



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Υπερέκφραση και καθαρισμός του πολυπεπτιδίου CYP79B2, μιας μονοξυγενάσης κυτοχρώματος P450, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό *Eruca sativa*

Overexpression and purification of CYP79B2, a cytochrome P450 monooxygenase involved in the biosynthesis of indole glycosinolates in the plant *Eruca sativa*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ - ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΗΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2012

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τσίκου Δανιέλα, Διδάσκουσα με σύμβαση (ΠΔ 407/80) ΤΒΒ, Π.Θ.

Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Ευχαριστίες:

Αρχικά θα ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Παπαδοπούλου που με αποδέχτηκε στο εργαστήριό της εκείνη την πολύ κρίσιμη χρονική στιγμή, αλλά και την κυρία Τσίκου Δανιέλα για την άριστη συνεργασία μας, και την άκρως απαραίτητη βοήθειά της παρ' όλες τις υποχρεώσεις της. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Κατσαρού για την καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια της εργασίας. Τέλος ευχαριστώ θερμά τον πατέρα μου Άγγελο Αντωνόπουλο και την προπτυχιακή φοιτήτρια Πανταζή Ιωάννα για την βοήθειά τους .

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
A. Εισαγωγή.....	5
1. <i>Eruca sativa</i> – Ρόκα.....	5
2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες και Γλυκοσινολικά Οξέα.....	6
2.1 Γενικά – Ιδιότητες.....	6
2.2 Κατηγορίες	7
3. Τα γλυκοσινολικά Οξέα.....	8
3.1 Γενικά-Βιολογικός ρόλος στα φυτά.....	8
3.2 Μηχανισμός φυτοπροστατευτικής δράσης.....	9
3.3 Τελικά προϊόντα υδρόλυσης γλυκοσινολικών.....	10
3.4 Χρήση και επίδραση των γλυκοσινολικών οξέων στον άνθρωπο.....	11
3.5 Κατηγορίες και ποικιλομορφία γλυκοσινολικών οξέων.....	12
3.6 Βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων.....	13
3.6.1 Γενικά.....	13
3.6.2 Πρώτο στάδιο, επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος.....	13
3.6.3 Δεύτερο στάδιο, η κατασκευή του πυρήνα των γλυκοσινολικών.....	14
3.6.4 Τρίτο στάδιο.....	16
4. Το γονίδιο CYP79B2.....	17
B.Υλικά – Μέθοδοι.....	19
1. Φορέας έκφρασης pET, κλωνοποίηση και έκφραση της πρωτεΐνης.....	19
2. Κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης.....	21
2.1 Προετοιμασία ανασυνδυασμένων γονιδίων και φορέων έκφρασης για κλωνοποίηση.....	21
2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτική αγαρόζη.....	22
2.3 Ανάκτηση DNA από την πηκτική.....	23
2.4 Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης.....	23

2.5 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων.....	24
2.6 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> BL21 (DE3) με ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης	25
2.7 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα.....	25
3. Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου.....	26
4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου Protino® Ni-NTA Agarose κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.....	27
4.1 Λύση των κυττάρων και απομόνωση των inclusion bodies.....	28
4.2 Διαλυτοποίηση inclusion bodies.....	29
4.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες..	29
5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	30
6. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue.....	33
7. Απομόνωση της πρωτεΐνης από την πηκτή με ηλεκτρο-έκλουση (Electroelution).....	33
Γ. Αποτελέσματα.....	35
1. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>EsCYP79B2</i>	35
2. Έκφραση του γονιδίου <i>EsCYP79B2</i>	35
3. Καθαρισμός της πρωτεΐνης <i>EsCYP79B2</i> με χρωματογραφία συγγένειας.....	37
Δ. Συζήτηση.....	40
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία στόχος μας ήταν η κλωνοποίηση, η έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *EsCYP79B2*. Το γονίδιο αυτό, που είχε απομονωθεί από τη ρόκα, εκφράζει μια μονοξυγενάση του συμπλόκου P450, που καταλύει την πρώτη αντίδραση στο δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Το παραπάνω γονίδιο ήταν κλωνοποιημένο σε φορέα pGEM. Αρχικά μεταφέρθηκε στο φορέα έκφρασης pET49b, στη συνέχεια έγινε επαγωγή της έκφρασης και ακολούθησε απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία στήλης νικελίου σε αποδιατακτικές συνθήκες. Ο τελικός καθαρισμός της από την παρουσία άλλων πρωτεϊνών έγινε με απομόνωσή της από πηκτή ακρυλαμίδης και ηλεκτρο-έκλυση. Τελικά ανακτήσαμε την πρωτεΐνη σε εξαιρετικά καθαρή μορφή και ικανοποιητική ποσότητα ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές όπως για παράδειγμα παραγωγή αντισωμάτων.

A. Εισαγωγή

1. *Eruca sativa* – Ρόκα

Η ρόκα είναι ένα μονοετές εδώδιμο φυτό που προέρχεται και ευδοκίμει στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae, έχει βιολογικό κύκλο περίπου 7 εβδομάδες και γονιδίωμα μήκους 560MB καταμεμημένο σε $2n=22$ χρωμοσώματα. Το ύψος του ανέρχεται στα 40-70 εκατοστά, το ανθός του είναι σε χρώμα άσπρου της κρέμας και έχουν σταυρωτό σχήμα, τυπικό για την οικογένεια Brassicaceae.

Καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό. Τα φύλλα του από μονά τους η μαζί με αλλά λαχανικά καταναλώνονται ως συστατικά σε σαλάτες. Επίσης χρησιμοποιείται από το Μεσαίωνα σε θεραπείες με βότανα και έχει αποδειχθεί ότι περιέχει ενώσεις με αντιοξειδωτική, διουρητική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση όπως τα γλυκοσινολικά οξέα.

Ακόμα είναι γνωστό ότι τα σπέρματα του περιέχουν πολύ υψηλή συγκέντρωση σε έλαια όπως το ερουκικό που το καθιστούν ιδανικό για βιομηχανική καλλιέργεια.



Εικόνα 1. Το φυτό *Eruca sativa*.

2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες και Γλυκοσινολικά Οξέα.

2.1 Γενικά - Ιδιότητες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα οργανικών ενώσεων που παράγονται από τα φυτά και κατά κανόνα δεν παίζουν άμεσο ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή τους, σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες. Γενικά ο βιολογικός τους ρόλος είναι να ενισχύουν την ανταγωνιστικότητα των φυτών στα αντίστοιχα οικοσυστήματα που ευδοκιμούν. Τα φυτά επειδή από τη φύση τους δεν μπορούν να μετακινηθούν στην περίπτωση που το περιβάλλον τους γίνει επικίνδυνο και ανταγωνιστικό, χρειάστηκε να αναπτύξουν στρατηγικές ώστε να είναι τέλεια προσαρμοσμένα σε κάθε εκάστοτε οικοσύστημα. Μια στρατηγική είναι να αναπτύξουν ένα οπλοστάσιο μορίων που να τα προστατεύει από τα παθογόνα. Αυτά τα μόρια είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες και προστατεύουν το φυτό από τη βρώση από φυτοφάγα, από παθογόνους μικροοργανισμούς από παράσιτα αλλά και από παθογόνους αβιοτικούς παράγοντες όπως οι ακτίνες UV επίσης μπορούν να προσελκύσουν επικονιαστές, αλλά και να σταματούν τη βλάστηση σπόρων άλλων φυτών ή και την ανάπτυξη διπλανών φυτών. Ο αριθμός των διαφορετικών δευτερογενών μεταβολιτών πρέπει να είναι τεράστιος, μιας και έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 100000 είδη που εικάζεται πως αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% του συνόλου. Το γεγονός αυτό δε θα πρέπει να μας εκπλήσσει αν σκεφτούμε τη μεγάλη πολυπλοκότητα και ποικιλότητα των οικοσυστημάτων.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό τους είναι η περιορισμένη κατανομή που έχουν στο φυτικό βασίλειο. Δηλαδή ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες απαντώνται συχνά σε ένα μόνο είδος ή σε μια ομάδα φυτών που είναι εξελικτικά κοντά. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες εξελίχθηκαν από τους πρωτογενείς μέσω διπλασιασμού και απόκλισης βιοσυνθετικών γονιδίων πρωτογενών μεταβολιτών. Είναι ακόμα αξιοσημείωτο ότι μερικές φορές δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ μερικών πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών μιας και οι δεύτεροι μπορεί να έχουν πάνω από έναν βιολογικό ρόλο π.χ. να παίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη (Τσέκος 2004, Kollner *et al.*, 2004, Tholl *et al.*, 2005).

2.2 Κατηγορίες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαιρούνται σε τρεις χημικές ομάδες ανάλογα με τα βασικά μεταβολικά μονοπάτια που αποκτούν το σκελετό τους. Οι 3 κατηγορίες είναι οι εξής :

- **Τερπένια**

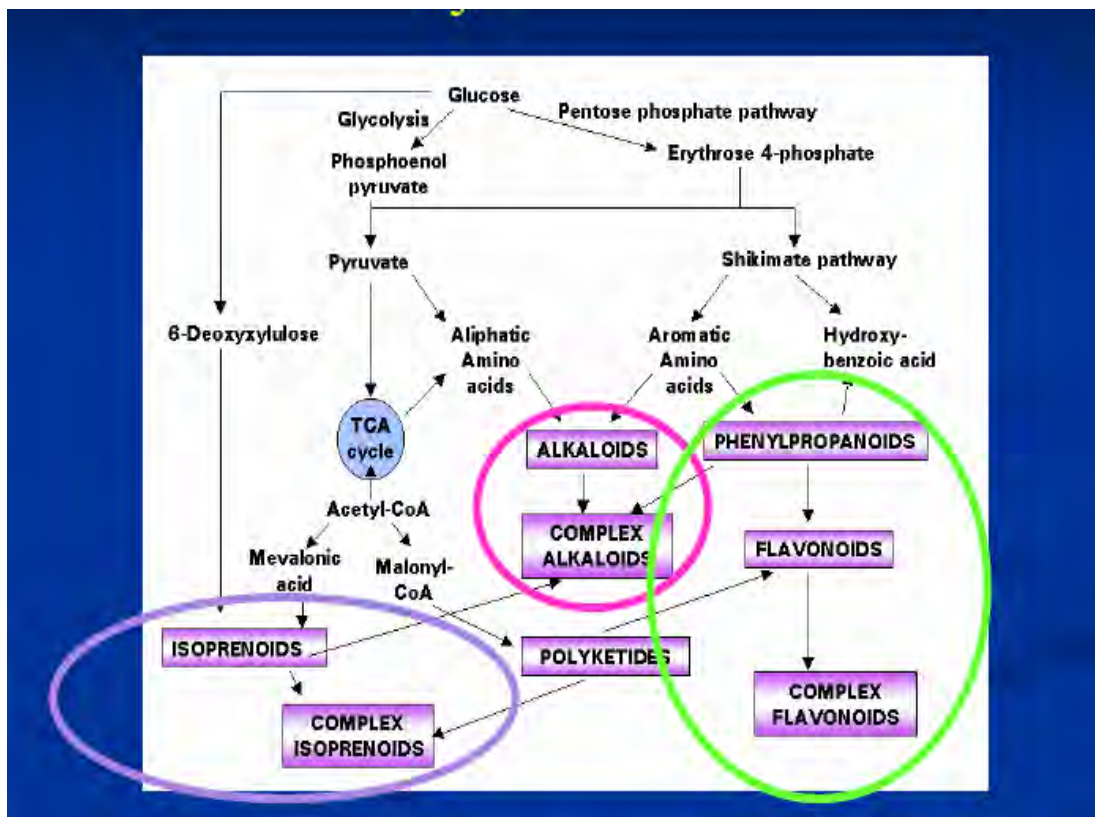
Τα τερπένια είναι λιπίδια που συντίθενται από το ακετυλοσυνενζυμο-A ή από ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκόλυσης.

- **Φαινολικές Ενώσεις**

Οι φαινολικές ενώσεις είναι αρωματικές ουσίες που σχηματίζονται από ενδιάμεσα του μονοπατιού βιοσύνθεσης του σικιμικού ή του μηλονικού οξέος.

- **Ενώσεις που περιέχουν άζωτο**

Αυτές οι ενώσεις σχηματίζονται από αμινοξέα. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα αλκαλοειδή, οι κυανογόνοι γλυκοζίτες και τέλος τα γλυκοσινολικά οξέα τα οποία θα αναλύσουμε εκτενέστερα.

