



*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Σχολή Επιστημών Υγείας*

*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

Διπλωματική εργασία

«Υπερέκφραση ενός γονιδίου κυκλάσης του 2,3 -οξειδοσκουαλενίου  
(AMY2) σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης »

[Παπαδοπούλου Μαρία-Άννα]

Επιβλέπων Καθηγητής:

[Δρ. Γκαραγκούνης Κωνσταντίνος]

Λάρισα, 2016

“Overexpression of a 2,3-oxidosqualene cyclase gene (AMY2) in prokaryotic and eukaryotic expression systems”

Τριμελής Επιτροπή

Δρ. Γκαραγκούνης Κωνσταντίνος: Διδάσκων Π.Δ. 407/80, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπλ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

# Ευχαριστίες

---

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη, καθώς και την κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την υπομονή που έδειξαν. Η βοήθειά τους, το ενδιαφέρον τους και οι παρατηρήσεις τους, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα αγαθά για να μπορέσω να φέρω εις πέρας αυτή την ερευνητική εργασία, καθώς και για οποιαδήποτε μελλοντική μου ενασχόληση.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην οικογένειά μου, για τη βοήθεια και τη ψυχολογική υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω και την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, όπου κατά τις κοινές συναντήσεις και συζητήσεις μας, έλαβα καλοπροαίρετες και εύστοχες παρατηρήσεις καθώς και συμβουλές. Η άψογη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και η βοήθειά τους σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, θα αποτελούν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη για το μέλλον.

## Περίληψη

---

Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση τερπενοειδών, μέσω της κυκλοποίησής του. Η κυκλοποίηση αυτή επιτελείται από τα ένζυμα κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου (oxidosqualene cyclases, OSCs) και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ευρέος φάσματος δομών τερπενίων τα οποία τροποποιούνται περαιτέρω από άλλα ένζυμα, ώστε να προκύψουν οι τελικοί μεταβολίτες. Η AMY2 είναι μια πολυλειτουργική OSC, από τον φυτικό οργανισμό *Lotus japonicas*, η οποία κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο προς σχηματισμό β-αμυρίνης, λουπεόλης και πιθανόν διϋδρολουπεόλης. Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας, ήταν η ετερόλογη έκφραση και απομόνωση της AMY2 σε διαλυτή, λειτουργική μορφή, ώστε να καταστεί εφικτή η περαιτέρω ενζυμική μελέτη της.

Το εγχείρημα έκφρασης και απομόνωσης των OSCs είναι γενικά δύσκολο, αφού παρά τη σημασία αυτών των ενζύμων και των ουσιών που συνθέτουν, τόσο για τα φυτά, όσο και για τον άνθρωπο, λίγα από αυτά έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί ενζυμικά με επιτυχία. Στην προκειμένη εργασία, κλωνοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία της AMY2, σε κατάλληλους φορείς-πλασμίδια, για έκφραση της σε βακτηριακά κύτταρα (*E. coli*) και σε ευκαρυωτικά κύτταρα ζύμης (*S. cerevisiae*). Για να διευκολυνθεί η απομόνωση της AMY2 και στα δύο αυτά συστήματα, έγινε προσθήκη «ετικέτας» ιστιδίνης (His tag) τόσο στο αμινο- όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο της. Στο παρόν κείμενο, περιγράφεται η επιτυχής έκφραση της AMY2, καθώς και οι μέχρι στιγμής προσπάθειες καθαρισμού της.

# Abstract

---

2,3-oxidosqualene is a precursor of terpenoid biosynthesis through its cyclization. This cyclization is affected by enzymes called oxidosqualene cyclases (OSCs) and results in the formation of a wide range of terpene structures which are further modified by other enzymes to obtain the final metabolites. AMY2 is a multifunctional OSC, from the organism *Lotus japonicus*, which cyclizes 2,3-oxidosqualene, to form beta-amyrin, lupeol, and possibly dihydrolupeol. The aim of this work was the heterologous expression and isolation of AMY2 in soluble, functional form in order to facilitate its enzymatic characterization.

The expression and isolation of the OSCs is generally challenging, since, despite the significance of these enzymes and the substances, both for plant function and human use, few have been isolated and characterized successfully. In this present work, we have cloned the AMY2 coding sequence into suitable vectors for expression in bacterial (*E. coli*) and eukaryotic yeast cells (*S. cerevisiae*). In order to facilitate the isolation of AMY2 from these two systems, a histidine tag was added to both the N-terminus and C-terminus of AMY2. This text describes the successful expression of AMY2, as well as efforts to isolate this protein that have been conducted to date.

# Πίνακας Περιεχομένων

---

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Πίνακας Περιεχομένων.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1. Στόχος.....	7
1.2.1. Τερπενοειδή.....	8
1.2.2.Ταξινόμηση Τερπενοειδών.....	8
1.2.3.Βιοσύνθεση Τερπενοειδών.....	9
1.3.Oxidosqualene Cyclases (OSCs)-Κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου.....	13
1.3.1. Οργάνωση του γονιδίου της AMY2 σε γονιδιακή ομάδα (gene cluster).....	14
1.4. Παραγόμενα Τερπένια: β-αμυρίνη, λουπεόλη και διϋδρολουπεόλη.....	15
1.5. Μοντέλο <i>Lotus japonicus</i> .....	17
1.6. Έκφραση σε ετερόλογα συστήματα.....	17
1.6.1. Δυσκολίες στην έκφραση των OSCs.....	19
1.7. Επίτευξη του στόχου.....	19
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	20
2.1. Έκφραση της AMY2 σε <i>E.coli</i> .....	20
2.2 Έκφραση της AMY2 σε <i>S.cerevisiae</i> .....	29
3. Αποτελέσματα.....	35
4. Συζήτηση.....	50
5.Παράρτημα.....	59
6.Βιβλιογραφία.....	69

# 1. Εισαγωγή

---

## 1.1 Στόχος

Οι κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, είναι ένζυμα απαραίτητα για τον σχηματισμό πρόδρομων τριτερπενίων. Τα τριτερπένια αποτελούν πολύπλοκες ενώσεις οι οποίες προκύπτουν από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Στόχο της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας, αποτέλεσε η έκφραση μιας ανασυνδυασμένης, μικτής δράσης κυκλάσης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου του ψυχανθούς *Lotus japonicus*. Πρόκειται για την AMY2 (β-amygrin synthase 2), μια πρωτεΐνη η οποία οδηγεί στην σύνθεση των τριτερπενίων β-αμυρίνη, λουπεόλη, και πιθανόν διϋδρολουπεόλη (Iturbe-Ormaetxe et al.,2003). Με σκοπό την απομόνωση διαλυτής, καταλυτικά ενεργής, πρωτεΐνης επιχειρήθηκε έκφραση της AMY2 σε κύτταρα *E. coli* (προκαρυωτικός οργανισμός) και ζύμης, *S. cerevisiae* (ευκαρυωτικός οργανισμός).

Η απομόνωση κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου, έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την έρευνα τα τελευταία χρόνια και αυτό γιατί πρόκειται για πολύπλοκα μόρια που παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες στη δομή τους (Haralampidis et al.,2002, Sawai et al.,2006), ενώ γενικότερα υπάρχει δυσκολία στην έκφραση διαλυτής και λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης σε ετερόλογους οργανισμούς (Abe et al.,1993, Ito et al.,2013, Kürten et al.,2015), όπως πρόκειται να αναλυθεί παρακάτω.

Υπάρχει λοιπόν μεγάλο ενδιαφέρον για την AMY2, καθώς αποτελεί μία κυκλάση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου μικτής δράσης, ενώ ερευνάται γενικότερα ο ρόλος της σε φυτικούς οργανισμούς και ιδιαίτερα στο μοντέλο ψυχανθές *Lotus japonicus*. Επειδή προηγούμενες προσπάθειες καθαρισμού της AMY2 απέδιδαν αποκλειστικά αδιάλυτη πρωτεΐνη, έγινε προσπάθεια να εκφραστεί σε βακτηριακά κύτταρα και κύτταρα ζύμης, αλλάζοντας κάθε φορά τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων, της έκφρασης, καθώς και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Κίνητρο αυτής της έρευνας αποτέλεσε η ανάγκη για απομόνωση διαλυτής, λειτουργικής πρωτεΐνης σε ικανοποιητική ποσότητα, που θα επέτρεπε περαιτέρω μελέτες αυτού του ενζύμου.

Εκτενέστερος λόγος πρόκειται ν' ακολουθήσει και για τη βιοσύνθεση των τριτερπενίων, τα ένζυμα-κυκλάσες που την συντελούν, ενώ κομμάτι της εισαγωγής θ'αποτελέσει και η παρουσίαση των γνώσεων που υπάρχουν σχετικά με τα τριτερπένια που παράγονται μέσω της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου από την AMY2.

### 1.2.1. Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή, είναι οι πιο πολυάριθμες και δομικά ποικιλόμορφες φυτικές φυσικές ενώσεις, οι οποίες ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Με βάση την αφθονία και την ποικιλία τους, προσφέρουν πολλές δυνατότητες σε μια σειρά από βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές, γι' αυτό και έχουν αξιοποιηθεί και μελετώνται ως φάρμακα και ενισχυτικά γεύσης.

Τα τριτερπένια είναι μια σημαντική υποομάδα της υπεροικογένειας των τερπενοειδών (Xu et al., 2004), με περισσότερα από 20.000 μέλη με χημικά διαφορετικές δομές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, τα τριτερπενοειδή είναι απαραίτητα πρόδρομα μόρια συστατικών των κυτταρικών μεμβρανών, ορμονών και στεροειδών (Nes et al., 1981, Benveniste et al., 2004, Suzuki et al., 2006). Επιπλέον, παίζουν ρόλους στην άμυνα κατά της προσβολής παθογόνων (Phillips et al., 2006). Συνήθως συντίθενται σε συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς και σε ορισμένα αναπτυξιακά στάδια (Nagegowda, 2010). Η αυξημένη συσσώρευση ή η απελευθέρωση των τερπενοειδών ως απάντηση σε διάφορες βιοτικές καταπονήσεις, συχνά οδηγεί στην αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων της βιοσύνθεσης τερπενοειδών. Αυτή η μεταγραφική απόκριση, ελέγχεται από μία σύνθετη αλληλουχία σηματοδότησης, στην οποία το ιασμονικό οξύ (JAs) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο. Ως εκ τούτου, η προσθήκη ιασμονικού οξέος σε φυτά ή φυτικά κυττάρα προκαλεί συχνά μεταγραφικές και μεταβολικές αλλαγές ανάλογες με αυτές που προκύπτουν μετά από επίθεση από φυτοφάγα (Thimmapra et al., 2014). Απλά τριτερπένια, αποτελούν συστατικά μεμβρανών και μπορεί δυνητικά να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια, ενώ πολύπλοκα γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια (σαπωνίνες), παρέχουν προστασία έναντι παθογόνων και παρασίτων (Thimmapra et al., 2014).

### 1.2.2. Ταξινόμηση Τερπενοειδών

Όλα τα τερπενοειδή, σχετίζονται μεταξύ τους, ανεξάρτητα από τις εμφανείς δομικές διαφορές τους. Σύμφωνα με τον κανόνα του ισοπρενίου, που προτάθηκε από τον Leopold Ruzicka, τα τερπένια μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχονται από συνένωση κεφαλής – ουράς μονάδων ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο). Ο άνθρακας 1, ονομάζεται κεφαλή της ισοπρενικής μονάδας, ενώ ο άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά της. Τα τερπένια, ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Πιο συγκεκριμένα, ταξινομούνται σε μονοτερπένια (10 άτομα C), σεσκιτερπένια (15 άτομα C), διτερπένια (20 άτομα C), σεστερτερπένια (25 άτομα C), τριτερπένια (30 άτομα C), τετρατερπένια (40 άτομα C).

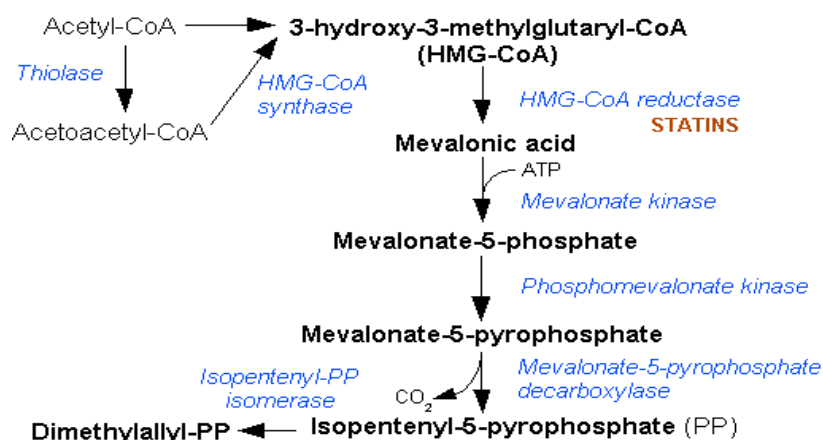
Στη συγκεκριμένη εργασία, έμφαση θα δοθεί στα τριτερπένια και συγκεκριμένα στον τρόπο βιοσύνθεσής τους. Όσον αφορά την ομάδα αυτή, με χημικό



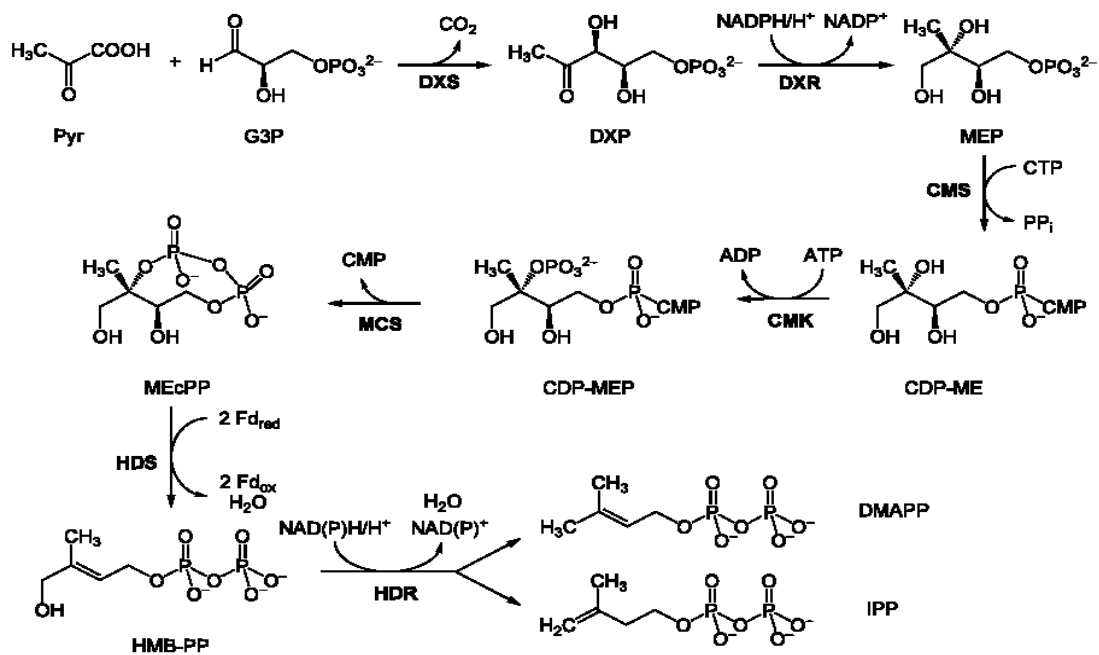
τύπο  $C_{30}H_{48}$ , ανήκουν και ενώσεις όπως οι σαπωνίνες και οι στερόλες. Τα ψυχανθή, παράγουν μια τεράστια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών (Wink & Mohamed, 2003). Μεταξύ αυτών, οι σαπωνίνες έχουν λάβει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω του ότι δίνουν ιδιότητες, που μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα των τροφίμων. Σημαντικός αριθμός φυτών, συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες τριτερπενίων ως γλυκοζίτες (τριτερπενοειδείς σαπωνίνες), συνήθως στο εσωτερικό των ριζών. Πολλά από αυτά, έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα, και έτσι είναι ικανά να προστατεύουν τα φυτά έναντι προσβολής από παθογόνα, ενώ παρουσιάζουν γενικότερα ένα εύρος λειτουργιών (Hostettmann και Marston, 1991). Επιπλέον οι ενώσεις αυτές, παρουσιάζονται ως ιδιαίτερα ευεργετικές και για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την σύνθεση άλλων πολύτιμων ενώσεων (Rochfort & Panozzo, 2007).

### 1.2.3. Βιοσύνθεση Τερπενοειδών

Η βιοσύνθεση ξεκινά με το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP), μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (MVA)-τρία μόρια ακετυλο-CoA, ενώνονται για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ- του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικού-CoA (HMG-CoA) και της HMG αναγωγάσης (Εικόνα 1). Εναλλακτικό μονοπάτι αποτελεί το μη-μεβαλονικό και πιο συγκεκριμένα το 4-φωσφορική 2-C-μεθυλ-D-ερυθρίτλη (MEP) / 5-φωσφορική 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη (DOXP)-(εικόνα 2) (Lichtenthaler H., 1999).



Εικόνα 1: Μονοπάτι βιοσύνθεσης τερπενοειδών μέσω σχηματισμού του μεβαλονικού οξέος (εικόνα από wikipedia).

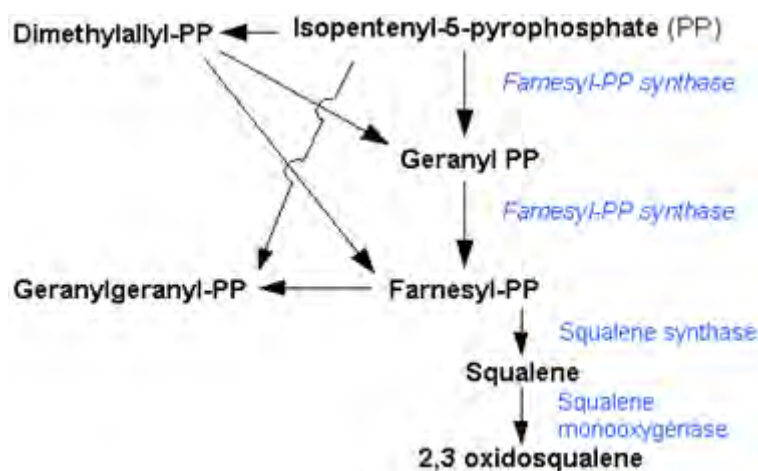


Εικόνα 2: Μονοπάτι βιοσύνθεσης τερπενοειδών μέσω σχηματισμού 4-φωσφορική 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη (MEP) και 5-φωσφορική 1-δεοξυ-D-ζυλουλόζη (DOXP) (εικόνα από Lichtenthaler H., 1999).

Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, η IPP ισομεριώνεται σε DMAPP. Η συνεχόμενη συμπύκνωση των μονάδων IPP και DMAPP οδηγεί στο σχηματισμό των πρενυλιωμένων πυροφωσφορικών, που είναι οι άμεσοι πρόδρομοι των τελικών προϊόντων των τερπενίων. Το IPP και το DMAPP, σχηματίζουν διφωσφορικό γερανύλιο (GPP)-πρόδρομη ένωση των μονοτερπενίων, το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP)- πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων, το διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο (GGPP)-πρόδρομη ένωση των διτερπενίων, ενώ ο διμερισμός των FPP και GGPP, οδηγούν στο σχηματισμό τριτερπενίων και τετρατερπενίων. Αυτές οι αντιδράσεις συμπύκνωσης καταλύονται από συγκεκριμένες πρενυλοτρανσφεράσες που ονομάζονται ανάλογα με το προϊόν που παράγουν. Ειδικές συνθάσες τερπενοειδών στη συνέχεια τροποποιούν αυτές τις πρόδρομες ουσίες σε σκελετούς τερπενοειδών (Chen et al., 2011), τα οποία μετέπειτα, με διάφορες ενζυματικές τροποποιήσεις μετατρέπονται, σε μόρια με δομική και λειτουργική ποικιλομορφία.

Η head-to-tail συμπύκνωση των IPP και DMAPP, αποδίδει όπως προαναφέρθηκε το FPP, δύο εκ των οποίων συντήκονται «κεφαλή με κεφαλή» για να δημιουργηθεί το γραμμικό C<sub>30</sub>, σκουαλένιο (εικόνα 3). Αυτή η ένωση εποξειδώνεται στο 2,3-οξειδοσκουαλένιο (Augustin et al., 2011), το οποίο κυκλοποιείται μέσω των κυκλασών οξειδοσκουαλενίου ή συνθασών (OSCs)-συνθάσες κυκλοαρτενόλης, συνθάσες λανοστερόλης για τις στερόλες, και συνθάσες τριτερπενίων για τριτερπενοειδή (Haralampidis et al., 2002), ώστε να προκύψουν τα πρόδρομα μόρια των τερπενίων (Phillips et al., 2006). Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (2,3-OS) σε στερόλες και τριτερπένια, αποτελεί το κομβικό σημείο μεταξύ

πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού. Από τη μία, παράγονται στερόλες και ορμόνες (πρωτογενείς μεταβολίτες) και από την άλλη παράγονται τριτερπένια (δευτερογενείς μεταβολίτες).

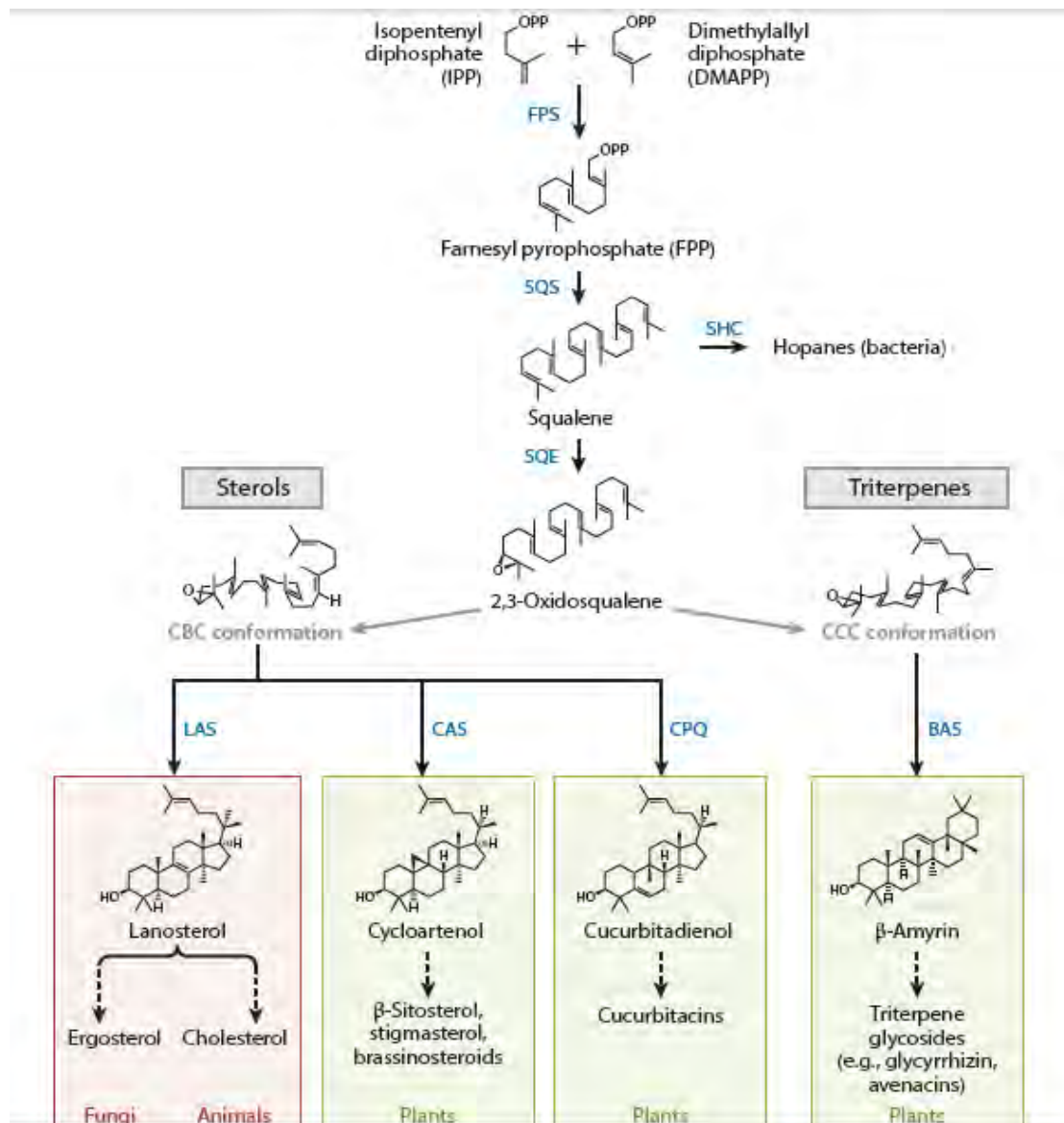


Εικόνα 3: Εποξείδωση του σκουαλενίου και σχηματισμός 2,3-οξειδοσκουαλενίου (εικόνα από wikipedia).

Τα μόρια που προκύπτουν, μετά την κυκλοποίηση του 2,3-OS, υποβάλλονται σε μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις όπως η οξείδωση, η αλκυλίωση, η ακυλίωση, και η γλυκοζυλίωση, με αποτέλεσμα την συσσώρευση γλυκοζιδίων τριτερπενίων. Οξειδώνονται περαιτέρω, από ένα ή περισσότερα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CytP450s), για να σχηματίσουν σαπογενίνες (την τελική μορφή δευτερογενών μεταβολιτών που συσσωρεύονται), ή γλυκοζυλιώνονται από UDP-εξαρτώμενες γλυκοζυλοτρανσφεράσες (UGTs) για να δημιουργήσουν τις σαπωνίνες (Augustin et al., 2011).

Στη βιοσύνθεση στερολών, το 2,3-OS, κυκλοποιείται στη λανοστερόλη (σε μύκητες και ζώα) ή στην κυκλοαρτενόλη (σε φυτά), μέσω της διαμόρφωσης ανάκλινδρου-σκάφης-ανάκλινδρου (chair-boat-chair, CBC) (εικόνα 4). Στην βιοσύνθεση τριτερπενίων, αντίθετα, υπάρχει μια διαφορετική διαμόρφωση, τριών σχηματισμών ανάκλινδρου (chair-chair-chair, CCC), η οποία αποδίδει μία τεράστια ποικιλία από τριτερπένια διαφορετικών σκελετικών τύπων (Thimappa et al., 2014).

Η κυκλοποίηση τριτερπενίων μπορεί να οδηγήσει σ' ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών δομών τριτερπενίων, όλα προερχόμενα από το αρχικό υπόστρωμα του γραμμικού ισοπρενοειδούς 2,3-OS. Τα προϊόντα που προκύπτουν, μπορούν στη συνέχεια να παρέχουν τη βάση για περαιτέρω τροποποίηση από τα τροποποιητικά ένζυμα (π.χ., κυτόχρωμα P450, τρανσφεράσες σακχάρων και ακυλοτρανσφεράσες), οδηγώντας έτσι στην τεράστια δομική ποικιλομορφία.



Εικόνα 4: Η βιοσυνθετική διαδρομή προς στερόλες και τριτερπένια. Οι στερόλες και τα τριτερπένια συντίθεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (MVA). Αναγράφονται επίσης και τα ένζυμα που καταλύουν τα διάφορα βήματα (εικόνα από Thimmappa et al., 2014).

Η κυκλοποίηση του 2,3-OS, γίνεται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει δέσμευση του υποστρώματος, αναδίπλωση, έναρξη της αντίδρασης με πρωτονίωση του εποξειδίου, κυκλοποίηση και αναδιάταξη των καρβοκατιόντων και τέλος τερματισμό με αποπρωτονίωση ή σύλληψη νερού για να παραχθεί ένα τελικό προϊόν τερπενίων. Η διαμόρφωση CCC κατευθύνει την κυκλοποίηση στο κατιόν δαμαρενυλίου (dammarenylyl), η οποία στη συνέχεια δημιουργεί μια σειρά από διάφορα τριτερπένια (Thimmappa et al., 2014).

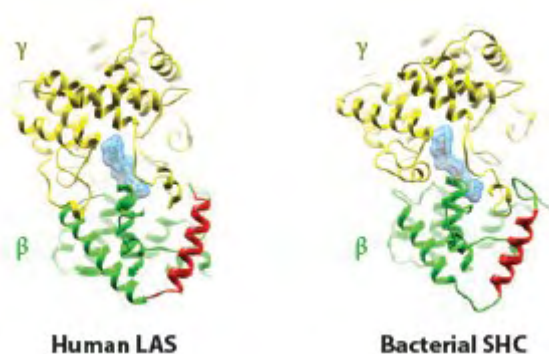
Τα τερπένια βρίσκονται στα φυτά σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η γλυκοζυλίωση καταλήγει σε αυξημένη πολικότητα και συνδέεται συχνά με τη

βιοδραστικότητα (Augustin et al., 2011). Τα γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια, αναφέρονται επίσης και ως σαπωνίνες (αναφέρθηκαν παραπάνω). Πολλά τριτερπένια έχουν μία ή περισσότερες αλυσίδες σακχάρων, που συνήθως συνδέονται στις C-3 και C-28 θέσεις (αν και η γλυκοζυλίωση στις C-4, C-16, C-20, C-21, C-22, ή και C-23 θέσεις μπορεί επίσης να συμβεί). Αυτές οι αλυσίδες σακχάρου συνήθως αποτελούνται από γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικό οξύ (και άλλα σάκχαρα μπορούν επίσης να ενσωματωθούν) που προστίθενται σε ομάδες υδροξυλίου ή καρβοξυλίου, σχηματίζοντας σακχαρικές ακετάλες και εστέρες σακχάρων αντίστοιχα (Vincken et al., 2007).

