

Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών  
Τμήμα Χημείας



Τομέας Βιοχημείας  
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας



### Πτυχιακή Εργασία

Βιοχημικός χαρακτηρισμός μονοοξυγενασών Baeyer-Villiger και  
βελτιστοποίηση των διεργασιών τους

Μέρτικα Τζέσι (A.M. 2590)

Επιβλέπων: Παυλίδης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

## Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ιωάννη Παυλίδη, ο οποίος με δέχτηκε ως μέλος του εργαστηρίου ενζυμικής τεχνολογίας και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία στο πλευρό του. Ο χρόνος που διέθεσε, η διαρκής καθοδήγηση και οι συμβουλές του, σε συνδυασμό με την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα στην επιτυχή περάτωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταπτυχιακό φοιτήτρια Χαρά Αγγέλη, η οποία στάθηκε δίπλα μου, από την αρχή έως το τέλος, λύνοντας οποιαδήποτε απορία και υποστηρίζοντας κάθε μου βήμα. Η εργατικότητα και η μεθοδικότητά της, η υπομονή και επιμονή της, καθώς και οι γνώσεις που μου μετέδωσε, συνέβαλαν σημαντικά στην εκπαίδευσή μου, αλλά και την ανάπτυξη της κριτικής μου σκέψης. Η προθυμία της να διδάξει και η ανιδιοτελής διάθεση του χρόνου της για τη βελτιστοποίηση πειραματικών τεχνικών και την επίλυση προβλημάτων, μου προσέφεραν άκρως απαραίτητα εφόδια για την μετέπειτα ακαδημαϊκή μου καριέρα.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Νίκο Καλούδη, Βασίλη Τσοπανάκη και Ανδρονίκη Σπανού, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μάνο Χατζάκη, Χριστίνα Μιχαλοπούλου και Κλειώ Ευαγγελάτου και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Νεκταρία Λιακούλη και Κατερίνα Βουγιατζή. Η καθημερινή τους παρουσία κατέστησε το εργαστήριο έναν ευχάριστο χώρο εργασίας, συνεργασίας και ανταλλαγής ευφύων ιδεών και θεωριών.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για τη διαρκή υποστήριξή τους και την ακλόνητη πίστη στις ικανότητές μου. Απέτελεσαν την κινητήριου δύναμή μου και επέδειξαν τη μέγιστη αγάπη, κατανόηση και υπομονή.

## Περίληψη

Οι μονοοξυγενάσες Baeyer-Villiger (BVMOs) τύπου I αποτελούν μέλη της οικογένειας των φλαβοπρωτεϊνικών μονοοξυγενασών, οι οποίες διαθέτουν ως προσθετική ομάδα το φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο (FAD). Καταλύουν, κυρίως, αντιδράσεις εναντιοεκλεκτικής μετατροπής κετονών σε εστέρες ή λακτόνες, εισάγοντας ένα άτομο οξυγόνου δίπλα σε μία κετο-ομάδα του υποστρώματος. Σπανιότερα, καταλύουν σουλφοξειδώσεις, εποξειδώσεις ή οξυγονώσεις ιωιδίων, σεληνίου και βορικών οξέων. Οι BVMOs βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα της βιοϊατρικής, όπου δύναται να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοδιασπώμενων ραμμάτων, εμφυτευμάτων και άλλων πολυμερών ενδιαφέροντος, όμως, η έλλειψη σταθερότητας που τις χαρακτηρίζει καθυστερεί τη χρήση τους σε ευρεία κλίμακα. Συγκεκριμένα, οι BVMOs παρουσιάζουν χαμηλή σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, μεταβολές pH και είναι ευαίσθητες σε οξειδωτικό στρες και οργανικούς διαλύτες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τριών μονοοξυγενασών, από τους μικροοργανισμούς *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas putida* και *Arthrobacter sp.*, καθώς και η βελτιστοποίηση των διεργασιών που σχεδιάζονται με αυτές. Αρχικά, εκφράστηκαν τα ένζυμα, πραγματοποιώντας καλλιέργειες σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3), και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας. Ακολούθως, προσδιορίστηκε η ειδική ενεργότητά τους, η σταθερότητα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συνθήκες pH και τέλος, η σταθερότητά τους παρουσία συνδιαλύτη (DMSO), ακολουθώντας πρωτόκολλο φωτομετρικής αντίδρασης. Στη συνέχεια, με εφαρμογή ορθολογικής μεταλλαξιγένεσης, επιλέχθηκαν σημειακές μεταλλάξεις για τα ένζυμα από *Acinetobacter sp.* και *Pseudomonas putida*, με στόχο την απομάκρυνση, από το ενεργό κέντρο, αμινοξέων που είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Τρία από τα πέντε μεταλλάγματα που δημιουργήθηκαν εκφράστηκαν και, μετρώντας την ειδική τους ενεργότητα, βρέθηκε πως μόνο ένα εξ αυτών διέθετε καταλυτική ικανότητα. Το μετάλλαγμα αυτό χαρακτηρίστηκε, ομοίως με τα ένζυμα φυσικού τύπου, και αποδείχθηκε πως παρουσίαζε βελτιωμένη σταθερότητα. Επιδιώκοντας την περαιτέρω αύξηση της σταθερότητας του μεταλλάγματος, κυρίως σε υψηλότερες θερμοκρασίες, πραγματοποιήθηκε τυχαία μεταλλαξιγένεση, από την οποία προέκυψαν τρεις βιβλιοθήκες μεταλλαγμάτων. Η εργασία ολοκληρώθηκε με τη διεξαγωγή στατιστικής ανάλυσης για τις βιβλιοθήκες και την επιλογή της βέλτιστης βιβλιοθήκης, με σκοπό την αναζήτηση νέων, σταθερότερων μεταλλαγμάτων.

# Περιεχόμενα

Συντομογραφίες.....	1
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>3</b>
1.1 Ένζυμα και βιοκατάλυση .....	3
1.1.1 Ένζυμα.....	3
1.1.2 Βιοκατάλυση .....	3
1.2 Φλαβοπρωτεϊνικές μονοοξυγενάσες (FPMOs).....	5
1.2.1 Κατηγοριοποίηση ενζύμων.....	5
1.2.2 Κατηγοριοποίηση φλαβοπρωτεϊνικών μονοοξυγενασών (FPMOs) .....	5
1.3 Μονοοξυγενάσες Baeyer-Villiger (BVMOs) .....	7
1.3.1 Αντίδραση Baeyer-Villiger (BV).....	7
1.3.2 Αντίδραση μονοοξυγενασών Baeyer-Villiger (BVMOs) .....	8
1.3.3 Μηχανισμός αντίδρασης των BVMOs .....	9
1.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των BVMOs .....	10
1.5 Σταθερότητα BVMOs .....	11
1.6 Πρωτεϊνική μηχανική BVMOs.....	11
1.7 Παραδείγματα BVMOs .....	12
1.7.1 Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από <i>Acinetobacter sp.</i> .....	12
1.7.2 Μονοοξυγενάση 2-οξο-Δ3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλ-CoA από <i>Pseudomonas putida</i> .....	13
.....	14
1.7.3 Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από <i>Arthrobacter sp.</i> .....	14
1.7.4 Εφαρμογές προϊόντων αντιδράσεων BVMOs .....	15
<b>2. Υλικά και μεθοδολογία.....</b>	<b>16</b>
Υλικά .....	16
2.1 Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικού υλικού Luria Bertani (LB).....	16
2.1.1 Παρασκευή τρυβλίων με θρεπτικό υλικό LB .....	17
2.2 Πρωτόκολλο παρασκευής αντιβιοτικών.....	17
2.3 Πρωτόκολλο παρασκευής επαγωγέων έκφρασης γονιδίων .....	17
2.4 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού χημειοδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> .....	17
2.5 Πρωτόκολλο παρασκευής δειγμάτων στελεχών βαθειάς κατάψυξης.....	18
2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού γενετικού υλικού.....	18
2.7 Πρωτόκολλο μέτρησης συγκέντρωσης πλασμιδίου .....	19

2.8 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	19
2.9 Πρωτόκολλο κυτταρικής λύσης με συσκευή υπερήχων .....	20
2.10 Πρωτόκολλο καθαρισμού πρωτεϊνών .....	21
2.11 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών .....	22
2.11.1 Παρασκευή απαραίτητων αντιδραστηρίων για SDS-PAGE .....	22
2.11.2 Παρασκευή πηκτών ηλεκτροφόρησης .....	22
2.12 Πρωτόκολλο προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεΐνης .....	24
2.13 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης ενεργότητας BVMOs .....	24
2.13.1 Πρωτόκολλο παρασκευής υποστρωμάτων κυκλοεξανόνη και δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνη .....	24
2.13.2 Πρωτόκολλο παρασκευής NADPH.....	25
2.13.3 Πρωτόκολλο ενζυμικής αντίδρασης για φωτομετρική μελέτη της ενεργότητας των BVMOs	25
2.14 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης pH προφίλ ενζύμων.....	26
2.15 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης της θερμοσταθερότητας ενζύμων .....	27
2.16 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης σταθερότητας ενζύμων .....	27
2.17 Σχεδιασμός εκκινητών για τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση .....	28
2.18 Πρωτόκολλο τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (site directed mutagenesis PCR) .....	29
2.19 Πρωτόκολλο τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (Error Prone PCR).....	30
2.20 Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων της error prone PCR .....	31
2.21 Πρωτόκολλο υποκλωνοποίησης με τη μέθοδο MEGAWHOP .....	32
2.22 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης DNA.....	32
2.23 Πρωτόκολλο πέψης μητρικών πλασμιδίων με περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI.....	33
2.24 Πρωτόκολλο προετοιμασίας πλασμιδίων για αλληλούχηση .....	33
<b>3. Αποτελέσματα και συζήτηση .....</b>	<b>35</b>
3.1 Βελτιστοποίηση έκφρασης CHMO Arthro με τη χρήση τσαπερονίων .....	35
3.2 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.....	36
3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός BVMOs.....	36
3.3.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός CHMO Acineto.....	37
3.3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός OTEMO .....	39
3.3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός CHMO Arthro.....	42
3.3.4 Σταθερότητα BVMOs παρουσία συνδιαλύτη .....	45
3.4 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.....	46
3.6 Αποτελέσματα αλληλούχησης μεταλλαγμάτων.....	50

3.7 Καλλιέργεια μεταλλαγμάτων.....	50
3.8 Μέτρηση συγκέντρωσης των μεταλλαγμάτων με τη μέθοδο Bradford.....	52
3.9 Μέτρηση ενεργότητας των μεταλλαγμάτων .....	53
3.10 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ΟΤΕΜΟ_C444S .....	54
3.11 Τυχαία μεταλλαξιγένεση .....	58
3.12 Παρασκευή βιβλιοθήκης μεταλλαγμάτων του ΟΤΕΜΟ_C444S .....	60
<b>Συμπεράσματα</b> .....	<b>62</b>
<b>Μελλοντικοί στόχοι</b> .....	<b>62</b>
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>63</b>

## Συντομογραφίες

ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
FMN	Φλάβινο μονονουκλεοτίδιο
FAD	Φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο
FPMOs	Φλαβοπρωτεϊνικές μονοοξυγενάσες
NMOs	Μονοοξυγενάσες που πραγματοποιούν N-υδροξυλιώσεις
FMOs	Μονοοξυγενάσες που περιέχουν φλαβίνη
BVMOs	Μονοοξυγενάσες Baeyer-Villiger
NADH	Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NADPH	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
CHMO Acineto	Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από <i>Acinetobacter sp.</i>
CHMO Arthro	Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από <i>Arthrobacter sp.</i>
OTEMO	Μονοοξυγενάση 2-οξο-Δ3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλ-CoA από <i>Pseudomonas putida</i>
LB	Θρεπτικό υλικό Luria Bertani
OD <sub>600</sub>	Οπτική πυκνότητα μετρημένη στα 600 nm
rpm	Στροφές ανά λεπτό
dH <sub>2</sub> O	Απεσταγμένο νερό
IPTG	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοζίτης
BI	Προ επαγωγής (Before Induction)
AI	Μετά επαγωγής (After Induction)
KPi	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
min	Λεπτά
h	Ώρες
s	Δευτερόλεπτα
°C	Βαθμοί Κελσίου
SDS	Δωδέκυλο θειικό νάτριο
PAGE	Πηκτή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδιου
APS	Υπερθειικό αμμώνιο
TEMED	Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
ABmix	Ακρυλαμίδιο/Δις-ακρυλαμίδιο
BSA	Αλβουμίνη ορού βοοειδών
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
fw	Forward
rv	Reverse

dNTPs	Δεοξυριβονουκλεοτίδια
dTTP	Δεοξυτριφωσφορική θυμίνη
dCTP	Δεοξυτριφωσφορική κυτοσίνη
dATP	Δεοξυτριφωσφορική αδενίνη
dGTP	Δεοξυτριφωσφορική γουανίνη
Abs	Απορροφητικότητα

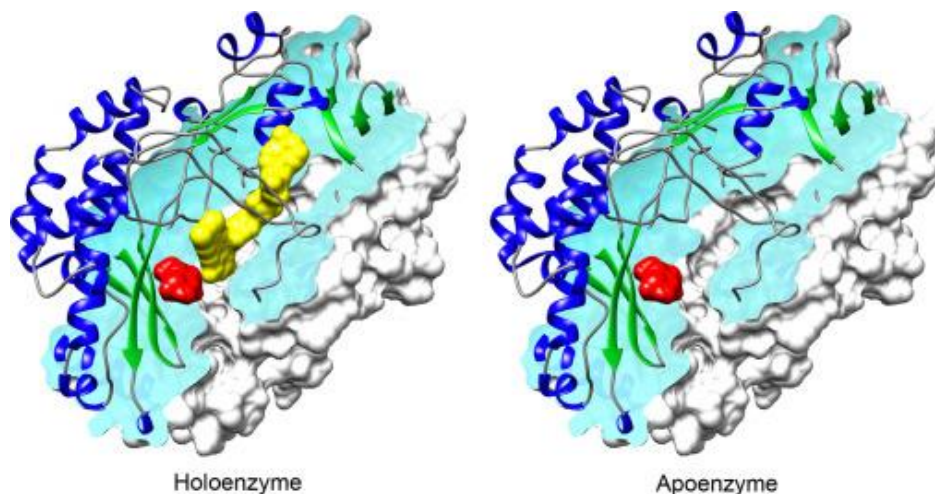


# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ένζυμα και βιοκατάλυση

### 1.1.1 Ένζυμα

Τα ένζυμα αποτελούν κυρίως μόρια πρωτεϊνικής φύσης, με φυσιολογική λειτουργία την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων. Έτσι, συχνά καλούνται βιοκαταλύτες. Η βασική τους λειτουργία στηρίζεται στην επιτάχυνση των αντιδράσεων που καταλύουν, ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης με σκοπό την επίτευξη ισορροπίας συντομότερα. Το κάθε ένζυμο δεν επηρεάζει το σημείο ισορροπίας της αντίδρασης, ενώ επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση με το πέρας της αντίδρασης. Τα ένζυμα, συχνά, δεσμεύουν άλλα μόρια, που συμβάλλουν στη δραστηριότητά τους. Τα μόρια αυτά ονομάζονται συμπαράγοντες. Όταν ο συμπαράγοντας είναι ένα μεταλλικό ιόν ή οργανικό μόριο χαλαρά δεσμευμένο στο ένζυμο, ονομάζεται συνένζυμο. Από την άλλη, όταν βρίσκεται ισχυρά δεσμευμένος στο ένζυμο και δεν απομακρύνεται με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ονομάζεται προσθετική ομάδα. Το σύμπλοκο ενζύμου-συμπαράγοντα ονομάζεται ολοένζυμο, ενώ το ένζυμο ελλείψει του συμπαράγοντα καλείται αποένζυμο και είναι αδρανές, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.1*. Οι ενώσεις στις οποίες επιφέρουν την καταλυτική τους δράση τα ένζυμα ονομάζονται υποστρώματα (1,2).



*Εικόνα 1.1: Οξειδάση της γλυκόζης από Aspergillus niger. Αριστερά φαίνεται το ολοένζυμο με τη γλυκόζη (κόκκινο) και το FAD (κίτρινο) και δεξιά το αποένζυμο © 2017 Elsevier Inc. (2).*

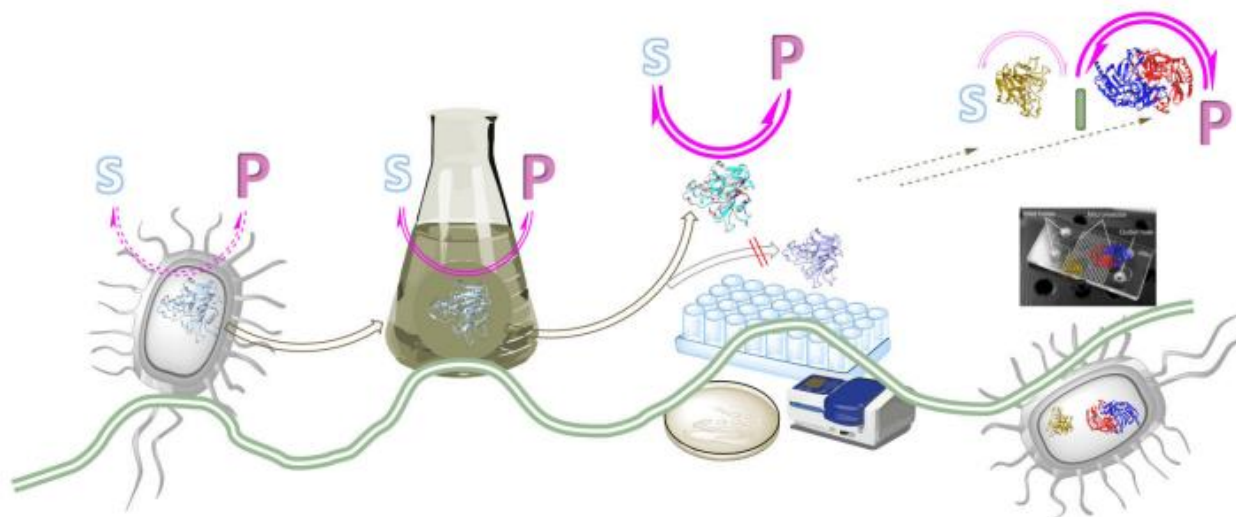
### 1.1.2 Βιοκατάλυση

Κατά τη βιομηχανική παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών και διαδεδομένων χημικών, όπως απορρυπαντικά, συνθετικά λάστιχα και διάφορα άλλα πολυμερή, παράγονται τεράστιες ποσότητες παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα αυτά οφείλονται, κυρίως, στη στοιχειομετρική

χρήση μεταλλικών ιόντων και οργανικών αντιδραστηρίων κατά τη σύνθεση των ζητούμενων ενώσεων. Ειδικά για τις φαρμακευτικές ουσίες, απαιτούνται συνθέσεις πολλών και περίπλοκων βημάτων, χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών και απαιτείται πληθώρα σταδίων απομόνωσης και καθαρισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη σημαντική επιβάρυνση του περιβάλλοντος και την αύξηση του οικονομικού κόστους των τελικών προϊόντων. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να λυθούν εξετάζοντας την κατάλυση ως εναλλακτική. Συγκεκριμένα, στην ανάπτυξη της πράσινης χημείας και τη μείωση του κόστους, μπορούν να συμβάλλουν η ομογενής και η ετερογενής κατάλυση, η οργανοκατάλυση και η βιοκατάλυση (3,4).

Η βιοκατάλυση περιλαμβάνει τη χρήση ενζύμων σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή, με σκοπό την παραγωγή μορίων που παρασκευάζονται, συνήθως, μέσω χημικών αντιδράσεων. Βρίσκει εφαρμογή σε ποίκιλα πεδία, από τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων σε μεγάλες ποσότητες, έως τη σύνθεση επιθυμητών μορίων σε ερευνητικό επίπεδο (5,6).

Προκειμένου να μπορέσει να εφαρμοστεί εκτενώς, η βιοκατάλυση έχει εξελιχθεί μέσω τριών τεχνολογικών κυμάτων. Το πρώτο κύμα ξεκίνησε πριν από έναν αιώνα, όταν οι επιστήμονες συνειδητοποίησαν πως ορισμένα συστατικά ζωντανών κυττάρων, τα ένζυμα, είχαν τη δυνατότητα να πραγματοποιούν σημαντικούς χημικούς μετασχηματισμούς, όπως η παραγωγή (*R*)-μαντελονιτριλίου από βενζαλδεΐδη και υδροκυάνιο, μέσω ενζύμων προερχομένων από φυτά. Φυσικά, κατά την περίοδο εκείνη, οι βιοκαταλύτες δεν είχαν χαρακτηριστεί, επομένως οι παράπλευρες αντιδράσεις, καθώς και η έλλειψη σταθερότητας τους, δεν μπορούσαν να ελεγχθούν. Κατά το δεύτερο κύμα, τη δεκαετία του 1980, έλαβαν χώρα εξελίξεις με τη βοήθεια της πρωτεϊνικής μηχανικής. Οι χημικές τροποποιήσεις και η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση επέτρεψαν τη χρήση περισσότερων υποστρωμάτων και κατά συνέπεια, οδήγησαν στην παρασκευή μεγαλύτερου αριθμού προϊόντων, χρησιμοποιώντας τη βιοκατάλυση. Τέλος, το τρίτο κύμα βιοκατάλυσης, κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1990, συμπεριέλαβε την τυχαία μεταλλαξιγένεση, τον έλεγχο υψηλής απόδοσης, καθώς και τη δημιουργία βιβλιοθηκών γονιδίων, διαδικασία που πλέον καλείται κατευθυνόμενη εξέλιξη. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, η βιοκατάλυση έχει επωφεληθεί σημαντικά από τις εξελίξεις στη μοριακή βιολογία, την αλληλούχηση και τη βιοπληροφορική. Πλέον, είναι εμφανές πως πλησιάζει το τέταρτο κύμα της βιοκατάλυσης, το οποίο προβλέπεται να επιτρέπει την ανακάλυψη καινούριων ενζύμων και τη δημιουργία λειτουργιών, οι οποίες δεν υπάρχουν στη φύση. Τα τέσσερα κύματα της βιοκατάλυσης παρουσιάζονται στην *Εικόνα 1.2* (7,8).



Εικόνα 1.2: Τα τέσσερα κύματα εξέλιξης της βιοκατάλυσης ©2018 Wiley-VHC Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim (7).

## 1.2 Φλαβοπρωτεϊνικές μονοοξυγενάσες (FPMOs)

### 1.2.1 Κατηγοριοποίηση ενζύμων

Τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται σε επτά τάξεις, από τη Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων, σύμφωνα με το είδος των αντιδράσεων που καταλύουν. Οι οξειδοαναγωγάσες αποτελούν την πρώτη τάξη και δρουν μεταφέροντας άτομα οξυγόνου, υδρογόνου ή ηλεκτρόνια μεταξύ μορίων. Η δεύτερη τάξη, οι μεταφοράσες, μεταφέρουν λειτουργικές ομάδες μεταξύ μορίων. Η τρίτη τάξη, οι υδρολάσες, διασπούν δεσμούς με τη συνεισφορά μορίων νερού. Οι λυάσες αποτελούν την τέταρτη τάξη και δρουν αποσπώντας ομάδες, χωρίς την παρουσία νερού. Η πέμπτη τάξη αποτελείται από τις ισομεράσες, οι οποίες καταλύουν ενδομοριακές αναδιατάξεις, ενώ η έκτη τάξη περιλαμβάνει τις λιγάσες, οι οποίες συνενώνουν μόρια καταναλώνοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Τέλος, οι τρανσλοκάσες μεταφέρουν ιόντα ή μόρια μεταξύ μεμβρανών (9).

### 1.2.2 Κατηγοριοποίηση φλαβοπρωτεϊνικών μονοοξυγενασών (FPMOs)

Οι φλαβοπρωτεϊνικές μονοοξυγενάσες ανήκουν στην πρώτη τάξη ενζύμων, είναι, δηλαδή, οξειδοαναγωγάσες. Χρησιμοποιούν, ως προσθετική ομάδα, φλάβινο μονονουκλεοτίδιο (FMN) ή φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο (FAD), με σκοπό την ενεργοποίηση μοριακού οξυγόνου. Η διαδικασία αυτή, συνήθως, πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός ενδιάμεσου μεταξύ της ανηγμένης φλαβίνης και του μοριακού οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα, ενσωματώνεται ένα άτομο οξυγόνου σε κάποιο υπόστρωμα, ενώ το δεύτερο ανάγεται σε μόριο νερού. Με το τρίτο κύμα της βιοκατάλυσης ανακαλύφθηκε πληθώρα FPMOs οι οποίες αναλύθηκαν και

ταυτοποιήθηκαν οι βιοχημικές, δομικές και βιοκαταλυτικές ιδιότητές τους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ομαδοποίησή τους σε οκτώ κατηγορίες (10–12).

Οι FPMOs κατηγορίας A κωδικοποιούνται από ένα γονίδιο και διαθέτουν ισχυρά προσδεδεμένο FAD. Χρησιμοποιούν διουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADH) ή φωσφορικό διουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADPH) ως συνένζυμο, απελευθερώνοντας NADP<sup>+</sup> με την αναγωγή της φλαβίνης. Δρουν κυρίως ως αρωματικές υδροξυλάσες, οξυγονώνοντας ένα ηλεκτρονιακά πλούσιο αρωματικό υπόστρωμα, από το οποίο αποσπάται ένα πρωτόνιο ή κάποια αποχωρούσα ομάδα. Έτσι, λαμβάνεται ως προϊόν ένα υδροξυλιωμένο αρωματικό μόριο (10,11,13).

Οι FPMOs κατηγορίας B κωδικοποιούνται και αυτές από ένα γονίδιο και διαθέτουν ισχυρά προσδεδεμένο FAD ως προσθετική ομάδα. Χρησιμοποιούν αποκλειστικά NADPH ως συνένζυμο, το οποίο διατηρούν προσδεδεμένο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Στην κατηγορία αυτήν περιλαμβάνονται οι Baeyer-Villiger μονοοξυγενάσες (BVMOs) και οι οξυγενάσες ετεροατόμων. Συγκεκριμένα, οι BVMOs αποτελούν την υποκατηγορία B1, οι μονοοξυγενάσες που περιέχουν φλαβίνη (FMOs) την υποκατηγορία B2 και οι μονοοξυγενάσες που πραγματοποιούν N-υδροξυλιώσεις (NMOs), την υποκατηγορία B3. Από τις BVMOs, οι τύπου I καταλύουν την εναντιοεκλεκτική μετατροπή πολλών κετονών σε εστέρες ή λακτόνες. Επιπλέον, αντιδρούν με αλδεΐδες σχηματίζοντας καρβοξυλικά οξέα, πραγματοποιούν σουλφοξειδώσεις, εποξειδώσεις και σπανίως οξυγονώσεις ιωδιδίων, βορικών οξέων ή ενώσεων σεληνίου (10,11,14–16).

Οι FPMOs κατηγορίας C κωδικοποιούνται από πολλαπλά γονίδια και χρησιμοποιούν FMN ως προσθετική ομάδα. Δρουν συνεργιστικά με μια αναγωγή φλαβίνης, καθώς τα ίδια τα ένζυμα δεν έχουν τη δυνατότητα αναγωγής. Η αναγωγή αυτή χρησιμοποιεί NADH ή NADPH ως συνένζυμο. Κύριο παράδειγμα ενζύμων κατηγορίας C αποτελεί η βακτηριακή λουσιφεράση, η οποία είναι και η μόνη FPMO που παράγει φως. Επιπλέον, πραγματοποιούν αντιδράσεις οξυγόνωσης αλκανίων μακριάς αλυσίδας, παράγοντας τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αλκοόλες (10,11,17,18).

