

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Τομέας Βιοχημείας



Πτυχιακή Εργασία

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *RICHA PASTORIS* ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΓΛΥΚΙΑΣ ΓΕΥΣΗΣ**

Βουγιατζή Αικατερίνη Σταυρούλα (2495)

Επιβλέπων: Ιωάννης Παυλίδης, Επίκουρος καθηγητής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

Ευχαριστίες

Μετά το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έπειτα από δύο εξάμηνα εντατικής εργασίας και έρευνας στο εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του τομέα Βιοχημείας του τμήματος Χημείας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους στάθηκαν δίπλα μου προσφέροντας τη γνώση, τη μεθοδολογία ή και απλώς την στήριξη και την υπομονή τους.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ιωάννη Παυλίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η καθοδήγησή του και οι συμβουλές του αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα για την θεμελίωση και ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Η γνώση, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, ο τρόπος σκέψης και οργάνωσης πειραμάτων καθώς επίσης και η αντιμετώπιση προβλημάτων, καλλιεργήθηκαν μετά από εκπαίδευση την οποία δε θα μπορούσα να έχω ολοκληρώσει χωρίς τη βοήθεια των υποψηφίων διδασκόντων. Οφείλω, λοιπόν, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους επιβλέποντες μου υποψήφιους διδάκτορες, Νίκο Καλούδη και Βασίλη Τσοπανάκη, οι οποίοι διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην εκπόνηση αυτής της εργασίας αλλά και στην απόκτηση όλων αυτών των εφοδίων για την μελλοντική μου ερευνητική σταδιοδρομία. Φυσικά δε θα μπορούσαν να λείπουν τα μέλη του εργαστηρίου Ανδρονίκη Σπανού, Χαρά Αγγέλη, Μάνος Χατζάκης, Κλειώ Ευαγγελάτου και Χριστίνα Μιχαλοπούλου οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν και συνεισέφεραν με τον τρόπο τους δημιουργώντας ένα εύθυμο εργαστηριακό κλίμα. Ευχαριστώ επίσης τις δύο προπτυχιακές φοιτήτριες και φίλες Νεκταρία Χάιδω Λιακούλη και Τζέσι Μέρτικα που συμβαδίσαμε μαζί σε αυτή την εμπειρία. Επιπροσθέτως ένα θερμό ευχαριστώ στους καθηγητές και τα μέλη των εργαστηρίων αυτών κ. Τσιώτη , κ. Γανωτάκη και κ. Μόσχου για την παραχώρηση του χώρου και των υλικών, όπου αυτά απαιτούνταν.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους φίλους μου Μαριάννα Μελά, Κατερίνα Σπανού, Νικόλα Βιτσαξάκη, Νίκο Χατζάκη, Δημήτρη Παπακώστα και Γιάννη Σβολιαντόπουλο για την ψυχολογική υποστήριξη και την πίστη τους σε εμένα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς όλη αυτή η προσπάθεια θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί χωρίς τη στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους.

Περίληψη

Ένα από τα δημοφιλέστερα συστήματα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών είναι ο μεθυλότροφος ζυμομύκητας *Pichia pastoris*. Αξιοποιώντας το μεταβολικό μονοπάτι της ζύμης για το μεταβολισμό της μεθανόλης (Methanol Utilization pathway, MUt), και συγκεκριμένα την ιδιότητα του προαγωγέα του ενζύμου της οξειδάσης της αλκοόλης (AOX) να ενεργοποιείται μόνο όταν η μεθανόλη βρίσκεται στο περιβάλλον του κυττάρου, μπορεί να πραγματοποιηθεί η αυστηρά ρυθμιζόμενη από μεθανόλη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών. Όντας ευκαρυωτικός μικροοργανισμός, η *P. pastoris* προσφέρει ένα πιο σύνθετο σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών, σε σχέση με βακτηριακούς ξενιστές όπως το *E. coli*, ενώ παράλληλα όντας ζύμη, είναι πιο φθινό και λιγότερο χρονοβόρο σύστημα από κύτταρα θηλαστικών.

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια ετερόλογης έκφρασης πέντε υποθετικών και δύο γνωστών γλυκών πρωτεϊνών σε σύστημα *P. pastoris*. Το πρώτο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός τους στελέχους GS115 της ζύμης με γραμμικό πλασμιδιακό φορέα pPIC9K. Στα επόμενα βήματα, προσδιορίστηκε ο φαινότυπος MUt^s ή MUt⁺ των αποικιών μέσω πειραμάτων ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεές καλλιέργειες υπό συγκεκριμένες συνθήκες, αλλά και ο γονότυπός τους, μέσω ανίχνευσης των επιθυμητών γονιδίων στο γονιδίωμα της ζύμης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τέλος, παρασκευάστηκαν καλλιέργειες με στόχο την έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος και έγιναν προσπάθειες απομόνωσής τους μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Μέσω της τεχνικής ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), παρατηρήθηκε η έκφραση των δύο πρωτεϊνών Mab II και MNEI, αλλά σε πολύ χαμηλές αποδόσεις.

Abstract

One of the most popular heterologous protein expression systems is the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Using the yeast metabolic pathway for the utilization of methanol (Methanol Utilization pathway, M_Ut), and specifically the characteristic of the alcohol oxidase (AOX) promoter being activated only when methanol is present in the environment of the cells, the tightly controlled expression of heterologous proteins can take place. Being a eukaryotic microorganism, *P. pastoris* offers a more complex protein expression system than bacterial hosts, such as *E. coli*, while being a yeast, it is a cheaper and less time-consuming system than mammalian cells.

The objective of this project was the preparation of *Pichia pastoris* strains for the heterologous expression of five hypothetical and two known sweet proteins. The first step of the process was to transform the yeast strain GS115 with linearized plasmid vector pPIC9K. In the following steps, growth experiments were performed on the transformed cells under specific conditions in solid-state cultures. The M_Ut^s or M_Ut⁺ phenotype of the colonies was determined, as well as their genotype by detecting the desired genes in the yeast genome using polymerase chain reaction (PCR). Finally, cultures were prepared for the expression of the proteins of interest and affinity chromatography was used for their purification. The expression of the two proteins Mab II and MNEI was observed through the electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE), but in low yields.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	8
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Pichia pastoris</i>	8
1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή	8
1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.1.3 Μεταβολικό μονοπάτι αξιοποίησης μεθανόλης (MUT)	9
1.1.4 Φαινότυποι MUT	10
1.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε σύστημα <i>Pichia pastoris</i>	12
1.2.1 Γενετική τροποποίηση της <i>Pichia pastoris</i>	12
1.2.1.1 Φορέας κλωνοποίησης	12
1.2.1.2 Ομόλογος ανασυνδυασμός στην <i>Pichia pastoris</i>	15
1.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην <i>Pichia pastoris</i>	17
1.3 Γλυκίες πρωτεΐνες	19
1.3.1 Εισαγωγή στις γλυκίες πρωτεΐνες	19
1.3.2 Παραγωγή γλυκών πρωτεϊνών σε διάφορα συστήματα έκφρασης	21
1.3.2.1 Διαγονιδιακά φυτά	21
1.3.2.2 Βακτήρια	22
1.3.2.3 Ζύμες	23
2. Σκοπός εργασίας	25
3. Υλικά και μέθοδοι	26
3.1 Πλασμίδια	28
3.2 Θρεπτικό Υλικό LB	28
3.3 Χημειοδεκτικά κύτταρα <i>E. coli</i>	28
3.4 Μετασηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων	30
3.5 Δημιουργία stock γλυκερίνης	31
3.6 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα <i>E. coli</i>	31
3.7 Πέψη πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	32
3.8 Απομόνωση γραμμικού DNA	33
3.9 Μετασηματισμός σε κύτταρα <i>P. pastoris</i> μέσω ηλεκτροδιάτρησης	34
3.10 Στερεή καλλιέργεια MD-His	35
3.11 Στερεή καλλιέργεια YPD-Gen	36
3.12 Στερεή καλλιέργεια YPD	37
3.13 Προσδιορισμός φαινοτύπου του μετασηματισμένου στελέχους <i>P. pastoris</i> - Σύγκριση ανάπτυξης σε MM και MD θρεπτικό υλικό	38

3.14 Προσδιορισμός φαινοτύπου του μετασχηματισμένου στελέχους <i>P. pastoris</i> - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	39
3.15 Καλλιέργεια κυττάρων και υπερέκφραση πρωτεϊνών	40
3.16 Απομόνωση πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας	41
3.17 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE.....	43
4. Αποτελέσματα - Συζήτηση αποτελεσμάτων	46
4.1 Επεξεργασία πλασμιδιακού φορέα pPIC9K.....	46
4.2 Μετασχηματισμός της <i>P. pastoris</i> με γραμμικό φορέα DNA	49
4.3 Προσδιορισμός φαινότυπου των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>Pichia pastoris</i> . 52	
4.4 Προσδιορισμός γονότυπου των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>Pichia pastoris</i> ... 53	
4.5 Έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών	57
5. Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	60
6. Παράρτημα γονιδιακών και αμινοξικών αλληλουχιών.....	62
7. Βιβλιογραφία	65

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SCP: Single Cell Proteins

Mbps: Mega base pairs

AOX: Alcohol Oxidase

MU_t: Methanol Utilization

VFD: Venus Flytrap Domain

LB: Luria Bertani

TAE: Tris Acetate EDTA

Mab II: Mabinlin-II

MNEI Single-chain monellin linked by a dipeptide (Gly-Phe)

YPD: Yeast extract Peptone Dextrose

MD: Minimal Dextrose

MM: Minimal Methanol

YNB: Yeast Nitrogen Base

PCR: Polymerase Chain Reaction

BMGY: Buffered Minimal Glycerol Yeast

BMMY: Buffered Minimal Methanol Yeast

OD: Optical Density

1.Εισαγωγή

1.1 Ο μικροοργανισμός *Pichia pastoris*

1.1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή

Ο Alexandre Guilliermond το 1919 για πρώτη φορά απομόνωσε από καστανιά τον ζυμομύκητα *Pichia pastoris* και τον ονομάτισε *Zygosaccharomyces pastori*.^[1] Ο Herman Phaff το 1955 κατάφερε να απομονώσει από δρύινα δέντρα πολλά διαφορετικά στελέχη αυτής της ζύμης, αργότερα γνωστής και ως *Pichia pastoris*.^[2] Πλέον, η ζύμη έχει μετανομαστεί σε *Komagataella pastoris*. Σχεδόν πριν από 50 χρόνια ο Koichi Ogata ανακάλυψε ότι διάφορα είδη ζύμης, όπως και η *Pichia pastoris*, είναι ικανά να μεταβολίσουν τη μεθανόλη και να την αξιοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, χαρακτηρίζοντας τις ως μεθυλότροφες ζύμες. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά την *P. pastoris* ενδιαφέρουσα για βιομηχανική χρήση.^[3]

Η ιστορία της *Pichia pastoris* στη βιομηχανία ξεκινάει στις αρχές του 1970 στην εταιρία Phillips Petroleum. Η εταιρεία ανέπτυξε όλα τα μέσα και τα πρωτόκολλα για την καλλιέργεια της ζύμης με κύριο στόχο την παραγωγή πρωτεϊνών σε μονοκύτταρους οργανισμούς (Single Cell Proteins, SCP) που προορίζονταν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Την ίδια χρονιά το κόστος της μεθανόλης αυξήθηκε δραματικά λόγω των πετρελαϊκών κρίσεων, ενώ παράλληλα η τιμή της σόγιας, που αποτελούσε την κύρια εναλλακτική πηγή ζωοτροφής, μειώθηκε. Ως αποτέλεσμα, η ανάπτυξη των SCP έπρεπε να ανασταλεί για αόριστο χρονικό διάστημα. Κάποια χρόνια αργότερα η εταιρεία Phillips Petroleum υπέγραψε μια συμφωνία με το ινστιτούτο Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) και η έρευνα πάνω στην *Pichia pastoris* συνεχίστηκε οδηγώντας έτσι, στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων για τον γενετικό χειρισμό της ζύμης, που βασίζεται στην ιδιότητά της να μεταβολίζει τη μεθανόλη.^[3] Πλέον η *Pichia pastoris* βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών,^[4] ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα.^[5]

1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Pichia pastoris* ταξινομείται βιολογικά στο βασίλειο των μυκήτων. Κατατάσσεται στο φύλο *Ascomycota* (ασκομύκητας), ανήκει στην κλάση των *Saccharomycetes* (σακχαρομύκητες), την τάξη *Saccharomycetales*, της οικογένειας *Phaffomycetaceae*, του γένους *Pichia* ή *Komagataella* και στο είδος *pastoris*,^[6] που είναι το είδος που χρησιμοποιείται στον τομέα της βιοτεχνολογίας για την ετερόλογη παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.^[7] Από τη χρωμοσωμική ανάλυση που έχει πραγματοποιηθεί σε διάφορα στελέχη *Pichia pastoris* προέκυψε ότι φέρουν τέσσερις χρωμοσωμικές ζώνες, που το μέγεθός τους κυμαίνεται από 1,7 Mbp έως 3,5 Mbp, ενώ το συνολικό μέγεθος του γονιδιώματος εκτιμήθηκε ότι ήταν 9,5 Mbp έως 9,8 Mbp.^[6]

Είναι ευκαρυωτικός μονοκύτταρος ζυμομύκητας, μη παθογόνος και υποχρεωτικά αερόβιος. Δηλαδή, κατά την αναπνοή γίνεται πλήρης διάσπαση της πηγής άνθρακα και ως προϊόν σχηματίζεται διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα κυρίως μεθανόλη και δευτερευόντως γλυκερίνη και γλυκόζη, γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως μεθυλότροφος οργανισμός.^[3]

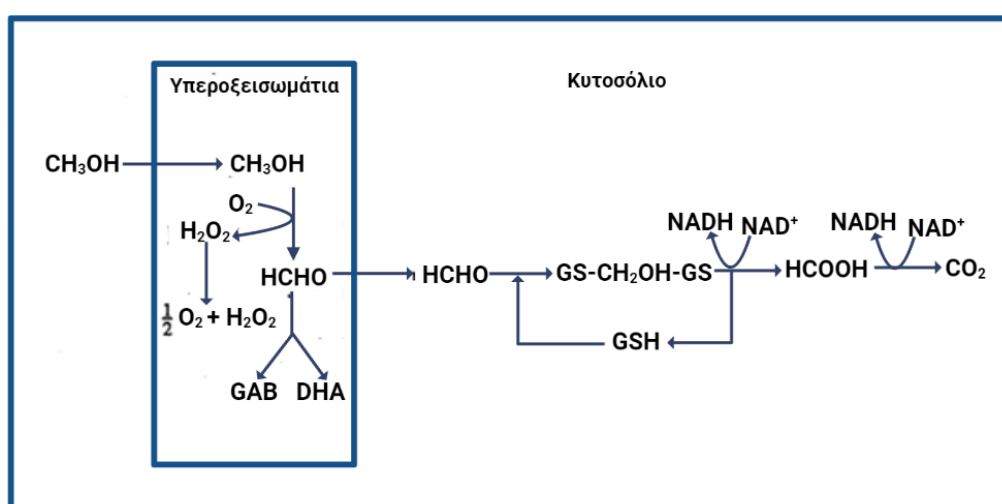
Επιπλέον, αυτός ο μικροοργανισμός είναι Crabtree αρνητικός, δηλαδή προτιμά μια αναπνευστική παρά μια ζυμωτική ανάπτυξη και σε αερόβιες συνθήκες παρουσία σακχάρων δεν παράγει αιθανόλη, σε αντίθεση με τις Crabtree θετικές ζύμες που επιτελούν αλκοολική ζύμωση. Συνεπώς η *Pichia pastoris* παράγει μεγαλύτερη βιομάζα και κατά συνέπεια περισσότερη επιθυμητή πρωτεΐνη κατά την ετερόλογη έκφραση.^[8]

1.1.3 Μεταβολικό μονοπάτι αξιοποίησης μεθανόλης (MUT)

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η *Pichia pastoris* είναι μεθυλότροφος οργανισμός. Έχει τη δυνατότητα να καταβολίσει τη μεθανόλη και το πρώτο βήμα στο μεταβολικό μονοπάτι αξιοποίησής της (**Methanol Utilization pathway**) πραγματοποιείται από το ένζυμο οξειδάση της αλκοόλης (AOX, EC 1.1.3.13) σχηματίζοντας φορμαλδεΰδη και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ένζυμο AOX βρίσκεται εντός του υπεροξειώματος μαζί με την καταλάση, η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό. Ένα μέρος της φορμαλδεΰδης που παράγεται από το AOX εγκαταλείπει το υπεροξειώμα και οξειδώνεται περαιτέρω σε μυρμηκικό και τελικά διοξείδιο του άνθρακα από δύο κυτταροπλάσματικές αφυδρογονάσες (Εικόνα 1.1). Αυτές οι

διαδικασίες αποτελούν πηγή ενέργειας για τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε περιβάλλον μεθανόλης.^[9]

Η μεταγραφή των γονιδίων της μεταβολικής οδού ΜUτ καταστέλλεται όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης ή γλυκερίνης. Χρησιμοποιώντας έναν από τους δύο υποκινητές ΑΟΧ, η έκφραση πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα μπορεί να προκληθεί από τη μεθανόλη σε μέσα που δεν έχουν άλλες ζυμώσιμες πηγές άνθρακα. Το γονιδίωμα της *Pichia pastoris* περιέχει δύο γονίδια, τα ΑΟΧ1 και ΑΟΧ2, τα οποία κωδικοποιούν τα αντίστοιχα ισοένζυμα οξειδωσης της αλκοόλης ΑΟΧ1 και ΑΟΧ2. Το γονίδιο ΑΟΧ1 ρυθμίζεται αυστηρά από τον υποκινητή ΑΟΧ1 (ρΑΟΧ1) και μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση έως και του 30 % του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών, αποκλειστικά όταν η ανάπτυξη της ζύμης γίνεται σε μεθανόλη, αναδεικνύοντας έτσι την αξιοσημείωτη ισχύ του υποκινητή του ΑΟΧ1.^[9]



Εικόνα 1.1. Το μεταβολικό μονοπάτι της μεθανόλης (ΜUτ) σε σύστημα *Pichia pastoris*.^[3]

1.1.4 Φαινότυποι ΜUτ

Όσον αφορά την ικανότητα μεταβολισμού της μεθανόλης υπάρχουν τρεις φαινότυποι της *Pichia pastoris*, οι ΜUτ⁺, ΜUτ^s και ΜUτ⁻. Ο φαινότυπος ΜUτ⁺ (**M**ethanol **U**tilization plus) προκύπτει σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση και τα δύο γονίδια, ΑΟΧ1 και ΑΟΧ2 παραμένουν άθικτα και λειτουργικά ενώ στην δεύτερη περίπτωση, μόνο το γονίδιο ΑΟΧ1 είναι δραστικό. Το στέλεχος αυτό, παρουσία μεθανόλης αναπτύσσεται με τον ίδιο ρυθμό που αναπτύσσεται και το στέλεχος αγρίου τύπου (wild type). Στον φαινότυπο ΜUτ^s (**M**ethanol **U**tilization slow) το γονίδιο ΑΟΧ1

έχει καταστραφεί. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξαρτάται αποκλειστικά από το μεταγραφικά ασθενέστερο γονίδιο AOX2 που σηματοδοτεί πιο αργό μεταβολισμό σε σύγκριση με το στέλεχος MU^+ . Στον φαινότυπο MU^- (**M**ethanol **U**t ilization minus) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται δύσκολα σε περιβάλλον μεθανόλης, λόγω της καταστροφής και των δύο γονιδίων AOX, συνεπώς δεν μπορεί να μεταβολίσει τη μεθανόλη.^[10]

Τα στελέχη MU^+ της *Pichia pastoris* είναι πολύ ευαίσθητα σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης. Παρουσία περίσσειας οξυγόνου και μεθανόλης, το πρώτο προϊόν του μεταβολισμού, η φορμαλδεΐδη, μπορεί να φτάσει σε τοξικά επίπεδα προκαλώντας συρρίκνωση των κυττάρων και στη συνέχεια κυτταρικό θάνατο. Έτσι, για επιτυχημένη κυτταρική ανάπτυξη και έκφραση πρωτεΐνης με MU^+ στελέχη, είναι κρίσιμο να ελέγχεται αυστηρά η συγκέντρωση μεθανόλης ώστε να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.

