

Τριμελής επιτροπή:

Κοντού Μαρία (επιβλέπουσα): Επίκουρος καθηγήτρια τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Λεωνίδας Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια καθηγήτρια τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες:

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέλαβαν στη διεκπεραίωση της. Κατά κύριο λόγο, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια Κοντού Μαρία για την εμπιστοσύνη που εξέφρασε ως προς το πρόσωπο μου δίνοντας μου την δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο. Την ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την απρόσκοπτη υποστήριξη και καθοδήγηση της οποιαδήποτε στιγμή και αν κρίθηκε απαραίτητη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους επιβλέποντες Αναπληρωτές Καθηγητές Λεωνίδα Δημήτριο και Παπαδοπούλου Καλλιόπη για το αμείωτο ενδιαφέρον και την συμπαράσταση τους καθώς και για τις πολύτιμες ώρες που αφιέρωσαν για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Τσίκου Δανιέλα μέλος του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τις γνώσεις που μου προσέφερε καθώς και για τις υποδείξεις της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον τη Καντσάδη Αναστασία, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τον μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Στραβοδήμο Γεώργιο και την Ρουσίδου Κωνσταντίνα, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη συνεργασία μαζί τους καθότι υπήρξε μοναδική διδακτική εμπειρία σε ένα φιλικό κλίμα γεμάτο θετική ενέργεια. Ευχαριστώ επίσης το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στερήσεις, στηρίζει τις προσπάθειές μου καθ' όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα εικόνων:.....	5
Περιεχόμενα πινάκων και διαγραμμάτων.....	6
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ:	7
1.1 ABSTRACT	8
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2.1 Μύκητες	9
2.2 Φυτοπαθογόνοι μύκητες.....	12
2.3 Είσοδος στον ξενιστή.....	13
2.4.Μηχανισμοί άμυνας φυτικών οργανισμών.....	14
2.5.Θεμελιώδης άμυνα.....	15
2.6. Επαγόμενη άμυνα	17
2.7.Επαγόμενη προστασία μέσω του <i>Fusarium solani</i> (FsK)	18
2.8.Σαπωνίνες-τοματίνη.....	20
2.9.Γλυκοσιδάσες	22
2.10.Τοματινάση.....	24
2.11.Αρχές ενζυμικής κινητικής.....	26
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
4.1. Κλωνοποίηση γονιδίου τοματινάσης σε φορέα κλωνοποίησης	30
4.1.1 Ενίσχυση γονιδίου τοματινάσης μέσω PCR.....	30
4.1.2 Ηλεκτροφόρηση αгарόζης των προϊόντων της PCR.....	31
4.1.3 Ανάκτηση DNA έπειτα από ηλεκτροφόρηση.....	32
4.1.4 Δημιουργία κατάλληλων άκρων στο γονίδιο και στο πλασμίδιο	33
4.1.5 Ligation	34
4.2. Μετασχηματισμός <i>E.coli</i> με τον φορέα	34
4.3. Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων και υπερέκφραση της τοματινάσης	37
4.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	39
4.5 Καθαρισμός τοματινάσης με τη βοήθεια στήλης	45
4.6. Απομόνωση τοματινάσης του μύκητα <i>fusarium solani</i>	47
4.7. Μέθοδος Bradford.....	47
4.8. Καθαρισμός ενζύμου μέσω διαπίδυσης	49
4.9 TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας).....	50

4.10. Tomatinase activity assay με DNS.....	52
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
5.1 Αλληλούχιση γονιδίου τοματινάσης.....	54
5.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	54
5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έπειτα από υπερέκφραση	55
5.4 Καθαρισμός τοματινάσης με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου	60
5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έπειτα από καθαρισμό με στήλη.....	60
5.6 Πρότυπη καμπύλη Bradford.....	63
5.7 TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας).....	63
5.8 Πρότυπη καμπύλη DNS με γλυκόζη	66
5.9 Κινητική μελέτη τοματινάσης	67
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

Περιεχόμενα εικόνων:

Εικόνα 1: Προσβεβλημένο φυτό από μύκητα

Εικόνα 2: Σκληρώτιο πάνω σε καλαμπόκι.

Εικόνα 3: διαδικασία μόλυνσης μέσω απρεσορίου

Εικόνα 4: *Fusarium solani*.

Εικόνα 5: Βιοσύνθεση σαπωνινών

Εικόνα 6 : Δομή τοματίνης.

Εικόνα 7: Μηχανισμός διατήρησης..

Εικόνα 8 : Μηχανισμός αναστροφής..

Εικόνα 9 : Υδρόλυση της α-τοματίνης από την τοματινάση.

Εικόνα 10 : Δομή τοματιδίνης.

Εικόνα 11: Διάγραμμα Michaelis-Menten

Εικόνα 12: Διαδικασία χημικού μετασχηματισμού

Εικόνα 13: Σύστημα ηλεκτροδιάτρησης

Εικόνα 14: Γενική αρχή ηλεκτροδιάτρησης

Εικόνα 15: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Εικόνα 16: μηχανήμα FPLC

Εικόνα 17: Διαδικασία καθαρισμού μέσω στήλης

Εικόνα 18: Διαμόρφωση ενός Bead

Εικόνα 19: Αρχή μεθόδου Bradford

Εικόνα 20 : Μέθοδος διαχωρισμού με διαπίδυση. Πορώδης μεμβράνη με διάλυμα της προς απομάκρυνση ουσίας βυθίζεται σε καθαρό διαλύτη: (α) πριν και (β) μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας.

Εικόνα 21 : Τεχνική TLC.

Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση έπειτα από PCR

Εικόνες 23-30: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

Εικόνα 31: Απομόνωση τοματινάσης με FPLC

Εικόνα 32: SDS-PAGE μετά από FPLC. Silver staining

Εικόνες 33 & 34: SDS-PAGE μετά από FPLC

Εικόνα 35: SDS-PAGE μετά από απομόνωση με beads

Εικόνες 36 & 37: Αποτελέσματα TLC

Περιεχόμενα πινάκων και διαγραμμάτων

Πίνακας 1: Ταξινόμηση *Fusarium solani*.

Πίνακας 2: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 4: Αντίδραση PCR

Πίνακας 5: Αντίδραση πέψης

Πίνακας 6: Αντίδραση Ligation

Πίνακας 7: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων στη μέθοδο Bradford

Πίνακας 8: Πρότυπη καμπύλη DNS

Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford

Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη DNS

Διάγραμμα 3: Δημιουργία β-λυκοτετραόζης ανάλογα με τη συγκέντρωση τοματίνης

Διάγραμμα 4: Καμπύλη Michaelis-Menten

Διάγραμμα 5: Διάγραμμα Lineweaver-Burk

1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Ο *Fusarium solani* *FsK* είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων, εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εποικήσει το ριζικό σύστημα της ντοματιάς, και αναλυτικότερα αναπτύσσεται ενδοφυτικά, εντός του αγωγού συστήματος. Η συμβίωση του μύκητα με το φυτό προσφέρει προστασία έναντι στον φυτοπαθογόνο μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*, και τον ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radicum lycopersici* (Karvoulakis et al, 2007).

Αυτή η επίδραση του μύκητα σχετίζεται με το αιθυλένιο και όχι το γιασμονικό οξύ καθώς σε μεταλλάγματα για το σηματοδοτικό μονοπάτι του αιθυλενίου ο μύκητας δεν είχε επίδραση, ενώ αυτά με μεταλλάξεις για το γιασμονικό προστατεύτηκαν αποτελεσματικά.

Η ικανότητα του *Fusarium solani* να επιζεί εντός της ντοματιάς προϋποθέτει την παράκαμψη της θεμελιώδους άμυνας του φυτού και κυρίως μιας σαπωνίνης, της α-τοματίνης. Πρόκειται για παράγωγο τριτερπενίων, που αποτελείται από μια αγλυκόνη (στρεοειδές γλυκοαλκαλοειδές) και ένα τετρασακχαρίδιο, την β-γλυκοτετραόζη. Έχει αντιμικροβιακή δράση και βρίσκεται τόσο σε υπέργειους όσο και σε υπόγειους ιστούς της ντομάτας. Ο μύκητας διαθέτει ένα ένζυμο με ικανότητα αποτοξικοποίησης της τοματίνης, την τοματινάση.

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια απομόνωσης της τοματινάσης από καλλιέργεια μύκητα, καθώς και από βακτήρια έπειτα από μετασχηματισμό τους με το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο. Σκοπός ήταν ο καθαρισμός με τη βοήθεια στήλης ώστε να γίνει κινητική μελέτη του ενζύμου με απώτερο στόχο τη μελέτη της δομής του μέσω κρυσταλλογραφίας. Η καλλιέργεια μύκητα έδωσε πολύ μικρή ποσότητα τοματινάσης. Αντίθετα, στις βακτηριακές καλλιέργειες επετεύχθη υπερέκφραση, ωστόσο, σχεδόν όλο το ένζυμο βρισκόταν με τη μορφή των inclusion bodies. Γι αυτό έγιναν πολλές αλλαγές στο πρωτόκολλο ώστε να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε η πρωτεΐνη να είναι διαλυτή.

Εν τέλει δεν επετεύχθη καθαρισμός, ωστόσο έγινε κινητική μελέτη σε μη καθαρό δείγμα με τη μέθοδο DNS, η οποία έδωσε τιμή $K_m = 1,48 \text{mM}$ και $V_{max} = 0,0255 \text{mM/min}$

1.1 ABSTRACT

Fusarium solani strain *FsK* is a non-pathogenic filamentous fungus belonging to the Ascomycota Phylum. It is a soil fungus that has the ability to interact with plants. Specifically, it has been shown to colonize the tomato root system, as an endophyte, in the vascular system. The symbiosis of the fungus with the plant provides protection against phytopathogenic fungi like *Septoria lycopersici* (a foliar pathogen), and *Fusarium oxysporum radicum-lycopersici*, a root-pathogenic fungus (Karvoulakis et al, 2007).

This protective effect is associated with ethylene and not Jasmonic acid (JA) as the fungus had no effect in tomato plants with mutations in the ethylene signaling pathway, while those with mutations in JA pathway were effectively protected.

In order to survive inside the tomato plant, *Fusarium solani* has to bypass the first barrier defense of the plant and mainly a saponin named alpha-tomatine. It is a triterpene derivative, consisting of an aglycone (steroid glycoalkaloid) and a tetrasaccharide, β -lycotetraose. Alpha-tomatine displays substantial antimicrobial activity and can be found in both above-ground and underground tissues of tomato plants. *Fusarium solani* possesses an enzyme capable of detoxifying α -tomatine, called tomatinase.

In this paper we attempted to isolate tomatinase from both the fungus and overexpressing bacteria cultures (following their transformation with the tomatinase gene). Our object was to purify the enzyme using chromatographic techniques, in order to study its kinetics while our ultimate goal was to determine its structure using X-ray crystallography. The fungal culture showed low yield of tomatinase expression. On the contrary, the bacterial cultures overexpressed the protein, however, most of it was in inclusion bodies. Therefore, a number of amendments in the protocol were attempted in order to optimize the conditions, so that the protein could be expressed as, soluble monomers and not as insoluble misfolded aggregates.

As we couldn't purify the protein we performed a kinetics study in an unpurified sample, using the DNS method, which resulted in a K_m value of 1,48mM and a $V_{max} = 0,0255\text{mM/min}$

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, αχλωρόφυλλοι μικροοργανισμοί, μονοκύτταροι ή μυκηλιακοί (πολυκύτταροι). Εκτιμάται ότι υπάρχουν από 1,5 έως και 5 εκατομμύρια είδη μυκήτων στον πλανήτη. Εξ αυτών έχουν χαρακτηριστεί μόλις 70.000 είδη που χωρίζονται στα εξής φύλλα:

- 1) Βασιδιομύκητες
- 2) Ασκομύκητες
- 3) Χυτριομύκητες (Chytridiomycota)
- 4) Μικροσπορίδια
- 5) Γκλομερομύκητες (Glomeromycota)
- 6) Βλαστοκλαδιομύκητες (Blastocladiomycota) και
- 7) Νεοκαλλιμαστιγομύκητες (Neocallimastigomycota)

Όλα τα είδη των μυκήτων αποτελούνται από το σώμα (που ονομάζεται και θαλλός) το οποίο περιβάλλεται από το κυτταρικό τοίχωμα. Αυτό αποτελείται από χιτίνη, β-γλυκάνες και κυτταρίνη. Βασική δομική μονάδα των μυκηλιακών μυκήτων είναι η υφή. Οι υφές αναπτύσσονται γραμμικά, σε μια κατεύθυνση, με την προσθήκη νέων υλικών στις άκρες τους και όχι σε όλο τους το μήκος. Το σύνολο των υφών αποτελεί το μυκήλιο. Οι υφές μπορεί να διαχωρίζονται σε διαμερίσματα μέσω διαφραγμάτων (septa), τα οποία μπορεί να είναι απλά διαφράγματα που επιτρέπουν τη μετακίνηση όλων των οργανιδίων ή δολιπόρα διαφράγματα, με πολύπλοκη δομή που επιτρέπουν το πέρασμα όλων των οργανιδίων εκτός των πυρήνων. Επίσης, υπάρχουν υφές που δεν φέρουν καθόλου διαφράγματα, σχηματίζοντας ένα κοινοκύτταρο μυκήλιο. Στους μύκητες συναντώνται τυπικά οργανίδια όπως ο πυρήνας (αρκετά μικρότερος από αυτούς των φυτικών και ζωικών κυττάρων), μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, πλαστίδια και χυμοτόπια.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αναπαραγωγής των μυκήτων. Οι δυο κύριες κατηγορίες αναπαραγωγής είναι η αγενής και η εγγενής αναπαραγωγή. Η αγενής περιλαμβάνει τους εξής τρόπους:

- A) θρυμματισμός του θαλλού έτσι ώστε κάθε θρύμμα να δώσει ένα νέο θαλλό
- B) σχάση σωματικών κυττάρων οπότε κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα δίνει ένα νέο θαλλό

Γ) εκβλάστηση σωματικών κυττάρων και

Δ) παραγωγή σπορίων (κονίδια)

Η εγγενής αναπαραγωγή αποτελείται από τρία στάδια:

- 1) Πλασμογαμία, δηλαδή την ένωση δυο συμβατών γαμετικών κυττάρων σε ένα, έτσι ώστε οι δύο πυρήνες να βρεθούν στο ίδιο κυτταρόπλασμα
- 2) Καρυογαμία, που είναι η ένωση δυο συμβατών πυρήνων και ο σχηματισμός διπλοειδούς ζυγωτού κυττάρου και
- 3) Μείωση

. Οι μύκητες εμφανίζουν τεράστια ποικιλία και αναπτύσσονται σε πολλά διαφορετικά υποστρώματα. Οι περισσότεροι βρίσκονται στο έδαφος ή στα φυτά και τρέφονται από οργανικά συστατικά των ζώντων ή νεκρών οργανισμών. Για το λόγο αυτό θεωρούνται και εκ των βασικών αποικοδομητών οργανικής ύλης στο περιβάλλον.

Τα είδη, αλλά και ο πληθυσμός που συναντώνται στο έδαφος, καθορίζονται κυρίως από τον αερισμό, την υγρασία, το pH, τη θερμοκρασία αλλά και την οργανική ουσία που παρέχεται για την ανάπτυξή τους. Σε όλα τα εδάφη υπάρχουν όλες σχεδόν οι τάξεις των μυκήτων. Συνήθως είναι αερόβιοι οργανισμοί, εκτός από μερικές ζύμες που είναι προαιρετικά αναερόβιες, και μπορούν να παράγουν ενέργεια και μέσω αναερόβιων ζυμώσεων. Σε κάποιους από τους κατώτερους μύκητες δε διακρίνεται κυτταρικό τοίχωμα σε όλη ή σε ένα μέρος της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου.

Ανάλυση της αλληλουχίας του 18S rRNA και άλλων 25 πρωτεϊνών έδειξε ότι οι μύκητες είναι περισσότερο συγγενικοί με τα ζώα παρά με φυτά, γεγονός που υποστηρίζεται από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους (Baldauf and al 1993). Οι μύκητες και τα ζώα χρησιμοποιούν χιτίνη, γλυκογόνο και τρεχαλόζη, ουσίες που απουσιάζουν από τα φυτά τα οποία χρησιμοποιούν αντίστοιχα κυτταρίνη, άμυλο και σακχαρόζη (Wessels et al 1999).

Πάνω από το 25% των γνωστών ασκομυκήτων συμμετέχουν σε ένα γνωστό συμβιωτικό φαινόμενο με τα κυανοπράσινα φύκη, που οδηγεί στο σχηματισμό των λειχήνων. Στην φύση το 95% των φυτών συμβιώνει με μύκητες στο ριζικό τους σύστημα, σχηματίζοντας μια δομή που είναι γνωστή ως μυκόρριζα. Πέρα από την συγγένεια και τις συμβιωτικές σχέσεις, όσον αφορά τα ζώα, τα φυτά και άλλους

μικροοργανισμούς, οι μύκητες λειτουργούν ή δρουν ανταγωνιστικά, σαπροφυτικά, παρασιτικά και συχνά μολυσματικά.

Ένζυμα όπως γλυκοαμυλάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, οργανικές ενώσεις όπως το κιτρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η αιθανόλη, η ακετόνη κτλ, αντιβιοτικά, εμβόλια και φάρμακα αποτελούν προϊόντα των μυκήτων. Επίσης οι μύκητες συμμετέχουν στις διαδικασίες παράγωγης ψωμιού, μπύρας, κρασιού, γιαουρτιού και τυριών. Παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αποσύνθεση φυτικών κυρίως οργανικών υπολειμμάτων και συμβάλουν στην διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Η βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση οδήγησε στην παραγωγή αλκοόλης, και διάφορων πρωτεϊνών για ζωοτροφές. Παράλληλα, αρκετά παράγωγά τους χρησιμοποιούνται και ως ανθρώπινη τροφή, ενώ έχουν απομονωθεί και πρωτεΐνες υψηλής ιατροφαρμακευτικής αξίας. Έχουν εντοπιστεί αρκετά παθογόνα στελέχη μυκήτων για τα φυτά (πάνω από 5.000), για τα ζώα και για τον άνθρωπο. Πολλοί μύκητες παράγουν τοξίνες (αφλατοξίνη, ωχρατοξίνη κτλ) που ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις, βλάβες στο ήπαρ και στους νεφρούς και μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Κάποιοι άλλοι μύκητες έχουν παραισθησιογόνα δράση.

Η ικανότητα των μυκήτων να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂, έχει ως αποτέλεσμα την κατακόρυφη διανομή τους στο έδαφος. Περιορισμένες είναι οι γνώσεις μας σχετικά την πληθυσμιακή τους δυναμική, με την κοινοτική τους δομή και την ποικιλότητα. Ο χρόνος ζωής των μυκήτων ποικίλει ανάλογα με τον ελεύθερο χώρο που διαθέτουν για να αναπτυχθούν καθώς και τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά. Η πλειονότητα όμως της ενεργούς μυκητοχλωρίδας εντοπίζεται στους ατελείς μύκητες και συγκεκριμένα στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Cladosporium* και *Fusarium* και στους φυκομύκητες *Mucor*, *Rhizopus* και *Mortierella*. Η σύνθεση των μυκήτων στο έδαφος, ελέγχεται από την ποσότητα και τη μορφή του άνθρακα. Έτσι, τα *Penicillia*, σε γενικές γραμμές, αποικοδομούν κυτταρίνη και ξυλάνες, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των *Mucorales*, τα οποία αποικοδομούν πρωτεΐνες, αυξάνεται με την εντατικοποίηση της διαδικασίας της αποσύνθεσης και της ανοργανοποίησης στο έδαφος. Ο *Mucor hiemalis f. hiemalis*, εξαιτίας της ταχύτητας ανάπτυξης του, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς μύκητες του εδάφους, γι αυτό και αποτελεί τον αντιπροσωπευτικό μύκητα της οικογένειας *Mucorales* (*Zygomycotina*).

2.2 Φυτοπαθογόνοι μύκητες

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες, αν και αποτελούν τη μειοψηφία των μυκήτων, είναι σε θέση να προκαλέσουν ολικές καταστροφές στα φυτά. Η προσβολή του ξενιστή εξαρτάται από τους τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ευπάθεια του φυτού. Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες εισέρχονται στον ξενιστή είτε με ένα συνδυασμό μηχανικής πίεσης και ενζυμικής δράσης σχηματίζοντας ειδικές δομές (τα απρεσσόρια), είτε από τα στόματα των φυτών (παράσιτα αδυναμίας) ή από τραυματισμό του φυτού. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 6.500 είδη μυκήτων που είναι υποχρεωτικά παράσιτα των ανώτερων φυτών. Τα μη υποχρεωτικά παράσιτα είναι πολύ περισσότερα. Ένα μόνο γένος των Αδηλομυκήτων, το γένος *Cercosora*, διαθέτει 1200 παρασιτικά είδη.

Η ευαισθησία, η ανεκτικότητα ή η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα στελέχη συνιστά συνεξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών στην ενδογενή άμυνα του φυτού, ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση. Η παρουσία άλλων, μη παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί επίσης να επηρεάσει τη διαδικασία μόλυνσης, εμποδίζοντας τους παθογόνους μύκητες. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω της παραγωγής προϊόντων που είναι τοξικά για τα παθογόνα στελέχη, την αδρανοποίηση τοξινών, τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία, καθώς και την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού (ISR) όπως θα δούμε και παρακάτω.



Εικόνα 1: Προσβεβλημένο φυτό από μύκητα.

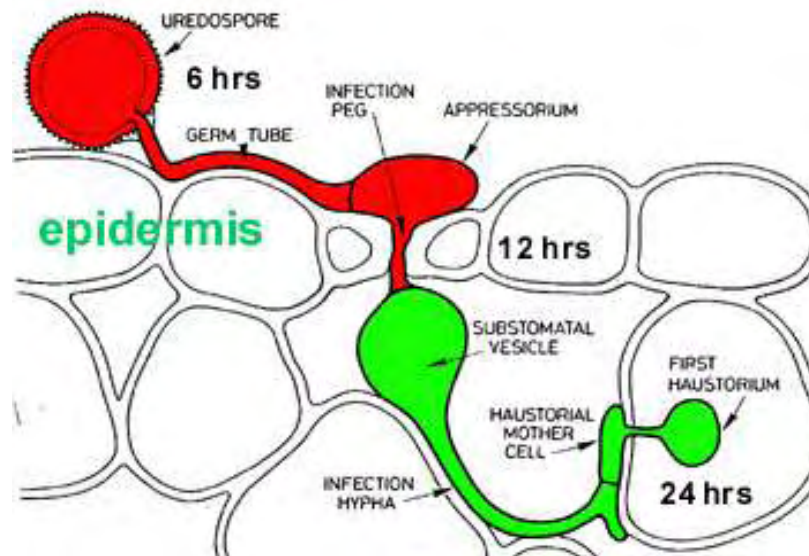
2.3 Είσοδος στον ξενιστή

Οι πρωτογενείς μολύνσεις στα καλλιεργούμενα φυτά δημιουργούνται από υπάρχοντα σκληρώτια στο έδαφος. Τα σκληρώτια είναι μαύρα ακανόνιστα αναπαραγωγικά σωματίδια, μέσω των οποίων επιβιώνει ο μύκητας στο έδαφος για πολλά χρόνια. Τα σκληρώτια είναι βλαστικές δομές που έχουν σχηματιστεί από μια πυκνή μάζα μυκηλίου, η οποία καλύπτεται και προστατεύεται από ένα στρώμα διαφοροποιημένων κυττάρων που αποτελούν το φλοιό. Έχει υπολογιστεί ότι το 90% του κύκλου ζωής του μύκητα είναι υπό μορφή σκληρωτίου στο έδαφος (Adams et al 1979).



Εικόνα 2: Σκληρώτιο πάνω σε καλαμπόκι.

Τα σκληρώτια βλαστάνουν είτε μυκηλιογενώς και μολύνουν τις ρίζες, τους βλαστούς ή τα φύλλα που βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος, είτε καρπογενώς παράγοντας αποθήκια και ελευθερώνοντας ασκοσπόρια, τα οποία μολύνουν το βλαστό, τα άνθη και τα φύλλα. Πολλές φορές η βλάστηση των σκληρωτίων μπορεί να γίνει και με τους δυο τρόπους. Στην εδαφογραμμή οι μολύνσεις γίνονται είτε με τα ασκοσπόρια είτε με το μυκήλιο (Adams et al 1979).



Εικόνα 3: διαδικασία μόλυνσης μέσω απρεσσορίου

Μηχανικά τραύματα και τραυματισμοί από έντομα σε λαχανικά παρέχουν θέσεις εισόδου για το μύκητα. Η προσβεβλημένη περιοχή αποκτά πράσινο βαθύ χρώμα ή υδατώδη εμφάνιση και λίγο αργότερα κιτρινίζει. Ακολούθως εμφανίζει λευκό βαμβακώδες μυκήλιο που εξαπλώνεται στα υγιή σημεία του φυτού (Dillard et al 1995).