### 1.3 Oxidosqualene cyclases (OSCs)-κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου

Οι κυκλοποιήσεις του οξειδοσκουαλενίου σε τετρακυκλικούς και πεντακυκλικούς σκελετούς άνθρακα, στερολών και τριτερπενίων είναι από τις πιο πολύπλοκες αντιδράσεις που υπάρχουν στη φύση (Kushiro et al., 1998, Haralampidis et al., 2001) και καταλύονται από τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου. Κλωνοποίηση και σύγκριση αλληλουχίας πολλών διαφορετικών cDNA συνθασών τριτερπενίων αναμένεται να ρίξει φως στο μηχανισμό που οδηγεί στην εξειδίκευση του προϊόντος, ιδιαίτερα την αναδίπλωση του υποστρώματος (Kushiro et al., 1998).

Οι OSCs ξεκινούν την αντίδραση κυκλοποίησης με πρωτονίωση του τελευταίου διπλού δεσμού του σκουαλενίου και του εποξειδίου του 2,3-OS, αντίστοιχα. Αυτό το βήμα πρωτονίωσης ορίζει τα ένζυμα SHC και OSC ως συνθάσες τριτερπενίων κατηγορίας II. Αντίθετα, συνθάσες τάξης I ξεκινούν την κυκλοποίηση μέσω του ιονισμού του πυροφωσφορικού με τη βοήθεια  $Mg^{2+}$  συμπαραγόντων (Thimmappa et al., 2014). Κωδικοποιούνται από πολυγονιδιακές οικογένειες στα φυτά, έτσι, ένα μοναδικό είδος φυτού είναι πιθανό να είναι σε θέση να δημιουργήσει πολλαπλά τριτερπένια. Οι κρυσταλλικές δομές φυτικών συνθασών στερολών και τριτερπενίων δεν είναι ακόμη διαθέσιμες κι αυτό λόγω της δυσκολίας που υπάρχει στον καθαρισμό και στην απομόνωσή τους. Ωστόσο, οι δομές δύο άλλων συγγενικών ενζύμων (εικόνα 5) -SHC από το βακτήριο *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Reinert et al., 2004 – Wendt et al., 1997, 1999) και της ανθρώπινης συνθάσης λανοστερόλης (LAS) (Thoma et al., 2004) έχουν βρεθεί (Thimmappa et al., 2014).



Εικόνα 5: Κρυσταλλικές δομές δύο σχετικών ενζύμων-SHC από το βακτήριο *A. acidocaldarius* και της ανθρώπινης συνθάσης λανοστερόλης (LAS) (εικόνα από Thimmappa et al., 2014)

Οι OSCs γενικά κατατάσσονται στις ακόλουθες τρεις κατηγορίες: α) μονολειτουργικές OSCs (δίνοντας ένα μοναδικό κυρίαρχο προϊόν), β) πολυλειτουργικές/μικτής δράσης OSCs (παράγουν μια ποικιλία από σκελετούς τριτερπενίων) καθώς και γ) μία δευτερογενή κατηγορία συνθασών (Phillips DR et al., 2006-Lodeiro S. et al., 2007). Οι κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου γενικότερα, συμβάλλουν στην ετερογένεια τριτερπενίων και μπορούν να χαρακτηριστούν ως «ακριβείς» και «πολυλειτουργικές» αφού μπορούν να οδηγήσουν είτε αποκλειστικά σε κυκλοποίηση του 2,3-OS σε ένα μόνο προϊόν ή να συνθέσουν αρκετά διαφορετικά προϊόντα κυκλοποίησης, αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 40 OSCs έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των συνθασών α- και β-αμυρίνης, λουπεόλης, και στερόλης.

### 1.3.1. Οργάνωση του γονιδίου της AMY2 σε γονιδιακή συστοιχία (gene cluster)

Στη συγκεκριμένη εργασία, γίνεται λόγος για την κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου που κωδικοποιείται από το γονίδιο της AMY2. Οι κύριοι αρωγοί στο μεταβολισμό των τερπενίων, είναι οι συνθάσες των τερπενίων, καθώς και το κυτοχρώμα P450 (CYPs), που τροποποιούν και διαφοροποιούν γενικότερα τα ενδιάμεσα του μεταβολισμού, ώστε να προκύψουν μετέπειτα τα τελικά προϊόντα. Οι συνθάσες των τερπενίων συμπεριλαμβάνονται σε μία υπεροικογένεια βιοσυνθετικών ενζύμων που εμπλέκονται στην κατασκευή της βασικής δομής των τερπενίων. Σε ορισμένες λοιπόν περιπτώσεις, τα γονίδια, για μόρια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τερπενίων, έχει βρεθεί πως είναι οργανωμένα σε γονιδιακές συστοιχίες (Osbourne A. et al., 2010, Nützmann HW et al., 2014, Chu HY et al., 2011).

Κάτι ανάλογο συμβαίνει και στην περίπτωση της AMY2, όπου φαίνεται πως το γονίδιο που την κωδικοποιεί, περιστοιχίζεται από γονίδια που κωδικοποιούν τροποποιητικά ένζυμα. Η πρώτη συστοιχία γονιδίων, αποτελείται από τα γονίδια που κωδικοποιούν τη χαρακτηρισμένη AMY2 (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003) και δύο ένζυμα κυτοχρώματος P450, *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353*. Ενώ, η δεύτερη υποθετική συστοιχία στο *L. japonicus* βρίσκεται 200 kb μακριά από την πρώτη ομάδα και αποτελείται από μόλις δύο γονίδια: ένα που είναι παρόμοιο με την AMY2 (99% ομοιότητα για τις συνεπαγόμενες αλληλουχίες αμινοξέων) και ένα γονίδιο του κυτοχρώματος P450, *LjCYP88D4* που είναι παρόμοιο με το *LjCYP88D5*.

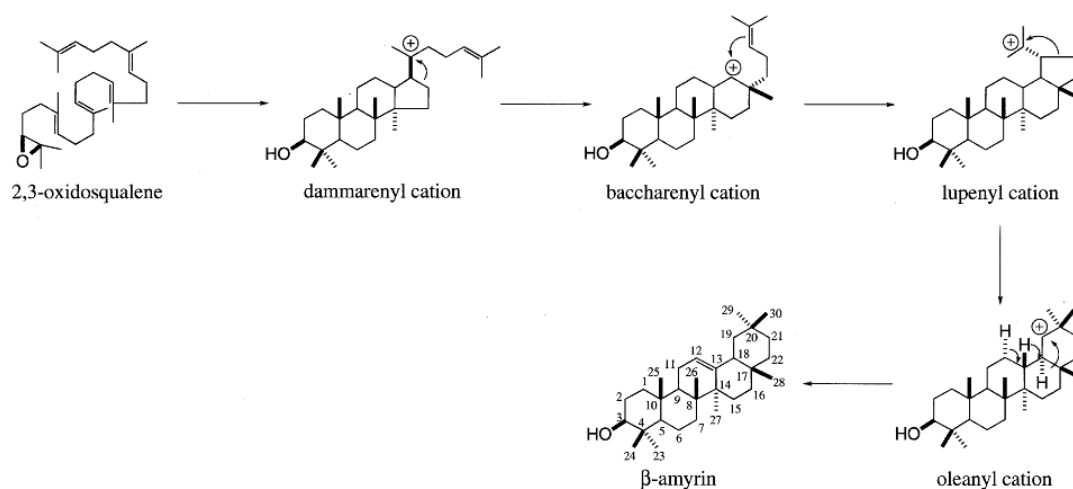
Το γονιδιακό σύμπλεγμα AMY2, συν-εκφράζεται στις ρίζες και στα φυμάτια του *L. japonicus* και προς απάντηση σε ορμόνες και στρεσογόνους παράγοντες. Προηγουμένως, είχε δειχθεί ότι η AMY2 εκφράζεται στη ρίζα και στα φυμάτια των φυτών *L. japonicus* που έχουν εμβολιαστεί με το συμβιωτικό βακτήριο

*Mesorhizobium loti* (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003, Sawai et al., 2006). Ως εκ τούτου, ερευνήθηκε αν τα γονίδια που είναι μαζί με την AMY2, ομοίως εκφράζονται στα φύλλα και τις ρίζες του *L. japonicus* φυτών και σε αυτά που εμβολιάζονται με *M. loti* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Αυτά τα πειράματα αποκάλυψαν ότι η AMY2 και τα *LjCYP88D5*, *LjCYP71D353* γονίδια δείχνουν παρόμοια εκφραστικά μοτίβα σε όλους τους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν, υποδεικνύοντας ότι τα τρία γονίδια συνεκφράζονται. Πολύ λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που ελέγχουν την ρύθμιση ομάδων γονιδίων του μεταβολισμού των φυτών. Η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να παίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων αυτών (Krokida et al., 2013).

#### 1.4 Παραγώμενα Τερπένια: β-αμυρίνη, λουπεόλη και διϋδρολουπεόλη

Όπως προαναφέρθηκε, από την κυκλοποίηση που υφίσταται το 2,3-OS από την πρωτεΐνη της AMY2, προκύπτει β-αμυρίνη, λουπεόλη, και πιθανόν διϋδρολουπεόλη. Η β-αμυρίνη, θεωρείται ότι δρα ως ένα πρόδρομο μόριο για το ολεανολικό οξύ και συνδέεται με την παραγωγή του. Συντίθεται μέσω της οδού των ισοπρενοειδών, με την κυκλοποίηση του 2,3-OS, που καταλύεται από τη συνθάση της β-αμυρίνης (OSC). Πρόκειται για τον πιο δημοφιλή τύπο τριτερπενίων (Liu et al., 2009).

Ο πεντακυκλικός σκελετός άνθρακα από τον οποίο βιοσυντίθεται, σχηματίζεται από το (3S)-2,3-OS, αναδιπλωμένο σε pre-CC διαμόρφωση (εικόνα 6). Το άνοιγμα του εποξειδίου, ακολουθείται από κυκλοποίηση που δίνει αρχικά ένα τετρακυκλικό κατιόν δαμμαρενυλίου. Μετά την επέκταση του δακτυλίου και το σχηματισμό του πέμπτου δακτυλίου, σχηματίζεται το κατιόν του λουπενυλίου. Μια άλλη επέκταση του δακτυλίου, ακολουθείται από μια σειρά από στερεοειδικές αλλαγές και η τελική αφαίρεση των 12A πρωτονίων δίνει μια β-αμυρίνη (Kushiro et al., 1998, Seo et al., 1988).

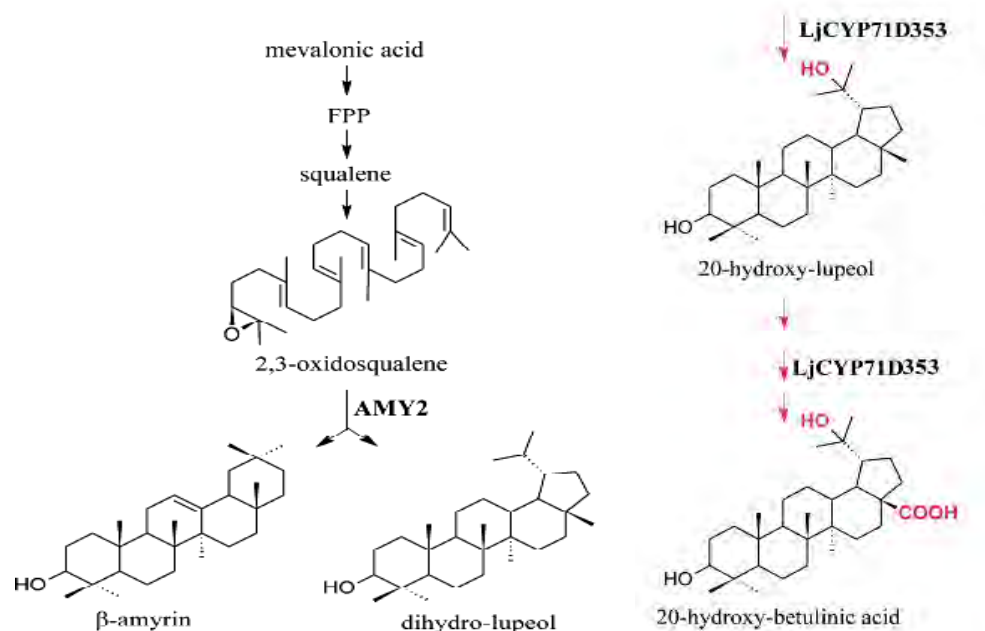


Εικόνα 6: Μηχανισμός κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προς σχηματισμό β-αμυρίνης (εικόνα από Kushiro, 1998)

Το ένζυμο AMY2, πρέπει να ελέγχει με ακρίβεια την γεωμετρία αναδίπλωσης του ακυκλικού υποστρώματος και τη σταθεροποίηση του ενδιάμεσου κατιόντος, έτσι ώστε να παράγει οκτώ ασύμμετρα κέντρα κατά τη διάρκεια του σχηματισμού πέντε ατόμων άνθρακα καρβοκυκλικού δακτυλίου (Kushiro, 1998).

OSC γονίδια που κωδικοποιούν συνθάσες β-αμυρίνης έχουν ταυτοποιηθεί σ' έναν αριθμό διαφορετικών ειδών φυτών. Εκτός από την β-αμυρίνη, και άλλα απλά τριτερπένια έχουν ανιχνευθεί ως κύρια συστατικά ενδοκυτταρικών στιβάδων σε πολλά φυτά (Moses et al., 2014). Για όλες τις OSCs, συμπεριλαμβανομένων κυρίως των συνθασών της β-αμυρίνης, λουπεόλης και κυκλοαρτενόλης, υπήρξαν πάντα δύο γνώμες σχετικά με την εξέλιξή τους (Zhang et al., 2003, Haralampidis et al., 2002). Η μία είναι ότι όλες οι OSCs των στερολών και των μονοπατιών βιοσύνθεσης τερπενίων μπορεί να μοιράζονται μια κοινή προγονική αρχή. Η άλλη είναι ότι η διαδοχική εξέλιξη της συνθάσης λουπεόλης και της συνθάσης β-αμυρίνης, προήλθε από τις πατρογονικές συνθάσες κυκλοαρτενόλης (Liu et al., 2009).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι το ιασμονικό οξύ, είναι ένα βασικό μόριο σηματοδότησης στη διαδικασία που οδηγεί στη συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών όπως έχει ήδη αναφερθεί (Zhao et al., 2005). Έχει δειχθεί επίσης, ότι εμπλέκεται στην αύξηση των επιπέδων mRNA της συνθάσης της β-αμυρίνης και στη συσσώρευση σαπωνινών (Liu et al., 2009, Hayashi et al., 2003, Shibuya et al., 2004).



Εικόνα 7: Προτεινόμενες ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύονται από την AMY2 για το σχηματισμό β-αμυρίνης και διϋδρολουπεόλης (εικόνα από Krokida, 2012)



Σε προηγούμενες έρευνες, η AMY2 παρουσιάστηκε ως ένα πολυ-λειτουργικό ένζυμο κυκλοποίησης του οξειδοσκουαλενίου, επειδή παράγει τόσο β-αμυρίνη, όσο και λουπεόλη όταν εκφράζεται σε ζυμομύκητα (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003). Σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*, η AMY2 παράγει β-αμυρίνη, παραδόξως όμως, λουπεόλη δεν εντοπίστηκε. Αντί αυτού, μία λιγότερο πολική ένωση ανιχνεύθηκε σε εκχυλίσματα φύλλων από φυτά που εκφράζουν την AMY2 που προτάθηκε να είναι διϋδρολουπεόλη (εικόνα 7). Είναι πιθανό, ότι μη ειδική ενδογενής ενζυμική δραστηριότητα στην *N. benthamiana*, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της διϋδρολουπεόλης σε σύγκριση με τον σχηματισμό λουπεόλης σε ζυμομύκητες. Εναλλακτικά, μία πιθανότητα για το σχηματισμό της είναι ότι η AMY2 αποδίδει ένα άτομο H στο λουπένυλο-κατιόν για να παράγει διϋδρολουπεόλη (Krokida et al., 2013)

### 1.5 Μοντέλο *Lotus japonicus*

Τα Ψυχανθή φυτά χρησιμεύουν ως πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα, καθώς και ως πρώτες ύλες για τις βιομηχανίες (Graham και Vance, 2003). Είναι σε θέση να δεσμεύουν το άζωτο σε μια συμβιωτική σχέση με τα βακτήρια του εδάφους του γένους *Rhizobium* από τα οποία λαμβάνουν, ανανεώσιμες ποσότητες αζώτου (N). Δύο είδη, το *L. japonicus* (Handberg και Stougaard, 1992) και το *Medicago truncatula* (Barker et al., 1990) έχουν επιλεγεί ως μοντέλα για την έρευνα των ψυχανθών. Αποτελεί αγγειόσπερμο δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στην Υποοικογένεια ψυχανθών ή *Papilionaeae των Fabaceae*. Είναι διπλοειδές ψυχανθές με μικρό μέγεθος γονιδιώματος (~ 470MB) και απλή δομή. Επιπλέον, έχει μικρό ανάστημα, μεγάλο σύνολο των σπόρων, σύντομο χρονικό διάστημα γενιάς (~ 2-3 μήνες) και είναι αυτο-γόνιμο (Handberg και Stougaard, 1992).

### 1.6 Έκφραση σε ετερόλογα συστήματα

Σημαντικές προκλήσεις για την εμπορευματοποίηση της φυτικής προέλευσης των τερπενοειδών, περιλαμβάνουν τα χαμηλά επίπεδα παραγωγής τους *in planta* εμποδίζοντας έτσι, τον καθαρισμό τους σε μεγάλες ποσότητες από τη φυσική πηγή, ενώ η συνεχής ζήτηση της βιομηχανίας για νέα μόρια με ανώτερες βιολογικές δραστηριότητες είναι αυξημένη. Φθηνότερη αλλά και μεγαλύτερη παραγωγή πολύτιμων τριτερπενοειδών μπορεί να επιτευχθεί από την «κλασική» γενετική μηχανική των φυτών ή με ετερόλογη παραγωγή των ενώσεων σε άλλα φυτά ή μικρόβια (Moses et al., 2013).

Η συνθετική βιολογία μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων φυτικών τριτερπενοειδών σε *in vitro* συστήματα ή σε ειδικά σχεδιασμένα τεχνητά βιολογικά συστήματα. Όταν η παραγωγή του φυσικού προϊόντος από τη φυσική πηγή δεν είναι επαρκής, διάφορες εναλλακτικές προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπεριλαμβανομένων: (1) αναπαραγωγή φυτών και γενετική μηχανική για να παραχθούν ποικιλίες ή διαγονιδιακά φυτά που συσσωρεύουν

υψηλότερα επίπεδα των επιθυμητών ενώσεων (2) ανάπτυξη επεκτάσιμων φυτικών κυττάρων ή ριζών και (3) η χρήση μικροβιακών ξενιστών για την παραγωγή της ένωσης (Moses et al., 2013).

Σε σύγκριση με τα συστήματα φυτικής παραγωγής, οι μικροοργανισμοί είναι ελκυστικές εναλλακτικές λύσεις ως ετερόλογοι ξενιστές λόγω της ταχείας τους παραγωγής, την απλότητα του καθαρισμού του προϊόντος και του χαμηλού κόστους, καθώς και λόγω της μετατροπής φθηνής πρώτης ύλης σε πολύτιμες ενώσεις. Η επιλογή ενός κατάλληλου ξενιστή, είναι κρίσιμη και πρέπει να βασίζεται σε πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της χημικής φύσης και της πολυπλοκότητας του προϊόντος που συντίθεται, τη γενετική επιδεκτικότητα του ξενιστή, την εγγενή διαθεσιμότητα των προδρόμων μορίων για τη βιοσύνθεση του προϊόντος, τη χρήση των κωδικονίων του ξενιστή, την ανάγκη για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τη δυνατότητα να ρυθμιστεί μεταβολικά ο ξενιστής, ώστε να δοθεί ώθηση στην παραγωγικότητα και έκφραση των ουσιών (Keasling, 2010).

Πολλαπλές OSCs, που καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-OS σε διαφορετικά τριτερπενοειδή έχουν ήδη απομονωθεί, αλλά μόνο λίγα γονίδια που τα τροποποιούν έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ εκατοντάδες πρέπει να υπάρχουν με βάση την εξέταση της ποικιλομορφίας των τριτερπενοειδών στο βασίλειο των φυτών. Μεγάλος αριθμός OSCs γονιδίων που καταλύουν τη σύνθεση των τριτερπενίων έχουν κλωνοποιηθεί και οι λειτουργίες τους έχουν επιβεβαιωθεί μέσω έκφρασης σε ζυμομύκητες. Κλωνοποιημένες συνθάσες τριτερπενίων αντιπροσωπεύουν τα κατάλληλα εργαλεία, για τη διερεύνηση της ρύθμισης της σύνθεσης και της φυσιολογικής λειτουργίας των τριτερπενίων καθώς και της παρατήρησης της περιεκτικότητας στερολών και τριτερπενίων που παράγονται από διαγονιδιακά φυτά αλλά και ετερόλογους οργανισμούς, όπως τα βακτήρια και οι ζύμες (Moses et al., 2013).

Έκφραση των *LjAMY2* στη ζύμη (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003) απέδωσε προϊόντα πανομοιότυπα με β-αμυρίνη και λουπεόλη σε περίπου ίσες ποσότητες καθώς και άλλα προϊόντα μικρότερης ποσότητας. Έτσι, όπως ήδη προαναφέρθηκε, η *LjAMY2* παρουσιάζει μια ποικιλία στο εύρος των λειτουργιών της όσον αφορά τη σύνθεση των τριτερπενίων. *MtAMY1* (από το *Medicago truncatula*) και *LjAMY2* εκφράστηκαν σε ζυμομύκητες, προκειμένου να εντοπιστούν οι πιθανοί μεταβολίτες τους. Η *MtAMY1* παρήγαγε ένα προϊόν ταυτόσημο με αυτό της β-αμυρίνης, ενώ η *LjAMY2* παρήγαγε συσσωρευμένα σχεδόν ίσες ποσότητες λουπεόλης και β-αμυρίνης και μια σειρά από άλλα δευτερεύοντα προϊόντα.

### 1.6.1. Δυσκολίες στην έκφραση των OSCs

Καθαρές, διαλυτές και λειτουργικές πρωτεΐνες είναι υψηλής ζήτησης στη σύγχρονη βιοτεχνολογία καθώς οι φυσικές κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου, σπανίως πληρούν απαιτήσεις όπως η απομόνωση μεγάλης ποσότητας, η ευκολία γενικότερα

της απομόνωσής τους ή ακόμη κι ένα γενικότερα χαμηλό κόστος. Η φυσική αφθονία των OSCs είναι γενικά πολύ χαμηλή για να απομονωθεί επαρκές υλικό για *in vitro* λειτουργικές και δομικές μελέτες. Επίσης, είναι σχετικά υδρόφοβες και άρα δυσδιάλυτες πρωτεΐνες, κάτι που δυσκολεύει περαιτέρω την απομόνωσή τους σε λειτουργική μορφή. Επιπλέον, η απομόνωση από φυσικές πηγές (λόγω ομοιότητας της αλληλουχίας των OSCs), δυσχερύνει την ανίχνευση και τον καθαρισμό τους με κλασικές τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών (Schlegel et al.,2010).

Η ανασυνδυασμένη τεχνολογία αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο για την απομόνωση λειτουργικής και καθαρής OSC, γι' αυτό και βασιστήκαμε στη δημιουργία ανασυνδυασμένης AMY2. Τα κύτταρα *Eschericia coli* αποτελούν συχνά χρησιμοποιούμενο ξενιστή, δεδομένου ότι διευκολύνουν την έκφραση πρωτεΐνης με μία σχετική απλότητα, μέσω φθηνής και γρήγορης καλλιέργειας υψηλής πυκνότητας, ενώ επίσης λόγω του μεγάλου αριθμού μοριακών εργαλείων που είναι πλέον διαθέσιμα οι ξενιστές αυτοί, χρησιμοποιούνται με ακόμα μεγαλύτερη ευκολία (Schlegel et al., 2010-Seddon et al.,2004).

Σκοπός της έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, είναι η απόκτηση ενός υψηλού βαθμού συσσώρευσης διαλυτού προϊόντος στο βακτηριακό κύτταρο. Αυτή η στρατηγική δεν είναι πάντα αποδεκτή όμως, από το κύτταρο-ξενιστή και πολλές φορές, μπορεί να έχουμε και το αντίθετο αποτέλεσμα όπως για παράδειγμα η συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων γνωστά ως "inclusion bodies". Αυτές οι πρωτεΐνες, είναι γενικότερα μη σωστά αναδιπλωμένες και βιολογικά ανενεργές. Έτσι, η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω *E. coli* συχνά, μπορεί να καταλήξει σε αδιάλυτη ή και μη λειτουργική πρωτεΐνη (Sørensen et al., 2005), γι'αυτό και το πείραμα συνεχίστηκε και με τη προσπάθεια έκφρασης και σε κύτταρα *S. cerevisiae* και συγκεκριμένα στο στέλεχος GIL77, καθώς έχει ξαναχρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης (Iturbe-Ormaetxe et al.,2003, Ito et al.,2013).

## 1.7 Επίτευξη του στόχου

Εδώ λοιπόν, εξετάζονται προσεγγίσεις για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια με στρατηγικές που εστιάζουν στην έκφραση ανασυνδυασμένης AMY2, της οποίας η κωδική αλληλουχία, κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι μετέπειτα μετασχηματίστηκαν τόσο σε κύτταρα *E.coli*, όσο και σε κύτταρα *S.cerevisiae*. Για το σκοπό αυτό, πολλοί φορείς έκφρασης έχουν αναπτυχθεί με κατάλληλους χειρισμούς ενός μεγάλου αριθμού γενετικών στοιχείων που ελέγχουν τη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης, καθώς και την έκκρισή της, από το κύτταρο-ξενιστή. Ακολούθησαν καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων και επαγωγή της έκφρασης. Μετά τη λύση των κυττάρων, έγινε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να παρατηρηθεί, αν υπάρχει έκφραση διαλυτής πρωτεΐνης.

Η χρήση των ετικετών συγγένειας σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιείται αρκετά συχνά όχι μόνο για την ανάπτυξη στρατηγικών καθαρισμού αλλά και γιατί έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν την απόδοση της πρωτεΐνης, την πρόληψη πρωτεόλυσης, την αύξηση της διαλυτότητας *in vivo* καθώς και τη βελτίωση της αναδίπλωσης (Smyth et al, 2003). Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε και στο συγκεκριμένο πείραμα, καθώς η αλληλουχία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης φέρει «ετικέτα» ιστιδίνης, η οποία δεσμεύεται σε στήλη νικελίου, προκειμένου να απομονωθεί και να καθαριστεί το επιθυμητό προϊόν. Τέλος, για να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη, η οποία ενδεχομένως παράγεται είναι λειτουργική, πραγματοποιήθηκε και χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

---

### 2.1 Έκφραση της AMY2 σε *E.coli*

Το cDNA του γονιδίου της AMY2 βρίσκεται κλωνοποιημένο στο πλασμίδιο pGEX-6P-1. Αφού επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη της αλληλουχίας μέσα στο πλασμίδιο pGEX, έγινε απομόνωση του πλασμιδίου και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), προκειμένου το γονίδιο της AMY2 να ενισχυθεί με τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα *NheI* και *NotI*. Έπειτα, έγινε καθαρισμός του PCR προϊόντος και η ένθεσή του, στους πλασμιδιακούς φορείς pET28a και pET21a ανάλογα με την ακολουθία που φέρει το Nterminal His tag ή αντίστοιχα το Cterminal His tag (η «ετικέτα» ιστιδίνης χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του εκφραζόμενου προϊόντος). Τέλος, τα βακτηριακά στελέχη BL21gold, μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα των αντιδράσεων της λιγάσης (μεταξύ φορέων και προϊόντων της PCR). Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων και έκφραση της AMY2 καθώς και μετέπειτα προσπάθεια καθαρισμού της.

#### Στελέχη κυττάρων *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν

##### *BL21 gold* στελέχη:

Κύτταρα υψηλής απόδοσης που παρέχουν αυξημένη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού και παράγουν υψηλής ποιότητας *miniprep* DNA, απομονωμένου δηλαδή DNA από τα κύτταρα. Είναι ιδανικά για μελέτες έκφρασης πρωτεΐνης που χρησιμοποιούν τον υποκινητή T7 RNA πολυμεράσης για υψηλά επίπεδα έκφρασης (Novagen Competent Cells).

##### *DH5a* στελέχη:

Κύτταρα κατάλληλα για τη δημιουργία γονιδιακών βιβλιοθηκών όπου χρησιμοποιούνται πλασμίδια-φορείς. Μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή μετασχηματισμένων και μη αποικιών σε τρυβλία βακτηριακών καλλιεργειών

που περιέχουν Bluο-gal ή X-gal λόγω δείκτη που παρέχει συμπληρωματικότητα με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Τα DH5α είναι ικανά να μετασχηματίζονται αποτελεσματικά με μεγάλα πλασμιδία (Novagen Competent Cells).

### **Απομόνωση πλασμιδίου pGEX – AMY2**

Αρχικά, προετοιμάστηκε μία προ-καλλιέργεια κυττάρων *E.coli* μετασχηματισμένων με τον φορέα pGEX που φέρει κλωνοποιημένο το γονίδιο της AMY2 σε θρεπτικό LB (10g/L bacto tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl, ±1.5% w/v agar για στερεό/υγρό θρεπτικό, αντίστοιχα) των 5ml και ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας στους 37°C και σε 180 στροφές. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας στον επωαστήρα, έγινε για ένα 24ωρο. Επίσης, στην καλλιέργεια αυτή προστέθηκε καρμπενικιλίνη ως αντιβιοτικό.