Για τα στελέχη MU^s ακολουθείται παρόμοια στρατηγική για την ανάπτυξή τους σε καλλιέργεια, όπως και με το MU^+ . Ένα πλεονέκτημα των στελεχών MU^s είναι ότι η ανάπτυξη τους δεν είναι τόσο ευαίσθητη στην περίσσεια μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο σε σχέση με τα στελέχη MU^+ και ως εκ τούτου η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να γίνει ευκολότερα. Βέβαια, ο φαινότυπος MU^s οδηγεί σε χρονοβόρα επαγωγή και μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης. Όταν χρησιμοποιούνται τα στελέχη MU^s μπορούν να εφαρμοστούν στρατηγικές μικτής τροφής, δηλαδή χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα και μεθανόλη γλυκερίνη ή γλυκόζη. Κατά συνέπεια τα κύτταρα δεν εξαρτώνται από τον αργό μεταβολισμό της μεθανόλης, η οποία λειτουργεί πλέον κυρίως ως επαγωγέας, και τα κύτταρα της ζύμης μπορούν να χρησιμοποιήσουν για την ανάπτυξή τους την εναλλακτική πηγή άνθρακα γλυκερίνη ή γλυκόζη.^[10]

Το στέλεχος MU^- μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, καθώς η μεθανόλη μπορεί να επάγει τη μεταγραφή από τον εκκινητή AOX1 και την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτόν. Η ανικανότητα του στελέχους να αναπτυχθεί σε μεθανόλη απαιτεί τη χρήση μιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα, όπως η γλυκερίνη, για την ανάπτυξη και την παραγωγή πρωτεΐνης. Ωστόσο, η περίσσεια γλυκερίνης μπορεί να προκαλέσει καταστολή του εκκινητή AOX1, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση ετερόλογων γονιδίων.^[10]

1.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε σύστημα *Pichia pastoris*

Λόγω των προτερημάτων που παρουσιάζει η ζύμη *Pichia pastoris*, έχει αναγνωριστεί ως ένα επιτυχημένο σύστημα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τα τελευταία περίπου σαράντα χρόνια. Αρχικά, χρησιμοποιούνται απλές τεχνικές για την εκμετάλλευση της σε μοριακό επίπεδο. Σε αυτό συμβάλλει και η ομοιότητα της *P. pastoris* με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία είναι ένα καλά μελετημένο πειραματικό σύστημα στη σύγχρονη βιολογία. Παράλληλα, η *Pichia pastoris* έχει την ικανότητα να παράγει ετερόλογα πρωτεΐνες σε υψηλά επίπεδα, τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια. Επιπλέον οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και πρωτεολυτική επεξεργασία.^[3]

1.2.1 Γενετική τροποποίηση της *Pichia pastoris*

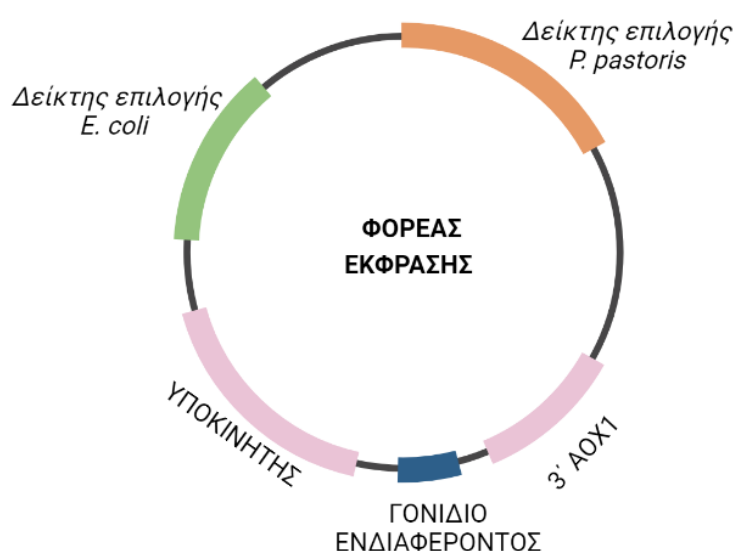
Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον γενετικό χειρισμό της *Pichia pastoris* είναι συνήθως ο μετασχηματισμός με την εισαγωγή τμήματος DNA, η γονιδιακή στόχευση, η αντικατάσταση γονιδίων και η κλωνοποίηση. Η *P. pastoris* παρουσιάζει μια τάση για ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ γονιδιωματικών και τεχνητά εισαγόμενων τμημάτων DNA, και η ένθεση οποιουδήποτε ξένου γονιδίου απαιτεί τέσσερα βασικά βήματα. Κατά το πρώτο βήμα, πραγματοποιείται εισαγωγή του γονιδίου σε έναν φορέα έκφρασης. Έπειτα, ο φορέας έκφρασης γίνεται γραμμικός με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και μέσω της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη της *Pichia pastoris* και μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, το γραμμικό DNA εισάγεται στο γονιδίωμα της.^[3]

1.2.1.1 Φορέας κλωνοποίησης

Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα μόριο DNA που χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει τμήματα DNA. Παράδειγμα φορέα κλωνοποίησης αποτελούν τα πλασμίδια, τα οποία είναι μικρά, κυκλικά τμήματα DNA, που αντιγράφονται μέσα στον ξενιστή και η ύπαρξή τους είναι ανεξάρτητη από το χρωμοσωμικό ή γενομικό DNA του ξενιστή. Τα πλασμίδια επιλέγονται πολύ συχνά καθώς έχουν μικρό μέγεθος, δίνουν μεγάλο αριθμό αντιγράφων, έχουν θέσεις δράσης περιοριστικών ενζύμων και τέλος

περιέχουν δείκτες επιλογής, κυρίως ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, που καθιστούν εύκολο τον προσδιορισμό των αποικιών που περιέχουν το γονίδιο.^[11]

Οι φορείς έκφρασης της *Pichia pastoris* αποτελούνται από την αλληλουχία του εκκινήτη, πιο συχνά του AOX1 στην περιοχή 5', την αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής στην περιοχή 3', από μία αλληλουχία με θέσεις κλωνοποίησης απαραίτητες για την εισαγωγή του γονιδίου ενδιαφέροντος και από αλληλουχίες δείκτη επιλογής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά τόσο για κύτταρα *E. coli* όσο και *P. pastoris*. Ένα γενικό διάγραμμα του φορέα έκφρασης παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2.^[3]



Εικόνα 1.2. Γενικό διάγραμμα του φορέα έκφρασης της *P. pastoris*.^[3]

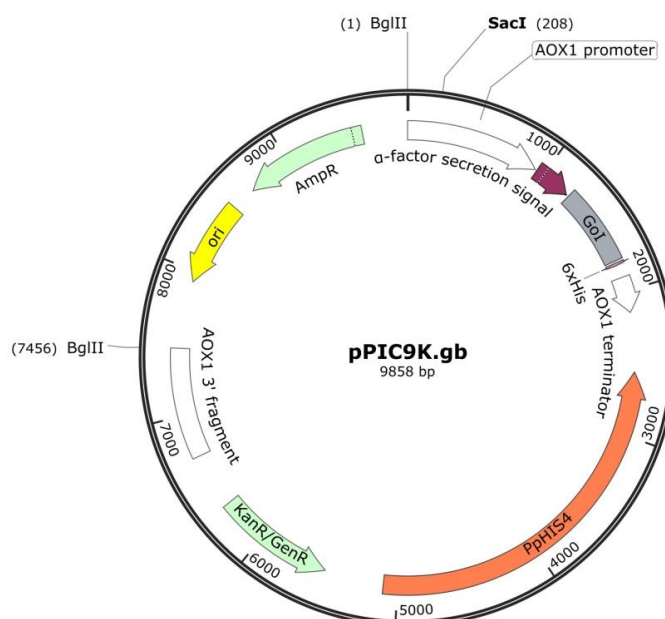
Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τύπου pPIC9K (Εικόνα 1.3), τα οποία κατασκευάστηκαν από την εταιρία GeneWiz. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια φέρουν παλίνδρομες αλληλουχίες αναγνώρισης **5'GAGCTC3'** και **5'AGATCT3'** από τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα SacI και Bgl II. Το γονίδιο ενδιαφέροντος βρίσκεται ανάμεσα στον υποκινητή του γονιδίου AOX και στην αλληλουχία λήξης της μεταγραφής.

Επιπλέον, ο φορέας pPIC9K περιέχει το γονίδιο HIS4 που επιτρέπει την ανάπτυξη σε περιβάλλον με έλλειψη ιστιδίνης. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα πολυλειτουργικό ένζυμο που ονομάζεται αφυδρογονάση της ιστιδινόλης (histidinol dehydrogenase), το οποίο καταλύει πολλά στάδια στη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Εφόσον το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της *P. pastoris* ήταν το GS115, το οποίο δε

διαθέτει το γονίδιο HIS4, οι αποικίες αυτού του στελέχους θα μπορούν να αναπτυχθούν μόνο σε μέσα καλλιέργειας παρουσία ιστιδίνης. Ωστόσο μετά από ένα επιτυχημένο μετασχηματισμό, όπου το γονίδιο HIS4 ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή, η ανάπτυξη των κλώνων επιτρέπεται και σε περιβάλλον με έλλειψη ιστιδίνης.^[12]

Ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει δύο γονίδια ανθεκτικότητας. Το πρώτο στην αμικικίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό επιλογής για τα κύτταρα *E. coli*. Το δεύτερο γονίδιο αντίστασης είναι το G418. Όταν ο ξενιστής είναι βακτήριο η αντίσταση γίνεται στην καναμυκίνη, ενώ όταν είναι ζύμη στην γενετικίνη. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο, την 3'-φωσφοτρανσφεράση της αμινογλυκοσίδης (aminoglycoside 3'-phosphotransferase), που προσφέρει στα μετασχηματισμένα κύτταρα αντίσταση κατά των συγκεκριμένων αντιβιοτικών. Κατά τη διάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού, η κασέτα ανασυνδυασμού (ή έκφρασης) που περιέχεται στον φορέα pPIC9K μπορεί να ενσωματωθεί πολλές φορές στο γονιδίωμα της *P. pastoris*. Όσο πιο συχνά η κασέτα ενσωματώνεται στο γονιδίωμα, τόσες μεγαλύτερες είναι, οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικού στις οποίες επιβιώνει ο οργανισμός.^[13]

Τέλος, ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει πριν τη θέση του γονιδίου ενδιαφέροντος, ένα γονίδιο που εκφράζει σηματοδοτικό πεπτιδίον το οποίο αναγνωρίζεται από την *P. pastoris* και εκκρίνει την εκφρασμένη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.



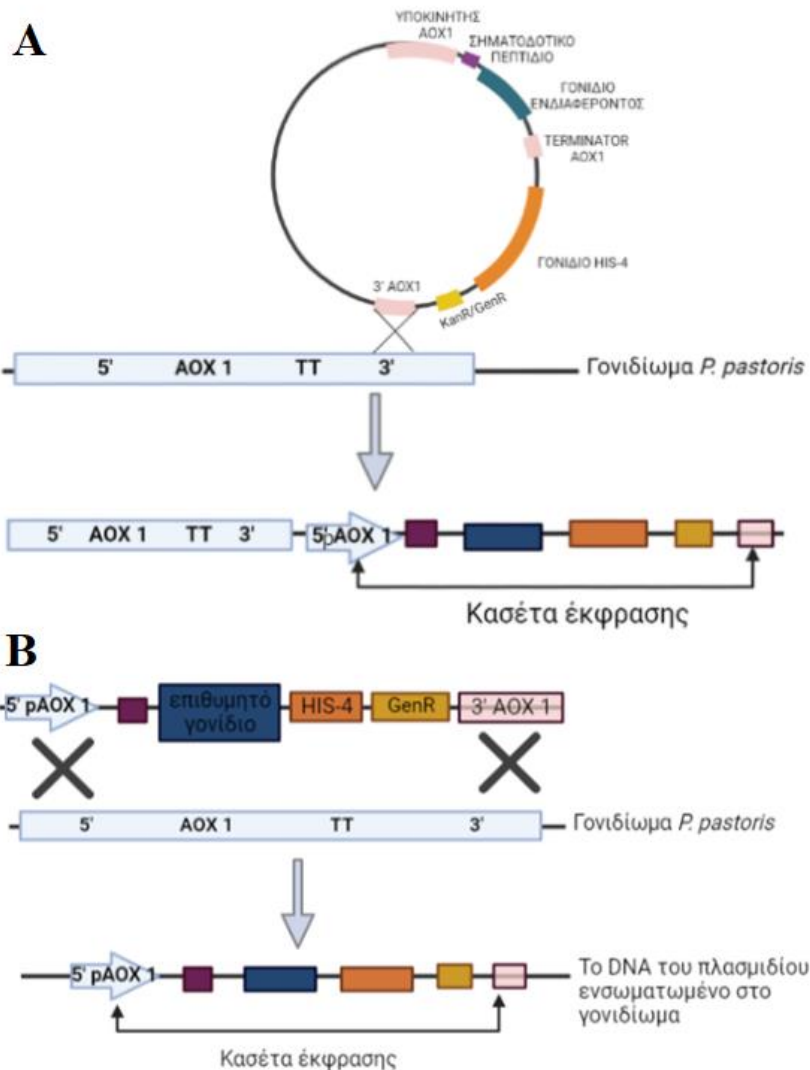
Εικόνα 1.3. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pPIC9K.^[3]

1.2.1.2 Ομόλογος ανασυνδυασμός στην *Pichia pastoris*

Ο φορέας έκφρασης ενσωματώνεται αποτελεσματικά στο γενετικό υλικό της *Pichia pastoris* σε μια στοχευμένη θέση στο γονιδιώμα της μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ενσωμάτωσης του ξένου πλασμιδίου, θα πρέπει πρώτα ο φορέας να γίνει γραμμικός με την χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων. Στη συνέχεια, το γραμμικό DNA εισάγεται στα κύτταρα μέσω ηλεκτροδιάτρησης ώστε να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη. Το εισαγόμενο γονίδιο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου και σχηματίζονται ανασυνδυασμένα κύτταρα.^[3] Στις περισσότερες περιπτώσεις, εμφανίζεται μια μεμονωμένη διασταύρωση στο γονιδίωμα, αλλά πολλαπλές ενσωματώσεις συμβαίνουν στο 1–10 % των περιπτώσεων.^[13]

Κατά την εισαγωγή του γραμμικού φορέα υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι ένταξης του στο χρωμοσωμικό DNA της ζύμης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο διαφορετικών φαινοτύπων. Η πρώτη περίπτωση ονομάζεται ομόλογος ανασυνδυασμός μίας θέσης (single site homologous recombination) και οδηγεί στον MU^+ φαινότυπο, στον οποίο το γονίδιο του AOX1 δεν έχει καταστραφεί και τα ανασυνδυασμένα κύτταρα αναπτύσσονται φυσιολογικά παρουσία μεθανόλης (Εικόνα 1.4 A). Παρατηρείται ότι σε μοριακό επίπεδο ο ομόλογος ανασυνδυασμός μιας θέσης είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης που συμβαίνει μεταξύ του γραμμικού φορέα και κάποιου μέρους του γονιδιώματος της *Pichia pastoris*. Με αυτόν τον τρόπο, η κασέτα έκφρασης ενσωματώνεται στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris* στο επιθυμητό σημείο δίπλα στον υποκινητή AOX1.^[14,15]

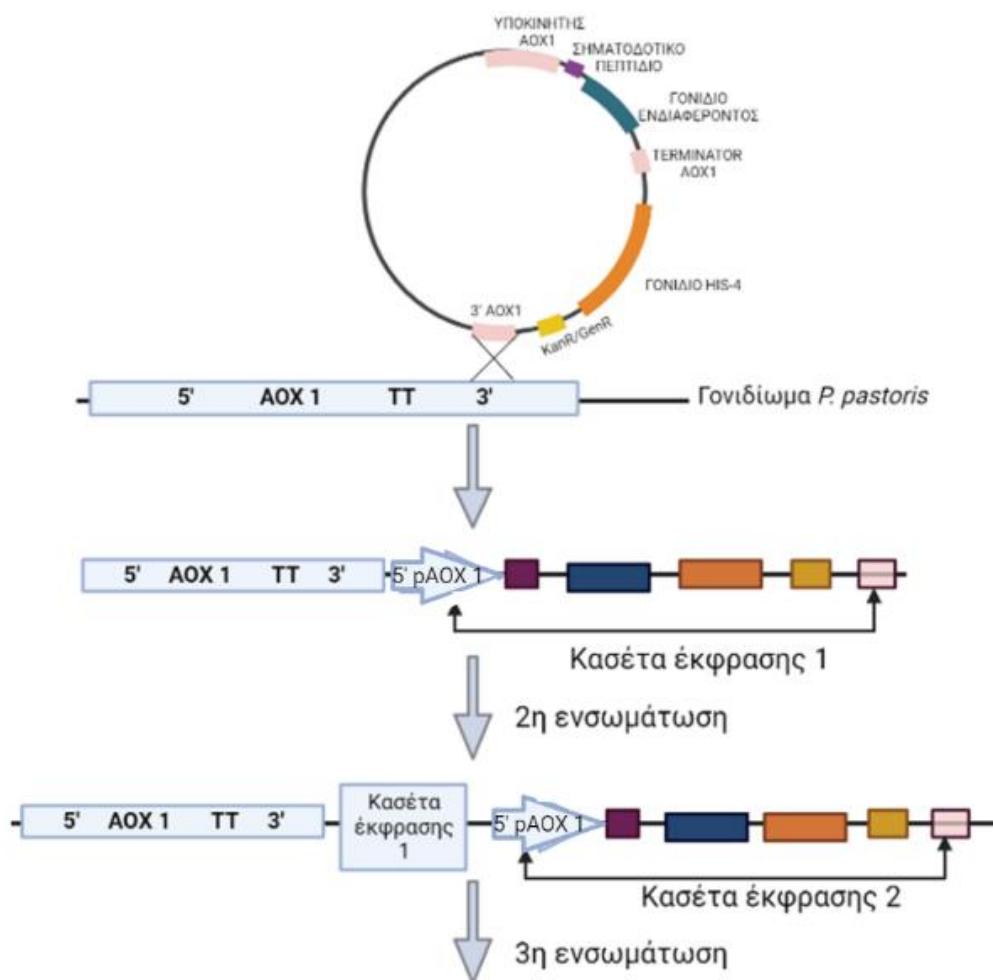
Η δεύτερη περίπτωση ονομάζεται ομόλογος ανασυνδυασμός διπλής θέσης (double site homologous recombination). Κατά την ενσωμάτωση της κασέτας έκφρασης το χρωμοσωμικό γονίδιο AOX1 μπορεί να καταστραφεί με αποτέλεσμα οι κλώνοι να μεταβολίζουν μεθανόλη ανεπαρκώς, προκύπτοντας έτσι ο φαινότυπος MU^s (Εικόνα 1.4 B). Σε μοριακό επίπεδο συμβαίνουν δύο διαδοχικές διασταυρώσεις, καταλήγοντας έτσι σε γονιδιακή αντικατάσταση. Έτσι το μέρος του γονιδιώματος με αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς τα τελικά άκρα της κασέτας ανασυνδυασμού, διαγράφεται. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στη *P. pastoris* ο ομόλογος ανασυνδυασμός μονής θέσης συμβαίνει με πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα σε σύγκριση με τον ομόλογο ανασυνδυασμό διπλής θέσης.^[14, 15]



Εικόνα 1.4. Α) Ομόλογος ανασυνδυασμός μονής θέσης γραμμικού φορέα σε *Pichia pastoris* μετά από μία διασταύρωση, όπου ο φορέας ενσωματώνεται στο γονιδίωμα στο τμήμα 3' AOX1. Β) Ομόλογος ανασυνδυασμός διπλής θέσης γραμμικού φορέα σε *Pichia pastoris*, όπου συμβαίνουν δύο διασταυρώσεις στο τμήμα του γονιδιώματος που βρίσκεται ανάμεσα στον υποκινητή pAOX1 και το τμήμα 3' AOX1 διαγράφοντας και αντικαθιστώντας το γονίδιο AOX1 με το γονίδιο ενδιαφέροντος. Το HIS4 αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο δείκτη τα συμβάντα διασταύρωσης σημειώνονται με x. [\[14,15\]](#)

Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις είναι το ίδιο πιθανό να συμβεί εισαγωγή πολλών αντιγράφων της κασέτας έκφρασης στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris* (Εικόνα 1.5). Ακόμα και όταν υπάρχουν πολλά αντίγραφα, οι ενσωματώσεις αυτές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα και δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τα στελέχη που περιέχουν πολλαπλά ενσωματωμένα αντίγραφα μιας κασέτας έκφρασης συχνά παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ξένης πρωτεΐνης απ' ό,τι τα στελέχη ενός αντιγράφου. Αυτό συμβαίνει διότι ο μεταβολισμός κάθε μορίου επαγωγέα οδηγεί σε μεταγραφή πολλαπλών αντιγράφων του ετερόλογου γονιδίου και κατά συνέπεια σε

