

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΡΙΚΟΣ
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΠΑΚΕΤΥΛΑΣΩΝ
ΧΙΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΟ
HELICOVERPA ARMIGERA

ΜΑΡΙΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Υπεύθυνος καθηγητής: Β. Μπουριώτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επικεφαλής του εργαστηρίου και υπεύθυνο καθηγητή κ. Βασίλη Μπουριώτη για την εμπιστοσύνη του και την ανάθεση του θέματος καθώς επίσης και για τις συμβουλές και καθοδηγήσεις στα δύσκολα σημεία της εργασίας. Ευχαριστώ, επίσης, τους καθηγητές κ. Ιωάννη Βόντα και κ. Κυριάκο Πετράτο που ήταν επιβλέποντες στην παρούσα εργασία αλλά και για τις συζητήσεις και συμβουλές που είχα μαζί τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Κουτσιούλη για την απεριόριστη βοήθεια που είχα από εκείνον τόσο στο πειραματικό μέρος, όσο και πέρα από αυτό και για τις συζητήσεις που είχαμε σε χώρους γυμναστικής! Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Εύη Μπαλωμένου μιας και ήταν επιβλέπουσα μου στην πρώτη τριμηνιαία εργαστηριακή άσκηση του μεταπτυχιακού προγράμματος και με βοήθησε πολύ στην κατανόηση πολλών πραγμάτων μέσω των συμβουλών της. Ευχαριστώ πολύ την Σοφία Αρναουτέλη για την βοήθεια της σε διάφορα σημεία της εργασίας μου, την κ. Μαίρη Τζανοδασκαλάκη για την βοήθεια της στην διεξαγωγή πειραμάτων σχετικά με την παρούσα διατριβή, την Νατάσα Τοματσίδου για τις πολλές στιγμές γέλιου και την βοήθεια της όπου τη χρειαζόμουν. Και τέλος ευχαριστώ πολύ την συνάδελφο Ελένη Μακράκη για την βοήθειά της στα τελευταία πειράματα της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Αλέξη, Γιάννη και Μάνο που και αν δεν είναι όλοι εδώ, στο μυαλό μου είναι πάντα για όλα αυτά που περάσαμε και ζήσαμε μαζί. Τους φίλους μου από την Αθήνα που όποτε τους βλέπω λησμονούμε τα παιδικά μας χρόνια. Τους φίλους μου εδώ στην Κρήτη, Ερριέτα, Ευγενία, Αλέξη, Ελένη, Νατάσα, Μανώλη, Μαριάννα που περάσαμε όμορφα τα δύο χρόνια του μεταπτυχιακού και φυσικά τον Άρη που εκτός από τις επιστημονικές συμβουλές ήταν πάντα εκεί για οποιοδήποτε συμβουλή.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στον άνθρωπο που πέρασα μαζί αυτό το διάστημα, την Σάσα, που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής και είχα πολλές όμορφες στιγμές μαζί της. Μέχρι και στη συγγραφή της εργασίας αυτής με συντρόφευε η παρέα της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου Σοφία και Αλέξανδρο όχι μόνο για την υλική, αλλά κυρίως για την ηθική τους υποστήριξη καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη και αγάπη που μου έχουν δείξει όλα αυτά τα χρόνια.

Μαρίνης Δημήτρης,

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	6
1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2.1 Καταπολέμηση επιβλαβών παρασίτων στη γεωργία.....	8
2.2 Χιτίνη και χιτοζάνη.....	10
2.3 Σύνθεση της χιτίνης.....	12
2.4 Απακετυλάσες χιτίνης: ο βιολογικός ρόλος και η διανομή τους.....	14
2.5 <i>Helicoverpa armigera</i>	18
2.6 Απακετυλάσες χιτίνης στο <i>H. Armigera</i>	20
2.7 Σκοπός.....	22
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	23
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.2.1 Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR).....	26
3.2.2 Αντίδραση PCR σε cDNA βιβλιοθήκη <i>H. Armigera</i> για τα γονίδια στόχους.....	27
3.2.3 Πέψη του πλασμιδίου pET26b και αντίδραση συγκόλλησης.....	29
3.2.4 Αντίδραση PCR για την εύρεση θετικών αποικιών (Colony PCR) χρησιμοποιώντας την Taq DNA πολυμεράση.....	30

3.2.5 Χημικός μετασχηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i>	31
3.2.6 Προσπάθεια παραγωγής των πρωτεϊνών HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b σε κύτταρα <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys.....	32
3.2.7 Μερική απομόνωση των ενζύμων HaCDA1, HaCDA5a.....	32
3.2.8 Χρωματογραφία σε προσροφητή νίτριλο – τριοξικού οξέος αγαρόζης (Ni-NTA) για τιςHaCDAs.....	33
3.2.9 Χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow για τις HaCDA1 και HaCDA5a	34
3.2.10 Χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow για τις HaCDA1 και HaCDA5a	34
3.2.11 Κατακρίμνηση πρωτεϊνών με χρήση θεικού αμμωνίου για τις HaCDA1 και HaCDA5a	35
3.2.12 Χρωματογραφία σε προσροφητή Phenyl-Sepharose Hi-load για τις HaCDA1 και HaCDA5a	35
3.2.13 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.....	35
3.2.14 PCR για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pPICZα1 για υπερέκφραση στον οργανισμό <i>P. Pastoris</i>	36
3.2.15 Πέψεις πλασμιδιακού φορέα pPICZα1 και αντίδραση λιγάσης με τις HaCDAs που φέρουν τις ίδιες θέσεις περιορισμού.....	38
3.2.16 Χημικός μετασχηματισμός του στελέχους X33 <i>P.pastoris</i>	38
3.2.17 Μετασχηματισμός του στελέχους X33 <i>P.pastoris</i> μέσω ηλεκτροδιάτρησης..	39
3.2.18 Μικρής κλίμακας παραγωγή των πρωτεϊνών στόχων στο στέλεχος X33 <i>P.pastoris</i>	40
3.2.19 Λύση κυτταρικής πελλέτας <i>Pichia Pastoris</i>	41
3.2.20 Ραδιοχημική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης.....	41

3.2.21 Ανάλυση κατά Western.....	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1 <i>In silico</i> ανάλυση των πιθανών απακετυλασών χιτίνης από το <i>Helicoverpa armigera</i> (HaCDAs)	43
4.2 Στοιχισή της αλληλουχίας των HaCDAs και σύγκριση με άλλες απακετυλάσες πολυσακχαριτών.....	46
4.3 Κλωνοποίηση γονιδίων hacda1, hacda5a, hacda5b στον πλασμιδιακό φορέα pET26b και στον pPICZαr1pha	49
4.4 Παραγωγή των HaCDAs σε κύτταρα <i>E.coli</i>	51
4.5 Κλωνοποίηση των γονιδίων hacda1, hacda5a, hacda5b στο στέλεχος X33, <i>P.pastoris</i>	55
4.6 Έκφραση και μερικός καθαρισμός της πρωτεΐνης HaCDA1 στο στέλεχος X33, <i>P.pastoris</i>	57
4.7 Κλωνοποίηση των hacdas και έκφραση στο στέλεχος X33, <i>P.pastoris</i> (με βελτιστοποιημένα γονίδια).....	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	65
5.1 Συζήτηση.....	65
5.2 Προοπτικές.....	67
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ABSTRACT

In order to develop new approaches to confront insects that affect crops, a number of insects' enzymes have been targeted. This study is part of a general research effort to evaluate chitin deacetylases as target enzymes for the development of specific inhibitory compounds as novel pest control agents. As a model organism the lepidopteron *Helicoverpa armigera*, a highly polyphagous species was chosen. The aim of this study is the overexpression, isolation and biochemical characterization of three putative chitin deacetylases (HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b) from *H. armigera*. For each gene, two plasmid constructs were made, with and without signal peptide into a plasmid vector (pet26b) suitable for expression in bacterial cells of *E. coli*. The transformation took place at six different *E. coli* strains namely BL21 (DE3) pLysS, BL21 star (DE3) pLysS, BL21 Codon Plus (DE3) RipL, C43 (DE3), Shuffle (DE3), BL21 star (DE3), PG-KJE8 BL21. However, the expression levels of the recombinant proteins were extremely low for further isolation and biochemical characterization. Therefore, a eukaryotic microorganism namely *Pichia Pastoris* was subsequently selected for expressing the three genes encoding for putative polysaccharide deacetylases. Genes hacda1, hacda5a, hacda5b were cloned into the plasmid vector pPICAZalpha suitable for transformation of *P.pastoris* X33 strain. However, the expression levels of the three proteins did not result in improved yields of the enzymes. Gene synthesis and codon optimization of all three genes and subsequent cloning in *Pichia Pastoris* took place in order to achieve higher expression levelsof the three proteins.

1.Περίληψη

Στα πλαίσια ανάπτυξης καινοτόμων μέσων αντιμετώπισης των εντόμων που πλήττουν τις γεωργικές καλλιέργειες, μια σειρά ενζύμων αυτών των εντόμων έχουν στοχοποιηθεί. Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα μιας ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας που εστιάζεται στην αξιολόγηση των απακετυλασών χιτίνης, ως στόχων νέων εντομοαπωθητικών και το σχεδιασμό ειδικών ενώσεων-αναστολέων για αυτά τα ένζυμα. Ως μοντέλο οργανισμός επιλέχθηκε το λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera*, ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος. Τα ένζυμα στόχοι της εργασίας αυτής είναι τρεις πιθανές απακετυλάσες χιτίνης HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b, του λεπιδόπτερου *H. armigera* με σκοπό την υπερέκφραση, απομόνωση και βιοχημικό χαρακτηρισμό τους. Για κάθε γονίδιο πραγματοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές με και χωρίς το αντίστοιχο πεπτιδίο σινιάλο σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (pET26b) κατάλληλο για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli*. Ο μετασχηματισμός έλαβε χώρα σε 6 διαφορετικές κυτταρικές σειρές *E.coli* (BL21 (DE3) pLysS, BL21 star (DE3) pLysS, BL21 Codon Plus (DE3) RipL, C43 (DE3), Shuffle (DE3), BL21 star (DE3), PG-KJE8 BL2). Τα επίπεδα έκφρασης των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών ήταν σε πολύ χαμηλό επίπεδο ώστε να γίνει περαιτέρω απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός τους και για αυτό το λόγο ακολούθησε προσπάθεια έκφρασής τους σε ευκαρυωτικό μικροοργανισμό και συγκεκριμένα στον ασκομύκητα *Pichia pastoris*. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα στην *P.pastoris* βοηθούν στην καλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών στόχου του έργου που είναι επίσης ευκαρυωτικής προέλευσης. Τα γονίδια hacda1, hacda5a, hacda5b κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pPICZalpha και ακολούθησαν πειράματα για την βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας. Ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης παρέμειναν χαμηλά και για αυτό αποφασίστηκε η σύνθεση των γονιδίων (gene synthesis) από την εταιρία Genescript για βελτιστοποίηση των κωδικονίων (codon optimization) που μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα επίπεδα έκφρασης

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Καταπολέμηση επιβλαβών παρασίτων στη γεωργία

Η καταπολέμηση των επιβλαβών για την γεωργία παρασίτων είναι αναγκαία στα πλαίσια διατήρησης της ποιότητας και της ποσότητας της παραγωγής. Οι παραγωγοί έχουν στη διάθεση του πολλά εργαλεία για τον έλεγχο των πληθυσμών σε ανεκτά για τις καλλιέργειες επίπεδα. Τα μέτρα αυτά μπορεί να διακριθούν σε καλλιεργητικά, μηχανικά, βιολογικά και χημικά. Στα καλλιεργητικά μέτρα περιλαμβάνονται διάφορες καλλιεργητικές εργασίες που γίνονται με τα συνηθισμένα γεωργικά μηχανήματα ή εργαλεία και συντελούν στον περιορισμό των βλαβερών εντόμων ή άλλων ζωικών εχθρών της παραγωγής ή στον περιορισμό των ζημιών. Στα καλλιεργητικά μέτρα μπορούν να περιληφθούν: η αμειψισπορά, οι περίοδοι χωρίς φυτό-ξενιστή, η αλλαγή του τρόπου ή του χρόνου φύτευσης ή συγκομιδής, η φύτευση φυτών παγίδων, η καταπολέμηση των ζιζανίων, η καλλιέργεια του εδάφους, η καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας και άλλα. Στα μηχανικά και άλλα μέτρα περιλαμβάνονται η συλλογή, η σύνθλιψη, η παγίδευση, τα μηχανικά και άλλα φράγματα, η μηχανική απομάκρυνση, η αχρήστευση του μέσου που ζουν και πολλαπλασιάζονται, η αλλαγή της υγρασίας, της θερμοκρασίας και του φωτός, η φωτεινή ή άλλη ακτινοβολία ενέργεια, τα ηχητικά κύματα, τα μέτρα γενικής υγιεινής. Η βιολογική καταπολέμηση για τον έλεγχο των επιβλαβών για την γεωργία παρασίτων βρίσκει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια (Arno et al., 2010). Η χρήση ωφέλιμων αρπακτικών και παρασιτοειδών και η εξαπόλυση τους, κυρίως μέσα σε θερμοκήπια, μπορεί να μειώσει αισθητά τους πληθυσμούς των εντόμων. Κύριος τρόπος για τον έλεγχο των επιβλαβών για την γεωργία εντόμων και ακάρεων γίνεται μέχρι και σήμερα με την χρήση εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων. Παρότι τα τελευταία χρόνια η βιολογική καταπολέμηση έχει κερδίσει έδαφος, σε πολλές περιπτώσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα, ο κύριος τρόπος καταπολέμησης εντόμων μέχρι σήμερα γίνεται κυρίως με χρήση χημικών σκευασμάτων.

Τα παρασιτικά έντομα είναι μεγάλη απειλή για την γεωργία και την δημόσια υγεία. Το κύριο μέσο καταπολέμησης και ελέγχου τους είναι τα νευροτοξικά εντομοκτόνα. Παρόλο που η χρήση τους είναι πολύ αποτελεσματική και ικανή να

σκοτώσει μεγάλους πληθυσμούς εντόμων, συνοδεύεται από πολύ σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις όπως η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, η μείωση των πληθυσμών ωφέλιμων εντόμων καθώς και τα χημικά υπολείμματα που καταλήγουν στη φυτική-ζωική παραγωγή και κατά συνέπεια στον άνθρωπο. Για τους παραπάνω λόγους είναι ανάγκη η ανάπτυξη νέων τρόπων αντιμετώπισης των παρασιτικών εντόμων, πιο αποτελεσματικών και πιο επιλεκτικών. Με τη συνδυαστική εφαρμογή της βιοπληροφορικής και της μοριακής βιολογίας δημιουργήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης νέων φυτοφαρμάκων για τον έλεγχο των εντόμων, όπως είναι η ταυτοποίηση νέων στόχων για εντομοκτόνα εστιάζοντας κυρίως σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια των εντόμων (όπως με τη χρήση επιλεκτικών ρυθμιστών ανάπτυξης των εντόμων, insect growth regulators, IGRs) και η ανάπτυξη βελτιωμένων βιολογικών προσεγγίσεων (*Bacillus thuringiensis*).

Τα IGRs αντιπροσωπεύουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων ουσιών που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των εντόμων. Η ανάπτυξη των IGRs είναι το αποτέλεσμα ερευνητικών προσπαθειών των τελευταίων 2-3 δεκαετιών, σε μια προσπάθεια μείωσης των επικίνδυνων εντομοκτόνων τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και για το περιβάλλον. Πρόκειται για εντομοκτόνα που δεν είναι τοξικά στον άνθρωπο και τα θηλαστικά, δεν βλάπτουν σοβαρά τα ωφέλιμα παράσιτα και αρπακτικά, είναι φιλικά προς το περιβάλλον και μπορούν να ενταχθούν σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης.

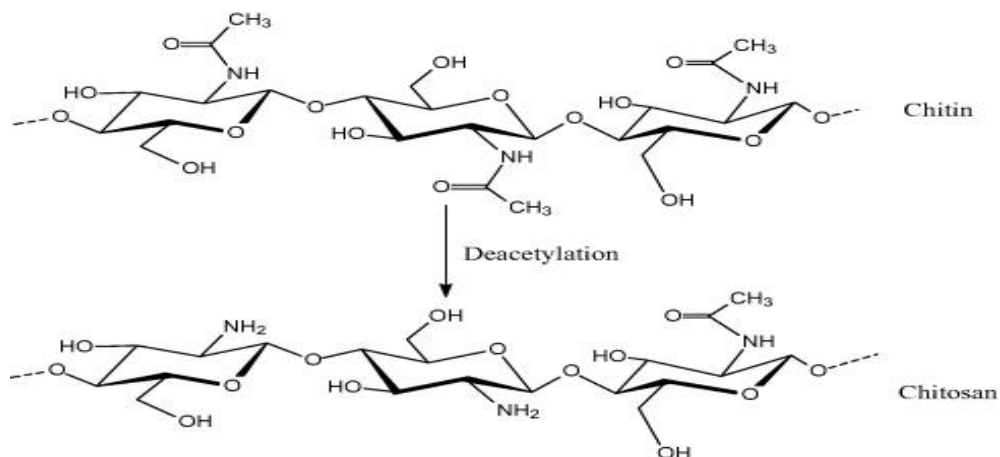
Με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης ή τις μεταβολικές διεργασίες που επηρεάζουν οι ενώσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες : 1) τους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης και 2) τις ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων.

Πιο ειδικά στην πρώτη κατηγορία υπάγονται οι βενζουλούριες, οι οποίες δρουν ως παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού νέου δερματοσκελετού κατά την έκδυση και μετάβαση του εντόμου από το ένα στάδιο στο άλλο. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η διακοπή της εξέλιξης των προνυμφικών σταδίων ή της μετάβασης στο στάδιο της νύμφης και της μεταμόρφωσής της σε ενήλικο και τελικά ο θάνατος των εντόμων. Εκτός από την προαναφερθείσα δράση τα εντομοκτόνα αυτά επιδεικνύουν και ωοτόκο δράση, αναστέλλοντας την εμβρυογένεση. Ειδικότερα, τα εντομοκτόνα αυτά

παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της N-ακετυλο- D-γλυκοζαμίνης και κατά συνέπεια τη σύνθεση και εναπόθεση της χιτίνης με αποτέλεσμα το θάνατο του υπό εξέλιξη εντόμου. Η σημαντικότητα του συγκεκριμένου τρόπου δράσης έγκειται στο γεγονός ότι η βιοσύνθεση της χιτίνης ως λειτουργία απουσιάζει από τα φυτά και τα ζώα (Wright J. and Retnakaran, 1987). Τροποποιητικά ένζυμα χιτίνης των εντόμων (απακετυλάσες χιτίνης) αποτελούν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας στα πλαίσια μια ευρύτερης προσπάθειας αξιολόγησής τους ως στόχοι καινοτόμων επιλεκτικών εντομοκτόνων.

2.2 Χιτίνη και χιτοζάνη

Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία πολυμερές στη φύση μετά την κυτταρίνη. Είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές N-ακετυλογλυκοζαμινών συνδεδεμένων με $\beta(1,4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς. Είναι ευρέως κατανεμημένη σε καρκινοειδή, έντομα και σε ορισμένους μύκητες. Μέχρι τώρα, η χιτοζάνη έχει βρει περισσότερες εφαρμογές από τη χιτίνη, λόγω του ότι η χιτίνη είναι αδιάλυτη σε νερό. Ωστόσο, η χιτοζάνη ανήκει σε μια οικογένεια από πολυμερή που προέρχονται από αποακετυλίωση της χιτίνης και η διαλυτότητά της στο νερό οφείλεται στις ελεύθερες αμινομάδες γλυκοζαμίνης. Η χιτοζάνη είναι ένα πολυκατιονικό βιοπολυμερές που προκύπτει είτε ενζυμικά είτε χημικά από την απακετυλίωση της χιτίνης (Εικόνα 1). Ο βαθμός ακετυλίωσης της χιτοζάνης, δηλαδή η επιμέρους σύσταση των αλυσίδων σε N-ακετυलगλυκοζαμίνη και γλυκοζαμίνη, έχει βρεθεί ότι ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών παρασκευασμάτων και για αυτό έχει προταθεί ο ορισμός της ως η διαλυτότητα αυτής σε διάλυμα οξικού οξέος 0.1M (Roberts, 1993).