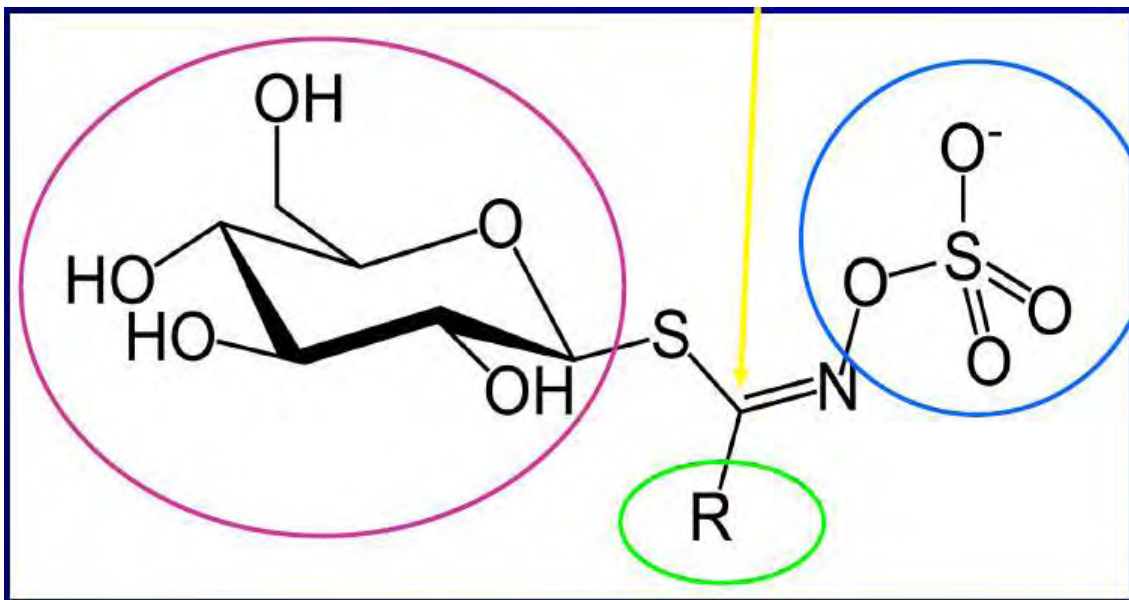


Εικόνα 2 Σε αυτή την εικόνα φαίνονται περιληπτικά τα μονοπάτια βιοσύνθεσης των κύριων κατηγοριών των δευτερογενών μεταβολιτών.

3. Τα γλυκοσινολικά Οξέα

3.1 Γενικά-Βιολογικός ρόλος στα φυτά

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από αμινοξέα. Είναι υδροξυαμινοθειικοί εστέρες με μια πλευρική αλυσίδα R που ποικίλει και ένα τμήμα β-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται με ένα άτομο θείου. Πιο συγκεκριμένα κάθε γλυκοσινολικό οξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα που συνδέεται μέσω ενός ατόμου θείου με μια ομάδα γλυκόνης, μέσω ενός ατόμου αζώτου με μια ομάδα θειικού και με μια πλευρική ομάδα χαρακτηριστική για κάθε μόριο γλυκοσινολικού.



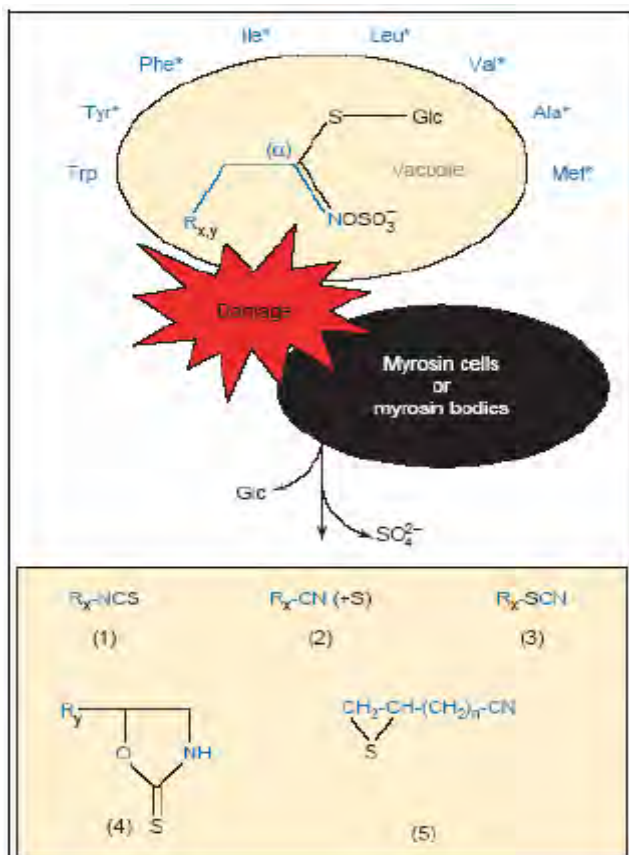
Εικόνα 3. Εδώ φαίνεται η γενική δομή των γλυκοσινολικών οξέων, το κίτρινο βέλος δείχνει το κεντρικό άτομο άνθρακα, ο μωβ κύκλος την ομάδα γλυκόνης, ο μπλε κύκλος την ομάδα θειικού και ο πράσινος την πλευρική ομάδα.

Τα γλυκοσινολικά οξέα απαντούνται στην τάξη *carpales* και είναι οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες των σταυρανθών. Έχουν βρεθεί περίπου 120 διαφορετικά είδη και βιοσυντίθενται αρχίζοντας από ένα συγκεκριμένο αμινοξύ τη μεθειονίνη, τη τρυπτοφάνη, τη τυροσίνη ή τη φαινυλαλανίνη. Για την ποικιλομορφία ευθύνεται κυρίως η πλευρική ομάδα, αλλά και οι προκαταρκτικές τροποποιήσεις των πρόδρομων αμινοξέων.

Ο ρόλος των γλυκοσινολικών οξέων είναι να αποθαρρύνουν ή να αποτρέπουν τη θήρευσή τους από φυτοφάγα θηλαστικά και έντομα. Τα γλυκοσινολικά οξέα από μόνα τους είναι σταθερά και αδρανή μόρια, αποθηκεύονται σε όλους τους ιστούς του φυτού μέσα σε κυστίδια των κυττάρων. Αυτό που πυροδοτεί τη δράση τους είναι η καταστροφή των κυττάρων (πιθανώς από το ζώο θηρευτή) και επαφή τους με το ένζυμο μυρισινάση. Η μυροσινάση είναι το "ένζυμο πυροκροτητής" της δράσης των γλυκοσινολικών. Βρίσκεται απομονωμένη σε ειδικά κύτταρα διάσπαρτα στο φυτό στα οποία προφανώς δεν βρίσκονται γλυκοσινολικά οξέα. (Kelly *et al.*, 1998)

3.2 Μηχανισμός φυτοπροστατευτικής δράσης

Όταν έρθουν σε επαφή γλυκοσινολικά οξέα και μυροσινάση, η μυροσινάση υδρολύει τα γλυκοσινολικά οξέα σε δραστικές ενώσεις που είναι ανατρεπτικές ή/και τοξικές για το θηρευτή. Πιο συγκεκριμένα η μυροσινάση υδρολύει το γλυκοσιδικό δεσμό αποκόπτοντας τη γλυκόζη και το απομένο ασταθές μόριο μπορεί να υποστεί περαιτέρω ενζυματική αφαίρεση της θειικής ομάδας ή/και αυθόρμητη ανακατάταξη της κεντρικής δομής προς παραγωγή των βιολογικά δραστικών ενώσεων. (Andreasson *et al.*, 2001, Grubb and Abel 2006).



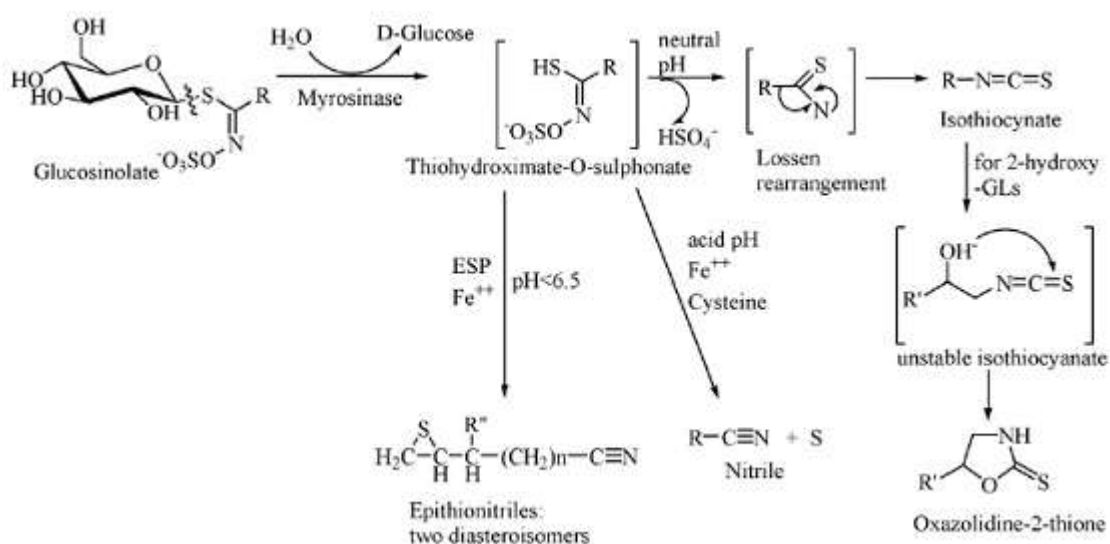
Εικόνα 4. Με το που θα έρθουν σε επαφή μυροσινάση και γλυκοσινολικά οξέα, παράγονται τελικά 5 ομάδες χημικών ενώσεων :

- (1) Ισοθειοκυανικά οξέα,
- (2) Νιτρίλια,
- (3) Θειοκυανικά οξέα,
- (4) οξαζολιδινο-2-θειόνες,
- (5) επιθειονιτρίλια

3.3 Τελικά προϊόντα υδρόλυσης γλυκοσινολικών.

Τα προϊόντα της υδρόλυσης χωρίζονται σε 5 κατηγορίες: Ισοθειοκυανικά οξέα, οξαζολιδινο-2-θειόνες, θειοκυανικά οξέα, επιθειονιτρίλια και νιτρίλια. Οι χημικές συνθήκες όπως το pH, η διαθεσιμότητα ιόντων σιδήρου και η παρουσία πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη μυροσινάση καθορίζουν τη τελική σύσταση του παραγόμενου μείγματος.

Σε ουδέτερο pH οι ασταθείς αγλυκόνες αναδιατάσσονται για να σχηματίσουν ισοθειοκυανικά οξέα. Αν η πλευρική αλυσίδα υδροξυλιωθεί στον άνθρακα 3, η αυθόρμητη κυκλοποίηση του ισοθειοκυανικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας οξαζολιδινο-2-θειόνης. Παρουσία ενός θειοειδικού παράγοντα που μοιάζει με πρωτεΐνη σχηματίζονται νιτρίλια. Αν υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας, το άτομο του θείου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του νιτρίλιου προσλαμβάνεται από το διπλό δεσμό, σχηματίζοντας επιθειονιτρίλια. Τέλος μερικά γλυκοσινολικά οξέα μπορούν να υδρολυθούν προς θειοκυανικά. (Wittstock & Halkier 2002)



Εικόνα 5 Συνοπτικά τα μονοπάτια αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών και τα τελικά προϊόντα

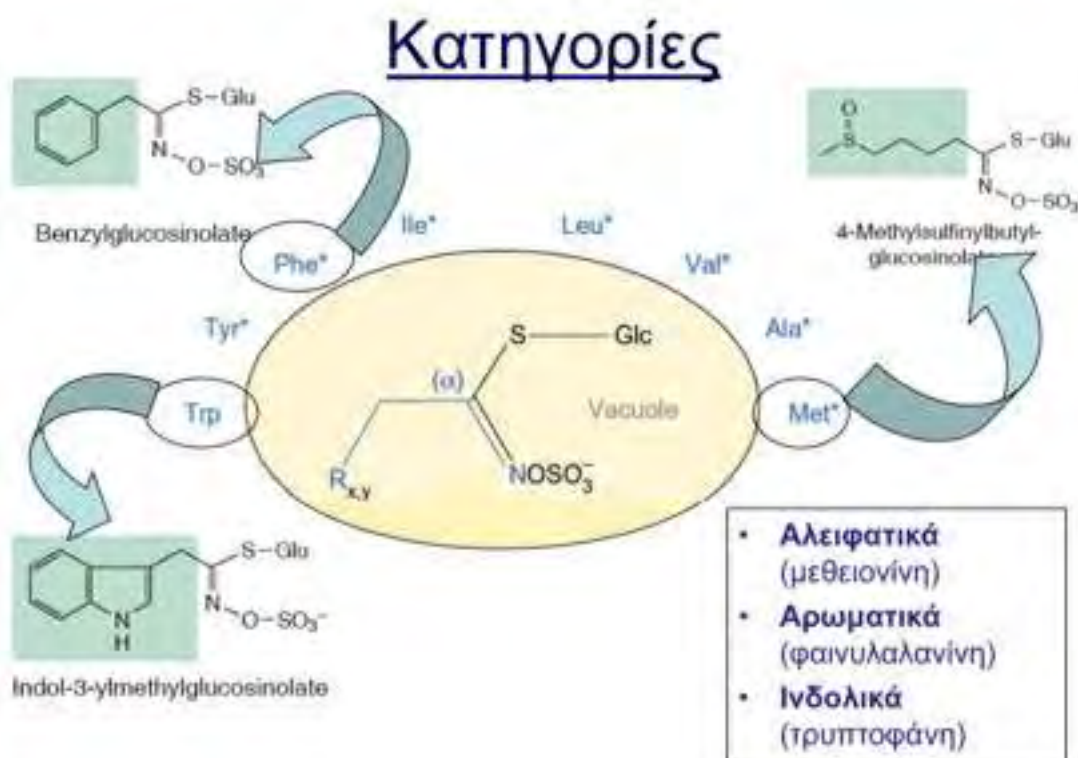
3.4 Χρήση και επίδραση των γλυκοσινολικών οξέων στον άνθρωπο.

