

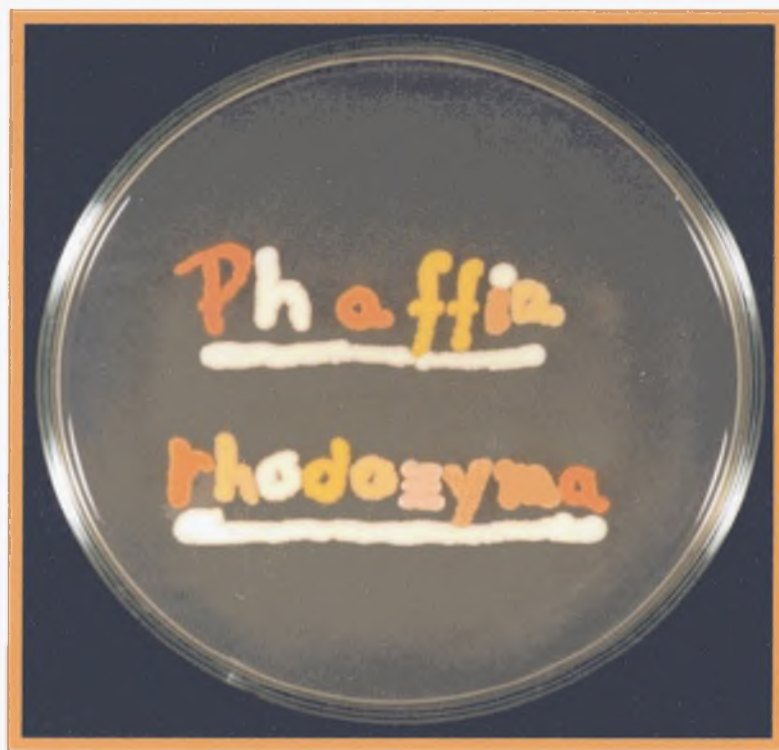
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

“Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου της ιμπερτάσης του μύκητα *Phaffia rhodozyma* σε κύτταρα *Escherichia coli*.”



Τσιλιγγίρη Κατερίνα
Λάρισα, Φεβρουάριος 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5202/1
Ημερ. Εισ.: 01-04-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΤΣΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087316

➤ *Ευχαριστίες*

Πρώτα από κάθε άλλον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Κ. Μαθιόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τη βοήθεια και συμπαράστασή του προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετακίνησή μου στο ίδρυμα που με φιλοξένησε (διαδικασία που δεν υπήρξε καθόλου εύκολη). Χωρίς τη βοήθειά του η εκπόνηση αυτής της εργασίας ποτέ δε θα είχε καταστεί δυνατή. Επίσης, για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στην Ισπανία αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Επιπλέον, τον κο Δημήτρη Κουρέττα, για την προθυμία με την οποία δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ακόμη, τον κύριο José María Requena για τις πολύτιμες παρεμβάσεις του οποτεδήποτε αντιμετώπισα γραφειοκατικά προβλήματα με το ίδρυμα υποδοχής. Την υπεύθυνη του εργαστηρίου στο οποίο δούλεψα, κα María Fernández Lobato καθώς και όλους τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, τη María Dolores Linde López, τον Miguel Álvaro Benito, τον Miguel Antonio de Abreu Felipe και την Patricia Alejandra Gutiérrez Alonso, για την προθυμία με την οποία κάθε φορά με βοηθούσαν σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπιζα, καθώς και για την υπομονή και τη στωικότητα με την οποία με ανέχθηκαν κατά τους πέντε μήνες που έμεινα μαζί τους.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Daniel Muñoz και την Elisa Longás για την ευγενική παραχώρηση του πλασμιδίου pET-28b(+) καθώς και στους συναδέλφους από το Centro de Biología Molecular Severo Ochoa που με στήριξαν ψυχολογικά κατά τη διάρκεια της παραμονής μου, τον Felipe Cava Valenciano και τον Daniel Vega Mendoza, των οποίων η βοήθεια και η συμπαράσταση ήρθε σε χρονική περίοδο που μου ήταν κάτι παραπάνω από απαραίτητη.

➤ Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1. Πρεβιοτικές ουσίες	5
2. Ευεργετικές ιδιότητες των πρεβιοτικών ουσιών	7
3. Ιμβερτάσες	10
4. Η <i>Rhaffia rhodozyma</i> και η ιμβερτάση της	12
5. Σκοπός της εργασίας	15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
1. Υλικά	16
1.1 Φορείς	16
1.2. Καλλιέργειες κυττάρων	19
1.3. Απομόνωση πλασμιδίων (<i>minipreps</i>)	19
1.4. PCR	20
1.5. Πέψεις	21
1.6. Αντιδράσεις λιγάσης	21
1.7. Κύτταρα ξενιστές	21
1.8. Μετασχηματισμός κυττάρων	21
1.9. Εξασφάλιση δεκτικών κυττάρων	21
1.10. Επαγωγή έκφρασης γονιδίου	21
1.11. SDS-PAGE	22
1.12. Εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας	22

<i>2. Μέθοδοι</i>	<i>23</i>
<i>2.1. Καλλιέργειες κυττάρων</i>	<i>23</i>
<i>2.2. Minipreps</i>	<i>23</i>
<i>2.3. PCR</i>	<i>24</i>
<i>2.4. Πέψεις</i>	<i>24</i>
<i>2.5. Αντιδράσεις λιάσης</i>	<i>25</i>
<i>2.6. Μετασηματισμός κυττάρων με το ανσυνδυνασμένο πλασμίδιο</i>	<i>27</i>
<i>2.7. Εξασφάλιση δεκτικών κυττάρων</i>	<i>27</i>
<i>2.8. Επαγωγή έκφρασης γονιδίου</i>	<i>28</i>
<i>2.9. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE</i>	<i>29</i>
<i>2.10. Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας</i>	<i>29</i>
<i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i>	<i>31</i>
<i>1. Κλωνοποιήσεις</i>	<i>31</i>
<i>2. Αλληλουχίες</i>	<i>33</i>
<i>3. Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου</i>	<i>36</i>
<i>ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ</i>	<i>39</i>
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	<i>40</i>

➤ Περίληψη

Η σημασία μιας σωστής διατροφής υπογραμμίζεται εδώ και πολλά χρόνια από ειδικούς σε διάφορους τομείς: ιατρούς, διαιτολόγους, τα τελευταία χρόνια ακόμη και ψυχολόγους. Ανά τακτά διαστήματα κυκλοφορούν στο εμπόριο διατροφικά προϊόντα “νέας γενιάς” τροποποιημένα με διάφορους τρόπους, σε μια προσπάθεια πολλών εταιριών να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες απαιτήσεις των καταναλωτών για προϊόντα πιο υγιεινά και όλο και πλουσιότερα σε θρεπτικά συστατικά. Έτσι, πολύ συχνά τα τελευταία χρόνια βλέπουμε εταιρίες να λανσάρουν προϊόντα εμπλουτισμένα με βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες, κλπ. Μια κατηγορία ουσιών που πρόσφατα έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων είναι οι λεγόμενες πρεβιοτικές ουσίες. Ως πρεβιοτική ορίζεται μια ουσία η οποία δεν πέπτεται από τα ένζυμα του στομάχου του ανθρώπου, αλλά αποτελεί τροφή για τη φυσική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, συγκεκριμένα για βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, επάγοντας την αύξηση και την αποτελεσματικότερη δράση των συγκεκριμένων πληθυσμών, και βελτιώνοντας έτσι τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με την κλωνοποίηση και έκφραση σε βακτήρια *E.coli* του γονιδίου της ιμβερτάσης του μύκητα *Phaffia rhodozyma*. Η συγκεκριμένη ιμβερτάση, κατά τη διάσπαση σακχάρων όπως η σακχαρόζη και η μαλτόζη παράγει σημαντικές ποσότητες ορισμένων από τις πιο δραστικές πρεβιοτικές ουσίες. Έτσι, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, αντικαθιστώντας τις μεθόδους που ακολουθούνται μέχρι τώρα και που περιλαμβάνουν τη χρήση βακτηρίων του γένους *Aspergillus* και *Saccharomyces*, χωρίς θεαματικά αποτελέσματα.

➤ Εισαγωγή

1. Πρεβιοτικές ουσίες

Πρεβιοτικές ονομάζονται οι ουσίες εκείνες που περιέχονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα, δεν πέπτονται από ένζυμα του στομάχου του ανθρώπου, επομένως φθάνουν αναλλοίωτες στο παχύ έντερο, και επάγουν επιλεκτικά τον πολλαπλασιασμό και την καλύτερη λειτουργία των βακτηριακών στελεχών που αποτελούν την φυσική μικροχλωρίδα του εντέρου (Ewaschuk, 2006).

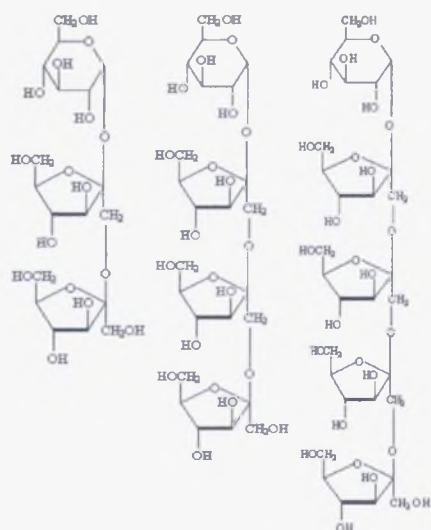
Συχνά συγχέεται η έννοια της πρεβιοτικής ουσίας με αυτήν της προβιοτικής. Προβιοτικές, ονομάζονται συγκεκριμένες κατηγορίες ζωντανών οργανισμών που περιέχονται (φυσικά ή μη) σε τρόφιμα, επιβιώνουν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου αλλά και στο αλκαλικό του εντέρου και προσφέρουν στον ξενιστή τους περαιτέρω θετικές επιδράσεις εκτός από τη διατροφική τους αξία. Ο όρος “ζωντανός οργανισμός” αναφέρεται συνήθως σε καλλιέργειες βακτηρίων όπως τα *Lactobacillus* ή τα *Bifidobacterium*, που υπάρχουν εκ των προτέρων ως μέρος της ωφέλιμης μικροχλωρίδας του εντέρου, και τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν θετικές επιπτώσεις προστιθέμενα σε τρόφιμα (Bengmark, 2006). Ωστόσο, θετικά οφέλη έχει ανιχνευθεί ότι προσφέρουν και άλλα είδη μικροοργανισμών όπως ο *Saccharomyces boulardii* κ. ά.

Διαφαίνεται λοιπόν σαφώς από τους παραπάνω ορισμούς η διαφορά μεταξύ προβιοτικών και πρεβιοτικών ουσιών, ήτοι πως οι προβιοτικές ουσίες είναι οι ίδιοι οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, ενώ πρεβιοτικές είναι οι ουσίες που επάγουν την ανάπτυξη αυτών και τους βοηθούν να ανταγωνιστούν αποτελεσματικά τα παθογόνα στελέχη που αναπόφευκτα υπάρχουν στον εντερικό σωλήνα. Σε πολλές έρευνες έχει μελετηθεί η ταυτόχρονη χρήση σε διατροφικά προϊόντα πρεβιοτικών και προβιοτικών ουσιών για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών που αναφέρονται εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα. Τέτοια προϊόντα, τα οποία είτε περιέχουν τις ουσίες αυτές φυσικά είτε τους προστίθενται εξωγενώς (πράγμα που είναι και το πιο σύνηθες), ονομάζονται συνβιοτικά (synbiotics), και τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής είναι αρκετά ενθαρρυντικά.

Συγκεκριμένα, σε ένα φυσιολογικό πεπτικό σωλήνα, συναντώνται βακτηριακά στελέχη τόσο ωφέλιμα, όσο και δυνητικά παθογόνα. Από έρευνες έχει βρεθεί, ότι το ποσοστό των ωφέλιμων μικροβίων φτάνει στην καλύτερη περίπτωση μόλις το ένα τρίτο του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (Gibson, 2004, Roberfroid, 2005). Στην αύξηση αυτού ακριβώς του ποσοστού μπορούν να βοηθήσουν οι πρεβιοτικές ουσίες, οι οποίες είναι κυρίως ολιγοσακχαρίτες και χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες, οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι οι εξής:

- Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS): πρόκειται για ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από τρεις έως πέντε μονάδες D-γλυκόζης ή D-φρουκτόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με β -2→1

γλυκοσιδικούς δεσμούς (εικ. 1, Roberfroid, 2000). Απαντώνται σε διάφορα τρόφιμα, όπως η μπανάνα, το κρεμμύδι, το σκόρδο, το κριθάρι, το σιτάρι και η τομάτα. Μία από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις FOS έχει ανιχνευθεί στις αγκινάρες (Farnworth, 1997).

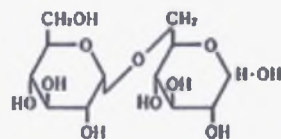


Εικόνα 1. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: 1-κεστόζη, νυστόζη, 1-β-φρουκτοφουρανοσυλ-νυστόζη

Τα βακτήρια που επωφελούνται από αυξημένες συγκεντρώσεις FOS, είναι κυρίως τα bifidobacteria, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν οξικά και λακτικά οξέα, προς αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων στελεχών καθώς και διευκόλυνση της πέψης του εντέρου (McFarlane, 2006). FOS που αποτελούνται από περισσότερες από 5 μονάδες μονοσακχαριτών (μέχρι και 60), ονομάζονται ινουλίνες, κατηγορία ουσιών πολύ χρήσιμη στη βιομηχανία των τροφίμων, αφού χρησιμοποιούνται ευρέως ως βελτιωτικά γεύσης και υφής, και έχουν επίσης πολλές ευεργετικές ιδιότητες στην ομοιοστάση του εντέρου (Ewaschuk, 2006). Η υδρόλυση μορίων ινουλίνης επίσης χρησιμοποιείται βιομηχανικά προς παραγωγή FOS.

- Ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (IMOS): αποτελούνται από άτομα γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με α-D-(1-6) γλυκοσιδικούς δεσμούς, π. χ. ισομαλτόζη (εικ. 2), πανόζη, ισομαλτοτετραόζη, ισομαλτοπενταόζη κλπ. Προωθούν την ανάπτυξη των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*.

