

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**«ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ AMY2
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΤΟΥ *Lotus japonicus* ΣΕ ΦΥΛΛΑ
ΚΑΠΝΟΥ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRMV-HT»**

ΝΤΑΛΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Υπερέκφραση της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2* βιοσύνθεσης
τριτερπενίων του *Lotus japonicus* σε φύλλα καπνού μέσω του
συστήματος CPMV-HT

Overexpression of *AMY2* gene cluster of *Lotus japonicus*
involved in triterpenoid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*
leaves through CPMV-HT system

Τριμελής επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθρων την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση του θέματος, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα πτυχιακή, καθώς και τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο, για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβαλλοντος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη και τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο, που συγκροτούν μαζί με την κ. Παπαδοπούλου την τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για τη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας και τη στήριξή της στις όμορφες και δύσκολες στιγμές, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα, τη συνεργασία και για τις ευχάριστες αναμνήσεις που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Δευτερογενείς μεταβολίτες	5
2. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών	6
3. Συνθάση της β-αμυρίνης & συνθάση της λουπεόλης	10
4. Ένζυμα του κυτοχρώματος P450	13
5. Γονιδιακές συστοιχίες	17
6. Ετερόλογη υπερέκφραση πρωτεϊνών	19
6.1 Συνδυαστική βιολογία (Combinatorial biology)	19
6.2 Ίικοί φορείς	23
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	28
2. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	29
3. Μοριακή κλωνοποίηση	31
3.1 Πέψεις με ένζυμα περιορισμού	31
3.2 Αντίδραση λιγάσης	32
4. Μετασηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	32
4.1 Προετοιμασία «ικανών» κυττάρων προς μετασηματισμό	32
4.2 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	33
5. Μετασηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	34
5.1 Προετοιμασία «ικανών» κυττάρων προς μετασηματισμό	35
5.2 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>A. tumefaciens</i>	35
5.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα από κύτταρα αγροβακτηρίου	36
6. Ανάπτυξη φυτών <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
7. Αγροεμποτισμός	37
8. Αέρια χρωματογραφία/ Φασματοσκοπία Μάζας (GC/MS)	38
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Σκοπός	41
2. Κλωνοποίηση γονιδίων της γονιδιακής συστοιχίας AMY2 σε ιϊκούς φορείς	41

3. Ανάλυση GC/MS των μεταβολιτών της γονιδιακής συστοιχίας AMY2	51
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια αποτελούν την κύρια ομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων, που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε αρκετά φυτικά είδη έχει παρατηρηθεί η οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σε γονιδιακές συστοιχίες. Έτσι, είναι δυνατό να παράγεται μία ευρεία ποικιλία τερπενίων, έπειτα από τη σύνθεσή τους από γονίδια που κωδικοποιούν κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (OSC) και από γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμβάλλουν στη βιολογική ενεργοποίηση των τριτερπενίων. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση διαφορετικών συνδυασμών γονιδίων της συστοιχίας AMY2 του φυτού *Lotus japonicus*, που περιλαμβάνει το γονίδιο AMY2 που κωδικοποιεί για μία κυκλάση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου και τα γονίδια του κυτοχρώματος P450, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* στο φυτό *Nicotiana benthamiana* μέσω του συστήματος έκφρασης CPMV-ΗΤ. Παρατηρήθηκε η παραγωγή μίας νέας δομής, της διυδρολουπεόλης, ενώ η έκφραση του γονιδίου AMY2 με το γονίδιο *LjCYP71D353* οδήγησε στο σχηματισμό της 20-υδροξυλουπεόλης και του 20-υδροξυβητουλινικού οξέος, μετά την διαδοχική οξείδωση τριών σταδίων της 20-υδροξυλουπεόλης. Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε και για την ετερόλογη υπερέκφραση του γονιδίου β -AS, αντί του γονιδίου AMY2, που κωδικοποιεί για τη συνθάση της β -αμυρίνης από το φυτό *Medicago truncatula*, καθώς και του γονιδίου OSC3 από το φυτό *Lotus japonicus*, που κωδικοποιεί τη συνθάση της λουπεόλης για τον έλεγχο σχηματισμού νέων τριτερπενοειδών δομών από διαφορετικούς οργανισμούς. Μέσω αυτών των πειραμάτων, είναι δυνατή η ανίχνευση των προϊόντων που παράγονται από μία γονιδιακή συστοιχία και ο συνδυασμός ετερόλογων γονιδίων που εντοπίζονται σε διαφορετικούς οργανισμούς και την παραγωγή νέων τριτερπενοειδών βιοδραστικών μορίων.