μεγαλύτερη έκφραση της ξένης πρωτεΐνης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση θα μεταγράφεται μόνο ένα αντίγραφο του ετερόλογου γονιδίου.^[14, 15]



Εικόνα 1.5. Η πολλαπλή ενσωμάτωση ενός ετερόλογου γονιδίου στο γονιδίωμα της *Pichia pastoris*.^[14, 15]

1.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην *Pichia pastoris*

Ένα άλλο πλεονέκτημα της *Pichia pastoris* ως ξενιστής για την παραγωγή ετερόλογης πρωτεΐνης είναι η ικανότητά της να εκτελεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως Ο- και Ν-γλυκοζυλίωση, σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και επίσης, δίνει την επιλογή μεταφοράς της πρωτεΐνης εξωκυττάρια.^[3,4]

Η γλυκοζυλίωση είναι η πιο συνηθισμένη πρωτεϊνική τροποποίηση. Εντοπίζεται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, στις

γλυκοπρωτεΐνες απαιτείται η σύνδεση δομών υδατανθράκων στη ραχοκοκαλιά της πρωτεΐνης για να επιτραπεί η σωστή αναδίπλωση, διαλυτότητα, σταθερότητα και βιολογική δραστικότητα. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι γλυκοζυλίωσης σε κύτταρα ζυμομύκητα, η σύνδεση με άτομο αζώτου (N-linked) και με άτομο οξυγόνου (O-linked), που λαμβάνουν χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο σύμπλεγμα Golgi. Στους ζυμομύκητες, κατά την N-linked γλυκοζυλίωση, οι ολιγοσακχαρίτες συνδέονται με το αμιδικό άζωτο του κατάλοιπου ασπαραγίνης μέσω ενός N-γλυκοζυτικού δεσμού εντός της αλληλουχίας ασπαραγίνης-X-σερίνης/θρεονίνης, όπου X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από την προλίνη. Για το σχηματισμό O-γλυκοζυτικού δεσμού, οι ολιγοσακχαρίτες συνδέονται με κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης. Βέβαια, έχει παρατηρηθεί στην *Pichia pastoris* ότι η O-γλυκοζυλίωση συμβαίνει σπάνια.^[3,4]

Η έκφραση σε *Pichia pastoris* έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς και πρωτεϊνών που δεν μπορούν να εκφραστούν στα βακτήρια. Οι πρωτεΐνες που παράγονται στη *Pichia pastoris* συνήθως αναδιπλώνονται σωστά, επειδή η ζύμη παρέχει ένα ενδοκυτταρικό περιβάλλον αναδίπλωσης παρόμοιο με εκείνο των κυττάρων θηλαστικών. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών που προορίζονται για αυτή την εκκριτική οδό λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου διασφαλίζει ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι σωστά αναδιπλωμένες, συμπεριλαμβανομένου και του σωστού σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται νωρίς κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης είναι συχνά λανθασμένοι. Οι κυστεΐνες μπορούν να σχηματίσουν λανθασμένα δεσμούς μεταξύ τους ή να σχηματίσουν τους σωστούς δεσμούς, όμως με λάθος χρονική σειρά, καθιστώντας δύσκολη την οξείδωση των εσωτερικών κυστεϊνών. Για να διορθωθούν αυτά τα σφάλματα, οι λανθασμένοι δισουλφιδικοί δεσμοί πρέπει να σπάσουν και να σχηματιστούν νέοι σε διαφορετική διαμόρφωση. Το ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχει βοηθούς αναδίπλωσης, όπως ένζυμα και βοηθητικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί (τσαπερόνες). Οι βοηθοί αναδίπλωσης συμβάλλουν ώστε οι πρωτεΐνες να επιτύχουν τη σωστή δισουλφιδική τους διάταξη.^[16,17]

Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται ετερόλογα στη *Pichia pastoris* μπορούν να παραχθούν είτε ενδοκυττάρια είτε εξωκυττάρια. Επειδή αυτή η ζύμη εκκρίνει μόνο χαμηλά επίπεδα ενδογενών πρωτεϊνών, η εκκρινόμενη ετερόλογη πρωτεΐνη αποτελεί τη συντριπτική

πλειονότητα της συνολικής πρωτεΐνης στο μέσο. Επομένως, η έκκριση μιας ετερόλογης πρωτεΐνης στο μέσο καλλιέργειας μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πρώτο βήμα καθαρισμού. Ωστόσο, λόγω της σταθερότητας των πρωτεϊνών και των απαιτήσεων αναδίπλωσης, η επιλογή έκκρισης επιλέγεται συνήθως για ξένες πρωτεΐνες που κανονικά εκκρίνονται από τους φυσιολογικούς ξενιστές τους.^[3]

1.3 Γλυκίες πρωτεΐνες

1.3.1 Εισαγωγή στις γλυκίες πρωτεΐνες

Η βιομηχανία τροφίμων βρίσκεται σε μια συνεχή αναζήτηση εναλλακτικών γλυκαντικών ώστε να καταφέρει να καλύψει τις μεγάλες απαιτήσεις ζάχαρης. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση σακχάρων στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου έχει συσχετισθεί με αυξημένο ρίσκο για παχυσαρκία, διαβήτη τύπου II, καρδιαγγειακά προβλήματα καθώς και καρκίνο. Σε μια προσπάθεια να αντικατασταθούν αυτές οι πηγές ζάχαρης, η βιομηχανία προσανατολίστηκε στη χρήση τεχνητών ή φυσικών μη θρεπτικών γλυκαντικών, όπως η ασπαρτάμη και οι γλυκοζίτες στεβιόλης. Σήμερα, αυτά τα γλυκαντικά έχουν ήδη αποδειχθεί ότι έχουν αρνητικές παρενέργειες στην υγεία του ανθρώπου, όπως ζάλη, πονοκεφάλους και ψυχολογικά προβλήματα.^[18] Έτσι το ενδιαφέρον στράφηκε στα φυσικά γλυκαντικά μη υδατανθρακικής προέλευσης, όπως τερπενοειδή, φλαβονοειδή και πρωτεΐνες.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι άγευστες και άοσμες. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες έχουν γλυκιά γεύση ή έχουν τροποποιητικές ιδιότητες όταν βρεθούν στον ανθρώπινο ουρανίσκο. Μια πρωτεΐνη με τροποποιητικές ιδιότητες μπορεί να μεταβάλλει μια βασική γεύση, όπως τη ξινή, σε γλυκιά. Υπάρχουν διάφορες γλυκές πρωτεΐνες των οποίων η γλυκαντική δράση είναι εκατοντάδες ή χιλιάδες φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τη ζάχαρη (Πίνακας 1.1). Παρόλα αυτά τα τελευταία 50 χρόνια, λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας και του ακριβού κόστους παραγωγής, μόνο η θαυματίνη έχει βιομηχανική εφαρμογή.^[19]

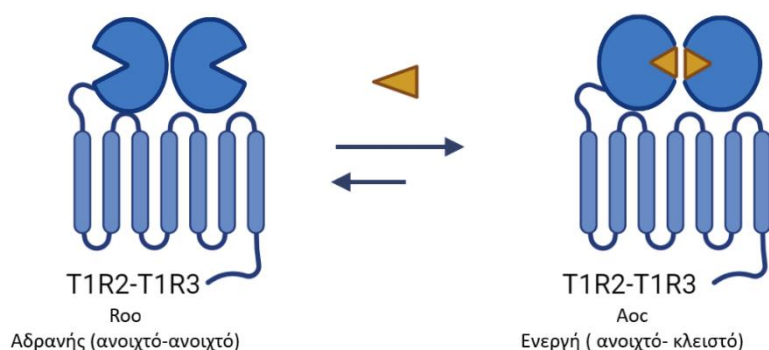
Ένας από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την παρασκευή υποκατάστατων ζάχαρης είναι η γλυκύτητα. Ο δείκτης γλυκύτητας προσδιορίζεται αναφορικά με την σουκρόζη.^[20]

Πίνακας 1.1. Τέσσερα παραδείγματα γνωστών γλυκών πρωτεϊνών, η προέλευσή τους και η γλυκύτητά τους συγκριτικά με τη ζάχαρη.

Γνωστές πρωτεΐνες γλυκιάς γεύσης		
Πρωτεΐνες	Οργανισμός προέλευσης	Γλυκύτητα
Θαυματίνη	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	3000X
Μπραζεΐνη	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon	2000X
Μονελλίνη	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> Diels	3000X
Μαμπινλίνη	<i>Capparis masakai</i> Levl	100X

Στην προσπάθεια εύρεσης νέων πρωτεϊνών με γλυκιά γεύση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης της πρόσδεσης (in silico docking experiments) των ήδη γνωστών πρωτεϊνών με γλυκιά γεύση στον ανθρώπινο υποδοχέα γλυκιάς γεύσης T1R2-T1R3.^[21] Από τη βιβλιογραφία θεωρείται πως οι γλυκές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα T1R2-T1R3 μέσω του μοντέλου σφήνας (wedge model, Εικόνα 1.6). Σε αυτό το μοντέλο, ο υποδοχέας της γλυκιάς γεύσης υπάρχει σε μια ισορροπία μεταξύ δύο διαμορφώσεων, την ανενεργή και την ενεργή. Στην ανενεργή διαμόρφωση η περιοχή πρόσδεσης του γλυκαντικού μορίου ονομάζεται VFD (Venus Flytrap Domain) και αποτελείται από δύο λοβούς οι οποίοι τοποθετούνται σε ανοιχτή διαμόρφωση (Roo, ανοιχτό-ανοιχτό). Όταν το γλυκαντικό μόριο, ανεξαρτήτου μεγέθους και μοριακού βάρους, προσδένεται στην περιοχή VFD, προκαλεί δομικές αλλαγές στον υποδοχέα, ο οποίος κλείνει και μετατρέπεται στην ενεργή του μορφή (Aoc, ανοιχτό-κλειστό).^[22]

Όπως προέκυψε από τα πειράματα docking οι γλυκές πρωτεΐνες που έχουν βασικό χαρακτήρα (ισοηλεκτρικό σημείο $pI > 8$) αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και δεσμών υδρογόνου. Έχουν βρεθεί πέντε αμινοξέα, συγκεκριμένα η Arg177 του T1R3 και τα Asn152, Glu170, Asp173, Asp218 του T1R2, που θα μπορούσαν να έχουν κρίσιμο ρόλο στην αλληλεπίδραση με τις χαρακτηρισμένες γλυκίες πρωτεΐνες. Είναι σαφές λοιπόν ότι η ενίσχυση του θετικού και του αρνητικού φορτίου σε συγκεκριμένες θέσεις στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα.^[21]



Εικόνα 1.6. Αναπαράσταση του μοντέλου σφήνας. Η αδρανής Roo διαμόρφωση μετατρέπεται σε ενεργή Aoc διαμόρφωση παρουσία κατάλληλου προσδέτη. ^[22]

Κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση για τον εντοπισμό αμινοξέων και μοτίβων κρίσιμων για την εκδήλωση της γλυκιάς γεύσης, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στις δύο γλυκές πρωτεΐνες, μονελίνη (MNE I) και μαμπινλίνη-2 (MabII). Με βάση τα αποτελέσματα από την ανάλυση δομής-λειτουργίας, αναζητήθηκαν σε βάσεις δεδομένων πιθανές γλυκές πρωτεΐνες. Βρέθηκαν πέντε αλληλουχίες που έχουν υποθετικά γλυκιά γεύση, οι Bcr1, Bcr2 και Bcr3 του οργανισμού *Brassica cretica*, η AaI του οργανισμού *Arabis alpina* και η Ome από τον οργανισμό *Oryza meyeriana var. granulata*. ^[21]

1.3.2 Παραγωγή γλυκών πρωτεϊνών σε διάφορα συστήματα έκφρασης

Διάφορα συστήματα είναι διαθέσιμα για έκφραση πρωτεΐνης όπως τα βακτήρια, οι ζύμες, οι μύκητες, τα κύτταρα θηλαστικών, έντομα, διαγονιδιακά ζώα και φυτά. Οι παρακάτω παράγοντες καθορίζουν τον τύπο του κατάλληλου ξενιστή για την παραγωγή ετερόλογης πρωτεΐνης: ο χρόνος έκφρασης, η ευκολία ελέγχου διεργασίας, η ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται, το μέγεθος, ο τύπος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ο αριθμός δισουλφιδικών δεσμών και ο προσορισμός της εκφρασμένης πρωτεΐνης. ^[23]

1.3.2.1 Διαγονιδιακά φυτά

Η σύνθεση γλυκών πρωτεϊνών έχει δοκιμαστεί να διεξαχθεί σε διαγονιδιακά φυτά. Η χρήση φυτικών κυττάρων ή καλλιέργειας ιστών έχει ορισμένα πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους όπως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις παρόμοιες με κύτταρα θηλαστικών, είναι ασφαλή για την ανθρώπινη υγεία και παρέχουν δυνατότητα

απλοποιημένης και υψηλής παραγωγικότητας που τα καθιστά κατάλληλα για μεγάλη κλίμακα.^[24]

Ωστόσο, τα γονιδιακά φυτά ως ξενιστές έχουν ορισμένα μειονεκτήματα σε σύγκριση με τους μικροβιακούς ξενιστές. Για παράδειγμα, η παραγωγή γλυκών πρωτεϊνών, ιδίως της θαυματίνης, παρουσιάζει χαμηλότερο επίπεδο ανάπτυξης. Επίσης, τα διαγονιδιακά φυτά υστερούν σε σχέση με τα βακτηριακά συστήματα σε ζητήματα όπως τον έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων έκφρασης. Επιπλέον, απαιτείται μια περαιτέρω βελτίωση στη σταθερότητα και την ανάκτηση της τελικής πρωτεΐνης. Βάσει των παραπάνω μειονεκτημάτων συμπεραίνεται ότι, θα ήταν προτιμότερο ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης το οποίο θα χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς ως ξενιστές.^[25]

1.3.2.2 Βακτήρια

Τα βακτηριακά συστήματα χρησιμοποιούνται συχνά για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων τόσο προκαρυωτικής όσο και ευκαρυωτικής προέλευσης. Το *Escherichia coli* είναι ένα από τα παλαιότερα και πιο δημοφιλή συστήματα έκφρασης για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης λόγω της ταχείας ανάπτυξης και έκφρασης, την εύκολη καλλιέργεια και τις υψηλές αποδόσεις. Επιπλέον, η γενετική του *E. coli* είναι καλά κατανοητή σε σύγκριση με άλλους οργανισμούς.^[23]

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα, το *E. coli* έχει ορισμένα μειονεκτήματα που μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσουν την αποδοτικότητα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ένα σημαντικό εμπόδιο είναι ότι σε καλλιέργεια υψηλής κυτταρικής πυκνότητας παράγονται υψηλές ποσότητες οξικού οξέος ως δευτερογενές προϊόν μεταβολισμού, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα. Επιπρόσθετα, σημαντικό εμπόδιο αποτελεί η ανικανότητα του βακτηρίου να εκτελεί πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τυπικές για τους ευκαρυώτες, όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση και ειδικές πρωτεολυτικές επεξεργασίες, που επηρεάζουν τη δομή, τη διαλυτότητα, τη βιολογική λειτουργικότητα και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Επίσης, το βακτηριακό σύστημα δεν προτιμάται για την παραγωγή πρωτεϊνών που έχουν δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς αδυνατεί να οξειδώσει τις ελεύθερα κατάλοιπα κυστεϊνών. Για την επίτευξη της έκφραση μιας σταθερής και σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης πρέπει να επιλεγθεί ξενιστής που να δίνει την δυνατότητα για τέτοιου τύπου μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις, όπως είναι οι ζύμες, οι μύκητες και τα κύτταρα θηλαστικών και εντόμων. ^[23]

1.3.2.3 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ένα εξαιρετικό σύστημα για την έκφραση ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Είναι γενικά πολύ καλά χαρακτηρισμένες και παρέχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Είναι ένα φθινό σύστημα έκφρασης καθώς αναπτύσσονται σε απλά μέσα καλλιέργειας, με σχετικά σύντομο κύκλο ανάπτυξης και εμφανίζουν υψηλή παραγωγικότητα. ^[22] Όσον αφορά την παραγωγή της θαυματίνης, έχουν επιτευχθεί αποδόσεις υψηλότερες από 100 mg/L από ζύμη, συμπεραίνοντας έτσι, ότι υπάρχουν περισσότερα ευνοϊκές συνθήκες έναντι άλλων ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών συστημάτων. ^[26] Οι δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες ζύμες για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι οι *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris*.

Το σύστημα έκφρασης *Pichia pastoris* εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ένα από αυτά είναι ο σχετικά γρήγορος χρόνος ανάπτυξης, σε βέλτιστες συνθήκες 60-120 min, και έκφρασης σε απλά μέσα καλλιέργειας. Επιπλέον είναι ανθεκτική και παραμένει το ίδιο παραγωγική σε καλλιέργειες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας. Επιπροσθέτως, επιτρέπει τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη κατά την μεταγραφή και τη μετάφραση. Τέλος η απομόνωση της πρωτεΐνης γίνεται εύκολα, καθώς παρέχει τη δυνατότητα έκκρισης των παραγόμενων πρωτεϊνών απευθείας στο υπερκείμενο, σε ποσοστό περίπου 80 %. Σε συνδυασμό με την περιορισμένη έκφραση ενδογενών εκκριτικών πρωτεϊνών, μπορεί να πραγματοποιηθεί μια γρήγορη και αποδοτική διαδικασία για τον καθαρισμό της ετερόλογης πρωτεΐνης αποφεύγοντας το στάδιο της κυτταρικής λύσης. ^[4] Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων, η ζύμη *P. pastoris*, χρησιμοποιείται εκτενώς ως σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών, ^[3,4,27] ακόμα και στη βιομηχανία. ^[5,28,29]

Ωστόσο, το παρόν ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, κατά τον μετασηματισμό απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες DNA, σε επίπεδο μg, συγκριτικά με ένα βακτηριακό σύστημα που χρειάζεται ποσότητα της τάξης των ng. Ένας άλλος περιορισμός στο σύστημα είναι η παρουσία λίγων διαθέσιμων δεικτών επιλογής για τον μετασηματισμό της *P. pastoris*. Επίσης, οι

ετερόλογες πρωτεΐνες που εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας μπορούν να αποικοδομηθούν από εκκρινόμενες πρωτεάσες της ζύμης. Επιπλέον, εφόσον η μεθανόλη είναι ο επαγωγέας της έκφρασης, η *P. pastoris*. δεν ενδείκνυται για παραγωγή προϊόντων στην βιομηχανία τροφίμων καθώς η μεθανόλη είναι τοξική για τους ανθρώπους.^[4]

Όπως γίνεται κατανοητό, η επιλογή του ξενιστή για την ετερόλογη έκφραση πρωτεΐνης εξαρτάται κάθε φορά από την ίδια την πρωτεΐνη, τη διάθεση ερευνητικού χρόνου και προϋπολογισμού, καθώς και από το σκοπό χρήσης της πρωτεΐνης. Στον Πίνακα 1.2 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των πιο κοινών ξενιστών, *E. coli* και *P. pastoris*.