2.4.Μηχανισμοί άμυνας φυτικών οργανισμών

Στα φυσικά οικοσυστήματα τα φυτά βρίσκονται συνεχώς σε επαφή με ένα εχθρικό βιοτικό περιβάλλον. Βακτήρια, ιοί, μύκητες, νηματώδεις, ακάρεα, έντομα, φυτοφάγα ζώα ακόμα και οι άνθρωποι συγκροτούν ένα μακρύ κατάλογο απειλητικών για την επιβίωση εχθρών. Δεδομένου ότι τα φυτά αδυνατούν να αντεπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος με τη φυγή, αναγκάστηκαν μέσω της εξέλιξης να εφοδιαστούν με μηχανισμούς για την επιβίωση τους. Οι φυτικοί οργανισμοί επιτυγχάνουν να επιβιώσουν από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις μέσω φυσικών παρεμβαλλόμενων αμυντικών φραγμάτων, όπως η επιδερμίδα και η εφυμενίδα, οι κηροί, τα αγκάθια αλλά και μέσω της σύνθεσης βιοχημικών μεταβολιτών που μπορεί να είναι τοξικοί ή/και αποτρεπτικοί για τα παθογόνα. Η άμυνα των φυτών είναι δυο ειδών:

- 1⁰) Θεμελιώδης προϋπάρχουσα άμυνα
- 2⁰) Επαγόμενη άμυνα

2.5.Θεμελιώδης άμυνα

Στη θεμελιώδη άμυνα των φυτών ανήκουν όλες οι προϋπάρχουσες εξωτερικές δομές όπως η επιδερμίδα και τα εξαρτήματά της (αγκάθια, τριχίδια κ.α.), η υμενίνη και οι κηροί της εφυμενίδας των υπέργειων οργάνων, καθώς και η φελλίνη, που καλύπτει κυρίως τα υπόγεια όργανα.

Το δεύτερο σκέλος της θεμελιώδους άμυνας είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οργανικά μόρια (τερπένια, φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις), η σύνθεση των οποίων δεν φαίνεται να σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών. Αρχικά, θεωρήθηκε πως τα οργανικά αυτά μόρια αποτελούν προϊόντα μεταβολικής δραστηριότητας που δε σχετίζονται με φυσιολογικές λειτουργίες ζωτικής σημασίας και χαρακτηρίστηκε ως μια δευτερεύουσα σημασίας δραστηριότητα (Kumiko et al 2006). Ωστόσο, έμμεσα οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι απαραίτητοι για την επιβίωση του φυτού καθώς το προστατεύουν από το βιοτικό στρες.

Όσον αφορά την κάθε κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών ξεχωριστά, τα τερπένια ή τερπενοειδή συνιστούν την μεγαλύτερη κλάση. Γενικά σαν ουσίες είναι αδιάλυτα στο νερό και έχουν όλα κοινή προέλευση από το ακέτυλο-CoA (μονοπάτι μεβαλονικού) και τις ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκόλυσης (μονοπάτι φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης). Και τα δυο αυτά μονοπάτια οδηγούν στο σχηματισμό διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (C₅) από το οποίο προκύπτουν όλα τα τερπένια. Η ονομασία τους γίνεται με βάση τα άτομα άνθρακα που περιέχουν, δηλαδή τα μονοτερπένια αποτελούνται από 10 άτομα άνθρακα, τα σέσκιτερπένια 15, τα διτερπένια 20, τα τριτερπένια 30 και ούτω καθεξής.

Τα τερπένια είναι τοξίνες και ανεπιθύμητα ως τροφή για πολλά φυτοφάγα έντομα, θηλαστικά αλλά και μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εντομοαπωθητικά είναι τα πυρεθροειδή, τα οποία είναι μονοτερπένια. Τα αιθέρια έλαια έχουν εντομοαπωθητικές ιδιότητες και είναι αέρια μίγματα μονο- και σέσκιτερπενίων. Αμυντικές ιδιότητες απέναντι σε έντομα έχουν και κάποια τριτερπένια όπως τα λιμονοειδή και οι φυτοεκδυσόνες. Μερικά τριτερπένια χρησιμεύουν στην άμυνα εναντίον των φυτοφάγων σπονδυλωτών, πχ οι καρδιακοί γλυκοζίτες. Ακόμα, στα τριτερπένια ανήκουν και οι σαπωνίνες με τις οποίες θα ασχοληθώ εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.

Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον μια φαινολική ομάδα. Πρόκειται για μια ετερογενής ομάδα περίπου 10.000 μεταβολιτών, καθώς ορισμένες είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές και υπάρχουν και ορισμένα αδιάλυτα πολυμερή. Η βιοσύνθεση πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού και του μονοπατιού του μηλονικού οξέος. Πολλές φαινολικές ενώσεις ενέχονται σε φαινόμενα αλληλοπάθειας καθώς εμποδίζουν την ανάπτυξη γειτονικών φυτών. Μια από τις κύριες φαινολικές ενώσεις είναι η λιγνίνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα, καθώς εναποτίθεται στα κυτταρικά τοιχώματα εμποδίζοντας την είσοδο μικροοργανισμών ενώ είναι δύσπεπτη με αποτέλεσμα τα φυτοφάγα να μην προτιμούν φυτά που περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιγνίνης. Άλλες σημαντικές φαινολικές ενώσεις είναι τα φλαβονοειδή και τα ισοφλαβονοειδή, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα εναντίον πολλών φυτοφάγων οργανισμών. Γενικά έχουν εντομοκτόνο, μυοκτόνο, ιχθυοκτόνο, αντί-οιστρογονική, αντιμικροβιακή, ακόμα και αντικαρκινική δράση. Στις φαινολικές ενώσεις ανήκουν και οι ταννίνες οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν πρωτεΐνες μη ειδικά και λειτουργούν αποτρεπτικά για τους φυτοφάγους οργανισμούς.

Τρίτη και τελευταία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι αζωτούχες ενώσεις. Σε αυτές ανήκουν τα αλκαλοειδή (περίπου 15.000). Το άτομο αζώτου είναι συνήθως μέρος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, δηλαδή ενός δακτυλίου που περιέχει άτομα τόσο αζώτου όσο και άνθρακα. Ως ομάδα, τα αλκαλοειδή είναι πολύ γνωστά για τις έντονες φαρμακευτικές επιδράσεις τους στα σπονδυλωτά. Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, τα περισσότερα αλκαλοειδή είναι αλκαλικά. Στις τιμές του pH που έχει το κυτταρόπλασμα (7,2) ή το χυμοτόπιο (5-6), το άτομο αζώτου είναι πρωτονιομένο, έτσι τα αλκαλοειδή έχουν θετικό φορτίο και γενικώς είναι υδατοδιαλυτά. Προέρχονται συνήθως από τα αρωματικά αμινοξέα. Τα περισσότερα δρουν έναντι φυτοφάγων ζώων, ιδιαίτερα θηλαστικών καθώς παρεμβάλλονται στις λειτουργίες του νευρικού συστήματος, στη μεμβρανική μεταφορά, τη σύνθεση πρωτεϊνών ή τις ενεργότητες διαφόρων ενζύμων. Εκτός από τα αλκαλοειδή υπάρχουν οι κυανογόνοι γλυκοζίτες, οι οποίοι απελευθερώνουν υδροκυάνιο με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η αναπνευστική αλυσίδα των φυτοφάγων, ενώ μια άλλη κατηγορία είναι τα γλυκοζινολικά (υπεύθυνα για τη χαρακτηριστική μυρωδιά των μπρόκολων) που επίσης απελευθερώνουν πτητικές τοξίνες.

Η θεμελιώδης άμυνα μπορεί να προσαρμόζεται, όχι μόνο σε καταπονήσεις, αλλά και στις διάφορες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον. Μεγάλη επίδραση

στη διαμόρφωση της θεμελιώδους άμυνας έχει η εποχή, το στάδιο της ανάπτυξης και το είδος του οργάνου (Lincoln Taiz et al 2002) . Μια σημαντική συνεισφορά στην άμυνα ενός φυτικού οργανισμού έχουν και οι απονεκρωμένοι ιστοί, στους οποίους, όμως, σε κάποια στάδια της ανάπτυξης συσσωρεύονται δευτερογενείς μεταβολίτες, συνήθως φαινολικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το εγκάρδιο ξύλο του κορμού ορισμένων δένδρων, καθώς και ορισμένα επιδερμικά εξαρτήματα. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι τα νεαρά φύλλα θωρακίζονται με υψηλότερη συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ οι καρποί εμφανίζουν μειωμένη αμυντική προστασία, καθώς η κατανάλωση τους αποτελεί συνήθως μέρος της διαδικασίας εξάπλωσης του είδους.

2.6. Επαγόμενη άμυνα

Οι επαγόμενες μορφές άμυνας του φυτού προϋποθέτουν την αλληλεπίδραση του φυτού με μικροοργανισμούς. Υπάρχουν δύο μορφές επαγόμενης άμυνας, Η επίκτητη συστημική ανθεκτικότητα (SAR) και η επαγόμενη συστημική ανθεκτικότητα (ISR).

Μέτα την προσβολή από κάποιο παθογόνο, το φυτικό κύτταρο αρχίζει μια σειρά από χημικές αντιδράσεις για την προστασία του. Οι επαγόμενοι αμυντικοί μηχανισμοί αποτελούνται από τις παρακάτω διεργασίες:

1. Σύνθεση φυτοαλεξινών από τα προσβεβλημένα κύτταρα του φυτού. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι τοξικές για τους παθογόνους εισβολείς.
2. Αντίδραση υπερευαισθησίας δηλαδή νέκρωση των προσβεβλημένων κυττάρων με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ώστε να μην εξαπλωθεί η μόλυνση σε όλο το φυτό.
3. Παραγωγή μορίων-σημάτων συναγερού όπως οξείδιο του αζώτου, σαλικυλικό, γιασμονικό και αιθυλένιο.
4. Ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω εναπόθεσης λιγνίνης
5. Σύνθεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με παθογόνα όπως οι λεκτίνες και οι χιτινάσες, που στοχεύουν στην εξουδετέρωση του παθογόνου.

Η επαγόμενη ανθεκτικότητα προκαλείται από μη παθογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύσσουν σχέσεις με το φυτό στο επίπεδο της ρίζας, σε

αντίθεση με την επίκτητη ανθεκτικότητα που προϋποθέτει επίθεση. Σχετίζεται με σηματοδότηση JA και αιθυλενίου και όχι SA όπως η SAR. Ακόμα, δεν παρατηρείται παραγωγή PR πρωτεϊνών, αντίθετα, το φυτό βρίσκεται σε μια κατάσταση ευαισθητοποίησης, ώστε να μπορεί να αντεπεξέλθει πολύ ταχύτερα σε τυχόν επίθεση από παθογόνο.

2.7.Επαγόμενη προστασία μέσω του *Fusarium solani* (FsK)

Ο *Fusarium solani* FsK είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Απομονώθηκε από ένα επισχετικό compost από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πληθώρα πηγών άνθρακα, με βέλτιστο pH 5 και βέλτιστη θερμοκρασία τους 24°C. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά ντομάτας ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* (Kavroulakis et al 2007).

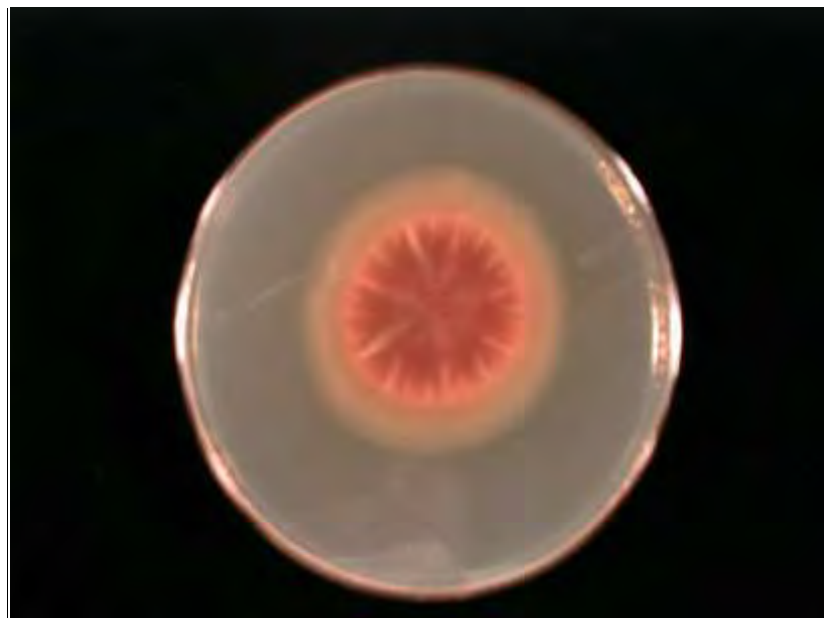
Έχουν αναφερθεί και άλλα στελέχη *F. solani* τα οποία είχαν προστατευτική επίδραση απέναντι σε ένα από τα δύο αυτά παθογόνα αλλά κανένα δεν προστάτευε και από τα δυο όπως το στέλεχος FsK. Επίσης, το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίζεται από ενδοφυτική ανάπτυξη και μάλιστα στο αγωγό σύστημα των φυτών. Μπορεί να απομονωθεί από όλα τα υπόγεια μέρη του φυτού αλλά όχι από τα υπέργεια όπου δεν αναπτύσσεται καθόλου. Έχει την ικανότητα άσκησης προστατευτικής δράσης ακόμα και σε αναλογία 1/1000 σε σχέση με τους παθογόνους οργανισμούς. Αυτή η δραστηριότητα οφείλεται σε κάποιο βαθμό σε εξωκυτταρικές ενώσεις που παράγει ο μύκητας και εμποδίζουν την αύξηση των παθογόνων.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται η προστατευτική δράση του FsK σχετίζεται με το αιθυλένιο καθώς μεταλλαγμένες ντοματιές με λειψό σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου δεν ήταν ανθεκτικά στα παθογόνα παρουσία του FsK, ενώ τα WT είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά που δεν προστέθηκε μύκητας. Από την άλλη ο μηχανισμός δράσης του μύκητα δεν σχετίζεται με το γιασμονικό οξύ καθώς μεταλλάγματα για τη σηματοδότηση γιασμονικού προστατεύονταν επαρκώς. Επίσης, τα μεταλλάγματα για το γιασμονικό προστατεύονταν καλύτερα απ'

ότι τα WT, γεγονός που υποδηλώνει πως το γασμονικό έχει ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του *F. solani* FsK. Αξίζει να σημειωθεί πως σε αντίθεση με άλλους φυτοπροστατευτικούς μικροοργανισμούς, το στέλεχος FsK δεν φαίνεται να προκαλεί την παραμικρή ζημιά στο φυτό-ξενιστή.

Για να καταφέρει να επιβιώσει εντός του φυτού, ο μύκητας πρέπει να μπορεί να μπορεί να αντεπεξέλθει στα αμυντικά συστήματα του. Ένας από τους κύριους δευτερογενής μεταβολίτες στην ντομάτα είναι η α -τοματίνη που έχει γνωστή αντιμυκητιακή δράση (Ito et al, 2007, Zaccardelli et al 2011, Simons et al, 2006). Προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί ο μύκητας εντός του φυτού πρέπει να μπορεί να εξουδετερώσει τον μεταβολίτη. Αυτό γίνεται μέσω ενός εξωκυτταρικού ενζύμου που ονομάζεται τοματινάση, το οποίο συναντάται και σε πολλά παθογόνα της ντομάτας. Πρόκειται για μια γλυκοσιδάση που διασπά την τοματίνη σε λιγότερο τοξικά παράγωγα.

Οι τοματινάσες του *Fusarium solani* και του *Fusarium oxysporum* διασπούν την β 1-συνδεδεμένη γαλακτόζη και απελευθερώνουν την β -lycotetraose και την τοματιδίνη (Roldan-Arjona et al 1999) .



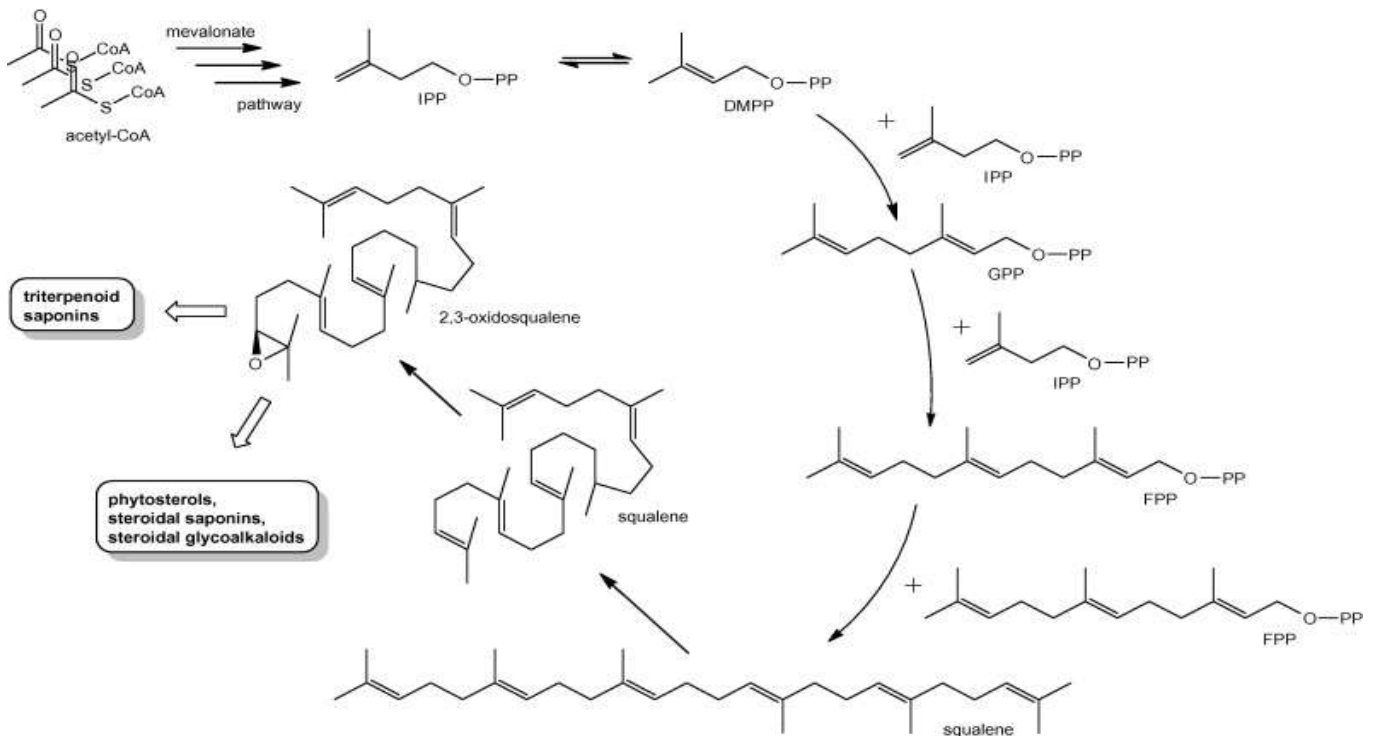
Εικόνα 4: *Fusarium solani*.

Βασίλειο	Μύκητας
Φύλο	Ασκομύκητας
Κλάση	Sordariomycetes
Τάξη	<i>Hypocreales</i>
Οικογένεια	<i>Nectriaceae</i>
Γένος	<i>Fusarium</i>

Πίνακας 1: Ταξινόμηση *Fusarium solani*.

2.8.Σαπωνίνες-τοματίνη

Οι σαπωνίνες προέρχονται από τα τριτερπένια άρα πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες. Αποτελούνται από μια αγλυκόνη, που έχει δομή είτε στεροειδούς (C27) είτε τριτερπενοειδούς (C30), η οποία συνδέεται με ένα ή περισσότερα σάκχαρα. Ονομάστηκαν έτσι λόγω του αφρού που δημιουργείται όταν ένα υδατικό διάλυμα που τις περιέχει αναταραχθεί.

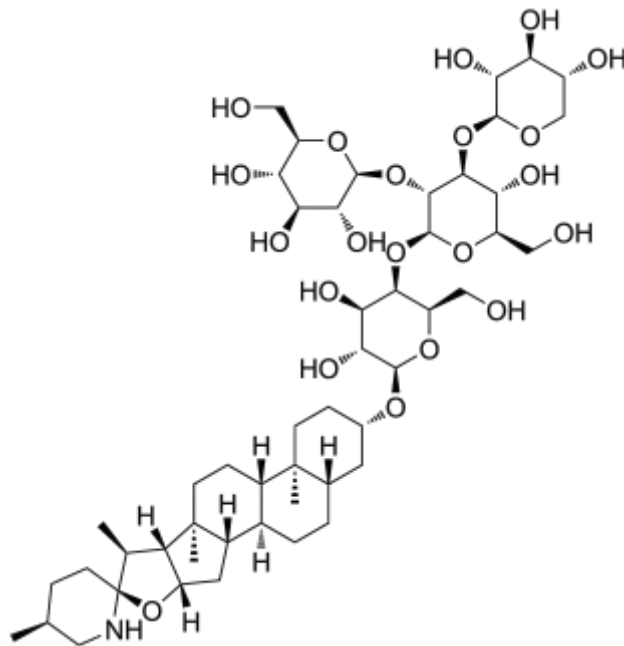


Εικόνα 5: Βιοσύνθεση σαπωνινών

Οι σαπωνίνες έχουν την ικανότητα σχηματισμού συμπλεγμάτων με τις στερόλες των μεμβρανών μικροοργανισμών, οι οποίες φέρουν ελεύθερες 3β-υδροξυστερόλες. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η απώλεια της σταθερότητας των μεμβρανών, η αύξηση της διαπερατότητας τους και η επακόλουθη διαρροή των ηλεκτρολυτών, που επιφέρει και το θάνατο (Sandrock et al 1995).

Η α-τοματίνη είναι μια σαπωνίνη που παράγεται στη τομάτα και εμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων, αφού είναι τοξική γι' αυτούς. Η συσσώρευση της α-τοματίνης σε ποσότητες που φτάνουν τα 10-30mg/Kg φυτικού ιστού είναι ικανή να προστατεύσει τις υγιείς τομάτες από το μύκητα. Βρίσκεται στα φύλλα, τις ρίζες και τον κορμό του φυτού, ενώ υπάρχει και στα ανώριμα φρούτα. Παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα και προκαλεί τη λύση των μεμβρανών του μύκητα. Έχουν αναφερθεί και άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων η τοματίνη παρουσιάζει φυτοπροστατευτική δράση καθώς μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη μυκήτων που στερούνται στερολών. Αυτοί οι μηχανισμοί πιθανώς περιλαμβάνουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω επαγωγής της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Τέτοιου είδους σαπωνίνες μπορεί να συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε υγιείς φυτικούς οργανισμούς.

Ο όρος φυτοαντισιπίνες (phytoanticipin) έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τις σαπωνίνες και άλλα χαμηλού μοριακού βάρους αντιμικροβιακά μόρια, τα οποία παράγονται σαν μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης των φυτών και μπορεί να παίξουν ρόλο στην προστασία τους από παθογόνους παράγοντες (Banetten et al 1994). Αυτός ο όρος έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό τους από τα αντιμικροβιακά μόρια που συνθέτονται de novo ως απόκριση στην μικροβιακή μόλυνση.



Εικόνα 6 : Δομή α-τοματίνης.

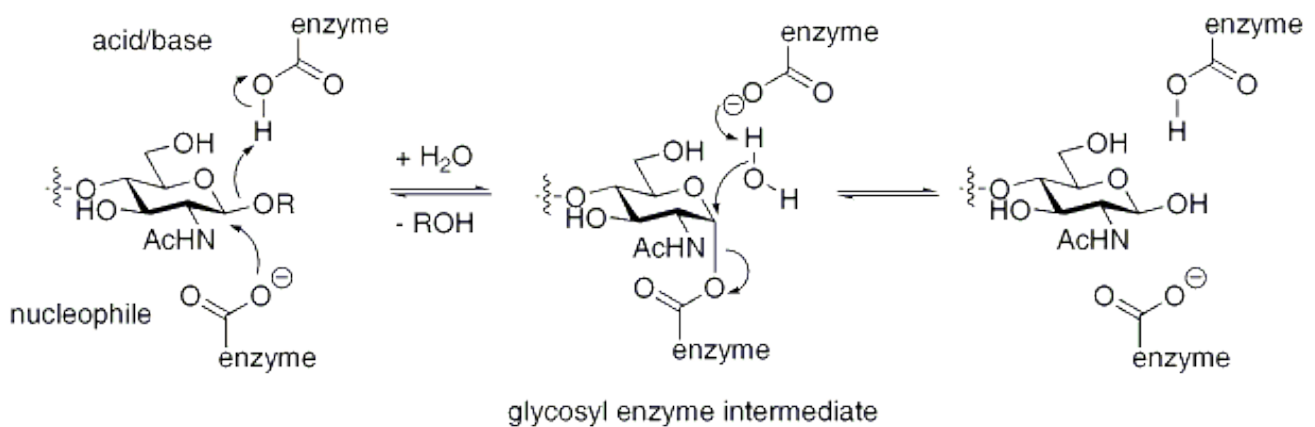
2.9.Γλυκοσιδάσες

Οι γλυκοσιδάσες χωρίζονται σε 128 οικογένειες. Εντοπίζονται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά σε όλους σχεδόν τους έμβιους οργανισμούς (εξάιρεση αποτελούν κάποια αρχαία και κάποια υποχρεωτικά παράσιτα). Έχουν ρόλο στην αποικοδόμηση βιομάζας, στην άμυνα των οργανισμών, σε μηχανισμούς παθογένεσης και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής υδρολύουν τους O-, N-ή S- γλυκοσιδικούς δεσμούς.

