



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την ετερόλογη έκφραση γονιδίου του υποδοχέα ABA του είδους *Gossypium hirsutum*».

"Protocol development for the heterologous expression of the ABA receptor gene from the species *Gossypium hirsutum*"



Σαμέλη Παρασκευή του Αποστόλου

ΛΑΡΙΣΑ , 2025

«Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την ετερόλογη έκφραση
γονιδίου του υποδοχέα ABA του είδους *Gossypium*
hirsutum».

"Protocol development for the heterologous expression of
the ABA receptor gene from the species *Gossypium*
hirsutum"

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Βασιλική Σκαμνάκη , Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-
Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Δημήτρης Λεωνίδας, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Αναστασία Καντσάδη, Επίκουρος Καθηγήτρια ,Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstact	7
1.Εισαγωγή	
1.1 Το βαμβάκι (<i>Gossypium</i>)	8
1.2 Αβιοτικό στρες	10
1.3 Αμπισισικό οξύ (ABA)	10
1.4 Μονοπάτι σηματοδότησης ABA	12
1.5 Ιοντική μεταφορά και κλείσιμο στομάτων	15
1.6 Ετερόλογη έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών	17
1.7 Καθαρισμός πρωτεϊνών	21
Σκοπός	25
2.Μέθοδοι και Υλικά	
2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός	26
2.2 Υλικά και μέσα για την καλλιέργεια βακτηρίων	26
2.3 Βακτηριακά στελέχη BL21, XL1-blue και φορέας ετερόλογης έκφρασης pGEX-6P1	27
2.4 Ρυθμιστικά διαλύματα	27
2.5 Βιοπληροφορική Μελέτη	28
2.6 Μοριακές Τεχνικές	29
2.6.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων BL21 και καλλιέργεια κυττάρων	30
2.6.2 Δοκιμασίες έκφρασης (expression tests)	30
2.6.3 Καλλιέργεια στελεχών E. coli. XL1-blue και απομόνωση πλασμιδιακού φορέα έκφρασης	31
2.7 Παρασκευαστικές Μέθοδοι	31
2.7.1 Λύση των κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού διαλύματος	31
2.7.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι καθαρισμού	32
2.7.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη	32
2.7.2.2 Διαπίδυση- Απομάκρυνση της γλουταθειόνης - Αποκοπή της GST	33
2.7.2.3 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη (αφαιρετική)	34
2.7.2.4 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη με ταυτόχρονη αποκοπή ετικέτας	34
2.7.2.5 Καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης	34
2.7.2.6 Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής	35
2.7.2.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	35
2.8 Αναλυτικές Μέθοδοι	35

2.8.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	35
2.8.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης σε nanodrop	38
3. Αποτελέσματα	
3.1 Βιοπληροφορική μελέτη	39
3.2 Βελτιστοποίηση γονιδίων για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε σύστημα έκφρασης E.coli (codon optimization)	39
3.3 Αποτελέσματα απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα	40
3.4 Δοκιμασίες έκφρασης	40
3.5 Χρωματογραφικές αναλύσεις	45
3.5.1 Χρωματογραφία με συγγένεια προς τη γλουταθειόνη	46
3.5.2 Χρωματογραφία συγγένειας προς την γλουταθειόνη (αφαιρετική)	48
3.5.3 Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής	50
3.5.4 Αποτελέσματα μετά από επώαση με σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης	52
3.5.5 Χρωματογραφία συγγένειας με γλουταθειόνη-πέψη με precision protease 3C	53
3.5.6 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	54
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	58
5. Βιβλιογραφία	60

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας το εαρινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2024-2025 υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας Βιοχημείας-Μεταβολισμού Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη. Αρχικά , θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια της εργασίας Βασιλική Σκαμνάκη για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε εντάσσοντας με στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση της κατά την διεξαγωγή της εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια και μέλος της τριμελούς επιτροπής Δρ. Αναστασία Καντσάδη για την πρακτική της βοήθεια, αλλά και την καθηγήτρια Δρ. Δανιέλα Τσίκου για την καθοδήγηση της κατά την εύρεση του θέματος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να δώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Σεραφείμ Αλεξόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του ,τη συνεχή του καθοδήγηση, την υπομονή και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακό φοιτήτρια Χριστίνα Ανατολιωτάκη και την συμφοιτήτρια μου , Ευανθία Μπακή για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν.

Επιπλέον , θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους για την αισθητή υποστήριξη τους, άλλα και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει.

Κλείνοντας, θα ήθελα να δώσω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους γονείς μου που πρόσφεραν αυτή την ευκαιρία και για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η καλλιέργεια βαμβακιού αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους και κερδοφόρους κλάδους της γεωργίας. Μία από τις σοβαρότερες γεωργικές καταπονήσεις που πλήττει τις καλλιέργειες βαμβακιού είναι το αβιοτικό στρες, και συγκεκριμένα η ξηρασία. Το αμπισισικό οξύ (ABA) είναι μία φυτοορμόνη που βοηθά, μεταξύ άλλων, την προσαρμογή και την επιβίωση των φυτών στην ξηρασία. Μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμπισισικού οξέος, στο οποίο συμμετέχουν οι υποδοχείς PYR/PYL/R-CAR, οι φωσφατάσες PP2C και οι κινάσες SnRK2, το ABA προκαλεί κλείσιμο των στομάτων και μείωση των απωλειών νερού. Βασικό ρυθμιστικό μόριο του εν λόγω μονοπατιού αποτελούν οι υποδοχείς PYR/PYL/R-CAR. Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου ετερόλογης έκφρασης της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR/PYL1 από το είδος βαμβακιού *Gossypium hirsutum*. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριών *Escherichia coli* με πλασμιδιακό φορέα, στον οποίο είχε γίνει εισαγωγή του γονιδίου του υποδοχέα. Ακολούθησε καλλιέργεια των βακτηριών σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και παρακολούθηση των ποσοστών έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός καθαρισμός της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR/PYL1. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων γεωργικών προϊόντων που βοηθούν την καλλιέργειά βαμβακιού υπό συνθήκες ξηρασίας.

Abstract

The cultivation of cotton constitutes one of the most widespread and rewarding sectors of agriculture. One of the main problems in agriculture regarding cotton plantation is abiotic stress, and more specifically drought stress. Absciscic acid (ABA) is a phytohormone that, among other roles, helps plants adapt to and survive when in drought conditions. Through the abscisic acid signaling pathway, involving the PYR/PYL/R-CAR ABA receptors, the PP2C phosphatases and the SnRK2 kinases, ABA manages to induce stomatal closure and thus reduces water loss. A key regulatory component of this signaling pathway is the group of PYR/PYL/RCAR receptors. The present study focuses on the development of a protocol for the heterologous expression of the PYR/PYL1 receptor protein from the cotton species *Gossypium hirsutum*. More specifically, transformation of *Escherichia coli* bacteria was performed using a plasmid vector, into which the receptor gene had been inserted. The bacteria were then cultured under different growth conditions, and the levels of heterologous protein expression were observed and monitored. Furthermore, chromatographic purification of the receptor PYR/PYL1 protein was pursued. The results could potentially be used in the future for the development of new agricultural products that support cotton cultivation under drought conditions.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το βαμβάκι (*Gossypium*)

Το βαμβάκι είναι ένα ευρέως καλλιεργούμενο φυτό μεγάλης οικονομικής σημασίας. Αναλυτικότερα, η καλλιέργεια του βαμβακιού αποτελεί έναν από τους βασικότερους κλάδους της γεωργίας, αφού το βαμβάκι καλλιεργείται ενεργά σε πάνω από 75 χώρες (Yang et al., 2020). Μάλιστα, το 87% της παγκόσμιας έκτασης της καλλιέργειας βαμβακιού βρίσκεται σε αναπτυσσόμενες χώρες (Nix et al., 2017).

Τα οικονομικά οφέλη του βαμβακιού προέρχονται κυρίως από την χρήση του ως πρώτη ύλη στην κλωστοϋφαντουργία ως μία φυσική, αλλά ανθεκτική φυτική ίνα. Επιπλέον, από τους σπόρους του βαμβακιού παράγεται το βαμβακέλαιο, το οποίο αξιοποιείται για διατροφικούς, αισθητικούς αλλά και για βιομηχανικούς σκοπούς (Saleem et al., 2024).



Εικόνα 1: Το φυτό *Gossypium hirsutum* (βαμβάκι)

Υπάρχουν περίπου 50 είδη βαμβακιού (*Gossypium*) που ανήκουν στην οικογένεια Malvaceae. Ωστόσο, μόνο τέσσερα είδη καλλιεργούνται ευρέως για την παραγωγή βαμβακιού. Σχεδόν το 97% του παραγόμενου προϊόντος προέρχεται από το είδος *Gossypium hirsutum*, 2-3% προέρχεται από το *G. arboreum*, και λιγότερο από 1% από τα *G. Herbaceum* και *G. barbadense* (Nix et al., 2017).

Το βάμβακι είναι ένας οργανισμός με πολύπλοκη γενετική δομή, αφού περιλαμβάνει 8 ομάδες διπλοειδών γονιδιωμάτων (A-G, K) και μία ομάδα αλλοπολυπλοειδών (AD), η οποία προέκυψε από μια συγχώνευση και διπλασιασμό χρωμοσωμάτων μεταξύ των προγονικών γονιδιωμάτων A και D. Οι ομάδες γονιδιωμάτων διαφέρουν όσον αφορά τη γενετική ποικιλομορφία, αφού υπάρχουν κατηγορίες στις οποίες ανήκει μόνο ένα είδος, όπως η ομάδα F, ενώ σε άλλες όπως η D και η K κατατάσσονται πάνω από 12 είδη (Wang et al., 2018).

Genome group	Number of species	Species presently recognized
A	2	<i>G. arboreum</i> , <i>G. herbaceum</i>
B	3–4	<i>G. anomalum</i> , <i>G. triphyllum</i> , <i>G. capitata-viridis</i> , (<i>G. trifurcatum</i>)
C	2	<i>G. sturtianum</i> , <i>G. robinsonii</i>
D	13–14	<i>G. thurberi</i> , <i>G. armourianum</i> , <i>G. harknessii</i> , <i>G. davidsonii</i> , <i>G. klotzschianum</i> , <i>G. aridum</i> , <i>G. raimondii</i> , <i>G. gossypoides</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. trilobum</i> , <i>G. laxum</i> , <i>G. turneri</i> , <i>G. schwendimanii</i> , (<i>G. sp.nov.</i>)
E	5–9	<i>G. stocksii</i> , <i>G. somalense</i> , <i>G. areysianum</i> , <i>G. incanum</i> , <i>G. trifurcatum</i> , (<i>G. benidirensis</i>), (<i>G. bricchetii</i>), (<i>G. vollesenii</i>), (<i>G. trifurcatum</i>)
F	1	<i>G. longicalyx</i>
G	3	<i>G. bickii</i> , <i>G. australe</i> , <i>G. nelsonii</i>
K	12	<i>G. anapoides</i> , <i>G. costulatum</i> , <i>G. cunninghamii</i> , <i>G. enthyale</i> , <i>G. exiguum</i> , <i>G. londondrensiense</i> , <i>G. marchantii</i> , <i>G. nobile</i> , <i>G. pilosum</i> , <i>G. populifolium</i> , <i>G. pulchellum</i> , <i>G. rotundifolium</i>
AD	7	<i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i> , <i>G. tomentosum</i> , <i>G. mustelinum</i> , <i>G. darwinii</i> , <i>G. ekmanianum</i> , <i>G. stephensii</i>

Εικόνα 2: Γενωμική καταγραφή των ειδών *Gossypium* ανά γονιδιωματική ομάδα (Wang et al., 2018)

Gossypium hirsutum

Το *Gossypium hirsutum* ανήκει στην ομάδα των αλλοπολυπλοειδών (AD), η οποία περιλαμβάνει 7 είδη. Είναι επομένως ένας αλλοπολυπλοειδής οργανισμός, με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων 26. Η γεωγραφική καταγωγή του είδους *Gossypium hirsutum* είναι από το δυτικό Μεξικό στην Αμερική. Τα παραπάνω δεδομένα λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων COTTONGEN, η οποία παρέχει εξειδικευμένες πληροφορίες για το βαμβάκι. Λόγω της τροπικής του καταγωγής αναπτύσσεται καλύτερα σε πιο θερμά περιβάλλοντα με αρκετή ηλιοφάνεια. Επίσης, ευδοκίμει σε εδάφη με χαμηλή συγκέντρωση αλάτων. Η βλάστηση και η ανάπτυξη των νεαρών φυτών σχετίζονται άμεσα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, λόγω του ριζικού συστήματος του βαμβακιού (tap root system), η ανάπτυξη των ριζών εξαρτάται από την διαθεσιμότητα νερού και θρεπτικών συστατικών (Rehman & Farooq, 2019).

Παρόλο που το βαμβάκι μπορεί να αναπτυχθεί επιτυχώς υπό ποικίλες διαφορετικές συνθήκες, η άμεση εξάρτηση της ανάπτυξης του από το περιβάλλον το καθιστά ευαίσθητο στις απότομες περιβαλλοντικές αλλαγές και το αβιοτικό στρες.

1.2 Αβιοτικό στρες

Η ανάπτυξη των φυτών επηρεάζεται από ποικίλους βιολογικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Στους βιολογικούς παράγοντες κατατάσσονται οι οργανισμοί του περιβάλλοντος, όπως για παράδειγμα συμβιώτες, παράσιτα και φυτοφάγα. Οι αβιοτικοί παράγοντες συντελούν πρακτικά τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού και περιλαμβάνουν παραμέτρους σαν τη θερμοκρασία, την υγρασία, τη διαθεσιμότητα νερού, φωτός, CO₂, θρεπτικών κ.α. (Ahmad, Parvaiz et.al 2012). Κάθε φυτό έχει διαφορετικές ανάγκες, προκειμένου να επιτευχθούν οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του. Οποιαδήποτε απόκλιση από τις ιδανικές εξωτερικές συνθήκες, είτε υπερβολή είτε έλλειψη σε χημικούς ή φυσικούς παράγοντες, θεωρείται αβιοτικό στρες και επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη, την εξέλιξη και πιθανώς και την παραγωγικότητα του φυτού. Συνολικά, η ανθεκτικότητα στο στρες είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, επειδή τα φυτά μπορεί να εκτίθενται σε πολλαπλά είδη στρες ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (Kougo et al., 2012).

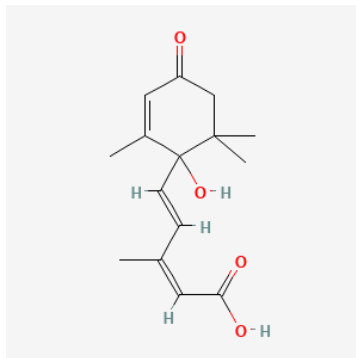
Κατ' επέκτασιν, το αβιοτικό στρες θεωρείται από τις σοβαρότερες περιβαλλοντικές καταπονήσεις με άμεσο αντίκτυπο στις καλλιέργειες, μεταξύ αυτών και του βαμβακιού με κύριο αίτιο την ξηρασία.(Rehman & Farooq, 2019) Πιο συγκεκριμένα, η ξηρασία προκαλείται συνήθως από έλλειψη νερού, λόγω μείωσης των βροχοπτώσεων και της αυξημένης συχνότητας ξηρών περιόδων, ενώ συνοδεύεται συχνά και από άλλες ανεπιθύμητες επιδράσεις, όπως η υψηλή αλατότητα, θερμοκρασία και οι επιθέσεις παθογόνων. Θεωρείται μία από τις πιο επιβλαβείς μορφές αβιοτικού στρες, καθώς τα φυτά υφίστανται διαφορές μορφολογικές και φυσιολογικές μεταβολές προκειμένου να μπορούν να επιβιώσουν. Τέτοιες μεταβολές είναι η καταστολή ανάπτυξής του βλαστού, το κλείσιμο των στομάτων, η μείωση του ρυθμού διαπνοής και φωτοσύνθεσης, οι ωσμωτικές προσαρμογές και η τροποποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης (Ahluwalia et al., 2021).

Το βαμβάκι είναι ένα φυτό που εμφανίζει μεγάλη αντοχή στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Ωστόσο, υπό συνθήκες έντονου αβιοτικού στρες, η ανάπτυξη και η παραγωγικότητά του επηρεάζονται αρνητικά. Σε σύγκριση με άλλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, η ξηρασία αποτελεί έναν από τους πιο επιβλαβείς παράγοντες της ανάπτυξης του βαμβακιού, προκαλώντας απώλειες στην απόδοση έως και 67 %.

1.3 Αμπισισικό οξύ (ABA)

Τα φυτά αντιμετωπίζουν φυσικά το αβιοτικό στρες που προκαλείται από ξηρασία, αλατότητα ή ψύχος μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμπισισικού οξέος (ABA), το οποίο είναι μία φυτοορμόνη (Lee & Luan, 2012).

Το ABA είναι μια σесκιτερπενική ένωση 15 ατόμων άνθρακα, η οποία ξεκινά να συντίθεται μέσω της πορείας της φωσφορικής οδού της μεθυλοεριοιθιόλης (MEP pathway) στα πλαστίδια, ενώ η σύνθεση του ολοκληρώνεται στο κυτοσόλιο. Είναι ένα λιποδιαλυτό μόριο, που μπορεί να μετακινείται στο φυτό, τόσο μέσω του ξυλώματος, όσο και του ηθμού (Finkelstein, 2013).



Εικόνα 3: Η μοριακή δομή του ABA (PubChem)

2,4-pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, (2Z,4E)-

Ως φυτοορμόνη, το ABA δρα ως ενδογενής αγγελιοφόρος και ρυθμίζει με αυτόν τον τρόπο το ισοζύγιο νερού του φυτού. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται λόγω της ικανότητας του ABA να στοχεύει ειδικά τα φυτικά στοματικά κύτταρα (guard cells), ώστε να προκαλεί το κλείσιμο των στομάτων, από όπου σημειώνονται οι μεγαλύτερες απώλειες νερού στα φυτά. Το ABA μπορεί επίσης να δρα διασυστηματικά, ενημερώνοντας το φυτό να προσαρμοστεί σε συνθήκες έντονης έλλειψης νερού. Μία από αυτές τις δράσεις του είναι η αναστολή της ανάπτυξης του βλαστού και η προώθηση της ανάπτυξης της ρίζας, προκειμένου το φυτό να αποκτήσει πρόσβαση σε νερό (Huang et al., 2019).

Μοριακά ανάλογα του ABA-Χρήση στη γεωργία

Η φυτοορμόνη ABA γεννά μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της εμπλοκής της στην αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες και της ξηρασίας. Για αυτόν τον λόγο, εξετάζονται οι δυνατότητες παραγωγής μορίων σχετιζόμενα με το ABA για γεωργικές χρήσεις, με στόχο την ενίσχυση των αποκρίσεων που προκαλεί η συγκεκριμένη ορμόνη.

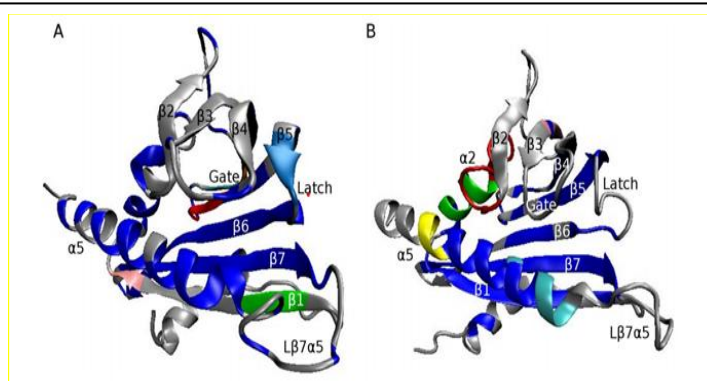
Το γνωστότερο μοριακό ανάλογο του ABA είναι το pyrabactin. Το pyrabactin αποτελεί ένα συνθετικό μόριο, το οποίο δρα ως ένα λειτουργικό ανάλογο του ABA. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζει συγγένεια για ορισμένους PYR υποδοχείς, προκαλώντας τις ίδιες φυσιολογικές αποκρίσεις με το ABA. Έχει χρησιμοποιηθεί ερευνητικά για τη μελέτη των υποδοχέων PYR/PYL/RCAR του ABA, βοηθώντας στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού και λειτουργίας αυτής της ορμόνης. Προς το παρόν, το pyrabactin χρησιμοποιείται αποκλειστικά για ερευνητικούς σκοπούς, αφού η χημική του αστάθεια καθιστά δυσμενή την αξιοποίησή του στον κλάδο της γεωργίας (Dorosh et al., 2013; Lee & Luan, 2012). Μοριακά ανάλογα του ABA (S7, quinabactin), τα οποία εμφανίζουν παρόμοια δράση, έχουν αποτελέσει πολλές φορές αντικείμενο έρευνας, όμως δεν έχουν εγκριθεί για γεωργικές χρήσεις. Στην γεωργική αγορά κυκλοφορεί αυτή τη στιγμή το φυσικό ισομερές του ABA, το S-ABA, υπό την ονομασία ProTone-SL και χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό χρώματος σε καλλιέργειες σταφυλιών. Κατ' επέκτασιν, η εύρεση ενός μορίου που θα ενισχύει τη σηματοδότηση ABA και ιδίως την αντοχή των φυτών στην ξηρασία μέσω ελέγχου των στομάτων αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου γεωργικού προϊόντος (Min et al., 2020; Okamoto et al., 2013; Peppi et al., 2010).

1.4 Μονοπάτι σηματοδότησης ABA

Το μονοπάτι σηματοδότησης του αμψισικού οξέος αποτελείται από τρία βασικά ρυθμιστικά στοιχεία, τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς PYL, τις φωσφατάσες PP2C (2C Protein Phosphatase) που λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές και τις κινάσες SnRK2 που λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές. Απουσία ABA διακρίνεται ένα σύμπλοκο μεταξύ των PP2C και των SnRK2 που καθιστά της κινάσες ανενεργές, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνει χώρα το σηματοδοτικό μονοπάτι. Υπό συνθήκες αβιοτικού στρες, ενεργοποιείται η βιοσύνθεση του ABA, το οποίο προσδένεται στους υποδοχείς PYL. Η πρόσδεση αυτή τροποποιεί τη μοριακή δομή των υποδοχέων, οι οποίοι είναι ικανοί να δεσμεύσουν τις PP2C φωσφατάσες, καθιστώντας τις ανενεργές. Οι κινάσες SnRK2 είναι πλέον λειτουργικές και διευρύνουν το σήμα για κλείσιμο των στομάτων, μεταξύ άλλων σημάτων (Lee & Luan, 2012).