Έπειτα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα 5ml της προ-καλλιέργειας τα οποία φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000g και για 30sec, ενώ κάθε φορά διατηρούνταν μόνο το ίζημα και το υπερκείμενο αποβάλλονταν. Στη συνέχεια, διαλυτοποιήθηκε πλήρως το ίζημα προσθέτοντας σε αυτό, 300μl P1 buffer (50mM Tris, 10mM EDTA, pH 8 HCl) μαζί με RNase (3mg/ml- stock 10mgr/ml) και κάνοντας ανάδευση με συσκευή vortex. Έπειτα προστέθηκαν 300μl P2 buffer (200mM NaOH, 1,2gr1% SDS) και έγινε ανάδευση για 5λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί διαυγές εναιώρημα, όπου προστέθηκαν και άλλα 300μl P3 buffer (3M Potassium acetate, pH 5,5 glacial acetic acid) ξανά με ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καθαρά erpendorfs και ξαναέγινε φυγοκέντρωση για 2 λεπτά. Μεταφέρθηκε και πάλι το υπερκείμενο σε καθαρά erpendorfs και σε αυτά προστέθηκαν 600μl ισοπροπανόλη με ήπια ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρωση, για 15 λεπτά και αφού κρατήθηκε μόνο το ίζημα, προστέθηκαν σε αυτό 500μl 70% αιθανόλης με ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά. Τέλος, το ίζημα στέγνωσε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C και επαναδιαλύθηκε σε 20μl ddH<sub>2</sub>O.

### **Ενίσχυση αλληλουχίας της AMY2 με περιοχές που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα NheI και NotI, μέσω αντίδρασης PCR**

Η ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2, είναι απαραίτητη προκειμένου στη μετέπειτα αντίδραση λιγάσης (κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς pET28 και pET21) οι πέψεις τόσο των φορέων όσο και της AMY2 να γίνουν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα συμπληρωματικά άκρα. Το δείγμα της PCR1 αφορά την ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και την ύπαρξη κωδικονίου λήξης, ενώ το δείγμα PCR2, αντιστοιχεί στην ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τα ίδια ένζυμα και την απουσία κωδικονίου λήξης, κάτι που αργότερα θα επιτρέψει την ύπαρξη των «ετικετών» ιστιδίνης τόσο στο αμινοτελικό άκρο της

αλληλουχίας (N-terminal His tag) , όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal His tag), αντίστοιχα. Η αντίδραση της PCR, έγινε με την Phusion High-fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), ενώ οι εκκινητές, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, υπάρχουν στο παράρτημα. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της NewEnglandBiolabs.

### **Καθαρισμός PCR προϊόντος (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up)**

Τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf, 15μl του δείγματος DNA και σε αυτό προστέθηκαν 85μl ddH<sub>2</sub>O, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200μl buffer NT1. Τοποθετήθηκε το Nucleospin gel καθώς και η στήλη καθαρισμού μέσα σε eppendorf των 2ml και αφού προστέθηκε και το δείγμα, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30sec (απομακρύνθηκε ότι έχει περάσει από τη στήλη). Προστέθηκαν στη μεμβράνη της στήλης, 700μl NT3 και έγινε πάλι φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνοντας πάλι ότι έχει περάσει από τη στήλη. Το τελευταίο βήμα, επαναλήφθηκε και ξαναέγινε έπειτα φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το NT3 buffer. Τοποθετήθηκε το Nucleospin gel καθώς και η στήλη μέσα σε eppendorf των 1,5ml και προστέθηκε σε αυτό 30μl NE. Τέλος, έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3 λεπτά.

### **Προ-καλλιέργειες DH5a και BL21gold κυττάρων μετασχηματισμένων με τους φορείς pET21 και pET28 αντίστοιχα σε 5ml LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (amp<sup>R</sup> και kan<sup>R</sup> αντίστοιχα).**

Την επόμενη μέρα της επώασης, έγινε απομόνωση πλασμιδίου από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες κυττάρων ακολουθώντας το παραπάνω πρωτόκολο. Ακολούθησε πέψη των απομονωμένων pET21 και pET28 με τα NheI και NotI (buffer 2), καθώς και των PCR προϊόντων (pET21 και pET28:600ngr, pcr1: 226,8ngr, pcr2: 453,6ngr) ώστε να ακολουθήσει αντίδραση λιγάσης. Η πέψη έγινε στους 37°C για 3 ώρες. Μετά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε DNA extraction προκειμένου να απομονωθούν τα προϊόντα των πέψεων των φορέων και των PCR προϊόντων. Αρχικά, κόπηκε προσεκτικά με λεπίδα από την πηκτή το σημείο στο οποίο φαινόταν το DNA μετά από έκθεση του σε λάμπα UV. Αφού τοποθετήθηκαν τα κομμάτια του gel (pET21, pET28, PCR1, PCR2) μέσα σε eppendorfs των 1,5ml, έπειτα ζυγίστηκε το βάρος τους. Για κάθε 100mg gel προστέθηκαν 200μl buffer NT1 και ακολούθησε επώαση για 10λεπτά στους 50°C και ανάδευση για 3λεπτά ώστε να ρευστοποιηθεί πλήρως το gel. Το Nucleospin gel καθώς και η στήλη καθαρισμού τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf των 2ml και αφού προστέθηκε και το δείγμα, προστέθηκαν στη μεμβράνη της στήλης και 700μl NT3 με φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30sec (απομακρύνθηκε ότι έχει περάσει από τη στήλη). Έπειτα, ξαναπροστέθηκαν 700μl NT3, φυγοκεντρώντας πάλι στις ίδιες συνθήκες και απομακρύνοντας ότι έχει περάσει από τη στήλη. Το τελευταίο βήμα

επαναλήφθηκε και ξαναέγινε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το NT3 buffer. Το Nucleospin gel καθώς και η στήλη τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf των 1,5ml και προστέθηκαν σε αυτό 15μl NE. Τέλος, ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3 λεπτά.

### **Αντίδραση Λιγάσης**

Μέσω συγκεκριμένων πράξεων, υπολογίστηκε τι ποσότητες θα χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις λιγάσης. Πιο συγκεκριμένα, γνωρίζοντας πως 1bp έχει  $Mr = 600\text{gr/mol}$ , υπολογίστηκε το μοριακό βάρος του φορέα και του ενθέματος ( $5.400\text{ bp (vector)} \rightarrow 324 \times 10^4\text{ gr/mol}$  και  $2.300\text{ bp (insert)} \rightarrow 138 \times 10^4\text{ gr/mol}$ ). Έπειτα, ακολούθησε ποσοτικοποίηση με Qubit από όπου πήραμε τα εξής αποτελέσματα: pET21 --  $5,4\text{ngr}/\mu\text{l}$ , pET28 --  $7,76\text{ngr}/\mu\text{l}$ , PCR1 --  $7,78\text{ngr}/\mu\text{l}$ , PCR2 --  $27,6\text{ngr}/\mu\text{l}$ . Θέλοντας να χρησιμοποιήσουμε  $30\text{fmol}$ , υπολογίστηκαν στη συνέχεια πόσα gr θα πρέπει να έχουμε από τον φορέα και το ένθεμα ώστε να δούμε πόσα μl θα έχουμε στις αντιδράσεις (Vector  $\rightarrow m = n \times Mr = 30 \times 10^{-15}\text{ mol} \times 324 \times 10^4\text{ gr/mol} = 972 \times 10^{-10}\text{gr}$ , Insert  $\rightarrow m = n \times Mr = 30 \times 10^{-15}\text{ mol} \times 138 \times 10^4\text{ gr/mol} = 414 \times 10^{-10}\text{gr}$ ). Για την πρώτη αντίδραση, για τον pET21 χρησιμοποιήθηκαν  $\sim 38\text{ngr}$ , ενώ για το PCR2,  $\sim 28\text{ngr}$ ). Για τη δεύτερη αντίδραση, για τον pET28 χρησιμοποιήθηκαν  $\sim 47\text{ngr}$ , ενώ για το PCR1, χρησιμοποιήθηκαν  $\sim 20\text{ngr}$ . Κρατήθηκαν 2μl στον πάγο σε θερμοκρασία δωματίου για 30λεπτά, ενώ τα υπόλοιπα 8μl τοποθετήθηκαν στους  $4^\circ\text{C}$  για όλο το βράδυ (έτσι ώστε να γίνουν οι αντιδράσεις λιγάσης).

### **Μετασχηματισμός Δεκτικών Κυττάρων BL21gold με τα pET28-AMY2 Nterminal His tag και pET21-AMY2 Cterminal His tag.**

Αρχικά, πολύ γρήγορα τοποθετήθηκαν στον πάγο τα δεκτικά κύτταρα από τους  $-80^\circ\text{C}$ . Έπειτα, εισήχθησαν στα κύτταρα 2μl από την κάθε αντίδραση σύνδεσης, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα control στα οποία δεν εισήχθη DNA, αλλά 2μl  $\text{H}_2\text{O}$ . Τα κύτταρα παρέμειναν στον πάγο για 30λεπτά και στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 50 δευτερόλεπτα στους  $42^\circ\text{C}$ . Αμέσως μετά, μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5λεπτά. Στα δείγματα προστέθηκε από 1ml θρεπτικό LB για να επανέλθουν και παρέμειναν στους  $37^\circ\text{C}$  για 50 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά (pET28 - Τετρακυκλίνη ( $10\mu\text{g/ml}$ ) και Καναμυκίνη ( $50\mu\text{g/ml}$ ), pET21 - Τετρακυκλίνη ( $10\mu\text{g/ml}$ ) και Καρμπενικιλίνη ( $100\mu\text{g/ml}$ ) και επώαση για ένα 24ωρο στους  $37^\circ\text{C}$ . Έπειτα, έγιναν υγρές καλλιέργειες (5ml LB) από τις αποικίες που πήραμε στα τρυβλία, πάλι με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίου με τον ίδιο τρόπο που αναλύθηκε παραπάνω.

**Διαγνωστικές Πέψεις στα πλασμίδια pET21-AMY2 και pET28-AMY2 για να επιβεβαιώσουμε αν έχει γίνει επιτυχής σύνδεση μεταξύ φορέων και γονιδίου AMY2**

Στη συνέχεια, έγιναν μετρήσεις με Qubit στα απομονωμένα πλασμίδια από κάθε διαφορετική αποικία προκειμένου να υπολογίσουμε τι ποσότητα θα χρησιμοποιήσουμε σε κάθε αντίδραση πέψης. Ανάλογα με τα ngr/μl που μετρήσαμε μέσω Qubit, υπολογίσαμε πόσα μl θα προσθέσουμε από κάθε δείγμα ώστε να έχουμε 800ngr DNA. Από το NEB cloner ακολουθήθηκε πρωτόκολλο για τελικό όγκο 30μl και έγιναν συγκεκριμένα οι εξής αντιδράσεις πέψεων: pET21-AMY2 και Pst1 (Buffer 3) και για τα 6 δείγματα (από 6 διαφορετικές αποικίες) και pET28-AMY2 και Xba1 (Buffer cut smart) και για τα δύο δείγματα (από 2 διαφορετικές αποικίες). Ακολούθησε πέψη για 2 ώρες και 30 λεπτά. Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της NewEnglandBiolabs.

### **Έκφραση της AMY2**

Από τις προηγούμενες υγρές καλλιέργειες, ξαναέγιναν υγρές σε 5 ml LB μόνο όμως με τις συγκεκριμένες αποικίες: pET21-AMY2 4, pET21-AMY2 6, pET28-AMY2 2, control (χωρίς την αλληλουχία της AMY2). Συγκεκριμένα, έγινε εμβολιασμός 50μl από την κάθε υγρή καλλιέργεια και με την προσθήκη πάντα των κατάλληλων αντιβιοτικών (βλ. παραπάνω). Έπειτα ακολούθησε επώαση για ένα 24ωρο στους 37°C. Στη συνέχεια, την επόμενη ημέρα, με αραιώση 1:50, εμβολιάστηκαν 100μl από τις καλλιέργειες σε νέες των 5ml και ακολούθησε επώαση για 1ώρα και 30λεπτά μέχρι O.D.<sub>600</sub>=0,5-0,6. Προστέθηκαν 0,5mM IPTG και έγινε επώαση για 3ώρες. Η ρύθμιση της έκφρασης της AMY2 στο συγκεκριμένο ετερόλογο σύστημα έκφρασης βασίζεται στο οπερόνιο της λακτόζης. Συγκεκριμένα, ένας καταστολέας (lacI) παράγεται από το πλασμίδιο και προσδένεται στο χειριστή του οπερονίου εμποδίζοντας την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή και συνεπώς τη μεταγραφή της κλωνοποιημένης αλληλουχίας. Επαγωγή της έκφρασης επιτυγχάνεται παρουσία ενός χημικού αναλόγου της λακτόζης, του IPTG (ισοπρόπυλ-θειό-β-D-γαλακτοσίδιο). Το συγκεκριμένο μόριο προσδένεται στον καταστολέα με αποτέλεσμα το προκύπτον σύμπλοκο καταστολέα-επαγωγέα να μην μπορεί να προσδεθεί στον χειριστή. Συνεπώς η RNA πολυμεράση μπορεί πλέον να προσδεθεί στον υποκινητή και να ξεκινήσει τη μεταγραφή.

Για τη λύση των κυττάρων, προστέθηκε 1ml από το lysis buffer (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200mM NaCl, 0,2mM PMSF, 5mM EDTA, 10% γλυκερόλη, 0,1% MTG) σε κάθε erpendorf και ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση σε max spin. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη κατεργασία με υπερήχους προκειμένου να διασπαστούν πλήρως τα κύτταρα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν, στην ειδική συσκευή και χρησιμοποιήσαμε τους υπερήχους 4 φορές με χρονική διάρκεια 15 δευτερολέπτων και αναμονή 30 δευτερολέπτων μετά από κάθε ενεργοποίηση. Έπειτα, αναδεύαμε κάθε 3 λεπτά μέχρι τα 10 λεπτά μέγιστο χρόνο και φυγοκεντρήσαμε στα 17.000g για 20 λεπτά. Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα erpendorfs, ενώ ακολούθησε επίσης και 2<sup>η</sup> επαναδιάλυση του ιζήματος με την προσθήκη 1ml lysis buffer.



## SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση

Αρχικά, έχουμε τη δημιουργία ενός stacking gel ακριβώς πάνω από το separating gel. Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το separating gel, στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Η δημιουργία των δύο διαφορετικών gel βοηθά στο να ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων από το ίδιο σημείο. Στο σύστημα Tris-glycine-SDS, το stacking gel έχει pH 6,8 και το δείγμα 'παγιδεύεται' ανάμεσα σε ιόντα Cl<sup>-</sup>, τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή γραμμή. Σχηματίζεται μια 'ζώνη' μέσα στην οποία βρίσκεται 'παγιδευμένο' το δείγμα. Όταν η 'ζώνη' αυτή εισέλθει στο stacking gel, το οποίο έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό, ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος. Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσα σε buffer (Tris-Glycine-SDS) με pH περίπου 8,3 (Amersham Biosciences).

Στη συνέχεια το δείγμα θερμαίνεται στους 95°C για 10 λεπτά, ώστε το SDS να δεθεί με τις πρωτεΐνες και να δράσει η αναγωγική ουσία. Στη συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε SDS-PAGE → 10% πολυακρυλαμίδη, ενώ οι πλύσεις κάθε πηκτής έγιναν με CH<sub>3</sub>COOH και η χρώση τους με Coomassie blue. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pink prestained protein ladder.

### *Καλλιέργειες των BL21gold (pET28-AMY2 και pET21-AMY2) σε 800ml LB*

Αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με τους ίδιους φορείς, αλλά αυτή τη φορά σε μεγαλύτερη κλίμακα, δηλαδή με καλλιέργειες των 800ml θρεπτικού LB. Αρχικά, προετοιμάστηκαν τα τρυβλία με θρεπτικό LB καθώς και οι υγρές καλλιέργειες των 50ml και των 800ml. Επιλογή των πλασμιδίων γινόταν με καναμυκίνη (100μg/mL) και τετρακυκλίνη (10μg/mL) για τον pET28 ενώ αμπικιλίνη (100μg/mL) και τετρακυκλίνη (10μg/mL). Από τα stock γλυκερόλης, χρησιμοποιήθηκαν τα BL21gold: pET28-AMY2 και pET21-AMY2. Με κίτρινο tip, απομονώθηκαν κύτταρα από τα stock και έγινε επίστρωσή τους με γκαζάκι στο συγκεκριμένο τρυβλίο για την κάθε καλλιέργεια. Στη συνέχεια, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C σε 200rpm για όλη τη νύχτα. Έπειτα, από το κάθε τρυβλίο, απομονώθηκαν αποικίες οι οποίες εισήχθησαν με κίτρινο tip σε 50ml LB -υγρές καλλιέργειες (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά) και μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C στα 200rpm για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, 8ml από την κάθε καλλιέργεια εμβολιάστηκαν (1:100) με αποστειρωμένες συνθήκες, σε 800ml LB χωρίς αντιβιοτικό (pET28-AMY2 και pET21-AMY2). Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα για 2 ώρες (στους 37°C στα 200rpm) μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν σε O.D.600 = 0,69 όπου και προστέθηκε σε αυτές 0,5mM IPTG (σε κάθε μία). Μετά από 2ώρες επώασης (37°C, 200rpm), κρατήθηκαν 2 eppendorfs (pET28-AMY2 και

pET21-AMY2) με 1ml από την κάθε καλλιέργεια των 800ml και 6 falcons (3 για pET28-AMY2 και 3 για pET21-AMY2) με το υπόλοιπο δείγμα. Φυγοκέντρηση των 2 erppendorfs σε max spin για 1min και των 6 falcons στα 3500g για 5min. Κάθε φορά απομακρύνονταν το υπερκείμενο και κρατούνταν το ίζημα, δηλαδή τα κύτταρα. Τα 6 falcons αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση, ενώ αρχικά δουλέψαμε με τα 2 erppendorfs. Λύση των κυττάρων έγινε σε 1ml lysis buffer NPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 με NaOH, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, Triton-X100 0,1% v/v). Αφού επαναδιαλύθηκε το ίζημα, μεταφέρθηκαν τα κύτταρα (erppendorfs μέσα σε πάγο) για διεργασία με υπερήχους προκειμένου να σπάσουν τα κύτταρα (*Sonication* → Cycle1-Amplitude 60% - 6 φορές κάθε erppendorf για 15 δευτ. με 30 δευτ. αναμονής). Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 17,000g για 20 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε με μικρή ποσότητα από το Lysis buffer. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που προέκυψαν, είναι ο pink prestained protein ladder.

### **Έκφραση των δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες**

Αρχικά, διατηρώντας τα κύτταρα πάντα στον πάγο, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα από κάθε falcon προσθέτοντας 2ml NPI-10 για κάθε 1gr ιζήματος. Στη συνέχεια, αφού προστέθηκαν όλα τα επαναδιαλυμένα ιζήματα σε ένα falcon, συνεχίσαμε με υπερήχους (*Sonication* → 6 φορές – 15δευτ – 30 δευτ αναμονής). Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 λεπτά – 4°C.

### **Καθαρισμός πρωτεϊνών με His tag, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες**

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η IMAC (immobilized metal-affinity Chromatography) που βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός ιόντος μετάλλου (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) ακινητοποιημένο σε μία μήτρα και συγκεκριμένων αλυσίδων αμινοξέων. Ιστιδίνη είναι το αμινοξύ που εμφανίζει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση καθώς οι δότες ηλεκτρονίων στο δακτύλιο μιδαζόλης της ιστοιδίνης εύκολα σχηματίζουν δεσμούς με το ακινητοποιημένο μέταλλο. Οι κλωνοποιήσεις οι οποίες προηγήθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα η εκφραζόμενη πρωτεΐνη να φέρει αμινοτελικά συντηγμένο επίτοπο ουράς έξι ιστοιδινών (6x His-tag) στον πλασμιδιακό φορέα pET28 και καρβοξυτελικά συντηγμένο επίτοπο ουράς έξι ιστοιδινών (6x His-tag) στον πλασμιδιακό φορέα pET21. Η αμινοξική ουρά των έξι ιστοιδινών έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά, μέσω των μιδαζολικών δακτυλίων, με τα δισθενή ιόντα Ni<sup>2+</sup> (χηλικά σύμπλοκα ιόντων Ni<sup>2+</sup>), τα οποία είναι ακινητοποιημένα επάνω στα σφαιρίδια-νιτροτριακετικού οξέος (NTA) της ρητίνης κι έτσι να δεσμεύεται σε αυτήν η επιθυμητή αναστυνδουασμένη πρωτεΐνη. Εξισορρόπηση της στήλης Νικελίου έγινε σε διάλυμα NPI-10 (+protease inhibitor). Δέσμευση του δείγματος στα σφαιρίδια της στήλης έγινε για 1 ώρα στους 4°C με ήπια ανάδευση. Πλύσιμο έγινε προσθέτοντας 2,5ml από το NPI-20 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole- pH στο 8.0 με NaOH) και 1ml από το NPI-20 με Triton-

X100 1μl και ξανακάναμε επανάληψη. Έκλουση έγινε προσθέτοντας στη στήλη 2,5ml από το NPI-250 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole-pH στο 8.0 με NaOH +Triton-X100 0,01% v/v). Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που ακολούθησε, είναι ο prestained Pink protein ladder (NIPPON Genetics).

### ***Έκφραση των δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, μετά από καλλιέργειες των 1600ml***

Αρχικά, έγιναν υγρές καλλιέργειες των 30ml και των 800ml αλλά αυτήν τη φορά δεν χρησιμοποιήθηκε μόνο το δείγμα BL21gold με το πλασμίδιο pET28-AMY2 αλλά και ένα δείγμα BL21gold χωρίς την AMY2, το οποίο είναι το δείγμα control. Από τα προηγούμενα LB τρυβλία, απομονώθηκε αποικία η οποία εμβολιάστηκε σε υγρή καλλιέργεια των 30ml ενώ για το δείγμα control, απομονώθηκε δείγμα από το stock γλυκερόλης και εμβολιάστηκε και αυτό σε 30ml υγρής καλλιέργειας με θρεπτικό LB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά). Στη συνέχεια, οι υγρές καλλιέργειες (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά) μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C στα 210rpm για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, 8ml από την κάθε καλλιέργεια εμβολιάστηκαν (1:100) με αποστειρωμένες συνθήκες, σε 800ml LB χωρίς αντιβιοτικό (pET28-AMY2 και control). Κορεσμένες προκαλλιέργες του στελέχους εμβολιάστηκαν (σε αραιώση 1/100) σε συνολικά 1600ml LB pET28-AMY2 (σε διαφορετικές κωνικές των 800ml LB). Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα για 2 ώρες (στους 37°C στα 210rpm) μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν σε O.D.600 = 0,57 όπου και προστέθηκε σε αυτές 0,5mM IPTG (σε κάθε μία). Μετά από 2ώρες επώασης (37°C, 210rpm), μαζεύτηκαν τα κύτταρα σε 6 falcons (3 για pET28-AMY2 και 3 για control). Φυγοκέντρωση των 6 falcons στα 3000g για 5min. Κάθε φορά απομακρύνονταν το υπερκείμενο και κρατούνταν το ίζημα, δηλαδή τα κύτταρα. Αρχικά, διατηρώντας τα κύτταρα πάντα στον πάγο, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα από κάθε falcon προσθέτοντας 2ml NPI-10 για κάθε 1gr ιζήματος. Στη συνέχεια, αφού προστέθηκαν όλα τα επαναδιαλυμένα ιζήματα σε ένα falcon, συνεχίσαμε με υπερήχους (*Sonication* → 4 φορές – 15δευτ – 30 δευτ αναμονής). Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρωση στα 4000g για 30 λεπτά – 4°C.

### ***Καθαρισμός πρωτεϊνών με His tag, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες***

Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν 250μl σφαιριδίων (1bed volume), για κάθε δείγμα, ενώ στο πλύσιμο της στήλης, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ιμιδαζολίου ίση με 40mM. Πιο συγκεκριμένα, το gel ξεπλύθηκε χρησιμοποιώντας 1,25ml από το NPI-40 (αντί για NPI-20), 0,5ml από το NPI-40 μαζί με DTT 15μl και άλλα 0,75ml από το NPI-40 και ακολούθησε επανάληψη. Η έκλουση έγινε με 1.25ml από το NPI-250 (+triton-x 0,1% v/v). Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που ακολούθησε, είναι ο pink prestained protein ladder.

### ***Έκφραση δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (απομόνωση διαφορετικού βακτηριακού κλώνου pET28-AMY2)***

Μετά από καλλιέργειες και επαγωγή της έκφρασης που έγιναν όπως ακριβώς και στα προηγούμενα πειράματα, απομονώθηκαν κύτταρα τα οποία, διαλυτοποιήθηκαν από κάθε falcon προσθέτοντας 2ml NPI-10 για κάθε 1gr ιζήματος. Στη συνέχεια, αφού προστέθηκαν όλα τα επαναδιαλυμένα ιζήματα σε ένα falcon, συνεχίσαμε με υπερήχους (*Sonication* → 6 φορές – 15 δευτ – 30 δευτ αναμονής). Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 λεπτά – 4°C.

### ***Καθαρισμός πρωτεϊνών με His tag, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες***

Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 500μl των σφαιριδίων για κάθε δείγμα, ενώ η έκλουση έγινε με 2,5ml από το NPI-250 (+triton-x 0,1% v/v). Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν ίδιες με το προηγούμενο πείραμα. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που ακολούθησε, είναι ο pink prestained protein ladder.

### ***Έκφραση των pET21-AMY2 και καθαρισμός με αποδιατακτικές συνθήκες***

Αφού τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, συνεχίσαμε δουλεύοντας με τα κύτταρα που είχαμε απομονώσει από τις καλλιέργειες των pET21-AMY2 που είχαμε αποθηκεύσει στους -80°C, αλλά αυτή τη φορά κάναμε καθαρισμό με αποδιατακτικές συνθήκες. Αρχικά, διατηρώντας τα κύτταρα πάντα στον πάγο, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα από κάθε falcon προσθέτοντας 5ml NPI-10 για κάθε 1gr ιζήματος. Προσθέσαμε λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml και διατηρήσαμε τα κύτταρα στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, αφού προστέθηκαν όλα τα επαναδιαλυμένα ιζήματα σε ένα falcon, συνεχίσαμε με υπερήχους (*Sonication* → 6 φορές – 15 δευτ – 30 δευτ αναμονής). Ακολούθησε ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 λεπτά – 4°C. Έπειτα, αφού κρατήσαμε πάλι μόνο το ίζημα ακολούθησε. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με προσθήκη 10ml NPI-10 ανά 1gr ιζήματος (1,722gr – 17,22ml NPI-10). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 λεπτά στους 4°C και επαναδιάλυση ιζήματος με την προσθήκη 2ml DNPI-10 ανά 1gr ιζήματος (1,7gr – 3,4ml DNPI-10). Στη συνέχεια, έγινε πάλι διεργασία με υπερήχους: (*Sonication* → 6 φορές – 15 δευτ – 30 δευτ αναμονής) και τα κύτταρα αφέθηκαν για 1 ώρα στον πάγο με ανάδευση κάθε 10 λεπτά. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 λεπτά – 20°C, το υπερκείμενο μόνο διατηρήθηκε αυτή τη φορά, ενώ ξαναέγινε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 10 λεπτά. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε όπως και προηγουμένως, μόνο που αυτή τη φορά, χρησιμοποιήθηκε το DNPI-10 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 8 M urea-pH στο 8.0 με NaOH). Ο όγκος των σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 500μl, ενώ οι πλύσεις έγιναν με DNPI-20 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 8 M urea-pH στο 8.0 με NaOH). Τέλος, η έκλουση έγινε με 2,5ml DNPI-250 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 8 M urea-pH στο 8.0 με NaOH). Ο μάρτυρας που

χρησιμοποιήθηκε στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που ακολούθησε, είναι ο pink prestained protein ladder (Εικόνα 8).

## 2.2. Έκφραση της AMY2 σε *S.cerevisiae*

Μετά την έκφραση σε βακτηριακά κύτταρα, στραφήκαμε στη χρήση στελέχους σακχαρομύκητα GIL77, (έλλειψη συνθάσης λανοστερόλης και συσσώρευση 2,3-οξειδοσκουαλενίου, παροχή εξωγενούς εργοστερόλης, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων). Έγινε λοιπόν PCR, προκειμένου το γονίδιο της AMY2 να ενισχυθεί με τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα KpnI και NotI. Επίσης, απομονώθηκε το πλασμίδιο pYES2/NT-B από κύτταρα DH5a. Ακολούθησε, καθαρισμός του PCR προϊόντος και έγινε η ένθεση του γονιδίου στο φορέα pYES2/NT-B. Η 1<sup>η</sup> PCR δεν είχε κωδικόνιο λήξης (για να επιτευχθεί η κλωνοποίηση στο φορέα με His tag στο καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας του) και η 2<sup>η</sup> PCR είχε κωδικόνιο λήξης (για να επιτευχθεί η κλωνοποίηση στο φορέα με His tag στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας του). Τέλος, τα στελέχη GIL77, μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα των αντιδράσεων της λιγάσης (μεταξύ φορέα και προϊόντων της PCR). Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων και έκφραση της AMY2 καθώς και μετέπειτα προσπάθεια καθαρισμού της. Αρχικά, κύτταρα DH5a (*E.coli*) μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pYES2/NT-B (από stock στους -80°C) με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Η ρύθμιση της έκφρασης της AMY2 στο συγκεκριμένο ετερόλογο σύστημα έκφρασης βασίζεται στη ρύθμιση της έκφρασης του GAL1 προαγωγέα (promoter), που υπάρχει στο πλασμίδιο pYES2/NT-B. Συγκεκριμένα, καταστολέα του υποκινητή αποτελεί η χρήση γλυκόζης, ενώ παρουσία γαλακτόζης, επιτυγχάνεται η επαγωγή της έκφρασης της αλληλουχίας του πλασμιδίου. Συνεπώς η RNA πολυμεράση μπορεί πλέον να προσδεθεί στον υποκινητή και να ξεκινήσει τη μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου.

### Διαγνωστικές Πέψεις

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν έχουμε απομονώσει επιτυχώς το επιθυμητό πλασμίδιο pYES2/NT-B κάναμε διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα PciI (buffer 3) και StuI (buffer CutSmart). Οι αναμενόμενες ζώνες, θα έπρεπε να είναι: 2.395bp + 3.644bp (PciI) και 780bp + 5.259bp (StuI), ενώ για τα δείγματα DNA χρησιμοποιήθηκαν 10<sup>3</sup>ngr. Οι πέψεις έγιναν για 2 ώρες και 30 λεπτά στους 37°C.