Όσον αφορά τις κατηγορίες D, E και F, οι FPMOs κωδικοποιούνται από δύο γονίδια, ένα για την μονοοξυγενάση και ένα για την αναγωγή της φλαβίνης. Ως προσθετική ομάδα διαθέτουν το FAD, το οποίο ανάγεται από την αναγωγή, ενώ ως συνένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί NADH ή NADPH. Η κατηγορία D μπορεί, επιπλέον, να χρησιμοποιήσει FMN ως προσθετική ομάδα, έχει δηλαδή τη δυνατότητα χρήσης δύο προσθετικών ομάδων, κάτι που δεν παρατηρείται σε καμία άλλη κατηγορία. Οι FPMOs κατηγορίας D είναι γνωστές στο φυσικό περιβάλλον για την αποικοδόμηση αλογονοφαινόλων σε μικρόβια, αλλά και για την οξειδωτική αποσουλφονίωση του ευρέως χρησιμοποιούμενου αντιβιοτικού σουλφαμεθοξαζόλη (10,11,19,20).

Οι FPMOs κατηγορίας E αποτελούν, κυρίως, εποξειδάσες και χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες. Η υποκατηγορία E1 περιλαμβάνει τις μονοοξυγενάσες στυρενίου, με προτίμηση σε παράγωγα στυρενίου ως υποστρώματα και η υποκατηγορία E2 περιλαμβάνει τις μονοοξυγενάσες ινδολίου, οι οποίες παρουσιάζουν μέγιστη ενεργότητα καταλύοντας παράγωγα ινδολίου. Σε βιομηχανικό επίπεδο, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις FPMOs κατηγορίας E, διότι τα εποξείδια σε καθарές μορφές εναντιομερών αποτελούν σημαντικά πρόδρομα μόρια για χειρόμορφες ενώσεις (10,11,21).

Η κατηγορία F των FPMOs αποτελείται, ως επί το πλείστον, από αλογονάσες, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τις μονοοξυγενάσες της κατηγορίας A. Οι περισσότερες εξ αυτών καταλύουν αλογονώσεις ινδολίων, πυρολλίων και φαινολών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα δράσης τους αποτελεί η αλογόνωση ενεργοποιημένων αλειφατικών υποστρωμάτων, όπως το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (10,11,22).

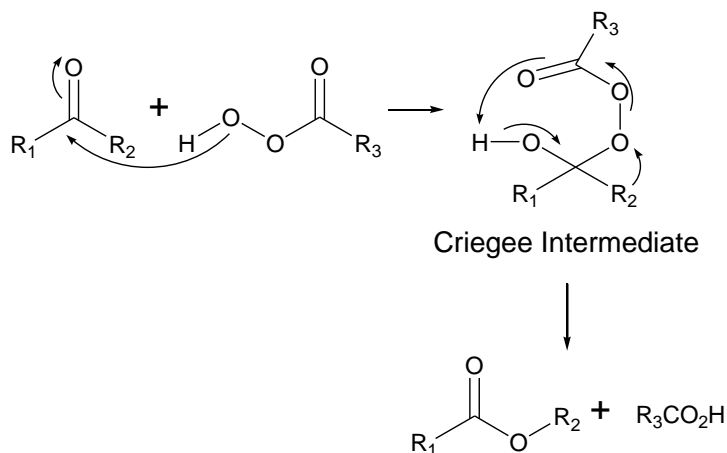
Όσον αφορά τις κατηγορίες G και H των FPMOs, αποτελούνται από ένζυμα τα οποία δεν απαιτούν συνένζυμα, όπως το NADH ή NADPH, αλλά ανάγουν τη φλαβίνη μέσω της οξειδωσης των υποστρωμάτων. Τα ένζυμα αυτά καλούνται εσωτερικές μονοοξυγενάσες. Η κατηγορία G χρησιμοποιεί το FAD ως προσθετική ομάδα και καταλύει, κυρίως, την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων, όπως η αργινίνη, η λυσίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη. Από την άλλη, οι μονοοξυγενάσες της κατηγορίας H καταλύουν οξειδωτικές αποκαρβοξυλίωσεις με μηχανισμό όμοιο με τον αντίστοιχο της κατηγορίας G, αλλά και αντιδράσεις οξειδωτικής απονίτρωσης. Οι αντιδράσεις αυτές, όμως, χρησιμοποιούν μηχανισμό ριζών, γεγονός το οποίο είναι ασυνήθιστο για τις FPMOs (10,11,23).

### 1.3 Μονοοξυγενάσες Baeyer-Villiger (BVMOs)

#### 1.3.1 Αντίδραση Baeyer-Villiger (BV)

Η μετατροπή των κετονών σε εστέρες ή λακτόνες με τη χρήση υπεροξέων ανακαλύφθηκε το 1899 από τους Adolf von Baeyer και Victor Villiger, κατά την εργασία τους στη διάσπαση παραγώγων τερπενοειδών. Συγκεκριμένα, ανέφεραν τη μετατροπή ενώσεων όπως η μενθόνη, η καρβομενθόνη και η καμφορά χρησιμοποιώντας μονοϋπερθειικό κάλιο ( $\text{KHSO}_5$ ), σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, με αποδόσεις έως και 50%. Η αντίδραση αυτή μελετήθηκε εκτενώς και, έπειτα από πολλές δοκιμές, διαπιστώθηκε πως πραγματοποιείται σύμφωνα με τον μηχανισμό Criegee. Αρχικά, λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη προσβολή από το υπεροξύ στο καρβονύλιο, σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, το ενδιάμεσο Criegee. Στη συνέχεια, όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 1.3*, ένας εκ των  $\alpha$  ανθράκων του καρβονυλίου δεσμεύεται στο άτομο οξυγόνου του υπεροξειδίου και απελευθερώνεται η καρβοξυλική ένωση από τον νεοσυντιθέμενο εστέρα. Το βήμα αυτό είναι, συνήθως, εκείνο που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, με την αποχωρούσα ομάδα να διαθέτει σημαντικό ρόλο. Αν ο άνθρακας που

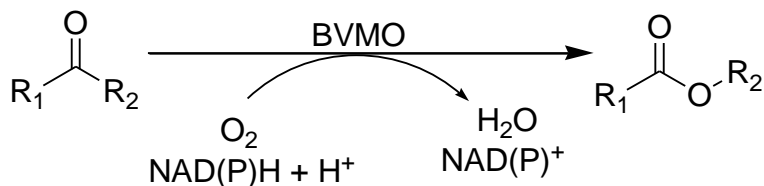
αποχωρεί είναι χειρόμορφος, τότε το προϊόν διατηρεί την στεreoχημεία του, γεγονός που αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα. Στα πλεονεκτήματα συγκαταλέγονται, επίσης, η δυνατότητα οξείδωσης πληθώρας καρβονυλικών υποστρωμάτων και η μη παρεμπόδιση της αντίδρασης από την παρουσία πολλών λειτουργικών ομάδων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά οξειδωτικά μέσα, ενώ είναι δυνατή η πρόβλεψη της στεreoχημείας του προϊόντος, σύμφωνα με την αποχωρούσα ομάδα. Παρόλα αυτά, η αντίδραση Baeyer-Villiger έχει και μειονεκτήματα. Δεν διαθέτει υψηλή χημειοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα, καθώς και ειδικότητα για υποστρώματα. Ακόμα, έχει μικρή απόδοση, ενώ, κατά την πραγματοποίησή της, παράγονται μεγάλοι όγκοι καρβοξυλικών οξέων, οι οποίοι πρέπει να απορρίπτονται ή να ανακυκλώνονται. Τέλος, τα περισσότερα οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται (π.χ. *m*-χλωροϋπεροξυβενζοϊκό οξύ, υπεροξείδιο του υδρογόνου) είναι ακριβά, ασταθή, ευαίσθητα ή και εκρηκτικά σε συμπυκνωμένη μορφή, με αποτέλεσμα η διαδικασία να καθίσταται επικίνδυνη. Οι λόγοι αυτοί φανερώνουν την σημασία της εύρεσης εναλλακτικών τρόπων για την πραγματοποίηση της οξείδωσης Baeyer-Villiger (14,15,24).



Εικόνα 1.3: Μηχανισμός Criegee για την οξείδωση BV.

### 1.3.2 Αντίδραση μονοοξυγενασών Baeyer-Villiger (BVMOs)

Όπως προαναφέρθηκε, οι μονοοξυγενάσες Baeyer-Villiger τύπου I ανήκουν στην κατηγορία Β των φλαβοπρωτεϊνικών μονοοξυγενασών. Αποτελούν φλαβινο-εξαρτώμενες οξειδοαναγωγάσες και καταλύουν την ενζυματική προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου δίπλα σε μια καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος κετόνης. Η γενική αντίδραση που καταλύουν, παρουσιάζεται στην *Εικόνα 1.4*.

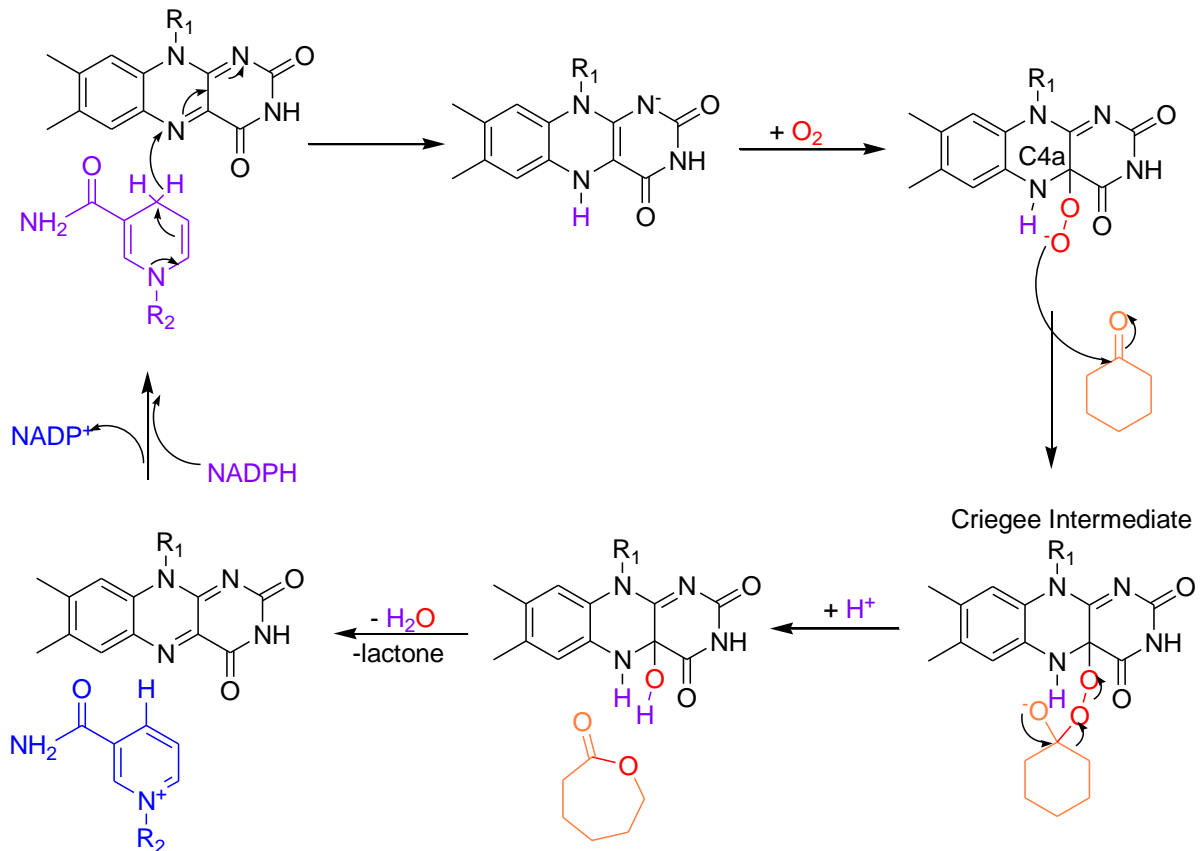


Εικόνα 1.4: Οξείδωση κετόνης σε εστέρα ή λακτόνη, μέσω BVMO καταλυόμενης αντίδρασης.

Το 1976, ο Trudgill και οι συνεργάτες του απομόνωσαν και καθάρισαν τις πρώτες BVMOs. Οι επιστήμονες απέδειξαν ότι αποτελούσαν φλαβοπρωτεΐνες, η οποίες παρουσίαζαν ειδικότητα σε ένα ευρύ φάσμα κετονών ως υποστρώματα και συμμετείχαν στον μεταβολισμό αλκοολών όπως η κυκλοεξανόλη και η κυκλοπεντανόλη και των αντίστοιχων κετονών. Οι BVMOs αυτές ήταν η μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης (CHMO) από το *Acinetobacter sp.* (Acineto) NCIMB 9871 και η μονοοξυγενάση κυκλοπεντανόνης (CPMO) από το *Comamonas sp.* NCIMB 9872. Η πλειονότητα των γνωστών BVMOs σήμερα συμμετέχουν σε καταβολικά μονοπάτια, όπως οι περισσότερες οξυγενάσες (15).

### 1.3.3 Μηχανισμός αντίδρασης των BVMOs

Ο μηχανισμός αντίδρασης των BVMOs τύπου I παρουσιάζει ομοιότητες με τον αντίστοιχο που περιεγράφηκε για τη χημική αντίδραση Baeyer-Villiger. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.5*, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, το FAD ανάγεται από το NADPH. Το παραγόμενο NADP<sup>+</sup> παραμένει προσδεδεμένο στο ενεργό κέντρο κατά τον καταλυτικό κύκλο. Στη συνέχεια, εισέρχεται το μοριακό οξυγόνο στο ενεργό κέντρο και προσδένεται στο C4α άτομο άνθρακα του ανηγμένου FAD. Αυτό οδηγεί στον σχηματισμό ενός αποπρωτονιωμένου υπεροξέος φλαβίνης, το οποίο προσβάλλει πυρηνόφιλα το υπόστρωμα, μόλις εκείνο εισέλθει στο ενεργό κέντρο. Έτσι, προκύπτει το ενδιάμεσο Criegee, το οποίο έχει τετραεδρική δομή και αναδιατάσσεται με τρόπο ώστε να απελευθερωθεί το προϊόν και το μόριο νερού. Κατά την κατάλυση ασύμμετρων υποστρωμάτων, μεταφέρεται στον άνθρακα του καρβονυλίου η πιο υποκατεστημένη ομάδα, καθώς έτσι σταθεροποιείται αποτελεσματικότερα το μερικό θετικό φορτίο που δημιουργείται κατά την αναδιάταξη του ενδιάμεσου. Σε αυτήν την περίπτωση παράγεται το κύριο προϊόν. Όμως, κάποιες φορές, μετακινείται ο λιγότερο υποκατεστημένος άνθρακας, με αποτέλεσμα να παράγεται το δευτερεύον προϊόν. Στην εικόνα παρουσιάζεται η αντίδραση χρησιμοποιώντας την κυκλοεξανόνη ως υπόστρωμα και λαμβάνοντας ε-καπρολακτόνη ως προϊόν (25–27).



Εικόνα 1.5: Μηχανισμός της ενζυμικής αντίδρασης BVMO.

Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου, κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης, το υπεροξύ της φλαβίνης δεν προσβάλλει πυρηνόφιλα το υπόστρωμα, αλλά αποσυντίθεται σε υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό συμβαίνει, όταν η σταθεροποίηση του υπεροξείος από το NADP<sup>+</sup> δεν είναι αρκετή. Έτσι, η κατανάλωση του NADPH δεν αφορά μόνο την παραγωγή προϊόντος, αλλά περιλαμβάνει και την παραγωγή του παραπροϊόντος. Αυτή η παράπλευρη αντίδραση (uncoupling), όταν συμβαίνει, μειώνει την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, αλλά και καταστρέφει το ίδιο το ένζυμο οξειδώνοντας τα αμινοξέα του (25,26).

#### 1.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των BVMOs

Οι BVMOs χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο από την ατμόσφαιρα ως οξειδωτικό μέσο, για την μετατροπή των υποστρωμάτων τους σε λακτόνες ή εστέρες. Έτσι, δεν είναι απαραίτητη η χρήση ακριβών και τοξικών οργανικών ενώσεων για την οξείδωση. Επιπλέον, τα ένζυμα αυτά είναι βιοδιασπώμενα και παράγονται από ανανεώσιμες πηγές, ενώ οι αντιδράσεις που καταλύουν λαμβάνουν χώρα σε ήπιες συνθήκες και θερμοκρασία περιβάλλοντος, μειώνοντας τόσο την επιβάρυνση του περιβάλλοντος, όσο και το κόστος παραγωγής των προϊόντων. Ακόμα, συνήθως, παρουσιάζουν υψηλή χημειοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα ή και



εναντιοεκλεκτικότητα, ενώ δέχονται ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Τέλος, έχουν τη δυνατότητα να οξειδώνουν και ετεροάτομα, όπως θείο, άζωτο, φώσφορο, βόριο ή σελήνιο. Παρόλα αυτά, οι BVMOs δεν είναι σημαντικά διαδεδομένες σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα. Αρχικά, επιδεικνύουν χαμηλή σταθερότητα, κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και σε οξειδωτικό στρες ή οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, η εξάρτησή τους από το NADPH, το οποίο είναι ακριβό, γεννά την ανάγκη για φθηνή και αποτελεσματική αναγέννησή του. Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις, όπου, κάποιες BVMOs, παρουσιάζουν χαμηλή τοποεκλεκτικότητα ή περιορισμένο εύρος υποστρωμάτων, γεγονός που απαιτεί την γενετική τροποποίησή τους πριν κριθούν κατάλληλες για τις απαιτούμενες καταλύσεις (15,25,28,29).

### 1.5 Σταθερότητα BVMOs

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους λόγους για τους οποίους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορισμένες BVMOs σε μεγάλη κλίμακα, αποτελεί η έλλειψη σταθερότητας τους. Συγκεκριμένα, οι BVMOs είναι ευαίσθητες παρουσία οργανικών διαλυτών και χάνουν ταχύτατα την ενεργότητά τους παρουσία συνδιαλυτών, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο, η μεθανόλη και η αιθανόλη. Επιπλέον, ελαττώνεται σημαντικά η καταλυτική τους ικανότητα όταν βρεθούν σε όξινα ή βασικά διαλύματα, αλλά και σε υψηλές θερμοκρασίες, διατηρώντας τη σταθερότητά τους μόνο κάτω των 30 °C. Ακόμα, είναι επιρρεπείς σε οξειδωτικό στρες. Ορισμένοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα είναι ακτινοβολίες, όπως ακτίνες X και υπεριώδες φως, οξειδωτικά που σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των κυττάρων, όπως υπεροξεία, υποχλωριώδες οξύ και οξυγόνο απλής κατάστασης αλλά και ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου. Ο σημαντικότερος εξ αυτών αποτελεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα πλέον ευαίσθητα στην οξείδωση αμινοξέα είναι η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη, η μεθειονίνη και η κυστεΐνη. Η οξείδωση μπορεί να λάβει χώρα στο ενεργό κέντρο, στον κύριο κορμό των ενζύμων, αλλά και στις πλευρικές αλυσίδες. Ως αποτέλεσμα, τα ένζυμα χάνουν τμήμα της καταλυτικής του ικανότητας ή, σε περιπτώσεις εκτεταμένης οξείδωσης, καθίστανται μη λειτουργικά (30–33).

### 1.6 Πρωτεϊνική μηχανική BVMOs

Η πρωτεϊνική μηχανική περιλαμβάνει την τροποποίηση της δομής μιας υπάρχουσας πρωτεΐνης, με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων της. Αρχικά, η πρωτεϊνική μηχανική σήμαινε ορθολογιστικό σχεδιασμό, χρησιμοποιώντας μοντέλα, δομικές και μηχανιστικές πληροφορίες. Ο σχεδιασμός αυτός αποσκοπούσε στην πραγματοποίηση δομικών αλλαγών, οι οποίες θα επέφεραν τις επιθυμητές ιδιότητες σε ένα ένζυμο. Πλέον, όμως, με την εξέλιξη των υπάρχόντων τεχνικών και την ανακάλυψη νέων, η πρωτεϊνική μηχανική ακολουθεί διαφορετικές διαδικασίες, σύμφωνα

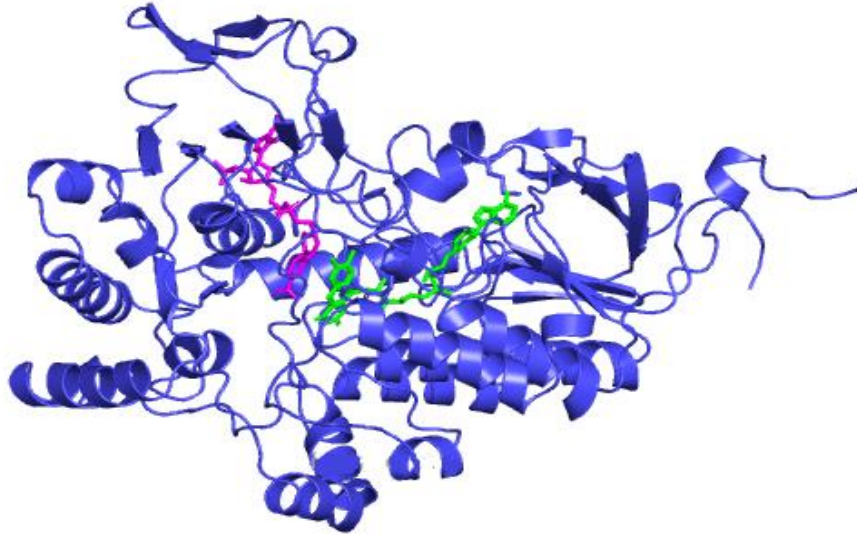
με τη διαθεσιμότητα υλικών και το ζητούμενο αποτέλεσμα. Οι περισσότεροι ερευνητές, χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό ορθολογιστικού σχεδιασμού και κατευθυνόμενης εξέλιξης. Σε κάθε περίπτωση, η πρωτεϊνική μηχανική περιλαμβάνει τρία βήματα. Αυτά είναι η επιλογή των αλλαγών που θα λάβουν χώρα, όπως ορθολογιστικός σχεδιασμός ή τυχαίες αλλαγές, η πραγματοποίηση των αλλαγών αυτών, δηλαδή η μεταλλαξιγένεση και τέλος, η αξιολόγηση των μεταλλαγμάτων ως προς τις επιθυμητές βελτιωμένες ιδιότητες (27,34,35).

Όταν απαιτείται η βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας, όπως στην περίπτωση των BVMOs, μια συχνή προσέγγιση είναι ο εντοπισμός των αμινοξέων που είναι ευαίσθητα, για παράδειγμα, στην οξείδωση (π.χ. μεθειονίνη, κυστεΐνη). Τα αμινοξέα αυτά επιλέγονται, με τη χρήση τεχνικών βιοπληροφορικής, ώστε να μεταλλαχθούν σε αμινοξέα λιγότερο επιρρεπή, όπως τα αλειφατικά και λαμβάνει χώρα τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Πραγματοποιούνται, με αυτήν την τεχνική, σημειακές μεταλλάξεις για κάθε ένζυμο. Όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές πληροφορίες για την επιλογή σημειακών μεταλλάξεων, τότε λαμβάνει χώρα τυχαία μεταλλαξιγένεση στο γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο. Από τα πολλαπλά τυχαία μεταλλάγματα δημιουργούνται γονιδιωματικές βιβλιοθήκες, οι οποίες υπόκεινται σε έλεγχο υψηλής απόδοσης, με σκοπό τον εντοπισμό σταθερότερων μεταλλαγμάτων. Κατά την επιλογή των μεταλλάξεων, υπάρχει πιθανότητα να επηρεαστούν και άλλα χαρακτηριστικά του κάθε ενζύμου, όπως η εναντιοεκλεκτικότητα ή η ενεργότητα(26,29,34) .

## 1.7 Παραδείγματα BVMOs

### 1.7.1 Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από *Acinetobacter sp.*

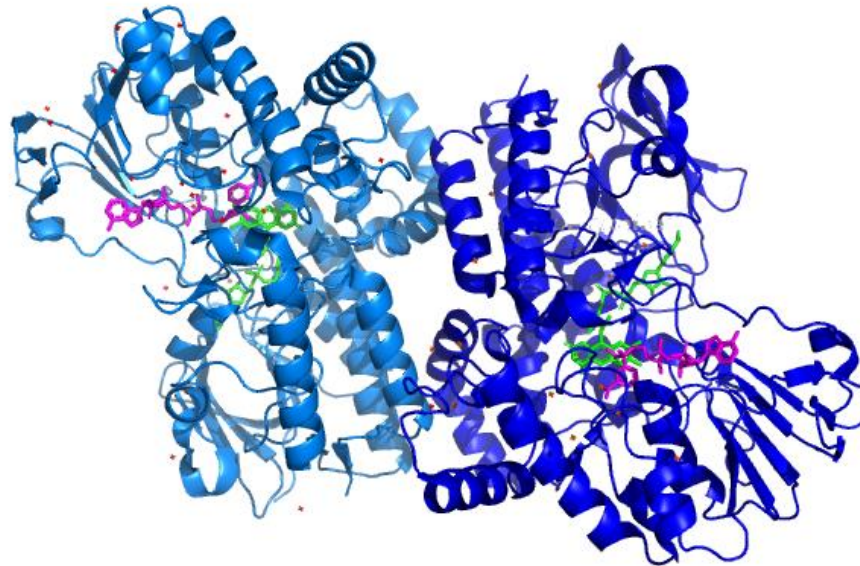
Η μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από *Acinetobacter sp.* Στέλεχος NCIMB 9871 (CHMO Acineto) αποτελεί την πιο εκτενώς μελετημένη BVMO από την αρχική της απομόνωση και τον χαρακτηρισμό από τον Trudgill και την ομάδα του το 1976. Είναι ένα ένζυμο μοριακού βάρους 64.5 KDa, το οποίο πραγματοποιεί ασύμμετρες οξειδώσεις Baeyer-Villiger, σύμφωνα με τον μηχανισμό της αντίδρασης των BVMOs. Ως υποστρώματα χρησιμοποιεί ένα εύρος κυκλικών κετονών και παρουσιάζει υψηλή χημειοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα. Αντιδράσεις της CHMO Acineto έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας καθαρισμένο το ένζυμο σε κύτταρα φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένα στελέχη. Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη προτιμώνται ιδιαίτερα, διότι ελαττώνουν την πιθανότητα παρουσίας παράπλευρων αντιδράσεων και παρέχουν υψηλές ποσότητες ενζύμου, μεγιστοποιώντας την ταχύτητα αντίδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντος. Επιπλέον, είναι δυνατή η έκφραση του ενζύμου σε ετερόλογα βακτήρια, όπως η *E. coli*. Με αυτόν τον τρόπο ελαττώνεται ο κίνδυνος που προέρχεται από την παθογένεια του μικροοργανισμού προέλευσης και εγγυάται η ταχύτερη έκφραση, καθώς η *E. coli* έχει μικρό χρόνο διπλασιασμού (15,36).



Εικόνα 1.6: Μοντέλο ομολογίας CHMO *Acineto*.

