

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ Β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS***



ΤΣΙΒΙΑΤΙΔΟΥ ΠΑΡΘΕΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ Β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS***

**ISOLATION AND PURIFICATION OF THE B-
AMYRIN PROTEIN OF THE *LOTUS JAPONICUS*
PLANT**

Τριμελής επιτροπή:

Λεωνίδας Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Τα τριτερπένια αποτελούν την κύρια ομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων, που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Καθοριστικής σημασίας κρίνεται η συμμετοχή τους τόσο στην ανάπτυξη των φυτών όσο και στην προσαρμογή τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε αρκετά φυτικά είδη έχει παρατηρηθεί η οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σε γονιδιακές συστοιχίες. Έτσι, είναι δυνατό να παράγεται μία ευρεία ποικιλία τριτερπενοειδών δομών, έπειτα από τη σύνθεσή τους από γονίδια που κωδικοποιούν κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (OSCs) και από γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμβάλλουν στη βιολογική ενεργοποίηση των τριτερπενίων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η υπερέκφραση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης του φυτού *Lotus japonicus* (*AMY2*) που κωδικοποιεί για μία κυκλάση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Για την υπερέκφραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν ο πλασμιδιακός φορέας *pgex-6p-1* και το στέλεχος *BL21* του βακτηρίου *Escherichia coli*. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές έκφρασης του γονιδίου, κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG. Αυτό είχε σαν σκοπό την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης στην οποία η επιθυμητή πρωτεΐνη βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης σε στήλη *micro biospin* προκειμένου να συλλεχθεί και να μελετηθεί εκτενέστερα η δομή και η λειτουργία της μελλοντικά.

ABSTRACT:

Triterpenes constitute the main group of the terpene superfamily of secondary metabolites. They play a defining role in plant development, as well as in the adaptability of plants to their environment. In many plant species the genes that are involved in the biosynthesis of triterpenoids have been observed to form gene clusters. This enables the production of a wide range of triterpenoid structures. These structures are formed by genes that encode 2,3-oxidosqualene cyclases (OSCs) and genes that encode enzymes, which take part in the biological activation of triterpenes. This present work examines the overexpression of β -amyrin synthase, which encodes a 2,3-oxidosqualene cyclase, in *Lotus japonicus* (AMY2). Overexpression of β -amyrin synthase was achieved through use of a p_{gex-6p-1} plasmid vector and BL21 bacterial strain of *Escherichia coli*. Initially, the expression of AMY2 was investigated under different temperatures and different IPTG concentrations, in order to determine the accurate conditions, in which the desired protein is found in maximum concentration in the supernatant. Subsequently, the purification of the protein was conducted in a micro-biospin column. The desired protein was collected and will be used for further examination of its structure and function in the future.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:	4
ABSTRACT:	5
Περιεχόμενα	6
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:	8
1. Δευτερογενείς Μεταβολίτες	8
1.1. Η σημασία των δευτερογενών μεταβολιτών	8
2. Τερπένια-Τριτερπενοειδή	10
2.1. Βιοσύνθεση τριτερπενίων.....	10
3. Αμυρίνες.....	14
3.1. Α-αμυρίνη (ή a-amyrin)	14
3.2. Β-αμυρίνη (ή b-amyrin)	15
3.2.1. Βιοσύνθεση β-αμυρίνης	15
3.2.2. Ρόλος β-αμυρίνης-Παραδείγματα σε διάφορα είδη φυτών	16
4. Συνθάση της β-αμυρίνης	18
4.1. Γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	18
5. Lotus japonicus.....	21
6. Υπερέκφραση πρωτεϊνών	22
6.1. Ετερόλογη υπερέκφραση.....	22
6.2. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια	24
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	25
1. Μοριακή Κλωνοποίηση.....	25
1.1. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού	25
1.2. Αντίδραση Λιγάσης.....	25
2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	27
3. Απομόνωση και καθαρισμός της συνθάσης της β-αμυρίνης από βακτήρια <i>Escherichia Coli BL21</i>	29
3.1. Καλλιέργεια βακτηρίων <i>Escherichia coli</i> και επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	29
3.2. Προεργασία για την απομόνωση και τον καθαρισμό της συνθάσης της β-αμυρίνης..	30
3.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	32
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	37

A. Δοκιμές για την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης παραγωγής της συνθάσης της β-αμυρίνης (AMY2)	37
B. Καθαρισμός της πρωτεΐνης AMY2 σε καλλιέργεια μικρής κλίμακας	40
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ:	42
Πηγές:	45

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

1. Δευτερογενείς Μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν χημικές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος που παράγονται τόσο από τα φυτά όσο και από άλλους οργανισμούς (φαιοφύκη, μύκητες, βακτήρια) και δεν φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή του οργανισμού.

Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως χλωροφύλλη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, απλοί υδατάνθρακες ή μεμβρανικά λιπίδια, η απουσία των δευτερογενών μεταβολιτών δεν προκαλεί άμεσο θάνατο, αλλά μακροπρόθεσμη βλάβη της επιβίωσης, της γονιμότητας, του φαινότυπου του οργανισμού ή ενδεχομένως κάποια σημαντική αλλαγή σε όλα αυτά.

Στα φυτά, δεν έχουν γενικά αναγνωρισμένους ρόλους σε βασικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η μεταφορά διαλυμένων ουσιών και η αφομοίωση θρεπτικών ουσιών με αποτέλεσμα να ονομαστούν δευτερογενείς μεταβολίτες ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού [1].

Οι τρεις κύριες ομάδες των φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών, όπως κατατάσσονται με βάση τα βιομόρια από τα οποία προέρχονται, είναι οι φαινολικές ενώσεις, τα τερπένια και οι αζωτούχες ενώσεις.

1.1. Η σημασία των δευτερογενών μεταβολιτών

- Η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται στενά τόσο με την ύπαρξη όσο και με τη λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτικών ειδών. Επιπλέον, συνδέεται με πληθώρα οικολογικών ρόλων, όπως η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, η επικονίαση και ο ανταγωνισμός με άλλα είδη.

- Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών η οποία συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης, δηλαδή το μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων [10].

2. Τερπένια-Τριτερπενοειδή

Τα τερπένια είναι η μεγαλύτερη ομάδα των μεταβολιτών αυτών, με κυριότερη ομάδα τα τριτερπενοειδή (ή αλλιώς τριτερπένια) , τα οποία αποτελούν δομικά πολύπλοκα μόρια με σχετικά μικρό μοριακό βάρος, εν δυνάμει φάρμακα,καλλυντικά καθώς και πρόσθετα τροφίμων [5].

Τα τερπένια ταξινομούνται, με βάση τον αριθμό των μονάδων με πέντε άτομα άνθρακα που αυτά περιέχουν, σε μονοτερπένια (2 C₅ μονάδες), σεσκιτερπένια (3 C₅ μονάδες) και διτερπένια (4 C₅ μονάδες). Πιο επιμήκη τερπένια συμπεριλαμβάνουν τριτερπένια (30 C), τετρατερπένια (40 C) και πολυτερπενοειδή ([C₅]_n, n>10) [1].

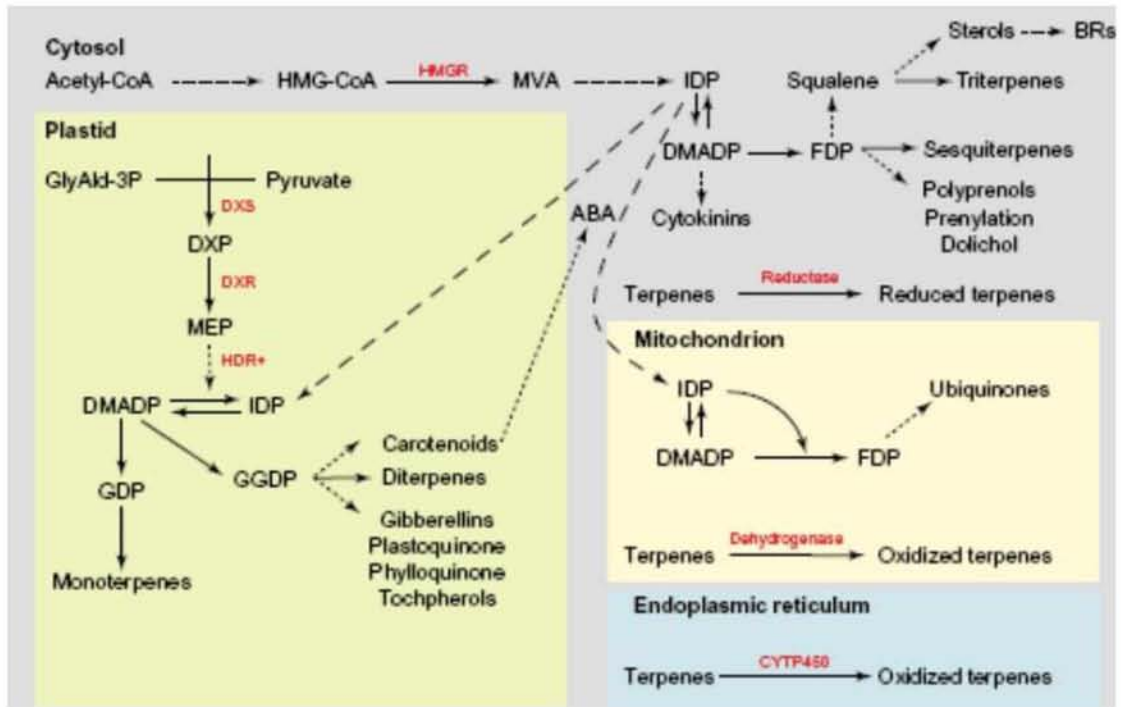
2.1.Βιοσύνθεση τριτερπενίων

Ανεξάρτητα από τη δομή τους, όλα τα τερπένια συντίθενται από δύο πρόδρομα μόρια, το ισοπρενυλικό διφωσφατίδιο (IPP) και τη διμεθυλαλλική πυροσφωρική ισομεράση του (DMAPP). Παρόλο που το IPP και η DMAPP αποτελούν κοινά πρόδρομα μόρια για την παραγωγή των τερπενίων, υπάρχουν δύο διακριτά μονοπάτια βιοσύνθεσής τους στο φυτικό βασίλειο. Το ένα είναι το καλά μελετημένο **μεβαλονικό μονοπάτι (mevalonate pathway, MVA)** και το άλλο είναι το σχετικά νέο **μεθυλό-ερυθριτολικό-φωσφατιδικό μονοπάτι (methyl-erythritol-phosphate pathway, MEP)**.

