3΄ αμετάφραστη περιοχή. Το γονίδιο περιλαμβάνει 4 μεγάλα εσώνια μεγέθους 1.1 -1.8 kb (Johanningmeier and Heiss (1993).

2.2. Θρεπτικά μέσα

2.2.1. Θρεπτικά μέσα - Βακτηριακή καλλιέργεια

- Luria-Bertani (LB) θρεπτικό μέσο:
  - 0.5 % (w/v) NaCl
  - 1% (w/v) bacto-tryptone
  - 0.5% (w/v) bacto-yeast extract

Για στέρεο θρεπτικό μέσο LB, στο παραπάνω μίγμα προστέθηκε 2% (w/v) άγαρ ρυθμίζοντας το pH 5.8-6.2. Το μέσο υποβλήθηκε σε αποστείρωση σε αυτόκαυστο σε τυπικές συνθήκες (120^{o}C, 20 min). Τα αντιβιοτικά προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο αφού είχε αφεθεί να κρυώσει στους 55°C περίπου, σε τελική συγκέντρωση σύμφωνα με το χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό.

- Αντιβιοτικά:
  - Αμπικιλλίνη (SIGMA) διαλύθηκε σε ddH_2O για την παρασκευή διαλύματος (100 mg/ml), το οποίο αποστειρώθηκε με διήθηση μέσω φίλτρου σύριγγας 0.22 μm και αποθηκεύτηκε στους –20^{o}C σε κλάσματα των 500 μl.
  - Καναμυκίνη (100 mg/ml) (SIGMA), παρασκευάστηκε με όμοιο τρόπο, αποστειρώθηκε με διήθηση μέσω φίλτρου σύριγγας 0.22 μm και αποθηκεύθηκε στους –20^{o}C σε κλάσματα των 500 μl.
  - Χλωραμφαινικόλη (25 mg/ml) διαλύθηκε σε 100% αιθανόλη και αποθηκεύτηκε επίσης στους –20^{o}C σε κλάσματα των 500 μl.

2.2.2. Θρεπτικά μέσα - Καλλιέργεια *Chlamydomonas reinhardtii*

- **Διάλυμα Α** (1L) :

  NH_4Cl 15gr

  $MgSO_4 . 7H_2O$ 4 gr

  $CaCl_2 . 2H_2O$ 2 gr

- **Διάλυμα Β** (100 ml) :

  K_2HPO_4 28.8 gr

  KH_2PO_4 14.4 gr

- **Διάλυμα Γ – Hutner's trace elements** (1L) :

  EDTA disodium salt 50 gr

  $ZnSO_4.7H_2O$ 22 gr

  H_3BO_3 11.4 gr

  $MnCl_2 . 4H_2O$ 5.06 gr

  $CoCl_2 . 6H_2O$ 1.61 gr

  $CuSO_4 . 5H_2O$ 1.57 gr

  $FeSO_4 . 7H_2O$ 4.99 gr

  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} .4H_2O$ 1.10 gr

- **Θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate)** (1L) για υγρή καλλιέργεια:

  2.42 gr Tris Base

  25 ml Διάλυμα Α

  530 μl Διάλυμα Β

  1 ml Διάλυμα Γ

  1 ml acetic acid

  ddH2O εώς 1L

2.3. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli*

Για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων, κύτταρα *E. coli* καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό (LB) έως ότου η συγκέντρωση των κυττάρων να γίνει περίπου 10^8 κύτταρα/ml (OD550=0.5-0.6). Η καλλιέργεια *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων πρέπει να βρίσκεται στο μέσον περίπου της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε falcons, τα οποία τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε 2500 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με ήπια ανάδευση σε 30 ml κρύου διαλύματος TfbI. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, σε 2000 rpm, στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε και προστέθηκαν 4 ml κρύου διαλύματος TfbII για επαναδιαλυτοποίηση. Έπειτα το δείγμα επωάστηκε στον πάγο για 30 λεπτά.

Το τελικό διάλυμα των δεκτικών κυττάρων μοιράστηκε σε 100 μl/eppendorf και αφού αφέθηκαν στιγμιαία να παγώσουν σε υγρό άζωτο, αποθηκεύτηκαν στους –80°C.

- TfbI (Transformation buffer I)

  3 ml 1M CH_3COOK

  5 ml 1M $MnCl_2$

  10 ml 1M KCl

  1 ml 1M $CaCl_2$

  15 ml glycerol

  ddH_2O μέχρι 100 ml

TfbII (Transformation buffer II)

200 μl 1M MOPS

1.5 ml 1M $CaCl_2$

200 μl 1M KCl

3 ml glycerol

ddH_2O μέχρι 20 ml

2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*

Σε 50 μl κυττάρων *E. coli* (-80°C) προστέθηκε 1 μl πλασμιδιακού DNA (~200 ng/μl), αναδεύτηκε ήπια και επωάστηκε στους 4°C (σε πάγο) για 30 min. Έπειτα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 40°C για 1 min και αφέθηκαν στον πάγο για ακόμη 20 min. Προστέθηκαν 950 μl LB και ακολούθησε επωάση στους 37°C υπό ανάδευση για 45 min. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 sec, αφαιρέθηκαν 900 μl από το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε στο θρεπτικό που απέμεινε. Τέλος, τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλίο με LB/Agar θρεπτικό μέσο και κατάλληλο αντιβιοτικό και αφέθηκαν προς ανάπτυξη αποικιών στους 37 °C για 16-22 h.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων στηρίζεται στην εξακρίβωση της παρουσίας τόσο του πλασμιδίου φορέα όσο και του ξένου DNA που έχει ενσωματωθεί σ' αυτό. Σ΄αυτή την περίπτωση, μετά τη φάση μετασχηματισμού το εναιώρημα των βακτηρίων επιστρώνεται σε τρυβλία petri το θρεπτικό υλικό των οποίων είναι εμπλουτισμένο με:

- κατάλληλο αντιβιοτικό
- IPTG που επάγει την παραγωγή γαλακτοσιδάσης διασπώντας την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη.
- X-gal

Η διάκριση μεταξύ των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και αυτών που δεν έχουν δεχτεί το ένθεμα βασίζεται στο εξής : Ως γνωστόν το ένθεμα παρεμβάλλεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το προϊόν του γονιδίου ευθύνεται για την υδρόλυση του X-gal (5-bromo- 4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γαλάζιου χρώματος στις αποικίες. Η αδρανοποίηση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης λόγω της παρεμβολής του ενθέματος οδηγεί σε μη διάσπαση του X-gal που έχει προστεθεί στο υπόστρωμα και συνεπώς προκύπτουν αποικίες λευκού χρώματος, τις οποίες επιλέγουμε.

2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, 2015). 5 ml υγρής καλλιέργειας *E. coli* σε LB, η οποία αφέθηκε να αναπτυχθεί για 16-22 h, φυγοκεντρήθηκε και η πελέτα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 250 μl διαλύματος P1 (διάλυμα επαναιώρισης). Έπειτα, προστέθηκαν 250 μl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης των κυττάρων) και επώαση για 5 min. Σε επόμενο βήμα προστέθηκαν 350 μl διαλύματος N3 (διάλυμα εξουδετέρωσης) και ακολούθησε φυγοκέντριση (13000 rpm) του δείγματος για 10 min. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε QIAprep κολώνα και φυγοκεντρήθηκε για 1 min. Στη συνέχεια, η κολώνα πλύθηκε με τη προσθήκη 750 μl διαλύματος PE. Τέλος, η κολώνα τοποθετήθηκε σε 1.5 ml eppendorf και το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε με τη προσθήκη 30 μl διαλύματος EB (διάλυμα έκλουσης) και φυγοκέντριση για 1 min σε 13000 rpm. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000. Η συσκευή αυτή εκτελεί αναλύσεις απορρόφησης πλήρους φάσματος UV-Vis (220-750nm) και προορίζεται μεταξύ άλλων για μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων DNA, σε μικρού όγκου δείγματα (2 μl).

2.6. Τεχνικές κλωνοποίησης

2.6.1. Περιοριστική πέψη πλασμιδιακού DNA

Η αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA περιλαμβάνει:

5 μl πλασμιδιακού DNA (τελική συγκέντρωση εώς 200 ng/μl),

3 μl of 10X BSA,

3 μl από 10x buffer κατάλληλο για το ένζυμο κοπής,

1 μl περιοριστικό ένζυμο.

Το μίγμα της αντίδρασης επωάστηκε σε κατάλληλη θερμοκρασία για 1 h και στη συνέχεια τα θραύσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1-2%).

2.6.2. Ηλεκροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης:

• Agarose (Sigma)

• Running Gel Buffer (TAE buffer): TAE Buffer 50X stock: 24.2 % (w/v) Tris base, 10% (v/v) 0,5M EDTA, 57 ml glacial acetic σε τελικό όγκο 1lt. 1x TAE (40 ml 50X TAE σε τελικό όγκο 2 L συμπληρωμένο με απιονισμένο νερό).

• EtBr

• Χρώση DNA με Orange-G

• UV light για οπτικοποίηση του gel

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον καθαρισμό θραυσμάτων DNA. Πήκτωμα αγαρόζης (συνήθως 1.2 % αγαρόζη σε TAE buffer) παρασκευάστηκε με προσθήκη 1.2 gr αγαρόζης σε 100 ml 1X TAE , αναμίχθηκε και στη συνέχεια θερμάνθηκε για 2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου το διάλυμα κατέστη ομογενές. Ακολουθεί συναρμολόγηση της συσκευής πηκτής. Μετά την προσθήκη διαλύματος χρώσης βρωμιούχου εθιδίου (EtBr), το ρευστό ακόμα πήκτωμα (gel) τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να στερεοποιηθεί. Τα δείγματα DNA αναμείχθηκαν με τη χρωστική Orange-G και τοποθετήθηκαν στα πηγάδια. Το πήκτωμα έτρεξε στα 230 V για τουλάχιστον μισή ώρα για να εξασφαλιστεί ο διαχωρισμός των θραυσμάτων. Το πήκτωμα στη συνέχεια απεικονίστηκε υπό υπεριώδες φως (UV light).

2.6.3. Καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης

Ο καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 2015). Το πρωτόκολλο είναι για τον καθαρισμό μέχρι 10 μg DNA (70 bp έως 10 kb). Το θραύσμα DNA κόπηκε από το πήκτωμα αγαρόζης με ένα καθαρό νυστέρι και ζυγίστηκε. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 3 όγκοι buffer QG σε 1 όγκο gel (gel 100 mg ~ 100 μλ). Η μέγιστη ποσότητα πηκτώματος ανά στήλη είναι 400 mg. Το δείγμα επωάστηκε στους 50°C για 10 λεπτά (ή μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πήκτωμα). Μετά τη διάλυσή του, ελέγχθηκε ότι το χρώμα του μίγματος είναι κίτρινο (παρόμοιο με το ρυθμιστικό διάλυμα QG) γεγονός που υποδεικνύει ότι έχει το επιθυμητό pH. Έπειτα, το δείγμα τοποθετήθηκε σε κολώνα (spin column) και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό. Η κολώνα πλύθηκε με τη προσθήκη 750 μl διαλύματος PE. Τέλος, η κολώνα τοποθετήθηκε σε 1.5 ml eppendorf και το DNA εκλούστηκε με τη προσθήκη 30 μl διαλύματος EB (διάλυμα έκλουσης) και φυγοκέντριση για 1 min σε 13000 rpm.

2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR, amplification) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein. Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια ενζυματική αντίδραση *in vitro*. Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές - ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

Η αντίδραση περιλαμβάνει 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

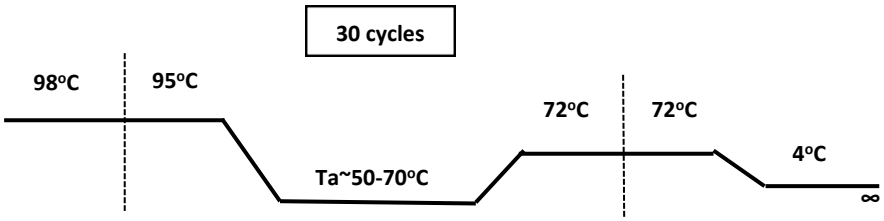
1) Αποδιάταξη της μήτρας του DNA
2) Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες.
3) Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA μεκατεύθυνση 5'-3'.

Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Μετα από n κύκλους το προιόν PCR περιέχει 2^n δίκλωνα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές. Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων περιλάμβανε τα ακόλουθα:

- DNA μήτρα
- Εκκινητές (Primers) 10 pmol/ μl
- DNA πολυμεράση (Phusion High-Fidelity, NEB) (1u/μl)
- ρυθμιστικό διάλυμα (5X Phusion High-Fidelity Buffer)
- Μίγμα των τεσσάρων δεόξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs mix) 10mM
- διπλά απεσταγμένο νερό (ddH_2O)

Το μίγμα της αντίδρασης που παρασκευάζεται κάθε φορά είναι τελικού όγκου 25 μl και περιέχει 1.25 μl από κάθε εκκινητή σε τελική συγκέντρωση 10 pmol /μl, 5 μl Phusion High-Fidelity Buffer 5X, 0.75 μl dNTPs mix και 0.25 μl Phusion High-Fidelity DNA πολυμεράση, 1 μl DNA template και ddH_2O. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε thermocycler υπό τις συνθήκες που απαιτούνται ανάλογα με την αντίδραση.

Η αντίδραση PCR περιγράφεται γενικά από τις παρακάτω παραμέτρους, όπου η θερμοκρασία επαναδιάταξης των μορίων DNA που εφαρμόζεται κάθε φορά (Ta=annealing temp.) υπολογίζεται ανάλογα από τη σύσταση των εκκινητών:



***Εικόνα 8*:** Σχηματική απεικόνιση των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR.

2.8. Βελτιστοποίηση κωδικής αλληλουχίας γονιδίου TXS

Η κωδική αλληλουχία του γονίδιου TXS, από το *Taxus brevifolia,* που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της εργασιας, κρίθηκε σκόπιμο να βελτιστοποιηθεί ως προς τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται στον χλωροπλάστη της χλαμυδομονάδας (codon usage optimization), ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχημένης έκφρασης του. Για το σκοπό αυτο, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CUO (Codon Usage Optimizer beta 0.92, Khai 2008). Τα χλωροπλαστικά γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπο για την προσαρμογή της αλληλουχίας ήταν τα εξής: psbK (photosystem II protein K), rbcL (big unit of Rubisco), psbD (photosystem II protein D2), psbA (photosystem II protein D1), psbC (photosystem II protein CP-43), psbB (photosystem II protein CP-43), psaC (Photosystem I subunit VII), psaB (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2), petB (Cytochrome b6), atpA (ATP synthase subunit alpha), atpB (ATP synthase subunit beta), atpH (ATP synthase subunit c). Ο πίνακας βαρύτητας των κωδικονίων που προήλθε από την ανάλυση των γονιδίων αυτών φαίνεται στο παράρτημα II (*Πίν. 5*). Μετά την in silico βελτιστοποίηση, ακολούθησε σύνθεση της αλληλουχίας optTXS ως ενα τμημα μαζί με το 3' UTR του γονιδίου atpA, δηλαδή συντέθηκε η αλληλουχία optTXS-3'UTR atpA από την εταιρία Invitrogen (*Παράρτημα II, Πίν.6*).

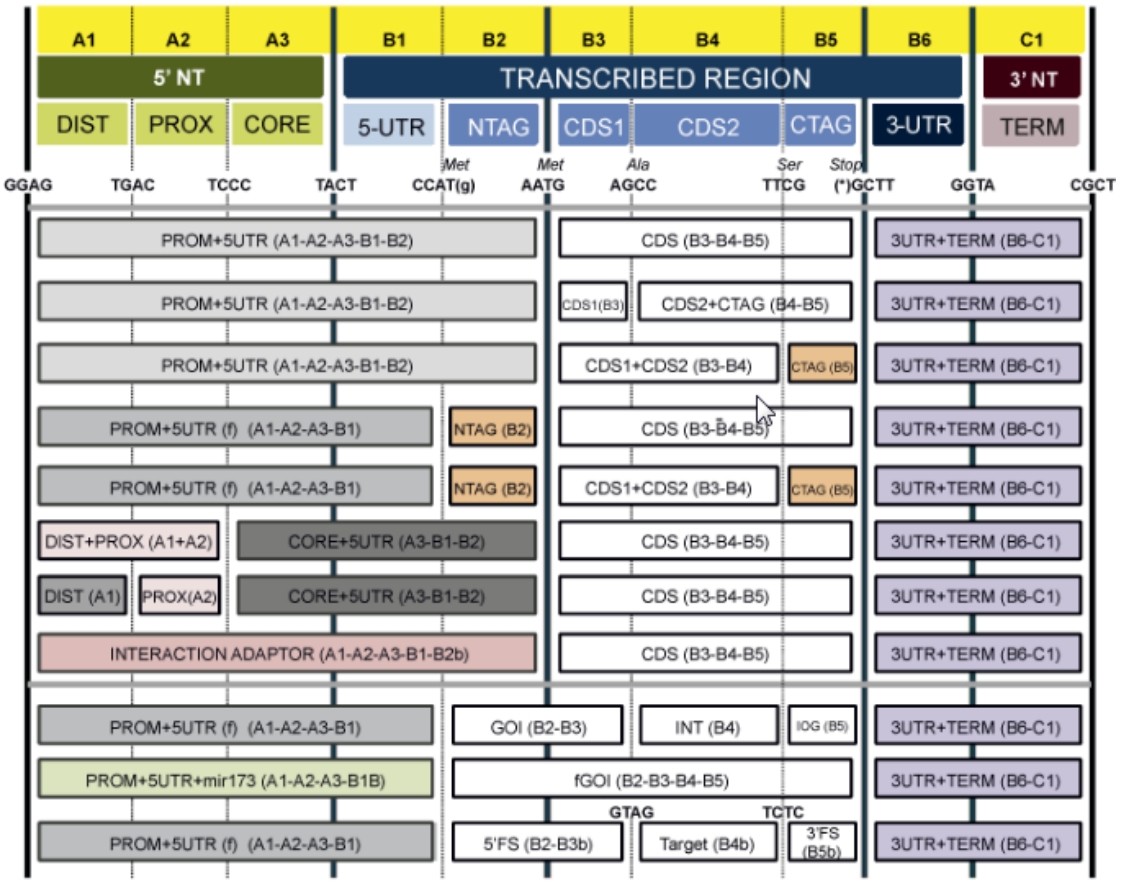
2.9. Golden Braid

Η χρήση του Golden Braid ως ένα εύχρηστο πλαίσιο συναρμολόγησης σύνθετων DNA κατασκευών με εφαρμογές στη Γενετική Μηχανική και τη Συνθετική Βιολογία αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την κατασκευή ολοκληρωμένων μεταγραφικών μονάδων (Sarrion-Perdigones et al., 2015). Αυτή η μέθοδος κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε στην

παρούσα εργασία για τον *in silico* σχεδιασμό και την σταδιακή κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων με σκοπό τον μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του μικροφύκους *Chlamydomonas reinhardtii*.