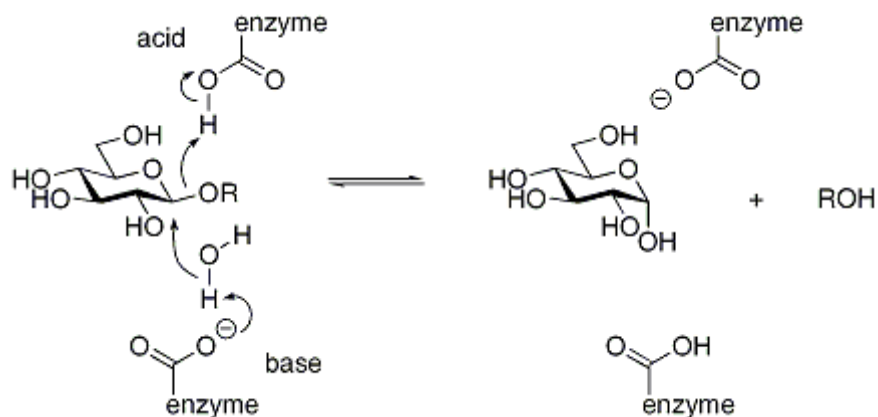
Η ενζυμική υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού πραγματοποιείται μέσω μιας γενικής όξινης κατάλυσης που απαιτεί δύο πολύ σημαντικά στοιχεία. Ένα δότη πρωτονίων και ένα πυρηνόφιλο μόριο/βάση. Αυτού του είδους η υδρόλυση πραγματοποιείται μέσω δύο σημαντικών μηχανισμών (Simos et al 1993). Οι μηχανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν είτε μια γενική διατήρηση, είτε μια αναστροφή της ανωμερούς διαμόρφωσης του μορίου που πρόκειται να υδρολυθεί. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, διατήρηση-αναστροφή, η θέση του δότη πρωτονίων είναι η ίδια, δηλαδή βρίσκεται πάντα στην περιοχή του υδρογόνου του γλυκοσιδικού οξυγόνου. Στα ένζυμα που χρησιμοποιούν το μηχανισμό διατήρησης, η πυρηνόφιλη καταλυτική βάση βρίσκεται κοντά στον ανωμερή άνθρακα του σακχάρου. Αυτή η βάση

βρίσκεται πιο μακριά στην περίπτωση αναστροφής, όπου ένα μόριο νερού θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της βάσης και του σακχάρου.

Αυτή η διαφορά οδηγεί σε μια μέση απόσταση μεταξύ των δύο καταλυτικών καταλοίπων της τάξης των 5.5 Å στα ένζυμα που χρησιμοποιούν το μηχανισμό της διατήρησης, ενώ στα ένζυμα που χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της αναστροφής φτάνουν σε μια απόσταση των 10 Å (Gideon Davies et al 1995).



Εικόνα 7 : Μηχανισμός διατήρησης..



Εικόνα 8 : Μηχανισμός αναστροφής..

Οι β-γλυκοσιδάσες (όπου ανήκει και η τοματινάση) καταλύουν την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ του άνω άνθρακα και του "γλυκοσιδικού" οξυγόνου μέσω του μηχανισμού διατήρησης.

Εκτός του μηχανισμού δράσης, οι γλυκοσιδάσες μπορούν να διαχωριστούν σε οικογένειες με βάση την ομοιότητα τους ως προς την αμινοξική αλληλουχία, ώστε να διευκολυνθεί η συλλογή χρήσιμων πληροφοριών για τη δομή και την λειτουργία των ενζύμων αυτών. Με βάση αυτή την κατάταξη, ένζυμα με διαφορετική ειδικότητα για υποστρώματα βρίσκονται μερικές φορές στην ίδια οικογένεια, υποδεικνύοντας μια εξελικτική απόκλιση για την δημιουργία νέων ιδιοτήτων. Από την άλλη, ένζυμα τα οποία υδρολύουν το ίδιο υπόστρωμα μπορεί μερικές φορές να βρεθούν σε διαφορετικές οικογένειες γεγονός που οφείλεται στη συγκλίνουσα εξέλιξη.

Γενικά, οι γλυκοσιδάσες έχουν εξαιρετικά αποκλίνουσες αλληλουχίες αλλά δεν ισχύει το ίδιο για την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους η οποία εμφανίζεται αρκετά συντηρημένη, ειδικά στο ενεργό κέντρο. Αυτή η διαφορά στη διατήρηση μεταξύ αλληλουχίας και δομής έχει ως αποτέλεσμα οικογένειες που διαφέρουν ως προς την αλληλουχία μπορεί να έχουν συναφείς αναδιπλώσεις. Μελέτες έχουν δείξει (Orego et al 1994) ότι συγκεκριμένες αναδιπλώσεις πρωτεϊνών εμφανίζονται πολύ συχνότερα από τις άλλες. Μέχρι στιγμής στις μισές οικογένειες των γλυκοσιδασών των οποίων η τρισδιάστατη δομή έχει βρεθεί, το ενεργό τους κέντρο έχει τη διαμόρφωση TIM barrel.

2.10. Τοματινάση

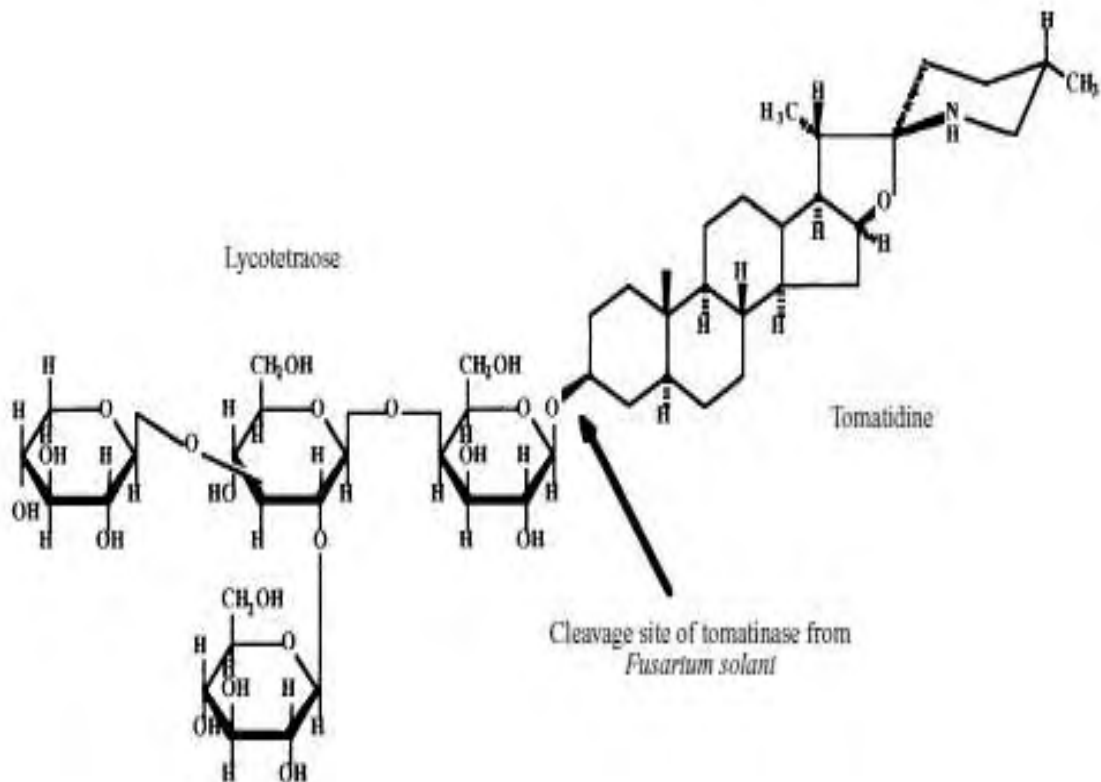
Η τοματινάση είναι μια γλυκοσιδάση που ανήκει στην οικογένεια των β-γλυκοσιδασών. Η αποτοξικοποίηση της α-τοματίνης επιτυγχάνεται καθώς η τοματινάση απομακρύνει είτε ένα, είτε και τα τέσσερα σάκχαρα από την τοματίνη.

Η τοματινάση χρησιμοποιείται σαν όπλο από τον *Fusarium solani* και άλλους μύκητες ή βακτήρια, προκειμένου να παρακάμψουν την θεμελιώδη άμυνα του φυτού. Υδρολύοντας την τοματίνη προκύπτουν δυο παράγωγά της. Αυτά (που είναι λιγότερο τοξικά), είναι η τοματιδίνη και η β-λυκοτετραόζη.

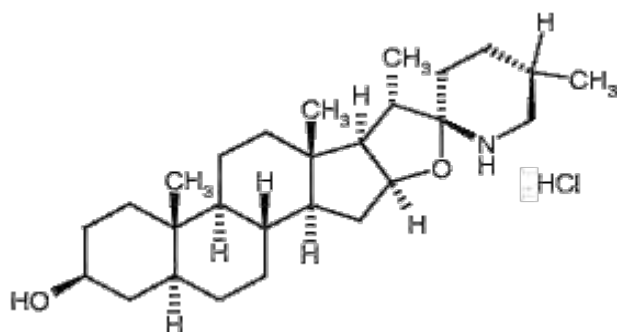
Υπάρχουν δυο μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μικροοργανισμοί που αλληλεπιδρούν με την τομάτα αποκτούν ανθεκτικότητα ενάντια στην α-τοματίνη. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την σύσταση των μεμβρανών τους. Έχουν απομονωθεί μεταλλαγμένα στελέχη του *Fusarium solani* για την βιοσύνθεση στερολών, τα οποία

έδειξαν αυξημένη αντοχή στην α-τοματίνη, ενώ είναι ικανά να μολύνουν το φυτό της τομάτας (Defago et al 1983). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει ενζυμική αποτοξίνωση από την τοματινάση που απομακρύνει σάκχαρα από το μόριο των σαπωνινών. Γενικά, οι τοματινάσες είναι εξαιρετικά αποκλίνουσες μεταξύ τους.

Πολυκλωνικό αντίσωμα αντί-τοματινάσης του *Fusarium oxysporum* δεν αναγνωρίζει την τοματινάση του *Fusarium solani*, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα δυο γονίδια έχουν αποκλίνει με το πέρασμα του χρόνου. Η τοματινάση του *Fusarium oxysporum*, του *Botrytis cinerea* και του *Fusarium solani* κόβουν την β1-γαλακτόζη, που είναι συνδεδεμένη και απελευθερώνουν τον τετρασακχαρίτη β-λυκοτετραόζη και την τοματιδίνη. Η τοματινάση από τον *Alternaria solani* επίσης αποικοδομεί τη α-τοματίνη σε τοματιδίνη, αλλά απελευθερώνει έναν μονοσακχαρίτη, αντί του τετρασακχαρίτη. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί απομακρύνουν σάκχαρα και καταστρέφουν την ικανότητα της α-τοματίνης να σχηματίζει συμπλέγματα με τις στερόλες των μεμβρανών.



Εικόνα 9 : Υδρόλυση της α-τοματίνης από την τοματινάση.



Εικόνα 10 : Δομή τοματιδίνης.

2.11. Αρχές ενζυμικής κινητικής

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

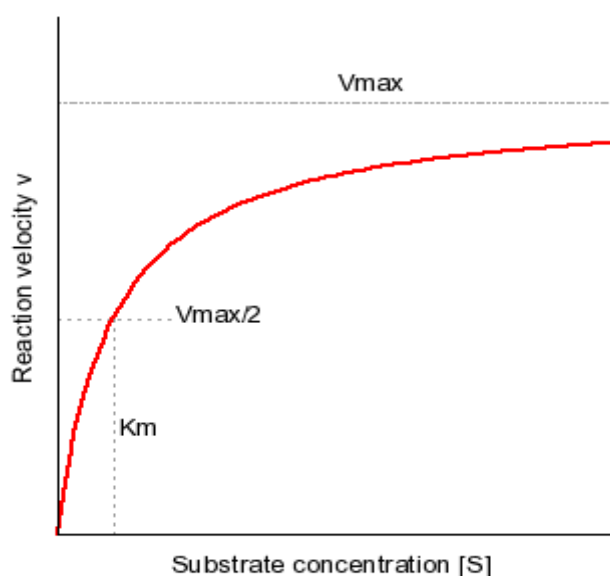
Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E , εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V , ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S , που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P , που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{MAX} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{MAX} Η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε :

$$K_M (\text{σταθερά Michaelis}) = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή:



Εικόνα 11: Διάγραμμα Michaelis-Menten

Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} . Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό

εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης)

Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η k_{cat} , που ορίζεται ως $k_{\text{cat}}=V_{\text{MAX}}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η $k_{\text{cat}}=k_3$ όταν $[S]\gg K_M$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε $M^{-1}\text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου. Αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας k_1 ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ελεύθερο ένζυμο, όταν $[S]\ll K_M$ και $[E_T]=[E_{\text{ελεύθερο}}]$

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η προσπάθεια υπερέκφρασης της τοματινάσης του *Fusarium solani* στέλεχος Fsk σε βακτήρια *E.coli* και στη συνέχεια ο καθαρισμός της ώστε να πραγματοποιηθεί κινητική μελέτη της και να ακολουθήσει κρυσταλλογραφικός προσδιορισμός της δομής της. Παράλληλα, απομονώθηκε τοματινάση και από καλλιέργεια μύκητα (*Fusarium solani* Fsk) για τον ίδιο λόγο. Η τοματινάση είναι μια γλυκοσιδάση που ανήκει στην οικογένεια των β -γλυκοσιδασών. Διασπά την τοματίνη δίνοντας έτσι την ευκαιρία σε οργανισμούς να αναπτυχθούν στην ντομάτα. Δεν υπάρχουν πληροφορίες ούτε για το μηχανισμό ενζυμικής της δράσης, ούτε για την δομή της, άρα παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, αφού πρόκειται για μη χαρακτηρισμένο ένζυμο. Αξίζει να σημειωθεί και το γεγονός ότι δεν μπορεί να γίνει σχεδιασμός δομής με βάση την ομολογία της, γιατί οι εν λόγω πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά αποκλίνουσες. Δεν υπάρχει κάποιο μοντέλο ομολογίας για την ακριβή περιγραφή της δομής της τοματινάσης.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φωτόμετρο
Speed Vac
Φυγόκεντρος
Sonicator
FPLC
Αναλυτικός ζυγός
Heating Block
Συσκευή ηλεκτροφόρησης
Επωαστήρας/Αναδευτήρας
Σύριγγα Hamilton
Μεμβράνες διαπίδυσης
Στήλη σεφαρόζης
Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης

Πίνακας 2: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Tomatine
Tomatidine
DNS
Bradford
Ammonium Sulfate
Sodium Citrate
Acrylamide
Ammonium Persulfate
TEMED
IPTG
LB Broth
Triton
Imidazole
BSA
SDS
AgNO ₃
Acetic Acid
Coomassie Brilliant Blue
Tris
PMSF
Running buffer
Na-Phosphate buffer

Loading buffer
Lysozyme
Ampicillin
Kanamycin
Potato Dextrose Agar

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

4.1. Κλωνοποίηση γονιδίου τοματινάσης σε φορέα κλωνοποίησης

Το γονίδιο της τοματινάσης κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης και πιο συγκεκριμένα στο πλασμίδιο pET28a ενώ σε δεύτερο πείραμα εισήχθη στο πλασμίδιο pET21a. Τα πλασμίδια είναι μικρά, δίκλινα κυκλικά μόρια DNA που συναντώνται κυρίως σε βακτήρια. Αντιγράφονται ανεξάρτητα από το πυρηνικό DNA καθώς φέρουν θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης, περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κι έτσι ο συνδυασμός όλων αυτών των χαρακτηριστικών τους τα καθιστά ιδανικούς φορείς κλωνοποίησης γονιδίων έως 3000bp.

Τα πλασμίδια έχουν τροποποιηθεί ώστε να περιέχουν και γονίδια επιλογής καθώς και μια θέση πολυσυνδέτη όπου υπάρχουν πολλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων ούτως ώστε να εισαχθούν τα ξένα γονίδια. Ακόμα, έχουν και μια ουρά ιστιδίνης (His-tag) που προτίθεται στο καρβοξυτελικό άκρο (pET28a) ή και στα δύο άκρα (pET21a) επιτρέποντας τον καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης σε στήλη συγγένειας μετάλλου. Αξίζει να σημειωθεί πως το γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lac).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου της τοματινάσης στο πλασμίδιο χωρίζεται σε 3 στάδια:

4.1.1 Ενίσχυση γονιδίου τοματινάσης μέσω PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιείται για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA από μια μήτρα, με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών. Απαραίτητα για την αντίδραση είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ρυθμιστικό διάλυμα.

Για την ενίσχυση του γονιδίου της τοματινάσης χρησιμοποιήσα ως μήτρα, cDNA του μύκητα, ενώ για τη δημιουργία κατάλληλων ενισχυτών μελετήθηκαν τα γονίδια τοματινάσης σε διάφορα είδη μυκήτων και σχεδιάστηκε μια συναινετική αλληλουχία. Αξίζει να σημειωθεί πως οι εκκινητές περιείχαν και ειδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Σε eppendorf προσθέτω τα παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
ddH ₂ O	14,75
Μήτρα	1
10mM dNTPs	0,75
10X buffer	5
Πρόσθιος εκκινητής	1,5
Οπίσθιος εκκινητής	1,5
DNA πολυμεράση (2U/μl)	0,5

Πίνακας 4: Αντίδραση PCR

Η PCR πραγματοποιείται σε διαδοχικούς κύκλους κάθε ένας εκ των οποίων αποτελείται από 3 βήματα:

- 1) Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (95°C), ώστε να αποδιαταχθεί το DNA
- 2) Υβριδισμός: πτώση της θερμοκρασίας προκειμένου οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών και την αναλογία των βάσεων τους.
- 3) Πολυμερισμός: Άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C ώστε να δράσει η πολυμεράση, ενισχύοντας το γονίδιο.

Τα παραπάνω 3 βήματα πραγματοποιούνται για 25-30 κύκλους συνήθως, κι έτσι το γονίδιο αυξάνεται εκθετικά. Πριν από τον πρώτο κύκλο προηγείται ένα βήμα αποδιάταξης για 5 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί όλο το DNA, ενώ μετά το τέλος και του τελευταίου κύκλου ακολουθεί ένα τελικό βήμα πολυμερισμού για 5 λεπτά ώστε να μπορέσει να κλείσει τυχόν κενά η πολυμεράση.

4.1.2 Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης των προϊόντων της PCR

Το προϊόν της PCR πρέπει στη συνέχεια να ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης για να δούμε αν ενισχύθηκε το σωστό κομμάτι. Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθός τους και τη διαμόρφωσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ταχύτητα διαχωρισμού εξαρτάται επίσης από το

ηλεκτρικό πεδίο που ασκείται, την συγκέντρωση της αγαρόζης, το ρυθμιστικό διάλυμα και το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ζωνών.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE, 1X (40mM Tris-Acetate, 1mM EDTA) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει και να είναι διάφανο το διάλυμα.
- 2) Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- 3) Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής DNA Loading Buffer 6X (0,25% μπλε βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη).
- 4) Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X.
- 5) Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5V/cm.

Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση (μόλις φτάσει το μπλε της βρωμοφαινόλης στην άλλη άκρη), μεταφέρουμε το gel σε UV όπου φαίνονται οι μπάντες λόγω της παρουσίας βρωμιούχου αιθιδίου μεταξύ των βάσεων. Επιλέγουμε την δικιά μας και την ανακτάμε από την πηκτή όπως θα δούμε στο επόμενο βήμα.

4.1.3 Ανάκτηση DNA έπειτα από ηλεκτροφόρηση

Η ζώνη που μας ενδιαφέρει αποκόπτεται από την πηκτή με ξυραφάκι και στη συνέχεια μπορεί να ανακτηθεί το DNA με την παρακάτω διαδικασία:

- 1) Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής σε eppendorf και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα QG σε αναλογία 3:1

- 2) Επώαση στους 50°C για 10 λεπτά ώστε να λιώσει πλήρως η πηκτή υπό ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά. Στο τέλος το διάλυμα έχει κίτρινο χρώμα
- 3) Πρόσθεση ισοπροπανόλης σε ίσο όγκο με την πηκτή και ανάδευση
- 4) Μεταφέρω το διάλυμα στη η στήλη που διατίθεται στο kit, η οποία στη συνέχεια προσαρμόζεται σε erpendorf ώστε να συλλεχθεί το DNA και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό
- 5) Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και αυτό προσαρμόζεται πάλι στη στήλη
- 6) Πρόσθεση 500μl ρυθμιστικού QG και επανάληψη των βημάτων 4,5
- 7) Για να ξεπλυθεί το DNA προσθέτω 0,75ml ρυθμιστικού PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό
- 8) Απομακρύνεται το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf και φυγοκεντρείται πάλι για 1 λεπτό στις 13.000rpm
- 9) Τέλος, η στήλη προσαρμόζεται σε νέο erpendorf, προσθέτω 50μl Elution Buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 15.000rpm προκειμένου να συλλεχθεί το DNA.

4.1.4 Δημιουργία κατάλληλων άκρων στο γονίδιο και στο πλασμίδιο

Τα κατάλληλα άκρα τόσο στο πλασμίδιο όσο και στο προϊόν της PCR δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών (υπενθυμίζεται πως οι εκκινητές έφεραν και τις αλληλουχίες αναγνώρισης των αντίστοιχων ενζύμων).

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
Δείγμα	33
BSA	0,5
Ένζυμο 1	1
Ένζυμο 2	1
10X buffer	5
H ₂ O	9,5

Πίνακας 5: Αντίδραση πέψης

Το διάλυμα αφέθηκε για 4 ώρες στους 37°C ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Αξίζει να σημειωθεί πως συνολικά χρησιμοποιήθηκαν δυο πλασμίδια, τα pET28a και pET21a. Και για τα δυο χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού BamI και SAL1.

4.1.5 Ligation

Έπειτα από την αντίδραση πέψης ακολούθησε η διαδικασία ένωσης του γονιδίου και του πλασμιδίου. Αυτό γίνεται με τη δράση της DNA λιγάσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl και περιέχει τα παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
10X ρυθμιστικό διάλυμα	1
T4 DNA λιγάση (1U/μl)	1
πλασμίδιο	1
γονίδιο	1
H ₂ O	6

Πίνακας 6: Αντίδραση Ligation

Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 3 ώρες ώστε να γίνει η ένωση.

4.2. Μετασχηματισμός *E.coli* με τον φορέα

Επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός βακτηρίων με το πλασμίδιο ώστε να επιτευχθεί υπερέκφραση της πρωτεΐνης έπειτα από καλλιέργεια και επαγωγή. Συνολικά μετασχηματίστηκαν τρία διαφορετικά στελέχη *E.coli*, τα BL21, BL21 gold και τα Rosetta. Χρησιμοποιήθηκαν δυο τεχνικές μετασχηματισμού, ο χημικός μετασχηματισμός με τη βοήθεια CaCl₂ (BL21 & gold) και η ηλεκτροδιάτρηση (Rosetta).

Ο μετασχηματισμός είναι μια φυσική ιδιότητα ορισμένων βακτηρίων μέσω της οποίας μπορούν να ενσωματώσουν εξωγενή μόρια DNA που μπορεί να περιέχουν κάποιο γονίδιο που θα προσδώσει νέες ιδιότητες στο βακτήριο.

Τα *E.coli* από μόνα τους δεν έχουν την ικανότητα μετασχηματισμού, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές μέσω των οποίων επιτυγχάνεται τεχνητός μετασχηματισμός. Έτσι μπορούν να δεχτούν το πλασμίδιο και να εκφράσουν την ετερόλογη πρωτεΐνη.