Το μονοπάτι *MEP* εντοπίζεται στα φυτά και συγκεκριμένα στα πλαστίδια των φυτών, αποτελώντας το μονοπάτι σύνθεσης των μονοτερπενίων, των διτερπενίων, των τετρατερπενίων (καροτενοειδών) καθώς και των πολυτερπενοειδών.

Αντίθετα, το *MVA* μονοπάτι κυριαρχεί στο κυτόλυμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ευθύνεται για τη βιοσύνθεση των σεσκιτερπενίων, των στερολών και των τριτερπενίων [1].

Τα μονοπάτια *MEP* και *MVA* απεικονίζονται αναλυτικά στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Τα μονοπάτια βιοσύνθεσης, MEP και MVA [1].

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών, προκύπτουν όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, όπως και οι στερόλες από το μεβαλονικό οξύ, με πρόδρομο βιοσυνθετικό μόριο το σκουαλένιο.

Το σκουαλένιο οξειδώνεται με τη δράση του ενζύμου οξειδάση του σκουαλενίου και προκύπτει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, το οποίο αποτελεί κομβικό σημείο μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού καθώς λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τις παρακάτω 3 κατηγορίες ενζύμων:

- τις *συνθάσες των στεροειδών*, με τη βοήθεια των οποίων προκύπτουν οι γνωστές στερόλες με βιολογικό ρόλο σαν συστατικά των μεμβρανών και δράση στη σηματοδότηση
- τις *συνθάσες των τριτερπενοειδών*, οι οποίες κυκλοποιούν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο προς τις πεντακυκλικές δομές όπως είναι η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη και
- τις *συνθάσες μεικτής δράσης*, οι οποίες χρησιμοποιούν το ίδιο ακριβώς υπόστρωμα και παράγουν μεικτά προϊόντα πχ και λουπεόλη και β-αμυρίνη.

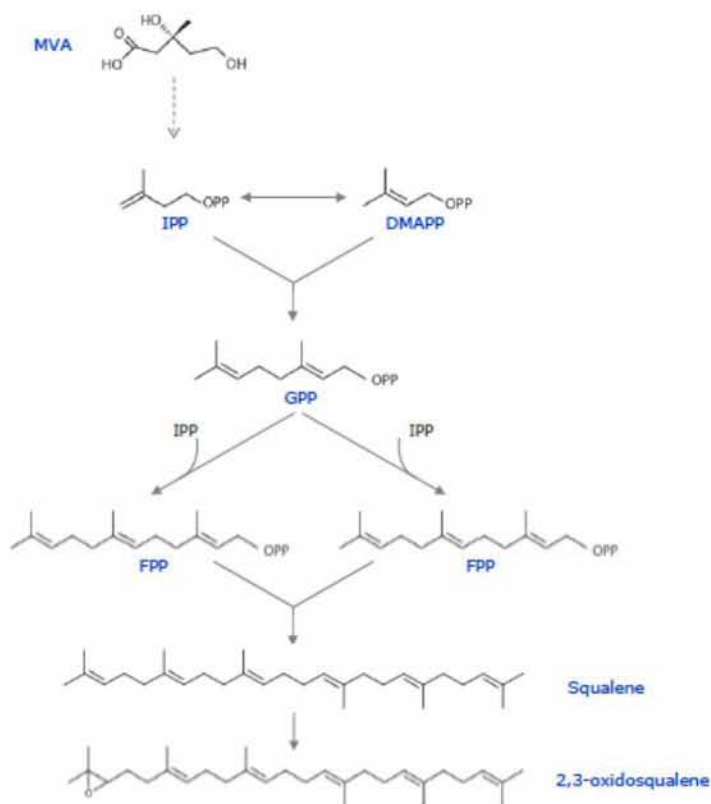
Στο *μεβαλονικό μονοπάτι (MVA)*, το μεβαλονικό στο ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί ένα εξανθρακικό ενδιάμεσο μόριο, το οποίο προκύπτει από τη διαδοχική συμπίκνωση τριών υπομονάδων του ακετυλοσυνενζύμου Α (ακετυλο-CoA), το μόριο εισόδου στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικού-κοενζύμου Α (HMG-CoA), με τη δράση μιας θειολάσης και μιας συνθάσης. Αυτό με τη σειρά του μετατρέπεται σε μεβαλονικό οξύ στο κυτταρόπλασμα μέσω μιας μη αναστρέψιμης αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο αναγωγή του HMG-CoA (HMGR). Το εξανθρακικό μεβαλονικό φωσφορυλιώνεται στη συνέχεια δύο φορές από δύο κινάσες: την κινάση του μεβαλονικού οξέος και την κινάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος [12]. Έπειτα, απομακρύνεται ένα μόριο CO₂ μέσω της αποκαρβοξυλάσης του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και έτσι προκύπτει η ισοπεντενυλική πυροφωσφορική ισομεράση (IPP).

Όσο αναφορά τη βιοσύνθεση των τριτερπενίων και των στερολών, το ισοπεντύλιο IPP προστίθεται στη διμεθυλαλλική πυροσφορική ισομεράση (DMAPP) προκειμένου να σχηματίσει το διφωσφορικό γερανύλιο (geranyl diphosphate, GPP). Περαιτέρω συμπίκνωση της GPP με την IPP προκαλεί το σχηματισμό του μεγαλύτερου πρενυλ-διφωσφατιδίου, του φαρνεσυλ-διφωσφατιδίου (farnesyl diphosphate, FPP). Έπειτα αυτό υφίσταται διμερισμό και συντίθενται το σκουαλένιο. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλτρανσφερασών στο κυτταρόπλασμα.

Τέλος, το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου προσθέτει ένα άτομο οξυγόνου απέναντι από τον πρώτο διττανθρακικό δεσμό σχηματίζοντας το εποξείδιο 2,3-οξειδοσκουαλενίου από το οποίο με οξείδωση προκύπτει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο [5] (βλ. **Εικόνα 2**).

Εκτός από την οδό του μεβαλονικού οξέος, τα φυτά εναλλακτικά βιοσυνθέτουν το ισοπρένιο μέσω του *μονοπατιού της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-ερυθρίτης (MEP)* που λαμβάνει μέρος στους χλωροπλάστες [13]. Το πλαστιδιακό μονοπάτι θεωρείται υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων, των διτερπενίων και των

τετρατερπενίων, καθώς και της φυτόλης, των καροτενοειδών και της πλευρικής αλυσίδας της χλωροφύλλης.



Εικόνα 2. Βιοσύνθεση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου μέσω του MVA μονοπατιού [5].

Η πρώτη αντίδραση αυτού του μονοπατιού είναι η σύμπτυξη του πυροσταφυλικού και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, ένα ενδιάμεσο που προέρχεται από την γλυκόλυση και τον κύκλο του Calvin, προς παραγωγή 1-δεοξυ-5-φωφο-ξυλουλόζης (DXP) [14]. Στη συνέχεια, μέσω της ρεδοκτάσης DXP και με κατανάλωση 1 μορίου NADPH, παράγεται η 4-φωσφορική-2-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (CDP). Έπειτα, μέσω μιας ρεδοκτάσης και δύο συνθασών, παράγεται το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο.

Σήμερα έχει αποδειχτεί ότι μεταξύ των δύο μονοπατιών που λειτουργούν παράλληλα υπάρχει ανταλλαγή πρόδρομων χημικών μορίων, ενώ κάποια τερπένια βιοσυντίθενται μέσω και των δυο μονοπατιών, ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού. Έχει παρατηρηθεί μεταφορά ισοπρενίων από το κυτταρόπλασμα στα πλαστίδια και αντίστροφα.

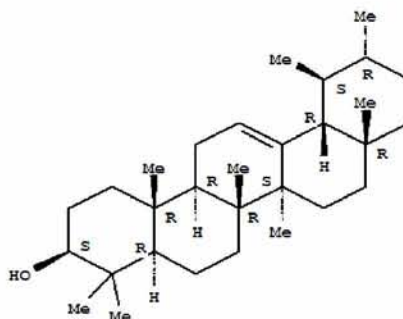
3. Αμυρίνες

Οι αμυρίνες αποτελούν ζεύγος στενά συνδεδεμένων χημικών ενώσεων της τάξης των τριτερπενίων. Διακρίνονται σε α-αμυρίνη και β-αμυρίνη, με χημικό μοριακό τύπο $C_{30}H_{50}O$. Πρόκειται για χημικές ενώσεις που απαντώνται ευρέως στη φύση, κυρίως σε φαρμακευτικά φυτά, και έχουν απομονωθεί από μια μεγάλη ποικιλία φυτικών πηγών όπως φυτικά τμήματα για παράδειγμα φύλλα, φλοιό, ξύλο και ρητίνες.

Όσο αναφορά τη δράση τους, είναι γνωστές για τις φαρμακολογικές τους δράσεις τόσο σε συνθήκες *in vivo* όσο και σε συνθήκες *in vitro*, έναντι συνθηκών που αφορούν την υγεία όπως οι λοιμώξεις, οι φλεγμονές και τα καρκινικά κύτταρα [4].

3.1. Α-αμυρίνη (ή a-amyrin)

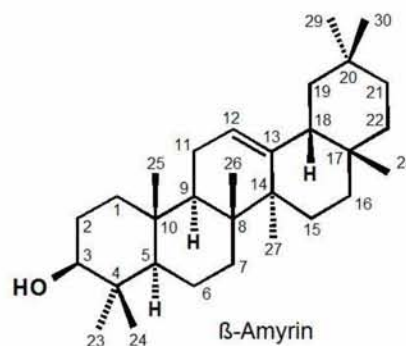
Η α-αμυρίνη είναι ένα τριτερπένιο φυτικής προέλευσης, το οποίο, όπως όλα τα τριτερπένια, χαρακτηρίζεται από έντονη αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση [4].