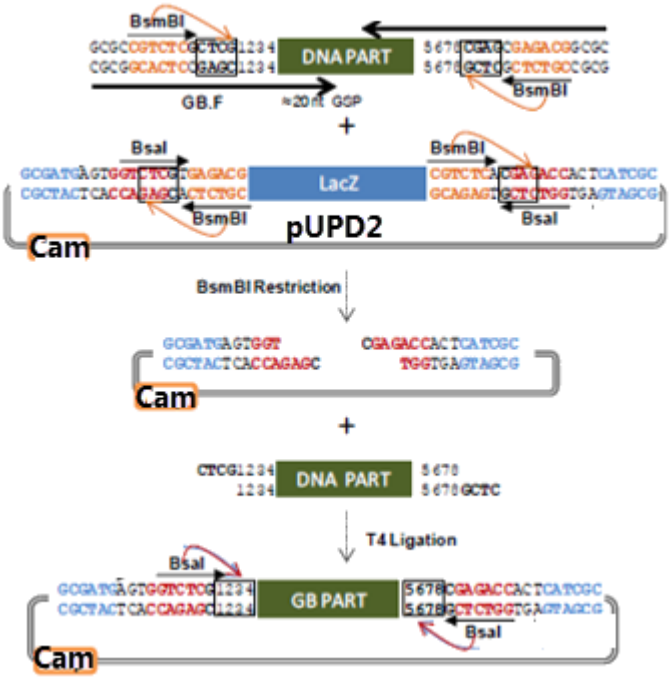
Η μέθοδος του Golden Braid στηρίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων τύπου IIS και συγκεκριμένα στα ένζυμα BsaI και BsmBI. Αυτά τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να κόβουν τμήματα DNA σε απόσταση 1 bp από τη θέση αναγνώρισης και να δημιουργούν έτσι κολλώδη άκρα μήκους 4 nt. Η χρήση αυτών των ενζύμων στοχεύει στην ένωση τμημάτων DNA σε φορείς κλωνοποίησης χωρίς τη δημιουργία σημαδιών από την διαδικάσια κοπής και ένωσης των επιθυμητών τμημάτων όπως αλληλουχίες αναγνωρίσης περιοριστικών ενζύμων μέσα στην γονιδιακή κατασκευή.

Βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η μέθοδος είναι η χρήση κατάλληλων αλληλουχιών μήκους 4 bp στα 5’ και 3’ άκρα των επιθυμητών DNA τμημάτων οι οποίες εξασφαλίζουν τη σειρά με την οποία θα ενωθούν τα επιμέρους αυτά DNA τμηματα σε μια κατασκευή, σύμφωνα με το προκαθορισμένο από τη μέθοδο σχήμα (*Εικ. 9*) (για περισσότερες πληροφορίες βλ. https://gbcloning.upv.es/).



Εικόνα 9: Η γραμματική του Golden Braid (GB grammar): σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών τρόπων με τους οποίους η μέθοδος επιτρεπει τη συγκόλληση των επιμέρους τμημάτων, καθώς και οι αλληλουχίες 4 bp που χρησιμοποιούνται στα 5’ και 3’ άκρα των επιθυμητών DNA τμημάτων.

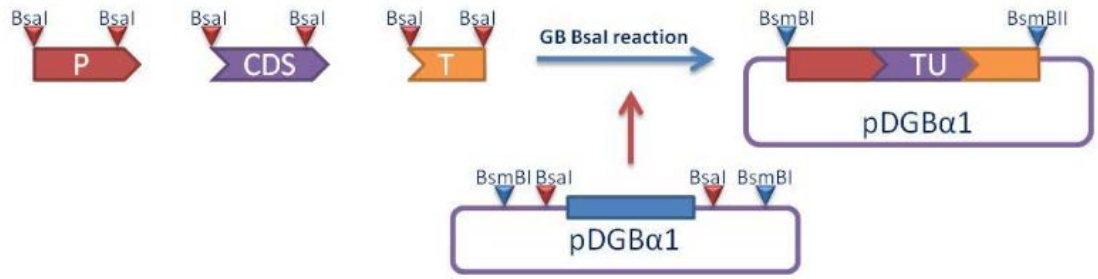
Το πρώτο βήμα της στρατηγικής κλωνοποίησης του Golden Braid είναι η εισαγωγή των επιθυμητών τμημάτων DNA σε έναν αρχικό φορέα κλωνοποίησης τον pUPD2 , μια διαδικασία η οποία ονομάζεται domestication, ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα (*βλ. γραμματική του GB, Εικ. 9*) για την περαιτέρω συναρμολόγηση της κατασκευής που θέλουμε να επιτύχουμε. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας ταυτόχρονης πέψης (με περιοριστικό ένζυμο BsmBI) και λιγοποίησης (με T4 λιγάση), σε μία αντίδραση, του φορέα και του επιθυμητού τμήματος DNA το οποίο έχει ήδη πολλαπλασιαστεί με τεχνική PCR (*Εικ. 10*).



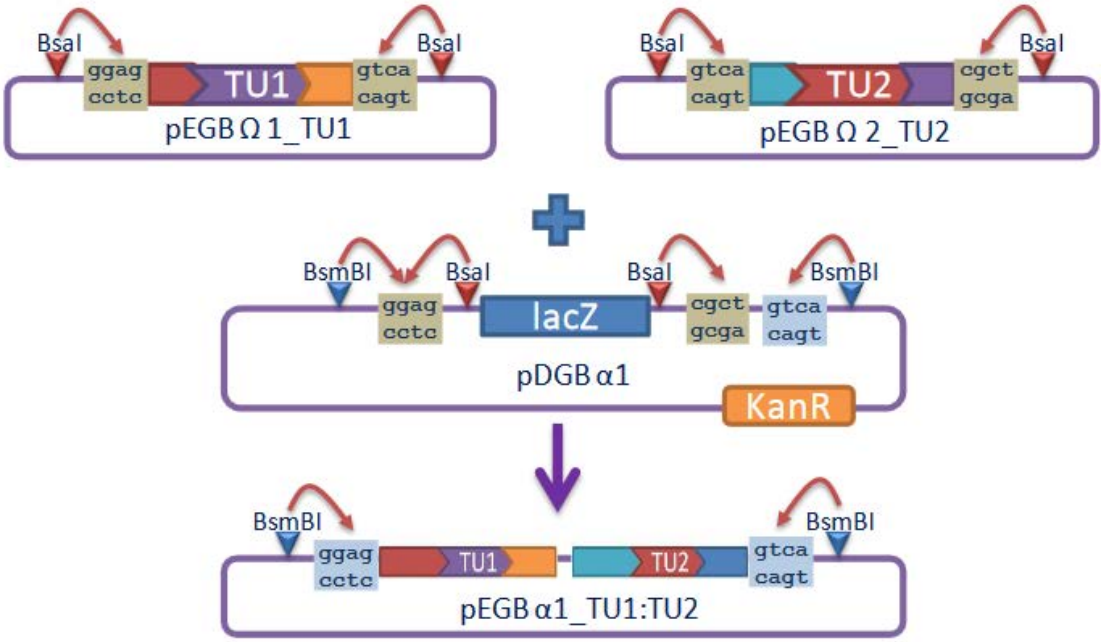
Εικόνα 10: Η διαδικασία της εισαγωγής των επιθυμητών τμημάτων DNA (GB patches) στον εναρκτήριο φορέα pUPD2 (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

Σε υψηλότερο επίπεδο οργάνωσης της κατασκευής, δηλαδή για την ένωση δύο ή περισσότερων τμημάτων που έχουμε εισάγει σε pUPD2 φορείς, χρησιμοποιούμε και πάλι μια αντίδραση ταυτόχρονης πέψης-λιγοποίησης με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (BsaI αν θέλουμε να τα εισάγουμε σε φορείς pDGB1-*alpha1*, pDGB1-*alpha2* και BsmBI για pDGB1-*omega1* και pDGB1-*omega2* φορείς) και T4 λιγάση, με τελικό στόχο τη δημιουργία ολοκληρωμένης μεταγραφικής μονάδας (*Εικ. 11*). Με το σύστημα Golden Braid μπορούμε να δημιουργήσουμε ακόμη πιο σύνθετες DNA κατασκευές μέσω δυαδικής ή πολλαπλής συναρμολόγησης των φορέων pDGB1*alpha1-alpha2* είτε των φορέων pDGB1*omega1-omega2* πρός σχηματισμό φορέων κλωνοποίησης που περιλαμβάνουν δύο μεταγραφικές

μονάδες γονιδίων μέσω και πάλι μιας απλής διαδικάσιας πέψης-λιγοποίησης (restriction – ligation) με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (*Εικ. 12*).



Εικόνα 11: Παράδειγμα πολλαπλών αντιδράσειων Golden Braid. Πολλαπλή αντίδραση BsaI τριών βασικών Gbparts χρησιμοποιώντας pDGB1-α1 πλασμίδιο ως δέκτη. P=υποκινητής, CSD=κωδική περιοχή,T=αλληλουχία τερματισμού. Η σωστή σειρά συγκόλλησης εξασφαλίζεται με τα συγκεκριμένα τετρανουκλεοτιδικά άκρα της γραμματικής του GB.



Εικόνα 12: Παράδειγμα «γραμματικά» σωστής δυαδικής συναρμολόγησης φορέων: μια μεταγραφική μονάδα κλωνοποιήθηκε σε ένα πλασμίδιο τύπου 1 από το επίπεδο Ω (TU1) μπορεί να συνδυαστεί με ένα συμπληρωματικό TU (TU2) που κλωνοποιείται σε ένα συμπληρωματικό πλασμίδιο τύπου 2 από το ίδιο επίπεδο Ω, χρησιμοποιώντας το pDGB1-α1 πλασμίδιο ως δέκτη.

2.9.1. Domestication σε pUPD2 φορείς κλωνοποίησης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε thermocycler στις ακόλουθες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής :

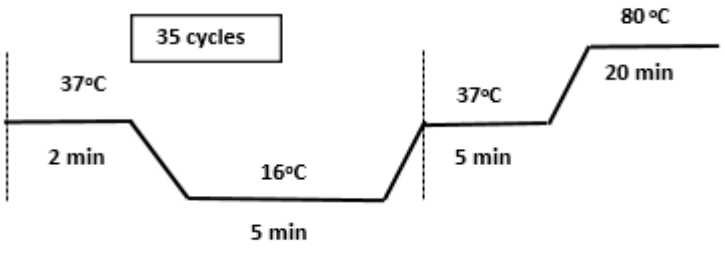
- 40 ng pUPD2
- 75 ng επιθυμητό τμήμα DNA
- 5-10 units BsmBI
- 3 units T4 λιγάση
- buffer T4 λιγάσης
- ddH_2O εώς τελικό όγκο 10 μl

$37^oC \rightarrow 2$ min
$16^oC \rightarrow 5$ min
$37^oC \rightarrow 5$ min
$80^oC \rightarrow 20$ min
} 35 cycles

2.9.2. Κατασκευή ολοκληρωμένης μεταγραφικής μονάδας (GB TU Assembly)

Ο συνδυασμός των τμημάτων DNA (π.χ. 5' αμετάφραστη περιοχή, υποκινητής, γονίδιο, αλληλουχία λήξης μεταγραφής κλπ), που εισάγαμε στο προηγούμενο βήμα (domestication) σε pUPD2 φορείς (GB parts), για την κατασκευή ολοκληρωμένης μεταγραφικής μονάδας υποστηρίζεται από τη διαδικτυακή πλατφορμα GB TU Assembler. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε thermocycler στις ακόλουθες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

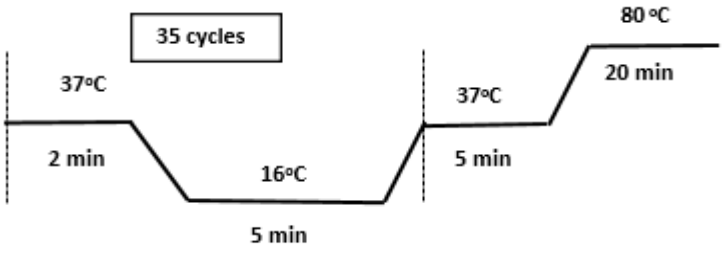
- 75 ng από κάθε GB part
- 75 ng destination vector (κάποιος από τους pDGB1-*alpha1*, pDGB1-*alpha2*, pDGB1-*omega1* και pDGB1-*omega2*)
- 5-10 units BsaI ή BsmBI (εξαρτάται από τον destination vector που επιλέχθηκε)
- 3 units T4 λιγάση
- buffer T4 λιγάσης
- ddH_2O εώς τελικό όγκο 10 μl



2.9.3. Δημιουργία σύνθετών DNA κατασκευών μέσω δυαδικής συναρμολόγησης φορέων (GB Binary Assembly)

Με το σύστημα Golden Braid μπορούμε να δημιουργήσουμε πιο σύνθετες DNA κατασκευές μέσω δυαδικής ή πολλαπλής συναρμολόγησης των φορέων pDGB1alpha1-alpha2 είτε των φορέων pDGB1omega1-omega2 που προέκυψαν στο προηγούμενο βήμα, GB TU Assemly, πρός σχηματισμό φορέων που περιλαμβάνουν δύο μεταγραφικές μονάδες γονιδίων μέσω και πάλι μιας απλής διαδικάσιας restriction – ligation. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε thermocycler στις ακόλουθες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- 75 ng από κάθε κατασκευή (φορέα) που προέκυψε από GB TU Assembly
- 75 ng destination vector (κάποιος από τους pDGB1-*alpha1*, pDGB1-*alpha2*, pDGB1-*omega1* και pDGB1-*omega2*)
- 5-10 units BsaI ή BsmBI (εξαρτάται από τον destination vector που επιλέχθηκε)
- 3 units T4 λιγάση
- Buffer T4 λιγάσης
- ddH_2O εώς τελικό όγκο 10 μl



Κεφάλαιο 3ο

Αποτελέσματα

3.1. Κατασκευή κασέτας ετερόλογης έκφρασης για το μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *Chlamydomonas reinhardtii*

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι διάφοροι υποκινητές και 5΄-αμετάφραστες περιοχές (UTR) έχουν δραματική επίδραση στη συσσώρευση mRNA και πρωτεϊνών (Eberhard et al., 2002; Nickelsen., 2003; Rasala et al., 2011).

Για την έκφραση των γονιδίων της κατασκευής, ένας από τους υποκινητες που επιλέχθηκε ήταν ο ενδογενής υποκινητής και η 5' UTR του πλαστιδιακού γονιδίου psbD που κωδικοποιεί την πρωτείνη D2 του φωτοσυστήματος II. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτή η ρυθμιστική αλληλουχία έγκειται στο γεγονός ότι το mRNA του psbD είναι από τα πιο άφθονα μεταγραφήματα στο χλωροπλάστη (Nickelsen et al., 1996) αλλά και απο άλλες μελέτες που έδειξαν ότι υπό τη ρύθμιση του εν λόγω υποκινητή επιτυγχάνονται μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης, συγκριτικά με άλλους υποκινητές του *C. reinhardtii* (Barnes et al., 2005; Rosales-Mendoza et al., 2011). Για λόγους επιλογής, η κασέτα περιείχε την πλήρη μεταγραφική μονάδα του γονιδίου psbA χωρίς τα εσώνια ώστε να συμπληρώνει την έλλειψη που υπάρχει στο μεταλλαγμένο στέλεχος FuD7 της χλαμυδομονάδας (*βλ. Ενότητα* 2.1.2.) που θα χρησιμοποιούσαμε για τον μετασχηματισμό. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η 3΄UTR του γονιδίου rbcL που κωδικοποιεί την μεγάλη υπομονάδα της RuBisCo και η οποία δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην αποδόμηση του RNA, όπως γνωρίζουμε ότι λειτουργούν οι περισσότερες 3΄αμετάφραστες περιοχές στο γονιδίωμα του χλωροπλάστη, ρυθμίζοντας έτσι την ποσότητα του mRNA (Blowers et al., 1993).

Μεταξύ του γονιδίου επιλογής και της μεταγραφικής μονάδας του επόμενου γονιδίου των κατασκευών παρεμβάλλαμε μια μικρή αλληλουχία DNA (IS1) 180 bp ώστε να μιμηθούμε την οργάνωση του ενδογενούς γονιδιώματος του χλωροπλάστη, το οποίο διαθέτει γονίδια που χωρίζονται μεταξύ τους με μικρές αλληλουχίες τουλάχιστον 150 bp (Maul et al., 2002) και να διασφαλίσουμε έτσι, την μεταγραφή και των 2 γονιδίων που θέλουμε να ενθέσουμε.

Τέλος, στην κατασκευή μας προσθέσαμε 2 ενδογενείς αλληλουχίες του χλωροπλάστη ως δεξιά και αριστερή περιοχή ανασυνδυασμού, καθώς το εισαγόμενο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Boynton et al., 1988), ώστε να γίνει στοχευμένα η ένθεση της κασέτας έκφρασης (Goldschmidt-Clermont, 1998). Συγκεκριμένα, η ένθεση στοχεύει στις δύο IR (Inverted Repeats) περιόχες (22.211 kb) οι οποίες βρίσκονται στις θέσεις 50000 και 150.000 kb του cpDNA και μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

3.2. *In silico* σχεδιασμός των επιμέρους κατασκευών για το μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *C. reinhardtii*

Οι κατασκευές των κασετών έκφρασης για τις δύο επιμέρους ερευνητικές εργασίες (ταξαδιένιο, λακκάση) σχεδιάστηκαν αρχικά *in silico* στη διαδικτυακή πλατφόρμα του Golden Braid (gbcloning.upv.es/) (Sarrion-Perdigones et al., 2015). Μεγάλη προσοχή δόθηκε στον σωστό *in silico* σχεδιασμό των επιμέρους βημάτων για όλα τα στάδια των κατασκευων, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστη σειρά ένθεσης των τμημάτων, μετέπειτα, στις *in vitro* κατασκευές. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρηση καταλληλων εκκινητών κατά τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων DNA που θα προσέδιδαν σε αυτά τα συγκεκριμένα άκρα μήκους 4bp που φαίνονται στον πίνακα 2.