Ο χημικός μετασχηματισμός κάνει χρήση δισθενών κατιόντων όπως το ασβέστιο τα οποία προκαλούν την προσκόλληση του DNA στη μεμβράνη καθώς και τα δύο είναι αρνητικά φορτισμένα και φυσιολογικά απωθούνται, ωστόσο η παρουσία των θετικά φορτισμένων ιόντων ασβεστίου αναιρεί την απώθηση. Στη συνέχεια, το

θερμικό σοκ που υφίστανται τα κύτταρα προκαλεί τρύπες στη μεμβράνη. Ανοίγματα προκαλεί επίσης και η ηλεκτροδιάτρηση αλλά με τη χρήση ηλεκτρισμού και όχι θερμότητας. Αναλυτικότερα τα πρωτόκολλα που πραγματοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

Χημικός μετασχηματισμός: Αρχικά απαιτείται η επεξεργασία των βακτηρίων ώστε να καταστούν δεκτικά (competent). Η διαδικασία έχει ως εξής:

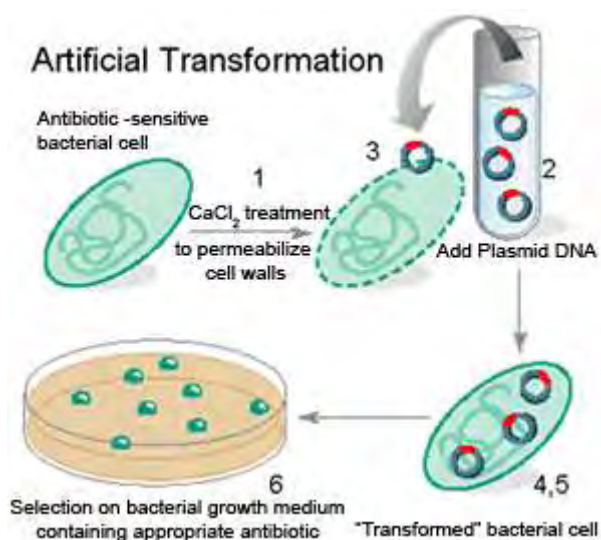
- 1) Παίρνω ένα ξύσμα από το παγωμένο stock γλυκερόλης και το απλώνω σε τριβλίο το οποίο επωάζεται O/N στους 37°C
- 2) Την επόμενη μέρα επιλέγω μια αποικία από το τριβλίο και τη μεταφέρω σε 5ml LB, όπου επωάζεται O/N, σε 250rpm, 37°C
- 3) Την επόμενη μέρα πραγματοποιώ ανακαλλιέργεια με 1 ml της προηγούμενης σε 100ml LB
- 4) Ακολουθεί επώαση στους 37°C, μέχρι η OD₆₀₀=0,4
- 5) Στην συνέχεια η καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο και όλα τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στο cold room
- 6) Μεταφέρω την καλλιέργεια σε 2 falcon των 50ml και φυγοκεντρώ στις 2700rpm για 10λεπτά στους 4°C
- 7) Αφαιρώ το υπερκείμενο και επαναδιαλύω τα κύτταρα σε 1,6ml 100mM CaCl₂
- 8) Επώαση για 30 λεπτά
- 9) Επανάληψη των βημάτων 6,7 και 8
- 10) Ενώνω τα κύτταρα σε ένα falcon και προσθέτω 0,5ml 80% γλυκερόλη
- 11) Παγώνω aliquot των 100μl σε υγρό άζωτο και αποθηκεύω στους -80°C
- 12) Πλέον τα κύτταρα έχουν καταστεί δεκτικά κι έτσι μπορεί να αρχίσει το πρωτόκολλο μετασχηματισμού. Ξεπαγώνω ένα aliquot σε πάγο
- 13) Προσθέτω κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου
- 14) Επώαση για 30 λεπτά σε πάγο
- 15) Επώαση για 60 δευτερόλεπτα στους 42°C
- 16) Στη συνέχεια τα κύτταρα επιστρέφουν στον πάγο για 5 λεπτά
- 17) Προσθέτω 900μl LB και επωάζω για 1 ώρα στους 37°C
- 18) Απλώνω 200μl σε τριβλίο το οποίο αφήνεται O/N στους 37°C

Αξιίζει να σημειωθεί πως το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε αρχικά στα διαγνωστικά κύτταρα DH5 ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του σωστού πλασμιδίου. Για το

σκοπό πήρα μια αποικία από το τριβλίο και την έβαλα σε 5ml LB O/N. Στη συνέχεια πραγματοποίησα φυγοκέντρηση ώστε να πέσουν τα κύτταρα και ακολούθησα το πρωτόκολλο Miniprep:

- 1) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250μl Buffer P1 και μεταφορά σε eppendorf
- 2) Προσθέτω 250μl Buffer P2 (περιέχει NaOH)
- 3) Προσθέτω 350μl Buffer N3 (περιέχει οξικό οξύ, guanidine hydrochloride)
- 4) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm
- 5) Μεταφέρω το υπερκείμενο στην ειδική κολωνίτσα με το φίλτρο
- 6) Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και πετάω το flow through
- 7) Πλύση με 0,75ml Buffer PE και νέα φυγοκέντρηση 1 λεπτό
- 8) Πετάω το flow through και ξαναφυγοκεντρώ για να φύγουν τα υπολείμματα
- 9) Τοποθετώ την κολωνίτσα σε καθαρό eppendorf και για την έκλουση του DNA προσθέτω 50μl Buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5), το αφήνω για 1 λεπτό και φυγοκεντρώ για 1 λεπτό.

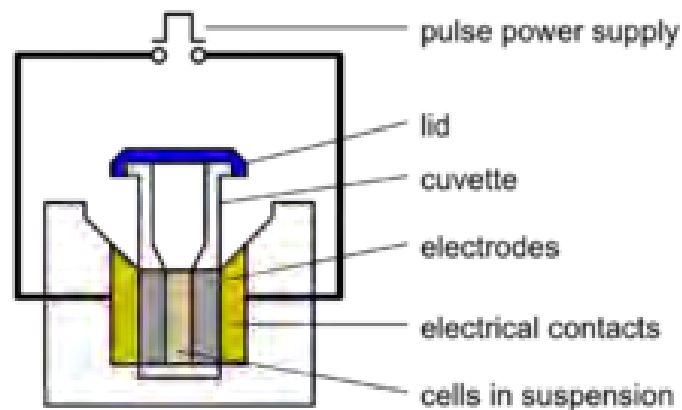
Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να εξακριβωθεί αν υπάρχει το σωστό πλασμίδιο, Αν δεν υπάρχει κάποιο πρόβλημα, τότε το πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό των κυττάρων όπου θα γίνει η έκφραση της πρωτεΐνης.



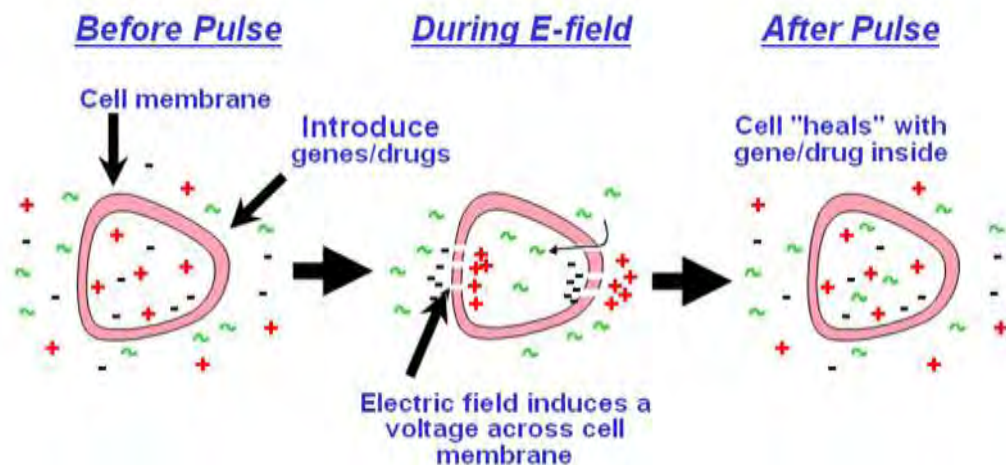
Εικόνα 12: Διαδικασία χημικού μετασχηματισμού

Η παραπάνω διαδικασία μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκε για τα BL21 και τα BL21 gold, ωστόσο, η Τρίτη κατηγορία κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε, τα Rosetta , απαιτούν διαφορετική τεχνική μετασχηματισμού, την ηλεκτροδιάτρηση.

Η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται σε ειδικό μηχάνημα, στο οποίο εισέρχεται μια κυψελίδα όπου έχουμε βάλει τα κύτταρα και το πλασμίδιο. Στην κυψελίδα ασκείται ένας παλμός ηλεκτρικού ρεύματος ο οποίος προκαλεί τη δημιουργία παροδικών τρυπών στη μεμβράνη με αποτέλεσμα να εισέρχεται το πλασμίδιο. Αυτή η διαδικασία είναι περίπου 10 φορές πιο αποτελεσματική από τον χημικό μετασχηματισμό.



Εικόνα 13: Σύστημα ηλεκτροδιάτρησης



Εικόνα 14: Γενική αρχή ηλεκτροδιάτρησης

4.3. Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων και υπερέκφραση της τοματινάσης

Έπειτα και από τον μετασχηματισμό επιλέχθηκε μια αποικία από το τριβλίο ώστε να πραγματοποιηθεί υγρή καλλιέργεια. Σκοπός ήταν να προσδιοριστούν οι συνθήκες καλλιέργειας που θα επέτρεπαν την υπερέκφραση της τοματινάσης και τον ταυτόχρονο εντοπισμό ως διαλυτή και όχι στο ίζημα με τη μορφή των inclusion bodies.

Πρώτο βήμα όπως αναφέρθηκε ήταν η επιλογή κατάλληλης αποικίας από το τριβλίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας μετέφερα την αποικία σε 3ml θρεπτικού μέσου LB σε ένα falcon. Η καλλιέργεια αφέθηκε O/N στους 37°C και την επόμενη ημέρα ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε νέο LB (10ml) και όταν η οπτική απορρόφηση στα 600nm έφτασε το 0,6 προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο το IPTG για την επαγωγή έκφρασης της τοματινάσης. Έπειτα από τέσσερις ώρες επώασης η καλλιέργεια σταμάτησε και με τη βοήθεια φυγοκέντρου (8000 rpm, 5min) έριξα τα κύτταρα στο ίζημα και πέταξα το υπερκείμενο. Σε αυτό το σημείο, το ίζημα μπορεί να αποθηκευθεί στους -80°C.

Στη συνέχεια, τα βακτήρια επαναδιαλυτοποιήθηκαν στο lysis buffer που περιείχε 50mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl και 0,1% Triton. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους (3-7 κύκλοι, 100%, 1, 30sec).

Επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρωση (8000 rpm, 5) ώστε να πέσουν οι μεμβράνες και όλα τα συσσωματώματα και να μείνουν στο υπερκείμενο οι διαλυτές πρωτεΐνες.

Κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας έγιναν αρκετές τροποποιήσεις σε πολλά από τα παραπάνω βήματα. Όσον αφορά τη θερμοκρασία επώασης, έγιναν δοκιμές και στους 30°C, στους 25°C και στους 15°C με την αντίστοιχη προσαρμογή στο χρόνο επώασης. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και διάφορες συγκεντρώσεις IPTG (χωρίς, 0,1mM, 0,5mM, 1mM) και χρόνοι επώασης με το IPTG καθώς επώαστηκε για 1,2,4,6 και 18 ώρες (οι 1,2,4 ώρες αφορούσαν κύτταρα που αυξάνονταν σε 25-37°C ενώ οι 6 και 18 ώρες αυτά που αυξάνονταν σε 15°C). Επίσης, στο lysis έγινε δοκιμή και χωρίς Triton όπου στη συνέχεια προστέθηκε λυσοζύμη και τα κύτταρα αφέθηκαν για μισή ώρα στον πάγο ώστε η λυσοζύμη να διασπάσει τα κυτταρικά τοιχώματα. Ακόμα έγιναν αλλαγές και στο χρόνο σπασίματος των βακτηρίων με το sonicator και τέλος στον χρόνο και τις στροφές της τελευταίας φυγοκέντρωσης (από 12000rpm, 30min πέσαμε στις 8000rpm, 10 min).

Το πρωτόκολλο στο οποίο κατέληξα καθώς φάνηκε να δίνει σχετικά καλή ποσότητα διαλυτής τοματινάσης ήταν το εξής:

- 1) Μετέφερα μια αποικία από το τριβλίο και την εισήγαγα απευθείας σε αποστειρωμένο BL, 500ml με 500μl καναμυκίνης
- 2) Η καλλιέργεια επώαστηκε για 12 ώρες, χωρίς ανάδευση στους 30°C
- 3) Στη συνέχεια ακολούθησε 24ωρη επώαση στους 30°C υπό ανάδευση
- 4) Μετά το πέρας της επώασης έριξα τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000rpm
- 5) Πέταξα το υπερκείμενο και επαναδιέλυσα το ίζημα σε 10 ml lysis buffer (20mM Tris-HCl, 0,1M NaCl, 5mM Imidazole, pH 7,8)
- 6) Ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με sonicator (7 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων στο 80%)
- 7) Φυγοκέντρηση (8000rpm, 10min) για να πέσει το ίζημα και κράτησα το υπερκείμενο.

4.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Για να διαπιστώσουμε αν η πρωτεΐνη έχει εκφραστεί και κυρίως αν έχει εκφραστεί υπό διαλυτή μορφή απαιτείται να γίνει ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται καθώς κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός ηλεκτρώματος. Η ταχύτητα μετακίνησης τους (U) εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο του μορίου (Z) και από τον συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τον τύπο $U=E*Z/f$. Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετο φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής f_v που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς επίσης και από την πυκνότητα και το ιξώδες του ηλεκτρώματος.

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε ηλεκτρώμα παρά σε υγρό, διότι η ηλεκτρώμα καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας (απαραίτητη για τον σωστό διαχωρισμό) και λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερο το διαχωρισμό των μορίων. Τα μόρια

που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα μπορεί να είναι άμυλο ή αγαρόζη κυρίως όμως χρησιμοποιείται πολυακρυλαμίδιο για τις πρωτεΐνες, γιατί παρέχει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, είναι χημικά αδρανές, διάφανο, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος και επιπλέον το μέγεθος των πόρων του μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

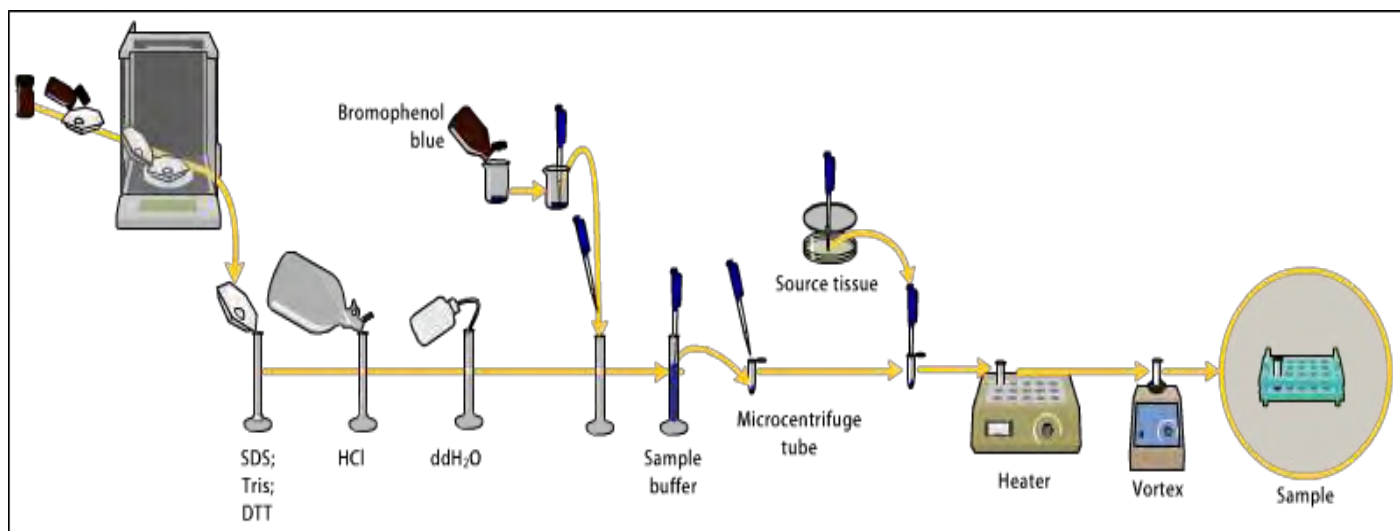
Το σύστημα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στην πηκτή και στα δοχεία ηλεκτροδίων και έχει ένα μόνο ενιαίο πήκτωμα διαχωρισμού. Στο ασυνεχές σύστημα, ένα μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους αποκαλούμενο πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) είναι τοποθετημένο σε στρώσεις πάνω από ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Κάθε πήκτωμα γίνεται με ένα διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα και τα ρυθμιστικά των δεξαμενών είναι διαφορετικά από τα ρυθμιστικά των πηκτωμάτων. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δυο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή συσσώρευσης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερα ο διαχωρισμός τους από ότι στο συνεχές σύστημα και η καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων.

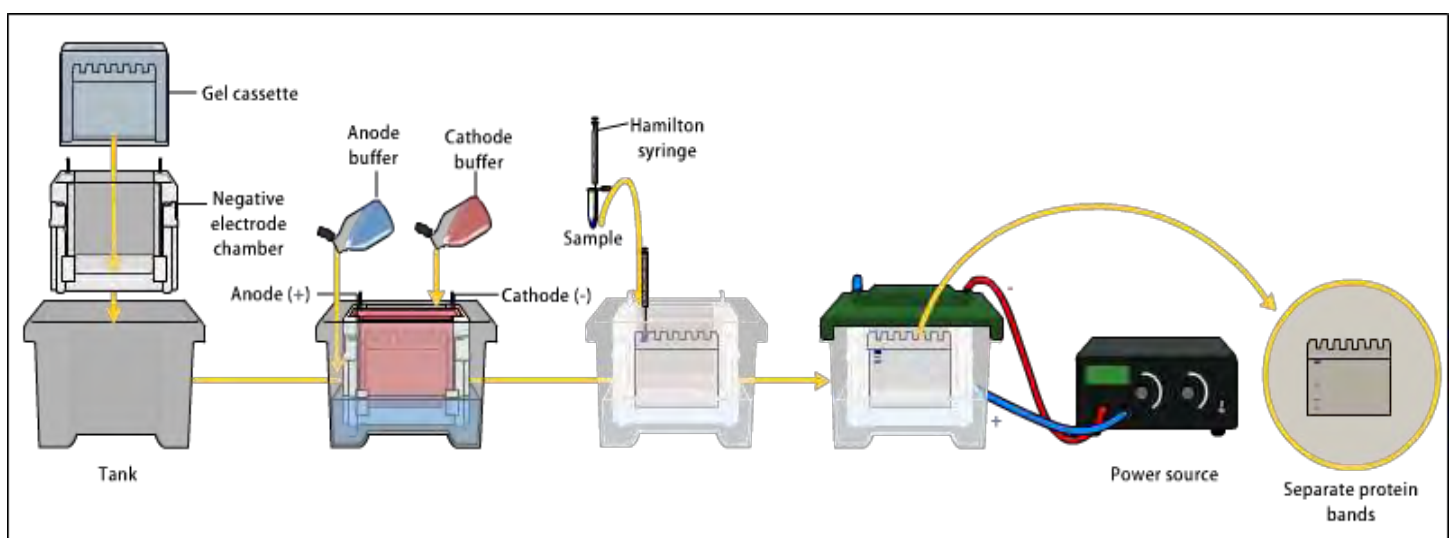
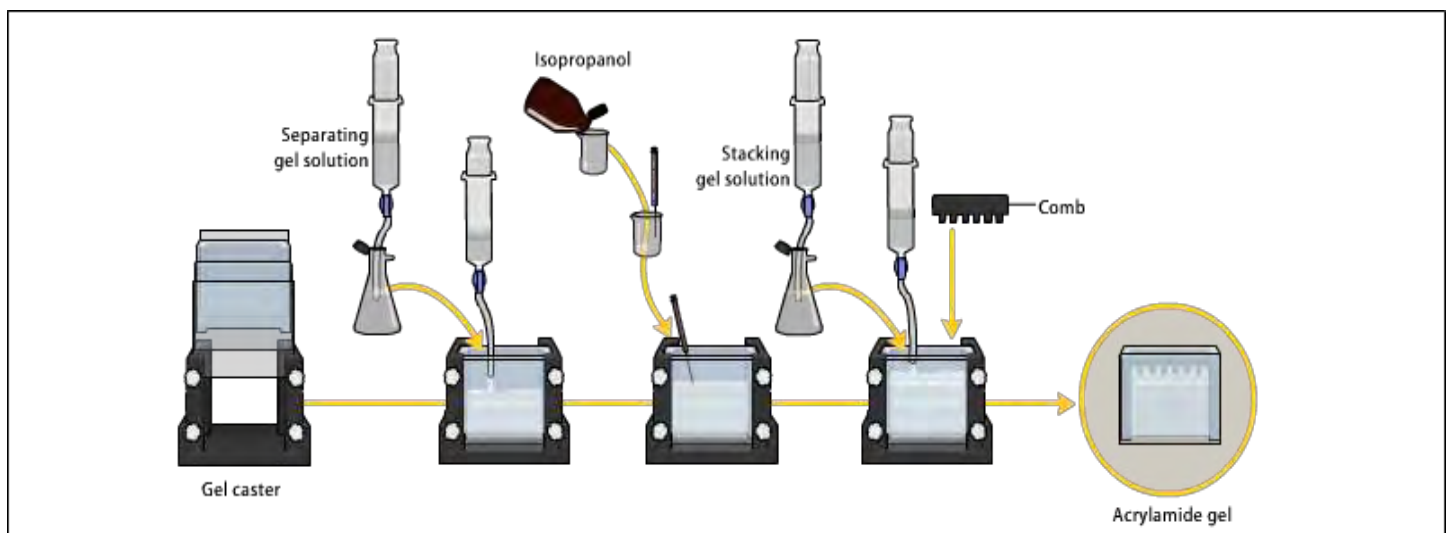
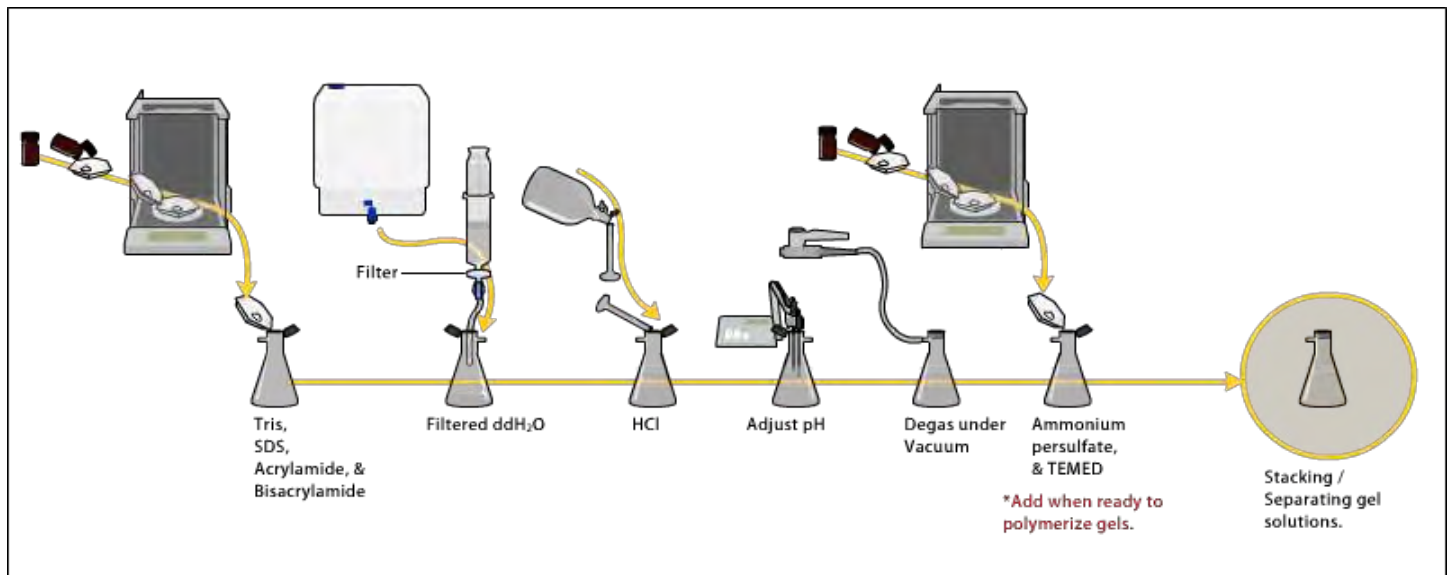
Τέλος η ηλεκτροφόρηση δύναται να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών μέσων, όπως του απορρυπαντικού SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) ή της ουρίας. Στην πρώτη περίπτωση (κάτω από μη-μετουσιωτικές συνθήκες), τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν άθικτες τις ανώτερες διαμορφώσεις τους και παραμένουν κατά κανόνα δραστικά. Στη δεύτερη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αναδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών λαμβάνοντας τυχαίες διαμορφώσεις και διαχωρίζονται.

Το θειικό άλας νατρίου (SDS) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται πάνω στην ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς. Το SDS δεσμεύεται αρκετά εξειδικευμένα με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης (1,4 gr SDS : 1 gr πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξη της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS- πολυπεπτιδικής

αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του στο πήκτωμα αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου.

Έτσι, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ή των υπομονάδων αυτών, με τον παραλληλισμό των αποτελεσμάτων της SDS-PAGE πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες) σε σχέση με αυτά των υπό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών. Γραμμική σχέση υπάρχει μεταξύ του λογαρίθμου του μοριακού βάρους ενός SDS-μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου ή ενός νουκλεϊκού οξέος και του R_f του. Το R_f ορίζεται ως η αναλογία της απόστασης μετανάστευσης ενός μορίου προς αυτή που μετανάστευσε ένας χρωματισμένος μάρτυρας. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση, διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών, καθώς επίσης για τον έλεγχο της ομοιογένειας ενός πρωτεϊνικού κλάσματος. Παρουσιάζει όμως ορισμένους περιορισμούς. Έτσι, πολύ βασικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό γλυκοζυλίωσης (επειδή δεσμεύουν απορρυπαντικό μόνο στο πρωτεϊνικό τμήμα τους) κινούνται πιο αργά στην πηκτή με αποτέλεσμα να ταυτοποιούνται λανθασμένα. Επίσης λανθασμένο μοριακό βάρος μπορεί να προκύψει και για ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών που δεν αναδιατάσσονται πλήρως με το SDS.