Πίνακας 1.2. Συνοπτική σύγκριση των συστημάτων έκφρασης *E. coli* και *Pichia pastoris*.^[4]

Σύγκριση συστημάτων ετερόλογης έκφρασης		
Χαρακτηριστικά	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Χρόνος διπλασιασμού	30 min	60-120 min
Μετασηματισμός	10 ⁸ -10 ¹¹ cells/mg of DNA	10 ³ -10 ⁴ cells/mg of DNA
Γενετική διαχείριση	Απλή (σταθεροί πλασμιδιακοί φορείς)	Σύνθετη (λάθη κατά την ένθεση γονιδίου)
Διαφοροποίηση κλώνων	Όχι	3 πιθανοί φαινότυποι MUT
Κόστος μέσου ανάπτυξης	Χαμηλό	Χαμηλό
Επίπεδο έκφρασης	Υψηλό	Χαμηλό-Υψηλό
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	Δε διαθέτει	Γλυκοζυλίωση, Δισουλφιδικοί Δεσμοί, Φωσφορυλίωση
Έκκριση πρωτεΐνης	Στο περίπλασμα	Στο μέσο καλλιέργειας
Ενδογενείς πρωτεΐνες	Μείγμα ενδογενών πρωτεϊνών	Μειωμένη παραγωγή
Καθαρισμός πρωτεΐνης	Κυτταρική λύση	Απομόνωση από υπερκείμενο

2. Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία στελεχών *Pichia pastoris* για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών γλυκιάς γεύσης. Η απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών από τα φυτά προέλευσής τους είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Γι' αυτό και προτείνεται η παραγωγή τους σε κάποιο ετερόλογο σύστημα έκφρασης. Αρχικά δοκιμάστηκε η παραγωγή τους στο πιο δημοφιλές σύστημα έκφρασης, *Escherichia coli*, ωστόσο το επίπεδο παραγωγής των γλυκών πρωτεϊνών ήταν αρκετά χαμηλό,^[21] οπότε κρίθηκε αναγκαία η εύρεση διαφορετικού ξενιστή. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, ο μικροοργανισμός *Pichia pastoris* είναι ένας πολλά υποσχόμενος ξενιστής για την παραγωγή γλυκών πρωτεϊνών και έχει χρησιμοποιηθεί ήδη για την έκφραση θαυματίνης.^[30] Από τις επτά πρωτεΐνες που εξετάστηκαν, οι δύο είναι αποδεδειγμένα γλυκές, η Mab II^[31] και η MNEI^[32], ενώ οι άλλες πέντε, οι Bcr 1, 2 και 3, Aa1 και η Ome είναι υποθετικά γλυκίες και χρειάζεται να γίνει βιολογική δοκιμασία (assay) για να αποδειχθεί η γλυκύτητά τους.

3. Υλικά και μέθοδοι

Τα γονίδια ενδιαφέροντος αγοράστηκαν ως συνθετικά σε πλασμίδια pPIC9K από την εταιρία GeneWiz (Λειψία, Γερμανία).

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου LB χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την εταιρία Riedel de-Haën, εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) από την Condalab και πεπτόνη από την Serva. Για την παρασκευή τρυβλίων Petri με στερεό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε και άγαρ από την Tokyo Chemical Industry (TCI). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες της *E. coli* ήταν η αμπικιλίνη από τη Serva.

Για την παραγωγή χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* TOP10 χρησιμοποιήθηκαν τα χλωριούχο ρουβίδιο ($RbCl_2$), χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2$), οξικό κάλιο (CH_3COOK) από την Alfa Aesar, χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) από τη Scharlau και 3-μορφολινοπροπάνιο-1-σουλφονικό οξύ (MOPS) από τη Serva.

Η απομόνωση πλασμιδίου μεγάλης κλίμακας πραγματοποιήθηκε με το Macherey-Nagel MidPrep Kit της εταιρίας Fisher Scientific UK και η πέψη των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με περιοριστικά ένζυμα SacI και Bgl II με το Buffer fastcut 10X της εταιρίας NIPPON Genetics.

Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν αγαρόζη και Midori Green από τη Nippon Genetics Europe. Το πρότυπο διάλυμα DNA 1 kbps από την NEB (0.5-10.0 kbps) και το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE αποτελείται από τρισαμινομεθάνιο (Tris) της εταιρίας Serva, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) και οξικό οξύ της Sigma-Aldrich. Για το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης από την Fluka.

Ο καθαρισμός του γραμμικού DNA πραγματοποιήθηκε μέσω του NucleoSpin® Gel PCR Clean-up Kit. Το καθαρό γραμμικό DNA, στο τελικό βήμα του καθαρισμού, εκλούστηκε με dH_2O , για να μειωθεί η αλατότητά του και φιλτραρίστηκε με στήλη Macherey-Nagel MiniPrep Kit της εταιρίας Fisher Scientific UK.

Κατά το μετασχηματισμό των κυττάρων της *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκε σορβιτόλη από τη Serva και κυβέτες των 2 mm της εταιρίας Cell Projects.

Για την παρασκευή τρυβλίων Petri με στερεό θρεπτικό υλικό MD-His χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: YNB από την εταιρία Condalab, βιοτίνη και δεξτρόζη από την Serva. Για τα τρυβλία με YPD-Gen χρησιμοποιήθηκε γενιτική από την εταιρία Fluka. Τέλος, για τα τρυβλία MM χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (HPLC grade, 99.9 %) από την Riedel de Haen.

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε εκκινητής 5'AOX1 με αλληλουχία 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' και εκκινητής 3'AOX1 με αλληλουχία 5'-GACTGGTCCAATTGACAAGC-3' από την εταιρία GeneWiz. Το ένζυμο Taq-DNA πολυμεράση με το υπόλοιπο kit αγοράστηκε από την NEB/Bioline.

Για την χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιήθηκε ρητίνη αγαρόζης νιτριλο-οξικού οξέος νικελίου (Ni-NTA agarose resin) από την εταιρία NEB και ιμιδαζόλιο από την Alfa Aesar. Η αφαλάτωση του κλάσματος έκλουσης έγινε με τη χρήση στήλης Desalting Hi-Trap με ρητίνη Sephadex G-25 της εταιρίας GE Healthcare.

Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), Trizma-base και γλυκίνη από την Sigma-Aldrich. Διάλυμα ακρυλαμιδίου/δισακρυλαμιδίου (Acrylamide/Bis) 37.5:1 (30 % w/v), θειικό δωδεκύλιο νάτριο (SDS), υπερθειικό αμμώνιο (APS) και χρωστική Serva Blue G και πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών Unstained Protein Marker (6.5-97.4 kDa) από την εταιρία Serva, Coomassie Brilliant Blue R-250 και 1-βουτανόλη της εταιρίας Merck, μπλε της βρωμοθυμόλης της εταιρίας Fluka και β-μερκαπτοαιθανόλη από την εταιρία Alfa-Aesar.

3.1 Πλασμίδια

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια pPIC9K που περιείχαν τα γονίδια ενδιαφέροντος. Για την προεργασία των εμπορικά διαθέσιμων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα $6000 \times g$, σε θερμοκρασία 4°C για 1 min. Ακολούθως, έγινε προσθήκη 20 μL προθερμασμένου dH_2O σε στείρες συνθήκες και ήπια ανακίνηση για 1-2 s. Τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

3.2 Θρεπτικό Υλικό LB

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν υγρές και στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο Lysogeny Broth (LB), παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού αμικικιλίνη τελικής συγκέντρωσης $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Τα συστατικά για την παρασκευή του υγρού και του στερεού θρεπτικού υλικού LB φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στον κλίβανο στους 120°C αμέσως μετά την παρασκευή του, και η προσθήκη των αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκε όταν το διάλυμα επανήλθε σε θερμοκρασία κάτω από τους 60°C .

Πίνακας 3.1. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή θρεπτικού μέσου LB.

* Προστίθεται μόνο για την παρασκευή στερεού μέσου καλλιέργειας

Συστατικό	Συγκέντρωση (% w/v)	Για 800 mL
Εκχύλισμα ζύμης	0.5	4 g
Τρυπτόνη	1.0	8 g
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)	1.0	8 g
Άγαρ*	1.5	12 g

3.3 Χημειοδεκτικά κύτταρα *E. coli*

Τα χημειοδεκτικά κύτταρα διαθέτουν μεταβαλλόμενα κυτταρικά τοιχώματα μέσω των οποίων το ξένο πλασμιδιακό DNA μπορεί να περάσει πιο εύκολα. Για την παρασκευή των χημειοδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα RF1 (Πίνακας 3.2) και RF2

(Πίνακας 3.3). Μετά την προετοιμασία των διαλυμάτων, το pH ρυθμίστηκε σε 5.8 για το διάλυμα RF1 με χρήση διαλύματος CH₃COOH (0.2 M) και σε pH 7 για το διάλυμα RF2 κάνοντας χρήση διαλύματος NaOH (0.1 M). Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με φίλτρα διαμέτρου 25 mm και μεγέθους πόρων 0.22 μm.

Για την προετοιμασία των χημειοδεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία σε στείρες συνθήκες. Σε 4 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB επώαστηκαν περίπου 50 μL από την επιθυμητή κυτταρική σειρά *E. coli* TOP10 στα 270 rpm, στους 37°C για 16-17 h. Την επόμενη ημέρα, 1 mL από την καλλιέργεια του επιθυμητού στελέχους *E. coli* TOP10, μεταφέρθηκε σε 100 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB και η νέα καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD₆₀₀) να φτάσει σε εύρος τιμών 0.3-0.5. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια επώαστηκε σε πάγο για 15 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3112 x g, σε θερμοκρασία 4°C για 20 min. Στο τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 mL διαλύματος RF1. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ξανά σε πάγο για 15 min. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και αυτή τη φορά το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 mL διαλύματος RF2. Τέλος, το διάλυμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 15 min και το διάλυμα με τα χημειοδεκτικά κύτταρα μοιράστηκε σε δοχεία συλλογής των 1.5 mL με ποσότητα διαλύματος περίπου 50 μL στο καθένα. Τα δοχεία συλλογής των 1.5 mL καταψύχθηκαν με υγρό άζωτο άμεσα κατά τον διαμοιρασμό τους και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

Πίνακας 3.2. Συστατικά και συγκεντρώσεις διαλύματος RF1.

Διάλυμα RF1		
Συστατικά	Συγκέντρωση	Για 70 mL
Χλωριούχο Ρουβίδιο (RbCl)	100 mM	846 mg
Χλωριούχο Μαγγάνιο (MnCl₂)	50 mM	69 mg
Οξικό Κάλιο (CH₃CO₂K)	30 mM	206 mg
Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl₂)	10 mM	77 mg
Γλυκερίνη	15 % (v/v)	12.00 mL

Πίνακας 3.3. Συστατικά και συγκεντρώσεις διαλύματος RF2.

Διάλυμα RF2		
Συστατικά	Συγκέντρωση	Για 15 mL
Χλωριούχο Ρουβίδιο (RbCl)	10 mM	18.1 mg
3-μορφολινοπροπάνιο-1-σουλφονικό οξύ (MOPS)	10 mM	31 mg
Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl ₂)	75 mM	125 mg
Γλυκερίνη	15 % (v/v)	2.60 mL

3.4 Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων

Η διαδικασία του μετασχηματισμού σε *E. coli* πραγματοποιείται προκειμένου ένα πλασμίδιο, που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο, να εισαχθεί στο βακτηριακό σύστημα. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά κύτταρα *E. coli* του στελέχους TOP10. Ο μετασχηματισμός των χημειοδεκτικών κυττάρων στηρίχτηκε στη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock), σύμφωνα με την οποία κατά την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργούνται πόροι στο κυτταρικό τοίχωμα επιτρέποντας στο ξένο DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Κατόπιν η θερμοκρασία μειώνεται, το κυτταρικό τοίχωμα επαναφέρεται στην αρχική κατάσταση και οι πόροι κλείνουν.

Για τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* TOP 10 και την παραγωγή στερεής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία σε στείρες συνθήκες. Αρχικά τα χημειοδεκτικά κύτταρα που φυλάσσονται τους -80°C τοποθετήθηκαν σε πάγο. Έγινε προσθήκη 3 μL πλασμιδίου pPIC9K που φέρει το γονίδιο ενδιαφέροντος. Το διάλυμα αναδεύτηκε ήπια και το μείγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για μέγιστο χρονικό διάστημα 30 min. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε θερμικό σοκ, χωρίς ανάδευση, για ακριβώς 30 s στους 42 °C. Άμεσα, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 2 min και μεταφέρθηκαν σε στείρες συνθήκες, όπου έγινε προσθήκη 1 mL θρεπτικού υλικού LB. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανάδευση στα 300 rpm, σε θερμοκρασία 37 °C για 1 h. Έπειτα, τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 6000 x g, σε θερμοκρασία 4 °C για 2 min και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλίο Petri, που περιείχε στερεό θρεπτικό υλικό LB με αντιβιοτικό αμπικικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 100 μg/mL. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το

μεγαλύτερο μέρος από το υπερκείμενο του μίγματος και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε με το θρεπτικό LB που απέμεινε. Το επαναιώρημα επιστρώθηκε στο τρυβλίο, που επώαστηκε στους 32°C για περίπου 16 h.

3.5 Δημιουργία stock γλυκερίνης

Μετά τον μετασηματισμό των βακτηριακών κυττάρων έγινε παρασκευή καλλιεργείων από μονές αποικίες. Σε στείρες συνθήκες, προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού LB σε δοκιμαστικό σωλήνα και έπειτα 5 mL αμπικιλίνη, ώστε η τελική συγκέντρωση αντιβιοτικού να είναι 100 µg/mL. Έπειτα έγινε επιλογή μίας μονής αποικίας από το τρυβλίο, η οποία εισήχθη σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο με το καπάκι ελαφρώς ανοιχτό, με ανάδευση στα 190 rpm, στους 30 °C για 16-17 h. Την επόμενη ημέρα, έγινε προσθήκη 450 µL υδατικού διαλύματος αποστειρωμένης γλυκερίνης 50 % v/v και 450 µL από την καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε δοχείο συλλογής των 1.5 mL. Τα δείγματα γλυκερίνης αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.6 Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα *E. coli*

Σε στείρες συνθήκες, προστέθηκαν σε κωνική φιάλη 200 mL θρεπτικού υλικού LB, 10 µL από το stock γλυκερίνης μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* TOP10 και 200 µL αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 100 µg/mL. Η κωνική φιάλη επώαστηκε με ανάδευση στα 190 rpm, στους 30°C, για περίπου 24 h. Την επόμενη μέρα έγινε συλλογή των κυττάρων μέσω φυγοκέντρησης στα 6000 x g, στους 4°C, για 15 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των κυττάρων που είχε απομείνει χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση πλασμιδίου εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο του Macherey-Nagel MidPrep Kit της εταιρίας Fisher Scientific UK. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των πλασμιδίων έγινε με μετρήσεις απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο Multiscan SKY της εταιρίας Thermo Scientific.

Στη συνέχεια δείγμα από κάθε πλασμίδιο στάλθηκε για ανάλυση αλληλουχίας ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα εμπορικά πλασμίδια φέρουν την σωστή αλληλουχία για το επιθυμητό γονίδιο. Τα δείγματα προς αλληλούχιση προετοιμάστηκαν με τον εξής τρόπο. Σε στείρες συνθήκες προστέθηκαν σε δοχείο συλλογής των 1.5 mL, 5 µL πλασμιδίου ($C_{\text{τελικό}} = 30\text{-}100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) και 5 µL εκκινητή (primer) συγκέντρωσης 5 pmol/µL. Για κάθε

πλασμίδιο στάλθηκαν δύο δείγματα, ένα με εκκινήτη που υβριδίζεται στην περιοχή 5' του υποκινητή AOX1 (promoter) και ένα με εκκινήτη που υβριδίζεται στην περιοχή 3' του τερματιστή AOX1 (terminator). Αρχικά οι εκκινήτες ήταν λυοφιλοποιημένοι και η ποσότητα τους ήταν 34.9 nmol. Έγινε αραιώση με 349 μL αποστειρωμένο MQ H_2O έτσι ώστε το διάλυμα να έχει συγκέντρωση 0.1 nmol/ μL . Λήφθηκαν 10 μL από το διάλυμα και αραιώθηκαν για δεύτερη φορά μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 200 μL και η τελική συγκέντρωση να είναι 5 pmol/ μL . Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε από την εταιρία GeneWiz.

3.7 Πέψη πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έγινε γραμμικό με την βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Σε στείρες συνθήκες, τοποθετήθηκαν σε δοχείο συλλογής των 200 μL , 5 μg πλασμιδιακού DNA, αποστειρωμένο MQ H_2O , Buffer fastcut 10X και τέλος τα ένζυμα SacI και Bgl II σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μL . Για κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο φτιάχτηκαν τρία δοχεία συλλογής των 200 μL αντίδρασης, ώστε η συνολική ποσότητα δείγματος προς πέψη να είναι 15 μg . Τα δοχεία συλλογής τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή για να επωαστούν στους 37 °C για 3 h.

Πίνακας 3.4. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την πέψη του πλασμιδιακού DNA.

Αντίδραση πέψης					
Πρωτεΐνη	Πλασμίδιο 5 μg (μL)	MQ H_2O (μL)	Buffer fastcut 10X (μL)	Sac I (μL)	Bgl II (μL)
Bcr1	25	16	5	2	2
Bcr2	10	31	5	2	2
Bcr3	12.5	28.5	5	2	2
Aal	36.5	4.5	5	2	2
Ome	17.5	23.5	5	2	2
Mab II	26	25	5	2	2
MNEI	20	21	5	2	2

3.8 Απομόνωση γραμμικού DNA

Για την απομόνωση του επιθυμητού θραύσματος που φέρει το γονίδιο προς έκφραση μετά την αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα, πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η γέλη φτιάχτηκε από διάλυμα με TAE 1X και αγαρόζη 0.8 % w/v. Το διάλυμα αυτό στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, για αυτό τον λόγο πριν την χρήση του είναι απαραίτητη η θέρμανση σε μικροκύματα μέχρι να γίνει πλήρως διαυγές. Από το διαυγές διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν 50 mL και σε αυτά προστέθηκαν 4 μ L της χρωστικής Midori Green. Έπειτα, προστέθηκε το διάλυμα στην ειδική θήκη, τοποθετήθηκε χτενάκι για τη δημιουργία πηγαδιών και το διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει πλήρως.

Στο ενδιάμεσο της αναμονής προετοιμάστηκαν τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν 10 μ L διαλύματος φόρτωσης 6X. Ως πρότυπο για την ένδειξη του μοριακού βάρους των θραυσμάτων χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα DNA με διάφορα μήκη αλληλουχιών 0.5-10.0 kbps. Ποσότητα 1.5 μ L πρότυπου διαλύματος αραιώθηκε με 1.5 μ L διαλύματος φόρτωσης 6X.

Αφού στήθηκε η διάταξη, προστέθηκε στη συσκευή ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X pH 8 μέχρι να καλύψει την γέλη. Σε κάθε πηγαδάκι της γέλης τοποθετήθηκαν 20 μ L δείγματος. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 120 V για 30 min. Τέλος, η γέλη παρατηρήθηκε σε συσκευή Blue light ή UV light.

Πίνακας 3.5. Συστατικά και ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος TAE 50X και διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων ηλεκτροφόρησης.

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X, pH 8		Διάλυμα φόρτωσης 6X	
Συστατικό	Ποσότητα	Συστατικό	Ποσότητα
MQ H ₂ O	225 mL	Μπλε της βρωμοφαινόλης	25 mg
Τρισαμινομεθάνιο (Tris)	60.5 g	Γλυκερίνη	3 mL
Οξικό οξύ 99.8 % v/v	14.25 mL	TAE 50X	2 mL
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ 0.5 M (EDTA)	25 mL	dH ₂ O	5 mL

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψαν τρεις μπάντες, μια στα 7.2 kbps, μια στα 2.4 kbps και μια στα 0.2 kbps. Το γονίδιο ενδιαφέροντος περιέχεται στο θραύσμα 7.2 kbps και για αυτό κόπηκε από το τζελ με τη βοήθεια νυστεριού. Η μπάντα με το επιθυμητό τμήμα μεταφέρθηκε σε δοχείο συλλογής των 2 mL και έπειτα ακολουθήθηκε καθαρισμός του γραμμικού DNA μέσω του NucleoSpin® Gel PCR Clean-up Kit. Τα καθαρά γραμμικά DNA, στο τελικό βήμα του καθαρισμού, εκλούστηκαν με 72 μ L dH₂O, για να μειωθεί η αλατότητα τους και φιλτραρίστηκαν από στήλες Macherey-Nagel MiniPrep Kit της εταιρίας Fisher Scientific UK. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων με φυγοκέντρηση υπό κενό σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα δείγματα παρέμειναν στη συσκευή μέχρι ξηρού, για περίπου 90 min, έπειτα αραιώθηκαν με 10 μ L αποστειρωμένο dH₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των γραμμικών DNA έγινε με μετρήσεις απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο Multiscan SKY της εταιρίας Thermo Scientific.

3.9 Μετασηματισμός σε κύτταρα *P. pastoris* μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Η διαδικασία του μετασηματισμού πραγματοποιήθηκε προκειμένου ο γραμμικός φορέας που φέρει το επιθυμητό γονίδιο να εισαχθεί στο κύτταρο της *P. pastoris*. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *P. pastoris* του στελέχους GS115. Ο μετασηματισμός των κυττάρων βασίστηκε στη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, κατά την οποία η κυτταρική μεμβράνη της ζύμης γίνεται διαπερατή όταν εφαρμόζεται στιγμιαία ηλεκτρικό ρεύμα υψηλής τάσης.