#### 1.7.2 Μονοοξυγενάση 2-οξο- $\Delta$ 3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλ-CoA από *Pseudomonas putida*

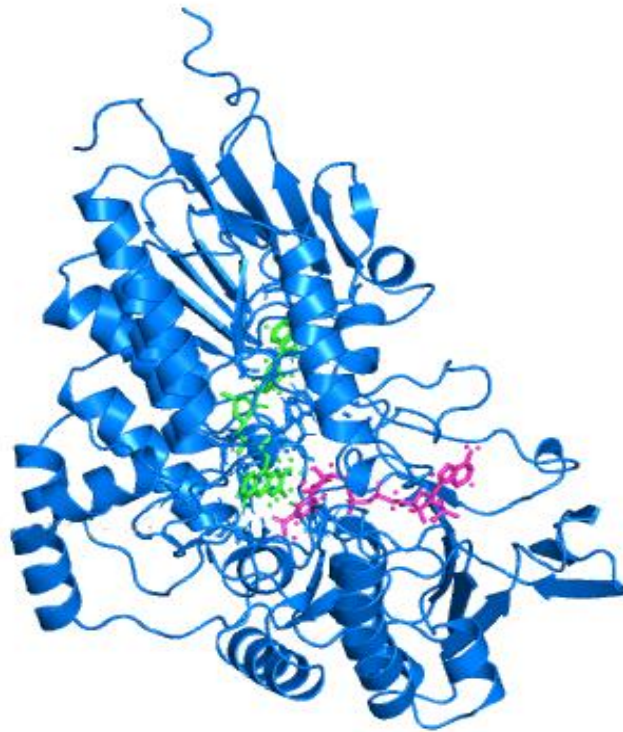
Η μονοοξυγενάση 2-οξο- $\Delta$ 3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλ-CoA από *Pseudomonas putida* στέλεχος ATCC 17453 (OTEMO) αποτελεί ένα ένζυμο με μονομερές μοριακού βάρους 63.5 kDa, του οποίου η κρυσταλλική δομή δημοσιεύτηκε πρόσφατα. Παρουσιάζεται στην *Εικόνα 1.6* και είναι η πρώτη διμερής δομή BVMO που περιέχει προσθετική ομάδα (FAD) και συνένζυμο (NADPH). Το ένζυμο αυτό είναι η τρίτη BVMO που βρέθηκε να συμμετέχει στην μετατροπή της καμφοράς σε ισοβουτυρικό και έρευνες έχουν δείξει ότι καλύτερα υποστρώματα αποτελούν οι δικυκλικές κετόνες, σε σύγκριση με τις μονοκυκλικές. Επιπλέον, καταλύει αποτελεσματικά τη μετατροπή ακόρεστων κυκλικών κετονών. Το φυσικό του υπόστρωμα είναι το 2-οξο- $\Delta$ 3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλακετικό οξύ, ενώ καταλύει και το παράγωγό του 2-οξο- $\Delta$ 3-4,5,5-τριμεθυλκυκλοπεντενυλακετυλ-CoA. Το γονίδιο έκφρασής του έχει κλωνοποιηθεί και μπορεί να εκφραστεί σε ετερόλογα βακτήρια, όπως η *E. coli* (15,37).



Εικόνα 1.7: Κρυσταλλική δομή διμερούς ΟΤΕΜΟ (PDB: 3UP4).

### 1.7.3 Μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από *Arthrobacter sp.*

Η μονοοξυγενάση κυκλοεξανόνης από *Arthrobacter sp.* στέλεχος BP2 (CHMO Arthro) αποτελεί ένα ένζυμο μοριακού βάρους 67.5 KDa. Εκφράζεται φυσικά από το *Arthrobacter sp.*, έναν μικροοργανισμό που ανακαλύφθηκε το 1975 από τον Cripps. Ο μικροοργανισμός αυτός βρέθηκε να αναπτύσσεται καταναλώνοντας ακετοφαινόνη ως πηγή άνθρακα και εκχυλίσματά του φάνηκε να μετατρέπουν την ακετοφαινόνη σε φαινόλη χρησιμοποιώντας NADPH και ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Η CHMO Arthro μπορεί να εκφραστεί ετερόλογα σε βακτήρια, όπως η *E. coli*, όμως, συχνά, η έκφρασή της απαιτεί τη χρήση τσαπερονίων. Τα τσαπερόνια είναι πρωτεΐνες, σχεδιασμένες να αυξάνουν την αποτελεσματική έκφραση ενζύμων στο υδατοδιαλυτό τμήμα καλλιεργειών και συμβάλλουν στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Τα γονίδιά τους εκφράζονται μαζί με τα γονίδια των ενζύμων και εμποδίζουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ένα παράδειγμα τσαπερονίου αποτελεί το TAKARA4 το οποίο αποτελείται από τα γονίδια *groEL*, *groES* και *tig* μοριακών βαρών 60, 10 και 56 KDa αντίστοιχα (15,38).



Εικόνα 1.8: Μοντέλο ομολογίας CHMO Arthro.

#### 1.7.4 Εφαρμογές προϊόντων αντιδράσεων BVMOs

Η ε-καπρολακτόνη αποτελεί το προϊόν που παράγεται από την αντίδραση μιας CHMO με κυκλοεξανόνη. Το πολυμερές της ε-καπρολακτόνης, η πολυ-ε-καπρολακτόνη είναι ένα συνθετικό βιοδιασπώμενο πολυμερές, το οποίο παρουσιάζει πολλά υποσχόμενες εφαρμογές. Το πολυμερές αυτό είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας, ο οποίος εμφανίζει βιοσυμβατότητα με τον ανθρώπινο οργανισμό και υδρολύεται εύκολα σε φυσιολογικές συνθήκες,. Έτσι, αποτελεί το κατάλληλο πολυμερές για χρήση στον τομέα της βιοϊατρικής. Συγκεκριμένα, δύναται να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή απορροφούμενων ραμμάτων, εμφυτευμάτων και τρισδιάστατων προτύπων για τη δημιουργία ιστών. Δυνατή είναι η χρήση του και για την παραγωγή προσθετικών μελών και βιοδιασπώμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (39).

## 2. Υλικά και μεθοδολογία

### Υλικά

Πεπτόνη από καζεΐνη (Serva), εκχύλισμα ζύμης (Condalab), χλωρίδιο του νατρίου-NaCl (Scharlau), άγαρ (TCI), dH<sub>2</sub>O, μονοθεϊκή καναμυκίνη (Alfa Aesar), (R,R)-χλωραμφενικόλη (Alfa Aesar), αιθανόλη (100% v/v), IPTG (Alfa Aesar), τετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich), αιθανόλη (70% v/v), Macherey-Nagel Plasmid DNA Purification kit, στήλη Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας (GE) και στήλη μοριακού αποκλεισμού, φίλτρα συμπύκνωσης Amikon, ακρυλαμίδιο (Sigma Aldrich) - δις-ακρυλαμίδιο (Serva) - ABmix 30%, APS 10% w/v (Serva), TEMED (Sigma-Aldrich), SDS (Merck), Tris-HCl (0.5 M pH=6.8)/0.4% SDS, Tris-HCl (1.5M pH=8.8)/0.4% SDS, ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος, trizma base (Sigma-Aldrich), γλυκίνη (Sigma-Aldrich), β-μερκαπτοαιθανόλη (Alfa Aesar), μπλε βρωμοφαινόλης (Fluka), μάρτυρας Protein test mixture 6 (Serva), μικροπλακίδιο 96 θέσεων (Sarstedt), διάλυμα Bradford, αλβουμίνη από ορό βοοειδών (BSA), φωτόμετρο μικροπλακιδίων 96 θέσεων (Thermo Scientific Multiscan Sky), μικροπλακίδιο UV 96 θέσεων (Greiner), NADPH (Serva) 3 mM σε Tris-HCl 50 mM pH=8.5, κυκλοεξανόνη 100 mM σε DMSO, δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνη (Alfa Aesar) 100 mM σε DMSO, DMSO (Fischer Chemical), NaOH (Fluka), HCl (Fluka), Q<sub>5</sub> ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (NEB), fw και rv εκκινητές, dNTPs (NEB), πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q<sub>5</sub> (NEB), λυοφυλιοποιημένοι εκκινητές, Taq ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (NEB), T<sub>7</sub> fw και rv εκκινητές, υδατικό διάλυμα MnCl<sub>2</sub>, πολυμεράση χαμηλής πιστότητας Taq, Macherey-Nagel (MN) DNA, RNA and protein purification by Nucleospin, gel and PCR cleanup kit, megaprimers, αγαρόζη (Nippon Genetics Europe), ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 50x, γλυκερίνη, DNA stain clear G (Serva), μάρτυρας 1 Kb Plus DNA ladder (NEB), περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI (NEB)

### 2.1 Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικού υλικού Luria Bertani (LB)

Το θρεπτικό υλικό LB αποτελείται από πεπτόνη από καζεΐνη, εκχύλισμα ζύμης, καθώς και NaCl. Τα παραπάνω συστατικά προστέθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως, στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον Πίνακα 2.1 και διαλύθηκαν σε μικρή ποσότητα dH<sub>2</sub>O. Ακολούθως, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώθηκε ο όγκος. Έπειτα, μεταφέρθηκε σε δοχείο Duran και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min.

Πίνακας 2.1: Συνταγή παρασκευής θρεπτικού υλικού LB.

Συστατικό	Συγκέντρωση (% w/v)
Εκχύλισμα ζύμης	0.5
Πεπτόνη	1.0
NaCl	1.0

Άγαρ*	1.5
-------	-----

\* Το άγαρ προστίθεται μόνο όταν απαιτείται η παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού

#### 2.1.1 Παρασκευή τρυβλίων με θρεπτικό υλικό LB

Αρχικά, παρασκευάστηκε το μίγμα LB-άγαρ σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.1. Λήφθηκε το δοχείο Duran από το αυτόκαυστο, αφέθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να ελαττωθεί η θερμοκρασία του έως περίπου τους 60 °C και παρασκευάστηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.2. Όταν το θρεπτικό έφτασε τους 60 °C προστέθηκε σε αυτό ποσότητα καναμυκίνης, τελικής συγκέντρωσης 50 µg/mL. Το δοχείο ανακινήθηκε καλά και μεταφέρθηκε σε κάθε τρυβλίο Petri ποσότητα LB-άγαρ/καναμυκίνη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε πριν η θερμοκρασία του θρεπτικού πέσει τους 42 °C, όπου το άγαρ πήζει. Τα τρυβλία φυλάχθηκαν στους 4 °C.

#### 2.2 Πρωτόκολλο παρασκευής αντιβιοτικών

Η παρασκευή διαλύματος καναμυκίνης 50 mg/mL πραγματοποιήθηκε διαλύοντας ποσότητα μονοθεϊκής καναμυκίνης σε dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, το διάλυμα αποστειρώθηκε με φίλτρο πόρων 0.22 µm σε θάλαμο νηματικής ροής και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε διάλυμα χλωραμφενικόλης 34 mg/mL σε αιθανόλη (100% v/v). Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν προσδίδουν ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, ενώ το πλασμίδιο με το τσαπερόνιο groES-groEL-tig (TAKARA4) στην χλωραμφενικόλη.

#### 2.3 Πρωτόκολλο παρασκευής επαγωγέων έκφρασης γονιδίων

Η παρασκευή του πυκνού διαλύματος IPTG 1M πραγματοποιήθηκε διαλύοντας ποσότητα IPTG σε dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, το διάλυμα αποστειρώθηκε με φίλτρο πόρων 0.22 µm σε θάλαμο νηματικής ροής και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε και το πυκνό διάλυμα τετρακυκλίνης 50 µg/mL σε αιθανόλη (70% v/v). Το IPTG επάγει την έκφραση των γονιδίων των ενζύμων, ενώ η τετρακυκλίνη των τσαπερονίων του συστήματος TAKARA4.

#### 2.4 Πρωτόκολλο μετασχηματισμού χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli*

Αρχικά, λήφθηκαν erpendorfs με 50 µL χημειοδεκτικών κυττάρων επιθυμητής κυτταρικής σειράς *E. coli* από τους -80 °C όπου φυλάσσονται, και μεταφέρθηκαν σε πάγο, σε θάλαμο νηματικής ροής. Αναδεύτηκαν ήπια και έπειτα, προστέθηκε σε κάθε erpendorf μέγιστη ποσότητα 5 µL από κάθε πλασμίδιο.

Στη συνέχεια, το μίγμα χημειοδεκτικών κυττάρων και πλασμιδίων αφέθηκε σε πάγο. Μετά το πέρας 30 min τα δείγματα υπέστησαν θερμικό σοκ μεταφέροντάς τα σε θερμικό αναδευτήρα στους 42 °C για 30 s και στη συνέχεια σε πάγο για 2 min. Ακολούθως, σε θάλαμο νηματικής ροής, προστέθηκε 1 mL LB σε καθένα και αφέθηκαν οριζόντια σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και ανάδευση 350 rpm. Μετά από 1 h και αφού το περιεχόμενο των errendorfs είχε θολώσει, αυτά φυγοκεντρήθηκαν για 7 min στα 11000 x g. Μεταφέρθηκαν ξανά σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου αποχύθηκε η πλειονότητα του υπερκειμένου και στην ποσότητα που παρέμεινε επαναιωρήθηκε το ίζημα. Τέλος, απλώθηκαν τα εναιωρήματα σε τρυβλία Petri με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Κατά τον μετασχηματισμό του CHMO Arthro/TAK4 απαιτείται η χρήση δύο αντιβιοτικών κατά την παρασκευή των τρυβλίων, καθώς διαθέτει και το σύστημα τσαπερονίων groES-groEL-tig (TAKARA4). Προστέθηκε, δηλαδή, καναμυκίνη τελικής συγκέντρωσης 25 µg/mL και χλωραμφενικόλη 17 µg/mL.

Για το άπλωμα των τρυβλίων απολυμάνθηκε η γυάλινη σπάτουλα σε αιθανόλη (100% v/v) και αποστειρώθηκε σε φλόγα. Αφού κρύωσε, απλώθηκαν τα εναιωρήματα με τη σπάτουλα σε κάθε τρυβλίο. Να σημειωθεί πως η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για ένα δείγμα τη φορά και πως μεταξύ δειγμάτων η σπάτουλα απολυμάνθηκε δύο φορές σε αιθανόλη και φλόγα. Τέλος, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε δωμάτιο θερμοκρασίας 37 °C, όπου αφέθηκαν ολονυκτίως.

## 2.5 Πρωτόκολλο παρασκευής δειγμάτων στελεχών βαθειάς κατάψυξης

Χρησιμοποιώντας μονήρεις αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, παρασκευάστηκαν προκαλλιέργειες σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.8. Σε θάλαμο νηματικής ροής, λήφθηκε ποσότητα γλυκερίνης (50% v/v) και αποστειρώθηκε με φίλτρα 0.22 µm σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon. Ακολούθως, μεταφέρθηκε 1 mL προκαλλιέργειας σε errendorf των 2 mL, το οποίο αναμίχθηκε με 1 mL γλυκερίνης (50% v/v). Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στους -80 °C.

## 2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού γενετικού υλικού

Για την απομόνωση πλασμιδίου από προκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 5.1 από το kit της εταιρίας Macherey-Nagel GeneJet Plasmid Miniprep. Σύμφωνα με αυτό λήφθηκαν 5 mL προκαλλιέργειας, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 7 min σε 11000 x g.

Στη συνέχεια, τα ιζήματα των κυττάρων επαναιωρήθηκαν σε 250 µL διαλύματος A1, σε errendorf των 2 mL. Ακολούθως, προστέθηκαν 250 µL διαλύματος A2, τα σωληνάκια ανακινήθηκαν ελαφρά επί 8 φορές και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Επιπλέον, προστέθηκαν 400 µL διαλύματος A3 και το διάλυμα ανακινήθηκε ελαφρά επί 8 φορές, ώστε να μην καταστραφεί το γονιδιακό DNA. Τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν για 7 min σε 11000 x g.



Όταν τελείωσε η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στις στήλες πρόσδεσης και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 2 min σε 11000 x g. Ακολούθως, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 300 μL διαλύματος A4 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 min σε 11000 x g. Αποχύθηκε το υγρό στον πυθμένα των errendorf και η ίδια διαδικασία έλαβε χώρα μια ακόμη φορά. Στη συνέχεια, οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες, αποχύθηκε όσο υγρό εξήλθε στον πυθμένα και τα errendorfs αφέθηκαν ανοιχτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να εξατμιστεί τυχόν εναπομένον διάλυμα A4. Μετά το πέρας του χρόνου τα σωληνάκια μεταφέρθηκαν σε θερμικό αναδευτήρα, όπου αφέθηκαν στους 60 °C για 7 min.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η έκλυση του πλασμιδίου από την κάθε στήλη, μεταφέροντας τη στήλη σε errendorf των 1.5 mL και προσθέτοντας σε αυτή 50 μL διαλύματος AE. Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν για 2 min σε 11000 x g.

## 2.7 Πρωτόκολλο μέτρησης συγκέντρωσης πλασμιδίου

Αρχικά, λήφθηκε το πλακίδιο μDroq, ανοίχθηκε το τζάμι και με ένα βρεγμένο με dH<sub>2</sub>O χαρτί καθαρίστηκε απαλά το τζάμι και οι θέσεις τοποθέτησης δειγμάτων. Ακολούθως, προστέθηκαν 2 μL από το διάλυμα AE στη θέση του τυφλού δείγματος και 2 μL κάθε δείγματος πλασμιδίου στις υπόλοιπες θέσεις. Ρυθμίστηκε το φωτόμετρο και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις και οι καθαρότητες των πλασμιδίων. Τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

## 2.8 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3)

Καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν για τα κύτταρα τα οποία έφεραν πλασμίδια για την έκφραση των CHMO Arthro/TAK4, OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L και Acineto\_W46L. Τα ένζυμα CHMO Acineto και OTEMO είχαν εκφραστεί και καθαριστεί σε προηγούμενη εργασία, από την Χαρά Αγγέλη (αδημοσίευτα αποτελέσματα), ενώ οι μεταλλάξεις OTEMO\_C56A και Acineto\_M390V απέτυχαν. Η χλωραμφενικόλη και η τετρακυκλίνη χρησιμοποιήθηκαν μόνο για το CHMO Arthro που διαθέτει το τσαπερόνιο groES-groEL-tig (TAKARA4).

Πριν την έναρξη της διαδικασίας αποστειρώθηκαν οι κωνικές φιάλες ανάλογα με τον αριθμό των καλλιεργειών, τα καπάκια τους, τα ρύγγη για τις πιπέτες ακριβείας, ο ογκομετρικός κύλινδρος και το θρεπτικό υλικό LB. Η αποστείρωση έλαβε χώρα σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν οι επαγωγείς και τα αντιβιοτικά, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα 2.2 και 2.3.

1<sup>η</sup> μέρα: Προκαλλιέργεια

Σε θάλαμο νηματικής ροής και υπό φλόγα, προστέθηκαν, σε κωνική φιάλη, 25 mL θρεπτικού υλικού LB, 10 μL δείγματος στελέχους βαθείας κατάψυξης ή μία μονήρης αποικία από τρυβλία

Petri και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Για το CHMO Arthro/TAK4 χρησιμοποιήθηκαν καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL και χλωραμφενικόλη 17 µg/mL, ενώ για τα υπόλοιπα ένζυμα καναμυκίνη 50 µg/mL. Έπειτα, η προκαλλιέργεια πωματίστηκε με μεταλλικό καπάκι που επέτρεπε την μεταφορά οξυγόνου από το περιβάλλον στα κύτταρα και μεταφέρθηκε στον επωαστήρα, όπου αφέθηκε ολονυκτίως σε θερμοκρασία 30 °C και 350 rpm ως βέλτιστη ανάδευση.

2<sup>η</sup> μέρα: Καλλιέργεια

Μετά το πέρας 16 έως 18 ωρών, σε θάλαμο νηματικής ροής, προετοιμάστηκαν κωνικές φιάλες των 2 L με 500 mL θρεπτικό LB και κατάλληλα αντιβιοτικά, όπως περιγράφονται για τις προκαλλιέργειες. Σε αυτές προστέθηκαν από 5 mL προκαλλιέργειας (1% του τελικού όγκου) και ακολούθως, μεταφέρθηκαν στον επωαστήρα, πωματισμένες, σε θερμοκρασία 37 °C και 110 rpm ως βέλτιστη ανάδευση. Όταν η τιμή του OD<sub>600</sub> ήταν μεταξύ 0.4 έως 0.5 έλαβε χώρα επαγωγή του τσαπερονίου TAKARA4, μόνο για το CHMO Arthro που διέθετε το τσαπερόνιο, προσθέτοντας τετρακυκλίνη σε τελική συγκέντρωση 5 ng/mL. Συνεχίστηκε η επώαση στις ίδιες συνθήκες και όταν μετρήθηκε τιμή OD<sub>600</sub> 0.6 έως 0.8, λήφθηκε από τις καλλιέργειες δείγμα προ επαγωγής (BI), για SDS-PAGE, σύμφωνα με τον τύπο  $BI(mL) = \frac{10}{OD(600)}$ . Ακολούθως, έλαβε χώρα η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων για όλα τα ένζυμα, προσθέτοντας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM. Οι κωνικές μεταφέρθηκαν ξανά στον επωαστήρα όπου αφέθηκαν ολονυκτίως σε θερμοκρασία 20 °C και βέλτιστη ανάδευση 110 rpm. Για το CHMO Arthro, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25 °C.

3<sup>η</sup> μέρα: Απομόνωση κυττάρων

Μετά το πέρας 16 έως 18 h μετρήθηκε ξανά το OD<sub>600</sub> σε δείγμα αραιωμένο 1/10 με LB. Έπειτα, λήφθηκε το δείγμα μετά επαγωγής (AI), για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, σύμφωνα με τον τύπο  $AI(mL) = \frac{10}{OD(600)}$ . Το AI, μαζί με το BI φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C, 6000 x g για 20 min. Αποχύθηκε το υπερκείμενο και τα ιζήματα φυλάχθηκαν στους -20 °C. Η ολική καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στους 4 °C, 6000 x g για 20 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και τα ιζήματα φυλάχθηκαν στους -20 °C αναμένοντας την κυτταρική λύση και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.

## 2.9 Πρωτόκολλο κυτταρικής λύσης με συσκευή υπερήχων

Αρχικά, λήφθηκαν από τους -20 °C τα ιζήματα των BI, AI και το αντίστοιχο της ολικής καλλιέργειας. Τα BI και AI επαναιωρήθηκαν σε 200 µL KPi (50 mM pH=7.5). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες erpendorf και μέσα σε πάγο στη συσκευή υπερήχων η οποία ξεπλύθηκε με αιθανόλη (70% v/v) και dH<sub>2</sub>O. Η λύση των κυττάρων έλαβε χώρα με βελόνα υπερήχων, η οποία ρυθμίστηκε σε πλάτος κύματος 50, με κύκλο εργασίας 0.5. Οι υπέρηχοι

τέθηκαν σε λειτουργία για 30 s και ακολούθως, έσβησαν για 30 s. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 5 φορές, με τα δείγματα να βρίσκονται διαρκώς στον πάγο. Τα λυμένα ΒΙ και ΑΙ φυγοκεντρήθηκαν στους 4 °C, 13000 x g για 10 min και διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα των λυμένων κυτταρικών μεμβρανών. Η πελέτα επαναιωρήθηκε σε 200 μL KPi (50 mM pH=7.5) και τα δείγματα διατηρήθηκαν σε πάγο, έως τη μεταφορά τους για SDS-PAGE.

Αντίστοιχα, τα ιζήματα ολικής καλλιέργειας επαναιωρήθηκαν σε 5 mL διαλύματος λύσης (πρωτόκολλο 2.10). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο σε μεγαλύτερη συσκευή υπερήχων, η οποία απολυμάνθηκε με αιθανόλη (70% v/v) και dH<sub>2</sub>O και ρυθμίστηκε σε κύκλο 50%, ένταση 3. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στη βελόνα και ενεργοποιήθηκε η συσκευή για 30 s. Έπειτα έσβησε για 30 s και η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 7 φορές, με τα δείγματα να βρίσκονται διαρκώς σε πάγο. Ακολούθως, τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C, 9000 x g για 20min. Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το ίζημα και φιλτραρίστηκε με φίλτρα 0.45 και 0.22 μm. Έπειτα, μεταφέρθηκε για καθαρισμό.

## 2.10 Πρωτόκολλο καθαρισμού πρωτεϊνών

Για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών απαιτήθηκαν τρία ρυθμιστικά διαλύματα.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Α: KPi (50 mM) με NaCl (300 mM), ρυθμισμένο σε pH 7.5
- Ρυθμιστικό διάλυμα Β: KPi (50mM) με NaCl (300mM) και ιμιδαζόλιο (300 mM) ρυθμισμένο σε pH 7.5
- Ρυθμιστικό διάλυμα Γ: KPi (50 mM pH=7.5).

Το διάλυμα λύσης παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας ποσότητες των διαλυμάτων Α (95%) και Β (5%), λαμβάνοντας τελική συγκέντρωση ιμιδαζολίου 15 mM.

Αφού παρασκευάστηκαν τα διαλύματα, λύθηκαν τα κύτταρα, φυγοκεντρήθηκαν και φιλτραρίστηκε το υπερκείμενο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.9. Ακολούθως, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στη συσκευή υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών, όπου έλαβε χώρα ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Ο καθαρισμός των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή αύξηση του ποσοστού του διαλύματος Β από 5% σε 10% και 100%, ώστε να απομακρυνθούν πρώτα όσες πρωτεΐνες δεν συναρμόζονταν με το Ni<sup>+2</sup> της στήλης (κλάσματα flowthrough) και τελευταία να εκλουστούν τα ένζυμα που έφεραν τη σηματοδότηση His-Tag. Τα κλάσματα που περιείχαν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρα Amikon σε μέγιστο τελικό όγκο 3 mL, φυγοκεντρώντας στους 4 °C, 4800 x g για 20 min. Τέλος, απομακρύνθηκαν τα άλατα με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

## 2.11 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

### 2.11.1 Παρασκευή απαραίτητων αντιδραστηρίων για SDS-PAGE

Το διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS 10% w/v) παρασκευάστηκε διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα του στερεού APS σε dH<sub>2</sub>O και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

Το διάλυμα Tris-HCl (0.5 M pH=6.8), παρουσία 0.4% SDS παρασκευάστηκε διαλύοντας Trizma base και SDS σε dH<sub>2</sub>O, ενώ το pH του ρυθμίστηκε με HCl. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4 °C. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε και το Tris-HCl (1.5M pH=8.8), παρουσία 0.4% SDS.

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) 10× παρασκευάστηκε διαλύοντας τα συστατικά του Πίνακα 2.2 σε μικρή ποσότητα dH<sub>2</sub>O. Έπειτα ρυθμίστηκε το pH=8.3 και συμπληρώθηκε ο υπόλοιπος όγκος με dH<sub>2</sub>O. Πριν από τη χρήση του αραιώθηκε από 10× σε 1×.

Πίνακας 2.2: Συνταγή για running buffer 10x.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Trizma base	250 mM
Γλυκίνη	1.93 M
SDS	1% w/v

Το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) 2× παρασκευάστηκε διαλύοντας πλήρως Tris και SDS σε ποσότητα dH<sub>2</sub>O. Ρυθμίστηκε το pH=6.8 με HCl και προστέθηκε η γλυκερίνη και η β-μερκαπτοαιθανόλη και το διάλυμα συμπληρώθηκε μέχρι τελικό όγκο 20 mL υπό ανάδευση. Τέλος, προστέθηκε το μπλε της βρωμοφαινόλης και αναδεύτηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών στο διάλυμα αναγράφονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Συνταγή για sample buffer 2x.