Τα διάφορα προϊόντα της αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών οξέων αρχικά είχαν αναφερθεί σαν έλαια μουστάρδας. Τα γλυκοσινολικά οξέα ευθύνονται για τη χαρακτηριστική γεύση και άρωμα των σταυρανθών λαχανικών και μπαχαρικών όμως έχουν και διάφορες σημαντικές βιολογικές ιδιότητες.

Τα γλυκοσινολικά οξέα και τα προϊόντα αποικοδόμησής τους σύμφωνα με σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν σημαντική χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση (Poppel *et al.*, 1999, Brader *et al.*, 2001, Tierens *et al.*, 2001). Αυτό ήταν το συμπέρασμα μιας σειράς μελετών όπου η υψηλή κατανάλωση λαχανικών της οικογένειας brassica που είναι γνωστό ότι περιέχουν γλυκοσινολικά οξέα συνδέθηκε με τη μείωση του ρίσκου για πολλές μορφές καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι προϊόντα υδρόλυσης που προέρχονται από τη μεθειονίνη είναι ιδιαίτερα δραστικά (, Kliebenstein *et al.*, 2005, , Talalay & Fahey 2001). Όμως υπάρχει και ο αντίλογος, μιας και έχει δειχθεί ότι μερικά είδη γλυκοσινολικών οξέων και προϊόντων τους όταν χορηγήθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις είχαν καρκινογόνο δράση! (Von Borstel & Higgins 1998, Verhoeven *et al.*, 1996). Πριν χρησιμοποιηθούν αυτές οι ενώσεις σαν φάρμακα πρέπει να εξιχνιαστεί πλήρως η μοριακή βάση της δράσης τους και να βρεθούν οι βέλτιστες δοσολογίες. Έχει γίνει πρόοδος σε αυτόν τον τομέα και έχει βρεθεί π.χ. ότι το 2- φαινυλαιθυλ ισοθειοκυανικό οξύ, προϊόν υδρόλυσης της γλυκοναστουρτίνης, μπορεί να προφυλάξει από διάφορες μορφές καρκίνου αναστέλλοντας ειδικά ορισμένα ένζυμα της φάσης 1 και 2 και έτσι αποτρέποντας το μεταβολισμό ορισμένων προκαρκινογόνων σε καρκινογόνα (Hecht *et al.*, 1999, Talalay & Fahey 2001).

3.5 Κατηγορίες και ποικιλομορφία γλυκοσινολικών οξέων

Τα γλυκοσινολικά οξέα διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τα αμινοξέα από τα οποία προκύπτουν. Δηλαδή εξαρτάται από το αν προέρχονται από αλειφατικά αμινοξέα, αρωματικά αμινοξέα ή τρυπτοφάνη. (Wittstock & Halkier 2002)



Εικόνα 6 Οι τρεις κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων είναι τα αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα, τα αρωματικά και τα ινδολικά, που βιοσυντίθενται με αρχικό αμινοξύ κυρίως τη μεθειονίνη, τη φαινυλαλανίνη και τη τρυπτοφάνη αντίστοιχα.

Η δομική ποικιλομορφία των γλυκοσινολικών οξέων οφείλεται σε 3 παράγοντες: Στη βιοσύνθεση από διαφορετικά πρόδρομα αμινοξέα, σε παραλλαγές στο μήκος της πλευρικής αλυσίδας και σε δευτερογενείς τύπους οξειδωσης και εστεροποίησης. (Textor *et al.*, 2004)

3.6 Βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων

3.6.1 Γενικά

Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων γίνεται σε τρία στάδια, τα δύο πρώτα στάδια παράγουν το σκελετό του γλυκοσινολικού οξέος και το τρίτο στάδιο είναι αυτό που ουσιαστικά καθορίζει τη βιολογική δράση του κάθε είδους. Η έρευνα για την ανακάλυψη όλων των γονιδίων, άλλα και των μονοπατιών της βιοσύνθεσης έγιναν κυρίως στο *Arabidopsis thaliana* με χαρτογράφηση των γενετικών τόπων, αντίστροφη γενετική και λειτουργική γονιδιωματική.

Στο πρώτο στάδιο γίνεται η επιμήκυνση της αλυσίδας του αμινοξέος με 1 η περισσότερα μεθύλια. Οι 5 αντιδράσεις αυτού του σταδίου μοιάζουν πολύ με τη σειρά αντιδράσεων για τη μετατροπή της βαλίνης σε λευκίνη.

Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η βιοσύνθεση της γλυκόνης που είναι η κεντρική δομή του γλυκοσινολικού οξέος. Το στάδιο περιλαμβάνει 6 βήματα.

Στο τρίτο στάδιο γίνονται οι δευτερογενείς τροποποιήσεις της πλευρικής αλυσίδας ο αριθμός σταδίων άλλα και τα ένζυμα που δρουν ποικίλουν και είναι διαφορετικά για κάθε τελικό προϊόν.

3.6.2 Πρώτο στάδιο, επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος

Στο πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων γίνεται η επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος (μεθειονίνη σε αυτό το παράδειγμα) κατά 1-9 μεθύλια με μία διαδικασία που μοιάζει με τη μετατροπή της βαλίνης σε λευκίνη.

Η διαδικασία ξεκινά με **(α)** την **απαμίνωση** της μεθειονίνης από την BCAT αμινοτρανσφεράση (αμινοτρανσφεράση διακλαδισμένων αμινοξέων) μετατρέποντας τη σε 2-οξο-οξύ. Στη συνέχεια το 2-οξο-οξύ μπαίνει σε ένα κύκλο τριών βημάτων, **(β)**

συμπύκνωση με ακετυλο-συνένζυμο Α από τη συνθετάση του μεθυλοθειοαλκυκομηλικού (MAM συνθάση), **(γ) ισομερίωση** από μια ισοπροπυλομηλική ισομεράση (IPMI) και **(δ) οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση** από την ισοπροπυλομηλική αφυδρογώνωση (IPM-DH). Το προϊόν αυτών των αντιδράσεων είναι **ένα 2-οξο-οξύ που έχει επιμηκυνθεί κατά ένα μεθύλιο**. Από αυτό το σημείο και μετά το 2-οξο-οξύ μπορεί να **(ε) τρανσαμινωθεί** από τη BCAT να μετατραπεί σε ομομεθειονίνη και από εκεί να αρχίσει το δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης ή να **επαναλάβει τον κύκλο** για να προσθέσει κι άλλα μεθύλια.

3.6.3 Δεύτερο στάδιο, η κατασκευή του πυρήνα των γλυκοσινολικών

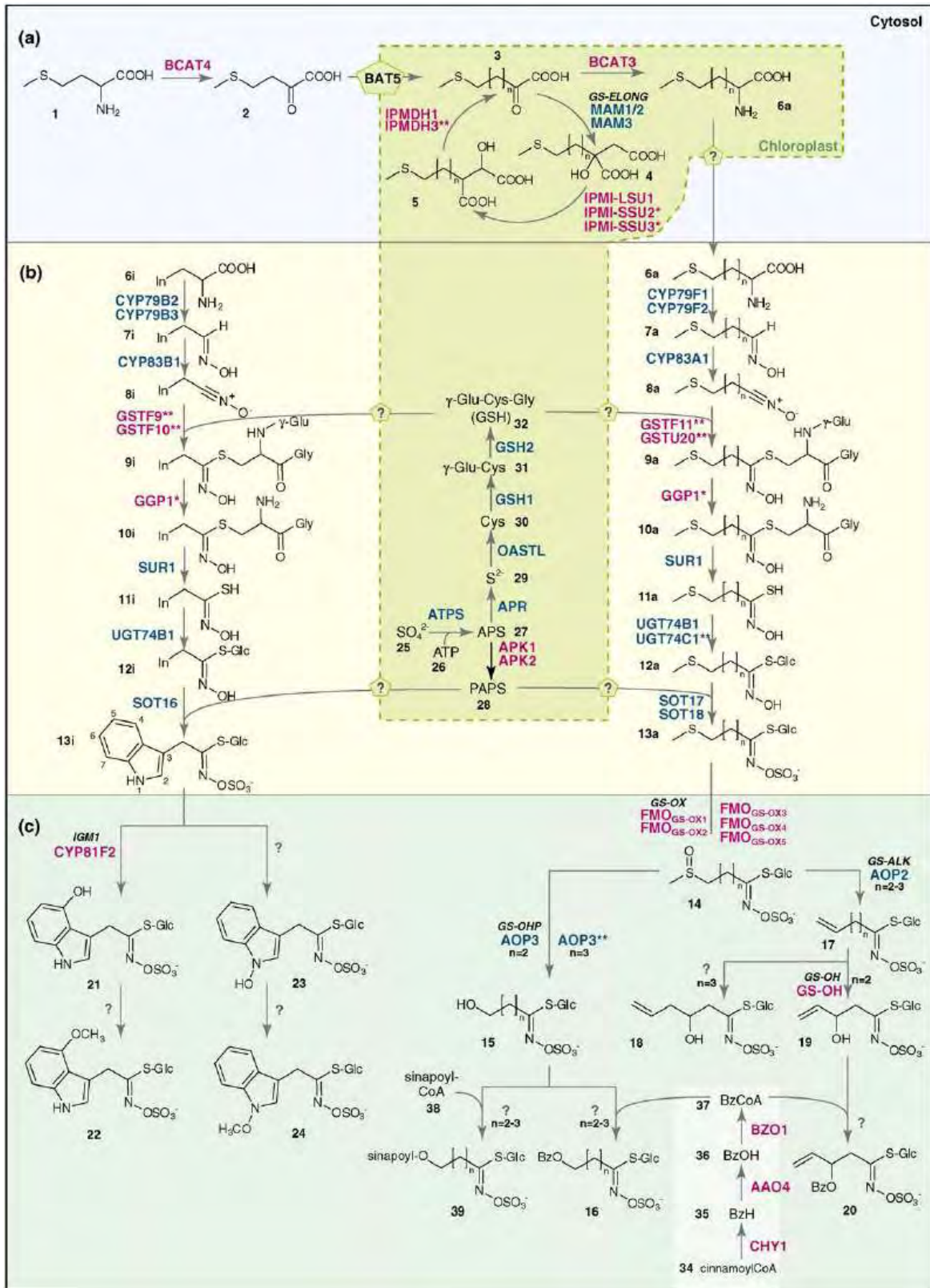
Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η βιοσύνθεση της γλυκόνης που είναι η κεντρική δομή των γλυκοσινολικών οξέων και έτσι τα μεθυλιωμένα αμινοξέα μετατρέπονται σε πρόδρομα γλυκοσινολικά οξέα.

Η σύνθεση των πρόδρομων γλυκοσινολικών οξέων αρχίζει με την οξειδωση του επιμηκυνμένου αμινοξέος στην αντιστοιχη αλδοξίμη, η αντίδραση αυτή καταλύεται από τις μονοξυγενάσες της οικογένειας CYP79. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στο κυτόχρωμα p450, έχουν ανακαλυφθεί 7 ομόλογα στο *Arabidopsis* το κάθε ένα με διαφορετική εξειδίκευση στην πλευρική αλυσίδα (CYP79C1, CYP79C2, CYP79F1, CYP79F2, CYP79A2, CYP79B2, CYP79B3)

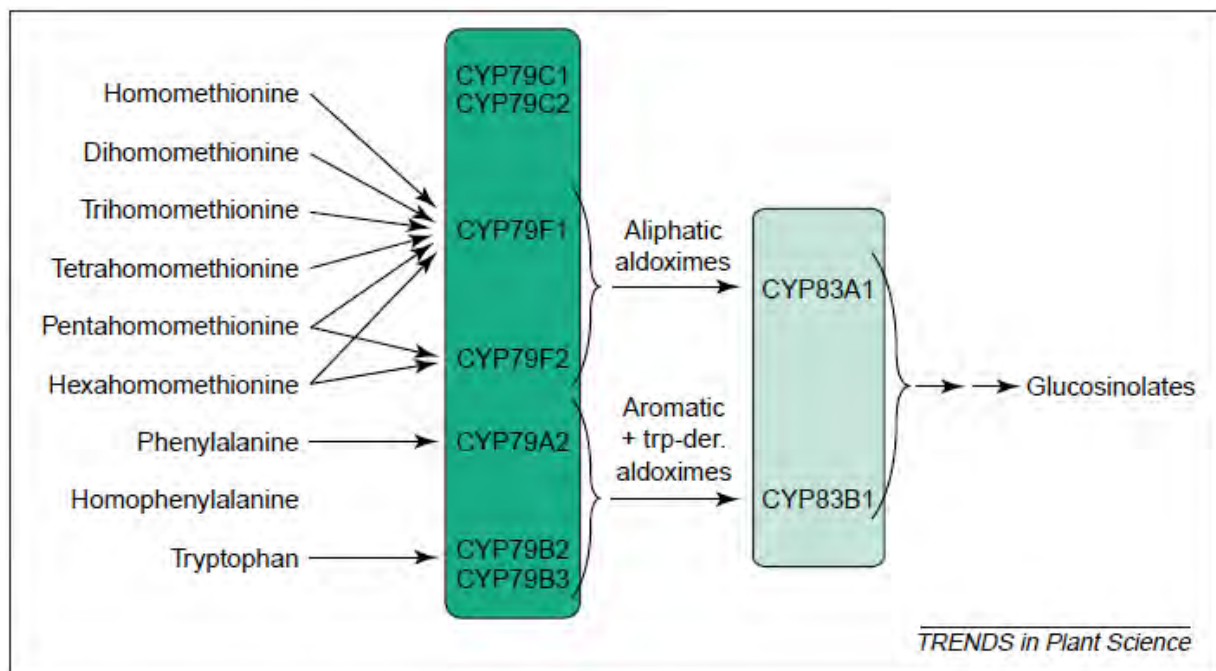
Το δεύτερο βήμα του σταδίου είναι η οξειδωση της αλδοξίμης από μια άλλη οικογένεια μονοξυγενασών τις CYP83 που και αυτές ανήκουν στο κυτόχρωμα p450. Το CYP83 οξειδώνει την αλδοξίμη σε οξο-νιτρο ενώσεις και οξειδία του νιτριλίου.