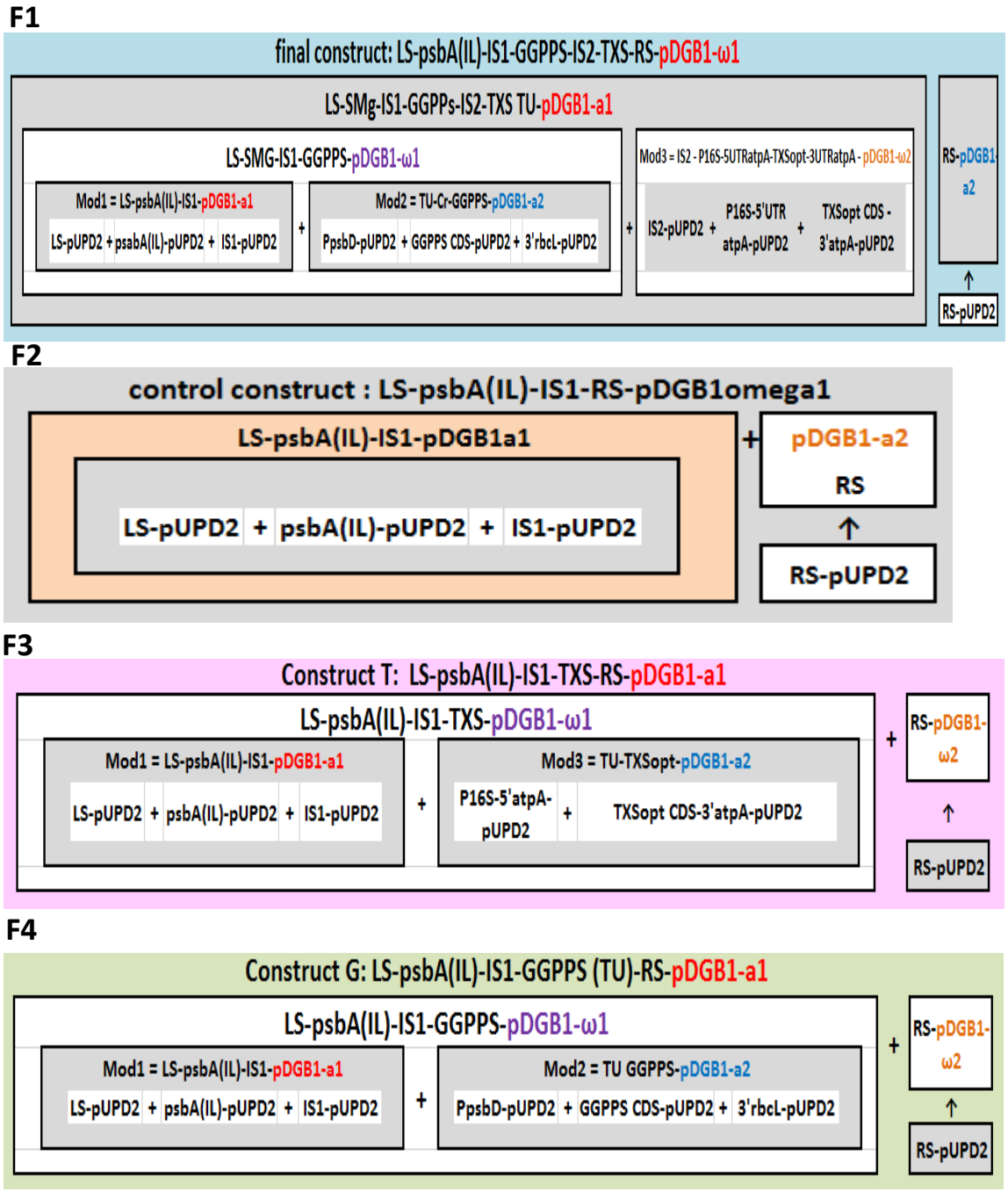
Πίνακας 2: Τα μεμονωμένα τμήματα DNA [LS, psbA (IL), IS1, PpsbD, GGPPS (CDS), 3'rbcl, IS2, P16S-5'UTR atpA, optTXS (CDS)-atpA 3' UTR, BlCotA, RS] και τα 5' και 3' άκρα αυτών, όπως σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες του παρόντος έργου.

fragment	5' end	3' end
LS	GGAG	TACT
psbA(IL)	TACT	GCTT
IS1	GCTT	CGCT
PpsbD	GGAG	AATG
GGPPS (CDS)	AATG	GCTT
3'rbcl	GCTT	CGCT
IS2	GGAG	TGAC
P16S-5'UTR atpA	TGAC	AATG
optTXS (CDS)-atpA 3' Term+UTR	AATG	CGCT
BlCotA	AATG	CGCT
RS	GGAG	CGCT

Έτσι, έχοντας υπόψιν τις ιδιαιτερότητες της μεθόδου Golden Braid, καταλήξαμε στον σχεδιασμό που φαίνεται στις εικόνες 13 και 14. Ακολούθως σχεδιάστηκαν οι φορείς pUPD2 που θα έφεραν τα επιμέρους επιθυμητά τμηματα DNA [LS, SMg, IS1, PpsbD, GGPPS (CDS), 3'rbcl, IS2, P16S-5'UTR atpA, optTXS (CDS)-atpA 3' Term+UTR, BlCotA, RS]. Οι γενετικοί χάρτες αυτών των πλασμιδίων φαίνονται στο παραρτημα Ι (*Εικ. 24-34*). Περαιτέρω, έχοντας αποκτήσει τους γενετικούς χάρτες με ενσωματωμένα τα επιθυμητά τμήματα στον εναρκτήριο φορέα pUPD2, ο in silico σχεδιασμός συνεχίστηκε με την συναρμολόγηση αυτών σε επόμενο επίπεδο, αυτό των φορέων pDBG-a και –ω. Στο στάδιο αυτό και πλέον χρησιμοποιήθηκαν οι εφαρμογές είτε της ελεύθερης συναρμολόγησης (free assembler) είτε της δυαδικής συναρμολόγησης (binary assempler), κατά περίπτωση, ανάλογα με τον αρχικό μας σχεδιασμό *(Εικ.13-14).* Τελικά, το

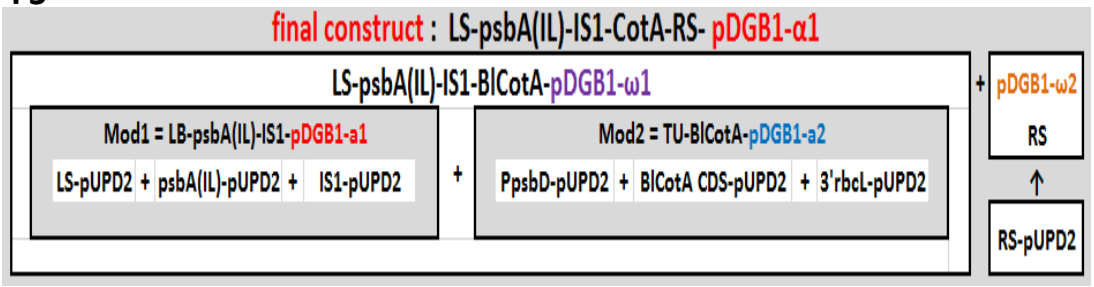
σύνολο των κατασκευών που ήταν απαραίτητες για την ολοκλήρωση του στόχου φαίνονται στον πίνακα 3 και στις εικόνες 13 και 14.

Εφόσον, με τους *in silico* σχεδιασμούς διασφαλίστηκε ότι έγινε σωστός σχεδιασμός σε όλα τα στάδια και επίπεδα συναρμολόγησης των γονιδιακών κατασκευών, προχωρήσαμε στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

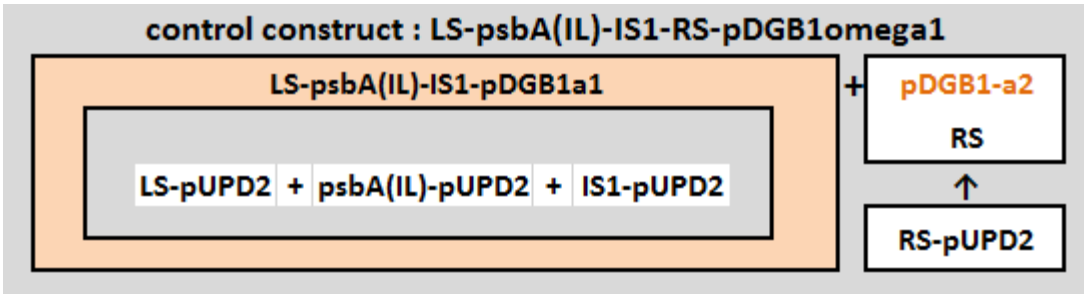


Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης των επιμέρους τμημάτων για την κατασκευή της κασέτας έκφρασης της συνθάσης GGPP και της συνθάσης ταξαδιενίου. **F1:** Τελική κατασκευή της κασέτας, **F2:** το control που θα χρησιμοποιηθεί και δεν θα περιλαμβάνει κανένα απο τα δύο γονίδια ενδιαφέροντος, **F3:** control κατασκευή που θα περιέχει μόνο το γονίδιο GGPP, **F4:** control κατασκευή που θα περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο TXS.

F5



F2



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης των επιμέρους τμημάτων για την κατασκευή της κασέτας έκφρασης της λακκάσης. **F5:** Τελική κατασκευή της κασέτας, **F2:** το control που θα χρησιμοποιηθεί και δεν θα περιλαμβάνει το γονίδιο ενδιαφέροντος.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των κατασκευών που σχεδιάστηκαν για την συναρμολόγηση των κασετών έκφρασης της λακκάσης και της συνθάσης του GGPP και ταξαδιενίου.

Code	Description	Full name	Host vector
D1	domesticated part	LS-pUPD2	pUPD2
D2	domesticated part	psbA(IL)-pUPD2	pUPD2
D3	domesticated part	IS1-pUPD2	pUPD2
D4	domesticated part	PpsbD-pUPD2	pUPD2
D5	domesticated part	GGPPS CDS-pUPD2	pUPD2
D6	domesticated part	BlCotA CDS-pUPD2	pUPD2
D7	domesticated part	3'rbcL- pUPD2	pUPD2
D8	domesticated part	IS2-pUPD2	pUPD2
D9	domesticated part	P16S-5'UTR atpA-pUPD2	pUPD2
D10	domesticated part	TXSopt CDS - 3'atpA-pUPD2	pUPD2
D11	domesticated part	RS-pUPD2	pUPD2
M1	1st order assembly	LS-psbA(IL)-IS1-pDGB1-a1	pDGB1-a1
M2	1st order assembly	TU GGPPS-pDGB1-a2	pDGB1-a2
M3	1st order assembly	IS2 - P16S-5'UTRatpA-TXSopt-3'UTRatpA-pDGB1-ω2	pDGB1-ω2
M4	1st order assembly	RS-pDGB1a2	pDGB1-a2
M5	1st order assembly	RS-pDGB1-ω2	pDGB1-ω2
M6	1st order assembly	TU-BlCotA-pDGB1-a2	pDGB1-a2
A1	2nd order assembly	LS-psbA(IL)-IS1-GGPPS-pDGB1-ω1	pDGB1-ω1
A2	2nd order assembly	LS-psbA(IL)-IS1-GGPPs-IS2-TXS TU-pDGB1-a1	pDGB1-a1
A3	2nd order assembly	LS-psbA(IL)-IS1-TXS-pDGB1-ω1	pDGB1-ω1
A4	2nd order assembly	LS-psbA(IL)-IS1-BlCotA-pDGB1-ω1	pDGB1-ω1
F1	final construct: GGPPS + TXS TUs	LS-psbA(IL)-IS1-GGPPS-IS2-TXS-RS-pDGB1-ω1	pDGB1-ω1
F2	final control construct	LS-psbA(IL)-IS1-RS-pDGB1-ω1	pDGB1-ω1
F3	final GGPPS TU control construct	LS-psbA(IL)-IS1-GGPPs-RS-pDGB1-a1	pDGB1-a1
F4	final TXS TU control construct	LS-psbA(IL)-IS1-TXS-RS-pDGB1-a1	pDGB1-a1
F5	final CotA TU control construct	LS-psbA(IL)-IS1-BlCotA-RS- pDGB1-a1	pDGB1-a1

.

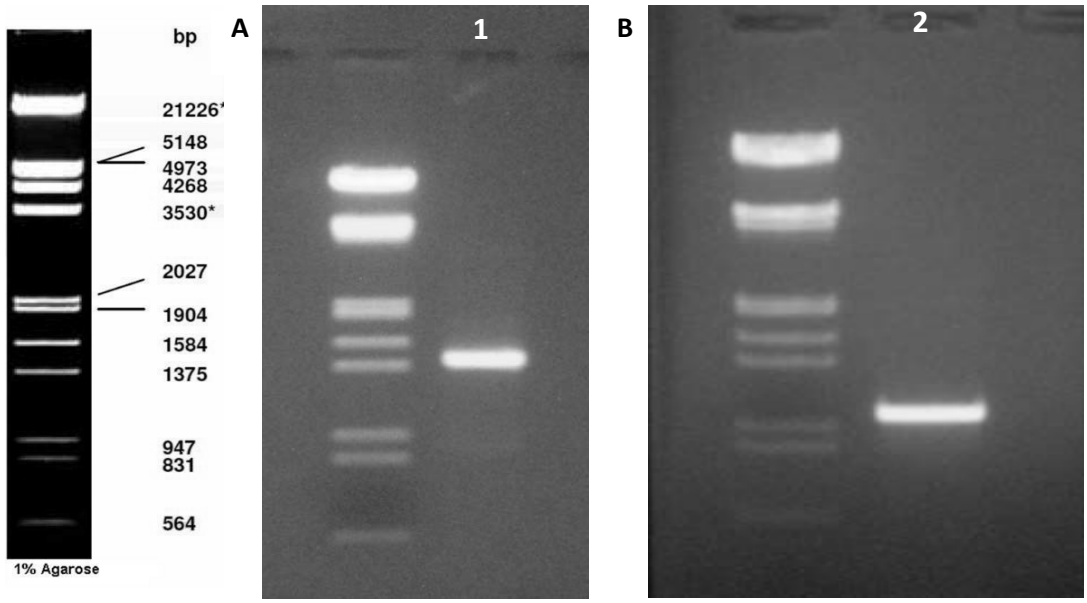
3.3. Κατασκευή κασέτας έκφρασης των ενζύμων GGPPS και TXS - πολλαπλασιασμος των τμημάτων DNA με PCR

Σε αυτή την εργασία, επιλέξαμε τον υποκινητή 16S του rRNA και την 5΄UTR του atpA γονιδίου που κωδικοποιεί μια συνθάση του ATP, ρυθμιστικά στοιχεία συμβάλλουν στην απόδοση υψηλότερων επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών στον χλωροπλάστη του *C. reinhardtii* (Barnes et al., 2005; Rasala et al., 2011; Pourmir et al., 2013). Χρησιμοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία του ενδογενούς γονιδιου GGPPS που βρίσκεται στον πυρήνα της χλαμυδομονάδας και η κωδική αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθάση του ταξαδιενίου (TXS) μαζι με την 3'UTR του TXS. Το γονίδιο TXS συντέθηκε *de novo* ύστερα από επεξεργασία της αλληλουχίας προς βελτιστοποίηση της χρήσης των κωδικονίων (CAI=0.993) με το πρόγραμμα CUO(Codon Usage Optimizer beta 0.92, Khai 2008)(*βλ. Παράρτημα ΙΙ*). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα GGPPS και TXS ήταν ευγενική παραχώρηση του Dr. Σωτηρη Καμπράνη. Το ενδογενές γονίδιο GGPP ανακτήθηκε από πλασμιδιακό φορέα pUC-GGPPS.

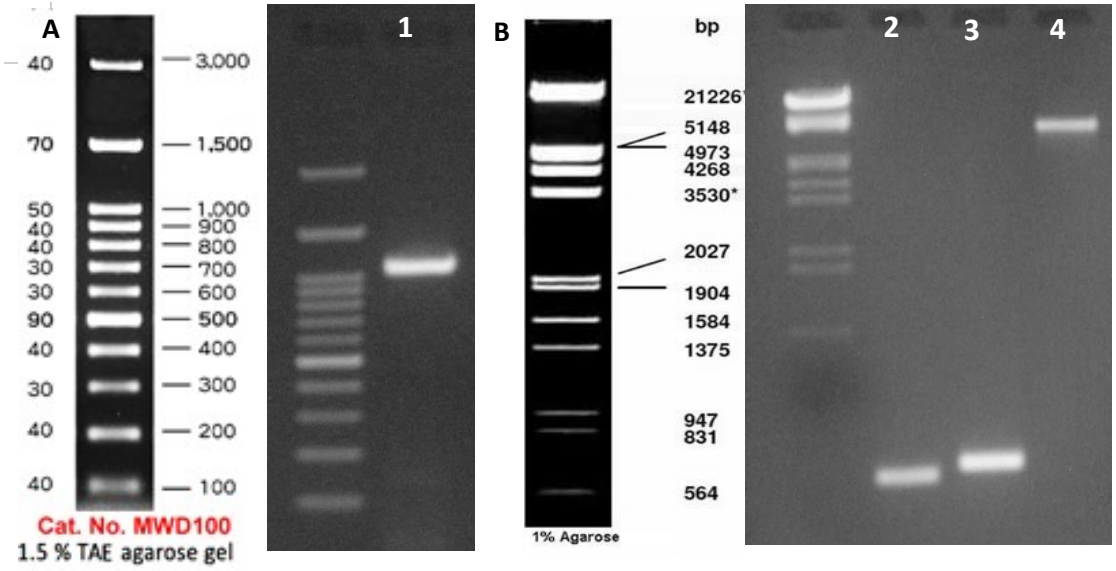
Μεταξύ των γονιδίων ενδιαφέροντος παρεμβάλλαμε τις IS1 και IS2 περιοχές για τους λόγους που εξηγήθηκαν παραπάνω (*Ενότητα 3.1*) οι οποίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να μην επηρεάζουν σε κανένα επίπεδο την κατασκευή της κασέτας (π.χ. να μην περιέχουν αλληλουχίες κοπής και να μην παρουσιάζουν ομοιότητα νουκλεοτιδικης αλληλουχίας με οποιαδήποτε άλλη περιοχή στις κατασκευές μας ώστε να αποφευχθεί τυχόν εκτομή σχηματισμένου βρόγχου.

Η μεταγραφική μονάδα του γονιδίου psbA, ο υποκινητής psbD, η αριστερή και δεξιά αλληλουχία ανασυνδυασμού ανακτήθηκαν από τον πλασμιδιακό φορέα pMM2. Η 3΄UTR-rbcL ανακτήθηκε από το πλασμίδιο pSk-KmR-a6 και ο υποκινητής 16S σε συνδυασμό με τη 5'UTR atpA ανάκτηθηκαν από τον πλασμιδιακό φορέα pTJ322- aphA6-16S-optXR, ο οποίος αγοράστηκε από το www.chlamycollection.org.

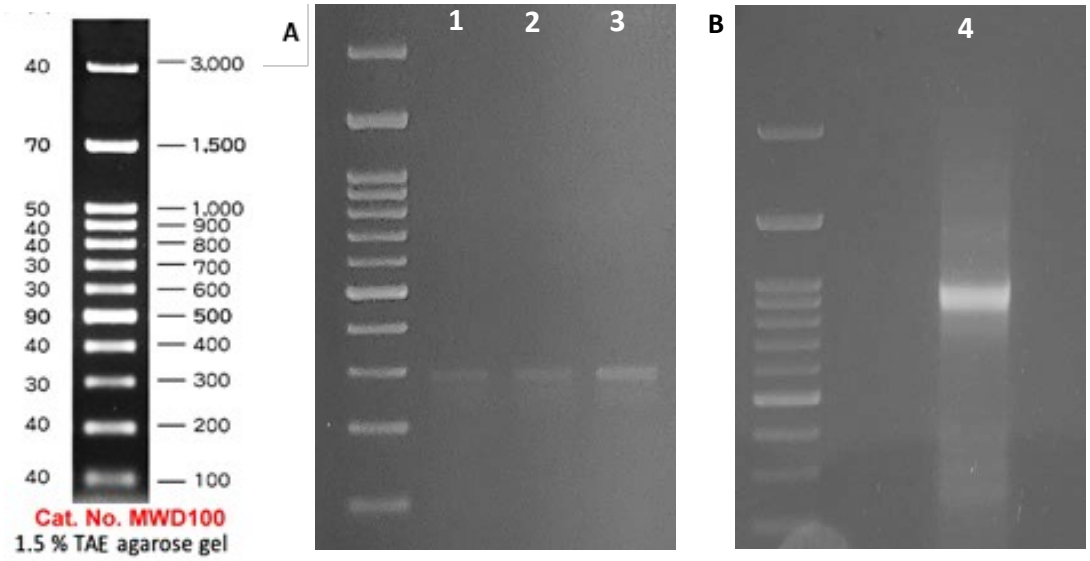
Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της ολοκληρωμένης κασέτας έκφρασης ανακτήθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν με τεχνική PCR και κατάλληλους εκκινητές ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης για την μετέπειτα εισαγωγή τους σε φορείς κλωνοποίησης. Τα προιόντα ταυτοποιήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση κατάλληλου DNA marker (Εικ. 15-18)



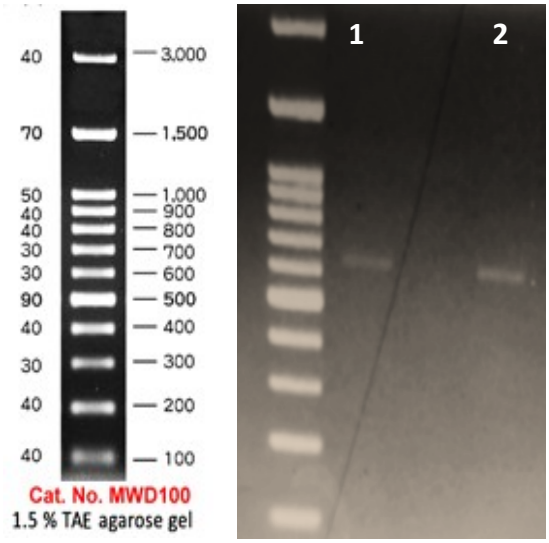
Εικόνα 15: Εικόνες από πήκτωμα αγαρόζης για την πιστοποίηση πολλαπλασιασμού: **A. (1)** του γονιδίου psbA intronless (Selectable marker gene) μεγέθους 1424 bp (1.2% πήκτωμα αγαρόζης) και **B. (2)** της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου GGPPS μεγέθους 994 bp (1.2 % πήκτωμα αγαρόζης) με τεχνική PCR και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Στα αριστερά φαίνεται ο βακτηριοφάγος λ ως δείκτης μεγέθους, ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI/HindIII.