Εικόνα 15: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SDS-PAGE είναι:

1) Ακρυλαμίδιο (C₃H₅NO, mW=71,08):

Είναι η χημική ουσία που πολυμερίζεται δίνοντας το πολυακρυλαμίδιο. Όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα, λαμβάνει χώρα αργός αυτοπολυμερισμός καθώς μόρια ακρυλαμιδίου ενώνονται το ένα πίσω από το άλλο δημιουργώντας έτσι αλυσίδες. Η παρουσία ενός συστήματος παραγωγής ελευθέρων ριζών επιταχύνει κατά πολύ τη διαδικασία. Αν δεν υπάρχει δις-ακρυλαμίδιο στο διάλυμα τότε αυτό απλά αυξάνει το ιξώδες του, χωρίς να δημιουργεί τζελ καθώς οι αλυσίδες δεν ενώνονται μεταξύ τους. Το ακρυλαμίδιο είναι μια νευροτοξίνη και πρέπει να φυλάσσεται σε σκοτεινό, κρύο και ξηρό μέρος για να μη λάβει χώρα ο αυτοπολυμερισμός.

2) δις- ακρυλαμίδιο(C₇H₁₀N₂O₂, mW=154,17):

Πρόκειται για δύο μόρια ακρυλαμιδίου συνδεδεμένα με αντίθετη κατεύθυνση από αυτή του πολυμερισμού. Αυτή η ιδιότητα του δίνει τη δυνατότητα να συνδέει δυο αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου δημιουργώντας έτσι το τζελ

3) SDS:

Στο SDS αναφέρθηκα παραπάνω

4) APS(Ammonium Persulfate,N₂H₈S₂O₈,mW=228,2):

Αποτελεί πηγή ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση του πολυμερισμού.

**5) TEMED(N'N'N'N'-TEtraMethylEthyleneDiamine,
C₆H₁₆N₂,mW=116,21):**

Η TEMED σταθεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το APS και ενισχύει τον πολυμερισμό. Η ταχύτητα πολυμερισμού και οι ιδιότητες του τζελ που προκύπτουν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Αύξηση των ελευθέρων ριζών οδηγεί σε μείωση του μέσου μεγέθους των αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου, αύξηση στη θολερότητα του τζελ και μείωση στην ελαστικότητα του. Από την άλλη, μείωση στη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται οι χαμηλότερες καταλυτικές συγκεντρώσεις που θα επιτρέψουν τον πολυμερισμό εντός ενός λογικού χρονικού πλαισίου.

6) Loading buffer:

Τα περισσότερα τζελ πολυακρυλαμιδίου φορτώνονται με τα δείγματα από πάνω. Για να είναι σίγουρο ότι το δείγμα θα μπει στο σωστό πηγαδάκι, αναμιγνύεται με το loading buffer το οποίο περιέχει ουσίες που αυξάνουν την πυκνότητα του δείγματος. Αυτές οι ουσίες πρέπει να είναι μη ιονικές και να μην αντιδρούν με τις πρωτεΐνες του δείγματος. Συχνά χρησιμοποιούμενες ουσίες είναι η γλυκερόλη και η σακχαρόζη. Εκτός αυτών, το loading buffer περιέχει και την χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης. Καθώς οι πρωτεΐνες είναι άχρωμες, η πρόοδος τους μέσω του τζελ είναι δύσκολο να ανιχνευτεί. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ανιονικές χρωστικές όπως το μπλε της βρωμοφαινόλης που είναι μπλε σε ουδέτερα και αλκαλικά pH και καθώς είναι μικρή σε μέγεθος κινείται μπροστά από τις πρωτεΐνες και μόλις φτάσει στην άνοδο, συνήθως είναι και το σήμα για να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση. Αξίζει να σημειωθεί πως μπορεί να συνδεθεί ασθενώς με ορισμένες πρωτεΐνες δίνοντας τους μπλε χρώμα.

7) Coomassie brilliant blue R-250(C₄₅H₄₄N₃NaO₇S₂; mW: 825.97):

Πρόκειται για τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρωστική πρωτεϊνών. Είναι ανιονική και προσδένεται μη ειδικά σε πρωτεΐνες. Η δομή της είναι μη πολική και χρησιμοποιείται σε μεθανολικά διαλύματα που έχουν και οξικό οξύ. Οι πρωτεΐνες του τζελ, αφού τρέξει, μονιμοποιούνται από το οξικό και έπειτα βάφονται από τη χρωστική. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με

οξικό οξύ. Οι πρωτεΐνες έπειτα από τη χρώση ανιχνεύονται ως μπλε μπάντες. Καθώς το SDS είναι επίσης ανιονικό, μπορεί να παρεμβληθεί στη διαδικασία της χρώσης, γι αυτό χρησιμοποιούνται μεγάλοι όγκοι χρωστικής, τουλάχιστον 10 φορές τον όγκο του τζελ

8) Silver staining:

Η τεχνική χρώσης με τη βοήθεια αργύρου χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση πρωτεϊνών. Τα όρια ευαισθησίας της Coomassie φτάνουν τα 10ng πρωτεΐνης ενώ αυτά της silver το 0,5ng, 20 φορές περισσότερο.

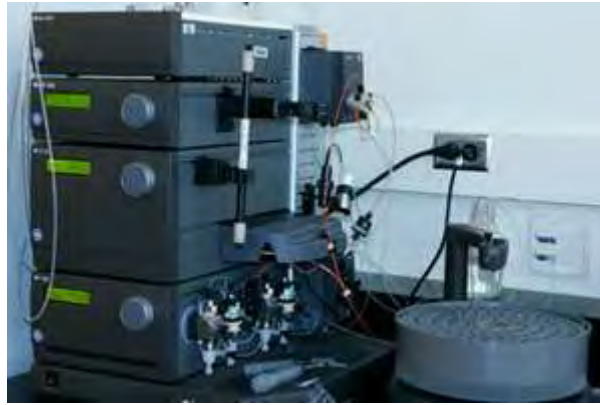
4.5 Καθαρισμός τοματινάσης με τη βοήθεια στήλης

Έπειτα από τον προσδιορισμό των συνθηκών καλλιέργειας με την καλύτερη απόδοση έκφρασης τοματινάσης (αν και αυτό δεν μπορεί να εξακριβωθεί απόλυτα χωρίς ανοσοστυπωμα), μετέβηκα σε μεγαλύτερες καλλιέργειες (από 10ml σε 500ml) με σκοπό την απομόνωση του ενζύμου.

Συνολικά έγιναν δοκιμές τόσο στο μηχάνημα FPLC όσο και με beads χωρίς όμως να παρατηρηθεί καλή απόδοση στην απομόνωση.

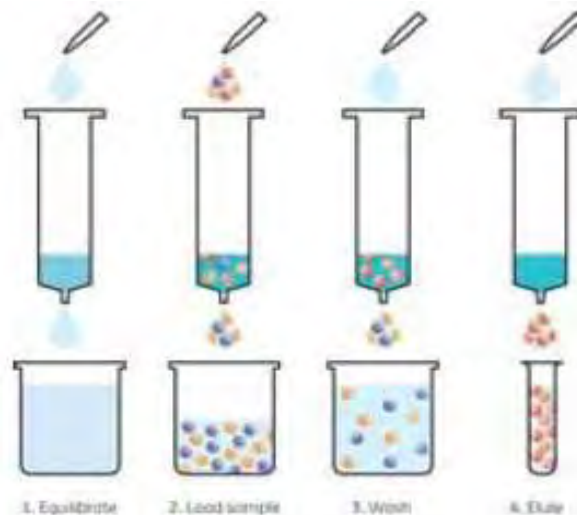
Η FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) είναι μια μέθοδος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για ανάλυση και καθαρισμό μιγμάτων πρωτεϊνών. Η κινητή φάση είναι ένα διάλυμα του οποίου η ροή ελέγχεται μέσω αντλίας. Η σύσταση του διαλύματος μπορεί να ποικίλλει καθώς αντλείται από 2 διαφορετικές δεξαμενές. Η σταθερή φάση είναι μια ρητίνη αποτελούμενη από beads (συνήθως αγαρόζης ή σεφαρόζης) πακεταρισμένα σε μια στήλη.

Η πιο συνηθισμένη στρατηγική καθαρισμού είναι η συγγένεια μετάλλου, όπου η πρωτεΐνη που περιέχει His-tag (6-10 ιστιδίνες που προσδίδουν θετικό φορτίο, στο C- ή N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης) προσδένεται στα beads που περιέχουν νικέλιο και στη συνέχεια εκλύεται με τη βοήθεια αυξανόμενης συγκέντρωσης (gradient) ιμιδαζολίου. Το έκλουσμα διέρχεται μέσα από ανιχνευτές UV (280nm) κι έτσι μπορούν να εντοπιστούν κορυφές (peak), ενδεικτικές της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του διαλύματος.

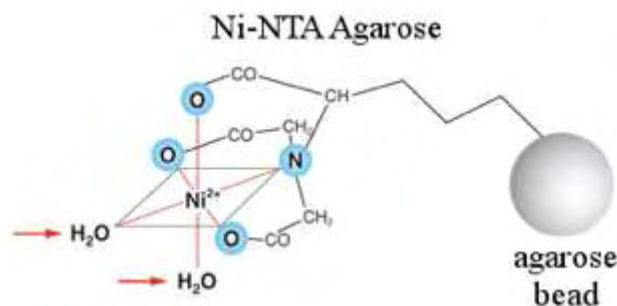


Εικόνα 16: μηχανήμα FPLC

Η προσπάθεια με τα beads έγινε manually. Το υπερκείμενο που περιείχε τις διαλυτές πρωτεΐνες επωάστηκε για 2 ώρες με τα beads και στη συνέχεια πακεταρίστηκε στη στήλη. Ακολούθησαν βήματα πλύσης, αρχικά με το lysis buffer, στη συνέχεια ακολούθησε η έκλουση που πραγματοποιήθηκε με διαδοχικά περάσματα τουλάχιστον 10 όγκων στήλης με buffer που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (50,100,150,200,300 και 500mM). Τόσο το flow through όσο και οι πλύσεις με τα εκλούσματα συλλέχθηκαν σε erpendorf το περιεχόμενο των οποίων φωτομετρήθηκε στα 280nm για να προσδιοριστεί η ποσότητα πρωτεΐνης. Η αρχή είναι ίδια με της FPLC απλά γίνεται manually.



Εικόνα 17: Διαδικασία καθαρισμού μέσω στήλης



Εικόνα 18: Διαμόρφωση ενός Bead

4.6. Απομόνωση τοματινάσης του μύκητα *Fusarium solani*

Η καλλιέργεια του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε τρεις φλάσκες των 100ml . Σε κάθε μια προστέθηκαν 2,4gr PDB (Potato Dextrose Broth) και H_2O μέχρι τα 100ml. Στη συνέχεια, οι φλάσκες με το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκαν και αφού κρύωσαν, εμβολιάστηκαν με στερεή καλλιέργεια του μύκητα FsK. Στην καλλιέργεια προστέθηκε α -τοματίνη 20 μ M και αναπτύχθηκε για 5 μέρες σε θερμοκρασία 26°C σε συνεχής ανάδευση. Η α -τοματίνη επάγει την παράγωγη της τοματινάσης του μύκητα.

Αφού έχει αναπτυχθεί η καλλιέργεια διηθούμε με γάζα έτσι ώστε να απομακρύνουμε το μικκύλιο .

Επόμενο βήμα είναι η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του με σταδιακή προσθήκη κορεσμένου διαλύματος 80% θειικού αμμωνίου, στους 4° C. Το αφήνουμε όλο το βράδυ σε συνεχή ανάδευση στους 4°C.

Μετά την κατακρήμνιση φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm στους 4° C για μια ώρα. Το ίζημα που παρουσιάζεται επαναδιαλύεται με 2,5ml οξικό νάτριο 20mM pH =5.

4.7. Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνες πραγματοποιείται με την μέθοδο Bradford. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το αντιδραστήριο που βρίσκεται σε περίσσεια και σχηματίζεται μια έγχρωμη ένωση. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της

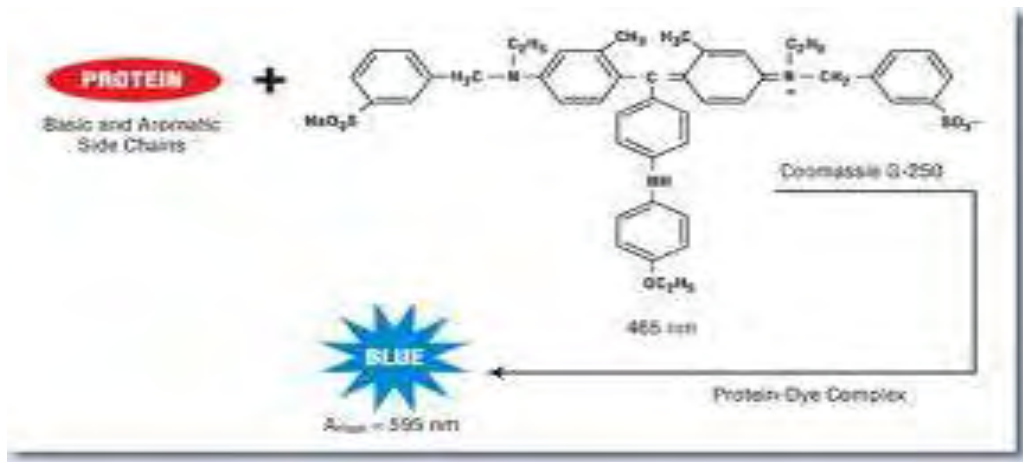
οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, λοιπόν μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin). Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γίνεται ως εξής :

Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων	Ποσότητα BSA (10μg/ml)	Ποσότητα H ₂ O
0	0	1ml
0,1	10μl	990 μl
0,2	20 μl	980 μl
0,4	40 μl	960 μl
0,6	60 μl	940 μl
0,8	80 μl	920 μl
1	100 μl	900 μl

Πίνακας 7:Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων στη μέθοδο Bradford

Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης κάθε φορά παίρνουμε 20μl από το κάθε πρότυπο διάλυμα και προσθέτουμε 980 μl διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση, επώαση για 5min και μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm. Από τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Με βάση την πρότυπη καμπύλη που δημιουργήσαμε αντιστοιχίζουμε την τιμή της απορρόφησης του δείγματος μας και γίνεται ο προσδιορισμός της άγνωστης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του δείγματος.



Εικόνα 19: Αρχή μεθόδου Bradford

4.8. Καθαρισμός ενζύμου μέσω διαπίδυσης

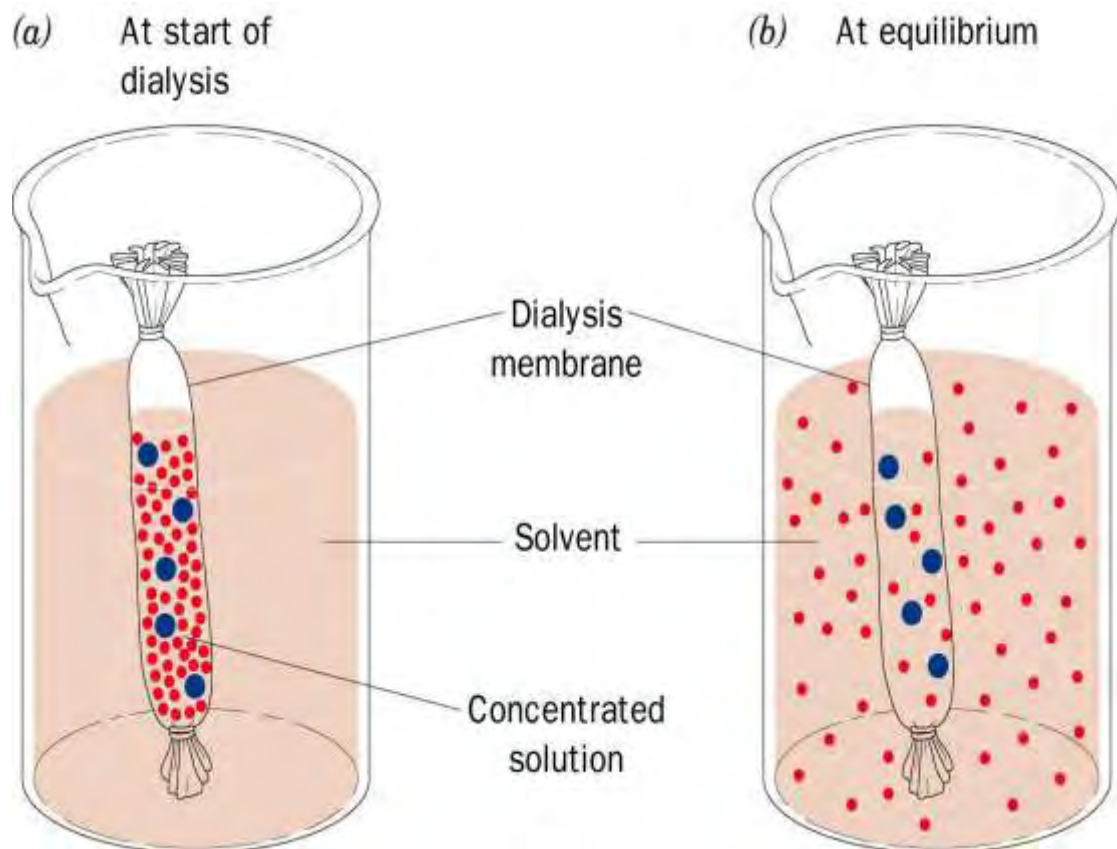
Η διαπίδυση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού με βάση το μέγεθος κατά την οποία χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη για να διαχωρίσει την ένωση που μας ενδιαφέρει από τις παρεμποδίσεις. Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον καθαρισμό του ενζύμου από την καλλιέργεια μύκητα, όσο και έπειτα από το πέρασμα από τις στήλες ώστε να φύγει το μιδαζόλιο το οποίο παρεμποδίζει τη δραστηριότητα της τοματινάσης και την ποσοτικοποίηση της με τη μέθοδο Bradford.

Το διάλυμα που περιέχει τοματινάση τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και εμβαπτίζεται σε διάλυμα του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτή του δείγματος.

Η διαδικασία απαιτεί επώαση O/N με συνεχή ανάδευση στους 4° C, ενώ πραγματοποιούνται δυο αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος ανά οκτώ ώρες .

Στην διαπίδυση χρησιμοποιούμε μεμβράνες που κατασκευάζονται από κυτταρίνη με διάμετρο πόρων 1-5nm. Παρασκευάζονται ως εξής : φτιάχνουμε ένα διάλυμα 8g διτανθρακικού νατρίου σε 500ml H₂O και το αφήνουμε να βράσει για 30 min. Οι μεμβράνες με αυτή τη διαδικασία καθίστανται ημιδιαπερατές.

Εάν η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι διαφορετική εκατέρωθεν της μεμβράνης η δημιουργούμενη βαθμίδα συγκέντρωσης παρέχει την κινητήρια δύναμη για τη διάχυσή της κατά μήκος της μεμβράνης. Έτσι, ενώ τα μικρά μπορούν να διέρθουν ελεύθερα μέσω της μεμβράνης, τα μεγάλα κατακρατούνται. Η διαπίδυση ως μέθοδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται συχνά στον καθορισμό πρωτεϊνών, ορμονών και ενζύμων (Μπακέα 2008).



Εικόνα 20 : Μέθοδος διαχωρισμού με διαπίδυση. Πορώδης μεμβράνη με διάλυμα της προς απομάκρυνση ουσίας βυθίζεται σε καθαρό διαλύτη: (α) πριν και (β) μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας.

4.9 TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

Η TLC (Thin Layer Chromatography) είναι μια χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού ουσιών με βάση το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με μια στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνης κτλ. Η κινητή φάση αποτελείται από χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό σε αναλογία 6:4:1. Με αυτήν την τεχνική έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των προϊόντων υδρόλυσης της ατοματίνης από την τοματινάση έπειτα από απομόνωση από βακτήρια και μύκητα.

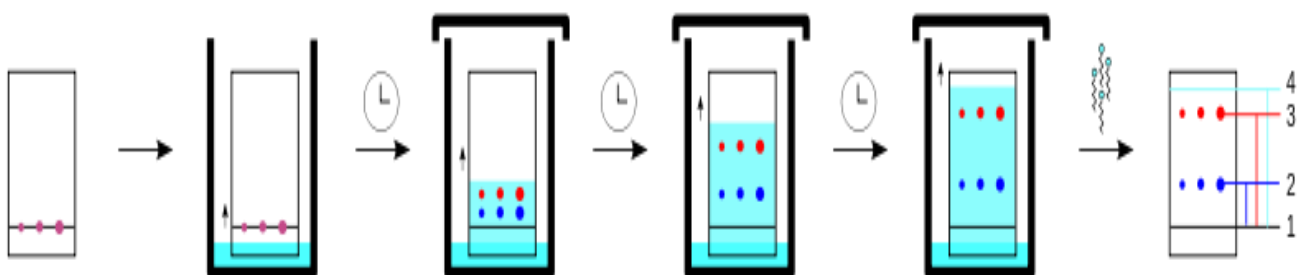
Αρχικά, επωάζουμε O/N σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα που αναμένουμε να περιέχει το ένζυμο, με τοματίνη ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε τελικό όγκο 50ml:

- 13μl από το διάλυμα της τοματινάσης
- 1μl α-τοματίνης 10mM
- 36μl κιτρικό νάτριο 20mM pH =5

Τα δείγματα την επόμενη μέρα λυοφιλοποιούνται και επαναδιαλύονται σε 30μl μεθανόλης. Ως control χρησιμοποιήσαμε α-τοματίνη 10mM διαλυμένη σε 50μl μεθανόλης και τοματιδίνη διαλυμένη σε 200μl μεθανόλης.

Η πλάκα της TLC είναι τοποθετημένη πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα στους 50 °C έτσι ώστε να εξατμίζεται αμέσως η μεθανόλη. Φορτώνουμε 10μl τοματιδίνης, στην συνέχεια 10μl τοματίνη και έπειτα από 10μl του κάθε δείγματος της αντίδρασης σε απόσταση 2cm μεταξύ τους. Στην συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια μέσα σε αεροστεγή θάλαμο, στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί η κινητή φάση σε ύψος κάτω από αυτό των κηλίδων. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν εισαχθεί στο θάλαμο τουλάχιστον 10min πριν την τοποθέτηση της πλάκας, ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς.

Ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με την βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Στην συνέχεια αποσύρεται και ψεκάζεται με 30% θειικό οξύ σε όλη την επιφάνεια της πλάκας. Τέλος στεγνώνεται με ζεστό αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Από το χρώμα των κηλίδων μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούνται .



Εικόνα 21 : Τεχνική TLC.

4.10. Tomatinase activity assay με DNS.

Το 3,5-Dinitrosalicylic οξύ ή DNS είναι μια αρωματική ένωση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων σε ένα διάλυμα κι έτσι βρίσκει χρήση σε πειράματα κινητικής γλυκοσιδασών. Σε αυτό το πείραμα στόχος μας είναι να βρούμε την ενζυμική ενεργότητα της τοματινάσης καθώς το DNS έχει την ικανότητα δέσμευσης στην β-lycotetraose, το αναγωγικό σάκχαρο που παράγεται από την διάσπαση της β1-συνδεδεμένης γαλακτόζης από την α-τοματίνη.

Είναι μια άμεση διαδικασία. Το σάκχαρο μειώνει το διαθέσιμο DNS και οδηγεί σε αλλαγή στο φάσμα απορρόφησης, η οποία παρατηρείται με αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο- καφέ. Το ποσοστό της απορρόφησης σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης που καταλύει η τοματινάση.

Παρασκευή dinitrosalicylic acid reagent solution 1% (DNS) 50ml:

- 0,5g Dinitrosalicylic acid
- 0,1g Phenol (C₆H₅OH)
- 0,025g Sodium sulfite (NaSO₃)
- 0,5g Sodium hydroxide (NaOH)
- 50ml H₂O

Συνολικά η μέθοδος DNS χρησιμοποιήθηκε για την κινητική μελέτη της τοματινάσης με διάφορες συγκεντρώσεις τοματίνης (0,5-3mM) σε διάφορες χρονικές στιγμές (5-120min).

Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις είχαν ως εξής:

1) Για 0,5mM τοματίνης:

Διάλυμα Τοματίνης σε κιτρικό νάτριο (10mM)	10μl
Διάλυμα τοματινάσης	20μl
Διάλυμα κιτρικού νατρίου 20mM pH=5,3	170μl

2) Για 1mM τοματίνης:

Διάλυμα Τοματίνης σε κιτρικό νάτριο (10mM)	20μl
Διάλυμα τοματινάσης	20μl
Διάλυμα κιτρικού νατρίου 20mM pH=5,3	160μl

3) Για 1,5mM τοματίνης:

Διάλυμα Τοματίνης σε κιτρικό νάτριο (10mM)	30μl
Διάλυμα τοματινάσης	20μl
Διάλυμα κιτρικού νατρίου 20mM pH=5,3	150μl

4) Για 2mM τοματίνης:

Διάλυμα Τοματίνης σε κιτρικό νάτριο (10mM)	40μl
Διάλυμα τοματινάσης	20μl
Διάλυμα κιτρικού νατρίου 20mM pH=5,3	140μl

5) Για 3mM τοματίνης

Διάλυμα Τοματίνης σε κιτρικό νάτριο (10mM)	60μl
Διάλυμα τοματινάσης	20μl
Διάλυμα κιτρικού νατρίου 20mM pH=5,3	120μl

Ως τυφλό για το μηδενισμό στο φωτόμετρο χρησιμοποιούμε:

1. 20μl διάλυμα tomatinase
2. 180μl Κιτρικό νάτριο 20mM pH=5,3

Η αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για το κατάλληλο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας του χρόνου κάθε αντίδρασης προσθέτουμε 200μl DNS και θερμαίνουμε στους 95° C για 10min. Στην συνέχεια αποσύρουμε τα δείγματα από το heat block και επαναφέρουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια υδατόλουτρου για περίπου 5 λεπτά. Τέλος, φωτομετρούμε στα 520nm με την κυψελίδα χαλαζία.