ABSTRACT

Plants synthesize a diverse range of secondary metabolites that have a wide range of functions from pigmentation to plant defense. Oxidosqualene cyclases (OSCs) catalyze the first committed step in triterpenoid secondary metabolite synthesis and cyclise 2,3-oxidosqualene to a number of compounds, which are produced by various enzymes such as cytochrome P450s and glucosyltransferases. Genes for triterpenoid biosynthesis, organized in gene clusters, were found in oat and *Arabidopsis* plants. In this present work, the heterologous expression of gene cluster *AMY2* from the legume *Lotus japonicus* was conducted in *Nicotiana benthamiana* leaves. This cluster consists of the *AMY2* gene, two genes from different classes of cytochrome P450 (*LjCYP71D353* and *LjCYP88D5*) and a gene predicted to encode for a reductase (*LjSDRt*). Different combinations of these genes, except for the *LjSDRt* gene, were used to identify the produced molecules. It was found that a novel triterpene structure was produced by the *AMY2* gene alone, the dihydrolupeol; in addition, the formation of 20-hydroxybetulinic acid was observed in a sequential three-step oxidation of 20-hydroxylupeol, combining the *AMY2* and *LjCYP71D353* genes. The same experiment was conducted using the β -amyrin synthase (β -*AS*) gene from the legume *Medicago truncatula* instead of the *AMY2* gene. Such combinatorial biosynthesis experiments can give future prospects of finding either new terpenoid structures and biosynthetic pathways or biodrastic compounds with a pharmaceutical mode of action.

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Η μεταβολική δραστηριότητα για τη σύνθεση των απαραίτητων συστατικών, τα οποία συγκροτούν τη θεμελιώδη δομή και διαμορφώνουν τον τρόπο λειτουργίας των φυτικών κυττάρων, χαρακτηρίζεται συνολικά ως πρωτογενής μεταβολισμός. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κυττάρων, ιστών ακόμα και οργανισμών. Προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού είναι οι ορμόνες (γιββερελίνες και βρασσινοστεροειδή), φωτοσυνθετικές χρωστικές (καροτενοειδή), συστατικά μεμβρανών (στερόλες) και μεταφορείς ηλεκτρονίων (χλωροφύλλη) (Liu et al, 2005). Ωστόσο, η πλειοψηφία των μεταβολικών προϊόντων (περισσότερα από 20.000 γνωστές δομές μέχρι σήμερα) παράγεται σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης (Connolly, 1991). Τα βιομόρια αυτά προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολό τους συνιστούν τον δευτερογενή μεταβολισμό (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003).

Με βάση τα πρόδρομα βιομόρια, προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού από τα οποία συντίθενται οι πολυάριθμοι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι τελευταίοι κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- α) Την ομάδα των φαινολικών ουσιών που περιλαμβάνει μεταβολίτες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου στο μόριό τους και προέρχονται από τις βιοσυνθετικές οδούς του σικιμικού και του μηλονικού οξέος.
- β) Την ομάδα των τερπενίων που συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού με πρόδρομο μόριο το ακέτυλο-συνένζυμο Α.
- γ) Την ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών, που περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες προέρχονται από αμινοξέα.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γνωστοί για τη δράση τους σε σημαντικές λειτουργίες της οικολογίας του φυτού, όπως είναι η προστασία από βιοτικούς (παράσιτα, παθογόνα, ακόμα και ζώα) και αβιοτικούς παράγοντες (ηλιοφάνεια, θερμοκρασία) καθώς και η επικοινωνία μέσω χρωστικών ή πτητικών ενώσεων.

Επιπρόσθετα, επιδρούν στην ανάπτυξη άλλων φυτών (φαινόμενο αλληλοπάθειας) μέσω πτητικών ενώσεων ή μεταβολιτών που εντοπίζονται στο έδαφος, όπως επίσης και στην εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων με βακτήρια, με την έκκριση φαινολικών ενώσεων (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003; McGarvey and Croteau, 1995).