Το επόμενο βήμα, ήταν η διένεξη PCR προκειμένου να ενισχύσουμε την αλληλουχία της AMY2 με συγκεκριμένες αλληλουχίες οι οποίες αναγνωρίζονται από τα ένζυμα KpnI και NotI (primers βλ.παράρτημα) μέσα στο πλασμίδιο pGEX όπου η AMY2 βρίσκεται ήδη κλωνοποιημένη. Η 1<sup>η</sup> PCR δεν είχε κωδικόνιο λήξης (για να επιτευχθεί η μετέπειτα κλωνοποίηση στο φορέα με His tag στο καρβοξυτελικό άκρο

της αλληλουχίας του) και η 2<sup>η</sup> PCR είχε κωδικόνιο λήξης (για να επιτευχθεί η μετέπειτα κλωνοποίηση στο φορέα με His tag στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας του) (Εικόνα 10). Η αντίδραση της PCR, έγινε με την Phusion High-fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), ενώ οι εκκινητές, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, υπάρχουν στο παράρτημα.

Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός των PCR προϊόντων, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω και ποσοτικοποίηση τόσο αυτών όσο και του απομονωμένου πλασμιδίου μας (Qubit) έτσι ώστε να δούμε τι ποσότητες θα χρησιμοποιήσουμε στις πέψεις που θα ακολουθήσουν. Επομένως, ακολούθησαν οι περιοριστικές Πέψεις με KpnI HF και NotI HF (buffer 2) και με 10<sup>3</sup>ngr για τις ποσότητες των PCR προϊόντων και του φορέα (για 2 ώρες στους 37°C). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων και έπειτα καθαρισμός των προϊόντων με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί. Στη συνέχεια, ακολούθησε ποσοτικοποίηση (Qubit) των προϊόντων: pYES - 27,5ng/μl, PCR 1 - 14,6ng/μl, PCR 2 - 17,1ng/μl, προκειμένου να υπολογιστούν οι όγκοι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις λιγάσης μεταξύ του πλασμιδίου και των δύο PCR προϊόντων. (Vector →  $m = n \times Mr = 30 \times 10^{15} \text{ mol} \times 36 \times 10^5 \text{ gr/mol} = 108 \text{ngr}$ , Insert →  $m = 50 \text{ngr}$ ). Οι αντιδράσεις λιγάσης έγιναν με αναλογία περίπου ίση με 1:1. Για τον pYES χρησιμοποιήθηκαν 2μl (55ngr) και για το PCR1 και PCR2, 1,5μl (50ngr). Αντίδραση λιγάσης στον πάγκο για 30 λεπτά. Αφού μετασχηματίστηκαν τα κύτταρα BL21 gold, έγινε επίστρωση σε τρυβλία (καρμπενικιλίνη ως αντιβιοτικό) από τα οποία απομονώθηκαν αποικίες και ακολούθησαν υγρές καλλιέργειες. Από τις υγρές καλλιέργειες στη συνέχεια, απομονώθηκαν τα πλασμίδια pYES + AMY2 Cterminal (3 αποικίες) και pYES + AMY2 Nterminal (2 αποικίες).

### **Διαγνωστικές Πέψεις για τα απομονωμένα πλασμίδια με το ένζυμο: PciI**

Ακολούθησε αρχικά ποσοτικοποίηση με Qubit και βρέθηκε πως μόνο η 3<sup>η</sup> αποικία είχε DNA (pYES + AMY2 Cterminal). Μετά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αποφασίσαμε να χρησιμοποιηθεί το DNA από την 3<sup>η</sup> αποικία (pYES + AMY2 Cterminal) και τη 2<sup>η</sup> (pYES + AMY2 Nterminal). Επειδή όμως χρειαζόμαστε μεγάλες ποσότητες από τα συγκεκριμένα πλασμίδια, μετασχηματίσαμε με αυτά DH5a και τα κάναμε επίστρωση σε τρυβλία. Έπειτα, από υγρές καλλιέργειες, απομονώθηκαν πλασμίδια από 4 αποικίες των pYES + AMY2 Nterminal και 4 πλασμίδια από τις αποικίες των pYES + AMY2 Cterminal.

### **Καλλιέργειες κυττάρων GIL77**

Από τρυβλία με σχηματιζόμενες αποικίες GIL77 αγρίου τύπου, απομονώσαμε αρκετή ποσότητα η οποία καλλιεργήθηκε σε YPD medium, τόσο σε νέα τρυβλία όσο και σε καλλιέργειες των 50ml. YPD υγρές καλλιέργειες και τρυβλία [(2% w/v peptone, 1% w/v yeast extract, 2% glucose, 20μg/mL ergosterol, 5mg/mL Tween-80, 1,5% agar (για τρυβλία)]

SD(Synthetic Dropout Medium)-uracil για υγρές καλλιέργειες και τρυβλία (2% w/v glucose, 20μg/mL ergosterol, 5mg/mL Tween-80, 13μg/mLhemin, ± 1.5% w/v agar)

### ***Ηλεκτροδιάτρηση για το μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης***

Αρχικά, αφήσαμε τις καλλιέργειες των κυττάρων ζύμης να μεγαλώσουν σε επωαστήρα στους 28°C στις 180 στροφές μέχρις ότου τα κύτταρα να φτάσουν σε  $OD_{600} = 1.3$ . Στη συνέχεια, φυγοκεντρήσαμε στα 5000 rpm για 5λεπτά και ξεπλύναμε το ίζημα με ίσο όγκο  $H_2O$  - της αρχικής καλλιέργειας και ξανακάναμε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα, αφού κρατήσαμε πάλι μόνο το ίζημα, ξεπλύναμε με τον μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας με  $H_2O$  και φυγοκεντρήσαμε ξανά. Στη συνέχεια, προσθέσαμε στο ίζημα το 1/25 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας- 1M μανιτόλη την οποία διατηρούσαμε σε πάγο. Επίσης, προσθέσαμε 25mM DTT και τα αφήσαμε για 10λεπτά στον πάγο σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση, ξεπλέναμε τα κύτταρα πάλι με 1M μανιτόλη. Στη συνέχεια, επαναδιαλύσαμε το ίζημα με την προσθήκη 1M μανιτόλης με όγκο 1/200 της αρχικής καλλιέργειας. Έπειτα, αφού προσθέσαμε σε ξεχωριστά eppendorfs 50μl του κυτταρικού εναιωρήματος, προσθέσαμε σε αυτά 5μl DNA. Αμέσως, χωρίς να καθυστερούμε, προσθέσαμε στον πάτο της ειδικής κιουβέτας το δείγμα και αφού το εισάγαμε στην ειδική συσκευή έγινε η ηλεκτροδιάτρηση στα 5kV, 200½, 25 μFaradays. Αμέσως, προσθέσαμε στην κιουβέτα 1M μανιτόλη για να επανέλθουν τα κύτταρα και αφού μεταφέραμε το δείγμα σε νέο eppendorf, τα τοποθετήσαμε στους 30°C για διάρκεια 1 ώρας. Τέλος, αφού φυγοκεντρήσαμε και επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 1M μανιτόλη, έπειτα κάναμε επίστρωση τα κύτταρα σε τρυβλία με θρεπτικό YPD και ελάχιστη ποσότητα μανιτόλης (επώαση στους 28°C χωρίς ανάδευση).

### ***Έκφραση των κυττάρων GIL77***

Τα τρυβλία στα οποία είδαμε αποικίες ήταν μόνο αυτά με τα κύτταρα ζύμης τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια pYES-AMY2 Cterminal. Από τις αποικίες αυτές, κάναμε υγρές καλλιέργειες (για δύο διαφορετικές αποικίες) σε SD medium –uracil, +supplements – 100μl για κάθε αποικία καθώς και για 1 wild type control σε YPD θρεπτικό. Φυγοκεντρήσαμε στα 3000g για 5 λεπτά, επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε SD medium και μεταφέραμε τις καλλιέργειες σε SD medium φυγοκεντρήσαμε ξανά, και επαναδιαλύσαμε σε NPI-10 lysis buffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Ρύθμιση του pH στο 8.0 με χρήση NaOH + 0,1% v/v triton-x.

Αφού επαναδιαλύσαμε, μαζέψαμε τα κύτταρα σε διαφορετικούς χρόνους μέχρι τις 48 ώρες (κάθε φορά από 1ml) και τα υπόλοιπα 96ml τα φυγοκεντρήσαμε και τα αποθηκεύσαμε στους -80°C για μελλοντική χρήση. Μετά τη φυγοκέντρηση, προστέθηκε 1ml lysis buffer στο κάθε δείγμα και ακολούθησε κατεργασία με υπερήχους ώστε να σπάσουν τα κύτταρα (Cycle 1 – Amplitude 65% - 12 δείγματα → 4 φορές το καθένα από 15 δευτερόλεπτα και 1 λεπτό αναμονής). Έπειτα,

ακολούθησε φυγοκέντρηση, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και μεταλλικά σφαιρίδια προκειμένου να σπάσουμε τα κύτταρα πιο αποτελεσματικά με vortexing. Ξαναέγινε φυγοκέντρηση στα 17g για 10 λεπτά και τέλος ακολούθησε SDS-PAGE (10% acrylamide).

### **Καθαρισμός της AMY2 μέσω στήλης Νικελίου (*protino Ni-NTA agarose*)**

Χρησιμοποιήσαμε 1 mL από το 50% του επαναδιαλυμένου διαλύματος άρα συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε 0,5ml των σφαιριδίων. Η εξισορρόπηση της στήλης Νικελίου, έγινε με NPI-10 +Triton-X 0,1% v/v + protease inhibitor. Η ανάδευση για τη δέσμευση του δείγματος στα σφαιρίδια έγινε για 45 λεπτά και η πλύση της στήλης έγινε με NPI-20. Τέλος, προστέθηκαν στη στήλη, 2,5ml από το NPI-250.

### **PCR για επιβεβαίωση μετασηματισμένων GIL77**

Στη συνέχεια, έγινε PCR, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν τα κύτταρα ζύμης GIL77 έχουν πραγματικά μετασηματιστεί με το πλασμίδιο pYES-AMY2. Οπότε αρχικά, κάναμε DNA extraction για να απομονώσουμε το DNA από τα GIL77 τα οποία είχαμε καλλιεργήσει σε τρυβλία (Clone 1-Cterminal-GIL77/Clone2-Cterminal-GIL77/Wild Type-GIL77). Σε 3 eppendorfs, προστέθηκε από 1ml YPD και με κίτρινο tip απομονώθηκε μεγάλη ποσότητα αποικίας από κάθε τρυβλίο αντίστοιχα και τοποθετήθηκε μέσα στο συγκεκριμένο eppendorf. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30 δευτερόλεπτα και μαζέψαμε τα κύτταρα (ίζημα) το οποίο επαναδιαλύθηκαν σε 100μl buffer: (Tris-HCl pH=7,5/ 250mM NaCl/ 25mM EDTA/ 0,5% w/v SDS). Προκειμένου να πετύχουμε τη μέγιστη δυνατή επαναδιάλυση, προσθέσαμε μεταλλικά σφαιρίδια και κάναμε vortexing σε κάθε eppendorf από 6 φορές για 15 δευτερόλεπτα και με αναμονή 30 δευτερολέπτων. Έπειτα, τοποθετήσαμε τα δείγματα σε υγρό N<sub>2</sub> και αφού τα βγάλαμε, κάναμε φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέσαμε σε αναλογία 1:25 CHCl<sub>3</sub>:isoamyl alcohol πιο συγκεκριμένα 100μl σε κάθε δείγμα και κάναμε vortexing. Προχωρήσαμε με φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για 4 λεπτά και στην υδατική φάση που προέκυψε προσθέσαμε: + 2vols από 100% αιθανόλη (130μl σε κάθε δείγμα), + 1/10vol CH<sub>3</sub>COONa 3M με pH=5,2 (6μl σε κάθε δείγμα). Αφήσαμε τα δείγματα στον πάγο για 10 λεπτά και ξανακάναμε φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για 15 λεπτά. Στο ίζημα, προσθέσαμε 1ml 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήσαμε ξανά σε μέγιστες στροφές για 10 λεπτά. Αφού κρατήσαμε το ίζημα κάναμε βρασμό για 10 λεπτά στους 50°C και επαναδιαλύσαμε προσθέτοντας 50μl H<sub>2</sub>O σε κάθε δείγμα. (Μέτρηση Ποσότητας με Qubit: Wilt Type – 122ng/μl, Clone1 – 3,30ng/μl, Clone2 – 2,61ng/μl). Η αντίδραση της PCR, έγινε με την Phusion High-fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), ενώ οι εκκινητές, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, υπάρχουν στο παράρτημα. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της NewEnglandBiolabs.



### ***Καλλιέργειες μετασχηματισμένων GIL77 των 600ml***

Αφού επιβεβαιώσαμε πως στα χέρια μας έχουμε μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης GIL77, συνεχίσαμε με καλλιέργειες σε SD θρεπτικό μέσο, των δύο κλώνων του Cterminal His tag (από stock γλυκερόλης). Ο ένας κλώνος, χρησιμοποιήθηκε ως control καθώς δε μεταφέρθηκε σε γαλακτόζη ώστε να ξεκινήσει η έκφραση και παρέμεινε σε θρεπτικό με γλυκόζη, ενώ ο 2<sup>ος</sup> κλώνος υπέστη επαγωγή καθώς μεταφέρθηκε σε θρεπτικό με γαλακτόζη. Επιπλέον, από αυτά τα stock επιστρώθηκαν κύτταρα και σε νέα τρυβλία SD. Προ-καλλιέργειες των 5ml (4ml SD, 500μl YNB, 500μl 20%w/v γλυκόζη)-επώαση για 2 μέρες στους 30°C και στα 200rpm- και για τους δύο κλώνους αντίστοιχα. Εμβολιασμός και των 5ml σε 100ml SD (+10% YNB, +10% γλυκόζη)-επώαση για 2 μέρες στους 30°C και στα 200rpm- και για τους δύο κλώνους αντίστοιχα. Μετά από 2 μέρες ακολούθησε φυγοκέντρηση των 100ml καλλιέργειας για τον κλώνο 1 και των 100ml για τον κλώνο 2, ενώ προστέθηκαν επίσης 50ml PBS 0,1M pH=7,00 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) για τις πλύσεις της γλυκόζης, επαναδιάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρηση, βήμα το οποίο επαναλήφθηκε. Μετά και την τελευταία φυγοκέντρηση, προστέθηκε στα κύτταρα μικρή ποσότητα SD, ακολούθησε επαναδιάλυση και έπειτα το υγρό αποχύθηκε μέσα στις καλλιέργειες των 600ml SD (10% YNB, 10% γλυκόζη-για τον έναν κλώνο, 10% YNB, 10% γαλακτόζη -για τον άλλον κλώνο )-επώαση για 24 ώρες, στους 30°C στα 150rpm. Την επόμενη μέρα, μαζεύτηκαν τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στα 1500g για 5 λεπτά κάθε φορά. Έπειτα, προστέθηκε στο ίζημα το δεύτερο buffer PBS 0,1M pH=7,00 (στερεό K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) +hemin (13μg/ml) +γλυκόζη (3%w/v) και ακολούθησε επαναδιάλυση και ξανα φυγοκέντρηση. Το υπόλοιπο buffer 1L, χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό για την επώαση των επαναδιαλυμένων κυττάρων (500ml για τον κλώνο1, 500ml για τον κλώνο2). Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες, στους 30°C στα 150rpm. Την επόμενη μέρα μαζεύτηκαν τα κύτταρα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 1500g (για 5 λεπτά κάθε φορά) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Αρχικά, διατηρώντας τα κύτταρα πάντα στον πάγο, διαλυτοποιήσαμε το ίζημα από κάθε falcon προσθέτοντας 2ml NPI-10 για κάθε 1gr ιζήματος (Κλώνος 1-σε γαλακτόζη και κλώνος 2-σε γλυκόζη). Στη συνέχεια, αφού προσθέσαμε όλα τα επαναδιαλυμένα ιζήματα σε ένα falcon, συνεχίσαμε με υπερήχους (*Sonication* → 4 φορές – 15δευτ – 1 λεπτό αναμονής). Ακολούθησε *ανάδευση* για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 3500g για 10 λεπτά – 4°C. Κρατήσαμε το υπερκείμενο ενώ το ίζημα το επαναδιαλύσαμε σε 2ml του υπερκειμένου και προσθέσαμε σε αυτό, γυάλινα σφαιρίδια για να υποστούν τα κύτταρα λύση με vortexing (10 φορές/30 δευτ./1 λεπτό αναμονής). Σε αυτά τα δείγματα έγινε φυγοκέντρηση, στα 4000g για 30 λεπτά – 4°C και κρατήθηκε το υπερκείμενο μαζί με το υπόλοιπο από την προηγούμενη φυγοκέντρηση. Στα δείγματα που προέκυψαν λοιπόν, προστέθηκαν τα σφαιρίδια για τον καθαρισμό καθώς και 0,2mM PMSF, ως αναστολέας πρωτεασών. Χρησιμοποιήσαμε 1 mL από το 50% του επαναδιαλυμένου διαλύματος άρα συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε 0,25ml των σφαιριδίων για το δείγμα με τη γαλακτόζη και 0,25ml για το δείγμα με τη γλυκόζη).

Η ανάδευση του δείγματος έγινε για 2 ώρες, ενώ χρησιμοποιήθηκε το NPI-40, προκειμένου να ξεπλυθεί η στήλη. Τέλος, η έκλουση έγινε με 2,5ml από το NPI-250.

### **Καλλιέργειες μετασχηματισμένων GIL77 των 1000ml**

Το προηγούμενο πείραμα επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες αλλά αυτήν τη φορά σε μεγαλύτερο όγκο καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν οι κλώνοι οι οποίοι είχαν επιστρωθεί από τα stock στα τρυβλία και ο ένας αποτέλεσε το control δείγμα καθώς δε μεταφέρθηκε σε γαλακτόζη ώστε να ξεκινήσει η έκφραση και παρέμεινε σε θρεπτικό με γλυκόζη, ενώ ο 2ος κλώνος υπέστη επαγωγή καθώς μεταφέρθηκε σε θρεπτικό με γαλακτόζη. Προ-καλλιέργειες των 5ml (4ml SD, 500μl YNB, 500μl 20%w/v γλυκόζη) )-επώαση για 2 μέρες στους 30°C και στα 200rpm- 2 και για τους δύο κλώνους αντίστοιχα. Εμβολιασμός και των 10ml σε 100ml SD (+10%YNB, +10% γλυκόζη) )-επώαση για 2 μέρες στους 30°C και στα 200rpm- 2 και για τους δύο κλώνους αντίστοιχα. Χρησιμοποιήσαμε 2 mL από το 50% του επαναδιαλυμένου διαλύματος άρα συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε 0,5ml των σφαιριδίων για το δείγμα με τη γαλακτόζη και 0,5ml για το δείγμα με τη γλυκόζη). Στην εξισορρόπηση χρησιμοποιήθηκε NPI-10 + Triton-X 0,1% v/v + protease inhibitor, ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν ίδιες.

### **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (**Thin-layer chromatography ή TLC**) αποτελεί τεχνική χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό διαφόρων ουσιών. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εκτελείται σε μια πλάκα που επικαλύπτεται με μια λεπτή στρώση διοξειδίου του πυριτίου. Αυτή η στρώση είναι γνωστή ως στατική φάση (stationary phase). Αφού το δείγμα έχει εφαρμοστεί στην πλάκα, ένα μείγμα διαλυτών (γνωστό ως η κινητή φάση (mobile phase)) ανέρχεται στην πλάκα μέσω τριχοειδούς κίνησης. Διαφορετικές ενώσεις του δείγματος κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες λόγω των διαφορών στην έλξη τους με την στατική φάση και λόγω των διαφορών στη διαλυτότητα στον διαλύτη. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό της διαλυμένης ουσίας και της κινητής φάσης για σύνδεση σε θέσεις της στατικής φάσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η κανονική φάση οξειδίου του πυριτίου (silica) χρησιμοποιείται ως η στατική φάση, μπορεί να θεωρηθεί ως πολική. Με δεδομένες δύο ενώσεις που διαφέρουν σε πολικότητα, η πιο πολική ένωση έχει μια ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το οξείδιο του πυριτίου και είναι, συνεπώς, πιο ικανή στην απομάκρυνση της κινητής φάσης από τα σημεία σύνδεσης.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε απομόνωση των μεταβολιτών, έγινε δηλαδή extraction από τα κύτταρα τα οποία είχαμε κρατήσει (τόσο των καλλιεργειών των 600ml όσο και των 1000ml). Για κύτταρα καλλιέργειας των 20ml ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο. Φυγοκέντρωση στις μέγιστες στροφές ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα και μετέπειτα προσθήκη σε αυτά, 2ml διαλύματος KOH 20%w/v : EtOH 50% v/v. Ακολούθησε vortex και μετέπειτα βρασμός στους 90°C-95°C για 15 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκαν στα δείγματα 2ml εξανίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ειδικά γυάλινα tubes τα οποία χρησιμοποιούνται για speed-vac. Το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε. Τα γυάλινα tubes μεταφέρθηκαν σε speed-vac για 20 λεπτά και έπειτα έγινε επαναδιάλυση των δειγμάτων με 50μl MeOH.

Για την εκτέλεση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, ακολουθήθηκε η παρακάτω διεργασία. Μια μικρή σταγόνα του διαλύματος που περιέχει το δείγμα εφαρμόζεται σε μια πλάκα, περίπου 1,5 εκατοστό από την κάτω άκρη. Μια μικρή ποσότητα ενός κατάλληλου διαλύτη (μέσου έκλουσης) χύνεται σε ένα ποτήρι ζέσεως (θάλαμο διαχωρισμού) σε ένα βάθος λιγότερο από 1 εκατοστό. Το μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν hexane και ethyl acetate σε αναλογία 9:1. Η πλάκα TLC τοποθετείται έπειτα στον θάλαμο έτσι ώστε η ποσότητα του δείγματος να μην εφάπτεται της επιφάνειας του μέσου έκλουσης στον θάλαμο και το κάλυμμα κλείνεται. Ο διαλύτης ανεβαίνει με τριχοειδή δράση (capillary action), συναντά το μείγμα του δείγματος και το μεταφέρει στην πλάκα (εκλούει το δείγμα). Η πλάκα πρέπει να αφαιρεθεί από τον θάλαμο πριν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει την κορυφή της στατικής φάσης (η συνέχιση της έκλουσης θα δώσει ένα παραπλανητικό αποτέλεσμα) και θα ξεραθεί. Αφού οι πλάκες ετοιμάστηκαν, στη συνέχεια έγινε χρώση με διάλυμα p-anisaldehyde 100μl, sulphuric acid 100μl και acetic acid 4,8ml, προκειμένου να εντοπιστούν οι επιθυμητές ζώνες-κουκκίδες.

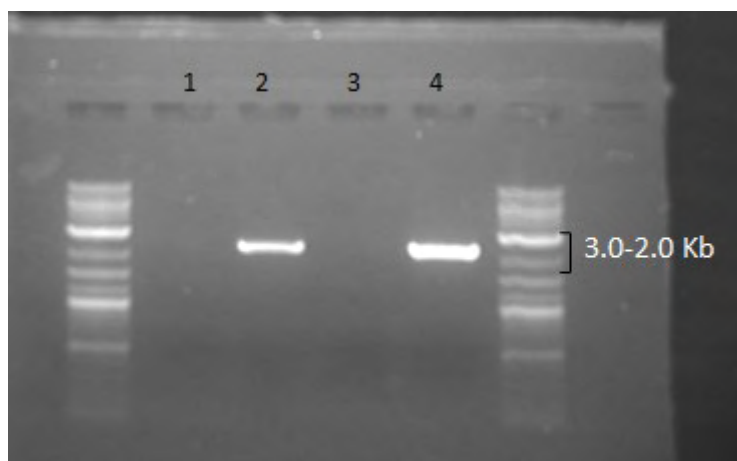
## 3. Αποτελέσματα

---

### 3.1. Έκφραση ανασυνδυασμένης AMY2 σε κύτταρα *E.coli*

*Ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης*

Η αλληλουχία της AMY2 (κλωνοποιημένη στο φορέα pGEX), ενισχύθηκε με εκκινητές που εισήγαγαν τις ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα *NheI* και *NotI* μέσω συγκεκριμένων εκκινητών που παρείχθησαν. Χρησιμοποιήθηκε, πολυμεράση με ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών (proofreading), ενώ έγινε η χρήση και δύο αρνητικών μαρτύρων, τα οποία αντί για δείγμα DNA περιείχαν, ddH<sub>2</sub>O. Το πρώτο δείγμα, αντιστοιχεί στην ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και την ύπαρξη κωδικονίου λήξης, ενώ το δεύτερο δείγμα, αντιστοιχεί στην ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τα ίδια ένζυμα και την απουσία κωδικονίου λήξης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, με κατάλληλο μάρτυρα μοριακού βάρους, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω.

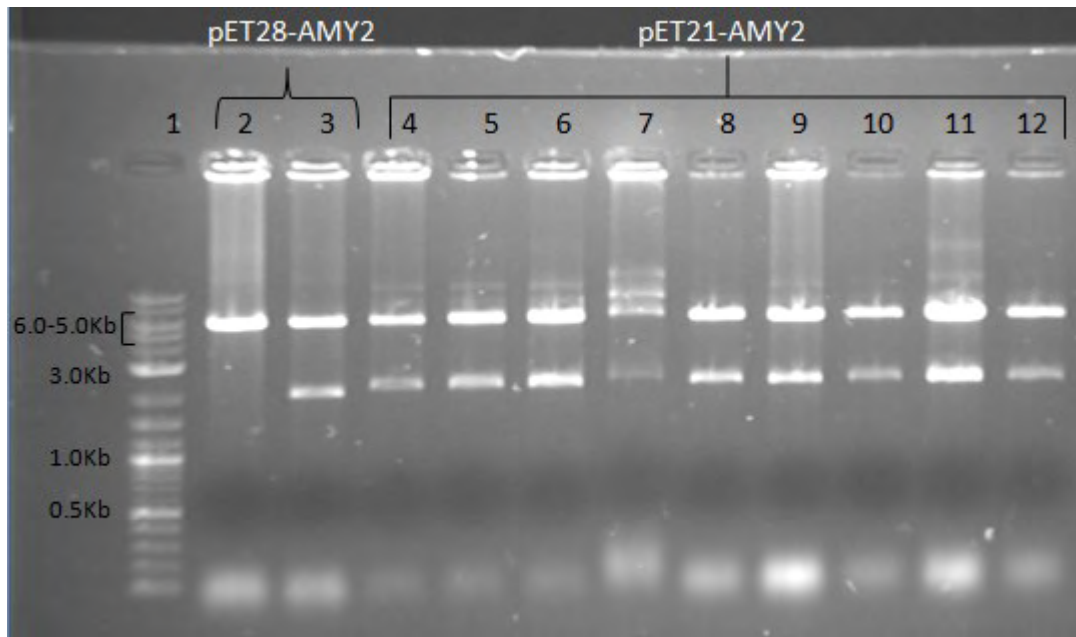


**Εικόνα 1:** Ενίσχυση αλληλουχίας της AMY2 εισάγοντας περιοχές που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα *NheI* και *NotI*, μέσω αντίδρασης PCR. Σειρά 1: αρνητικός μάρτυρας 1, σειρά 2: προϊόν ενίσχυσης της AMY2 με κωδικόνιο λήξης, σειρά 3: αρνητικός μάρτυρας 2, σειρά 4: προϊόν ενίσχυσης της AMY2 χωρίς κωδικόνιο λήξης. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1%.

#### Διαγνωστικές πέψεις στα πλασμίδια *pET21-AMY2* και *pET28-AMY2*

Μετά τις αντιδράσεις λιγάσης μεταξύ του *pET21* και της AMY2 που δεν φέρει κωδικόνιο λήξης (προκειμένου η «ετικέτα ιστιδίνης» να υπάρξει στο καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας) και του *pET28* και της AMY2 που φέρει κωδικόνιο λήξης (προκειμένου η «ετικέτα ιστιδίνης» να υπάρξει στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας), έγινε επιτυχώς ο μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών BL21gold (εξειδικευμένο στέλεχος *E.coli* για κλωνοποίηση και έκφραση πρωτεϊνών). Ακολούθησαν αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων, για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της αλληλουχίας της AMY2 μέσα στους πλασμιδιακούς φορείς *pET21* και *pET28*. Για τα πλασμίδια *pET21-AMY2* έγινε πέψη με το ένζυμο *PstI* και για τα 6 πλασμίδια που απομονώθηκαν από διαφορετικές αποικίες, ενώ για τα πλασμίδια *pET28-AMY2* έγινε πέψη με το ένζυμο *XbaI* και για τα δύο πλασμίδια, που απομονώθηκαν και αυτά από διαφορετικές καλλιέργειες.