Υποδοχείς Pyrabactin resistance (PYR)/ PYR - like (PYL)- Regulatory component of ABA receptor (RCAR)

Οι υποδοχείς PYR/PYL-RCAR είναι οι βασικότεροι υποδοχείς αμψισικού οξέος στα φυτά, συμπεριλαμβανόμενου και του βαμβακιού. Συνολικά υπάρχουν 14 PYR/PYL υποδοχείς. Ένας τυπικός PYR/PYL υποδοχέας αποτελείται από επτά β πτυχωτές επιφάνειες και δύο α έλικες. Η δεύτερη έλικα εντοπίζεται στη C τελική περιοχή του υποδοχέα, διαμορφώνοντας τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα (ligand binding site). Κατά τη σύνδεση του ABA με τον υποδοχέα, σχηματίζονται άμεσες σταθεροποιητικές επαφές με δύο ευέλικτους βρόχους (Lb3b4 και Lb5b6, που ονομάζονται gate/proline cap και latch-leucine loop), οι οποίοι λειτουργούν σαν σκελετός που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με την φωσφατάση PP2C. Η εικόνα που ακολουθεί προέκυψε μετά από κρυσταλλογραφική ανάλυση της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR1 από το είδος *Arabidopsis thaliana*. Με μπλε διακρίνεται το κύριο σώμα της πρωτεΐνης, ενώ με κόκκινο και γκρι-ροζ χρώμα διακρίνονται και οι σταθεροποιητικές περιοχές gate και latch (Dorosh et al., 2013).



Εικόνα 4 : Απεικόνιση της δομής του υποδοχέα PYR

(A) Κλειστή διαμόρφωση, υποδοχέας δεσμευμένος με ABA (δεν απεικονίζεται)
PDB ID: 3K3K chain B

(B) Ανοικτή διαμόρφωση, υποδοχέας χωρίς ligand PDB ID: 3K3K chain A

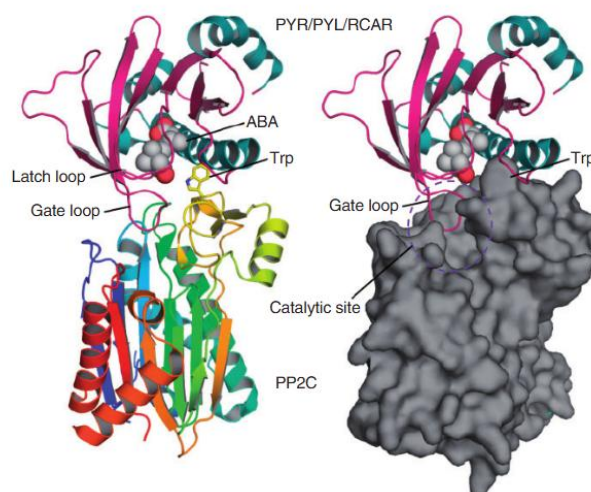
(Dorosh et al., 2013)

2C Protein Phosphatase (PP2C)

Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες τύπου 2C (PP2Cs) ανήκουν σε μία ειδική κατηγορία ενζύμων, γνωστής και ως μεταλλοφωσφατάσες φωσφοπρωτεϊνών, η οποία χαρακτηρίζεται από την εξάρτησή της από ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) ή μαγγανίου (Mn^{2+}) για τη λειτουργία της. Στα ανώτερα φυτά, η οικογένεια των PP2Cs αποτελείται από περισσότερα από 80 μέλη, τα οποία κατατάσσονται σε δέκα υποομάδες A-K με βάση τη λειτουργία τους. Οι PP2Cs της κλάσης A είναι και αυτές που σχετίζονται με το αβιοτικό στρες και συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του αμπισισικού οξέος (Pandey, 2020).

Σύμπλοκο PYL-PP2C

Οι δομικές αναδιαμορφώσεις που προκαλούνται λόγω πρόσδεσης του ABA επιτρέπουν στους υποδοχείς να δεσμεύουν τις φωσφατάσες PP2C και να αναστέλλουν την καταλυτική τους δράση μέσω της δομής gate-latch του υποδοχέα. Αναλυτικότερα, ένα κατάλοιπο σερίνης εισάγεται μέσα στην καταλυτική σχισμή της PP2C και την απενεργοποιεί. Επιπλέον, ένα εκτεθειμένο κατάλοιπο τρυπτοφάνης (flap domain) από την PP2C εισέρχεται στον υποδοχέα και σχηματίζει επαφή μέσω ενός μορίου νερού με το ABA στην υποδοχή, σταθεροποιώντας μοριακά το σύμπλοκο PYL-PP2C. Η παρακάτω εικόνα δημιουργήθηκε με βάση κρυσταλλογραφικές μελέτες της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2C ABI1 και του υποδοχέα PYR1 στον οργανισμό *Arabidopsis thaliana*. Με ροζ χρώμα αποτυπώνεται η δομή gate-latch του υποδοχέα, ενώ με κίτρινο διακρίνεται και το κατάλοιπο τρυπτοφάνης της φωσφατάσης (Umezawa et al., 2010).



Εικόνα 5 : Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου μεταξύ του υποδοχέα PYR/PYL/RCAR και της φωσφατάσης PP2C. Ο υποδοχέας απεικονίζεται στο επάνω μέρος και των δύο διαγραμμάτων, ενώ η φωσφατάση στο κάτω.

PDB ID: 3JRQ

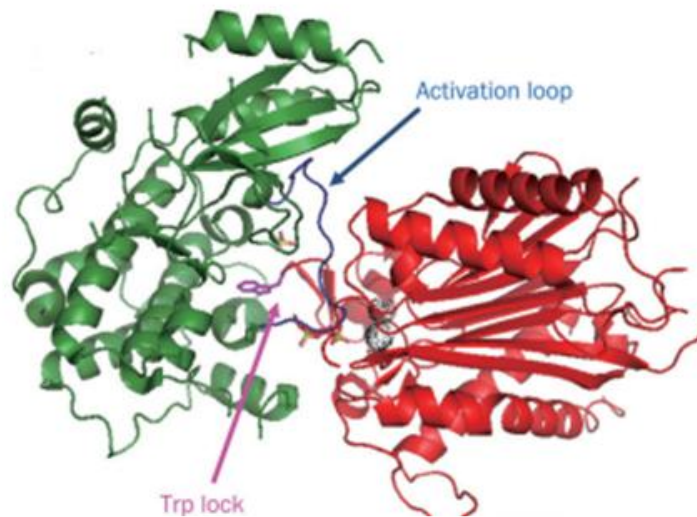
(Umezawa et al., 2010)

Snf1-related Kinase (SnRK2s)

Τα μέλη της οικογένειας SnRK2 είναι ειδικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που εμπλέκονται στην απόκριση των φυτών σε αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες και στην ανάπτυξη των φυτών που εξαρτάται από το αμπισισικό οξύ (ABA). Οι κινάσες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες με κριτήριο τη συγγένειά τους με το ABA. Η ομάδα ένα περιλαμβάνει κινάσες που δεν ενεργοποιούνται από το ABA, η ομάδα δύο κινάσες που ενεργοποιούνται ασθενώς, ενώ η τρία κινάσες που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τη σηματοδότηση ABA. Οι κινάσες SnRK2 που ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης έναντι του στρες, τα οποία όμως δεν περιλαμβάνουν το ABA και δεν έχουν ως πρωταρχικό στόχο την αντιμετώπιση της ξηρασίας. Αυτές που σχετίζονται άμεσα με το μονοπάτι σηματοδότησης του ABA, και μάλιστα ενεργοποιούνται από αυτό, είναι οι SnRK2 κινάσες της ομάδας τρία (Maszkowska et al., 2021).

2C Protein Phosphatase (PP2C) - Snf1-related Kinase (SnRK2s)

Η απενεργοποίηση των PP2C παρουσία ABA επιτρέπει την αυτοφωσφορυλίωση ενός κεντρικού καταλοίπου σερίνης των SnRK2s στους βρόχους ενεργοποίησής τους. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση της ενεργού διαμόρφωσης της κινάσης και για την απομάκρυνση του βρόχου ενεργοποίησης από τη σχισμή πρόσδεσης του υποστρώματος. Οι ενεργοποιημένες κινάσες μπορούν στη συνέχεια να μεταδώσουν το σήμα του ABA φωσφορυλιώνοντας καθοδικούς ρυθμιστές (effectors), οι οποίοι περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, διαύλους ιόντων και τη NADPH οξειδάση που παράγει δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Υπό συνθήκες απουσίας ABA οι φωσφατάσες PP2C είναι ενεργές και απενεργοποιούν τις κινάσες SnRK2. Ο συνηθέστερος μηχανισμός απενεργοποίησης είναι μέσω του σχηματισμού σταθερών συμπλόκων μαζί τους, όπου τα καταλυτικά κέντρα και των δύο ενζύμων αλληλοεπιδρούν άμεσα. Πιο συγκεκριμένα, ο βρόχος ενεργοποίησης της κινάσης εισέρχεται στη σχισμή του καταλυτικού κέντρου της PP2C, όπου το κατάλοιπο σερίνης τοποθετείται στο ενεργό κέντρο της φωσφατάσης. Ταυτόχρονα, η τρυπτοφάνη (flap domain) της PP2C εισέρχεται στη σχισμή πρόσδεσης υποστρώματος της κινάσης, μιμούμενη τον τρόπο που προσδένεται ο υποδοχέας PYL στην PP2C. Επιπλέον, οι SnRK2 έχουν ένα ισχυρά αρνητικά φορτισμένο C-τελικό άκρο, γνωστό ως ABA box, το οποίο συνδέεται με μια θετικά φορτισμένη περιοχή στο πίσω μέρος της PP2C, σταθεροποιώντας παραπάνω τις αλληλεπιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο. Το αποτέλεσμα της δημιουργίας του παραπάνω συμπλόκου είναι η πλήρης απενεργοποίηση των SnRK2, αφού παραμένουν διαρκώς σε μία ανοιχτή διαμόρφωση, λόγω της αποφωσφορυλίωσης του καταλοίπου σερίνης του βρόχου ενεργοποίησης. Η εικόνα που ακολουθεί προέκυψε μετά από μελέτη του συμπλόκου SnRK2.6 με την PP2C HAB1 στον οργανισμό *Arabidopsis thaliana* ((Ng et al., 2014, Edward Zhou et al., 2012; Lee & Luan, 2012a; Maszkowska et al., 2021).



Εικόνα 6: Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου μεταξύ της κινάσης SnRK2 (πράσινο) και τη φωσφατάσης PP2C (κόκκινο). Στο κέντρο διακρίνεται με σκούρο μπλε ο βρόγχος ενεργοποίησης της κινάσης και με ροζ το κατάλοιπο τρυπτοφάνης της φωσφατάσης

PDB: 3UJG

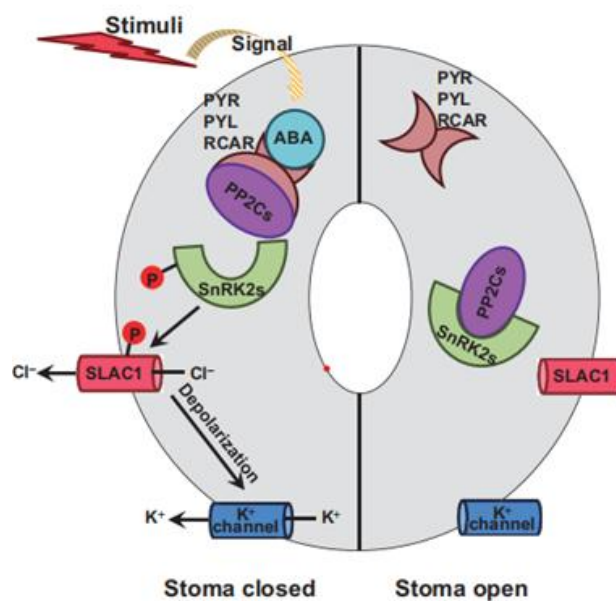
(Ng et al., 2014)

1.5 Ιοντική μεταφορά και κλείσιμο των στομάτων

Η ρύθμιση και το κλείσιμο των στομάτων από το αμπισισικό οξύ σχετίζεται άμεσα και με τη μεταφορά ιόντων από ιοντικούς διαύλους που βρίσκονται στη πλασματική μεμβράνη των φυτικών στοματικών κυττάρων (guard cells). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται οι ανιοντικοί δίαυλοι τύπου S και οι εξερχόμενοι δίαυλοι καλίου (K^+), οι οποίοι ενεργοποιούνται από το ABA υπό συνθήκες αβιοτικού στρες. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε μαζική εκροή νερού και ιόντων από το εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα το κλείσιμο των στομάτων προκειμένου να σταματήσει η εν λόγω εκροή.

Αναλυτικότερα, η αύξηση του αμπισισικού οξέος που προκαλείται από την ξηρασία ή άλλες στρεσογόνες καταστάσεις ενεργοποιεί τους υποδοχείς PYL, οι οποίοι δεσμεύουν και απενεργοποιούν τις PP2C φωσφατάσες. Με τις φωσφατάσες ανενεργές, οι κινάσες SnRK2 είναι λειτουργικές και ενεργοποιούν τους ανιοντικούς διαύλους, όπως τον SLAC1 που είναι ιοντικός μεταφορέας ανιόντων χλωρίου (Cl^-), οι οποίοι μέχρι τώρα είναι κλειστοί, με φωσφορυλίωση. Η ενεργοποίηση των διαύλων προκαλεί έξοδο ανιόντων από το κύτταρο, αποπόλωση της μεμβράνης και ενεργοποίηση των εξερχόμενων διαύλων καλίου, το οποίο οδηγεί ύστερα σε κλείσιμο των στομάτων (Munemasa et al., 2015).

Υπό κανονικές συνθήκες, τα επίπεδα αμπισισικού οξέος παραμένουν χαμηλά και οι υποδοχείς PYL είναι ανενεργοί. Οι φωσφατάσες PP2C ενώνονται με τις κινάσες και τις απενεργοποιούν, με συνέπεια οι ιοντικοί δίαυλοι να παραμένουν κλειστοί. Επομένως, δεν παρατηρείται κάποια εκροή ιόντων και τα στόματα διατηρούνται ανοιχτά (Lee & Luan, 2012).



Εικόνα 7 : Απεικόνιση της σηματοδότησης ABA

Στα αριστερά: Εξωτερικό ερέθισμα δίνει σήμα για απελευθέρωση ABA. Το ABA συνδέεται στους PYR, οι οποίοι ενώνονται με τις PP2C. Οι SnRK2 ενεργοποιούνται και φωσφορυλιώνουν τα κανάλια χλωρίου SLAC1. Προκαλείται εκροή ιόντων και κλείσιμο των στομάτων

Στα δεξιά: Απουσία ABA, οι υποδοχείς PYR παραμένουν ανενεργοί. Δημιουργία συμπλόκου PP2C και SnRK2. Τα στόματα παραμένουν κλειστά

(Lee & Luan, 2012a)

1.6 Ετερόλογη έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών

Η ετερόλογη έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα επιστημονικά επιτεύγματα του περασμένου αιώνα, καθώς συμβάλλει στην ανάλυση των μοριακών δομών της πρωτεΐνης, ενώ επιτρέπει και την υπερέκφραση των πρωτεϊνών υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Το δεύτερο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για πρωτεΐνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023). Ως ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη ορίζεται μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ανασυνδυασμένο DNA και εκφράζεται σε ετερόλογο ξενιστή. Αναλυτικότερα, η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει την εισαγωγή της γενετικής πληροφορίας μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε έναν οργανισμό-δέκτη, η οποία συνήθως δεν απαντάται φυσικά στον συγκεκριμένο οργανισμό. Η διεργασία αυτή οδηγεί στην παραγωγή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στους οποίους παράγεται μία ξένη πρωτεΐνη. Έπειτα, η διαδικασία οδηγείται σε βελτιστοποίηση με στόχο την αποδοτικότερη, αλλά και οικονομικότερη, παραγωγή της πρωτεΐνης σε όσο υψηλότερες συγκεντρώσεις γίνεται. (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023)

Το βακτήριο *Escherichia coli* ως σύστημα έκφρασης

Η επιλογή κατάλληλων συστημάτων έκφρασης εξαρτάται από πολλά κριτήρια, όπως τα ενδογενή χαρακτηριστικά του ξενιστή, τα χαρακτηριστικά της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, την πηγή του ετερογενούς γονιδίου, την δυνατότητα βελτιστοποίησης της ετερογενούς έκφρασης, τις ρυθμιστικές απαιτήσεις, το τελικό κόστος παραγωγής, άλλα και τον σκοπό της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

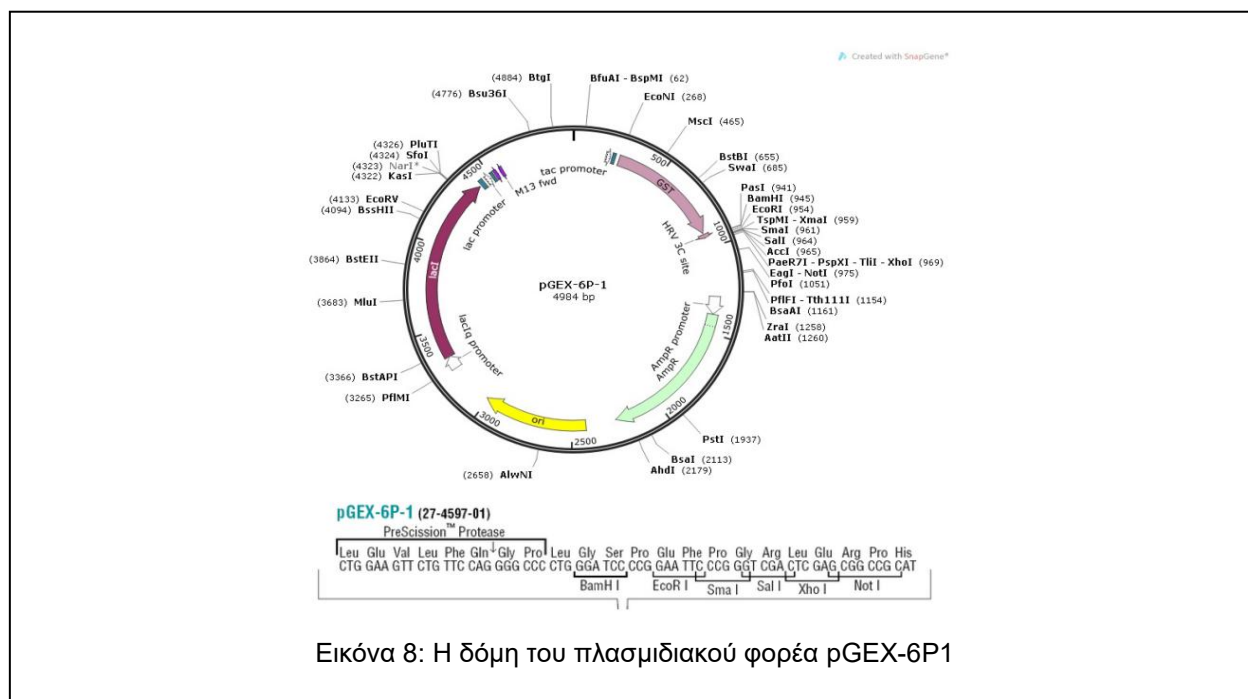
Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ένας από τους σημαντικότερους ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδόμορφο πρωτεοβακτήριο και παθογόνο του εντέρου των θηλαστικών (Overman et al., 2014). Η συχνή επιλογή του *E.coli* προκύπτει από την εκτεταμένη έρευνα που έχει γίνει για τον συγκεκριμένο οργανισμό, ενώ διαθέτει και άλλα πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, η φυσιολογία και η γενετική του *E. coli* έχει μελετηθεί περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο διευκολύνει τον σχεδιασμό των περίπλοκων γενετικών μηχανισμών που απαιτεί μια τέτοιου είδους βιοτεχνολογική διεργασία. Επιπρόσθετα, η αξιοποίηση σύγχρονων μοριακών τεχνικών καθιστά εύκολη την εισαγωγή και χειραγώγηση ξένων γονιδίων στο *E. coli*. Αυτό περιλαμβάνει τη χρήση καλά ανεπτυγμένων πλασμιδιακών συστημάτων, υποκινητών, δεικτών επιλογής και διαφορετικών στελεχών του *E. coli*, καθένα προσαρμοσμένο για συγκεκριμένες ανάγκες. Ως βακτηριακός οργανισμός, το *E.coli* προσφέρει τη δυνατότητα για ταχεία, αλλά και ελεγχόμενη ανάπτυξη, ενώ ταυτόχρονα χρειάζεται σχετικά φτηνά και απλά θρεπτικά μέσα για να αναπτυχθεί. Τα παραπάνω οδηγούν σε μία συνολική μείωση του κόστους παραγωγής, χωρίς όμως να μειώνεται η αποδοτικότητα, χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για την επιλογή ενός κατάλληλου οργανισμού ξενιστή (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023).

Υπάρχουν διάφορα στελέχη *E.coli* που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Ένα από αυτά αποτελεί και το στέλεχος BL21 gold (DE3), το οποίο ενδείκνυται για την υψηλή έκφραση πρωτεϊνών αλλά και για την εύκολη επαγωγή της έκφρασης. Επιπλέον, εμφανίζει υψηλή σταθερότητα mRNA, καθώς και ανοχή στην τοξικότητα. Τέλος, φαίνεται πως παράγει χαμηλά επίπεδα οξικού οξέος, μίας ουσίας που δρα ως ανασταλτικός παράγοντας της κυτταρικής ανάπτυξης (Jeong et al., 2016).

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P1

Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος εισάγεται με τη βοήθεια κατάλληλων ενζύμων περιορισμού σε πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος στη συνέχεια θα προσληφθεί από τα βακτήρια μέσω χημικού μετασχηματισμού.