Το τρίτο βήμα είναι αυθόρμητο, μιας και οι προηγούμενες ενώσεις είναι ρίζες που είναι γενικά ασταθείς και οι συγκεκριμένες είναι ισχυρά ηλεκτρονιόφιλα, οπότε αντιδρούν με ένα δότη θείου τη γλουταθειόνη (Sønderby & Halkier, 2010) προς παραγωγή S-αλκυλουδροξιμικών ενώσεων.

Στη συνέχεια στο τέταρτο βήμα οι S-αλκυλουδροξιμικές ενώσεις διασπώνται από μια C-S λυάση τη SUR1 παράγοντας θειουδροξιμικά οξέα, τα οποία στη συνέχεια γλυκοσιλιώνονται από τη UGT74 μια UDP- γλυκοσυλοτρανσφεράση προς αποθειωμένα γλυκοσινολικά. Τέλος τα αποθειωμένα γλυκοσινολικά θειώνονται από τη θειοτρανσφεράση SOT17, SOT18 και έτσι ολοκληρώνεται η σύνθεση των πρωτογενών γλυκοσινολικών.



Εικόνα 7 Σε αυτή την εικόνα φαίνεται συνολικά όλα τα γνωστά βήματα της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Με μπλε παρουσιάζονται τα ένζυμα που ήταν γνωστά από παλιότερα, με κόκκινο τα ένζυμα που ανακαλύφθηκαν τελευταία, με μαύρο οι QTL, με έναν αστερίσκο τα μερικώς χαρακτηρισμένα ένζυμα, με 2 αστερίσκους τα ένζυμα που προβλέφθηκαν ότι δρουν και με ερωτηματικό τα άγνωστα ένζυμα.



Εικόνα 8 Σε αυτή την εικόνα φαίνονται τα υποστρώματα των μονοξυγενασών CYP79, CYP83 που καταλύουν το πρώτο και το δεύτερο βήμα του δεύτερου σταδίου αντίστοιχα.

3.6.4 Τρίτο στάδιο

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο τροποποιείται η πλευρική αλυσίδα του πρωτογενούς γλυκοσινολικού. Αυτές οι τροποποιήσεις κατά κανόνα καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη βιολογική δράση των προϊόντων αποικοδόμησης του εκάστοτε είδους γλυκοσινολικού οξέος. (Wittstock & Halkier 2002)

Οι τροποποιήσεις αυτές γίνονται μέσω αντιδράσεων οξειδωσης, αλκυλίωσης και εστεροποίησης. (Mikkelsen *et al.*, 2002, Wittstock & Halkier, 2002, Kliebstein *et al.*, 2005). Οι γνώσεις για αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι προήλθαν αρχικά από αναλύσεις QTL όπου ταυτοποιήθηκαν 4 γενετικοί τόποι που είναι υπεύθυνοι για την ποικιλότητα των πλευρικών αλυσίδων των αλφατικών γλυκοσινολικών. Αυτοί ονομάστηκαν: GS-ELONG, GSOX, GS-AOP και GS-OH. Σε αυτούς τους 4 γενετικούς τόπους βρέθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στο τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης αυτά είναι :

FMOGS-OX1-5 : **φλαβινοεξαρτώμενες μονοοξυγενάσες (flavin monooxygenase)**

AOP2-AOP3: 2-κετογλουτάρυλο εξαρτώμενες διοξυγενάσες (2-oxoglutarate-dependent Dioxygenases)

GS-OH: 2-οξο-οξύ εξαρτώμενη διοξυγενάση (2-oxo acid-dependent dioxygenase)

AAO4: οξειδάση αλδευδών (aldehyde oxidase)

CHY-1: μετατροπή της βενζαλδευδης σε βενζυλο-συνένζυμο-A (?)

BZO1: μετατροπή βενζοϊκό οξύ σε βενζυλο-συνένζυμο-A (?)

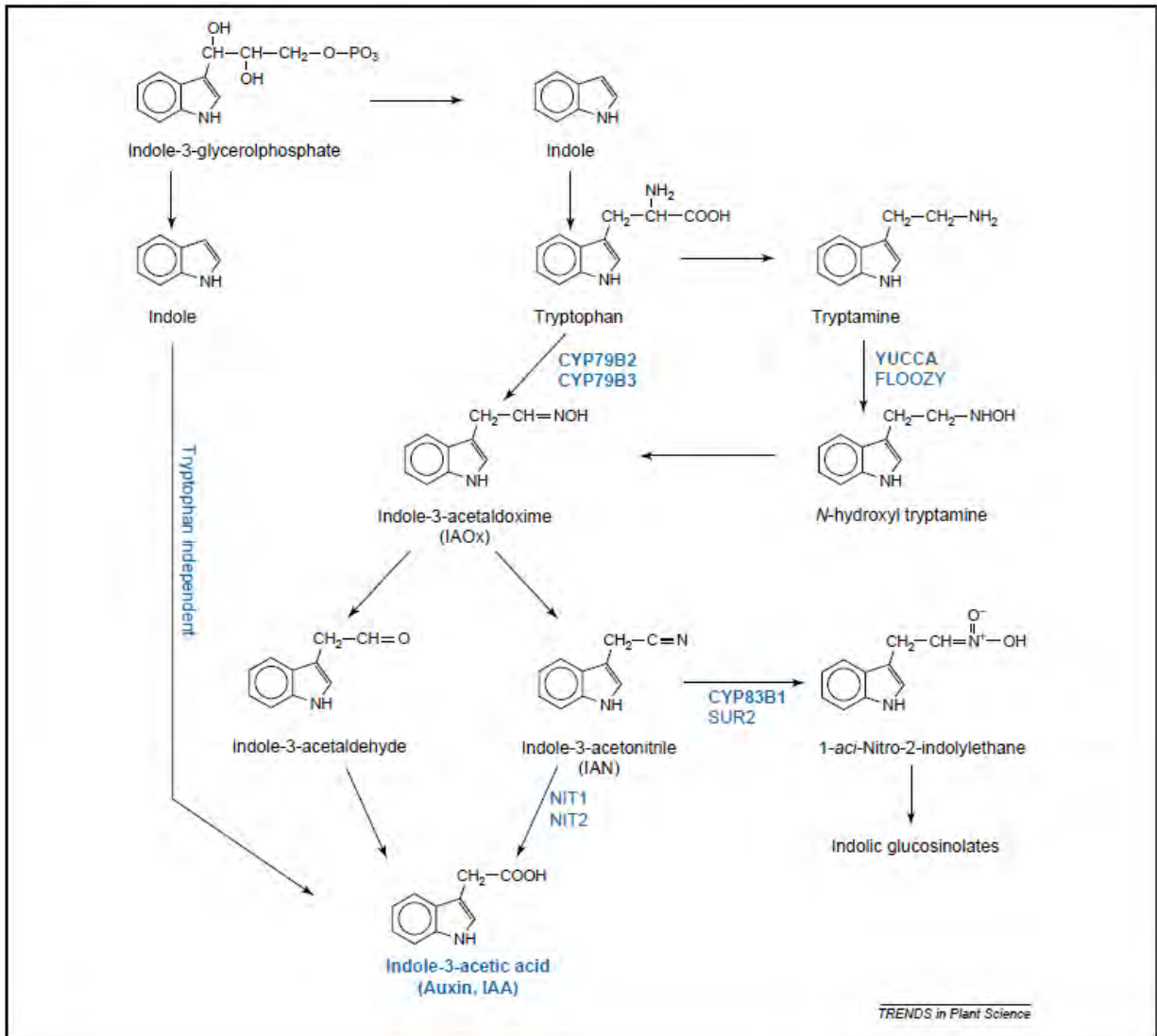
Το ολοκληρωμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι του τρίτου σταδίου της βιοσύνθεσης δεν είναι ακόμα γνωστό αλλά έχει γίνει η αρχή μιας και έχουν βρεθεί πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται.

Όλες οι πληροφορίες για τη βιοσύνθεση προήλθαν από το άρθρο (Sønderby & Halkier, 2010)

4. Το γονίδιο CYP79B2

Σε αυτή την εργασία ασχοληθήκαμε αποκλειστικά με το γονίδιο *EsCYP79B2* της ρόκας (*Eruca sativa*) που είναι κοντινό ορθόλογο του CYP79B2 στο *Arabidopsis*. Το *CYP79B2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 του *Arabidopsis* και έχει μήκος 2334 bp και χωρίζεται σε 2 μεγάλα εξώνια. Μεταφράζεται σε πρωτεΐνη μήκους 541 αμινοξέων. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&term=830154> , <http://www.uniprot.org/uniprot/O81346>)

Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια NADPH εξαρτώμενη μονοξυγενάση που ανήκει στο κυτόχρωμα P450 και εμπλέκεται σε 2 διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, στη βιοσύνθεση της αυξίνης και στο δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης των ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων (Mikkelsen *et al.*, 2000). Στη βιοσύνθεση των ινδολικών γλυκοσινολικών πιο συγκεκριμένα καταλύει το πρώτο βήμα του δεύτερου σταδίου όπου το επιμηκυμένο αμινοξύ (τρυπτοφάνη στη συγκεκριμένη περίπτωση) οξειδώνεται για να παράγει την αντίστοιχη αλδοξίμη. Στη βιοσύνθεση της αυξίνης υπάρχουν παραπάνω από 1 μονοπάτια (Grubb and Abel 2006, Cohen *et al.*, 2003) το προϊόν του CYP79B2 καταλύει την αντίδραση **L-tryptophan + 2 NADPH + 2 O₂ => indole-3-acetaldoxime + 2 NADP⁺ + 3 H₂O + CO₂**



Εικόνα 9: Εδώ φαίνεται το στάδιο της βιοσύνθεσης της αυξίνης που δρα το CYP79B2.

Β.Υλικά – Μέθοδοι

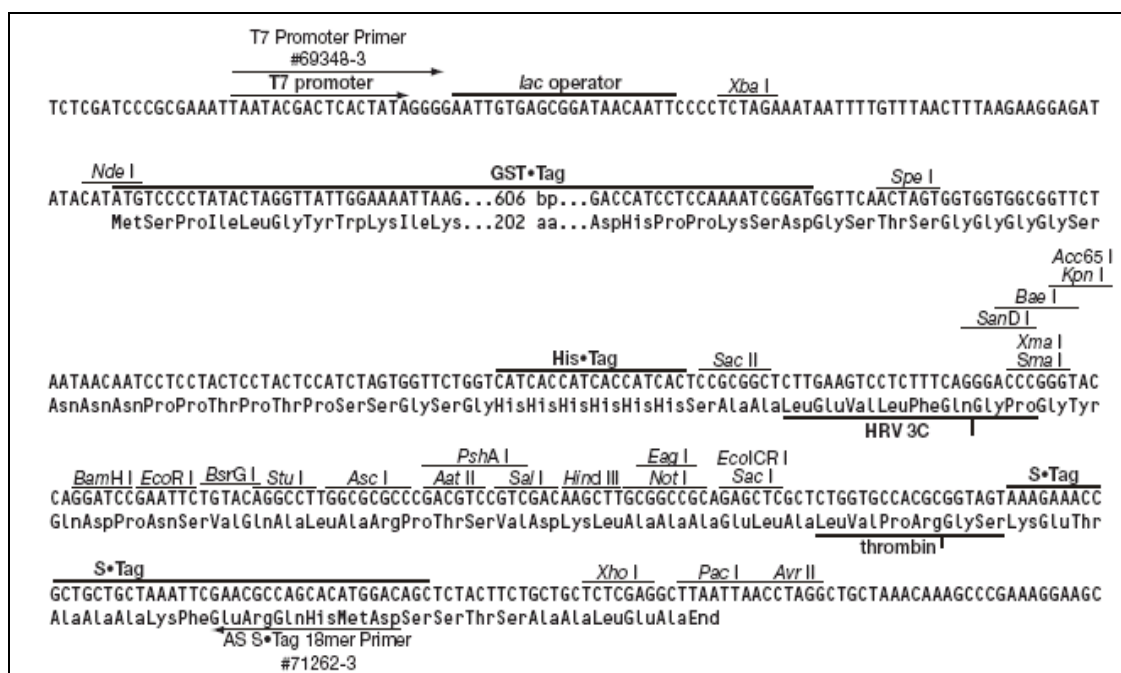
1. Φορέας έκφρασης pET, κλωνοποίηση και έκφραση της πρωτεΐνης

Οι φορείς έκφρασης pET είναι πλασμίδια που περιλαμβάνουν τις εξής περιοχές: (1) Ένα γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα του *lac*, (2) τον T7 υποκινητή που είναι εξειδικευμένος στην T7 RNA πολυμεράση, (3) τον ρυθμιστή *lac* που ελέγχει την έναρξη μεταγραφής, (4) μια *f1* θέση έναρξης αντιγραφής, (5) μία περιοχή πολυσυνδέτη που χρησιμοποιείται ως θέση εισαγωγής του γονιδίου που μελετάται, (6) ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και (7) μία θέση έναρξης της αντιγραφής *CoLE1*.