Εικόνα 1 : Η απακετυλίωση της χιτίνης από την απακετυλάση της χιτίνης οδηγεί στη δημιουργία χιτοζάνης και οξικού οξέος

Η κυτταρίνη και η χιτίνη στην κρυσταλλική τους μορφή προσδίδουν αντοχή και ακαμψία σε δομικά στοιχεία και προσφέρουν μηχανική στήριξη. Παρέχουν επίσης προστασία στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, φυκών και μυκήτων και στον εξωσκελετό των αρθροπόδων. Η χιτίνη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα ασπόνδυλα, κυρίως τα αρθρόποδα (έντομα και καρκινοειδή), Ενώ σε μικρότερες ποσότητες από τα μαλάκια, τους δακτυλιοσκώληκες και τους νηματώδεις. Απαντάται τέλος στο κυτταρικό τοίχωμα όλων των μυκήτων (εκτός από τους ωομύκητες/Oomycetes) (Cohen, 2001). Ποικίλες είναι οι χρήσεις της χιτίνης σε πολλούς κλάδους επιστημών και οι εφαρμογές της όλο και πληθαίνουν. (Πίνακας 1).

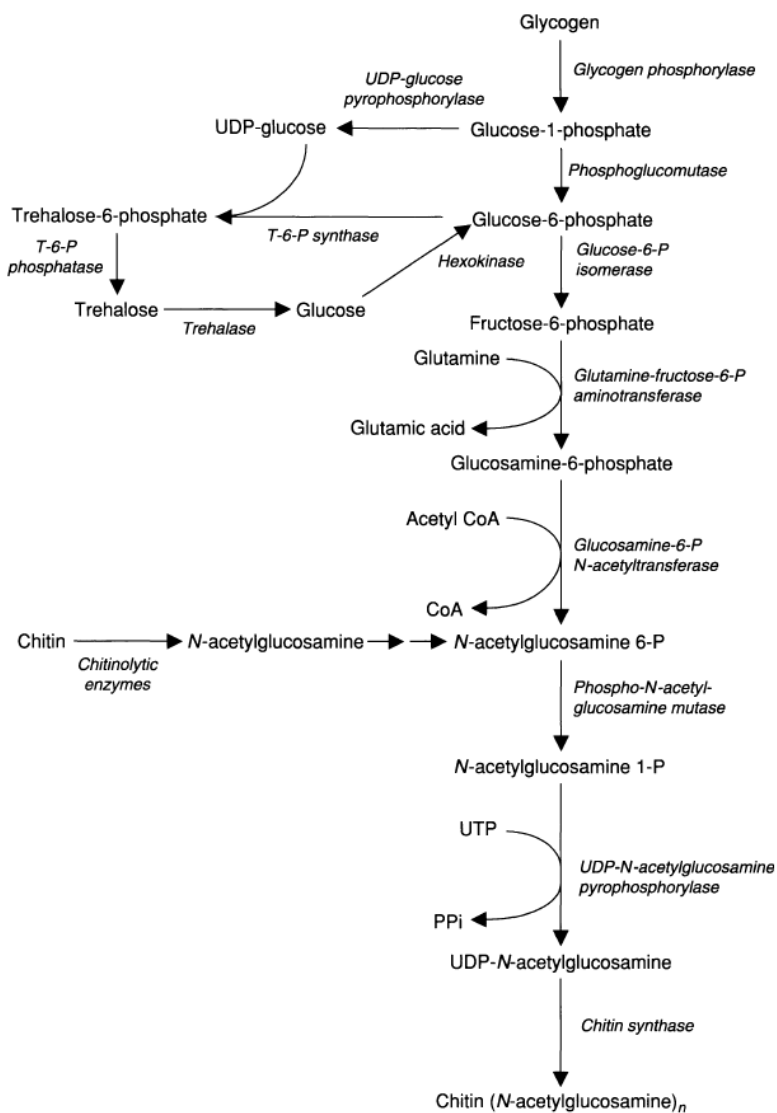
ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΧΙΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ

ΚΛΑΔΟΣ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ
Βιοϊατρική	<ul style="list-style-type: none"> • Υποχοληστεριναιμική διαίτα • Απορροφούμενα ράμματα • Συνθετικό δέρμα
Βιομηχανία	<ul style="list-style-type: none"> • Καθαρισμός αποβλήτων • Διαύγαση χυμών και αναψυκτικών • Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Γεωργία-Κτηνοτροφία	<ul style="list-style-type: none"> • Επικάλυψη σπόρων και φυλλώματος • Πρόσθετο εδάφους και άρδευσης • Πρόσθετο ζωοτροφών
Βιομηχανία καλλυντικών	<ul style="list-style-type: none"> • Κομμωτική • Περιποίηση δέρματος
Βιοτεχνολογία	<ul style="list-style-type: none"> • Ακινητοποίηση ενζύμων και κυττάρων • Χρωματογραφία

2.3 Σύνθεση της χιτίνης

Ο σχηματισμός και η εναπόθεση της χιτίνης είναι μία περίπλοκη βιοχημική διαδικασία βιοχημικών, που ξεκινάει ενδοκυτταρικά και ολοκληρώνεται με την έγκλιση της χιτίνης σε εξωτερικές υπερ-μακρομοριακές δομές (εφυμενίδα, περιτροφικές μεμβράνες, κυτταρικό τοίχωμα). Η βιοσύνθεση της χιτίνης ξεκινάει από το γλυκογόνο, την τριαλόζη και από ανακυκλωμένη χιτίνη (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Βιοσυνθετικό μονοπάτι της χιτίνης

Οι περισσότερες πληροφορίες για τη βιοσύνθεση της χιτίνης στους μύκητες, κατά διάφορα αναπτυξιακά στάδια, προέρχονται από τον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*. Το ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των N-ακετυλογλυκοζαμινομάδων με τον σχηματισμό β(1,4) γλυκοσιδικών δεσμών είναι η συνθάση της χιτίνης. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία παραλαμβάνει το υπόστρωμα της, την UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, από το κυτταροπλασματικό μέρος και αποδίδει το προϊόν της, τις αλυσίδες χιτίνης στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Duran et al, 1975). Η μεταφορά των συνθασών χιτίνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο ή το σύστημα Golgi, όπου ολοκληρώνεται η σύνθεσή τους, προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη γίνεται με ειδικά κυστίδια, τα χιτινοσώματα (Ruiz-Herera et al, 1977). Σύμφωνα με τις μελέτες του Bartnicki-

Garcia (Bartnicki-Garcia, 1989) η απακετυλίωση των καταλοίπων της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στο μόριο της χιτίνης συμβαίνει πιθανότατα στο περιπλασμικό χώρο των κυττάρων, όπου η απακετυλάση της χιτίνης συντονίζει τη δράση της με τη συνθάση της χιτίνης, έτσι ώστε η απακετυλίωση να λαμβάνει χώρα πριν την κρυστάλλωση των αλυσίδων χιτίνης.

Στα έντομα η επιδερμίδα και το μεσέντερο είναι οι δύο κύριοι ιστοί όπου γίνεται η σύνθεση της χιτίνης στα έντομα. Κύτταρα τις επιδερμίδας είναι υπεύθυνα για την εναπόθεση καινούριας επιδερμίδας και τα κύτταρα του μεσεντέρου σχετίζονται με την δομή και το σχηματισμό της περιτροφικής μεμβράνης (peritrophic matrix, PM) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τροφής του εντόμου. Η χιτίνη, επιπρόσθετα σχετίζεται και με άλλους ιστούς όπως το εμπρόσθιο έντερο, τα φτερά, του σιελογόνους αδένες, την τραχεία των ενήλικων ατόμων και στα στάδια της προνύμφης (Wilson και Cryan, 1997). Γενικότερα, έχει αναφερθεί ότι τα κύτταρα στα σημεία που βρίσκεται η χιτίνη είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεσή της. Ωστόσο, αυτή η ερμηνεία είναι περίπλοκη, διότι η συναρμολότητα των μικροϊνιδίων χιτίνης λαμβάνει χώρα στον εξωκυττάριο χώρο και επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία των συνδεδεμένων αυτών πρωτεϊνών. Αυτό συμβαίνει στο έντερο όπου μερικά κύτταρα συνεισφέρουν στην σύνθεση και έκκριση της χιτίνης, ενώ άλλα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πρωτεϊνών της PM (Wang και Granados, 2000).

2.4 Απακετυλάσες χιτίνης: ο ρόλος και η διανομή τους

Στην οικογένεια CE-4 (σύμφωνα με την ταξινόμηση Henrissat) ανήκουν οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών, οι οποίες περιλαμβάνουν τις :

- Απακετυλάσες χιτίνης
- Εστεράσες ακετυλ-ξυλάνης
- Ξυλανάσες A, C, D και E
- Απακετυλάσες χιτοολιγοσακχαριτών (NodB) των ριζόβιων
- Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης

Τα παραπάνω ένζυμα αυτά έχουν από κοινού μια γενική συντηρημένη περιοχή που αποκαλείται περιοχή απακετυλίωσης πολυσακχαριτών (NodB domain) (Kafetzopoulos et al., 1993).

Απακετυλάσες χιτίνης και χιτοολισακχαριτών έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί σε βακτήρια, μύκητες και έντομα. Πιο αναλυτικά:

1.Απακετυλάσες χιτοολιγοσακχαριτών στα βακτήρια. Τα *Vibrionaceae* είναι θαλάσσια βακτήρια ευρέως καταναμημένα σε όλες τις θάλασσες και στις εκβολές των ποταμών και είναι υπεύθυνα για την ανακύκλωση του αζώτου που υπάρχουν στα χιτινώδη συντρίμια που καθιζάνουν με τον καιρό στο νερό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το βακτήριο *Vibrio cholerae* όπου η χιτίνη αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για τις συνήθειες και τη ζωή του βακτηρίου. Τη χρησιμοποιεί για να τραφεί, να προσαρμοστεί στο περιβάλλον, για την ανοχή του σε καταπονήσεις και για αμυντικό μηχανισμό ενάντια στους εχθρούς (Yong Zhao et al, 2010).

2.Απακετυλάσες χιτίνης στους μύκητες. Απακετυλάσες της χιτίνης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μύκητες (*Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthanum*, *Mucor rouxi*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Tsigos et al, 2000).

Οι απακετυλάσες της χιτίνης στους μύκητες συμμετέχουν στη δημιουργία του κυτταρικού τους τοιχώματος και έχει προταθεί ότι παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου. Στην περίπτωση του μύκητα *M. rouxii* και του *A. coerulea*, έχει δειχθεί ότι η συνθάση της χιτίνης δρα διαδοχικά με την απακετυλάση της χιτίνης για το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη βλαστική φάση ανάπτυξης (Gao et al, 1995 και Davis et al, 1984). Στον *S.cerevisiae* οι απακετυλάσες της χιτίνης χρειάζονται για τη σωστή δημιουργία του τοιχώματος του ασκοσπορίου κατά την φάση της σπορίωσης (Christodoulidou et al, 1996). Στον μύκητα *C.lindemuthanum* , η απακετυλάση της χιτίνης εκκρίνεται και έχει προταθεί ότι δρα σε ολιγομερή χιτίνης τα οποία όταν απακετυλιωθούν χάνουν την ικανότητα τους να προάγουν αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού (Vander et al, 1998). Επιπλέον, έχει προταθεί ένας ρόλος των απακετυλασών χιτίνης στη διαδικασία εισβολής των υφών του μύκητα σε ιστούς του φυτού. Η ενζυματική απακετυλίωση μπορεί να προστατεύει

τις υφές, αφού μειωμένα επίπεδα ακετυλίωσης έχουν ως αποτέλεσμα τη λιγότερο αποτελεσματική υδρόλυση της χιτίνης από τις φυτικές ενδοχιτινάσες (Mendgen et al, 1996 και El Gueddari et al, 2002).

3 Απακετυλάσες χιτίνης στα έντομα. Η περιτροφική μήτρα των εντόμων αποτελείται από χιτίνη και πρωτεΐνες. Η PM διαδραματίζει ποικίλες λειτουργίες στη φυσιολογία των εντόμων, αλλά κυρίως αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας στο μεσέντερο του εντόμου. Έχουν ταυτοποιηθεί 18 πρωτεΐνες της PM από διάφορα έντομα. Χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι ο μεγάλος αριθμός συντηρημένων κυστεϊνών που περιέχουν για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Με τον τρόπο αυτόν η πρωτεΐνη είναι πιο σταθερή για να ανταπεξέλθει στο περιβάλλον του εντέρου που είναι πλούσιο σε πρωτεάσες. Επίσης οι πρωτεΐνες αυτές μέσω των πολλαπλών περιοχών αυτών (chitin-binding domains), επιτρέπουν τις διαμοριακές συνδέσεις (cross-linkings) των ινιδίων χιτίνης με τις πρωτεΐνες για το σχηματισμό της PM (Wei Guo et al., 2005).

Η χιτίνη είναι ένα βιοπολυμερές που εναποτίθεται με μορφή οργανωμένων μικροϊνιδίων στους εξωσκελετούς των αρθροπόδων. Η χιτίνη συμβάλλει στην ισχύ και αντοχή δομικών στοιχείων του οργανισμού, δηλαδή σε διάφορες δομές όπως η επιδερμίδα και η PM του μεσεντέρου. Η παρεμπόδιση λοιπόν της εναπόθεσης της χιτίνης είναι καταστροφική για τον οργανισμό. Για αυτόν τον λόγο ένζυμα που σχετίζονται με την σύνθεση και την αποικοδόμηση (συνθάση της χιτίνης, χιτινάσες), αποτελούν συνήθεις στόχους για καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων. Οι απακετυλάσες της χιτίνης τροποποιούν την χιτίνη και ενδέχεται να είναι στόχοι για νέα εντομοκτόνα.

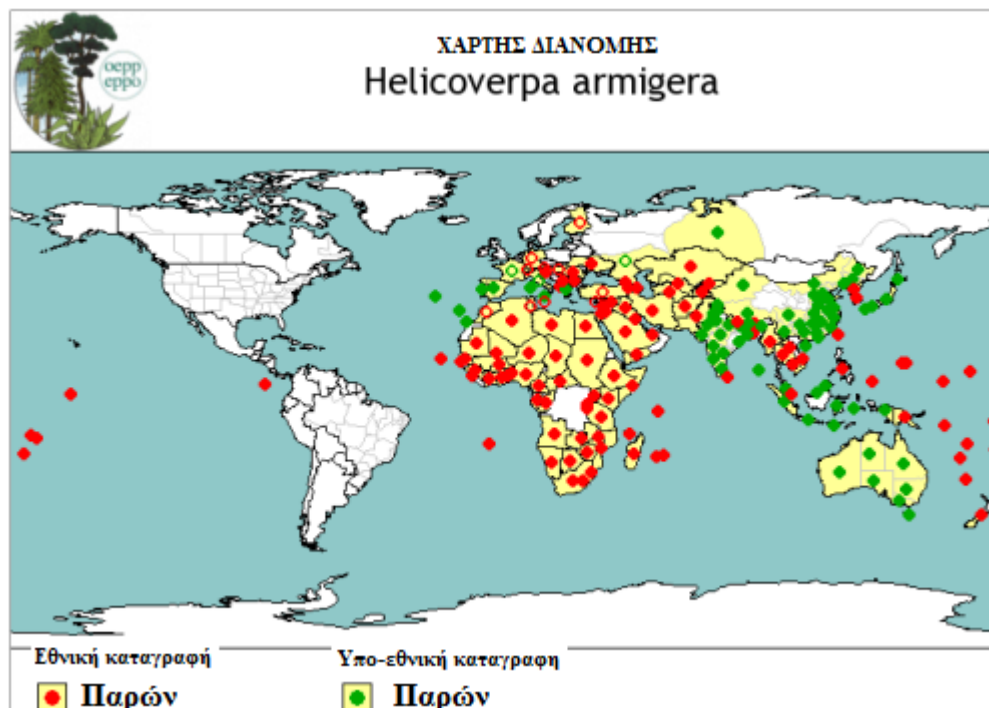
Οι απακετυλάσες χιτίνης έχουν ανιχνευθεί σε αρκετά έντομα, όπως τα *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Helicoverpa armigera*, *Mamestra configurata*, *Tribolium castaneum* και *Trichoplusia ni* (Wei Guo et al., 2005). Οι περισσότερες από τις αναφερόμενες απακετυλάσες χιτίνης σχετίζονται με την PM του μεσεντέρου και διανέμονται σε ολο το μήκος της μήτρας. Επιπρόσθετα, η παρουσία αυτών των ενζύμων στον ιστό του μεσεντέρου κατά το στάδιο της λάρβας ανιχνεύθηκε μόνο κατά την περίοδο της σίτισης. Όταν η λάρβα σταμάτησε να τρέφεται, στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια η πρωτεΐνη απουσίαζε από το μεσέντερο.

Παρόλο που η συμμετοχή των απακετυλασών χιτίνης στην PM είναι κοινή στα έντομα, η εμφάνιση τους δεν περιορίζεται μόνο στην PM. Για παράδειγμα στην *D.melanogaster*, δύο πιθανές απακετυλάσες της χιτίνης οι CDA1 και CDA2 (serpentine και vermiform) βρέθηκε να σχετίζονται με την εξωτερική μήτρα της τραχείας (Yong Zhao et al,2010).

Η σημασία τους για τη ζωή των αρθροπόδων αποκαλύπτεται από πολλά ευρήματα, όπως δηλαδή η απώλεια του χαρακτηριστικού σχήματος των εντόμων, ο φαινότυπός τους με μη φυσιολογικές δομές και οι διαστάσεις που παρουσιάζουν σε απουσία χιτίνης. Επιπλέον, η απενεργοποίηση δύο ενζύμων τροποποίησης χιτίνης στη *Drosophila melanogaster* επηρέασαν στην ανάπτυξη των ανώμαλων και ελικοειδών σχημάτων της τραχείας (Luschnig et al. 2006, Wang et al. 2006). Επιπροσθέτως, οι Arakane et al, έχουν αναφερθεί σε διαταραχές στην ανάπτυξη του *Tribolium castaneum* που προκαλείται από RNA σίγηση των αντίστοιχων γονιδίων CDA. Αποτελέσματα από RNA σίγηση έδειξαν πως οι TcCDA1 και TcCDA2 είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη του εντόμου και TcCDA2A TcCDA2B που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα της TcCDA2 έχουν ποικίλους ρόλους για τη μορφολογία του ενήλικου εντόμου (Arakane et al, 2009).