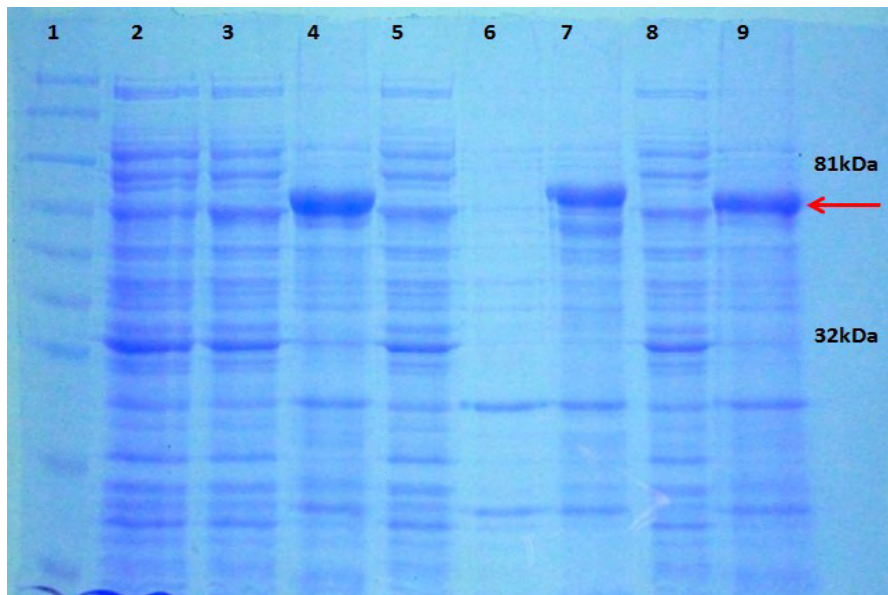
Το αποτέλεσμα των διαγνωστικών πέψεων σε πηκτή αгарόζης έδειξε ότι η αλληλουχία της AMY2, ενσωματώθηκε επιτυχώς, καθώς η πέψη του κάθε πλασμιδίου έδωσε 2 ζώνες στα μεγέθη που περιμέναμε. Η παρουσία της AMY2 στα πλασμίδια *pET21-AMY2* 4 και 6, *pET28-AMY2* 2 καθώς και στο *pGEX-AMY2* επιβεβαιώθηκε και με αλληλούχιση, τα αποτελέσματα της οποίας υπάρχουν στο παράρτημα.



**Εικόνα 2:** Αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων των pET21-AMY2 και pET28-AMY2. Σειρά 1: Μάρτυρας Μοριακού Βάρους, σειρές 2-3: pET28-AMY2 1, pET28-AMY2 2, κόπηκαν με XbaI και έδωσαν τις ζώνες: 5.613bp+1.987bp, σειρές 4-6 : pET21-AMY2 1', 4', 6' κόπηκαν με PstI HF και έδωσαν τις ζώνες: 5.533bp + 2.141bp, σειρές 7-12: pET21-AMY2 1, 2, 3, 4, 5, 6 κόπηκαν με PstI και έδωσαν τις ζώνες: 5.533bp + 2.141bp. Αποτελέσματα σε πηκτή αγαρόζης 1%.

#### *SDS-PAGE μετά από έκφραση και λύση των κυττάρων*

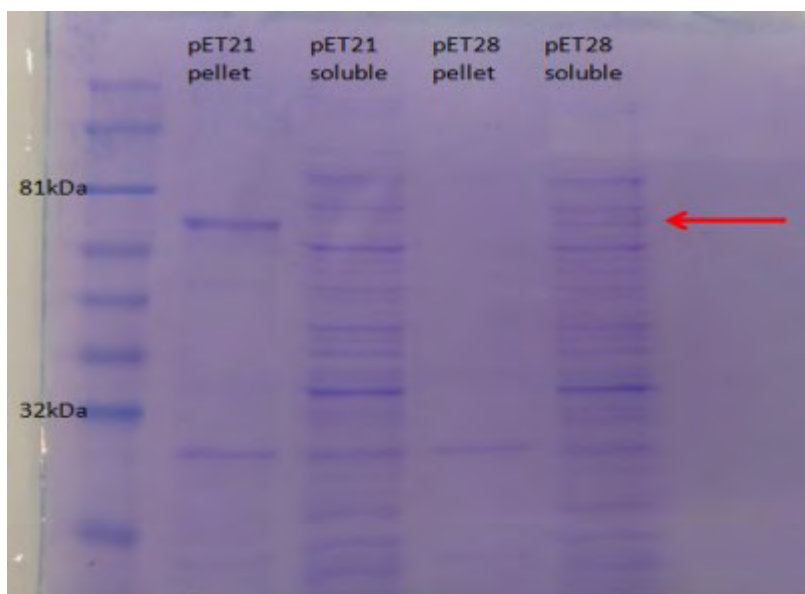
Ελέγχθηκαν τρεις αποικίες (pET21-AMY2 4, pET21-AMY2 6, pET28-AMY2), καθώς και ένα δείγμα control από κύτταρα BL21 gold το οποίο δεν περιείχε την αλληλουχία της AMY2, οι καλλιέργειες των οποίων αναπτύχθηκαν υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση, σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών. Η επαγωγή έγινε για 3 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των βακτηρίων, ενώ το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη λύση των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου πρωτεϊνικού κλάσματος. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, αν και εκφράστηκε σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης, το μεγαλύτερο κλάσμα αυτής ήταν αδιάλυτο και εντοπιζόταν στο ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων που προέκυψαν μετά τη λύση και τη φυγοκέντρωση. Υποθέτουμε πως πρόκειται για την AMY2, καθώς οι ζώνες σχηματίζονται στο αναμενόμενο για την AMY2 μοριακό βάρος (~87kDa).



**Εικόνα 3:** Αποτελέσματα της έκφρασης των πρωτεϊνικών δειγμάτων με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10%, και χρώση με Coomassie blue.. Σειρά 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: control soluble, σειρά 3: pET28+AMY2 soluble, σειρά 4: pET21+AMY2, 4 pellet, σειρά 5: pET21+AMY2, 6 soluble, σειρά 6: control (BL21gold χωρίς αλληλουχία της AMY2) pellet, σειρά 7: pET28+AMY2 pellet, σειρά 8: pET21+AMY2,4 soluble, σειρά 9: pET21+AMY2, 6 pellet. Με το βελάκι, συμβολίζονται οι ζώνες που πιθανώς αντιστοιχούν στην AMY2.

#### *Καλλιέργειες των BL21gold (pET28-AMY2 και pET21-AMY2) σε 800ml LB*

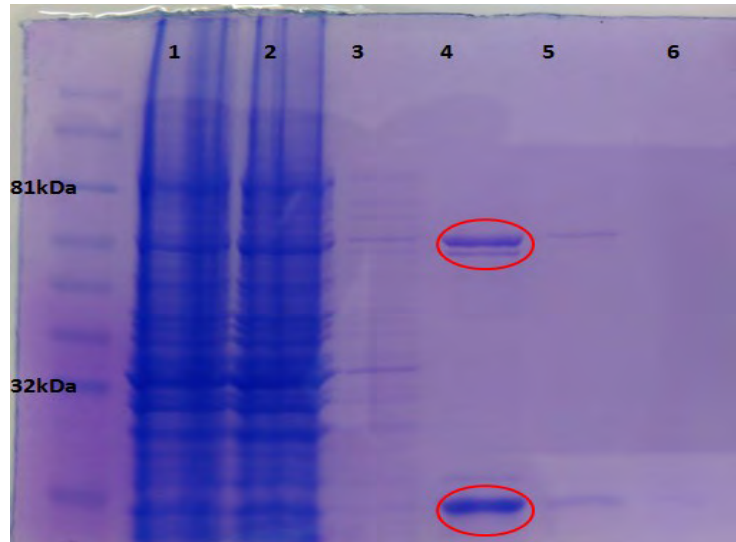
Ελέγχθηκαν δύο αποικίες (pET21-AMY2, pET28-AMY2), οι καλλιέργειες των οποίων αναπτύχθηκαν υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε για 2 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των βακτηρίων, ενώ το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη λύση των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου πρωτεϊνικού κλάσματος. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, όσον αφορά το δείγμα pET28-AMY2 βλέπουμε ότι εκφράστηκε ελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης, το κλάσμα της οποίας ήταν διαλυτό και εντοπιζόταν στο υπερκείμενο των κυτταρικών υπολειμμάτων που προέκυψαν μετά τη λύση και τη φυγοκέντρηση. Από την άλλη όσον αφορά το δείγμα pET21-AMY2, βλέπουμε πως η έκφραση της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο ίζημα, δηλαδή στο μη διαλυτό κλάσμα της φυγοκέντρησης. Υποθέτουμε πως πρόκειται για την AMY2, καθώς οι μπάστες σχηματίζονται στο αναμενόμενο για την AMY2 μοριακό βάρος.



**Εικόνα 4:** Έκφραση AMY2 από καλλιέργειες των 800ml. Αποτελέσματα μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10%. Με το κόκκινο βέλος, δείχνεται η ζώνη που πιθανώς αντιστοιχεί στην AMY2. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% & χρώση με Coomassie blue.

*Έκφραση των δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες*

Ξεκινήσαμε με λύση των κυττάρων (δουλέψαμε μόνο με τα δείγματα pET28-AMY2, τα οποία διατηρήθηκαν από το προηγούμενο πείραμα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , καθώς το προηγούμενο αποτέλεσμα-εικόνα 4 έδειξε πως το δείγμα αυτό είναι διαλυτό) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, με εφαρμογή υπερήχων. Έπειτα, το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε, προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου πρωτεϊνικού κλάσματος. Το διαλυτό κλάσμα διήλθε από στήλη χρωματογραφίας που περιείχε σφαιρίδια ρητίνης πάνω στα οποία ήταν ακινητοποιημένα δισθενή ιόντα νικελίου ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Η έκλυση της προσδεδεμένης στη ρητίνη πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με διάλυμα ιμιδαζολίου. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, του προσδεδεμένου στην ρητίνη κλάσματος και των εκλουσμάτων, με SDS-PAGE. Παρατηρήθηκε ότι, αν και η επαγωγή της έκφρασης έχει επιτευχθεί, φαίνεται πως στα εκλούσματα τα οποία προκύπτουν υπάρχουν δύο ζώνες εκ των οποίων η μία φαίνεται να αντιπροσωπεύει την AMY2 λόγω μοριακού βάρους, αλλά υπάρχει και ακόμα μία ζώνη.

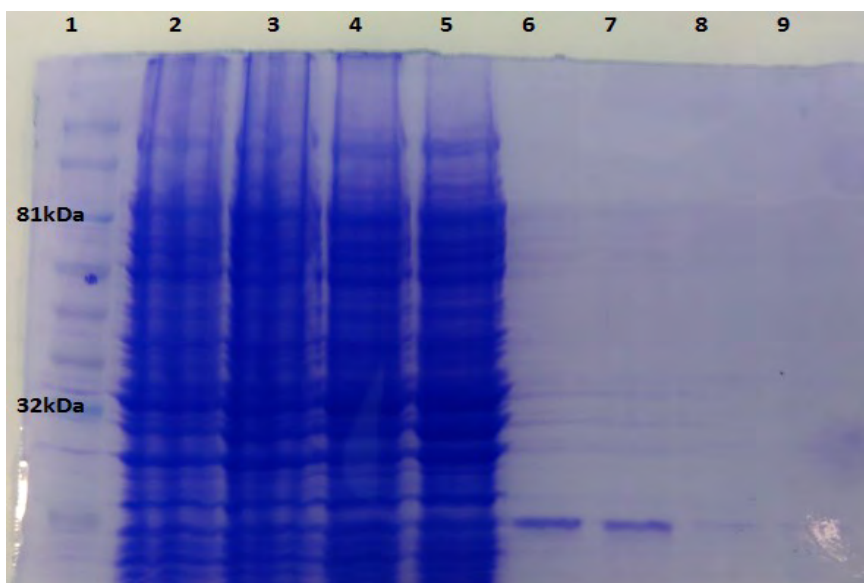


**Εικόνα 5:** Έκφραση του pET28-AMY2 και καθαρισμός μέσω της «ετικέτας» ιστιδίνης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Σειρά1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: soluble, σειρά 3: flowthrough δείγμα που απομακρύνεται μετά την πρόσδεση στη στήλη, σειρά 4: wash δείγμα μετά τη χρήση NPI-20 (πλύση στήλης), σειρές 5,6,7: εκλούσματα μετά τη χρήση NPI-250. Με κύκλο συμβολίζονται οι ζώνες που εμφανίζονται στα δείγματα των εκλουσμάτων. Η πρώτη ζώνη υψηλού μοριακού βάρους θεωρείται πως αντιστοιχεί στην AMY2, ενώ η δεύτερη ζώνη βρίσκεται σε πολύ χαμηλό μοριακό βάρος (γύρω στα 25kDa). Πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% & χρώση με Coomassie blue.

*Έκφραση των δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, μετά από καλλιέργειες των 1600ml*

Δεδομένου ότι το δείγμα του pET28-AMY2 είναι διαλυτό (εικόνα 4) Ελέγχθηκαν δύο αποικίες (pET28-AMY2, pET28 control), οι καλλιέργειες των οποίων αναπτύχθηκαν υπό συνεχή περιστροφική ανάδευση (για 2ώρες), σε υγρό θρεπτικό μέσο 1600ml, ώστε να πετύχουμε καλύτερο αποτέλεσμα της προηγούμενης προσπάθειας (εικόνα 5). Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες όπως περιγράφηκε προηγουμένως και ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, στα εκλούσματα τα οποία προέκυψαν, υπάρχει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που φαίνεται να δεσμεύονται στη στήλη νικελίου τόσο στα δείγματα pET28-AMY2 όσο και στα control κάνοντας αδύνατη και τη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται πως υπάρχει ο σχηματισμός πιο έντονης ζώνης σε χαμηλό μοριακό βάρος, που υπάρχει όμως και στα δείγματα control.

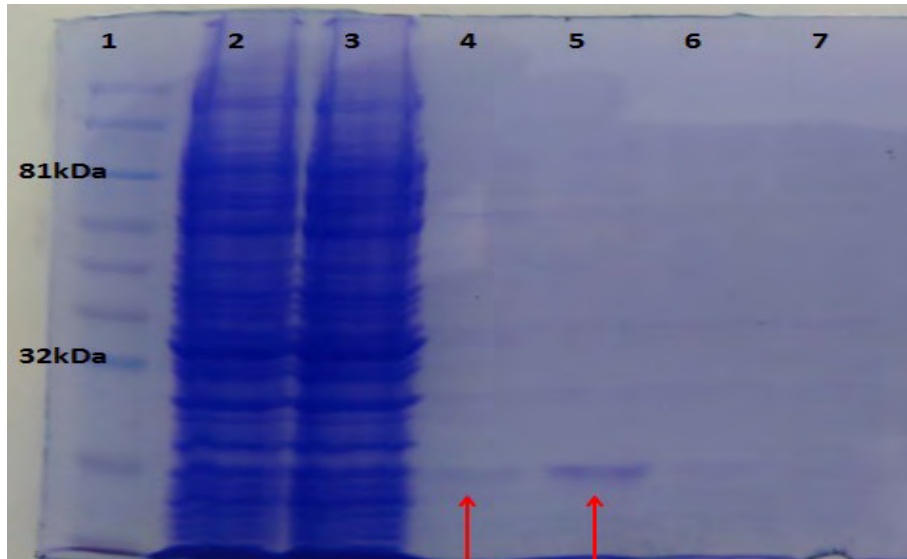




**Εικόνα 6:** ; Έκφραση AMY2 (όπως στην Εικόνα 5 αλλά σε μεγαλύτερη καλλιέργεια κυττάρων) και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Σειρά1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: soluble control, σειρά 3: soluble pET28-AMY2, σειρά 4: flowthrough control, σειρά 5: flowthrough pET28-AMY2, σειρά 6:έκλουσμα 1 control, σειρά 7: έκλουσμα 1 pET28-AMY2, σειρά 8: έκλουσμα 2 control, σειρά 9: έκλουσμα 2 pET28-AMY2. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% & χρώση με Coomassie blue.

*Έκφραση δειγμάτων pET28-AMY2 και καθαρισμός υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (απομόνωση διαφορετικού βακτηριακού κλώνου pET28-AMY2)*

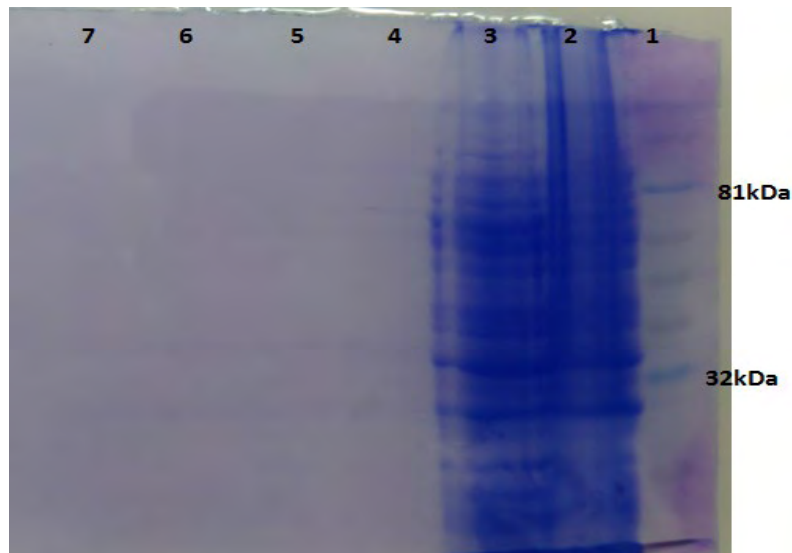
Στο συγκεκριμένο πείραμα, ακολουθήθηκαν ακριβώς τα ίδια βήματα με το προηγούμενο πείραμα, μόνο που αυτή τη φορά, άλλαξε η σύσταση των buffers που χρησιμοποιήθηκαν στον καθαρισμό, ενώ απομονώθηκε διαφορετικός βακτηριακός κλώνος που φέρει τον pET28-AMY2, μήπως και βλέπαμε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης και την διαλυτότητα σε σχέση με τον προηγούμενο κλώνο. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου συγκέντρωσης 10%. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, στα εκλούσματα τα οποία προέκυψαν, φαίνεται η ύπαρξη ζώνης, δηλαδή πρωτεΐνης που δεσμεύεται από τη στήλη νικελίου, σε πολύ χαμηλό όμως μοριακό βάρος, κάτι που δεν μας επιτρέπει να είμαστε βέβαιοι για το αν πρόκειται για την AMY2. Επιπλέον, ένα ακόμα μειονέκτημα είναι η ύπαρξη της ίδιας ζώνης και στο δείγμα που προέκυψε μετά τη χρησιμοποίηση του wash buffer.



**Εικόνα 7:** Αποτελέσματα έκφρασης pET28-AMY2 και καθαρισμού υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (όπως στις Εικόνες 5 και 6 με διαφορετικό βακτηριακό κλώνο). Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: soluble, σειρά 3:flowthrough, σειρά 4: wash, σειρά 5: έκλουσμα 1, σειρά 6: έκλουσμα 2, σειρά 7: έκλουσμα. Με βέλος συμβολίζονται οι ζώνες που προκύπτουν μετά την πλύση (σειρά 4) και μετά τη δέσμευση στη στήλη (σειρά 5). Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% & χρώση με Coomassie blue.

#### *Έκφραση των pET21-AMY2 και καθαρισμός με αποδιατακτικές συνθήκες*

Αφού τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, συνεχίσαμε δουλεύοντας με τα κύτταρα που είχαμε απομονώσει από τις καλλιέργειες των pET21-AMY2 που είχαμε αποθηκεύσει στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , αλλά αυτή τη φορά προκειμένου να βελτιωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επιχειρήθηκε καθαρισμός με αποδιατακτικές συνθήκες. Η επιλογή του pET21-AMY2 (καρβοξυτελικό his tag) έγινε καθώς, έχει εκφραστεί επιτυχώς συνθάση β-αμυρίνης από την *Euphorbia tirucalli* με καρβοξυτελικό his-tag (Ito et al.,2013). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων χαοτροπικών και άλλων αποδιατακτικών παραγόντων όπως είναι η ουρία. Οι παράγοντες αυτοί εμποδίζουν την ανάπτυξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και έτσι συμβάλλουν στην πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά και τη λύση των κυττάρων, έγινε απομόνωση των inclusion bodies, έπειτα η διαλυτοποίησή τους και ακολούθησε ο καθαρισμός με ουρία συγκέντρωσης 8M. Τα αποτελέσματα των εκλουσμάτων δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά αφού δε δεσμεύτηκε καμία πρωτεΐνη.



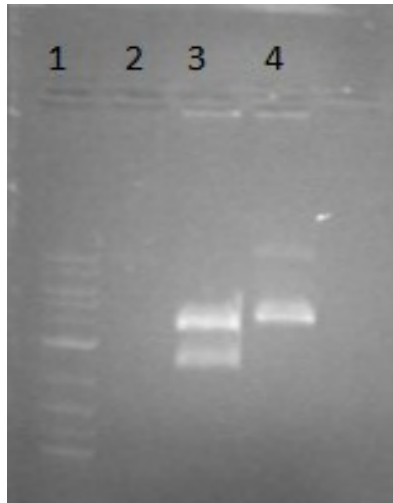
**Εικόνα 8:** Αποτελέσματα του καθαρισμού των PET21-AMY2 υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: soluble, σειρά 3: flowthrough, σειρά 4:wash, σειρές 5,6,7: εκλούσματα. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% & χρώση με Coomassie blue.

### 3.2 Έκφραση ανασυνδυασμένης AMY2 σε *S. cerevisiae*

Μετά την έκφραση σε βακτηριακά κύτταρα, στραφήκαμε στη χρήση στελέχους σακχαρομύκητα GIL77 (έλλειψη συνθάσης λανοστερόλης και συσσώρευση 2,3-οξειδοσκουαλενίου, παροχή εξωγενούς εργοστερόλης, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων), ώστε να προσπαθήσουμε την ετερόλογη έκφραση και σε αυτό το σύστημα, καθώς τόσο η AMY2 (Iturbe-Ormatexe et al.,2003), όσο και η συνθάση β-αμυρίνης από τον οργανισμό *Euphorbia tirucalli* (Ito et al., 2013), εκφράστηκαν επιτυχώς σ' αυτό το στέλεχος, όπως έχει ήδη προαναφερθεί.

*Διαγνωστικές πέψεις, για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του επιθυμητού πλασμιδίου pYES2/NT-B*

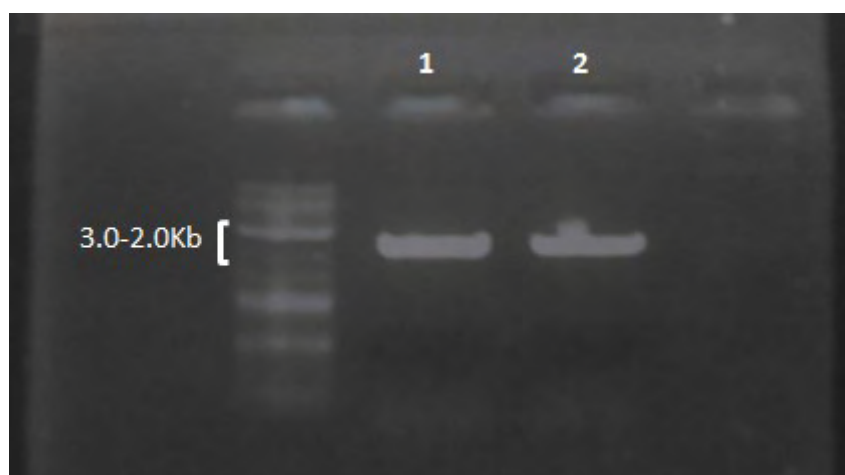
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν έχουμε απομονώσει επιτυχώς το επιθυμητό πλασμίδιο κάναμε διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα PciI και StuI. Οι αναμενόμενες ζώνες, θα έπρεπε να είναι: 2.395bp + 3.644bp για την πέψη με PciI και 780bp + 5.259bp για την πέψη με StuI. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα που επιβεβαίωσαν τις ζώνες που περιμέναμε να δούμε.



**Εικόνα 9:** Αποτελέσματα διαγνωστικών πέψεων για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του επιθυμητού πλασμιδίου pYES2/NT-B (πηκτική αгарόζης 0,8%). Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 3: πέψη με PciI (ζώνες: 2.395bp + 3.644bp), σειρά 4: πέψη με StuI (ζώνες: 780bp + 5.259bp)

#### *Ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης*

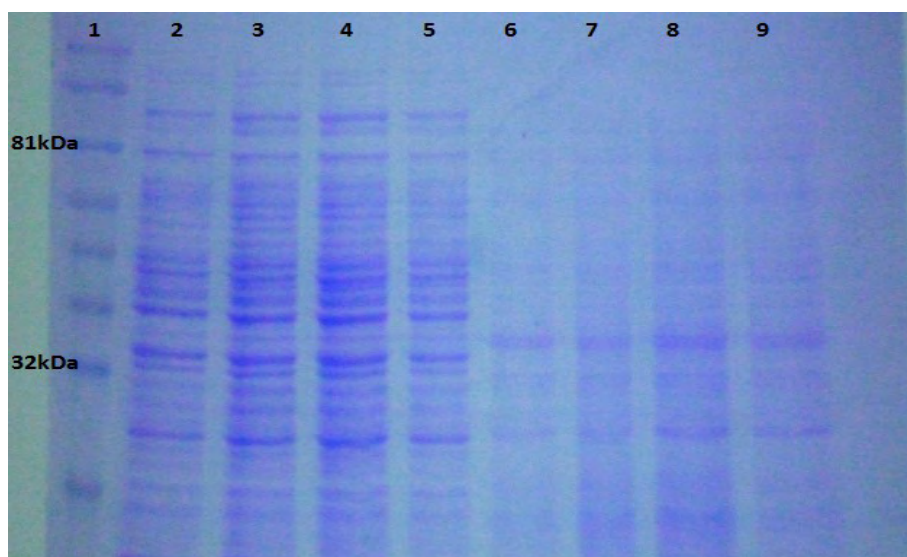
Η αλληλουχία της AMY2 (κλωνοποιημένη στο φορέα pGEX-6P-1), ενισχύθηκε με τις ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NotI μέσω συγκεκριμένων εκκινητών που παρείχθησαν. Χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση με ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών (proofreading). Το πρώτο δείγμα, αντιστοιχεί στην ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τις περιοχές που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και την απουσία κωδικονίου λήξης, ενώ το δεύτερο δείγμα, αντιστοιχεί στην ενίσχυση της αλληλουχίας της AMY2 με τα ίδια ένζυμα και την ύπαρξη κωδικονίου λήξης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των παραγόμενων προϊόντων σε πηκτική αгарόζης, με κατάλληλο μάρτυρα μοριακού βάρους, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω.



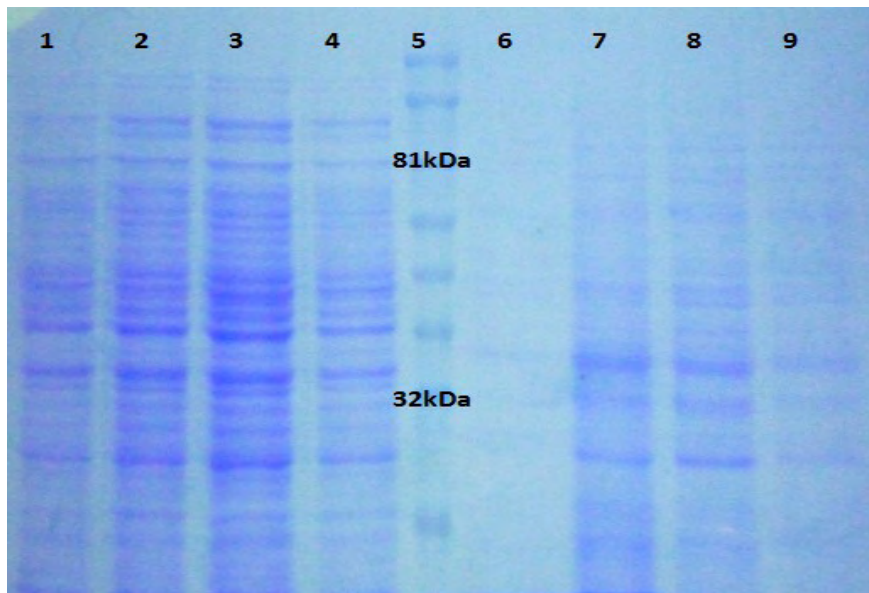
**Εικόνα10:** Ενίσχυση αλληλουχίας της AMY2 με περιοχές που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα KpnI και NotI, μέσω αντίδρασης PCR. Σειρά 1: ενίσχυση της AMY2 χωρίς κωδικόνιο λήξης, σειρά 2: ενίσχυση της AMY2 με κωδικόνιο λήξης. Αποτελέσματα σε πηκτική αгарόζης 0,8%.

## Έκφραση στα κύτταρα ζύμης

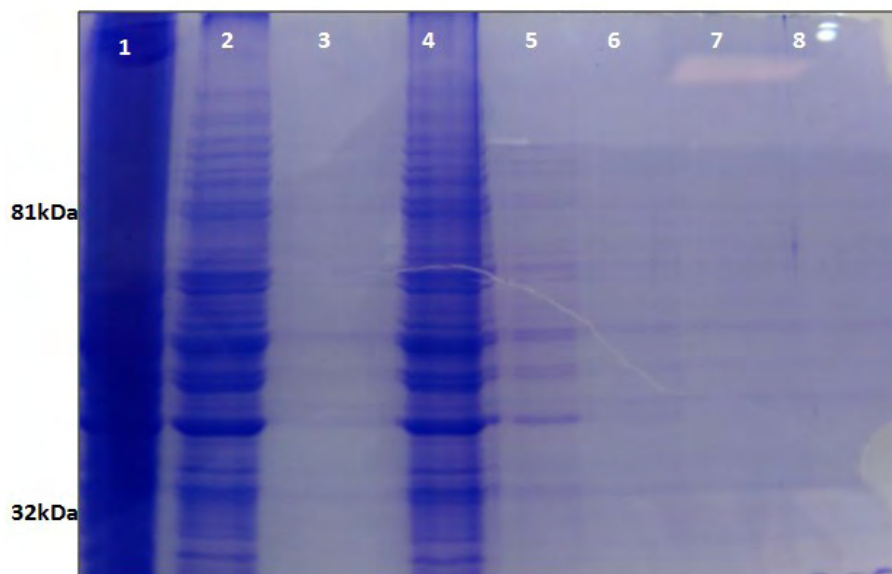
Ελέγχθηκαν δύο αποικίες του pYES-AMY2 C-terminal, καθώς και ένα δείγμα control από κύτταρα GIL77 τα οποία δεν περιείχαν την αλληλουχία της AMY2. Έπειτα ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης και κρατήθηκαν δείγματα σε διαφορετικούς χρόνους, ενώ πραγματοποιήθηκε και λύση των κυττάρων και το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από τη λύση των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου πρωτεϊνικού κλάσματος. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων (υπερκείμενο) της καλλιέργειας, με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στις εικόνες 11 και 12, έχουμε έκφραση πρωτεϊνών, αλλά δε μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την έκφραση συγκεκριμένα της AMY2 καθώς έχουμε την εμφάνιση μεγάλου πλήθους εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Επομένως, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με καθαρισμό μέσω στήλης νικελίου, (βασιζόμενοι σε προηγούμενη έρευνα του Ito et.al., 2013) όπου τα αποτελέσματα του φαίνονται στην εικόνα 13. Τα αποτελέσματα δεν ήταν όμως ικανοποιητικά, καθώς στα εκλούσματα διακρίνουμε ένα εύρος πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στη στήλη.