Ο T7 υποκινητής και ο *lac* ρυθμιστής βρίσκονται ανοδικά της θέσης πολυσυνδέτη που εισάγαμε το γονίδιο. Όταν ο ρυθμιστής *lac* δεν καταστέλλεται από τον καταστολέα *lacI* και υπάρχει T7 RNA πολυμεράση διαθέσιμη ώστε να προσδεθεί στον T7 υποκινητή, τότε το γονίδιο που έχουμε εισάγει μεταγράφεται. Το γονίδιο που εκφράζει την T7 πολυμεράση βρίσκεται στο κύριο μόριο DNA του κυττάρου *E. Coli* και ελέγχεται και αυτό από τον ρυθμιστή και τον υποκινητή *lac* (στέλεχος BI21). Όταν επιθυμούμε την έκφραση του γονιδίου που εισάγαμε, απλά προσθέτουμε ισοπρωπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη αλλιώς γνωστό ως IPTG.

Το IPTG είναι ένα μόριο που μοιάζει με τη λακτόζη, οπότε μπορεί να προσδεθεί στο καταστολέα *lacI* αποτρέποντας τον έτσι να καταστείλει τη μεταγραφή των 2 οπερονίων (ένα που ελέγχει την μεταγραφή της πρωτεΐνης που κλωνοποιήσαμε στο φορέα έκφρασης pET και ένα που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη T7 RNA πολυμεράση στο κύριο μόριο DNA). Επίσης το IPTG ΔΕΝ μεταβολίζεται όπως η λακτόζη οπότε η συγκέντρωσή του παραμένει σταθερή, δίνοντας πιο σταθερή έκφραση απ' ό,τι αν χρησιμοποιούσαμε λακτόζη.

Ο φορέας έκφρασης pET-49b(+) που χρησιμοποιήσαμε έχει μήκος 5926bp και διαθέτει όλες τις περιοχές που έχει ένας φορέας pET δηλαδή: έναν υποκινητή T7 *lac*, γονίδιο του καταστολέα *lac* (*lacI*), γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, αλληλουχία που σηματοδοτεί την έναρξη της αντιγραφής (*ori*) και μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης που περιέχει διάφορες θέσεις κοπής από ένζυμα περιορισμού. Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας έχει 5 ακόμα περιοχές καθοδικά της θέσης του πολυσυνδέτη που βοηθούν στην απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αφού εκφραστεί. Με τη σειρά 5'→3' και όπως φαίνεται καλύτερα στο χάρτη (εικόνα 11) οι αλληλουχίες



Εικόνα 11 Περιοχή κλωνοποίησης του φορέα έκφρασης

2. Κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης

Το γονίδιο που έχει χρησιμοποιηθεί ως ένθεμα είναι το *EsCYP79B2*, του οποίου η αλληλουχία έχει απομονωθεί και έχει κλωνοποιηθεί αρχικά στο φορέα pGEM και κατόπιν στον pET49b.

2.1 Προετοιμασία ανασυνδυασμένων γονιδίων και φορέων έκφρασης για κλωνοποίηση

Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς έκφρασης απαιτείται ενζυμική πέψη των ενθεμάτων (γονιδίων ενδιαφέροντος) και των φορέων με τα κατάλληλα ένζυμα, ώστε να είναι συμβατά τα άκρα τους και να είναι δυνατή η εννοποίηση τους. Για την κάθε πέψη χρησιμοποιούνται:

Δείγμα DNA 1-2 µg

10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου

dH₂O

Προστίθεται ενδονουκλεάση περιορισμού σε συγκέντρωση μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.

Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 με 4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.

Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης

2.2 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

Σε ορισμένο όγκο διαλύματος 1xTAE προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης, ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής, με βάση το εύρος διαχωρισμού που χρειάζεται για κάθε περίπτωση και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Για παράδειγμα για προετοιμασία πηκτής αγαρόζης 1% προστίθεται 1g αγαρόζης σε 100 gr διαλύματος 1xTAE.

Το υλικό θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη.

Το διάλυμα κρυώνει μέχρι τους 50° C περίπου, προστίθεται 0,007 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αναμιγνύεται καλά.

Το διάλυμα αδειάζεται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται η ειδική «χτένα» ώστε να δημιουργηθούν υποδοχείς για τοποθέτηση των δειγμάτων και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων στα οποία προστίθεται διάλυμα χρωστικής 10x.

Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά η «χτένα» και τοποθετείται στο δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE. Σε κάθε μία από τις θέσεις που δημιουργήθηκαν στην πηκτή τοποθετείται με πιπέτα η επιθυμητή ποσότητα δείγματος, ενώ σε κάποια από αυτές τοποθετείται ο μάρτυρας μοριακών βαρών.

Εφαρμόζεται η επιθυμητή τάση ρεύματος στη συσκευή και τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/ cm.

50x TAE : 24,2%(w/v) Tris, 57,1 ml/lit acetic acid, 100 ml 0,5M EDTA

Βρωμιούχο αιθίδιο : παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αгарόζης είναι 0,5 μg/ml.

Διάλυμα χρωστικής 10x: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 35% γλυκερόλη

2.3 Ανάκτηση DNA από την πηκτή

Η ανάκτηση του μορίου DNA από την πηκτή πραγματοποιήθηκε με εκτομή και καθαρισμό σύμφωνα με το σύστημα Extract II (Macherey-Nagel) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4 Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης

Τα προϊόντα των πέψων αποκόπτονται από την πηκτή αгарόζης και ετοιμάζεται η αντίδραση ενοποίησης. Στην αντίδραση προστίθενται:

Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	10×
φορέας DNA	50 ng
ένθεμα DNA	X ng (μοριακή αναλογία φορέα:ένθεμα=1:3)
T4 DNA λιγάση (350U/μl)	1 μl
ddH ₂ O	μέχρι τα 20 μl

Επωάζουμε 1-5 ώρες στους 16°C αν έχουμε κομμάτια DNA με κολλώδη άκρα και 1-24 στους 16°C αν έχουμε DNA με τυφλά άκρα.

2.5 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

Χρησιμοποιούνται κύτταρα BL21(DE3) και ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία:

Εμβολιάζονται 5ml υγρού θρεπτικού μέσου με κύτταρα από stock γλυκερόλης, χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού. Γίνεται επώαση για 12-16h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm.

Εμβολιάζονται 100ml υγρού θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικό με 1ml από την καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί και επωάζονται υπό ανάδευση στις 210 rpm στους 37° C. Παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων και η επώαση σταματά μόλις η οπτική απορρόφηση στα 600 nm φτάσει την τιμή 0.4 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων.

Αμέσως μετά τα κύτταρα αφήνονται στον πάγο για 10min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10min στις 4000 rcf στους 4° C.

Το ίζημα αναδιαλύεται σε 60ml διαλύματος MgCl₂-CaCl₂ (80mM MgCl₂-20mM CaCl₂). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 4000 rcf στους 4° C και το ίζημα αναδιαλύεται σε 4ml CaCl₂ 0.1M.

Αμέσως μετά προστίθεται 140μl DMSO, το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύεται ελαφρά και αφήνεται για επώαση στον πάγο για 15min.

Προστίθενται πάλι 140μl DMSO, γίνεται ελαφριά ανάδευση και το εναιώρημα μοιράζεται γρήγορα σε παγωμένους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες και φυλάσσεται στους -80° C.

2.6 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) με ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης

Τα δεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) μετασχηματίζονται με την εξής μέθοδο :

Εισάγονται 10μl από την αντίδραση σύνδεσης σε 100μl επιδεικτικών κυττάρων και επωάζονται για 25min στον πάγο.

Ακολουθεί θερμικό σοκ για 45sec στους 42° C και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται πάλι στον πάγο για 2min.

Προστίθενται 0,2 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB και ακολουθεί επώαση για 1h στους 37° C υπό ανάδευση 210 rpm.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει καναμικίνη (50μg/ml) και επωάζονται στους 37° C για 16h.

Επιλέγονται αποικίες και αναπτύσσονται για 12-16h υπό ανάδευση στις 210 rpm σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth παρουσία καναμικίνης (50μg/ml) στην οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα ο ανασυνδυασμένος φορέας pET-49b(+).

2.7 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα

Επιλέγονται αποικίες και επωάζονται στους 37° C για 16h σε 5ml υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth παρουσία του αντιβιοτικού καναμικίνη (50μg/ml) υπό ανάδευση 210 rpm. Ακολουθεί η απομόνωση των πλασμιδίων όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή (Nucleospin Plasmid, Macherey-Nagel).

Στα πλασμίδια που απομονώνονται στη συνέχεια ακολουθούν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που επιλέχθηκαν κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για να ελεγχθεί η παρουσία γονιδίου του επιθυμητού μοριακού βάρους. Επιλέγονται τα πλασμίδια που φέρουν το ένθεμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος και ακολουθεί αλληλούχηση για επιβεβαίωση των σωστών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Προστίθενται σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα 700μl από τα κύτταρα που έχουν μεγαλώσει, αναμιγνύονται με 300μl αποστειρωμένου διαλύματος 50% γλυκερόλης και αποθηκεύονται στους -80 °C (stock γλυκερόλης).

3. Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου

Για να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης των κλωνοποιημένων πρωτεϊνών πραγματοποιούνται ποικίλες δοκιμές στις συνθήκες συγκέντρωσης IPTG, θερμοκρασίας και χρόνου ανάπτυξης κατά την επαγωγή.

Σε 5ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth με αντιβιοτικό καναμυκίνη (50μg/μl) εμβολιάζονται από stock γλυκερόλης κύτταρα έκφρασης που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και επωάζονται υπό ανάδευση 210 rpm, για 12-16h στους 37° C.

Τα 5ml αυτής της καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνης (50μg/ml). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση 210 rpm μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600nm να έχει τιμή 0.6.

Η καλλιέργεια μοιράζεται σε 3 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (50ml η κάθε μία).

Στις δύο κωνικές φιάλες προστίθεται IPTG σε συγκέντρωση 1mM και ακολουθεί επώαση στους 16° C για 12h και 72h με ανάδευση στις 125 rpm.

Παρόμοια στην τρίτη κωνική φιάλη προστίθεται IPTG σε συγκέντρωση 1mM και επωάζονται στους 28° C για 12h με ανάδευση στις 125 rpm.

Άλλες τρεις κωνικές φιάλες χρησιμοποιούνται για έλεγχο των αποτελεσμάτων. Έτσι, εμβολιάζονται 50 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνης (50μg/ml) με καλλιέργεια από κύτταρα έκφρασης που περιέχουν μόνο το πλασμίδιο χωρίς το ένθεμα και έχουν επωαστεί υπό ανάδευση 210 rpm, για 12-16h στους 37° C. Οι τέσσερις κωνικές φιάλες χρησιμοποιούνται ως αρνητικός έλεγχος σε κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες, οπότε ακολουθούνται οι ίδιοι χειρισμοί όπως και οι αντίστοιχες μεταχειρίσεις.

Μετά τις επωάσεις συλλέγονται όλα τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 4000 rcf για 20min στους 4° C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα ιζήματα φυλάσσονται στον πάγο. Για την επεξεργασία τους ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

Το κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 2ml διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl), γίνεται επώαση για 2h στους 4° C.

Ακολουθεί ομογενοποίηση με τη χρήση υπερήχων για 2min με παύσεις 10sec ανά 10sec και φυγοκέντρηση στις 14000 rcf για 20min στους 4° C.

Μετά από αυτή τη φυγοκέντρηση, οι διαλυτές πρωτεΐνες βρίσκονται στο υπερκείμενο ενώ οι μη-διαλυτές στο ίζημα. Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους πλαστικούς σωλήνες. Σε κάθε δείγμα γίνεται μέτρηση Bradford, λαμβάνονται ίδιες συγκεντρώσεις και ηλεκτροφορούνται σε SDS-PAGE.

Αφού καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης (θερμοκρασία, χρόνος επώασης και συγκέντρωση IPTG), η διαδικασία εφαρμόζεται σε μεγαλύτερη κλίμακα, σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου για να πραγματοποιηθεί έκφραση των γονιδίων και καθαρισμός και απομόνωση των πρωτεϊνών σε μεγάλη ποσότητα.

4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου Protino® Ni-NTA Agarose κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας συγγένειας με σταθερή φάση τα σφαιρίδια που πάνω τους έχουν ακινητοποιηθεί χημικά σύμπλοκα που δεσμεύουν ιόντα νικελίου, και κινητή φάση το εναιώρημα των πρωτεϊνών που έχουν απομονωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η διαδικασία είναι η εξής: Το γονίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε το έχουμε κλωνοποιήσει σε ένα φορέα έκφρασης ο οποίος προσθέτει στην πρωτεΐνη μας μια ουρά έξι ιστιδινών. Η ουρά των έξι ιστιδινών δεσμεύεται πάνω στα ιόντα νικελίου που είναι ακινητοποιημένα στα σφαιρίδια, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες παραμένουν ελεύθερες ή δεσμεύονται πολύ πιο χαλαρά. Στην περίπτωση που όταν εκφράζεται η πρωτεΐνη συσσωρεύεται σε συσσωματώματα (inclusion bodies), χρησιμοποιείται ουρία σε υψηλή συγκέντρωση (8M) για την απομόνωσή της.