Αρχικά, έγινε προετοιμασία των χημειοδεκτικών κυττάρων της ζύμης. Σε στείρες συνθήκες λήφθηκαν 10 μ L από stock γλυκερίνης 36 % v/v κυττάρων *P. pastoris* και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε 50 mL YPD. Η κωνική επώαστηκε στα 200 rpm, στους 30°C για 16-17 h. Την επόμενη μέρα συλλέχθηκε 1 mL από την καλλιέργεια και τοποθετήθηκε σε νέα κωνική που περιείχε 100 mL YPD. Το μίγμα αφέθηκε να επωαστεί σε ανάδευση 290 rpm, στους 30°C μέχρι το OD₆₀₀ να φτάσει την τιμή 1.

Μόλις η καλλιέργεια έφτασε OD₆₀₀ 1 ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 1400 x g, στους 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε με 50 mL κρύο αποστειρωμένο dH₂O και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες

συνθήκες. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε περίπου 30 mL κρύο dH₂O και έγινε πάλι φυγοκέντρηση. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 mL αποστειρωμένης σορβιτόλης 1 M και φυλάχθηκαν σε πάγο.

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν κυβέτες των 2 mL της εταιρίας Cell Projects και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 min. Σε στείρες συνθήκες, προστέθηκαν σε κυβέτες 80 μL του δείγματος σορβιτόλης-ζύμης και 10 μL γραμμικού πλασμιδιακού φορέα. Οι κυβέτες μεταφέρθηκαν στον ηλεκτροπαραγωγό (electroporator) και εφαρμόστηκε ρεύμα 2500 V. Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία, στα δείγματα προστέθηκε 1 mL από αποστειρωμένο διάλυμα κρύας σορβιτόλης 1 M και μεταφέρθηκε σε δοχείο συλλογής των 15 mL. Πραγματοποιήθηκε επώαση σε 190 rpm, στους 30 °C, για 1 h.

3.10 Στερεή καλλιέργεια MD-His

Η διάκριση των μετασχηματισμένων κυττάρων από τα μη μετασχηματισμένα, στηρίζεται στην ανάπτυξη της ζύμης απουσία ιστιδίνης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα λόγω του γονιδίου HIS-4, που εισήχθη στο γονιδίωμα της ζύμης, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ιστιδίνη, επιβιώνοντας σε περιβάλλον που δε διαθέτει το αμινοξύ.

Μετά το μετασχηματισμό και την επώαση, για κάθε δείγμα προετοιμάστηκαν δύο στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία Minimal Dextrose απουσία ιστιδίνης (MD-His). Παρασκευάστηκε μία αραιή στερεή καλλιέργεια στην οποία επιστρώθηκαν 150 μL δείγματος και μια πυκνή στερεή καλλιέργεια, όπου το υπόλοιπο δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 6000 x g, σε θερμοκρασία 4°C για 2 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα κυττάρων επαναιωρήθηκε με 100 μL σορβιτόλης 1 M και επιστρώθηκε σε τρυβλίο MD-His. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν στους 32°C για 72 h.

Τα συστατικά για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού υλικού MD φαίνονται στον Πίνακα 3.6. Το dH₂O με το άγαρ αποστειρώθηκε στον κλίβανο στους 120 °C. Όταν το διάλυμα επανήλθε κάτω από τους 60 °C προστέθηκαν και τα υπόλοιπα συστατικά.

Το διάλυμα της δεξτρόζης 10X παρασκευάστηκε με 200 g δεξτρόζης που αραιώθηκαν με 1000 mL dH₂O και αποστειρώθηκαν στον κλίβανο στους 120°C.

Το θρεπτικό υλικό YNB 10X παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 6.8 g YNB, που διαλύθηκαν σε 50 mL dH₂O. Ακολούθησε αποστείρωση του διαλύματος με φίλτρα διαμέτρου 25 mm και μεγέθους πόρων 0.22 μm .

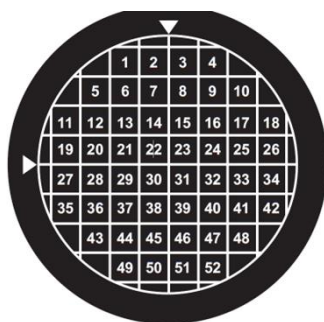
Το διάλυμα της βιοτίνης 500X παρασκευάστηκε με 20 mg βιοτίνης που διαλύθηκαν σε 100 mL αποστειρωμένο dH₂O. Ακολούθησε αποστείρωση με φίλτρα διαμέτρου 25 mm και μεγέθους πόρων 0.22 μm .

Πίνακας 3.6. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή θρεπτικού μέσου MD-His.

Τρυβλία MD-His		
Συστατικό	Συγκέντρωση	Για 1000 mL
dH₂O		800 mL
YNB 10X	10% v/v	100 mL
Βιοτίνη 500X	0.2% v/v	2 mL
Δεξτρόζη 10X	10% v/v	100 mL
Άγαρ	1.5 % w/v	15 g

3.11 Στερεή καλλιέργεια YPD-Gen

Για να γίνει έλεγχος σχετικά με την πολλαπλή ένθεση της κασέτας έκφρασης στο γονιδίωμα της *P. pastoris*, παρασκευάστηκαν τέσσερα τρυβλία MD-άγαρ, που το καθένα περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις γενετικής (YPD-Gen). Κάθε αποικία που εμφανίστηκε στα MD-His τρυβλία συλλέχθηκε σε στείρες συνθήκες και επαναιωρήθηκε σε 40 μL θρεπτικού YPD. Έπειτα το μείγμα μοιράστηκε ισόποσα στα τέσσερα τρυβλία YPD-Gen, τα οποία διαιρέθηκαν όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1. Απεικονίζονται οι επισημασμένες θέσεις στο τρυβλίο YPD-Gen. Κάθε θέση ανήκει σε μια αποικία.

Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στον κλίβανο στους 120°C και η προσθήκη της δεξτρόζης και του αντιβιοτικού της γενιτικίνης σε τελική συγκέντρωση 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL και 4.0 mg/mL έγιναν όταν το διάλυμα επανήλθε κάτω από τους 60°C. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού YPD-Gen γίνεται όπως αναφέρεται στον Πίνακα 3.7. Η παρασκευή του διαλύματος δεξτρόζης 10X αναφέρεται στην ενότητα 3.10.

Πίνακας 3.7. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή θρεπτικού μέσου YPD.* Προστίθεται μόνο για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού.

Τρυβλία YPD-Gen		
Συστατικό	Συγκέντρωση	Για 1000 mL
dH ₂ O	90 % v/v	900 mL
Εκχύλισμα ζύμης	1.0 % w/v	10 g
Πεπτόνη	2.0 % w/v	20 g
Δεξτρόζη 10X	10 % v/v	100 mL
Άγαρ*	2.0 % w/v	20g

3.12 Στερεή καλλιέργεια YPD

Για την αποθήκευση των μετασηματισμένων αποικιών *P. pastoris*, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία YPD. Για το σκοπό αυτό, κάθε αποικία που εμφανίστηκε σε τρυβλίο YPD-Gen συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 2 mg/mL, επαναιωρήθηκε σε 50 μL θρεπτικού μέσου YPD και επιστρώθηκε σε τρυβλίο YPD. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30°C

για 48 ώρες και τελικά φυλάχθηκαν στους 4°C. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού YPD γίνεται όπως αναφέρεται στον Πίνακα 3.7 χωρίς το αντιβιοτικό γενετικίνη.

3.13 Προσδιορισμός φαινοτύπου του μετασηματισμένου στελέχους *P. pastoris* - Σύγκριση ανάπτυξης σε MM και MD θρεπτικό υλικό

Για να προσδιοριστεί ο φαινότυπος ΜUτ για τις αποικίες *P. pastoris* έγινε έλεγχος της ανάπτυξης των αποικιών σε περιβάλλον παρουσία και απουσία μεθανόλης. Λήφθηκαν μεμονωμένοι κλώνοι από τρυβλίο YPD και επαναιωρήθηκαν σε 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 50 mM, pH 7.5. Στη συνέχεια το διάλυμα απλώθηκε ισόποσα σε πιατάκια MD και Minimal Methanol (MM). Επιστρώθηκαν πρώτα τα τρυβλία MM-άγαρ και μετά τα τρυβλία MD-άγαρ για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των τρυβλίων MM με δεξτρόζη. Τα τρυβλία επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και για 48 h παρατηρούνταν ο ρυθμός ανάπτυξης κάθε αποικίας.

Τα συστατικά για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού υλικού MM φαίνονται στον Πίνακα 3.8. Το dH₂O με το άγαρ αποστειρώθηκαν στον κλίβανο στους 120°C. Όταν το διάλυμα επανήλθε κάτω από τους 60°C προστέθηκαν και τα υπόλοιπα συστατικά.

Το διάλυμα της μεθανόλης 10X παρασκευάστηκε με 5 mL μεθανόλης 99.9 % v/v που αραιώθηκαν με 95 mL dH₂O και το διάλυμα αποστειρώθηκε με φίλτρα διαμέτρου 25 mm και μεγέθους πόρων 0.22 μm.

Πίνακας 3.8. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή θρεπτικού μέσου MM.

Τρυβλία MM		
Συστατικό	Συγκέντρωση	Για 1000 mL
dH ₂ O		800 mL
YNB 10X	10 % v/v	100 mL
Βιοτίνη 500X	0.2 % v/v	2 ml
Μεθανόλη 10X	10 % v/v	100 mL
Άγαρ	1.5 % w/v	15 g

3.14 Προσδιορισμός φαινοτύπου του μετασχηματισμένου στελέχους *P. pastoris* - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για να ελεγχθεί αν κατά την ενσωμάτωση του ξένου DNA καταστράφηκε ή έμεινε ακέραιο το γονίδιο του AOX1 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, οι οποίοι προσδένονται στον υποκινητή AOX1 και στον τερματιστή AOX1.

Από επιλεγμένες αποικίες του YPD άγαρ αφαιρέθηκε ένα τμήμα και μεταφέρθηκε σε δοχείο συλλογής των 200 μL , στο οποίο είχαν προηγουμένως προστεθεί 20 μL υδροξειδίου του νατρίου 0.2 M. Πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 99°C σε θερμοκυκλοποιητή για 10 min, ώστε για τη λύση των κυττάρων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 4000 $\times g$ σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Το υπερκείμενο που προέκυψε περιείχε το DNA της ζύμης. Για την ανάλυση PCR, χρησιμοποιήθηκε 1 μL υπερκείμενου. Τα αντιδραστήρια για την αντίδραση της PCR φαίνονται στον Πίνακα 3.9 και οι συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.9. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση PCR.

Μίγμα αντίδρασης PCR	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μL)
dH ₂ O	18.875
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	2.5
Εκκινητής forward 5' AOX1 10 μM	1
Εκκινητής reverse 3' AOX1 10 μM	1
Μείγμα DNA	1
dNTPs 10 mM	0.5
Taq DNA πολυμεράση	0.125

Πίνακας 3.10. Συνθήκες και βήματα για την αντίδραση της PCR. Η Taq πολυμεράση αντιγράφει με ρυθμό 1 kbps/min. Το μήκος του γονιδίου ενδιαφέροντος και του AOX1 είναι συνολικά περίπου 2 kbps, οπότε χρειάστηκαν 2 min για το βήμα της επιμήκυνσης. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης, όπως περιγράφεται στην υποενότητα [3.8](#).

Αντίδραση PCR			
Κύκλοι	Βήμα	Taq DNA πολυμεράση	Χρόνος
1 X	Αποδιάταξη DNA	95 °C	5 min
30 X	Αποδιάταξη DNA	95 °C	30 s
	Υβριδισμός	55 °C	1 min
	Επιμήκυνση	68 °C	2 min
1 X	Επιμήκυνση	68 °C	5 min

3.15 Καλλιέργεια κυττάρων και υπερέκφραση πρωτεϊνών

Η ανάπτυξη των μετασηματισμένων κυττάρων *P. pastoris* GS115 πραγματοποιείται σε περιβάλλον παρουσία γλυκόζης, η οποία αποτελεί πηγή ενέργειας και παράλληλα καταστέλλει την έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου. Η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου επάγεται ελεγχόμενα όταν γίνεται προσθήκη μεθανόλης στο μέσο καλλιέργειας.

Σε στείρες συνθήκες, σε κωνική φιάλη των 250 mL προστέθηκαν 20 mL θρεπτικού υλικού BMGY και μονή αποικία κυττάρων από τρυβλίο YPD. Πραγματοποιήθηκε επώαση στα 170 rpm, στους 30°C, για 24 h.

Την επόμενη μέρα, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας OD₆₀₀ και έπειτα 1 mL από αυτήν προστέθηκε σε νέα κωνική φιάλη των 250 mL που περιέχει 50 mL θρεπτικό μέσο BMMY. Πραγματοποιήθηκε επώαση στα 140 rpm στους 30°C.

Για να πραγματοποιείται σταθερά η έκφραση, η τελική συγκέντρωση μεθανόλης ρυθμιζόταν στο 0.5 % κάθε 24 h με προσθήκη καθαρής αποστειρωμένης μεθανόλης (99.9 % v/v). Η οπτική πυκνότητα των κύριων καλλιεργειών προσδιοριζόταν ανά 24 h. Στις 48 και 96 h λήφθηκαν 20 mL καλλιέργειας, που φυγοκεντρήθηκαν στα 1400 x g,

στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο που περιείχε την πρωτεΐνη φιλτραρίστηκε με φίλτρα 25 mm και μεγέθους 0.45 μm και 0.22 μm και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Τα συστατικά για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού BMGY και BMMY φαίνονται στον Πίνακα 3.11. Το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη διαλύθηκαν σε dH₂O. Έπειτα, το διάλυμα αποστειρώθηκε στον κλίβανο στους 120 °C και μόλις επανήλθε σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν και τα υπόλοιπα συστατικά.

Το διάλυμα της γλυκερίνης 10X παρασκευάστηκε από 100 mL καθαρής γλυκερίνης που αραιώθηκαν με 900 mL dH₂O και τέλος αποστειρώθηκαν στον κλίβανο στους 120°C.

Πίνακας 3.11. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή θρεπτικού μέσου BMGY ή BMMY.

BMGY / BMMY		
Συστατικό	Συγκέντρωση	Για 1000 mL
dH₂O		700 mL
Εκχύλισμα ζύμης	1 % w/v	10 g
Πεπτόνη	2 % w/v	20 g
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 1 M pH 6	10 % v/v	100 mL
YNB 10X	10 % v/v	100 mL
Βιοτίνη 500X	0.2 % v/v	2 mL
Γλυκερίνη 10X / Μεθανόλη 10X *	10 % v/v	100 mL

* Στο διάλυμα BMGY προστίθεται γλυκερίνη 10X, ενώ στο διάλυμα BMMY προστίθεται μεθανόλη 10X.

3.16 Απομόνωση πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας

Η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης, από τις υπόλοιπες που εκκρίνονται από τη ζύμη εξωκυττάρια, πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος υπάρχει μια αλληλουχία με 6 διαδοχικές ιστιδίνες (His), γνωστή ως 6xHis-tag. Μέσω αυτής της αλληλουχίας προσδένεται η πρωτεΐνη στο νικέλιο (Ni) που υπάρχει στο υλικό πλήρωσης στη στήλη Ni-NTA, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν τόσο ισχυρά και εκλούνται.

Αρχικά, έγινε εξισορρόπηση 1-2 mL της ρητίνης Ni-NTA σε δοχείο συλλογής των 15 mL με 10mL ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης για 10 min στους 4°C με αργή ανάδευση. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκε η ρητίνη σε 2000 x g, στους 4 °C για 2 min και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα της καλλιέργειας, που περιέχει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, επώαστηκε με τη ρητίνη στους 4°C με αργή ανάδευση για 1 h. Μετά το πέρας της 1 h, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 2000 x g στους 4°C για 2 min και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Πραγματοποιήθηκε πλύση της ρητίνης με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στους 4°C με ήπια ανάδευση για 10 min και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 2000 x g στους 4°C για 2 min. Αφαιρέθηκε εκ νέου το υπερκείμενο και προστέθηκαν 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης το οποίο κρατήθηκε για να φορτωθεί η ρητίνη στη στήλη. Η μεταφορά της ρητίνης στη στήλη πραγματοποιήθηκε σε ψυκτικό θάλαμο με θερμοκρασία 4°C. Έγινε συλλογή του κλάσματος αδέσμευτων πρωτεϊνών (flowthrough) και πραγματοποιήθηκε έκλυση προσθέτοντας 1-3 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του κλάσματος έκλυσης με σωλήνες φιλτραρίσματος με όριο μοριακού βάρους (MWCO) 3 kDa. Το δείγμα έκλυσης προστέθηκε στο σωλήνα και έγινε φυγοκέντρηση στα 4500 x g, στους 4°C για 15 min. Τέλος, τα δείγματα αφαλατώθηκαν (διαχωρισμός από ιμιδαζόλιο) με τη χρήση στήλης Desalting Hi-Trap σε αυτοματοποιημένο σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν έχουν pH 7.5 και τα συστατικά τους φαίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.12.

Πίνακας 3.12. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην χρωματογραφία συγγένειας.

Διαλύματα χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA			
Συστατικά	Εξισορρόπησης	Έκπλυσης	Έκλυσης
Μίγμα μονόξινου και δισόξινου φωσφορικού καλίου	50 mM	50 mM	50 mM,
Αλάτι (NaCl)	300 mM	300 mM	300 mM
Ιμιδαζόλιο	-	10 mM	300 mM

3.17 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών των πειραμάτων έκφρασης και καθαρισμού, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Αρχικά έγινε το στήσιμο της συσκευής της ηλεκτροφόρησης. Ακολούθησε η παρασκευή του διαλύματος της πηκτής διαχωρισμού, η οποία τοποθετήθηκε ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες μέχρι τα 3/4 του ύψους. Έπειτα, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα 2-προπανόλης πάνω από το μέτωπο του διαλύματος της πηκτής, δημιουργώντας μια στοιβάδα που βοηθάει στην σωστή επιστροφή της πηκτής. Μόλις πολυμερίστηκε η πηκτή διαχωρισμού, απορρίφθηκε η 2-προπανόλη και προστέθηκε το διάλυμα της πηκτής επιστοιβάξης. Άμεσα, τοποθετήθηκε και ένα ειδικό πλαστικό χτενάκι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις φόρτωσης. Μόλις πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός της πηκτής επιστοιβάξης, το χτενάκι αφαιρέθηκε, η συσκευή ηλεκτροφόρησης εισήχθη στο ειδικό δοχείο στο οποίο προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα φόρτωσης 2X, το οποίο αναμίχθηκε με τα δείγματα σε αναλογία 1:1. Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 10 min.

Τα δείγματα φορτώθηκαν στην πηκτή και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση στα 200 V μέχρι το μέτωπο της χρώσης να απομακρυνθεί από την πηκτή, περίπου στα 70 min. Ακολούθως, η πηκτή χρωματίστηκε με διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 για 3 h. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού και οι πρωτεΐνες εμφανίστηκαν ως μπλε ζώνες σε ανοιχτόχρωμο φόντο.

Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που εμφανίζει μπάντες στο εύρος 6.5-97.4 kDa. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την τεχνική της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στους Πίνακες 3.13-3.16.

Πίνακας 3.13. Συστατικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό πηκτής ηλεκτροφόρησης.*Προστέθηκαν λίγο πριν τη φόρτωση στη συσκευή.

Πηκτή ηλεκτροφόρησης		
Συστατικά	Πηκτή διαχωρισμού 12.5 %	Πηκτή επιστοιβάξης 4 %
dH ₂ O	5.33 mL	4.95 mL
Τρισαμινομεθάνιο-HCl 1.5 M, pH 8.8	4 mL	-
Τρισαμινομεθάνιο-HCl 0.5 M, pH 6.8	-	2 mL
Διάλυμα ακρυλαμίδιου/δισ-ακρυλαμίδιο 37.5/1, 30 % w/v	6.67 mL	1.07 mL
Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 % w/v*	80 μL	80 μL
Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)*	8 μL	8 μL

Πίνακας 3.14. Συστατικά και ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10X pH 8.3.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X		
Συστατικά	Συγκέντρωση	Ποσότητες για 1L
Τρισαμινομεθάνιο (Tris)	250 mM	30.30 g
Γλυκίνη	1.93 M	144.10 g
Λαουρυλοθειικό νάτριο (SDS)	1 % w/v	10.00 g

Πίνακας 3.15. Συστατικά και ποσότητες διαλύματος φόρτωσης ηλεκτροφόρησης 2X.