2.5 *Helicoverpa armigera*

Γεωγραφική κατανομή

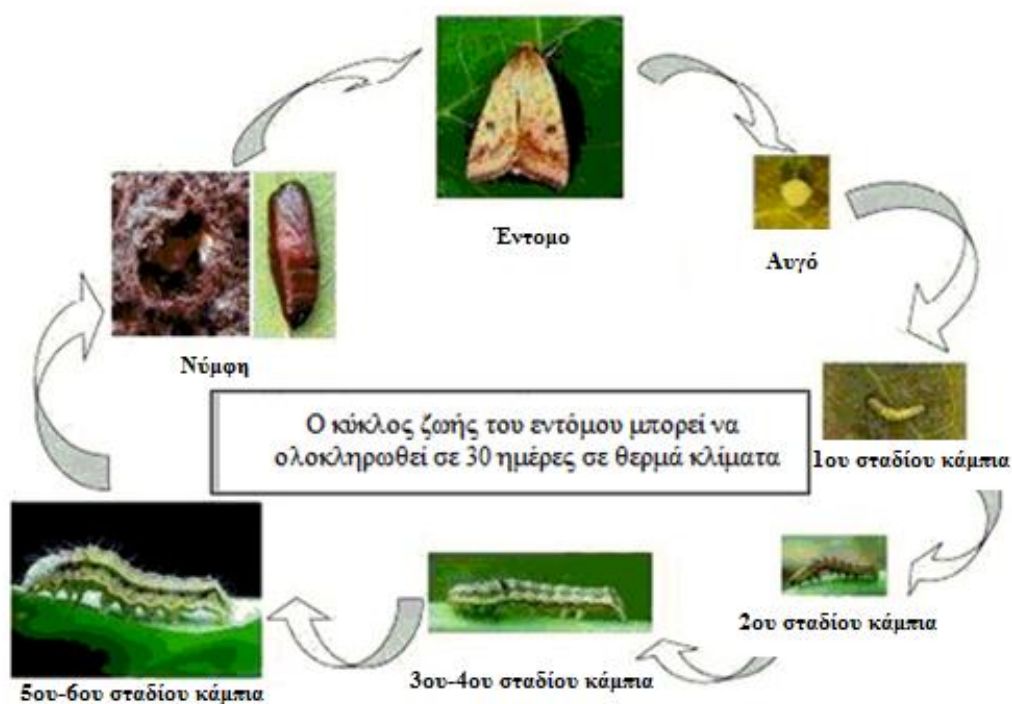


Εικόνα 3 Χάρτης διανομής του *Helicoverpa armigera* (EPPO, 2006)

Η *H. armigera* είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος. Οι πιο σημαντικοί ξενιστές καλλιεργειών στους οποίους η *H. armigera* παρασιτεί είναι η ντομάτα, το βαμβάκι, το μπιζέλι, το ρεβίθι, το χρυσάνθεμο, οι μπάμιες, τα κουκιά, η σόγια, ο καπνός, η πατάτα και το καλαμπόκι (Multani et al, 2002 Chandra et al, 1974, Gahukar, 2002 Kakimoto et al, 2003). Τα τελευταία χρόνια το συγκεκριμένο έντομο κάνει αισθητή την παρουσία του κυρίως στην Ευρώπη, την Αφρική και στην Ασία (Εικόνα 3).

Τα ενήλικα άτομα της *H. armigera* έχουν συνήθως κιτρινωπά έως κόκκινα φτερά (τα θηλυκά) ή πρασινωπά / γκρι (τα αρσενικά). Τα αυγά ποικίλουν από λευκό σε κίτρινο / καφέ ανάλογα με την ηλικία τους. Μετά την εκκόλαψη, οι προνύμφες έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα, ενώ οι νύμφες εμφανίζουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα από κιτρινωπό / πράσινο σε σκούρο καφέ. Το μέγεθός τους μπορεί να είναι μέχρι και 40mm. Το μέσο ενήλικο θηλυκό του είδους είναι ικανό να ωοτοκήσει αρκετές

εκατοντάδες αυγά. Δεν φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερη προτίμηση για την κατανομή των αυγών, καθώς αυτά μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε όλα τα μέρη του φυτού, στα άνθη και στους καρπούς. Στους 25 °C η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη *H. armigera*, ο χρόνος εκκόλαψης είναι 3 ημέρες. Σε 3-4 εβδομάδες, οι κάμπιες έχουν περάσει μέσα από πέντε ή έξι στάδια ανάπτυξης, μέχρι να φύγουν τελικά από το φυτό και μείνουν στο έδαφος (Εικόνα 4). Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης σε νύμφη, οι προνύμφες εσωκλείονται σε ένα μεταξένιο κουκούλι αρκετών εκατοστών υπόγειο, το οποίο τους επιτρέπει να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια ενός ήπιου χειμώνα. Σε ιδανικές συνθήκες, το νυμφικό στάδιο διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Σε γενικές γραμμές, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές το σύνολο του κύκλου ζωής της *H. armigera* μπορεί να ολοκληρωθεί σε 30 ημέρες.



Εικόνα 4 Κύκλος ζωής του εντόμου

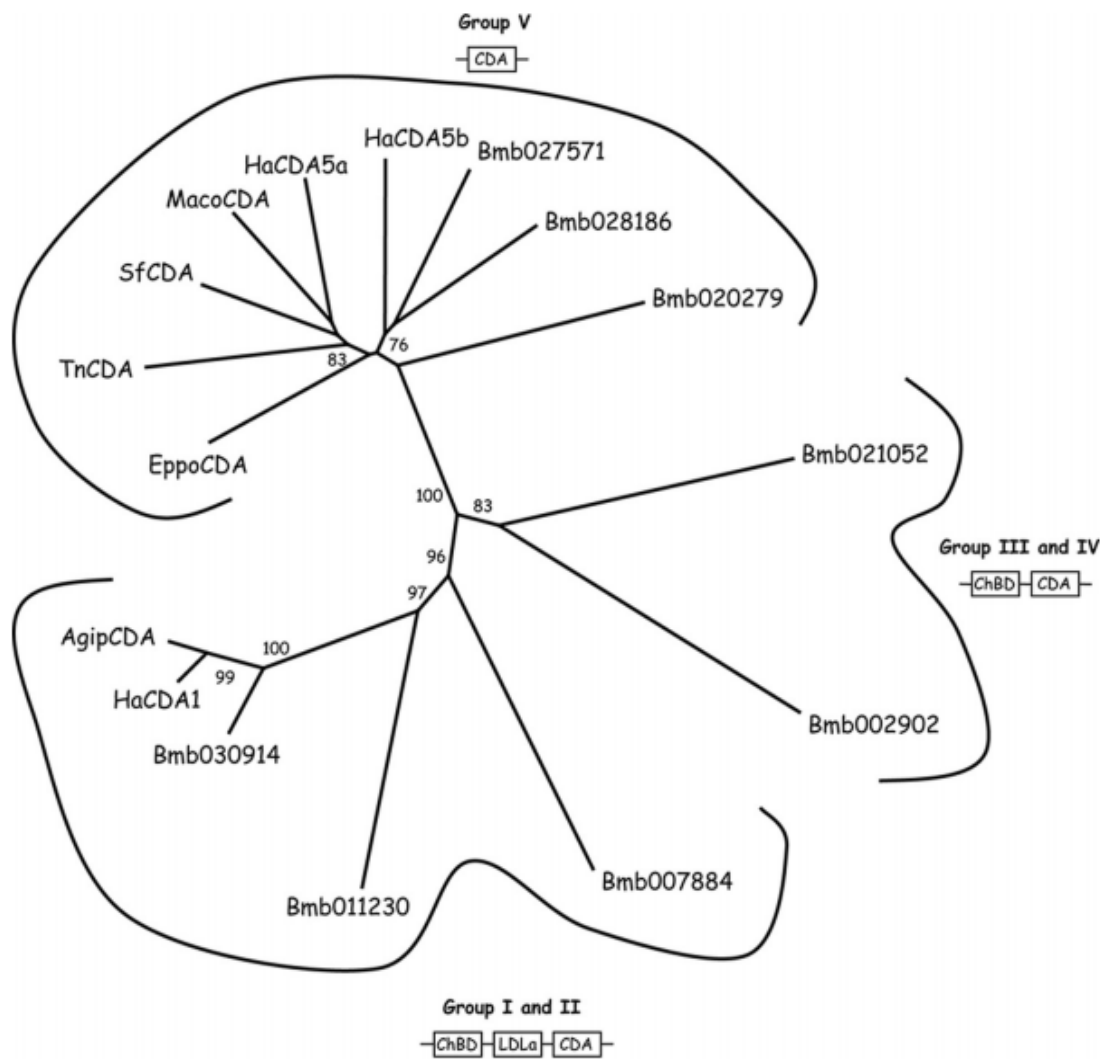
Το γεωργικό και οικονομικό ενδιαφέρον προς την *H. armigera* προέρχεται από το γεγονός ότι οι κάμπιες του συγκεκριμένου δείχνουν μια ισχυρή προτίμηση προς τα αναπαραγωγικά όργανα του φυτού ξενιστή. Στην περίπτωση του βαμβακιού,

κατεστραμμένα άνθη έχουν μια υψηλή πιθανότητα να ανοίξουν πρόωρα και να μείνουν άκαρπα, και τα κατεστραμμένα άνθη μπορεί να πέσουν, με τελικό αποτέλεσμα την σημαντική μείωση ποιοτικά και ποσοτικά της παραγωγής σε βαμβάκι.

2.6 Απακετυλάσες χιτίνης στο *H. Armigera*

Η *H. armigera* όπως όλα τα άλλα αρθρόποδα παράγει μικροϊνίδια χιτίνης που απαρτίζουν τον εξωσκελετό του ζώου. Αυτά τα μικροϊνίδια χρησιμεύουν ως παράγοντες που διασφαλίζουν την ευρωστία και τη δύναμη του εξωσκελετού. Επιπλέον, αυτά τα μικροϊνίδια αποτελούν δομικά στοιχεία των πολλών εξωκυτταρικών δομών στο σώμα των ενήλικων εντόμων και των προνύμφων τους, όπως η επιδερμίδα ή η PM.

Στο γονιδίωμα της *H. Armigera* έχουν αναφερθεί τρία γονίδια απακετυλασών χιτίνης, (*hacda1*, *hacda5a* και *hacda5b*). Στην φυλογενετική ομαδοποίηση των απακετυλασών χιτίνης, σύμφωνα με τον Campbell (Εικόνα 5) (Campbell et al. 2008), η *HaCDA1* ανήκει στην ομάδα I μιας και περιέχει μία καταλυτική περιοχή απακετυλάσης χιτίνης (CDAD), μία περιοχή δέσμευσης απακετυλάσης χιτίνης (ChBD) και μια περιοχή υποδοχέων λιποπρωτεϊνών (LDL_a). Τόσο η *HaCDA5a* και η *HaCDA5b* ανήκουν στην ομάδα V, δεδομένου ότι περιέχουν μόνο την περιοχή CDAD. Είναι ενδιαφέρον ότι, το ένα από αυτά τα γονίδια (*HaCDA5a*) έχει ήδη αναφερθεί να διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην εξισορρόπηση της διαπερατότητας της PM στο μεσέντερο ανάλογα με τις ανάγκες του εντόμου (σίτιση ή προστασία). Το έντομο είναι σε θέση να ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών για την αμυντική του λειτουργία έτσι ώστε να μην μπορεί να γίνει διαπερατή η PM από τον εχθρό. Πειράματα μόλυνσης του εντόμου με βακουλοϊό οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της *HaCDA5a*, προσδίδοντας έτσι μια δυσκαμψία στην μεμβράνη για την άμυνα του εντόμου με σκοπό να μην είναι διαπερατή η PM από τον ιό (Agata K. Jakubowska et al, 2010). Δεδομένου ότι η *H. armigera* αποτελεί έναν εξαιρετικά ισχυρό εχθρό των καλλιεργειών σε όλο τον κόσμο, η πλήρης ανάλυση του βιολογικού ρόλου αυτών των γονιδίων μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση νέων στόχων για την ανάπτυξη καινοτόμων εντομοαπωθητικών.



Εικόνα 5 Ομαδοποίηση απακετυλασών χιτίνης από διάφορα έντομα σύμφωνα Campell et al.

2.7 Σκοπός

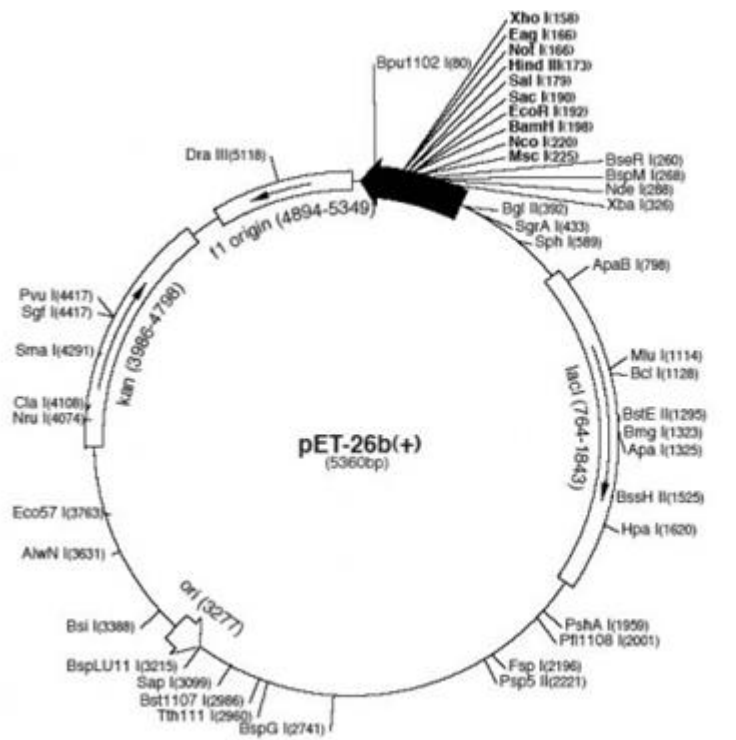
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση, απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός τριών πιθανών απακετυλασών χιτίνης του λεπιδοπτέρου *Helicoverpa armigera*. Αρχικός στόχος των πειραμάτων ήταν η απομόνωση των τριών γονιδίων από το έντομο (hacda1, hacda5a, hacda5b) και η κλωνοποίησή τους σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα για τον μετασχηματισμό και μετέπειτα έκφρασή τους σε κύτταρα *E.coli*. Επιπλέον στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκε προσπάθεια ετερόλογης έκφρασης σε έναν ευκαρυωτικό μικροοργανισμό, τον ασκομύκητα *Pichia pastoris*. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια έκφρασης ενζύμου με ενεργότητα απακετυλάσης χιτίνης από έντομα με σκοπό την κρυσταλλογραφική τους ανάλυση για την κατασκευή αναστολέων που θα στοχεύουν αυτά τα ένζυμα. Αυτό καθιστά την συγκεκριμένη προσπάθεια πρωτότυπη αλλά και με ιδιαίτερο ρίσκο λόγω των τροποποιήσεων που φέρουν οι πρωτεΐνες από έντομα και επηρεάζουν τόσο την δομική τους αναδίπλωση όσο και τα επίπεδα έκφρασης. Με βάση τα παράλληλα πειράματα της σίγησης των γονιδίων στόχων, θα στοχοποιηθούν οι απαραίτητες για το έντομο πρωτεΐνες για την περαιτέρω ανάλυσή τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

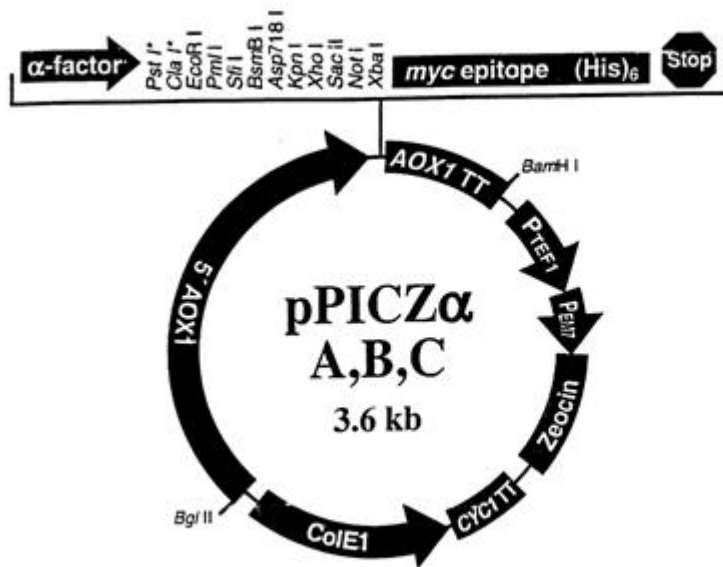
3.1 ΥΛΙΚΑ

- Οι νουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR) συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB).
- Τα στελέχη *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys, DH5a, DH10b προήλθαν από την εταιρεία Novagen, το BL21 star PlysS από την Promega, το BL21 codon plus (DE3)-RIPL από την Agilent Technologies, το Shuffle T7 *lysY* από την New England Biolabs και τέλος το PG-KJE8 BL21 (DE3) από την εταιρεία Takara.
- Ο πλασμιδιακός φορέας pET-26b προήλθε από την εταιρεία Novagen (Εικόνα 6A)
- Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου ήταν από την εταιρεία Fermentas Life Sciences.
- Το πλασμίδιο pPCIZalpha (Εικόνα 6B) και το στέλεχος *Pichia pastoris* X33 περιέχονται στο easy select *Pichia Expression Kit* της εταιρείας Invitrogen
- Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων καθώς και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα δράσης τους είναι από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology και New England Biolabs.

- Η προμήθεια των χρωματογραφικών υλικών S Sepharose fast flow, Q Sepharose fast flow, Ni-NTA αραρόζης και Sephacryl S200 HR έγινε από την εταιρεία GE- Healthcare.
- Τα φίλτρα υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν (YM10) ήταν από την Amicon.
- Ο [H^3] οξικός ανυδρίτης προμηθεύτηκε από την New England Nuclear.
- Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA (100bp-10kb) μετά από αλυσυδωτή αντίδραση πολυμεράσης και αντιδράσεις με περιοριστικά ένζυμα καθώς και για την εκχύλιση τμημάτων DNA (70bp-10kb) από πήκτωμα αραρόζης χρησιμοποιήθηκε στήλη nucleospin extract II (MACHEREY NAGEL GmbH).
- Για της μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια έγινε χρήση του kit Nucleospin plasmid (MACHEREY NAGEL GmbH).
- Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των βακτηρίων προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Difco Laboratories και Merck. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich Inc., Promega Corporation, Boehringer Mannheim GmbH, GE- Healthcare.
- Η συσκευή reqSTAR 96X Universal Gradient αγοράστηκε απο την εταιρεία reqlab. Η συσκευή Mastercycler gradient και Ellectroporator 2510 ήταν από την εταιρεία Eppendorf Netheler-Hinz GmbH.



A



B

Εικόνα 6 Οι πλασμινδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν σαν μήτρες : A) pET26b και B) pPICZα

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράση (PCR).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

<u>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</u>	<u>T_m</u>	<u>ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ENZYMO</u>
1)H1F (HaCDA1)	CGCCATATGGCGCGCTACGC	64 °C	NdeI
	TCCCCTCGAGGTAATGGCCGTCACCC	66 °C	XhoI
2)H1R (HaCDA1)	GTAG		
3)H5aF(HaCDA5α)	CGCCATATGAAGTTGTTCGGGCTT	60 °C	NdeI
4)H5aR(HaCDA5α)	TCCCCTCGAGTTGTCCAAGAGGATTG CC	61 °C	XhoI
5)H5Bf (HaCDA5b)	CGCCATATGAAGTTGTTGTGGTGTGT C	60 °C	NdeI
6)H5bR(HaCDA5b)	TCCCCTCGAGCAAGCCGAGGGGGTT	62 °C	XhoI
7)H1FWO(HaCDA 1)w/o sp	CGCCATATGCACCGATGGCGGC	62 °C	NdeI
8)H5aFWO(HaCD A5α)w/o sp	CGCCATATGGATGACTCTTCGTCGTC AGA	61 °C	NdeI
9)H5bFWO(HaCD A5b)w/o sp	CGCCATATGGATGACTCTTCGTCGTC AGA	62 °C	NdeI

10)pPICZaA_CDA 1F	CCGGAATTCATGGCGCGCTACGCCCG TGTC	63 °C	EcoRI
11)pPICZaA_CDA 1R	AAGGAAAAAAGCGGCCGC	63 °C	NotI
12)pPICZaA_CDA 5aF	CCGGAATTCATGAAGTTGTTTCGGGCTT CTTGCTTTG	63 °C	EcoRI
13)pPICZaA_CDA 5aR	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATTGTC CAAGAGGATTG	63 °C	NotI
14)pPICZaA_CDA 5bF	CCGGAATTCATGAAGTTGTTGTGGTGT GTCTTGGTACTCG	63 °C	EcoRI
15)pPICZaA_CDA 5bR	AAGGAAAAAAGCGGCCGATTACAAGC CGAGGGGGTTGC	63 °C	NotI
16)5' AOX1 sequencing primer (5' Pichia primer)	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	53 °C	
17)3' AOX1 sequencing primer (3' Pichia primer)	GCAAATGGCATTCTGACATCC	53 °C	

3.2.2 Αντίδραση PCR σε cDNA βιβλιοθήκη *H. armigera* για τα γονίδια στόχους.