Εικόνα 16: Εικόνες πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση πολλαπλασιασμού: **Α.** της αλληλουχίας που θα λειτουργήσει σαν Right Recombination Site (RS) μεγέθους 1054 bp **(1)** (1.5 % πήκτωμα αγαρόζης), στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους DNA που χρησιμοποιήθηκε, και **Β. (με τη σειρά που εμφανίζονται στο πήκτωμα)** οι αλληλουχίες που θα λειτουργήσουν σαν intergenic regions **(2)** IS1 μεγέθους 180 bp, **(3)** η αλληλουχία IS2 μεγέθους 200 bp και **(4)** η αλληλουχία του συνθετικού γονιδίου optTXS-3'atpA (2400 bp) **(**1.8% πήκτωμα αγαρόζης)στα αριστερά φαίνεται ο βακτηριοφάγος λ ως δείκτης μεγέθους, ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI/HindIII.



Εικόνα 17: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση πολλαπλασιασμού **Α.** της αλληλουχίας 3΄- UTR του rbcL 280 bp (1.5 % πήκτωμα αγαρόζης). Πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις PCR με διαφορετική μήτρα DNA, τα πλασμίδια (1) P-463 , (2) P-464 και (3) pSk-KmR-a6 καθώς υπήρξε πρόβλημα με την ανάκτηση αυτής της αλληλουχίας. Το τμήμα 3΄rbcL που χρησιμοποιήθηκε τελικά ήταν εκείνο που ανακτήθηκε από το φορέα pSk- KmR-a6 (3). **Β.** (4) της αλληλουχίας που θα λειτουργήσει σαν Left Recombination Site (LS) μεγέθους 820 bp (1.5 % πήκτωμα αγαρόζης), Στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους DNA που χρησιμοποιήθηκε



Εικόνα 18: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας του υποκινητή 16S-5' atpA 640 bp (1.5 % πήκτωμα αγαρόζης). Πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις PCR έχοντας ως μήτρα DNA, το πλασμίδιο pTJ322-aphA6-16S-optXR (Pourmir et al., 2013) καθώς υπήρξε πρόβλημα με την ανάκτηση του τμήματος DNA. Στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους DNA που χρησιμοποιήθηκε. (1) και (2) οι ζώνες που αντιστοιχούν στο επιθυμητό τμήμα.

3.4. Κατασκευή κασέτας έκφρασης της βακτηριακής λακκάσης CotA

3.4.1. Βιβλιογραφική έρευνα για την επιλογή κατάλληλου γονιδίου λακκάσης

Για την επιλογή κατάλληλου γονιδίου λακκάσης αξιογήθηκαν τα μεχρι τότε διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούσαν την αλληλουχία των γονιδίων και τις ιδιότητές των αντίστοιχων ενζύμων. Προκειμένου να εξασφαλίστεί η έκφραση του γονιδίου στον χλωροπλάστη της χλαμυδομονάδας, ένα κριτήριο που πρέπει αυτο να πληροί είναι να έχει προκαρυωτική δομή περισσότερο, παρα ευκαρυωτική καθώς ο χλωροπλάστης είναι προκαρυωτικής φύσης. Επομένως, οι επιλογές προσανατολίστηκαν σε λακκασες βακτηριακής προέλευσης, οι οποίες επιπλέον διαθέτουν το πλεονέκτημα ότι εμφανίζουν ενεργότητα οξειδωτικής δράσης έναντι φαινολικών υποστρωμάτων. Άλλα κριτήρια τα οποία λήφθηκαν υπόψιν ήταν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, όπως το εύρος του pH και της θερμοκρασίας στα οποία παρουσιάζουν τη βέλτιστη ενεργότητα τους, το εύρος των υποστρωμάτων και η δραστικότητά τους έναντι αυτών (Km, Kcat). Εξετάστηκε, επίσης, η περιεκτικότητα των γονιδίων σε GC, ώστε να μην ξεπερνάει κατά πολύ την περιεκτικότητα του χλωροπλάστη της χλαμυδομονάδας (~35%), ενώ επίσης, και αν πρόκειται για γονίδια, που έχουν ήδη κλωνοποιηθεί. Η βιβλιογραφική έρευνα απέφερε τα στοιχεία που φαίνονται

στον πίνακα 4. Το γονίδιο της λακκάσης που επιλέχθηκε τελικά ήταν το cotA από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* (BlCotA), το οποίο παραχωρήθηκε ευγενικά από την Dr Vlada B. Urlacher (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Πίνακας 4: Υποψήφιες λακκάσες που μελετήθηκαν βιβλιογραφικά, προκειμένου να επιλεγεί η βέλτιστη για τις ανάγκες του συγκεκριμένου έργου *και κάποιες από τις ιδιότητες που παρουσιάζουν.*

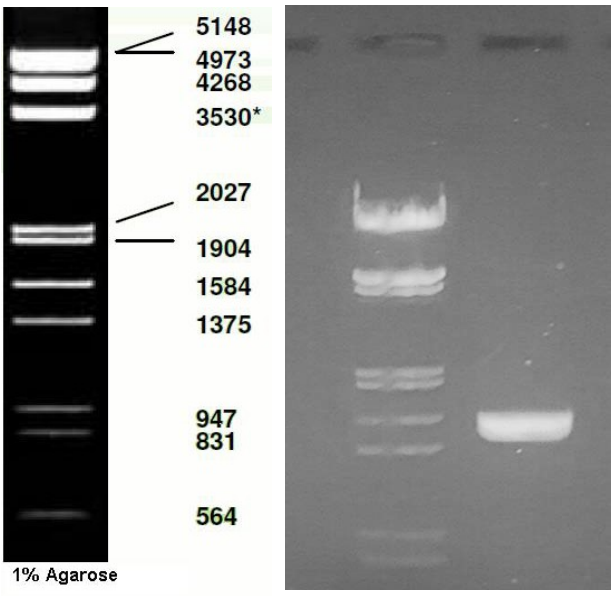
organism	type	GC%	name	cloned	substrates	pH	T	mass	pI
Bacillus licheniformis	**bacteria**	**46,2**			**oxidation of ABTS, SGZ, 2,6DMP, dimerization of sinapic, ferulic, caffeic, syringic acid acid, syringic acid**	**5.0-7.0**	**25-70**	**65 kDa**	**pI=6.81-7**
Streptomyces coelicolor	bacteria (soil)		SLAC	√	ABTS (8 U/mg), DMP, SGZ	4(ABTS), 9 (DMP)	30-60	32 kDa	
E. coli	bacteria	50,8	CueO	√	ABTS (no others tested)	6.5(DMP)		53 kDa	
Pseudomonas putida F6	bacteria (soil)	**61**		no	SGZ (0.11mM), L-Dopa(0.84mM)	5-9 (opt 7 for SGZ)	30	59 kDa	
Stenotrophomonas m.	bacteria (soil)	66,7	Sm laccase	no	syringaldazine (53), ABTS (700), pyrocatechol (25), dy	6-9 (7 for SGZ)	40		
Marinomonas mediterranea	bacteria		PpoA	√	DMP, SGZ				
Streptomyces griseus	bacteria	70-74	EpoA	√	DMPPDA (0.42mM), SGZ (0),guaiacol (0)	6,5	40		
					DMP (N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine sulfate) (58.				
					p-phenylenediamine 19.1				
					chlorogenic acid 15.5				
					dihydroxyphenylalanine (DOPA) 13.7				
					pyrogallol 12.7				
					4-aminoantipyrine 10.9				
					m-methoxyphenol				
Bacillus sp. HR03	bacteria		CotA	√	ABTS (535), DMP (53), SGZ (5), Dopa	S), 6.5-8 (SGZ,DMP, Dopa)		65 kDa	
Bacillus sp. ADR	bacteria			no	o-tolidine, DMP, guaiacol, hydroquinone and L-DOPA	-80% activity at pH7	40	66 kDa	
Bacillus tequilensis SN4	bacteria		SN4LAC	no	o-phenols (DMP(680)>guaiacol>L-DOPA>pyrogallol>catechol) > p-phenols (ABTS, a-naphthol, SGZ) > m-phenols (resorcinol) >tyrosine	5.5-8	85	32 kDa	
Bacillus vallismortis	bacteria			no	ABTS,SGZ, dyes	3-5(ABTS), 7-8(SGZ)	70-85		
Bacillus pumilus DSM 27	bacteria		CotA	√	ABTS (80), SGZ(?), DMP(680), ACS, and another 18 ort	BTS), 7(DMP), 6.5(S	55-75	58 kDa	
Bacillus clausii KSM16	bacteria	44	CotA	√	ABTS, SGZ, DMP, caffeic acid, tannic acid, and bilirubin		50		
Streptomyces griseus	bacteria	70-74	poA, rEpoA	√	DMP (420?), p-phenylenediamine>chlorogenic acid>D	6,5	40	114 kDa	pI=5.5
Streptomyces psammoticus	bacteria				pyrogallol (250)>gallic, tannic acids>DMP>ABTS (390)	8.5 (7-10)	45 (35-55)	43 kDa	pI=7.9
Natrialba sp. C21	archaea				catechol, protocatechol	2.6(ABTS), 8.0(DMP)			
Aeromonas hydrophila WL-11	bacteria	61,5		√	ABTS, DMP			534 a/a	
Klebsiella spp 601	bacteria (soil)			√	DMP(487), ABTS(5630), SGZ(23)	(DMP),7(SGZ), 3(ABTS)		536 a/a	pI=6.1
Klebsiella spp 601	bacteria (soil)			√	wt-->2847 (DMP), 539 (ABTS), 11.6(SGZ)/mutant--> 63	5	37	58.2 kDa	
Bacillus coagulans	bacteria								
Bacillus subtilis	bacteria	43,51	Cot A	√	wt-->60 (DMP), 87 (ABTS), 10(SGZ), 69 [K4(FeCN6)]	6(K4(FeCN6), 7(DMI	37		
Azospillum lipoferum	soil bacteria	67,7			35(SGZ)	6			

3.4.2. Πολλάπλασιασμός του γονιδίου BlCotA με τεχνική PCR

Για την κατασκευή κασέτας για την έκφραση της λακκάσης χρησιμοποιήθηκαν κάποιες ρυθμιστικές αλληλουχίες όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην κασέτα έκφρασης για την παραγωγή ταξαδιενίου όπως ο υποκινητής psbD, 3’ UTR rbcL, το γονίδιο επιλογής psbA, η IS1 και οι αλληλουχίες LS και RS.

Το γονίδιο της λακκάσης ανακτήθηκε από πλασμιδιακό φορέα pET22-cotA με τεχνική PCR. Το προϊόν της αντίδρασης ταυτοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση κατάλληλου DNA marker (*Εικ.* 19).

.

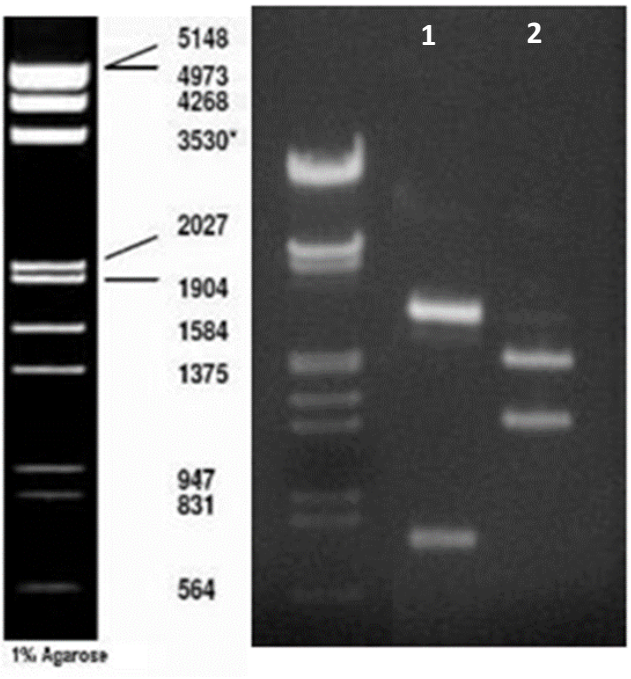


Εικόνα 19: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας του του γονιδίου της λακκάσης cotA μεγέθους 1542 bp (1.2% πήκτωμα αγαρόζης). Στα αριστερά φαίνεται ο βακτηριοφάγος λ ως δείκτης μεγέθους, ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI/HindIII

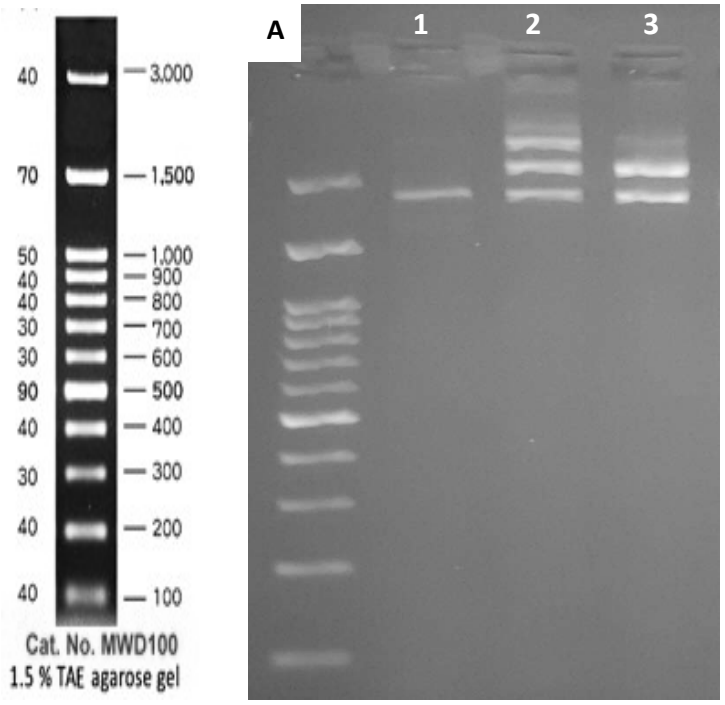
3.5. Κλωνοποίηση των τμημάτων DNA σε pUPD2 φορείς

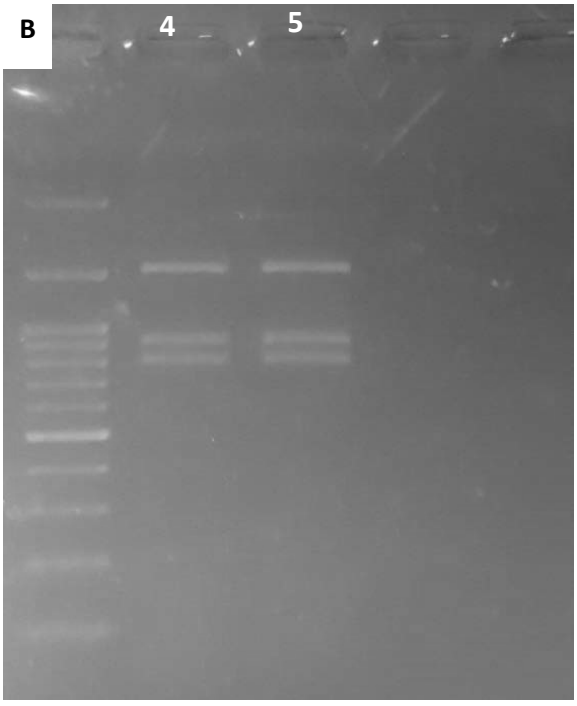
Ακολούθησε ένθεση όλων των αλληλουχιών σε pUPD2 φορείς κλωνοποίησης μέσω μιας διαδικασίας πέψης-λιγοποίησης σε θερμοκυκλοποιητή και μετασχηματισμό δεκτικών DH10b κυττάρων με τα προιόντα αυτής της αντίδρασης. Η ταυτοποίηση των κλώνων που περιέχουν τον πλασμιδικό φορέα pUPD2 με το επιθυμητό ένθεμα πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλης και IPTG/Xgal στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων.

Για να πιστοποιήσουμε ότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχει ολόκληρο το επιθυμητό ένθεμα πραγματοποιήσαμε colony-PCR ενώ παράλληλα καλλιεργήθηκαν εκ νέου αποικίες, με σκοπό την απομόνωση του φορέα pUPD2 και την κοπή του με περιοριστικά ένζυμα ώστε να ταυτοποιήθει η ακεραιότητα του, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (*Εικ. 20-23*).