Εικόνα 3. Δομή α-αμυρίνης [4].

3.2. Β-αμυρίνη (ή b-amyirin)

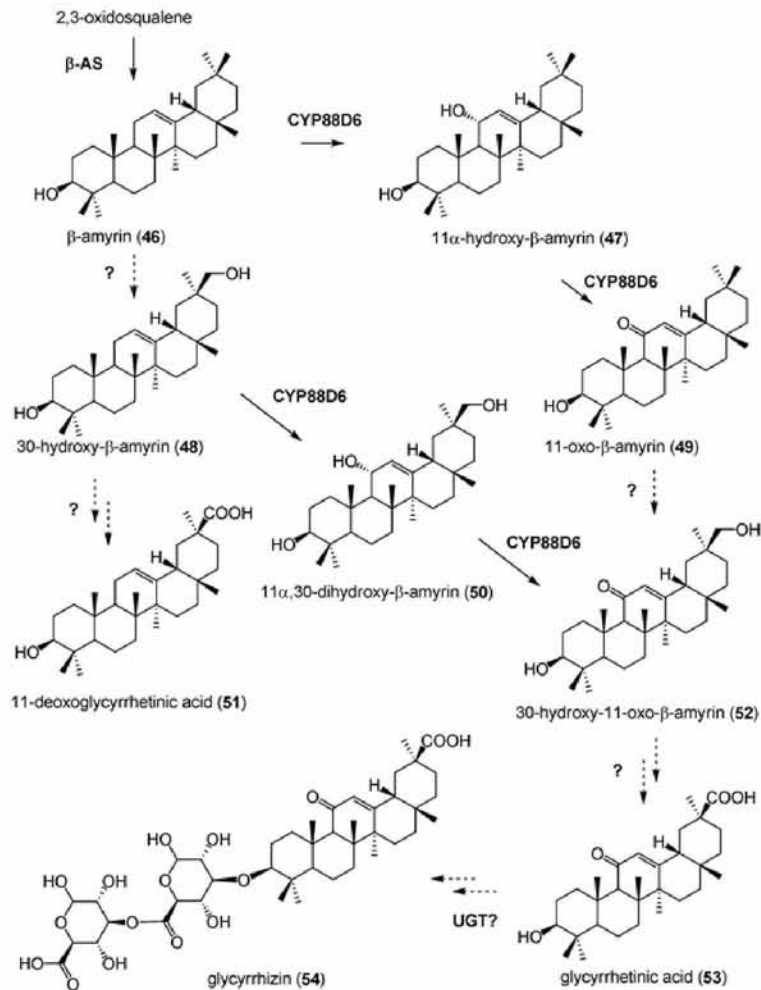
Η β-αμυρίνη αποτελεί το μέχρι τώρα πιο δημοφιλή τύπο τριτερπενίου που έχει βρεθεί στα φυτά. Πρόκειται για ένα φυτικό δευτερογενή μεταβολίτη, ένα πεντακυκλικό σκελετό άνθρακα (ολεανικό σκελετό), ο οποίος βιοσυντίθεται από το (3S) -2,3-οξειδοσκουαλένιο με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση της β-αμυρίνης (AMY2) [4].



Εικόνα 4. Δομή β-αμυρίνης [4].

3.2.1. Βιοσύνθεση β-αμυρίνης

Προκειμένου να σχηματιστεί το πεντακυκλικό τριτερπένιο β-αμυρίνη από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, πραγματοποιείται αρχικά άνοιγμα του δακτυλίου εποξειδίου (epoxide ring), το οποίο ακολουθείται από κυκλοποίηση του κατιόντος-π. Η κυκλοποίηση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό τετρακυκλικού κατιόντος νταμαρενυλίου (dammaranyl cation). Μετά την επέκταση του δακτυλίου και το σχηματισμό πέμπτου δακτυλίου, σχηματίζεται το κατιόν λουπενυλίου (lupenyl cation). Μια επόμενη επέκταση του δακτυλίου αυτού, η οποία ακολουθείται από μια σειρά στερεοειδικών 1,2-υδριδικών εναλλαγών καθώς και η τελική αφαίρεση των 12Α πρωτονίων μας οδηγούν τελικά στο σχηματισμό της β-αμυρίνης.



Εικόνα 5. Βιοσύνθεση β-αμυρίνης [2].

3.2.2. Ρόλος β-αμυρίνης-Παραδείγματα σε διάφορα είδη φυτών

Τα φυτά συνθέτουν τόσο στερόλες όσο και τριτερπένια μέσω του ισοπρενοειδούς μονοπατιού με κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου.

Οι στερόλες είναι γνωστές ως σημαντικά μεμβρανικά συστατικά αλλά διαδραματίζουν και σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των ορμονών, δρώντας ως πρόδρομες ουσίες. Αντίθετα, η βιολογική λειτουργία των τριτερπενίων, όπως η β-αμυρίνη, στα φυτά είναι λιγότερο εξακριβωμένη. Ορισμένα φυτά συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τριτερπενίων με τη μορφή γλυκοζιτών (γνωστοί και ως σαπωνίνες τριτερπενοειδών) συνήθως στις ρίζες.

Πολλά γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια έχουν αντιμικροβιακή δράση και για το λόγο αυτό καθίστανται ικανά να προστατεύουν τα φυτά ενάντια σε παθογόνα. Πιο συγκεκριμένα, η β-αμυρίνη αποτελεί τριτερπένιο με χαρακτηριστική αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση, προστατεύοντας έτσι το φυτό στο οποίο παράγεται από διάφορα μικρόβια. Παρόλα αυτά κάποια από αυτά τα μόρια ενδέχεται να έχουν περαιτέρω λειτουργίες. Για παράδειγμα, οι σαπωνίνες του *Pisum sativum* έχουν προταθεί για τη ρύθμιση της σύνθεσης τόσο του βαρυτροπισμού όσο και της κυτταρίνης στα φυτά.

Πιο συγκεκριμένα, στο είδος *Pisum sativum* και στα *Sorgum sp*, η παραγωγή της β-αμυρίνης είναι ιδιαίτερος αυξημένη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και αμέσως μετά τη βλάστηση, σε αντίθεση με τη βιοσύνθεση των στερολών η οποία ξεκινάει 7 μέρες αργότερα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως οι εν λόγω διακόπτες στο μεταβολισμό μπορεί να είναι ένα συνήθες φαινόμενο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυξημένα επίπεδα τόσο της β-αμυρίνης όσο και άλλων τριτερπενίων ενδεχομένως να αποτελούν ένδειξη ενεργής βιοσύνθεσης σαπωνίνης.

Παρόλα αυτά οι αγλυκόνες των τριτερπενίων, οι ενώσεις δηλαδή που δημιουργούνται από την αντικατάσταση μιας γλυκοζυλικής ομάδας ενός γλυκοζυλίου από ένα άτομο υδρογόνου, μπορεί επίσης να έχουν βιολογική δράση στα φυτά, δρώντας ως διαρθρωτικά συστατικά των μεμβρανών αφενός κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και αύξησης των φυτών και αφετέρου κατά τη συμβίωση των ριζοβίων και των μυκορριζών [2].

4. Συνθάση της β-αμυρίνης

Οι κυκλοποιήσεις του οξειδοσκουαλενίου σε πεντακυκλικό σκελετό άνθρακα τριτερπενίων είναι από τις πιο πολύπλοκες αντιδράσεις που βρίσκονται στη φύση, καταλυόμενες από ένζυμα που ονομάζονται κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου (OSCs), στα οποία ανήκει και η συνθάση της β αμυρίνης. Οι συνθάσες των τριτερπενίων προσέλκυσαν ιδιαίτερη προσοχή όσο αναφορά το μεταβολισμό των φυτών.

Οι κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου διακρίνονται, όσο αναφορά τις στερόλες, στη συνθάση κυκλοαρτενόλης και στη συνθάση λανοστερόλης και όσο αναφορά τα πεντακυκλικά τριτερπένια, στις συνθάσες τριτερπενίων όπως είναι και η συνθάση της β-αμυρίνης [3]. Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου για την παραγωγή τόσο στερολών όσο και τριτερπενίων αποτελεί κομβικό σημείο μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού.

Το ένζυμο συνθάση της β-αμυρίνης (AMY2), αποτελεί ένα εξειδικευμένο ένζυμο που καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου σε β-αμυρίνη, παράγοντας πέντε δακτυλίους και οκτώ ασύμμετρα κέντρα σε ένα ενιαίο μετασχηματισμό. Πρόκειται για μια κυκλάση οξειδοσκουαλενίου (OSC) μεικτής λειτουργίας, ικανή να συνθέσει τόσο β-αμυρίνη όσο και διυδρο-λουπεόλη [7].

4.1. Γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης

Το παραπάνω ένζυμο, η συνθάση της β-αμυρίνης (AMY2), κωδικοποιείται από το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης (AMY2/OSC8) στο *Lotus japonicus*.

Στο *Lotus japonicus* το γονίδιο αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 όπου έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονιδιακές συστοιχίες στις οποίες και περιέχεται. Στη μία γονιδιακή συστοιχία, βρίσκονται γειτονικά του γονιδίου αυτού δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450, το ένζυμο *LjCYP88D5* με άγνωστη ως τώρα λειτουργία και το ένζυμο *LjCYP71D353* που μετατρέπει την διυδρο-λουπεόλη σε 20-

υδροξυλουπεόλη. Τα γονίδια αυτά είναι γειτονικά μεταξύ τους, απέχουν περίπου 60 kb από το γονίδιο της *AMY2* και πιθανώς μοιράζονται ένα κοινό ρυθμιστικό στοιχείο 2 kb. Η δεύτερη γονιδιακή συστοιχία βρίσκεται 200 kb μακριά από την πρώτη και περιέχει το γονίδιο *LjCYP88D4*, πέραν του γονιδίου *AMY2* [19].