Τα γονίδια *hacda1*, *hacda5a*, *hacda5b* απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη του οργανισμού *H. armigera* (ευγενική χορήγηση από το εργαστήριο Βιοχημείας του κ. Τζαμαρία, Πανεπιστήμιο Κρήτης). Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για πολλαπλασιασμό και απομόνωση των γονιδίων στόχων:

A) με το πεπτίδιο σινιάλο και ζεύγη εκκινητών τα ολιγονουκλεοτίδια 1-2, 3-4, 5-6 για τα γονίδια *hacda1*, *hacda5a*, *hacda5b* (Πίνακας 2) αντίστοιχα και

B) χωρίς το πεπτίδιο σινιάλο και ζεύγη εκκινητών τα ολιγονουκλεοτίδια 7-2, 8-4, 9-6 για τα γονίδια *hacda1*, *hacda5a*, *hacda5b* αντίστοιχα (Πίνακας 2).

Όλα τα ενισχυμένα γονίδια που προέκυψαν φέρουν την περιοριστική θέση NdeI στο 5' άκρο και την περιοριστική θέση XhoI στο 3' άκρο. Ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης των παραπάνω γονιδίων (με και χωρίς πεπτίδιο σινιάλο) στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET26b.

Παρακάτω παρατείνονται οι συνθήκες και η σύσταση των αντιδράσεων PCR για όλες τις HaCDAs (Πίνακας 3):

98 °C	30 sec	}	Επανάληψη του κύκλου 30 φορές
98 °C	10 sec		
58 °C	20 sec		
72 °C	30 sec		
72 °C	10 min		
8 °C	Αποθήκευση		

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 Σύσταση αντίδρασης

Αντιδραστήρια	(1X)
	Συγκεντρώσεις
Buffer (5X)	1X
Phusion πολυμεράση (2u/μl)	0.02 u/μl
dNTPs (10mM)	0.5mM
Μείγμα εκκινητών (12.5pmol/μl) όπως αναφέρονται στην ενότητα 3.2.2	0.5 pmol/μl
<i>H. armigera</i> cDNA	144-180ng
H₂O ~ 50 μl	

3.2.3 Πέψη του πλασμιδίου pET26b και αντίδραση συγκόλλησης

Για την ενσωμάτωση των γονιδίων hacda1, hacda5a, hacda5b στον πλασμιδιακό φορέα pET26b ήταν αναγκαία η τροποποίηση του φορέα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν συμβατά άκρα μεταξύ τους κατά την αντίδραση συγκόλλησης. Έτσι πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και XhoI (Πίνακας 4).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Σύσταση πέψης. Επώαση στους 37°C για 90 λεπτά

	H1, H5a, H5b	pET26b
NdeI (20 u/ µl)	0.66 u/ µl	0.66 u/ µl
XhoI (12 u/ µl)	0.4 u/ µl	0.4 u/ µl
Smartcut Buffer	1X	1X
DNA	1000 ng	1800 ng
H₂O	Up to 30 µl	Up to 30 µl

Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pET26b, έγινε αντίδραση συγκόλλησης στους 16°C για 16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής:

-50-100 ng φορέα

-ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπ όψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για τυφλά άκρα είναι 5-10 : 1.

-2µl 1× ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol)

-2 µl ATP (20mM)

-1µl T4 DNA λιγάση (3-5units)

-H₂O μέχρι 20μl τελικό όγκο

3.2.4 Αντίδραση PCR για την εύρεση θετικών αποικιών (Colony PCR) χρησιμοποιώντας την Taq DNA πολυμεράση

Το κάθε μείγμα της αντίδρασης συγκόλλησης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση του γονιδίου ενδιαφέροντος μέσω της αντίδρασης Colony PCR.

Παρακάτω παρατείνονται οι συνθήκες και η σύσταση των αντιδράσεων PCR (Πίνακας 5).

Συνθήκες αντίδρασης:

95 °C	30 sec	}	Επανάληψη του κύκλου 30 φορές
95 °C	10 sec		
Tm °C	30 sec		
68 °C	1 min 40 sec		
68 °C	5 min		
8 °C	Αποθήκευση		

(όπου Tm για hacda1= 51°C και για hacda5a,b= 47°C)

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Σύσταση αντίδρασης

Αντιδραστήρια	(1X) Συγκεντρώσεις
Buffer (10X)	1X
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0.025 u/μl
dNTPs (10mM)	0.5mM

Μείγμα εκκινητών (12.5 μ mol/ μ l) όπως 0.5 μ mol/ μ l

αναφέρονται στην ενότητα 3.2.2

Μήτρα	2.5 μl διάλυμα αποικίας (μια αποικία σε 20 μl νερό)
--------------	--

H₂O ~25 μ l

Μετά την επιλογή των θετικών κλώνων ακολούθησε μικρής κλίμακας καλλιέργεια (ολονύκτια επώαση 10ml LB/καναμυκίνη στους 37°C: για 1 lt διαλύματος Luria Bertani (LB) Medium: 10 gr bacto-tryptone, 5 gr yeast-extract, 10gr NaCl, σε αυτό προσθέτουμε 1ml διαλύματος καναμυκίνης 30 mg/ml), απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής μέσω του Nucleospin plasmid kit και νουκλεοτιδική αλληλούχιση, όπου διαπιστώθηκε η ένθεση του γονιδίου στο σωστό σημείο (σωστό πλαίσιο ανάγνωσης).

Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν οι παρακάτω κατασκευές : pET26bCDA1w/oSP, pET26bCDA5aw/oSP, pET26bCDA5bw/oSP, pET26bCDA1wSP, pET26bCDA5awSP, pET26bCDA5bwSP. (επεξήγηση στα ποτελέσματα, Πίνακας 2).

3.2.5 Χημικός μετασχηματισμός

Σε 100 μ l επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA (<0,2 μ g). Το κυτταρικό εναιώρημα επωάζεται σε πάγο (4 °C) για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμική διέγερση των κυττάρων με τοποθέτηση του σωληνάριου σε υδατόλουτρο των 42 °C για 70 sec και μετά το σωληνάκι μεταφέρεται απευθείας στον πάγο όπου και παραμένει για 2 λεπτά. Το κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάζεται σε 900 μ l LB και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για 1 ώρα, ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να δοθεί ο χρόνος στο πλασμιδιακό DNA να αντιγραφεί και να εκφραστεί. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.500 rpm, αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και από το υπόλοιπο μαζί με τα κύτταρα (εώς 200 μ l) επιστρώνεται σε τρυβλίο με LB που περιέχει το

κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για μία νύχτα.

3.2.6 Προσπάθεια παραγωγής των πρωτεϊνών HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) pLys

Στα πλαίσια της προσπάθειας υπερπαραγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε 6 κυτταρικές σειρές *E. coli* (BL21 (DE3) pLysS, BL21 star (DE3) pLysS, BL21 Codon Plus (DE3) RipL, C43 (DE3), Shuffle (DE3), BL21 star (DE3), PG-KJE8 BL21) με την πλασμιδιακή κατασκευή. Από το τρυβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα συλλέχθηκε μοναδική αποικία με την οποία μολύνθηκε υγρή καλλιέργεια LB/καναμικίνη/χλωραμφαινικόλη (για 1 lt διαλύματος Luria-Bertani Medium: 10 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 10 g NaCl και προσθήκη διαλύματος καναμικίνης και χλωραμφαινικόλης σε τελικές συγκεντρώσεις 100 µg/ml και 34 µg/ml αντίστοιχα). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός από την προκαλλιέργεια σε 1 lt φρέσκου θρεπτικού μέσου LB/κατάλληλο αντιβιοτικό (αραίωση 1/50) και ακολούθησε επώαση στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει το 0.6. Στην καλλιέργεια προστέθηκε επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,3 mM και ακολούθησε επώαση για 7 ώρες ή ολονύκτια στους 30 °C. Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε (20 λεπτά στις 6.500 rpm, στους 4°C), συλλέχθηκε η βακτηριακή πελέττα και αποθηκεύθηκε στους -20°C.

3.2.7 Μερική απομόνωση των ενζύμων HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b

Ενζυμική λύση κυττάρων *E. coli*

Η πελέττα κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (1g πελλέτας σε 3 ml διαλύματος): 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,3 mg/ml λυσοζύμη. Ακολούθησε επώαση στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 2,5 ώρες. Ανά

30 λεπτά γινόταν προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Μετά από 45 min έγινε προσθήκη λυσοζύμης τόση ώστε να διπλασιαστεί η αρχική της συγκέντρωση στο διάλυμα. Μετά από επώαση 1,5 ώρα στον πάγο, έγινε προσθήκη του ενζύμου DNase και MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml και 10 mM αντίστοιχα. Μετά από 1 ώρα επώασης, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C για 20 λεπτά στις 10.000 x g, ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα και να συλλεχθεί το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολούθως, η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε 15 ml διάλυμα: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 2% Triton x 100, για περαιτέρω αποδιάταξη των διλιπιδικών μεμβρανών. Το δείγμα επαναδιαλύθηκε για 4 ώρες στους 4 °C, φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 14.000 rpm στους 4 °C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθως το υπερκείμενο υπέστη διαπίδυση σε διάλυμα: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl (διάλυμα A) για 16 ώρες στους 4 °C.

3.2.8 Χρωματογραφία σε προσροφητή νίτριλο – τριοξικού οξέος αγαρόζης (Ni-NTA) για τις HaCDAs

Το δείγμα που προέκυψε από τη λύση των κυττάρων μέσω λυσοζύμης από τα *E. coli* και αντίστοιχα το υπερκείμενο που συλλέχθηκε από την *P.pastoris* αναμείχθηκε με προσροφητή νίτριλο- οξικού οξέος που έχουν προστεθεί ιόντα νικελίου (Ni-NTA αγαρόζης), (5 ml προσροφητή ανά 10 ml δείγματος) για 2 ώρες στους 4 °C, το οποίο με τη σειρά του είχε εξισορροπηθεί με το διάλυμα A. Ακολούθησε ο εγκιβωτισμός της στήλης με το υλικό και το πρωτεϊνικό δείγμα μαζί, όπου και συλλέχθηκε 15 ml νεκρός όγκος (void). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση με 10 όγκους στήλης με διάλυμα: 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, με ταχύτητα 2 ml/min. Ύστερα εφαρμόσθηκε συνεχής διαβάθμιση 0-500 mM ιμιδαζόλιο με 10 όγκους στήλης με διάλυμα που περιείχε: 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, με ταχύτητα 2 ml/min. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης, οι πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν ουρά έξι ιστιδινών αποσυνδέονται από τη στήλη Ni-NTA αγαρόζης, καθώς δεν μπορούν να ανταγωνιστούν για τις θέσεις πρόσδεσης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου.

Στα κλάσματα από τα κύτταρα *E. coli* δεν ανιχνεύθηκε κάποια ενεργότητα και δεν προχώρησε περαιτέρω η χρωματογραφική τους ανάλυση (δεν υπήρξε έκφραση των πρωτεϊνών). Τα κλάσματα της *P.pastoris* στα οποία ανιχνεύθηκε ενεργότητα από ενζυμική αντίδραση με ραδιοσημασμένη γλυκόλ-χιτίνη και μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, αναμίχθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση σε διάλυμα με σύσταση: 25 mM Bis-Tris pH 6.3 (διάλυμα Β) για 16 ώρες στους 4 °C.

3.2.9 Χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow για τις HaCDA1 και HaCDA5a :

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το προηγούμενο στάδιο φορτώθηκε σε προσροφητή SP Sepharose fast flow, ο οποίος αρχικά εξισορροπήθηκε με διάλυμα Β. Ο προσροφητής εκπλύθηκε με το διάλυμα Β και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες εκλούστηκαν σε κλάσματα όγκου 10ml με συνεχή διαβάθμιση NaCl (0- 1M). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη δεν εκλούστηκε σε κάποιο από τα κλάσματα, αλλά στον νεκρό όγκο και στο στάδιο της έκπλυσης της στήλης χρωματογραφίας (αρνητική χρωματογραφία). Στη συνέχεια τα τελευταία ενώθηκαν και υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση σε διάλυμα Γ (25mM Tris-HCl pH 8.0).

3.2.10 Χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow για τις HaCDA1 και HaCDA5a:

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το προηγούμενο βήμα φορτώθηκε εκ νέου σε προσροφητή Q Sepharose fast flow, ο οποίος εξισορροπήθηκε με διάλυμα και οι προσροφημένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν σε κλάσματα όγκου 10ml με συνεχή διαβάθμιση NaCl (0-1M). Τα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα και ποσότητα πρωτεΐνης αναμίχθηκαν και υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση σε διάλυμα 25mM Bis- Tris pH 6.3 / 300mM NaCl.

3.2.11 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με χρήση θειικού αμμωνίου για τις HaCDA1 και HaCDA5a

Από το υπερκείμενο που συλλέχθηκε από καλλιέργειες *P.pastoris* (μετά από φυγοκέντρηση) προστέθηκε ποσότητα στερεού θειικού αμμωνίου υπό ανάδευση (τελική συγκέντρωση 1,5 M). Οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 6000 στροφές στους 4 °C.

3.2.12 Χρωματογραφία σε προσροφητή Phenyl-Sepharose Hi-load για τις HaCDA1 και HaCDA5a

Το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο (ενότητα 3.2.11) φορτώθηκε σε προσροφητή Phenyl-Sepharose Hi-load (26 x 110 mm), ο οποίος είχε εξισορροπηθεί με 25mM Bis- Tris pH 6.3, 1,5 M θειικό αμμώνιο (διάλυμα Δ). ο προσροφητής εκπλύθηκε με με το διάλυμα Δ και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε κλάσματα όγκου 10 ml με κλιμάκωση θειικού αμμωνίου στο διάλυμα Β (1000 ml, 360 ml/hr, 1,5M-0M). Ακολούθησε και νέα γραμμική κλιμάκωση της συγκέντρωσης πολυαιθυλενικής γλυκόλης, με μοριακό βάρος 400, σε διάλυμα 20% PEG 400 25mM Bis- Tris pH 6.3. Οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε κλάσματα όγκου 10 ml (500 ml, 360 ml/hr, 0-20% PEG 400).

3.2.13 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση έγινε σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) πυκνότητας 12,5%. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των διαφόρων πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου.

3.2.14 PCR για κλωνοποίηση γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pPICZalpha για υπερέκφραση στον οργανισμό *P. Pastoris*

Τα γονίδια *hacda1*, *hacda5a*, *hacda5b* απομονώθηκαν ξανά από cDNA βιβλιοθήκη του οργανισμού *H. armigera*. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για πολλαπλασιασμό και απομόνωση των γονιδίων στόχων με ζεύγη εκκινητών τα ολιγονουκλεοτίδια 10-11, 12-13,14-15 για τα γονίδια *hacda1*, *hacda5a*, *hacda5b* αντίστοιχα. Όλα τα γονίδια που πολλαπλασιάστηκαν φέρουν το ενδογενές πεπτίδιο οδηγό.

Όλα τα ενισχυμένα γονίδια που προέκυψαν φέρουν την περιοριστική θέση EcoRI στο 5' άκρο και την περιοριστική θέση NotI στο 3' άκρο. Ακολούθησε διαδικασία κλωνοποίησης των παραπάνω γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pPICZalpha ώστε οι ετερόλογες πρωτεΐνες που θα προκύψουν να έχουν στο αμινοτελικό τους άκρο το πεπτίδιο σινιάλο a-factor (κατάλληλο για την έκκριση των πρωτεϊνών). Επίπρόσθετα ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε έφερε στο αμινοτελικό του άκρο ουρά έξι ιστιδινών για την προσπάθεια απομόνωση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας και τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για την ανίχνευσή τους. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν οι παρακάτω κατασκευές : pPICZalphaCDA1, pPICZalphaCDA5a, pPICZalphaCDA5b .(επεξήγηση στα αποτελέσματα, Πίνακας 2).

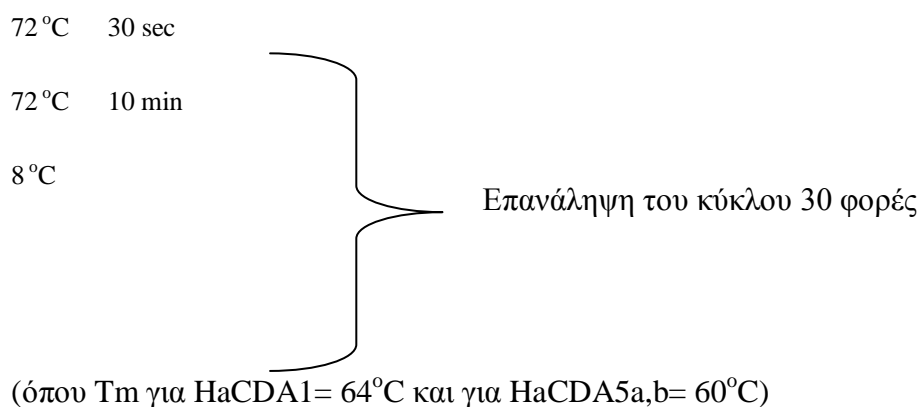
Παρακάτω παρατείθονται οι συνθήκες της αντίδρασης και η σύσταση των αντιδράσεων αλυσιδωτής πολυμεράσης για τα γονίδια HaCDAs (Πίνακας 6, 7)

Συνθήκες αντίδρασης για τις HaCDAs

98 °C 30 sec

98 °C 10 sec

Tm °C 20 sec



ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΣΥΣΤΑΣΗ Phusion PCR HaCDA1

Αντιδραστήρια	(1X)
	Συγκεντρώσεις
Buffer (5X)	1X
Phusion πολυμεράση (2u/μl)	0.02 u/μl
dNTPs (10mM)	0.5mM
Μείγμα εκκινητών (12.5pmol/μl) όπως αναφέρονται στην ενότητα 3.2.14	0.5 pmol/μl
<i>H. armigera</i> cDNA	180-360ng
H₂O~ 50 μl	

Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα, έγινε αντίδραση συγκόλλησης στους 16 °C για 16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής:

- 50-100 ng φορέα
- ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπ όψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για τυφλά άκρα είναι 5-10 : 1.
- 1μl 1× ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης
- 2 μl ATP (20mM)
- 1 μl T4 DNA λιγάση (3-5units)
- H₂O μέχρι 20μl τελικό όγκο

3.2.15 Πέψεις pPICZalpha και αντίδραση συγκόλλησης με τις HaCDAs που φέρουν τις ίδιες θέσεις περιορισμού

Ο πλασμιδιακός φορέας pPICZalpha κόπηκε με τα κατάλληλα περιοριστικά άκρα που φέρουν και τα γονίδια των HaCDAs (Πίνακας 8) και ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης (Πίνακας 9).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΠΕΨΕΙΣ

	H1, H5a, H5b	pET26b
EcoRI (20 u/ μl)	0.66 u/ μl	0.66 u/ μl
NotI (12 u/ μl)	0.4 u/ μl	0.4 u/ μl
EcoRI Buffer	1X	1X
DNA	250 ng	50 ng
H₂O	~30 μl	~ 30 μl

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

H1-pPICZalpha	H5a-pPICZalpha	H5b-pPICZalpha
2λ ATP	2λ ATP	2λ ATP
2λ Ρυθμιστικό δ/μα	2λ Ρυθμιστικό δ/μα	2λ Ρυθμιστικό δ/μα
2λ Πλασμίδιο	2λ Πλασμίδιο	2λ Πλασμίδιο
11λ Γονίδιο- H1	10λ Γονίδιο- H5a	10λ Γονίδιο- H5b
2λ H₂O	3λ H ₂ O	3λ H ₂ O
1λ Λιγάση	1λ Λιγάση	1λ Λιγάση

3.2.16 Χημικός μετασχηματισμός του στελέχους X33 *P.pastoris*

Από φρέσκο τρυβλίο (YPD, yeast extract, peptone, dextrose) με κύτταρα *P.pastoris* X33 συλλέχθηκε μοναδική αποικία με την οποία μολύνθηκε υγρή καλλιέργεια 20 ml

YPD. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 30 °C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1 ml από την προκαλλιέργεια σε 200 ml YPD και ακολούθησε επώαση στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει το 0.8-1. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πελλέτες που προκύπτουν από την φυγοκέντρηση ξεπλένονται με αποστειρωμένο νερό και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ύστερα οι πελλέτες επαναδιαλύονται με 900 μl νερό και 100 μl LiCl. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 10 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στη συνέχεια, προστίθεται 240μl PEG 50%, 36 μl LiCl, 40 μl συνοδό DNA (50 μl salmon sperm + 50 μl νερό), 40 μl DNA σε συγκέντρωση 5-10 μg (το οποίο έχει γίνει ευθύγραμμο, μετά από πέψη με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, PmeI) και γίνεται επώαση 30 λεπτά στους 30 °C και έπειτα 25 λεπτά στους 42 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 1 ml YPD και επωάζεται για 4 ώρες στους 30 °C. Επαναλαμβάνεται μια φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα YPD και απλώνεται σε πιάτα YPD + ζεοσίνη στους 30 °C για 1-3 μέρες μέχρι να εμφανιστούν αποικίες.