**Εικόνα 11:** Έκφραση των πρωτεϊνών στα κύτταρα GIL77 σε διαφορετικούς χρόνους από 0 (T<sub>0</sub>) έως 48 ώρες (T<sub>48</sub>) μετά την επαγωγή με γαλακτόζη. Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: T<sub>0</sub> wild type, σειρά 3: T<sub>6</sub> wild type, σειρά 4: T<sub>24</sub> wild type, σειρά 5: T<sub>48</sub> wild type, σειρά 6: T<sub>0</sub> αποικία 1, σειρά 7: T<sub>6</sub> αποικία 1, σειρά 8: T<sub>24</sub> αποικία 1, σειρά 9: T<sub>48</sub> αποικία 1. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% & χρώση με Coomassie blue.



**Εικόνα 12:** Έκφραση των πρωτεϊνών στα κύτταρα GIL77 σε διαφορετικούς χρόνους από 0 (T<sub>0</sub>) έως 48 ώρες (T<sub>48</sub>) μετά την επαγωγή με γαλακτόζη. Σειρά 1: T<sub>0</sub> wild type, σειρά 2: T<sub>6</sub> wild type, σειρά 3: T<sub>24</sub> wild type, σειρά 4: T<sub>48</sub> wild type, σειρά 5: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 6: T<sub>0</sub> αποικία 2, σειρά 7: T<sub>6</sub> αποικία 2, σειρά 8: T<sub>24</sub> αποικία 2, σειρά 9: T<sub>48</sub> αποικία 2. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% & χρώση με Coomassie blue.

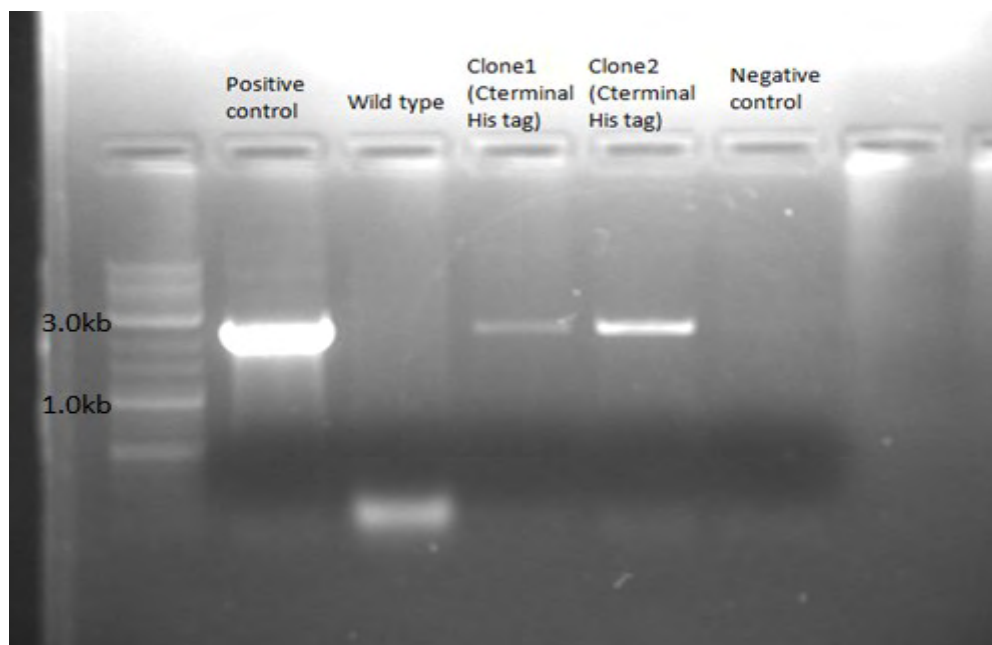


**Εικόνα 13:** Καθαρισμός της AMY2 μέσω στήλης Νικελίου (protino Ni-NTA agarose) από τα κύτταρα GIL77. Σειρά 1: crude, σειρά 2: soluble, σειρά 3: NPI-250, σειρά 4: flowthrough, σειρά 5: wash, σειρές 6,7,8: εκλούσματα 1,2,3. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% & χρώση με coomassie blue.

*Πραγματοποιήθηκε PCR προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν τα κύτταρα ζύμης GIL77 έχουν πραγματικά μετασηματιστεί με το πλασμίδιο pYES-AMY2*

Πραγματοποιήθηκε PCR, σε κλώνους από αποικίες που είχαν μεγαλώσει σε τρυβλία με το ανάλογο θρεπτικό (Clone 1-Cterminal-GIL77/Clone2-Cterminal-GIL77/Wild Type-GIL77) και η αντίδραση έγινε με πολυμεράση με ικανότητα

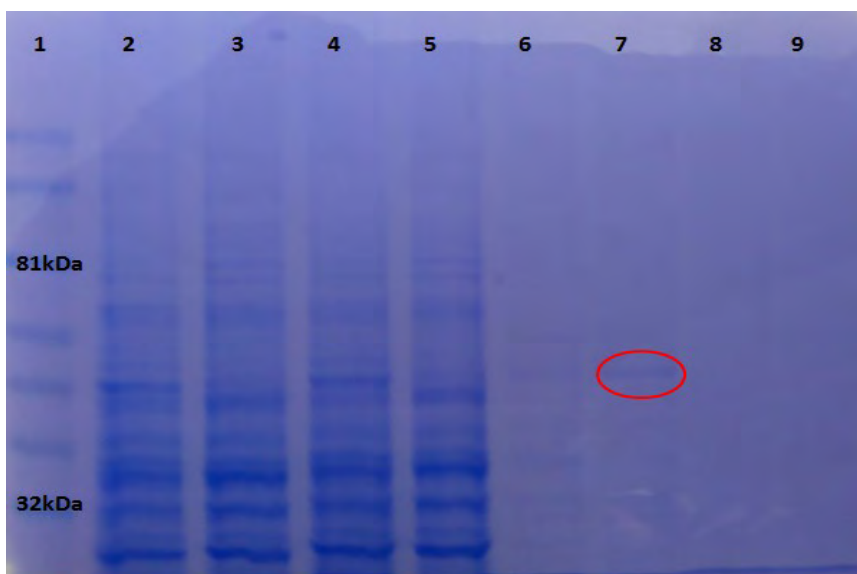
επιδιόρθωσης λαθών (proofreading). Οι εκκινήτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν, βρίσκονται στο παράρτημα. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, καταφέραμε με επιτυχία να μετασχηματίσουμε τα GIL77 με τα επιθυμητά πλασμίδια.



**Εικόνα 14:** Αποτελέσματα PCR για την επιβεβαίωση επιτυχώς μετασχηματισμένων GIL77 με την κατασκευή έκφρασης AMY2. Πηκτή αγαρόζης 1%.

*Καλλιέργειες μετασχηματισμένων GIL77 των 600ml και καθαρισμός μέσω στήλης νικελίου*

Ξεκινήσαμε με καλλιέργειες σε SD θρεπτικό μέσο, των δύο κλώνων του GIL77-AMY2 Cterminal His tag (από stock γλυκερόλης). Ο ένας κλώνος, χρησιμοποιήθηκε ως control καθώς δε μεταφέρθηκε σε γαλακτόζη ώστε να ξεκινήσει η έκφραση και παρέμεινε σε θρεπτικό με γλυκόζη, ενώ ο 2<sup>ος</sup> κλώνος υπέστη επαγωγή καθώς μεταφέρθηκε σε θρεπτικό με γαλακτόζη. Μετά λοιπόν από επαγωγή της έκφρασης έγιναν πλύσεις των κυττάρων με PBS και λύση με υπερήχους, ακολούθησε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προς καθαρισμό με στήλη νικελίου. Η ανάλυση των δειγμάτων, έγινε με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, διακρίνουμε το σχηματισμό ζώνης και την ύπαρξη δηλαδή πρωτεΐνης σε μικρή ποσότητα και σε χαμηλό μοριακό βάρος στα επαγόμενα από γαλακτόζη δείγματα, ενώ στα μη επαγόμενα δείγματα δε διακρίνουμε κάποια ζώνη στις συγκεκριμένες θέσεις. Επίσης, στα εκλούσματα ξανά διακρίνεται ένα εύρος πρωτεϊνών που φαίνεται να δεσμεύονται στη στήλη.

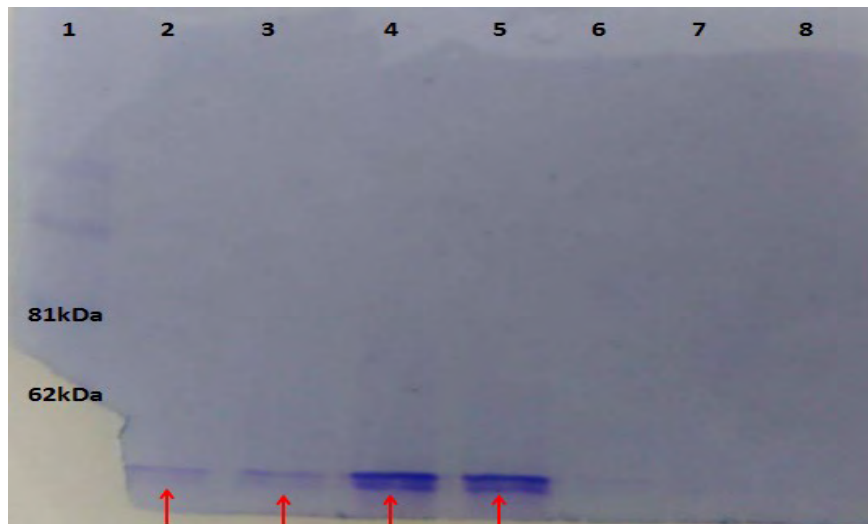


**Εικόνα 15:** Αποτελέσματα έκφρασης των κυττάρων GIL77-AMY2 C-terminal His-tag από καλλιέργειες των 600ml και μετέπειτα καθαρισμού μέσω στήλης νικελίου. Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2:soluble induced, σειρά 3: soluble repressed, σειρά 4:unbound induced, σειρά 5: unbound repressed, (unbound δείγματα είναι αυτά τα οποία δε δεσμεύτηκαν στη στήλη), σειρά 6: elution 1 repressed, σειρά 7:elution 1 induced, σειρά 8: elution 2 repressed, σειρά 9: elution 2 induced. Με κύκλο, συμβολίζεται η ζώνη που διακρίνεται στο πρώτο επαγόμενο έκλουσμα. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% & χρώση με Coomassie blue.

*Καλλιέργειες μετασχηματισμένων GIL77 των 1000ml και καθαρισμός μέσω στήλης νικελίου*

Ξεκινήσαμε με καλλιέργειες σε SD θρεπτικό μέσο, των δύο κλώνων του Cterminal His tag (από stock γλυκερόλης) και ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη προσπάθεια. Η ανάλυση των δειγμάτων, έγινε με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, δε διακρίνουμε το σχηματισμό ζώνης και την ύπαρξη δηλαδή πρωτεΐνης στα εκλούσματα στα επαγόμενα από γαλακτόζη δείγματα, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα διακρίνονται ζώνες σε πολύ χαμηλό μοριακό βάρος τόσο στα επαγόμενα δείγματα, όσο και στα μη επαγόμενα.

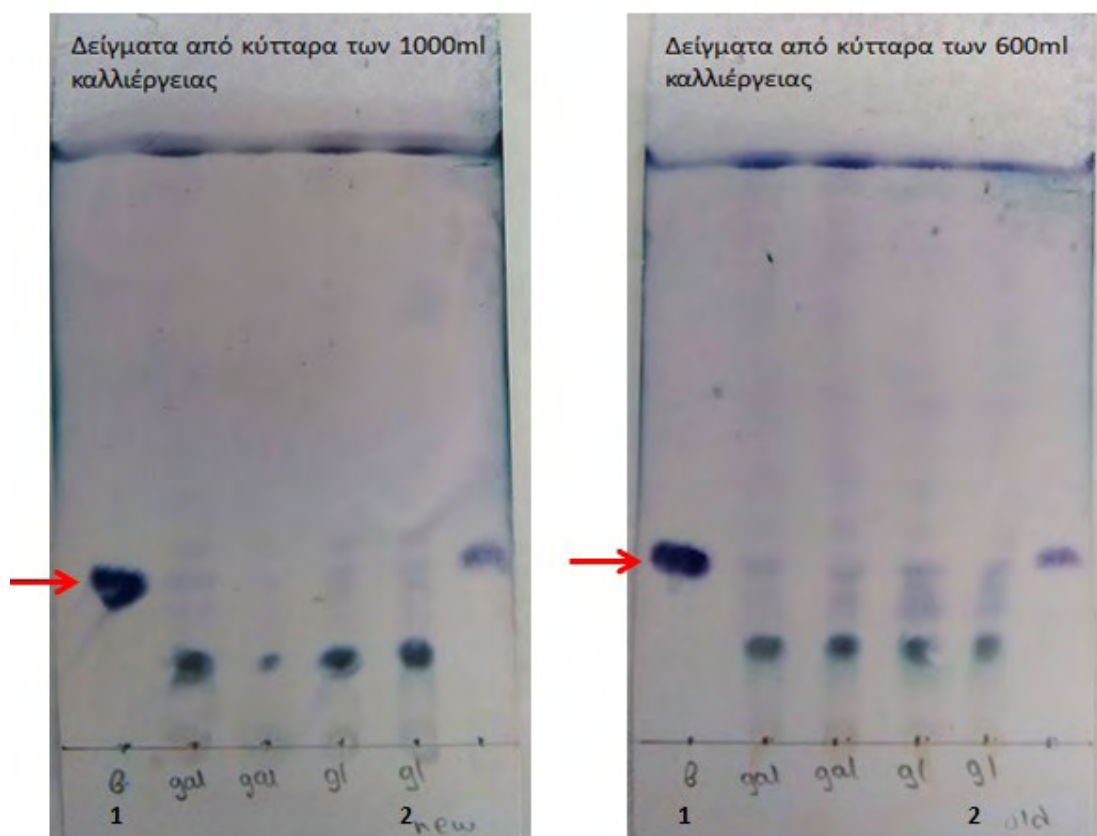




**Εικόνα 16:** Αποτελέσματα έκφρασης των κυττάρων από καλλιέργειες των 1000ml και μετέπειτα καθαρισμού μέσω στήλης νικελίου. Σειρά 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, σειρά 2: repressed soluble, σειρά 3: induced soluble, σειρά 4: repressed flowthrough, σειρά 5: induced flowthrough, σειρά 6: repressed elution 1, σειρά 7: induced elution 1, σειρά 8: induced elution 2. Με τα βέλη, υποδεικνύονται οι ζώνες που έχουν προκύψει στα δείγματα soluble και flowthrough. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% & χρώση με Coomassie blue.

*Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC) στα δείγματα των 600ml και των 1000ml καλλιέργειας*

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μεταβολιτών από τα κύτταρα τα οποία είχαμε κρατήσει (τόσο των καλλιεργειών των 600ml, όσο και των 1000ml). Μικρή σταγόνα του διαλύματος που περιέχει το δείγμα εφαρμόστηκε σε μια πλάκα, ενώ μικρή ποσότητα hexane και ethyl acetate σε αναλογία 9:1 χύθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως σε ένα βάθος λιγότερο από 1 εκατοστό. Αφού οι πλάκες ετοιμάστηκαν, στη συνέχεια έγινε χρώση με διάλυμα p-anisaldehyde 100μl, sulphuric acid 100μl και acetic acid 4,8ml, προκειμένου να εντοπιστούν οι επιθυμητές ζώνες-κουκκίδες. Στα παρακάτω αποτελέσματα, γίνεται σύγκριση των παραγόμενων μεταβολιτών με τη β-αμυρίνη (control σε διαφορετικές συγκεντρώσεις), δε διακρίνεται όμως καμία διαφορά στο περιεχόμενο των μεταβολιτών στις επαγόμενες/μη-επαγόμενες καλλιέργειες.



**Εικόνες 17,18:** Αποτελέσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος. Η πρώτη εικόνα αφορά τα δείγματα που προέκυψαν από τα κύτταρα των 1000ml καλλιέργειας, ενώ η δεύτερη εικόνα, αφορά τις καλλιέργειες των 600ml. Τα 1 και 2 και στις δύο εικόνες, αφορούν τα δείγματα control (1:καθαρή β-αμυρίνη, 2: καθαρή β-αμυρίνη σε αραιώση 1:100), ενώ τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες β-αμυρίνης που σχηματίζονται. Τα δείγματα gal (γαλακτόζη) ανήκουν στα δείγματα που προέκυψαν από τις επαγόμενες καλλιέργειες, ενώ τα δείγματα gl (γλυκόζη), ανήκουν σε αυτά που προέκυψαν από τις μη επαγόμενες καλλιέργειες των κυττάρων GIL77.

## 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τα τριτερπένια αποτελούν ένα μεγάλο σύνολο μορίων με διαφορετική δομή και λειτουργία. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον 83 διαφορετικά τριτερπένια που είναι πιθανό να δημιουργηθούν μέσω ενζυματικής κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου και είναι σαφές ότι περισσότερες συνθέσεις τριτερπενίων με διαφορετικές ιδιαιτερότητες, θα κλωνοποιηθούν και θα χαρακτηρισθούν στο μέλλον.

Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 40 OSC ένζυμα έχουν χαρακτηρισθεί από διάφορα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των συνθασών α- και β-αμυρίνης, λουπεόλης, και στερόλης. Οι κρυσταλλικές δομές των περισσότερων συνθασών στερολών και τριτερπενίων δεν είναι ακόμη διαθέσιμες. Ωστόσο, οι δομές δύο άλλων

σχετικών ενζύμων-SHC από το βακτήριο *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Reinert et al., 2004 – Wendt et al., 1997, 1999) και της ανθρώπινης συνθάσης λανοστερόλης (LAS) (Thoma et al., 2004) έχουν βρεθεί.

Προηγουμένως, η AMY2 παρουσιάστηκε ως ένα πολυ-λειτουργικό ένζυμο κυκλοποίησης του οξειδοσκουαλενίου, επειδή παράγει τόσο β-αμυρίνη, όσο και λουπεόλη όταν εκφράζεται ετερόλογα σε ζυμομύκητα (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003). Σε φύλλα *N. benthamiana*, η AMY2 παράγει β-αμυρίνη και πολύ πιθανόν διϋδρολουπεόλη (Krokida et al., 2013).

Η λειτουργία ενός από τα γονίδια που κωδικοποιούν OSCs στο *L. japonicus*, του OSC3, το οποίο κωδικοποιεί λουπεόλη, έχει επίσης χαρακτηριστεί (Delis et al., 2011). Η απομόνωση της AMY2 από τους ιστούς που την εκφράζουν φυσιολογικά είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς οι OSCs παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στη δομή τους και δε θα μπορούσε να διαχωριστεί από τις υπόλοιπες (Haralampidis et al., 2002, Sawai et al., 2006). Επίσης, κάτι τέτοιο θα ήταν δύσκολο γιατί εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και είναι δύσκολο να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα ιστών που να την εκφράζουν (κυρίως ρίζες) που να επιτρέπει την απομόνωση AMY2 σε σημαντικές/ανιχνεύσιμες ποσότητες.

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία έγινε προσπάθεια έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης AMY2 και μετέπειτα καθαρισμού της με στήλη νικελίου, τόσο σε προκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, όσο και σε ευκαρυωτικά συστήματα. Προηγουμένως είχαν γίνει εκτεταμένες/επίμονες/επανηλημένες και ανεπιτυχείς προσπάθειες έκφρασής της με ετικέτα Glutathione S-transferase (GST). (Krokida & Garagounis unpublished)

Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα επιχειρήθηκε απομόνωση ανασυνδυασμένης AMY2 από δύο ετερόλογα συστήματα έκφρασης, *E. coli* και ζυμομύκητα (*S. cerevisiae*). Αρχικά, επιχειρήθηκε η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, συντηγμένης με His tag, τόσο στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο (κλωνοποιημένη σε διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς) σε κύτταρα *E. coli*. Επιβεβαιώνοντας, την επιτυχή κλωνοποίηση μέσω διαγνωστικών περιοριστικών πέψεων και τον επιτυχημένο μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων, προχωρήσαμε σε καλλιέργειες κυττάρων. Αρχικά, η πρώτη προσπάθεια της έκφρασης, έγινε με επαγωγή μέσω IPTG, ενώ αργότερα ακολούθησε η λύση των κυττάρων και η φυγοκέντρηση του κυτταρικού εκχυλίσματος ώστε να διαχωριστεί διαλυτό (υπερκείμενο) και αδιάλυτο (ίζημα) κλάσμα. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (εικόνα 3), έδειξε πως εκφράστηκε σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης και κρίνοντας από το μοριακό βάρος στο οποίο εμφανίζονται οι πιο έντονες ζώνες υποθέτουμε πως πρόκειται για την AMY2. Το μεγαλύτερο κλάσμα αυτής παρουσιάζεται αδιάλυτο και εντοπίζεται στο ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων που προέκυψαν μετά τη λύση και τη φυγοκέντρηση. Οι παρατηρήσεις γίνονται με βάση τα δείγματα control στα οποία δεν υπάρχει εκφραζόμενη AMY2,

επομένως συγκρίνοντας τα δείγματα control του ιζήματος και των υπόλοιπων δειγμάτων ιζήματος, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η ζώνη η οποία εμφανίζεται στα υπόλοιπα δείγματα εκτός του αρνητικού μάρτυρα (control-κύτταρα BL21gold χωρίς να έχουν μετασηματιστεί με την αλληλουχία της AMY2) αφορά την AMY2. Σκεπτόμενοι με τον ίδιο τρόπο και για τα διαλυτά (soluble) δείγματα, καταλήγουμε στην παρατήρηση πως, όλες οι ζώνες συμπεριλαμβανομένου και του control soluble παρουσιάζονται κοινές σε όλα τα δείγματα κάτι που λειτουργεί ως ένδειξη απουσίας διαλυτής AMY2.

Τα αποτελέσματα αυτά, συμβαδίζουν με προηγούμενες ερευνητικές προσεγγίσεις. Αδυναμία έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης (αναμενόμενο 87 kD χωρίς ετικέτα), η οποία δύσκολα εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα καθώς και η αδυναμία έκφρασης συγκεκριμένων, σπάνιων κωδικονίων από τα κύτταρα E.coli (Schlegel et al., 2010-Seddon et al., 2004, Sorensen et al., 2005). Σκοπός της έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης είναι η συσσώρευση του διαλυτού προϊόντος στο βακτηριακό κύτταρο. Αυτή η στρατηγική δεν είναι πάντα αποδεκτή όμως, από το κύτταρο-ξενιστή και πολλές φορές φορές μπορεί να έχουμε και το αντίθετο αποτέλεσμα, όπως η συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων της ετερόλογης πρωτεΐνης, γνωστά ως "inclusion bodies". Αυτές οι πρωτεΐνες είναι γενικότερα μη σωστά αναδιπλωμένες και βιολογικά ανενεργές. Έτσι, η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω E. coli συχνά, μπορεί να καταλήξει σε αδιάλυτη ή και μη λειτουργική πρωτεΐνη (Sorensen et al, 2005). Επιπλέον, όσον αφορά την AMY2, μετά από in silico ανάλυση, είναι πως η πρωτεΐνη είναι σχετικά υδρόφοβη και ασταθής όταν εκφράζεται σ'ετερόλογα συστήματα. Αυτό είναι λογικό, δεδομένης της πιθανής φυσιολογικής έκφρασης της AMY2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) των φυτικών κυττάρων. Θεωρητική πρόβλεψη προτείνει ότι η AMY2 έχει μέγιστη πιθανότητα να στοχεύεται στο ΕΔ, πράγμα που συνάδει και με την υδρόφοβη φύση του υποστρώματος/ων και των προϊόντων της. Είναι επίσης γνωστό ότι πολλά ένζυμα βιοσύνθεσης υδρόφοβων δευτερογενών μεταβολιτών εκφράζονται στο ΕΔ (Moller et al., 1980, 2010, Hrazdina et al., 1985), οπότε το να είναι η AMY2 υδρόφοβη και συνεπώς ασταθής σε προκαρυωτικό οργανισμό είναι εν μέρει αναμενόμενο.

Στη συνέχεια, προκειμένου να ελαττωθεί η συσσώρευση αδιάλυτης AMY2 (σε inclusion bodies) έγινε επαγωγή της AMY2 για λιγότερη ώρα, ώστε να συσσωρευθεί λιγότερη πρωτεΐνη κι ενδεχομένως να παραμείνει διαλυτή. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (εικόνα 4). Η ανάλυση των δειγμάτων αυτήν τη φορά απέδωσε διαλυτή πρωτεΐνη αν και σε ελάχιστη ποσότητα και μόνο από το δείγμα του pET28-AMY2 Nterminal his tag. Το κλάσμα του συγκεκριμένου δείγματος ήταν διαλυτό και εντοπιζόταν στο υπερκείμενο των κυτταρικών υπολειμμάτων που προέκυψαν μετά τη λύση και τη φυγοκέντρηση. Η έκφραση της πρωτεΐνης του δείγματος pET21-AMY2 Cterminal His tag, εντοπίζεται στο ιζήμα, δηλαδή στο μη διαλυτό κλάσμα της φυγοκέντρησης. Τόσο με σύγκριση των δειγμάτων του ιζήματος και του υπερκειμένου, καθώς και λόγω ύπαρξης της ζώνης στο

συγκεκριμένο αναμενόμενο μοριακό βάρος, υποθέτουμε πως πρόκειται για την AMY2.

Γενικότερα, σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός πως πολλές φορές είναι δυνατόν να προκύψει η ύπαρξη ζώνης σε χαμηλότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο, για την επιθυμητή πρωτεΐνη, κάτι το οποίο δεν είναι ασυνήθιστο, καθώς σύμφωνα με τον Ito (2013), αυτό μπορεί να συμβεί και να προκύψει μία διαφορά μεταξύ 10-30% ανάμεσα σε θεωρητικό μοριακό βάρος και σε αυτό που παρατηρείται.

Παίρνοντας λοιπόν διαλυτή πρωτεΐνη, μόνο όμως από το δείγμα pET28-AMY2 Nterminal his tag (έστω και ελάχιστη ποσότητα αυτής), οδηγούμαστε στο επόμενο βήμα, του καθαρισμού της μέσω στήλης νικελίου (υπό ήπιες συνθήκες), εκμεταλλευόμενοι το γεγονός σύντηξης της αλληλουχίας της AMY2 με την ετικέτα ιστιδίνης, περιμένοντας πως το His tag θα δεσμευτεί με τη στήλη καταφέροντας έτσι να δούμε την πρωτεΐνη στα εκλούσματα που θα προκύψουν. Μετα λοιπόν από την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, παρατηρήθηκε ότι, αν και η επαγωγή της έκφρασης έχει επιτευχθεί, στα δείγματα των εκλουσμάτων υπάρχουν δύο ζώνες εκ των οποίων η μία φαίνεται να αντιπροσωπεύει την AMY2 λόγω μοριακού βάρους αλλά υπάρχει και ακόμα μία ζώνη η οποία είτε αποτελεί θραύσμα της πρώτης, είτε πρόκειται για κάποια ενδογενώς εκφραζόμενη πρωτεΐνη (γύρω στα 25 kDa) που φέρει μικρή επανάληψη ιστιδινών (2-3 στη σειρά) ή παρουσιάζει συγγένεια για νικέλιο/δισθενή κατιόντα και δεσμεύεται επίσης στη στήλη νικελίου. Πολύ πιθανόν να έχει δράσει και κάποια πρωτεάση γι' αυτό και στο επόμενο βήμα αποφασίσαμε να προσθέσουμε αναστολέα πρωτεασών και στο wash buffer του καθαρισμού. Επίσης, Triton-X100 και DTT, που βοηθούν (μειώνοντας της υδροφοβικές και δισουλφιδικές αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα) στην απομάκρυνση πρωτεϊνών μη-ειδικά δεσμευμένων στην στήλη νικελίου προστέθηκαν στο wash buffer για την πλύση της στήλης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και διπλάσια συγκέντρωση μιδαζολίου για την προετοιμασία του διαλύματος πλύσης.

Επομένως, καταφέραμε να πάρουμε πρωτεΐνη που δεσμεύεται στη στήλη (με χαμηλότερο όμως MB από το αναμενόμενο) αλλά για ν' αυξηθεί η ποσότητα που απομονώθηκε με τον παραπάνω τρόπο, αλλά και να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου καθαρισμού έγινε έκφραση της AMY2 με τις ίδιες συνθήκες σε διπλάσιο όγκο καλλιέργειας (Nterminal-His-AMY2). Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός υπό ήπιες συνθήκες όπως περιγράφηκε προηγουμένως και ανάλυση των δειγμάτων της καλλιέργειας, με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (εικόνα6). Στα εκλούσματα τα οποία προέκυψαν, υπάρχει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που φαίνεται να δεσμεύονται στη στήλη νικελίου τόσο στα δείγματα pET28-AMY2 όσο και στα control κάνοντας αδύνατη και τη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται πως υπάρχει ο σχηματισμός πιο έντονης ζώνης σε χαμηλό μοριακό βάρος, που υπάρχει όμως και στα δείγματα control. Επομένως, πολύ πιθανόν η AMY2 να μην εκφράστηκε επιτυχώς ή να ήταν πάλι

αδιάλυτη. Επιπλέον, αφού η 2<sup>η</sup> ζώνη είναι και στο μάρτυρα, προφανώς πρόκειται για ενδογενή πρωτεΐνη του *E. coli* και δεν είναι πρωτεολυτικό θραύσμα.