Ως φορέας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGEX-6P1. Όλα τα μέλη της οικογένειας των προκαρυωτικών φορέων pGEX εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά και έχουν ουσιαστικά την ίδια δομή. Πρόκειται για ένα πλασμίδιο περίπου 5kb, το οποίο περιέχει το γονίδιο της β-λακταμάσης που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Επιπρόσθετα, εμφανίζει τη θέση έναρξης της αντιγραφής pB2322, ενώ διακρίνεται και το αλληλόμορφο *lacI* q. Το γονίδιο αυτό οδηγεί σε υπερέκφραση του καταστολέα *lacI* του σπερονίου της λακτόζης, επιτρέποντας την αυστηρά επαγόμενη έκφραση των γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του σπερονίου. Καθοδικά του υποκινητή έχει τοποθετηθεί ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της ετικέτας GST (glutathione S-transferase), το οποίο προέρχεται από τον οργανισμό *Schistosoma japonicum* (PDB ID: 1GTA). Η GST είναι μία πρωτεΐνη 26 kDa που μπορεί να εκφραστεί ως διαλυτή πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα του *E.coli* σε μεγάλες ποσότητες και με πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Κατ' επέκτασιν, η σύντηξη της GST στο N-τελικό άκρο μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος βοηθά στην έκφραση της πρωτεΐνης αυτής στο φάσμα του διαλυτού, ενώ διατηρείται παράλληλα και η δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η προσθήκη μίας ετικέτας GST είναι χρήσιμη και για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Ο φορέας εμφανίζει επίσης καθοδικά του γονιδίου της GST την αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης ακριβείας HRV (Human Rhinovirus) 3C. Η πρωτεάση αυτή κόβει ειδικά μεταξύ της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος και της ετικέτας GST και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση της ετικέτας GST, αφήνοντας την επιθυμητή πρωτεΐνη χωρίς πρόσθετες αλληλουχίες. Η αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης διακρίνεται στην ακόλουθη εικόνα και συγκεκριμένα η θέση της πέψης είναι μεταξύ της γλουταμίνης και της γλυκίνης. Τέλος, διακρίνονται πολλές θέσεις κλωνοποίησης που αναγνωρίζονται από περιοριστικά ένζυμα και καταλήγουν σε κωδικόνια λήξης της μετάφρασης για τα πιθανά αναγνωστικά πλαίσια, στις οποίες μπορεί να γίνει η ένθεση του γονιδίου ενδιαφέροντος (Smith et al., 1988).



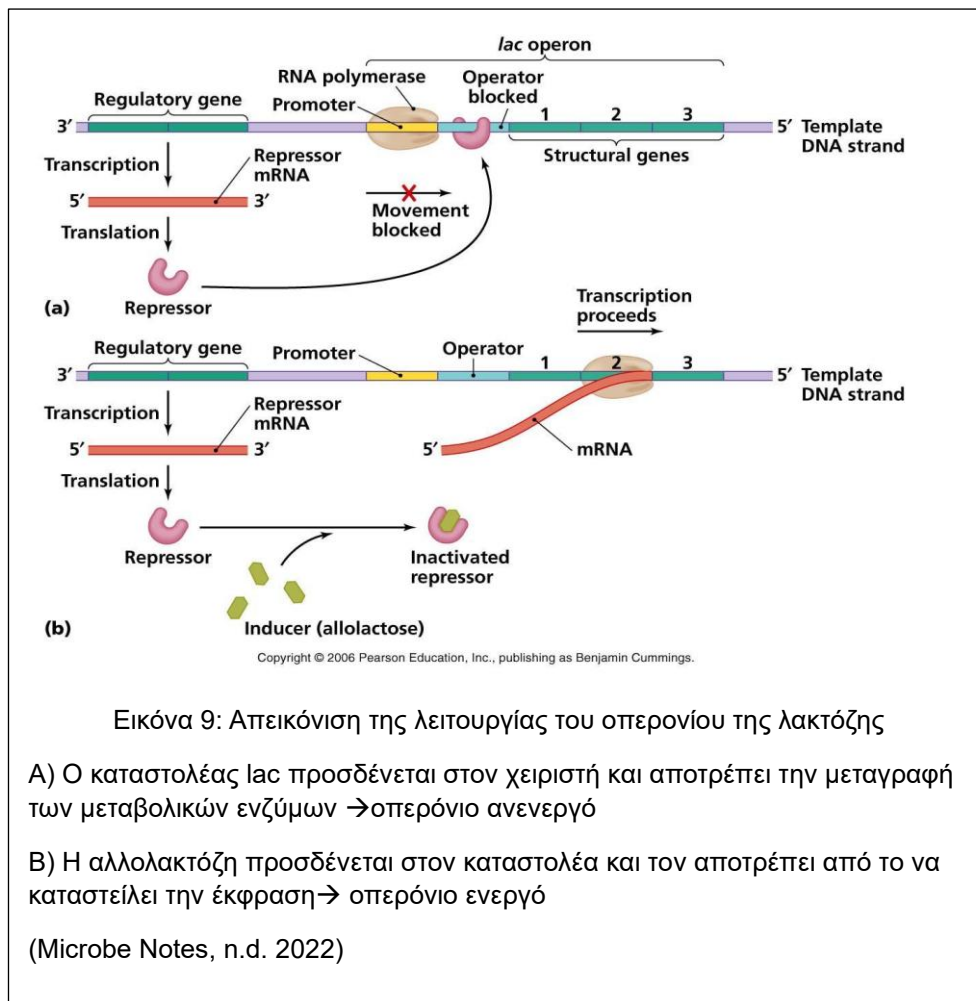
Το οπερόνιο της λακτόζης ως σύστημα έκφρασης ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα έκφρασης σε βακτήρια *E.coli* βασίζεται στην επαγωγίμη δράση της T7 πολυμεράσης του βακτηριοφάγου, καθώς εμφανίζει υψηλά ποσοστά έκφρασης ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Η πολυμεράση αυτή βρίσκεται υπό τον έλεγχο του επαγωγίμου υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*lac UV5*). Η αλληλουχία του γονιδίου της T7 πολυμεράσης ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του βακτηρίου και εκφράζεται από την ενδογενή RNA πολυμεράση (Studier & Moffatt, 1986).

Φυσιολογικά, το οπερόνιο της λακτόζης αποτελείται από τρία γονίδια: το *lacZ*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που διασπά την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της αλλολακτόζης, δηλαδή τον φυσικό επαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης. Το δεύτερο είναι το *lacY* που κωδικοποιεί την περμεάση της λακτόζης. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά της λακτόζης και των αναλόγων της προς το κυτταρόπλασμα. Τέλος, το τρίτο γονίδιο είναι το *lacA* που κωδικοποιεί την τρανσακετυλάση, η οποία προστατεύει το κύτταρο απέναντι σε τοξικά ανάλογα της λακτόζης που μπορούν να το βλάψουν. Επιπλέον, το οπερόνιο εμφανίζει και δύο ρυθμιστικές περιοχές, τον υποκινητή *lac* και τον χειριστή *lacO* (Donovan et al., 1996).

Η μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης ρυθμίζεται από την καταστολέα *lac*, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *lacI* που διαθέτει δικό του ξεχωριστό αναγνωστικό πλαίσιο. Όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη λακτόζη ως πηγή άνθρακα, ο καταστολέας *lacI* έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε μία περιοχή που ονομάζεται χειριστής του οπερονίου (*lacO*), η οποία αλληλεπικαλύπτεται και με την περιοχή του υποκινητή *lac*. Η πρόσδεση αυτή αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του υποκινητή, καθιστώντας την πρόσδεση της RNAP στον υποκινητή μη εφικτή. Το παραπάνω οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που χρειάζονται για τον μεταβολισμό της λακτόζης. Το σύστημα οδηγείται σε μία συνεχή, αλλά χαμηλή, μεταγραφή των ενζύμων, με βάση τη χημική ισορροπία δεσμευμένου καταστολέα-ελεύθερου καταστολέα (Donovan et al., 1996).

Η ύπαρξη λακτόζης στο εσωτερικό των κυττάρων, αυξάνει την συγκέντρωση της συγγενούς ουσίας, της αλλολακτόζης, η οποία παράγεται με την δράση της β-γαλακτοζιδάσης κατά τη διάσπαση της λακτόζης. Η αλλολακτόζη, προσδένεται στα μόρια του καταστολέα εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσδεση τους στον χειριστή. Έτσι, η μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου μπορεί να αρχίσει. Μάλιστα, τα επίπεδα μεταγραφής μπορούν να αυξηθούν μέχρι και χίλιες φορές (Kennell & Riezma, 1977).



Εικόνα 9: Απεικόνιση της λειτουργίας του οπερονίου της λακτόζης

A) Ο καταστολέας *lac* προσδένεται στον χειριστή και αποτρέπει την μεταγραφή των μεταβολικών ενζύμων → οπερόνιο ανενεργό

B) Η αλλολακτόζη προσδένεται στον καταστολέα και τον αποτρέπει από το να καταστείλει την έκφραση → οπερόνιο ενεργό

(Microbe Notes, n.d. 2022)

Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Η θερμοκρασία ανάπτυξης στην οποία παρατηρείται ο γρηγορότερος ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* κυμαίνεται γύρω στους 37°C. Σε πειράματα όμως, που σκοπός είναι η ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, επιλέγονται συχνά χαμηλότερες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη των βακτηρίων, ανάμεσα στους 15 και 25 °C. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών μειώνει τις ανεπιθύμητες μεταβολικές αποκρίσεις του κυττάρου, όταν σε αυτό γίνεται εξαναγκασμένη μαζική παραγωγή πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες φαίνεται να βοηθούν στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, αυξάνοντας την διαλυτότητα και αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο τη δημιουργία έγκλειστων σωματιδίων. Συνεπώς, παρόλο που μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης, μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερα ποσοστά παραγόμενης πρωτεΐνης (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023b).

Ο επαγωγέας IPTG

Το IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) χρησιμοποιείται συχνά σε πειράματα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, αφού είναι ο πιο αποτελεσματικός μοριακός επαγωγέας για τη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή *lac* UV5.

Πρόκειται για ένα δομικό ανάλογο της αλλολακτόζης που δε μεταβολίζεται, για αυτό και η προσθήκη του προκαλεί την επαγωγή του οπερονίου. Αναλυτικότερα, η μοριακή ομοιότητα του IPTG με την αλλολακτόζη καθιστά εφικτή τη πρόσδεση του με τον καταστολέα lacI, αποτρέποντας τον από το να συνδεθεί με τον χειριστή του οπερονίου και να καταστείλει την έκφραση. Ταυτόχρονα οδηγεί στη παραγωγή και ενεργοποίηση της RNA πολυμεράσης T7, η οποία μπορεί να αλληλοεπιδράσει πλέον στερεοχημικά με τον υποκινητή lac και να μεταγράψει το οπερόνιο. Πέρα από το οπερόνιο μεταγράφεται και η αλληλουχία της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, αφού βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή lac (Simas et al., 2023).

Η προσθήκη του επαγωγέα γίνεται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η τοπολογία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο κύτταρο, η διαλυτότητα και η μοριακή της δομή είναι παράγοντες, μεταξύ άλλων, που επηρεάζουν την συγκέντρωση IPTG που απαιτείται για την αποτελεσματικότερη επαγωγή. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη η ισχύς του υποκινητή, αλλά και τα ποσοστά έκφρασης του γονιδίου lacI, στο εκάστοτε σύστημα έκφρασης.

Βελτιστοποίηση κωδικονίων

Η βελτιστοποίηση κωδικονίων είναι μία τεχνική που αποσκοπεί στη βελτίωση των επιπέδων έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι κάποιοι οργανισμοί, μεταξύ αυτών και το *E.coli*, εμφανίζουν μία προτίμηση σε ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο έναντι των συνωνύμων του, ένα φαινόμενο που έχει χαρακτηριστεί ως codon usage bias. Ένα βασικό αίτιο για το παραπάνω φαινόμενο αποτελεί η μεγαλύτερη διαθεσιμότητα ορισμένων tRNA μορίων.

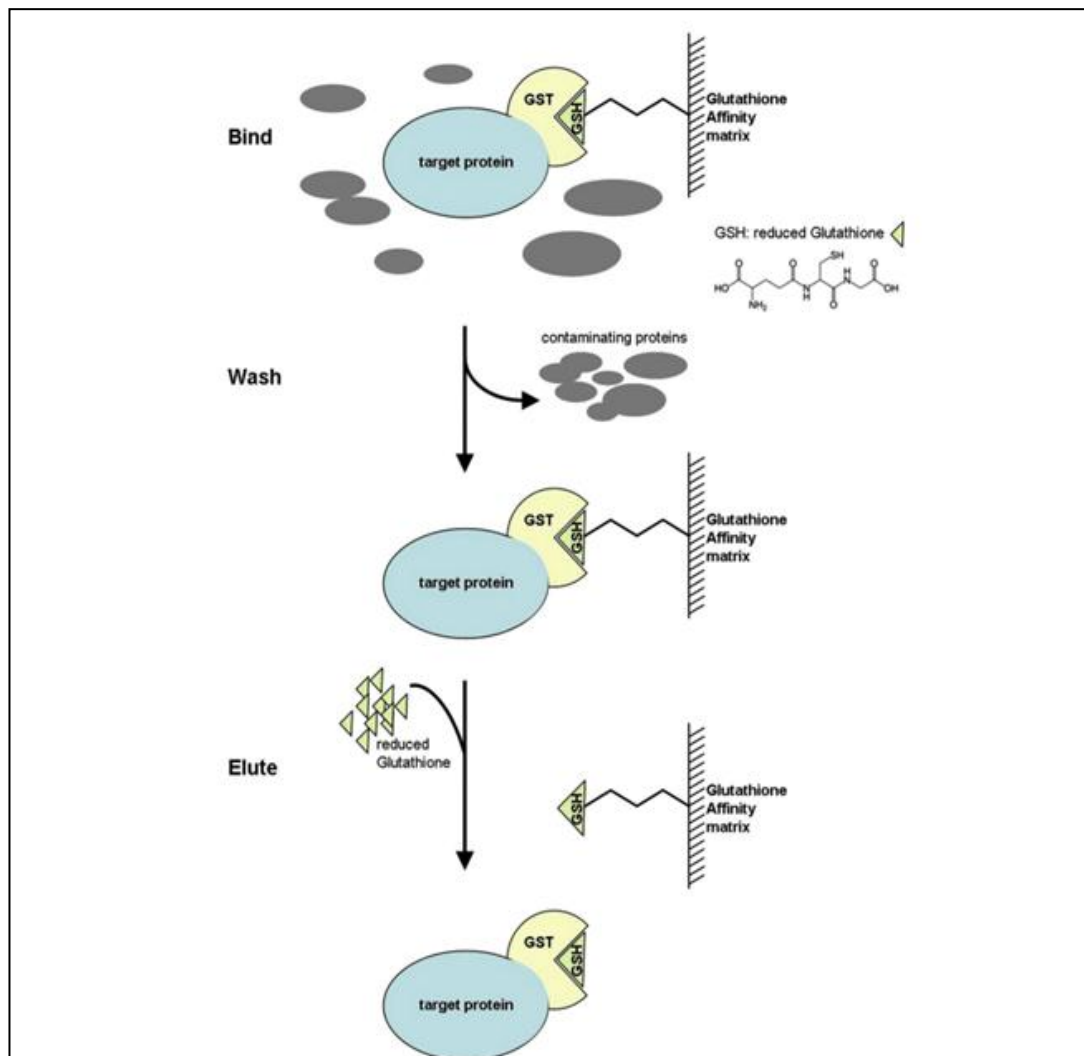
Ο εκφυλισμός του γενετικού κώδικα, η δυνατότητα δηλαδή μιας πρωτεΐνης να κωδικοποιείται από πολλαπλές συνώνυμες αλληλουχίες γονιδίων, είναι ένα χαρακτηριστικό του γενετικού κώδικα που χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της απόδοσης κατά την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών. Μέσω κατάλληλων μοριακών τεχνικών είναι εφικτή η αντικατάσταση της αλληλουχίας κωδικονίων του γονιδίου ενδιαφέροντος με τα κωδικόνια που προτιμά ο οργανισμός-ξενιστής, και στο τέλος να εκφράζεται ένα εναλλακτικό γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, με βάση όμως τα πρότυπα έκφρασης του ξενιστή. Μία διαφορετική προσέγγιση αποτελεί και η χρήση ενός γενετικού τροποποιημένου στελέχους του ξενιστή, το οποίο να έχει τη δυνατότητα να εκφράζει όλα τα κωδικόνια. Επιπλέον παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά τη βελτιστοποίηση κωδικονίων αποτελούν το ποσοστό GC, η σταθερότητα του παραγόμενου mRNA και η αποφυγή ανεπιθύμητων δευτεροταγών δομών (elusion bodies)(Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023).

1.7 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη

Ο καθαρισμός πρωτεϊνών με συγγένεια προς τη γλουταθειόνη είναι μία τεχνική καθαρισμού για πρωτεΐνες που έχουν συντηχθεί με ετικέτα GST. Η πρωτεΐνη GST, είτε σε φυσική μορφή, είτε ετερόλογα εκφρασμένη σε *E.coli* ή άλλους πιθανούς ξενιστές, μπορεί να καθαριστεί με χρωματογραφία συγγένειας σε ακινητοποιημένη γλουταθειόνη, ακολουθούμενη από έκλουση με ανταγωνιστικό τρόπο, χρησιμοποιώντας περίσσεια γλουταθειόνης.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μία στήλη ρητίνης που περιέχει γλουταθειόνη. Η GST εμφανίζει ισχυρή συγγένεια με τη γλουταθειόνη, με αποτέλεσμα να προσκολλάται, μαζί με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, στην στήλη κατά το πέρασμα του κυτταρικού λύματος από την στήλη. Ακολουθεί μία διαδικασία πλύσεων και εκλούσεων με ανάλογα διαλύματα, με στόχο την τελική απομόνωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.



Εικόνα 10: Χρωματογραφία συγγένειας γλουταθειόνης

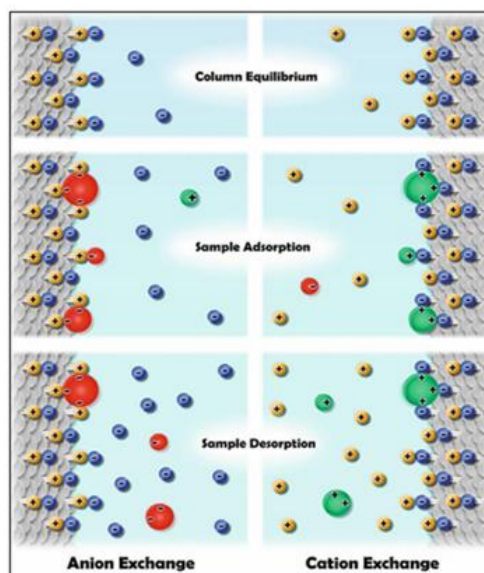
Οι πρωτεΐνες που φέρουν το GST-tag προσδένονται ειδικά στη γλουταθειόνη της στήλης. Οι πρωτεΐνες που δεν συνδέονται απομακρύνονται από το υπόστρωμα με πλύσιμο και οι δεσμευμένες πρωτεΐνες σύντηξης με GST εκλούνται από το υπόστρωμα με την προσθήκη διαλύματος που περιέχει γλουταθειόνη.

(Schäfer et al., 2015)

Η κλίμακα καθαρισμού πρωτεϊνών με GST-tag εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κυτταρικό λύμα. Το μέγεθος της στήλης και η συνολική ικανότητα δέσμευσης θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα, ώστε να ταιριάζουν περίπου με την ποσότητα της πρωτεΐνης που πρόκειται να καθαριστεί, με σκοπό την εξοικονόμηση ρητίνης και την καταστολή μη ειδικής δέσμευσης ανεπιθύμητων πρωτεϊνών. Ελάχιστες ποσότητες μη επισημασμένων πρωτεϊνών συγκρατούνται συνήθως στη στήλη, εάν η πρωτεΐνη στόχος καταλαμβάνει σχεδόν όλες τις διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης γλουταθειόνης. Αν χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη στήλη από ό,τι χρειάζεται, ενδέχεται άλλες πρωτεΐνες να δεσμευτούν μη ειδικά και να εκλουστούν ως ρυπαντές, το οποίο όμως μειώνει τον βαθμό καθαρισμού της πρωτεΐνης (Schäfer et al., 2015).

Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής είναι μία μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Αναλυτικότερα, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται σε μία στήλη ρητίνης, η οποία περιέχει θετικά φορτισμένους προσδέτες. Η στήλη εξισορροπείται σε pH μεγαλύτερο από το pI της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να φέρει καθαρό αρνητικό φορτίο, γεγονός που ευνοεί τη δέσμευσή της σε μια θετικά φορτισμένη στήλη. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών γίνεται είτε με τη προσθήκη διαλύματος διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σε αλάτι (salt gradient), είτε με την απότομη αλλαγή διαλυμάτων άλατος με αυξανόμενη συγκέντρωση (step elution). Οι πρωτεΐνες με χαμηλότερη συγγένεια προς την στήλη απομακρύνονται πρώτες. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος, διασπώνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και απομακρύνονται πρωτεΐνες με ισχυρότερη συγγένεια (Yigzaw et al., 2009).

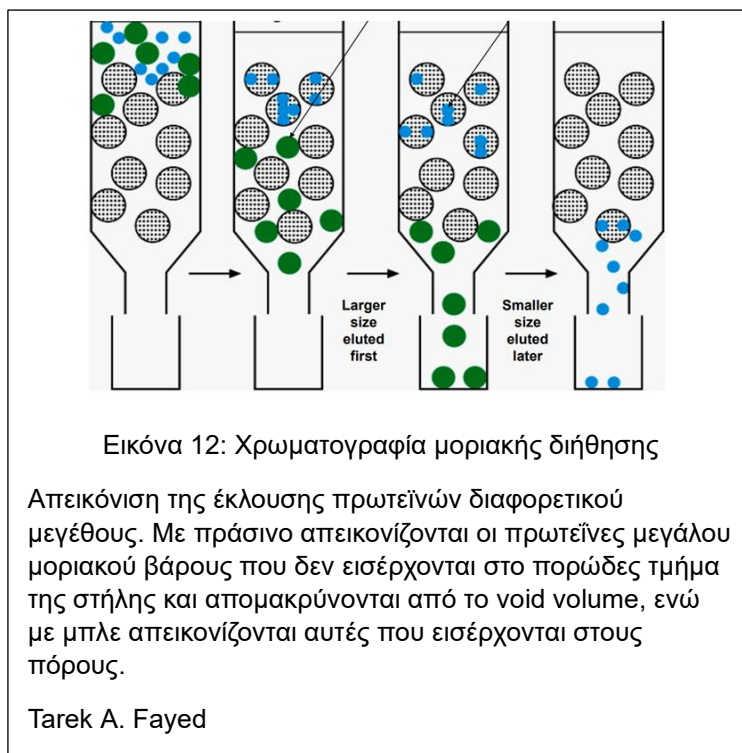


Εικόνα 11: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Στα αριστερά διακρίνεται η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, ενώ στα δεξιά η χρωματογραφία κατιοντικής ανταλλαγής. Τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια (μπλε) προσκολλώνται στη θετικά φορτισμένη στήλη

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι μία μέθοδος καθαρισμού μειγμάτων πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος. Κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται μία πορώδης στήλη διαχωρισμού. Μία τέτοιου είδους στήλη εμφανίζει δύο μετρήσιμους όγκους, τον εξωτερικό όγκο, που αποτελείται από το υγρό ανάμεσα στους πόρους (void volume), και τον εσωτερικό όγκο, που αποτελείται από το υγρό μέσα στους πόρους (total volume). Οι πρωτεΐνες με αυξημένο μοριακό βάρος δεν διαπερνούν τους πόρους της στήλης και απομακρύνονται πρώτες ακολουθώντας μία γρηγορότερη διαδρομή ανάμεσα από τους πόρους της μεμβράνης. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες με χαμηλότερο μοριακό βάρος διαπερνούν τους πόρους, το οποίο καθυστερεί την απομάκρυνση τους από την στήλη. Συνοπτικά, πρώτα γίνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες δεν εισέρχονται στο πορώδες τμήμα της στήλης. Έπειτα, απομακρύνονται οι πρωτεΐνες που εισέρχονται στην στήλη, με φθίνουσα σειρά μεγέθους (O'Fágáin et al., 2011).



Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εντάσσεται στις ερευνητικές δράσεις του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κεντρικό ερευνητικό πυλώνα αποτέλεσαν οι υποδοχείς αμψισισικού οξέος (ABA) PYR/PYL/R-CAR , οι οποίοι παίζουν ρόλο-κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι του αμψισισικού οξέος στα φυτά, και συγκεκριμένα ο PYR/PYL1. Ως οργανισμός μελέτης επιλέχθηκε το είδος βαμβακιού *Gossypium hirsutum*. Πρωτεύον στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για την εύρεση των συνθηκών θερμοκρασίας και συγκέντρωσης του επαγωγέα έκφρασης IPTG, όπου σημειώνονται τα υψηλότερα ποσοστά ετερόλογης έκφρασης του υποδοχέα PYR/PYL1 του είδους *Gossypium hirsutum*. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης με διαφορετικά είδη χρωματογραφικών αναλύσεων. Η μελέτη του υποδοχέα PYR/PYL1 ενέχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη γεωργικών προϊόντων που θα αυξάνουν την ανοχή του βαμβακιού στην ξηρασία.

2. Μέθοδοι και Υλικά

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός, ο οποίος περιλαμβάνει: ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, σωληνάρια τύπου Erpendorf (1,5 mL), σωληνάρια τύπου Falcon (15 & 50 mL), αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου, πιπέτες Pasteur, φίλτρα αποστείρωσης και αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό συμπεριλαμβάνονται και οι εξής συσκευές:

- pH - μέτρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- Θερμορυθμιζόμενη φυγόκεντρος
- Θερμορυθμιζόμενος, ανακινούμενος επωαστήρας
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Συσκευή υπερήχων (UP100H της εταιρίας hielscher)
- Συσκευή φίλτρου
- Φωτόμετρο κυψελίδας (PerkinElmer LamdaBio+)
- Φωτόμετρο NanoDrop (ND-1000 της εταιρείας LabTech)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-page
- Χρωματογραφικές στήλες καθαρισμού:
 - ✓ Protino GST/4B 1mL
 - ✓ Hitrap q ff 1ml column Ge healthcare
 - ✓ HiLoad 16/600 Superdex 75pg

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και ο απαραίτητος εξοπλισμός είχε αποστειρωθεί κατάλληλα. Κατά τη διαχείριση των μικροοργανισμών επικρατούσαν στείρες συνθήκες, αφού όλες οι σχετικές διεργασίες έγιναν υπό φλόγα.

2.2 Υλικά και μέσα για την καλλιέργεια βακτηρίων

Ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το *Luria-Bertani (LB) Medium*: Tryptone 10g/L, Yeast Extract 5g/L, NaCl 10g/L σε pH=7.0. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου καταναλώθηκε απιονισμένο νερό, ενώ το θρεπτικό αποστειρώθηκε και σε αυτόκαυστο. Για την προετοιμασία των τρυβλίων Petri προστέθηκε στο θρεπτικό άγαρ 12 g/l και μετά από κατάλληλη ανάδευση και αποστείρωση έγινε διαμοιρασμός στα τρυβλία. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κλώνων έγινε προσθήκη αμπικιλίνης 100μg/ml, τόσο κατά την καλλιέργεια των βακτηρίων σε τρυβλία Petri, όσο και κατά την ανάπτυξη τους σε υγρές καλλιέργειες. Η επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης έγινε με τη χρήση β-D-1-

θειογαλακτοπυρανοζίδιο (IPTG), το οποίο παρασκευάζεται από στερεή σκόνη ως διάλυμα αποστειρωμένου H₂O. Η τελική συγκέντρωση του IPTG είναι 1mM και η αποθήκευση του γίνεται στους -20°C.

2.3 Βακτηριακά στελέχη BL21, XL1-blue και φορέας ετερόλογης έκφρασης pGEX-6P1

Για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR1 χρησιμοποιήθηκαν ως σύστημα έκφρασης στελέχη *E.coli*. BL21 Gold (DE3), με σκοπό τα αυξημένα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε ο φορέας pGEX -6P1. Ο ανασυνδιασμός του πλασμιδίου και η κλωνοποίηση έγινε κατά παραγγελία από την εταιρία Biocat με βάση τη βιοπληροφορική έρευνα που είχε προηγηθεί (Μέθοδοι και Υλικά, 2.4). Για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού φορέα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *E.coli* XL1-blue. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επιδεκτικά και σε θέση να μπορούν να προσλάβουν τον πλασμιδιακό φορέα.

2.4 Ρυθμιστικά διαλύματα

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Lysis buffer 1: Hepes 20mM pH 7,5, EDTA 1mM 22
- Lysis buffer 2: Hepes 20mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 100mM, PMSF 0,1mM
- Buffer Ουρίας: 1M pH 8,5M
- Buffer χρωματογραφίας συγγένειας προς την γλουταθειόνη:

	Buffer εξισορρόπησης (A)	Buffer έκλουσης (B)
Hepes	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5
EDTA	1mM	1mM
NaCl	100mM	100mM
γλουταθειόνη	-	20mM

- Buffer χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής:

	Buffer Εξισορρόπησης	Buffer Έκλουσης 1	Buffer Έκλουσης 2	Buffer Έκλουσης 3	Buffer Έκλουσης 4
Hepes	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5
EDTA	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM
NaCl	-	120mM	250mM	500mM	1M

- Buffer χρωματογραφίας συγγένειας -πέψη με precision protease 3C:

	Buffer Εξισορρόπησης (A)	Buffer Έκλουσης (B)
Hepes	20mM pH 7,5	20mM pH 7,5
EDTA	1mM	1mM
NaCl	50mM	50mM
γλουταθειόνη	-	20mM

- Buffer χρωματογραφίας μοριακής διήθησης: Hepes 20mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 50mM

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και αναλυτικός ζυγός για την μέτρηση της μάζας. Όλα τα διαλύματα καθαρίστηκαν με φίλτρο και απαερώθηκαν πριν την χρήση.

2.5 Βιοπληροφορική Μελέτη

Για την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής βάσεις δεδομένων και προγράμματα:

1. Cottongen: Η Cottongen είναι μία βάση δεδομένων που εξειδικεύεται στο βαμβάκι και ιδίως στα τέσσερα συχνότερα είδη, δηλαδή το *Gossypium hirsutum*, το *G. arboreum*, και το *G. Herbaceum* και το *G. barbadense*. Αναλυτικότερα, περιλαμβάνει πληροφορίες τόσο για το γένωμα, όσο και για το πρωτέωμα του βαμβακιού (Yu J et.al. 2013). Μετά από βιβλιογραφική έρευνα βρέθηκε ότι το Gene ID του γονιδίου του υποδοχέα PYR1 είναι Gh_A12G1895 (Zhang, G et. Al. 2018), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της νουκλεοτιδικής και πρωτεϊνικής αλληλουχίας του υποδοχέα.

Πιο συγκεκριμένα, η κωδική αλληλουχία του γονιδίου, η οποία κλωνοποιήθηκε και στον πλασμιδιακό φορέα ετερόλογης έκφρασης, είναι η εξής:

```
5'GCAGTCTCAAAACCCGCTCCTTTCTCTTCTCCCAAACCACCAC
TCACCACCTCACCCTTCCCCCGGCATATCCCACGACGAGTTCCACGACT
TAATCCCTTCCATAACCCAGTTGCACAATACTCAGTTGGTCCCGGAAAA
TGCTCTTCTTACTAGCCAAACGTATCAGCGCCCCACACGACCTTGTCTG
GTCCATCGTCCGCCGTTTTGACAAACCCCAAGCTTACAAACATTTTCATCC
GAAGCTGTGCCGTTGAACAAGGTTGCGAAATGGTGGTGGGGTGCACGCGT
AAGGTCAACGTGATCTCCGGCTTACCTGCTGATACCAGCACCGAGAGACT
GGATATTTTAGACGACGAACGACGGGTACCCGGGTTTAGTATCATTGGAG
GGGAGCACCGATTGAGGAATTACCGGTCTGTGACGACTGTACACGGTTTC
AATCGTAACGGGAGGATCTGGACCGTCGTTTTGGAATCTTACGTTGTCTGA
TGTTCCGGAAGGTAATACGGAGGAAGACACGCGGGCTGTTCCGCAACACCG
TTGTGAAGTTGAACTTGCAAAAGCTAGCGTCTGTTACCGAAGGGTTAGCG
CGTGATGATGATAATGACGGTAATAATTCATAG 3
```

Η πρωτεϊνική αλληλουχία του υποδοχέα είναι η εξής:

```
AVSKPAPFSSFSQTTTHHLTLPPGISHDEFHDLIPSITQLHNYSVGPGKCSSLLAKRISAPHDL
VWSIVRRFDKPKQAYKHFIRSCAVEQGSQMVVGCTRKVNVISGLPADTSTERLDILDDERRVT
GFSIIGGEHRLRNYRSVTTVHGFNRNGRIWTVVLESYVVDVPEGNTEEDTRLFANTVVKLNL
QKLASVTEGLARDDDNDGNNS
```

Στα άκρα του γονιδίου τοποθετήθηκαν οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και XhoI, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα αποκοπής του γονιδίου και εισαγωγής του σε άλλον πλασμιδιακό φορέα. Τα ένζυμα αυτά επιλέχθηκαν, καθώς η αλληλουχία που αναγνωρίζουν δεν υπάρχει στο γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

2. Uniprot: Η Uniprot είναι μια βάση δεδομένων, η οποία περιέχει πληροφορίες για καταχωρημένες πρωτεΐνες, όπως η αμινοξική τους αλληλουχία, τον οργανισμό στον οποίο ανήκουν και τα ταξινομικά τους δεδομένα. Χρησιμοποιήθηκε για να γίνει έλεγχος των αλληλουχιών που βρέθηκαν από τη βάση δεδομένων Cottongen.

3. ProtParam: Το ProtParam είναι ένα πρόγραμμα, το οποίο αναλύει και προβλέπει τις φυσικοχημικές παραμέτρους των πρωτεϊνών, δηλαδή το pI, το μοριακό βάρος, το ποσοστό ανά αμινοξύ κ.α. Οι παράμετροι αυτοί χρειάστηκαν κατά την ανάπτυξη του πειραματικού πρωτοκόλλου.

4. AlphaFold DB: Το AlphaFold είναι μία βάση δεδομένων που προβλέπει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

5. Solubility assays : Χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα όπως το Protein-sol με στόχο την πρόβλεψη της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Η διαλυτότητα ελέγχθηκε και για την πρωτεΐνη που φέρει ετικέτα με τη GST (GST-Tag').

2.6 Μοριακές τεχνικές

Όλες οι διεργασίες που περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς εκτελέστηκαν σε κατάλληλα αποστειρωμένο περιβάλλον υπό φλόγα.

2.6.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων BL21 και καλλιέργεια κυττάρων

Για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά κύτταρα BL21 Gold (DE3), τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C . Όταν τα κύτταρα ξεπαγώσουν, γίνεται προσθήκη 1μl από το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο σε 100μl κυττάρων σε σωληνάριο erpendorf. Ακολουθεί επώαση 30min στον πάγο και ύστερα τα κύτταρα θερμαίνονται για 42 sec στους 42°C , έτσι ώστε να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη. Μετά την θέρμανση, γίνεται προσθήκη 900μL θρεπτικού μέσου LB και τα κύτταρα τοποθετούνται σε ανακινούμενο, θερμαινόμενο επωαστήριο για 1h, ο οποίος είναι ρυθμισμένος στους 37°C και 210rpm. Το επόμενο βήμα είναι η επίστρωση των κυττάρων σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri με τη βοήθεια πιπετών Pasteur. Στο συγκεκριμένο πείραμα επιστρώθηκαν δύο τρυβλία με 75μL και 125 μL κυττάρων αντίστοιχα. Τα τρυβλία θα επωαστούν για 16-18h, ανάποδα, στους 37°C . Αφού περάσει ο απαραίτητος χρόνος επώασης παρατηρείται αν έχουν αναπτυχθεί αποικίες.

Σε 100ml αποστειρωμένου θρεπτικού γίνεται προσθήκη αντιβιοτικού, συγκεκριμένα αμπικιλίνης συγκέντρωσης 50mg/mL. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου σιφωνίου γίνεται διαμοιρασμός 10mL από το θρεπτικό σε 3-4 σωληνάρια falcon των 50ml. Στα σωληνάρια falcon μεταφέρεται μία στικτή αποικία από το κέντρο του τρυβλίου. Σε ένα από τα σωληνάρια δεν προσθέτουμε αποικία. Αυτό το δείγμα θα λειτουργήσει ως control για να μπορεί να γίνει ο έλεγχος επιμόλυνσης. Επομένως, δεν αναμένεται βακτηριακή ανάπτυξη στο συγκεκριμένο δείγμα. Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμενόμενο ανακινούμενο επωαστήριο στους 37°C στα 210 rpm για 16-18h. Τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν σε αυτό το στάδιο είναι μετασχηματισμένα, αφού η καλλιέργεια γίνεται σε θρεπτικό που περιέχει αντιβιοτικό.

Για τα επόμενα στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια falcon των 50mL, στα οποία διαμοιράζονται 15mL αποστειρωμένου θρεπτικού LB και αμπικιλίνης συγκέντρωσης 50mg/mL. Στα σωληνάρια falcon έγινε εμβολιασμός από την αρχική καλλιέργεια βακτηρίων (προσθήκη 1,5mL, 1/100). Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με κίνηση 210rpm για 3h ή μέχρι οπτική πυκνότητα να φτάσει 0,5-0,6, όπου τα βακτήρια θα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας γίνονται μετρήσεις στο φωτόμετρο στα 600nm για έλεγχο της οπτικής πυκνότητας. Ύστερα, γίνεται προσθήκη του IPTG. Από αυτό το σημείο και έπειτα δεν είναι απαραίτητη η χρήση του φλόγιστρου. Μετά από κατάλληλη επώαση για 4h, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 6000g για 15 min στους 4°C . Έπειτα, γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου και το κυτταρικό ίζημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C .

2.6.2 Δοκιμασίες έκφρασης (expression test)

Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης, καθώς και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του IPTG, με στόχο να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης. Αναλυτικότερα, δείγματα κυττάρων επωάστηκαν μετά την προσθήκη IPTG στους 37°C για 4h και στους 18°C για 16-18h. Οι συγκεντρώσεις IPTG που εξετάστηκαν είναι 0,1mM, 0,5mM και 1mM. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιείται και ένα δείγμα control στο οποίο δεν γίνεται προσθήκη IPTG.

Όταν βρέθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες, έγινε επανάληψη της καλλιέργειας σε όγκο θρεπτικού 500ml, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα της έκφρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

2.6.3 Καλλιέργεια στελεχών *E. coli*. XL1-blue και απομόνωση πλασμιδιακού φορέα έκφρασης

Ο μετασχηματισμός των στελεχών XL1-blue έγινε με στόχο τον πολλαπλασιασμό και απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα. Το στέλεχος αυτό προτιμάτε για την κλωνοποίηση πλασμιδίων σε μεγάλες ποσότητες. Για την κλωνοποίηση και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού φορέα χρησιμοποιήθηκε το mini prep plasmid extraction kit NucleoSpin Plasmid της εταιρίας Macherey-Nagel. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με την ίδια μέθοδο που καλλιεργήθηκαν και τα BL21. (Μέθοδοι και Υλικά 2.4.2) Σε αποστειρωμένο τριβλύο επιστρώθηκαν κύτταρα XL1-blue που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο και είχαν επωαστεί στους 37°C για 16-18h. Έπειτα, έγινε προσθήκη μίας στικτής αποικίας σε 10mL αποστειρωμένου θρεπτικού LB. Η καλλιέργεια επωάζεται ξανά για 16-18h στους 37°C στα 210rpm. Σε εκείνο το σημείο έγινε η λήψη του κυτταρικού δείγματος για την απομόνωση. Για την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του extraction kit.

2.7 Παρασκευαστικές μέθοδοι

2.7.1 Λύση των κύτταρων και παρασκευή πρωτεϊνικού διαλύματος

Στα πειράματα όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 15mL θρεπτικού μέσου η λύση των κύτταρων έγινε με προσθήκη lysis buffer, το οποίο αποτελούταν από 20mM Hepes και 1mM EDTA και ήταν ρυθμισμένο σε pH=7,5. Συνολικά προστέθηκαν 20mL από το διάλυμα και η διαλυτοποίηση έγινε με ήπια ανάδευση με πιπέτα μέχρι να μην μπορούν να διακριθούν πλέον σωματίδια. Το κυτταρικό λύμα υποβάλλεται σε τρεις κύκλους υπερήχων 75% για 5sec με 30sec ανάμεσα σε κάθε κύκλο. Σε αυτό το σημείο συλλέγονται τα δείγματα ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (total). Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρούνται για 30min στα 11.000g στους 4°C. Έπειτα, γίνεται η συλλογή των διαλυτών κλασμάτων (soluble), όπου αναμένεται να βρίσκεται και η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Το βακτηριακό ίζημα (pellet) διαλυτοποιείται με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ουρίας συγκέντρωσης 1M ρυθμισμένο σε pH 8,5. Όλα τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

Κατά την λύση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε 500mL θρεπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 20mM Hepes σε pH 7,5, 1mM EDTA και PMSF 0,1mM, το οποίο δρα ως αναστολέας πρωτεασών. Αφού τα κύτταρα, έχουν λυθεί γίνεται προσθήκη και 1μl 6mg/ mL βενζονάσης. Έπειτα ακολουθούν τρεις κύκλοι υπερήχων, οι οποίοι έχουν διάρκεια 30sec με 30sec ενδιάμεσα από κάθε κύκλο. Αφού συλλεχθούν τα δείγματα total, γίνεται φυγοκέντρωση στα 17.000g στους 4°C για 1h. Το υπερκείμενο συλλέγεται με τη βοήθεια αποστειρωμένου σιφωνίου και το δείγμα προετοιμάζεται για χρωματογραφική ανάλυση.

2.7.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι καθαρισμού πρωτεϊνών

Για τις χρωματογραφικές μεθόδους διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε το σύστημα AKTA, το οποίο είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας για καθαρισμό πρωτεϊνικών μειγμάτων, πεπτιδίων και άλλων βιομορίων. Σε πειράματα χρωματογραφίας διατηρείται ένα δείγμα πριν τη τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη, το οποίο ονομάζεται input.



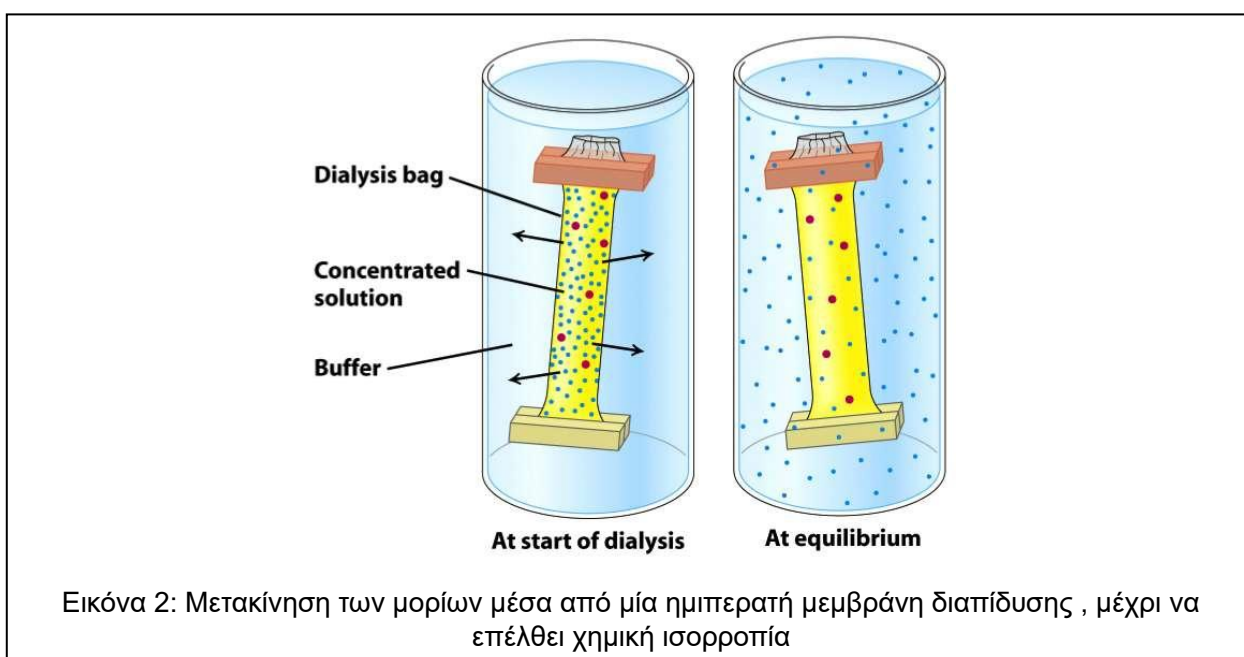
Εικόνα 1: Η στήλη HPLC AKTA

2.7.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη

Κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR1 αξιοποιήθηκε η συγγένεια που εμφανίζει η GST-tag με τη γλουταθειόνη. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε μία στήλη ρητίνης του 1ml της εταιρίας GE healthcare, η οποία περιέχει γλουταθειόνη. Η στήλη εξισορροπήθηκε με δέκα όγκους διαλύματος Hepes 20mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM. Έπειτα, ακολούθησε το φόρτωμα του δείγματος (sample loading) στη στήλη χρωματογραφίας, το οποίο σημειώνει και την έναρξη συλλογής δειγμάτων. Με βάση τη θεωρία της στήλης χρωματογραφίας, οι πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν συγγένεια με τη στήλη γλουταθειόνης απομακρύνονται στα πρώτα δείγματα. Μόλις περάσει όλο το δείγμα από τη στήλη χρωματογραφίας, η στήλη ξεπλένεται κατάλληλα με 10 όγκους από το Buffer εξισορρόπησης, έτσι ώστε να απομακρυνθούν και οι πρωτεΐνες που είχαν προσδεθεί μη ειδικά στην στήλη. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, λόγω της ετικέτας GST, έχει προσδεθεί ειδικά στην στήλη γλουταθειόνης. Για να γίνει η απομάκρυνση της πρωτεΐνης από τη στήλη, έγινε έκλουση της στήλης με 10 όγκους διαλύματος Hepes 20mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, γλουταθειόνης 20mM, το οποίο περιέχει ανοιγμένη γλουταθειόνη. Σε αυτή την περίπτωση, η ελεύθερη γλουταθειόνη ανταγωνίζεται την γλουταθειόνη στη στήλη και εκτοπίζει την πρωτεΐνη-στόχο από τη στήλη, η οποία συλλέγεται στα τελευταία κλάσματα. Τέλος, ακολουθούν ξανά πλύσεις με διάλυμα εξισορρόπησης για καθαρισμό της στήλης.