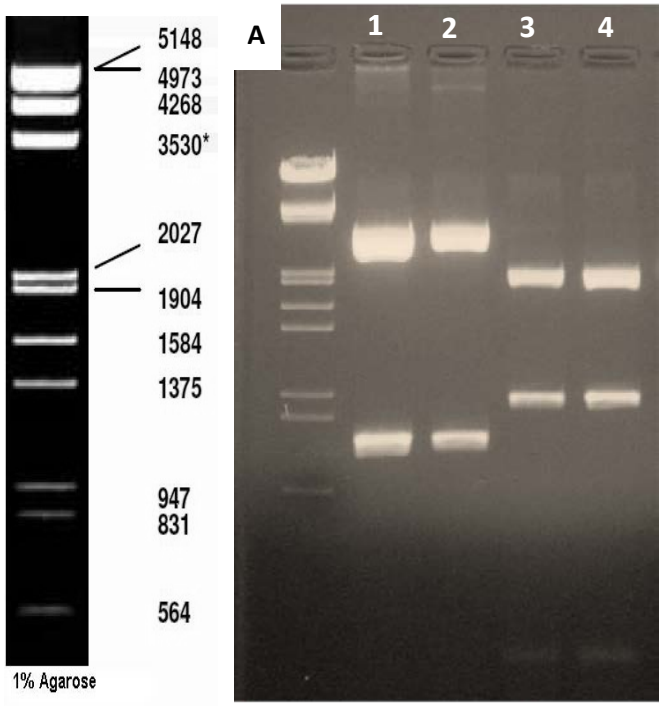


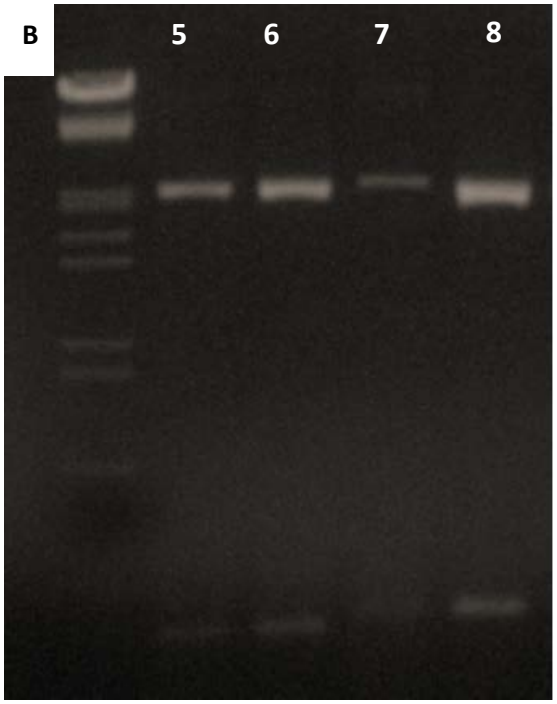
Εικόνα 20: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση της σωστής ένθεσης της αλληλουχίας του γονιδίου επιλογής σε pUPD2 φορέα, ύστερα από πέψη του pUPD2-psbA(IL), απομονωμένου από 2 διαφορετικές αποκίες, με τα περιοριστικά ένζυμα PstI (2779/754) **(1)** και NcoI (2072/1461) **(2)** (1.5 % πήκτωμα αγαρόζης). Και οι δύο αποικίες περιείχαν το πλασμίδιο με το σωστό ένθεμα. Στα αριστερά φαίνεται ο βακτηριοφάγος λ ως δείκτης μεγέθους, ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI/HindII



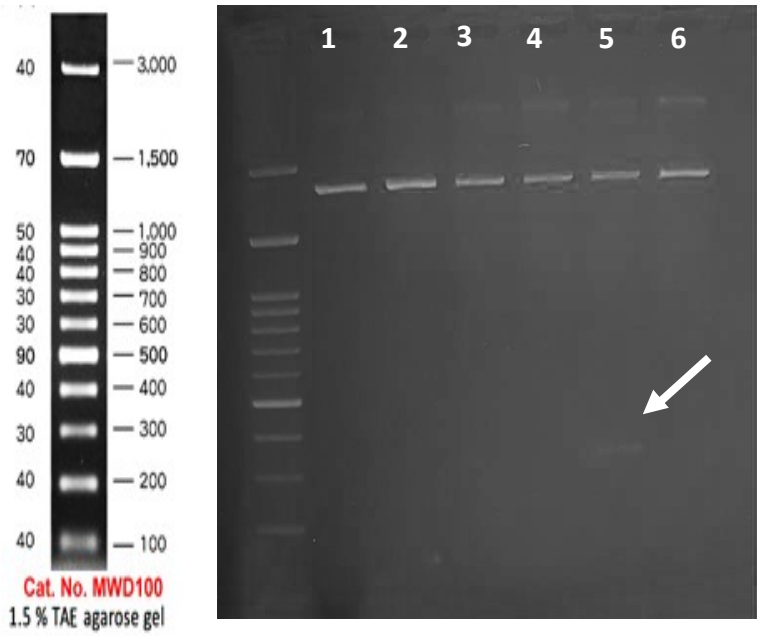


Εικόνα 21: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης ύστερα από **A.** πέψη του pUPD2-TXS (από 3 διαφορετικές αποικίες) με το περιοριστικά ένζυμο NotI (2875/2046) και **B.** του pUPD2-RS (από 2 διαφορετικές αποικίες) με XhoI (1478/892/791), (1.4% πήκτωμα αγαρόζης). Τα πηγάδια (3), (4) και (5) περιέχουνν τους φορείς με το σωστό ένθεμα. Στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους DNA που χρησιμοποιήθηκε.





Εικόνα 22: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης ύστερα από **Α.** πέψη του pUPD2-CotA (από 2 διαφορετικές αποικίες) (1) και (2) με το περιοριστικά ένζυμο PstI (2911/737), του pUPD2- GGPPS (από 2 διαφορετικές αποικίες) με NcoI (1945 / 917 /159) (3), (4) και **Β.** του pUPD2-IS1 (5), (6) και pUPD2-IS2 (7), (8)(από 2 διαφορετικές αποικίες) με NotI , (2046/243) και (2046/263) (1.4% πήκτωμα αγαρόζης). Στα αριστερά φαίνεται ο βακτηριοφάγος λ ως δείκτης μεγέθους, ύστερα από πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI/HindIII.



Εικόνα 23: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης για την πιστοποίηση σωστής ένθεσης της αλληλουχίας 3'rbcL στον pUPD2, ύστερα από πέψη του φορέα (από 6 διαφορετικές αποικίες) με NotI (2046/300) (1.4 % πήκτωμα αγαρόζης). Ο φορέας με το σωστό ένθεμα εμφανίζεται μόνο στο (5). Στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους DNA που χρησιμοποιήθηκε.

Κεφάλαιο 4ο

Συζήτηση

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος ενός γενικότερου σχεδιασμού για την χρήση του χλωροφύκους *C. reinhardtii* ως πλατφόρμα παραγωγής, σε δύο ανεξάρτητες βιοτεχνολογικές εφαρμογές που είναι α) η ετερόλογη παραγωγή ταξαδιενίου και β) η ετερόλογη έκφραση ενζύμου με ενεργότητα λακκάσης.

Το πειραματικό μέρος που εκτελέστηκε στην παρούσα εργασία ήταν το εξής: Αρχικά πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της αλληλουχίας DNA της κωδικής περιοχής του γονιδίου TXS για την ετερόλογη έκφραση του, στον χλωροπλάστη της χλαμυδομονάδας. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η βελτιστοποίηση των κωδικονίων παίζει κυρίαρχο ρόλο για την ετερόλογη έκφραση γονιδίων στο χλωροφύκος.

Ακολούθησε, η επιλογή των κατάλληλων ρυθμιστικών περιοχών που θα πλαισιώσουν την κατασκευή της κασέτας έκφρασης και ο *in silico* σχεδιασμός της στρατηγικής για την i*n vitro* συρραφή των απαραίτητων DNA τμημάτων που απαιτούνται για την έκφραση των προϊόντων. Έπειτα, ανακτήθηκαν μέσω τεχνικής PCR όλα τα επιθυμητα τμήματα DNA που απαρτίζουν τις κατασκευές για την ετερόλογη έκφραση α) των ενζύμων GGPPS και TXS που εμπλέκονται σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού για την παραγωγή του ταξαδιενίου και β) της βακτηριακής λακκάσης CotA. Επιτεύχθηκε η ολοκλήρωση του πρώτου βήματος της διαδικασίας ενσωμάτωσης όλων των επιμέρους τμημάτων, που θα απαρτίζουν τις τελικές κατασκευές, στον εναρκτήριο φορέα pUPD2 (domestication) και η συναρμολόγηση κάποιων κατασκευών στο δεύτερο (από τα 4 συνολικά) επίπεδο συναρμολόγησης, σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό.

Το Golden Braid 2.0 χρησιμοποιήθηκε για τους in silico σχεδιασμούς και την κατασκευή κασέτας ετερόλογης έκφρασης για το μετασχηματισμό του χλωροπλάστη του *Chlamydomonas reinhardtii,* ως ένα εύχρηστο πλαίσιο συναρμολόγησης σύνθετων DNA κατασκευών. Το πρώτο βήμα για την κατασκευή των δύο διαφορετικών κασετών έκφρασης, που θελήσαμε να δημιουργήσουμε για τον μετασχηματισμό του χλωροπλαστικού γονιδιώματος της χλαμυδομονάδας, στηρίζεται στη διαδικασία του domestication των επιμέρους τμημάτων DNA, που απαρτίζουν την κατασκευή μας, στον αρχικό φορέα κλωνοποίησης pUPD2. Για το σκοπό αυτό, το πρόγραμμα σχεδιάζει κατάλληλους εκκινητές ώστε στη κάθε αλληλουχία που θα ενσωματωθεί στον φορέα pUPD2 (γονίδια, ρυθμιστικές περιοχές κ.λπ.), να δημιουργηθούν κατάλληλα άκρα, τα οποία παίζουν τον κύριο ρόλο στη σωστή συναρμολόγηση της κατασκευής, στα επόμενα βήματα.

Για την περαιτέρω συναρμολόγηση της κατασκευής, μέσω μιας διαδικασίας ταυτόχρονης πέψης – λιγοποίησης, τα τμήματα που έχουν ενσωματωθεί σε pUPD2 φορείς ενώνονται προς σχηματισμό μεταγραφικής μονάδας σε κάποιον από τους φορείς pDGB1-

a1, a2, ω1 ή ω2. Αυτό επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο σχεδιασμό και την ενσωμάτωση μέσω εκκινητών μοναδικών θέσεων κοπής από συγκεκριμένα ένζυμα (BsaI και BsmBI) σε όλες τις αλληλουχίες που μας ενδιαφέρουν.

Για την ολοκλήρωση των κατασκευών των κασετών έκφρασης ενώνονται, και πάλι μέσω μιας διαδικασίας ταυτόχρονης πέψης – λιγοποίησης, δύο μεταγραφικές μονάδες, όπως για παράδειγμα στη περίπτωση της κασέτας έκφρασης της συνθάσης του GGPP και της συνθάσης ταξαδιενίου, με δυαδική συναρμολόγηση είτε των φορέων a1-a2 είτε των φορέων ω1-ω2.

Προσπάθειες, για το επόμενο επίπεδο της συναρμολόγησης των κατασκευών πραγματοποιήθηκαν, προς την κατασκευή μεταγραφικών μονάδων του γονιδίου της συνθάσης του GGPP με τη συναρμολόγηση των τμημάτων PpsbD, GGPPS (CDS), 3'rbcl σε pDGB1-α1 φορέα και του γονιδίου της λακκάσης με τη συναρμολόγηση των PpsbD, BlCotA, 3'rbcl σε pDGB1-α2 φορέα αλλά δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια συναρμολόγησης των τμημάτων LS, psbA (IL) και IS1 σε pDGB1-α1 φορέα ως δέκτη, σύμφωνα με τον σχεδιασμό.

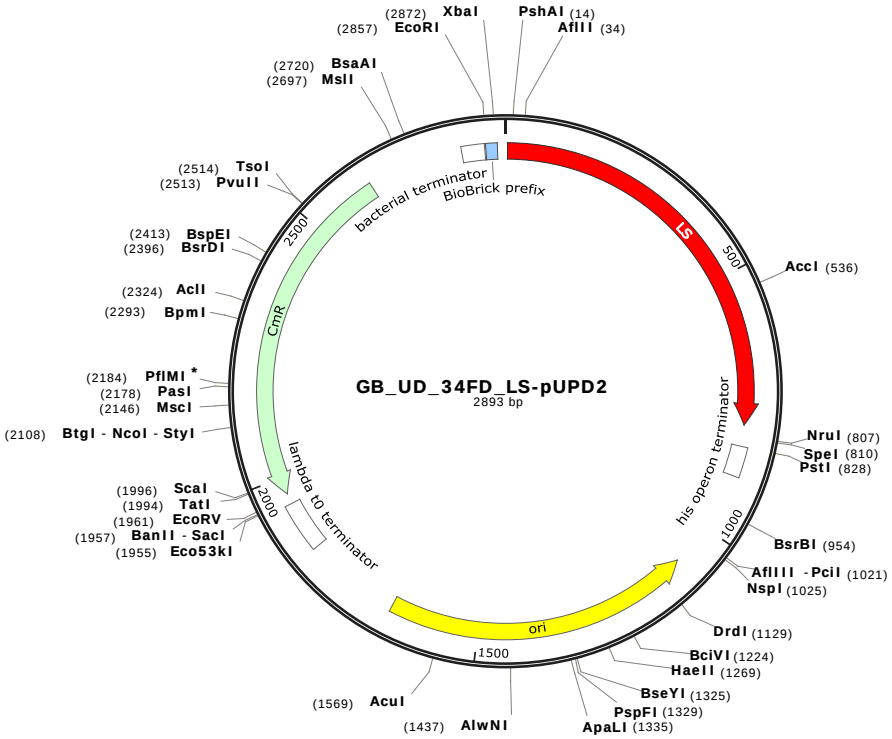
Η δυσκολία για τον πολλαπλασιασμό και το domestication του τμήματος που θα λειτουργούσε ως αριστερή περιοχή ανασυνδυασμού (LS) ήταν κομβικής σημασίας, καθώς τμήμα αυτής της αλληλουχίας συμπληρώνει το έλλειμα του cpDNA του μεταλλαγμένου στελέχους Fud7 της χλαμυδομονάδας. Ελλείψει δυνατότητας αλλαγής αυτής της αλληλουχίας, το πρόβλημα θα μπορούσε να ξεπεραστεί με αλλαγή της πηγής ανάκτησής της, δηλ. εκ νέου απομόνωση της αλληλουχίας από το χλωροπλαστικό γονοδίωμα του wt στελέχους της χλαμυδομονάδας, αντί από το πλασμίδιο PMM2, το οποίο αποδείχθηκε αναποτελεσματικό.

Το πρώτο βήμα του domestication στον εναρκτήριο φορέα επιτεύχθηκε, αλλά μια πρώτη προσπάθεια που έγινε για συναρμολόγηση των τμημάτων σε ανώτερο επίπεδο (φορείς α και ω), δεν καρποφόρησε. Ως εκ τούτου, απαιτείται εκ νέου και προσεκτικότερη απομόνωση των βακτηριακών στελεχών που φέρουν τα πλασμίδιαpDGB1-α και –ω, και επανάληψη της προσπάθειας.

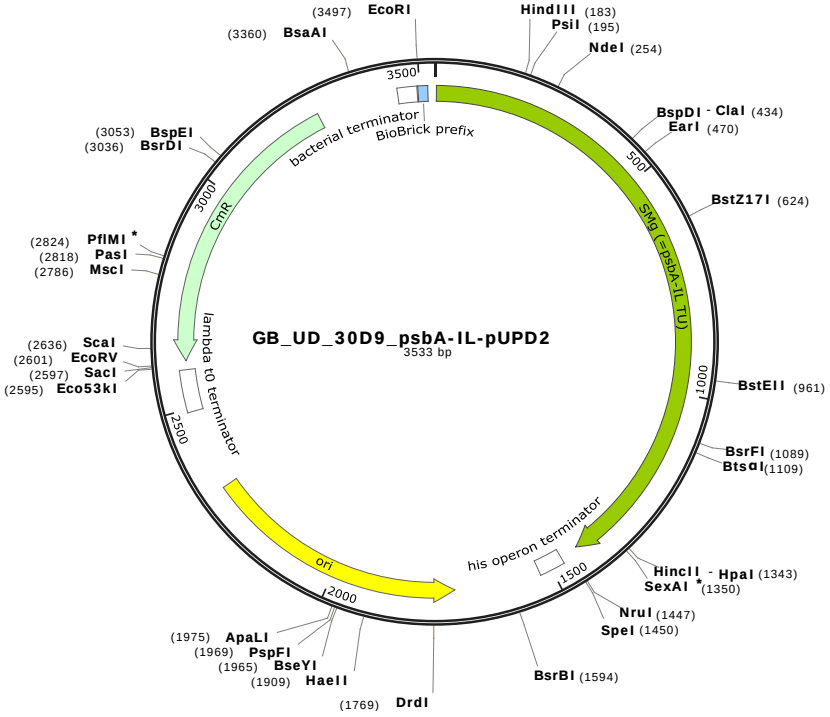
Οι κατασκευές που δημιουργήθηκαν αποτελούν σημαντικό βήμα για την συνέχιση της παραπάνω ερευνητικής εργασίας προς την κατευθυνση των τελικών στόχων και τον μετασχηματισμό του στελέχους FuD7 της χλαμυδομονάδας. Επιπλέον, θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν μελλοντικά και για οποιονδήποτε άλλο μετασχηματισμό της χλαμυδομονάδας με κάποιο άλλο γονίδιο ενδιαφέροντος με διαδικασίες στηριζόμενες βέβαια στις αρχές της μεθόδου του Golden Braid.

Η χρήση του μεταλλαγμένου στελέχους της χλαμυδομονάδας σαν μια «πράσινη» πλατφόρμα παραγωγής υψηλής αξίας βιοενεργών μορίων με εφαρμογές στο χώρο της βιομηχανίας, θα μπορούσε να δώσει νέα ώθηση στον τομέα της έρευνας των μικροφυκών και γενικότερα στη δημιουργία πιο φιλικών προς το περιβάλλον βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

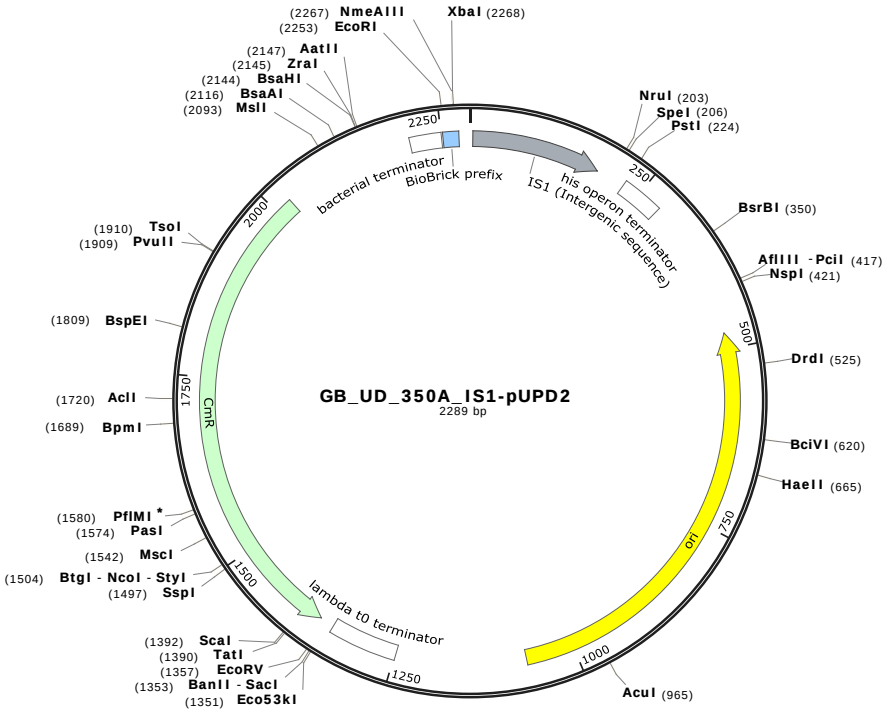
Παράρτημα Ι



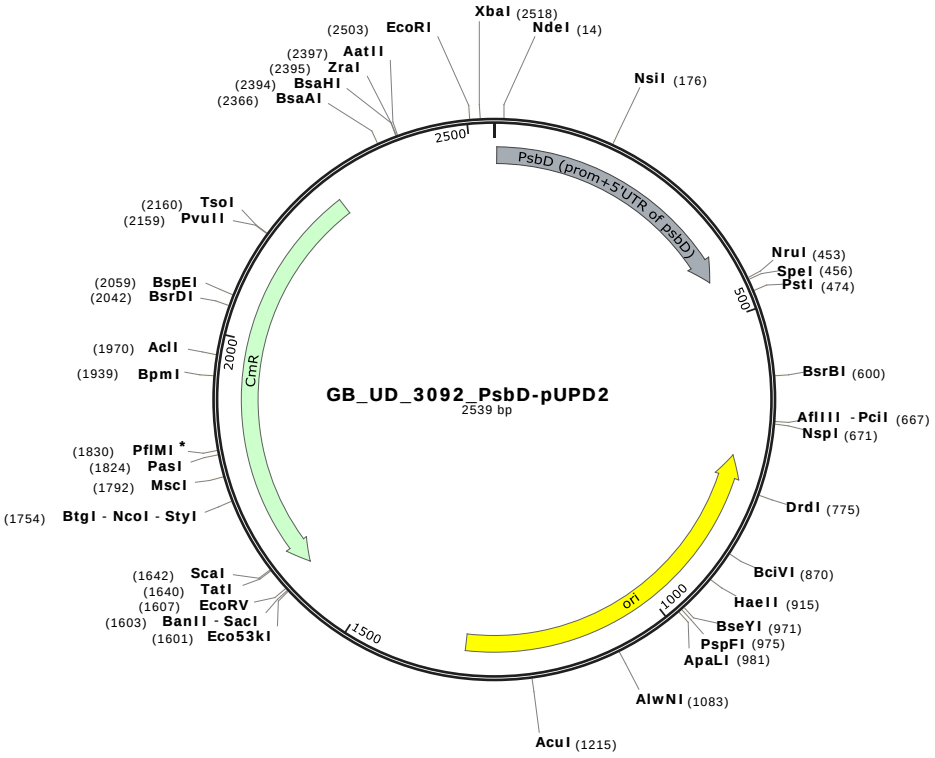
Εικόνα 24: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- LS (domesticated part) με ένθεμα την DNA αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε σαν αριστερή αλληλουχία ανασυνδυασμού.