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά του γονιδίου [11]:

Πηγή απομόνωσης-Οργανισμός μοντέλο	<i>Lotus japonicus</i>
Αριθμός των βάσεων (bp)	2458
Αλληλουχία	<pre> 1 ggcaagaagat catgtggaag ctgaaggtag cagatggtgg caagaatcct tacatattca 61 gcatcaacaa cttcgtggga aggcagacat gggagtatga tcctgatgca ggtactcctg 121 aggaacgagc tcagggtgaa gaagctcgtc aggatttcta taacaaccgc tacaaggtca 181 agacttgtgg cgaccgactt tggcggtttc aggttatgag ggaataaac ttcaaacaaa 241 caataccgag tgtgaagata gaggatggag agaaggtaac atacgataaa gtgacaacaa 301 ctgtgagaag gggcgcacat cacctagcag gattacagac cagtgatggc cattggcctg 361 ctcaaatgct tggcctctg cttttcacgc ctcccttgat cttttgatg tacataacag 421 gtcatcctga ttctgtattc ccagaagtgt accgcaaga gattctcgt tacacatagc 481 ttcatcagaa tgaagatgga ggggtgggac tacacataga gggcatagc accatgtttt 541 gtactgtact caactacata tgcattcgaa tacttggaga aggcctgat ggggtcag 601 acaatgcttg tgcaagagca agaaaatgga ttcatgatca tggggcgcg acacacatag 661 cttctggggg gaagacatgg ctttcgatac ttggtatatt tggatggagc ggaaccaatc 721 caatgcctcc agaattttg atccttcctt ctttctctcc tatgcatcca gctaaaatgt 781 ggtgttattg ccgattgggt tacatgccta tgtcttactt gtattggagg gattttgtgg 841 gtccaataac accactcctc ttacagttag gagaagaact ctttactcaa cttatgaaa 901 aagttaattg gaagaaggca cgtcatcaat gtgcaaggga agatctttac tatcctcctc 961 ctttgataca agacttgatg tgggatagtt tatacctatt cactgagcca ttcttgactc 1021 gttggccttt caacaagctg atcagagaaa gagcccttca agtaacaatg aacatatacc 1081 attatgaaga tcataatagt cgatacatta ccattgggtg cgtggaanaag gttttatgca 1141 tgcttgcttg ttgggtggaa gatccgaacg gaattgcttt caagagacat cttgccaggg 1201 tcccggatta cttgtggcct gcagaagatg gaatgtgcat gcagagtttt ggtagccaag 1261 aatgggatgc tggtttcgcc gttcaagctc tgctttctac taacctaatg gacgaactcg 1321 gtccgcactc tgcaaaagga catgatttta tcaagaattc tcaggttaag gacaaccctt 1381 caggagattt taagagtatg catcgccata ttccaaagg agcatggacc tttctgctg 1441 aagaccatgg atggcaagtt tctgattgca ctgcagaagg ttttaagtgt tgcctacttt 1501 tgtcaatggt gccctccagag attgtagggg aaaaagataga gcttgaaggc ttattcgata 1561 ctgtcaatct cctattgtca cttcagagta aaaaagggtg ttttcagta tgggagccag 1621 caggagctca ggagtgctg gaactactca atccataga attttttgag gacattgtaa 1681 ttgagcatga attggttgag tgcactggat cagcaattgg agcctagtt ttgttcaaga 1741 atcattatcc agagcataga aagaagaga tcgaggattg cattgctaac cgacttctgt 1801 actttgaaga tatacaaca gcagatggtt cttggtatgg aatcgagga atttgcttca 1861 tttatggtac ttggtttgca cttggtggtc tagaagcagc tggcaaaact tatgcaatt 1921 gtgctgccat tcgcaaaagt gttaaattc tactcacgac acaatcaaaag gatggtggtg 1981 ggggagagag ttatctatca tgcccaaaaa agatataatg acctcttgaa ggaaccgat 2041 caaatggtgt acagacagca tgggctctta tgggtttgat tcactgtggc caggcggaga 2101 gagaccctac tccacttcac cgtgctgcaa aattgctcat caattctcag cttgaagatg 2161 gtgattggcc ccaacaggat attactggag tatacgtgaa aaattgcacg ctgattacc 2221 caatgtacag aataatttt acaacgatgg ccctagctga atactctgca cgggttccat 2281 taccatccat tgcagtttaa cttgtaaga tagctgtgtg cacaaaaagg cacagccaca 2341 tcaatagatc atgcaataa aataatcaaa caagttctgc agttgacctt gtacaattgt 2401 actcttatta ctatagatg tatttagtgt cggttgttg ccaaaaaaaa aaaaggcc </pre>
Προϊόν έκφρασης	Συνθάση της β-αμυρίνης
Αλληλουχία προϊόντος /ενζύμου	<pre> 1 mwklkvadgg knpyifsinn fvgrqtweyd pdagtpeera qveearqdfy nnrykvktcg 61 drlwrfqvmr ennfkqtips vkiedgekvt ydkvttvrr aahhlaglqt sdghwpaqia 121 gp1lftppli fcmyitghld svfpevyrke ilrytyvhnq edggwglhie ghstmfctvl 181 nyicmrilge gpdggqdnac ararkwihdh ggathiaswg ktwlsilgif dwsgtnpmpp 241 efwilpsflp mhpakmwcyc rlvympsyl ygkrfvgpit plilqlreel ftqpyekvnnw 301 kkarhqcake dlyyphpliq dlmwdslylf tepfltrwpf nklieralq vtmkhihyed 361 hnsryitigc vekvlcmllac wvedpngiaf krhlarvpyd lwlaedgmcm qsfgsqewda 421 gfavqallst nlidelgpal akghdfikns qvkdnpsgdf ksmhrhiskg awtfdsdqdhg 481 wqvsdctaeg fkcclllsmll ppeivgekie perlfdtvl nllsqskkg favwepagaaq 541 ewlellnpie ffediviehe lvectgsaig alvlfknhyp ehrkkeiedc ianavryfed 601 iqtadgswyg nagicfiygt wfalgglea gktyancaai rkgvkfltt qskdggwges 661 ylscpkkiyv plegnrsvv qtawalmgli hagqaerdp plhraaklli nsqledgdwp 721 qqditgvvyk nctlhypmyr nnftmalae yrrrvplpsi av </pre>

5. Lotus japonicus

Τα ψυχανθή φυτά είναι μια σημαντική κατηγορία φυτών, καθώς αποτελούν πηγή φαγητού για τον άνθρωπο, τροφής για τα ζώα και πρώτων υλών για τις βιομηχανίες [15]. Είναι φυτά ικανά να δεσμεύουν το άζωτο μέσω μιας συμβιωτικής σχέσης με βακτήρια του εδάφους του γένους *Rhizobium*, έτσι ώστε να προμηθεύονται τόσο αυτά όσο και οι συνδεόμενες ή μετέπειτα καλλιέργειες με μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου (N).

Για το λόγο αυτό, το *Lotus japonicus* επιλέχθηκε ως ψυχανθές-μοντέλο, προκειμένου να απομονωθούν γονίδια με κρίσιμο ρόλο στη συμβιωτική ανάπτυξη μεταξύ φυτών και βακτηρίων. Τα οργανίδια και η μορφολογία του φυτού φαίνονται στην **Εικόνα 6**. Πρόκειται για ένα αυτό-γονιμοποιούμενο διπλοειδές ψυχανθές με μικρό γονιδίωμα (~470Mb) και απλή δομή. Χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος φυτού, υψηλή παραγωγή σπόρων εύκολη καλλιέργεια, δεκτικότητα έναντι μετασχηματισμού καθώς και ικανότητα συμβίωσης με ριζόβια και μυκόρριζες [16] [6].



Εικόνα 6. Διαφορετικά φυτικά όργανα και μορφολογία των φυτών *Lotus Japonicus*. a-d) Αναπτυξιακά στάδια των λουλουδιών του φυτού σχετικά με την «μηχανική γονιμοποίηση». e) Λουλούδια των οικοτύπων *Gifu* (κίτρινα) και *Filicaulis* (κόκκινα). f) οργανίδιο-θήκη του φυτού που περιέχει 20 σπόρους. g) Τρίφυλλο φύλλο h) Φυτό 2 μηνών [6].

6. Υπερέκφραση πρωτεϊνών

Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών αναφέρεται στην κατευθυνόμενη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων των επιθυμητών πρωτεϊνών. Περιλαμβάνει αρχικά την εισαγωγή του ξένου DNA στα κύτταρα-ξενιστές, συνήθως πρόκειται για βακτηριακά κύτταρα με τη χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων, και αφετέρου τη δράση παραγόντων που επηρεάζουν την έκφρασή του στο επιλεγθέν σύστημα έκφρασης [9].

Η κλωνοποίηση σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς των γονιδίων των κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) καθίσταται απαραίτητη για τη σύνθεση τριτερπενίων από διάφορα είδη ψυχανθών, όπως το *Lotus japonicus*, τα οποία επιδέχονται μελέτες μοριακής γενετικής, καθώς μας παρέχει τα εργαλεία προκειμένου να κατανοήσουμε τη σπουδαιότητα των τριτερπενίων και των παραγώγων τους στη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των φυτών.

Επιπλέον, μας βοηθάει να κατανοήσουμε τις αντιδράσεις των τριτερπενίων τόσο με συμβιωτικά όσο και με παθογόνα [2]. Πρόσφατα ένας αριθμός OSCs που καταλύει τη σύνθεση τριτερπενίων έχει κλωνοποιηθεί και οι λειτουργίες τους επιβεβαιώθηκαν με την έκφραση τους σε ζυμομύκητες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται και η συνθάση της β-αμυρίνης από το κινέζικο φυτό *Panax ginseng* και τα είδη *Glycyrrhiza glabra* και *Pisum sativum*.