Στην παρούσα εργασία έγινε καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη στήλη σε αποδιατακτικές συνθήκες. Η διαδικασία περιλαμβάνει 3 βήματα. Για όλη τη διαδικασία χρειάζονται 4 διαλύματα, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

NPI-10	DNPI-10 διάλυμα λύσης	DNPI-20 διάλυμα πλύσης	DNPI-250 διάλυμα έκλουσης
50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
<u>10 mM</u> <u>ιμιδαζόλιο</u>	<u>10 mM</u> <u>ιμιδαζόλιο</u>	<u>20 mM</u> <u>ιμιδαζόλιο</u>	<u>250 mM</u> <u>ιμιδαζόλιο</u>
-	8M ουρία	8M ουρία	8M ουρία
pH 8	pH 8	pH 8	pH 8

Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την πρόσδεση των πρωτεϊνών πάνω στα ιόντα νικελίου. Άρα χρειαζόμαστε ένα διάλυμα με ελάχιστη συγκέντρωση για να εξασφαλίσουμε την ειδικότητα της σύνδεσης της πρωτεΐνης μας με τα σφαιρίδια με το **DNPI-10/ NPI-10**, ένα με μεγαλύτερη συγκέντρωση για να αποδεσμευτούν οι άλλες πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με μικρότερη συγγένεια **DNPI-20** κατά τις πλύσεις, και τέλος ένα με πολύ μεγάλη συγκέντρωση για να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης μας που έχει δεσμευτεί στα σφαιρίδια το **DNPI-250**.

4.1 Λύση των κυττάρων και απομόνωση των inclusion bodies

-**Φυγοκεντρώ** την καλλιέργεια για 15 λεπτά στα 6000g στους 4 °C και παίρνω το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα.

-**Επαναδιαλύω** το ίζημα με **NPI-10**, επίσης προσθέτω **λυσοζύμη** και αναστολέα πρωτεασών **PMSF**.

NPI-10 σε τελική συγκέντρωση 0.2gr/ml

Λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml

PMSF σε τελική συγκέντρωση 0.5mM

-Σπάω τα κύτταρα με **sonication** στον πάγο 10-14 δευτερόλεπτα sonication κάθε falcon που είναι γεμάτο μέχρι τη μέση 10-12 φορές το κάθε ένα.

-**Φυγοκεντρώ** στις 10000 στροφές για μισή ώρα και παίρνω το ίζημα που βρίσκεται η πρωτεΐνη μου σε inclusion bodies.

4.2 Διαλυτοποίηση inclusion bodies

-**Επαναδιαλύω** σε **NPI-10** σε τελική συγκέντρωση 0.1gr/ml

-**Φυγοκεντρώ** στις 10000 στροφές για μισή ώρα και παίρνω το ίζημα.

-**Επαναδιαλύω** το ίζημα με **DNPI-10** 2ml/gr ιζήματος

-Αφήνω 2 μέρες να διαλυθεί το ίζημα και τα inclusion bodies στο τροχό στους 4 βαθμούς κελσίου.

4.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

-**Φυγοκεντρώ 2 φορές** στις 10000 στροφές για μισή ώρα και παίρνω το υπερκείμενο.

A. Εξισορρόπηση

-Επαναιωρώ τη στήλη Protino® Ni-NTA Agarose ανακατεύοντάς τη μέχρι να γίνει ομογενές.

-Μεταφέρω την απαιτούμενη ποσότητα στήλης σε ένα σωληνάριο

-Πιπετάρω 2ml 50% συγκέντρωσης στήλης για κάθε 1ml όγκου στήλης που θα χρησιμοποιήσω.

-Αφήνω τη στήλη να αποστραγγίξει με τη βαρύτητα.

-Προσθέτω 10 όγκους στήλης DNPI-10 για να εξισορροπήσω τη στήλη.

- Αφήνω τη στήλη να αποστραγγίξει με τη βαρύτητα.

B. Δέσμευση της πρωτεΐνης

-Προσθέτω το καθαρισμένο λύμα των κυττάρων που περιέχουν τη πρωτεΐνη.

--Επωάζω μια ώρα για να προσδεθεί πάνω στα σφαιρίδια.

--Αφήνω τη στήλη να αποστραγγίξει με τη βαρύτητα.

Γ. Πλύσεις

-Προσθέτω 10 όγκους στήλης DNPI-20

-Αφήνω τη στήλη να αποστραγγίξει με τη βαρύτητα.

-Επαναλαμβάνω αυτό το στάδιο 8-10 φορές

Δ. Έκλουση

-Προσθέτω 1 όγκο στήλης DNPI-250

-Ανακινώ προσεκτικά για 2 λεπτά για να αποδεσμευτεί η πρωτεΐνη μου από τη στήλη.

-Αφήνω η στήλη να αποστραγγίξει με τη βαρύτητα και διατηρώ τη καθαρισμένη πρωτεΐνη στον πάγο.

- Επαναλαμβάνω το στάδιο της έκλουσης 4-5 φορές και κάθε φορά ελέγχω την ποσότητα της πρωτεΐνης με αντιδραστήριο Bradford.

5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου έχει ως στόχο το διαχωρισμό των πρωτεϊνών / πολυπεπτιδίων ενός μίγματος με βάση μόνο το μέγεθός τους. Η λογική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι η εξής: Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζει ένα ομοιόμορφο πλέγμα που δρα σαν εμπόδιο στις πρωτεΐνες που μετακινούνται προσανατολισμένα μέσα του, όλες με σταθερή ταχύτητα ανάλογη με την τάση που έχουμε εφαρμόσει και αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση είναι αποδιαταγμένες ώστε οι τριτοταγή τους δομή που ποικίλει να μην παίζει κανένα ρόλο. Έτσι πολύ απλά οι μεγάλες πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος της πηκτής αργά ενώ οι μικρές γρήγορα και η ταχύτητα ηλεκτροφόρησης οπότε και η τελική μετατόπιση είναι ανάλογη μόνο με το μέγεθος της πρωτεΐνης και εντελώς προβλέψιμη. Επίσης χρησιμοποιείται δείκτης μοριακών βαρών που είναι ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστού

μοριακού βάρους που ηλεκτροφορούνται σε ξεχωριστό πηγαδάκι παράλληλα με το δείγμα, με αυτόν τον τρόπο μπορούμε με μια ματιά να ελέγχουμε την πρόοδο της διαδικασίας απλά συγκρίνοντας με το δείκτη.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου γίνεται σε ειδική συσκευή υπό την επίδραση διαφοράς δυναμικού στα άκρα της. Οι πηκτές σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του Bis-ακρυλαμιδίου σε αναλογία 30/1 w/w αντίστοιχα, έτσι σχηματίζεται ένα ομογενές τρισδιάστατο πλέγμα με μέγεθος πόρων ανάλογο με το βαθμό πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και της τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED) πάνω στα δύο είδη ακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα το TEMED μετατρέπει τα δύο αυτά είδη σε ελεύθερες ρίζες και το APS πολυμερίζει αυτές τις ενεργοποιημένες ενώσεις φτιάχνοντας έτσι το πλέγμα. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που χρησιμεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε να ηλεκτροφορούνται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος.

Για τη μέθοδο χρειάζονται -δύο πηκτές, η πηκτή επιστοιβάξης και η διαχωρισμού. Η 2 πηκτές έχουν σύσταση, pH, και μέγεθος πόρων έτσι ώστε στην πηκτή επιστοιβάξης οι πρωτεΐνες να συμπυκνώνονται και να συσσωρεύονται σε σημεία μεγάλης συγκέντρωσης και στην διαχωρισμού να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος .

Πηκτή διαχωρισμού

Πηκτή (%)	Μέγεθος Πρωτεϊνών (kDa)	Διαλύματα (100ml)
6	60-200	Ακρυλαμίδιο 30%: 20.0ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9): 25.0ml 10% SDS: 1.0ml Απιονισμένο H ₂ O: 52.9ml TEMED: 0.08ml 10% APS: 1ml
8	40-140	Ακρυλαμίδιο 30%: 26.7ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9): 25.0ml 10% SDS: 1.0ml Απιονισμένο H ₂ O: 46.2ml TEMED: 0.08ml

		10% APS: 1ml
10	20-80	Ακρυλαμίδιο 30%: 33.3ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9): 25.0ml 10% SDS: 1.0ml Απιονισμένο H ₂ O: 39.6ml TEMED: 0.08ml 10% APS: 1ml
12	15-70	Ακρυλαμίδιο 30%: 40.0ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9): 25.0ml 10% SDS: 1.0ml Απιονισμένο H ₂ O: 32.9ml TEMED: 0.08ml 10% APS: 1ml
15	10-50	Ακρυλαμίδιο 30%: 50.0ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9): 25.0ml 10% SDS: 1.0ml Απιονισμένο H ₂ O: 22.9ml TEMED: 0.08ml 10% APS: 1ml

Πηκτή επιστοίβαξης

Διαλύματα (100ml)
Ακρυλαμίδιο 30%: 17ml
1M Tris-HCl (pH 6.8): 12.5ml
10% SDS: 1ml
Απιονισμένο H ₂ O: 68ml
TEMED: 0.1ml
10% APS: 1ml

6. Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250 που αποτελεί μια ανιοντική βαφή που προσδένεται στις πρωτεΐνες μη ειδικά και έχει κυρίως μη πολική δομή. Δημιουργείται ένα διάλυμα χρώσης στο οποίο επωάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα περιέχει οξικό οξύ που σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες οι οποίες κατά την επώαση χρωματίζονται μπλε. Η περίσσεια του διαλύματος χρώσης απομακρύνεται με το διάλυμα αποχρωματισμού.

Διάλυμα χρώσης με Coomassie Brilliant Blue R-250: 0.2% Coomassie Blue, 10% Acetic acid, 50% Methanol.

Διάλυμα Αποχρωματισμού για Coomassie Brilliant Blue R-250: 10% Acetic acid, 50% Methanol.

7. Απομόνωση της πρωτεΐνης από την πηκτή με ηλεκτρο-έκλυση (Electroelution)

Η τεχνική ηλεκτρο-έκλυσης (Electroelution) έχει ως στόχο την απομόνωση πρωτεϊνών ή DNA/RNA από πηκτή πολυακρυλαμιδίου/ αγαρόζης αντίστοιχα. Η αρχή της μεθόδου είναι πανομοιότυπη με την αρχή της ηλεκτροφόρησης. Η τεχνική που ακολουθήσαμε έχει ως εξής: Αρχικά γίνεται ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και στη συνέχεια η πηκτή βάφεται με Coomassie blue για 15 λεπτά και ξεβάφεται επίσης για 15 λεπτά. Η ζώνη που μας ενδιαφέρει αποκόπτεται με λεπίδα από την πηκτή και πλένεται με 10-mL 1 M Tris-HCl, pH 8.0 για 5 λεπτά και ακολουθούν 5 πλύσεις με νερό 5 λεπτά η κάθε μια και τέλος εξισορροπούμε με 10ml διαλύματος ηλεκρο-έκλυσης για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τεμαχίσαμε τη μπάντα και τοποθετήσαμε τα κομμάτια σε ένα σακουλάκι διαπίδυσης που το γεμίσαμε με 800μl διαλύματος ηλεκρο-έκλυσης. Τοποθετήσαμε το σακουλάκι σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA και το σταθεροποιήσαμε, προσέχουμε ώστε σακουλάκι να είναι βυθισμένο σε διάλυμα ηλεκρο-έκλυσης εντελώς καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Συνδέσαμε τη συσκευή με το ρεύμα στα 100V και αφήσαμε να γίνει το electroelution για 1 ώρα. Κατά την ηλεκτροφόρηση η πρωτεΐνη μετακινείται από την πηκτή στο διάλυμα. Πολύ προσεχτικά ανοίξαμε τη μεμβράνη διαπίδυσης και με μια πιπέτα πήραμε το υγρό περιεχόμενο του που περιέχει διαλυμένη την πρωτεΐνη. Στη

συνέχεια κάναμε διαπίδυση 12 ώρες σε 2 λίτρα διαλύματος διαπίδυσης. Για την τεχνική χρειάζονται τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα :

Διάλυμα Χρώσης: 0.125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 50% (v/v) methanol, 10% acetic acid.