Συστατικό	Συγκέντρωση
Trizma base	0.1 M
SDS	4% w/v
β-μερκαπτοαιθανόλη	9% v/v
Γλυκερίνη	20% v/v
Μπλε βρωμοφαινόλης	0.005% w/v

### 2.11.2 Παρασκευή πηκτών ηλεκτροφόρησης

Για τη συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ασυνεχής πηκτή, η οποία περιλάμβανε την πηκτή διαχωρισμού (κάτω) και την πηκτή επιστοίβασης (πάνω). Η πηκτή διαχωρισμού

περιείχε ποσοστό 12.5% πολυακρυλαμιδίου, ενώ η αντίστοιχη επιστοιβασής 4%. Τα απαραίτητα συστατικά για την παρασκευή των πηκτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4. Οι αναγραφόμενες ποσότητες αφορούν την παρασκευή δύο πηκτών από καθεμία.

Πίνακας 2.4: Τα απαραίτητα συστατικά για την παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού και επιστοιβασής.

Συστατικό	Πηκτή διαχωρισμού (12.5% w/v)	Πηκτή επιστοιβασής 4% (w/v)
dH <sub>2</sub> O	3.98 mL	4.95 mL
ABmix	4.98 mL	1.07 mL
Tris-HCl (1.5M pH=6.8) + 0.4% SDS	-	2 mL
Tris-HCl (1.5M pH=8.8) + 0.4% SDS	2.98 mL	-
APS	80 μL	80 μL
TEMED	8 μL	8 μL

Στη συνέχεια, συναρμολογήθηκε η συσκευή της ηλεκτροφόρησης δίνοντας ιδιαίτερη σημασία στη συμμετρία των γυάλινων τοιχωμάτων. Βεβαιώθηκε ότι δεν στάζει η συσκευή με τη χρήση dH<sub>2</sub>O και σε falcon των 50 mL προστέθηκαν τα συστατικά της πηκτής διαχωρισμού με τη σειρά που αναγράφονται στον Πίνακα 2.4. Τα APS και TEMED προστέθηκαν γρήγορα στο τέλος, καθώς ο πολυμερισμός πραγματοποιείται ταχύτατα όταν βρεθούν σε επαφή με το ακρυλαμίδιο. Παράλληλα, μετά από μία σύντομη ανάμιξη, πραγματοποιήθηκε γρήγορα η προσθήκη του μίγματος στη συσκευή. Η επιφάνεια της πολυμεριζόμενης πηκτής καλύφθηκε με μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης, η οποία απομακρύνθηκε πριν την εισαγωγή της πηκτής επιστοιβασής. Μετά το πέρας 40 min και αφού ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού, παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο και σύμφωνα με τις ποσότητες του Πίνακα 2.4 και η πηκτή επιστοιβασής. Η διαφορά ήταν ότι κατά την εισαγωγή της στη συσκευή τοποθετήθηκε σε αυτή «χτενάκι» για το σχηματισμό «πηγαδιών» φόρτωσης δειγμάτων.

Ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση. Για κάθε δείγμα αναμίχθηκαν 10 μL με 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος, αναδεύτηκαν σε vortex και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για να συλλεχθεί το δείγμα. Για τα δείγματα καθαρών πρωτεϊνών αναμίχθηκαν 6 μL πρωτεΐνης με 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Στη συνέχεια, θερμάνθηκαν για 10 min στους 95 °C και φυγοκεντρήθηκαν για να συλλεχθεί το δείγμα. Στην πηκτή φορτώθηκαν 25 μL μάρτυρα και 20 μL από το κάθε δείγμα. Ρυθμίστηκε η συσκευή στα 180 V και αφέθηκε να τρέξει για 90 min.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι δύο πηκτές επώαστηκαν για 2 h σε υδατικό διάλυμα χρώσης αποτελούμενο από μεθανόλη (45% v/v), οξικό οξύ (45% v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (1% w/v). Ακολούθησε αποχρωματισμός σε υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού

αποτελούμενο από μεθανόλη (10% v/v), και οξικό οξύ (10% v/v). Η επώαση διήρκησε 1 h, το διάλυμα αντικαταστάθηκε με φρέσκο και αφέθηκε για 1 μέρα υπό ανάδευση. Τέλος, οι δύο πηκτές παρατηρήθηκαν σε φωτιζόμενη τράπεζα.

## 2.12 Πρωτόκολλο προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Αρχικά, παρασκευάστηκε το διάλυμα Bradford διαλύοντας 0.1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 50 mL αιθανόλης, προσθέτοντας σε αυτό 100 mL φωσφορικού οξέος (85%) και 100 mL dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια 4 mL αυτού αραιώθηκαν με 12 mL dH<sub>2</sub>O (αναλογία 1/4) και φιλτραρίστηκε με διηθητικό χαρτί. Από τη στιγμή της παρασκευής του το διάλυμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό δοχείο, διότι είναι φωτοευαίσθητο και πριν από κάθε χρήση του χρειάζεται ισχυρή ανάδευση.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε το αραιωμένο διάλυμα Bradford, καθώς και διαλύματα BSA συγκεντρώσεων 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 και 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL. Η κάθε μέτρηση έλαβε χώρα σε τριπλέτες για μεγαλύτερη ακρίβεια. Σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου 96 πηγαδιών προστέθηκαν 200 μL Bradford και 15 μL πρωτεΐνης BSA γνωστής συγκέντρωσης. Μόνο η πρώτη τριπλέτα περιείχε 15 μL KPi (50 mM pH=7.5) αντί για πρωτεΐνη, καθώς αντιπροσώπευε τη συγκέντρωση 0. Για τα πρωτεϊνικά δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις όπου ήταν απαραίτητο, συμφωνά με το εύρος τιμών της πρότυπης καμπύλης, και μετρήθηκε η συγκέντρωση σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Για τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης η διαδικασία επαναλήφθηκε σε διπλέτες.

## 2.13 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης ενεργότητας BVMOs

Το πρωτόκολλο αυτό έλαβε χώρα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων CHMO Acineto, OTEMO, CHMO Arthro, OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L και Acineto\_W46L

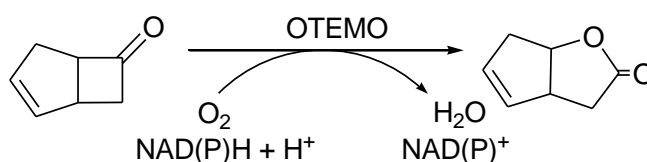
### 2.13.1 Πρωτόκολλο παρασκευής υποστρωμάτων κυκλοεξανόνη και δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνη

Για την παρασκευή διαλύματος κυκλοεξανόνης 100 mM προστέθηκε ποσότητα κυκλοεξανόνης σε DMSO. Αντίστοιχα παρασκευάστηκε και το διάλυμα στοκ δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνης 100 mM σε DMSO. Από τα διαλύματα αυτά λαμβανόταν κάθε φορά απαραίτητη ποσότητα, ώστε τα υποστρώματα να έχουν τελική συγκέντρωση 1 mM.

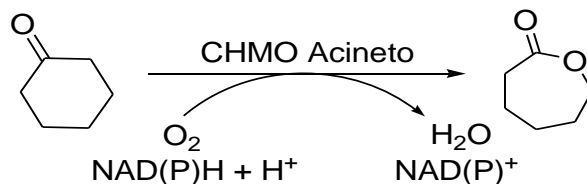
### 2.13.2 Πρωτόκολλο παρασκευής NADPH

Το NADPH 3mM, παρασκευάστηκε διαλύοντας ποσότητα NADPH σε ρυθμιστικό Tris-HCl (50 mM pH=8.5). Από το διάλυμα αυτό λαμβανόταν κάθε φορά απαραίτητη ποσότητα, ώστε το NADPH να έχει τελική συγκέντρωση 250 μM.

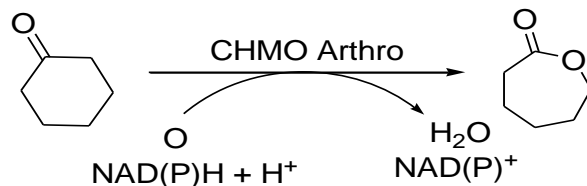
2.13.3 Πρωτόκολλο ενζυμικής αντίδρασης για φωτομετρική μελέτη της ενεργότητας των BVMOs  
Η ενζυμική αντίδραση έλαβε χώρα σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων 96 θέσεων, χρησιμοποιώντας πλακίδια UV της εταιρίας Greiner, τα οποία δεν απορροφούν το υπεριώδες φως. Για κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν δύο πηγάδια τυφλού δείγματος (διπλέτα) και τρία αντίδρασης (τριπλέτα) σε τελικό όγκο αντίδρασης 200 μL. Το τυφλό δείγμα περιλάμβανε το ρυθμιστικό αντίδρασης, KPi (50 mM pH=7.5), δηλαδή το ρυθμιστικό στο οποίο διατηρούνται τα καθαρισμένα ένζυμα, αντί του ενζύμου, το κατάλληλο υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 1 mM καθώς και NADPH σε τελική συγκέντρωση 250 μM. Από την άλλη το δείγμα της αντίδρασης περιλάμβανε το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, κατάλληλη ποσότητα ενζύμου, το κατάλληλο υπόστρωμα, καθώς και NADPH. Για τα CHMO Acineto και CHMO Arthro χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η κυκλοεξανόνη, ενώ για το OTEMO η δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνη, όπως φαίνεται στις αντιδράσεις των *Εικόνα 2.1, 2.2, 2.3*. Η απαραίτητη ποσότητα ενζύμου για την αντίδραση προσδιορίστηκε κάνοντας δοκιμές με διαφορετικές ποσότητες ενζύμου και πραγματοποιώντας την αντίδραση (αντίδραση χρόνου μηδέν,  $t_0$ ). Επιλέχθηκε εκείνη η ποσότητα, η οποία παρείχε την καλύτερη ευθεία για τον προσδιορισμό της κλίσης στο αρχικό κομμάτι της αντίδρασης. Τα απαιτούμενα συστατικά και οι τελικές τους συγκεντρώσεις για την αντίδραση κάθε ενζύμου παρουσιάζονται στον *Πίνακα 2.5*.



*Εικόνα 2.1: Ενζυμική αντίδραση OTEMO.*



*Εικόνα 2.2: Ενζυμική αντίδραση CHMO Acineto.*



Εικόνα 2.3: Ενζυμική αντίδραση CHMO Arthro.

Πίνακας 2.5: Πρωτόκολλο φωτομετρικής αντίδρασης των ενζύμων.

Συστατικό	Τελική συγκέντρωση σε τυφλό δείγμα (×2)	Τελική συγκέντρωση σε δείγμα αντίδρασης (×3)
Ρυθμιστικό αντίδρασης	Σε τελικό όγκο 200 μL	Σε τελικό όγκο 200 μL
KPi (50 mM pH=7.5)	+	-
Υπόστρωμα (100 mM σε DMSO)	1 mM	1 mM
Ένζυμο	-	+
NADPH (3 mM σε Tris-HCl 50 mM pH=8.5)	250 μM	250 μM

Το ρυθμιστικό αντίδρασης, το KPi (50 mM pH=7.5), αλλά και τα υποστρώματα επωάζονταν για 5 min στους 30 °C πριν την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Παράλληλα, το NADPH εισαγόταν στο μίγμα αντίδρασης με γρήγορες κινήσεις, διότι εκείνο σηματοδοτούσε την έναρξη της αντίδρασης.

Η λήψη μετρήσεων από το φωτόμετρο πραγματοποιούνταν ρυθμίζοντας το στα 340 nm, όπου απορροφά το NADPH, στους 30 °C, υπό ανάδευση, με διάρκεια αντίδρασης 3 min και διάστημα μεταξύ λήψεων τα 6 s. Όσο καταναλωνόταν το NADPH, τόσο ελαττωνόταν η απορροφητικότητά του. Από την ευθεία που προέκυπτε, υπολογιζόταν η κλίση και στη συνέχεια, με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Excel, η ενεργότητα του κάθε ενζύμου.

#### 2.14 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης pH προφίλ ενζύμων

Η φωτομετρική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης KPi (50 mM pH=7.0-7.5-8.0), Tris-HCl (50 mM pH=7.0-7.5-8.0-8.5-9.0) και CHES (50 mM pH=9.0-9.5-10.0), σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος Excel προσδιορίστηκε η ειδική ενεργότητα του ενζύμου σε κάθε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης.



2.15 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης της θερμοσταθερότητας ενζύμων  
 Ο προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας ξεκίνησε με την μεταφορά ποσότητας κάθε ενζύμου προς επώαση σε θερμικό αναδευτήρα ρυθμισμένο σε θερμοκρασίες 25, 30, 35 και 40 °C. Τα ένζυμα επώαστηκαν στις θερμοκρασίες αυτές για 1, 3, 5 και 24 h. Στα χρονικά αυτά διαστήματα λήφθηκε ποσότητα από τον θερμικό αναδευτήρα, η οποία αφέθηκε σε πάγο για 2 min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η φωτομετρική αντίδραση σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Μετά το πέρας των 24 h λήφθηκαν τα δεδομένα και με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος Excel προσδιορίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα των ενζύμων σε κάθε μία από τις τέσσερις χρονικές στιγμές. Στον Πίνακα 2.6 παρουσιάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένζυμο.

Να σημειωθεί πως για το CHMO Arthro, στις θερμοκρασίες επώασης συμπεριλήφθηκαν και οι 15 και 20 °C. Παράλληλα, για το OTEMO\_C444S, λήφθηκαν μετρήσεις και στις 7 και 16 h σε θερμοκρασία 35 °C.

Πίνακας 2.6: Ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης για τον προσδιορισμό της θερμοσταθερότητας κάθε ενζύμου.

Ένζυμο	Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
CHMO Acineto	KPi (50 mM pH=8.0)
OTEMO	Tris-HCl (50mM pH=9.0)
Petri	Tris-HCl (50 mM pH=8.5)
OTEMO_C444S	Tris-HCl (50mM pH=9.0)

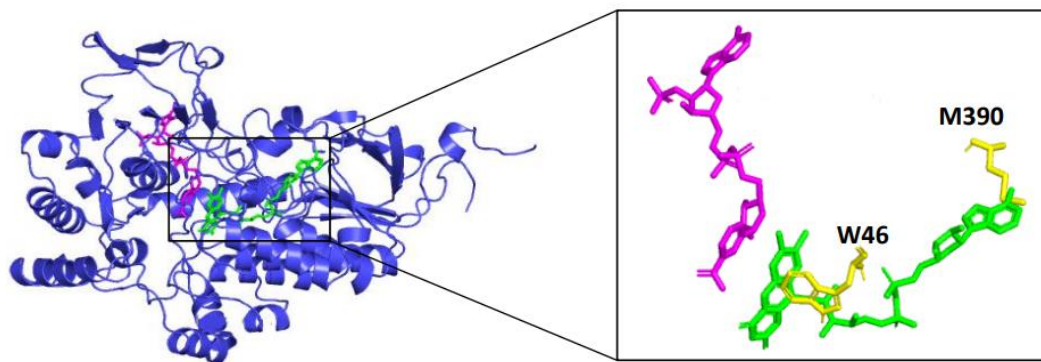
## 2.16 Πρωτόκολλο φωτομετρικής μελέτης σταθερότητας ενζύμων

Τα ένζυμα επώαστηκαν για 24 h σε ρυθμιστικά διαλύματα, με σκοπό τον προσδιορισμό της εναπομείνουσας ενεργότητάς τους. Λήφθηκαν μετρήσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.11 στις 1, 3, 5 και 24 h, ενώ ως ρυθμιστικά διαλύματα επώασης χρησιμοποιήθηκαν τα KPi (50 mM pH=7.0-7.5-8.0), Tris-HCl (50 mM pH=7.5-9.0) και CHES (50 mM pH=9.0-10.0). Η επώαση έλαβε χώρα σε θερμικό αναδευτήρα, όπου τοποθετήθηκαν δείγματα ενζύμου και τυφλού δείγματος υπό ανάδευση 200 rpm. Τα CHMO Acineto, OTEMO και OTEMO\_C444S επώαστηκαν στους 25 °C, ενώ το CHMO Arthro στους 15 °C. Τα δείγματα ενζύμου περιείχαν την απαραίτητη ποσότητα κάθε ρυθμιστικού διαλύματος και κάθε ενζύμου. Αντίστοιχα, τα δείγματα του τυφλού περιείχαν την απαραίτητη ποσότητα κάθε ρυθμιστικού διαλύματος και KPi (50 mM pH=7.5). Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων λήφθηκε ποσότητα από κάθε δείγμα που επωαζόταν, η οποία αφέθηκε σε πάγο για 2 min και, στη συνέχεια, έλαβε χώρα η φωτομετρική αντίδραση σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Μετά το πέρας των 24 h λήφθηκαν τα δεδομένα και με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Excel προσδιορίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα των ενζύμων σε καθεμία από τις τέσσερις χρονικές στιγμές.

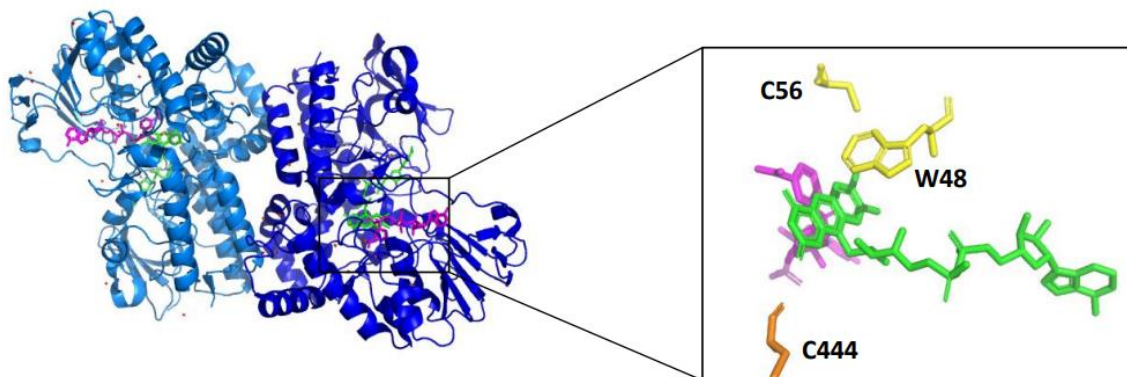
Ο προσδιορισμός της σταθερότητας των ενζύμων σε αυξανόμενα ποσοστά συνδιαλύτη (DMSO) έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Με κάθε πραγματοποίηση της αντίδρασης αυξανόταν η προστιθέμενη ποσότητα DMSO, διατηρώντας πάντα τον τελικό όγκο στα 200  $\mu$ L. Χρησιμοποιήθηκαν ποσοστά έως και 40%. Στο τέλος, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Excel υπολογίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου για κάθε ποσοστό DMSO.

## 2.17 Σχεδιασμός εκκινητών για τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Από τα ένζυμα CHMO Acineto, OTEMO και CHMO Arthgo επιλέχθηκαν τα δύο πρώτα, ώστε να πραγματοποιηθούν κάποιες σημειακές μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, για το OTEMO επιλέχθηκαν οι μεταλλάξεις C56A, C444S, W48L. Από την άλλη, για το CHMO Acineto επιλέχθηκαν οι μεταλλάξεις W46L και M390V. Οι μεταλλάξεις παρουσιάζονται στις *Εικόνα 2.4, 2.5*.



*Εικόνα 2.4: Αμινοξέα προς μετάλλαξη για CHMO Acineto.*



*Εικόνα 9: Αμινοξέα προς μετάλλαξη για OTEMO.*

Ένας εκκινητής πρέπει να περιέχει 18 έως 30 βάσεις και στην 3' άκρη του να περιέχει 1 έως 2 βάσεις G ή C. Επιπλέον, ο εκκινητής πρέπει να περιέχει αναλογία G, C μικρότερη του 65%, να διαθέτει θερμοκρασία τήξης μικρότερη των 70 °C και να μην παρουσιάζει αυτοσυμπληρωματικότητα.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών ξεκίνησε με τον εντοπισμό του κωδικονίου που κωδικοποιεί τη θέση ενδιαφέροντος. Στην συνέχεια, από τον πίνακα χρήσης κωδικονίων της *E. coli* (40), επιλέχθηκε το βέλτιστο κωδικόνιο για την εισαγωγή του επιθυμητού αμινοξέος στη θέση, δίνοντας προσοχή στη συχνότητα χρήσης του κωδικονίου στο γονιδίωμα της *E. coli* και επιδιώκοντας τον μικρότερο αριθμό αναντιστοιχιών. Ακολούθως, επιλέχθηκαν, συνολικά, περίπου τριάντα βάσεις για κάθε εκκινητή, οι οποίες περιείχαν το κωδικόνιο ενδιαφέροντος περίπου στη μέση. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή μελετήθηκε στην πλατφόρμα OligoCalc για το σημείο τήξης, πιθανές δευτεροταγείς δομές και για το ποσοστό GC.

Λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν και με την αφαίρεση βάσεων όπου χρειάστηκε προέκυψαν οι ευθείς (forward, fw) και αντίστροφοι (reverse, rv) εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7 (41).

Πίνακας 2.7: Εκκινητές (κατεύθυνση 5' → 3') που σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της εν λόγω εργασίας.

Μετάλλαξη	Forward primer	Reverse primer
OТЕMO_C56A	A TAT CCA GGC <b>GCC</b> AGG CTG	CAG CCT <b>GGC</b> GCC TGG ATA TC
OТЕMO_C444S	G ACC TTT <b>AGC</b> AAC GTC GGT G	C ACC GAC GTT <b>GCT</b> AAA GGT C
OТЕMO_W48L	GGC GGA ACC <b>TTG</b> TAC TGG AAC C	G GTT CCA GTA <b>CAA</b> GGT TCC GCC
Acineto_W46L	C GCA GGT ACT <b>TTG</b> TAC TGG AAC C	G GTT CCA GTA <b>CAA</b> AGT ACC TGC G
Acineto_M390V	GTG CGC <b>GTG</b> GAC ATT CAA GG	CC TTG AAT GTC <b>CAC</b> GCG CAC

## 2.18 Πρωτόκολλο τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (site directed mutagenesis PCR)

Το πρωτόκολλο της τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης στήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει η New England Biolabs, από την οποία προμηθεύτηκε η πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5.

Αρχικά, οι εκκινητές λήφθηκαν σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Από τα στερεά παρασκευάστηκαν στοκ διαλύματα 10 μM για τον καθένα διαλύοντάς τα σε αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε αποστειρωμένα erpendorfs, σε θάλαμο νηματικής ροής. Αντίστοιχα, αραιώθηκαν τα πλασμίδια σε συγκεντρώσεις 10 ng/μL.

Σε θάλαμο νηματικής ροής μεταφέρθηκαν οι απαραίτητες ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον Πίνακα 2.8, σε τελικό όγκο 25  $\mu\text{L}$ . Κατά την προετοιμασία αυτή τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν σε πάγο. Έπειτα, τα δείγματα αναδεύτηκαν ήπια και τοποθετήθηκαν σε συσκευή spin down.

Πίνακας 2.8: Πρωτόκολλο τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο υπερκάθαρο $\text{H}_2\text{O}$	Σε τελικό όγκο 25 $\mu\text{L}$
Ρυθμιστικό αντίδρασης $Q_5$ (5x)	1x
Εκκινητής fw (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{M}$
Εκκινητής rv (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{M}$
Πατρικό πλασμίδιο (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	5.0 ng
dNTPs (10 mM A, T, G, C)	0.2 mM
$Q_5$ πολυμεράση (2000 U/mL)	0.5 U

Με την ολοκλήρωση της προετοιμασίας των δειγμάτων προς μετάλλαξη ρυθμίστηκε ο θερμικός κυκλοποιητής στις απαραίτητες συνθήκες, εισήχθησαν τα δείγματα και τέθηκε σε λειτουργία. Οι συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9.

Πίνακας 2.9: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.

	Αρχική αποδιάταξη	98 °C	30 s
x25 κύκλοι	• Αποδιάταξη	98 °C	10 s
	• Υβριδισμός	50-65 °C	30 s
	• Αντιγραφή	72 °C	3 min 30 s
	Τελική επέκταση	72 °C	2 min
	Παύση	10 °C	$\infty$

## 2.19 Πρωτόκολλο τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (Error Prone PCR)

Η τυχαία μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο OTEMO\_C444S.

Σε θάλαμο νηματικής ροής μεταφέρθηκαν, σε erpendorf 200  $\mu\text{L}$ , οι απαραίτητες ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον Πίνακα 2.10, σε τελικό όγκο 100  $\mu\text{L}$ . Κατά την προετοιμασία αυτή τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν σε πάγο. Έπειτα, τα δείγματα αναδεύτηκαν

ήπια και τοποθετήθηκαν σε συσκευή spin down. Επιπλέον, στον Πίνακα 2.11 παρουσιάζεται το πρόγραμμα στο οποίο ρυθμίστηκε ο θερμικός κυκλοποιητής για την πραγματοποίηση της επιρρεπούς σε λάθη (error prone) PCR.

Πίνακας 2.10: Πρωτόκολλο τυχαίας μεταλλαξιγένεσης.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	Σε τελικό όγκο 100 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Taq (10 ×)	1×
Εκκινητής T <sub>7</sub> fw (10 μM)	0.5 μM
Εκκινητής T <sub>7</sub> rv (10 μM)	0.5 μM
Πατρικό πλασμίδιο	0.02 ng
MnCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.25/0.50/0.75 mM
dNTPs/dTTP-dCTP, dATP-dGTP (10 mM A, T, G, C/25 mM T, C και 5mM A, G)	0.2 mM A, T, G, C /1 mM T, C και 0.2 mM A, G
Taq πολυμεράση (5000 U/mL)	0.05 U

Πίνακας 2.11: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για τυχαία μεταλλαξιγένεση.

	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	30 s
×20 κύκλοι	• Αποδιάταξη	95 °C	30 s
	• Υβριδισμός	50-60 °C	60 s
	• Αντιγραφή	68 °C	2 min
	Τελική επέκταση	68 °C	5 min
	Παύση	10 °C	∞

## 2.20 Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων της error prone PCR

Αρχικά αναμίχθηκαν τα προϊόντα της error prone PCR με διπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος NT1. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε μια από τις μικροστήλες του κιτ σε erpendorf των 2 mL, φορτώθηκε το δείγμα και φυγοκεντρήθηκε για 1 min σε 11000 x g. Ακολούθως, προστέθηκαν 500 μL διαλύματος NT3 και έλαβε χώρα φυγοκέντρωση για 1 min σε 11000 x g. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξανά με 300 μL NT3, φυγοκεντρώντας για 2 min. Αποχύθηκε το υγρό και η στήλη μεταφέρθηκε σε erpendorf των 1.5 mL. Προστέθηκαν 6 μL διαλύματος NE και το δείγμα αφέθηκε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Τέλος, φυγοκεντρήθηκε για 2 min σε 11000 x g επαναφορτώθηκε το υγρό στη στήλη και έλαβε χώρα μια ακόμα φυγοκέντρωση.

## 2.21 Πρωτόκολλο υποκλωνοποίησης με τη μέθοδο MEGAWHOP

Για τα προϊόντα της τυχαίας μεταλλαξιγένεσης πραγματοποιήθηκε η τεχνική της MEGAWHOP, ώστε να κλωνοποιηθεί η βιβλιοθήκη της error prone PCR στο πλασμίδιο ενδιαφέροντος. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις τελικού όγκου 50  $\mu\text{L}$  και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.12. Ο megaprimer είναι το κάθε τυχαία μεταλλαγμένο γονίδιο που προέκυψε από την error prone PCR. Στον Πίνακα 2.13 παρουσιάζεται το πρόγραμμα στο οποίο ρυθμίστηκε ο θερμικός κυκλοποιητής για την πραγματοποίηση της PCR.