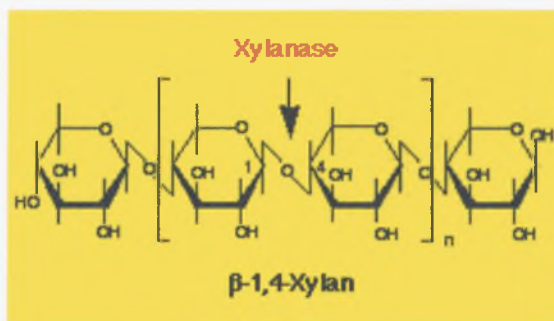
Isomaltose



[α] _D²⁰ : 121.5° (H₂O)
 分子量 : 342.3

Εικόνα 2. Δομή της ισομαλτόζης

- Ξυλοολιγοσακχαρίτες: αποτελούνται από μονομερή ξυλόζης, συνδεδεμένα μεταξύ τους με β(1-4) γλυκοσιδικούς δεσμούς και προκύπτουν από τη διάσπαση του πολυσακχαρίτη ξυλάνη από το ένζυμο ξυλανάση (εικ. 3, Zhu, 2006). Έχουν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των FOS, ενώ επιπλέον είναι μόρια σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH. Παρ' όλα αυτά, το σχετικά υψηλό κόστος παραγωγής και

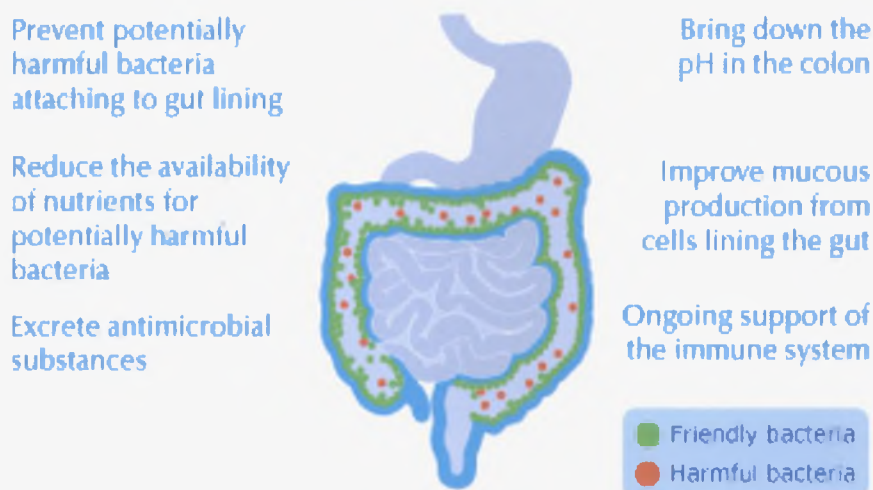


Εικόνα 3. Δομή της ξυλάνης.

καθαρισμού τους δεν έχει επιτρέψει μέχρι στιγμής την ευρεία χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων (Alonso, 2001).

2. Ευεργετικές ιδιότητες των πρεβιοτικών ουσιών

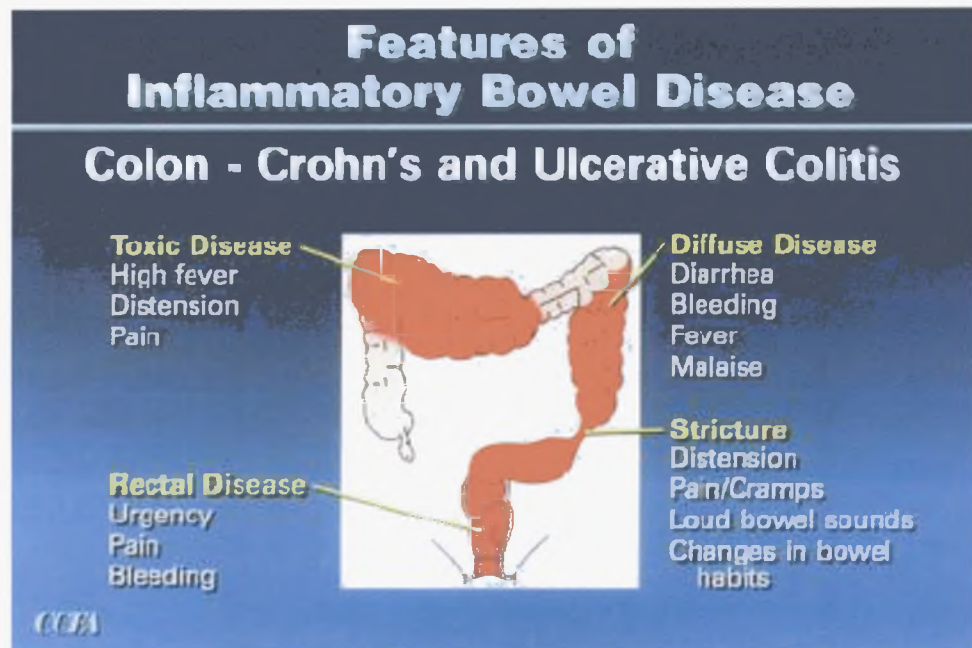
Οι πρεβιοτικές ουσίες, είτε σε τρόφιμα στα οποία απαντώνται φυσικά, είτε σε άλλα στα οποία προστίθενται εξωγενώς μετά από ειδικές κατεργασίες (γάλα, γιαούρτι, κ. ά.), προσφέρουν πολλά οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό, αφού επιδρούν καταλυτικά στην καλή υγεία και σωστή λειτουργία του εντέρου (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Συνοψίζονται οι ευεργετικές επιδράσεις των πρεβιοτικών ουσιών στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα.

Πρωτίστως, όπως προαναφέρθηκε, η θετική επίδραση των πρεβιοτικών ουσιών συνίσταται στην επιλεκτική επαγωγή της ανάπτυξης της ωφέλιμης μικροβιακής χλωρίδας του εντερικού σωλήνα. Το γεγονός αυτό, με τη σειρά του, έχει μια σειρά άλλων επιδράσεων, όπως για παράδειγμα την αναπόφευκτη μείωση του πληθυσμού διαφόρων παθογόνων βακτηρίων και την αποφυγή με αυτό τον τρόπο λοιμώξεων στη συγκεκριμένη περιοχή. Επίσης, διασπώντας τις πρεβιοτικές ουσίες, τα βακτηριακά αυτά στελέχη (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) παράγουν αυξημένο αριθμό SCFA (Short Chain Fatty Acids) και κυρίως βουτυρικού, τα οποία εκτός του ότι συμβάλλουν στη μείωση των τριγλυκεριδίων και της «κακής» χοληστερόλης (Roberfroid, 2000), βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών όπως το IBD (Inflammatory Bowel Disease, Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου), κλινικές εκδηλώσεις του οποίου αποτελούν η ελκώδης κολίτιδα και η ασθένεια του Crohn (Geier, 2006). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μείωσης των επιπέδων της IL-1β και αύξησης αυτών του TGF-α, πράγμα που συμβαίνει με αδιευκρίνιστους ακόμη μηχανισμούς (Hoentjen, 2005). Ειδικά όσον αφορά στην ασθένεια του Crohn (εικ. 5), ιδιαίτερα ευεργετική έχει αποδειχθεί η επίδραση των FOS, οι οποίοι προκαλούν τροποποιήσεις στη δομή των Toll-like

receptors καθώς και στην έκφραση της IL-10. Έτσι, παρατηρείται δραστική βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων των ασθενών (Lindsay, 2006).



Εικόνα 5. Κλινικά συμπτώματα των IBD, ασθένειες που χαρακτηρίζονται από οίδημα του εντερικού σωλήνα, και μπορεί να οφείλονται σε μια πληθώρα αιτιών.

Ακόμη, αφθονία πρεβιοτικών ουσιών στον εντερικό σωλήνα, δημιουργεί δυσμενείς συνθήκες για την προσκόλληση παθογόνων οργανισμών στο βλεννώδες επιθήλιο, αφ' ενός λόγω της αυξημένης παραγωγής SCFA (Sartor, 2004) και αφ' εταίρου διότι οι πρεβιοτικές ουσίες, μιμούμενες κάποιους προσδέτες παθογόνων βακτηρίων, συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Shoaf, 2006), εμποδίζοντας έτσι ανταγωνιστικά την πρόσδεση των παθογόνων.

Εκτός αυτού, οι πρεβιοτικές ουσίες, ευνοούν σε μεγάλο βαθμό την απορρόφηση ορισμένων μετάλλων στον εντερικό σωλήνα, κυρίως του ασβεστίου και του μαγνησίου. Βοηθούν έτσι στην καλή υγεία των οστών και την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Ohta, 2006), και για αυτόν ακριβώς τον λόγο μεγάλες εταιρείες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν ήδη αρχίσει να εμπλουτίζουν τα προϊόντα τους σε πρεβιοτικές αλλά και προβιοτικές ουσίες.

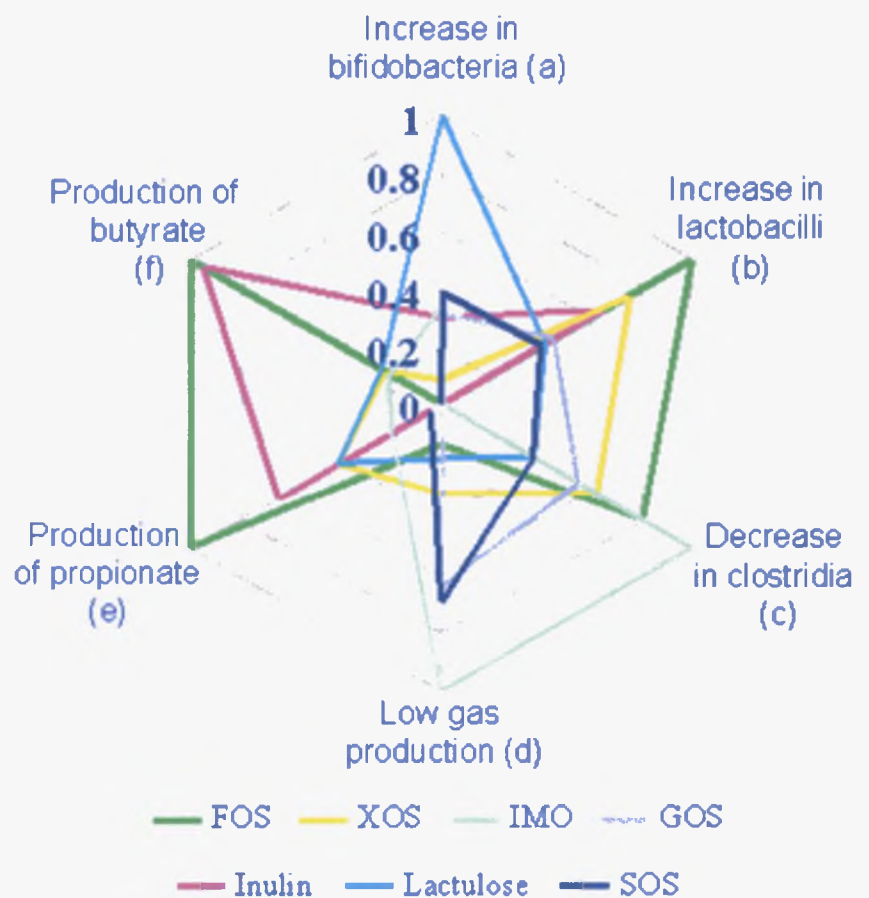
Έρευνες έχουν δείξει, ότι οι πρεβιοτικές ουσίες θα μπορούσαν να παίξουν ρόλο ακόμη και στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, αφού η αύξηση των ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών οδηγεί σε ύφεση οποιασδήποτε εντερικής λοίμωξης, τοπική ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αντι-ογκογενετική δραστηριότητα. Επιπλέον, οι ίδιες οι πρεβιοτικές ουσίες προσδέονται σε καρκινογόνες ουσίες που περιέχονται σε πολλά διατροφικά προϊόντα και κυρίως σε τυποποιημένα κρέατα, βοηθώντας έτσι στην έγκαιρη εξουδετέρωση και απέκκρισή τους. Επιπλέον, σε κάποιες μελέτες, έχει βρεθεί ότι ορισμένες πρεβιοτικές ουσίες

προκαλούν μείωση της παραγωγής της β-γλυκουρονιδάσης, βακτηριακού ενζύμου που υδρολύει και ενεργοποιεί προ-καρκινογόνες ουσίες (Geier, 2006). Συγκεκριμένα οι FOS μειώνουν τη μεταλλαξιγόνο δραστηριότητα ενζύμων όπως η νιτρορεδοουκτάση (Simmering, 2001). Στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου βοηθά και η αυξημένη παραγωγή βουτυρικού οξέος και άλλων SCFA (Wollowski, 2001). Εκτός όμως από τους ενήλικες, πολύ σημαντικός είναι ο ρόλος των πρεβιοτικών ουσιών και στη διατροφή των νηπίων. Για την ακρίβεια, σημαντικές συγκεντρώσεις πρεβιοτικών ουσιών έχουν ανιχνευθεί στο μητρικό γάλα, και μετά από



Εικόνα 6. Παθογένεση της ατοπικής δερματίτιδας

διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι προστατεύουν τα νεογέννητα από διάφορες ασθένειες. Κατ' αρχήν και στην περίπτωση των νηπίων, συμβάλλουν στην εξασφάλιση μιας υγιούς αναλογίας ωφέλιμων-παθογόνων μικροοργανισμών στον εντερικό σωλήνα, αυξάνοντας τον αριθμό των *Bifidobacterium* (Knoll, 2005). Επιπλέον, αλλάζουν το ανοσολογικό προφίλ της συγκεκριμένης περιοχής, πράγμα που αντικατοπτρίζεται κυρίως στην επιτυ-χέστερη αντιμετώπιση της ατοπικής δερματίτιδας (εικ. 6) σε νήπια στα οποία χορηγούνται πρεβιοτικές ουσίες (Passeron, 2006), αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτό επιτυγχάνεται

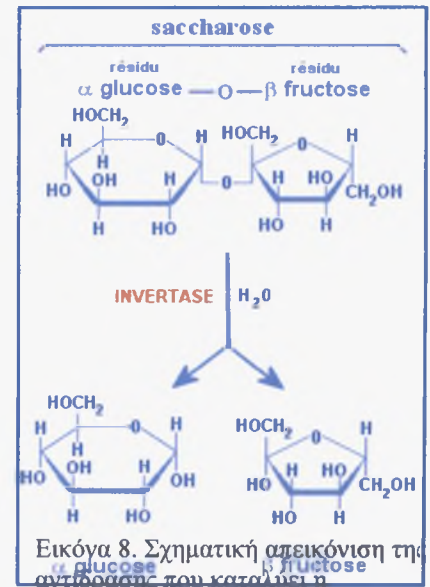


Εικόνα 7. Περιγραφή της αλληλεπίδρασης διαφόρων ειδών πρεβιοτικών ουσιών μεταξύ τους αλλά και με τη μικροχλωρίδα του εντέρου.

είναι ακόμη άγνωστος (Moro, 2006). Ύστερα από όσα ειπώθηκαν, γίνεται προφανής η ανάγκη για πιο εκτεταμένη έρευνα, τόσο όσον αφορά στους μηχανισμούς με τους οποίους οι πρεβιοτικές ουσίες επιδρούν στην ομοιόσταση του εντερικού σωλήνα (εικ. 7), όσο και στην ανακάλυψη νέων, αποτελεσματικότερων και φθηνότερων τρόπων παραγωγής των ουσιών αυτών σε βιομηχανική κλίμακα.