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων ηλεκτροφόρησης 2X		
Συστατικά	Συγκέντρωση	Ποσότητες για 20 mL
Τρισαμινομεθάνιο-HCl 0.1 M pH 6.8	0.12 g	240 mg
Λαουρυλοθειικό νάτριο (SDS)	4 % v/v	0.8 g
β-μερκαπτοαιθανόλη	10 % v/v	1.8 mL
Γλυκερίνη	20 % v/v	4 mL
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0.005 % v/v	12 mg

Πίνακας 3.16. Συστατικά και ποσότητες διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού ηλεκτροφόρησης.

Διαλύματα χρώσης και αποχρωματισμού ηλεκτροφόρησης		
Συστατικά	Ποσότητες διαλύματος χρώσης	Ποσότητες διαλύματος αποχρωματισμού
Κυανό της Coomassie	1 g	-
Μεθανόλη (95% v/v)	450 mL	100 mL
dH ₂ O	450 mL	800 mL
Οξικό οξύ	100 mL	100 mL

4. Αποτελέσματα - Συζήτηση αποτελεσμάτων

4.1 Επεξεργασία πλασμιδιακού φορέα pPIC9K

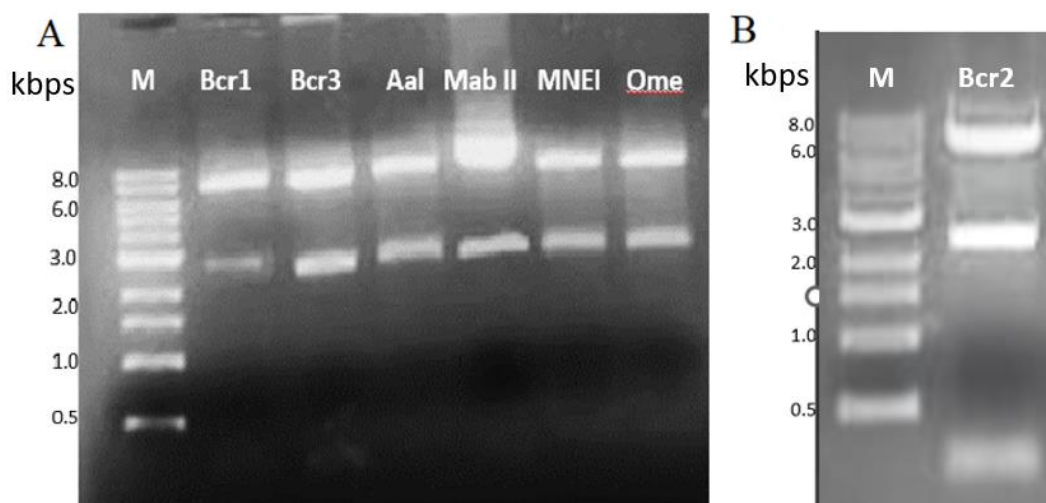
Από υγρές καλλιέργειες LB μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδίων και έγιναν μετρήσεις απορρόφησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείγματος και την καθαρότητά του ως προς τα οργανικά συστατικά και ως προς τις πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας τους λόγους απορρόφησης $A_{260/230}$ και $A_{260/280}$ αντίστοιχα. Οι τιμές του λόγου $A_{260/230}$, για να θεωρηθεί ένα δείγμα DNA καθαρό, είναι συνήθως 2.0-2.2. Αν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8, υποδηλώνει επιμόλυνση που πιθανώς προκαλείται από οργανικές ενώσεις ή άλατα, που απορροφούν στα 230 nm. Αντίστοιχα, οι τιμές του λόγου $A_{260/280}$, για να θεωρηθεί ένα δείγμα DNA καθαρό, είναι συνήθως 1.7–2.0. Εάν ο λόγος είναι χαμηλότερος, υποδηλώνει την παρουσία επιμόλυνσης που απορροφούν έντονα στα 280 nm, όπως κάποιας πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1, τα δείγματα πλασμιδίων έχουν υψηλές συγκεντρώσεις και θεωρούνται αρκετά καθαρά, συνεπώς ακολούθησαν πειράματα πέψης.

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα απομόνωσης πλασμιδίων pPIC9K από *E. coli* με MidPrep Kit σε τελικό όγκο 500 μ L.

Γονίδιο	Συγκέντρωση (ng/ μ L)	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$
Bcr1	210	2.53	2.08
Bcr2	546	2.43	2.10
Bcr3	438	2.46	2.11
Ome	286	2.46	2.10
Aal	137	2.35	2.10
Mab II	193	2.41	2.11
MNEI	249	2.40	2.08

Όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα [1.2.1.1](#), ο πλασμιδιακός φορέας πρέπει να γίνει γραμμικός, ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα εισαγωγής του στον ξενιστή *P. pastoris*. Η πέψη του πλασμιδίου έγινε με τα περιοριστικά ένζυμα Sac I και Bgl II, με την

τελευταία να έχει δύο θέσεις κοπής. Μία φορά στην αρχή του υποκινητή AOX1 (θέση 1 bp) και μία ακόμα φορά στο τέλος της αλληλουχίας της περιοχής του, καθοδικά του γονιδίου AOX1, περίπου στα 7.5 kbps. Η Sac I κόβει εσωτερικά στο 5' άκρο του υποκινητή AOX1, περίπου στα 200 bp. Σύμφωνα με τις θέσεις κοπής, προκύπτουν τρία θραύσματα, ένα μήκους 200 bps, ένα περίπου 2.5 kbps και ένα περίπου 7.2 kbps, το οποίο είναι το επιθυμητό τμήμα που φέρει το γονίδιο ενδιαφέροντος. Όπως παρατηρείται στη γέλη αγαρόζης (Εικόνα 4.1), μετά την πέψη των πλασμιδίων προέκυψαν τρεις μπάντες στο επιθυμητό μήκος, συνεπώς η αντίδραση της πέψης ήταν επιτυχής. Επίσης, σε όλα τα δείγματα δεν παρατηρήθηκε καμία μπάντα κοντά στα 9.8 kbps, που είναι το μέγεθος του αρχικού πλασμιδίου, συνεπώς η πέψη ολοκληρώθηκε στους χρόνους αντίδρασης. Στην Mab II φαίνεται πιο πλατιά η μπάντα στα 7.2 kbps σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αλλά, δεν οφείλεται στην παρουσία αρχικού πλασμιδίου. Η μπάντα στα 200 bps φαίνεται πιο ξεκάθαρα στο δείγμα 7 στην Εικόνα 4.2. Η πρώτη μπάντα, στην οποία ανήκει το τμήμα 7.2 kbps, απομονώθηκε και καθαρίστηκε. Τα αποτελέσματα της απομόνωσης και του καθαρισμού φαίνονται στον Πίνακα 4.2.



Εικόνα 4.1. Πηκτές αγαρόζης μετά την χρήση περιοριστικών ενζύμων Bgl II και Sac I σε πλασμίδια pPIC9K. Χρησιμοποιήθηκε ο marker 1kb DNA Ladder.

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα της απομόνωσης γραμμικού φορέα από γέλη αγαρόζης.

Γονίδιο	Συγκέντρωση (ng/μL)	Ποσότητα (ng)	A _{260/230}	A _{260/280}
Bcr1	71.3	5134	0.102	2.04
Bcr2	49.9	3593	0.0258	2.29
Bcr3	38.7	2786	0.0127	2.72
Ome	37.2	2678	0.0120	1.96
Aal	33.1	2383	0.0657	2.04
Mab II	20.8	1498	0.106	2.15
MNEI	47.6	3427	0.0294	2.09

Παρατηρείται ότι ανακτάται πολύ χαμηλή ποσότητα γραμμικού DNA σε σχέση με αυτή που προστέθηκε αρχικά στην αντίδραση πέψης. Ξεκινώντας από 15 μg πλασμιδίου, η μέγιστη ποσότητα ανάκτησης του τμήματος που φέρει το γονίδιο είναι 10.5 μg. Οι αποδόσεις της απομόνωσης όμως κυμαίνονται στο 14-49 %. Οι χαμηλές αυτές τιμές, πιθανόν να οφείλονται σε μη επαρκή κατακράτηση του DNA από την στήλη καθαρισμού. Επίσης, τα δείγματα εμφανίζουν χαμηλό λόγο A_{260/230} ο οποίος πιθανόν να οφείλεται σε υψηλή συγκέντρωση οργανικών διαλυτών και αλάτων, τα οποία μπορεί να προέρχονται από τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό.

Τα διαλύματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο dH₂O. Τα διαλύματα στη συνέχεια καθαρίστηκαν περαιτέρω με στήλη MiniPrep Kit και εκλούστηκαν με θερμό dH₂O. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού μέσω στήλης από το MiniPrep Kit φαίνονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα καθαρισμού γραμμικών φορέων μέσω στήλης από το MiniPrep Kit.

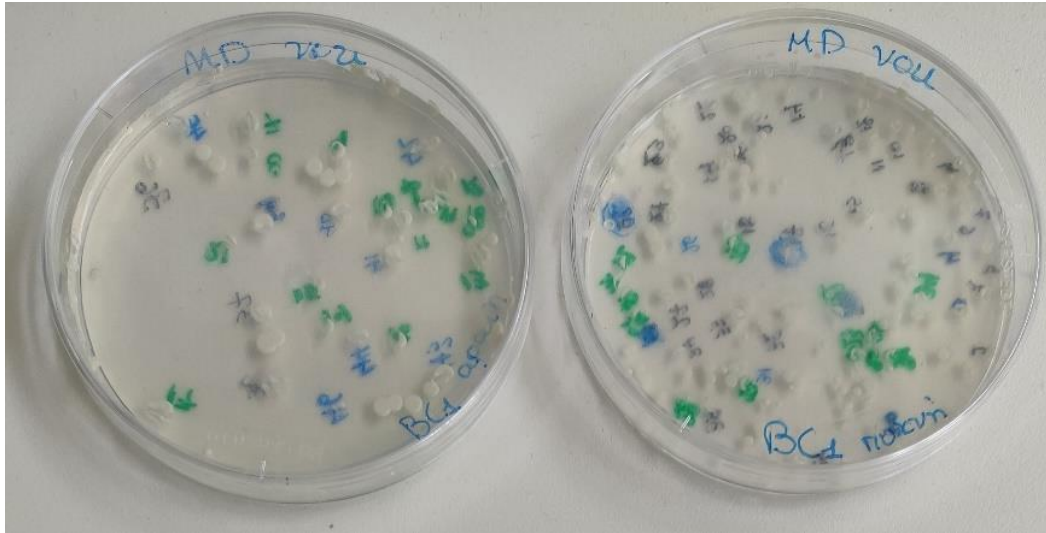
Γονίδιο	Συγκέντρωση (ng/μL)	Ποσότητα (ng)	A _{260/230}	A _{260/280}
Bcr1	12.0	1800	1.84	1.90
Bcr2	10.9	1090	1.63	1.95
Bcr3	2.8	281	0.96	1.69
Ome	9.0	897	1.48	1.77
Aal	14.7	1470	0.68	1.84
Mab II	36.2	3620	1.18	2.18
MNEI	6.0	603	1.69	1.95

Παρατηρώντας τον Πίνακα 4.3 γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι κατά τον καθαρισμό με στήλης MiniPrep Kit χάνεται αρκετή ποσότητα DNA, αλλά αυξάνεται σημαντικά ο λόγος A_{260/230}, συνεπώς μειώθηκε η αλατότητα των δειγμάτων, τα οποία κρίθηκαν πλέον κατάλληλα για μετασχηματισμό. Τα διαλύματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και διαλύθηκαν σε 10 μL αποστειρωμένο dH₂O, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι στο εύρος 0.3-3.5 μg/mL.

4.2 Μετασχηματισμός της *P. pastoris* με γραμμικό φορέα DNA

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης. Ο αναμενόμενος χρόνος διέλευσης ρεύματος τάσης 2.500 V στην κυβέτα είναι 5.3-5.8 ms ωστόσο στα δείγματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3, οι χρόνοι κυμαίνονταν στο 4.2-4.5 ms. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αλατότητα του διαλύματος πλασμιδίων.

Μετά το μετασχηματισμό τα διαλύματα επώαστηκαν σε σορβιτόλη, η οποία αποτελεί πηγή άνθρακα για την ζύμη και δεν επάγει ούτε καταστέλλει τον υποκινητή AOX. Έπειτα το διάλυμα για κάθε γονίδιο διαμοιράστηκε σε τρυβλία MD-His, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 2-4 μέρες και τέλος καταμετρήθηκαν οι αποικίες που εμφανίστηκαν.

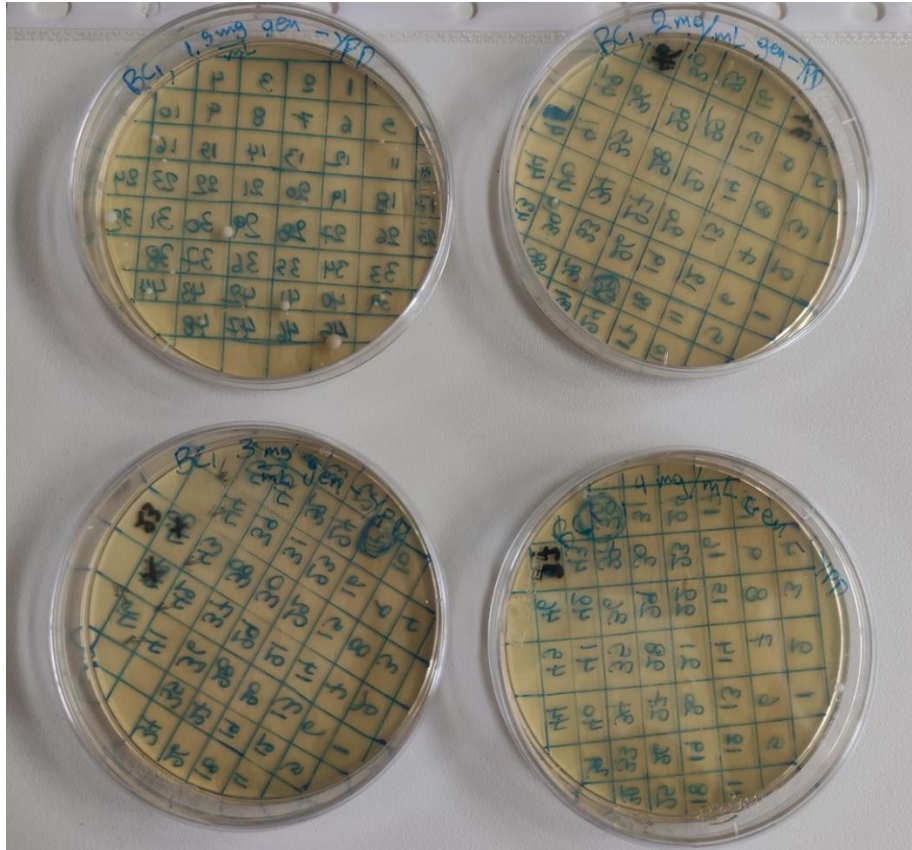


Εικόνα 4.2. Παράδειγμα τρυβλίων MD-His της αραιής (αριστερά) και της πυκνής (δεξιά) στερεής καλλιέργειας Bcr1.

Όσες αποικίες εμφανίστηκαν στα τρυβλία MD-His μεταφέρθηκαν σε τρυβλία YPD-Gen (Εικόνα 4.3.) με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού γενετικής, με σκοπό τον έλεγχο των πολλαπλών ενσωματώσεων του γραμμικού φορέα στο γονιδίωμα της ζύμης. Οι αποικίες που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γενετικής σημαίνει ότι φέρουν περισσότερα αντίγραφα της κασέτας ανασυνδυασμού συγκριτικά με αυτές που αναπτύσσονται αποκλειστικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Παρατηρήθηκε ότι όσες αποικίες εμφανίστηκαν στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γενετικής των 3 και 4 mg/mL άργησαν να αναπτυχθούν συγκριτικά με τις αντίστοιχές τους στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 1.5 και 2 mg/mL. Οι αποικίες με τις οποίες συνεχίστηκαν τα πειράματα φαίνονται στον Πίνακα 4.4.

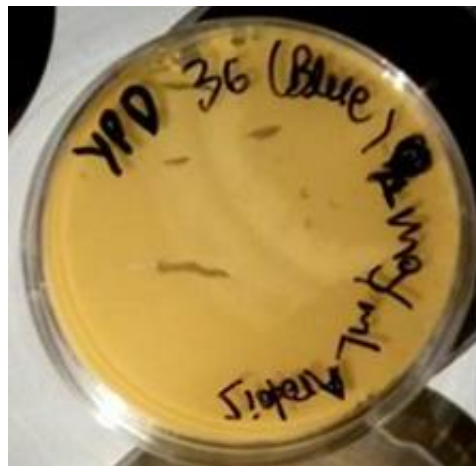
Πίνακας 4.4. Οι αποικίες που επιβιώνουν σε συγκέντρωση αντιβιοτικού ≥ 2 mg/mL.

Γονίδιο	2 mg/mL	3 mg/mL	4 mg/mL
Bcr1	17, 20, 25, 34, 37, 38	20, 37	-
Bcr2	1, 7, 11	-	-
Bcr3	9	-	-
Ome	4	4	4
Aal	31, 36	31	-
Mab II	5, 16	5	-
MNEI	24, 26, 32, 35, 39	24, 39	39



Εικόνα 4.3. Τα τρυβλία YPD-Gen των αποικιών της Bcr1. Στην πάνω σειρά απεικονίζονται τα τρυβλία συγκέντρωσης γενετικής 1.5 mg/mL (αριστερά) και 2 mg/mL (δεξιά), ενώ στην κάτω σειρά φαίνονται των 3 mg/mL (αριστερά) και 4 mg/mL (δεξιά).

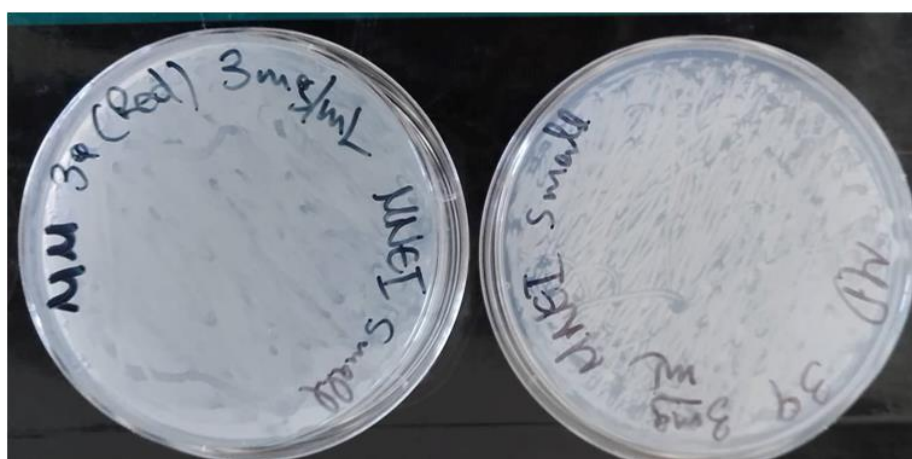
Οι αποικίες που μεγάλωσαν σε τρυβλία με συγκέντρωση γενετικής ≥ 2 mg/mL, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό YPD (Εικόνα 4.4) για αποθήκευση και επωάστηκαν για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 4.4. Τρυβλίο YPD από αποικία της Aal που προέρχεται από τρυβλίο YPD-Gen.

4.3 Προσδιορισμός φαινότυπου των μετασηματισμένων κυττάρων *Pichia pastoris*.

Ο προσδιορισμός του φαινότυπου έγινε για κάθε αποικία που μεταφέρθηκε σε τρυβλίο YPD και παρατηρήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης της σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά MM και MD, παρουσία και απουσία μεθανόλης αντίστοιχα (Εικόνα 4.5). Στο θρεπτικό υλικό MD τα κύτταρα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας τη γλυκόζη, που λειτουργεί ως αναστολέας του γονιδίου AOX1. Στο θρεπτικό υλικό MM τα κύτταρα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας τη μεθανόλη. Σε περίπτωση που το γονίδιο AOX1 δεν έχει καταστραφεί (φαινότυπος MU^+), τα κύτταρα αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό που θα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό με γλυκόζη. Ωστόσο, όταν το γονίδιο AOX1 καταστρέφεται (φαινότυπος MU^s), η ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό μεθανόλης εξαρτάται αποκλειστικά από τον ασθενέστερο υποκινητή AOX2 και γίνεται με πιο αργό ρυθμό απ' ότι σε θρεπτικό παρουσία γλυκόζης.