Πίνακας 2.12: Πρωτόκολλο MEGAWHOP.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο υπερκάθαρο $\text{H}_2\text{O}$	Σε τελικό όγκο 50 $\mu\text{L}$
Ρυθμιστικό αντίδρασης $\text{Q}_5$ (5 $\times$ )	1 $\times$
Megaprimer	500 ng
Πατρικό πλασμίδιο (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 ng/ $\mu\text{L}$
dNTPs (10 mM A, T, G, C)	0.2 mM
$\text{Q}_5$ HF πολυμεράση (2000 U/mL)	20 U/mL

Πίνακας 2.13: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της MEGAWHOP PCR.

	Αρχική αποδιάταξη	98 °C	30 s
x40 κύκλοι	• Αποδιάταξη	98 °C	10 s
	• Υβριδισμός	55 °C	30 s
	• Αντιγραφή	72 °C	3 min 30 s
	Τελική επέκταση	72 °C	2 min
	Παύση	10 °C	$\infty$

## 2.22 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης DNA

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης διαλύθηκαν 242 g Trizma, 57.1 mL οξικού οξέος και 100 mL EDTA 0.5 M σε 500 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ . Για την πλήρη διαλυτοποίηση απαιτήθηκαν ανάδευση και θέρμανση. Έπειτα, συμπληρώθηκε ο όγκος με  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Επειδή το διάλυμα αυτό είχε συγκέντρωση 50 $\times$  αραιώθηκε σε 1 $\times$ .

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος αναμίχθηκαν 0.025 g μπλε της βρωμοφαινόλης με 3 mL γλυκερίνης, 2 mL TAE 50 $\times$  και 5 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Για την παρασκευή αγαρόζης 0.8% (w/v) ζυγίστηκαν 0.8 g αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε δοχείο με 100 mL TAE 1x. Ακολούθως, το δοχείο αυτό θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλύθηκε πλήρως.

Αρχικά, αραιώθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και προετοιμάστηκε η αγαρόζη όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, 30 mL αγαρόζης μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν σε αυτήν 3 mL χρωστικής DNA stain clear G. Αφού έπεσε η θερμοκρασία της περίπου στους 60 °C, στήθηκε η συσκευή της ηλεκτροφόρησης και αποχύθηκε η αγαρόζη σε αυτή. Αμέσως εφαρμόστηκαν τα «χτενάκια» στις κατάλληλες οπές της συσκευής και ο πολυσακχαρίτης αφέθηκε να πήξει. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν τα δείγματα και ο μάρτυρας. Ο μάρτυρας προετοιμάστηκε αναμιγνύοντας 1.5 μL με 1.5 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Αντίστοιχα τα δείγματα προετοιμάστηκαν αναμιγνύοντας 5 μL δείγματος από την PCR με 2 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος.

Μόλις έπηξε η αγαρόζη φορτώθηκαν τα δείγματα, ρυθμίστηκε το τροφοδοτικό στα 120 V για 20 min και αφέθηκε να τρέξει η ηλεκτροφόρηση. Όταν τελείωσε, η πηκτή μεταφέρθηκε σε λυχνία υπεριώδους φωτός και παρατηρήθηκαν οι ζώνες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τόσο η προετοιμασία των αντιδραστηρίων, όσο και η πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης και η παρατήρηση της πηκτής πραγματοποιήθηκαν σε απομονωμένο χώρο, ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση των πάγκων του εργαστηρίου από τη χρωστική της πηκτής.

## 2.23 Πρωτόκολλο πέψης μητρικών πλασμιδίων με περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI

Αφότου ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, οι πετυχημένες αντιδράσεις μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής. Λήφθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση από τους -20 °C και προστέθηκε 1 μL αυτής σε κάθε προϊόν PCR. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμικό αναδευτήρα, ο οποίος ρυθμίστηκε στους 37 °C και αφέθηκαν να επωαστούν για 1 h.

## 2.24 Πρωτόκολλο προετοιμασίας πλασμιδίων για αλληλούχηση

Αρχικά, λήφθηκαν οι λυοφυλιοποιημένοι T<sub>7</sub> εκκινητές (5' → 3'):

Ευθύς (fw): TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Αντίστροφος (rv): TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG

Διαλύοντας τις κατάλληλες ποσότητες σε αποστειρωμένο υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O ετοιμάστηκαν διαλύματα εκκινητών, τελικής συγκέντρωσης 5 μM.

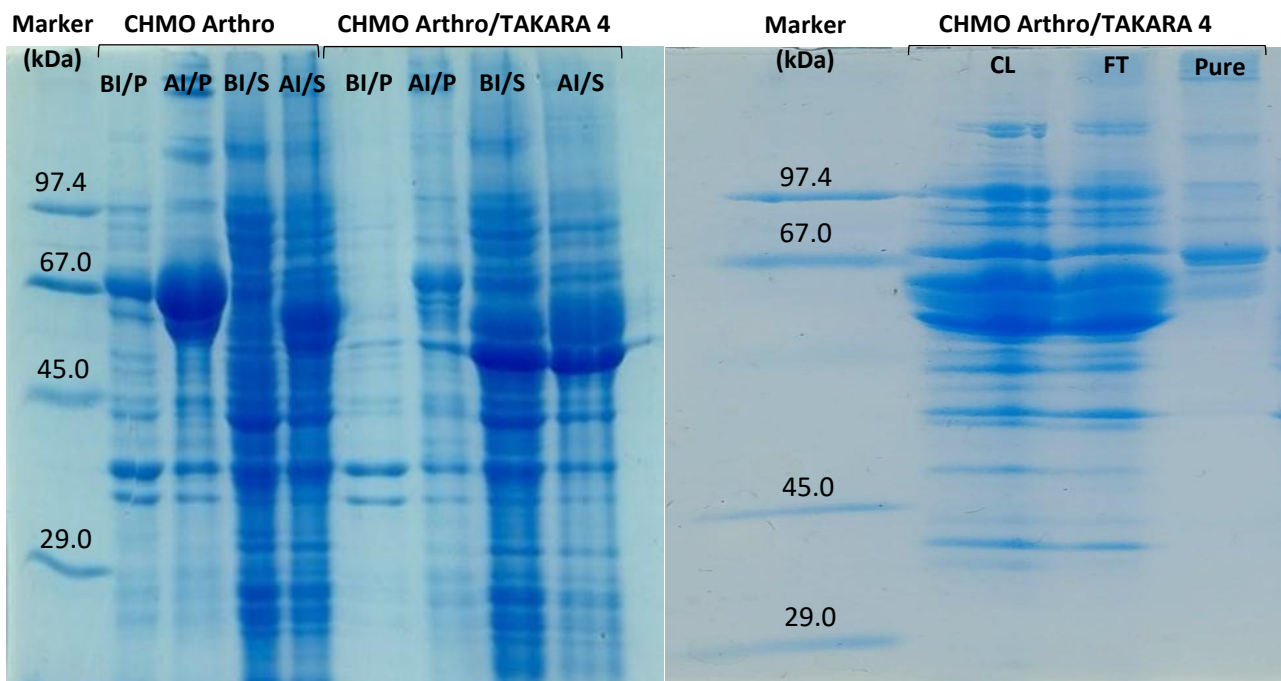
Στη συνέχεια, λήφθηκαν τα πλασμίδια, των οποίων οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.8 και αναμίχθηκαν με τους εκκινητές. Για κάθε πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκαν δύο erpendorf, στο ένα προστέθηκαν 5  $\mu$ L εκκινητή T<sub>7</sub> fw και στο άλλο 5  $\mu$ L εκκινητή T<sub>7</sub> rv. Επιπλέον, σε καθένα από τα δύο σωληνάκια προστέθηκαν 2 έως 5  $\mu$ L πλασμιδίου, ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι από 30 έως 100 ng/ $\mu$ L.



### 3. Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 3.1 Βελτιστοποίηση έκφρασης CHMO Arthro με τη χρήση τσαπερονίων

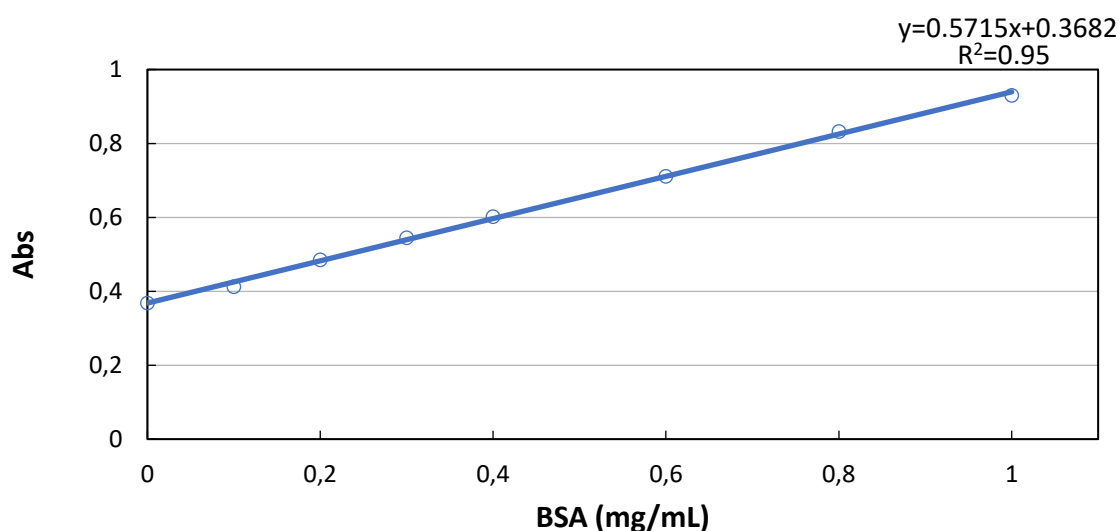
Τα ένζυμα CHMO Acineto, OTEMO και CHMO Arthro μελετήθηκαν βιβλιογραφικά, εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν σε προηγούμενη εργασία από την Χαρά Αγγέλη (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Όμως, κατά την καλλιέργεια του CHMO Arthro, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.8, παρατηρήθηκε πως η πλειονότητα του ενζύμου καταβυθιζόταν στο ίζημα με τις λυμένες μεμβράνες των κυττάρων, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανακτηθεί. Αυτό φαίνεται στην *Εικόνα 3.1*, στις θέσεις 3 και 5, όπου παρατηρείται πως ελάχιστο ένζυμο βρίσκεται στις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Πραγματοποιώντας βιβλιογραφική έρευνα, αποφασίστηκε η εισαγωγή του τσαπερονίου groES (10 kDa)-groEL (60 kDa)-tig (56 kDa) στο πλασμίδιο του CHMO Arthro, ώστε να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα του (42). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εκ νέου καλλιέργεια για το νέο στέλεχος CHMO Arthro. Το CHMO Arthro έχει μοριακό βάρος 67.5 kDa. Η πηκτή της ηλεκτροφόρησης, στα αριστερά της *Εικόνας 3.1*, περιέχει, στις θέσεις 6 έως 9, δείγματα από την καλλιέργεια αυτή και είναι εμφανές πως στη θέση 9, όπου τοποθετήθηκε δείγμα AI που περιέχει τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, υπάρχει ικανοποιητική έκφραση του ενζύμου. Παράλληλα, η έκφρασή του στη θέση 7, όπου παρουσιάζεται το AI από το δείγμα των σπασμένων μεμβρανών, έχει ελαττωθεί σημαντικά. Έτσι, το ένζυμο από αυτήν την καλλιέργεια καθαρίστηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.10. Δεξιά της *Εικόνας 3.1* βρίσκεται η πηκτή ηλεκτροφόρησης που έλαβε χώρα μετά τον καθαρισμό. Είναι εμφανές στη θέση 13 πως το CHMO Arthro έχει καθαριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό, ειδικά αν συγκριθεί με τη θέση 11 που περιέχει τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες μετά τη λύση των κυττάρων ολικής καλλιέργειας.



*Εικόνα 3.1:* Πηκτές SDS-PAGE CHMO Arthro και CHMO Arthro/TAKARA4. Marker-Protein Test Mixture 6 Serva, BI/P-Δείγμα λυμένων μεμβρανών κυττάρων προ επαγωγής, AI/P-Δείγμα λυμένων μεμβρανών κυττάρων μετά επαγωγής, BI/S-Δείγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών προ επαγωγής, AI/S- Δείγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών μετά επαγωγής, CL-Δείγμα σπασμένων 35 κυττάρων ολικής καλλιέργειας, FT-Κλάσμα πρωτεϊνών κατά τον καθαρισμό, Pure-Δείγμα καθαρισμένης πρωτεΐνης.

### 3.2 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Αφού λήφθηκε το καθαρισμένο ένζυμο, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του με τη χρήση της μεθόδου Bradford. Στο *Γράφημα 3.1* παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη Bradford που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα BSA. Το δείγμα του CHMO Arthro αραιώθηκε κατά πέντε φορές και η συγκέντρωσή του προέκυψε από την εξίσωση της ευθείας με τιμή  $1.9 \pm 0.2$  mg/mL. Παράλληλα, προσδιορίστηκε και η παραγωγικότητα του ενζύμου στα  $4.0 \pm 0.4$  mg/L καλλιέργειας, τιμή που είναι σχετικά χαμηλή. Για τα υπόλοιπα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση της ποσότητας του ενζύμου τα ολοκλήρωσε η Χαρά Αγγέλη (αδημοσίευτα αποτελέσματα).



*Γράφημα 3.1: Πρότυπη καμπύλη Bradford με χρήση BSA, κατασκευασμένη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του CHMO Arthro.*

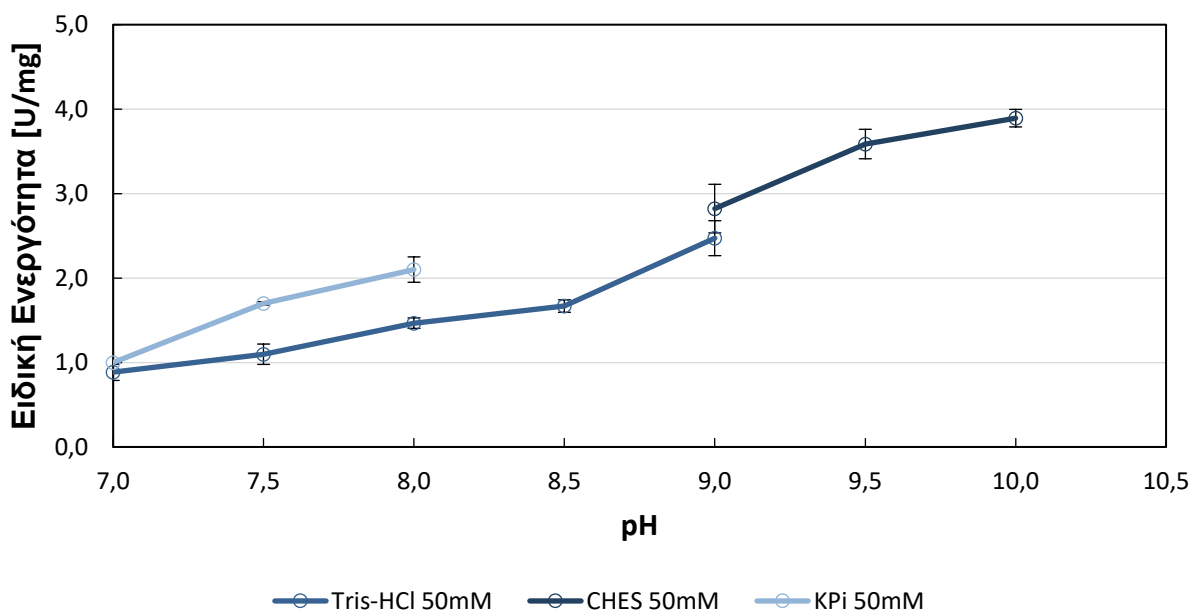
### 3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός BVMOs

Στη συνέχεια, λήφθηκαν τα ένζυμα CHMO Acineto, OTEMO και CHMO Arthro. Για καθένα από αυτά προσδιορίστηκε η θερμοσταθερότητα, έπειτα από εικοσιτετράωρη επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, καθώς και η σταθερότητα σε μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων, κατά τη διάρκεια εικοσιτετράωρης επώασης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν σε προηγούμενη εργασία, από την Χαρά Αγγέλη (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), η σταθερότητα σε ρυθμιστικά διαλύματα χωρίς επώαση, με σκοπό την εύρεση

του βέλτιστου ρυθμιστικού διαλύματος για τα τρία ένζυμα (pH προφίλ), καθώς και η επίδραση συνδιαλύτη (DMSO) στην ενεργότητα των ενζύμων. Τα γραφήματα παρουσιάζονται παρακάτω.

### 3.3.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός CHMO Acineto

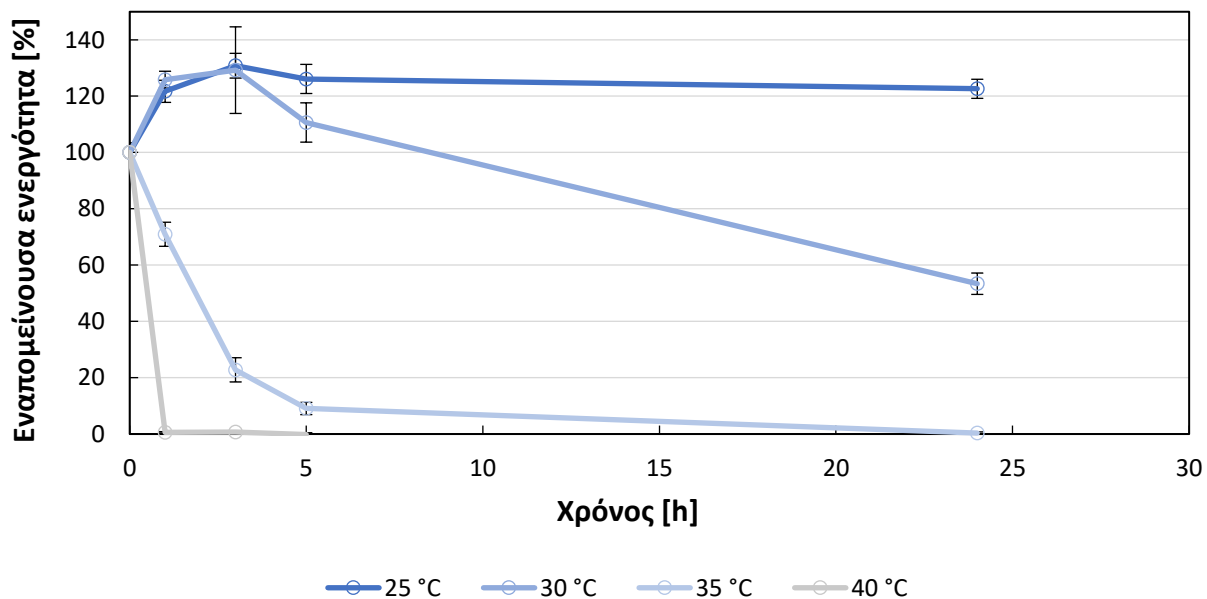
Πρώτο βήμα στον βιοχημικό χαρακτηρισμό του CHMO Acineto αποτέλεσε ο προσδιορισμός της ενεργότητάς του σε ρυθμιστικά διαλύματα, διαφορετικών pH, και, κατά συνέπεια, η εύρεση του βέλτιστου pH για το ένζυμο. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.14, χωρίς να πραγματοποιηθεί προηγούμενη επώαση του ενζύμου στα διαλύματα και έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων αρχικής ταχύτητας στα διαφορετικά pH προέκυψε το *Γράφημα 3.2*. Όπως φαίνεται από το γράφημα, το ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του οποίου το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα με τιμή  $3.9 \pm 0.1$  U/mg είναι το CHES (50 mM) με pH=10.0. Σε τιμές pH κάτω του 9 η ενεργότητα ελαττώνεται σημαντικά. Συγκεκριμένα, σε διαλύματα με pH=7.0, το ένζυμο παρουσιάζει ενεργότητα ίση με  $0.9 \pm 0.1$  U/mg, γεγονός που υποδεικνύει ότι σε χαμηλότερες τιμές pH αποσταθεροποιείται.



Γράφημα 3.2: Ειδική ενεργότητα του CHMO Acineto σε διαφορετικά pH.

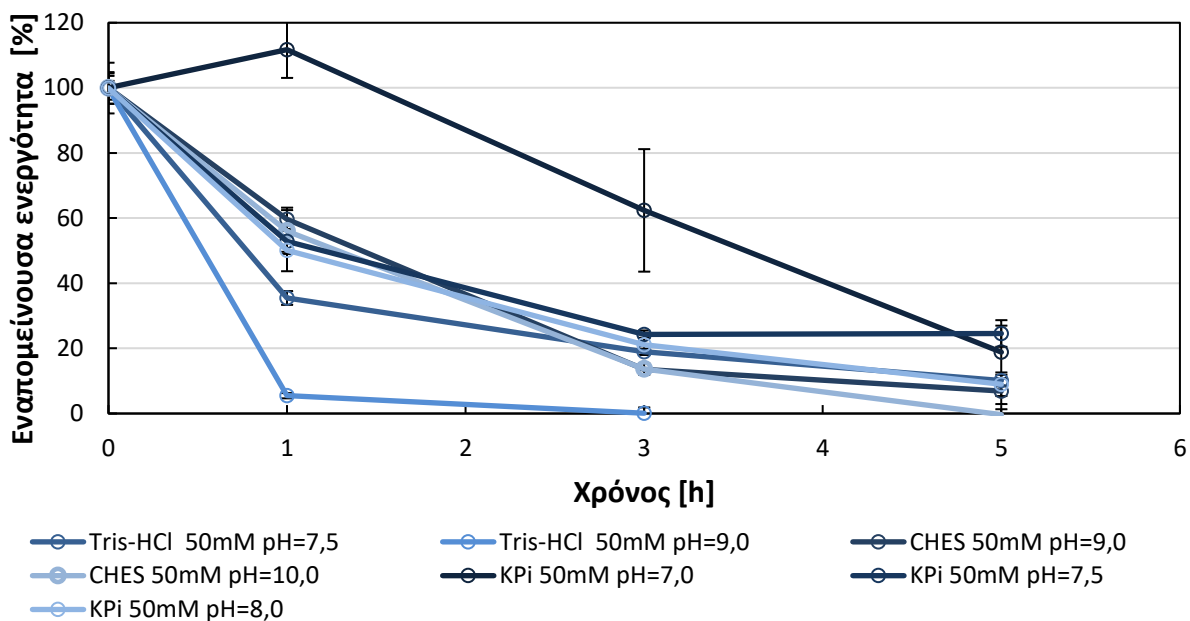
Όπως φαίνεται στο *Γράφημα 3.3*, το CHMO Acineto επώαστηκε σε θερμοκρασίες 25, 30, 35 και 40 °C, για εικοσιτέσσερις ώρες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.15. Λήφθηκε ποσότητα ενζύμου στις 0, 1, 3, 5 και 24 h και πραγματοποιήθηκε αντίδραση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13. Έπειτα, προσδιορίστηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου την κάθε χρονική στιγμή, σε κάθε θερμοκρασία, θεωρώντας την ενεργότητα σε χρόνο μηδέν ως 100%. Στους 25 °C παρατηρείται ενεργοποίηση του ενζύμου, στο 130% της αρχικής του ενεργότητας, η οποία

ελαττώνεται ελαφρώς με το πέρας του χρόνου. Το ένζυμο παραμένει ενεργοποιημένο έπειτα από 24 h, με τιμή ενεργότητας 123%. Στους 30 °C το CHMO Acineto ενεργοποιείται ξανά στο 130%, όμως, έως το πέρας της επώασης η ενεργότητά του μειώνεται στο 53%. Όσον αφορά τους 35 και 40 °C, είναι φανερό πως μέχρι τις 5 h το ένζυμο χάνει σχεδόν εξ ολοκλήρου την ενεργότητά του. Έτσι, συμπεραίνεται πως η βέλτιστη θερμοκρασία για το CHMO Acineto, είναι οι 25 °C.



Γράφημα 3.3: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) ως προς το χρόνο για το CHMO Acineto, σε διάφορες θερμοκρασίες.

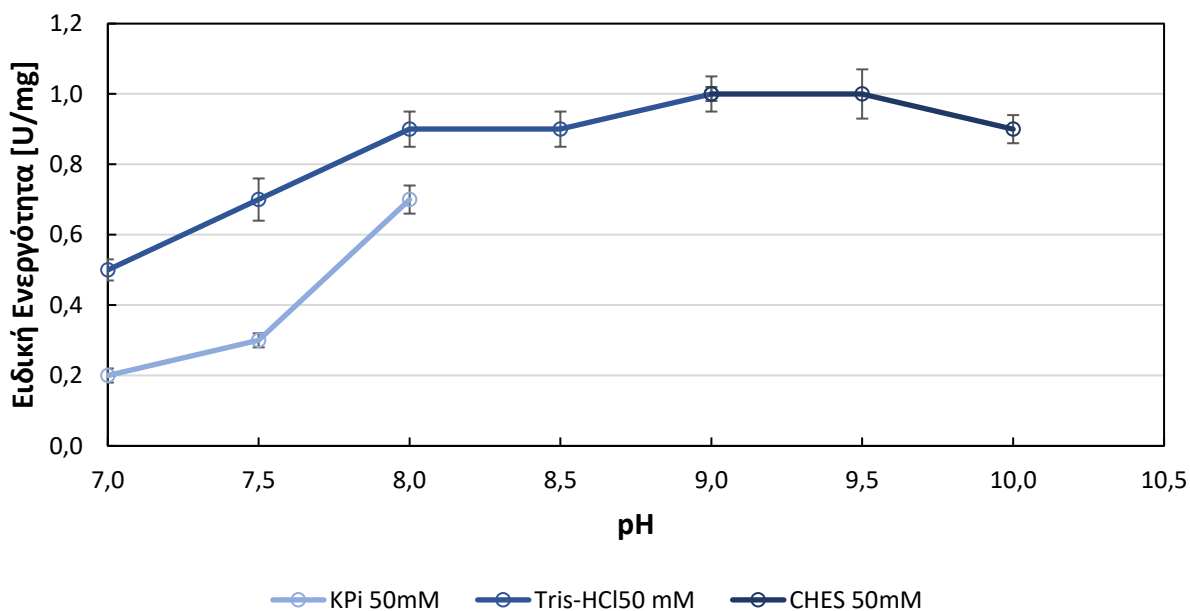
Μεταβαίνοντας στην επώαση σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, σε θερμοκρασία 25 °C, στο Γράφημα 3.4, παρουσιάζονται μετρήσεις σε δείγματα επώασης 1, 3 και 5 h, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Για τα ρυθμιστικά διαλύματα CHES και Tris-HCl η ενεργότητα ελαττώθηκε σημαντικά από την πρώτη ώρα επώασης. Από τα KPi, μόνο σε εκείνο με pH=7.0 παρουσιάστηκε μια ενεργοποίηση στο 110%, όμως η τιμή της εναπομείνουσας ενεργότητας μειώθηκε ραγδαία έως τις 5 h. Επομένως, το CHMO Acineto δεν είναι σταθερό κατά την επώασή του στα συγκεκριμένα ρυθμιστικά διαλύματα.