3. Ιμβερτάσες

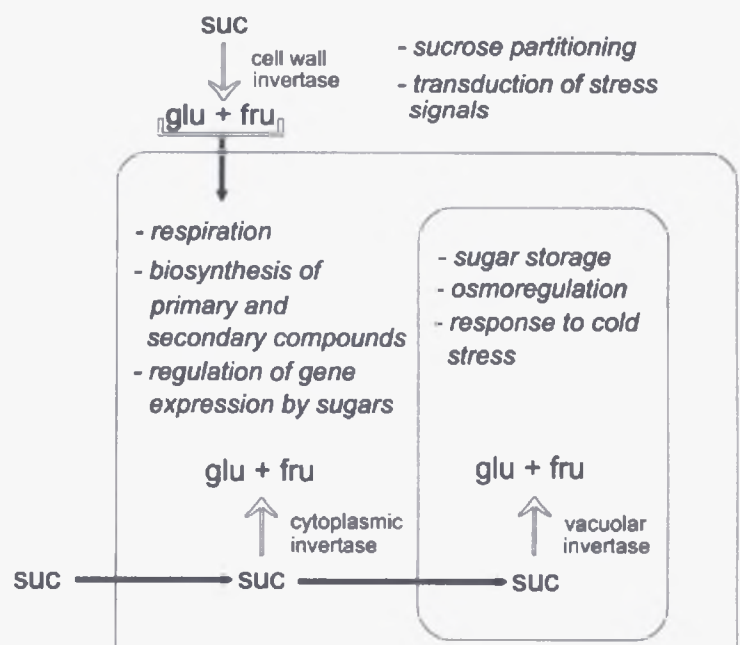
Οι ιμβερτάσες είναι ένζυμα που σε γενικές γραμμές καταλύουν τη διάσπαση της σουκρόζης σε α-D-γλυκόζη και β-D-φρουκτόζη (εικ. 8). Η ίδια αυτή αντίδραση καταλύεται επίσης και από την α-D-γλυκοσιδάση, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και απουσία οποιουδήποτε ενζύμου σε όξινο περιβάλλον. Το επίσημο όνομα των ιμβερτασών είναι β-φρουκτοφουρανοσιδάσες (EC 3.2.1.26), που σημαίνει ότι καταλύουν την υδρόλυση καταλοίπων β-φρουκτοφουρανοσίδης. Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ενζύμων, οι ιμβερτάσες παρουσιάζουν δραστηριότητα σε μεγάλο εύρος pH (3,5-5,5), με τη μέγιστη δραστηριότητα να παρατηρείται για τις περισσότερες από αυτές σε pH γύρω στο 4,5 και θερμοκρασία 55°C.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης που καταλύει η ιμβερτάση.

Οι κινητικές παράμετροι ποικίλλουν, αλλά για τις περισσότερες από τις ιμβερτάσες η k_m κυμαίνεται μεταξύ 2mM και 5mM. Απαντώνται σε ένα πλήθος οργανισμών, από μικροοργανισμούς όπως διάφορες ζύμες, που χρησιμοποιούνται και για τη βιομηχανική σύνθεσή της μέχρι φυτά και ζώα, όπως για παράδειγμα στις μέλισσες, που τη χρησιμοποιούν για να μετατρέψουν το νέκταρ σε μέλι.

Στα φυτά, οι ιμβερτάσες υπάρχουν σε διάφορες ισομορφές, των οποίων ο υποκυτταρικός εντοπισμός ποικίλλει (Sturm, 1999). Συγκεκριμένα, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στα χυμοτόπια, αλλά και εξωκυτταρικά (στα τοιχώματα του κυττάρου), θέσεις από τις οποίες φαίνεται ότι καθορίζουν την τύχη της συντιθέμενης σουκρόζης, προωθώντας την σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια κάθε φορά, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες



Εικόνα 9. Οι διάφορες λειτουργίες των ιμβερτασών στο φυτικό κύτταρο.

του φυτικού κυτάρου (εικ. 9). Καθ' ότι τα σάκχαρα στα φυτά δεν αποτελούν μόνο θρεπτικά στοιχεία, αλλά και ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (Koch, 1996) φαίνεται ότι εμμέσως οι ιμβερτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι οι εξωκυτταρικές ιμβερτάσες ρυθμίζονται από διάφορες φυτο-ορμόνες (Roitsch, 2004). Οι ισομορφές που εντοπίζονται στα χυμοτόπια και στα τοιχώματα του κυττάρου, έχουν παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες, αφού παρουσιάζουν μέγιστη δραστηριότητα σε pH μεταξύ 4,5 και 5, και καταλύουν τη διάσπαση και άλλων ολιγοσακχαριτών που περιέχουν κατάλοιπα β-φρουκτόζης. Αντιθέτως, οι κυτταροπλασματικές ιμβερτάσες είναι πιο δραστικές σε ουδέτερο προς αλκαλικό pH και (παρ' όλο που δεν είναι τόσο καλά χαρακτηρισμένες όσο οι προαναφερθείσες) φαίνεται να παρουσιάζουν εξειδίκευση στη σουκρόζη. Τέτοιου είδους «ουδέτερες» ιμβερτάσες, που δεν ανήκουν στην κατηγορία των β-φρουκτοφουρανοσιδασών, απαντώνται αποκλειστικά σε φυτά και φωτοσυνθετικά βακτήρια. Μάλιστα, στους οργανισμούς αυτούς, οι διαφορετικές ισομορφές ιμβερτασών κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, πράγμα που δεν ισχύει στην περίπτωση των μυκήτων (βλ. παρακάτω).

Οι ιμβερτάσες που απαντώνται στους μύκητες, είναι όλες β-φρουκτοφουρανοσιδάσες, επομένως δρουν πιο αποτελεσματικά σε pH 4,5 περίπου. Όπως και στην περίπτωση των φυτών, έτσι και στους μύκητες, απαντώνται ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές ιμβερτάσες. Σε αντίθεση όμως με τα φυτά, στους μύκητες μονάχα ένα γονίδιο, το SUC2, κωδικοποιεί την παραγωγή και των δύο ισομορφών, οι οποίες διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Η ενδοκυτταρική μορφή του ενζύμου, η οποία είναι μόνο μερικώς ενεργή, είναι ένα μονομερές το οποίο δεν υπόκειται σε περαιτέρω τροποποιήσεις μετά από τη μετάφραση. Η μορφή αυτή, εκφράζεται συνεχώς μέσα στο κύτταρο ανεξαρτήτως συνθηκών και παρουσίας θρεπτικών συστατικών. Η άλλη ισομορφή, που εκκρίνεται εκτός κυττάρου, περιλαμβάνει στο αμινοτελικό άκρο κάποια αμινοξέα παραπάνω, που δρουν ως σήμα υποκυτταρικού εντοπισμού, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το κυτταρόπλασμα στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα αμινοξέα αυτά, (που κυμαίνονται μεταξύ 14 και 28), προκύπτουν λόγω έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου από διαφορετικό σημείο του πρώτου εξονίου. Μετά από τη μετάφραση, η πολυπεπτιδική αλυσίδα γλυκοσυλιώνεται και αφού φτάσει στη μεμβράνη διμερίζεται, για να αποκτήσει την πλήρως δραστική μορφή της. Η παραγωγή της συγκεκριμένης ισομορφής, αναστέλλεται παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο (Tanaka, 1998), ενώ ακριβώς το αντίθετο συμβαίνει ελλείψη αυτής (Klein, 1989).

Ιμβερτάσες που παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα από διάφορα είδη μυκήτων, χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής κυρίως στη ζαχαροπλαστική, για παράδειγμα στην παραγωγή

σοκολάτας (εικ. 10), αλλά προσφάτως στην Ιαπωνία και τις Ηνωμένες Πολιτείες και για τη σύνθεση πρεβιοτικών ουσιών. Παρ' όλα αυτά, προς το παρόν η παραγωγή της είναι αρκετά ακριβή, αλλά όχι ιδιαίτερα αποδοτική, πράγμα που περιορίζει τις εφαρμογές και τη χρήση της. Για αυτόν ακριβώς το λόγο πραγματοποιούνται εκτεταμένες έρευνες με στελέχη μυκήτων που δεν έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί για αυτόν το σκοπό, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι τεχνικές παραγωγής του ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα.



Εικόνα 10. Μία από τις πιο κλασικές χρήσεις των μβερτασών στη ζαχαροπλαστική.

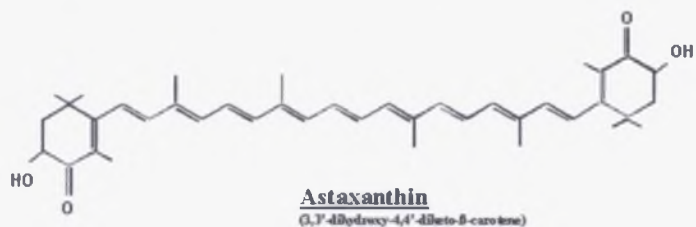
4. Η *Phaffia rhodozyma* και η ιμβερτάση της

Η *Phaffia rhodozyma* απομονώθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 από το Herman Phaff, στα πλαίσια των μελετών του τελευταίου πάνω στην οικολογία των μυκήτων (Johnson, 2003). Αρχικά, κατατάχθηκε στους βασιδιομύκητες, βάσει της μορφολογίας της, της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, τον τρόπο σχηματισμού του κάλυκα, το χρωματισμό της και τις μεταβολικές της ιδιότητες, αν και παρ' όλες τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, στην αρχή δεν κατέστη δυνατή η διαπίστωση σεξουαλικού κύκλου. Κάτι τέτοιο επετεύχθη πολύ αργότερα και μετά από πολλές αποτυχημένες προσπάθειες τόσο του Phaff όσο και των μαθητών του. Συγκεκριμένα, ομοθαλική σεξουαλική δραστηριότητα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1995 (Golubev, 1995) και συγκεκριμένα παιδογαμία, με μητρικά κύτταρα να ζευγαρώνουν με τα θυγατρικά τους, κάτι που δε συνηθίζεται μεταξύ βασιδιομυκήτων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν στελέχη του μύκητα που δεν έχουν την ικανότητα σχηματισμού βασιδίου και βασιδιοσπορίων (Kucsera, 1998), η δε σεξουαλική δραστηριότητα του μύκητα αναστέλλεται παρουσία αζώτου.

Η *Phaffia rhodozyma*, υποείδος της οποίας είναι ο *Xanthophyllomyces dendrorhous*, είναι από τους λίγους μικροοργανισμούς

που έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν το καροτενοειδές ασταξανθίνη (εικ. 11).

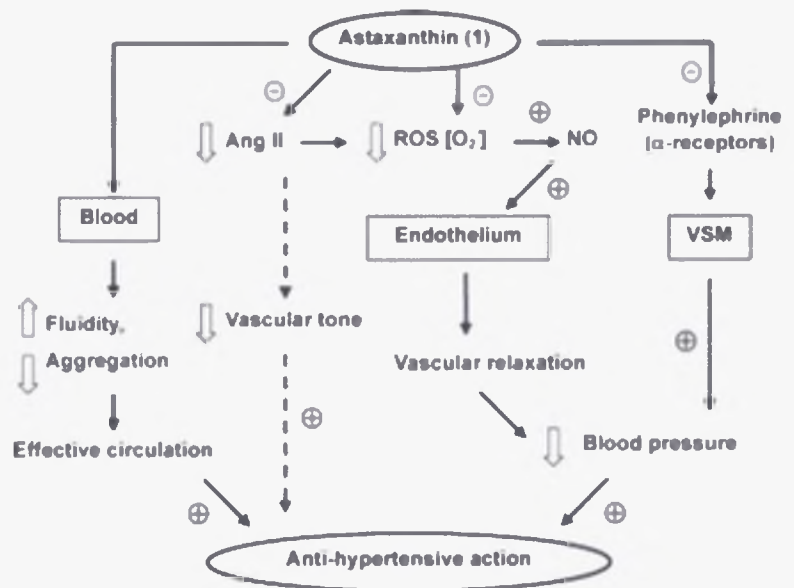
Το συγκεκριμένο καροτενοειδές, είναι υπεύθυνο για το σχεδόν πορτοκαλί χρώμα ζώων όπως τα φλαμίνγκο και πολλών θαλασσιών, όπως ορισμένων



Εικόνα 11. Δομή της ασταξανθίνης.

ειδών πέστροφας, των αστακών, των γαρίδων αλλά και των σολωμών. Στον τελευταίο,

ασταξανθίνη προστίθεται εξωγενώς κατά την κατεργασία του στη βιομηχανία τροφίμων, αφού το πιο έντονο πορτοκαλί χρώμα καθιστά το συγκεκριμένο προϊόν πιο ελκυστικό στον καταναλωτή. Μάλιστα, ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή ασταξανθίνης, είναι η *Phaffia rhodozyma*, πράγμα που προσδίδει ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον στο μικροοργανισμό, αφού πρόσφατα



Εικόνα 12. Μηχανισμός αντι-υπερτασικής δράσης της ασταξανθίνης.

έχουν αποδοθεί στην ασταξανθίνη αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Πράγματι, η φυσιολογική λειτουργία της ασταξανθίνης φαίνεται να είναι η προστασία του κυττάρου της *Phaffia* από τις ελεύθερες ρίζες και τις κυτταρικές βλάβες που αυτές προκαλούν, υπόθεση η οποία ενισχύεται από την ανακάλυψη ότι η σύνθεση της ασταξανθίνης ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από την ποσότητα των ελευθέρων ριζών που υπάρχουν στο κύτταρο (Shroeder, 1995). Επίσης, έχει και αντι-υπερτασική δράση (εικ. 12). Τα παραπάνω έχουν αποδειχθεί και από διάφορες έρευνες που έχουν διεξαχθεί κυρίως σε ποντίκια, στα οποία η ασταξανθίνη έχει επειδειξει αντικαρκινογενετική δράση, στην περίπτωση, για παράδειγμα, του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Tanaka, 1994, 1995). Επιπλέον, ενισχύει σημαντικά τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Jyonouchi, 1993, 1994, 1995), και προστατεύει αποτελεσματικά από το οξειδωτικό στρες, κυρίως στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς (Snodderly, 1995), όπου εκτός των άλλων βοηθά στην επούλωση τραυμάτων και αναστέλλει τον εκφυλισμό των φωτοϋποδοχέων (Tso and Lam, 1996).

Ένα άλλο περίεργο και άξιο αναφοράς γεγονός είναι ότι η ασταξανθίνη που παράγεται από την *Phaffia* έχει στερεοδιάταξη 3R,3'R, σε αντίθεση με την ασταξανθίνη που έχει ανιχνευθεί σε άλλους οργανισμούς, η οποία είναι της μορφής S. Αυτή ήταν και η πρώτη περίπτωση όπου ανιχνεύθηκε ένα φυσικά συντιθέμενο καροτενοειδές με διαφορετική οπτική στερεοδιάταξη από τη μέχρι τότε διαπιστωμένη (Johnson, 2003), πράγμα που ενίσχυσε το επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό των ενζύμων που συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της συγκεκριμένης ουσίας.

Η *Phaffia*, είναι ο μοναδικός γνωστός μύκητας, που παράγει καρτενοειδή ουσία και ταυτόχρονα έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει μεγάλη ποικιλία σακχάρων (Johnson, 2003). Ένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των σακχάρων αυτών, είναι και η ιμπερτάση με την οποία ασχολείται η παρούσα εργασία, η οποία σημειωτέον είναι και πολύ ασυνήθιστη σε σχέση με τις ιμπερτάσες άλλων μυκήτων. Συγκεκριμένα, έπειτα από κινητικές μελέτες του συγκεκριμένου ενζύμου που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας από τη Μαρία Dolores Linde López, διαπιστώθηκε ότι η συγκεκριμένη ιμπερτάση παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 65-70°C, και pH 6,5-7, ενώ όπως έχει προαναφερθεί, για τους περισσότερους μύκητες το αντίστοιχο pH είναι γύρω στο 4,5. Αυτό υποδηλώνει ότι στην περίπτωση μας δεν πρόκειται για μια φρουκτοφουρανοσιδάση με εξειδίκευση στη φρουκτόζη, αλλά για ένα ένζυμο για το οποίο ιδανικό υποστρώμα αποτελεί η σακχαρόζη. Πράγματι, ύστερα από μελέτες με διάφορα υποστρώματα (πίν. 1), φαίνεται πως το ένζυμο αναγνωρίζει πιο αποτελεσματικά ως υποστρώματα τη σακχαρόζη και την 1-κεστόζη (βλ. ενότητα 1). Πάνω στα δύο αυτά υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω κινητικές μελέτες προκειμένου να καθοριστούν οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου για το κάθε ένα από αυτά (πίν. 2).