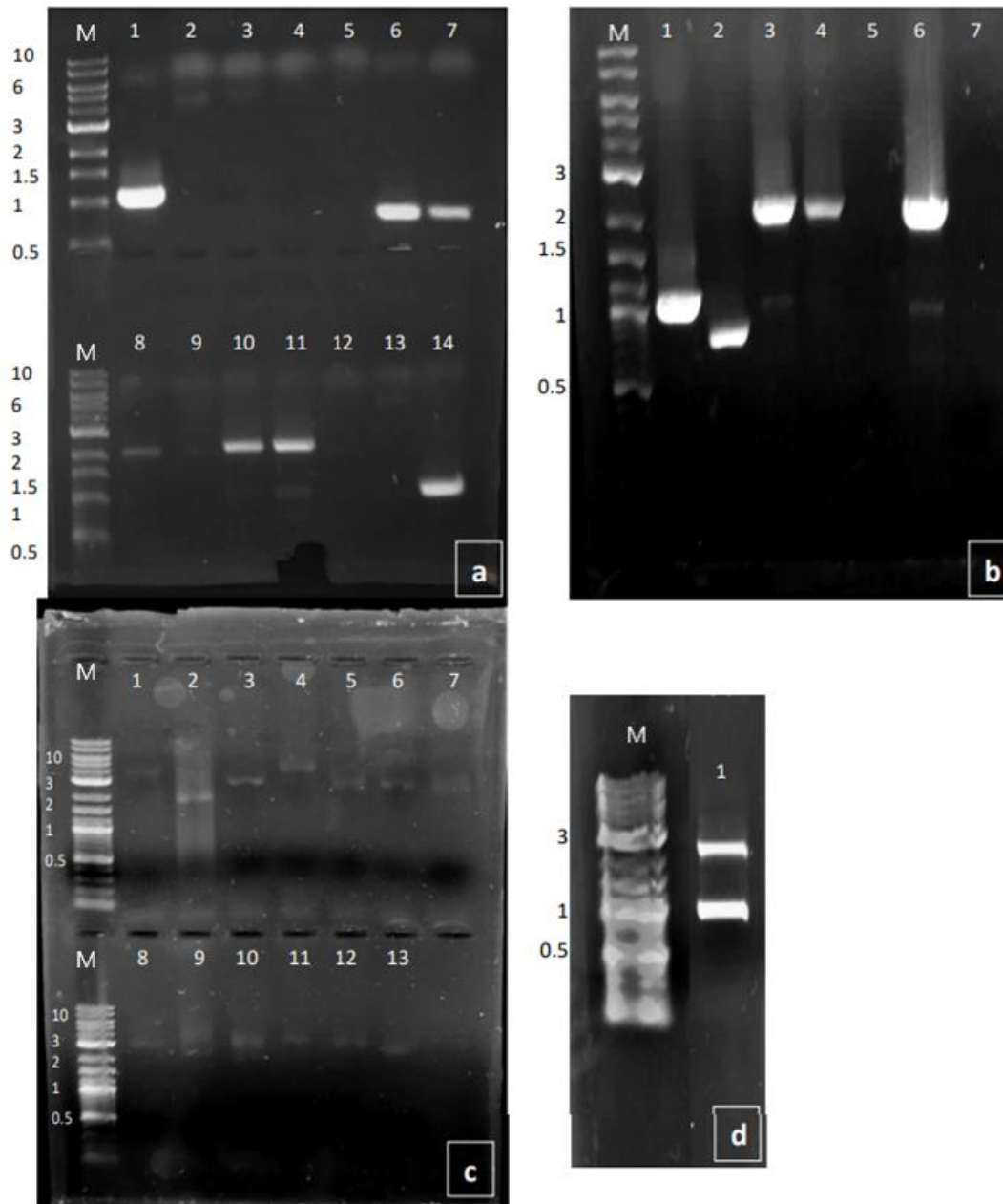
Εικόνα 4.5. Τρυβλία MD στα δεξιά και MM στα αριστερά από αποικία της MNEI.

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα της Εικόνας 4.5, ο ρυθμός ανάπτυξης των αποικιών ήταν ο ίδιος σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ως πηγή άνθρακα είτε γλυκόζη (MD) είτε μεθανόλη (MM). Η αποικία των τρυβλίων πολύ πιθανόν να έχει MU^+ φαινότυπο. Η αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για όλες τις αποικίες που μεγάλωσαν σε τρυβλία YPD-Gen με συγκέντρωση γενετικής ≥ 2 mg/mL. Οι φαινότυποι των αποικιών πιθανολογείται να είναι MU^+ , καθώς δεν παρατηρήθηκε διαφορά στους ρυθμούς ανάπτυξης στα τρυβλία MM και MD.

4.4 Προσδιορισμός γονότυπου των μετασχηματισμένων κυττάρων *Pichia pastoris*.

Για να προσδιοριστεί ο γονότυπος των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται ανάλυση του γονιδιώματος αναφορικά με την παρουσία ή απουσία του γονιδίου AOX1, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων σε 20 μL NaOH 0.2 M. Για την PCR χρησιμοποιήθηκε 1 μL του διαλύματος λύσης και κατάλληλοι εκκινητές 5' AOX1 και 3' AOX1 για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής του υποκινητή AOX1. Σε περίπτωση που το γονίδιο AOX1 δεν έχει καταστραφεί (MUt⁺ φαινότυπος), θα προκύψουν δύο προϊόντα από την PCR. Το πρώτο προϊόν θα οφείλεται στο γονίδιο του AOX1 με μήκος 2.1 kbps, ενώ το δεύτερο προϊόν θα ανήκει στο γονίδιο ενδιαφέροντος με μήκος περίπου 1 kbps. Σε περίπτωση που το γονίδιο AOX1 έχει καταστραφεί (MUt⁻ φαινότυπος), θα προκύψει ένα προϊόν από την PCR, το γονίδιο ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα από την PCR φαίνονται στην Εικόνα 4.6.



Εικόνα 4.6. Γέλη αгарόζης από την PCR των γονιδιωμάτων των μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris*. Χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο 1 kb DNA Ladder (M). **a)** 1.Aal 36, 2.MNEI 24, 3.MNEI 24, 4.MNEI 26, 5.MNEI 26, 6.MNEI 32, 7.MNEI 35, 8.Bcr1 20, 9. Bcr1 37, 10.Bcr1 17, 11.Bcr1 25, 12.Bcr1 34, 13.Bcr1 37, 14.Bcr1 38 **b)** 1.Aal 36, 2.MNEI 32, 3.Bcr1 25, 4.Bcr2 1, 5.Bcr2 7, 6.Bcr2 11, 7.Bcr3 9 **c)** 1.Aal 36, 2.Aal 31, 3.Ome 4, 4.Ome 4, 5.Ome 4, 6.Mab II 16, 7.Mab II 5, 8.MNEI 32, 9.MNEI 39, 10.MNEI 39, 11.Bcr1 25, 12.Bcr2 11, 13.Bcr3 .9 **d)** 1.Mab II 5.

Από τη διερεύνηση του γονότυπου των μετασηματισμένων κυττάρων της *P. pastoris* έγινε ανάθεση του γονότυπου κάθε αποικίας. Σχετικά με την Bcr1, οι αποικίες 17 (Εικόνα 4.6 a10) και 25 (Εικόνα 4.6 a11 και b3) φαίνεται να περιέχουν το γονίδιο του AOX1 (2.1 kbp) και το γονίδιο ενδιαφέροντος (1024 bp). Ο γονότυπος χαρακτηρίζεται ως MUt⁺. Αντιθέτως, η αποικία 38 (Εικόνα 4.6 a14) εμφανίζει μία μόνο μπάντα, κοντά στο 1 kbp η οποία οφείλεται στο γονίδιο της Bcr1. Συνεπώς ο γονότυπος χαρακτηρίζεται ως Mut^s. Στην αποικία 20 εμφανίζεται μόνο η μπάντα του γονιδίου AOX1. Από τη στιγμή όμως που η αποικία αναπτύχθηκε σε περιβάλλον απουσία ιστιδίνης και σε περιβάλλον παρουσία αντιβιοτικού γενετικής 3 mg/mL, το γονίδιο ενδιαφέροντος θεωρείται πως έχει εισαχθεί στο γονιδίωμα, οπότε ενδεχομένως να μην πραγματοποιήθηκε η PCR επιτυχώς. Σε αυτή την περίπτωση, ο γονότυπος θεωρείται MUt⁺. Για τις αποικίες 34 (Εικόνα 4.6 a12) και 37 (Εικόνα 4.6 a9 και a13) δεν εμφανίζεται καμία μπάντα, συνεπώς δεν μπορεί να αποδοθεί γονότυπος.

Αντίστοιχα, για την Bcr2 αποικία 1 (Εικόνα 4.6 b4) εμφανίζεται μόνο το γονίδιο του AOX1, οπότε, όπως και στην περίπτωση της Bcr1 αποικία 20, ο γονότυπος πιθανώς να είναι MUt⁺. Σχετικά με την αποικία 7 (Εικόνα 4.6 b5), δεν εμφανίζεται καμία μπάντα, συνεπώς δεν μπορεί να αποδοθεί γονότυπος. Στην αποικία 11 (Εικόνα 4.6 b6) εμφανίζονται και οι δύο μπάντες, που ανήκουν στο γονίδιο AOX1 και το γονίδιο της Bcr2 (1066 bps), οπότε ο γονότυπος είναι MUt⁺.

Αναφορικά με την Bcr3 αποικία 9 (Εικόνα 4.6 c13) εμφανίζεται μια πολύ αχνή μπάντα γύρω στα 2 kbps, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο AOX1, όμως δεν εμφανίζεται κάποια μπάντα που να αντιστοιχεί στο γονίδιο ενδιαφέροντος (829 bps). Από τη στιγμή όμως που η αποικία αναπτύχθηκε σε περιβάλλον απουσία ιστιδίνης και σε περιβάλλον παρουσία αντιβιοτικού γενετικής 2 mg/mL, το γονίδιο θεωρείται πως έχει εισαχθεί στο γονιδίωμα, οπότε ενδεχομένως να μην πραγματοποιήθηκε η PCR επιτυχώς. Σε αυτή την περίπτωση, ο φαινότυπος θεωρείται MUt⁺.

Ομοίως, στην περίπτωση της Ome (Εικόνα 4.6 c3 και c5) εμφανίζεται η μπάντα του γονιδίου AOX1, όχι όμως του γονιδίου ενδιαφέροντος. Εικάζεται πως και σε αυτήν την περίπτωση η αντίδραση PCR δεν πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και ο φαινότυπος θεωρείται MUt⁺.

Για την AaI αποικία 31 (Εικόνα 4.6 c2) εμφανίζεται η μπάντα του γονιδίου AOX1, οπότε και σε αυτήν την περίπτωση θεωρείται ο γονότυπος MUt⁺. Για την αποικία 36 (Εικόνα 4.6 a1) εμφανίζεται μόνο το γονίδιο ενδιαφέροντος (1075 bp), άρα ο γονότυπος είναι MUt^S.

Για την Mab II αποικία 5 (Εικόνα 4.6 d1) φαίνονται δύο μπάντες, η μία ανήκει στο γονίδιο AOX1, ενώ η χαμηλότερη ανήκει στο γονίδιο της Mab II (935 bp), συνεπώς ο γονότυπος είναι MUt⁺. Για την αποικία 16 (Εικόνα 4.6 c6) εμφανίζεται μία αχνή μπάντα σε μήκος μεγαλύτερο του γονιδίου του AOX1 αλλά και του γονιδίου ενδιαφέροντος, συνεπώς δεν μπορεί να αποδοθεί γονότυπος.

Για την MNEI, οι αποικίες 24 και 26 (Εικόνα 4.6 a2-5) δεν εμφάνισαν καμία μπάντα κατά την PCR, οπότε δεν μπορεί να αποδοθεί γονότυπος. Η αποικία 32 εμφανίζει μία μόνο μπάντα κοντά στο 1 kbp, η οποία οφείλεται στο γονίδιο της MNEI (817 bps, Εικόνα 4.6 a6), αλλά και μία μπάντα μεγαλύτερου μήκους και από του AOX1 (Εικόνα 4.6 c8). Συνεπώς, από τα δύο αποτελέσματα προκύπτει πως ο γονότυπος είναι MUt^S. Η αποικία 35 (Εικόνα 4.6 a7) φαίνεται να περιέχει μία μόνο μπάντα κοντά στο 1 kbp, η οποία οφείλεται στο γονίδιο της MNEI (817 bps), συνεπώς ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται επίσης ως MUt^S. Η αποικία 39 (Εικόνα 4.6 c9) εμφανίζεται μία αχνή μπάντα σε μήκος μεγαλύτερο και από του γονιδίου του AOX1, οπότε δεν μπορεί να αποδοθεί γονότυπος. Οι αποδόσεις των γονότυπων από την PCR φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5. Ο γονότυπος των αποικιών των μετασηματισμένων κυττάρων *P. pastoris*, με βάση την PCR.

Γονίδιο	Γονότυπος MUt ⁺	Γονότυπος MUt ^S	Άγνωστος
Bcr1	17, 20, 25	38	34, 37
Bcr2	1, 11	-	7
Bcr3	9	-	-
Ome	4	-	
AaI	31	36	-
Mab II	-	5	16
MNEI	-	32, 35	24, 26, 39

4.5 Έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών

Σε 20 mL θρεπτικό υλικό BMGY προστέθηκαν μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris* από τρυβλία YPD και επώαστηκαν στους 30°C για 24 h. Έπειτα έγινε μέτρηση του OD₆₀₀ και ένα μέρος των καλλιεργιών μεταφέρθηκε σε 50 mL θρεπτικό υλικό BMMY σε τέτοια ποσότητα ώστε η αρχική οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ στο νέο θρεπτικό υλικό να είναι περίπου 0.2. Το συγκεκριμένο θρεπτικό περιέχει μεθανόλη η οποία λειτουργεί ως επαγωγέας στην έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Έπειτα έγιναν μετρήσεις του OD₆₀₀ ανά 24 h. Τα αποτελέσματα της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ φαίνονται στον Πίνακα 4.6.

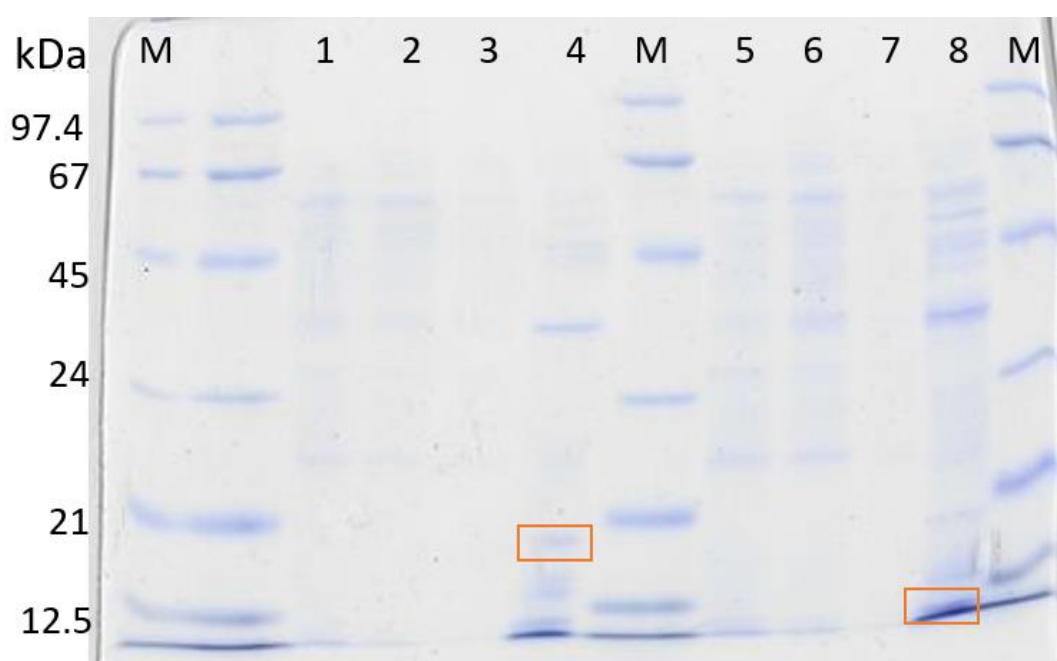
Πίνακας 4.6. Η οπτική πυκνότητα της ζύμης OD₆₀₀ μετά από 24 h σε καλλιέργεια με BMGY και ανά 24h σε καλλιέργεια με BMMY.

Γονίδιο	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀ 24 h	OD ₆₀₀ 48 h	OD ₆₀₀ 72 h	OD ₆₀₀ 96 h
Bcr1 (17)	2.76	16	24.4	28	20
Bcr1 (25)	6.33	12.5	13.4	30	12
Bcr1 (38)	8.15	12	14.4	36	15
Bcr2 (11)	3.33	10.7	19.6	25	23
Bcr3 (9)	10.7	11.2	16	27.2	12
Ome (4)	10.15	13	17	21	12
Aal	10.0	12.5	16	16	16
Mab II (5)	11.65	12.4	16	23.6	12
MNEI (32)	12.8	14	14	18.8	20
MNEI (35)	10.9	12.4	18.4	38	25

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.6, με βάση την οπτική πυκνότητα OD₆₀₀, η ανάπτυξη των περισσότερων μετασχηματισμένων κυττάρων της ζύμης έφτασε σε ένα μέγιστο στις 72 h, εκτός από τις περιπτώσεις των Aal, που έφτασε στις 48 h, και της MNEI 32, που έφτασε στις 96 h. Γενικότερα παρατηρήθηκε μείωση της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ στις 96 h, γεγονός που υποδεικνύει την απόπτωση των κυττάρων.

Στις 48 και 96 ώρες λήφθηκαν δείγματα όγκου 20 mL από τις καλλιέργειες, στα οποία πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.16.

Τέλος, η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Από όλα τα δείγματα, τα μόνα στα οποία πιθανολογείται η ύπαρξη επιθυμητής πρωτεΐνης ήταν σε εκείνες των αποικιών Mab II αποικία 5 και MNEI αποικία 35. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην Εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.7: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE με δείγματα καθαρισμού από την αποικία Mab II (5) και MNEI (35). Με M συμβολίζεται το πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών-δείκτης (Marker). Δείγμα Mab II (17.182 kDa): 1) υπερκείμενο μετά από επώαση με ρητίνη Ni-NTA 2) κλάσμα έκπλυσης 3) κλάσμα έκλουσης 4) κλάσμα αφαλατωμένου δείγματος. Δείγμα MNEI (12.486 kDa): 5) υπερκείμενο μετά από επώαση με ρητίνη Ni-NTA 6) κλάσμα έκπλυσης 7) κλάσμα έκλουσης 8) κλάσμα αφαλατωμένου δείγματος.

Τα δείγματα παρόλο που συμπυκνώθηκαν, παρέμειναν αραιά και αυτό φαίνεται από την χαμηλή ένταση των μπαντών. Στα κλάσματα 4 και 8, μετά την αφαλάτωση και τη συμπύκνωση θα έπρεπε να υπάρχει μόνο μία μπάντα η οποία θα οφειλόταν στην απομονωμένη πρωτεΐνη. Αντιθέτως, παρατηρούνται περισσότερες από μία μπάντες, αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν προσμίξεις, οπότε συμπεραίνεται ότι ο καθαρισμός δεν πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Επίσης, οι μπάντες που ανήκουν στις πρωτεΐνες Mab II

και ΜΝΕΙ θα έπρεπε να είναι πιο έντονες, λόγω υπερέκφρασης, από τις υπόλοιπες μπάντες στο δείγμα που ανήκουν σε ακαθαρσίες.

Τα αποτελέσματα αυτά πιθανολογείται να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες. Πρώτον, τα στελέχη *P. pastoris* που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των δύο πρωτεϊνών είναι φαινότυπου ΜU^{t+} για την Mab II και ΜU^{t5} για την ΜΝΕΙ και οι συνθήκες επαγωγής θα πρέπει να προσαρμοστούν σε αυτούς τους φαινότυπους. Όπως παρατηρήθηκε στις 96 ώρες, στις περισσότερες καλλιέργειες συνέβη κυτταρική απόπτωση, που ίσως οφείλεται στις συνθήκες της καλλιέργειας. Επίσης, ο όγκος της καλλιέργειας έκφρασης είναι μικρός, συνεπώς η βιομάζα και κατ' επέκταση η ποσότητα της εκφρασμένης πρωτεΐνης είναι πολύ μικρή. Ομοίως, η συλλογή των δειγμάτων στις 48 h δεν ενδείκνυται για συλλογή μεγάλης βιομάζας. Είναι πιθανό μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα να μην έχει παραχθεί αρκετή ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και η υπερέκφραση να συμβαίνει αργότερα, στις 72 h. Τέλος, θα πρέπει να διερευνηθεί ακόμα περισσότερο η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τον καθαρισμό, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές απώλειες.

5. Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στη δημιουργία στελεχών *P. pastoris* για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών με γλυκιά γεύση. Δοκιμάστηκαν επτά πρωτεΐνες ως υποψήφια γλυκαντικά, οι Bcr1, Bcr2, Bcr3, Aal, Ome, Mab II και MNEI.

Ο πρώτος στόχος ήταν ο μετασχηματισμός σε *P. pastoris*. Απαιτήθηκε μεγάλη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα pPIC9K και γι' αυτό το λόγο, έγινε αρχικά εισαγωγή των πλασμιδίων με τα διαφορετικά γονίδια ενδιαφέροντος σε κύτταρα *E. coli*. Στη συνέχεια, τα πλασμίδια απομονώθηκαν σε ποσότητες εύρους 1.5-5.0 μg και ακολούθησε κοπή με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II και Sac I ώστε να γίνουν γραμμικά. Οι γραμμικοί φορείς πλέον φέρουν κατάλληλα άκρα συμπληρωματικά ως προς το γονιδίωμα της ζύμης για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός και να εισαχθεί το εκάστοτε γονίδιο ενδιαφέροντος καθοδικά του προαγωγέα AOX1. Αξίζει να σημειωθεί πως οι γραμμικοί φορείς, αν και απομονώθηκαν σε χαμηλή απόδοση (14-49 %) είχαν αρκετά καλή καθαρότητα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα διακρίθηκαν από τα μη σε περιβάλλον απουσία ιστιδίνης, στο οποίο μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν, λόγω του γονιδίου HIS-4 που φέρουν οι γραμμικοί φορείς.

Ο δεύτερος στόχος ήταν ο προσδιορισμός του φαινότυπου και του γονότυπου των μετασχηματισμένων κυττάρων. Αρχικά έγινε ποιοτική διερεύνηση της πολλαπλότητας ένθεσης της κασέτας ανασυνδυασμού. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα της ζύμης αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό διαφορετικής συγκέντρωσης γενετικής. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 mg/mL θεωρείται πως φέρουν πολλαπλά ένθετα του γονιδίου ενδιαφέροντος στο γονιδίωμα. Έπειτα, οι αποικίες αυτές, δοκιμάστηκαν σε περιβάλλον με κύρια πηγή άνθρακα τη μεθανόλη και σε περιβάλλον με κύρια πηγή τη γλυκόζη και η διαφορά στο ρυθμό ανάπτυξης μεταξύ των δύο συνθηκών καθόρισε το φαινότυπο της ζύμης. Οι αποικίες δεν εμφάνισαν διαφορά, οπότε έγινε η υπόθεση ότι πραγματοποιήθηκε ομόλογος ανασυνδυασμός χωρίς την καταστροφή του γονιδίου AOX1, συνεπώς στα μετασχηματισμένα κύτταρα αποδόθηκε ο φαινότυπος MUT⁺. Η επιβεβαίωση αυτή της υπόθεσης έγινε με ανίχνευση των δύο γονιδίων μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα αποτελέσματα

από την PCR έδειξαν ότι σχηματίστηκαν κύτταρα με γονότυπο MUt^+ και MUt^S και κάποιοι γονότυποι δεν ήταν δυνατό να χαρακτηριστούν βάση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων.

Τέλος, δοκιμάστηκε η ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris*. Η επαγωγή της εκάστοτε πρωτεΐνης γίνεται από τον επαγωγέα του γονιδίου AOX1, τη μεθανόλη. Λόγω της ένθεσης του γονιδίου ενδιαφέροντος καθοδικά του γονιδίου AOX1, η επαγωγή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος ρυθμίζεται από τον ίδιο υποκινητή AOX1. Επίσης, λόγω της ύπαρξη σηματοδοτικής αλληλουχίας ανοδικά του γονιδίου ενδιαφέροντος, μετά την έκφραση αναμένεται η έκκριση της πρωτεΐνης στο μέσο καλλιέργειας. Από τα δείγματα έκφρασης των 48 και 96 ωρών, έπειτα από καθαρισμό από το μέσο της καλλιέργειας, φάνηκε πως μόνο οι δύο πρωτεΐνες Mab II και MNEI εκφράστηκαν, αλλά πολύ μικρή ποσότητα, σύμφωνα με την ανάλυση SDS-PAGE.

Για τη βελτιστοποίηση των πειραμάτων έκφρασης προτείνεται η δοκιμή αποικιών τόσο φαινότυπου MUt^S όσο και MUt^+ . Αυτή η διαδικασία ακολουθείται συνήθως στη βιβλιογραφία για να εξεταστεί ποιος από τους δύο φαινότυπους είναι πιο αποδοτικός στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.^[33] Επίσης, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν διαφορετικές στρατηγικές καλλιέργειας *P. pastoris* ώστε να βελτιωθεί η πρωτεϊνική έκφραση. Πρώτον, το θρεπτικό υλικό στις κύριες καλλιέργειες μπορεί να αποτελείται από μίγμα πηγών άνθρακα. Η μεθανόλη είναι απαραίτητη λόγω της επαγωγής στο γονίδιο AOX ενώ σαν δεύτερη πηγή άνθρακα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η σορβιτόλη που δεν καταστέλλει αυτό το γονίδιο. Σύμφωνα με έρευνες, σε καλλιέργεια με τελική συγκέντρωση 2.5 % μεθανόλη και 1 % σορβιτόλη πραγματοποιείται μικρότερη συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών που προκύπτουν από την κατανάλωση μεθανόλης και μεγαλύτερη παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.^[34] Δεύτερον, η θερμοκρασία της καλλιέργειας μπορεί να είναι 20°C αντί 30°C για τη μεγαλύτερη σταθερότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης.^[35] Τέλος, προτείνεται η διακοπή της καλλιέργειας στις 48 h, καθώς σε μεγαλύτερο διάστημα ίσως να πραγματοποιείται πρωτεόλυση από πρωτεάσες του ξενιστή που εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.^[36]

6. Παράρτημα γονιδιακών και αμινοξικών αλληλουχιών

Aal Wild type 573 bp με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGACCCAGAAGCTGTTCCGTTTTGGTCGTCGTAGCGACCAACGTCAGTGGTGGTACGGCACCCGTCGTA
GCAGCAGCATCAGCAGCACCATTAAGCTGAAGCCGACCGCGCTGACCTGCAGCAGCAGCCGTACCCGTTTTCCC
GTATCGTAGCGGTCTGGCGACCCTGCGTCTGGCGCGTAAGGAGTTTCAAGAAAAGCCAGCACCTGCGTGCGTGC
CAGCAATGGATCCGTATGCGTGCGATGAAAACCGCGTTACGGTCTGGGCGTGGACGATGAGCTGGACTTCCAAG
ACGATTTTGAGAACCCGCAAGGTCCGCGAGCAACAGCACCCGCTGCTGCAAAAAGTGTGCAGCGAACTGCACCA
GGAAGAGCCGGTGTGCGTTTTGCCCGACCCTGAAGCAAGCGGCGAAAAGCGGTGCGTCTGCAGGGTCAGCATGGT
CCGTCCAGGCGAGCAAGATTTATCGTACC GCGAAAAACCTGCCGAACGTTTGCAACATCCCGCAGGTGGATG
TTTGCCCGTTTTAAAGCGATTCCGTTCTTTCCGCCGTACTATCTCGAGCACCACCACCACCACCAC-3'

Aal Wild type 191 aa με τερματικό-C 6xHis-tag

MTQKLFREFRRSDQRQWWYGTRRSSSISSTIKLKPTALTSSSRTRFPYRSLATLRLARKEFQESQHLRACQ
QWIRMRAMKPRYGLGVDELDFFDFENPQGPQQQHPLLQKCCSELHQEPEVCVCPTLKQAAKAVRLQGQHGPF
QASKIYRTAKNLPNVCNIPQVDVCPFKAI PFFPPYYLEHHHHHH

Bcr1 Wild type 522 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGAAGCGTAGCGGAGCGTGAGCCTGGACACCTGCCGTACGAAATCAAACGTCTGATTTACGTGGCGA
GCTATGTTGGCGAGGGCGAAGTTCGTAAGCAAAAAGAGTTCAGCAAGCGCAGCACCTGCGTGCGTGCCAGCA
ATGGCTGCACAAGCAAGCGATGCAGAGCGGTAGCGGTCCGAGCTGGACCCTGGATGGCGAGTTCGATTTTGAA
GACGATATGGAGAACCCGCAAAGCCCGCAGCAACGTCCGCCGCTGCTGCAGCAATGCTGCAACGAACTGCACC
AGGAAGAGCCGCTGTGCGTGTGCCCGACCCTGAAAGGTGCGAGCAAGCGGTGAAACAGCAAGTTCGTCAGCA
ACAGGGTCAACAGGGCCAACAGCTGCAACAGGTGATCAGCCGATTTACCAGACCGCGACCCACCTGCCGAAG
GTTTGCAACATCCCGCAAGTGAGCGTTTGCCCGTTTCAGAAAACCATGCCGGGTCCGAGCTATCTCGAGCACC
ACCACCACCACCAC-3'

Bcr1 Wild type μετάφραση 174 aa με τερματικό-C 6xHis-tag

MKRSASVSLDTCRHEIKRLIYVASVYVGEVGRKQKEFQQAQHLRACQQLHKLQAMQSGSGPSWTL DGEFDFED
DMENPQSPQQRPLLQCCNELHQEELVCVCPTLKGASKAVKQVVRQQQGGQQLQQVISRIYQTATHLPKV
CNIPQVSVCPFQKTMPPGPSYLEHHHHHH

Bcr2 Wild type 564 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGGCGAACAAGCTGTTTCTGGTGAGCGCACCCCTGGCGTTCTTTTTCTGCTGACCAACCGGAGCGTGT
ACCGTACCGTGGTTGAGGTTGACGAAGACGATGCACCAACCCGGCGGGTCCGTTTCGTATCCCGAAGTGCCG
TAAAGAATTCAGCAAGCGCAGCACCTGCGTGCGTGCCAGCAATGGCTGCACAAGCAGGCGATGCAAAGCGGT
AGCGGTCCGAGCCTGGCGCTGGCGGGCGAGTTTGATTTGAAAGACGATATGGAGAACCCGAGGGCAGCCAGC
AACGTCCGCCGCTGCTGCAGCAATGCTGCAACAGACTGCACCAGGAAGAGCCGCTGTGCGTTCGCCCGACCCT
GAAAGGTGCGAGCAAGCGGTGAAAAGCCGTGTTTCAGCAACAGGGTCAGATGCAAGGCCAACAGCAACAGCAA
ATCGTGGGCCGTATTTATCAGACCGCAAGCACCTGCCGCGTGTTCGCAACATTCGCAAGTGAGCGTTTGCC
CGTTCGGTAAAACACCCCGGGCCCGTACTATCTCGAGCACCACCACCACCACCAC-3'

Bcr2 Wild type μετάφραση 188 αα με τερματικό-C 6xHis-tag

MANKLFLVSA TLAFFFLLTNASVYRTVVEVDEDDATNPAGPFRI PKCRKEFQQAQHLRACQQWLHKQAMQSGS
GPSLALAGEFD FEDDMENPQGSQQRPLLQCCNELHQE EPLCVCPTLKGASKAVKSRVQQQGGOMQGGQQQQI
VGRIYQTAKHLPRVCNIPQVSVCPFRKTTGPGYYLEHHHHHH

Bcr3 Wild type 327 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGGAGAACCCGCAAAGCCCGCAGCAACGTAGCCCGCTGCTGCAGCAATGCTGCAACGAACTGCACCAGG
AAGAGCCGCTGTGCGTGTGCCCGACCCTGAAGGGTGCAGCAAGGCGGTGAAACAGCAAGTTGCTCAGCAACA
GGGTCAACAGGGCCAACAGCTGCAACAGGTGATCAGCCGTATTTACCAAACCGCGACCCACCTGCCGAAAGTT
TGCAACATCCCGCAAGTGAGCGTTTGCCTGTTTCAAAGACCATGCCGGGTCCGCCGACCCGTTTTCAGACCA
AACCGAGCAGCGTTCGAGCACCACCACCACCACCAC - 3'

Bcr3 Wild type μετάφραση 109 αα με τερματικό-C 6xHis-tag

MENPQSPQQRSP LLQCCNELHQE EPLCVCPTLKGASKAVKQQVRQQQGGQQQLQQVISR IYQTATHLPKVC
NIPQVSVCPFPQKTMGPPTRFQTKPSSVLEHHHHHH

Ome Wild type 376 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGGTGAATCGGGTCAAAGCTGATCAGTTTACGCGCTTGTACGATCC
TGTTTCATAAACACCAGCCCTCGTAACGGCCATCCTTCGCACCGCTGCTGCTCGCCTCCAGGGTCAGACGATAGT
TAACACCCGCAACCCTTGTCTTCCGCAATGGTTCACACGGTTGAAGGTCAGGCCACCCAGCCGGTACGACG
GTTTCATTTCCGCAACCGCCCAACGACCCAGCTCCTGCACGTGCGGATCGTTAATGTCGATTTGCTGCCAGCTG
CCAACGGTCCGCCGGTCCGACCCACGCGCCGCCGCCGAGAACCGCCACGATGGTCACCGCCGCGAACAGCA
GGCTGCTGGTACGC - 3'

Ome Wild type μετάφραση 126 αα με τερματικό-C 6xHis-tag

MRTSSLLFAAVTIVAVLAAAARGATAATVGSWQQIDINDPHVQELGRWAVAEMNRRTGLGGLTFNRVTIAEKQ
VVAGVNYRLTLEASSSGAKDGRYEAVVYEQDRSNARKLISFDPIHLEHHHHHH

Mab II Wild type 432 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGAGCATTAGACCACCGTGATCGAAGTTGACGAGGAAGAGGATAACCAACTGTGGCGTTGCCAGCGTC
AATTCCTGCAGCACCACGCTGCTGCGTGCCTGCCAGCGTTTCATTCACCGTCGTGCGCAGTTTGGTGGCCAACC
GGACGAACTGGAGGATGAAGTGGAGGACGATAACGACGATGAGAACCAACCGCGTCGTCCGGCGCTGCGTCAA
TGCTGCAACCAGCTGCGTCAAGTTGACCGTCCGTGCGTGTGCCGGTTCGCGTCAGGCGGCGCAGCAAGTTC
TGCAGCGTCAAATCATTCAAGGTCCGCAGCAACTGCGTCTGTTTCGATGCGGCGGTAACCTGCCGAACAT
CTGCAACATTCGAACATCGGCACCTGCCCGTTTCGTACCTGGCCGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC - 3'

Mab II Wild type μετάφραση 144 αα με τερματικό-C 6xHis-tag

MSIQTTVIEVDEEEDNQLWRCQRQFLQHQRRLACQRFIHRRAQFGGQPDELEDEVEDDNDNDENQPRR PALRQC
CNQLRQVDRPCVCPVLRQAAQVLRQRI IQGPQQLRRLFDAARNLPNICNIPNIGTCTPFRTPLEHHHHHHH

MNEI Wild type 315 bp DNA με τερματικό-C 6xHis-tag

5' -ATGGGTGAGTGGGAAATCATTGACATCGGTCCGTTCAACCAGAACCTGGGCAAGTTTGCGGTGGATGAGG
AAAACAAAATTGGTCAATACGGCCGTCTGACCTTCAACAAGTTATCCGTCCGTGCATGAAGAAAACCATTTA
TGAGAACGAAGGTTTTTCGTGAGATCAAGGGCTACGAATATCAGCTGTACGTGTATGCGAGCGACAAACTGTTC
CGTGCGGACATTAGCGAGGATTACAAGACCCGTGGTCGTAAACTGCTGCGTTTTAACGGCCCGGTGCCGCCGC
CGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC-3'

MNEI Wild type μετάφραση 105 aa με τερματικό-C 6xHis-tag

MGEWEI IDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLLTFNKVIRPCMKKTIIYENEGFREIKGYEYQLYVYASDKLFR
ADISEDYKTRGRKLLRFNGFVPPPLEHHHHHH

7. Βιβλιογραφία

- [1] Guilliermond A. (1920) *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **36**: 203–211.
- [2] Phaff H.J., Miller M.W. & Shifrine M. (1956) The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie Van Leeuwenhoek* **22**: 145–161.
- [3] Cereghino J.L. & Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microb. Rev.* **24**: 45–66.
- [4] Karbalaee M., Rezaee S.A. & Farsiani H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J. Cell. Physiol.* **235**(9): 5867–5881.
- [5] Cereghino G.P.L., Cereghino J., Ilgen C. & Cregg J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Opin. Biotechnol.* **13**: 329–332.
- [6] Heisting L., Gasser B. & Mattanovich D. (2020) Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. *Microbiology* **166**(7): 614–616.
- [7] Kurtzman C.P. (2009) Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 1435–1448.
- [8] Mattanovich D., Graf A., Stadlmann J. *et al.* (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb. Cell. Fact.* **8**: 29.
- [9] Hartner F.S. & Glieder A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb. Cell. Fact.* **5**: 39.
- [10] Stratton J., Chiruvolu V. & Meagher M. (1998) High cell-density fermentation. *Pichia protocols* (Humana Press) **103**: 107–120.
- [11] Julin D.A. (2018) Plasmid Cloning Vector. In: Wells R.D., Bond J.S., Klinman J. & Masters B.S.S. (eds) *Molecular Life Sciences* (Springer) 925–935.
- [12] Schutter K.D., Lin Y., Tiels P. *et al.* (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **27**: 561–566.
- [13] Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R. *et al.* (1994) Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. *Nat. Biotechnol.* **12**(2): 181–184.
- [14] Li P., Anumanthan A., Gao X.G. *et al.* (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **142**: 105–124.

-
- [15] Cregg J.M. & Russel K.A. (1998) Transformation. *Pichia Protocols* **103**: 27–39.
- [16] White C., Kempf N. & Komives E. (1994) Expression of highly disulfide–bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* **2**(11): 1003–1005.
- [17] Inan M., Aryasomayajula D., Sinha J. & Meagher M.M. (2006) Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* **93**(4): 771–778.
- [18] Belloir, C., Neiers, F., & Briand, L. (2017). Sweeteners and sweetness enhancers. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(4), 279–285.
- [19] Joseph J.A., Akkermans S., Nimmegeers P. & Van Impe J.F.M. (2019). Bioproduction of the Recombinant Sweet Protein Thaumatin: Current State of the Art and Perspectives. *Front. Microbiol.* **10**: 695.
- [20] Margolskee, R. F. (2001). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.* 277, 1–4.
- [21] Lazou T. (2022) In silico and experimental study for the identification of sweet new proteins as additives. [Master thesis]. University of Crete.
- [22] Morini G., Bassoli A. & Temussi P.A. (2005) From small sweeteners to sweet proteins: Anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Medic. Chem.* **48**(17): 5520–5529.
- [23] Demain A.L. & Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**: 297–306.
- [24] Doran P.M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 199–204.
- [25] Firsov A.P., Pushin A.S. & Dolgov S.V. (2016) Transgenic plants as producers of supersweet protein thaumatin II. *Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry* eds Mérillon J. M. and Ramawat K. (Springer) 1–25.
- [26] Masuda T. & Kitabatake N. (2006) Developments in biotechnological production of sweet proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **102**: 375–389.
- [27] Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J. & Higgins D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**: 23–52.
- [28] Weinacker D., Rabert C., Zepeda A.B. *et al.* (2014) Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz. J. Microbiol.* **44**(4): 1043–1048.
- [29] Rabert C., Weinacker D., Pessoa Jr A. & Farías J.G. (2013) Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz. J. Microbiol.* **44**(2): 351–356.

-
- [30] Masuda, T., Tamaki, S., Kaneko, R., et al. (2004). Cloning, expression and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 761–769.
- [31] Liu X., Maeda S., Hu Z. *et al.* (1993) Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, mabinlin II. *Eur. J. Biochem.* **211**: 281–287.
- [32] Inglett G.E. & May J.F. (1969) Serendipity berries: source of a new intense sweetener. *J. Food Sci.* **34**: 408–411.
- [33] Singh A. & Narang A. (2020) The Mut⁺ strain of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) expresses PAOX1 5 and 10 times faster than Mut^s and Mut⁻ strains: evidence that formaldehyde or/and formate are true inducers of PAOX1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**: 7801–7814.
- [34] Azadi S., Mahboubi A., Naghdi N. *et al.* (2017) Evaluation of sorbitol-methanol co-feeding strategy on production of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Ir. J. Pharm. Res.* **16**: 1555–1564.
- [35] Dragosits M., Stadlmann J., Albiol J. *et al.* (2009) The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J. Proteome Res.* **8**: 1380–1392.
- [36] Santoso A., Herawati N. & Rubiana Y. (2012) Effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Makara J. Technol.* **16**: 29–34.