3.2.17 Μετασχηματισμός του στελέχους X33 *P.pastoris* μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων. Από προκαλλιέργεια 5 ml του στελέχους X33 σε θρεπτικό υλικό YPD στους 30 °C όλη τη νύχτα, μια ποσότητα του μεγέθους των 0,2-0,5 ml από την προκαλλιέργεια εμβολιάζεται σε νέα προκαλλιέργεια των 500 ml YPD ώσπου η απορρόφηση στα 600 nm φτάσει στο 1,3-1,5. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 στροφές στους 4 °C. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 500 ml κρύο νερό και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Επαναδιαλύεται και πάλι η πελλέτα σε 250 ml κρύο νερό και ακολουθεί φυγοκέντρηση . Ακολουθεί επαναδιάλυση της πελλέτας σε 20 ml σορβιτόλη 1M φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε 1 ml 1M σορβιτόλη.

Ηλεκτροδιάτρηση. 80 μl επιδεικτικών κυττάρων αναμειγνύονται με 10 μl ευθύγραμμου DNA (5-10 μg). Γίνεται ανάμειξη των κυττάρων με το DNA σε κυψελίδα κατάλληλη για την ηλεκτροδιάτρηση και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά στον πάγο. Ύστερα γίνεται η ηλεκτροδιάτρηση στην κατάλληλη συσκευή (eppendorf electroporator 2510) στις παρακάτω συνθήκες: 200 Ω, 50μ F, 1500V. Ακολουθεί προσθήκη 1 ml σορβιτόλη στην κυψελίδα και επώαση για 2 ώρες στους 30 °C χωρίς ανάδευση. Τέλος, το μείγμα απλώνεται σε πιάτα Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1% εκχύλισμα ζύμης, yeast extract , 2% πεπτόνη, 2% δεξτρόζη (γλυκόζη) 1 M σορβιτόλη 2% άγαρ), YPDS +100 μg ζεοσίνη στους 30 °C για 3-10 μέρες, μέχρι να εμφανιστούν αποικίες.

3.2.18 Μικρής κλίμακας παραγωγή των πρωτεϊνών στόχων στο στελέχος X33 *P.pastoris*

Μία αποικία τοποθετείται σε 25 ml με Minimal Glycerol Medium(MGY, 1.34% YNB (yeast nitrogen base), 1% γλυκερόλη, 4×10^{-5} % βιοτίνη), Buffered Minimal Glycerol (BMG, 100 mM φωσφορικό οξύ, pH 6.0 1.34% YNB 4×10^{-5} % βιοτίνη 1% γλυκερόλη ή 0.5% μεθανόλη), ή Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY, 1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 100 mM φωσφορικό οξύ pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % βιοτίνη 1%, γλυκερόλη) σε μία φιάλη 250 ml για καλύτερο αερισμό της καλλιέργειας. Επωάζεται στους 28–30°C στις 250–300 rpm μέχρι $O.D_{600nm} = 2-6$ (περίπου 16–18 ώρες). Ακολουθείται φυγοκέντρηση στις 1,500–3,000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε τελική απορρόφηση στα 600nm 1 σε Minimal Methanol (MM, 1.34% YNB, 0,5% μεθανόλη, 4×10^{-5} % βιοτίνη), Buffered Minimal Methanol (BMM) ή Buffered Methanol-complex Medium (BMMY, 1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 100 mM φωσφορικό οξύ pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % βιοτίνη 1%, 0.5% μεθανόλη) θρεπτικό μέσο για να γίνει η επαγωγή της έκφρασης (περίπου σε 100–200 ml). Προστίθεται 100% μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 0.5-1% κάθε 24 ώρες για να διατηρηθεί η επαγωγή της έκφρασης. Καθημερινά συλλέγεται δείγμα (1 ml) από την καλλιέργεια. Το δείγμα φυγοκεντρείται 5 λεπτά στις 3.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου και διαχωρίζεται το

υπερκείμενο και η πελλέτα και χρησιμοποιούνται και οι δύο φάσεις για έλεγχο της ενζυμικής ενεργότητας μέσω αντίδρασης με ραδιοσημασμένη γλυκόλ-χιτίνη και των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνικών δειγμάτων μέσω αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακριλαμίδης.

Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3.000rpm, στους 4°C, Συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο και συγκεντρώνεται μέσω μικροδιήθησης (συσκευή AMICON).

3.2.19 Λύση κυτταρικής πελλέτας *P.pastoris*

Οι πελλέτες, μετά τη φυγοκέντρωση τοποθετούνται στον πάγο. Για πελλετα από 1 ml καλλιέργειας τοποθετείται 1 ml διάλυμα λύσης [50 mM Na₃PO₄, pH 7.4 , 1mM PMSF (ή μείγμα με αναστολείς πρωτεασών) , 1 mM EDTA, 5% γλυκερόλη]. επαναδιαλύεται. Προστίθεται ίσος όγκος υαλοσφαιριδίων (διαμέτρημα 0,5 χιλιοστά), ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και επώαση για 30 δευτερόλεπτα στον πάγο. Επανάληψη των βημάτων για οχτώ κύκλους. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C, συλλογή του υπερκείμενου και αποθήκευση στους 4°C.

3.2.20 Ραδιοχημική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε H³ γλυκολ-χιτίνη (υδατοδιαλυτό παράγωγο της χιτίνης), (Araki, 1980). Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί η ποσότητα ραδιοσημασμένου οξικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την ενζυμική απακετυλίωση της ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης.



Αντίδραση παραγωγής ραδιοσημασμένου οξικού οξέος από ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη.

Ραδιοχημικός προσδιορισμός του παραγόμενου οξικού οξέος.

Η αντίδραση απακετυλίωσης για τις HaCDAs διεξάγονται σε 50μl τελικό όγκο, με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris pH 7,6, 1mM CoCl₂, 5μl ιχνοθετημένου υποστρώματος με το ισότοπο H³ και 31.5μl υπερκείμενο καλλιέργειας. Ο χρόνος επώασης είναι 3 ώρες ή όλη νύχτα σε θερμοκρασία 50°C. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 100μl διαλύματος 20mM HCl / 50mM CH₃COOH. Στη συνέχεια, το οξικό οξύ εκχυλίζεται από την υδατική φάση με 500μl οξικού αιθυλεστέρα και μετριέται σε σπινθηριστές (scintillation counters).

Σύσταση αντίδρασης ενζύμων με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη:

- 12,5 μl 100mM Tris 7,6
- 1 μl 10mM CoCl₂
- 5 μl H³
- 31,5 μl υπερκείμενο
- Ολονύκτια επώαση στους 50°C

Δοκιμάστηκαν και άλλες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και χρόνου, αλλά τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες.

3.2.21 Ανάλυση κατά Western

Πραγματοποιείται διαχωρισμός των επιλεγμένων δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χωρίς να γίνει χρώση του πηκτώματος. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε κατάλληλη

συσκευή (western blotting) όλη νύχτα στους 4°C στα 112 mA, 40V. Την επόμενη μέρα μπλοκάρονται οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης με ρυθμιστικό διάλυμα TBSTM (Tris-Buffered Saline and Tween 20), [(1X TBS Tris-Buffered Saline), (200mM Tris-HCl pH 7.6 (2M), 1.37M NaCl (5M), H₂O μέχρι τα 250 ml), 0.1% Tween 20 (100%), 5% dry milk και H₂O μέχρι τα 50 ml)] για 2 ώρες στους 4°C. Ακολουθείται επώαση όλη νύχτα με το πρώτο αντίσωμα anti-His (0.3 μg/μl) στους 4°C . Η μεμβράνη πλένεται με 50ml TBSTM buffer για 15 λεπτά/πλύσιμο. Το βήμα του πλησύματος επαναλαμβάνεται για 4 κύκλους. Στη συνέχεια γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για 2 ώρες στους 4°C (anti-mouse). Η μεμβράνη πλένεται με 50ml ρυθμιστικό διάλυμα TBSTM για 15 λεπτά/πλύσιμο (4 κύκλοι) και πλέον είναι έτοιμη για εμφάνιση στον κατάλληλο σκοτεινό χώρο (εμφάνιση με τη χρήση διαλυμάτων luminal enhancer, chemilucifer peroxide).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 *In silico* ανάλυση των πιθανών απακετυλασών χιτίνης από το *Helicoverpa armigera* (HaCDAs)

Οι αλληλουχίες των γονιδίων στόχων του έργου έχουν μέγεθος 1626bp για την HaCDA1, 1173bp για την HaCDA5a και 1185bp για την HaCDA5b. Το προβλεπόμενο μοριακό τους βάρος είναι 61,77kDa, 43,645kDa, 44,768kDa και το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) είναι 5,04, 4,72, 4,46 αντίστοιχα για την κάθε πρωτεΐνη. (http://www.expasy.org/proteomics/protein_sequences_and_identification).

Αξιοσημείωτο είναι πως οι αλληλουχίες τους είναι πλούσιες σε κυστεΐνες, 26 για την HaCDA1, 15 για την HaCDA5a και 16 για την HaCDA5b (Εικόνα 7, με κίτρινο είναι σημασμένη η παρουσία των κυστεϊνών).

HaCDA1

1 maryarvatl aacllfaca vadghrwrqa ddreapkkdd slevelckdk dagewfrlva
61 gegdnrcrdvi qctasgiqai rcpaglyfdi ekqtcdwkda vkncklknke rkvkplyte
121 eplcqdqgfla cgdscncierg lfcngekdca dgsdensedi dndpnrappe dasqcvlpc
181 fcsedgtvip gdlpakdvq mititfdai nnnnielyke ifngkrknpn gc dikatyfi
241 shktyntysav qethrkg hei avhsithndd erfwsnatvd dwgkemaagmr viiekfsnit
301 dnsvvg vrap ylrvggnqf tmmeeqafly dstitaplsn pplwpytmyf rmphrchgnl
361 qscprshav wemvnneldr redptndeyl pgcamvdses niltgdqfyn flnhnfdhrhy
421 eqnrapgly fhaawlknnp efleaflywi deilqshndv yfvmtqviq wiqnprtite
481 aknfeprwrek csvegyqacw vphsckltsk evpgetinlq tcvrcpwnyp wlnndptgdgh
541 y

HaCDA5a

1 mklfllall lvasvfadds ssseeneagl plaeadqea cslpdcrcss tnipgglnpr
61 dvpqfvvtvf dggvnnnii tyrnilynl nsgcpagvt ffsheytny a line l ynqg
121 feialhsish rtpqywfefa tkevikieia dqkaqmahfa nippsaikgv rmpflqlagn
181 asfeimseyg leydtwpti aptnpglwpy tldyastqdc iippcpsasi pgvwwkpmva
241 wsdlnq vpcsmvda cffipd reneeewykf ilsnerhyl gnrpfgfyv heaflaanpa
301 vnralvr fmd lvnnlnda fm vnahevidwv knpkplneyr sqgcrsftps icnprnncgpl
361 fsthnqlayy mqvcscapnsn yprwvgnplgq

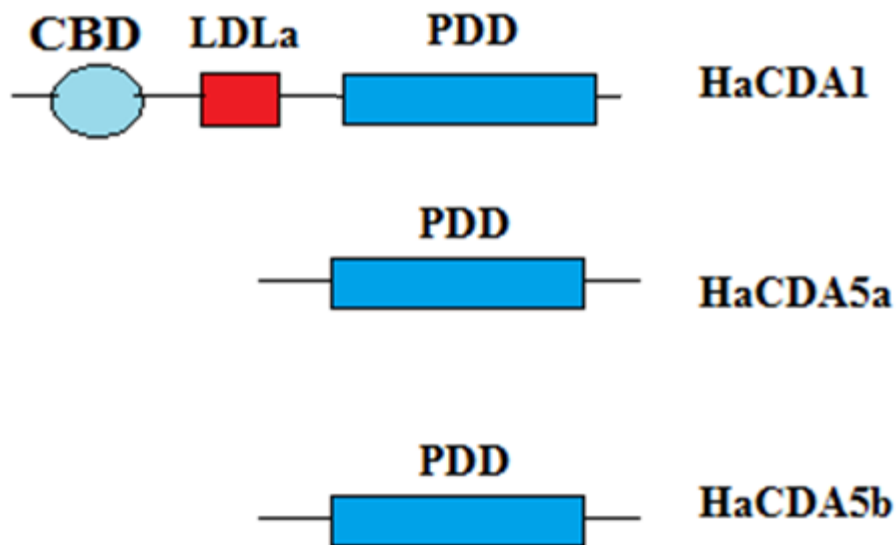
HaCDA5b

1 mklwcnvlvl aalvlaeene gssesse sqe vpe l plaee c deelcklpdc rcssteipgg
61 llprdtqfv tvtfddg vnv inintyre vl dgrqnsngcp ag atfyvshe ytnyrvnel
121 ynngyeialh sishkipqdw watatydelk eeia dqrtqm ahfanipfes ikgvrlpflq
181 lagntsfqvm adhdlydcs wptntfddpg lwpytldyas eqdc mippcp ta sipkpwvl
241 pmvswkdln d fpcamadsdf ytpdmedeea wfqfvsnf rhylg nrapf gfyvhe wyls
301 anpavksafi rfnlnlslp dvfmvnsse v idwvknrvpl teyrakprt wssaacpvsl
361 cgnvpsehmq mtywleacnv cprvypwtgn plg

Εικόνα 7 Κυστεΐνες στην αλληλουχία των πρωτεϊνών στόχων

Ανάλυση των πρωτεϊνών

A) Ανάλυση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών στόχων μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>), έδειξε πως πρόκειται για πρωτεΐνες της οικογένειας CE4 και τις αναφέρει ως πιθανές απακετυλάσες χιτίνης. Όσον αφορά την HaCDA1, φαίνεται να φέρει στο καταλυτικό της κέντρο την περιοχή πρόσδεσης χιτίνης (chitin binding domain, CBD), τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών και την περιοχή πρόσδεσης πολυσακχαριτών. Όσον αφορά τις άλλες δύο φαίνεται να φέρουν μόνο την περιοχή πρόσδεσης πολυσακχαριτών (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Μέσω του προγράμματος rFAM και χρησιμοποιώντας τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες των HaCDAs βρέθηκαν οι πιθανείς τομείς που φέρουν οι πρωτεΐνες στόχοι

B) Λόγω του μεγάλου αριθμού καταλοίπων κυστεϊνών στις αλληλουχίες των πρωτεϊνών στόχων πραγματοποιήθηκε ανάλυση στην ηλεκτρονική πλατφόρμα DIANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA>) όπου δίνεται η δυνατότητα πρόβλεψης των πιθανών δισουλφιδικών δεσμών. Στον πίνακα 10 γίνεται εμφανές ότι υπάρχει πρόβλεψη για μεγάλο αριθμό πιθανών δεσμών (14 για την HaCDA1 και 7 για τις HaCDA5a και HaCDA5b). Αυτό το αποτέλεσμα καθιστά την προσπάθεια ετερόλογης έκφρασης ιδιαίτερα ριψοκίνδυνη, μιας και η παρουσία πολλών δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές αναδιπλώσεις των πρωτεϊνικών δομών και επομένως να επηρεάσει τόσο τα επίπεδα έκφρασης όσο και την ενεργότητα τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10 Προβλεπόμενοι δισουλφιδικοί δεσμοί των HaCDAs. Στον πίνακα φαίνονται τα πιθανά ζεύγη δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών που βρίσκονται στις αντίστοιχες θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών.

<u>Προβλεπόμενοι δισουλφιδικοί δεσμοί</u>		
HaCDA1	HaCDA5a	HaCDA5b
13-182	36-48	6-224
18-399	46-255	40-45
47-232	95-195	50-259
66-131	202-352	99-229
72-95	225-374	199-348
82-393	249-377	356-361
104-136	344-357	378-381
124-175		
143-158		
149-363		
170-180		
356-491		
499-505		
522-525		

4.2 Στοιχίση της αλληλουχίας των HaCDAs και σύγκριση με άλλες απακετυλάσες πολυσακχαριτών

Πραγματοποιήθηκε στοιχίση επιλεγμένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών στην ηλεκτρονική πλατφόρμα clustalW. Οι αλληλουχίες ,μέσω του προγράμματος αυτού φαίνεται να προέρχονται από απακετυλάσες πολυσακχαριτών και να είναι πιθανές απακετυλάσες χιτίνης. Οι περισσότερες των πρωτεϊνών αυτών φέρουν πολλά κοινά μοτίβα και συντηρημένες περιοχές στο καταλυτικό τους κέντρο.