Substrate	Specific activity (U / μ g)
Σακχαρόζη	3,75
Ραφινόζη	0,04
1-Κετόζη	0,227
Νιστόζη	0,072
Παλατινόζη	0,027

Πίνακας 1. Δραστηριότητα της ιμπερτάσης σε σχέση με διάφορα υποστρώματα.

Έπειτα από περαιτέρω αναλύσεις, βρέθηκε επίσης ότι και η συγκεκριμένη ιμπερτάση υπάρχει σε δύο μορφές, μία ενδοκυτταρική και μία εξωκυτταρική. Σε αντίθεση όμως με το σύνηθες, και οι δύο μορφές της συγκεκριμένης ιμπερτάσης παρατηρούνται N-γλυκοσυλιωμένες και μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό (44% για την ενδοκυτταρική και 67% για την εξωκυτταρική μορφή!). Η εξωκυτταρική μορφή, σε φυσιολογικές συνθήκες έχει μοριακό βάρος 214kDa, ενώ μετά από απογλυκοσυλίωση απομένει ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 66kDa.

Substrate	V_{max} (μ g Glucose ml ⁻¹ min ⁻¹)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)	K_{cat}/K_m (mM ⁻¹ min ⁻¹)
Sucrose	947	141	4	35,2
1-Kestose	257	38	5	7,6

Πίνακας 2. Κινητικές παράμετροι της ιμπερτάσης της *Phaffia rhodozyma* ως προς τα δύο υποστρώματα για τα οποία το ένζυμο επιδεικνύει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα.

5. Σκοπός της εργασίας

Στη συγκεκριμένη εργασία, επιχειρείται η κλωνοποίηση του γονιδίου της ιμπερτάσης σε κύτταρα *E.coli*, ώστε να μελετηθεί αρχικά η δραστικότητα του παραγόμενου πρωτεϊνικού μορίου, η δυνατότητα παραγωγής του σε μεγάλη κλίμακα σε περίπτωση που ανιχνευθεί δραστικότητα αλλά και κρυταλλοποίησή του προς ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης είτε τελικά προκύψει δραστικό μόριο είτε όχι. Μελλοντικοί στόχοι του εργαστηρίου αποτελούν, εκτός από την παραγωγή του ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα, την τροποποίηση της δραστικότητάς του με τη μέθοδο των κατευθυνόμενων μεταλλάξεων.

➤ **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

1. ΥΛΙΚΑ

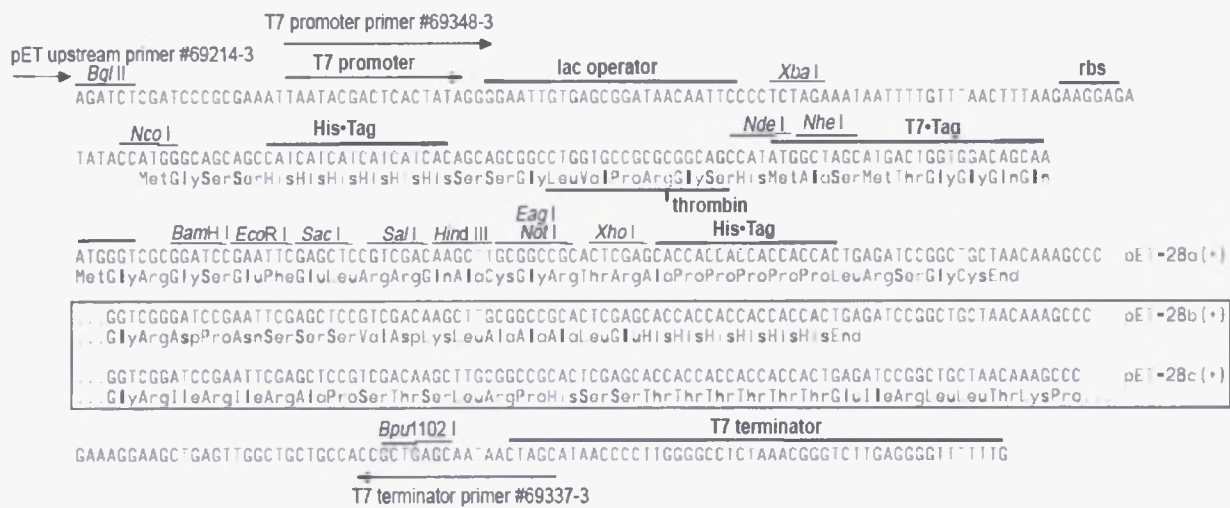
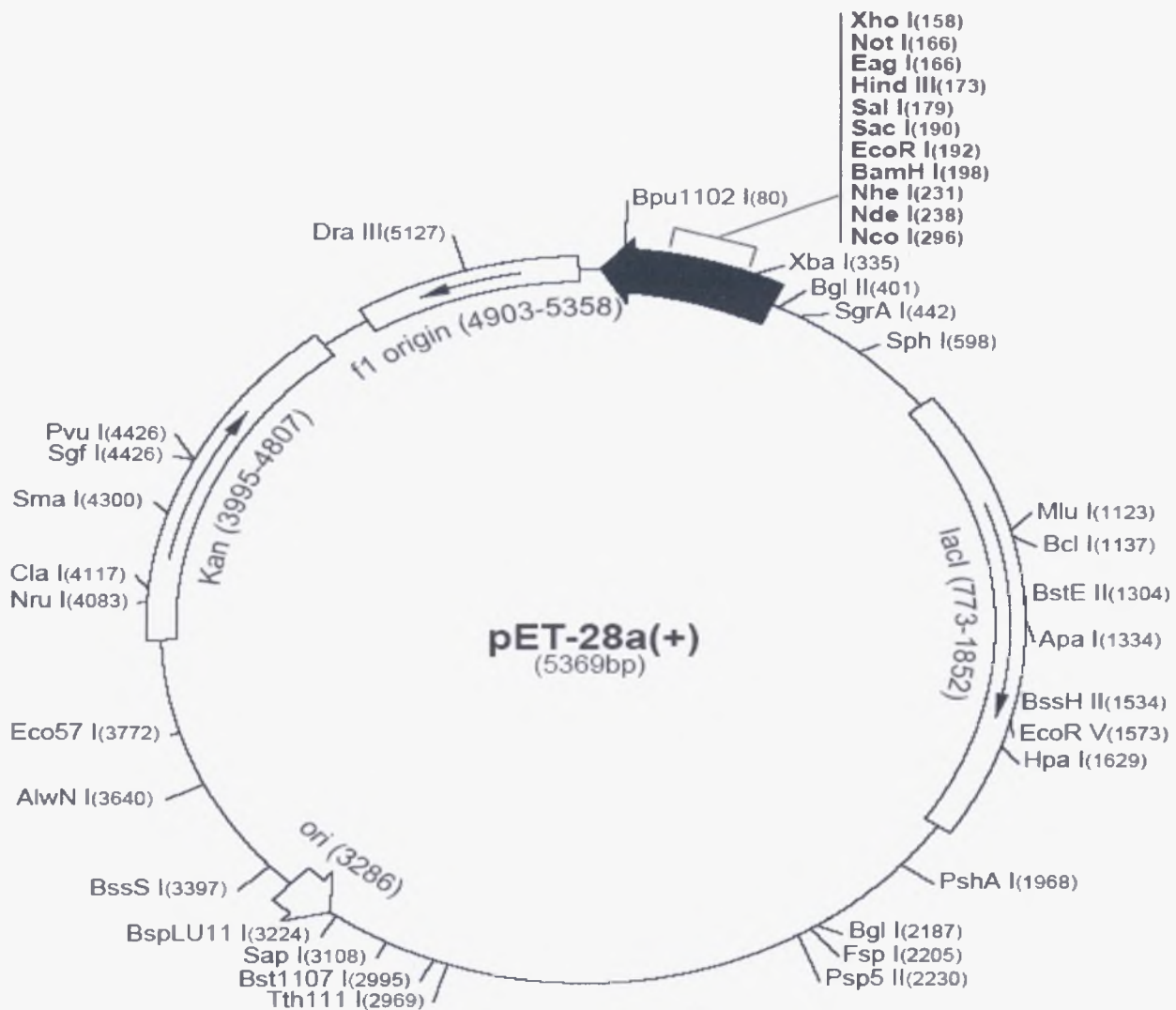
1.1 ΦΟΡΕΙΣ

1.1.α. pET 28-b (+)

Οι φορείς pET (Novagen, βλ. επόμενη σελίδα) είναι από τα καλύτερα συστήματα έκφρασης γονιδίων, η επαγωγή της οποίας γίνεται με IPTG, αφού το polylinker των φορέων βρίσκεται αμέσως μετά από το χειριστή του οπερονίου της λακτόζης. Ο συγκεκριμένος pET, όπως φαίνεται στην εικόνα, δίνει τη δυνατότητα τοποθέτησης στο αμινοτελικό αλλά και στο καρβοξυτελικό άκρο της εκφραζόμενης πρωτεΐνης μιας ουράς Ιστιδινών, προκειμένου να είναι εύκολος ο καθαρισμός της πρωτεΐνης μετά από την έκφραση, πράγμα που πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας (Zahn, 1997). Στην περίπτωση μας, η κατασκευή σχεδιάστηκε έτσι ώστε οι Ιστιδίνες να τοποθετηθούν στο αμινοτελικό άκρο, γιατί αμέσως μετά, ο φορέας περιλαμβάνει μια σύντομη αλληλουχία έξι αμινοξέων (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser), που αναγνωρίζεται και πέπτεται από τη θρομβίνη (Chang, 1985). Έτσι, μετά από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης είναι δυνατή η απομάκρυνση των Ιστιδινών.

Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν εκκινητές (βλ. 1.4.1.1) που περιείχαν τις αλληλουχίες αναγνώρισης του NdeI (εκκινητής αρχής του γονιδίου) και του HindIII (εκκινητής τέλους του γονιδίου). Στον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για το τέλος του γονιδίου εισήχθη και ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Έτσι, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, πέπτοντας το φορέα αλλά και το γονίδιο με τα δύο αυτά ένζυμα, το γονίδιο τοποθετείται αμέσως μετά από την αλληλουχία αναγνώρισης της θρομβίνης, πριν από την οποία είναι τοποθετημένες έξι Ιστιδίνες.

Επιπλέον, αυτό το πλασμίδιο, φέρει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, έτσι στη συνέχεια η επιλογή των κλώνων στους οποίους έχει μπει το πλασμίδιο γίνεται καλλιεργώντας τα κύτταρα σε μέσο που περιέχει καναμυκίνη.

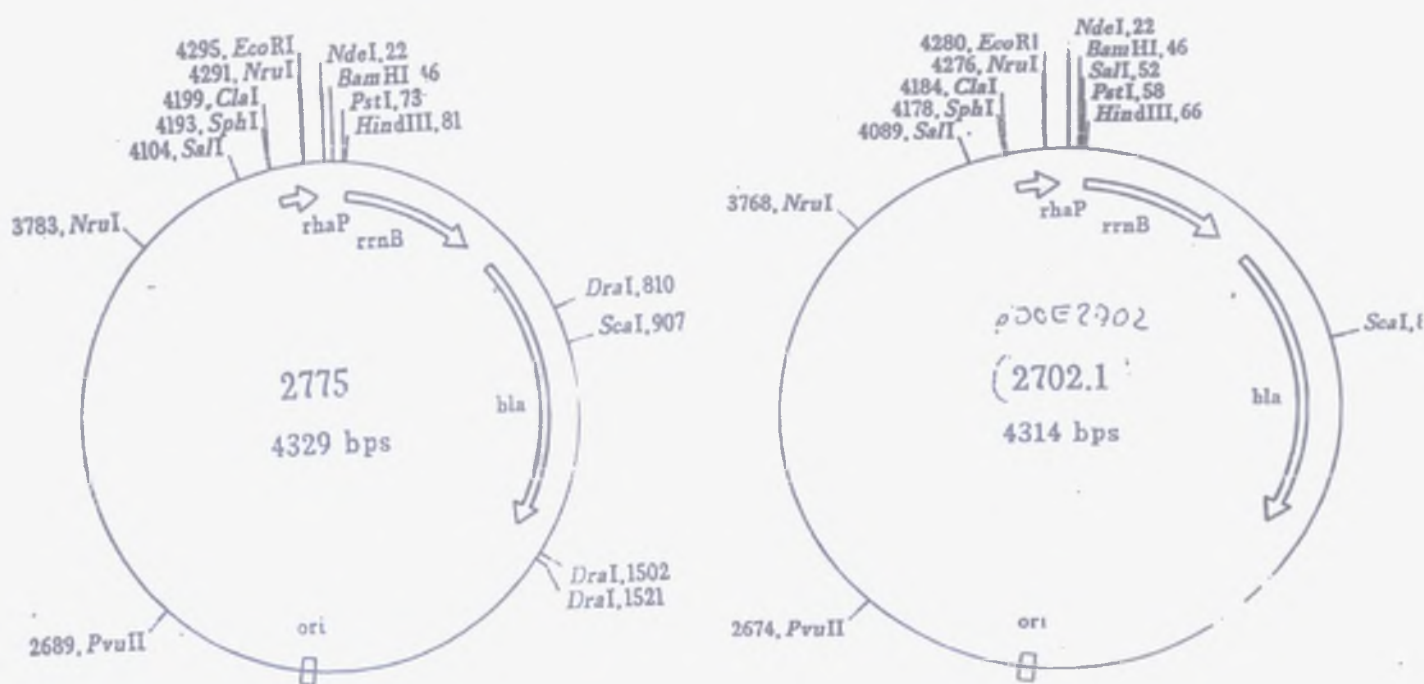


pET-28a-c(+) cloning/expression region

Εικόνα 13. Ο φορέας pET-28b(+), ευγενική παραχώρηση του Daniel Muñoz.

1.1.β. pJOE2702 και pJOE2775

Πρόκειται για δύο φορείς (εικ. 14), στους οποίους η έκφραση του γονιδίου επάγεται με τη χρήση ραμνόζης, μέθοδος η οποία δε δίνει τόσο καλά αποτελέσματα όσο η επαγωγή με IPTG, αλλά σε πολλές περιπτώσεις προτιμάται για αυτόν ακριβώς το λόγο. Επειδή με το IPTG παρατηρείται υπερβολική έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης, σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματίζονται συσσωματώματα, τα οποία είναι αδύνατον να διαλυτοποιηθούν και καθιστούν αδύνατο τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Αντίθετα, με τη χρήση της ραμνόζης, συνήθως αυτό το πρόβλημα δεν παρατηρείται.



Εικόνα 14. Τα πλασμίδια pJOE2702 και pJOE2775, ευγενική παραχώρηση του Dr. Anke Engels.