Διάλυμα Αποχρωματισμού: 50% methanol, 10% acetic acid

Διάλυμα Ηλεκτροέκλουσης : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS

Διάλυμα Διαπίδυσης : 15 mM NH_4HCO_3 , 0.025% SDS

Γ. Αποτελέσματα

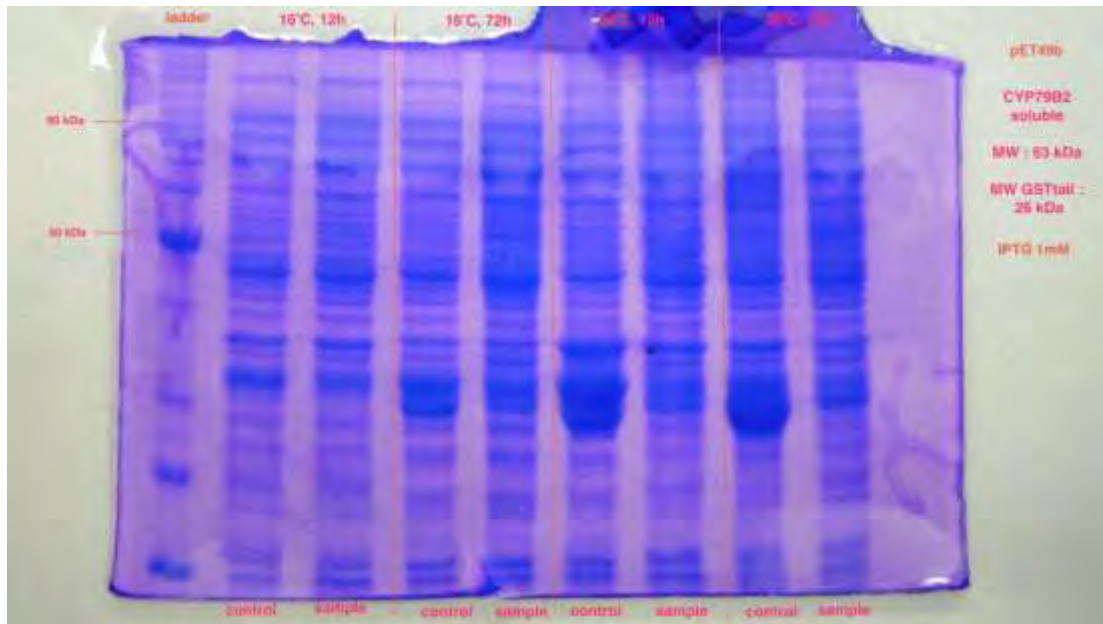
1. Κλωνοποίηση του γονιδίου *EsCYP79B2*

Το γονίδιο *EsCYP79B2* ήταν κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pGEM και είχε εισαχθεί σε κύτταρα *E.Coli* DH5a. Για να μεταφέρουμε το γονίδιο στο φορέα έκφρασης αρχικά απομονώσαμε τα πλασμίδια στα οποία το είχαμε κλωνοποιήσει με kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (Nucleospin Plasmid, Macherey-Nagel). Αφού απομονώσαμε το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο κάναμε πέψη με BamHI και Sall για να απομονώσουμε το ένθεμα (οι ίδιες θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα είχαν χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίησή του στον pGEM φορέα). Το BamHI έκοψε το ένθεμα ανωδικά του 5 άκρου του γονιδίου και το Sall καθοδικά του 3 άκρου. Στη συνέχεια με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα κόψαμε και το φορέα έκφρασης pET49b για να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα και κάναμε αντίδραση ενοποίησης για να ενσωματωθεί το ένθεμα στο νέο φορέα. Μετά στείλαμε το πλασμίδιο για αλληλούχηση για να πιστοποιήσουμε ότι το γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί σωστά στον φορέα έκφρασης ώστε να μπορέσει να εκφραστεί. Τέλος μεταφέραμε τον ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε κύτταρα έκφρασης *E.Coli* BL21.

2. Έκφραση του γονιδίου *EsCYP79B2*

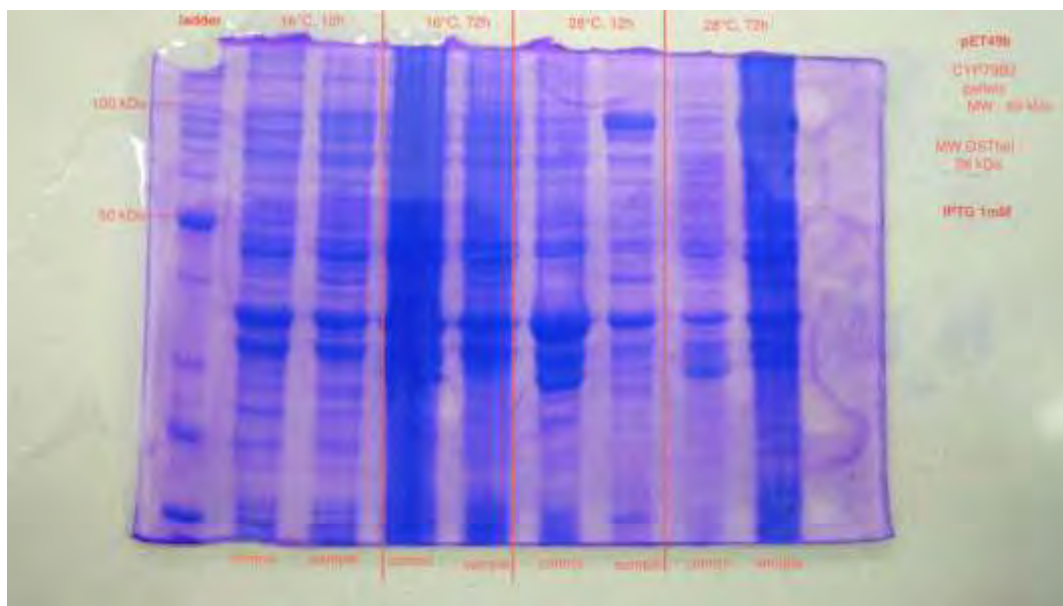
Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να βρούμε τις συνθήκες στις οποίες γίνεται η μεγαλύτερη δυνατή έκφραση του γονιδίου, οπότε κάναμε δοκιμές επωάζοντας τα κύτταρα σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης IPTG και για διαφορετικό χρόνο. Για κάθε συνθήκη ελέγχαμε την έκφραση της πρωτεΐνης *EsCYP79B2* ηλεκτροφορώντας τις ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων (αφού σπάσουμε πρώτα τα κύτταρα με SDS και εφαρμόσουμε υψηλή θερμοκρασία 95°C για 10 λεπτά) και ελέγχοντας το μέγεθος της μπάντας στην περιοχή που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που προσπαθούμε να εκφράσουμε.

Παράλληλα για κάθε συνθήκη ηλεκτροφορούμε τις ολικές πρωτεΐνες που απομονώσαμε από κύτταρα στα οποία δεν έχουμε εισάγει το γονίδιο στο φορέα ως μέτρο σύγκρισης. Βρήκαμε ότι το γονίδιό μας εκφράζεται σχετικά καλύτερα στις εξής συνθήκες: **IPTG 1mM, θερμοκρασία 28°C και χρόνος 12h** με ελαφρά ανακίνηση στα **125 rpm**. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης μαζί με την ουρά ιστιδίνης είναι **89 kDa**



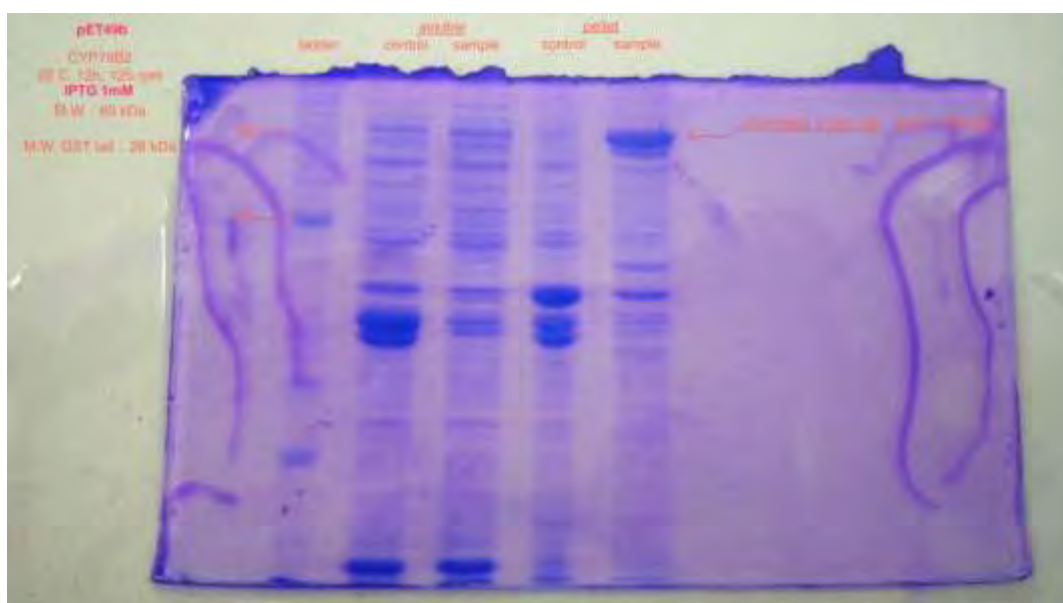
Εικόνα 12 Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE έδειξε ότι η ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης που εκφράζεται ήταν πολύ μικρή.

Μετά ελέγξαμε την πιθανότητα η πρωτεΐνη να εκφράζεται κανονικά αλλά να βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε **inclusion bodies** (δηλαδή σε συσσωματώματα που δημιουργεί η εκφραζόμενη πρωτεΐνη μας και κατά τη φυγοκέντρηση που πραγματοποιείται μετά τη λύση των κυττάρων διαχωρίζονται στο κλάσμα των μη-διαλυτών) και όχι και τόσο σε διαλυτή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα. Χρησιμοποιώντας τον αρχικό φορέα έκφρασης pET48b επαναλάβαμε την έκφραση αλλά αυτή τη φορά αναλύσαμε σε πηκτή SDS-PAGE το κλάσμα των μη διαλυτών πρωτεϊνών. Εφαρμόσαμε αποδιατακτικές συνθήκες ώστε αν πράγματι ένα σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης μας βρισκόταν σε inclusion bodies να διαλυτοποιούταν και έτσι να μπορέσει να ηλεκτροφορηθεί.



Εικόνα 23 Όταν ηλεκτροφορήσαμε το μη διαλυτό κλάσμα είδαμε ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης ήταν σε μη διαλυτή μορφή

Για σύγκριση ηλεκτροφορήσαμε στην ίδια πηκτή τόσο το κλάσμα των διαλυτών όσο και το κλάσμα των μη διαλυτών πρωτεΐνών



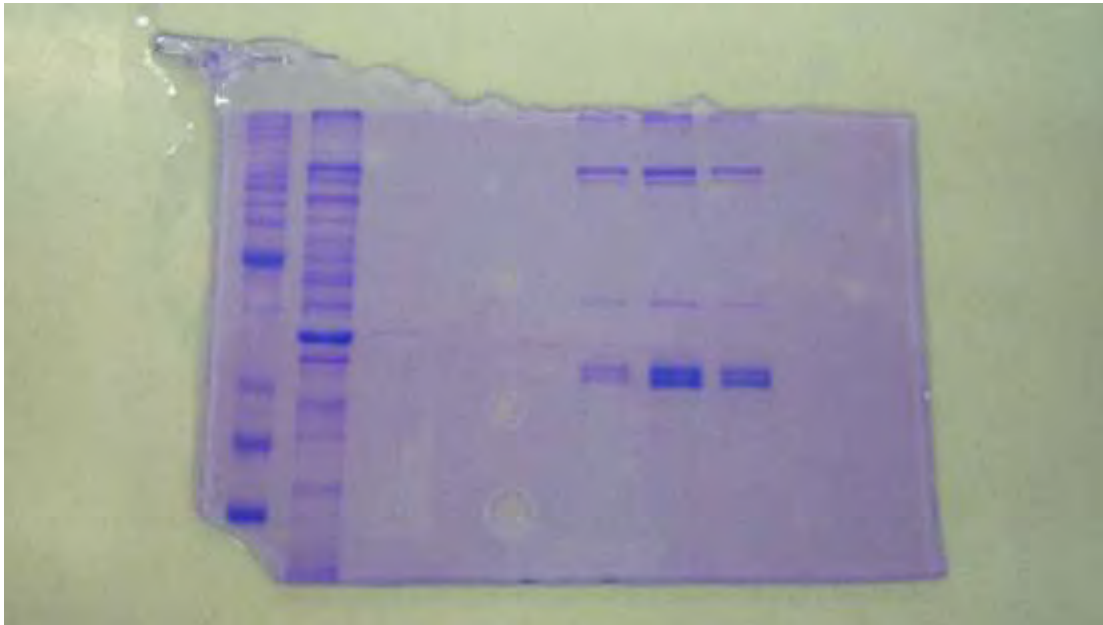
Εικόνα 14 Ηλεκτροφόρηση διαλυτής vs μη διαλυτής πρωτεΐνης

3. Καθαρισμός της πρωτεΐνης *EsCYP79B2* με χρωματογραφία συγγένειας

Αφού βρήκαμε τις συνθήκες στις οποίες υπάρχει σημαντική έκφραση, προσπαθήσαμε να επάγουμε την έκφραση ξανά σε μεγαλύτερη κλίμακα αυτή τη φορά για να απομονώσουμε την πρωτεΐνη. Οπότε

φτιάξαμε μια υγρή καλλιέργεια 2 λίτρων και επάγαμε την έκφραση με τις συνθήκες που είχαμε βρεί πριν. Στη συνέχεια σπάσαμε τα κύτταρα με υπερήχους (sonication) και προσπαθήσαμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη με χρωματογραφία στήλης νικελίου.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης ήταν υπό αποδιατακτικές συνθήκες έτσι ώστε να διαλυτοποιηθούν τα inclusion bodies και έτσι να μπορέσουμε να συλλέξουμε το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης που βρισκόταν σε μη διαλυτή μορφή. Τελικά καταφέραμε να απομονώσουμε μεγάλη ποσότητα της πρωτεΐνης όπως φαίνεται στην εικόνα.