BC1974	-----KVAYITFDGPGKYTA-----	16
TcCDA1	-----PQMITTFDDAINNNNIEL--YK	21
HaCDA1	-----PQMITTFDDAINNNNIEL--YK	21
TcCDA3	-----PQMVLLTFDGPVNSHNWVL--LD	21
HaCDA5a	-----PQFVTVTFDDGVNVNNIIT--YR	21
HaCDA5b	-----PQFVTVTFDDGVNVININT--YR	21
TcCDA6	-----PQLITI TFDEAV-VNNIPTDVWK	22
S288c	-----KLSCTFDGGPSASTT-----	15
Bs168	PINWGFKRVSNHQPPDAGKQLNSLIEKYDAFYLGNTKEKTIYITFDNGYENGYTP-----	55
BC1974	ELLNLTQK-----HDAKATFFLIGANVKE-----	40
TcCDA1	EIPNGKRKNPNG-----CDIKATFFVSHKYTNY-----	49
HaCDA1	EIPNGKRKNPNG-----CDIKATFFVSHKYTNY-----	49
TcCDA3	GLLNG-ALNPNG-----CPIKATFFVSHESNNY-----	48
HaCDA5a	NILYN-RLNSNG-----CPAGVTFVVSHEYTNY-----	48
HaCDA5b	EVLDG-RQNSNG-----CPAGATFVVSHEYTNY-----	48
TcCDA6	PLLFDR-KKNPDG-----NPISATFFVPHYEYTDY-----	49
S288c	KLLDRLKH-----NSTFFNLGVNIVQ-----	36
Bs168	KVLDVLKK-----HRVTGTFFVTGHFVKD-----	79
BC1974	FPLVKRENAEGHYVGMHSMTNFAKLYKNGEYVNMKEDOGLIANIIGKSP-----K	93
TcCDA1	--SAVQEMHRKGHEIAVHSITHNDDERFWSNATVDDWAKEMAGMRIIAEKFANLTONSVV	107
HaCDA1	--SAVQETHRKGHEIAVHSITHNDDERFWSNATVDDWAKEMAGMRVIEKFSNITONSVV	107
TcCDA3	--HQTQKLWNEGHEIAVHSITYG---RWLLNATIEDWPFDEMVGQANIHRFSGVRLREL	103
HaCDA5a	--ALINELYNQGFELHSISHRTPTQYWFATKEVIKEEIAADQKAQMAHFANIPPSAIK	106
HaCDA5b	--RIVNELYNNGYEIALHSISHKIPODWWATATYDELKEEIAQRTQMAHFANIPFESIK	106
TcCDA6	--RRVQELYVQGFELGNSITKNSAEYWLKASEDVLREEFEGQRILMSHFANIPEDIV	107
S288c	HPDIYQRMQKEGHLIGSHTWSHVYLPNVSNEKIIAQIEWSIWMNATGNHTP-----K	89
Bs168	QPQLIKRMSDEGHIIGNHSFHHPDLTTKTADQIQDELDSVNEEVYKITGKQDN-----L	133
BC1974	LTRPPYGSMPG-----LNEGLRNKVVVEGGFKVWDWTIDSLDWRK-----	132
TcCDA1	GVRAPYLRVGGNNQFTMMEEQAFLYDSTITAPLSN-PPLWPYTYMFRMPHRCBGNLQSCP	166
HaCDA1	GVRAPYLRVGGNNQFTMMEEQAFLYDSTITAPLSN-PPLWPYTYMFRMPHRCBGNLQSCP	166
TcCDA3	GLRAPFLQIGSNRQFLMMKEFGFVYDSSIVAPFTH-LPLWPYTLDHKLPHECIK--QCEP	160
HaCDA5a	GVRMPFLQLAGNASFEIMSEYGLEIDCTWPTIAPTNPGLWPYTLDYASTQDCIIP-P-CP	164
HaCDA5b	GVRLPFLQLAGNTSFQVMADHLLYDCSWPTNTFTDPGLWPYTLDYASEQDCMIP-P-CP	164
TcCDA6	GARTPQLQLQGDASVNAYVASGVAYDSSWTSRSTS--MMFPYTLDYASTQDCRTG-TTCP	164
S288c	WFRPPYGGID-----NRVRAITRQFGLQAVLWEDTFDWSLLN-----	128
Bs168	YLRPPRGVFS-----EYVLKETKRLGYQTVFWSAFVVDKIN-----	170

Εικόνα 9 Αλληλούχιση ως τη NodB περιχοχή διάφορων απακετυλασών πολυσακχαριτών (των *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Tribolium castaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*, συμπεριλαμβανομένου και τις απακετυλάσες τις παρούσας εργασίας (ClustalW).

ΠΙΝΑΚΑΣ 11 Στοιχισή των κοινών μοτίβων μεταξύ των τριών πρωτεϊνών στόχου. Με υπογράμμιση σημαίνονται τα κοινά αμινοξέα τα οποία απαρτίζουν το εκάστοτε μοτίβο

Μοτίβο 1	Μοτίβο 2	Μοτίβο 3	Μοτίβο 4	Μοτίβο 5
----------	----------	----------	----------	----------

HaCDA1	<u>TFDD</u>	<u>HSITH</u>	<u>RAPY</u>	FLY <u>DS</u>	MYFRMPH
HaCDA5a	<u>TFDD</u>	<u>HSISH</u>	<u>RMPF</u>	LE <u>Y</u> DC	<u>LDY</u> ASTQ
HaCDA5b	<u>TFDD</u>	<u>HSISH</u>	<u>RLPF</u>	LL <u>Y</u> DC	<u>LDY</u> ASFQ

Στην εικόνα 9 και τον πίνακα 11 παρατηρούμε ότι τα πέντε κοινά μοτίβα των απακετυλασών πολυσακχαριτών είναι συντηρημένα και στις HaCDAs από το *H. Armigera*,

A) Το πρώτο μοτίβο (TFDD) περιέχει ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος το οποίο συνδέεται με το ιόν ψευδαργύρου και ένα δεύτερο κατάλοιπο ασπαρτικού που δεσμεύει το οξικό ιόν που παράγεται από την αντίδραση της απακετυλίωσης.

B) Το δεύτερο μοτίβο (H[S/T]xxHP) περιέχει δύο ιστιδίνες που συνδέονται με το ιόν ψευδαργύρου και μία σερίνη ή θρεονίνη που δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με την δεύτερη ιστιδίνη του μοτίβου, σταθεροποιώντας την περιοχή πρόσδεσης του μεταλλικού ιόντος.

Γ) Το τρίτο μοτίβο (RXPY/F) σχηματίζει την μία πλευρά του ενεργού κέντρου και έχει διάφορους ρόλους, όπως για παράδειγμα δεσμεύει το οξικό ιόν, το ιόν ψευδαργύρου και συντονίζει το καταλυτικό κατάλοιπο του ασπαρτικού.

Δ) Το τέταρτο μοτίβο (DxxDW) απαρτίζει το άλλο κομμάτι του ενεργού κέντρου του ενζύμου, του οποίου η τρυπτοφάνη είναι το πιο κρίσιμο αμινοξύ και τέλος,

E) Το μοτίβο 5, δεν συμβαδίζει με τα κοινά μοτίβα των υπόλοιπων απακετυλασών πολυσακχαριτών που περιέχουν μία λευκίνη και μία τρυπτοφάνη που δημιουργούν μια υδρόφοβη εσοχή και μία ιστιδίνη που σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξικό ιόν που απελευθερώνεται από την απακετυλίωση του υποστρώματος (David E. Blair et al, 2005).

4.3 Κλωνοποίηση γονιδίων hacda1, hacda5a, hacda5b στον πλασμιδιακό φορέα pET26b και στον pPICZα1pha

Στον παρακάτω πίνακα παρατείνονται οι πλασμιδιακές κατασκευές που σχεδιάστηκαν για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων τόσο στο βακτήριο *E.coli* όσο και στο μύκητα *P. Pastoris*. Επισημαίνεται ότι για την έκφραση σε κύτταρα *E. coli* κάθε γονίδιο κλωνοποιήθηκε με και χωρίς το πεπτιδίο σινιάλο στον πλασμιδιακό φορέα pET26b που φέρει στο 3' άκρο του ουρά έξι ιστιδινών, ενώ για την έκφραση στον μύκητα *P.pastoris*, όλες οι κατασκευές έγιναν στο πλασμίδιο pPICZα1pha με τα γονίδια να φέρουν τα ενδογενή πεπτιδία σινιάλα. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας φέρει στο 3' άκρο του ουρά έξι ιστιδινών και στο 5' άκρο βρίσκεται ο a-factor που είναι υπεύθυνος για την έκκριση των πρωτεϊνών μέσω του πεπτιδίου οδηγού που περιέχει.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12 ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΤΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

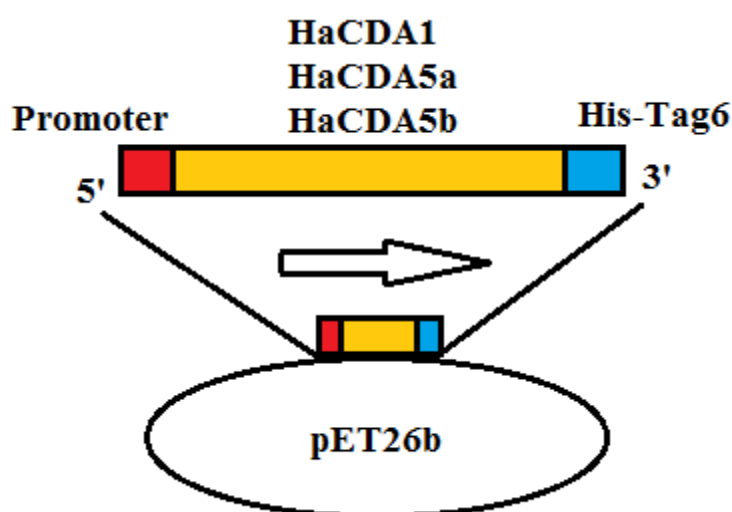
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ
pET26bCDA1wSP	Τα πλήρη γονίδια	<i>Escherichia coli</i> BL21
pET26bCDA5awSP	HaCDA1, HaCDA5a,	(DE3) pLysS
pET26bCDA5bwSP	HaCDA5b με ουρά	
	ιστιδινών κλωνοποιημένα	<i>Escherichia coli</i> BL21 star
	στον pET26b	(DE3) pLysS
	HaCDA1:1-23 πεπτιδίο	
	σινιάλο	<i>Escherichia coli</i> BL21
	HaCDA5a:1-17 πεπτιδίο	Codon Plus (DE3) RipL
	σινιάλο	
	HaCDA5b: 1-16 πεπτιδίο	
	σινιάλο	<i>Escherichia coli</i> C43
		(DE3)
		<i>Escherichia coli</i> NEB
		SHUFFLE (DE3)
		<i>Escherichia coli</i> BL21 star
		(DE3) PG-KJE8 BL21

pET26bCDA1w/oSP	Τα γονίδια hacda1,	Escherichia coli BL21
pET26bCDA5aw/oSP	hacda5a, hacda5b	(DE3) pLysS
pET26bCDA5bw/oSP	με ουρά ιστιδινών χωρίς το πεπτίδιο σινιάλο κλωνοποιημένα στον pET26b	Escherichia coli BL21 star (DE3) pLysS Escherichia coli BL21 Codon Plus (DE3) RipL Escherichia coli C43 (DE3) Escherichia coli NEB SHUFFLE (DE3) Escherichia coli BL21 star (DE3) PG-KJE8 BL21

pPICZalphaCDA1	Έκφραση σε Pichia Στέλεχος X33 Pastoris
pPICZalphaCDA5a	
pPICZalphaCDA5b	

4.4 Παραγωγή των HaCDAs σε κύτταρα *E.coli*

Βασική προϋπόθεση για τη μελέτη της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης καθώς και της επίλυσης της δομής της είναι η παραγωγή της σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά στα οποία παράγεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων HaCDAs στον πλασμιδιακό φορέα pET26b (Εικόνα 10) και έκφραση σε κύτταρα *E. coli*.



Εικόνα 10 Οι πλασμιδιακές κατασκευές που φτιάχτηκαν με σκοπό την έκφραση των πρωτεϊνών στον πλασμιδιακό φορέα pET26b με πεπτίδιο οδηγό και χωρίς

Τα γονίδια HaCDAs απομονώθηκαν από το cDNA βιβλιοθήκη μέσω αντίδρασης PCR. Ακολούθησε η τροποποίηση του πλασμιδιακού φορέα pET26b με σκοπό τη δημιουργία συμβατών άκρων έτσι ώστε να ενσωματωθεί το γονίδιο μέσω αντίδρασης συγκόλλησης και να τοποθετηθεί κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του T₇ *lac* υποκινητή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων BL21 (DE3) pLys με την πλασμιδιακή κατασκευή και η επαγωγή της έκφρασης επετεύχθη με την προσθήκη IPTG.

Στα πρωταρχικά πειράματα της εργασίας αυτής έλαβε χώρα η κλωνοποίηση των τριών απακετυλασών στόχων με πεπτίδιο σινιάλο και χωρίς (έξι κατασκευές) στον πλασμιδιακό φορέα p_{et26b}. Στην προσπάθεια έκφρασης των πρωτεϊνών στόχων στο βακτήριο *E.coli* μία σειρά στελεχών που το καθένα συγκεντρώνει διαφορετικά χαρακτηριστικά δοκιμάστηκαν :

- BL21 (DE3) pLysS. Χαρακτηριστικό αυτής της κυτταρικής σειράς είναι το πλασμίδιο pLysS που φέρει το γονίδιο για την T7 λυσοζύμη.
- BL21 star PlysS. Σε αυτή την κυτταρική σειρά υπάρχει μια μεταλλαγή στο γονίδιο της RNase E που ενισχύει τη σταθερότητα του mRNA και δεν υπάρχει αποικοδόμησή του.
- BL21 codon plus (DE3). Σε αυτή τη σειρά υπάρχουν παραπάνω αντίγραφα γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNAs. Αναγνωρίζουν λοιπόν περισσότερα κωδικόνια που δεν ανήκουν στο ίδιο το *E.coli* και ανήκουν σε άλλους οργανισμούς για να επιτευχθεί η ετερόλογη έκφραση.
- Shuffle (DE3). Τα κύτταρα αυτά υπερεκφράζουν κυτταροπλασματικά τη πρωτεΐνη DsbC. Πρόκειται για μια ισομεράση δισουλφιδικών δεσμών που βοηθάει στην καλύτερη αναδίπλωση πρωτεϊνών που φέρουν κυστεΐνες στην αλληλουχία τους.
- PG-KJE8 BL21 (DE3). Χαρακτηριστικό αυτής της κυτταρικής σειράς είναι η έκφραση σαπερονών με σκοπό την καλύτερη αναδίπλωση των ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών.

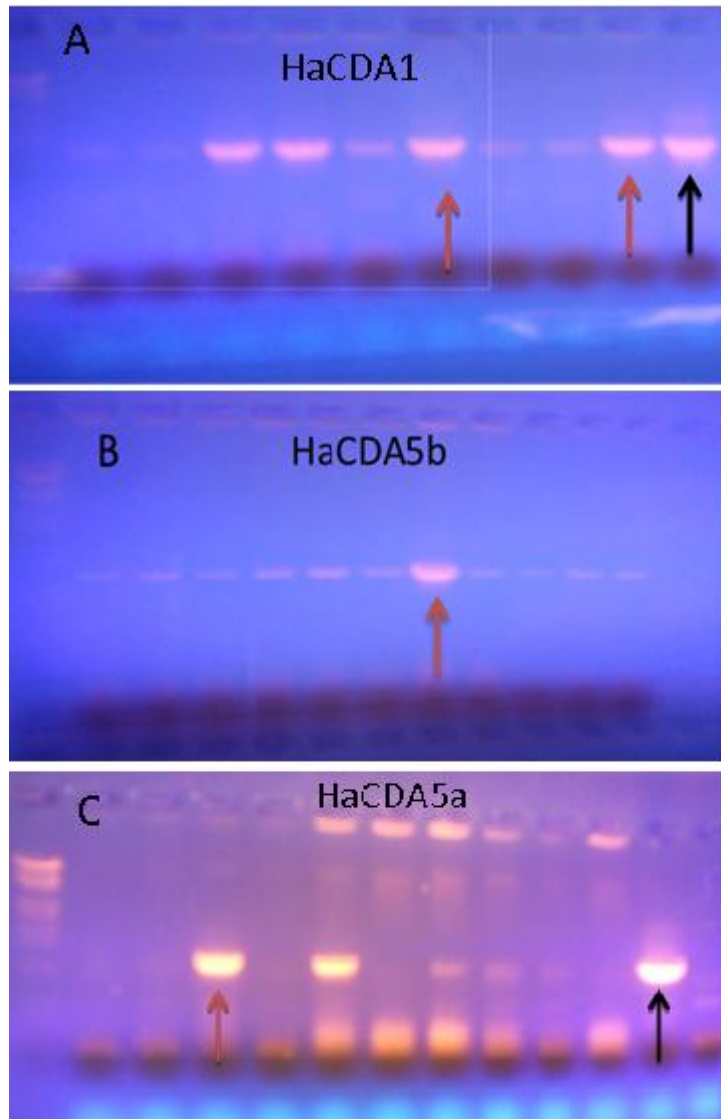
Τα γονίδια που προέκυψαν από την αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) φαίνεται πως βρίσκοντα στο σωστό και αναμενόμενο μοριακό βάρος.

Για την *hacda1* αντιστοιχεί η ζώνη στα 1626bp περίπου, για την *hacda5a* η ζώνη στα 1173bp και για την *hacda5b* η ζώνη στα HaCDA5b (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 PCR για την απομόνωση των γονιδίων στόχων

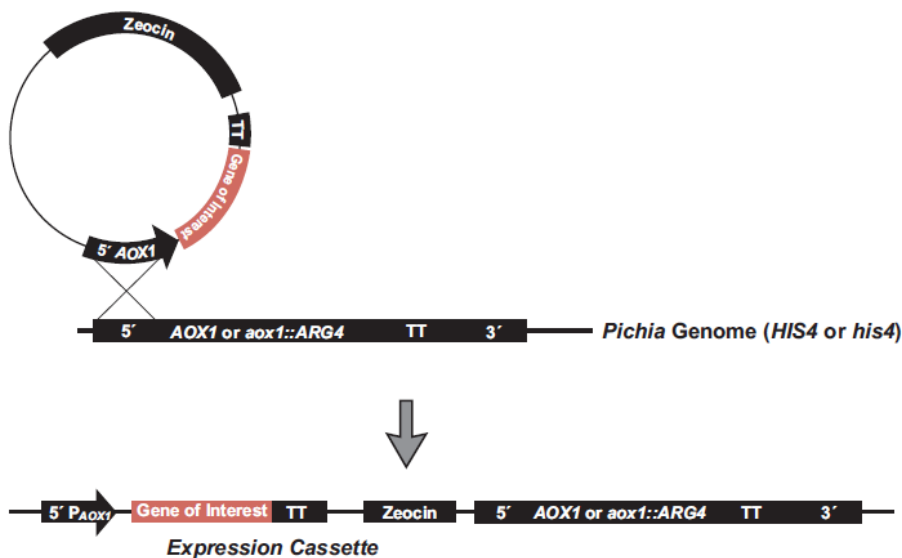
Ακολούθησε πέψη στα γονίδια και στον πλασμιδιακό φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI* και *NdeI*, αντίδραση συγκόλλησης και μετασχηματισμός της κατασκευής σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος με PCR για την εύρεση θετικών κλώνων που θα χρησιμοποιούνταν για την προσπάθεια έκφρασής τους (Εικόνα 12 A, B, C).



Εικόνα 12 Στις παραπάνω εικόνες βλέπουμε με το κόκκινο βέλος τις θετικές αποικίες από τον χημικό μετασχηματισμό ύστερα από PCR και με μαύρο βέλος έχουμε το θετικό control.

Στην προσπάθεια εύρεσης σχήματος απομόνωσης των HaCDAs μια σειρά χρωματογραφικών προσροφητών δοκιμάστηκαν, που είχαν ως στόχο την πλήρη διερεύνηση και κατανόηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του ενζύμου. Έτσι, δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες, διάφοροι προσροφητές στην προσπάθεια απομόνωσης του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος. Δεν παρατείθονται τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης γιατί σε όσες περιπτώσεις ήταν ορατή πρωτεϊνική ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, ήταν αμιδρή (δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα).