2.7.2.2 Διαπίδυση- Απομάκρυνση της γλουταθειόνης - Αποκοπή της GST

Μετά τη συλλογή του δείγματος από την πρώτη στήλη καθαρισμού, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει μέσα γλουταθειόνη. Για να απομακρυνθεί η γλουταθειόνη από το ρυθμιστικό διάλυμα εφαρμόστηκε μία μέθοδος που ονομάζεται διαπίδυση. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην θεωρία της ώσμωσης, η οποία εξηγεί ότι όταν επικρατεί διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ των πλευρών μίας ημιπερατής μεμβράνης, μικρά σωματίδια διαπερνούν τη μεμβράνη μέχρι να επέλθει εξισορρόπηση της συγκέντρωσης.(Batley & Apte, n.d.)



Για την διαπίδυση χρησιμοποιήθηκαν ειδικές μεμβράνες κυτταρίνης , στις οποίες έγινε προσθήκη του πρωτεϊνικού δείγματος με τη βοήθεια σιφωνίου. Στο πρωτεϊνικό δείγμα γίνεται και προσθήκη της HRV (Human Rhinovirus) 3C precision protease (1mg ανά 20mg πρωτεΐνης). Η πρωτεάση αυτή κόβει ειδικά μεταξύ της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος και της GST, διαχωρίζοντας τες. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα Hepes 20mM, EDTA 1mM , NaCl 100mM. Επομένως, η γλουταθειόνη που βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης διαπίδυσης, κατευθύνεται μέσα από τους πόρους προς το εξωτερικό. Η μεμβράνη διαπίδυσης επωάζεται στο διάλυμα για 16-18h. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως στόχο να ελαχιστοποιήσει τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο πρωτεϊνικό διάλυμα, αλλά και να διαχωρίσει τη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος από την GST. Για λόγους επιβεβαίωσης διατηρείται πάντα ένα δείγμα πριν γίνει η διαπίδυση(-3 C) .

2.7.2.3 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη (αφαιρετική)

Μετά τη διαδικασία της διαπίδυσης ακολουθεί μία επαναληπτική χρωματογραφία συγγένειας, για την οποία χρησιμοποιούνται τα ίδια ρυθμιστικά διαλύματα. Όμως, αφού η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος δεν είναι πλέον προσδεμένη με την ετικέτα GST, η συλλογή της αναμένεται κατά το πέρας του δείγματος από την στήλη και κατά την πλύση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης Hepes 20mM pH 7,5 , EDTA 1mM , NaCl 100mM (Buffer A). Ακολουθεί έκλουση της στήλης με το διάλυμα γλουταθειόνης, το οποίο αναίρει τη συγγένεια της GST με την στήλη και οδηγεί στην απομάκρυνση της από αυτή.

Όταν τελείωσε η χρωματογραφική ανάλυση, η στήλη πλύθηκε με διαλύματα Tris-NaCl pH 7,5 και CH₃COONa NaCl 100mM pH 4,5 και αποθηκεύτηκε κατάλληλα σε ουδέτερο pH με βάση τις οδηγίες της εταιρίας.

2.7.2.4 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη με ταυτόχρονη αποκοπή ετικέτας

Κατά τη χρωματογραφία συγγένειας με ταυτόχρονη πέψη με την HRV (Human Rhinovirus) 3C precision protease, το πρωτεϊνικό δείγμα θα επωαστεί ολονύχτια μαζί με την πρωτεάση μέσα στη στήλη. Αρχικά , η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα Hepes 20mM, EDTA 1mM και NaCl 20mM. Μετά την εξισορρόπηση, φορτώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα στην στήλη. Μόλις περάσει όλο το δείγμα από την στήλη, εισάγεται η πρωτεάση στην στήλη (1mg πρωτεάσης ανά 20mg πρωτεΐνης) . Σε αυτό το σημείο σταματάει η συλλογή κλασμάτων και ξεκινάει η επώαση, κατά την διάρκεια της οποίας η πρωτεάση διαχωρίζει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος από την ετικέτα GST. Μετά την επώαση με την πρωτεάση γίνεται ξέπλυμα της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος από την στήλη, με την προϋπόθεση ότι η πέψη με την πρωτεάση ήταν επιτυχής. Τέλος, ακολουθεί έκλουση της στήλης με διάλυμα που περιέχει γλουταθειόνη, έτσι ώστε να αναιρεθεί η συγγένεια της GST με την στήλη και να αποδεσμευτεί από αυτήν.

2.7.2.5 Καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης

Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης αποτελούν μία αποτελεσματική μέθοδο απομάκρυνσης της GST από ένα πρωτεϊνικό δείγμα. Κατά τον καθαρισμό με τα σφαιρίδια δεν χρησιμοποιείται η AKTA, αλλά μία μικρή στήλη καθαρισμού των 10ml. Αναλυτικότερα, η στήλη εξισορροπείται με 3 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης και ύστερα γίνεται προσθήκη των σφαιριδίων, τα οποία ξεπλένονται με άλλους τρεις όγκους διαλύματος εξισορρόπησης. Έπειτα, τοποθετείται το πρωτεϊνικό δείγμα στην στήλη και γίνεται συλλογή κλασμάτων. Όσες πρωτεΐνες δεν έχουν συγγένεια με την στήλη την διαπερνούν, μεταξύ αυτών και η πρωτεΐνη PYR1 , εφόσον έχει προηγηθεί πέψη με την πρωτεάση 3C. Η GST εμφανίζει συγγένεια με την στήλη και ενώνονται με αυτήν. Ακολουθεί έκλουση με διάλυμα που περιέχει γλουταθειόνη για να αναιρεθεί η συγγένεια και να γίνει συλλογή της GST.

2.7.2.6 Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής

Για την στήλη ανιοντοανταλλαγής πρέπει το διάλυμα, στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, να μην περιέχει κάποιο άλας. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα Hepes 20mM pH 7,5 και EDTA 1mM, με το οποίο θα γίνει και η εξισορρόπηση της στήλης. Για το συγκεκριμένο είδος χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε η στήλη Hi-Trap Q FF του 1ml της εταιρίας GE Healthcare, η οποία είναι μία στήλη σεφαρόζης που περιέχει θετικά φορτισμένα σωματίδια στο εσωτερικό της.

Αφού η στήλη εξισορροπηθεί και όλο το δείγμα περάσει από μέσα, ακολουθούν πλύσεις με διαλύματα χλωριούχου νατρίου αυξανόμενης αλατότητας (step elution). Με κάθε καινούργια έκλουση γίνεται και συλλογή διαφορετικού κλάσματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα με την ακόλουθη σειρά:

- Buffer 1: Hepes 20mM, EDTA 1mM, 120mM NaCl
- Buffer 2: Hepes 20mM, EDTA 1mM, 250mM NaCl
- Buffer 3: Hepes 20mM, EDTA 1mM, 500mM NaCl
- Buffer 4: Hepes 20mM, EDTA 1mM, 1M NaCl

Όταν ολοκληρωθούν και οι τέσσερις εκλούσεις (10 όγκοι/ έκλουση), η στήλη καθαρίζεται με το διάλυμα εξισορρόπησης και αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη, με βάση τις οδηγίες της εταιρείας.

2.7.2.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Κατά τη χρωματογραφία μοριακή διήθησης γίνεται εξισορρόπηση της στήλης με περίπου δέκα όγκους διαλύματος Hepes 20mM, EDTA 1mM, 50mM NaCl. Ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος στην στήλη. Μόλις περάσει όλο το δείγμα στην στήλη ξεκινάει η συλλογή κλασμάτων, ώσπου ο όγκος έκλουσης να είναι λίγο μεγαλύτερος από τον συνολικό όγκο της στήλης. Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HiLoad 16/600 Superdex 75pg.

2.8 Αναλυτικές μέθοδοι

2.8.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι μία μοριακή τεχνική, η οποία έχει ως στόχο των διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό μειγμάτων πρωτεϊνών, αλλά και για την ταυτοποίηση και τον καθαρισμό τους.

Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πήκτωμα ή χαρτί), πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Συγκεκριμένα για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (gel), το οποίο φτιάχνεται πάνω σε μία γυάλινη επιφάνεια. Όσο το πήκτωμα δεν έχει πήξει ακόμη τοποθετείται στο πάνω μέρος μια ειδική χτένα που δημιουργεί τα πηγάδια, όπου και θα φορτωθούν μετέπειτα τα πρωτεϊνικά δείγματα. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διαφορετικά μέρη, το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel), τα οποία εμφανίζουν

διαφορετικά μεγέθη πόρων και έχουν ρυθμιστεί σε διαφορετικά pH. Το πήκτωμα «πακεταρίσματος» συμπυκνώνει τις πρωτεΐνες σε μία μικρή ζώνη, έτσι ώστε να φτάσουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Σε πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται πάντα και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (marker), ο οποίος αποτελεί ένα μείγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη. Η χρήση του marker είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue). Το πρώτο βήμα της χρώσης είναι το βράσιμο του πηκτώματος σε διάλυμα 10% οξικού οξέος. Ύστερα, γίνεται αφαίρεση του οξικού και προσθήκη της χρωστικής. Το πήκτωμα βράζει ξανά και τοποθετείται σε συσκευή ανακίνησης για 15min. Ακολουθούν πλύσεις με οξικό και βράσιμο του πηκτώματος, ώστε να μπορούν να διακριθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών στο πήκτωμα.

Το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης αποτελείται από τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Διάλυμα 30% Acrylamide/Bis
2. Tris Buffer
3. SDS → απομακρύνει τη φυσική διαμόρφωση και φορτίο των πρωτεϊνών και τις φορτίζει αρνητικά, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος
4. Υπερθειικό Αμμώνιο (APS)
5. TEMED

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα με διαφορετική περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα, με στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό. Κριτήριο για αυτό αποτελεί το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης διαχωρισμού. Όσο μικρότερο το μοριακό βάρος, τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό σε ακρυλαμίδα. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Για το running gel:

	12% w/v Acrylamide mix	15% w/v Acrylamide mix	18% w/v Acrylamide mix
H ₂ O	3,2 mL	2.3 mL	1,3 mL
30% acrylamide mix	4 mL	5 mL	6mL
1.5M Tris-NaCl pH 8.8	2.5mL	2,5 mL	2,5 mL
10% SDS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
10% APS	0,1 mL	0,1 mL	0,1mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL	0,004 mL

Το stacking gel είναι ίδιο και στις τρεις περιπτώσεις. Για την παραγωγή 3ml gel χρειάζονται:

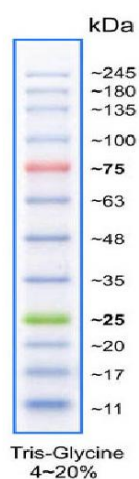
H ₂ O	2,1 mL
30% acrylamide mix	0,5 mL
1,5M Tris-NaCl pH 6,8	0,38 mL
10% SDS	0,03 mL
10% APS	0,03 mL
TEMED	0,004 mL

Προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Σε κάθε ηλεκτροφορούμενο δείγμα έγινε ανάλογη προσθήκη loading buffer, το οποίο αποτελείται από :

1. Γλυκερόλη
2. Χρωστική, στη συγκεκριμένη περίπτωση Bromophenol Blue→Βοηθά στον οπτικό εντοπισμό της προόδου της ηλεκτροφόρησης.
3. SDS
4. DTT ή β -mercaptoethanol
5. Tris-HCl buffer

Έπειτα, τα δείγματα βράζουν σε θερμαντικό μπλοκ για 5min στους 95°C . Σε κάθε πείραμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται και ένας μάρτυρας, ο οποίος αποτελείται από ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας Tris-Glycine 4-20% της εταιρείας Nippon Genetics.



Εικόνα 3: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

2.8.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης σε NanoDrop

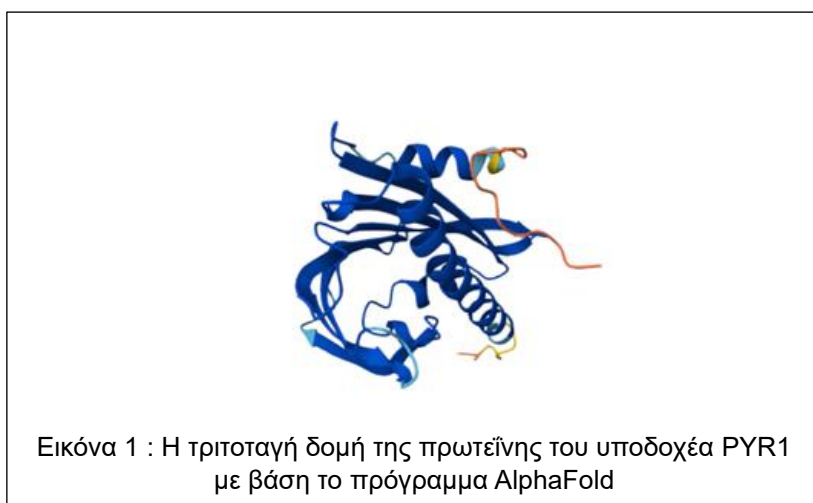
Το nanodrop είναι μία συσκευή φασματοσκοπίας χωρίς κυψελίδα, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Μετά το τέλος κάθε σταδίου της διαδικασίας έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης PYR1 ακολουθούσε μέτρηση στο nanodrop στα 280 nm, ενώ μετρήθηκε και η συγκέντρωση του πλασμιδίου που απομονώθηκε στα 260nm.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βιοπληροφορική μελέτη

Από το ProtParam βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη PYR1 αποτελείται συνολικά από 210 αμινοξέα με μοριακό βάρος 23312.20 , το θεωρητικό pI προβλέπεται στο 6.75, ενώ ο Ext. coefficient υπολογίζεται στα $17085 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για μέτρηση στα 280 nm.

Από την εισαγωγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας στο AlphaFold προέκυψε η παρακάτω τριτοταγής δομή:

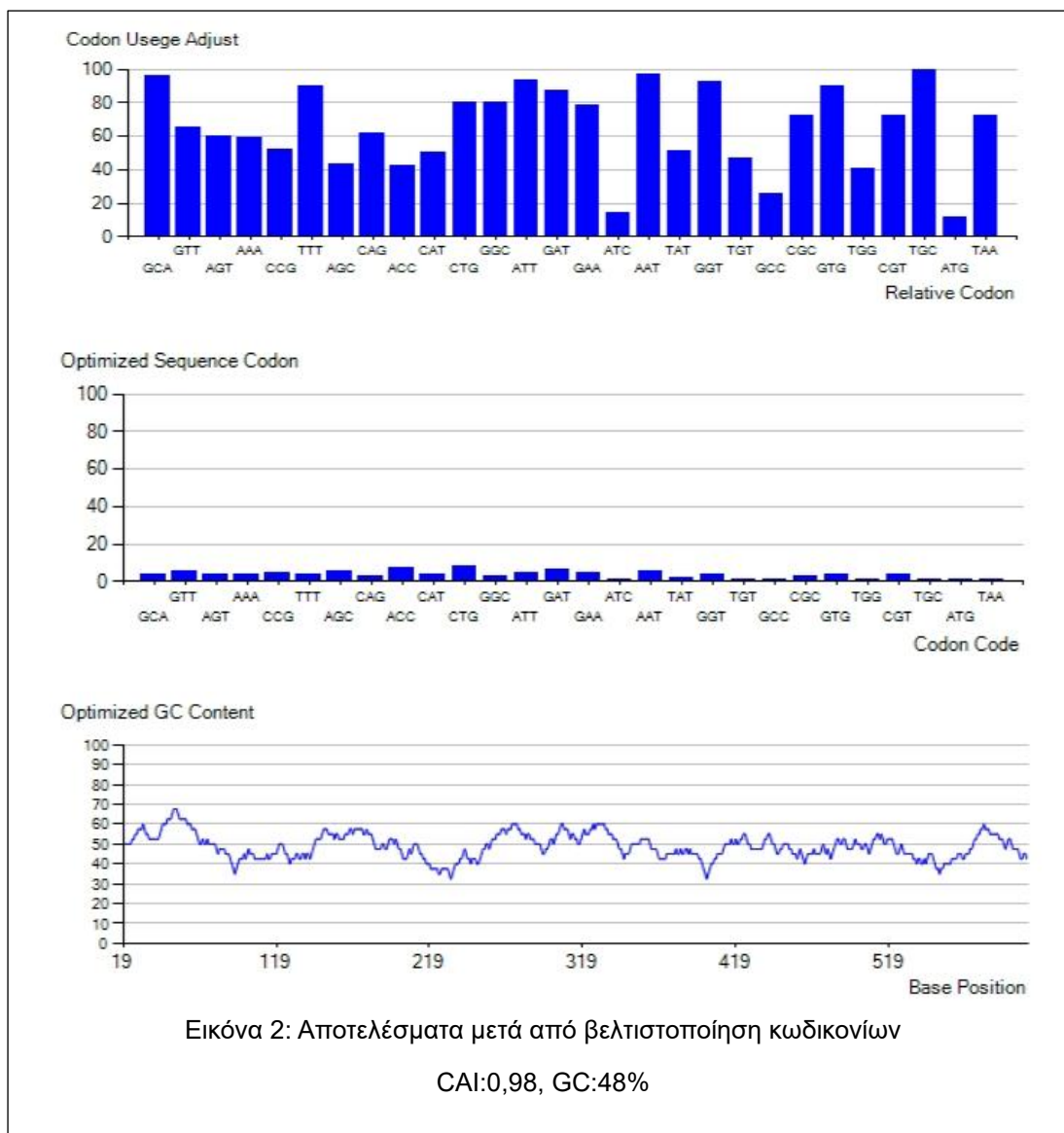


3.2 Βελτιστοποίηση γονιδίων για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε σύστημα έκφρασης *E.coli* (codon optimization)

Κατά τη βελτιστοποίηση κωδικονίων για έκφραση σε *E.coli* έγινε τροποποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου ενδιαφέροντος , έτσι ώστε να περιέχει τα κωδικόνια που είναι προτιμότερα για τον συγκεκριμένο ξενιστή (codon usage adjustment). Επιπλέον, η βελτιστοποίηση φροντίζει τα κωδικόνια να κατανέμονται ομοιόμορφα κατά μήκος της αλληλουχίας (codon usage distribution). Τέλος, η αλληλουχία τροποποιήθηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε το ποσοστό GC να κυμαίνεται γύρω στο 50%.

Η αλληλουχία μετά τη βελτιστοποίηση είναι η ακόλουθη:

```
AVSKPAPFSSFSQTTTHHLTLPPGISHDEFHDLIPSITQLHNYSVGPGKCSSLLAKRISAPHDLV  
WSIVRRFDKPKQAYKHFIRSCAVEQGSQMVGCTRKVNVISGLPADTSTERLDILDDERRVTG  
FSIIGGEHRLRNYSVTTVHGFNRNGRIWTVVLESYVVDVPEGNTTEEDTRLFANTVVKLNQ  
KLASVTEGLARDDDDNDGNNS
```



Εικόνα 2: Αποτελέσματα μετά από βελτιστοποίηση κωδικονίων

CAI:0,98, GC:48%

3.3 Αποτελέσματα απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα

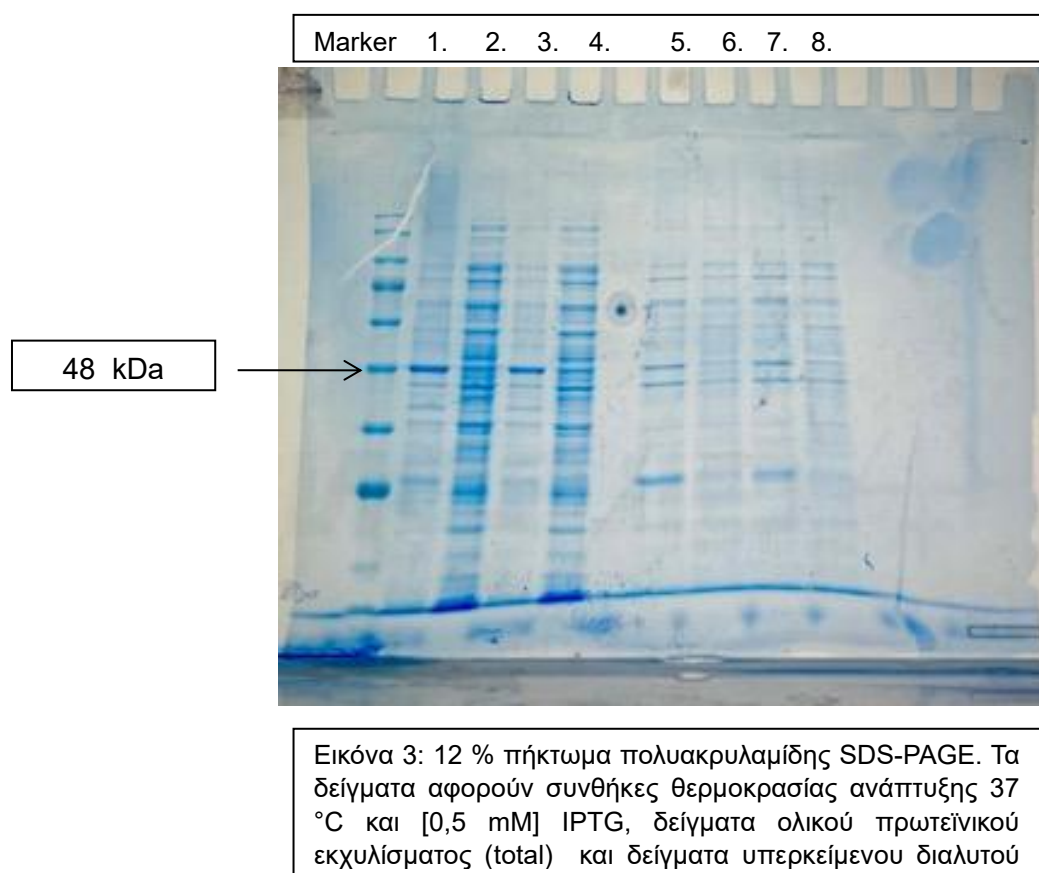
Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου με βάση της οδηγίες του kit, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA σε nanodrop στα 260nm, η οποία ήταν 125 ng/μl. Το πλασμίδιο αποθηκεύτηκε σε σωληνάριο τύπου erpendorf C στα-20°C.