Οι δύο αυτοί φορείς είναι όμοιοι και προσδίδουν και οι δύο ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Η μοναδική διαφορά τους είναι ότι ο 2775, αμέσως μετά από το σημείο αναγνώρισης του BamHI, περιλαμβάνει μία αλληλουχία που κωδικοποιεί για 5 Ιστιδίνες (τακτική παρόμοια με αυτή του pET). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση στον 2702 ήταν οι ίδιοι με αυτούς του pET. Στην περίπτωση του 2775, όμως, δεν ήταν δυνατή η χρήση του ίδιου εκκινητή για το τέλος του γονιδίου, αφού εκτός του ότι δεν θα έπρεπε να περιλαμβάνει κωδικόνιο λήξης για να συνεχιστεί η μετάφραση μέχρι και μετά από την αλληλουχία των ιστιδινών, η πέψη έπρεπε υποχρεωτικά να γίνει με BamHI. Δυστυχώς, μετά από εισαγωγή της αλληλουχίας του γονιδίου στο πρόγραμμα gene runner, διαπιστώθηκε ότι το σημείο κοπής του BamHI περιλαμβάνεται στην αλληλουχία. Έτσι, σχεδιάστηκε ένας εκκινητής για το τέλος του γονιδίου (βλ. 1.4.1.1) χωρίς

κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης που περιείχε το σημείο κοπής του HindIII καθώς και την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα έξι αμινοξέα που αναγνωρίζει η θρομβίνη. Η επανασύνδεση του γονιδίου με το φορέα έγινε με blunt-end ligation.

1.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.2.1. Σε υγρό υπόστρωμα

1.2.1.α. LB-Amp

Για τελικό όγκο 1L:

- 10gr Triptone (BD)
- 10gr NaCl (Merck)
- 5gr Yeast Extract (BD)
- 1μg/mL αμπικιλίνη (AMRESCO), η οποία προστίθεται μετά την αποστείρωση του μέσου και αφού φτάσει σε θερμοκρασία <math><50^{\circ}\text{C}</math>.

1.2.1.β. LB-Kan

Για τελικό όγκο 1L:

- 10gr Triptone (BD)
- 7,2gr NaCl (Merck)
- 5gr Yeast Extract (BD)
- 1,6μg/mL καναμυκίνη (AMRESCO), η οποία προστίθεται μετά την αποστείρωση του μέσου και αφού φτάσει σε θερμοκρασία <math><50^{\circ}\text{C}</math>.

1.2.2. Σε στερεό υπόστρωμα

Βλ. 1.2.1.: Προστίθενται 15gr αγαρόζης για κάθε λίτρο μέσου.

1.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ (MINIPREPS)

1.3.α. Διάλυμα I

- 50mM γλυκόζη (Merck)
- 25mM Tris (Sigma) pH 8
- 10mM EDTA (SERVA)

1.3.β. Διάλυμα II

- 0,1% SDS (Merck)
- 0,2M NaOH (Merck)

1.3.γ. Διάλυμα III

- 60mL CH₃COOK 5M
- 11,5mL CH₃COOH (Riedel-Dehaen)
- 28,8mL H₂O

1.3.δ. RNAση (Sigma)

1.3.ε. Διάλυμα φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1

- Φαινόλη (GIBCOBRL)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοαμυλική αλκοόλη (Merck)

1.3.στ. Διάλυμα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1

Βλ. 1.3.ε.

1.3.ζ. EtOH (Amersham Biosciences)

1.3.η. Διάλυμα επαναδιάλυσης EB (QIAGEN)

1.4. PCR

1.4.1. PCR για ενίσχυση του προς κλωνοποίηση γονιδιακού τόπου

1.4.1.α. High Fidelity Polymerase kit (Roche)

1.4.1.β. dNTPs (Roche)

1.4.1.γ. Εκκινητές (ISOGEN)

- InvCab(+): 5'-TCTCAACCATATGCAAGATAACTCC-3'
- InvCol(-): 5'-ACGATAGTAAAGCTTTAGTAACCAGC-3'
- InvColTr(-): 5'-TGAAAAGCTTGGCTAACACGCGGCACCAGGTAACCAGCAAAGAG
ACCGTACATTGC-3'

■ : Σημείο κοπής NdeI, και κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης

■ : Σημείο κοπής HindIII

■ : Κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης

■ : Αλληλουχία κοπής της θρομβίνης

1.4.1.δ. cDNA (Γονιδιωματική βιβλιοθήκη María Dolores Linde López)

1.4.2. PCR για έλεγχο αποικιών

1.4.2.α. Expand Long Template kit (Roche)

1.4.2.β. dNTPs (Roche)

1.4.2.γ. Εσωτερικοί εκκινητές του γονιδίου της ιμπερτάσης (Isogen).

- GWMNDP(+)
- RDP(-)

- RDP(+)
- FVK(-)

1.5. ΠΕΨΕΙΣ

- 1.5.α. Buffer Tango (Fermentas)
- 1.5.β. BamHI (Fermentas, Amersham)
- 1.5.γ. HindIII (Fermentas)
- 1.5.δ. NdeI (Fermentas)

1.6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΓΑΣΗΣ

- 1.6.1. Κανονικές: Rapid Ligation kit (Roche)
- 1.6.2. Blunt end
 - 1.6.2.α. Mung Bean nuclease (Promega)
 - 1.6.2.β. Mung Bean nuclease buffer (Promega)
- 1.6.3.γ. Rapid Ligation kit (Roche)

1.7. ΚΥΤΤΑΡΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ

- 1.7.α. E. coli DH5a
- 1.7.β. E. coli XL1-Blue
- 1.7.γ. E. coli JM109

1.8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- 1.8.α. β-μερκαπταιθανόλη (BME)
- 1.8.β. Θρεπτικό μέσο SOC
- 1.8.γ. Τρυβλία petri (βλ. 1.2.2)

1.9. ΕΞΑΣΦΑΛΙΣΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- 1.9.α. CaCl₂ (Panreac)

1.10. ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

- 1.10.α. Ραμνόζη (Sigma)
- 1.10.β. Φίλτρα 22μm (MILLEX)
- 1.10.γ. Διάλυμα επαναδιάλυσης

- 50mM NaH₂PO₄ pH 8,0
- 300mM NaCl

1.10.δ. Loading Buffer

- 62,5mM Tris-HCl pH 6,8
- 0,02% SDS
- 5% β-μερκαπταιθανόλη

1.11. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

1.11.α. Gel ακρυλαμίδης 10%

- Ακρυλαμίδα (Merck)
- Bis-ακρυλαμίδα (Serva)
- Διάλυμα Tris-HCl pH 8,8
- SDS (Merck)
- APS (Merck)
- TEMED (BioRad)

1.11.β. Buffer ηλεκτροφόρησης (για 1L)

- 14gr γλυκίνη (Merck)
- 3gr Tris
- 1gr SDS

1.11.γ. Blue πρωτεϊνών

1.11.δ. Χρωστική Proto-Blue

1.12. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

1.12.α. Σακχαρόζη (Merck)

1.12.β. Buffer (για 1L)

- 82,3gr Na₂HPO₄ (Merck)
- 57,98gr NaH₂PO₄ (Merck)

1.12.γ. Διάλυμα A

- 1,7u/mL οξειδάση της γλυκόζης
- 0,8u/mL υπεροξειδάση

1.12.δ. Ορθοδιανισιδίνη 0,8%

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργειες κυττάρων

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν minipreps για την εξαγωγή των πλασμιδίων από κύτταρα *E.coli* DH5α, απαιτούνται υγρές καλλιέργειες των συγκεκριμένων κυττάρων, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν (κατά περίπτωση) 25 ή 50 mL LB σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250mL, στις οποίες γίνονταν με (επίσης αποστειρωμένο...) ενοφθαλμισμός μικρής ποσότητας κυττάρων από τρυβλία petri αποθηκευμένα σε θερμοκρασία 4°C. Οι καλλιέργειες αφήνονταν overnight σε θερμοκρασία 37°C με συνεχή και έντονη ανάδευση και την επόμενη μέρα ήταν δυνατή η απομόνωση του πλασμιδίου.

2.2. Minipreps

Τα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο, συλλέγονται με φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13.000rpm μετά από καλλιέργεια που περιγράφεται πιο πάνω (βλ. 2.1). Μετά από τη φυγοκέντρηση, το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα επαναδιαλύεται σε διάλυμα γλυκόζης (50mM), Tris (25mM pH 8,5), EDTA (10mM) και αφήνεται για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα 1% SDS 0,2M NaOH, και τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά σε πάγο. Κατά το συγκεκριμένο βήμα, το SDS σε αλκαλικό περιβάλλον συντελεί στη σταδιακή αποδιάταξη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Έπειτα, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού καλίου προς λύση του κυτταρικού τοιχώματος και ακολουθεί άλλη μια επώαση σε πάγο για άλλα 10 λεπτά. Το διάλυμα που έχει προκύψει φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 13.000 rpm και στη συνέχεια το υπερκείμενο επωάζεται με RNάση (Promega) για 1,5 ώρα τουλάχιστον, στους 37°C. Ακολούθως, προς καθίζηση των πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης και μετά από έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση ενός λεπτού σε 13.000rpm, ανακτάται η υδατική φάση, όπου κολυμπούν πλέον μόνο τα νουκλεϊκά οξέα. Προκειμένου το υπερκείμενο να απαλλαγεί εξ' ολοκλήρου από κάθε ίχνος φαινόλης, προστίθεται διάλυμα χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης, και μετά από όμοια φυγοκέντρηση ανακτάται και πάλι η υδατική φάση. Προς καθίζηση του DNA προστίθεται αιθανόλη 100% και το διάλυμα επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία -20° C. Τέλος, πραγματοποιούνται πλύσεις του DNA με διάλυμα αιθανόλης 70% και μετά από φυγοκέντρηση και καλό στέγνωμα, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα EB (QIAGEN).

2.3. PCR

2.3.1. PCR για ενίσχυση του προς έκφραση γονιδίου

Παρασκευάζεται μείγμα το οποίο για τελικό όγκο 25μL για κάθε σωληνάκι περιέχει:

Buffer 3: 2,5μL*

MgCl₂: 2,5μL*

Primers: 0,7μL/ κάθε έναν

dNTPs: 0,5μL

High Fidelity TaqPol: 0,2μL*

cDNA: 8μL

H₂O: 9,9μL

*(βλ. 1.4.1.α)

2.3.2. PCR για έλεγχο αποικιών

Αρχικά, από τρυβλία petri στα οποία έχουν ενοφθαλμιστεί μετασχηματισμένα κύτταρα, επιλέγονται τυχαία με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες κάποιες αποικίες, μέρος των οποίων μεταφέρεται σε ένα άλλο, αριθμημένο τρυβλίο petri ενώ η υπόλοιπη αποικία εναποτίθεται στο (επίσης αριθμημένο) σωληνάκι της PCR, στο οποίο έχουν τοποθετηθεί από πριν 8μL απεσταγμένου H₂O. Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 17μL PCR mix, παρασκευασμένο ομοίως με το προαναφερθέν, αλλά όχι με πολυμεράση High Fidelity, αλλά απλή (βλ. 1.4.2.α).

2.3.3. Καθαρισμός προϊόντων PCR προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για πέψεις

Ο καθαρισμός όλων των PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε με το Nucleotide Removal Kit (QIAGEN).

2.4. Πέψεις

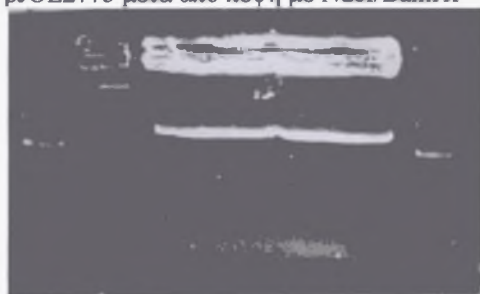
Όλες οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25μL με την ποσότητα του DNA να ποικίλλει κάθε φορά ανάλογα με την απόδοση των καθαρισμών και των minipreps. Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιούνταν σε gel ακρυλαμίδης 1,5% για τα πλασμίδια και 0,7% για τα προϊόντα της PCR. Παρακάτω φαίνονται οι ποσοτικοποιήσεις (εικ. 15) και το πρωτόκολλο (πίν. 3) που ακολουθήθηκε για τις διπλές πέψεις.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα όλων των πέψεων καθαρίζονταν με το ίδιο kit της QIAGEN, που χρησιμοποιήθηκε για τα προϊόντα της PCR ακολουθώντας το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο. Δοκιμάστηκε και ο καθαρισμός των πλασμιδίων από gel ακρυλαμίδης κόβοντας τη μπάντα, με παρεμφερές kit της ίδιας εταιρείας, αλλά τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά (εικ. 16).

Πίνακας 3. Διπλές πέψεις των φορέων κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και των προϊόντων της PCR μετά από καθαρισμό τους.

Vf=25μL	pJOE2702	pJOE2775	pET-28b(+)	Inserts
Buffer Tango	2,5μL	2,5μL	2,5μL	2,5μL
NdeI	0,3μL	0,3μL	0,3μL	0,3μL
HindIII	0,3μL		0,3μL	0,3μL
BamHI		0,3μL		
Vec/Ins	8μL	8μL	12μL	20μL
H ₂ O	14μL	14μL	10μL	2μL

pJOE2775 μετά από πέψη με NdeI/BamHI



Ο φορέας μετά από τον καθαρισμό.



Εικόνα15 . Καθαρισμός μπάντας από gel με το quick extraction kit της εταιρείας QIAGEN.

2.5. Αντιδράσεις λιγάσης

marker InvCol InvColTr 2702 2775 pET marker



Εικόνα 16. Ποσοτικοποιήσεις προς υπολογισμό pmol για τις αντιδράσεις λιγάσης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση όλων των μορίων DNA σε gel ακρυλαμίδης 0,7% (εικ. 8) και υπολογίστηκαν τα pmol DNA που περιέχονταν σε κάθε δείγμα, προκειμένου να προστεθούν στο μείγμα της αντίδρασης σε αναλογία Vec/Ins 1:2 και 1:3.

2.5.1. Σύνδεση με το insert, των φορέων pJOE2702 και pET-28b(+)

Σε αυτήν την περίπτωση, αφού τα πλασμίδια και το γονίδιο είναι κομμένα με τα ίδια ένζυμα, δε χρειάστηκε καμμία ειδική κατεργασία κανενός από τα δύο, παρά μόνο προετοιμασία του μείγματος (πίνακας 4). Μετά από επώαση 10' σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C για 10', προς απενεργοποίηση της λιγάσης (προαιρετικό βήμα).

Vf=10μL	1:2	1:3	C-	C _{rel}
Buffer	3,2μL	3,2μL	3,2μL	3,2μL
Λιγάση T4	0,8μL	0,8μL	—	0,8μL
Πλασμίδιο	4μL	4μL	2,5μL	3μL
Γονίδιο	1μL	1,5μL	0,5μL	—
H ₂ O	1μL	0,5μL	4μL	3μL

Πίνακας 4. Αντιδράσεις λιγάσης για σύνδεση των φορέων με το προς έκφραση γονίδιο.