4.5 Κλωνοποίηση των γονιδίων hacda1, hacda5a, hacda5b στο στέλεχος X33, *P.pastoris*



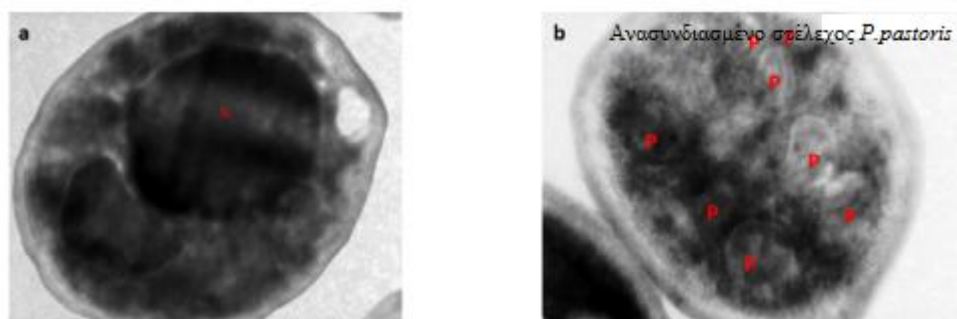
Εικόνα 1 3 Μονός ανασυνδιασμός στο γένωμα του οργανισμού για το επιθυμητό γονίδιο

Λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών στα κύτταρα *E.coli*, ακολούθησε έκφραση τους σε έναν ευκαρυωτικό οργανισμό, στη μεθυλότροφη ζύμη *P.pastoris*. Τα γονίδια hacdas απομονώθηκαν από το cDNA βιβλιοθήκη μέσω αντίδρασης PCR. Ακολούθησε η τροποποίηση του πλασμιδιακού φορέα pPICZalpha με σκοπό τη δημιουργία συμβατών άκρων έτσι ώστε να ενσωματωθεί το γονίδιο μέσω αντίδρασης συγκόλλησης. Οι κατασκευές ενσωματώθηκαν στο γένωμα του στελέχους X33 της *P.pastoris* μέσω μετασχηματισμού και η επαγωγή της έκφρασης έγινε με μεθανόλη.

Μετά την ένθεση και κλωνοποίηση της ετερόλογης αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα (pPICZalpha) πραγματοποιείται γραμμικοποίησή του με πέψη από περιοριστικά ένζυμα που τέμνουν το πλασμίδιο σε ειδική θέση, η οποία εντοπίζεται ενδιάμεσα στην αλληλουχία του υποκινητή AOX1. Έπειτα, ακολουθεί ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *P.pastoris*, προς την παραγωγή τροποποιημένων, γενετικά σταθερών στελεχών που εκφράζουν την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη. Η αλληλουχία του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου ενσωματώνεται με

ομόλογο ανασυνδιασμό στην αλληλουχία του υποκινητή AOX1 του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (Εικόνα 13). Τα ανασυνδυασμένα στελέχη είναι ικανά να παράγουν μεγάλες ποσότητες της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης, ενώ μπορούν να αναπτύσσονται σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης καθώς η αλκοολική οξειδάση παράγεται από αμφότερα τα γονίδια AOX1 και AOX2. Τα στελέχη συτά εμφανίζουν φαινότυπο Mut⁺(Methanol utilization plus).

Στα πλαίσια βελτιστοποίησης της μεθόδου έκφρασης των πρωτεϊνών δοκιμάτηκε μια σειρά θρεπτικών υλικών (MM, BMM, BMMY). Με βάση την καλύτερη απόδοση και ενεργότητα σε ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το θρεπτικό BMMY είναι το βέλτιστο. Όπως αναφέρεται και στο kit της Invitrogen το θρεπτικό αυτό ευνοεί την έκφραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών και επίσης μειώνει και την δράση πρωτεασών η επαγωγή γίνεται μέσω μεθανόλης και ο καταβολισμός της λαμβάνει χώρα στα περιξοσώματα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε την ανάπτυξη του στελέχους X33 στο θρεπτικό BMMY. Στην αριστερή εικόνα έχουμε το X33 αγρίου τύπου και δεξιά το X33 που έχει γίνει επαγωγή με μεθανόλη. Η διαφορά των στελεχών παρατηρείται με κόκκινο που παρουσιάζονται τα περιξοσώματα στα οποία γίνεται ο καταβολισμός της μεθανόλης.

4.6 Έκφραση και μερικός καθαρισμός της πρωτεΐνης HaCDA1 στο στέλεχος X33, *P.pastoris*

Η βάση της χρήσης του μικροοργανισμού *P.pastoris* ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών, έγκειται στο γεγονός ότι ο μικροοργανισμός εξαναγκάζεται να παράγει μεγάλες ποσότητες του ενζύμου αλκοολική οξειδάση (AOX), όταν αναπτύσσεται σε περιβάλλον που περιέχει μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα, λόγω της χαμηλής συγγένειας της αλκοολικής οξειδάσης με το μοριακό οξυγόνο. Το γονίδιο AOX1 και η έκφρασή του επάγεται από την παρουσία μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο. Συνεπώς, η εισαγωγή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί κάποια πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο αυτού του υποκινητή, επιτρέπει την ελεγχόμενη έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ανέρχεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, ακόμη και αν εισαχθεί μόνο ένα αντίγραφο της ετερόλογης αλληλουχίας. Επιπρόσθετα, καθώς η έκφραση του γονιδίου καταστέλλεται παρουσία γλυκερόλης ή γλυκόζης, ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες επιλογής στελεχών με μη επιθυμητές μεταλλάξεις κατά την παραγωγή βιομάζας.

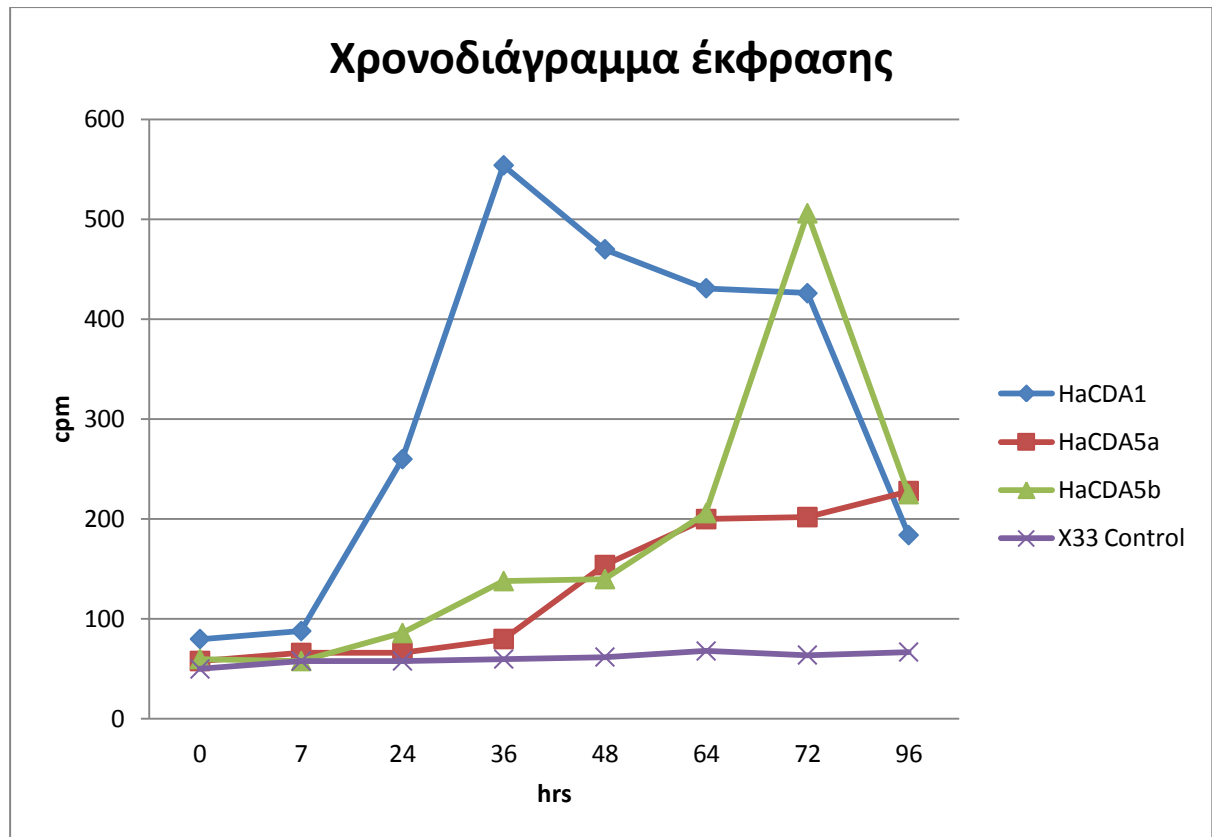
Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων από τα μετασηματισμένα στελέχη X33, τα κύτταρα αναπύχθηκαν σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας όγκου 100 ml. Αρχικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με γλυκερόλη ως κύρια πηγή άνθρακα (Buffered Complex Glycerol Medium, BMGY). Η παρουσία γλυκερόλης καταστέλλει τη δράση του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης, AOX1 και συνεπώς την ανάπτυξη του γονιδίου, ωστόσο ευνοεί την ανάπτυξη της βιομάζας. Μετά από επώαση 24 ωρών, ελήφθη κατάλληλος όγκος προκαλλιέργειας τέτοιος ώστε μετά από φυγοκέντρηση και επανααιώρηση των συλλεχθέντων κυττάρων σε 100 ml BMMY (Buffered Complex Methanol Medium) το εναιώρημα που προέκυψε είχε οπτική πυκνότητα ίση με τη μονάδα. Η παρουσία της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο επάγει την έκφραση των γονιδίων τα οποία έχουν τεθεί υπό τον έλεγχο του υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης AOX1. Η καλλιέργεια επώαστηκε για πέντε μέρες. Ανά διάστημα 24 ωρών πραγματοποιούνταν προσθήκη μεθανόλης και λαμβανόταν δείγμα. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η ενεργότητα για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών τόσο στο υπερκείμενο όσο και στην πελλέτα.

Ο πίνακας 13 που είναι αποτέλεσμα της μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας με υπόστρωμα ραδιοσημασμένη γλυκόλ-χιτίνη κατά τη διάρκεια της έκφρασης των HaCDAs κατά τη διάρκεια 5 ημερών. Για την HaCDA1 μέγιστη τιμή είναι 554cpm (counts per minute) κατά την διάρκεια της δεύτερης ημέρας. Για την HaCDA5a η μέγιστη τιμή είναι 228 cpm κατά το τέλος της τέταρτης ημέρας και για την HaCDA5b η τιμή 506 cpm αντιστοιχεί στην τρίτη ημέρα. (Πίνακας 13, εικόνα 15).

Ενζυμική αντίδραση σε ραδιενεργό υπόστρωμα γλυκόλ-χιτίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΡΟΥΣΕΩΝ cpm

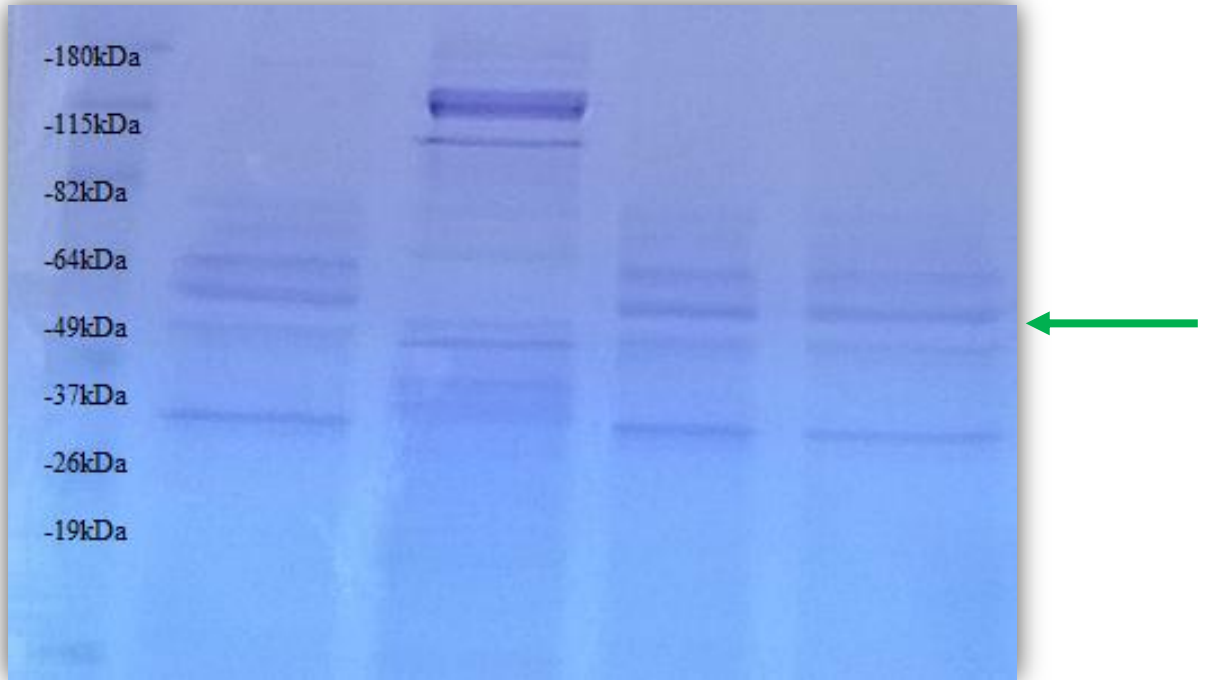
ΩΡΕΣ	HaCDA1	HaCDA5a	HaCDA5b	X33 Control
0	80	58	60	50
7	88	66	58	58
24	260	66	86	58
36	554	80	138	60
48	470	154	140	62
64	431	200	206	68
72	426	202	506	64
96	184	228	225	67



Εικόνα 15 Χρονοδιάγραμμα έκφρασης μέσω ενζυμικής αντίδρασης σε ραδιοσημασμένο υπόστρωμα γλυκολ-χιτίνης (5 μέρες καλλιέργεια)

Η προσπάθεια καθαρισμού των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών όπως η χρωματογραφία συγγένειας (νικελίου και σφαιρίδια χιτίνης), ιοτοαναταλλαγής και υδρόφοβης. Από τις παραπάνω προσεγγίσεις για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών η χρωματογραφία ιοντοαναταλλαγής με προσροφητή Source Q Sepharose έδειξε το καλύτερο αποτέλεσμα (Εικόνα 16).

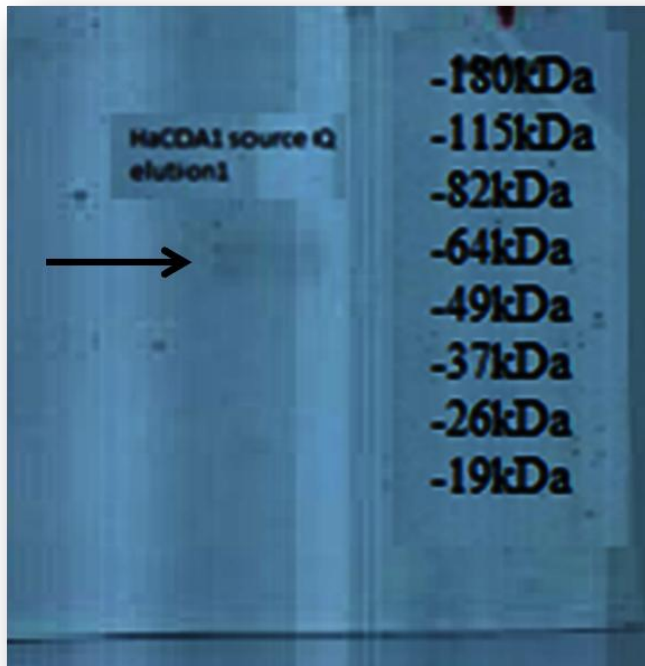
ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΝΕΚΡΟΣ ΟΓΚΟΣ	ΕΚΛΟΥΣΗ 1 (0-10 ml) source Q	ΕΚΛΟΥΣΗ 2(10-20ml) source Q
-------------------------------	-----------	--------------	------------------------------------	-----------------------------------



Εικόνα 16 :Source Q sepharose HaCDA1 , αποδιατακτικό μέσω πολυακρυλαμίδης που παρουσιάζεται η προσπάθεια απομόνωσης της πρωτεΐνης HaCDA1 μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται οι πρωτεϊνικοί μάρτυρες, στο δεύτερο είναι το δείγμα που φορτώθηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας το οποίο είχε συγκεντρωθεί κατάλληλα, στο τρίτο είναι ο νεκρός όγκος (void volume) που πέρα σε ότι δεν κράτησε η η στήλη χρωματογραφίας Q από το δείγμα που φορτώθηκε και στο τέταρτο και πέμπτο πηγάδι είναι οι εκλούσεις στα 300mM NaCl που έλαβαν χώρα.

Ακολούθησε και western blot ανάλυση της HaCDA1:

Και οι τρεις πρωτεΐνες στόχοι έχουν κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει στο 3' άκρο του ουρά έξι ιστιδινών. Μέσω κατάλληλων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την ουρά των ιστιδινών σε ανάλυση κατά western εμφανίστηκε η παρακάτω ζώνη (Εικόνα 17).



Εικόνα 17 Western blot HaCDA1. Στα αριστερά φαίνεται η ζώνη της HaCDA1 που τρέχει 61 kDa και φέρει την ουρά 6 ιστιδινών στο 3' άκρο της.

Δεν παρατείνονται τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης και αναλύσεις κατά western για τις άλλες δύο πρωτεΐνες, γιατί σε όσες περιπτώσεις υπήρξε ζώνη που αντιστοιχούσε στο προβλεπόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ήταν αμυδρή (δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα). Πιθανόν να είναι γλυκοπρωτεΐνες και να μην παρουσιάζονται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος λόγω των N και O γλυκοζυλιώσεων που μπορεί να έχουν λάβει χώρα.

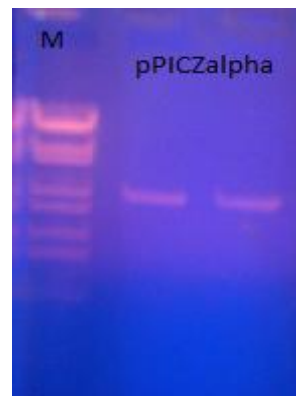
4.7 Κλωνοποίηση των hacdas και έκφραση στο στέλεχος X33, *P.pastoris* (με βελτιστοποιημένα γονίδια)

Λόγω εκ νέου χαμηλού επίπεδου έκφρασης των πρωτεϊνών της μελέτης αυτής, έγινε προσπάθεια μέσω της εταιρίας Genescript για βελτιστοποίηση των τριών γονιδίων με απώτερο σκοπό την περαιτέρω έκφραση τους. Τα γονίδια επεξεργάστηκαν και άλλαξε σε μεγάλο ποσοστό η αλληλουχία τους, διαμορφώνοντας τα κωδικόνια (codon usage), το περιεχόμενο σε νουκλεοτίδια G και C, τις CpG νησίδες, αλλάζοντας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και πιθανές θέσεις περιορισμού που αποτρέπουν την κλωνοποίηση των συγκεκριμένων αλληλουχιών.

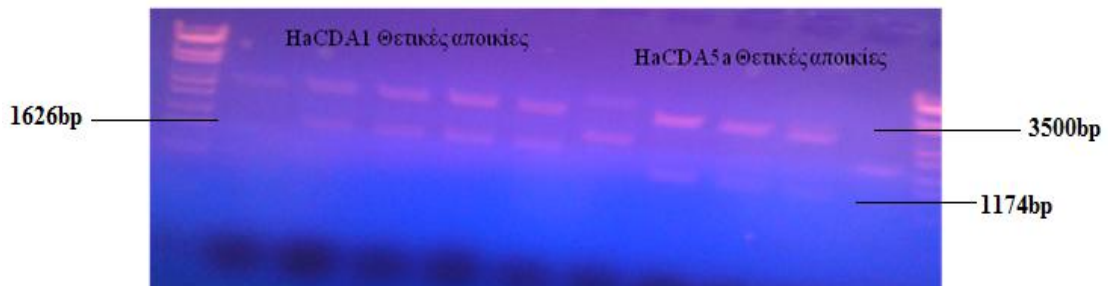
Τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν σε ένα νέο πλασμιδιακό φορέα, τον pUC57,amp^R και από εκεί και πέρα υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα κατάλληλο για την έκφραση στην *P.pastoris* τον pPICAZalpha, zco^R. Ο πρώτος φορέας έφερε θέσεις περιορισμού EcoRI στο 5' άκρο και NotI στο 3' άκρο και ενδιάμεσά τους ήταν ενσωματωμένα τα γονίδια. Με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα έγινε πέψη και του πλασμιδιακού φορέα pPICAZalpha και στη συνέχεια ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης. Οι νέες κατασκευές ελέγχθηκαν μέσω PCR και πέψεις για να δειχθεί η παρουσία των γονιδίων μέσα στο γένωμα της *P.pastoris* (Εικόνες 18, 19, 20).