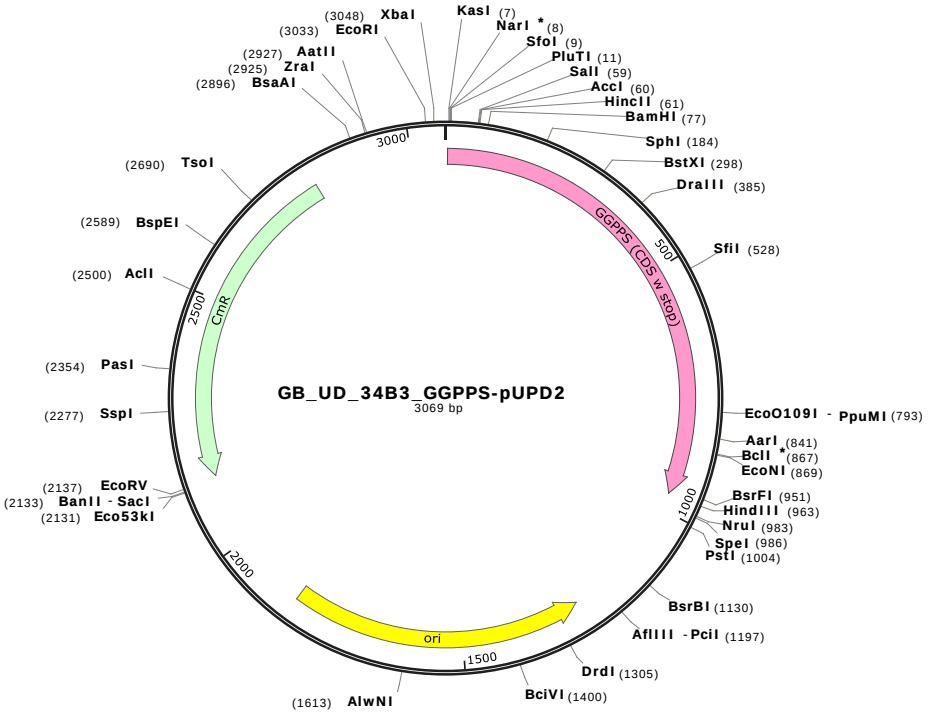
Εικόνα 25: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- psbA(IL) (domesticated part) με ένθεμα το γονίδιο επιλογής .



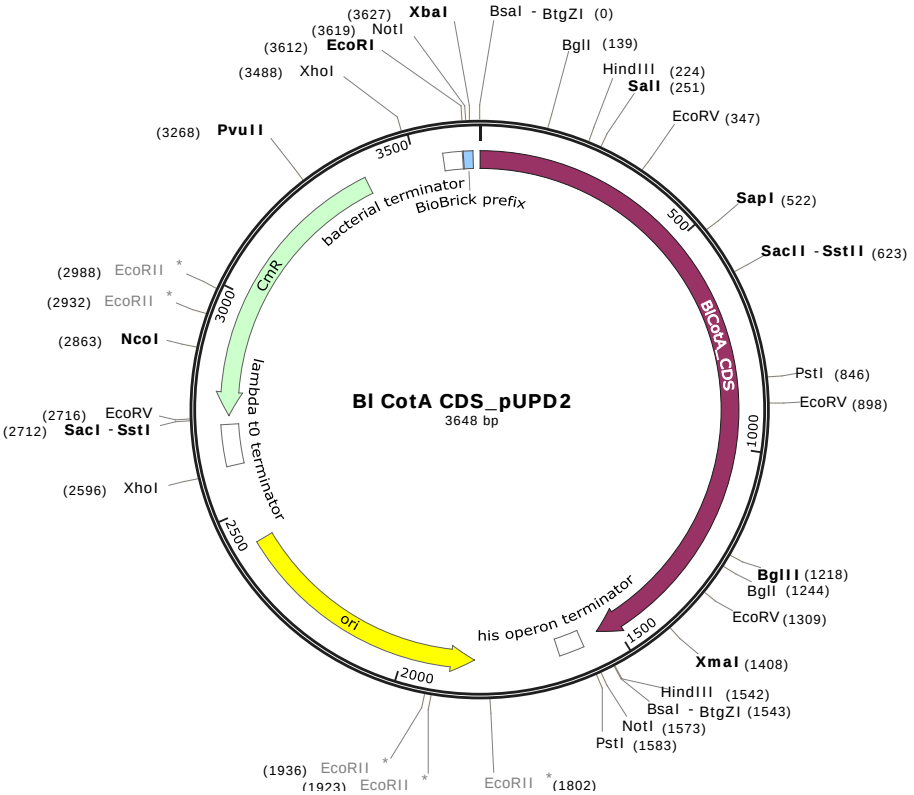
Εικόνα 26: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- IS1(domesticated part) την πρώτη αλληλουχία που θα λειτουργήσει στην κατασκευή σαν αποστάτης μεταξύ γονιδίων.



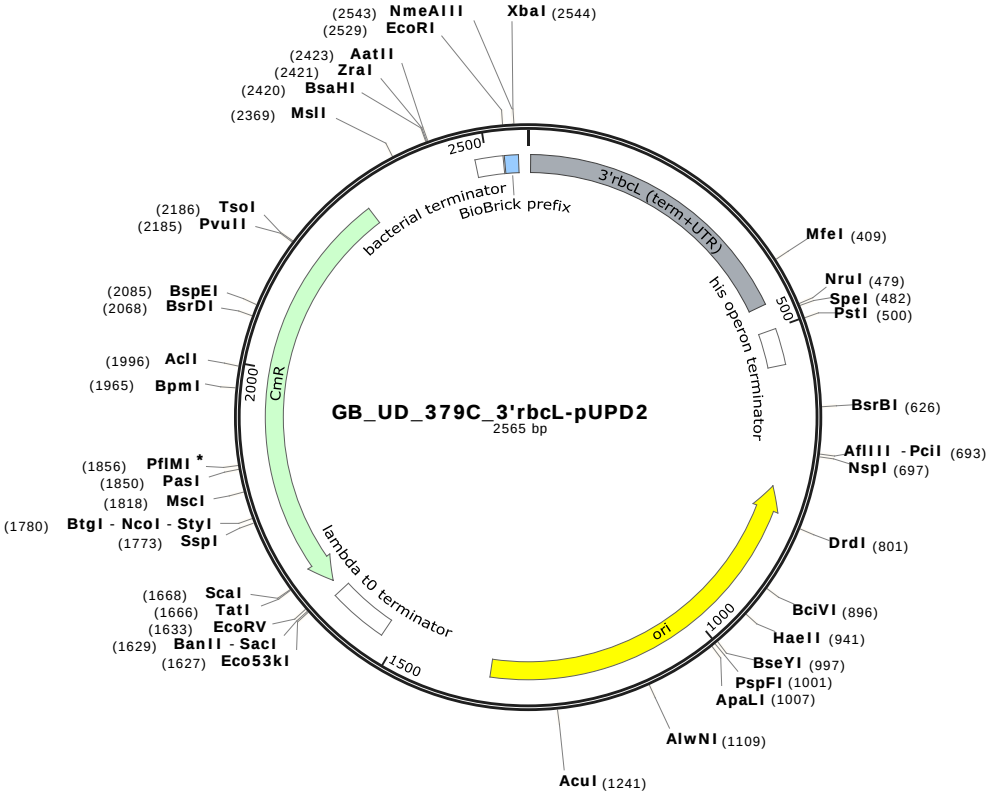
Εικόνα 27: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- PpsbD (domesticated part) με ένθεμα τον υποκινητή του γονιδίου PpsbD.



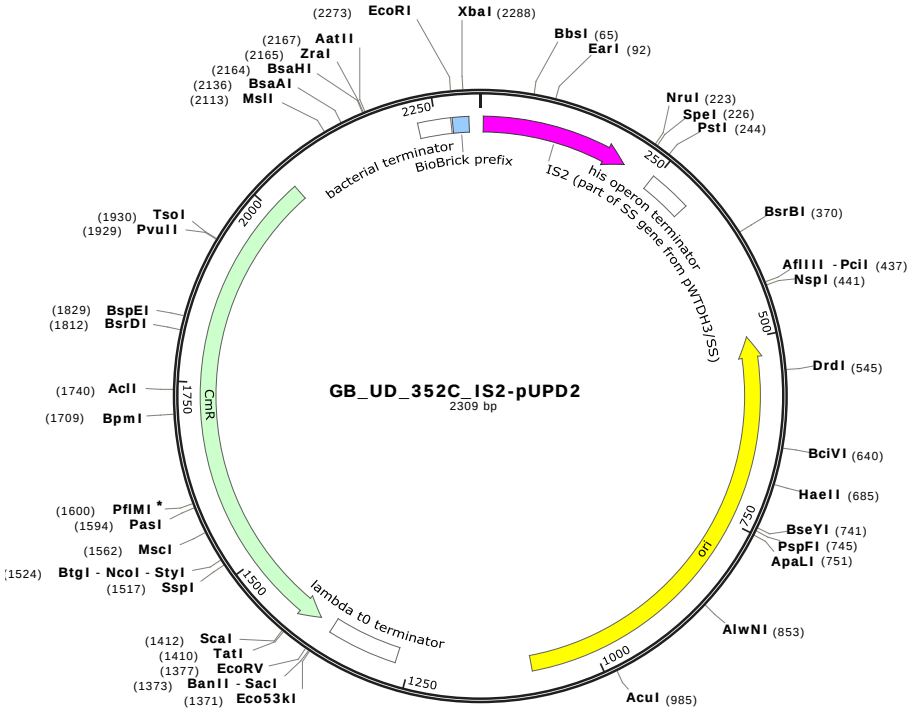
Εικόνα 28: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- GGPPS (domesticated part) με ένθεμα το CDS του γονιδίου που κωδικοιεί τη συνθάση του GGPP.



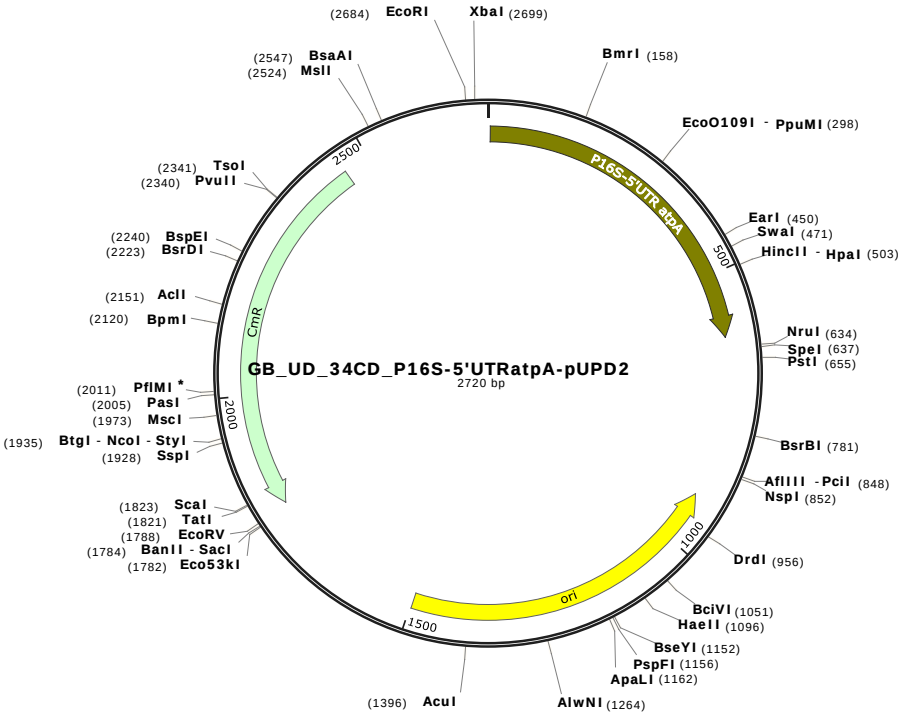
Εικόνα 29: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2-BlCotA (domesticated part) με ένθεμα το CDS του γονιδίου που κωδικοιεί το ένζυμο της λακκάσης.



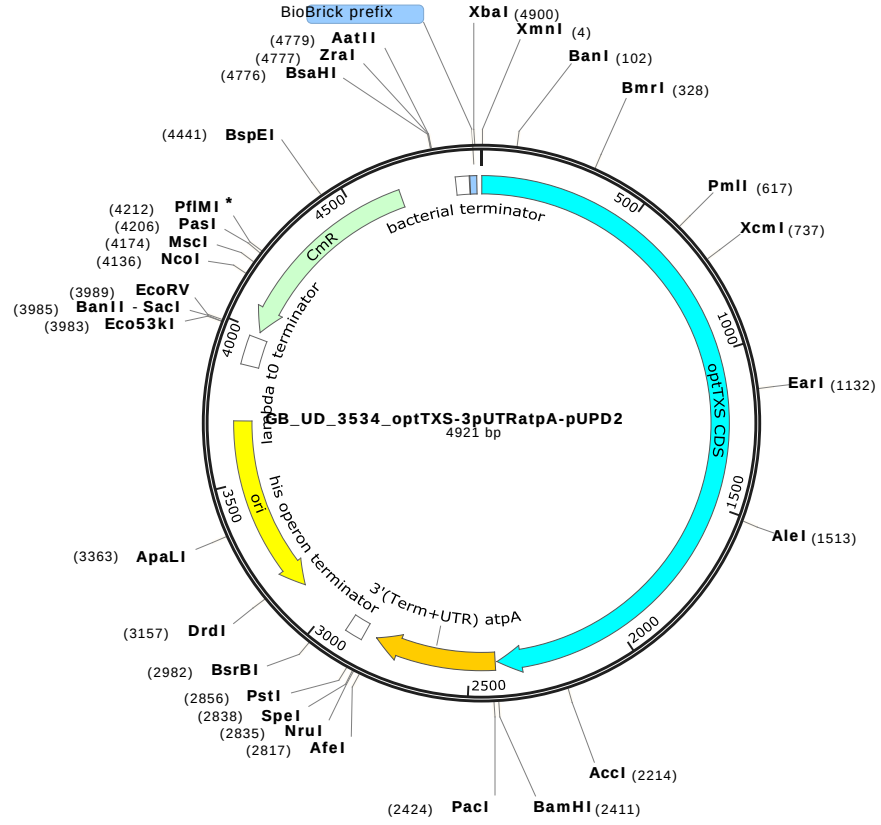
Εικόνα 30: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2-3΄rbcL (domesticated part) με ένθεμα την 3' UTR του γονιδίου rbcL.



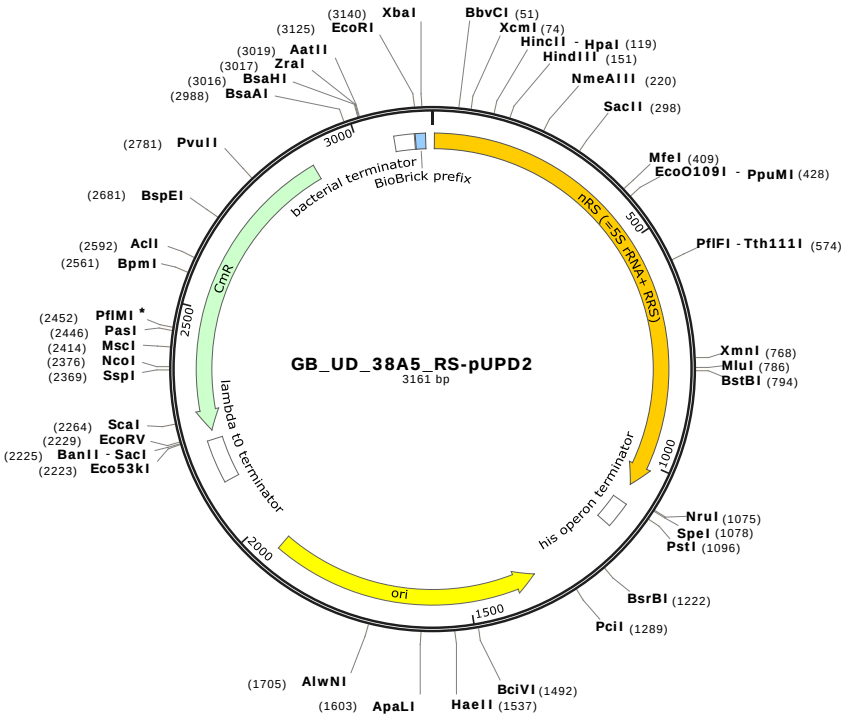
Εικόνα 31: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- IS2(domesticated part) με ένθεμα την δεύτερη αλληλουχία που θα λειτουργήσει στην κατασκευή σαν αποστάτης μεταξύ γονιδίων GGPPS και TXS.



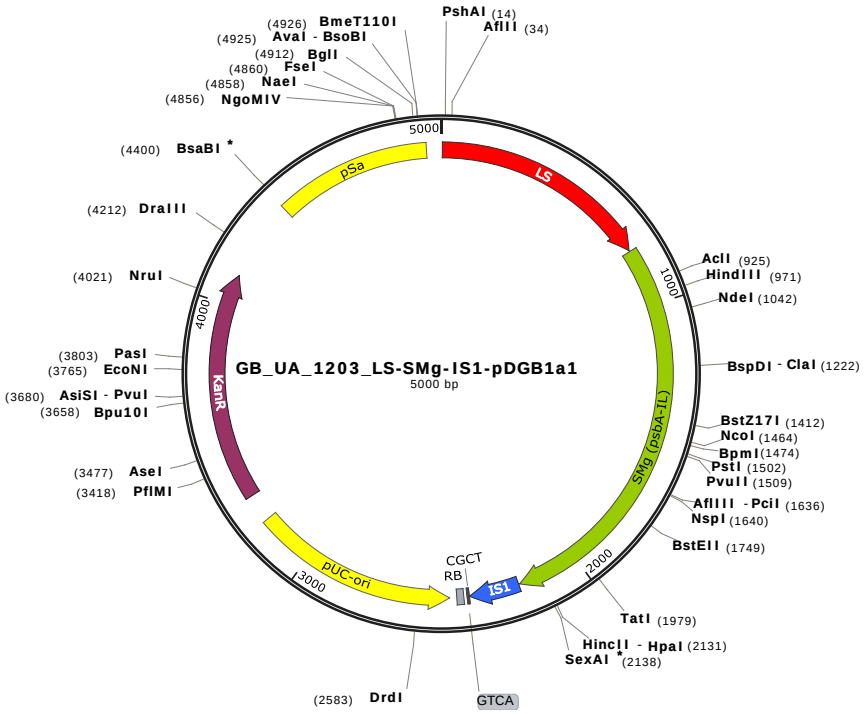
Εικόνα 32: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- P16S-5'UTRatpA (domesticated part) με ένθεμα τον υποκινητή του γονιδίου P16S σε συνδυασμό με την 5΄ UTR του γονιδίου atpA.