2.5.2. Σύνδεση με το insert, του φορέα pJOE2775

Παρατηρώντας τον πίνακα 3, βλέπουμε ότι το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι κομμένο με διαφορετικό ένζυμο περιορισμού από ότι η αλληλουχία του τέλους του γονιδίου. Έτσι, για αυτήν την κατασκευή ακολουθήθηκε διαφορετική τακτική. Συγκεκριμένα, αφού ετοιμάστηκε μείγμα για αντίδραση λιγάσης όπως φαίνεται στον πίνακα 3, μετά από τη δεκάλεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, η λιγάση απενεργοποιήθηκε. Έτσι, κατά τη διάρκεια των 10 αυτών λεπτών, συνδέθηκαν τα συμπληρωματικά κολλώδη άκρα που είχαν κοπεί με το ένζυμο NdeI. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1μL buffer της νουκλεάσης Mung Bean, και 0,15μL ενζύμου. Το ένζυμο αυτό, που απομονώνεται από σπόρους *Phaseolus aureus* παρουσιάζει υπό προϋποθέσεις εξειδίκευση για μονόκλιωνα άκρα τα οποία και αποικοδομεί με κατεύθυνση είτε 5' είτε 3' (αν και χρησιμοποιείται και για διάφορες άλλες εφαρμογές, Vernick, 1988, McCutchan, 1984). Στην προκειμένη περίπτωση, δεν ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του φυλλαδίου του προμηθευτή, όπου συστήνεται η επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία 37°C. Προτιμήθηκε η επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, επειδή το ένζυμο παρέχεται σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση (100u/μL), στην οποία αν η ποσότητα του DNA είναι μικρότερη του 1μg, η συγκεκριμένη νουκλεάση αποικοδομεί και δίκλιωνα μόρια. Για αυτό το λόγο, το μείγμα επώαστηκε για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε απενεργοποίηση της νουκλεάσης, ομοίως με τη λιγάση. Προέκυψαν έτσι γραμμικά μόρια DNA με blunt ends. Έπειτα, ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με το γνωστό kit της QIAGEN, αφού

για να πραγματοποιηθεί blunt-end ligation το δείγμα δεν πρέπει να περιέχει καθόλου άλατα. Το DNA μετά από τον καθαρισμό επαναδιαλύθηκε σε τελικό όγκο 10μL στα οποία προς κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων, προστέθηκαν 2,8μL buffer και 1μL λιγάσης. Το μείγμα ξαναεπώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10'. Μετά από απενεργοποίηση της λιγάσης, τα δείγματα ήταν έτοιμα προς χρήση για μετασχηματισμό των κυττάρων ξενιστών (βλ. επόμενη ενότητα).

2.6. Μετασχηματισμός κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Sambrook et. Al., με μικρές τροποποιήσεις. Από τους -70°C ξεπαγώθηκαν κύτταρα *E.coli* XL1-Blue. Σε έξι σωληνάκια erpendorf τοποθετήθηκαν από 100μL κυττάρων. Προστέθηκαν 5μL β-μερκαπταιθανόλης και 5μL από τα μείγματα των αντιδράσεων λιγάσης. Τα δείγματα επώαστηκαν σε πάγο για 30', και ακολούθησε πρόκληση θερμικού σοκ. Από τον πάγο, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο 42°C για 40'' και στη συνέχεια ξανά στον πάγο για 2'. Έπειτα, προστέθηκαν 900μL μέσου SOC και τα δείγματα αφέθηκαν για μία ώρα στους 37°C με συνεχή και έντονη ανάδευση. Τέλος, 500mL από το κάθε μείγμα ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία Petri μέσου LB, με το αντίστοιχο αντιβιοτικό για κάθε φορά. Οι πλάκες για κάθε κατασκευή είχαν ως εξής:

- 1:2
- 1:3
- C-
- C_{rel} (μόνο το πλασμίδιο με λιγάση προς έλεγχο της αντίδρασης πέψης)
- C⁺ (κύτταρα μετασχηματισμένα μόνο με το πλασμίδιο, χωρίς insert, προς έλεγχο της σωστής εκτέλεσης του πρωτοκόλλου.)
- C_{cells} (κύτταρα χωρίς πλασμίδιο, προς έλεγχο αυτών.)

Οι πλάκες αφέθηκαν overnight στους 37°C και την επόμενη μέρα ακολούθησε PCR αποικιών (βλ. 2.3.2.)

2.7. Εξασφάλιση δεκτικών κυττάρων

Η πρώτη κυτταρική σειρά στην οποία είχε εισαχθεί το πλασμίδιο (*E.coli* XL1-Blue), δεν είναι κατάλληλη για έκφραση του ξενογονιδίου. Πρόκειται μονάχα για έναν ενδιάμεσο ξενιστή ο οποίος συμβάλλει στη σταθεροποίηση της κατασκευής και στην αποτελεσματική αλληλούχισή της. Για την έκφραση του γονιδίου επομένως, είναι αναγκαία η μεταφορά του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τα κύτταρα *E.coli* XL1-Blue σε κύτταρα *E.coli* JM-109. Προηγουμένως όμως,

πρέπει τα κύτταρα JM-109 να κατασταθούν δεκτικά σε μετασχηματισμό με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πράγμα για το οποίο πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με CaCl_2 , σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Maniatis et. al., (1982), που αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου των Cohen et. al. (1972). Το CaCl_2 καθιστά τη μεμβράνη των κυττάρων διαπερατή σε μακρομόρια. Ακολουθεί μετασχηματισμός των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 2.6 (παραλείποντας την επώαση με β-μερκαπταιθανόλη) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που έχει απομονωθεί από θετικούς κλώνους με miniprep και έχει σταλεί για αλληλούχιση (υπηρεσία αλληλούχισης Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid). Πριν από την επαγωγή της έκφρασης, πραγματοποιήθηκε PCR αποκίων (με εσωτερικούς εκκινητές) από τους μετασχηματισμένους κλώνους JM-109, για παν ενδεχόμενο.

2.8 Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου

Από τις μετασχηματισμένες και ελεγμένες αποικίες των JM-109, επιλέγεται μία τυχαία, από την οποία ετοιμάζεται μια προ-καλλιέργεια των 10mL, σε κωνική φιάλη των 100mL. Μετά από επώαση overnight στους 37°C με συνεχή και έντονη ανάδευση, ετοιμάζονται οι προς επαγωγή καλλιέργειες, για τις οποίες σε τελικό όγκο μέσου 25mL (κωνικές φιάλες των 250mL) προστίθενται 250μL προ-καλλιέργειας. Στη συνέχεια, οι προς επαγωγή καλλιέργειες αφήνονται στους 37°C μέχρι να φτάσουν σε συγκεκριμένη οπτική πυκνότητα, στην οποία και προστίθεται η ραμνόζη. Η οπτική αυτή πυκνότητα ποικίλλει κατά περίπτωση, και μέχρι την προσθήκη της ραμνόζης μετράται κάθε 30'. Επίσης κατά περίπτωση ποικίλλει η συγκέντρωση της προστιθέμενης ραμνόζης, καθώς και η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας μετά από την προσθήκη αυτής. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά στην προστιθέμενη ραμνόζη, παρασκευάζεται αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1% w/v, το οποίο και αποστειρώνεται φιλτράροντας (βλ. 1.10.β).

Μετά από την προσθήκη της ραμνόζης, η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας μετράται κάθε μία ώρα και τα κύτταρα συλλέγονται είτε όταν φτάσουν σε οπτική πυκνότητα 1,2, είτε μετά από επώαση overnight (βλ. αποτελέσματα). Για τη συλλογή των κυττάρων, σε δύο σωληνάκια erpendorf τοποθετείται στο κάθε ένα 1,5mL από κάθε καλλιέργεια και φυγοκεντρώνται για 5' λεπτά στις 13.000rpm. Από αυτά, το ένα χρησιμεύει για τη συλλογή της ολικής πρωτεΐνης και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 160μL διαλύματος επαναδιάλυσης και 40μL loading buffer. Κατά αυτόν τον τρόπο, μετά από 10' βράσιμο, τα δείγματα είναι έτοιμα για φόρτωση σε gel SDS-PAGE. Το δεύτερο σωληνάκι, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του δείγματος σε διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα, και για την επαναδιάλυση χρησιμοποιούνται 200μL διαλύματος επαναδιάλυσης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα βομβαρδίζονται 2 φορές και για 30 δευτερόλεπτα με υπερήχους διάρκειας

0,7s/s (στη μέγιστη ισχύ) και φυγοκεντρώνται για 5' στις 13.000rpm. Το υπερκείμενο συνιστά το διαλυτό κλάσμα, ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μL διαλύματος επαναδιάλυσης και συνιστά το αδιάλυτο κλάσμα. Προκειμένου τα δύο κλάσματα να ελεγχθούν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τα δείγματα της ολικής πρωτεΐνης.

2.9. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Τα gel ακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ποσοστού 10%, μια που η πρωτεΐνη που αναζητούμε έχει μέγεθος 66kDa. Για όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε η ασυνεχής τεχνική, κατά την οποία το δείγμα περνά μέσα από δύο διαφορετικά gel, ένα gel «πακεταρίσματος» (stacking gel) και στη συνέχεια από το κανονικό gel. Για 10mL gel αναμειγνύονται 3,3mL μείγματος ακρυλαμίδης-bis-ακρυλαμίδης 30%, 2,5 mL διαλύματος Tris-HCl pH 8,8 100μL SDS 10%, 100μL APS 10%, 4μL TEMED και 4mL H₂O. Το buffer της ηλεκτροφόρησης περιέχει 14gr/L γλυκίνη, 3gr/L Tris και 1gr/L SDS. Τα συστατικά αυτά, συντελούν στην αποτελεσματική αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων και στο διαχωρισμό τους βάσει μοριακού βάρους και μόνον. Συγκεκριμένα, το SDS προσδένεται στις πρωτεΐνες σε μια αναλογία όμοια για όλα τα πρωτεϊνικά μόρια (1,4gr SDS/1gr πρωτεΐνης), καθιστώντας έτσι δυνατό το διαχωρισμό τους μόνο με βάση τη μάζα τους. Η χρώση έγινε με τη χρωστική ProtoBlue Safe, 9 μέρη της οποίας αναμειγνύονται με 1 μέρος αιθανόλης (π.χ. για ολική ποσότητα 50mL: 45mL χρωστικής με 5mL αιθανόλης.) Τα gel αφέθηκαν στη χρωστική overnight και το επόμενο πρωί πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με απεσταγμένο H₂O.

2.10. Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Μετά από την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Burke, Dawson, Sterns (Methods in yeast genetics, 2000) σύμφωνα με το οποίο 100μL δείγματος αναμειγνύονται με 400μL buffer (βλ. 1.12.β). Στη συνέχεια, προστίθενται 500μL διαλύματος σακχαρόζης (1% w/v) και από το 1mL που έχει προκύψει, 400μL αφαιρούνται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα και τοποθετούνται σε H₂O που βράζει, προς απενεργοποίηση του ενζύμου, ώστε να μετρηθεί η δραστηριότητα για t=0. Τα υπόλοιπα δείγματα, επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία 37°C. Εν τω μεταξύ, παρασκευάζεται το διάλυμα το οποίο θα δώσει το χρωμοφόρο, προσθέτοντας 250μL ορθοδιανισιδίνη σε 4,75mL διαλύματος A (βλ. 1.12.γ). Μετά από μία ώρα τα δείγματα βράζονται και σε 400μL κάθε δείγματος προστίθενται 100μL διαλύματος A. Η γλυκόζη που έχει παραχθεί από τη δράση της ιμπερτάσης μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450nm. Το χρώμα που αποκτά το διάλυμα είναι αποτέλεσμα των αντιδράσεων:



Ενώ αρχικά το διάλυμα της ορθοδιανισιδίνης είναι διαυγές, μετά από την οξείδωσή της αποκτά κοκκινωπό χρώμα.

➤ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα “Υλικά και Μέθοδοι”, πραγματοποιήθηκαν τρεις κλωνοποιήσεις, με τρεις διαφορετικούς φορείς, ο κάθε ένας από τους οποίους προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες στο εκφραζόμενο μόριο DNA. Η χρήση των φορέων pJOE προτιμήθηκε λόγω πολύ καλών παλαιότερων αποτελεσμάτων στο συγκεκριμένο εργαστήριο, αφού έχει παρατηρηθεί πως η επαγωγή με IPTG δίνει υπερβολικά καλά αποτελέσματα, και σχηματίζονται έτσι συσσωματώματα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα της *E.coli*, η οποία δεν μπορεί να ανταπεξέλθει σε αυτή την υπερπαραγωγή πρωτεΐνης. Παρ’ όλα αυτά, θεωρήθηκε καλό να δοκιμαστεί η έκφραση του γονιδίου και στον συγκεκριμένο pET φορέα, ο οποίος δεν είχε ξαναχρησιμοποιηθεί στο παρελθόν στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Μετά από την πραγματοποίηση όλων των αντιδράσεων που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα, και μετά από το μετασχηματισμό των XL1-Blue, είχαμε έξι τρυβλία για κάθε μία από τις κατασκευές (βλ. ενότητα 2.6), εκ των οποίων μόνο τα δύο (τα τρυβλία 1:2 και 1:3) περιέχουν την κατασκευή μας, επομένως μόνο από τα συγκεκριμένα ελέγχθηκαν αποικίες με PCR. Στον πίνακα 5 φαίνονται οι αποικίες που παρατηρήθηκαν σε κάθε πλάκα και για κάθε κατασκευή ξεχωριστά. Το γεγονός ότι σε δύο από τις τρεις κατασκευές παρατηρούνται αποικίες στα τρυβλία του C_{rel} οφείλεται προφανώς στο γεγονός ότι μετά από τις πέψεις τα πλασμίδια δεν καθαρίστηκαν από gel, αλλά κατ’ ευθείαν από το διάλυμα στο οποίο περιέχονταν, στην οποία περίπτωση δεν απαλασσόμαστε από μη κομμένα πλασμίδια. Στην περίπτωση του καθαρισμού από gel, αντιθέτως, οι διαφορετικές isoμορφές των πλασμιδίων που δεν έχουν κοπεί τρέχουν με διαφορετικό τρόπο, δίνοντας περισσότερες από μία μπάντες, που φαινομενικά δεν είναι του αναμενόμενου μεγέθους. Έτσι, κόβοντας την μπάντα που παρουσιάζεται στο ύψος του μεγέθους του πλασμιδίου είναι βέβαιο ότι απομονώνονται μόνο οι κομμένοι φορείς. Παρ’ όλα αυτά και σε αυτή την περίπτωση δεν είναι σίγουρο ότι η πέψη είναι επιτυχημένη, αφού τίποτα δεν αποκλείει την πιθανότητα του να έχει κοπεί ο φορέας μόνο με ένα από τα δύο ένζυμα. Έτσι λοιπόν,

	1:2	1:3	C_{rel}	C-	C+	C_{cells}
2702-INV	αμέτρητες	αμέτρητες	αμέτρητες	αμέτρητες	αμέτρητες	-
2775-INV	αμέτρητες	αμέτρητες	-	82	αμέτρητες	-
pET-INV	αμέτρητες	αμέτρητες	αμέτρητες	5	αμέτρητες	1

Πίνακας 5. Αποτελέσματα του μετασχηματισμού των XL1-Blue.

προτιμήθηκε ο απ' ευθείας καθαρισμός από το διάλυμα, μέσω του οποίου είναι δυνατή η ανάκτηση του πλασμιδίου σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό.