3.4 Δοκιμασίες έκφρασης

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 2. 4.2 , εκτελέστηκαν κάποια τεστ έκφρασης, κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης και διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα έκφρασης IPTG , με στόχο να βρεθούν οι συνθήκες όπου παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης από τα βακτηριακά στελέχη. Κατά την εκτέλεση των τεστ έκφρασης , η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος έχει μοριακό βάρος περίπου 50 kDa, αφού είναι ενωμένη με την ετικέτα GST.

Δοκιμασία έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης

Οι πρώτες συνθήκες, οι οποίες δοκιμάστηκαν ήταν η καλλιέργεια των βακτηρίων στους 37°C με βάση το πρωτόκολλο που αναλύεται στο κεφάλαιο 2.4.1. Στο συγκεκριμένο τεστ έκφρασης έγινε λήψη δείγματος και από τα δύο τρυβλία (Α και Β) που καλλιιεργήθηκαν. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν στο 0,5 - 0,6, έγινε προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0,5 mM. Ακολούθησε μία τριώρη επώαση στους 37°C στα 210 rpm. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση, μετά την οποία απομακρύνεται το υπερκείμενο και διαλυτοποιείται το κυτταρικό ίζημα, όπως εξηγείται στο κεφάλαιο 2.7.1. Αφού έγινε η λήψη των δειγμάτων total και soluble, τα δείγματα προετοιμάζονται για SDS - ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης διακρίνονται παρακάτω:



Στην εικόνα βλέπουμε πρώτα τα δείγματα ο total και soluble. Από τα δείγματα total φορτώθηκαν 3μL στο gel, ενώ από το soluble 12mL. Για κάθε δείγμα εξετάστηκε και ένα δείγμα control, στο οποίο δεν είχε γίνει προσθήκη IPTG. Συγκεκριμένα, η σειρά των δειγμάτων είναι:

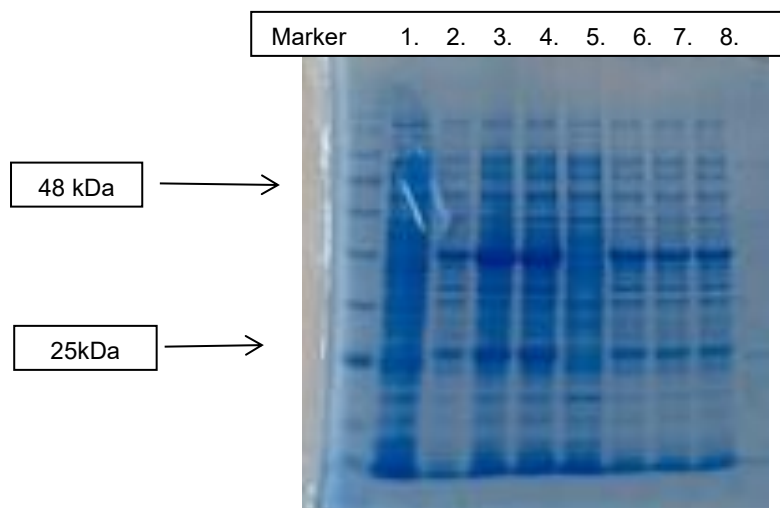
1. +IPTG τρυβλίο Α Total
2. -IPTG τρυβλίο Α Total
3. + IPTG τρυβλίο Β Total
4. - IPTG τρυβλίο Β Total
5. +IPTG τρυβλίο Α soluble
6. -IPTG τρυβλίο Α soluble
7. + IPTG τρυβλίο Β soluble
8. - IPTG τρυβλίο Β soluble

Συγκρίνοντας τα δείγματα 5 και 7 με τα δείγματα 6 και 8, παρατηρείται πως η προσθήκη του επαγωγέα όντως αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, το ποσοστό έκφρασης παραμένει χαμηλό, αφού δεν διακρίνονται έντονες ζωνώσεις.

Δοκιμασία έκφρασης για βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης (θερμοκρασία, επαγωγέα)

Κατά τη δεύτερη δοκιμασία έκφρασης εξετάστηκαν παράλληλα δύο θερμοκρασίες ανάπτυξης, 18°C και 37°C και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG, συγκεκριμένα 0,1mM, 0,5mM και 1mM. Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων στους 18°C, αφού η οπτική πυκνότητα έφτασε το 0,5-0,6, τα δείγματα επωάστηκαν για 16-18h. Για κάθε θερμοκρασία υπήρχε ένα δείγμα negative control χωρίς IPTG, το οποίο επωάστηκε κανονικά με τα εκάστοτε δείγματα. Μετά τις ανάλογες διαδικασίες (φυγοκέντρηση, λύση κυττάρων, υπέρηχοι, φυγοκέντρηση), έγινε λήψη των δειγμάτων total και του soluble. Το βακτηριακό ίζημα (pellet) διαλυτοποιήθηκε σε αυτό το τεστ έκφρασης με διάλυμα ουρίας. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής.

Στο παρακάτω gel ηλεκτροφόρησης παρατηρούνται τα αποτελέσματα από τα δείγματα total, από τα οποία φορτώθηκαν 3 μl στο πήκτωμα.



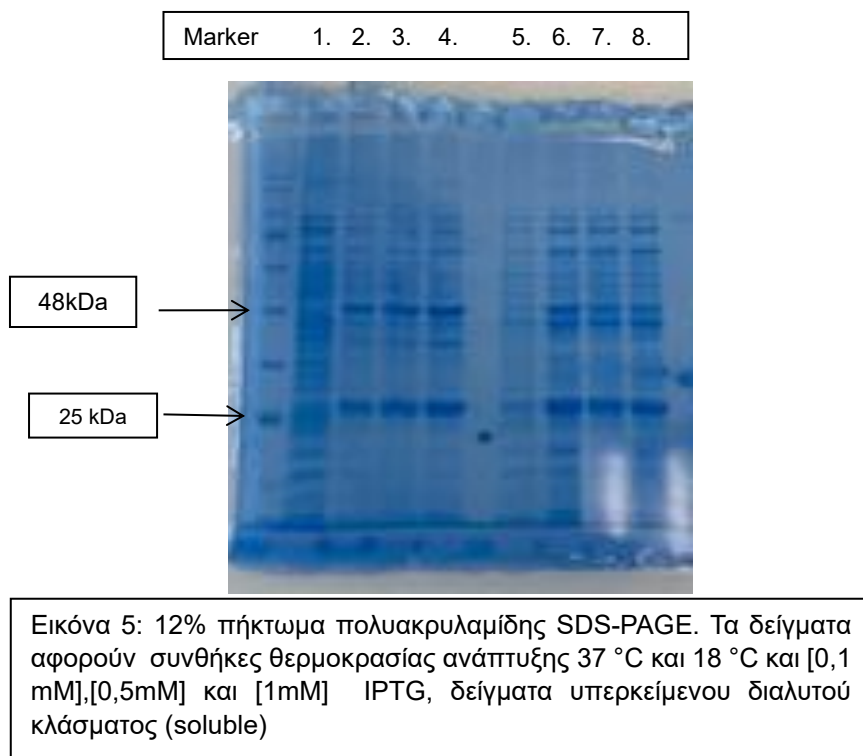
Εικόνα 4: 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE. Τα δείγματα αφορούν συνθήκες θερμοκρασίας ανάπτυξης 37 °C και 18 °C και [0,1 mM], [0,5mM] και [1mM] IPTG, δείγματα ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (total)

Για κάθε δείγματα total φορτώθηκαν 3μL στο gel ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, η σειρά των δειγμάτων είναι :

1. 18°C -IPTG total
2. 18°C 0,1mM IPTG total
3. 18°C 0,5mM IPTG total
4. 18°C 1mM IPTG total
5. 37°C -IPTG total
6. 37°C 0,1mM IPTG total
7. 37°C 0,5mM IPTG total

8. 37°C 1mM IPTG total

Στο παρακάτω gel ηλεκτροφόρησης παρατηρούνται τα αποτελέσματα από τα δείγματα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων:

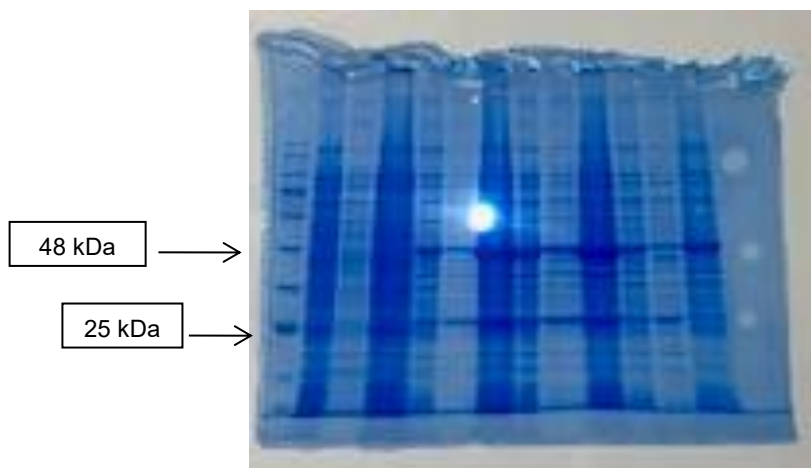


Από τα δείγματα soluble φορτώθηκαν στο πήκτωμα 12μL. Συγκεκριμένα, η σειρά των δειγμάτων είναι:

1. 18°C -IPTG soluble
2. 18°C 0,1mM IPTG soluble
3. 18°C 0,5mM IPTG soluble
4. 18°C 1mM IPTG soluble
5. 37°C -IPTG soluble
6. 37°C 0,1mM IPTG soluble
7. 37°C 0,5mM IPTG soluble
8. 37°C 1mM IPTG soluble

Τέλος , έγινε μία επαναληπτική ηλεκτροφόρηση με όλα τα δείγματα , στην οποία συμπεριλήφθηκαν και δείγματα από το ίζημα, αφού είχαν διαλυτοποιηθεί πρώτα με ουρία. Το gel της ηλεκτροφόρησης είναι το ακόλουθο:

Marker 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.



Εικόνα 6: 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE. Τα δείγματα αφορούν συνθήκες θερμοκρασίας ανάπτυξης 37 °C και 18 °C και [0,1 mM], και [1mM] IPTG, δείγματα ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (total), δείγματα υπερκείμενου διαλυτού κλάσματος (soluble) και δείγματα κυτταρικού ιζήματος (pellet).

Από τα δείγματα total φορτώθηκαν 3μL στο gel ηλεκτροφόρησης, ενώ από τα δείγματα soluble και pellet 12mL. Η σειρά των δειγμάτων είναι η ακόλουθη:

1. 18°C -IPTG total
2. 18°C -IPTG soluble
3. 18°C - IPTG pellet
4. 18 °C 0,1mM total
5. 18 °C 0,1 mM soluble
6. 18 °C 0,1 mM pellet
7. 18 °C 1 mM total
8. 18 °C 1 mM soluble
9. 18 °C 1 mM pellet
10. 37 °C 1 mM total
11. 37 °C 1 mM soluble
12. 37 °C 1 mM pellet

Από το τεστ έκφρασης παρατηρείται ότι η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης του PYR1 είναι αποτελεσματικότερη σε χαμηλές θερμοκρασίες και με υψηλή συγκέντρωση επαγωγέα. Το παραπάνω συμπέρασμα προκύπτει συγκρίνοντας τα δείγματα 2 , 4 και 8 από την εικόνα 5 και επιβεβαιώνεται και από τα δείγματα 5 , 8 και 10 της εικόνας 6.

Για την καλλιέργεια σε μεγάλο όγκο επιλέχθηκαν με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα οι εξής συνθήκες ανάπτυξης:

- Θερμοκρασία : 18°C
- Συγκέντρωση IPTG : 1mM

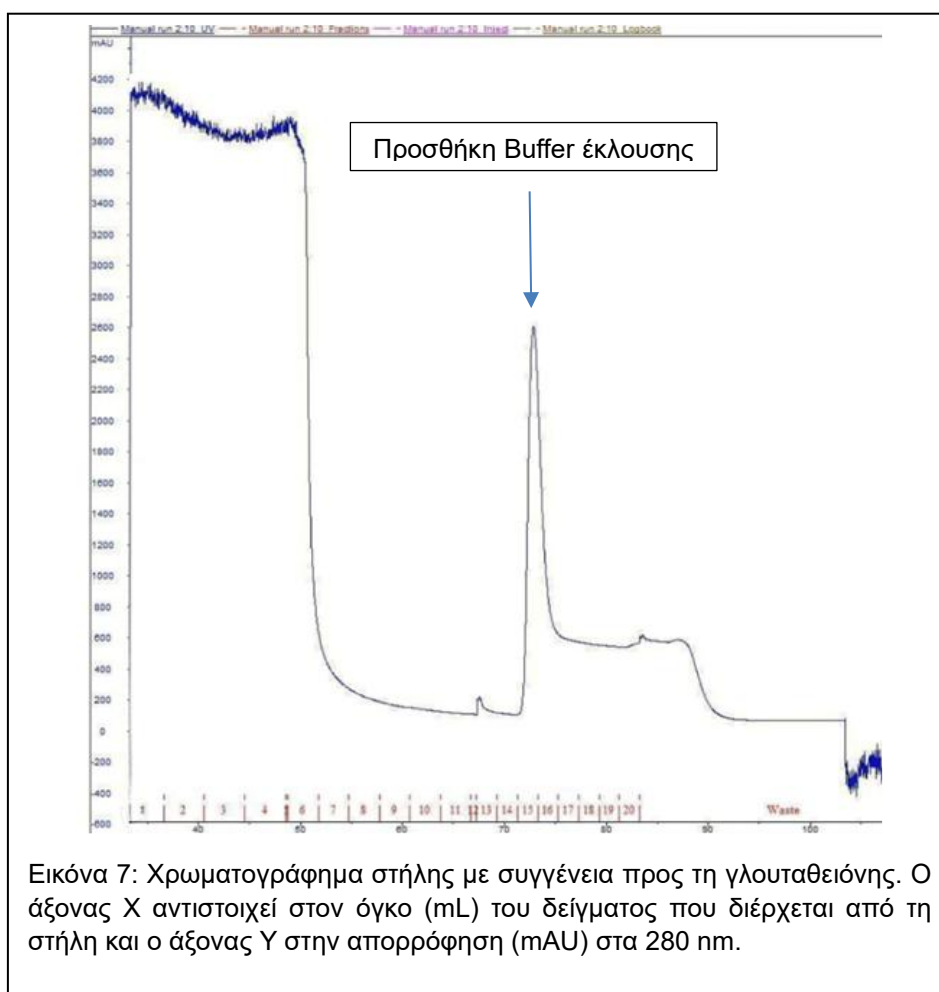
Συνολικά καλλιεργήθηκαν δύο διαφορετικές καλλιέργειες του ενός λίτρου η κάθε μία και αποθηκεύτηκαν στους - 20 °C.

3.5 Αποτελέσματα χρωματογραφικών αναλύσεων

Κατά τον καθαρισμό εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα, με στόχο την απομόνωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης. Τα πρωτοκολλά καθαρισμού αποτελούνταν από διαφορετικά είδη χρωματογραφίας, ενώ έγινε και στις δύο περιπτώσεις καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης. Αναλυτικότερα, οι διαδικασίες που εφαρμόστηκαν είναι η εξής:

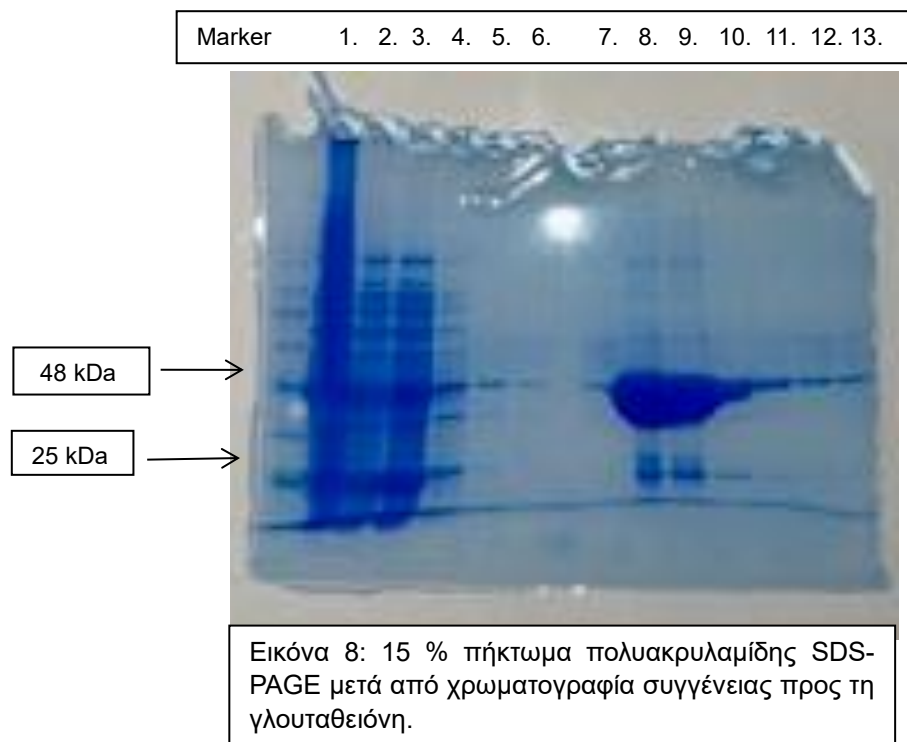
- 1ο Πρωτόκολλο Καθαρισμού:
 - Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη
 - Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη (αφαιρετική)
 - Χρωματογραφία ανιοντοαναταλλαγής
 - Καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης - σεφαρόζης
- 2ο Πρωτόκολλο Καθαρισμού:
 - Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη- Πέψη με την πρωτεάση 3C
 - Καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης - σεφαρόζης
 - Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

3.5.1 Χρωματογραφία συγγένειας προς τη γλουταθειόνη (Εικόνες 7 και 8)



Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος είναι ενωμένη με ένα GST-tag και φέρει ως αποτέλεσμα συγγένεια προς τη γλουταθειόνη. Με βάση τη θεωρία της χρωματογραφίας συγγένειας προς τη γλουταθειόνη, το πρώτο βήμα είναι το να περάσει όλο το δείγμα από τη στήλη χρωματογραφίας, έτσι ώστε να απομακρυνθεί οτιδήποτε δεν εμφανίζει συγγένεια με την στήλη (flowthrough, κλάσματα 1-6). Ακολουθεί πλύση της στήλης με το κατάλληλο διάλυμα για να απομακρυνθούν από τη στήλη πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά (wash, κλάσματα 7-11). Τέλος, γίνεται έκλυση της στήλης με διάλυμα που περιέχει γλουταθειόνη ώστε να αναιρεθεί η συγγένεια της στήλης με την GST και να ελκυστεί η πρωτεΐνη από τη στήλη. Η αύξηση της απορρόφησης UV στα κλάσματα 14, 15 και 16 δείχνει ότι η αναίρεση της συγγένειας ήταν επιτυχής και ότι έγινε απομάκρυνση της πρωτεΐνης από την στήλη.

Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση. Από κάθε δείγματα φορτώθηκαν 10μL στο πήκτωμα:



Αναλυτικότερα, τα δείγματα που αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση , από τα οποία φορτώθηκαν 10μL στο πήκτωμα, είναι τα εξής:

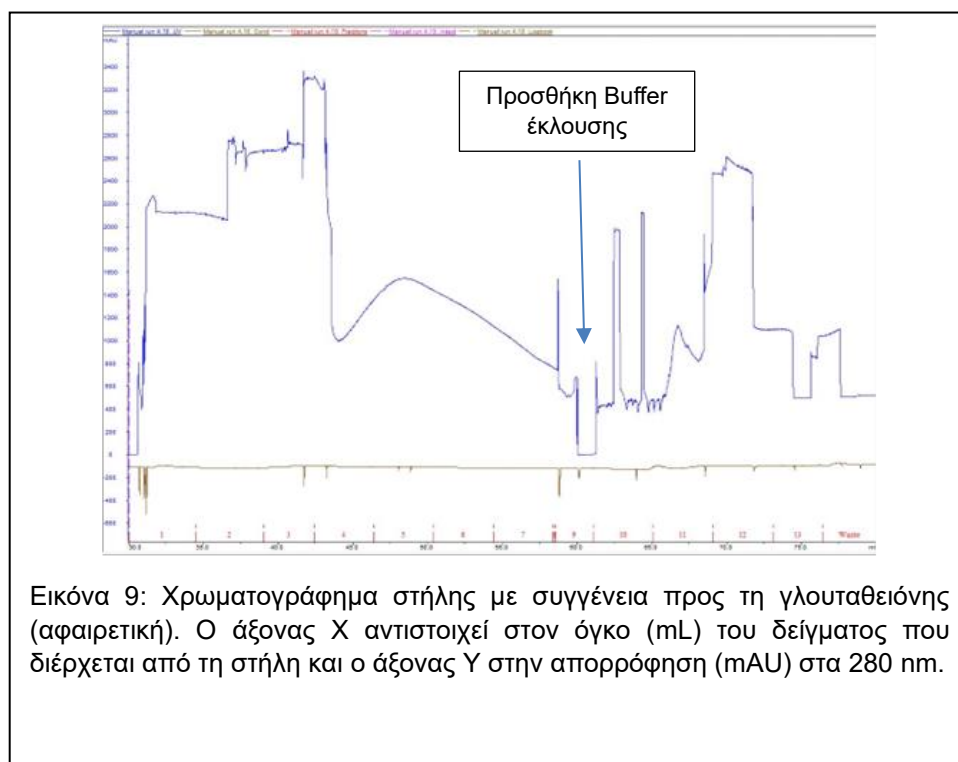
1. Total
2. Input
3. Κλάσμα 3 - flowthrough
4. Κλάσμα 7 wash
5. Κλάσμα 8 wash
6. Κλάσμα 11 wash
7. Κλάσμα 14 elution-peak
8. Κλάσμα 15 elution-peak
9. Κλάσμα 16 elution-peak
10. Κλάσμα 17
11. Κλάσμα 18
12. Κλάσμα 19
13. Κλάσμα 20

Στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης διακρίνονται έντονες ζώνες στα ίδια δείγματα που η απορρόφηση αυξάνεται στο χρωματογράφημα. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε σε nanodrop και ήταν 5,37 mg/ml. Συνολικά συλλέχθηκαν 12ml πρωτεΐνης.