Πριν τη μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης γλυκόζης ώστε στη συνέχεια να μπορεί να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε β-λυκοτετραόζη και κατά συνέπεια η ενζυμική ενεργότητα. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης έφτιαξα stock γλυκόζης 10mM σε κιτρικό νάτριο, pH 5,3. Στη συνέχεια έφτιαξα από το stock διαλύματα που είχαν 0,5-2mM γλυκόζης (στα 200ml). Τέλος, ακολούθησε η προσθήκη DNS, θέρμανση στους 95°C και φωτομέτρηση στα 520nm.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

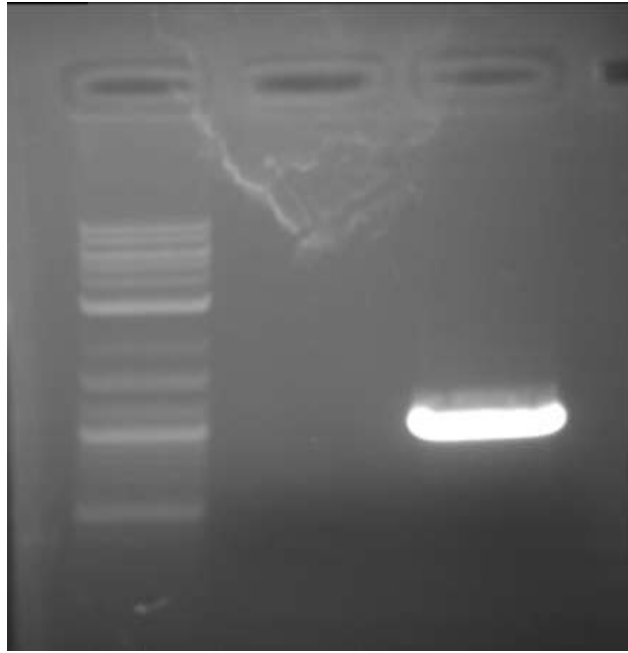
5.1 Αλληλούχιση γονιδίου τοματινάσης

Το γονίδιο στάλθηκε για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής (από 5' στο 3' άκρο):

```
ATGAAAGCCACTATCATCATCGGTCTTCTCGCCGCTGTCCGAGCAGCCTATGTGGCCCCCGGTG
CAACAGAACTACCTCCCTGAGGGAGGAGGCTGCCAAGAAAGATATTCTCATCGGGTCTGGTGCCA
TCAACCCAACTATTTGGATGATCCTAGGTTCTCTGCCGTCCTTGCCGAGCAGTTCAACAGCCTG
TCTCCCGAAAATGAGGGCAAGTGGGCGTTCCCTCAACCCGACCCAAGGACATTTACGACTGGACAAA
GATCGACCGCCTCGTTGCCTTCGCCGAGGACAACAACATGGTTCGTCAGGGACATGGCCTCATCT
CGGGCTGCTGCAACCCTGGTTACATCGACGCCATAACCAGCCCGCAGAGCTTCGTGCTGCTATG
ACGGCTCACTTCGAGGCATTCATGCATCGCTACGACGGCAAGGTGGATCGTTGGGACGTCGTAC
TGAAAGCCCTGAAACGCAGGGCACC GTTCTGAAACCAACAGCACCTTTTACAGACTGCTCGGCC
CCAGTTACATCGACGAGGCCTTCCGCATTTGCCCGAGCAGCAGATCCGGATGCCAAAATTGTTCTTC
AACGAGAATCTTGTGAGGTGCTTCCGGCCAAGCGACAGGCACCTCCTCGAACTAGTCACTCGCCT
CGTATCGGAGGGCGTCCCTATCGACGGAGTAGCCCTCCAGATGCACATTAAGTGAAGTTGCCCCAG
AACCAGGCGTACTGACGGAATGGTCAACTCCTATAAGGCGCTCGGGTTGGAGGTGACAAATTGCT
GAGATGGATGTCCACACCCTCAACACTACCCTCCAGACCGAAATCTACGGCGCCGTCATAACCGA
GGCTTTGGACGCAGGCATCACCGACATTAGCTTCTGGGGCTTCACGGATGCCCATGCCTACACCT
GGCTGCCAGGCGCAAGCCTCTCATGTTTCGACGAGGACTACAAGCCCAAGGGCGCATTTCTTCGCT
ACCCATGCCGCCCTGAAGAACTTTGTCAGCAAACCTTAG
```

5.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Έπειτα από την ενίσχυση του γονιδίου μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για επαλήθευση της αντίδρασης και πράγματι στο τζελ φαίνεται ξεκάθαρα η ζώνη του γονιδίου:

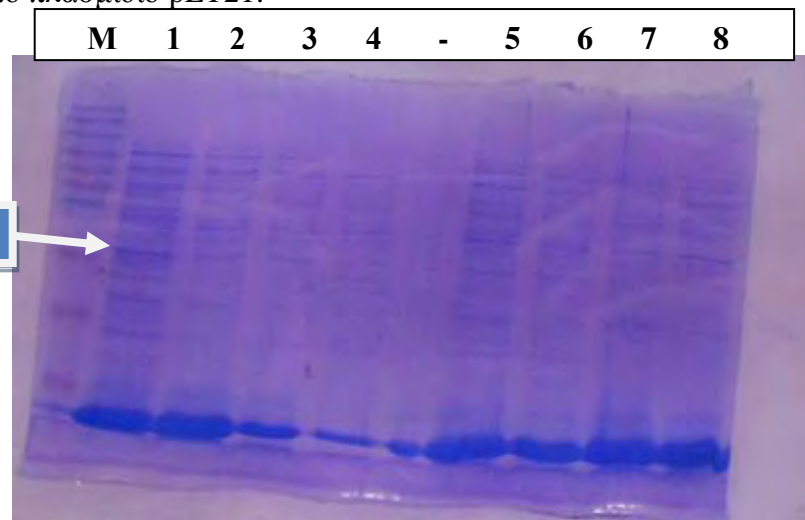


Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση έπειτα από PCR

5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έπειτα από υπερέκφραση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η προσπάθεια υπερέκφρασης της τοματινάσης πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά στελέχη *E.coli* (BL21, BL21 gold, Rosetta), με 2 διαφορετικούς φορείς (με τον pET21a τα BL21 και BL21 gold ενώ με τον pET28a μετασηματίστηκαν τα BL21 και Rosetta) σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (15,25,30,37°C). Μερικά χαρακτηριστικά gel που πήραμε είναι τα παρακάτω:

1) Με το πλασμίδιο pET21:



Εικόνα 23: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker

1: BL21, 37°C, χωρίς IPTG, υπερκείμενο

2: BL21, 37°C, 0,1mM IPTG, υπερκείμενο

3: BL21, 37°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο

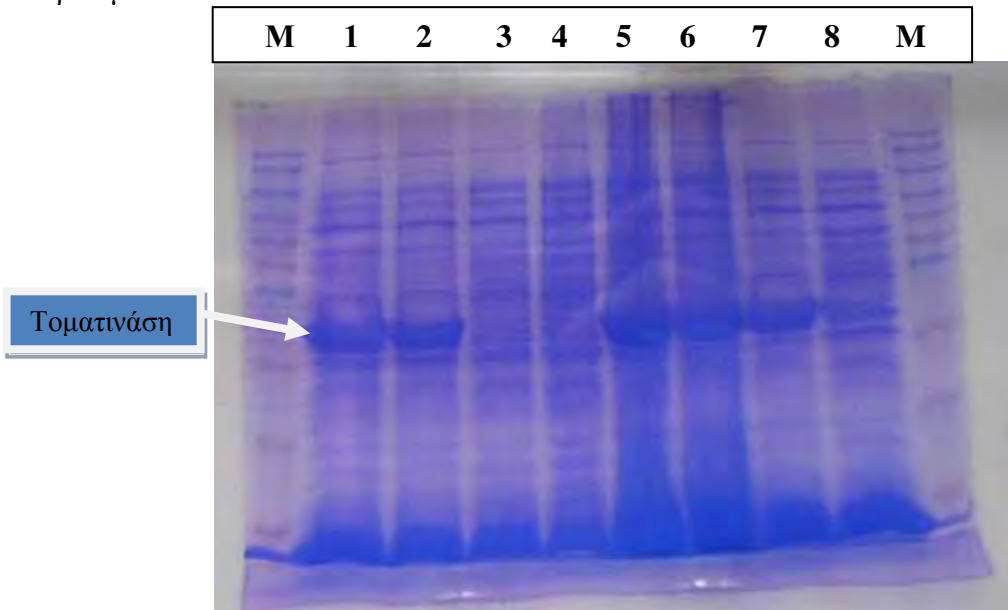
4: BL21, 37°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο

5: BL21 gold, 37°C, χωρίς IPTG, υπερκείμενο

6: BL21 gold, 37°C, 0,1mM IPTG, υπερκείμενο

7: BL21 gold, 37°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο

8: BL21 gold, 37°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο



Εικόνα 24: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker

1: BL21 gold, 37°C, 1mM IPTG, pellet

2: BL21 gold, 37°C, 0,5mM IPTG, pellet

3: BL21 gold, 37°C, 0,1mM IPTG, pellet

4: BL21 gold, 37°C, χωρίς IPTG, pellet

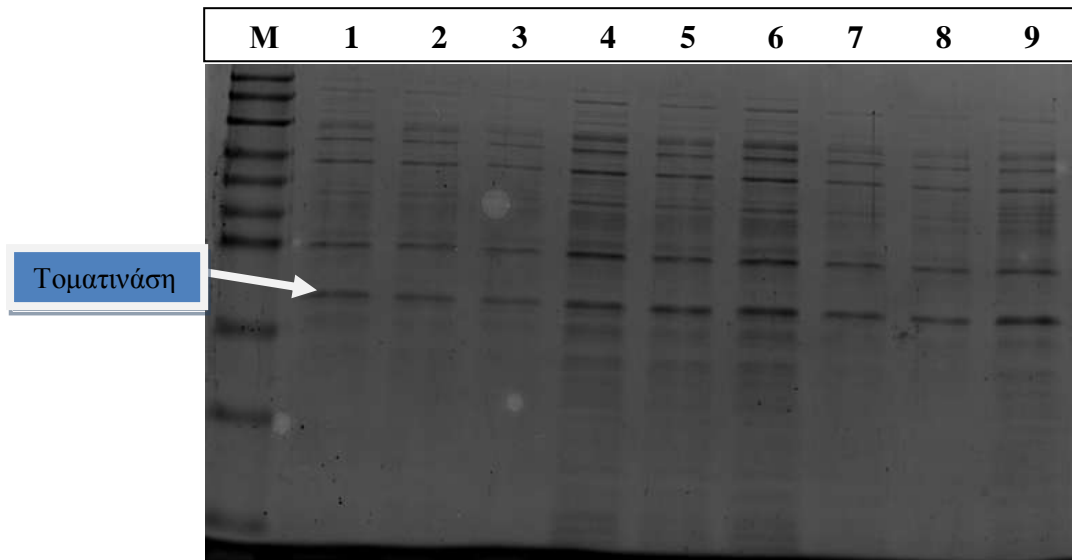
5: BL21, 37°C, 1mM IPTG, pellet

6: BL21, 37°C, 0,5mM IPTG, pellet

7: BL21, 37°C, 0,1mM IPTG, pellet

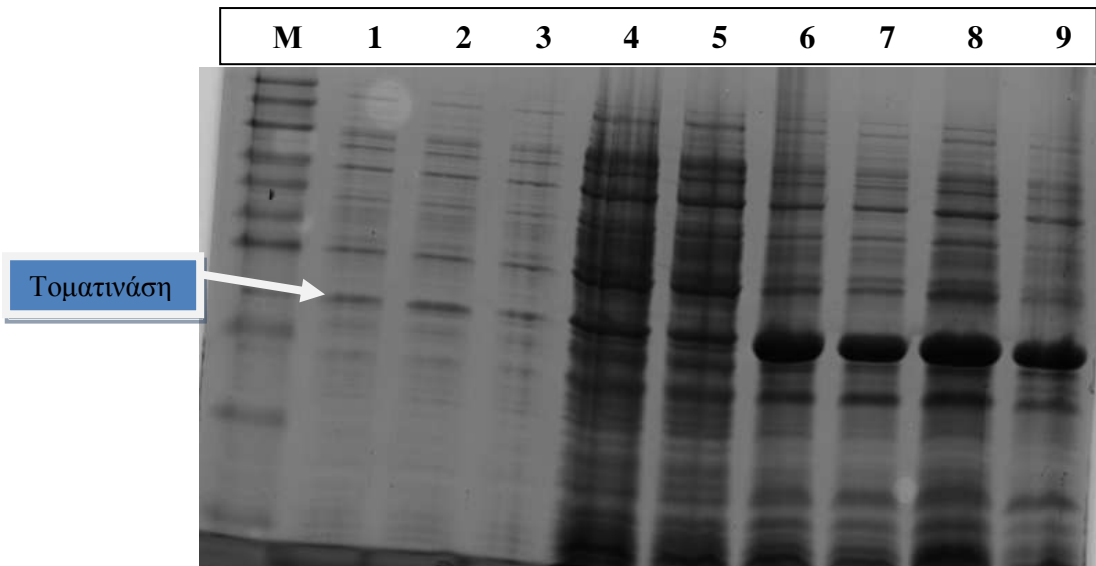
8: BL21, 37°C, χωρίς IPTG, pellet

2) με το πλασμίδιο pET28:



Εικόνα 25: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

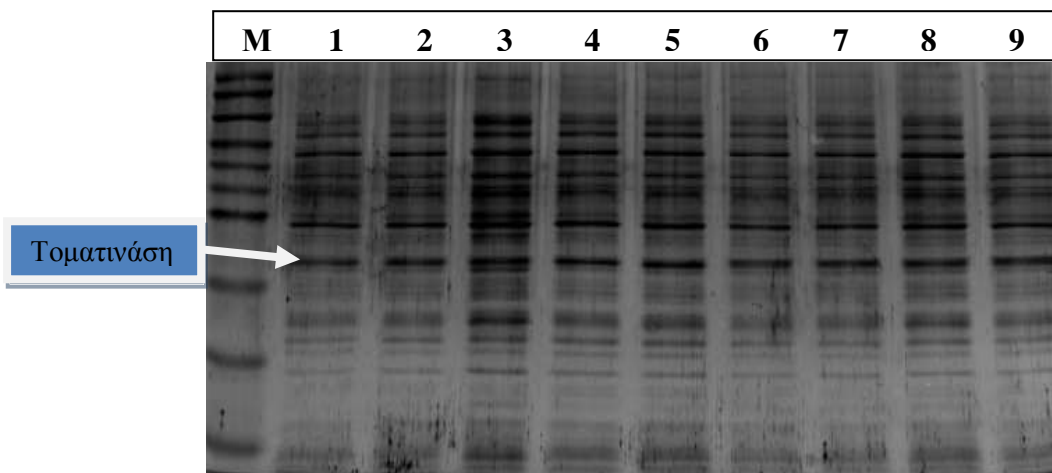
M: Marker	1: BL21, 37°C, 0,1mM IPTG, υπερκείμενο	2: BL21, 37°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο	3: BL21, 37°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο	4: BL21, 25°C, 0,1mM IPTG, υπερκείμενο	5: BL21, 25°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο	6: BL21, 25°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο	7: Rosetta, 37°C, 0,1 IPTG, υπερκείμενο	8: Rosetta, 37°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο	9: Rosetta, 37°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο
------------------	---	---	---	---	---	---	--	--	--



Εικόνα 26: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker
1: Rosetta, 25°C, 0,1mM IPTG, υπερκείμενο
2: Rosetta, 25°C, 0,5mM IPTG, υπερκείμενο
3: Rosetta, 25°C, 1mM IPTG, υπερκείμενο

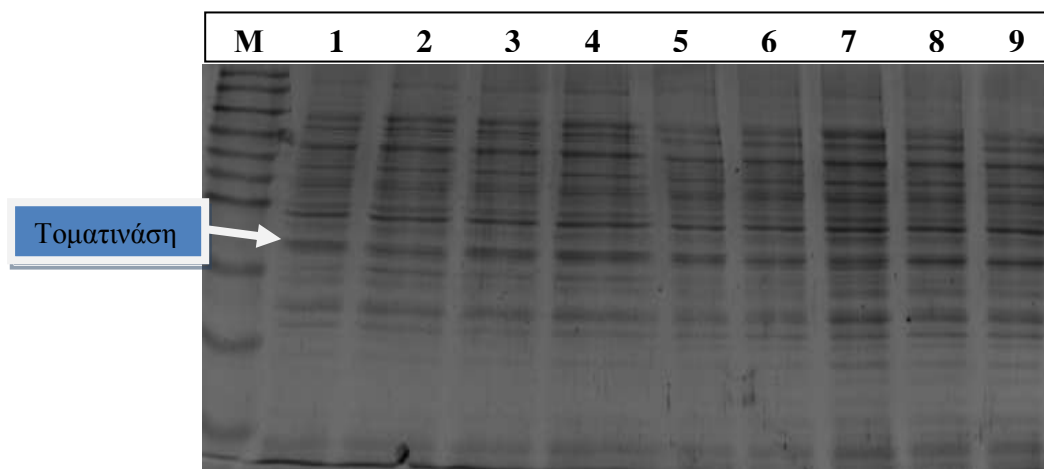
4: BL21, 25°C, χωρίς IPTG, υπερκείμενο
5: Rosetta, 25°C, χωρίς IPTG, υπερκείμενο
6: BL21, 37°C, 1mM IPTG, pellet
7: BL21, 37°C, 0,1mM IPTG, pellet
8: BL21, 25°C, 1mM IPTG, pellet
9: BL21, 25°C, 0,1mM IPTG, pellet



Εικόνα 27: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker
1: Rosetta, 25°C, 0,1mM IPTG για 2 ώρες, υπερκείμενο
2: Rosetta, 25°C, 0,5mM IPTG για 2 ώρες, υπερκείμενο
3: Rosetta, 25°C, χωρίς IPTG, υπερκείμενο
4: Rosetta, 25°C, 0,1mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο

5: Rosetta, 25°C, 0,5mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο
6: Rosetta, 15°C, 0,1mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο
7: Rosetta, 15°C, 0,5mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο
8: Rosetta, 15°C, χωρίς IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο
9: Rosetta, 15°C, 0,1mM IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο



Εικόνα 28: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker

1: Rosetta, 15°C, 0,5mM IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο

2: Rosetta, 15°C, χωρίς IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

3: Rosetta, 15°C, 0,1mM IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

4: Rosetta, 15°C, 0,5mM IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

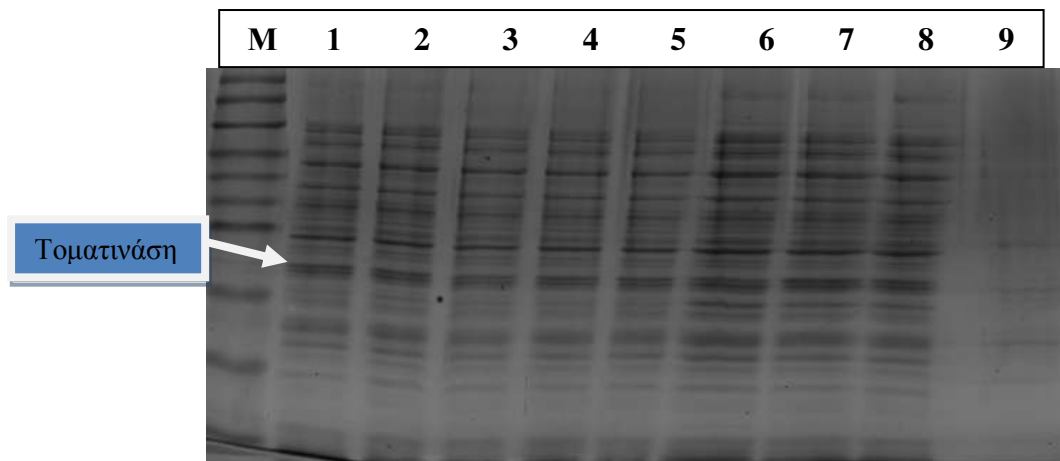
5: BL21, 25°C, 0,1mM IPTG για 2 ώρες, υπερκείμενο

6: BL21, 25°C, 0,5mM IPTG για 2 ώρες, υπερκείμενο

7: BL21, 25°C, χωρίς IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο

8: BL21, 25°C, 0,1mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο

9: BL21, 25°C, 0,5mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο



Εικόνα 29: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker

1: BL21, 15°C, 0,1mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο

2: BL21, 15°C, 0,5mM IPTG για 4 ώρες, υπερκείμενο

3: BL21, 15°C, χωρίς IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο

4: BL21, 15°C, 0,1mM IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο

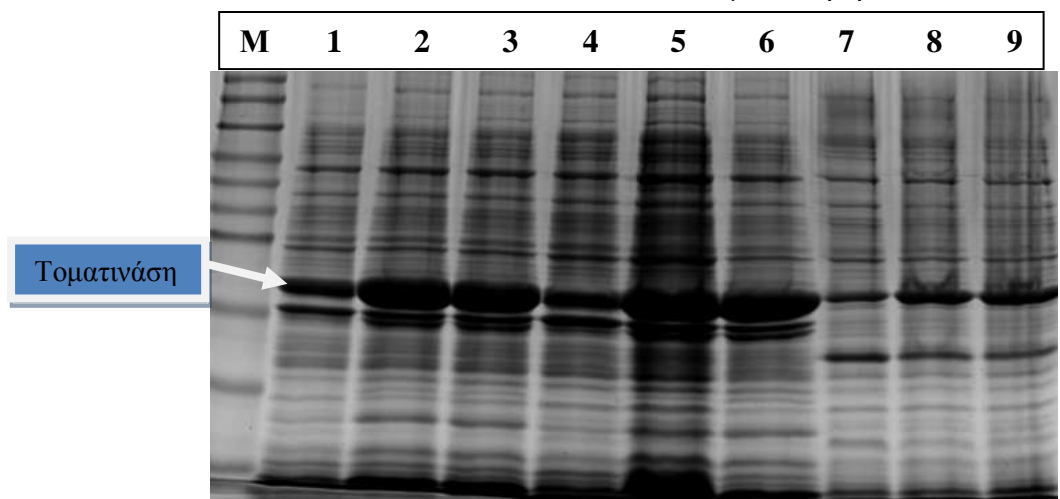
5: BL21, 15°C, 0,5mM IPTG για 6 ώρες, υπερκείμενο

6: BL21, 15°C, χωρίς IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

7: BL21, 15°C, 0,1mM IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

8: BL21, 15°C, 0,5mM IPTG για 18 ώρες, υπερκείμενο

9: Δείγμα από μύκητα έπειτα από απομόνωση πρωτεϊνών



Εικόνα 30: SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση

M: Marker

1: BL21, 15°C, χωρίς IPTG για 18 ώρες, pellet

2: BL21, 15°C, 0.1mM IPTG για 18 ώρες, pellet

3: BL21, 15°C, 0.5mM IPTG για 18 ώρες, pellet

4: Rosetta, 15°C, χωρίς IPTG για 18 ώρες, pellet

5: Rosetta, 15°C, 0.1mM IPTG για 18 ώρες, pellet

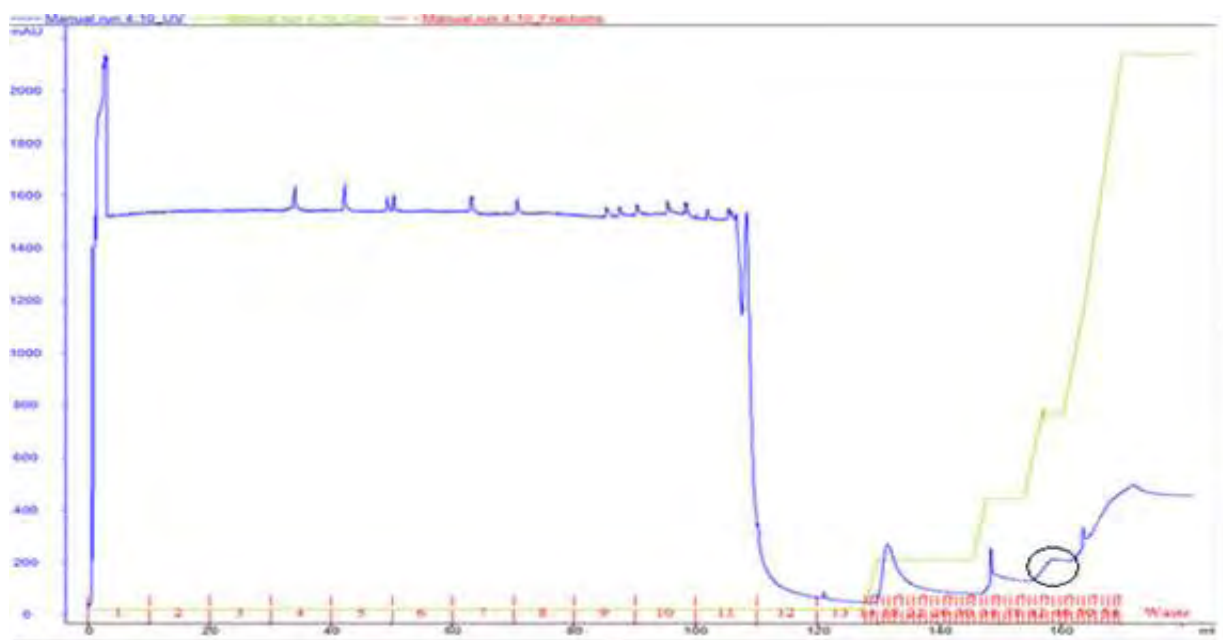
6: Rosetta, 15°C, 0.5mM IPTG για 18 ώρες, pellet

7: Rosetta, 15°C, χωρίς IPTG για 6 ώρες, pellet

8: Rosetta, 15°C, 0.1mM IPTG για 6 ώρες, pellet

9: Rosetta, 15°C, 0.5mM IPTG για 6 ώρες, pellet

5.4 Καθαρισμός τοματινάσης με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου

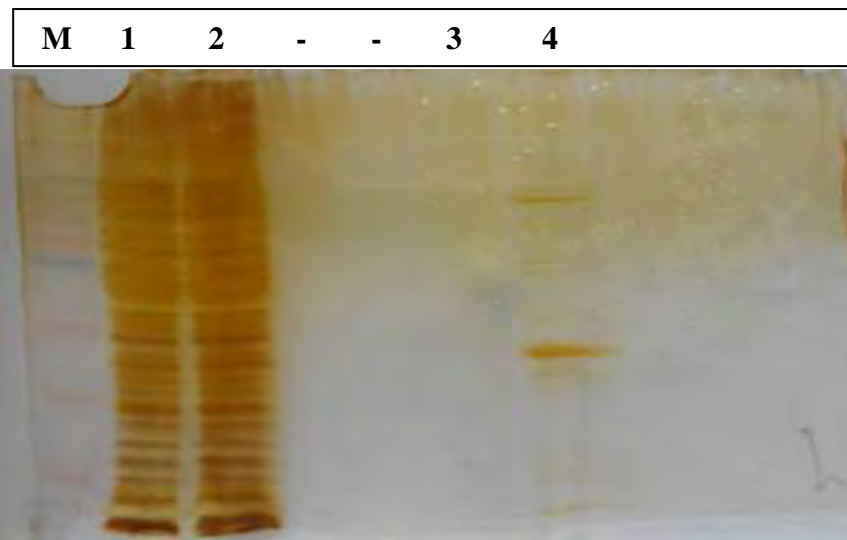


Εικόνα 31: Απομόνωση τοματινάσης με FPLC

5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έπειτα από καθαρισμό με στήλη

Έγιναν αρκετές προσπάθειες για την απομόνωση της τοματινάσης από στήλη νικελίου χωρίς ωστόσο επιτυχία καθώς ως επί το πλείστον δεν έδενε και κατέληγε στο flowthrough.