Βλέποντας τον πίνακα 3, παρατηρείται το παράδοξο της ύπαρξης αποικιών και στα τρυβλία του C-, το οποίο συμβαίνει προφανώς για τον ίδιο λόγο που υπάρχουν αποικίες και στα τρυβλία του C_{rel}, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση του C- η ύπαρξη αποικιών οφείλεται αποκλειστικά σε μη κομμένα πλασμίδια, ενώ στην περίπτωση του C_{rel} πρόκειται και για πλασμίδια τα οποία είχαν κοπεί μόνο με το ένα από τα δύο ένζυμα περιορισμού και έτσι ξανακυκλοποιήθηκαν κατά την επώαση με λιγάση. Όσο για τη μία αποικία που παρατηρήθηκε στην πλάκα του ελέγχου των κυττάρων στο pET, οφείλεται στο γεγονός ότι το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τα τρυβλία περιέχει NaCl, το οποίο αναστέλλει μερικώς την επίδραση της καναμυκίνης, έτσι η συγκεκριμένη αποικία θεωρήθηκε τυχαίο γεγονός. Από τις παραπάνω πλάκες ελέγχθηκαν με PCR έξι τυχαίες αποικίες από τα τρυβλία 1:2 και 1:3 για τους φορείς pJOE και 5 αποικίες από το τρυβλίο 1:2 για το φορέα pET. Η PCR σε αυτή την περίπτωση έγινε με εκκινητές τους RDP(+) και FVK(-), αλληλουχίες εσωτερικά του γονιδίου οι οποίες μεγεθύνουν ένα τμήμα 600 ζευγών βάσεων (1.4.2.γ). Κρίνοντας από τα δεδομένα των πλακών, μόνο στην περίπτωση του pJOE2775 αναμενόταν η ύπαρξη του insert σε όλους τους κλώνους, ενώ για τις άλλες δύο κατασκευές οι προοπτικές ήταν αρκετά δυσοίωνες. Παρ' όλα αυτά, στο gel φαίνεται ότι το insert υπάρχει σε πολύ καλά ποσοστά στις αποικίες που επιλέχθηκαν (βλ. εικ. 17).



Ύστερα από τον έλεγχο των αποικιών και αφού διαπιστώθηκε ότι αρκετοί από τους κλώνους είναι όντως θετικοί για το insert, το επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση με miniprep του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από ορισμένους από τους κλώνους και η αποστολή των δειγμάτων για αλληλούχιση. Οι κλώνοι από τους οποίους πραγματοποιήθηκαν τα minipreps επιλέχθηκαν επίσης τυχαία και ήταν:

- Για το πλασμίδιο 2702-INV: κλώνοι 5,6 από τρυβλίο 1:2
- 2775-INV: κλώνοι 4,6 από τρυβλίο 1:2 και 4,6 από τρυβλίο 1:3
- pET-INV: κλώνοι 2,5 από τρυβλίο 1:2.

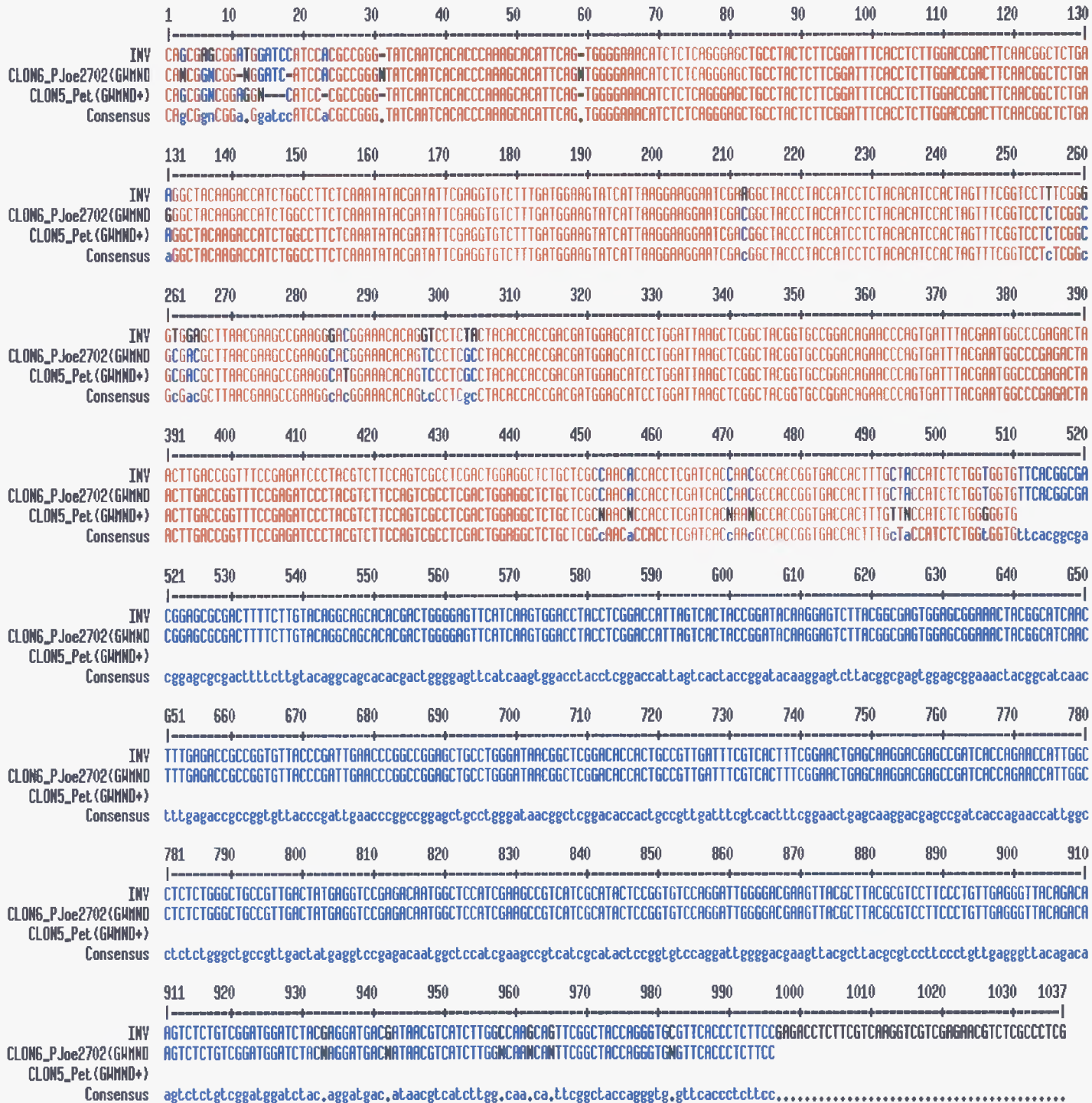
Μετά από τα minipreps, αρχικά στάλθηκαν για αλληλούχιση τα δείγματα που προέκυψαν με την υψηλότερη συγκέντρωση (η ποσοτικοποίηση έγινε σε gel αγαρόζης 0,7%), και συγκεκριμένα ο κλώνος 6 από την κατασκευή 2702-INV, ο κλώνος 5 από την κατασκευή με τον φορέα pET και οι κλώνοι 4 και 6 από το τρυβλίο 1:2 της κατασκευής με τον φορέα 2775. Από τη συγκεκριμένη κατασκευή πραγματοποιήθηκαν περισσότερα minipreps, αφού η πιθανότητα να έχει προκύψει η αναμενόμενη αλληλουχία είναι σχετικά μικρή, λόγω της επώασης με τη νουκλεάση mung bean, η οποία εκτός από το κολλώδες άκρο μπορεί να έχει αποικοδομήσει και τμήμα του δίκλωνου μορίου (βλ. ενότητα 2.5.2). Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλούχισης περιγράφονται στην επόμενη ενότητα.

2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΕΙΣ

Οι αλληλουχίσεις πραγματοποιήθηκαν από την υπηρεσία αλληλούχισης του Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Τα δείγματα αποστέλλονται σε συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη των 100ng/μL, ενώ ο εκκινητής αποστέλλεται σε συγκέντρωση 10ng/μL. Η συγκεκριμένη υπηρεσία έχει τη δυνατότητα αλληλούχισης 700 κατά μέσο όρο ζευγών βάσεων σε κάθε αντίδραση, αριθμός που φυσικά εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος, η T_m του εκκινητή και η αποτελεσματική προσκόλλησή του στο εκμαγείο κ.ά. Επομένως, στην περίπτωση μας, αφού το γονίδιο της ιμπερτάσης αποτελείται από 1800 περίπου ζεύγη βάσεων απαιτούνται τρεις αντιδράσεις για να επαληθευτεί πλήρως η αλληλουχία του insert.

Την πρώτη φορά που στάλθηκαν τα δείγματα, ο εκκινητής με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν ο GWMNDP(+) (María Dolores Linde López). Από τα τέσσερα δείγματα που στάλθηκαν, στα δύο δείγματα της κατασκευής 2775-INV η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε για άγνωστους λόγους. Στους άλλους δύο κλώνους η αλληλούχιση ήταν αρκετά ικανοποιητική,

κυρίως στην περίπτωση του 2702-INV, όπου ο sequencer έδινε πολύ καλό σήμα ακόμη και 1000 νουκλεοτίδια μετά. Δυστυχώς, μετά από ομοπαράθεση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα CLUSTALW με την αλληλουχία του γονιδίου διαπιστώθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στα insert και των δύο κλώνων (βλ. εικ. 18), παρά τη χρήση της πολυμεράσης high fidelity, η οποία θεωρητικά αποκλείει αυτή την πιθανότητα.



Εικόνα 18. Ομοπαράθεση των αλληλουχιών των δύο ανασυνδυασμένων κλώνων με την αλληλουχία του γονιδίου της ιμπερτάσης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, ο κλώνος 6 έχει μία μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 131, ενώ ο κλώνος 5 έχει τρεις μεταλλάξεις, στα νουκλεοτίδια 286, 492 και 506. Μετά από αυτή τη διαπίστωση, το επόμενο βήμα ήταν η μετάφραση των αλληλουχιών που μας είχαν σταλεί και η ομοπαράθεσή τους με την αμινοξική αλληλουχία της ιμπερτάσης, έτσι ώστε να ελεγχθεί αν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις που έχουν προκύψει στα insert είναι συνώνυμες μεταλλάξεις. Πράγματι, στην περίπτωση του κλώνου 6 επρόκειτο όντως για μετάλλαξη η οποία έδινε το ίδιο αμινοξύ, πράγμα που δυστυχώς δεν ίσχυσε στην περίπτωση του κλώνου 5, όπου από όλες τις μεταλλάξεις προέκυπτε διαφορετικό αμινοξύ. Συνεπώς, μόνο ο κλώνος 6 εστάλη ξανά για αλληλούχιση με διαφορετικούς εκκινητές, ώστε να καθοριστεί και η αλληλουχία του υπόλοιπου γονιδίου. Δυστυχώς, κατά την αλληλούχιση του τελευταίου τμήματος του γονιδίου διαπιστώθηκε η ύπαρξη τριών μεταλλάξεων, εκ των οποίων οι δύο ήταν για ακόμη μια φορά συνώνυμες, η τρίτη όμως αντικαθιστούσε ένα γλουταμινικό οξύ (E) με μια γλυκίνη (G) (εικ. 19).



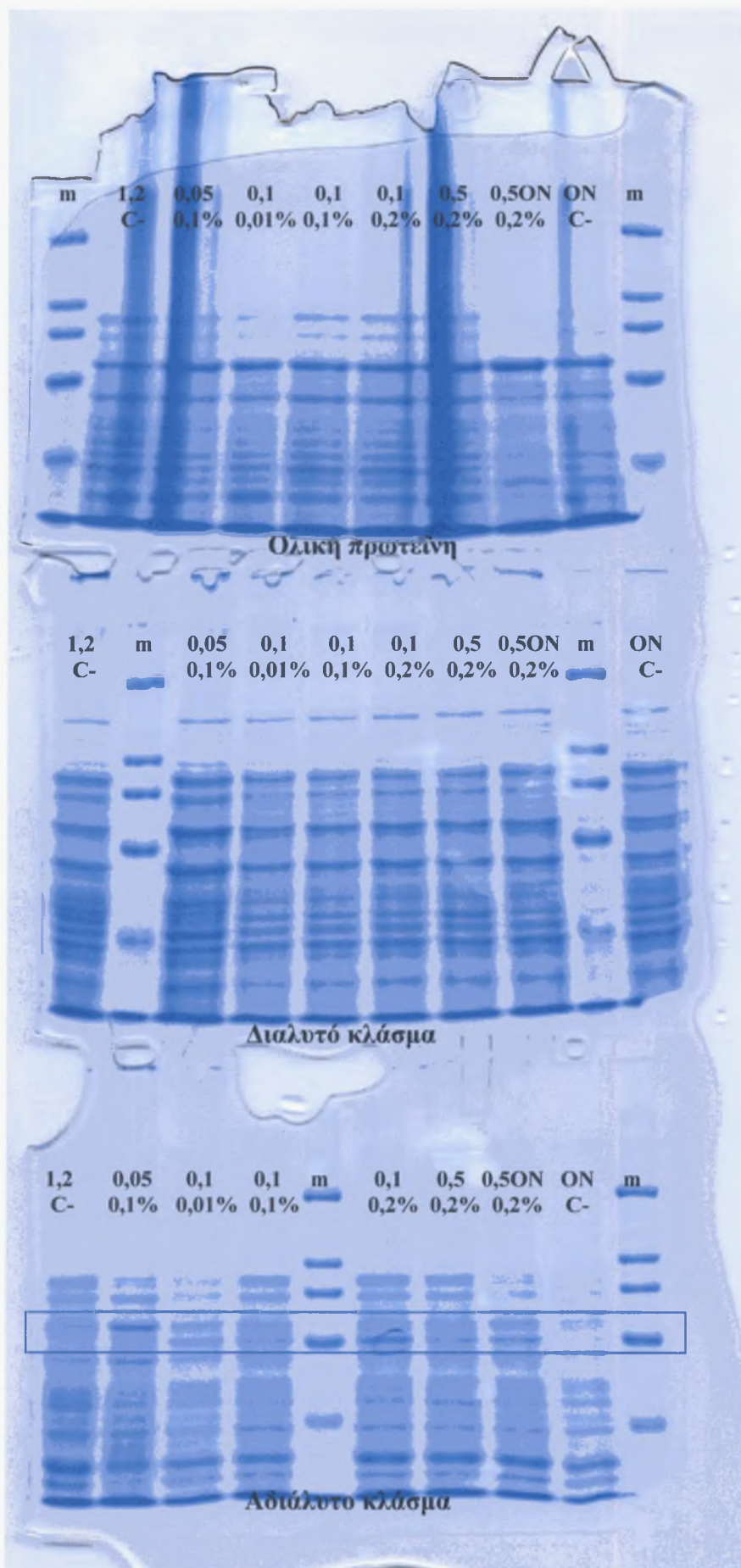
Εικόνα 19. Φαίνεται στη θέση 600 το μεταλλαγμένο αμινοξύ του ανασυνδυασμένου κλώνου.

Παρ' όλη την ύπαρξη της προαναφερθείσας μετάλλαξης αποφασίστηκε να γίνουν διάφορες δοκιμές για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου στο συγκεκριμένο κλώνο, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη προβλημάτων όπως η μη αποτελεσματική έκφραση του γονιδίου, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της εκφραζόμενης πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο και γενικώς οποιουδήποτε προβλήματος θα μπορούσε να υπάρξει. Με αυτό τον τρόπο, και στέλνοντας εν τω μεταξύ και άλλα δείγματα για αλληλούχιση θα μπορούσαμε να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες επαγωγής έτσι ώστε αν κάποια στιγμή καταφέρουμε να βρούμε έναν κλώνο χωρίς μεταλλάξεις να είναι δυνατή η απ' ευθείας έκφραση και η εύκολη και αποτελεσματική απομόνωση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες συνθήκες, που αποφασίστηκαν βάσει παλαιότερων πρωτοκόλλων και πειραμάτων που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο (Miguel Álvaro Benito, 2005) και περιγράφονται στην επόμενη ενότητα.