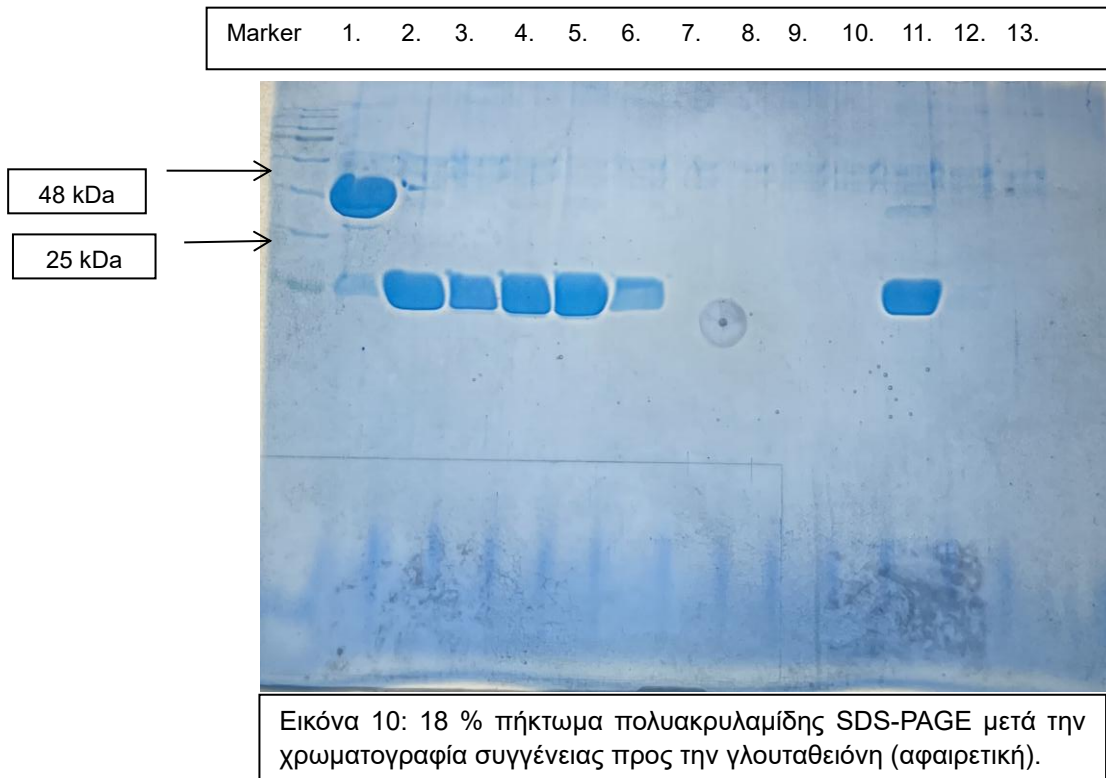
3.5.2 Χρωματογραφία συγγένειας προς την γλουταθειόνη (αφαιρετική) (Εικόνες 9 και 10)

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 2.7.2.2, πριν την διεξαγωγή αυτής της στήλης προηγείται η διαδικασία της διαπίδυσης, κατά την οποία απομακρύνεται η γλουταθειόνη από το διάλυμα της πρωτεΐνης και η πρωτεάση 3C διαχωρίζει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος από την ετικέτα GST. Επομένως, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος δεν εμφανίζει πλέον συγγένεια με τη στήλη και αναμένεται να συλλέγει στα πρώτα δείγματα. Η GST θα συνδεθεί κανονικά στη στήλη και θα απομακρυνθεί κατά τη διάρκεια της έκλουσης.

Το αντίστοιχο χρωματογράφημα είναι το ακόλουθο:



Μετά τη χρωματογραφία ακολούθησε και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 10μL στο gel ηλεκτροφόρησης:



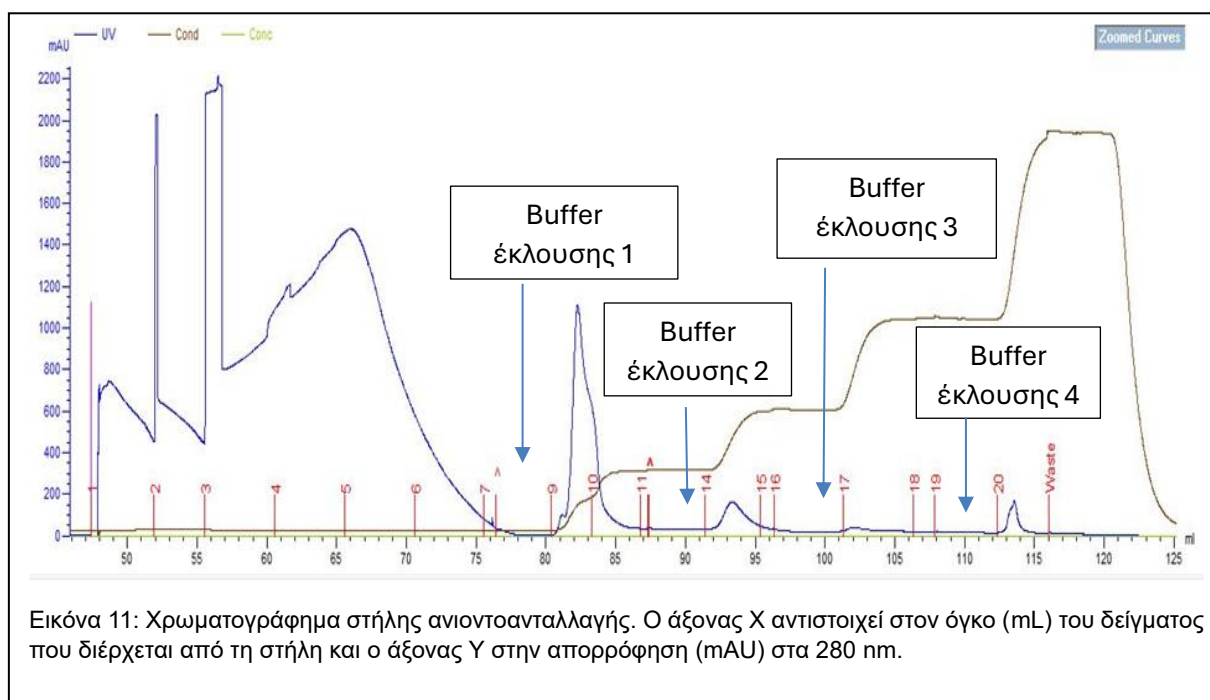
Η σειρά των δειγμάτων είναι η ακόλουθη:

1. -3C
2. Input
3. Κλάσμα 1
4. Κλάσμα 2
5. Κλάσμα 3
6. Κλάσμα 4
7. Κλάσμα 5
8. Κλάσμα 6
9. Κλάσμα 9
10. Κλάσμα 10
11. Κλάσμα 11
12. Κλάσμα 12
13. Κλάσμα 13

Συγκρίνοντας τα πρώτα δύο δείγματα συμπεραίνεται ότι η διαδικασία της διαπίδυσης και ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από την GST ήταν επιτυχής. Αυτό γίνεται κατανοητό, καθώς στο πρώτο δείγμα που δεν έχει γίνει προσθήκη της πρωτεάσης διακρίνεται μια ζώνη στα 48 kDa, ενώ στο input, που είναι το δείγμα που λήφθηκε μετά την διαπίδυση, παρατηρείται μόνο μία ζώνη στα 25 kDa. Ο λόγος που εμφανίζεται μία ζώνη και όχι δύο είναι επειδή η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και η GST έχουν πολύ κοντινό μοριακό βάρος, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να διαχωριστούν καλά στο πήκτωμα. Στα δείγματα 3 - 6 (flowthrough) εμφανίζονται έντονες ζωνώσεις στο πήκτωμα, οι οποίες αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Όμως, καθώς όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος η πρωτεΐνη και η GST έχουν κοντινό μοριακό βάρος, είναι πιθανό και κάποια ποσότητα GST να έχει παρασυρθεί μαζί με το δείγμα και να μην μπορεί να γίνει εμφανές στο gel. Στο δείγμα 11, κατά τη συλλογή του οποίου γινότανε έκλυση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης, έχει συλλέξει η GST. Αυτό βρίσκεται σύμφωνο και με το χρωματογράφημα, μίας και στο κλάσμα 11 διακρίνεται μία ομαλή αύξηση της απορρόφησης. Επίσης, στο δείγμα 11 διακρίνεται και μία ζώνη στα 48 kD, η οποία αντιστοιχεί σε ενωμένη PYR - GST πρωτεΐνη που δεν διαχωρίστηκε κατά την διαπίδυση. Συνολικά συλλέχθηκαν 11ml πρωτεΐνης, τα οποία συμπυκνώθηκαν σε 1,5ml με φίλτρο συμπύκνωσης. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης σε nanodrop, η οποία ήταν 11,6 mg/ml.

3.5.3 Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (Εικόνες 11 και 12)

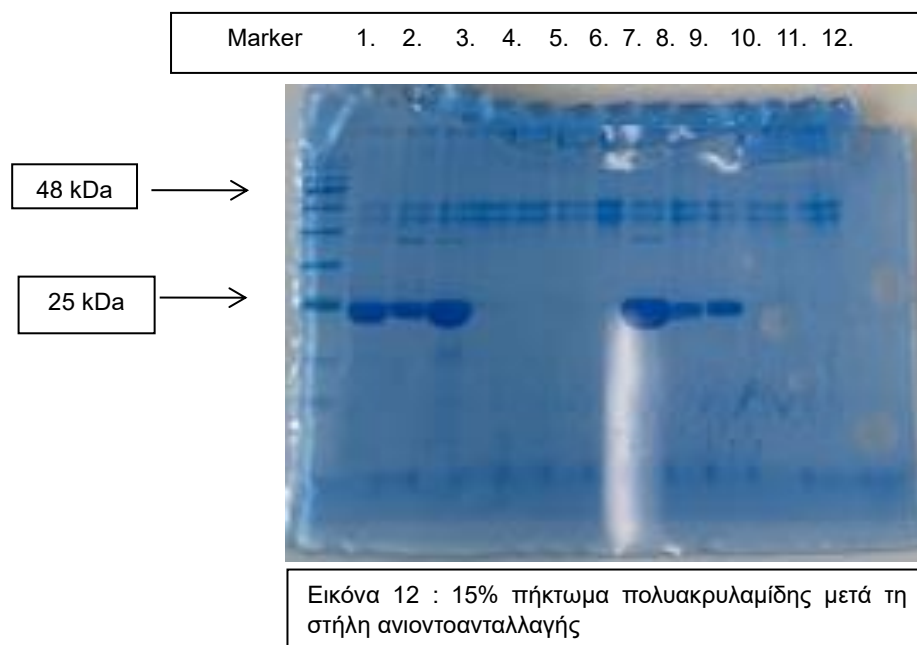
Η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής βασίζεται στον διαχωρισμό με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο, όπου το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν. Κατά της έκλυση της στήλης χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα διαφορετικής αλατότητας. Το χρωματογράφημα που προέκυψε ήταν το ακόλουθο:



Η έκλυση της στήλης ξεκίνησε στο κλάσμα 9 με διάλυμα αλατότητας 120mM NaCl. Στο χρωματογράφημα παρατηρείται μία έντονη αύξηση της ακτινοβολίας κατά την προσθήκη του διαλύματος, το οποίο σημαίνει πως γίνεται έκλυση πρωτεΐνης από την

στήλη. Οι αυξήσεις της απορρόφησης κατά την προσθήκη των επομένων διαλυμάτων ήταν σημαντικά μικρότερες. Για κάθε διαφορετικό διάλυμα αλατότητας έγινε συλλογή 2-3 κλασμάτων των 4 ml.

Τα αποτελέσματα από την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση φαίνονται παρακάτω. Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 10μL, πέρα από το δείγμα input, που αναλύθηκε δύο φορές.



Η σειρά των δειγμάτων είναι:

1. Input (5μl)
2. Κλάσμα 11 από χρωματογραφία συγγένειας (GST)
3. Input (10μl)
4. Κλάσμα 2
5. Κλάσμα 3
6. Κλάσμα 4
7. Κλάσμα 5
8. Κλάσμα 9
9. Κλάσμα 10
10. Κλάσμα 14
11. Κλάσμα 17
12. Κλάσμα 20

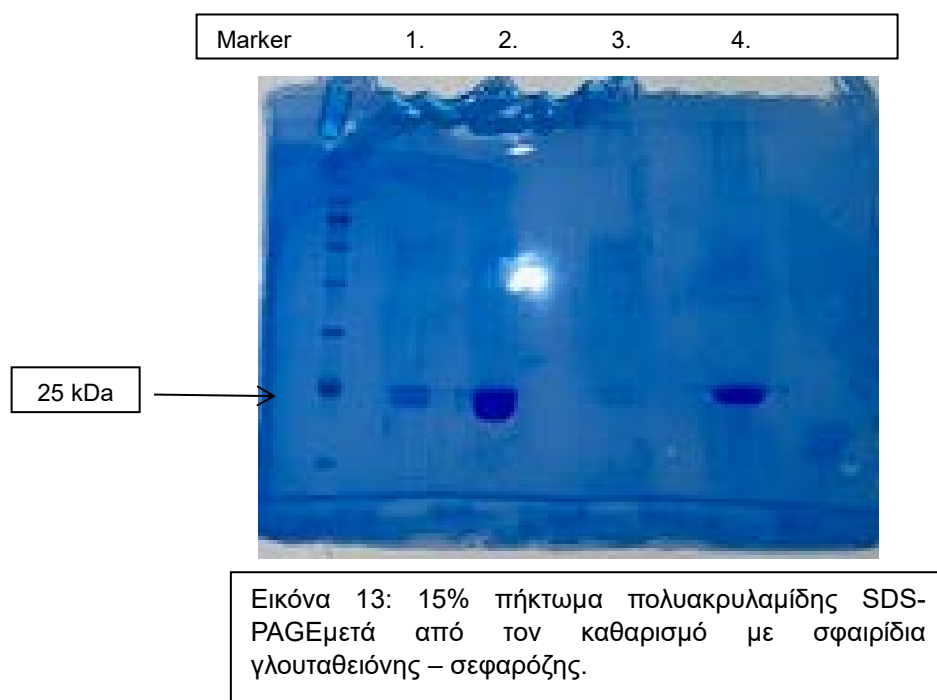
Παρατηρούμε ότι στα δείγματα 8 και 9 (κλάσματα 9 και 10) υπάρχει όντως μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης, η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Επίσης, διακρίνεται πρωτεΐνη και κατά την έκλουση με διάλυμα αλατότητας 250 mM όπως βλέπουμε και στο πήκτωμα στο δείγμα 10 (κλάσμα 14) , η οποία αντιστοιχεί σε

ποσότητα GST που δεν είχε απομακρυνθεί με προηγούμενες μεθόδους καθαρισμού. Τέλος, σε όλα τα δείγματα υπάρχουν ζωνώσεις στα 50kDa , οι οποίες προκύπτουν από μία ποσότητα πρωτεΐνης που δεν κόπηκε από την πρωτεάση και βρίσκεται ακόμη στο διάλυμα. Η συγκέντρωση μετρήθηκε σε nanodrop και ήταν 1,04 mg/ml με συνολικό όγκο 7ml πρωτεΐνης.

3.5.4 Αποτελέσματα μετά από επώαση με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (Εικόνα 13)

Με βάση τα αποτελέσματα της δεύτερης στήλης χρωματογραφίας επιλέχθηκαν τα κλάσματα 9,10 και 14 για περαιτέρω καθαρισμό με χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Τα κλάσματα πέρασαν το κάθε ένα ξεχωριστά από μία στήλη καθαρισμού των 10ml στην οποία είχε γίνει προσθήκη των σφαιριδίων. Ενδιάμεσα από κάθε κλάσμα έγινε καλό ξέπλυμα της στήλης με 3 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης. Τέλος, έγινε έκλυση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης , για να γίνει η συλλογή της GST που είχε προσδεθεί σε αυτή.

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον καθαρισμό υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση :



Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 10μL. Αναλυτικότερα, η σειρά των δειγμάτων είναι η εξής:

1. Κλάσμα 9
2. Κλάσμα 10
3. Κλάσμα 14
4. Έκλυση με διάλυμα γλουταθειόνης

Τα σφαιρίδια φάνηκαν αποτελεσματικά στο να απομακρύνουν μία σημαντική ποσότητα GST και ενωμένης πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, έγινε και μία δεύτερη επώαση του δείγματος 2, το οποίο εμφανίζει τη μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση και περιέχει

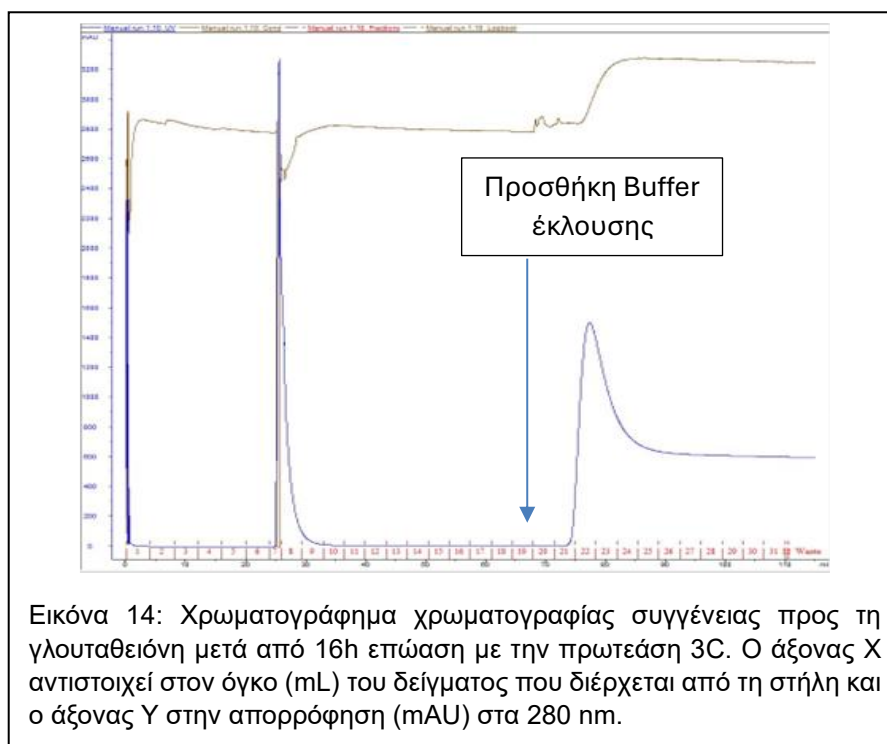
την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος με τα σφαιρίδια, καθώς ακόμη διακρίνονται προσμίξεις . Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 15 (δείγματα 13 και 14).

Από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος βρίσκεται στο κλάσμα 10, του οποίου η συγκέντρωση πριν την επίδραση με beads ήταν 0,84 mg/ml. Όμως, μαζί με την πρωτεΐνη φαίνεται ότι υπάρχει και μεγάλη ποσότητα GST που δεν έχει απομακρυνθεί με τον καθαρισμό. Παρόλα αυτά, τα σφαιρίδια είναι λειτουργικά , καθώς η μεγαλύτερη ποσότητα της GST συγκεντρώνεται στο δείγμα 4, στο κλάσμα μετά την έκλυση της στήλης με γλουταθειόνη. Έγινε μέτρηση της τελικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο nanodrop, η οποία ήταν 0,60 mg/ml σε συνολικό όγκο 4ml πρωτεΐνης. Μετά από το πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού απομονώθηκαν επομένως 2,4 mg πρωτεΐνης από ένα λίτρο καλλιέργειας.

Για τις ακόλουθες μεθόδους καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε νέο κυτταρικό ίζημα από ένα λίτρο καλλιέργειας που είχε αποθηκευτεί στους -20°C.

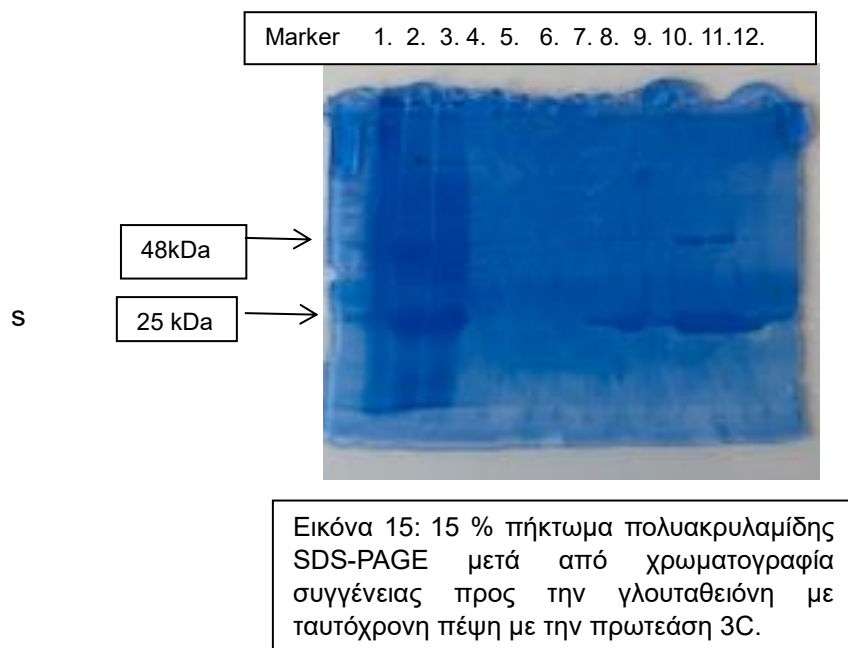
3.5.5 Χρωματογραφία συγγένειας με γλουταθειόνη - πέψη με precision protease 3C (Εικόνες 14, 15)

Κατά την χρωματογραφία συγγένειας με ταυτόχρονη πέψη με την precision protease 3C, το δείγμα επώαζεται μαζί με τη πρωτεάση στην στήλη για 16-18h. Μετά την επώαση, γίνεται πλύση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Σε αυτό το σημείο αναμένεται να αποδεσμευτεί η πρωτεΐνη από τη στήλη, εφόσον η πρωτεάση έχει επιδράσει. Ακολουθεί έκλυση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης , έτσι ώστε να αποδεσμευτεί η GST από την στήλη.



Στο κλάσμα 7 ξεκίνησε το ξέπλυμα της στήλης μετά την επώαση με την πρωτεάση. Η έντονη πτώση της ακτινοβολίας δείχνει πως γίνεται απομάκρυνση πρωτεΐνης από την στήλη. Στο κλάσμα 20 ξεκίνησε η έκλυση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης. Σε αυτό το σημείο απομακρύνεται η GST από την στήλη, αφού γίνεται αναίρεση της συγγένειας που εμφανίζουν λόγω προσθήκης της γλουταθειόνης.

Τα αποτελέσματα από την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση φαίνονται στην συνέχεια. Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 10μL.