Γράφημα 3.4: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το CHMO Acineto σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

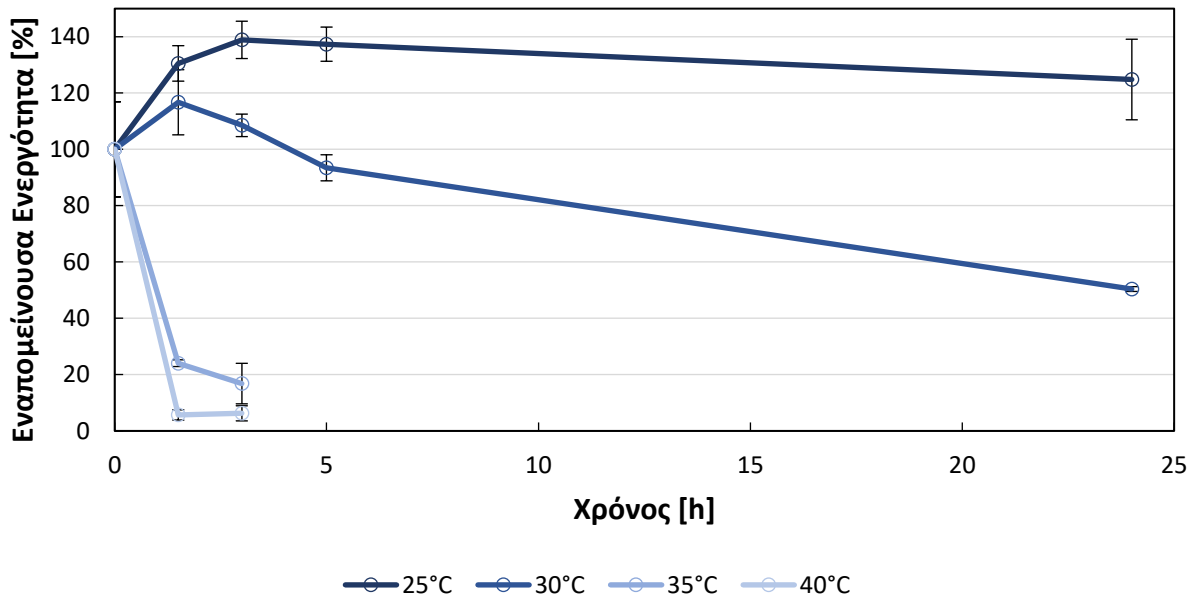
### 3.3.2 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ΟΤΕΜΟ

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ΟΤΕΜΟ ξεκίνησε με τον προσδιορισμό της ενεργότητάς του σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών pH. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας τιμές από τη φωτομετρική αντίδραση που περιγράφεται στο πρωτόκολλο 2.14, χωρίς να πραγματοποιηθεί επώαση στα διαλύματα και έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων σε υπολογιστικό πρόγραμμα Excel προέκυψε το Γράφημα 3.5. Είναι εμφανές από το γράφημα πως, το ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του οποίου το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα με τιμή  $1.01 \pm 0.05$  U/mg είναι το Tris-HCl (50 mM) με pH=9.0. Όταν το ένζυμο βρεθεί σε διαλύματα χαμηλότερων pH η ενεργότητά του ελαττώνεται και σε pH=7.0 αποσταθεροποιείται σημαντικά, δίνοντας ελάχιστη τιμή ειδικής ενεργότητας  $0.20 \pm 0.02$  U/mg.



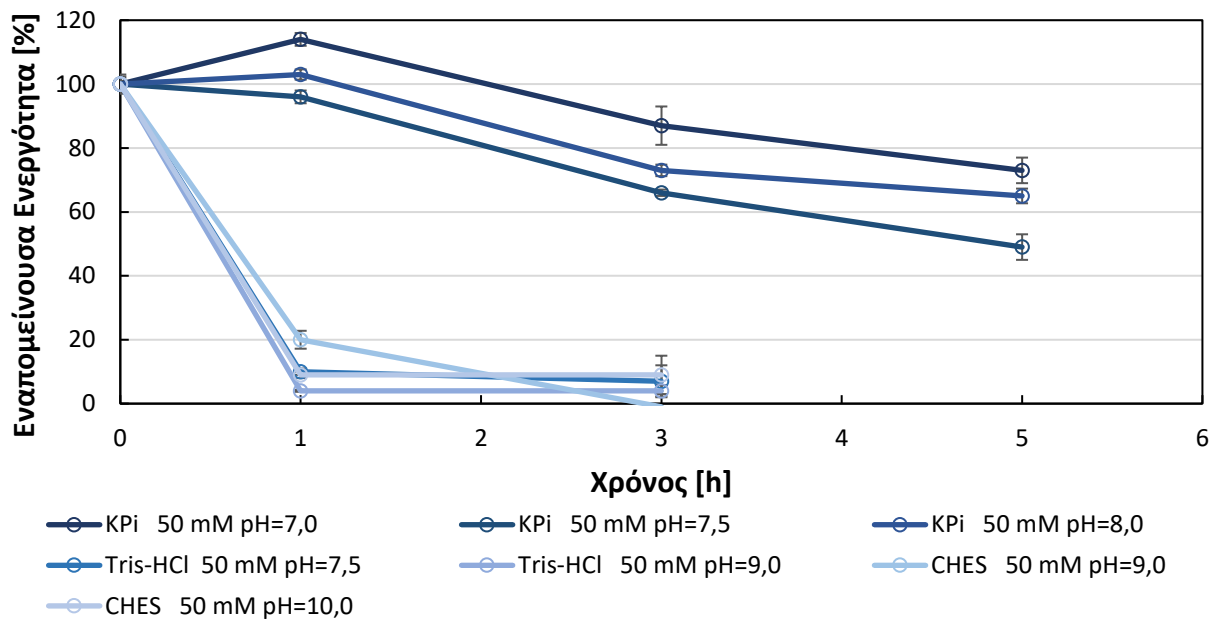
Γράφημα 3.5: Ειδική ενεργότητα του ΟΤΕΜΟ σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

Ακολούθως, προσδιορίστηκε η θερμοσταθερότητα για το ΟΤΕΜΟ, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.15. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.6, το ένζυμο επώαστηκε για 24 h στους 25 και 30 °C, αλλά για 3 h στους 35 και 40 °C. Στους 25°C το ένζυμο παρουσιάζει ενεργοποίηση, με τιμή εναπομείνουσας ενεργότητας 131%. Η τιμή αυτή πέφτει, όμως παραμένει στο 125% στις 24 h. Στους 30°C το ένζυμο ενεργοποιείται λιγότερο, φτάνοντας το 117% της αρχικής ενεργότητας, όμως, μετά το πέρας 24 h η τιμή αυτή ελαττώνεται στο 50%. Όσον αφορά τους 35 και 40 °C το ΟΤΕΜΟ αποσταθεροποιείται ταχύτατα, καθιστώντας τις θερμοκρασίες αυτές ακατάλληλες. Έτσι, συμπεραίνεται πως η βέλτιστη θερμοκρασία για τη λειτουργία του ΟΤΕΜΟ είναι οι 25 °C.



Γράφημα 3.6: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το OTEMO σε διάφορες θερμοκρασίες.

Όσον αφορά την επώαση του OTEMO σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.7, κατά την επώαση σε διαλύματα Tris-HCl και CHES η εναπομείνουσα ενεργότητα μηδενίστηκε σε διάστημα 3 h. Ενδιαφέρον παρουσίασε η ενεργοποίηση του ενζύμου στο διάλυμα KPi (50 mM) με pH=7.0, όμως, όπως και στα υπόλοιπα KPi, επήλθε σταδιακή απώλεια της ενεργότητας. Ως αποτέλεσμα της ανάλυσης αυτής προκύπτει ότι το OTEMO είναι ασταθές στα ρυθμιστικά διαλύματα που δοκιμάστηκαν, με την καταλυτική του ικανότητα να ελαττώνεται ταχύτερα σε υψηλότερες τιμές pH.

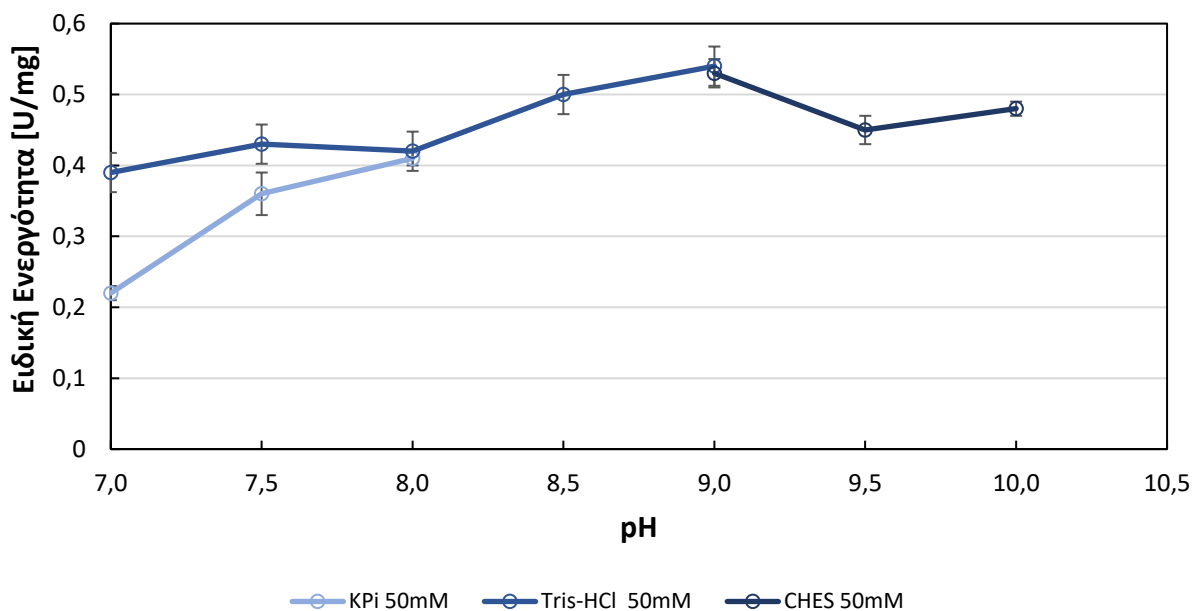


Γράφημα 3.7: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το OTEMO σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

### 3.3.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός CHMO Arthro

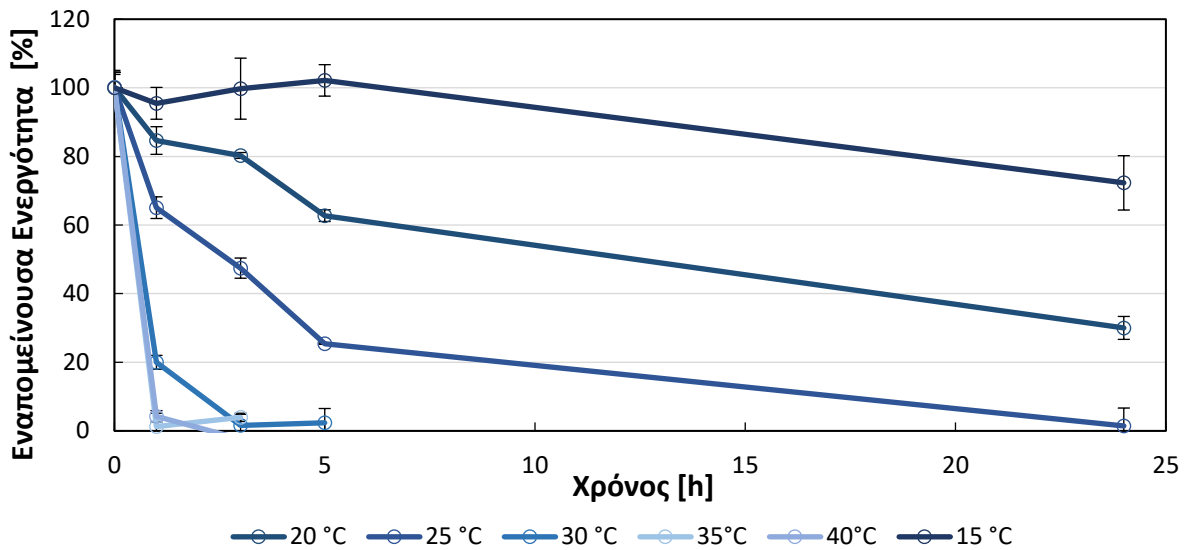
Κατά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του CHMO Arthro, προσδιορίστηκε η ενεργότητά του σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, χωρίς να επωαστεί σε αυτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο 2.14. Από το *Γράφημα 3.8* συμπεραίνεται πως η μέγιστη ενεργότητα για το ένζυμο, με τιμή  $0.54 \pm 0.02$  U/mg, παρατηρείται σε διάλυμα Tris-HCl (50 mM) με pH=9.0. Σε υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές pH η τιμή ελαττώνεται, παρουσιάζοντας ελάχιστο  $0.22 \pm 0.01$  U/mg σε KPi (50 mM) με pH=7.0.





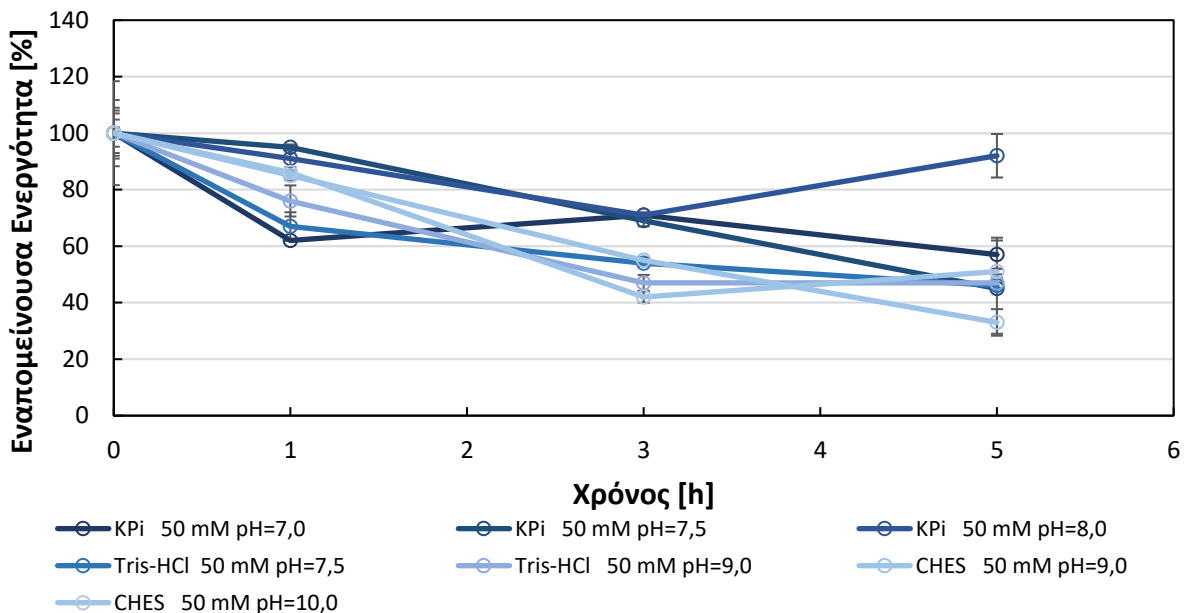
Γράφημα 3.8: Ειδική ενεργότητα του CHMO Arthro σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

Ακολούθως, το CHMO Arthro επώαστηκε σε θερμοκρασίες έως και 40 °C, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.15. Στο Γράφημα 3.9 είναι εμφανές πως στους 30, 35 και 40 °C το ένζυμο απενεργοποιήθηκε από τις πρώτες ώρες επώασης. Στους 20 και 25 °C παρατηρήθηκε πτώση της ενεργότητας κάτω του 50% σε διάστημα 24 h. Όσο για τους 15 °C, το ένζυμο παρουσιάστηκε σταθερό έως 5 h, όμως, στις 24 h επώασης, η ενεργότητα έπεσε στο 72%. Λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές αυτές, συμπεραίνεται πως το CHMO Arthro διατηρεί σημαντικό ποσοστό της ενεργότητάς του μόνο στους 15 °C.



Γράφημα 3.9: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το CHMO Arthro σε διάφορες θερμοκρασίες.

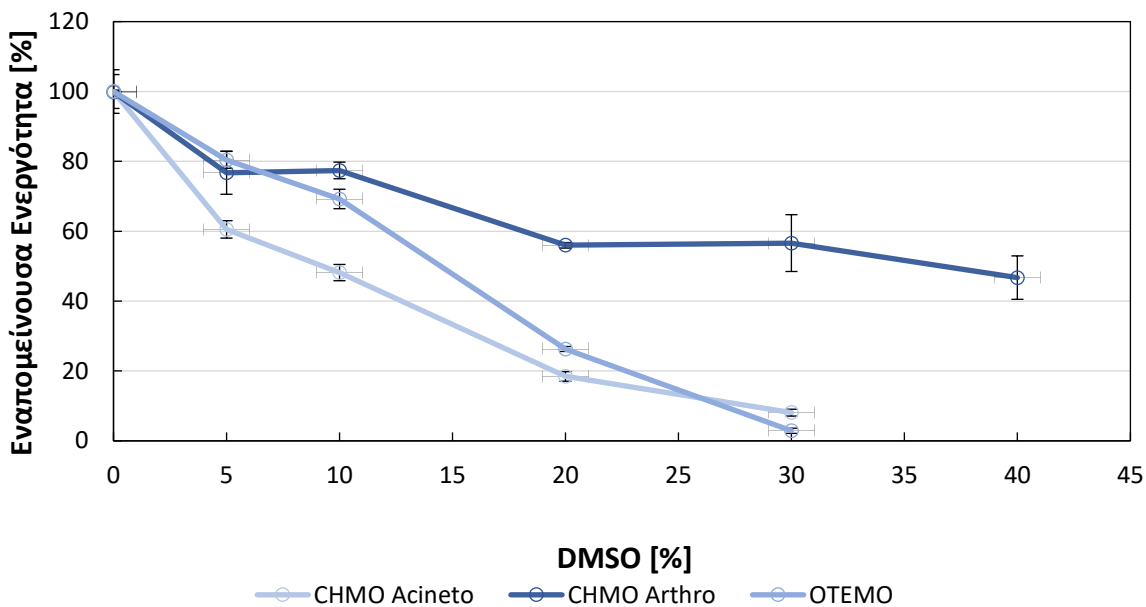
Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η σταθερότητα του CHMO Arthro σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, όπως φαίνεται στο Γράφημα 10, επωάζοντάς το σε αυτά και λαμβάνοντας μετρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Σε όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα το ένζυμο φαίνεται να χάνει σταδιακά την ενεργότητά του, με τις τιμές να πέφτουν κάτω του 60% στις 5 h. Αυτό αποδεικνύει πως το ένζυμο αποσταθεροποιείται σε όλα τα pH που δοκιμάστηκαν. Παρόλα αυτά, ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση της ενεργότητας στο 92%, στις 5 h, όταν το ένζυμο επώαστηκε σε ρυθμιστικό KPi (50 mM) με pH=8. Το συγκεκριμένο πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί, ώστε να εξαχθούν τελικά συμπεράσματα.



Γράφημα 3.10: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το CHMO Arthro σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

### 3.3.4 Σταθερότητα ΒΜΟs παρουσία συνδιαλύτη

Το DMSO αποτελεί έναν οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιείται συχνά ως συνδιαλύτης, καθώς είναι αναμίξιμος με το H<sub>2</sub>O, ενώ έχει τη δυνατότητα να διαλυτοποιεί υδρόφοβες ενώσεις. Για το λόγο αυτόν αποφασίστηκε να διερευνηθεί η συμπεριφορά των τριών ενζύμων παρουσία αυξανόμενων ποσοστών αυτού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Είναι φανερό, στο Γράφημα 3.11, πως η εναπομείνουσα ενεργότητα των CHMO Acineto και ΟΤΕΜΟ ελαττώνεται με γρήγορους ρυθμούς, όσο αυξάνεται το ποσοστό του συνδιαλύτη, επομένως η καταλυτική τους ικανότητα επηρεάζεται σημαντικά από αυτόν. Από την άλλη, το CHMO Arthro δείχνει να επηρεάζεται λιγότερο, διατηρώντας το 47% της ενεργότητάς του σε 40% DMSO. Αυτό υποδεικνύει ότι έχει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσία του DMSO σε σύγκριση με τα άλλα δύο ένζυμα. Παρόλα αυτά το CHMO Arthro διαθέτει εξ αρχής τη χαμηλότερη ειδική ενεργότητα, επομένως δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως το σταθερότερο εκ των τριών.



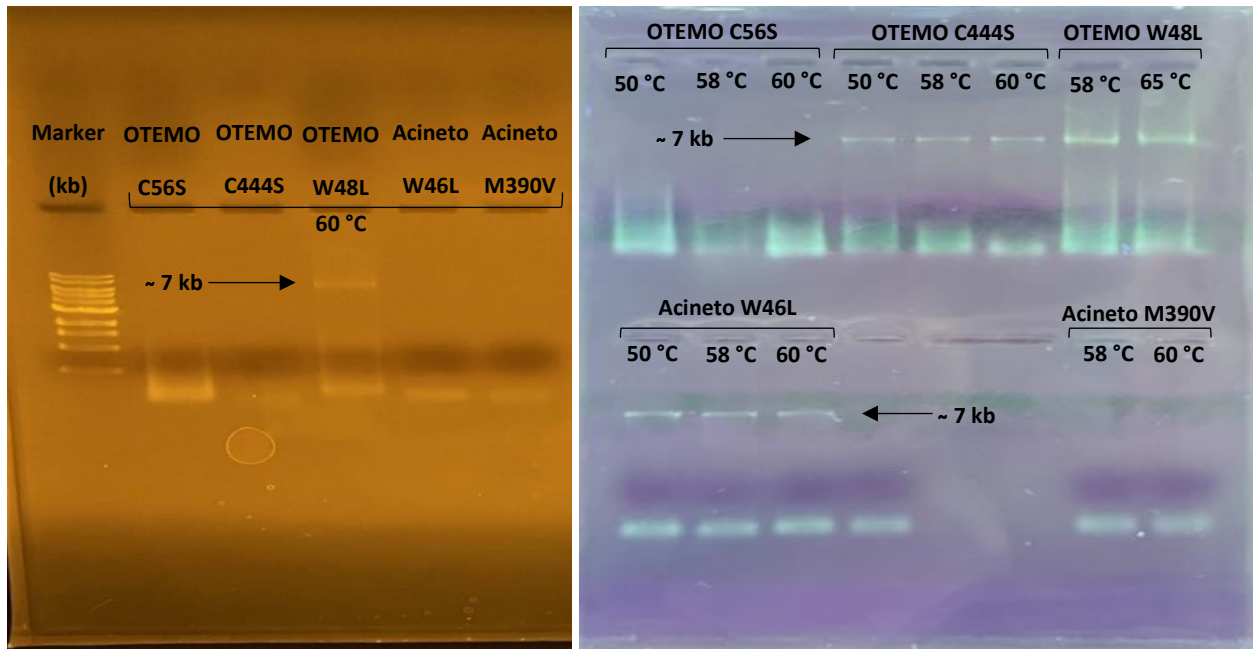
Γράφημα 3.11: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) των BVMOs σε αυξανόμενες ποσότητες DMSO.

### 3.4 Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

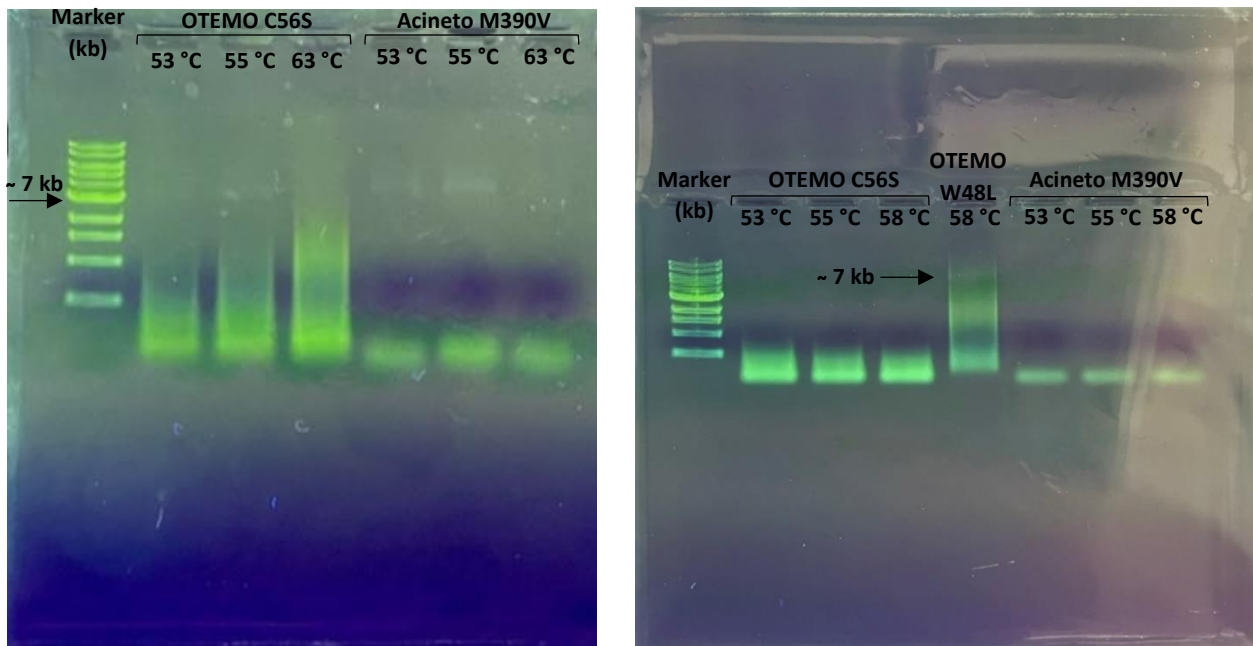
Η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί μόνο για τα ένζυμα CHMO Acineto και OTEMO, καθώς, όπως φάνηκε από την καλλιέργεια και το βιοχημικό χαρακτηρισμό του CHMO Arthro, το ένζυμο εκφράζεται σε χαμηλές ποσότητες, μετουσιώνεται ταχύτατα όταν βρεθεί σε θερμοκρασίες άνω των 15 °C για χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα των 5 h και χάνει την ενεργότητά του με γρήγορους ρυθμούς σε μια πληθώρα ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Αρχικά, σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές με τη διαδικασία που αναγράφεται στο πρωτόκολλο 2.17. Έπειτα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.18 πραγματοποιήθηκε η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και παράχθηκαν τα μεταλλάγματα OTEMO\_C56A, OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L, Acineto\_W46L και Acineto\_M390V. Στην *Εικόνα 3.2* και την *Εικόνα 3.3* παρουσιάζονται οι πηκτές αγαρόζης που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.22. Το πλασμίδιο του OTEMO έχει μήκος 6.944 bp, ενώ του CHMO Acineto 6.976 bp, επομένως για μια επιτυχημένη PCR αναμένεται να φανεί ζώνη μεταξύ των αντίστοιχων ζωνών 8 και 6 Kb του μάρτυρα, για καθένα από τα δύο ένζυμα. Όπως φαίνεται στα αριστερά της *Εικόνα 3.2* η αντίδραση ήταν επιτυχής για την μετάλλαξη OTEMO\_W48L, η οποία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 60°C. Στα δεξιά της εικόνας είναι εμφανές πως οι μεταλλάξεις OTEMO\_C444S, Acineto\_W46L και OTEMO\_W48L ήταν επιτυχείς σε αρκετές θερμοκρασίες.