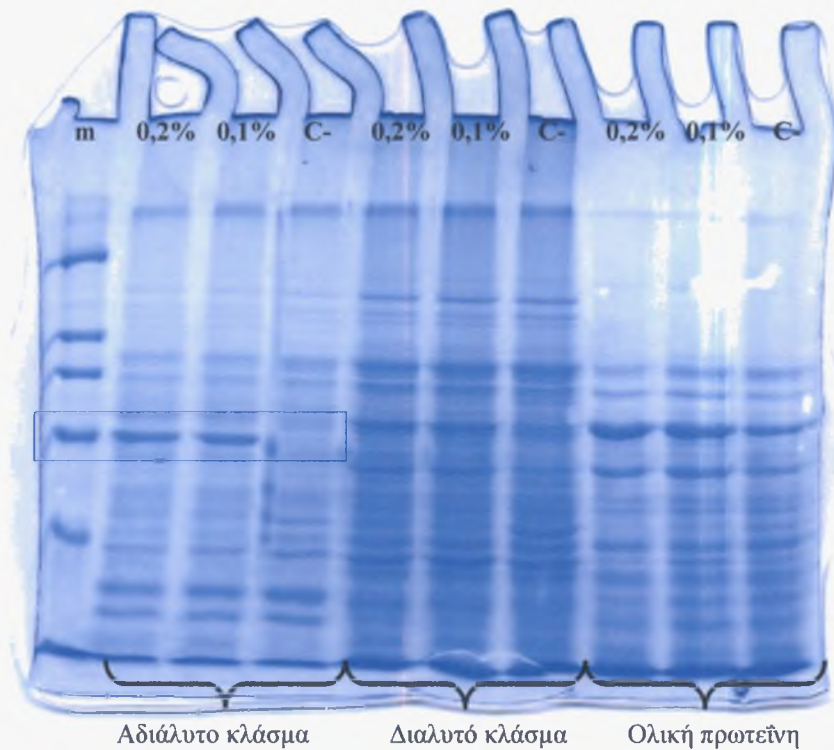
3. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Πριν από την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου είναι απαραίτητη η μεταφορά του πλασμιδίου από το στέλεχος XL1-Blue σε ένα διαφορετικό στέλεχος *E. coli* κατάλληλο για έκφραση ξενογονιδίων, το JM-109. Αφού μεταφέρθηκε το πλασμίδιο (βλ. ενότητα 2.7) στα συγκεκριμένα κύτταρα, ακολούθησε μία PCR αποικιών από οκτώ κλώνους, προκειμένου να επαληθευτεί η σωστή εκτέλεση του πρωτοκόλλου και γενικώς να διαπιστωθεί ότι όλα βαίνουν καλώς πριν πραγματοποιηθεί η επαγωγή. Κατά την επαγωγή του οποιουδήποτε κλώνου, μπορεί να ποικίλλουν διάφορες συνθήκες, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας, η πυκνότητα της καλλιέργειας τη στιγμή που προστίθεται ο επαγωγέας (στην περίπτωση μας η ραμνόζη), η πυκνότητα της καλλιέργειας όταν κάποιες ώρες μετά από την επαγωγή συλλέγονται τα κύτταρα, αλλά και η συγκέντρωση στην οποία προστίθεται ο επαγωγέας.

Αφού η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη της *E. Coli* είναι οι 37°C, αρχικά όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη θερμοκρασία. Ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά κάθε 30', και η ραμνόζη προστέθηκε όταν η οπτική πυκνότητα ήταν 0,05 (σε συγκέντρωση 0,1% w/v), 0,1% (σε συγκεντρώσεις 0,01%, 0,1% και 0,2% w/v), και 0,5 (σε συγκέντρωση 0,2% w/v). Τα κύτταρα από όλες τις καλλιέργειες συλλέχθηκαν όταν έφθασαν σε οπτική πυκνότητα 1,2, εκτός από ένα δείγμα της καλλιέργειας στην οποία η ραμνόζη είχε προστεθεί σε οπτική πυκνότητα 0,5, το οποίο αφέθηκε να αναπτυχθεί overnight. Μετά από διαχωρισμό των κλασμάτων όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.8, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel ακρυλαμίδης 10% (βλ. ενότητα 2.9). Τα gel φαίνονται στην επόμενη σελίδα (εικ. 20). Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη που αναζητούμε όταν δεν είναι γλυκοσυλιωμένη έχει μέγεθος 66kDa, οι μπάντες που αναμένουμε να δούμε βρίσκονται ακριβώς στο ύψος της τέταρτης μπάντας του marker. Πράγματι, στο gel των δειγμάτων του αδιάλυτου κλάσματος, στα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί ραμνόζη, παρατηρείται καθαρά μία μπάντα η οποία δε φαίνεται στα δείγματα τα οποία δεν επήχθησαν. Καθ' ότι όμως σε γενικές γραμμές δεν επιδιώκεται η ύπαρξη της πρωτεΐνης στο αδιάλυτο κλάσμα, αφού κάτι τέτοιο σημαίνει ότι η πρωτεΐνη σχηματίζει συσσωματώματα μέσα στο κύτταρο, έπρεπε να πραγματοποιηθεί επαγωγή σε διαφορετικές συνθήκες. Έτσι, και πάλι με βάση παλαιότερα πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο εργαστήριο (Patricia Barrado Guerrero, 2003), πραγματοποιήθηκαν αυτή τη φορά δοκιμές στους 30°C. Η ραμνόζη προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,2% w/v όταν οι καλλιέργειες έφθασαν σε οπτική πυκνότητα 0,05, ενώ τα κύτταρα συλλέχθηκαν όταν έφθασαν σε οπτική πυκνότητα 1,2 περίπου. Το συγκεκριμένο gel φαίνεται στην εικόνα 21 (σελ.).



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των δειγμάτων μετά από τις πρώτες δοκιμές για επαγωγή, σε θερμοκρασία 37°C. Πάνω από κάθε gel στην πρώτη σειρά αναγράφεται η οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας τη στιγμή που προστέθηκε η ραμνόζη, ενώ στη δεύτερη σειρά φαίνεται η συγκέντρωση της ραμνόζης σε κάθε καλλιέργεια.



Εικόνα 21. Φωτογραφία από το gel της επαγωγής που πραγματοποιήθηκε στους 30°C. Πάνω από κάθε δείγμα φαίνεται η συγκέντρωση της προστιθέμενης ραμνόζης.

Όπως και πάλι φαίνεται ξεκάθαρα στο gel, η πρωτεΐνη εξακολουθεί να βρίσκεται στο αδιάλυτο κλάσμα, αν και μία ελάχιστη ποσότητα βρίσκεται αυτή τη φορά και στο διαλυτό κλάσμα, που όμως δεν είναι αρκετή. Παρ' όλα αυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα δείγματα του παραπάνω gel, όπου διαπιστώθηκε η πλήρης απουσία οποιασδήποτε δραστηριότητας. Φυσικά, ακόμα και στο διαλυτό κλάσμα να βρισκόταν η πρωτεΐνη, ένα τέτοιο αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο και οφείλεται προφανώς στο γεγονός ότι η *E. coli* δεν εισάγει στην παραγόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που χρειάζονται για να κατασταθεί πλήρως δραστικό το ένζυμο. Βέβαια, σε αρκετές περιπτώσεις έκφρασης ενζύμων σε κύτταρα *E. coli* έχει παρατηρηθεί δραστηριότητα του παραγόμενου μορίου, αλλά συνήθως πρόκειται για πρωτεΐνες που δεν υπόκεινται σε εκτενείς τροποποιήσεις μετά από τη μετάφραση, σε αντίθεση με τη συγκεκριμένη ιμπερτάση, η οποία στην *Rhaffia* απαντάται κατά 67% γλυκοσυλιωμένη, εκτός του γεγονότος ότι για να αποκτήσει την πλήρη δραστηριότητά της απαιτείται διμερισμός της. Από όλα τα προαναφερθέντα, φαίνεται ότι προφανώς θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλες τεχνικές προκειμένου να απομονωθεί αποτελεσματικά η πρωτεΐνη (βλ. επόμενη ενότητα).

➤ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Όπως διαφαίνεται από τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, οι μέθοδοι έκφρασης του γονιδίου του ενζύμου που μας ενδιαφέρει θα πρέπει να εξιδανικευτούν προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης στο επιθυμητό κλάσμα. Αυτό μπορεί να γίνει πραγματοποιώντας περαιτέρω δοκιμές σε διαφορετικές από τις μέχρι τώρα δοκιμασμένες συνθήκες. Μπορεί για παράδειγμα να δοκιμαστεί η επώαση των καλλιεργειών σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ή η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ραμνόζης. Παρ' όλα αυτά, αν και πάλι δεν καταστεί δυνατή η απομόνωση του ενζύμου στο διαλυτό κλάσμα, υπάρχει πάντα η επιλογή του να απομονωθεί η πρωτεΐνη από το αδιάλυτο κλάσμα. Φυσικά, κάτι τέτοιο προϋποθέτει πλήρη αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου, ώστε να αποσχηματιστούν τα συσσωματώματα που σχηματίζονται μέσα στο κύτταρο της *E. coli* και ύστερα τοποθέτηση των αποδιαταγμένων πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε διάλυμα όπου θα επικρατούν κατάλληλες συνθήκες, ευνοϊκές για την επαναδιάταξη του μορίου.

Επιπλέον, πέρα από την έκφραση σε κύτταρα *E. coli*, στο συγκεκριμένο εργαστήριο μελετάται ταυτόχρονα και η έκφραση του γονιδίου σε στελέχη μυκήτων, και συγκεκριμένα σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και *Picchia pastoris*, με σκοπό την παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Είναι ευνόητο, ότι καθ' ότι σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για κύτταρα μυκήτων, ικανά να τροποποιήσουν κατάλληλα το παραγόμενο πολυπεπτίδιο, πιθανότατα μετά από την έκφραση του γονιδίου το ένζυμο θα είναι λειτουργικό. Παρ' όλα αυτά, απαραίτητη είναι και η έκφραση του ενζύμου σε κύτταρα *E. coli* με σκοπό ακριβώς την απομόνωση αυτούσιας της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που παράγεται αμέσως μετά από τη μετάφραση του μορίου χωρίς αυτή να είναι τροποποιημένη. Έτσι, μετά από κρυσταλλοποίηση της πρωτεΐνης και ανάλυσης με περίθλαση ακτίνων Χ, θα μπορέσουν να διαπιστωθούν οι περιοχές που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην εκδήλωση της δράσης του ενζύμου. Με αυτόν τον τρόπο, θα πραγματοποιηθούν στη συνέχεια κατευθυνόμενες μεταλλάξεις στην πολυπεπτιδική αλυσίδα προς βελτιστοποίηση ή/και τροποποίηση της δραστηριότητας του ενζύμου.

➤ Βιβλιογραφία

Roberfroid MB (2000), Fructooligosaccharide malabsorption: benefit for gastrointestinal functions, *Curr Opin Gastroenterol.* 16(2):173-7

Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid M., (2004), Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17: 259–75.

Roberfroid M. Inulin-type Fructans. *Functional Food Ingredients*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005.

Ohta A., (2006). Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. The effect of fructooligosaccharides (FOS) on the calcium absorption and bone, *Clin calcium*, 16(10):81-8

Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW, (2006) Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells, *Infect Immun.*, 74(12):6920-8.

Geier MS, Butler RN, Howarth GS, (2006), Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: A Role in Chemoprevention for Colorectal Cancer?, *Cancer Biol Ther.* Oct 19;5(10)

Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G., (2006), A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch Dis Child.* Oct;91(10):814-9.

Knol J., Scholtens P, Kafka C., Steenbakkers J., Gro S., Helm K., Klarczyk M., Schopfer H., Bockler HM, Wells J., (2005), Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Jan;40(1):36-42

Bengmark S., Gil A., (2006), Bioecological and nutritional control of disease: prebiotics, probiotics and synbiotics, *Nutr Hosp.* May;21 Suppl 2:72-84, 73-86

Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel BL., (2001), Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer *Am J Clin Nutr.* Feb;73(2 Suppl):451S-455S

M.S. Geier, Ross N. Butler, G.S. Howarth, (2006), Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics, *International Journal of Food Microbiology* (Article in press)

T. Passeron, J.-P. Lacour, E. Fontas, J.-P. Ortonne, (2006), Probiotics and synbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years, *Allergy*, 61: 431–437

S. McFarlane, G. T. McFarlane & J. H. Cummings, (2006), Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract, *Aliment Pharmacol Ther* 24, 701–714

Julia B Ewaschuk, Levinus A Dieleman (2006), Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases, *World J Gastroenterol* October 7;12(37):5941-5950

J. Kucsera, I. Pfeiffer & L. Ferenczy, (1998), Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 163–168

Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, Kamm MA, Knight SC, Forbes A., (2006) Clinical, Microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*; 55: 348-355

Roitsch T., Gonzalez MC., (2004), Function and regulation of plant invertases: sweet sensations, *Trends Plant Sci. Dec*;9(12):606-13

Roitsch, (2003), Extracellular invertase key metabolic enzyme and PR protein, *Journal of Experimental Botany*, 54 (382) 513

Sturm A., (1999), Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning, *Plant Physiol.* (1999) 121: 1-8

Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okomura, A., and Mori, H. (1994b) Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogen.*, 15:15-19.

Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Hideki, M., Sato, K., and Hara, A. (1995b) Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.*, 55:4059-4064.

Tso, M. O., and T.-T. Lam. (1996) Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage, U.S. Patent #5527533. Board of trustees of the University of Illinois, United States of America.

Snodderly, D.M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62(suppl):1448S-1461S.

Jyonouchi H., Sun S., Tomita Y., and Gross M. D. (1995) Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J. Nutr.*, 125(10):2483-2492.

Jyonouchi H., Zhang L., and Tomita Y. (1993) Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer*, 19(3):269-280.

Jyonouchi H., Zhang L., Gross M., and Tomita Y. (1994) Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. *Nutr. Cancer*, 21(1):47-58

Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJM, et al., (2005) Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation, *Inflamm Bowel Dis* 2005;11: 977–85.

Sartor RB., (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*; 126: 1620-1633

- Johnson E., (2003), *Phaffia rhodozyma*, a colourful odyssey, *Int. Microbiol.*, 6:169-174
- Koch KE, (1996), Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540
- E. Farnworth, (1997), Fructooligosaccharides – FOS, *Medicinal food news*, 23
- José Luis Alonso, Herminia. Domínguez, Gil Garrote, Juan Carlos Parajó, M^a. José Vázquez, (2001), XYLOOLIGOSACCHARIDES: PROPERTIES AND PRODUCTION TECHNOLOGIES, *EJEAFChe*
- Chang, J.Y., K D Vernick, R B Imberski, and T F McCutchan (1985), Mung bean nuclease exhibits a generalized gene-excision activity upon purified *Plasmodium falciparum* genomic DNA. *Eur. J. Biochem.*, 16(14B): 6883–6896
- Burke, Dawson, Sterns, (2000), *Methods in yeast genetics*
- Simmering R., Blaut M., (2001), Pro- and prebiotics: the tasty guardian angels?, *Applied Microbiol. Biotechnology*, 55(1): 19-28
- Zhu Y., Kim T.T., Lee Y.T., Chen R., Elauder R.T., (2006), Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia, *Applied Biochem. Biotech.*, 129-132; 586-98
- Schroeder W.A., Johnson E.A., (1995), Singlet oxygen and peroxide radicals regulate carotenoid biosynthesis in *P. rhodozyma*, *J. Biol. Chem.*, 270(31): 18374-9
- Zahn R., von Schroetter C., Wutrich K., (1997), Human Prion proteins expressed in *E. Coli* and purified by high affinity column refolding, *FEBS Letters*, 417, 400-404
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press