6.1. Ετερόλογη υπερέκφραση

Ετερόλογη έκφραση σημαίνει πως μια πρωτεΐνη τοποθετείται πειραματικά σε ένα κύτταρο, το οποίο κανονικά δεν την εκφράζει. Συχνά η μεταφερθείσα πρωτεΐνη έχει κλωνοποιηθεί ή προέλθει αρχικά από ένα διαφορετικό κυτταρικό τύπο ή από ένα είδος διαφορετικό του κυττάρου-δέκτη.

Τυπικά, δεν πρόκειται για τη μεταφορά της ίδιας της πρωτεΐνης αλλά για την προσθήκη του γενετικού υλικού που την κωδικοποιεί (το συμπληρωματικό DNA ή cDNA) στο κύτταρο-δέκτη. Το γενετικό υλικό που μεταφέρεται θα πρέπει να

ενσωματωθεί αρχικά σε ένα πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος στη συνέχεια θα εισαχθεί στο φορέα έκφρασης που θα εκφράσει το cDNA ως πρωτεΐνη [8].

Οι πιο διαδεδομένοι αποδέκτες, γνωστοί ως ετερόλογα συστήματα έκφρασης, επιλέγονται συνήθως είτε επειδή είναι εύκολη η μεταφορά DNA σε αυτούς είτε επειδή επιτρέπουν μια απλούστερη αξιολόγηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης [8].

Τα ετερόλογα συστήματα έκφρασης διακρίνονται στα προκαρυωτικά, όπως τα βακτηριακά συστήματα, και στα ευκαρυωτικά συστήματα, όπως οι ζύμες, οι βακίλλοι, τα κύτταρα των θηλαστικών, το είδος αμοιβάδας του εδάφους *Dictyostelium discoideum* και το φυτό *Nicotiana benthamiana*. Συγκεκριμένα, όσο αναφορά το σύστημα του καπνού του φυτού *Nicotiana benthamiana*, επιτρέπει τις μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητάς τους και κατ' επέκταση την αύξηση των επιπέδων συσσώρευσής τους. Τα προκαρυωτικά συστήματα είναι γενικά πιο εύκολα ως προς το χειρισμό τους και ικανοποιούν και τους περισσότερους σκοπούς της χρήσης τους. Ωστόσο, υπάρχουν σοβαροί περιορισμοί στη χρήση προκαρυωτικών κυττάρων για την παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα το σύνολο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που αυτές υφίστανται (κατάλληλη αναδίπλωση, γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση και άλλες). Πρόκειται για ένα σύνολο αντιδράσεων τις οποίες τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα να πραγματοποιήσουν όπως τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει καθολικό ετερόλογο σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών καθώς τόσο τα προκαρυωτικά όσο και τα ευκαρυωτικά συστήματα διαθέτουν πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Η επιλογή του συστήματος βασίζεται αποκλειστικά στις εκάστοτε ανάγκες.

Κλωνοποιώντας και εκφράζοντας ένα ξένο γονίδιο σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης, αποκτούμε την ικανότητα παραγωγής οποιασδήποτε πρωτεΐνης σε άφθονη ποσότητα έτσι ώστε μελετώντας αναλυτικά τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργία της, να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός ή θεραπευτικός παράγοντας [9].

6.2. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια

Τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης για την ετερόλογη παραγωγή πρωτεϊνών, χαρακτηρίζονται από χαμηλό κόστος, υψηλή παραγωγικότητα, εύκολο χειρισμό καθώς και από τη δυνατότητα ταχείας χρήσης τους [9]. Επιπλέον, τα συστήματα αυτά έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ταχέως και σε υψηλή πυκνότητα σε φθηνά υποστρώματα, ενώ ταυτόχρονα παρέχουν πληθώρα φορέων κλωνοποίησης και μεταλλαγμένων στελεχών κυττάρων-ξενιστών [17].

Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο κύτταρο-ξενιστής, λόγω της πληθώρας των πληροφοριών που υπάρχουν τόσο σχετικά με τη γενετική και τη φυσιολογία του όσο και με την πλήρη αλληλουχία του. Το γεγονός αυτό διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό αφενός την κλωνοποίηση και αφετέρου την καλλέργεια των επιθυμητών γονιδίων.

Πρόκειται για ένα βακτήριο με υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (με χρόνο διπλασιασμού 20 λεπτά), το οποίο έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί ταχύτατα σε υψηλές πυκνότητες απλών και ανέξοδων θρεπτικών μέσων, εκφράζοντας υψηλά επίπεδα ετερόλογων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η *E.coli*, όπως και άλλα βακτηριακά στελέχη, δεν έχει την ικανότητα να γλυκοζυλιώνει πρωτεΐνες, τόσο στην N-συνδεόμενη όσο και στην O-συνδεόμενη διαμόρφωσή τους, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται μόνο στην περίπτωση που οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του παραγόμενου προϊόντος δεν είναι απαραίτητες [9].

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

1. Μοριακή Κλωνοποίηση

1.1. Πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Μέσω της πέψης με ένζυμα περιορισμού, είναι δυνατή η δημιουργία γραμμικών πλασμιδιακών φορέων ή η απομόνωση γονιδίου από πλασμιδιακούς φορείς με συμβατά άκρα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί σε επόμενο στάδιο, η κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα μέσω της αντίδρασης λιγάσης.

Κατά κανόνα, για 1 µg DNA απαιτείται 1 µg ενζύμου. Στην ολική αντίδραση (50µl), τοποθετείται το κατάλληλο buffer αντίδρασης που προτείνεται από την εκάστοτε εταιρεία και προαιρετικά, BSA (Bovine Serum Albumin), που αποτρέπει την προσκόλληση του ενζύμου στα erpendorfs και στα tips. Οι κατάλληλες συνθήκες για την πέψη μπορούν να βρεθούν από το πρόγραμμα double digest finder της εταιρείας New England BioLabs.

1.2. Αντίδραση Λιγάσης

Κατά την αντίδραση λιγάσης (ligation), πραγματοποιείται η ένωση τμημάτων DNA κατά την μοριακή κλωνοποίηση, μέσω του ενζύμου T4 DNA λιγάση, η οποία σχηματίζει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του 5'-φωσφόρου και του 3'-υδροξυλίου σε τμήματα DNA και RNA.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής συστατικά:

Συστατικά	Ποσότητες
10x ligation buffer	2 μ l
Πλασμιδιακός φορέας DNA	50 ng
Ένθεμα	150 ng
T4 DNA λιγάση	1 l (350U/ml)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 20 μ l

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16 °C και διαρκεί για 1-5 ώρες και από 1-24 ώρες για τμήματα DNA με κολλώδη και τυφλά άκρα, αντίστοιχα.

1.3. Μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων

Escherichia coli

Σε σωλήνα erppendorf που περιέχει 100 μ l δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 10-100ng πλασμιδίου. Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Υποβάλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση για 1-2 λεπτά, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου. Προστίθενται 200 μ l υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 50 λεπτά. Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Μετά, γίνεται επώαση των τρυβλίων για όλο το βράδυ στους 37°C. Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.

Η διαδικασία της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών πριν την εκπόνηση της παρούσας άσκησης.

2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f) και δίνεται από τον τύπο $v = Ez / f$.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (MBA).

Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, προκειμένου να μην αλληλεπιδρούν με τα φορτισμένα μόρια των πρωτεϊνών, και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο, στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDSPolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού

νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών.

3. Απομόνωση και καθαρισμός της συνθάσης της β-αμυρίνης από βακτήρια *Escherichia coli* BL21

3.1. Καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli* και επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης

- Ποσότητα βακτηρίων από το stock γλυκερόλης επιστρώνεται σε τρυβλίο.
- Σε φιάλη με θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό, εισάγεται μικρή ποσότητα από το stock γλυκερόλης, στο οποίο έχει αποθηκευτεί μεγάλη ποσότητα βακτηρίων *E. coli* μετασχηματισμένων με πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης.
- Επώαση της φιάλης στους 37°C (καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli*).
- Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια με την μεταφορά του περιεχομένου της φιάλης σε φλάσκα των 500ml.
- Τα βακτήρια αφήνονται στη φλάσκα να μεγαλώνουν στους 37°C έως ότου φτάσουν στην εκθετική φάση κατά την οποία παρατηρείται ο μέγιστος βαθμός ανάπτυξής τους. Αυτό ελέγχεται ανα τακτά χρονικά διαστήματα με φωτομέτρηση και μέτρηση της εκάστοτε οπτικής πυκνότητας (επιθυμητή OD: 0,6 - 0,7).
- Προσθήκη 0,5ml IPTG 0,5M, ενός παράγοντα που επάγει την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου στα βακτήρια, και στη συνέχεια η καλλιέργεια επωάζεται στους 28°C στις 210 στροφές, για 5 ώρες.

- Φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 4°C προκειμένου να συλλεχθούν τα βακτηριακά κύτταρα με τη μορφή ιζήματος.
- Συντήρηση των κυττάρων στους -80°C.

3.2. Προεργασία για την απομόνωση και τον καθαρισμό της συνθάσης της β-αμυρίνης

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 100ml Buffer A, pH = 7,5 (Συνίσταται από: α) 5ml Tris-Base 50mM, β) 10ml NaCl 100mM, γ) 10gr γλυκερόλης 10%): προστατευτικό διάλυμα του βακτηριακού περιεχομένου μετά τη λύση της βακτηριακής μεμβράνης.
- ✓ 50μl Triton : παράγοντας λύσης της μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων.
- ✓ 400μl PMSF 0,5mM : αναστολέας πρωτεασών.
- ✓ 300μl GST-Beads : πρωτεΐνες δέσμησης άλλων πρωτεϊνών μέσω της δομής GST με την οποία είναι συνδεδεμένες.
- ✓ 2μl DTT 1M : αναγωγικός παράγοντας.
- ✓ 0,0049gr Γλουταθειόνη : διάσπαση συμπλόκων GST-beads-πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών προετοιμάστηκε η συσκευή τυπικής ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE):

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα *πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel)*, στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα *πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel)*, το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος.

Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελείται από:

- ✓ H₂O
- ✓ Ακρυλαμίδη 30%, 4°C
- ✓ Tris HCL, **pH=8,9**
- ✓ SDS 10%
- ✓ TEMED, 4°C : παράγοντας πήξης του gel
- ✓ APS 10%, -20°C : παράγοντας πήξης του gel

Το πήκτωμα πακεταρίσματος αποτελείται από:

- ✓ H₂O
- ✓ Ακρυλαμίδη 30%, 4°C
- ✓ Tris HCL 1M, **pH=6,8**
- ✓ SDS 10%
- ✓ TEMED, 4°C : παράγοντας πήξης του gel
- ✓ APS 10%, -20°C : παράγοντας πήξης του gel

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το stacking gel δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

Για την παρασκευή διαλύματος αποχρωματισμού ($V_d = 400\text{ml}$) του ηλεκτροφορητικού gel πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 120ml Μεθανόλης
- ✓ 40ml Οξικού οξέος
- ✓ 240ml H_2O

Για την παρασκευή διαλύματος χρώσης του gel πρωτεϊνών ($V_d = 1\text{lt}$) χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 450ml H_2O
- ✓ 450ml Μεθανόλη
- ✓ 100ml Οξικού οξέος
- ✓ 0,25gr Coomassie Brilliant Blu R250

3.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού της συνθάσης της β-αμυρίνης

Απομόνωση του συνόλου των επιθυμητών πρωτεϊνών από τα βακτηριακά κύτταρα:

- ✓ Τα βακτήρια, το buffer A και το Triton τοποθετούνται στον πάγο ενώ το PMSF θερμαίνεται στους 50°C .
- ✓ Σε κάθε δείγμα βακτηρίων, εισάγονται 10ml buffer A για την επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων (επαναδιαλυτοποίηση 500ml καλλιέργειας σε 40ml buffer A).

- ✓ Μεταφορά του περιεχομένου σε 2 φάλκον.
- ✓ Προσθήκη σε κάθε καλλιέργεια 20μl Triton 0,1% και 200μl PMSF 0,5mM.
- ✓ Σπάσιμο κυττάρων στο sonicator. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές από 15 λεπτά τη φορά για κάθε φάλκον.
- ✓ Τα 2 φάλκον τοποθετούνται στη ρόδα για 10 λεπτά στους 4°C.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 8000 στροφές, στους 4°C και ένωση των υπερκειμένων σε νέο φαλκον (40ml).

Ένωση των πρωτεϊνών με τα GST-beads και δημιουργία συμπλόκων:

- ✓ Μεταφορά 300μl από τα GST-beads σε ένα erpendorf και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 3000 στροφές. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται προκειμένου να κάτσουν κάτω τα beats και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο.
- ✓ Προσθήκη buffer A στο erpendorf και επανάληψη φυγοκέντρησης 2 φορές για ένα λεπτό στις 3000 στροφές, απομακρύνοντας κάθε φορά το υπερκείμενο.
- ✓ Εισαγωγή των beads στο φάλκον και ελαφριά ανάδευση.
- ✓ Τοποθέτηση του φάλκον στη ρόδα για 2 ώρες στους 4°C. Μέσω της κίνησης που δίνεται από τη ρόδα, τα beads διαχέονται μέσα στο φάλκον δεσμεύοντας όσο περισσότερες πρωτεΐνες γίνεται.

Απομόνωση και καθαρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων:

- ✓ Διπλή φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3000 στροφές στους 4°C και απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
- ✓ Προσθήκη 15ml buffer A, το οποίο συμβάλλει στην ευκολότερη διάκριση του συμπλόκου beads-πρωτεϊνών και φυγοκέντρηση 2 φορές για 3 λεπτά, στις 3000 στροφές στους 4°C και απομάκρυνση όσου υπερκειμένου είναι δυνατό.
- ✓ Επαναφυγοκέντρηση του φάλκον με όση ποσότητα buffer A έχει μείνει, χωρίς την προσθήκη επίπλεον, και απομάκρυνση σχεδόν όλου του υπερκειμένου.
- ✓ Προσθήκη 1ml buffer A και επαναδιάλυση των beads.
- ✓ Τα σύμπλοκα beads-πρωτεΐνες περνώνται από στήλη και πραγματοποιείται σύντομο spin με σκοπό την απομόνωση των συνδεόμενων με beads πρωτεϊνών.
- ✓ Πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με 500μl buffer A και ένα σύντομο spin. Σκοπός όλων των ξεπλυμάτων είναι ο καθαρισμός των συμπλόκων.
- ✓ Ένα ξέπλυμα με 500μl buffer A και 1μl Triton 0,2%.
- ✓ Δύο ξεπλύματα με 500μl buffer A.
- ✓ Ένα ξέπλυμα με 200μl buffer A και 2μl DDT.

Αποδέσμευση των επιθυμητών πρωτεϊνών από τα beads και συλλογή τους:

- ✓ Η στήλη κλείνεται και προστίθενται 0,0049g γλουταθειόνης διαλυμένα σε 200μl buffer A.
- ✓ Η στήλη αφήνεται στη ρόδα για 30 λεπτά.
- ✓ Το περιεχόμενο της στήλης μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf (elution 1).
- ✓ Πραγματοποιείται σύντομο spin και το erpendorf αποθηκεύεται στους -20°C .
- ✓ Η στήλη κλείνεται ξανά, προστίθενται άλλα 0,0049g γλουταθειόνης διαλυμένα σε 200μl buffer A και αφήνεται στη ρόδα overnight, με σκοπό οι πρωτεΐνες να καθαριστούν τελείως από τα beads.
- ✓ Πραγματοποιείται ένα γρήγορο spin και το περιεχόμενο της στήλης μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf (elution 2). Το erpendorf περιέχει τις επιθυμητές πρωτεΐνες ενώ τα beads μένουν συνδεδεμένα στο φίλτρο.
- ✓ Εισάγονται επιπλέον 150μl buffer A στη στήλη έτσι ώστε να εκλουστούν οι όποιες πρωτεΐνες έχουν μείνει στο φίλτρο. Τα beads φυλάσσονται για έλεγχο.
- ✓ Από το elution 2 χρησιμοποιούνται 10μl και η υπόλοιπη ποσότητα φυλάσσεται στους -20°C .

Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων:

- ✓ Το elution 1, το elution 2 και τα beads θερμαίνονται για 4 λεπτά στους 95°C στον απαγωγό.
- ✓ Προσθήκη σε κάθε ένα 25μl loading buffer 4x, χρωστικής απαραίτητης για την ηλεκτροφόρησή τους.
- ✓ Φυγοκέντρηση των elution 1, elution 2 και των beads για 1 λεπτό.
- ✓ Ηλεκτροφορούνται 7μl από το Ladder και 10μl από καθένα από τα 3 δείγματα (elution 1, elution 2 και beads). Πρώτα τρέχουν τα beads, μετά το elution 1 και τέλος το elution 2.
- ✓ Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel αφήνεται να βαφτεί για 2 ημέρες παρουσία ειδικού διαλύματος χρωματισμού.
- ✓ Το gel ξεβάφεται με τη χρήση κατάλληλου buffer αποχρωματισμού, προκειμένου να είναι ορατές μόνο οι μπάντες με την επιθυμητή χρωστική.
- ✓ Πραγματοποιούνται δύο επιπλέον πλύσεις του gel με το ίδιο διάλυμα ανά μία ώρα για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

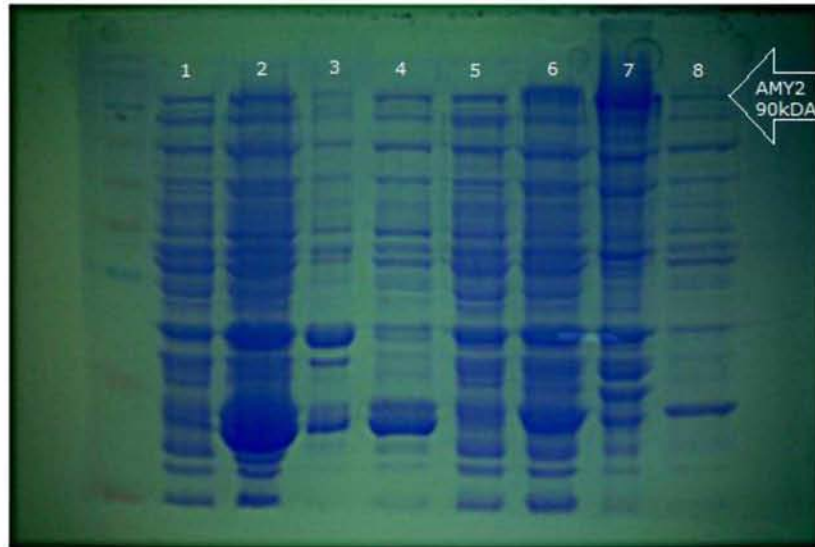
A. Δοκιμές για την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης παραγωγής της συνθάσης της β-αμυρίνης (AMY2)

Για την ετερόλογη έκφραση της AMY2 αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινήτες και στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα DNA το αυθεντικό πλασμίδιο pYES-AMY2. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις στο ένθεμα και το πλασμίδιο pGEX-6P-1, και αντίδραση λιγάσης. Κύτταρα *Escherichia coli DH5a* μετασχηματίστηκαν και τελικά δύο θετικά πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθησαν και μετασχηματίστηκαν κύτταρα *Escherichia coli BL21* και *Rosetta*, προκειμένου να επιλεγεί το καταλληλότερο σύστημα έκφρασης για το γονίδιο. Τα κύτταρα *Rosetta* αποκλείστηκαν καθώς δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν μετά τον μετασχηματισμό τους. Το μέγεθος της AMY2 με βάση τα αποτελέσματα του προγράμματος expasy βρέθηκε να είναι περίπου 90 kDa με ισοηλεκτρικό σημείο 5,4.

Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη συνθήκη κατά την οποία θα υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα της AMY2 στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli BL21* (υπερκείμενο) από ότι στο εσωτερικό των κυτταρικών οργανιδίων (ίζημα), εφαρμόστηκαν με τη σειρά οι παρακάτω συνθήκες έκφρασης:

✓ **37 °C, IPTG 0,1mM**

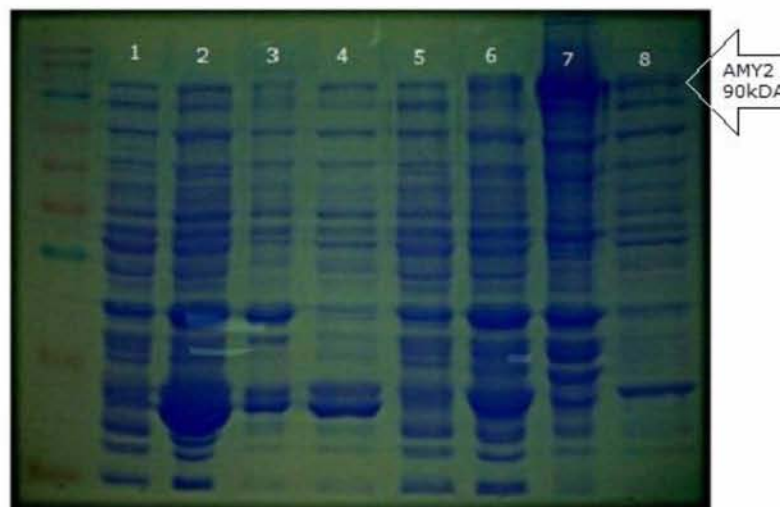
Με τη σειρά ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα: 1. Άδειος φορέας pGEX πριν την επαγωγή (control), 2. Φορέας pGEX μετά την επαγωγή (έκφραση μόνο πρωτεϊνών του φορέα), 3. Ίζημα, 4. Υπερκείμενο, 5. Φορέας pGEX-AMY2 πριν την επαγωγή, 6. Φορέας pGEX-AMY2 μετά την επαγωγή (έκφραση και της AMY2), 7. Ίζημα, 8. Υπερκείμενο.



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 1-8. Παρατηρείται μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα 8 (υπερκείμενο) – αγνή μπάντα.

✓ **28 °C, IPTG 0,1mM**

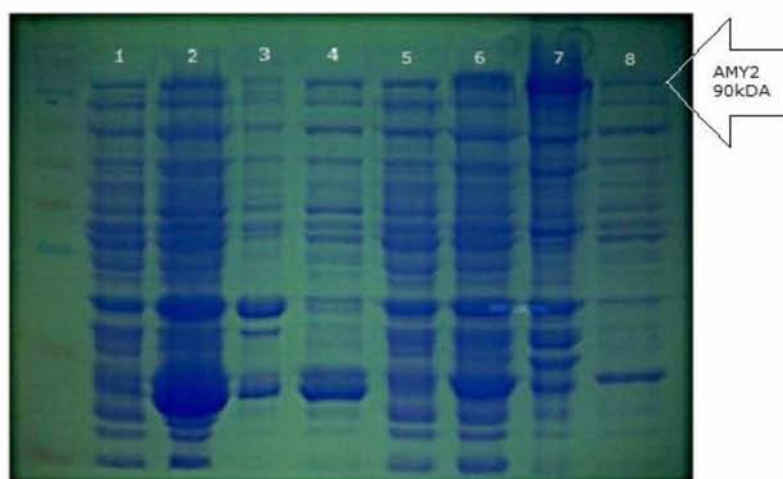
Με τη σειρά ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα: 1. Άδειος φορέας pGEX πριν την επαγωγή(control), 2. Φορέας pGEX μετά την επαγωγή (έκφραση μόνο πρωτεϊνών του φορέα), 3. Ίζημα, 4. Υπερκείμενο, 5. Φορέας pGEX-AMY2 πριν την επαγωγή, 6. Φορέας pGEX-AMY2 μετά την επαγωγή (έκφραση και της AMY2), 7. Ίζημα, 8. Υπερκείμενο.



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 1-8. Παρατηρείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα 8 (υπερκείμενο) – έντονη μπάντα.

✓ 18 °C, IPTG 0,1mM

Με τη σειρά είναι τα δείγματα: 1. Άδειος φορέας pGEX πριν την επαγωγή (control), 2. Φορέας pGEX μετά την επαγωγή (έκφραση μόνο πρωτεϊνών του φορέα), 3. Ίζημα, 4. Υπερκείμενο, 5. Φορέας pGEX-AMY2 πριν την επαγωγή, 6. Φορέας pGEX-AMY2 μετά την επαγωγή (έκφραση και της AMY2), 7. Ίζημα, 8. Υπερκείμενο.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 1-8. Παρατηρείται μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα 8 (υπερκείμενο) – αχνή μπάντα.

Η διαφορά στις παραπάνω τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C, 28°C, 18°C) που εφαρμόστηκαν για την έκφραση του γονιδίου της *AMY2*, έγκειται στη διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης που βρέθηκε στο υπερκείμενο (δείγμα 8).

Η θερμοκρασία των 28°C, αποδείχτηκε η βέλτιστη θερμοκρασία για την έκφραση της *AMY2* λόγω εντοπισμού μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε σχέση με αυτή των δύο άλλων θερμοκρασιών που δοκιμάστηκαν, όπως φαίνεται και στις παραπάνω φωτογραφίες. Λίγο μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης φαίνεται να απομονώνεται με συγκέντρωση IPTG 0,5mM αντί για 0,1mM.

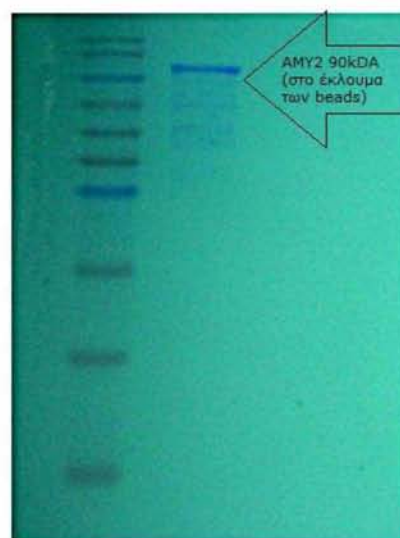
Επομένως η συνθήκη που εφαρμόστηκε έτσι ώστε η *AMY2* να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο υπερκείμενο είναι οι 28°C, IPTG 0,5mM.

B. Καθαρισμός της πρωτεΐνης AMY2 σε καλλιέργεια μικρής κλίμακας

Μετά την ανάπτυξη καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* BL21 όγκου 500ml, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης σε ικανοποιητικές ποσότητες (28°C, IPTG 0,5mM), πραγματοποιήθηκε προσπάθεια καθαρισμού της σε στήλες micro biospin. Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα και στο πρωτόκολλο, πραγματοποιήθηκαν εκλούσματα παρουσία γλουταθειόνης προκειμένου η πρωτεΐνη να καθαριστεί από τα beads. Το έκλουμα 1 έπειτα από 30 λεπτά επώασης της στήλης με γλουταθειόνη, ενώ το έκλουμα 2 έπειτα από επώαση overnight. Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό με την πρωτεΐνη να μην έχει αποδεσμευτεί από τα beads.

Η προσπάθεια καθαρισμού της πρωτεΐνης επαναλήφθηκε με τη χρήση διαφορετικών beads, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ελαττωματικής λειτουργίας τους, αλλά το αποτέλεσμα παρέμεινε το ίδιο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν άλλες 2 επαναλήψεις με τη χρήση διαφορετικής γλουταθειόνης, προκειμένου να αποκλειστεί αυτή τη φορά το ενδεχόμενο η γλουταθειόνη να μην είναι τόσο αποτελεσματική ώστε να καταφέρει να διασπάσει τα σύμπλοκα beads-πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά το αποτέλεσμα παρέμεινε το ίδιο.

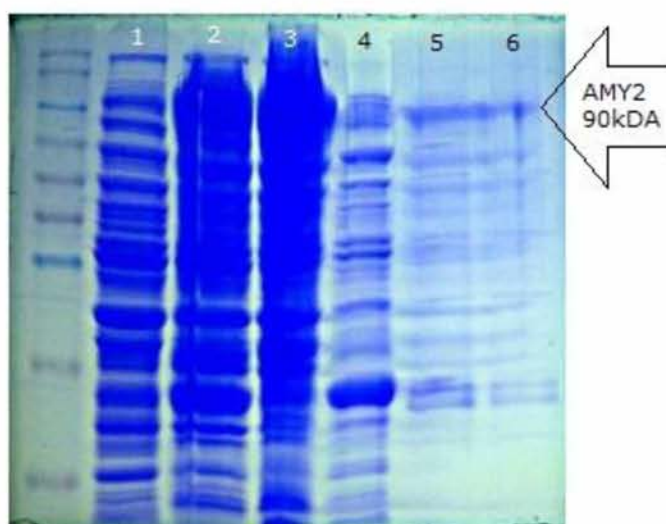
Το αποτέλεσμα των 4 προσπαθειών καθαρισμού της AMY2 από τα beads, με την πρωτεΐνη να μην έχει αποδεσμευτεί από αυτά, φαίνεται στην **εικόνα 10**:



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση με την πρωτεΐνη να παραμένει συνδεδεμένη στα beads και να μην εκλύεται στα elution 1 και 2.

Προκειμένου να επιτευχθεί η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τα beads και μετά τις 4 προσπάθειες που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίες δεν είχαν κάποιο αποτέλεσμα, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη των βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*, τα *Escherichia coli* DE3 Gold. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλες micro biospin, με τη χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων. Το αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας ήταν θετικό, με την πρωτεΐνη να εντοπίζεται στο έκλουμα 1 και στο έκλουμα 2 όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**.