Αντίστοιχα, στα αριστερά της *Εικόνας 3.3* φαίνεται η επιτυχημένη σύνθεση προϊόντος για τη μετάλλαξη OTEMO\_C56A και τη μετάλλαξη Acineto\_M390V. Ωστόσο, στα δεξιά της εικόνας φαίνεται να λειτουργήσει μόνο η μετάλλαξη OTEMO\_W48L σε θερμοκρασία υβριδισμού 58 °C. Για κάθε μετάλλαγμα προέκυψαν επιτυχείς αντιδράσεις σε περισσότερες από μία θερμοκρασίες υβριδισμού. Από αυτές επιλέχθηκε μία, εκείνη για την οποία φαινόταν η εντονότερη ζώνη στην πηκτή αγαρόζης, καθώς, δυνητικά, είχε τη μεγαλύτερη απόδοση. Έτσι, για την OTEMO\_C56A επιλέχθηκε το προϊόν από τους 63°C, για την OTEMO\_C444S από τους 50°C, για την OTEMO\_W48L από τους 58 °C, για την Acineto\_W46L από τους 58 °C και για την Acineto\_M390V από τους 50°C.



Εικόνα 3.2: Πηκτές ηλεκτροφόρησης DNA μεταλλαγμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού.



Εικόνα 3.3: Πηκτές ηλεκτροφόρησης DNA μεταλλαγμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού.

Ακολούθησε η πέψη των μεταλλαγμένων πλασμιδίων με DpnI, ο μετασχηματισμός τους σε κύτταρα Top10 *E. coli*, άπλωμα των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία LB-άγαρ, η παρασκευή προκαλλιέργειών από αποικίες των τρυβλίων και τέλος η απομόνωση πλασμιδίου για κάθε μετάλλαγμα, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα 2.23, 2.4, 2.8 και 2.6 αντίστοιχα. Από κάθε τρυβλίο λήφθηκαν δύο αποικίες, παρασκευάστηκαν δύο προκαλλιέργειες και απομονώθηκαν δύο πλασμίδια. Στη συνέχεια, σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού, μετρήθηκε η συγκέντρωσή των μεταλλαγμάτων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.7.

Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 40 ng/μL έως 315 ng/μL, και είναι στο εύρος που απαιτείται για την αλληλούχηση. Όσον αφορά τις καθαρότητες, τα δείγματα δεν παρουσιάζουν επιμολύνσεις από πρωτεΐνες, όπως υποδεικνύεται από το λόγο 260 nm/280 nm, ο οποίος εμφανίζει τιμές μεγαλύτερες από 1.8 για όλα τα δείγματα. Από την άλλη, τα περισσότερα δείγματα παρουσιάζουν πιθανή επιμόλυνση από οργανικές ενώσεις, αφού ο λόγος 260 nm/230 nm είναι 1.5 σε αρκετά από τα δείγματα. Παρόλα αυτά, τα πλασμίδια προετοιμάστηκαν και αποστάλθηκαν για αλληλούχηση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.24.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που απομονώθηκαν και καθαρότητες αυτών.

Μετάλλαξη-Αποικία	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα 260 nm/230 nm	Καθαρότητα 260 nm/280 nm
ΟΤΕΜΟ_C56A (1)	198.0	1.58	2.03
ΟΤΕΜΟ_C56A (2)	234.0	1.49	1.98
ΟΤΕΜΟ_C444S (1)	261.0	1.91	2.03
ΟΤΕΜΟ_C444S (2)	218.0	1.55	1.98
ΟΤΕΜΟ_W48L (1)	220.0	1.51	1.98
ΟΤΕΜΟ_W48L (2)	315.0	1.59	2.00
Acineto_W46L (1)	42.9	1.70	2.33
Acineto_W46L (2)	40.4	1.91	2.13
Acineto_M390V (1)	231.0	1.60	2.00
Acineto_M390V (2)	245.0	1.48	1.98

### 3.6 Αποτελέσματα αλληλούχησης μεταλλάγμάτων

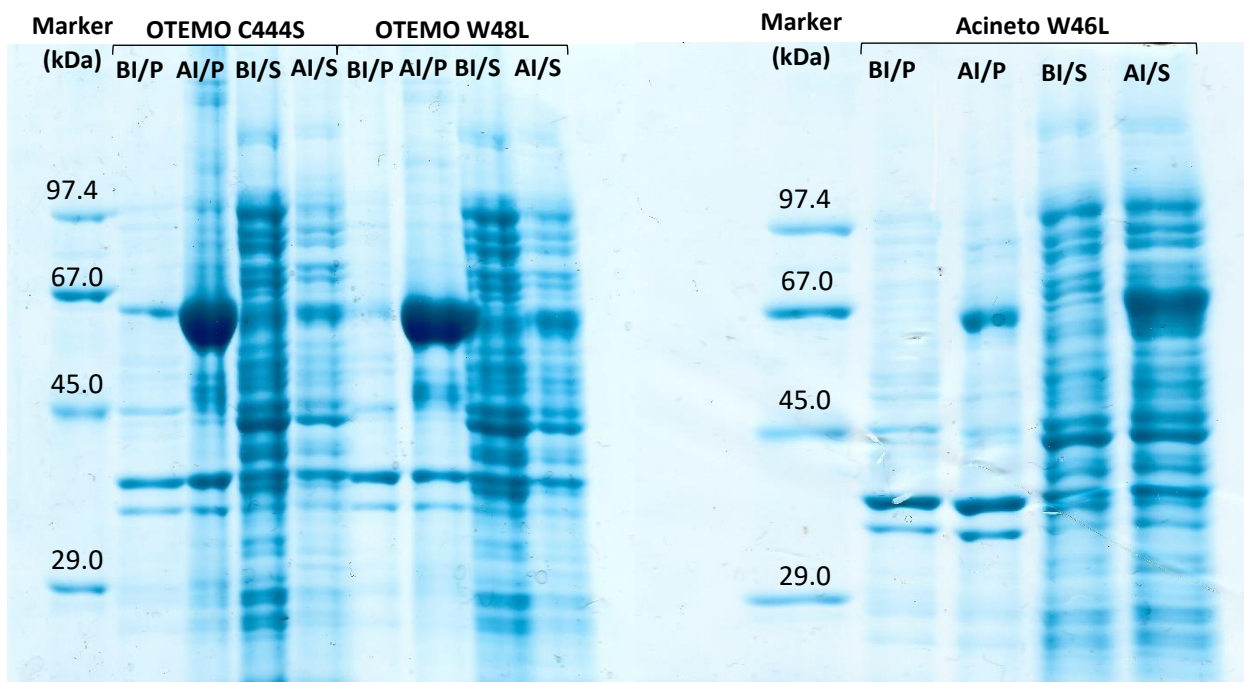
Τα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχηση και τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα μεταλλάγματα OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L και Acineto\_W46L διέθεταν την επιθυμητή αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Για τα OTEMO\_C56A και Acineto\_M390V φάνηκε αλληλουχία πλασμιδίου φυσικού τύπου. Ωστόσο, δεν μπόρεσε να ληφθεί εκ νέου προϊόν τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, ενδεχομένως, διότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακατάλληλοι. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου οι εκκινητές σχηματίζουν δεσμούς είτε μεταξύ τους, συμπληρωματικά, είτε ενδομοριακά, παράγοντας δομές φουρκέτας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μείωση των διαθέσιμων εκκινητών κατά τη μεταλλαξιγένεση και κατά συνέπεια χαμηλή απόδοση της αντίδρασης. Η μεταλλαξιγένεση για τα ένζυμα OTEMO\_C56A και Acineto\_M390V πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο, δοκιμάζοντας, για αρχή, νέους εκκινητές.

### 3.7 Καλλιέργεια μεταλλάγμάτων

Έχοντας επιτύχει στη μετάλλαξη των πλασμιδίων και έχοντας αλληλουχήσει τα OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L και Acineto\_W46L, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε χημειοδεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3), απλώθηκαν τρυβλία για κάθε μετάλλαγμα, καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα και καθαρίστηκαν οι τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα 2.4, 2.8-2.10. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE, με δείγματα BI και AI που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών τόσο από τις πρωτεΐνες που καταβυθίζονται, όσο και από τις υδατοδιαλυτές του υπερκειμένου. Στην *Εικόνα 3.4* φαίνονται οι δύο πηκτές που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση αυτή.

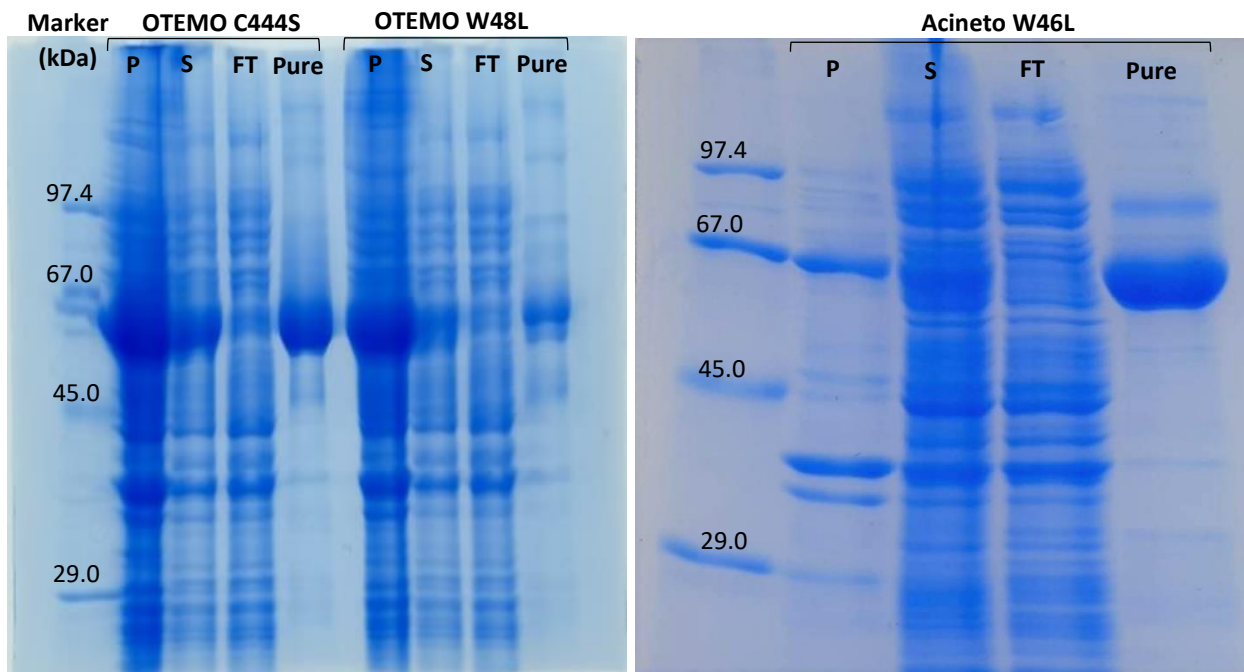
Για το μετάλλαγμα OTEMO\_C444S φαίνεται πως αρκετή ποσότητα εκφράζεται ως μη διαλυτή πρωτεΐνη, αλλά επαρκής ποσότητα παράγεται και στο διαλυτό δείγμα, για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του δείγματος. Το ίδιο συμβαίνει και για το OTEMO\_W46L. Όσον αφορά το Acineto\_W48L, η έκφραση του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στη διαλυτή του μορφή. Επομένως, και τα τρία μεταλλάγματα εκφράστηκαν ικανοποιητικά.





Εικόνα 3.4: Πηκτές SDS-PAGE OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L, Acineto\_W46L. Marker-Protein Test Mixture 6 Serva, BI/P-Δείγμα λυμένων μεμβρανών κυττάρων προ επαγωγής, AI/P-Δείγμα λυμένων μεμβρανών κυττάρων μετά επαγωγής, BI/S-Δείγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών προ επαγωγής, AI/S- Δείγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών μετά επαγωγής.

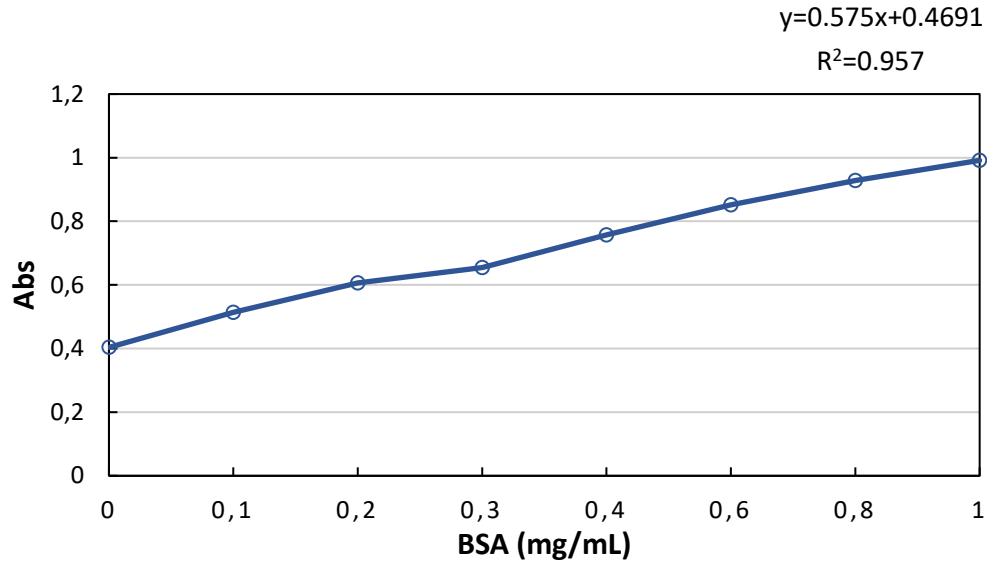
Αφού ολοκληρώθηκε ο καθαρισμός των τριών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, έλαβε χώρα μία ακόμα SDS-PAGE, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μετά από τη λύση της ολικής καλλιέργειας υδατοδιαλυτών και μη πρωτεϊνών, κλάσματα πρωτεϊνών που απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, αλλά και δείγματα καθαρής πρωτεΐνης και για τα τρία μεταλλάγματα. Παρατηρώντας την Εικόνα 3.5, είναι προφανές ότι τα ένζυμα OTEMO\_C444S και Acineto\_W46L καθαρίστηκαν ικανοποιητικά, ενώ η καθαρότητα της πρωτεΐνης OTEMO\_W48L είναι λίγο χαμηλότερη, αλλά επαρκής για τα επόμενα πειράματα.



Εικόνα 3.5: Πηκτές SDS-PAGE OTEMO\_C444S, OTEMO\_W48L, Acineto\_W46L. Marker-Protein Test Mixture 6 Serva, P-Δείγμα λυμένων μεμβρανών κυττάρων ολικής καλλιέργειας, S-Δείγμα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών ολικής καλλιέργειας, FT-Κλάσμα πρωτεϊνών κατά τον καθαρισμό, Pure-Δείγμα καθαρισμένης πρωτεΐνης

### 3.8 Μέτρηση συγκέντρωσης των μεταλλαγμάτων με τη μέθοδο Bradford

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση των τριών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών OTEMO\_C444S, OTEMO\_W46L και Acineto\_W48L, με τη χρήση της μεθόδου Bradford, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.12. Για το σκοπό αυτόν κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη Bradford και χρησιμοποιώντας την εξίσωση της ευθείας προσδιορίστηκε η συγκέντρωση για κάθε μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.



Γράφημα 3.12: Πρότυπη καμπύλη Bradford, κατασκευασμένη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ΟΤΕΜΟ\_C444S, ΟΤΕΜΟ\_W48L, Acineto\_W46L.

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των τριών δειγμάτων των ενζύμων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των ενζύμων φυσικού τύπου. Να σημειωθεί πως μετά τον καθαρισμό και την αφαλάτωση μπορεί να γίνει συμπύκνωση του δείγματος με φυγοκεντρικά φίλτρα, οπότε η συγκέντρωση των δειγμάτων δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη.

Πίνακας 3.2: Συγκεντρώσεις ενζύμων φυσικού τύπου και μεταλλαγμάτων.

Ένζυμο	C (mg/mL)	STDEV	DF
ΟΤΕΜΟ_C444S	4.3	0.1	10
ΟΤΕΜΟ_W48L	1.6	0.3	5
ΟΤΕΜΟ	4.57	0.06	5
Acineto_W46L	4.6	0.8	10
CHMO Acineto	2.95	0.07	5

### 3.9 Μέτρηση ενεργότητας των μεταλλαγμάτων

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε φωτομετρική αντίδραση για καθένα από τα τρία μεταλλαγμένα ένζυμα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.13, ώστε να προσδιοριστεί η ειδική ενεργότητα για τα ΟΤΕΜΟ\_C444S, ΟΤΕΜΟ\_W46L και Acineto\_W48L και να συγκριθεί με την αντίστοιχη των ΟΤΕΜΟ και CHMO Acineto φυσικού τύπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Όπως είναι εμφανές, το Acineto\_W46L παρουσιάζει ελάχιστη ενεργότητα, επομένως η

μετάλλαξη κατέστρεψε το 99 % της ενεργότητας του ενζύμου φυσικού τύπου, και, συνεπώς, δεν είναι επιθυμητή. Το ίδιο ισχύει και για το ΟΤΕΜΟ όπου η εισαγωγή της μετάλλαξης W48L οδήγησε σε απώλεια της ενεργότητας κατά 95 %. Όμως, παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι το ΟΤΕΜΟ\_C444S παρουσιάζει τετραπλάσια ενεργότητα από την αντίστοιχη πρωτεΐνη φυσικού τύπου. Αυτό υποδεικνύει πως η μετάλλαξη βελτίωσε σημαντικά την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως η καθαρισμένη πρωτεΐνη ΟΤΕΜΟ\_C444S εμφάνισε, επιπλέον, έντονο κίτρινο χρώμα, ενώ οι άλλες δύο ήταν άχρωμες. Αυτή η χρωματική διαφορά υποδηλώνει την ισχυρή πρόσδεση της προσθετικής ομάδας FAD στο ΟΤΕΜΟ\_C444S, ενώ οι μεταλλάξεις των ΟΤΕΜΟ\_W48L και Acineto\_W46L πιθανόν να παρεμπόδισαν αλληλεπιδράσεις, οι οποίες σταθεροποιούν το FAD στα ένζυμα, καθώς οι αρωματικοί δακτύλιοι της τρυπτοφάνης αντικαταστάθηκαν με την αλειφατική αλυσίδα της λευκίνης. Σύμφωνα με τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός μόνο του ΟΤΕΜΟ\_C444S

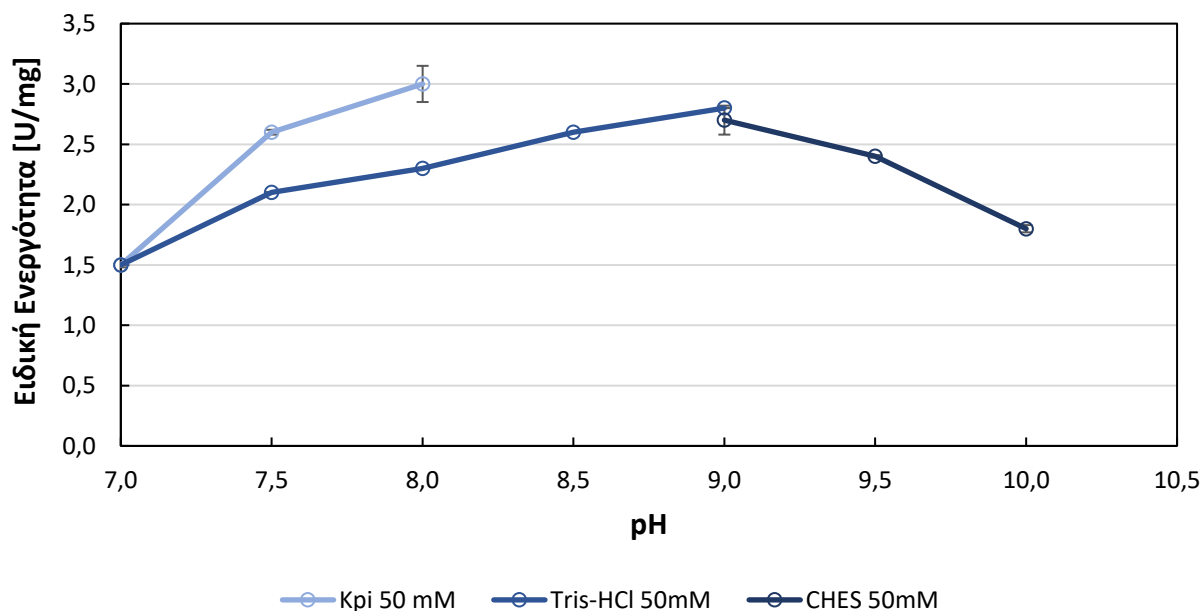
Πίνακας 3.3: Ειδικές ενεργότητες ενζύμων φυσικού τύπου και μεταλλαγμάτων.

Ένζυμο	Ειδική ενεργότητα [U/mg]	STDEV
Acineto_wt	3.6	0.3
Acineto_W46L	0.012	0.003
ΟΤΕΜΟ_wt	0.72	0.01
ΟΤΕΜΟ_C444S	2.80	0.03
ΟΤΕΜΟ_W48L	0.037	0.003

### 3.10 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ΟΤΕΜΟ\_C444S

Πρώτο βήμα στον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ΟΤΕΜΟ\_C444S αποτέλεσε ο προσδιορισμός του βέλτιστου pH για το ένζυμο. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.14. Όπως φαίνεται από το *Γράφημα 2.13*, το ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του οποίου το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ειδική ενεργότητα με τιμή  $3.0 \pm 0.1$  U/mg είναι το ΚΡi (50 mM) με pH=8.0. Η τιμή αυτή ελαττώνεται με αύξηση ή μείωση του pH και παρουσιάζει ελάχιστο για pH=7.0, υποδεικνύοντας ότι το ένζυμο αποσταθεροποιείται.

Στο *Γράφημα 3.5* το φυσικού τύπου ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη ειδική ενεργότητα σε διάλυμα (Tris-HCl 50 mM) με pH=9.0, ενώ σε ΚΡi (50 mM) με pH=8.0 παρουσιάζει περίπου το 65% της μέγιστης δραστηριότητας του. Αυτό υποδεικνύει μία μετατόπιση του βέλτιστου pH, ενώ φαίνεται ότι η μετάλλαξη οδήγησε σε μία καλύτερη δραστηριότητα παρουσία φωσφορικών αλάτων, καθώς στην περίπτωση του ενζύμου φυσικού τύπου το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα ΚΡi οδήγησε σε χαμηλότερη ενεργότητα από ότι το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl.

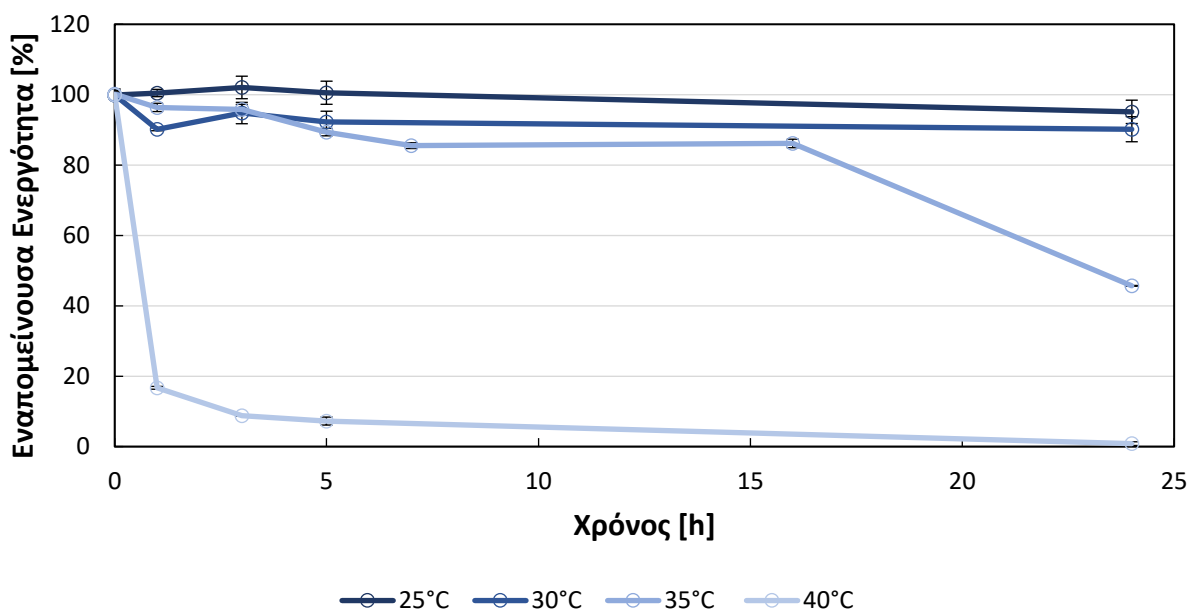


Γράφημα 3.13: Ειδική ενεργότητα του OTEMO\_C444S σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η θερμοσταθερότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου, επώζοντας το για 24 h σε θερμοκρασίες έως και 40 °C και λαμβάνοντας μετρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.15. Κατά την επώαση στους 35 °C λήφθηκαν επιπλέον μετρήσεις στις 7 και 16 h. Παρατηρώντας το *Γράφημα 3.14* είναι εμφανές πως η ενεργότητα του OTEMO\_C444S ελαττώνεται ραγδαία στους 40 °C, καθιστώντας τη θερμοκρασία αυτήν ακατάλληλη για αντιδράσεις με το συγκεκριμένο βιοκαταλύτη. Στους 25 °C, παρατηρείται σταθερότητα του ενζύμου, με την ενεργότητα να ελαττώνεται μόλις στο 95% στις 24 h. Αντίστοιχα, στους 30 °C, η ενεργότητα παραμένει στο 90% μετά το πέρας της επώασης. Ενδιαφέρουσες είναι οι τιμές που προκύπτουν από την επώαση στους 35 °C, ειδικά σε σύγκριση με το ένζυμο φυσικού τύπου. Το ένζυμο παρουσιάζει μια σταδιακή ελάττωση της ενεργότητας στο 89% σε διάστημα 5 h. Έως τις 16 h η ενεργότητα παρουσιάζει τιμή 86% της αρχικής, ενώ στις 24h, η καταλυτική ικανότητα του ενζύμου βρίσκεται στο 46% της αρχικής. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται πως το OTEMO\_C444S είναι σταθερό σε θερμοκρασίες 25 και 30 °C, ενώ παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα και στους 35 °C.