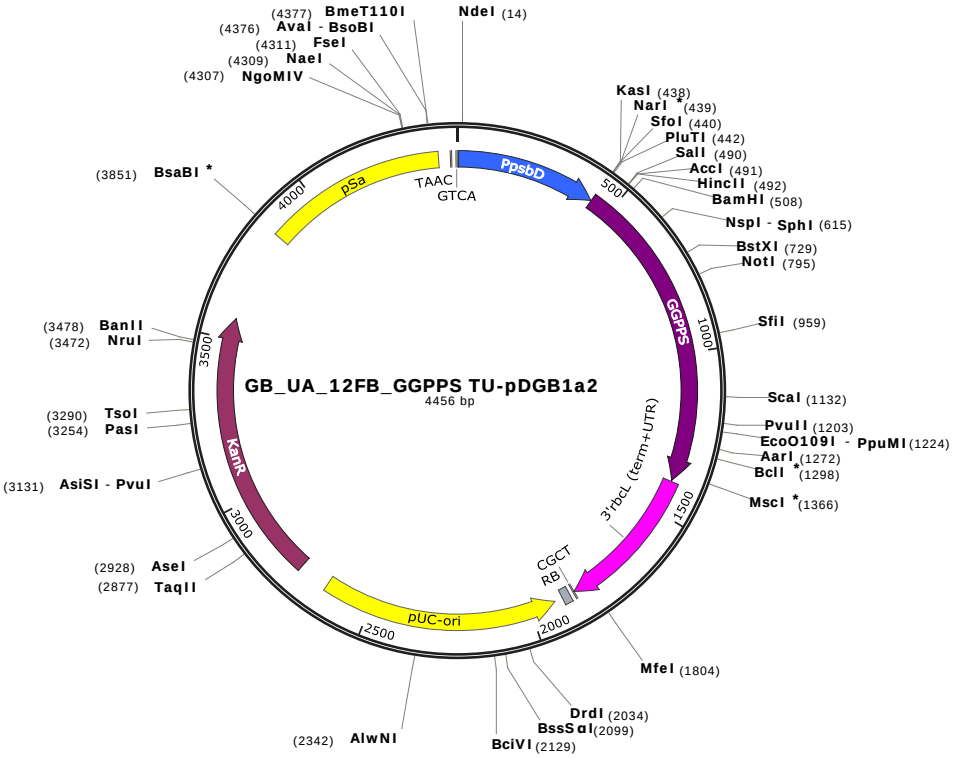
Εικόνα 33: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2-TXS3'UTRatpA (domesticated part) με ένθεμα το CDS του γονιδίου που κωδικοιεί τη συνθάση του ταξαδιενίου (txs) σε συνδυασμό με την 3'UTR του atpA.



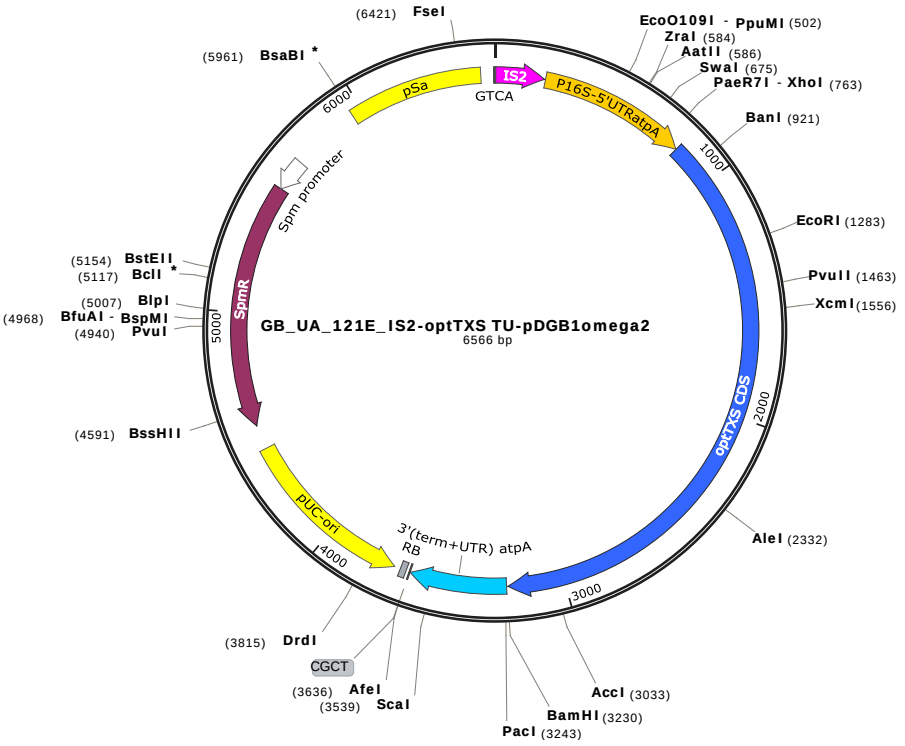
Εικόνα 34: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pUPD2- RS (domesticated part) με ένθεμα την DNA αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ως δεξιά αλληλουχία ανασυνδυασμού (RS).



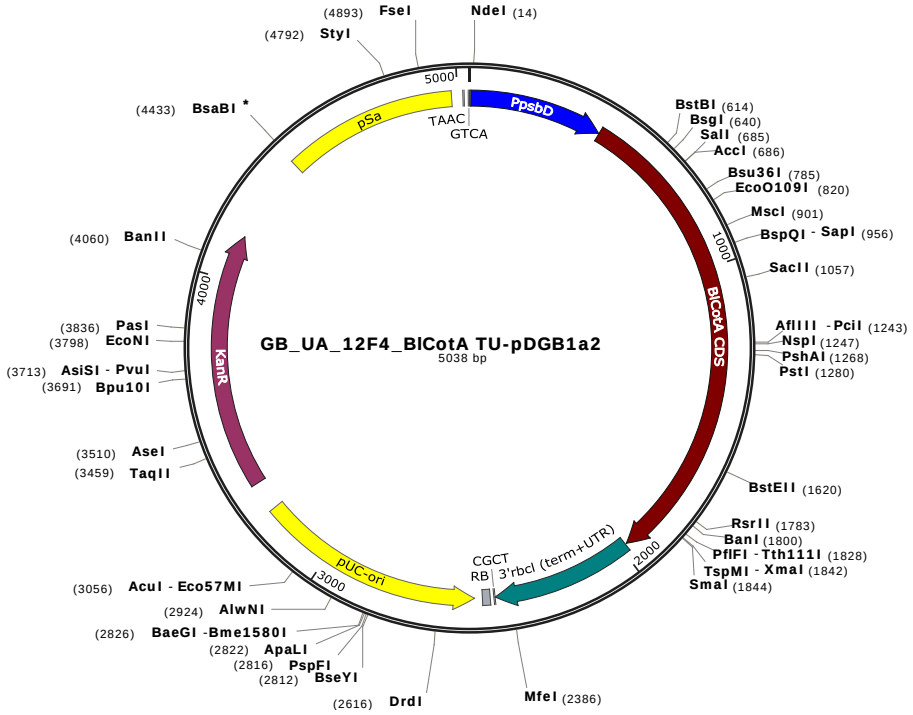
Εικόνα 35: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1-a1-LS-psbA-IS1 (first order assembly) που περιλαμβάνει ως ένθεμα την ένωση των τμημάτων LS-psbA-IS1.



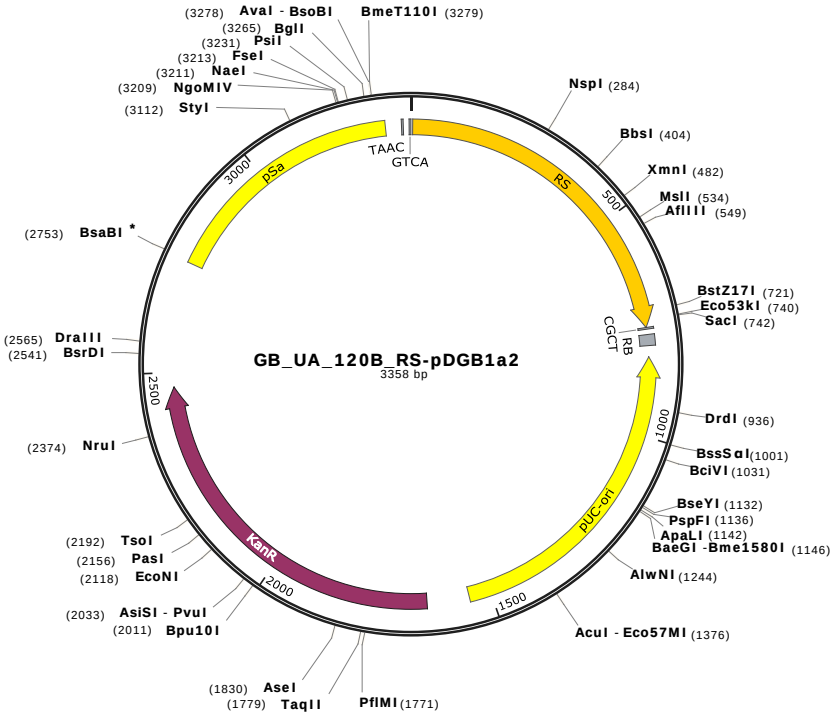
Εικόνα 36: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1-a2-GGPPS(TU) (first order assembly) που περιλαμβάνει ως ένθεμα την ένωση των τμημάτων psbD-GGPPS(CDS)-3'rbcL για τον σχηματισμό της μεταγραφικής μονάδας του γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθάση του GGPP .



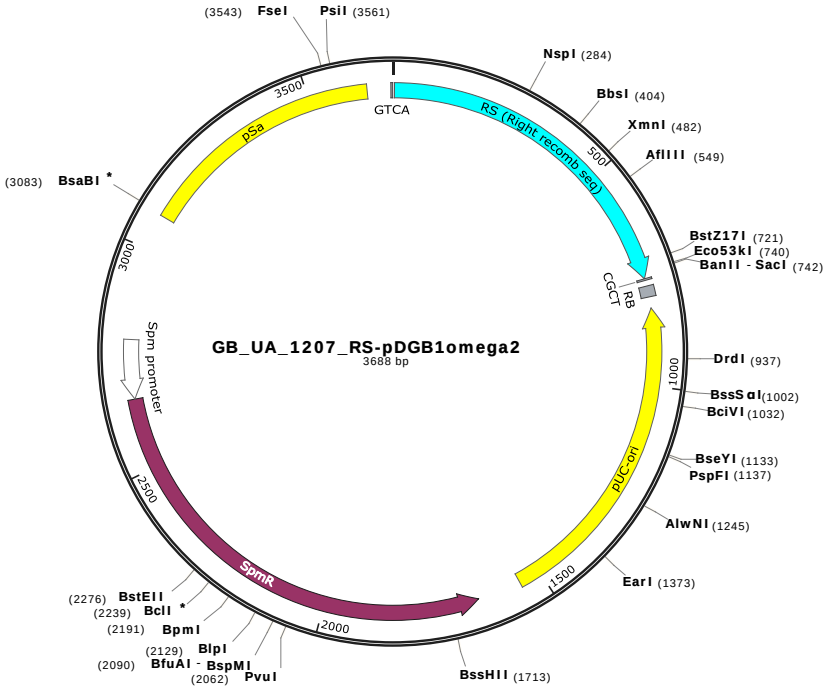
Εικόνα 37: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1-ω2-IS2-optTXS(TU) (first order assembly) που περιλαμβάνει ως ένθεμα την ένωση των τμημάτων IS2-p16S5'UTRatpA-optTXS3'UTRatpA για τον σχηματισμό της μεταγραφικής μονάδας του γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθάση του ταξαδιενίου (TXS) ενωμένης με το τμήμα της IS2 περιοχής .



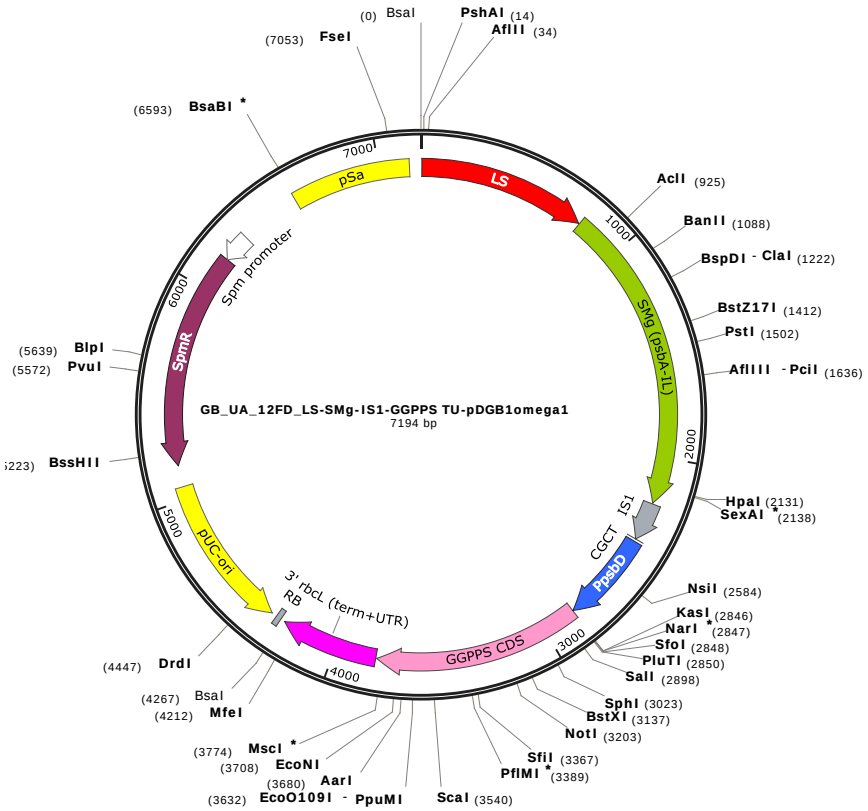
Εικόνα 38: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1-a2-BlCotA(TU) (first order assembly) που περιλαμβάνει ως ένθεμα την ένωση των τμημάτων psbD-BlCotA(CDS)-3'rbcL για τον σχηματισμό της μεταγραφικής μονάδας του γονιδίου που κωδικοποιεί τη λακκάση CotA .



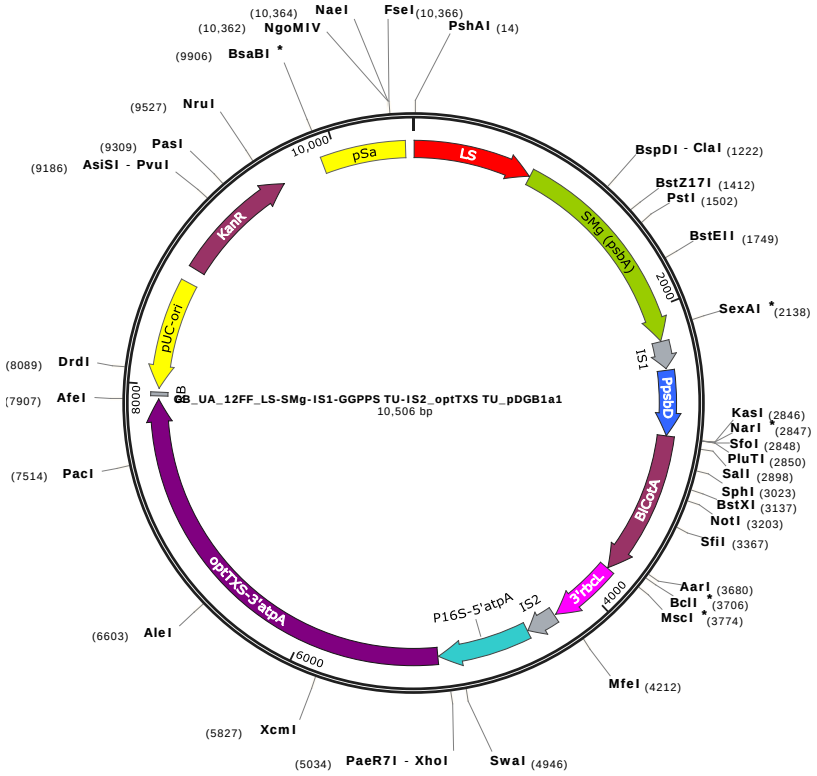
Εικόνα 39: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1-α2- RS (first order assembly) με ένθεμα την DNA αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ως δεξιά αλληλουχία ανασυνδυασμού (RS) σε επίπεδο φορέα α ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό της τελικής συναρμολόγησης.



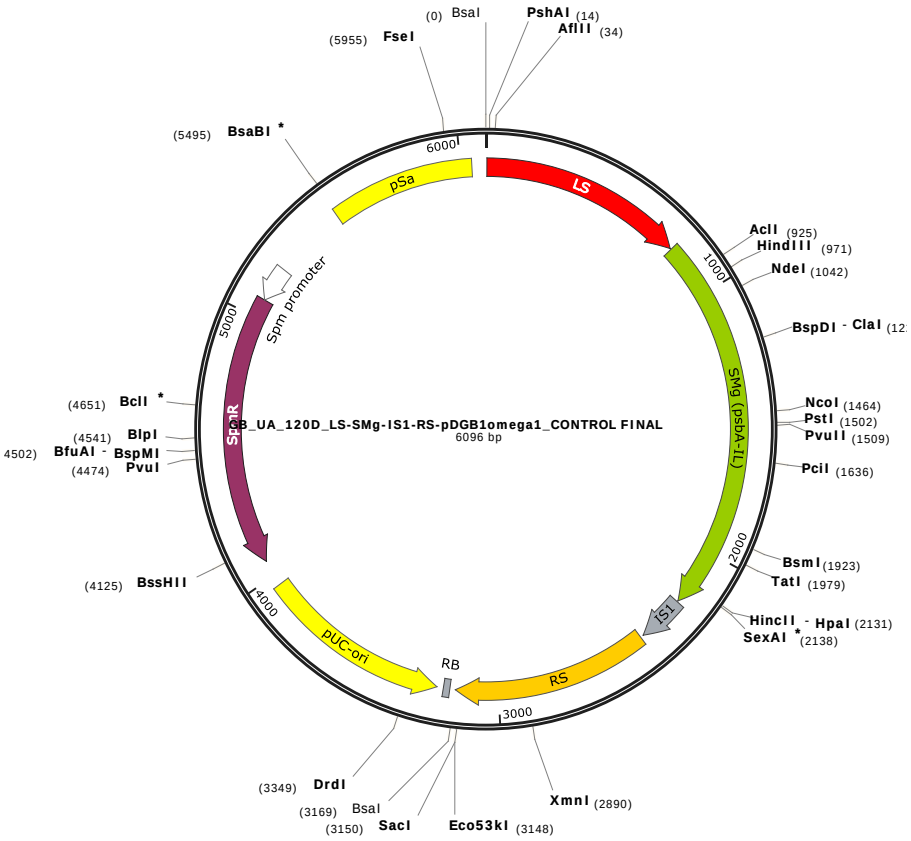
Εικόνα 40: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1- ω2-RS (first order assembly) με ένθεμα την DNA αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ως δεξιά αλληλουχία ανασυνδυασμού (RS) σε επίπεδο φορέα ω ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό της τελικής συναρμολόγησης.



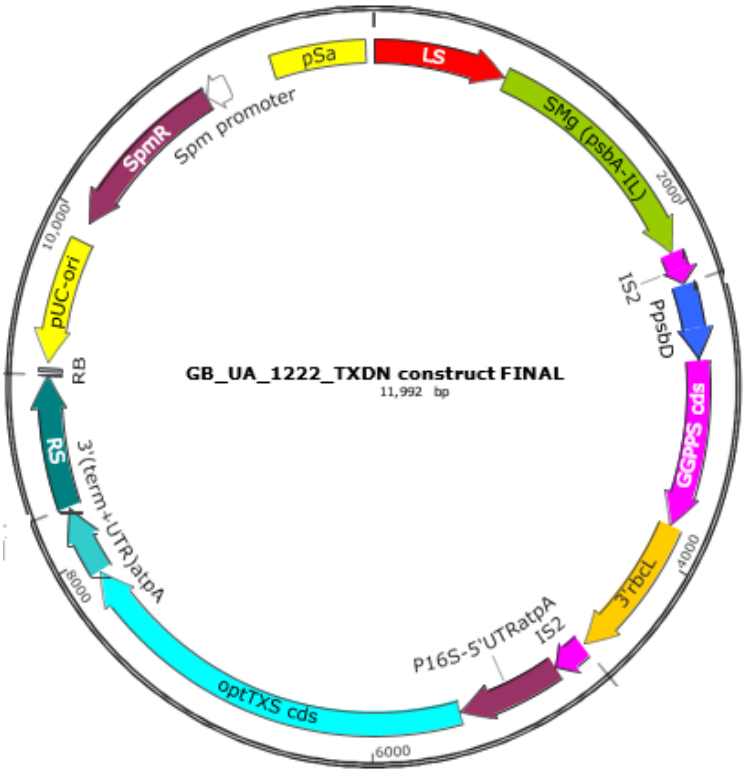
Εικόνα 41: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1- ω1 (higher order assembly) ύστερα από δυαδική συναρμολόγηση των τμημάτων DNA που βρίσκονται στούς φορείς pDGB1-α1-LS-psbA-IS1 και pDGB1-α2-GGPPS(TU) .