Εικόνα 18 Πέψεις pUC57 με EcoRI και NotI. Οι πάνω ζώνες δείχνουν τον πλασμιδιακό φορέα pUC57 και οι κάτω τα δύο γονίδια στο σωστό μοριακό βάρος (~1626 και ~1173)



Εικόνα 19 Πέψεις pPICZalpha με EcoRI και NotI



Εικόνα 20 θετικές αποικίες αντίδρασης συγκόλλησης μέσω PCR και πέψεων

Μετά την εύρεση θετικά μετασηματισμένων κλώνων ακολούθησε μετασηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του στελέχους X33 και οι κλώνοι θα δοκιμαστούν σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας για περαιτέρω έλεγχο της έκφρασής τους.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

5.1 Συζήτηση

Το γονιδίωμα της *H. armigera* περιέχει τρία γονίδια ομόλογα με CDAs (HaCDA1, HaCDA5a, HaCDA5b). Τα γονίδια ανήκουν σε δύο διαφορετικές τάξεις (I, V) με διαφορετική οργάνωση πρωτεϊνικών περιοχών (Jakubowska et al, 2010). Με βάση τη βιβλιογραφία (Campbell et al. 2008), αλλά και πειράματα στα συγκεκριμένα γονίδια στο εργαστήριο της Μοριακής Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι CDA κλάσης I (και II) εκφράζονται πιθανώς κατά τη μεταμόρφωση στην επιδερμίδα και σε σχετιζόμενους ιστούς (τραχείες στη *Drosophila*), πιθανώς κατά τη μεταμόρφωση και οι πρωτεΐνες του κλάσης V CDA εκφράζονται στο μεσέντερο και εκκρίνονται στην PM, πιθανώς κατά τα στάδια της προνύμφης όπου το έντομο τρέφεται. Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα μιας ευρύτερης έρευνας η οποία περιλαμβάνει αφενός την αποσιώπηση αφενός των γονιδίων αυτών στο ίδιο το έντομο και αφετέρου την ετερόλογη έκφρασή τους σε άλλο οργανισμό για το βιοχημικό τους χαρακτηρισμό και την κρυσταλλογραφική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Με βάση τις κρυσταλλογραφικές τους δομές θα σχεδιαστούν ειδικοί αναστολείς με προοπτική ανάπτυξης νέων εντομοκτόνων. Αυτό θα εξαρτηθεί από παράλληλα πειράματα που λαμβάνουν χώρα στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας σχετικά με την αποσιώπηση των συγκεκριμένων γονιδίων. Με βάση τα πρότυπα της RNAi σίγησης θα εστιαστεί και η προσοχή στα αντίστοιχα γονίδια για την κατασκευή ενώσεων αναστολεών.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά έγιναν προσπάθειες για την ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών στον οργανισμό *E.coli*. Το *E.coli* συγκεντρώνει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως απλές πλασμιδιακές κατασκευές, υψηλό ρυθμό ανάπτυξης φθηνά θρεπτικά υλικά. Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν επιθυμητά μιας και δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική ενεργότητα σε καμία πρωτεΐνη και η έκφρασή τους στον συγκεκριμένο οργανισμό δεν ήταν εφικτή. Η δυσκολία αυτή μπορεί να εξηγηθεί στο ότι είναι δύσκολη η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών ευκαρυωτικού οργανισμού σε προκαρυωτικό (βακτήρια *E.coli*). Πολλές φορές η έκφραση σε κύτταρα *E.coli*

δίνει προϊόντα ανενεργά ιδιαίτερα όταν πρόκειται για πρωτεΐνες ευκαρυωτικής προέλευσης. Τότε προτιμάται η έκφραση σε άλλα ετερόλογα συστήματα έκφρασης όπως οι μύκητες στους οποίους υπάρχει δυνατότητα μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που απουσιάζει από το βακτήριο *E.coli*.

Στη συνέχεια, η ετερόλογη έκφραση έλαβε χώρα σε έναν ευκαρυωτικό οργανισμό. Το σύστημα που επιλέχθηκε για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ήταν αυτό του ασκομύκητα *Pichia pastoris*. Η επιλογή αυτή, βασίστηκε στην ικανότητα του συστήματος να συνδυάζει χαρακτηριστικά των ανωτέρων και κατωτέρων συστημάτων έκφρασης. Σε αυτά συγκαταλέγονται η ικανότητα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με σωστή διαμόρφωση και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις -χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών-, καθώς και η εύκολη, γρήγορη και οικονομική χρήση -χαρακτηριστικά κατώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως αυτό του *E.coli*. Η συγκεκριμένη προσπάθεια για ετερόλογη έκφραση σε αυτόν τον οργανισμό ήταν πιο επιτυχημένη καθώς ανιχνεύθηκε ενζυμική ενεργότητα κατά τα στάδια έκφρασής τους. Λόγω του πεπτιδίου σινιάλου που φέρει ο φορέας που έγινε η κλωνοποίηση των γονιδίων, οι πρωτεΐνες είναι εκκρινόμενες και η προσπάθεια για απομόνωσή τους έγινε από το υπερκείμενο. Προσπάθειες και έλεγχος των πελλετών έγινε, αλλά ενεργότητα ή πρωτεΐνη δεν ήταν εμφανής σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ανάλυση κατά western έδειξε την ύπαρξη των πρωτεϊνών που φέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο τις έξι ιστιδίνες. Επιπρόσθετα, επιτεύχθηκε μερικός καθαρισμός της HaCDA1 με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των επιπέδων έκφρασης στην *P.pastoris*, τα γονίδια συντέθηκαν από την εταιρία Genescript. Μέσω της σύνθεσης πραγματοποιείται μια σειρά βελτιστοποιήσεων σε παραμέτρους που έχουν σχέση με τη μεταγραφή, την μετάφραση και την σωστή ανδίπλωση. Μερικά από τα σημεία όπου επικεντρώνεται η βελτιστοποίηση είναι: η συγκέντρωση των βάσεων CG, η συχνότητα χρήσης κωδικώνιων (codon usage) και η δευτεροταγής δομή του mRNA. Τα νεοσυνθετιμένα γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιακό φορέα pPICAZalpha και οι νέες κατασκευές ενσωματώθηκαν στο γένωμα του στελέχους X33. Στην παρούσα φάση γίνονται πειράματα ταυτοποίησης μετασχηματισμένων κλώνων με στόχο την έκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

5.2 Προοπτικές

Μετά την ταυτοποίηση στελεχών *P.pastoris* που φέρουν τα νεοσυντιθέμενα γονίδια θα ακολουθήσουν δοκιμές σχημάτων υπερέκφρασης σε διάφορα θρεπτικά (MM, BMM, BMMY), σε διαφορετικές θερμοκρασίες (16-30 °C). Τυχόν θετικά αποτελέσματα θα οδηγήσουν στο σχεδιασμό σχημάτων απομόνωσης των ενζύμων με τη χρήση διάφορων χρωματογραφικών τεχνικών (χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, συγγένειας, υδρόφοβη, μοριακής διήθησης).

Ένα μεγάλο πρόβλημα που πρέπει να επισημανθεί είναι η παρουσία του μεγάλου αριθμού των κυστεϊνών και στις τρεις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί που μπορούν να προκύψουν αποτελούν πιθανό εμπόδιο στη σωστή αναδίπλωση και συνεπώς στα επίπεδα έκφρασης και την ενεργότητα που προκύπτουν. Μία προσέγγιση που μπορεί να εφαρμοστεί είναι αυτή που περιγράφεται από τους Mehmet Inan., et al, 2005. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε βελτίωση στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στόχου συνεκφράζοντας στην *P.pastoris* μια ισομεράση δισουλφιδικών δεσμών (PDI) από τον ίδιο τον οργανισμό. Η ισομεράση PDI είναι μια 57 kDa πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου της *P.pastoris* που βοηθά στην αναδιάταξη των των ακατάλληλων δισουλφιδικών ζευγαρωμάτων.

Εναλλακτικά μπορεί να γίνει δοκιμή έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών σε ένα άλλο σύστημα έκφρασης όπως είναι ο βακουλοϊός (*Baculovirus*). Επισημάνεται ότι σε αυτό το σύστημα η τελική παραγωγή πρωτεΐνης επιτυγχάνεται από κυτταρικές σειρές εντόμων και ειδικότερα λεπιδοπτέρων (όπως SF9). Μιας και οι πρωτεΐνες στόχοι προέρχονται από λεπιδόπτερο το συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα (κοινή χρήση κωδικονίων (codon usage) και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις). Το σύστημα έκφρασης βακουλλοϊού φορέα (*Baculovirus*, Expression System, BEVS) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή υψηλών επιπέδων (μέχρι 1000 mg / mL) ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Το BEVS βασίζεται στην εισαγωγή ενός ξένου γονιδίου σε μη-ουσιώδη για την ιική αντιγραφή περιοχή γονιδιώματος μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με ένα φορέα μεταφοράς που περιέχει το γονίδιο-στόχο. Ο προκύπτον ανασυνδυασμένος ραβδοϊός στερείται ένα από τα μη αναγκαία γονίδια που αντικαθίσταται με το ξένο γονίδιο που

κωδικοποιεί ετερόλογη πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να εκφράζεται σε καλλιεργημένα κύτταρα εντόμου και προνύμφες εντόμων.

Αρκετά χαρακτηριστικά καθιστούν το σύστημα βακουλιοΐού ως ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα:

- Υψηλά επίπεδα ετερόλογης γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνονται συχνά σε σύγκριση με άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, ιδιαίτερα για ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Σε πολλές περιπτώσεις, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες είναι διαλυτές, μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες και εύκολα ανακτώνται από μολυσμένα κύτταρα.
- Τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για πολλαπλασιασμό AcMNPV αναπτύσσονται καλά σε καλλιέργειες εναιωρήματος, η οποία επιτρέπει την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βιοαντιδραστήρες ευρείας κλίμακας.
- Έκφραση πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί με την ταυτόχρονη μόλυνση κυττάρων με δύο ή περισσότερους ιούς ή μολύνοντας τα κύτταρα με ανασυνδυασμένους ιούς που περιέχουν δύο ή περισσότερες κασέτες έκφρασης.
- Βακουλιοΐοί έχουν ένα περιορισμένο εύρος ξενιστών, περιορίζεται σε συγκεκριμένα είδη ασπόνδυλων (δεδομένου ότι είναι μη μολυσματικοί για τα σπονδυλωτά).

Απώτερος σκοπός της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών είναι η δυνατότητα για βιοχημικό χαρακτηρισμό τους την περαιτέρω μελέτη τους, έτσι ώστε να ακολουθήσει η κρυσταλλογραφική τους ανάλυση. Τυχόν επίλυση της δομής τους θα είναι καθοριστικό βήμα στην εύρεση ενώσεων-αναστολέων ενάντια στα ένζυμα στόχους και στη συνέχεια για την ανάπτυξη έντομο-κατασταλτικών ενώσεων

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agata K. Jakubowska, Silvia Caccia, Karl H. Gordon, Juan Ferre and Salvador Herrero, (2010). Downregulation of a Chitin Deacetylase-Like Protein in Response to Baculovirus Infection and Its Application for Improving Baculovirus Infectivity, *JOURNAL OF VIROLOGY*, Vol. 84, p. 2547–2555.
- Arakane, Y, Dixit, R., Begum, K.; Park, Y.; Specht, C.A.; Merzendorfer, H.; Kramer, K.J. Muthukrishnan and S. Beeman, R.W, (2009). Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol.*, 39, 355–365.
- Arnó, J, Gabarra, R., Liu, T.-X., Simmons, A., and Gerling, D, (2010). Natural Enemies of *Bemisia tabaci*: Predators and Parasitoids. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, eds. (Springer Netherlands), pp. 385-421.
- Arnó J, Castañé C, Riudavets J and Gabarra R, (2010). Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). *Bull Entomol Res.* Feb;100(1):105-15.
- A.R. Ferreira, F. Ataí De, M. von Stosch, J. M. L. Dias, J. J. Clemente, A. E. Cunha, R. Oliveira, (2012). Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv), *Bioprocess Biosyst Eng* DOI 10.1007/s00449-012-0751-z.
- Bartnicki-Garcia, S (1989). The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. *Chitin and chitosan*, Skjak-Braek G, Anthosen, T. and Sandford, P.eds, (Elsevier, Essex) pp.23-35.

- Birgit Hobl, Björn Hock, Sandra Schneck, Reinhard Fischer, Matthias Mack, (2013). Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* Nov;92(1):100-4. doi: 10.1016/j.pep.2013.09.004.

- Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KH, (2008). Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol*. Oct;38(10):950-8.

- Chandra, B.K.N and Rai, P.S, (1974). Two new ornamental host plants of *Heliothis armigera* Huebner in India. *Indian Journal of Horticulture*, 31(2): 198.

- Charles E, Bracker, Jose Ruiz- Herrerat and Solomon Bartnicki- Garcia, (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Cell biology*, vol 73, No 12: 4570-4574.

- Christodoulidou A, Bouriotis V, Thireos G, (1996). Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271:31420-31425.

- Cohen E: Chitin synthesis and inhibition: a revisit, (2001). *Pest Manag Sci* , 57:946-950.

- Cregg J, Keizer-Gunnink I, Sjollem K, Veenhuis M, Ab G, (1991). Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*. 21;291(2):299-302.

- David E. Blair, Alexander W. Schuttelkopf, James I. MacRae, and Daan M. F. van Aalten, (2005). Structure and metal dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. PNAS 102:43 15429-15434.

- Davis LL, Bartnicki-Garcia S, (1984). The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*). J Gen Microbiol, 130:2095-2102.

- Dongyang Liu, Ruifu Zhang, Xingming Yang, Zhenhua Zhang, Song Song, Youzhi Miao and Qirong Shen,(2012). Characterization of a thermostable b-glucosidase from *Aspergillus fumigates* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. Microb Cell Fact; 11: 25.

- Duran A, Bowers B and Cabib E, (1975). Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 72, 3952-3955.

- El Gueddari DE, Rauchhaus U, Moerschbacher B and Deising HB, (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. New Phytologist 156 (1):103-112.

- Feng Wang, Xiu-ying Li, Xue-mei Mo, Guang Zhang and Han-xiao Sun, (2013). A biologically active vMIP-II-IgG3-TfN fusion protein, secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 87 47–54.

- Gahukar, R.T,(2002). Population dynamics of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) on rose flowers in central India. Journal of Entomological Research, 26(4): 265-276 .

- Kakimoto, T., Fujisaki, K. and Miyatake, (2003). Egg laying preference, larval dispersion, and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 96(6): 793-798.
- Gao XD, Katsumoto T and Onodera K, (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J Biochem (Tokyo)*, 117:257-263.
- Guoxing Quan, Tim Ladd, Jun Duana, Fayuan Wen , Daniel Doucet, Michel Cusson and Peter J. Krell, (2013). Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: Stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43.
- James M. Cregg, Ilya Tolstorukov, Anasua Kusari, Jay Sunga, Knut Madden, and Thomas Chappell, (2009). Expression in the Yeast *Pichia pastoris*, *Methods in Enzymology*, Volume 463.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N. and Bouriotis, V,(1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 8005-8008.
- Luschnig, S., Batz, T., Armbruster, K., Krasnow, M.A, (2006). Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 16(2): 186--194.
- Mehmet Inan, Dinesh Aryasomayajula, Jayanta Sinha, Michael M. Meagher, (2005). Enhancement of Protein Secretion in *Pichia Pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, VOL. 93, NO. 4.

- Mendgen K, Hahn M and Deising H,(1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 34:367-386.
- Multani, J.S. and Sohi, A.S, (2002). *Helicoverpa armigera*(Hubner) on carnation, *Dianthus caryophyllus* Linn. in Punjab. *Insect-Environment*, 8(2): 82.
- Pingzuo Li Anukanth Anumanthan, Xiu-Gong Gao, Kuppusamy Ilangovan,Vincent V. Suzara, Nejat Düzgüne and V. Renugopalakrishnan, (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*,*Appl Biochem Biotechnol* 142:105–124 .
- Ping Wang, Guoxun Li and Robert R. Granados, (2004). Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni* : structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 215–227.
- Radhika Dixit , Yasuyuki Arakane, Charles A. Specht, Chad Richard, Karl J. Kramer,Richard W. Beeman and Subbaratnam Muthukrishna, (2007). Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2008) 440–451.
- Roberts, (1993). Proposals for a standard nomenclature for chitin and chitosan. *European Chitin Society Newsletter*, no 1.
- Ruiz-Herera J, Lopez-Romero E and Bartnicki-Garcia S, (1977). Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J.Biol.Chem*, 252, 3338-3343.

- Salma Abdelmoula-Souissi, Leila Rekik, Ali Gargouri and Raja Mokdad-Gargouri, (2007). High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* 54 283–288.
- Sue Macauley-Patrick,* Mariana L. Fazenda, Brian McNeil and Linda M. Harvey, (2005). Heterologous protein production using the *Pichia Pastoris* expression system, *Yeast* 22 : 249–270. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI:10.1002/yea.1208.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D and Bouriotis V, (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol*, 18:305-312.
- Tsigos I, Zydowicz N, Martinou A, Domard A, Bouriotis V (1999). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *Eur J Biochem*, 261:698-705.
- User Manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*, (2010). Cat. no. K1740-01Rev. Manual part no. 25-0172.
- Vander P, KM Vr, Domard A, Eddine El Gueddari N, Moerschbacher BM, (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol*, 118:1353-1359.
- V. Ghormade , S. Kulkarni, N. Doiphode , P.R. Rajamohan and M.V. Deshpande, (2010). Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. *Current Research, Technology*

and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 84:2547–2555.

- Wang, S, Jayaram, S.A, Hemphala, J, Senti, K.A., Tsarouhas, V., Jin, H., and Samakovlis, (2006). Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the *Drosophila* trachea. *Curr. Biol.* 16, 180–185.
- Wei Guo , Guoxun Li, Yi Pang, Ping Wang , (2005). A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 1224–1234.
- Wilson, T.G., and J.R. Cryan. 1997. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology* 278: 37-44
- Wright J. and Retnakaran, (1987). Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. ISBN 90- 6193-612-8.
- Xiao-Wu Zhong, Liping Zhang, Yong Zou, Qiying Yi, Ping Zhao , Qingyou Xia & Zhonghuai Xiang, (2012). Shotgun analysis on the peritrophic membrane of the silkworm *Bombyx mori*, State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, *BMB Rep.* 45(11): 665–67.
- Xiao-Wu Zhong , Xiao-Huan Wang , Xiang Tan , Qing-You Xia , Zhong-Huai Xiang and Ping Zhao , (2014). Identification and Molecular Characterization of a Chitin Deacetylase from *Bombyx mori* Peritrophic Membrane. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1946-1961.

- Yasuyuki Arakane , Radhika Dixit, Khurshida Begum, Yoonseong Park, Charles A. Specht, Hans Merzendorfer, Karl J. Kramer, Subbaratnam Muthukrishnan and Richard W. Beeman, (2009). Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum* *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 355–365.

- Yong Zhao, Ro-Dong Park and Riccardo A.A. Muzzarelli, (2010). Chitin Deacetylases: Properties and Applications, *Mar. Drugs* 8, 24-46; doi:10.3390/md8010024 .