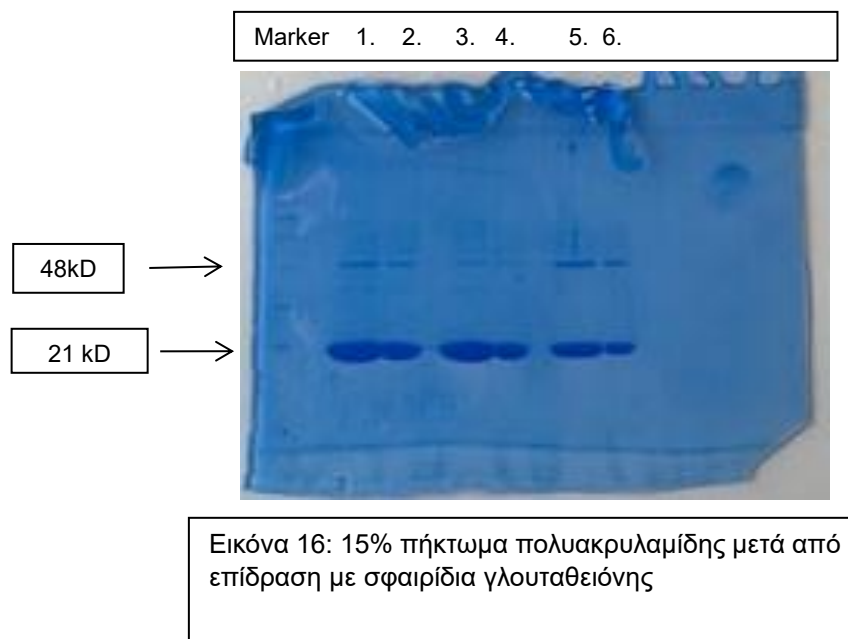
Η σειρά των δειγμάτων είναι η ακόλουθη:

1. Total
2. Input
3. 2 (πριν την προσθήκη 3C)
4. 7 (πριν την προσθήκη 3C)
5. 15 (πριν την προσθήκη 3C)
6. Κλάσμα 1 (μετά την προσθήκη 3C)
7. Κλάσμα 3 (μετά την προσθήκη 3C)
8. Κλάσμα 7 (μετά την προσθήκη 3C)
9. Κλάσμα 8 (μετά την προσθήκη 3C)
10. Κλάσμα 9 (μετά την προσθήκη 3C)
11. Κλάσμα 22 (μετά την προσθήκη 3C)
12. Κλάσμα 23 (μετά την προσθήκη 3C)

Από την ηλεκτροφόρηση παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος βρίσκεται στα δείγματα 9 και 10 (κλάσματα 7-9). Και σε αυτήν την περίπτωση διακρίνεται μία ποσότητα ενωμένης πρωτεΐνης ενδιαφέροντος - GST. Στα δείγματα 11 και 12

(κλάσματα 22 και 23) , τα οποία συλλέχθηκαν μετά την έκλουση με το διάλυμα γλουταθειόνης, εμφανίζεται να έχει συλλέγει η μεγαλύτερη ποσότητα τόσο της GST, όσο και της ενωμένης πρωτεΐνης ενδιαφέροντος - GST,

Ο καθαρισμός συνεχίστηκε με την προσθήκη του δείγματος σε στήλη των 10ml μαζί με σφαιρίδια γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση φαίνονται στην συνέχεια .(Εικόνα 14)



Η σειρά των δειγμάτων είναι η ακόλουθη. Κάθε δείγμα φορτώθηκε δύο φορές, από 10μL και 5μL αντίστοιχα.

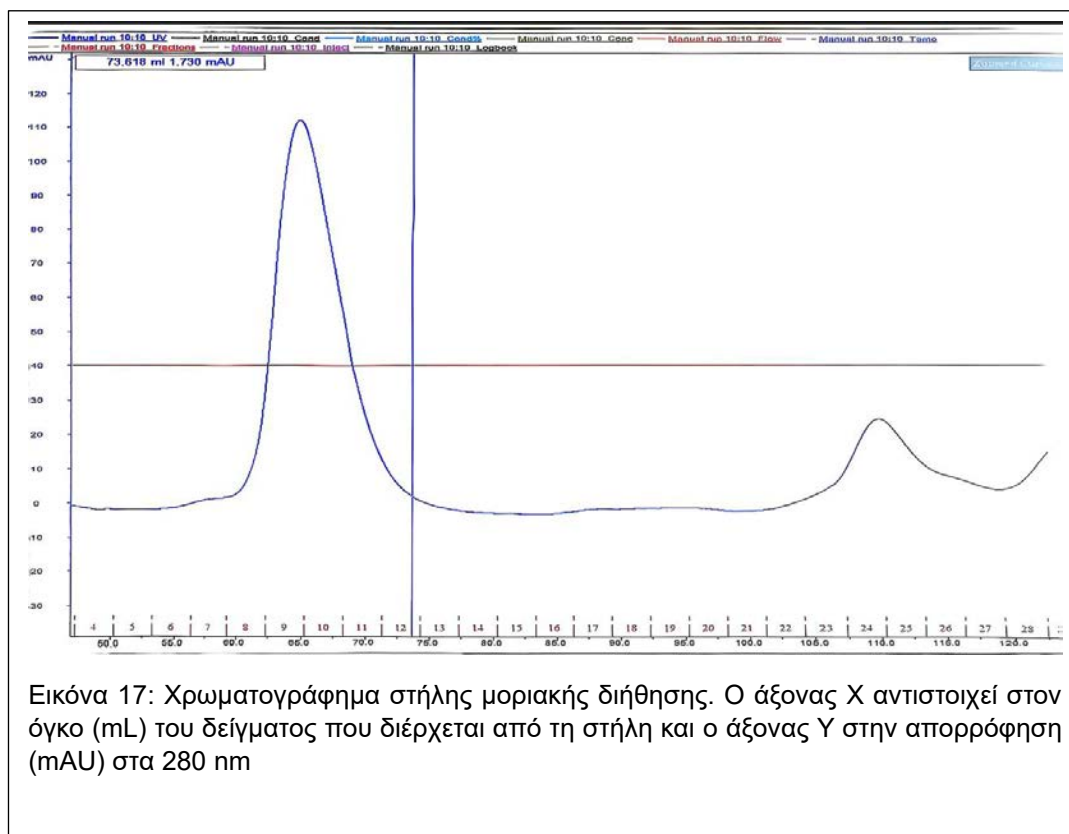
1. Δείγμα πριν την επίδραση με τα σφαιρίδια
2. Δείγμα πριν την επίδραση με τα σφαιρίδια
3. Δείγμα μετά την επίδραση με τα σφαιρίδια
4. Δείγμα πριν την επίδραση με τα σφαιρίδια
5. Δείγμα μετά την έκλουση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης
6. Δείγμα μετά την έκλουση της στήλης με διάλυμα γλουταθειόνης

Συγκρίνοντας τα δείγματα 3 και 4 με τα δείγματα 5 και 6 φαίνεται πως η επίδραση με τα σφαιρίδια απομάκρυνε επιτυχώς την μεγαλύτερη ποσότητα της ενωμένης πρωτεΐνης, το οποίο αποδεικνύει τη λειτουργικότητά τους και τη συγγένειά τους με την GST. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε στο nanodrop και ήταν 0,79 mg/ml. Ακολούθησε συμπύκνωση της πρωτεΐνης στο 1ml. Μετά τη συμπύκνωση η συγκέντρωσή της ήταν 4,15mg / ml.

3.5.6 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Εικόνες 17 και 18)

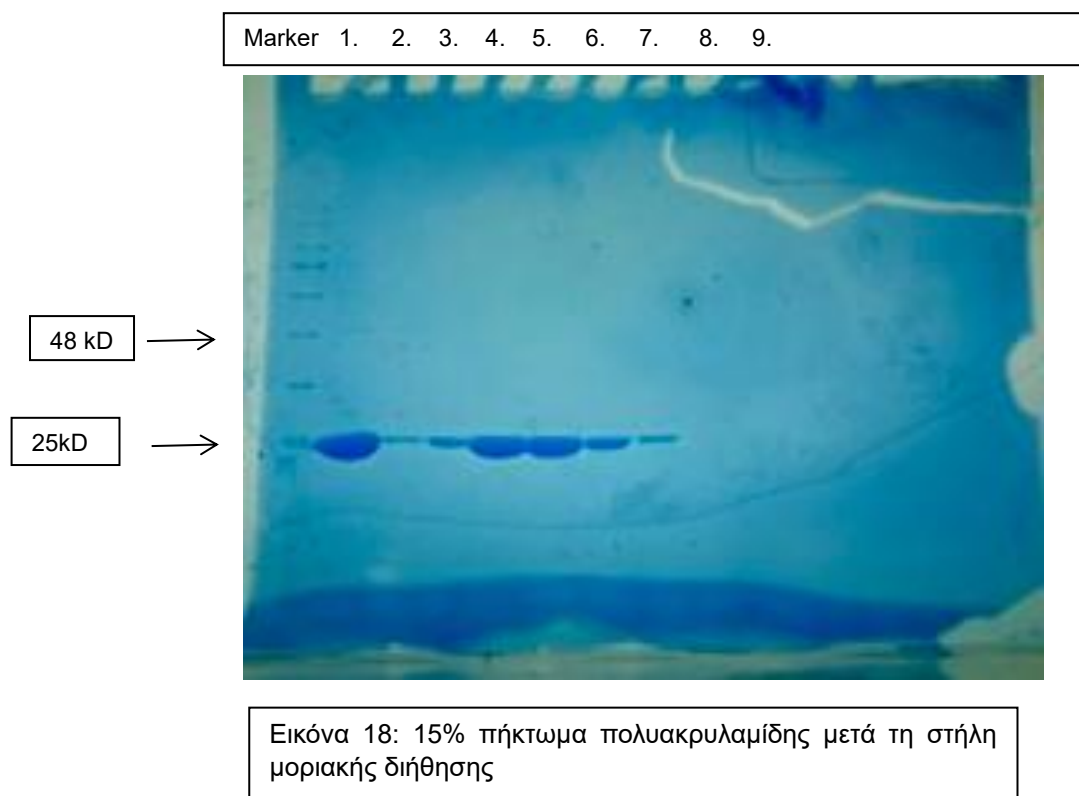
Τέλος, εφαρμόστηκε χρωμοφωτογραφία μοριακής διήθησης, με στόχο την απομάκρυνση της ενωμένης πρωτεΐνης που απομένει.

Στο χρωματογράφημα διακρίνονται δύο κορυφές, το οποίο σημαίνει πως από την στήλη απομακρύνθηκαν δύο πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους.



Στο χρωματογράφημα διακρίνονται δύο κορυφές, το οποίο σημαίνει πως από την στήλη απομακρύνθηκαν δύο πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους. Πρώτα, απομακρύνθηκε η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, όπως φαίνεται και από την έντονη αύξηση της ακτινοβολίας και έπειτα απομακρύνθηκε κάποια άλλη πρωτεΐνη με χαμηλότερο μοριακό βάρος από την πρωτεΐνη PYR1 (25kDa), η οποία δεν είχε γίνει διακριτή από τις αναλύσεις που είχαν προηγηθεί.

Παρακάτω φαίνεται και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:



Από κάθε δείγμα φορτώθηκαν 7 μ L. Η σειρά των δειγμάτων είναι η ακόλουθη:

1. Input
2. Κλάσμα 3
3. Κλάσμα 8
4. Κλάσμα 9
5. Κλάσμα 10
6. Κλάσμα 11
7. Κλάσμα 12
8. Κλάσμα 24
9. Κλάσμα 25

Όπως φαίνεται και από την ηλεκτροφόρηση, η συγκέντρωση τόσο της ενωμένης πρωτεΐνης, όσο και της νέας πρωτεϊνικής πρόσμιξης που έγινε αντιληπτή κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης, είναι παρά πολύ χαμηλή και μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα.

Μετά την ολοκλήρωση της χρωματογραφίας η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0,4 mg/ ml με συνολικό όγκο 9 ml. Επομένως, μετά τον καθαρισμό απομονώθηκαν συνολικά 3.5 mg πρωτεΐνης από ένα λίτρο καλλιέργειας κυττάρων.

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιική εργασία επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη ενός πειραματικού πρωτοκόλλου για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα PYR1 του αμψισικού οξέος από το είδος βαμβακιού *Gossypium hirsutum*. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, αφού μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων γεωργικών προϊόντων, τα οποία θα αυξάνουν την ανοχή των φυτών στην ξηρασία. Επιπροσθέτως, εξετάστηκαν πρωτόκολλα καθαρισμού, με στόχο την απομόνωση διαλυτής πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας (>90-95%).

Για την ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς στελέχη *Escherichia coli* BL21 Gold (DE3) λόγω την εύκολης κυτταρικής τους ανάπτυξης και των αυξημένων ποσοστών έκφρασης ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών που εμφανίζουν. Τα βακτήρια μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1, στον οποίο είχε ενσωματωθεί το γονίδιο του υποδοχέα PYR1. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με την προσθήκη IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Μελετήθηκαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων και συγκεντρώσεις επαγωγέα, προκειμένου να βρεθούν τα πειραματικά δεδομένα όπου παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές έκφρασης δείχνουν πως σε θερμοκρασία 18°C και συγκέντρωση IPTG 1mM σημειώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ετερόλογης έκφρασης. Παρόλα αυτά, παρατηρείται από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, ότι ποσοστό της πρωτεΐνης εκφράζεται στο κυτταρικό ίζημα. (Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.4, Εικόνα 6, Δείγματα 8 και 9). Επομένως, η προσθήκη της ετικέτας GST ήταν σημαντική, καθώς αυξάνει την απόδοση της έκφρασης σε διαλυτή πρωτεΐνη.

Από τα αποτελέσματα των πρωτοκόλλων καθαρισμού που εφαρμόστηκαν φαίνεται ότι το πρωτόκολλο καθαρισμού που περιλάμβανε χρωματογραφία συγγένειας με ταυτόχρονη πέψη με την πρωτεάση 3C, καθαρισμό με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης και χρωματογραφία μοριακής διήθησης, απέδωσε μεγαλύτερη ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης. Η χρωματογραφία συγγένειας με ταυτόχρονη πέψη οδήγησε στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση της ετικέτας GST. Για μελλοντική βελτίωση του πρωτοκόλλου αυτού προτείνεται η αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεάσης ή του χρόνου επώασης, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος που παραμένει ενωμένη με την ετικέτα και απομακρύνεται κατά την έκλυση. (Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.5.5 Εικόνες 14 και 15). Επιπλέον, οι επαναληπτικές αφαιρετικές στήλες συγγένειας προς την γλουταθειόνη με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης συνέβαλαν στην απομάκρυνση της υπολείπουσας ποσότητας GST. Η τελική χρωματογραφία μοριακής διήθησης που εκτελέστηκε βοήθησε στην απομάκρυνση άλλων τυχών προσμίξεων (Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.5.6, Εικόνες 17 και 18), αυξάνοντας σημαντικά με αυτόν τον τρόπο την καθαρότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής δεν είναι αποτελεσματική για την απομόνωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, καθώς η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και η GST έχουν πέρα από παρόμοιο μοριακό βάρος και παρόμοιο ισοηλεκτρικό σημείο. (Αποτελέσματα, Κεφάλαιο 3.5.3 Εικόνες 11 και 12).

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας αναδύεται το συμπέρασμα πως, παρόλο που η ετικέτα GST βοήθησε κατά την ετερόλογη έκφραση, αυξάνοντας την διαλυτότητα της πρωτεΐνης, οι δομικές και φυσικοχημικές της ομοιότητες με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος δυσκολεύουν την διαδικασία καθαρισμού. Για αυτόν τον λόγο χρειάστηκαν επαναληπτικές αφαιρετικές χρωματογραφίες, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός καθαρότητας.

Συνεπώς, προτείνεται μελλοντικά η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα PYR1 σε έναν διαφορετικό φορέα έκφρασης με διαφορετική ετικέτα. Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό του φορέα ετερόλογης έκφρασης εισήχθησαν θέσης περιοριστικών ενζύμων, συγκεκριμένα BamHI στο αμινοτελικό άκρο και XhoI στο καρβοξυτελικό άκρο, οι οποίες καθιστούν εφικτή την υποκλωνοποίηση του γονιδίου σε έναν διαφορετικό φορέα έκφρασης που φέρει άλλη ετικέτα, όπως παραδείγματος χάριν οι φορείς του συστήματος pET.

5. Βιβλιογραφία

- Ahluwalia, O., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. In *Resources, Environment and Sustainability* (Vol. 5). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032>
- Ahmad, Parvaiz & Majeti, Prasad. (2012). Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. 10.1007/978-1-4614-0815-4.
- Batley, G. E., & Apte, S. C. (n.d.). *Waters, Sediments, and Soils*.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. In *Journal of Industrial Microbiology* (Vol. 16). <https://academic.oup.com/jimb/article/16/3/145/5988682>
- Dorosh, L., Kharenko, O. A., Rajagopalan, N., Loewen, M. C., & Stepanova, M. (2013). Molecular Mechanisms in the Activation of Absciscic Acid Receptor PYR1. *PLoS Computational Biology*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003114>
- Edward Zhou, X., Soon, F. F., Ng, L. M., Kovach, A., Suino-Powell, K. M., Li, J., Yong, E. L., Zhu, J. K., Eric Xu, H., & Melcher, K. (2012). Catalytic mechanism and kinase interactions of ABA-signaling PP2C phosphatases. *Plant Signaling and Behavior*, 7(5). <https://doi.org/10.4161/psb.19694>
- Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. (n.d.).
- GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. (2025). *Ion exchange chromatography: A comprehensive review*. <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/sites/default/files/GSCBPS-2025-0127.pdf>
- Finkelstein, R. (2013). Absciscic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Huang, S., Waadt, R., Nuhkat, M., Kollist, H., Hedrich, R., & Roelfsema, M. R. G. (2019). Calcium signals in guard cells enhance the efficiency by which absciscic acid triggers stomatal closure. *New Phytologist*, 224(1), 177–187. <https://doi.org/10.1111/nph.15985>
- Jeong, H., Kim, H. J., & Lee, S. J. (2016). Complete genome sequence of Escherichia coli strain BL21. *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00134-15>
- Kennell, D., & Riezma, H. (1977). Transcription and Translation Initiation Frequencies of the Escherichia coli lac Operon. In *J. Mol. Biol* (Vol. 114).
- Koyro, H. W., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: An overview. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (pp. 1–28). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_1

- Lee, S. C., & Luan, S. (2012a). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 35, Issue 1, pp. 53–60). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x>
- Lee, S. C., & Luan, S. (2012b). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 35, Issue 1, pp. 53–60). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x>
- Maszkowska, J., Szymańska, K. P., Kasztelan, A., Krzywińska, E., Sztatelman, O., & Dobrowolska, G. (2021). The multifaceted regulation of SnRK2 kinases. In *Cells* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10092180>
- Min, M. K., Kim, R., Moon, S. J., Lee, Y., Han, S., Lee, S., & Kim, B. G. (2020). Selection and functional identification of a synthetic partial ABA agonist, S7. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56343-9>
- Microbe Notes. (n.d.). *Lac operon – Definition, structure, Inducers, diagram*. 2022 <https://microbenotes.com/lac-operon/>
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., & Schroeder, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 28, pp. 154–162). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.010>
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E. (2014). Abscisic acid perception and signaling: Structural mechanisms and applications. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 35, Issue 5, pp. 567–584). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.5>
- Nix, A., Paull, C., & Colgrave, M. (2017). Flavonoid profile of the cotton plant, *Gossypium hirsutum*: A review. In *Plants* (Vol. 6, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants6040043>
- O'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2011). Gel-filtration chromatography. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 681, pp. 25–33). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_2
- Okamoto, M., Peterson, F. C., Defries, A., Park, S. Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B. F., & Cutler, S. R. (2013). Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12132–12137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305919110>
- Pandey, G. K. (2020). Protein Phosphatases and Stress Management in Plants: Functional Genomic Perspective. In *Protein Phosphatases and Stress Management in Plants: Functional Genomic Perspective*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48733-1>
- Peppi, M. C., Retamales, J., Cecilia Peppi, M., & Retamales, J. (2010). ABA EFFECT ON TABLE GRAPE COLOR DEVELOPMENT IN THE CENTRAL REGION OF CHILE. <https://www.researchgate.net/publication/288881060>
- Pouresmaeil, M., & Azizi-Dargahlou, S. (2023a). Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. *Archives of Microbiology*, 205(5). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03541-9>

- Rehman, A., & Farooq, M. (2019). Morphology, Physiology and Ecology of Cotton. In *Cotton Production* (pp. 23–46). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119385523.ch2>
- Saleem, M. S., Khan, S. H., Ahmad, A., Rana, I. A., Naveed, Z. A., & Khan, A. I. (2024). The 4Fs of cotton: genome editing of cotton for fiber, food, feed, and fuel to achieve zero hunger. In *Frontiers in Genome Editing* (Vol. 6). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2024.1401088>
- Schäfer, F., Seip, N., Maertens, B., Block, H., & Kubicek, J. (2015). Purification of GST-Tagged Proteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 559, pp. 127–139). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.005>
- Simas, R. G., Pessoa Junior, A., & Long, P. F. (2023). Mechanistic aspects of IPTG (isopropylthio- β -galactoside) transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* - a rate limiting step in the induction of recombinant protein expression. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 50(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad034>
- Smith, D. B., Johnsonb, K. S., & Australia, (. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. In *Gene* (Vol. 67).
- Studier, F. W., & Moffattf, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. In *J. MoZ. Biol* (Vol. 189).
- Tarek A. Fayed Chromatographic Methods of Analysis <https://sci.tanta.edu.eg/files/Chrom-lect%206-Gel.pdf>
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: Sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology*, 51(11), 1821–1839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq156>
- Wang, K., Wendel, J. F., & Hua, J. (2018). Designations for individual genomes and chromosomes in *Gossypium*. In *Journal of Cotton Research* (Vol. 1, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42397-018-0002-1>
- Yang, Z., Qanmber, G., Wang, Z., Yang, Z., & Li, F. (2020). *Gossypium* Genomics: Trends, Scope, and Utilization for Cotton Improvement. In *Trends in Plant Science* (Vol. 25, Issue 5, pp. 488–500). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.12.011>
- Yigzaw, Y., Hinckley, P., Hewig, A., & Vedantham, G. (2009). Ion Exchange Chromatography of Proteins and Clearance of Aggregates. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4), 421–426. <https://doi.org/10.2174/138920109788488842>
- Yu J, Jung S, Cheng CH, Ficklin SP, Lee T, Zheng P, Jones D, Percy RG, Main D. (2013) CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research. doi: 10.1093/nar/gkt1064.
- Zhang, G., Lu, T., Miao, W., Sun, L., Tian, M., Wang, J., & Hao, F. (2018). Genome-wide identification of ABA receptor PYL family and expression analysis of PYLs in response to ABA and osmotic stress in *Gossypium*. *BMC Genomics*, 19(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4382-3>