Συγκρίνοντας το μετάλλαγμα με το φυσικού τύπου ένζυμο, στο *Γράφημα 3.6*, στους 30 °C, μετά το πέρας της επώασης, το OTEMO εμφανίζει εναπομείνουσα ενεργότητα ίση με 50%, ενώ το μετάλλαγμα διατηρεί το 90% της αρχικής του ενεργότητας. Στους 35 °C το OTEMO καθίσταται μη λειτουργικό σε χρονικό διάστημα 3 h, ενώ, διατηρεί 46% της δραστηρότητάς του ύστερα από 24 h. Το OTEMO\_C444S, δηλαδή, παρουσιάζει σημαντικά βελτιωμένη θερμοσταθερότητα σε

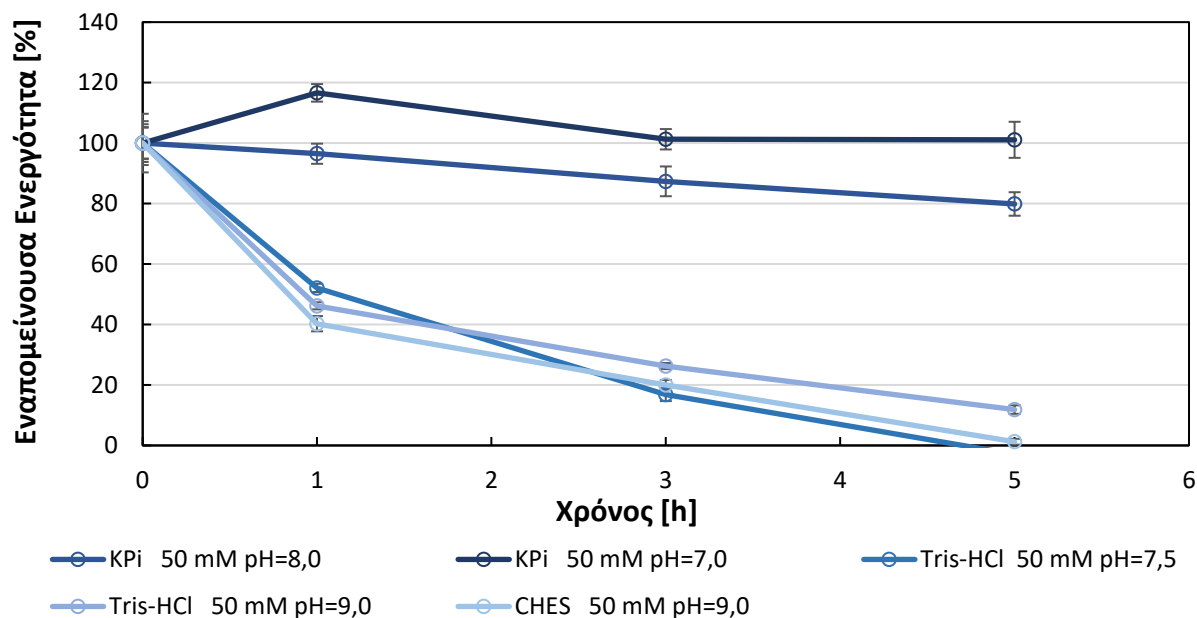
σχέση με το ΟΤΕΜΟ και είναι ικανό να διατηρεί μεγαλύτερη καταλυτική ικανότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες.



Γράφημα 3.14: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το ΟΤΕΜΟ\_C444S σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

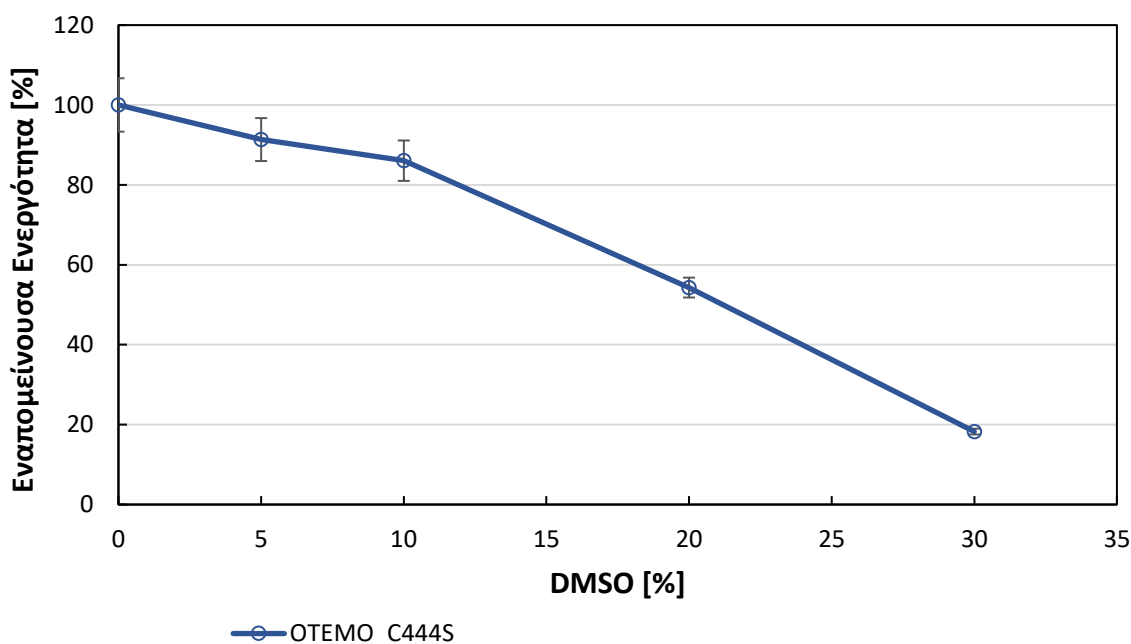
Στο Γράφημα 3.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σταθερότητας του ΟΤΕΜΟ\_C444S σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Λήφθηκαν μετρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα επώασης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Συγκεκριμένα, όπως παρατηρείται στο γράφημα, η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου μηδενίζεται ταχύτατα κατά την επώαση σε διαλύματα Tris-HCl και CHES. Αντίστοιχα, σε ρυθμιστικό διάλυμα KPi (50 mM) με pH=8.0, η ενεργότητα του ενζύμου ελαττώνεται σταδιακά, έως τον μηδενισμό της. Σε ρυθμιστικό διάλυμα KPi (50 mM) με pH=7, όμως, το ΟΤΕΜΟ\_C444S ενεργοποιείται (117% της αρχικής ενεργότητας), ενώ διατηρεί το 35% της αρχικής του δραστηριότητας ύστερα από επώαση 24 h. Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνεται πως το ΟΤΕΜΟ\_C444S παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα στις περισσότερες συνθήκες που μελετήθηκαν, εξαιρώντας το KPi 50 (mM) με pH=7 για διάστημα τουλάχιστον 5 h.

Στο Γράφημα 3.7 φαίνεται πως το φυσικού τύπου ένζυμο απενεργοποιείται σχεδόν πλήρως στις 3 h επώασης σε ρυθμιστικά διαλύματα Tris-HCl και CHES. Σε KPi (50 mM) με pH=7.0, το ΟΤΕΜΟ εμφανίζει μικρότερη ενεργοποίηση από ότι το μετάλλαγμα, ενώ, στις 24 h επώασης έχει απωλέσει εντελώς τη δραστηριότητά του. Συμπερασματικά, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει βελτιωμένη σταθερότητα σε σχέση με το ένζυμο φυσικού τύπου.



Γράφημα 3.15: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το OTEMO\_C444S σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα.

Οι μετρήσεις σε αυξανόμενα ποσοστά DMSO έλαβαν χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2.16. Όπως φαίνεται στο *Γράφημα 3.16*, η ενεργότητα του OTEMO\_C444S ελαττώνεται σταδιακά όσο αυξάνεται το DMSO. Σε ποσοστό 30% (v/v) DMSO το ένζυμο παρουσιάζει 18% ενεργότητα σε σχέση με την απουσία συνδιαλύτη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ο συνδιαλύτης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την καταλυτική δράση του ενζύμου. Παρόλα αυτά, Συγκρίνοντας τις τιμές του γραφήματος με τις αντίστοιχες που προέκυψαν για το OTEMO στο *Γράφημα 3.11*, προκύπτει ο *Πίνακας 3.4*. Από τα στοιχεία του συμπεραίνεται πως, αν και η ενεργότητα του μεταλλάγματος επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία DMSO, το OTEMO\_C444S είναι σταθερότερο από το OTEMO κατά την παρουσία DMSO στο διάλυμα.



Γράφημα 3.16: Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) για το OTEMO\_C444S παρουσία DMSO.

Πίνακας 3.4: Σύγκριση εναπομεινουσών ενεργοτήτων (%) OTEMO και OTEMO\_C444S σε DMSO.

DMSO	Εναπομείνουσα ενεργότητα OTEMO	Εναπομείνουσα ενεργότητα OTEMO_C444S
0	100%	100%
5%	80%	91%
10%	69%	86%
20%	26%	54%
30%	3%	18%

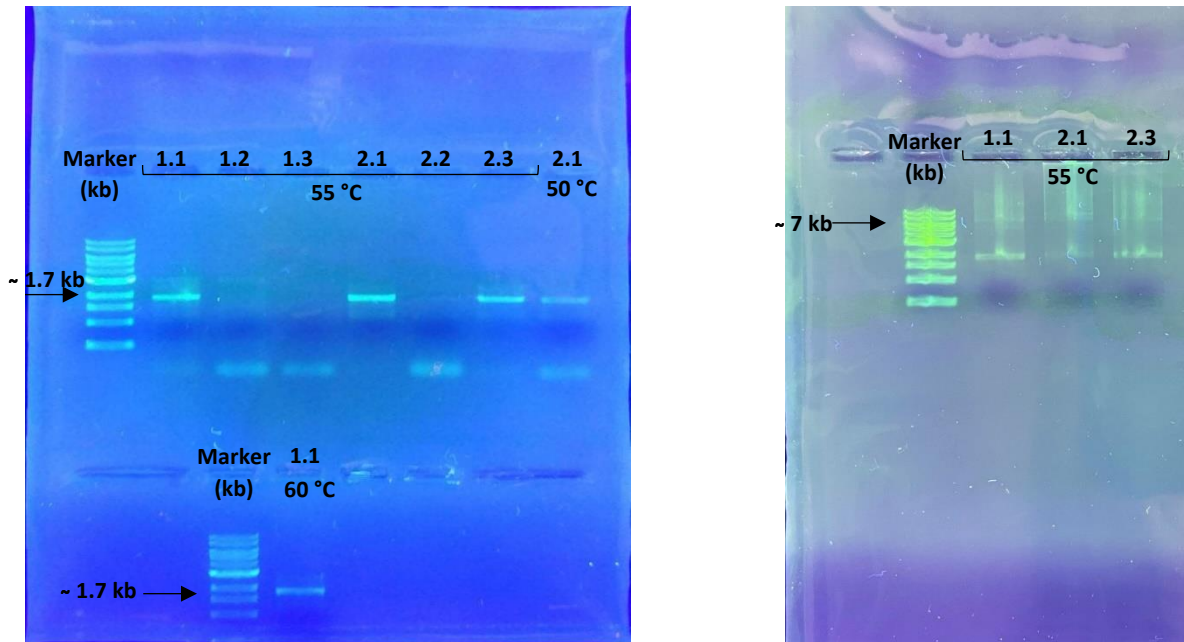
### 3.11 Τυχαία μεταλλαξιγένεση

Με την ολοκλήρωση του βιοχημικού χαρακτηρισμού του OTEMO\_C444S, αποφασίστηκε να ακολουθηθεί μία διαφορετική προσέγγιση, αποσκοπώντας στην αύξηση της θερμοσταθερότητας του OTEMO. Η προσέγγιση αυτή περιλάμβανε την τυχαία μεταλλαξιγένεση και τη δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών πολλαπλών μεταλλαγμάτων. Για την πραγματοποίηση αυτής της διαδικασίας επιλέχθηκε ως πατρικό πλασμίδιο το OTEMO\_C444S, καθώς το ένζυμο αυτό αποδείχθηκε ότι είναι σταθερότερο και πιο ανθεκτικό από το OTEMO.



Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα 2.21-2.23, έλαβε χώρα error prone PCR στο γονίδιο του μεταλλάγματος και στη συνέχεια συμπληρώθηκε το πλασμίδιο πραγματοποιώντας υποκλωνοποίηση με τη μέθοδο MEGAWHOP PCR.

Στην *Εικόνα 3.7*, αριστερά, φαίνεται η πηκτή αγαρόζης που προέκυψε από την error prone PCR, ενώ δεξιά η αντίστοιχη που προέκυψε από τη MEGAWHOP PCR. Το προϊόν της error prone PCR αναμένεται να έχει μήκος 1700 b. Οι ζώνες που υποδεικνύουν τη μεγαλύτερη επιτυχία και απόδοση της PCR προέκυψαν από υβριδισμό στους 55 °C και ισόποση παρουσία dNTPs (10 mM) με 0.25 mM MnCl<sub>2</sub> ή με ανισόποση κατανομή τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων όπως dTTP-dCTP 25 mM/dATP-dGTP 5 mM με 0.25 mM MnCl<sub>2</sub> και dTTP-dCTP 25 mM/dATP-dGTP 5 mM παρουσία 0.75 mM MnCl<sub>2</sub>. Τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση υποκλωνοποίησης με τη μέθοδο MEGAWHOP. Το νέο μεταλλαγμένο πλασμίδιο που παράγεται από τη MEGAWHOP, αναμένεται να έχει μήκος 6.944 bp. Η επιθυμητή ζώνη παρατηρείται και για τα τρία δείγματα, επομένως η διαδικασία ήταν επιτυχής. Από τα τρία αυτά προϊόντα προκύπτουν τρεις βιβλιοθήκες μεταλλαγμάτων, οι οποίες αναλύονται, με σκοπό τον προσδιορισμό εκείνης με τις περισσότερες και βέλτιστες μεταλλάξεις. Η βιβλιοθήκη αυτή υπόκειται σε έλεγχο υψηλής απόδοσης.



*Εικόνα 3.6: Πηκτές ηλεκτροφόρησης DNA τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (αριστερά) και υποκλωνοποίησης (δεξιά). [1.1], [1.2], [1.3] Δείγματα με dNTPs 10mM και MnCl<sub>2</sub> 0.25, 0.5 και 0.75mM αντίστοιχα. [2.1], [2.2], [2.3] Δείγματα με dCTP-dTTP 25mM, dATP-dGTP 5mM και MnCl<sub>2</sub> 0.25, 0.5 και 0.75 mM αντίστοιχα.*

### 3.12 Παρασκευή βιβλιοθήκης μεταλλαγμάτων του ΟΤΕΜΟ\_C444S

Τα μεταλλαγμένα πλασμίδια που προέκυψαν από τις τρεις διαφορετικές συνθήκες τυχαίας μεταλλαγμένης, μετασηματίστηκαν σε χημειοδεκτικά κύτταρα DH5a. Στη συνέχεια, απλώθηκαν τρυβλία και λήφθηκαν αποικίες για προκαλλιέργειες, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα 2.4 και 2.8. Από τα τρυβλία κάθε προϊόντος 1.1 (b), 2.1 (b) και 3.1 (b) λήφθηκαν δέκα αποικίες για το καθένα και από τις προκαλλιέργειες έλαβε χώρα απομόνωση πλασμιδίων. Κάθε αποικία περιείχε μια διαφορετική μετάλλαξη. Τα δέκα πλασμίδια που απομονώθηκαν για κάθε προϊόν αποτέλεσαν τις τρεις βιβλιοθήκες μεταλλαγμάτων προς ανάλυση, από το 1.1 η βιβλιοθήκη 1, από το 2.1 η βιβλιοθήκη 2 και από το 3.1 η βιβλιοθήκη 3. Τα πλασμίδια κάθε βιβλιοθήκης, οι συγκεντρώσεις και οι καθαρότητές τους παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5, 3.6, 3.7.

Πίνακας 3.5: Συγκεντρώσεις πλασμιδίων και καθαρότητες για τη βιβλιοθήκη 1.

Αποικία	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα 260 nm/230 nm	Καθαρότητα 260 nm/280 nm
A	31.0	1.91	2.00
B	47.9	3.85	2.02
C	27.3	2.38	2.12
D	39.8	3.62	2.01
E	42.6	2.35	2.10
F	49.8	2.24	2.12
G	38.0	2.90	2.09
H	49.4	2.33	2.13
I	47.6	2.09	2.07
J	39.4	2.89	2.12

Πίνακας 3.6: Συγκεντρώσεις πλασμιδίων και καθαρότητες για τη βιβλιοθήκη 2.

Αποικία	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα 260 nm/230 nm	Καθαρότητα 260 nm/280 nm
A	39.2	3,15	2.13
B	32.1	3.94	2.20
C	27.3	2.54	2.23
D	41.5	2.49	2.08
E	32.6	2.92	2.07
F	42.4	2.60	2.11

G	38.4	2.15	2.07
H	33.1	2.40	2.09
I	31.1	2.47	2.06
J	33.3	2.80	2.06

Πίνακας 3.7: Συγκεντρώσεις πλασμιδίων και καθαρότητες για τη βιβλιοθήκη 3.

Αποικία	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα 260 nm/230 nm	Καθαρότητα 260 nm/280 nm
A	34.0	5.97	1.95
B	35.8	5.99	1.97
C	49.3	5.35	2.03
D	43.2	4.24	2.00
E	39.1	6.87	2.07
F	42.5	13.5	1.80
G	44.7	4.74	2.04
H	34.2	6.83	2.00
I	36.5	5.11	1.99
J	34.2	4.65	2.17

Για καθεμία από τις τρεις βιβλιοθήκες έλαβε χώρα στατιστική ανάλυση, από τη μεταπτυχιακό φοιτήτρια Χριστίνα Μιχαλοπούλου, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν πως η βέλτιστη βιβλιοθήκη είναι η βιβλιοθήκη 3 (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η βιβλιοθήκη αυτή διέθετε τον μικρότερο αριθμό εισαγωγής νέων νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η πλειονότητα των μεταλλάξεων της συμπεριλάμβανε τη μετατροπή πυριμιδίων σε πουρίνες, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό αυτών οδήγησε στην κωδικοποίηση διαφορετικών αμινοξέων. Αναμένεται η μελέτη της παρούσας βιβλιοθήκης για την εύρεση νέων σταθερότερων ενζύμων.

## Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα, τα οποία αφορούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν. Η έκφραση του CHMO Arthro παρουσία του συστήματος groEL-groES-tig, υποδεικνύει πως τα τσαπερόνια αυτά είναι απαραίτητα για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας του ενζύμου. Επιπλέον, η πραγματοποίηση βιοχημικού χαρακτηρισμού των CHMO Acineto, OTEMO και CHMO Arthro επιβεβαίωσε πως οι πρωτεΐνες αυτές είναι ασταθείς σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα και παρουσία αυξανόμενης ποσότητας DMSO, ενώ αποσταθεροποιούνται και χάνουν τη δραστηκότητά τους με αύξηση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, τα CHMO Acineto και OTEMO διατηρούν το 100% της εναπομείνουσας ενεργότητας σε θερμοκρασίες έως 25 °C, ενώ στους 30°C παρουσιάζουν ενεργότητα 50% μετά το πέρας εικοσιτετράωρης επώασης. Το CHMO Arthro διατηρεί το 72% της εναπομείνουσας ενεργότητάς του στους 15 °C, όμως, έπειτα από 24 h σε θερμοκρασία 20 °C, η ενεργότητά του ελαττώνεται στο 30%. Όσον αφορά την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, ένα εκ των πέντε μεταλλαγμάτων που σχεδιάστηκαν εκφράστηκε επιτυχώς και διαπιστώθηκε ότι διαθέτει καταλυτική ικανότητα, ως προς τη δικυκλο[3,2,0]επτ-2-εν-6-όνη. Αυτό είναι το OTEMO\_C444S, το οποίο παρουσιάζει τετραπλάσια ειδική ενεργότητα σε σύγκριση με το ένζυμο φυσικού τύπου, αυξημένη θερμοσταθερότητα, βραδύτερη αποσταθεροποίηση σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα, καθώς και παρουσία DMSO. Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα χρησιμοποιήθηκε ως βάση για το σχεδιασμό βιβλιοθηκών τυχαίας μεταλλαξιγένεσης, οι οποίες αναμένεται να δώσουν πρόσβαση σε μεταλλάγματα με μεγαλύτερη σταθερότητα.

## Μελλοντικοί στόχοι

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει προοπτικές, ώστε να συνεχιστεί μελλοντικά με την πραγματοποίηση νέων πειραμάτων. Αρχικά, δύναται να σχεδιαστούν καινούριοι, κατάλληλοι εκκινητές για την πραγματοποίηση των μεταλλάξεων OTEMO\_C56S και Acineto\_M390V και στη συνέχεια, την υπερέκφραση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Ακολούθως, προτείνεται η παρασκευή βιβλιοθηκών τυχαίας μεταλλαξιγένεσης, χρησιμοποιώντας ως βάση τα τρία ένζυμα φυσικού τύπου, οι οποίες, μαζί με τη βιβλιοθήκη του OTEMO\_C444S θα υποβληθούν σε έλεγχο υψηλής απόδοσης, με σκοπό την ταυτοποίηση σταθερότερων μεταλλαγμάτων. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα να πραγματοποιηθούν αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία, ώστε να ταυτοποιηθεί το ποσοστό των υποστρωμάτων που μετατρέπεται στο επιθυμητό προϊόν.

## Βιβλιογραφία

1. Ι. Κλώνης, *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, 4, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2020), 1
2. M. Staiano, A. Pennacchio, A. Varriale, A. Capo, A. Majoli, C. Capacchione, Enzymes as Sensors, *Methods in Enzymology*, 589, Academic Press Inc., (2017), 115-131
3. R. A. Sheldon, J. M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chemical Reviews*, 118, American Chemical Society, (2018), 801-838
4. J. M. Woodley, New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener, *Trends in Biotechnology*, 26, (2008), 321-327
5. N. J. Turner, Directed evolution drives the next generation of biocatalysts, *Nature Chemical Biology*, Nature Publishing Group, (2009), 567-573
6. J. Wachtmeister, D. Rother, Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale, *Current Opinion in Biotechnology*, 42, Elsevier Ltd., (2016), 169-177
7. S. Slagman, H. Zuilhof, M. Franssen, Laccase-Mediated Grafting on Biopolymers and Synthetic Polymers: A Critical Review, *ChemBioChem*, 19, Wiley-VCH Verlag, (2018), 288-311
8. U. T. Bornscheuer, The fourth wave of biocatalysis is approaching, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376, Royal Society Publishing, (2018), 1-7
9. A.G. McDonald, K.F. Tipton, Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties, *FEBS Journal*, 281, (2014), 583-592
10. C.E. Paul, D. Eggerichs, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. van Berkel, Flavoprotein monooxygenases: versatile biocatalysts, *Biotechnology Advances*, 51, (2021), 1-25
11. W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts, *Journal of Biotechnology*, 124, (2006), 670-689
12. M. M. E. Huijbers, S. Montersino, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. van Berkel, Flavin dependent monooxygenases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544, Academic Press Inc., (2014), 2-17
13. S. Montersino, R. Orru, A. Barendregt, A. H. Westphal, E. van Duijn, A. Mattevi, Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase uncovers lipid-assisted flavoprotein

- strategy for regioselective aromatic hydroxylation, *Journal of Biological Chemistry*, 288, (2013), 26235-26245
14. V. Alphand, G. Carrea, R. Wohlgemuth, R. Furstoss, J. M. Woodley, Towards large-scale synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases, *Trends in Biotechnology*, 21, Elsevier Ltd, (2003), 318-323
  15. H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, Baeyer-Villiger monooxygenases: More than just green chemistry, *Chemical Reviews*, 111, American Chemical Society, (2011), 4165–4222
  16. C. T. Walsh, Y. C. J. Chen, Enzymic Baeyer-Villiger Oxidations by Flavin-Dependent Monooxygenases, *Angewandte Chemie*, 27, (1988), 333-343
  17. J. W. Hastings, K. H. Nealson, Bacterial bioluminescence light emission in the mixed function oxidation of reduced flavin and fatty aldehyde, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, (1978), 163-184
  18. C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Morikawa, Cloning and expression of three ladA-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23, *Extremophiles*, 18, (2014), 515–523
  19. P. Pimviriyakul, K. Thotsaporn, J. Sucharitakul, P. Chaiyen, Kinetic mechanism of the dechlorinating flavin-dependent monooxygenase HadA, *Journal of Biological Chemistry*, 292, (2017), 4818-4832
  20. B. Ricken, B. A. Kolvenbach, C. Bergesch, D. Benndorf, K. Kroll, H. Strnad, κ. α., FMNH<sub>2</sub>-dependent monooxygenases initiate catabolism of sulfonamides in *Microbacterium* sp. strain BR1 subsisting on sulfonamide antibiotics, *Sci Rep*, 7, (2017), 1-11
  21. S. Panke, M. G. Wubbolts, A. Schmid, B. Witholt, Production of Enantiopure Styrene Oxide by Recombinant *Escherichia coli* Synthesizing a Two-Component Styrene Monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.*, 69, (2000), 91-100
  22. J. Latham, E. Brandenburger, S. A. Shepherd, B. R. K. Menon, J. Micklefield, Development of Halogenase Enzymes for Use in Synthesis, *Chem Rev*, 118, (2018), 232-269
  23. H. M. Gaweska, A. B. Taylor, P. J. Hart, P. F. Fitzpatrick, Structure of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase, a key enzyme in the formation of galls in plants, *Biochemistry*, 52, (2013), 2620-2626
  24. M. Renz, B. Meunier, 100 Years of Baeyer-Villiger Oxidations, *European Journal of Organic Chemistry*, (1999), 737-750

25. S. Schmidt, U. T. Bornscheuer, Baeyer-Villiger monooxygenases: From protein engineering to biocatalytic applications, *Enzymes*, Academic Press, (2020), 231-281
26. K. Balke, A. Beier, U. T. Bornscheuer, Hot spots for the protein engineering of Baeyer-Villiger monooxygenases, *Biotechnology Advances*, 36, Elsevier Inc., (2018), 247-263
27. K. Balke, A. Beier, U. T. Bornscheuer, Hot spots for the protein engineering of Baeyer-Villiger monooxygenases, *Biotechnology Advances*, 36, Elsevier Inc., (2018), 247-263
28. U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, Engineering the third wave of biocatalysis, *Nature*, 485, (2012), 185-194
29. Z. G. Zhang, L. P. Parra, M. T. Reetz, Protein engineering of stereoselective Baeyer-Villiger monooxygenases, *Chemistry - A European Journal*, 18, (2012), 10160-10172
30. D. J. Opperman, M. T. Reetz, Towards practical Baeyer-Villiger-monooxygenases: Design of cyclohexanone monooxygenase mutants with enhanced oxidative stability, *ChemBioChem*, 11, (2010), 2589-2596
31. E. Romero, J. R. G. Castellanos, A. Mattevi, M. W. Fraaije, Characterization and Crystal Structure of a Robust Cyclohexanone Monooxygenase, *Angewandte Chemie*, 55, (2016), 15852-15855
32. M. J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703, (2005), 93-109
33. L. O. Klotz, K. D. Kröncke, H. Sies, Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2, Royal Society of Chemistry, (2003), 88-94
34. U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Survey of protein engineering strategies, *Curr Protoc Protein Sci.*, 66, (2011), 1-26
35. R. J. Kazlauskas, U. T., Bornscheuer, Finding Better Protein Engineering strategies, *Nature Chemical Biology*, 4, (2009), 526-529
36. B. G. Kyte, P. Rouvière, Q. Cheng, J. D. Stewart, Assessing the Substrate Selectivities and Enantioselectivities of Eight Novel Baeyer-Villiger Monooxygenases toward Alkyl-Substituted Cyclohexanones, *Journal of Organic Chemistry*, 69, (2004), 12-17
37. K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Saß, U. T. Bornscheuer, Discovery, application and protein engineering of Baeyer-Villiger monooxygenases for organic synthesis, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10, Royal Society of Chemistry, (2012), 6249-6265

38. C. Shuo-Shuo, L. Xue-Zheng, S. Ji-Hong, Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948, *Protein Expr Purif.*, 77, (2011), 166-172
39. B. Azimi, P. Nourpanah, M. Rabiee, S. Arbab, Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Fiber: An Overview, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 9, (2014), 74-90
40. Codon Usage Frequency Table (chart) Tool, *GenScript*.
41. PCR Primer Design Guidelines, *Premier Biosoft*
42. K. Balke, M. Bäumgen, U. T. Bornscheuer. Controlling the Regioselectivity of Baeyer–Villiger Monooxygenases by Mutation of Active-Site Residues, *ChemBioChem*, 18 (2017), 1627-1638