Με τη σειρά ηλεκτροφορήθηκαν τα δείγματα: 1. Φορέας pGEX πριν την επαγωγή (control), 2. Φορέας pGEX μετά την επαγωγή (έκφραση μόνο πρωτεϊνών του φορέα), 3. Ίζημα, 4. Υπερκείμενο, 5. Έκλουμα 1, 6. Έκλουμα 2.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 1-6. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο έκλουμα 1 και 2.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12, στα εκλούματα 1 και 2 διακρίνονται πολλές μπάντες και όχι μόνο μία ευδιάκριτη, κάτι το οποίο σημαίνει πως η AMY2 δεν είναι σε καθαρή μορφή. Εάν η πρωτεΐνη δεν είναι σε καθαρή μορφή, δεν μπορεί να γίνει χρήση της σε μελλοντικά πειράματα. Για το λόγο αυτό προβλέπεται μελλοντικός καθαρισμός της πρωτεΐνης σε μεγαλύτερη κλίμακα σε στήλη ΑΚΤΑ.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

Τα τριτερπενοειδή (ή αλλιώς τριτερπένια) αποτελούν την κυριότερη ομάδα των τερπενίων, φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών που προέρχονται από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από εξειδικευμένα ένζυμα, τις συνθάσες ή κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων έχουν χαρακτηριστεί στα φυτά, τα οποία συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού. Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσυλιωμένα τριτερπενοειδή, που έχουν μια πλειάδα δράσεων στο φυτό, κυρίως αντιμυκητιακής, αντιμικροβιακής και εντομοκτόνου, αλλά συμβάλλουν ταυτόχρονα στα φαινόμενα αλληλοπάθειας μεταξύ των φυτών και στη γλυκιά ή πικρή γεύση που προσδίδεται στο φυτό [17]. Συντίθεται από το μονοπάτι των ισοπρενοειδών μέσω κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου οδηγώντας στην παραγωγή κυρίως ολαενικών ή νταμμαρενυλικών τριτερπενοειδών σκελετών [18]. Οι σκελετοί αυτοί υφίστανται περαιτέρω τροποποιήσεις, όπως οξειδώσεις, υποκαταστάσεις και γλυκοζυλιώσεις από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, προς παραγωγή των σαπωνινών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η υπερέκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης AMY2 του φυτού *Lotus japonicus*. Μέσω της διαδικασίας υπερέκφρασης μπορεί να επιτευχθεί η κατευθυνόμενη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων της επιθυμητής πρωτεΐνης [9]. Τα συστήματα έκφρασης που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, διακρίνονται στα προκαρυωτικά, όπως τα βακτηριακά συστήματα, και στα ευκαρυωτικά συστήματα, όπως οι ζύμες, οι βακιλοϊοί, τα κύτταρα των θηλαστικών, το είδος αμοιβάδας του εδάφους *Dictyostelium discoideum* καθώς και το φυτό *Nicotiana benthamiana*. Τα προκαρυωτικά συστήματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία, χαρακτηρίζονται πιο εύκολα ως προς το χειρισμό τους σε σχέση με τα ευκαρυωτικά, λόγω μειωμένης πολυπλοκότητας και μικρότερης ποσότητας γενετικού υλικού, ικανοποιώντας τους περισσότερους σκοπούς της χρήσης τους [18]. Στο φυτό οι δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή τα τριτερπένια όπως η β-αμυρίνη, παράγονται σε μικρές ποσότητες με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η απευθείας απομόνωση τους για την περαιτέρω μελέτη της δομής και της λειτουργίας τους. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται ετερόλογη έκφρασή τους, σε κύτταρα τα οποία κανονικά δεν τους εκφράζουν όπως τα βακτηριακά, με την εφαρμογή

συνθηκών κατάλληλων για την παραγωγή τους σε ικανοποιητικές για τη μελέτη τους ποσότητες.

Η β-αμυρίνη, δευτερογενής μεταβολίτης του φυτού *Lotus japonicus*, συντίθεται από ένα μεικτής δράσης ένζυμο, μια κυκλάση οξειδοσκουαλενίου (OSC), τη συνθάση της β-αμυρίνης (AMY2). Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από ένα γονίδιο του γονιδιώματος του φυτού, το *AMY2*. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *Lotus japonicus* και χρησιμοποιήθηκε για τον ανασυνδυασμό των πλασμιδιακών φορέων p_{gex-6p-1}. Στη συνέχεια, μετασχηματίστηκαν τα στελέχη *Escherichia Coli BL21* προκειμένου να πραγματοποιηθεί υπερέκφραση του γονιδίου κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης IPTG. Η βέλτιστη συνθήκη έκφρασής του, για την παραγωγή της επιθυμητής ποσότητας της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί, βρέθηκε να είναι οι 28 °C, IPTG 0,5mM. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη χρήση του πρωτοκόλλου καθαρισμού που αναλύθηκε εκτενώς στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Έπειτα από αρκετές προσπάθειες καθαρισμού της, οι οποίες δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα, επιτεύχθηκε ο καθαρισμός της και η αποδέσμευσή της από τα beads, πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέθηκε προκειμένου να εντοπιστεί, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναλύθηκε στο κεφάλαιο Αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, η AMY2 που εκλούστηκε δεν ήταν σε καθαρή μορφή αλλά μαζί με άλλες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να μελετηθεί στη μορφή αυτή η δομή και η λειτουργία της.

Υπάρχουν ίσως δυο λόγοι που μπορεί να οδήγησαν στο αποτέλεσμα αυτό. Ο ένας αφορά την ύπαρξη ενός πεπτιδίου-οδηγού στο μπροστινό τμήμα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, το οποίο κατευθύνει την έκφρασή της στις μεμβράνες των οργανιδίων των κυττάρων με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να βρίσκεται συνδεδεμένη εκεί και να μην μπορεί να εκλουστεί. Η αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι η απομόνωση από το φυτικό γονιδίωμα μόνο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη πλην της αλληλουχίας του πεπτιδίου-οδηγού. Ο δεύτερος λόγος θα μπορούσε ενδεχομένως να αφορά το ίδιο το σύστημα ετερόλογης έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε. Στη συγκεκριμένη άσκηση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα στελέχη βακτηριακών κυττάρων για την υπερέκφραση της AMY2. Τα βακτήρια αποτελούν ένα γρήγορο, εύκολο και φτηνό μέσο ετερόλογης έκφρασης, αλλά δεν επιτρέπουν την εισαγωγή ξένου γενετικού υλικού μεγάλου μεγέθους. Εναλλακτικά θα μπορούσαν να

χρησιμοποιηθούν κάποιοι ευκαρυωτικοί φορείς όπως για παράδειγμα οι ζύμες. Για τη μελλοντική μελέτη τόσο της δομής όσο και της λειτουργίας της AMY2 προτείνεται ο καθαρισμός της με τη χρήση της χρωματογραφίας ΑΚΤΑ. Η χρωματογραφία ΑΚΤΑ αποτελεί μια μορφή υγρής χρωματογραφίας, η οποία χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση ή των καθαρισμό πρωτεϊνικών δειγμάτων. Επιπλέον, η AMY2 θα μπορούσε να αναλυθεί δομικά και λειτουργικά χρησιμοποιώντας τεχνικές μεταλλαξιγένεσης.

Θα πρέπει να αναφερθεί, πως αυτή η εργασία αποτελεί μια από τις περιορισμένες προσπάθειες που έχουν γίνει προκειμένου να επιτευχθεί η υπερέκφραση και ο καθαρισμός ενός ενζύμου που συμμετέχει στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων στα φυτά. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία περιορίζει την αποτελεσματικότητα της πειραματικής διαδικασίας. Πολύ λίγα πράγματα είναι γνωστά για τις ενζυματικές ιδιότητες των κυκλασών του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, κυρίως λόγω των δυσχερειών που συχνά συναντώνται στο καθαρισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά η κατηγορία των ενζύμων κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς η δομική ποικιλότητα των τριτερπενοειδών σκελετών που έχουν ταυτοποιηθεί είναι αξιοσημείωτη. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή οι αναρίθμητες βιολογικές δράσεις των δευτερογενών μεταβολιτών, όπως φαρμακευτικές, αντιοξειδωτικές, προστατευτικές, αντιμικροβιακές, καθιστούν τις ομάδες αυτές εξαιρετικά σημαντικές και στενά συνδεδεμένες με την επιβίωση των φυτών, αλλά και του ανθρώπου. Συμπερασματικά, η πληροφορία που παρέχεται μέσω αυτής της εργασίας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ένα σκαλί προς την δομική και λειτουργική διαλεύκανση ενός σημαντικού ενζύμου, της συνθάσης της β-αμυρίνης.

Πηγές:

1. Ιωάννης Β. Τσέκου, 2003, Φυσιολογία Φυτών, τόμος Ι, Εκδοτικός οίκος Αδερφών Κυριακίδη α.ε., Θεσσαλονίκη
2. Inaki Iturbe-Ormaetxe, Kosmas Haralampidis, Kalliopi Papadopoulou, Anne E.Osbourne , Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*
3. Nes and McKean 1997
4. Liliana Hernandez Vazquez, Javier Palazon and Arturo Navarro-Ocapa, The Pentacyclic Triterpenes α,β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities
5. Afrodite Krokida, Genome organization, functional analysis of biosynthetic genes and metabolic diversity of triterpenes in legumes, Márquez, A.J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., Webb, J., Chiurazzi, M., Márquez, A.J, Lotus japonicus Handbook, 2005
6. Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Peña-Rodríguez LM, Katsarou D, Field B, Osbourn AE, Papadopoulou KK , A metabolic gene cluster in Lotus japonicus discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis
7. Meena Rai and Harish Padh , Expression systems for production of heterologous proteins
8. Γεώργιος Α. Καραμπουρνιώτης, Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, 2003
9. NCBI, Lotus japonicus multifunctional beta-amyryn synthase (AMY2) mRNA, complete cds
10. Vranova et al, 2012, Philips et al, 2006
11. Eisenrich et al., 1998; Vranova et al., 2012
12. McGarvey and Croteau, 1995
13. Graham and Vance, 2003
14. Handberg and Stougaard, 1992
15. Kay Terpe, Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems
16. Hostettmann et al, 1991
17. Haralampidis et al, 2002
18. Krokida et al, 2013