- 1) Ηλεκτροφόρηση έπειτα από απομόνωση με FPLC (πλασμίδιο: pET21):



Εικόνα 32: SDS-PAGE μετά από στήλη. Silver staining

M: Marker

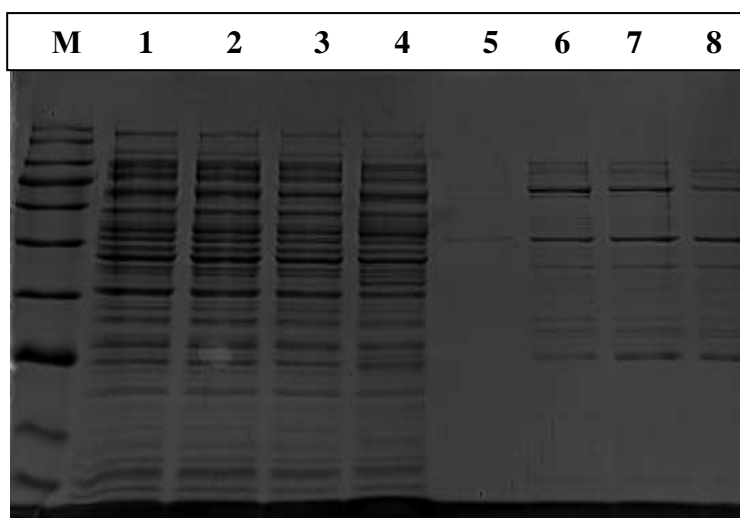
1: Δείγμα πριν τη στήλη

2: flowthrough

3: Wash

4: Elution

2) Ηλεκτροφόρηση μετά από FPLC (πλασμίδιο: pET28)



Εικόνα 33: SDS-PAGE μετά από στήλη

M: Marker

1: Δείγμα πριν την απομόνωση (απομόνωση υπερκειμένου με φυγοκέντρηση στις 8000rpm)

2: Δείγμα πριν την απομόνωση (απομόνωση υπερκειμένου με φυγοκέντρηση στις 12000rpm)

3: Flowthrough (2)

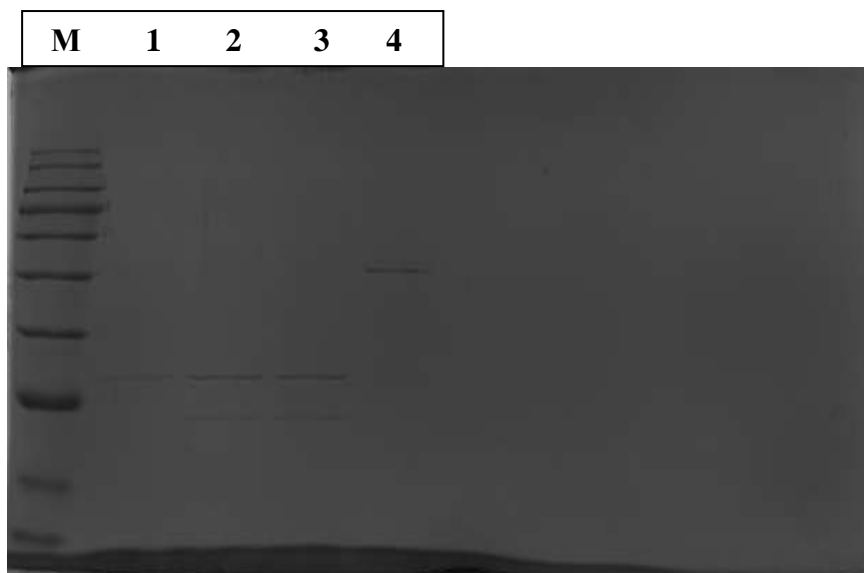
4: Flowthrough (11)

5: Wash (13)

6: Elution (17), 45mM Imidazole, πρώτη κορυφή

7: Elution (18), 45mM Imidazole, πρώτη κορυφή

8: Elution (19), 45mM Imidazole, πρώτη κορυφή



Εικόνα 34: SDS-PAGE μετά από στήλη

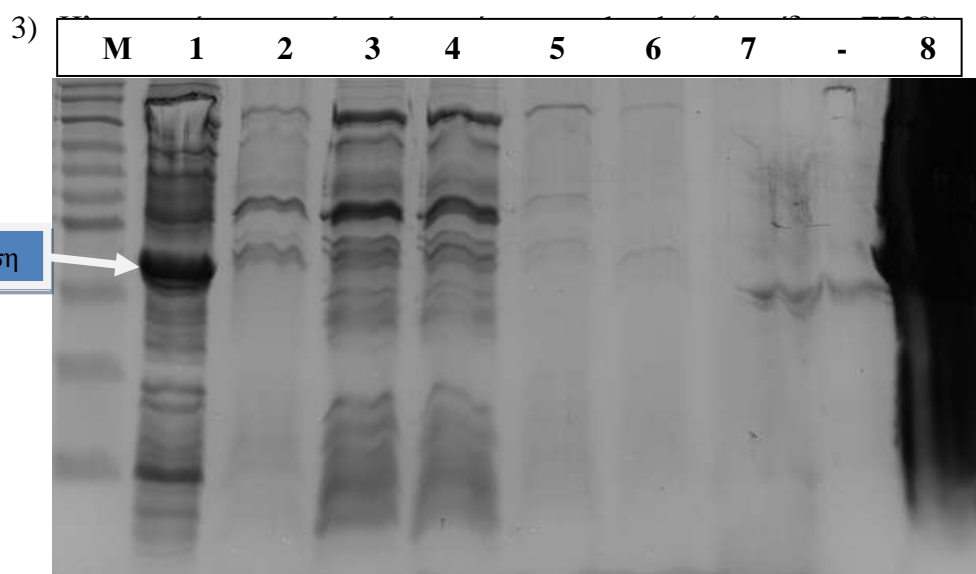
M: Marker

1: Elution (34), 100mM Imidazole, δεύτερη κορυφή

2: Elution (35), 100mM Imidazole, δεύτερη κορυφή

3: Elution (36), 100mM Imidazole, δεύτερη κορυφή

4: Elution (45), 200mM Imidazole, Τρίτη κορυφή



Εικόνα 35: SDS-PAGE μετά από στήλη

M: Marker

1: Flowthrough

2: Wash

3: Elution (100mM Imidazole)

4: Elution (100mM Imidazole)

5: Elution (200mM Imidazole)

6: Elution (500mM Imidazole)

7: Δείγμα από το LB που έγινε η καλλιέργεια

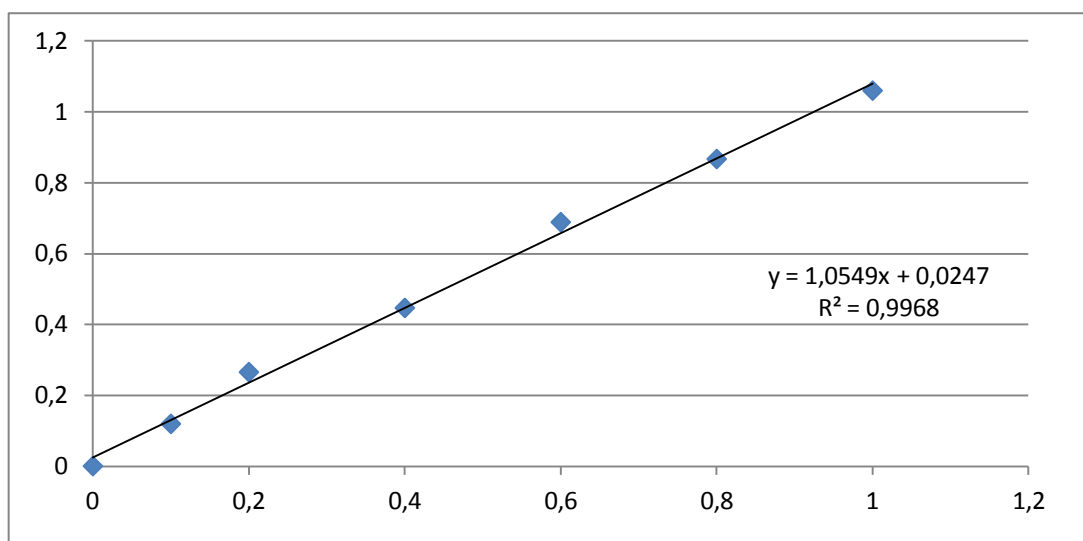
8: Δείγμα από το pellet

Όπως βλέπουμε, σε καμία περίπτωση η πρωτεΐνη δεν έδεσε στη στήλη, παρά μόνο έφευγε στο flowthrough. Μόνο σε μια περίπτωση εντοπίστηκαν μέσω TLC

κάποια ίχνη πρωτεΐνης στην δεύτερη FPLC (με πλασμίδιο το pET28, εικόνα 34, στο δείγμα 4 και εικόνα 31, η κυκλωμένη κορυφή), όπως θα δούμε και παρακάτω.

5.6 Πρότυπη καμπύλη Bradford

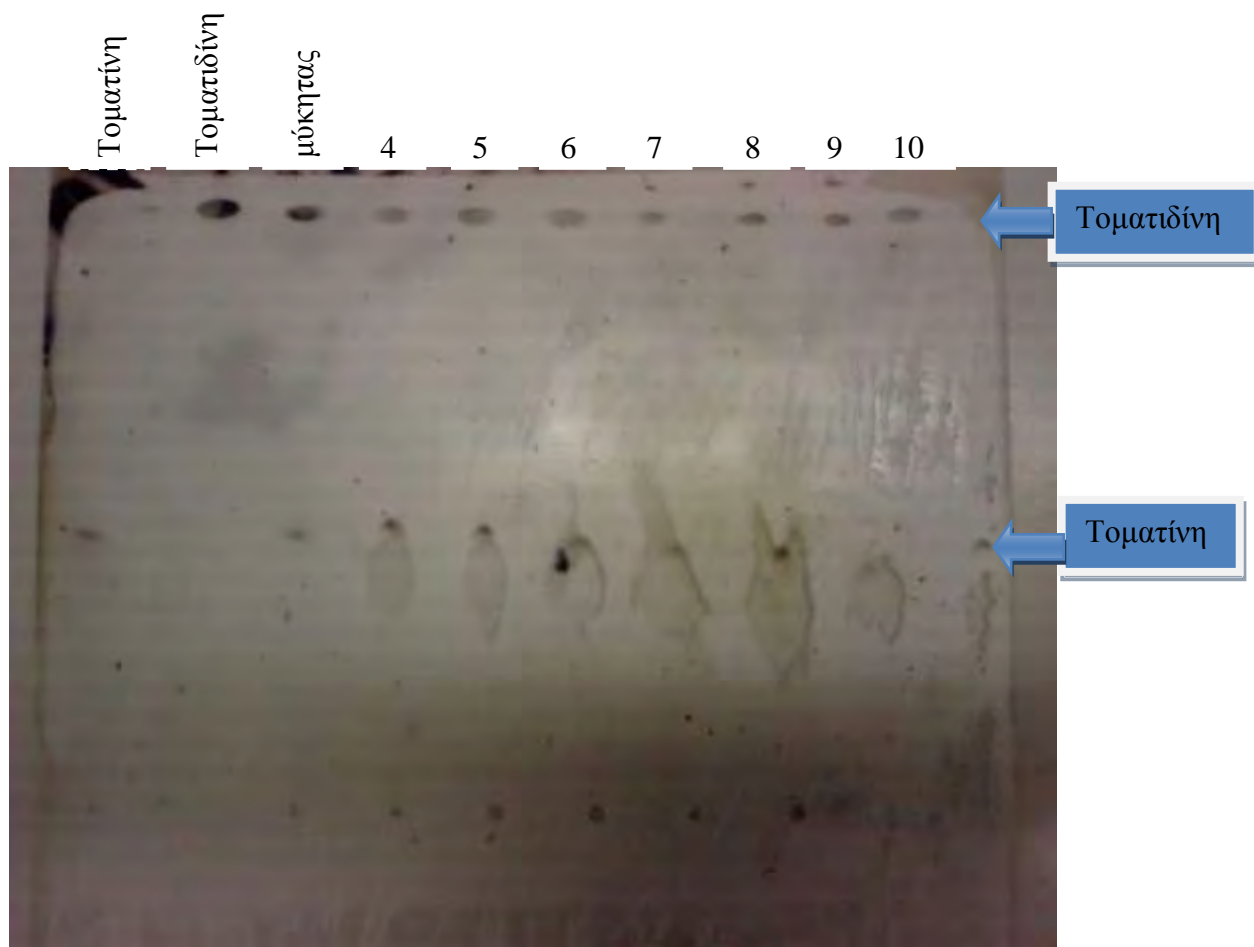
Από τις τιμές απορρόφησης γνωστής συγκέντρωσης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford

5.7 TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας)

Η τοματιδίνη απεικονίζεται στην πλάκα TLC σε συγκεκριμένο χαρακτηριστικό ύψος. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη τοματινίνης στα δείγματα μας, καθώς επίσης και ότι είναι ενεργή, αφού διασπά την τοματινίνη.



Εικόνα 36: Αποτελέσματα TLC (1)

4: Δείγμα από BL21, στους 25°C, επωασμένα για 4 ώρες με 0,1mM IPTG

5: Δείγμα από BL21, στους 25°C, επωασμένα για 4 ώρες με 0,5mM IPTG

6: Δείγμα από BL21, στους 25°C, επωασμένα για 2 ώρες με 0,5mM IPTG

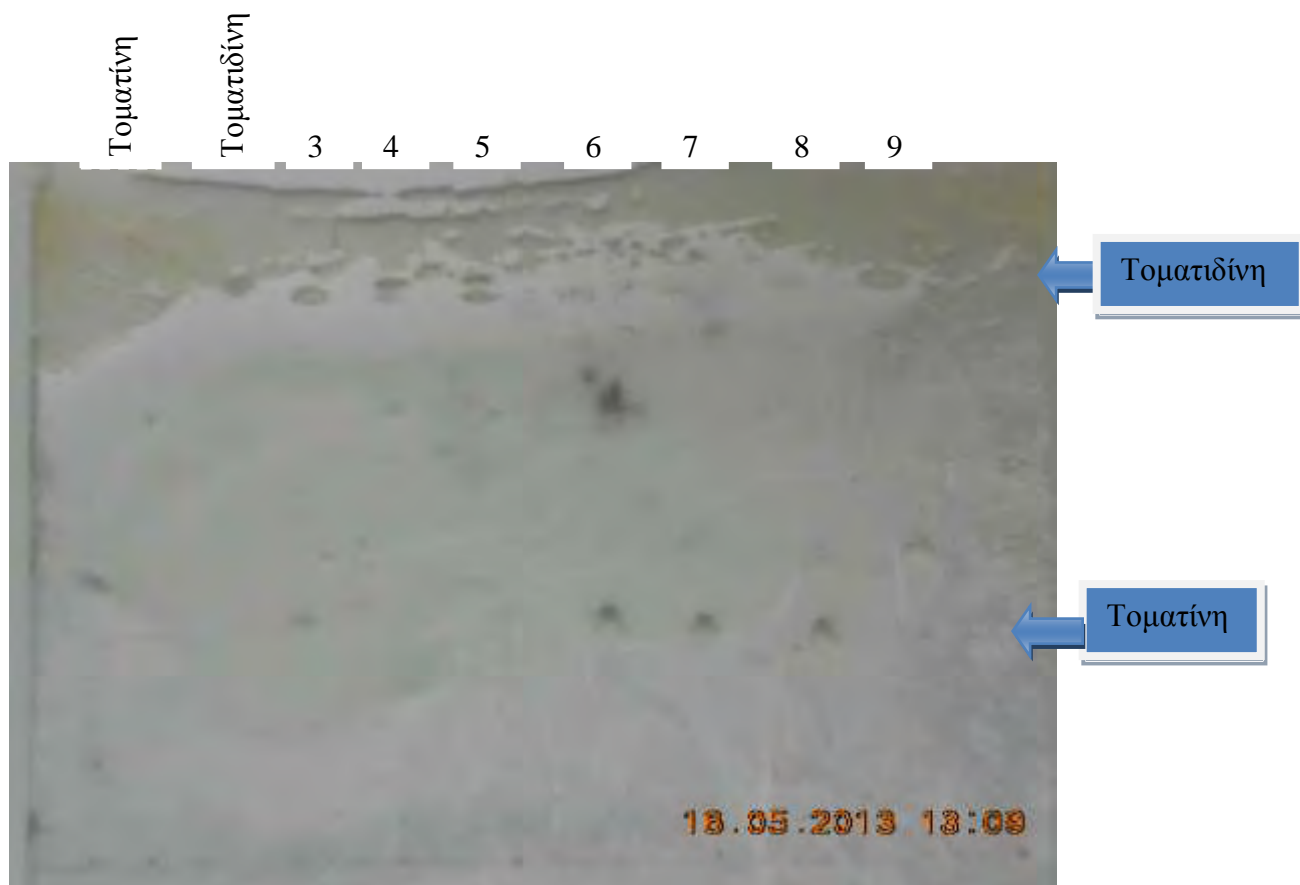
7: Δείγμα από Rosetta, στους 25°C, επωασμένα για 4 ώρες με 0,5mM IPTG

8: Δείγμα από Rosetta, στους 25°C, επωασμένα για 2 ώρες με 0,5mM IPTG

9: Δείγμα από Rosetta, στους 15°C, επωασμένα για 6 ώρες με 0,5mM IPTG

10: Δείγμα από BL21, στους 15°C, επωασμένα για 6 ώρες με 0,5mM IPTG

Σε αυτή την περίπτωση δοκιμάσαμε παράλληλα την πρωτεΐνη που απομονώθηκε από τον μύκητα, όσο και το υπερκείμενο έπειτα από το σπάσιμο των βακτηρίων για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι ενεργούς πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, όλα τα δείγματα είχαν ενεργή πρωτεΐνη καθώς, αν και κανένα δεν είχε διασπάσει πλήρως την τοματίνη, σε όλα ανιχνεύτηκε τοματιδίνη.



Εικόνα 37: Αποτελέσματα TLC (2)

- | | |
|---|---|
| 3: Δείγμα μύκητα | 7: Δείγμα από την δεύτερη κορυφή που έβγαλε η στήλη (34) |
| 4: Δείγμα από το flowthrough (2) | 8: Δείγμα από την δεύτερη κορυφή που έβγαλε η στήλη (35) |
| 5: Δείγμα από το flowthrough (11) | 9: Δείγμα από την τρίτη κορυφή που έβγαλε η στήλη (45) |
| 6: Δείγμα από την πρώτη κορυφή που έβγαλε η στήλη (18) | |

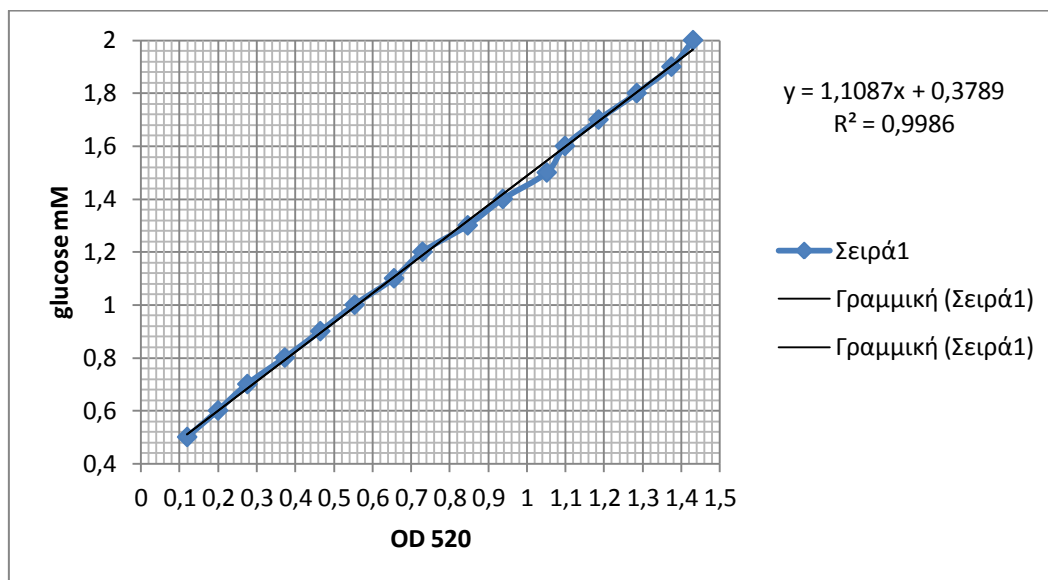
Στη δεύτερη περίπτωση έχουμε την TLC έπειτα από καθαρισμό της πρωτεΐνης με τη βοήθεια της FPLC (Η δεύτερη FPLC, με πλασμίδιο το pET28). Με βάση τις κορυφές και την ηλεκτροφόρηση, περιμέναμε η πρωτεΐνη να βρίσκεται στην δεύτερη κορυφή (δείγματα 34, 35), ωστόσο σε αυτά δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα τοματινάσης. Αντίθετα, υψηλή ενεργότητα είχαν και τα δύο δείγματα από το flow through που σημαίνει πως μεγάλη ποσότητα της πρωτεΐνης δεν έδεσε στο νικέλιο. Ωστόσο η τρίτη κορυφή (45, η κυκλωμένη κορυφή στην εικόνα 31) έδειξε επίσης να έχει ενεργότητα. Σύμφωνα με το gel, η κορυφή αυτή περιείχε μια πρωτεΐνη με αρκετά υψηλό μοριακό βάρος (~50kDa) για να είναι η τοματινάση. Ωστόσο πιθανολογούμε ότι η δραστηριότητα οφείλεται σε ίχνη πρωτεΐνης τα οποία έδεσαν στη στήλη αλλά δεν μπόρεσαν να φανούν ξεκάθαρα με την Coomassie.