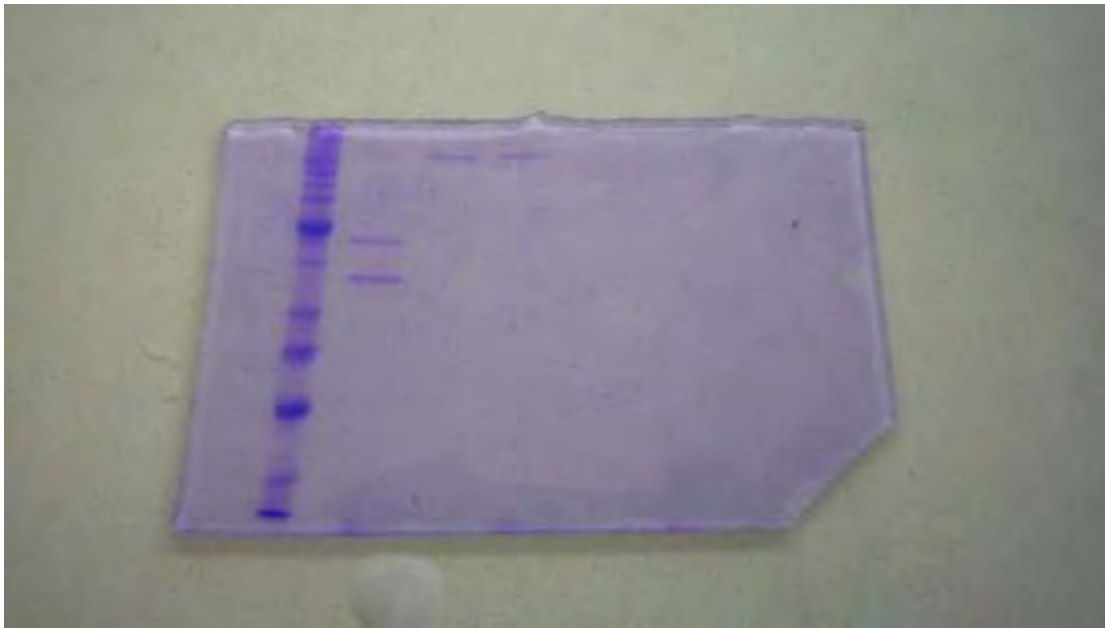
Εικόνα 15 Εδώ φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των 3 εκλούσεων, πρώτη, δεύτερη και τρίτη έκλουση από αριστερά προς τα δεξιά . Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται : ο δείκτης μοριακών βαρών, το σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη, τρεις πλύσεις και τις τρεις εκλούσεις.

Η πρωτεΐνη δεν είναι καθαρή, βλέπουμε περισσότερες από μία ζώνες στην πηκτική ακρυλαμίδης, οπότε αποφασίσαμε να επαναλάβουμε την ηλεκτροφόρηση με μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης, να κόψουμε την μπάντα που περιέχει την πρωτεΐνη και να προσπαθήσουμε να την απομονώσουμε από την πηκτική.

Φτιάξαμε πηκτική πολυακρυλαμίδης με ένα μεγάλο πηγαδάκι και ηλεκτροφορήσαμε μεγάλο μέρος από την πρωτεΐνη που πήραμε από τη

δεύτερη έκλουση, μιάς και αυτή περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης.

Τέλος κόψαμε την μπάντα που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση και προσπαθήσαμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη μας από την πηκτή με την μέθοδο ηλεκτρο-έκλουσης (electroelution) για να την πάρουμε σε καθαρή μορφή.



Εικόνα 16 Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης που απομονώσαμε από την προηγούμενη πηκτή με ηλεκτρο-έκλουση (electroelution). Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο δείκτης μοριακών βαρών, θρυψίνη, πρωτεΐνη μετά την ηλεκτρο-έκλουση, πρωτεΐνη μετά τη διαπίδυση

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία ηλεκτρο-έκλουσης ηλεκτροφορήσαμε την πρωτεΐνη που απομονώσαμε και είδαμε ότι καταφέραμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη σε ικανοποιητική ποσότητα και σε εξαιρετικά καθαρή μορφή.

Δ. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με την έκφραση, την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *EsCYP79B2*. Αυτό το γονίδιο συμμετέχει στη βιοσύνθεση γλυκοσινολικών οξέων στη ρόκα (*Eruka sativa*).

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που είναι εξειδικευμένη στην άμυνα του φυτού έναντι θηρευτών. Τα μόρια αυτά όταν απελευθερωθούν ως αποτέλεσμα της επίθεσης του θηρευτή, γρήγορα αποικοδομούνται προς δραστικές ουσίες και έτσι αποτρέπουν περαιτέρω ζημιά από το θηρευτή (Kelly *et al.*, 1998). Τα δεδομένα για την επίδραση των γλυκοσινολικών οξέων στον άνθρωπο και στα άλλα θηλαστικά είναι εξαιρετικά αντικρουόμενα και η μοριακή βάση της δράσης τους είναι σχεδόν εντελώς άγνωστη. (Poppel *et al.*, 1999; Brader *et al.*, 2001; Tierens *et al.*, 2001; Lambrix *et al.*, 2001; Von Borstel & Higgins 1998; Verhoeven *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1999; Engelen-Eingles *et al.*, 2006; Talalay & Fahey 2001).

Το γενικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων είναι χωρισμένο σε 3 στάδια, με κάθε διαδοχικό στάδιο να είναι και πιο εξειδικευμένο. Το γονίδιο *CYP79B2* βρίσκεται στην αρχή του δεύτερου σταδίου και κωδικοποιεί μια NADPH εξαρτώμενη μονοξυγενάση (Mikkelsen *et al.*, 2000). Το προϊόν του γονιδίου αυτού επίσης καταλύει ακόμα μια αντίδραση σε ένα φαινομενικά πολύ διαφορετικό μονοπάτι, στη τρυπτοφانو-εξαρτώμενη βιοσύνθεση της αυξίνης (Cohen *et al.*, 2003). Αυτό το γεγονός μας δίνει μια ιδέα για την εξελικτική προέλευση των γλυκοσινολικών οξέων και κατ' επέκταση όλων των δευτερογενών μεταβολιτών.

Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων έχει μελετηθεί εκτενώς στο *Arabidopsis thaliana*, έχουν χαρακτηριστεί όλα τα γονίδια του πρώτου και του δεύτερου σταδίου της βιοσύνθεσης αλλά η γνώση για το τρίτο και τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης είναι περιορισμένη (Sønderby & Halkier, 2010). Το γονίδιο *AtCYP79B2* είναι το αντίστοιχο ομόλογο στο *Arabidopsis* και είναι πλήρως χαρακτηρισμένο. Εφόσον το *Arabidopsis* και η ρόκα είναι εξελικτικά κοντά και επειδή αυτό το γονίδιο εμπλέκεται σε δύο μονοπάτια, οπότε υπόκειται σε ισχυρότερη εξελικτική πίεση, η πρωτοταγής δομή των δύο πρωτεϊνών είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό όμοια και η βιολογική τους δράση είναι εντελώς πανομοιότυπη.

Έχοντας ως σκοπό την παραγωγή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας της πρωτεΐνης *EsCYP79B2* σε καθαρή μορφή, κλωνοποιήσαμε το ORF του γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης και εκφράσαμε την πρωτεΐνη σε κατάλληλα κύτταρα έκφρασης. Το ORF του γονιδίου είχε κλωνοποιηθεί σε φορέα κλωνοποίησης *pGEM* σε προηγούμενη εργασία. Επομένως κόψαμε το πλασμίδιο αυτό με περιοριστικά ένζυμα για να απελευθερωθεί το γονίδιο από το φορέα και το εισάγαμε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης *pET49b*. Ακολούθησε αλληλούχιση, που μας πιστοποίησε ότι το ORF του γονιδίου είχε εισαχθεί σωστά.

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να επάγουμε την έκφραση του γονιδίου με IPTG. Κάναμε δοκιμές σε διαφορετικές συνθήκες συγκέντρωσης IPTG, χρόνου επώασης και θερμοκρασίας και καταλήξαμε στις συνθήκες που επιφέρουν τη μέγιστη έκφραση. Για να ελέγξουμε τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, αφού λύσαμε τα κύτταρα, ηλεκτροφορήσαμε το διαλυτό και το μη διαλυτό κλάσμα των ολικών πρωτεϊνών και βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη εμφανίζεται πολύ περισσότερο σε αδιάλυτη μορφή.

Η μη διαλυτότητα της πρωτεΐνης μας οδήγησε στο να την καθαρίσουμε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Το γονίδιο μας είχε κλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με μια αλληλουχία που της προσθέτει έναν επίτοπο 6 ιστιδινών στο αμινο-τελικό της άκρο. Η παρουσία των έξι ιστιδινών επιτρέπει την απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία στήλης νικελίου. Η ηλεκτροφόρηση τριών εκλουσμάτων που πάρθηκαν από τη διαδικασία του καθαρισμού έδειξε ότι ο καθαρισμός με τη στήλη δεν ήταν απόλυτα επιτυχής μιας και απομονώθηκαν και ζώνες από άλλες πρωτεΐνες.

Για να απαλλαγούμε από την παρουσία των επιπλέον ζωνών και να πάρουμε την πρωτεΐνη σε εντελώς καθαρή μορφή χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο απομόνωσης μοναδικής ζώνης από την πηκτή σε συνδυασμό με τη μέθοδο της ηλεκτρο-έκλουσης (*electroelution*). Ηλεκτροφορήσαμε τα κλάσματα έκλουσης (που συλλέξαμε στη διαδικασία του καθαρισμού) σε πηκτή ακρυλαμίδης που έχει ένα μόνο μεγάλο πηγαδάκι και με το πέρας της ηλεκτροφόρησης κόψαμε τη ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη μας. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της ηλεκτρο-έκλουσης (*electroelution*) καταφέραμε να μεταφέρουμε την πρωτεΐνη από τη πηκτή σε υδατικό

διάλυμα. Με το πέρας της διαδικασίας αυτής καταφέραμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη μας σε απόλυτα καθαρή μορφή και σε ικανοποιητική ποσότητα.

Η καθαρή πρωτεΐνη πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο για τη σάρωση μιας παραγόμενης βιβλιοθήκης αντισωμάτων που προέρχονται από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η μεγάλη ομοιότητα των δύο φυτών (*Eruka sativa* και *Arabidopsis thaliana*) μπορεί να επιτρέψει την αλληλεπίδραση της απομονωμένης πρωτεΐνης *EsCYP79B2* με κάποια ή κάποιες πρωτεΐνες του *Arabidopsis* οπότε με τη διαδικασία αυτή θα μπορούσαμε ίσως να ανιχνεύσουμε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την *EsCYP79B2*.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μια προσπάθειας μελέτης των μονοπατιών βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών στη ρόκα, εκμεταλλεύομενοι την εκτενή μελέτη που έχει γίνει στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Είναι πολύ πιθανό ένα από τα επόμενα στάδια της έρευνας στον τομέα των γλυκοσινολικών να είναι η χρήση της γνώσης που αποκτήθηκε από το *Arabidopsis thaliana* για τη βελτίωση/τροποποίηση καλλιεργούμενων φυτών όπως η ρόκα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Τσέκος Φυσιολογία Φυτών 2004 σελ, 543-577

Kollner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J., Degenhardt, J., (2004) The variability of sesquiterpenes cultivars is controlled by allelic emitted from two *Zea mays* variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* 16, 1115–1131.

Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant Journal*. 42, 757–771.

Kelly, P.J., Bones, A., and Rossiter, J.T. (1998) Sub-cellular immunolocalisation of the glycosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* 206, 370-377

Andreasson, E., Jorgensen, L.B, Hoglund, A.S., Rask, L., and Meijer, J (2001) Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* 127, 1750-1763

Sønderby I.E., Geu-Flores F., Halkier B.A. (2010) Biosynthesis of glucosinolates Gene discovery and beyond. *Trends Plant Science* 15, 283–290.

Wittstock, U., and Halkier, B.A. (2002) Glycosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* 7, 263-270

Van Poppel G., Verhoeven DT., Verhagen H., Goldbohm RA. (1999) Brassica Vegetables and cancer prevention. Epidemiology and Mechanisms. *Advances in Experimental Medicine Biology* 472, 159-68

Brader, G., Tas, E., and Palva, E.T (2001) Jasmonate-dependent induction of indole glycosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology* 126, 849-860

Tierens K.F.M.J., Tomma, B.P.H., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P.A., and Broekaert., W.F (2001). Study of the antimicrobial glycosinolate derivative isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology* 125, 1688-1699

Talalay,P., and Fahey, J.W (2001) Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition* 131, 3027-3033

- Kliebenstein, D.J. ., Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T (2005) The glucosinolate myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 264-271
- Von Borstel, R.C., Higgins J.A. (1998) Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402, 321-329
- Verhoeven, D.T., R.A. Goldbohm, G. Poppel, H. Verhagen and P.A. Brandt, (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biol. Preven.* 5, 733-748.
- Hecht, S.S (1999) Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition* 129, 768-774
- Textor, S., Bartram, S., Kroymann, J., Falk, K.L., Hick, A., Pickett, J.A., and Gershenzon, J. (2004) Biosynthesis of methionine derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 218, 1026-1035
- Mikkelsen, M.D., Petersen, B.L., Olsen, C.E., and Halkier, B.A, (2002) Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* 22, 279-295
- Sonderby, I.E, Geu-Flores F, Halkier, B.A (2010) Biosynthesis of Glucosinolates gene-discovery and beyond. *Trends in Plant Science*
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., and Halkier, B.A. (2000). Cytochrome P450 CYP450B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33712-33717
- Grubb, C.D., Abel, S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11, 89-100
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., Hendrickson, A.M., (2003) Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* 8, 197-199