Για να ελεγχθεί πιθανή διαφορά στην έκφραση διαλυτής AMY2 από διαφορετικούς κλώνους που φέρουν την ίδια κατασκευή έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός κλώνος από την πρώτη προσπάθεια καθαρισμού μέσω στήλης νικελίου. Επαναλάβαμε ξανά το πείραμα υπό τις ίδιες προηγούμενες συνθήκες, παρατηρώντας αυτή τη φορά στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης (εικόνα 7), πως στα εκλούσματα τα οποία προέκυψαν, φαίνεται η ύπαρξη της ίδιας ζώνης (με τα προηγούμενα δύο αποτελέσματα), πρωτεΐνης που δεσμεύεται από τη στήλη νικελίου, σε πολύ χαμηλό μοριακό βάρος. Μαζί με την προηγούμενη παρατήρηση, ότι η ζώνη αυτή εκφράζεται και σε καλλιέργεια αρνητικού μάρτυρα, συμπεραίνεται ότι αυτή η ζώνη χαμηλού μοριακού βάρους δεν πρόκειται για πρωτεολυτικό θραύσμα της AMY2, αλλά για ενδογενή πρωτεΐνη του *E. coli* με συγγένεια για τη στήλη νικελίου. Η υψηλή συγγένεια για τη στήλη νικελίου είναι προφανής αφού η ζώνη αυτή δεν απομακρύνεται έπειτα από πλύση της στήλης με αυστηρές συνθήκες (υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου).

Εν τέλη, χωρίς ικανοποιητικό αποτέλεσμα, στρέψαμε την προσοχή μας πίσω στα δείγματα pET21-AMY2, (Cterminal-His tag) στα οποία η λύση των κυττάρων ακολουθήθηκε από καθαρισμό με αποδιατακτικές συνθήκες, όπου θα περιμέναμε σίγουρα να απομονώσουμε διαλυτή πρωτεΐνη. Στην προκειμένη περίπτωση, η αλληλεπίδραση της στήλης με την ετικέτα πολυιστιδίνης δεν απαιτεί ειδική διαμόρφωση της ετικέτας πεπτιδίου (his tag)- είναι λειτουργική ανεξάρτητα της τριτοταγούς της δομής, γεγονός που καθιστά δυνατό τον αποτελεσματικό καθαρισμό με τη χρήση συνθηκών αποδιάταξης. Ο καθαρισμός υπό συνθήκες αποδιάταξης, μπορεί να καταστείλει τη δραστηριότητα των φωσφατασών και των πρωτεολυτικών ενζύμων. Γίνεται χρήση ουρίας ως μετουσιωτής, ενώ τα κύτταρα διαταράσσονται χρησιμοποιώντας λυσοζύμη μαζί με κατεργασία με υπερήχους. Παρ'όλα αυτά μετά από την ηλεκτροφόρηση με SDS-PAGE, δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη στα δείγματα των εκλουσμάτων, με επακόλουθο συμπέρασμα πως καμία πρωτεΐνη δεν κατάφερε να δεσμευτεί στη στήλη νικελίου.

Εφ' όσον δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση διαλυτής πρωτεΐνης επανειλημμένα από *E. coli*, επιχειρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης αυτή τη φορά σε ευκαρυωτικά κύτταρα ζύμης (στελέχη GIL77), γνωρίζοντας πως μπορούν να αποτελέσουν αποτελεσματικούς ξενιστές για ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Iturbe-ormaetxe et al., 2003, Ito et al. 2013). Χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα pYES2/NT-B (όπως προαναφέρθηκε, ο φορέας αυτός φέρει την ετικέτα ιστιδίνης, ενώ η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου επιτυγχάνεται μέσω του GAL1 προαγωγέα) και το προϊόν ενίσχυσης της αλληλουχίας της AMY2, έγινε επιτυχής αντίδραση λιγάσης και ακολούθησε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του στελέχους GIL77 (κατάλληλα στελέχη σακχαρομύκητα, έλλειψη συνθάσης λανοστερόλης και συσώρευση 2,3-οξειδοσκουαλενίου). Στηριζόμενοι στη ρύθμιση

της έκφρασης του GAL1 promoter και χρησιμοποιώντας ως καταστολέα του υποκινητή τη γλυκόζη (ισχυρή καταστολή του μεταβολισμού της γαλακτόζης), ενώ ως επαγωγή τη γαλακτόζη, επιτεύχθηκε η επαγωγή της έκφρασης, της αλληλουχίας του πλασμιδίου. Μετά την επαγωγή της έκφρασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους, για να δούμε εάν επάγεται η έκφραση κάποιας πρωτεΐνης και ακολούθησε η λύση τους. Μετά το διαχωρισμό διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων (υπερκείμενο) της καλλιέργειας, με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (εικόνες 11 και 12). Παρατηρήθηκε λοιπόν έκφραση πρωτεϊνών στους διαφορετικούς χρόνους συλλογής των δειγμάτων, αλλά δε μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την έκφραση συγκεκριμένα της AMY2, καθώς και στις δύο εικόνες, υπάρχει ένα μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών που εκφράζονται. Σε περίπτωση που διακρίναμε κάποια ζώνη, η οποία όμως δεν υπάρχει και στα δείγματα αγρίου τύπου (κύτταρα χωρίς να είναι μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο που φέρει την AMY2) και που βρίσκεται κοντά στο αναμενόμενο για την AMY2 μοριακό βάρος, θα μπορούσαμε να πούμε πως πρόκειται γι'αυτήν. Κάτι τέτοιο όμως δε συμβαίνει σε αυτήν την περίπτωση. Επομένως, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με καθαρισμό μέσω στήλης νικελίου, (βασισμένοι σε προηγούμενη έρευνα του Ito et.al., 2013, κατά την οποία απομονώθηκε επιτυχώς συνθάση β-αμυρίνης από τον οργανισμό *Euphorbia tirucalli* μέσω του καρβοξυτελικού his-tag που έφερε στην αλληλουχία του πλασμιδίου όπου είχε κλωνοποιηθεί το γονίδιο που την κωδικοποιεί) περιμένοντας στα δείγματα των εκλουσμάτων να παρατηρήσουμε μία και μοναδική ζώνη, αυτή δηλαδή της AMY2 μέσω του His tag που της προστέθηκε απο την κασέτα έκφρασης του πλασμιδίου. Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα δεν ήταν αυτά που περιμέναμε, καθώς στα εκλούσματα διακρίνουμε με πολύ αγνές ζώνες, ένα εύρος πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στη στήλη. Το στέλεχος GIL77, δεν είναι σχεδιασμένο για υπερέκφραση πρωτεϊνών, αλλά για απλή ετερόλογη έκφραση κυκλασών οξειδοσκουαλενίου, επομένως, πολύ πιθανόν να υπάρχει έκφραση αλλά σε μικρές ποσότητες, κάτι το οποίο δε μπορεί να γίνει ορατό μέσω της εικόνας 13. Επίσης, πολύ πιθανόν, ο χρόνος επαγωγής να μην ήταν αρκετός προκειμένου να συσσωρευτεί μεγάλη ποσότητα της AMY2.

Προκειμένου να λυθεί το προηγούμενο πρόβλημα, κάναμε καλλιέργειες (σε μεγαλύτερη κλίμακα) και ακολούθησαν πλύσεις των κυττάρων με PBS για να ξεπλυθούν τα υπολείμματα γλυκόζης, ενώ μετέπειτα προστέθηκε γαλακτόζη για την επαγωγή της έκφρασης. Μετά τη λύση με υπερήχους και γάλανα σφαιρίδια, ακολούθησε φυγοκέντρωση και το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με στήλη νικελίου. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων, με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (εικόνα 15). Τα δείγματα στα οποία έγινε επαγωγή της έκφρασης (induced), συγκρίθηκαν με τα δείγματα εκείνα στα οποία δεν προστέθηκε γαλακτόζη και καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη (repressed). Ελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης φαίνεται να έχει εκφραστεί στα επαγόμενα από γαλακτόζη εκλούσματα που προέκυψαν μετά τον καθαρισμό, διακρίνεται όμως σε χαμηλό

μοριακό βάρος. Από την άλλη αντίστοιχα, στα μη επαγόμενα δείγματα δε διακρίνουμε κάποια ζώνη στη συγκεκριμένη θέση, χωρίς ωστόσο να είμαστε σίγουροι για το οπτικό αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης. Επίσης, στα εκλούσματα διακρίνεται ένα εύρος ενδογενών πρωτεϊνών φαίνεται να δεσμεύονται στη στήλη.

Το επόμενο βήμα ήταν οι καλλιέργειες σε μεγαλύτερη κλίμακα, ευελπιστώντας στην έκφραση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν ίδιες και τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν μετά τον καθαρισμό (εικόνα 16) δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνεται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης (παρόμοιου μοριακού βάρους, περίπου 60kDa, με τη ζώνη που διακρίνεται στην εικόνα 15) στα δείγματα τα οποία δε δεσμεύτηκαν με τη στήλη, τόσο στα επαγόμενα με γαλακτόζη, όσο και στα μη επαγόμενα. Ωστόσο η πρωτεΐνη αυτή δεν εκλούσθηκε από τη στήλη νικελίου, αυτό σε συνδυασμό με την παρουσία της τόσο στις επαγόμενες, όσο και τις κατεσταλμένες καλλιέργειες ζύμης υποδεικνύει ότι πρόκειται για ενδογενή πρωτεΐνη.

Θέλοντας να ελέγξουμε εάν η AMY2 εκφράζεται έστω και σε χαμηλά επίπεδα στον μετασχηματισμένο σακχαρομύκητα, αλλά και να ελεγχθεί η λειτουργικότητά της προχωρήσαμε με ανάλυση των μεταβολιτών που παράγονται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Προηγούμενη έκφραση των *LjAMY2* στο ίδιο στέλεχος ζύμης (Iturbe-Ormaetxe et al.2003) απέδωσε προϊόντα πανομοιότυπα με μάρτυρες β-αμυρίνης και λουπεόλης σε περίπου ίσες ποσότητες καθώς και άλλα προϊόντα μικρότερης ποσότητας. Έτσι, όπως ήδη προαναφέρθηκε, η *LjAMY2* παρουσιάζει μια ποικιλία στο εύρος των λειτουργιών της όσον αφορά τη σύνθεση των τριτερπενίων. *MtAMY1* και *LjAMY2* εκφράστηκαν σε ζυμομύκητες, προκειμένου να εντοπιστούν οι πιθανοί μεταβολίτες τους. Η *MtAMY1* παρήγαγε ένα προϊόν ταυτόσημο με αυτό της β-αμυρίνης, ενώ η *LjAMY2* παρήγαγε συσσωρευμένα σχεδόν ίσες ποσότητες λουπεόλης και β-αμυρίνης και μια σειρά από άλλα δευτερεύοντα προϊόντα. Τα δείγματα μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν αυτά της β-αμυρίνης, θέλοντας έτσι να δούμε αν παράγεται β-αμυρίνη και από την έκφραση της AMY2 (οπότε θα υποθέταμε έτσι, ότι η πρωτεΐνη είναι λειτουργική). Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα δεν ήταν ακριβώς τα αναμενόμενα, αφού όπως φαίνεται και στις εικόνες 17 και 18, υπάρχει μεγάλη ποσότητα συγκεκριμένου μεταβολίτη (που δεν ταυτίζεται με τη β-αμυρίνη), ενώ σχηματίζονται πολύ πιο αχνές ζώνες στα σημεία όπου υπάρχουν τα control της β-αμυρίνης. Το μεγαλύτερο όμως πρόβλημα είναι πως δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των μεταβολιτών που προκύπτουν από τις επαγόμενες και μη επαγόμενες καλλιέργειες. Κάτι που σημαίνει πως οι ίδιοι μεταβολίτες σχηματίζονται τόσο στα κύτταρα στα οποία υπάρχει δραστηριότητα της AMY2, όσο και σε αυτά στα οποία έχει κατασταλεί η έκφρασή της.

Γενικότερα λοιπόν, στηριζόμενοι σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες, η απομόνωση και ο καθαρισμός διαλυτής κυκλάσης οξειδοσκουαλενίου αποτελεί επίπονη διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου, τόσο από φυτικούς



οργανισμούς, όσο και από τον άνθρωπο καθώς και από μύκητες. Παρ'όλα αυτά, η συνέχεια της έρευνας προς έκφραση διαλυτής πρωτεΐνης και μετέπειτα καθαρισμού της, έχει επιτευχθεί χρονολογικά το 1989, μέσω καλλιέργειας κυττάρων από τον οργανισμό *Rabdosia japonica*, από όπου απομονώθηκε μία συνθάση κυκλοαρτενόλης και μία συνθάση β-αμυρίνης (Abe et al.,1989). Η επιτυχία αυτή αποδόθηκε στο γεγονός πως μπορεί οι συνθάσες αυτές να απομονώθηκαν από το φυσικό τους περιβάλλον, είχαν όμως μεγάλη διαφορά στο μοριακό τους βάρος και μπορούσαν έτσι να διαχωριστούν. Το 1995, οι Abe και Prestwich, απομόνωσαν μέσω έκφρασης μία κυκλάση (από αρουραίο), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό λανοστερόλης. Στην προκειμένη περίπτωση, έγινε χρήση των στελεχών ζύμης SGL9, ενώ η επαγωγή της έκφρασης έγινε με γαλακτόζη. Το 2003 έγινε καθαρισμός μίας κυκλάσης από βόειο ήπαρ (Wu et al.,2003), ενώ το 2004 απομονώθηκε μέσω έκφρασης σε *P.pastoris* και μετέπειτα καθαρισμού με στήλη νικελίου, μία ανθρώπινη κυκλάση οξειδοσκουαλενίου που οδηγεί στο σχηματισμό λανοστερόλης (Ruf et al.,2004). Το 2015, επετεύχθη η απομόνωση ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας της ανθρώπινης συνθάσης λανοστερόλης, μέσω έκφρασης σε κύτταρα *E.coli* (Kürten et al., 2015). Τέλος οι έρευνες εκείνες που προχώρησαν μέχρι και την κρυσταλλοποίηση, αφορούν την παρουσίαση της ολοκληρωμένης δομής της SHC (Squalene Hopene Cyclase) του οργανισμού *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Wendt et al., 1997, 1999) και της hOSC (human Oxidosqualene Cyclase) (Thoma et al.,2004). Παρόλ' αυτά, υπάρχει μόνο μία αναφορά επιτυχούς απομόνωσης και καθαρισμού φυτικής OSC σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης (Ito et al., 2013) υποδεικνύοντας τη δυσκολία απομόνωσης λειτουργικής φυτικής κυκλάσης του οξειδοσκουαλενίου.

Προηγούμενες προσπάθειες για καθαρισμό της AMY2 έχουν γίνει και προηγουμένως στην εργαστηριακή ομάδα, με έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, σε κύτταρα *E. coli*. Ο καθαρισμός στη συγκεκριμένη περίπτωση, επιχειρήθηκε μέσω της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) η οποία, ήταν συντηγμένη με το αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας της AMY2. Η πειραματική διαδικασία στηρίχθηκε στην πρόσδεση του GST tag σε γλουταθειόνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αγαρόζης- και στη μετέπειτα έκλουσή της, όταν προστεθεί ελεύθερη γλουταθειόνη σε περίσσεια. Από την ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων σε gel πολυακρυλαμιδίου, παρατηρήθηκε πως συμβαίνει υπερέκφραση της πρωτεΐνης, η οποία όμως είναι πλήρως αδιάλυτη. Επομένως, σαν επόμενο βήμα για ενίσχυση της διαλυτότητάς της προστέθηκε στη λύση των κυττάρων το απορρυπαντικό sarkosyl και ακολούθησε εκ νέου καθαρισμός μέσω δέσμευσης ελεύθερης γλουταθειόνης, χωρίς όμως ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Στηριζόμενοι λοιπόν, στις ιδιότητες του sarkosyl, θα μπορούσαμε να επιχειρήσουμε τη χρήση του και στη λύση των στελεχών BL21 gold, τα οποία είναι μετασχηματισμένα με τους πλασμιδιακούς φορείς pET και την αλληλουχία της AMY2, συντηγμένη με το His tag. Πολύ πιθανόν μία τέτοια προσπάθεια να είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα έκφρασης σημαντικής ποσότητας διαλυτής πρωτεΐνης, αφού η αποδιάταξη που επιφέρει το sarkosyl δεν ήταν κατάλληλη για την ετικέτα GST, καθώς για να είναι

αυτή λειτουργική θα πρέπει να αναδιπλωμένη, επομένως η αποδιάταξη με το sarkosyl πολύ πιθανόν να είναι επιτυχής, καθώς το his tag μπορεί και λειτουργεί ανεξαρτήτως της τριτοταγούς του δομής, άρα δεν θα επηρεαστεί από το sarkosyl.

Καταλήγοντας λοιπόν, αναμένονται ακόμα πολλαπλές μελλοντικές προσπάθειες προκειμένου να επιτευχθεί η υπερέκφραση της AMY2 και άλλων κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου σε διαλυτή και λειτουργική μορφή, ενώ το μόνο σίγουρο είναι πως θα μελετηθούν και θα χαρακτηρισθούν ακόμα πολυάριθμα γονίδια τα οποία, κωδικοποιούν τέτοιου είδους πρωτεΐνες, λόγω της μεγάλης τους σημασία τόσο στη λειτουργία φυτικών οργανισμών, όσο και για εκμετάλλευση από τον άνθρωπο.

## 5. Παράρτημα

Primers για την PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας με τις περιοχές  
που αναγνωρίζονται από τα NheI και NotI

### Nterminal His tag

NheI-AMY2Forward	NotI-AMY2ReverseStop
GATAGCTAGCATGTGGAAGCTGAAGGTAGC	CAAGCGGCCGCTTAAACTGCAATGGTAATG

### Cterminal His tag

NheI-AMY2Forward	NotI-AMY2Reverse NoStop
GATAGCTAGCATGTGGAAGCTGAAGGTAGC	CAAGCGGCCGCAACTGCAATGGTAATG

ddH <sub>2</sub> O	12,4μl	ddH <sub>2</sub> O	12,4μl
Buffer 5x HF	4μl	Buffer 5x HF	4μl
dNTPs	0,4μl	dNTPs	0,4μl
F primer	1μl	F primer	1μl
R primer (Stop)	1μl	R primer (NoStop)	1μl
DNA	1μl	DNA	1μl
Phusion polymerase	0,2μl	Phusion polymerase	0,2μl
Τελικός όγκος	20μl	Τελικός όγκος	20μl

### Κύκλοι Αντίδρασης

	PCR1 με κωδ.λήξης	PCR2 χωρίς κωδ.λήξης
Initial Denaturation	98°C για 30sec	98°C για 30sec

Second Denaturation	98°C για 10sec	98°C για 10sec
Annealing	58°C για 30sec	60,4°C για 30sec
Extension	72°C για 1min	72°C για 1min
Final Extension	72°C για 10min	72°C για 10min

Primers για την PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας με τις περιοχές  
που αναγνωρίζονται από τα KpnI και NotI

Nterminal His tag

KpnI-AMY2Forward	NotI-AMY2ReverseStop
GAGGTACCAATGTGGAAGCTGAAGGTAGC	CAAGCGGCCCGCTTAAACTGCAATGGTAATG

Cterminal His tag

KpnI-AMY2Forward	NotI-AMY2Reverse NoStop
GAGGTACCAATGTGGAAGCTGAAGGTAGC	CAAGCGGCCCGCGAAACTGCAATGGATGGTAATG

	1 <sup>η</sup> PCR χωρίς κωδ. λήξης	2 <sup>η</sup> PCR με κωδ. Λήξης
ddH <sub>2</sub> O	12,4μl	12,4μl
Buffer	4μl	4μl
dNTPs	0,4μl	0,4μl
F primer	1μl	1μl
R primer	1μl	1μl
DNA	1μl	1μl
Phusion polymerase	0,2μl	0,2μl
Τελικός Όγκος	20μl	20μl

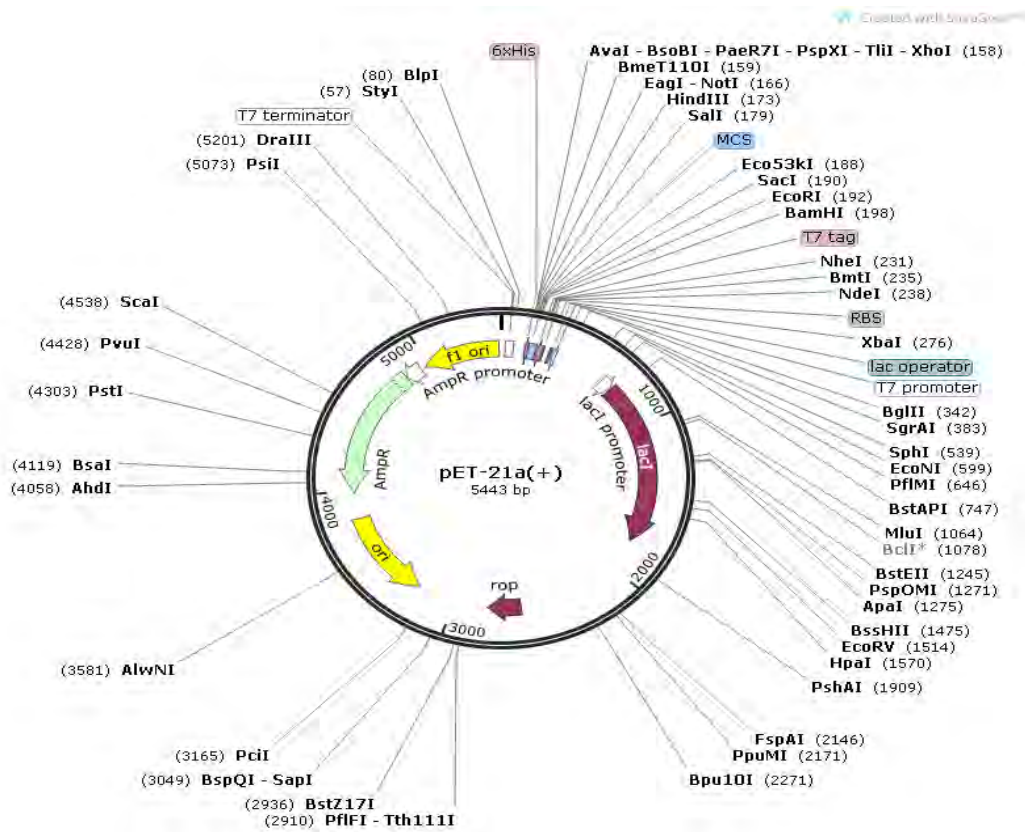
Κύκλοι προγράμματος

	PCR1 χωρίς κωδ. Λήξης	PCR2 με κωδ. Λήξης
Initial Denaturation	98°C για 30sec	98°C για 30sec
Second Denaturation	98°C για 10sec	98°C για 10sec
Annealing	60,4°C για 30sec	58°C για 30sec
Extension	72°C για 1min	72°C για 1min
Final Extension	72°C για 10min	72°C για 10min

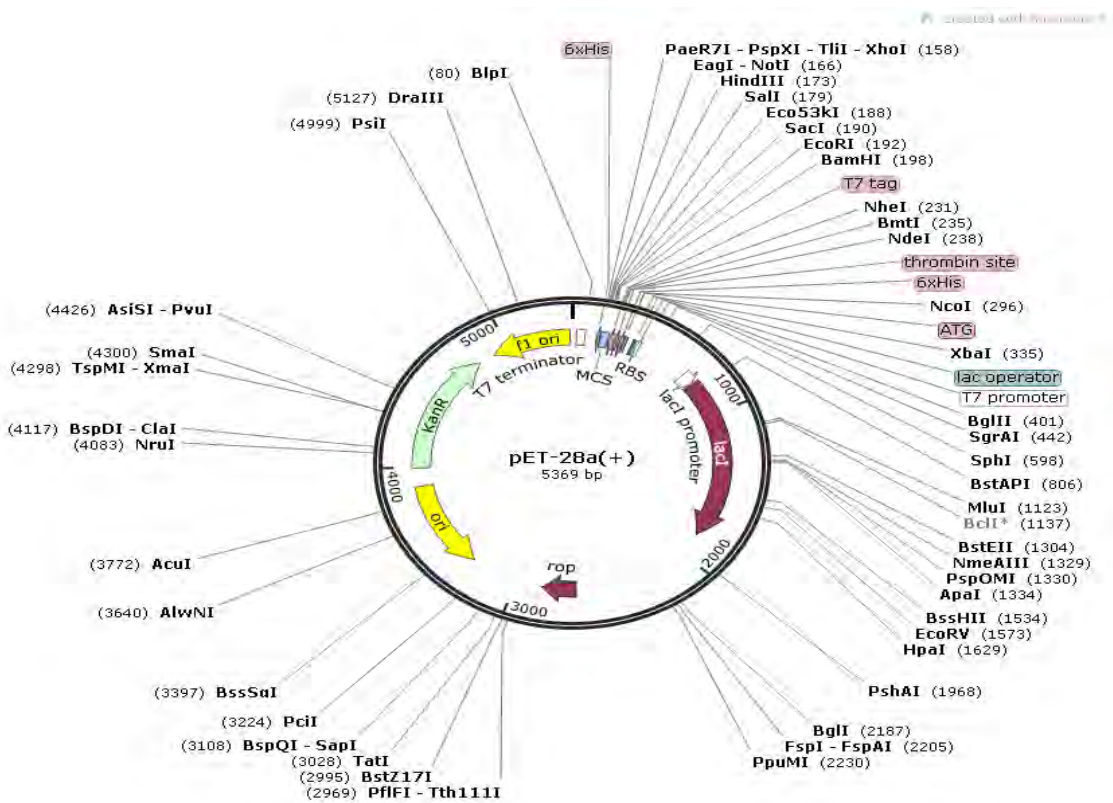
PCR για την επιβεβαίωση μετασηματισμένων GIL77 (χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που ενισχύουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης από τα KpnI και NotI)

ddH <sub>2</sub> O	12,4μl
Buffer 5x HF	4μl
dNTPs	0,4μl
F primer	1μl
R primer	1μl
DNA(WT, C11, C12)	1μl
Phusion polymerase	0,2μl
Τελικός Όγκος	20μl

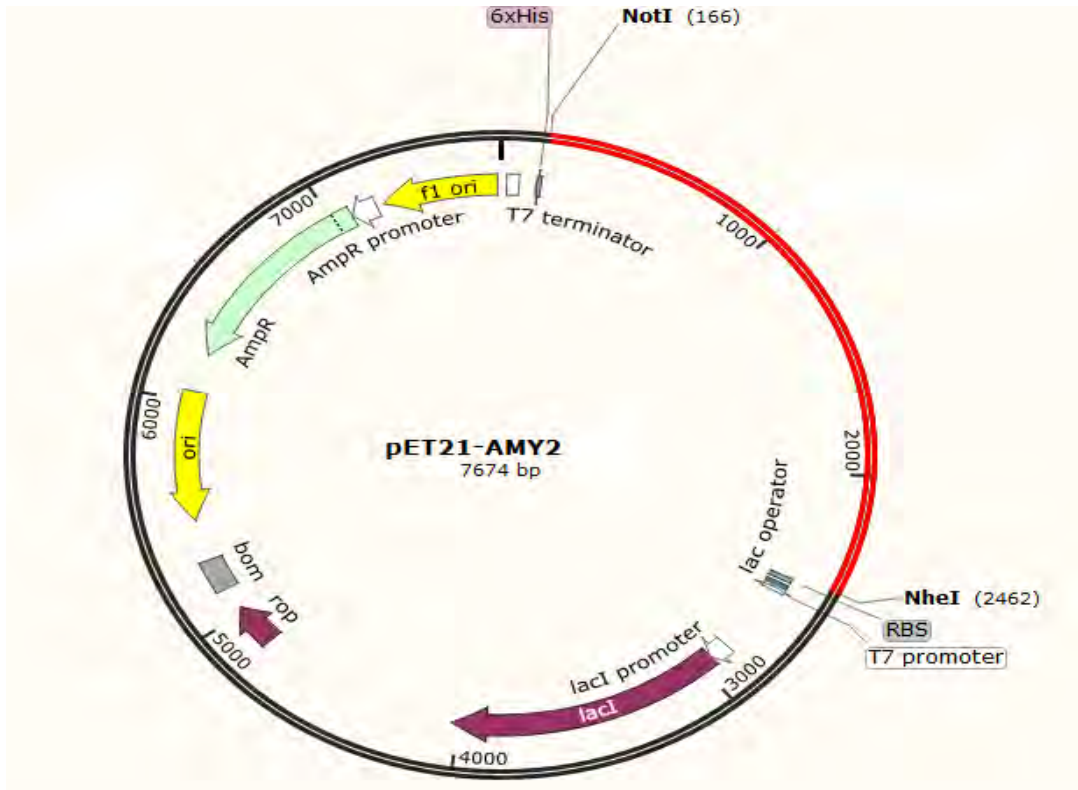
pET21:Εμπεριέχει τον T7 promoter καθώς και το 6xHis (amp<sup>R</sup>)