5.8 Πρότυπη καμπύλη DNS με γλυκόζη

Η πρότυπη καμπύλη πραγματοποιήθηκε με συγκεντρώσεις γλυκόζης μεταξύ 0,5 και 2mM σε διάλυμα κιτρικού νατρίου, pH=5,3. Τα αποτελέσματα είναι τα παρακάτω:

Γλυκόζη (mM)	OD ₅₂₀
0,5	0,119
0,6	0,199
0,7	0,275
0,8	0,372
0,9	0,464
1	0,553
1,1	0,655
1,2	0,729
1,3	0,846
1,4	0,937
1,5	1,051
1,6	1,098
1,7	1,185
1,8	1,284
1,9	1,374
2	1,43

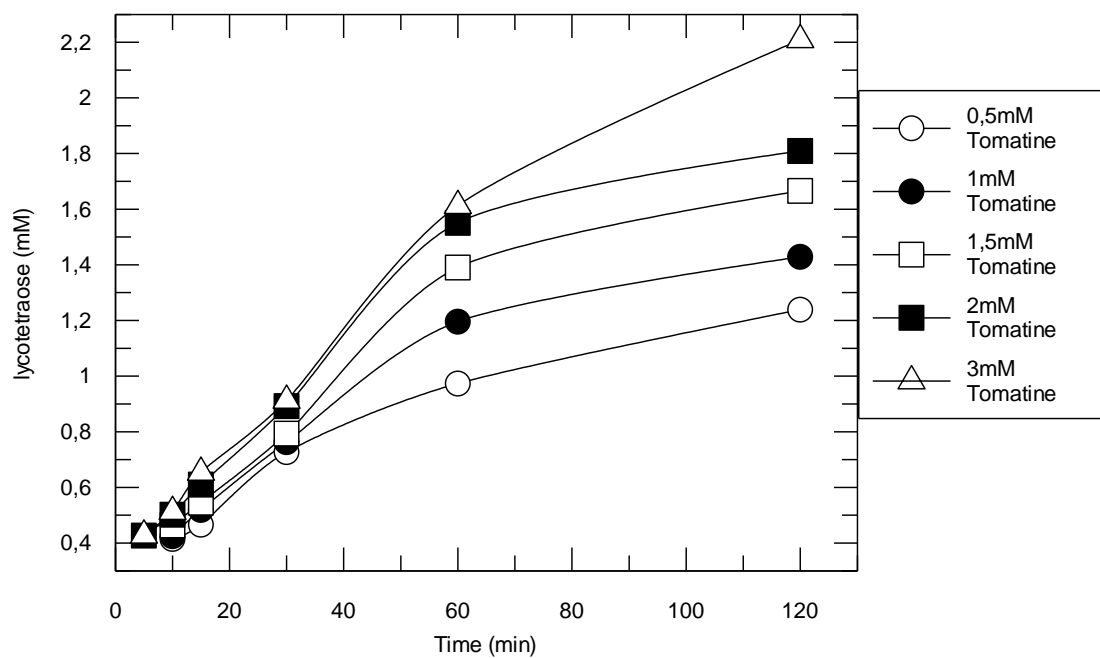
Πίνακας 8: Πρότυπη καμπύλη DNS



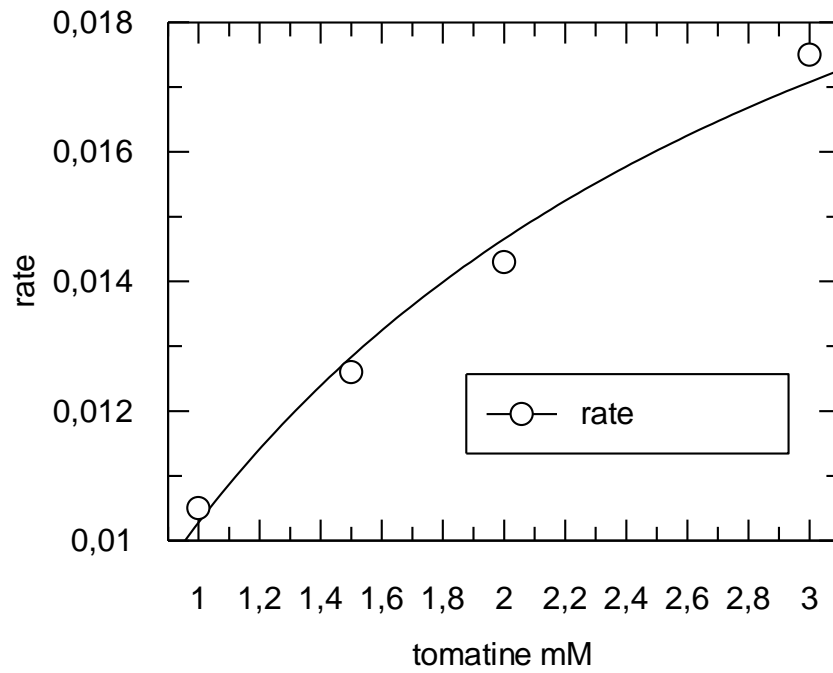
Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη DNS

5.9 Κινητική μελέτη τοματινάσης

Για τον υπολογισμό των V_{max} και K_m χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις τοματίνης (0,5, 1, 1,5, 2 και 3mM) σε 6 διαφορετικές χρονικές στιγμές (5, 10, 15, 30, 60, 120min). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Grafit και έχουν ως εξής:

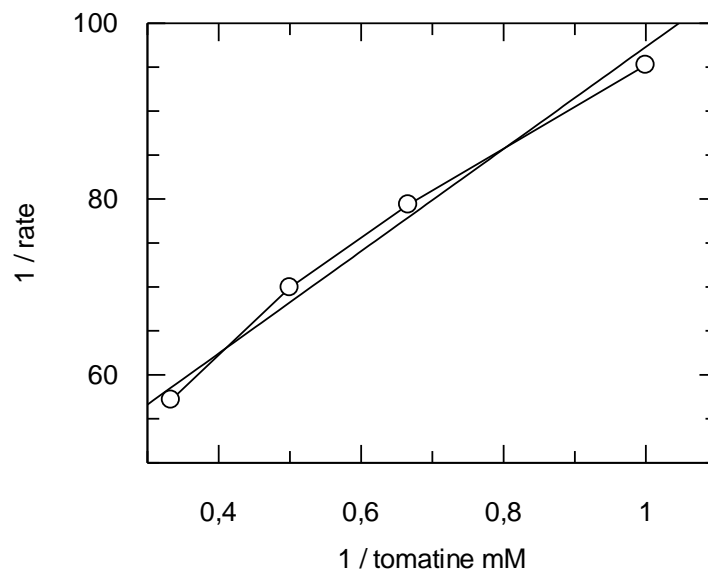


Διάγραμμα 3: Δημιουργία β -λυκοτετραόζης ανάλογα με τη συγκέντρωση τοματίνης



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,0255	0,0020
Km	1,4844	0,2448

Διάγραμμα 4: Καμπύλη Michaelis-Menten



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα Lineweaver-Burk

Βλέπουμε πως με βάση τα αποτελέσματά, η Km υπολογίζεται σε $1,48 \pm 0,24$ mM ενώ η Vmax σε $0,0255 \pm 0,002$ mM/min

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο *Fusarium solani* Fsk είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων, εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εποικήσει το ριζικό σύστημα της ντοματιάς, και αναλυτικότερα αναπτύσσεται ενδοφυτικά, εντός του αγωγού συστήματος. Η συμβίωση του μύκητα με το φυτό προσφέρει προστασία έναντι στον φυτοπαθογόνο μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*, και τον ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radicle-lycopersici* (Karvoulakis et al, 2007).

Αυτή η επίδραση του μύκητα σχετίζεται με το αιθυλένιο και όχι το γιασμονικό οξύ καθώς σε μεταλλάγματα για το σηματοδοτικό μονοπάτι του αιθυλενίου ο μύκητας δεν είχε επίδραση, ενώ αυτά για το γιασμονικό προστατεύτηκαν αποτελεσματικά.

Η ικανότητα του *Fusarium solani* Fsk να επιζεί εντός της ντοματιάς προϋποθέτει την παράκαμψη της θεμελιώδους άμυνας του φυτού και κυρίως της τοματινής. Η τοματίνη προέρχεται από τριτερπένια, καθώς αποτελείται από μια αγλυκόνη (στρεοειδές γλυκοαλκαλοειδές) και ένα τετρασακχαρίδιο, την β-λυκοτετραόζη. Βρίσκεται τόσο σε υπέργειους όσο και σε υπόγειους ιστούς της ντομάτας και έχει αντιμικροβιακή δράση καθώς μπορεί να αλληλεπιδράσει με την κυτταρική μεμβράνη μικροοργανισμών αυξάνοντας τη διαπερατότητά της οδηγώντας έτσι στο θάνατο ενώ φέρεται να έχει και ένα μηχανισμό δράσης που σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και άρα τη δημιουργία οξειδωτικού στρες στον μικροοργανισμό.

Ο μύκητας διαθέτει ένα ένζυμο με ικανότητα αποτοξικοποίησης της τοματινής, την τοματινάση. Πρόκειται για μια γλυκοσιδάση που διασπά την τοματίνη σε τοματιδίνη (αγλυκόνη) και το τετρασακχαρίδιο β-λυκοτετραόζη. Ένζυμα με δραστηριότητα τοματινάσης έχουν εντοπιστεί σε πολλά παθογόνα ντομάτας (Seipke & Loria, 2008; Kaup et al, 2005; Roldan-Arjona et al, 1999; Lairini & Ruiz-Rubio, 1997; Sandrock et al, 1995), καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποφυγή της θεμελιώδους άμυνας του φυτού. Οι κινητικές μελέτες που έγιναν σε άλλες τοματινάσες έδειξαν ότι το K_m ποικίλλει από 650μM έως και 1,1mM, ενώ η V_{max} έχει υπολογιστεί στα 118 μmol/min/mg. Για τον *Fusarium solani* Fsk δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά τα κινητικά και τη δομή της τοματινάσης ενώ δεν μπορεί να γίνει υπολογισμός της δομής μέσω ομολογίας με κοντινά είδη καθώς οι

τοματινάσες όπως και γενικά οι γλυκοσιδάσες είναι εξαιρετικά αποκλίνουσες πρωτεΐνες.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός (κινητική μελέτη) της τοματινάσης με απώτερο στόχο τη μελέτη της δομής της μέσω κρυσταλλογραφίας. Η απομόνωση επιχειρήθηκε τόσο από καλλιέργεια μύκητα, όσο και από καλλιέργεια βακτηρίων έπειτα από μετασχηματισμό τους με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη.

Η καλλιέργεια μύκητα μας έδωσε μεν ενεργή πρωτεΐνη όπως φάνηκε και στην TLC, ωστόσο η ποσότητα ήταν πολύ μικρή για περαιτέρω μελέτη όπως συνέβη και σε παλιότερες προσπάθειες απομόνωσης από μύκητα. Γι αυτό το λόγο επιχειρήθηκε η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας διάφορα στελέχη E.coli. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα BL21, BL21 gold και Rosetta.

Η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης είχε επιχειρηθεί και προηγουμένως χωρίς όμως επιτυχία. Πιο συγκεκριμένα, είχε χρησιμοποιηθεί υβριδική τοματινάση με GST στον pET49b σε πολλές διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας ωστόσο κάθε φορά η πρωτεΐνη έβγαινε στο ίζημα, δηλαδή ήταν αδιάλυτη και δημιουργούσε συσσωματώματα (inclusion bodies).

Γι αυτό το λόγο θεωρήθηκε ότι πρέπει να γίνει αλλαγή στο ένζυμο, με την αφαίρεση της GST. Έτσι, έχοντας την αλληλουχία του γονιδίου και αφού το ενίσχυσα με PCR, το κλωνοποίησα με το πλασμίδιο pET21a που προσθέτει His-tag στο καρβόξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ώστε να μπορεί να καθαριστεί σε στήλη νικελίου. Αρχικά έκανα δοκιμή με τα BL21 και τα BL21 gold, αλλά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοματινάση παρέμεινε αδιάλυτη στο ίζημα όσες αλλαγές κι αν έγιναν στο πρωτόκολλο έκφρασης σε θερμοκρασία, ποσότητα και ώρα επαγωγής με IPTG.

Στη συνέχεια άλλαξα πλασμίδιο και δοκίμασα το pET28a (επίσης C-τελική His-tag) στα BL21 και τα Rosetta. Όπως φάνηκε και στα τζελ, υπήρξε καλύτερη απόδοση σε όλες σχεδόν τις δοκιμές, με τα καλύτερα αποτελέσματα να τα δίνουν τα BL21 που αυξάνονταν στους 25°C με 0,5mM IPTG για 4 ώρες. Ωστόσο όταν δοκίμασα αυτές τις συνθήκες σε μεγαλύτερη καλλιέργεια (1,6L) και πέρασα το υπερκείμενο από την FPLC, δεν έδωσε παρά ελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης και μάλιστα χωρίς να είναι καθαρό το έκλουσμα όπως φαίνεται στην εικόνα 33 (4) και στην εικόνα 31, η κυκλωμένη κορυφή.

Η τελευταία δοκιμή έγινε με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε το 1999 από τους Roldán-Arjona, A Pérez-Espinoso και M Ruiz-Rubio και το 2004 από τους

Woods, Hamilton και Field , σύμφωνα με το οποίο απομόνωσαν 14,5mg τοματινάσης του μύκητα *Fusarium oxysporum f spp. Lycopersici*, κλωνοποιημένης στο πλασμίδιο pET16b (10 ιστιδίνες αντί για τις 6 που έχουν οι pET21 και pET28), από 500ml καλλιέργειας BL21. Το πρωτόκολλο αναφέρεται στις τεχνικές. Με αυτόν τον τρόπο φάνηκε να έχουμε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σύμφωνα πάντα με την ηλεκτροφόρηση, ωστόσο η προσπάθεια για καθαρισμό δεν απέδωσε καρπούς καθώς όλη η πρωτεΐνη έφευγε στο flow through.

Εξ αιτίας αυτού, υπέθεσα ότι ίσως το καρβοξυτελικό άκρο και ειδικότερα η ουρά ιστιδίνης της τοματινάσης να είναι, έστω και μερικώς, 'βυθισμένες' στην τριτοταγή δομή του ενζύμου και ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη στήλη νικελίου ή να αλληλεπιδρά πολύ ασθενώς κι έτσι το ιμιδαζόλιο που χρησιμοποιείται στο binding buffer αποτρέπει την πρόσδεση. Έτσι έγινε δοκιμή με τη χρήση ουρίας (8M) στο binding buffer ωστόσο και πάλι το ένζυμο δεν έδεσε στη στήλη γεγονός που υποδεικνύει πως υπήρχε κάποιο πρόβλημα με το His-tag του πλασμιδίου με αποτέλεσμα ή να μην εκφράζεται καν, ή να κόβεται κατά την έκφραση της τοματινάσης. Σε αυτό συντελεί και το μοριακό βάρος που βλέπουμε στα τζελ (~32kDa) σε σύγκριση με το θεωρητικό μοριακό βάρος με βάση την αλληλούχιση του γονιδίου (~37kDa), γεγονός που υποδεικνύει ότι ίσως αποκόπτεται ένα μέρος του καρβοξυτελικού άκρου (~5kDa) με αποτέλεσμα να χάνεται το His-tag και να μην μπορεί να δέσει η πρωτεΐνη στη στήλη αν και διατηρεί την ενεργότητα της.

Επειδή δεν ήταν δυνατός ο καθαρισμός του ενζύμου δεν μπόρεσα να υπολογίσω την ειδική ενεργότητα καθώς δεν ήξερα την ακριβή ποσότητα της τοματινάσης στο διάλυμα. Έτσι υπολογίστηκε μόνο η γενική ενεργότητα. Δοκιμάστηκαν διάφορες χρονικές στιγμές (5, 10, 15, 30, 60 και 120 λεπτά) και συγκεντρώσεις τοματινής (0,5, 1, 1,5, 2 και 3mM) και πήρα τιμή $K_m = 1,48\text{mM}$ και $V_{max} = 0,0255\text{mM/min}$

Κλείνοντας, με βάση την αλληλουχία του γονιδίου εντοπίστηκε στο αμινοτελικό άκρο ένα πεπτίδιο οδηγός το οποίο στον μύκητα είναι υπεύθυνο για τον εξωκυτταρικό εντοπισμό της τοματινάσης. Ωστόσο δεν είναι γνωστό αν θα μπορούσε να έχει την ίδια δράση και στα *E.coli* (γεγονός που θα οδηγούσε μεγάλο ποσοστό της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά), ή αν μπορεί να έχει γενικά κάποια επίδραση στην ετερόλογη έκφραση της τοματινάσης. Έτσι, θα μπορούσε να γίνει αποκοπή του πεπτιδίου για να φανεί αν επηρέαζε κάτι και σε τι βαθμό. Επόμενο βήμα στη έρευνα για την τοματινάση είναι ο καθαρισμός για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας και η απομόνωση ικανής ποσότητας για κρυσταλλογραφική μελέτη της δομής της.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahn IP, Park K, Kim CH. 2002. Rhizobacteria-induced resistance perturbs viral disease progress and triggers defence-related gene expression. *Molecular Cell* 13, 302–308.
2. Ajit Varma, Savita Verma, Sudha, Nirmal Sahay, Britta Butehorn and Philipp Franken, 1998, *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte.
3. Adams, P.B. and Ayres, W.A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*.
4. Azcon-Aguilar C, Barea JM. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68, 1–24.
5. Bamford VA, Kolade OO, Osbourn AE, Hemmings AM(2004). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Jul;60(Pt 7):1331-3.
6. Barry CS, Fox EA, Yen H, Lee S, Ying T, Grierson D, Giovannoni JJ. 2001. Analysis of the ethylene response in the epinastic mutant of tomato. *Plant Physiology* 127, 58–66.
7. Benhamou N, Klopper JW, Quadt-Hallman A, Tuzun S. 1996. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* 112, 919–929.
8. Bolwerk A, Lagopodi AL, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. 2005. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 18, 710–721.
9. Borowicz VA. 2001. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant–pathogen relations? *Ecology* 82, 3057–3068.
10. Brayford D. 1996. *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*. *Mycopathologia* 133, 61–63.
11. Chandanie WA, Kubota M, Hyakumachi M. 2006. Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*

- and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant and Soil* 286, 209–217.
12. Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi- Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 11, 1017–1028.
 13. Défago G., Kern H., 1983. Induction of *Fusarium solani* mutants insensitive to tomatine, their pathogenicity and aggressiveness to tomato fruits and pea plants. *Physiological Plant Pathology* 22 (1): 29-37
 14. Diaz J., Silvar C., Varela M., Bernal A., Merino F., 2005 *Fusarium* confers protection against several mycelia pathogens of pepper plants.
 15. Diaz J, ten Have A, van Kan JAL. 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 129, 1341–1351.
 16. Dillard, H.R. and Cobb, A.C. 1995. Relationship between leaf injury and colonization.
 17. Duijff BJ, Pouhair D, Olivain C, Alabouvette C, Lemanceau P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* 104, 903–910.
 18. Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185–209.
 19. Fillion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f.sp *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology* 93, 229–235.
 20. Fuchs G, Y. Moenne-Loccoz and G. Defago, 1998. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to Protect Tomato against *Fusarium* Wilt
 21. Geraats BPJ, Bakker PAHM, Lawrence CB, Achuo EA, Hoffte M, van Loon LC. 2003. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* 93, 813–821.

22. Gernns H, von Alten H, Poehling H-M. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen: is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11, 237–243.
23. Gideon Davies and Bernard Henrissat, 1995, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases
24. Hase S, Van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2003. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 219–226.
25. Hoitink HAJ, Boehm MJ. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37, 427–446.
26. Ito S, Ihara T, Tamura H, Tanaka S, Ikeda T, Kajihara H, Dissanayake C, Abdel-Motaal FF, El-Sayed MA 2007. alpha-Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.* 2007 Jul 10;581(17):3217-22. Epub 2007 Jun 15.
27. Karvoulakis, N. Ntougias, S. Zervakis, GI. Ehaliotis, C. Haralampidis, K. Papadopoulou, KK.2007.Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of experimental botany.*58(14):3853-3864.
28. Kavroulakis N, Ehaliotis C, Ntougias S, Zervakis GI, Papadopoulou KK. 2005. Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 163–174.
29. Kavroulakis N, Papadopoulou KK, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C. 2006. Cytological and other aspects of pathogenesis-related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. *Annals of Botany* 98, 555–564.
30. Kaup, O., Grafen, I., Zellerman, E.M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., 2005, Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Glavibacter michiganensis* NGPPB382. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005 Oct;18(10):1090-8.

31. Kumiko Oka, Akiko Okubo, Motoichiro Kodama and Hiroshi Otani
2006, Detoxification of α -tomatinase by tomato pathogens *Alternaria alternata*
tomato pathotype and *Corynerpora casii* and its role in infection
32. Lairini K, APerez-Espinoza, M Pineda, and M Ruiz-Rubio, May
1996, Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium*
oxysporum f. sp. *Lycopersici*
33. Lairini, K., Perez-Espinosa, A. & Ruiz-Rubio, M. (1997). Tomatinase
induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of
tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50, 37±52.
34. Lairini, K. & Ruiz-Rubio, M. (1997). Detection of tomatinase from *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici* in infected tomato plants. *Phytochemistry* 45,
1371±1376.
35. Lairini K, Ruiz-Rubio, 1998. Detoxification of α -tomatine by *Fusarium solani*.
Mycol. Res. 102 (11) : 1375±1380
36. Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, 2002, Plant Physiology
37. Liu JY, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD,
Harrison MJ. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is
accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an
increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50, 529–544.
38. Martin-Hernandez AM, Dufresne M, Hugouvieux V, Melton R, Osbourn A.
2000. Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction
of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Molecular Plant–Microbe*
Interactions 13, 1301–1311.
39. Naumoff D.G., 2011. Hierarchical Classification of Glycoside Hydrolases.
Biochemistry (Moscow), 2011, Vol. 76, No. 6, pp. 622_635
40. Olivain C., Alabouvette C., 1998, Process of tomato root colonization by a
pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison
with a non-pathogenic strain
41. Osbourn, A. (1996). Saponins and plant defense ± a soap history. *Trends in*
Plant Science 1, 4±9.
42. Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azco´n-
Aguilar C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal
fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal*
of Experimental Botany 53, 525–534.

43. Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1999. Microbiology. 4th edition. McGraw-hill
44. Punja ZK, Utkhede RS. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology 21, 400–407.
45. Quidde T, A. E. Osbourn and P. Tudzynski , 1998 , Detoxification of α -tomatinase by *Botrytis cinerea*
46. Redman Regina S., Dunigan David D., Rodriguez Rusty J.,2001,Fungal symbiosis from mutualism to parasitism : who controls the outcome, host or invader?
47. Roddick, J. G. (1974). The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. *Phytochemistry* 13, 9±25.
48. Roddick, J. G. (1979). Complex formation between solanaceous steroidal alkaloids and free sterols *in vitro*. *Phytochemistry* 18, 1467±1470.
49. Roddick, J. G.&Drysedale, R. B. (1984). Destabilization of liposome membranes by the steroidal glycoalkaloid α -tomatine. *Phytochemistry* 23, 543±547.
50. Roldán-Arjona, A Pérez-Espinosa, M Ruiz-Rubio, 1999. Tomatinase from *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* defines a new class of saponinases. Mol Plant Microbe Interact. 1999 Oct ;12 (10):852-61
51. Sandrock, R. W.,Della Penna, D., VanEtten, 1995, ppurification characterization of β 2-tomatinase ,an Enzyme involved in the Degredation of α -tomatinase and Isolation of the GeneEncoding β 2-tomatinase from *Septoria lycopersici*. Mol Plant Microbe Interact. 1995 Nov-Dec;8(6):960-70.
52. Schonbeck, F. & Schlo\$ sser, E. (1976). Preformed substances as potential protectants. In *Physiological Plant Pathology* (ed. R. Heitefus & P. H. Williams), pp. 653±678. Springer-Verlag : Berlin.
53. Seipke R, Loria R, 2008. *Streptomyces scabies* 87-22 Possesses a Functional Tomatinase. J. Bacteriol. December 2008vol. 190 no. 23 7684-7692
54. Simons V, Morrissey JP, Latijnhouwers M, Csukai M, Cleaver A, Yarrow C, Osbourn A (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2732-40

55. Simos G., Panagiotidis C. A., Skoumbas A., Choli D., Ouzounis C., Georgatos J. G., 1993, Barley β -glukosidase : expression during seed germination and maturation and partial amino acid sequences
56. Simos G., Georgatos J. G. 1988, Lactose-hydrolysing β -glycosidases of barley meal
57. Sprague SJ, Watt M, Kirkegaard JA, and Howlett GJ, 2007, Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*.
58. Teresa Roldan-Arjona, Alonso Perez-Espinoza, and Manuel Ruiz-Rubio, 1999, Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Defines a New Class of Saponinases
59. Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135, 530–538.
60. Tsutomu A, Hideki T, Motoichiro K, Tohru T, 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology* 24, 135–147
61. Woods K, Hamilton C, Field R., 2004. Enzymatic liberation of lycotetraose from the *Solanum* glycoalkaloid α -tomatine. *Carbohydrate Research* 339 (2004) 2325–2328
62. Vicky A. Bamford, Ola O. Kolade, Anne E. Osbourn and Andrew M. Hemmings, 2004, Purification, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme.
63. Vinale Francecco, Sivasithamparam Krishnapillai, Ghisalberti Emilio L., Marra Roberta, Woo Sheridan L., Lorito Matteo, 2007, *Trichoderma*-plant – pathogen interactions
64. Zaccardelli, M., Campanile, F., Cammareri, M. and Grandillo, S. 2011. Agronomical use of α -tomatine and crude extracts of *solanum* spp. to control phytopathogenic fungi. *Acta Hort. (ISHS)* 914:401-404
65. Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J., Kloepper, J.W., 2001. Application to rhizobacteria for induced resistance.