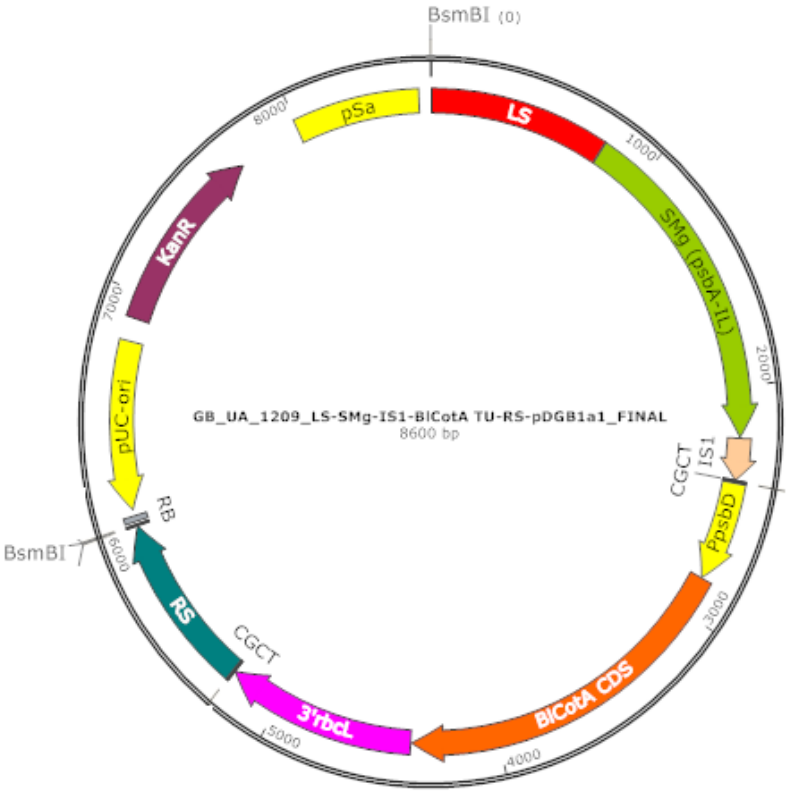
Εικόνα 42: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1- α1 (higher order assembly) ύστερα από δυαδική συναρμολόγηση των τμημάτων DNA που βρίσκονται στούς φορείς pDGB1- ω1- LS-psbA-IS1-GGPPS(TU) και pDGB1-ω2-IS2-optTXS(TU).



Εικόνα 43: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pDGB1- ω1 (higher order assembly) ύστερα από δυαδική συναρμολόγηση των τμημάτων DNA που βρίσκονται στούς φορείς pDGB1-α1-LS-psbA-IS1 και pDGB1-α2-RS. Αποτελεί την κατασκευή που θα λειτουργήσει ως control και δεν περιέχει τα γονίδια που θέλουμε να εκφράσουμε, μόνο το γονίδιο επιλογής.



Εικόνα 44: Η τελική κατασευή του πλασμιδίου για τον μετασχησματισμό της χλαμυδομονάδας, με σκόπο την έκφραση της συνθάσης GGPP και της συνθάσης ταξαδιενίου.



Εικόνα 45: Η τελική κατασκευή του πλασμιδίου για τον μετασχησματισμό της χλαμυδομονάδας, με σκόπο την έκφραση της λακκάσης CotA.

Παράρτημα ΙΙ

Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση των επιμέρους τμημάτων των κατασκευών.

Ονομασία εκκινητή	***Αλληλουχία (5'→3')***
LSdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGGGCAGGACGTTAGTCGATA
LSdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAGTATCAGTGGCAGTTGCCTGCCA
psbAdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGTACTCGTCCTATTTTAATACTCCGAAG
psbAdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCGGGACGTCCTGCCAACTGCC
IS1dom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGGCTTGCTAATCCTGTTACCAGT
IS1dom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGCAATGCTCACGCTGTAGG
BlCotAdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGAATGAAACTTGAAAAATTCGTTGACC
BlCotAdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTTATTGATGACGAACATCTGTCAC
3'rbcldom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGGCTTTTTTTATTTTTCATGATGTTTATGTGAATAG
3'rbcldom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGTACATCCGCTTTAGTATG
Rsdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGCTTACGGGACAAATGTATTTATTG
RSdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGTGTAGAGGCCATAAGAG
GGPPSdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCGCCTGGCCGCAAGGTTG
GGPPSdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTTAGTTTTGCCGGTAGCCGATGAACTTGG
optTXS3pdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGAATGTCTTCTTCTACAGGTACTTC
optTXS3pdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGCTGTATAAACAAAAATTTTTAATGT
P16S5pdom_Fw	GCGCCGTCTCGCTCGTGACCAGGCAACAAATTTATTTATTGTCC
P16S5pdom_Rv	GCGCCGTCTCGCTCACATTAAAAAAGAAAAAATAAATAAAAGATTAAAAAAGTTTA

Πίνακας 5: Ο πίνακας βάρους των κωδικονίων, που εμφανίζονται σε 12 γονίδια με υψηλή έκφραση στον χλωροπλάστη του C. Reinhardtii, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συνθάση του ταξαδιενίου.

Amino acid	Codon	Weight									
Phe	UUU	0,347	Ser	UCU	1	Tyr	UAU	0,333	Cys	UGU	1
	UUC	1		UCC	0		UAC	1		UGC	0,044
Leu	UUA	1		UCA	0,98	STOP	UAA	---	STOP	UGA	---
	UUG	0		UCG	0,041		UAG	---	Trp	UGG	---
Leu	CUU	0,365	Pro	CCU	0,512	His	CAU	0,089	Arg	CGU	1
	CUC	0		CCC	0		CAC	1		CGC	0,022
	CUA	0,148		CCA	1	Gln	CAA	1		CGA	0,006
	CUG	0,011		CCG	0,064		CAG	0,053		CGG	0
ile	AUU	1	Thr	ACU	1	Asn	AAU	0,197	Ser	AGU	0,337
	AUC	0,394		ACC	0		AAC	1		AGC	0,194
	AUA	0,006		ACA	0,945	Lys	AAA	1	Arg	AGA	0,022
Met	AUG	---		ACG	0,024		AAG	0,032		AGG	0,006
Val	GUU	0,871	Ala	GCU	1	Asp	GAU	0,923	Gly	GGU	1
	GUC	0		GCC	0,01		GAC	1		GGC	0,029
	GUA	1		GCA	0,32	Glu	GAA	1		GGA	0,012
	GUG	0,025		GCG	0,043		GAG	0,056		GGG	0,005

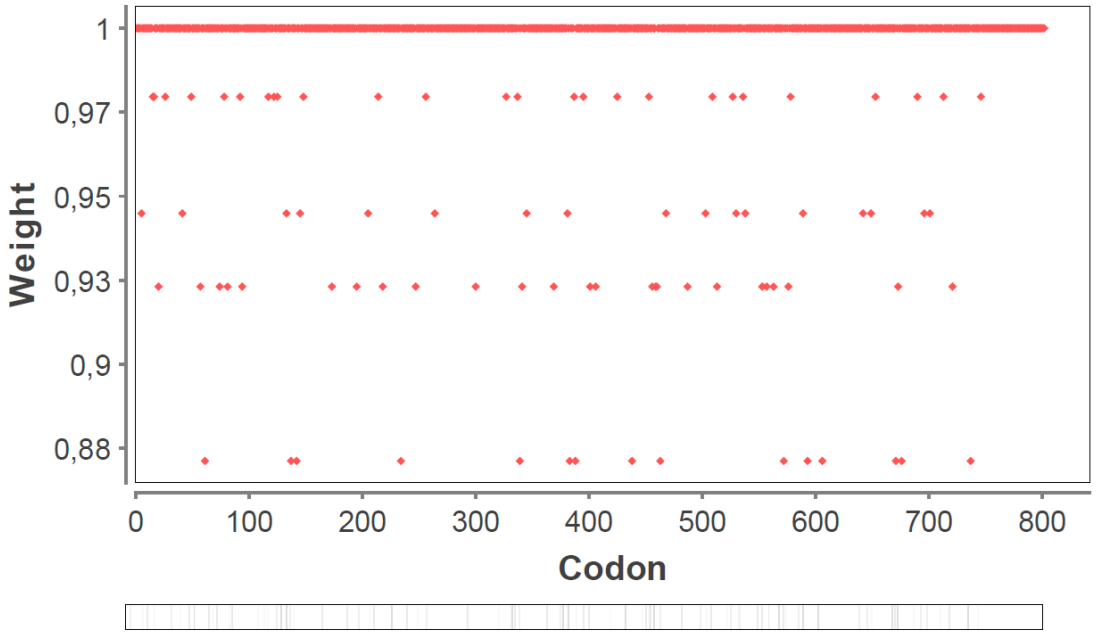
Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης της αλληλουχίας του TXS γονιδίου για την κατασκευή συνθετικού γονιδίου που διαθέτει κωδικόνια τα οποία προτιμώνται από το Chlamydomonas reinhardtii. Φαινεται η συχνότητα των κωδικονίων που συμμετέχουν στην βελτιστοποιημένη πλέον αλληλουχία του γονιδίου txs, καθώς, και *η περιέκτικότητα του συνθετικού γονιδίου σε GC= 35.49 % που βρίσκεται κοντά στη περιέκτικότητα GC του cpDNA.*

Amino acid	Codon	Number	Frequency per thousand											
Phe	UUU	0	0,0	Ser	UCU	35	43,6	Tyr	UAU	0	0,0	Cys	UGU	15	18,7
	UUC	41	51,1		UCC	0	0,0		UAC	31	38,7		UGC	0	0,0
Leu	UUA	81	101,0		UCA	26	32,4	STOP	UAA	0	0,0	STOP	UGA	0	0,0
	UUG	0	0,0		UCG	0	0,0		UAG	0	0,0	Trp	UGG	17	21,2
Leu	CUU	0	0,0	Pro	CCU	0	0,0	His	CAU	0	0,0	Arg	CGU	41	51,1
	CUC	0	0,0		CCC	0	0,0		CAC	17	21,2		CGC	0	0,0
	CUA	0	0,0		CCA	29	36,2	Gln	CAA	26	32,4		CGA	0	0,0
	CUG	0	0,0		CCG	0	0,0		CAG	0	0,0		CGG	0	0,0
ile	AUU	47	58,6	Thr	ACU	25	31,2	Asn	AAU	0	0,0	Ser	AGU	0	0,0
	AUC	0	0,0		ACC	0	0,0		AAC	39	48,6		AGC	0	0,0
	AUA	0	0,0		ACA	17	21,2	Lys	AAA	44	54,9	Arg	AGA	0	0,0
Met	AUG	19	23,7		ACG	0	0,0		AAG	0	0,0		AGG	0	0,0
Val	GUU	15	18,7	Ala	GCU	53	66,1	Asp	GAU	25	31,2	Gly	GGU	39	48,6
	GUC	0	0,0		GCC	0	0,0		GAC	28	34,9		GGC	0	0,0
	GUA	33	41,1		GCA	0	0,0	Glu	GAA	59	73,6		GGA	0	0,0
	GUG	0	0,0		GCG	0	0,0		GAG	0	0,0		GGG	0	0,0

0 unidentified codons.

Nucleotide frequency: A=775 U=777 G=400 C=454 X=0

GC Content: 35,49% 1st letter GC: 45,51% 2nd letter GC: 37,03% 3rd letter GC: 23,94%



Codon Adaptation Index = 0,993

Εικόνα 46: Γραφική παράσταση της προσαρμογής των κωδικονίων στο βελτιστοποιημένο γονίδιο txs και ο Δείκτης Προσαρμογής των Κωδικονίων (CAI=0,993) του συνθετικού γονιδίου.

Βιβλιογραφία

Almaraz-Delgado, A. L., et al. (2014). "Production of therapeutic proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii." AMB Express 4: 57.

Ajikumar, P. K., et al. (2008). "Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. Mol. Pharm. 5, 167–190

Ajikumar, P.K., et al. (2010). "Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*". Science 330:70-74

Barnes, D., et al. (2005) "Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes". Mol Genet Genomics 274: 625.

Barrera, D. J. and S. P. Mayfield (2013). High-value Recombinant Protein Production in Microalgae. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. A. Richmond and Q. Hu, Blackwell Publishing Ltd.

Blowers., A.D., et al. (1993) "Functional in vivo analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcL* and *psaB* genes ". Mol Gen Genet 238:339–349

Boynton, J. E., et al. (1988). "Chloroplast Transformation in Chlamydomonas with High Velocity Microprojectiles." Science 240: 1534-1538.

Croteau, R., et al. (2006). "Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics." Phytochemistry Reviews 5(1): 75-97.

Curtain, C., (2000) "Plant biotechnology-the growth of Australia's algal β-carotene industry" Australas Biotechnol 10:18.

Degenhardt, J., et al. (2009). "Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants". Phytochemistry 70:1621-1637.

Eberhard, S., et al. (2002). "Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: Relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*". Plant J. 31 149–160.

Goldschmidt-Clermont M. (1998) "Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells". Int Rev Cytol. 177:115-180.

Gimpel, J. A., et al. (2013). "Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production." Current Opinion in Chemical Biology 17(3): 489-495.

Gong, Y., et al. (2011). "Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 38(12): 1879-1890.

Grant, G. S., *et al*., (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 874645-4649.

Griesbeck, C., et al. (2006). "Chlamydomonas reinhardtii A Protein Expression System for

Pharmaceutical and Biotechnological Proteins." Molecular Biotechnology 34: 213-223.

Hamilton, M. L., et al. (2014). "Metabolic engineering of Phaeodactylum tricornutum for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids." Metabolic Engineering 22(Supplement C): 3-9.

Johanningmeier, U. and D. Fischer (2010). Perspective for the Use of Genetic Transformants in Order to Enhance the Synthesis of the Desired Metabolites: Engineering Chloroplasts of Microalgae for the Production of Bioactive Compounds. Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. M. T. Giardi, G. Rea and B. Berra, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 144-151.

Johanningmeier, U. and S. Heiss (1993). "Construction of a Chlamydomonas reinhardtii mutant with an intronless psbA gene." Plant Molecular Biology 22: 91-99.

Jones, S. M. and E. I. Solomon (2015). "Electron transfer and reaction mechanism of laccases." Cellular and Molecular Life Sciences 72(5): 869-883.

Kempinski, C., et al. (2015). "Metabolic Engineering of Higher Plants and Algae for Isoprenoid Production." 148: 161-199.

Klein-Marcuschamer, D., et al. (2013). Technoeconomic analysis of renewable aviation fuel from microalgae, Pongamia pinnata, and sugarcane.

Köksal, M., et al. (2011). "Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis." Nature 469(7328): 116-120.

Koschorreck, K., et al. (2008). "Cloning and characterization of a new laccase from Bacillus licheniformis catalyzing dimerization of phenolic acids." Applied Microbiology and Biotechnology 79(2): 217-224.

Koschorreck, K., et al. (2009). "Improving the functional expression of a Bacillus licheniformis laccase by random and site-directed mutagenesis." BMC Biotechnology 9(1): 12.

Li, Z., et al. (2011). "Overlapping Photoprotective Function of Vitamin E and Carotenoids in Chlamydomonas." Plant Physiology 158(1): 313-323.

Manuell, A. L., et al. (2007). "Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast." Plant Biotechnology Journal 5(3): 402-412.

Martins, L. O., et al. (2015). "Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology." Cellular and Molecular Life Sciences 72(5): 911-922.

Maul, J. E., et al. (2002). "The Chlamydomonas reinhardtii Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats." The Plant Cell Online 14(11): 2659-2679.

Mayfield, S. P. and S. E. Franklin (2005). "Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae." Vaccine 23(15): 1828-1832.

Minussi, R. C., et al. (2002). "Potential applications of laccase in the food industry." Trends in Food Science & Technology 13(6): 205-216.

Nickelsen , J., et al. (2003) "Cloroplast RNA binding proteins". Curr Genet 43(6): 392-399.

Pezzella, C., et al. (2015). "How to enjoy laccases." Cellular and Molecular Life Sciences 72(5): 923-940.

Piscitelli, A., et al. (2010). "Heterologous laccase production and its role in industrial applications." Bioengineered Bugs 1(4): 252-262.

Pourmir, A., et al. (2013). "Production of xylitol by recombinant microalgae." Journal of Biotechnology 165(3): 178-183.

Proschold, T., et al. (2005). "Portrait of a Species: Chlamydomonas reinhardtii." Genetics 170(4): 1601-1610.

Rao, S., et al. (1992). "Direct Photoaffinity Labeling of Tubulin With Taxol." JNCI: Journal of the National Cancer Institute 84(10): 785-788.

Rasala, B. A. and S. P. Mayfield (2014). "The microalga Chlamydomonas reinhardtii as a platform for the production of human protein therapeutics." Bioengineered Bugs 2(1): 50-54.

Ro, D.-K., et al. (2006). "Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast." Nature 440(7086): 940-943.

Rosales-Mendoza, S., et al. (2011). "Chlamydomonas reinhardtii as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives." Plant Cell Reports 31(3): 479-494.

Roth, S. and A. C. Spiess (2015). "Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives." Bioprocess and Biosystems Engineering 38(12): 2285-2313.

Sarrion-Perdigones, A., et al. (2013). "GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology." Plant Physiology 162(3): 1618-1631.

Sasso, S., et al. (2012). "Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products." FEMS Microbiology Reviews 36(4): 761-785.

Specht, E. A., et al. (2017). Host Organisms: Algae. Industrial Biotechnology: Microorganisms. W. C. and J. C. Liao, byWiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 605-641.

Steinbrenner, J. and G. Sandmann (2006). "Transformation of the Green Alga Haematococcus pluvialis with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis." Applied and Environmental Microbiology 72(12): 7477-7484.

Thurston, C. F. (1994). "The structure and function of fungal laccases." Microbiology 140(1): 19-26.

Tran, M., et al. (2012). "Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts." Proceedings of the National Academy of Sciences 110(1): E15-E22.

Vickers, C.E., et al. (2014). "Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes". Plant Cell & Environ. 37(8):1753-1775

Walker, K. and R. Croteau (2001). "Molecules of Interest: Taxol biosynthetic genes." Phytochemistry 58: 1-7.

Wani, M. C., et al. (1971). "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia." J Am Chem Soc 93(9): 2325-2327.

Wannathong, T., et al. (2016). "New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Applied Microbiology and Biotechnology 100(12): 5467-5477.

Xu, L., et al. (2014). "Improvement of hydrogen yield of lba-transgenic Chlamydomonas reinhardtii caused by increasing respiration and impairing photosynthesis." International Journal of Hydrogen Energy 39(25): 13347-13352.

Young, R. E. B. and S. Purton (2016). "Codon reassignment to facilitate genetic engineering and biocontainment in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii." Plant Biotechnology Journal 14(5): 125