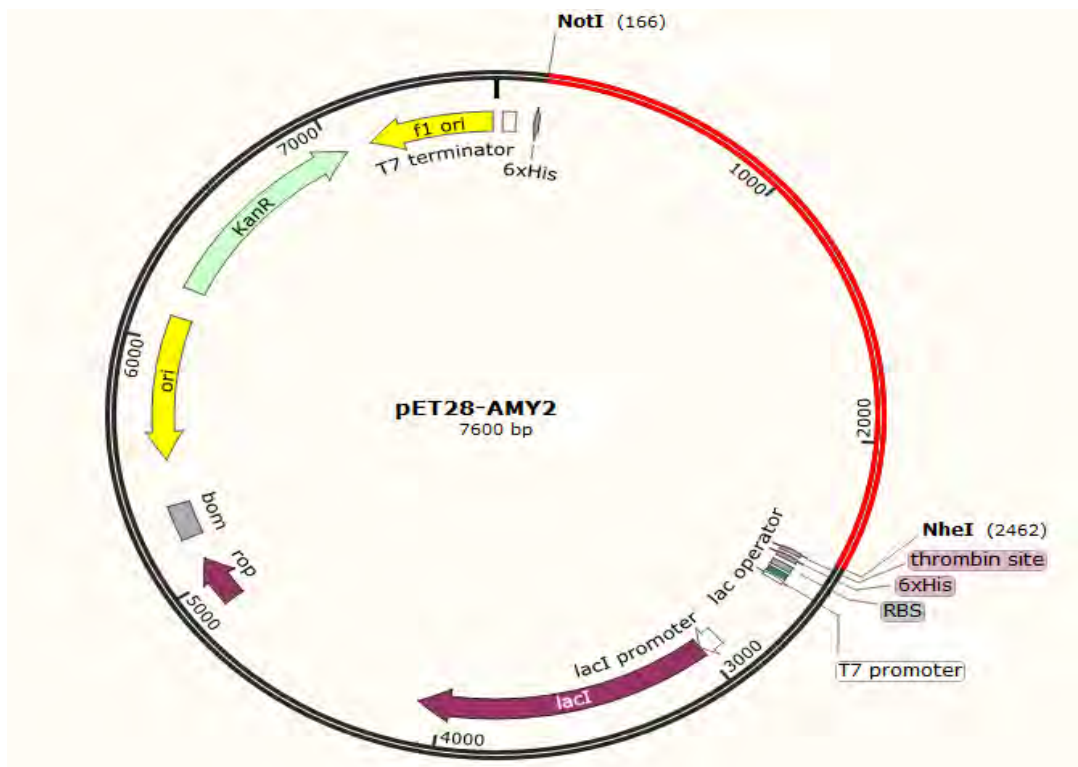
pET28:T7 promoter και 6xHis (kan<sup>R</sup>)



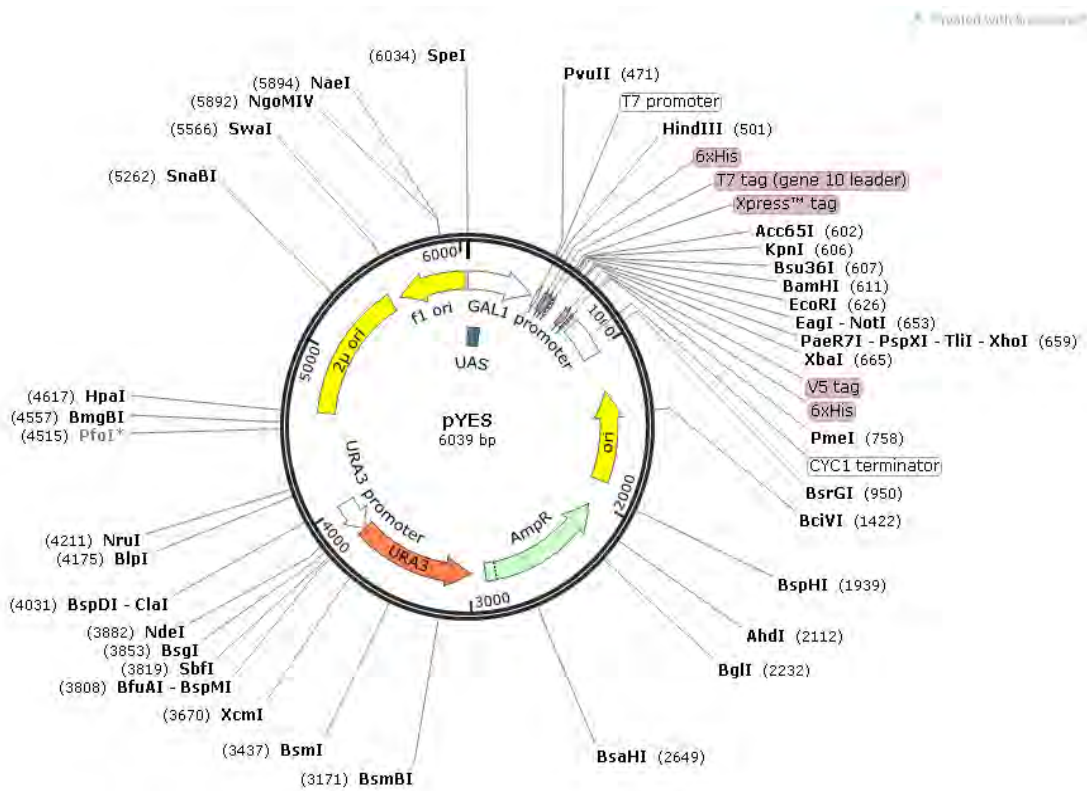
pET21-AMY2:



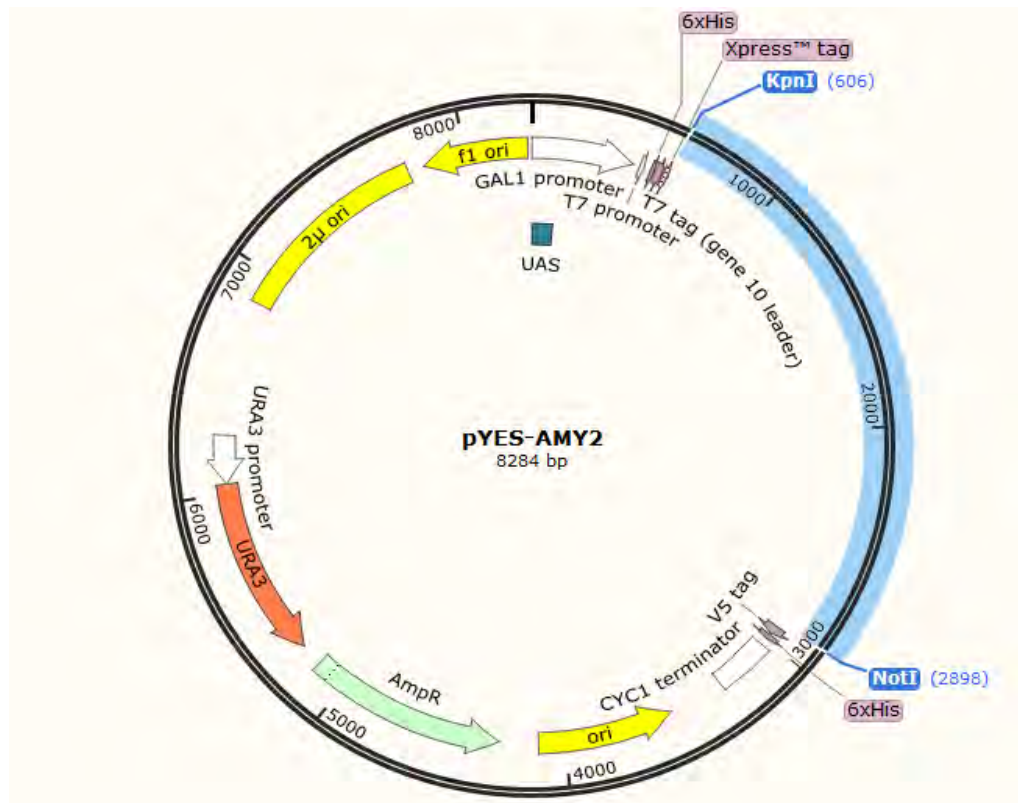
pET28-AMY2:



Πλασμίδιο pYES2/NT-B: GAL1 promoter και 6xHis (amp<sup>R</sup>)



pYES2/NT-B-AMY2:





ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΕΩΝ (MacroGen)

>AMY2\_CT\_His\_CYC1\_reverse

AAAACGGATGCGGACTCTAGATCAGCGGGTTTAACTCAATGGTGATGGTG  
ATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATA  
GGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCGAAACTGCAAT  
GGATGGTAATGGAACCCGTCGACGATATTCAGCTAGGGCCATCGTTGTAA  
AATTATTTCTGTACATTGGGTAATGCAGCGTGCAATTTTTTACGTATACTC  
CAGTAATATCCTGTTGGGGCCAATCACCATCTTCAAGCTGAGAATTGATG  
AGCAATTTTGCAGCACGGTGAAGTGGAGTAGGGTCTCTCTCCGCCTGGCC  
AGCATGAATCAAACCCATAAGAGCCCATGCTGTCTGTACAACATTTGATC  
GGTTTCCTTCAAGAGGTACATATATCTTTTTTGGGCATGATAGATAACTCT  
CTCCCCACCCACCATCCTTTGATTGTGTCGTGAGTAGAAATTTAACACCTT  
TGCGAATGGCAGCACAATTGGCATAAGTTTTGCCAGCTGCTTCTAGACCA  
CCAAGTGCAAACCAAGTACCATAAATGAAGCAAATTCCTGCATTTCCATA  
CCAAGAACCATCTGCTGTTTGTATATCTTCAAAGTAACGAACTGCATTAGC  
AATGCAATCCTCGATCTCTTTCTTTCTATGCTCTGGATAATGATTCTTGAAC  
AAAATAAGGCTCCAATTGCTGATCCAGTGCCTCAACCAATTCATGCTC  
AATTACAATGTCCTCAAAAAATTCTATAGGATTGAGTAGTTCCAGCCACTC  
CTGAGCTCCTGCTGGCTCCCATACTGCAAAACCACCCTTTTTACTCTGAAG  
TGACAATAGGAGATTGACAGTATCGAATAACCTTTCAGGCTCTATCTTTTC  
CCCTACAATCTCTGGAGGCAACATTGACAAAAGTAGACAACACTTAAAC  
CTTCTGCAGTGCAATCAGAACTTGCCATCCATGGTCTTGATCAGAAAAG  
GTCCATGCTCCTTTGGAAATATGGCGATGCATACTCTTAAAATCTCCCTGA  
AGGGTTGTCCTTAACCTGAAAATTCTTGATAAAAATCATGTCCTTTTGCAAG  
TGCGGGAACGAGTTCGTCAATTAGGTTAGTAAAAAGCAAACTTGAACAG  
CGAAACCAGCATCCCATTTCTGGGTACCAAAATCTGGATGGCATTTCATCT  
TCTGCAAGCACAAGTAATCCGGGACCCGGGAAAAAGTTCTTTGAAGAAAT  
TTCTTTTGGATTTCCACCCCAAAGAAGAAGGCTTAAAATTTTCTCCCC  
CAAGGGGATGGGTGCGCCATAAGATCTTCCAAGGGAAGTGTTCCTGTTCT  
TTAAGGGCGCTTTTCTTATAATTTTGTAAAGGCAAAAATCAAAAAGGGCT  
CGGGGAAAATAAACATCCCTCTCAAATTCGTCCAAGGAGGGGATAAAAT  
ATCCTTGCCATTGGAGGCGCCTCCCCTATTTTTCAAGGGGGAAGGAGTCTC  
CTCCCGCAAAGAGGTTTTGCCGTCAA

>AMY2\_CT\_His\_T7promoter

ATGCTACTGCGGGGTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGA  
CTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGTA  
CCAATGTGGAAGCTGAAGGTAGCAGATGGTGGCAAGAATCCTTACATATT  
CAGCATCAACAACCTTCGTGGGAAGGCAGACATGGGAGTATGATCCTGATG

CAGGTACTCCTGAGGAACGAGCTCAGGTTGAAGAAGCTCGTCAGGATTTCTATAACAACCGCTACAAGGTCAAGACTTGTGGCGACCGACTTTGGCGGTTTCAGGTTATGAGGGAAAATAACTTCAAACAACAATACCGAGTGTGAAGATAGAGGATGGAGAGAAGGTAACATACGATAAAGTGACAACAACACTGTGA GAAGGGCCGCACATCACCTAGCAGGATTACAGACCAGTGATGGCCATTGGCCTGCTCAAATTGCTGGTCCTCTGCTTTTACAGCCTCCCTTGATCTTTTGTA TGTACATAACAGGTCATCTTGATTCTGTATTCCCAGAAGTGTACCGCAAAG AGATTCTTCGTTACACATACGTTTCATCAGAATGAAGATGGAGGGTGGGGA CTACACATAGAGGGTCATAGCACCATGTTTTGACTGTACTCAACTACATA TGCATGCGAATACTTGGAGAAGGACCTGATGGAGGTCAAGACAATGCTTG TGCAAGAGCAAGAAAATGGATTCATGATCATGGGGGCGCGACACACATA GCTTCTTGGGGGAAGACATGGCTTTCGATACTTGGTATATTTGATTGGAGC GGAACCAATCCAATGCCTCCAGAATTTGGATCCTTCCTTCATTTCTTCTCT ATGCATCCAGCTAAAATGTGGTGTTATTGCCGATTGGTGTACATGCCTATG TCTTACTTGTATGGGAAGAGATTTGTGGGTCCAATAACACCACTCATCTTA CAGTTGAGAGAAGAAGACTCTTACTCAACCTTATGAAAAAGTTAATTGGAA GAAGGCACGTCATCAATGTGCAAAGGAAGATCTTACTATCCCAATCCTT TGATAACAAGATCTGATATGGGATAGTTTATACTTATTCACTGAGCCATTCT TACTCGTTGGCCTTTCAACAAGCTGATCAGAGAAAGAGCCCTTTCAGTA ACAATGAAACATATCCCTTATGAAGATCTAATAATCCATACTTACCATTGG GGCCGTGGAAAAGGTTTTAGCATGCTTGCTTGTGGGGGAAAACCAA CGGAATTGTTTCCAAGAAAACCTTTGCCAGGGTCCCGGAAAATTTTGGGT TTTCCAAAAAAGGAAATGCTCCGCAATTTTGGTACCCACAAAGGGGAGC GGTTTCTGGTTAACACCGGTTTTCTAAACCAATTGAGAAGACCGTCCGCC TTCCAGAGAGAGATGTTTCAAATCCCGTTAGGGAACCCTCTCGGTTATA AATAGTCCCCCATTTCCACAGGAGCTTTTCTTGAGCACGAGAAGGTAGTTT ACCCAACGCATGGAGCGACCTTACCTGCGCCCCAACTTAAATACATCCG A

>AMY2\_NT\_His\_CYC1\_reverse

CAATCGATGCGGACTCTAGGATCAGCGGGTTTAAACTCAATGGTGATGGT GATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT AGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCTTAAACTGCA ATGGATGGTAATGGAACCCGTCGACGATATTCAGCTAGGGCCATCGTTGT AAAATTATTTCTGTACATTGGGTAATGCAGCGTGCAATTTTTTACGTATAC TCCAGTAATATCCTGTTGGGGCCAATCACCATCTTCAAGCTGAGAATTGAT GAGCAATTTTGCAGCACGGTGAAGTGGAGTAGGGTCTCTCTCCGCTGGC CAGCATGAATCAAACCCATAAGAGCCCATGCTGTCTGTACAACATTTGAT CGGTTTTCTTCAAGAGGTACATATATCTTTTTTGGGCATGATAGATAACTC TCTCCCCACCCACCATCCTTTGATTGTGTCGTGAGTAGAAATTTAACACCT TTGCGAATGGCAGCACAAATTGGCATAAGTTTTGCCAGCTGCTTCTAGACC

ACCAAGTGCAAACCAAGTACCATAAATGAAGCAAATTCCTGCATTTCCAT  
ACCAAGAACCATCTGCTGTTTGTATATCTTCAAAGTAACGAACTGCATTAG  
CAATGCAATCCTCGATCTCTTTCTTTCTATGCTCTGGATAATGATTCTTGAA  
CAAAACTAAGGCTCCAATTGCTGATCCAGTGCCTCAACCAATTCATGCT  
CAATTACAATGTCCTCAAAAAATTCTATAGGATTGAGTAGTTCCAGCCACT  
CCTGAGCTCCTGCTGGCTCCCATACTGCAAAACCACCCTTTTTACTCTGAA  
GTGACAATAGGAGATTGACAGTATCGAATAACCTTTCAGGCTCTATCTTTT  
CCCCTACAATCTCTGGAGGCAACATTGACAAAAGTAGACAACACTTAAAA  
CCTTCTGCAGTGCAATCAGAACTTGCCATCCATGGTCTTGATCAGAAAA  
GGTCCATGCTCCTTTGGAAATATGGCGATGCATACTCTTAAATCTCCTGAA  
GGTTGTCCTTAACCTGAGAATTCTTGATAAAATCATGTCCTTTTGCAAGT  
GCGGGACCGAGTTCGTCAATTAGGTAGTAAAAAGCCAACTTGAACAGC  
GAAACCAGCATCCCATTCTTGGGTACAAAAATCTGGATGGAAATTCATCT  
TCTGCAAGCACAAATAATCCGGGACCTGGCCAGAATGTCCTTGAAGAAAA  
TTCCGTTCCGATTTCTCCCCAAAAAAAAGGACGGTAAAAACTTTTCCGCCC  
CCCAGGGGAATGTTTGCCTTTATGATTTTCTAAAGGAAAGTGTTCTGTTT  
CCTAAAGGGCTGTTCCGTAGGACTGTGTAAAGGCAAACAACCTAAAGGGC  
CCGGGAAAATATAAAATTCTCCCACCACTTTGTCACGGGGGGAGGAGAAA  
AAATCCCTTCGCCAGAAAGGGCCTTCCCATACTATATATAAGGGGTAAA  
AATTTCCCTCCCCCTCAAAGGAGTGTGTGCCAACATCCTCCTCCAATT  
CAAG

>AMY2\_NT\_His\_T7promoter

TAGCCTCCTGAGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCAT  
GACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAG  
GTACCAATGTGGAAGCTGAAGGTAGCAGATGGTGGCAAGAATCCTTACAT  
ATTCAGCATCAACAACCTTCGTGGGAAGGCAGACATGGGAGTATGATCCTG  
ATGCAGGTACTCCTGAGGAACGAGCTCAGGTTGAAGAAGCTCGTCAGGAT  
TTCTATAACAACCGCTACAAGGTCAAGACTTGTGGCGACCGACTTTGGCG  
GTTTCAGGTTATGAGGGGAAAATAACTTCAAACAAACAATACCGAGTGTGA  
AGATAGAGGATGGAGAGAAGGTAACATACGATAAAGTGACAACAACCTGT  
GAGAAGGGCCGCACATCACCTAGCAGGATTACAGACCAGTGATGGCCATT  
GGCCTGCTCAAATTGCTGGTCCTCTGCTTTTACGCCTCCCTTGATCTTTTG  
TATGTACATAACAGGTCATCTTGATTCTGTATTCCCAGAAGTGTACCGCAA  
AGAGATTCTTCGTTACACATACGTTTCATCAGAATGAAGATGGAGGGTGGG  
GACTACACATAGAGGGTCATAGCACCATGTTTTGTAAGTACTCAACTAC  
ATATGCATGCGAATACTTGGAGAAGGACCTGATGGAGGTCAAGACAATGC  
TTGTGCAAGAGCAAGAAAATGGATTCATGATCATGGGGGCGCGACACAC  
ATAGCTTCTTGGGGGAAGACATGGCTTTCGATACTTGGTATATTTGATTGG  
AGCGGAACCAATCCAATGCCTCCAGAATTTTGGATCCTTCCTTCATTTCTT  
CCTATGCATCCAGCTAAAATGTGGTGTTATTGCCGATTGGTGTACATGCCT

ATGTCTTACTTGTATGGGAAGAAAATTTGTGGGTCCAATAACACCACTCAT  
CTTACAGTTGAGAGAAGAAGTCTTTACTCAACCTTATGAAAAAGTTAATTG  
GAAGAAGGCACGTCATCAATGTGCAAAGGAAGATCTTTACTATCCCAAT  
CCTTTGATACAAGATCTGAATATGGGGATAGTTTATACTTATTCCTGAGC  
CATTCTTGACTCGTTGGCCTTTCAACAAGCTGAATCAAAGAAAGAGCCCTT  
CAAGTAACAATGAAACCTATCCCTTTTTGAAGAATCTTAAAAGTCCAAAC  
ATTACCATTGGGGGGCGGGGGAAAAAGGTTTTATTCCTCCTTTCCTTTTTT  
GGGGGGGAAAAATCCAAACCGGAATTGTTTTTTAGAAAAATCCTTGTCAA  
GGGTCCCGGGAAATATTTTGGGTTGTCCAAAAATGGAAAGTGCCTCCCA  
AGTTTTTGTTCCTCAAAAAAGGAAAACGTGGTTTTCTTTTTTCAAACTCC  
GTTCTTATCAAAACAATATTGCAAAAACGCGCGCGGCCCTGTCAAAGAGA  
AAAGGTTTTTTCTCAAATTCACCGGGTGGAAGGGACCTCCTCCAGGATTT  
TTTTAAAATTGTCCCCCATTTCTTACAAGAGAAAGGGCGTTTTCTTTTA  
GAACCCCGAGGGAGATATCTATTGTCCCCCAGAAGTGTAGAATGGTCGG  
CTTTTTTGTTTTTGCTCCCCGACTACTTTAAAAAGATGACAA

## 6.Βιβλιογραφία

---

- Abe Ikuro, Yutaka Ebizuka, Shujiro Sea and Ushio Sankawa, Purification of squalene-2,3-epoxide cyclases from cell suspension cultures of *Rabdosia japonica* Hara, Elsevier Science Publishers, Volume 249, number 1, 100-104,1989
- Abe Ikuro and Glenn D. Prestwich, Active Site Mapping of Affinity-labeled Rat Oxidosqualene Cyclase, Vol. 269, No. 2, 1994
- Abe Ikuro and Glenn D. Prestwich, Molecular cloning, characterization, and functional expression of rat oxidosqualene cyclase cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, pp. 9274-9278, 1995
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72:435–57
- Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8, 40-49
- Behrens J. 2000. Control of b-catenin signaling in tumor development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 910: 21–33
- Benveniste P., Biosynthesis and accumulation of sterols, *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:429-57
- Joshua A. Bornhorst and Joseph J. Falke, Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, *Methods Enzymol.* 2000 ; 326: 245–254
- Chen Y, Guo Q, Liu L, et al. (2011). Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *J Med Plant Res* 5:1749–55.
- Chu HY, Wegel E, Osbourn A (2011) From hormones to secondary metabolism: The emergence of metabolic gene clusters in plants. *Plant J* 66(1):66–79.
- Delis Costas, Afrodite Krokida, Sofia Georgiou, Luis M. Pena-Rodríguez, Nektarios Kavroulakis, Efstathia Ioannou, Vassilios Roussis, Anne E. Osbourn and Kalliopi K. Papadopoulou, Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation, *New Phytologist* (2011) 189: 335–346
- Peter H. Graham and Carroll P. Vance, Legumes: importance and constraints to greater use, *Plant Physiol.* 2003, 131(3):872-7.
- Kurt Handberg and Jens Stougaard, *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, *The Plant Journal* (1992) 2(4), 487-496
- Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 13431—13436 (2001)
- Haralampidis, K., Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. 2001a. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnology* 75: 31–49
- Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R. and Osbourn, A. 2001b. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13431–13436
- Haralampidis K., Trojanowska M. and Osbourn A.E. (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in biochemical engineering / biotechnology* 75, 31-49
- Hayashi H., Huang P. Y., Inoue K., *Plant Cell Physiol.*, 44, 404—411(2003)

Hrazdina, G. and G. J. Wagner (1985). "Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 237(1): 88-100

Hostettmann K, Marston A. (1995). *Saponins (chemistry and pharmacology of natural products)*. Cambridge, UK: Cambridge University Press

Hostettmann, K.A. and Marston, A. 1991. *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK)

Ito Ryouzuke, Yukari Masukawa and Tsutomu Hoshino, Purification, kinetics, inhibitors and CD for recombinant b-amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L and functional analysis of the DCTA motif, which is highly conserved among oxidosqualene cyclases, *FEBS Journal* 280 (2013) 1267–1280

Iturbe-Ormaetxe Iñaki, Kosmas Haralampidis, Kalliopi Papadopoulou and Anne E. Osbourn, Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, *Plant Molecular Biology* 51: 731–743, 2003

Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. (1994): *Thin-Layer Chromatography*

Justus G. Kirchner (1978): *Thin-layer chromatography*, 2nd edition, Wiley

Jay D. Keasling, *Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering*, Science Vol. 330, 2010

Krokida Afrodite, Costas Delis, Katrin Geisler, Constantine Garagounis, Daniela Tsikou, Luis M. Pena-Rodriguez, Dimitra Katsarou, Ben Field, Anne E. Osbourn and Kalliope K. Papadopoulou, A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis, *New Phytologist* (2013) 200: 675–690

Kürten Charlotte, Mathias Uhlén, Per-Olof Syrén, Overexpression of functional human oxidosqualene cyclase in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* (2015)

Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. 1998.  $\beta$ -Amyrin synthase: cloning of the oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* 256:238–44

Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y., *Excerpta Medica International Congress Series*, 1157, 421–428 (1998b)

Lichtenthaler H, The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 47–65, 1999

Liu Yanling, Yunfei Cai, Zhongjuan Zhao, Junfeng Wang, Jing Li, Wei Xin, Guangmin Xia and Fengning Xiang, Cloning and Functional Analysis of a b-Amyrin Synthase Gene Associated with Oleanolic Acid Biosynthesis in *Gentiana straminea* MAXIM, *Biol. Pharm. Bull.* 32(5) 818–824 (2009)

Lodeiro S, Xiong Q, Wilson WK, Kolesnikova MD, Onak CS & Matsuda SP (2007) An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: a challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. *J Am Chem Soc* 129, 11213–11222

Lodeiro S, Xiong Q, Wilson WK, Kolesnikova MD, Onak CS, Matsuda SPT. 2007. An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: a challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 129:11213–22

Moller, B. L. and E. E. Conn (1980). The Biosynthesis of Cyanogenic Glucosides in Higher Plant. *The Journal of Biological Chemistry* 255(7): 3049-3056.

- Moller, B. L. (2010). Dynamic Metabolons. *Science* 330(6009): 1328-1329.
- Moses Tessa, Kalliope K. Papadopoulou and Anne Osbourn, Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives, 2014 Informa Healthcare USA
- Moses Tessa, Jacob Pollier, Johan M. Thevelein and Alain Goosens, Bioengineering of plant triterpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro, *New Phytologist* (2013)
- Nagegowda DA. 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* 584: 2965–2973.
- Nes, W. D. and Heftmann, E. 1981. A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J. Nat. Prod.* 44, 377–400
- Nützmann HW, Osbourn A (2014) Gene clustering in plant specialized metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 26:91–99.
- Osbourn A (2010) Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet* 26(10):449–457.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B & Matsuda SP (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol* 9, 305–314.
- Reinert DJ, Balliano G, Schulz GE. 2004. Conversion of squalene to the pentacarbocyclic hopene. *Chem. Biol.* 11:121–26
- Rochfort S, Panozzo J. 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7981–7994.
- Armin Ruf, Francis Müller, Brigitte D'Arcy, Martine Stihle, Eric Kuszniir, Corinne Handschin, Olivier H. Morand, 1 and Ralf Thoma, The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315 (2004) 247–254
- Satoru Sawai, Tamotsu Shindo, Shusei Sato, Takakazu Kaneko, Satoshi Tabata, Shin-ichi Ayabe, Toshio Aoki, Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus* *Plant Science* 170 (2006) 247–257
- Schlegel S., M. Klepsch, D. Gialama, D. Wickström, D.J. Slotboom, J.-W. de Gier, Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria, *Microb. Biotechnol.* 3 (2010) 403–411
- Seddon A.M., P. Curnow, P.J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim. Biophys. Acta* (2004) 105–117.
- Seo, S., Yoshimura, Y., Uomori, A., Takeda, K., Seto, H., Ebizuka, Y. & Sankawa, U. (1988) Biosynthesis of triterpenes, ursolic acid and oleanolic acid in tissue culture of *Rabdosia japonica* Hara fed [5-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>]mevalono lactone and [2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>]acetate, *J. Am. Chem. Soc.* 110, 174021745.
- Zhang H., Shibuya M., Yokota S., Ebizuka Y., *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 642—650 (2003)
- Shibuya M., Adachi S., Ebizuka Y., *Tetrahedron*, 60, 6995—7003 (2004).
- Douglas R. Smyth, Marek K. Mrozkiewicz, William J. Mcgrath, Pawel Listwan, Bostjan Kobe, Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags, *Protein Science* (2003), 12:1313–1322. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press. The Protein Society
- Hans Peter Sørensen, Kim Kusk Mortensen, Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories* 2005, 4:1

- Suzuki M, Xiang T, Ohyama K, Seki H, Saito K, et al. 2006. Lanosterol synthase in dicotyledonous plants *Plant Cell Physiol.* 47:565–71
- Thimmappa Ramesha, Katrin Geisler, Thomas Louveau, Paul O'Maille and Anne Osbourn, Triterpene Biosynthesis in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. 65:16.1–16.33
- Thoma R, Schulz-Gasch T, D'Arcy B, Benz J, Aebi J, et al. 2004. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* 432:118–22
- Ralf Thoma, Tanja Schulz-Gasch, Brigitte D'Arcy, Jorg Benz, Johannes Aebi, Henrietta Dehmlow, Michael Hennig, Martine Stihle & Armin Ruf Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase, *Nature* Vol. 432, 2004
- Vincken J-P, Heng L, de Groot A, Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68:275–97
- Wendt KU, Lenhart A, Schulz GE. 1999. The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 286:175–87
- K. Ulrich Wendt, Karl Poralla, Georg E. Schulz, Structure and Function of a Squalene Cyclase, *Science* vol. 277, 1997
- K. U. Wendt, A. Lenhart and G. E. Schulz, The Structure of the Membrane Protein Squalene-Hopene Cyclase at 2.0 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* (1999) 286, 175-187
- Wink M, Mohamed GIA. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 897–917.
- Wu Tung-Kung, Chiao-Yin Huang, Cheng-Yu Ko, Cheng-Hsiang Chang, Yu-Ju Chen and Hsin-Kai Liao, Purification, tandem mass characterization, and inhibition studies of oxidosqualene-lanosterol cyclase enzyme from bovine liver, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421 (2004) 42–53
- Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65:261–91
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283–333.