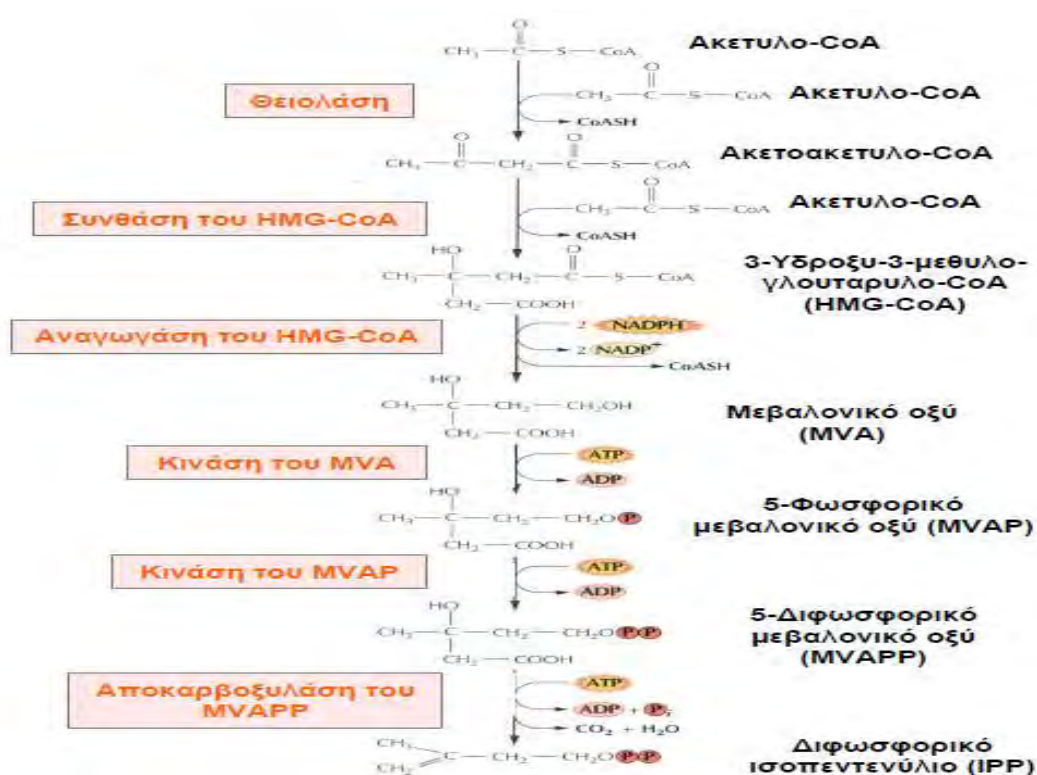
Τα τερπένια αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, με κύριο ρόλο στη συμβολή της άμυνας του φυτού. Πρόκειται για μία ομάδα λιπιδίων των οποίων ο βασικός σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα, το ισοπεντενύλιο (IPP). Το ισοπεντενύλιο είναι η ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου, το οποίο προέρχεται από τη συμπύκνωση τριών μορίων ακέτυλο-CoA. Με βάση τον αριθμό των μονάδων του ισοπρενίου, προκύπτουν οι εξής ομάδες:

- Τα μονοτερπένια ($C_{10}H_{16}$) από τα οποία παράγονται πτητικά παράγωγα των ανθέων (μενθόλη).
- Τα σεσκιτερπένια ($C_{15}H_{24}$) που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια και λειτουργούν ως αντιμικροβιακές φυτοαλεξίνες και αποτρέπουν την προσβολή από έντομα.
- Τα διτερπένια ($C_{20}H_{32}$) με κύριο χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τις γερανυλγερανιόλες, που απωθούν τα κουνούπια αλλά προσελκύουν τις μέλισσες για επικονίαση.
- Τα τριτερπένια ($C_{30}H_{48}$) που αποτελεί τη σημαντικότερη ομάδα αμυντικών μεταβολιτών ενάντια σε μύκητες και παθογόνα. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα στεροειδή (φυτοεκδυσόνες), τα λεμονοειδή (αιθέρια έλαια λεμονιάς), τα καρδιακά γλυκοζίδια (ολεανδρίνη) και οι σαπωνίνες (που παράγονται από τις πρόδρομες ενώσεις α -αμυρίνη, β -αμυρίνη, λουπεόλη).
- Τα τετρατερπένια ($C_{40}H_{64}$) τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη και προστασία του φυτού (καροτενοειδή που παρίστανται στο κέντρο αντίδρασης και στα σύμπλοκα κεραιών του φωτοσυστήματος, ενώ ταυτόχρονα απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου) (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003; McGarvey and Croteau, 1995; Barnard et al, 2004; Danka et al., 1990).

2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα τριτερπενοειδή συντίθενται από το μεβαλονικό οξύ, το οποίο προέρχεται από το ακέτυλο-CoA, το μόριο εισόδου στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στο

ενδοπλασματικό δίκτυο, σε ένα μόριο ακετύλο-CoA ακολουθεί προσθήκη δύο μορίων ακετύλο-CoA μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA με τη δράση μιας θειολάσης και μιας συνθάσης, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε μεβαλονικό οξύ στο κυτταρόπλασμα. Το μεβαλονικό οξύ φωσφορυλιώνεται δύο φορές από δύο κινάσες: την κινάση του μεβαλονικού οξέος και την κινάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος (Vranova et al, 2012; Philips et al, 2006). Έπειτα, απομακρύνεται ένα μόριο CO₂ μέσω της αποκαρβοξυλάσης του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και έτσι προκύπτει το ισοπεντενύλιο (IPP) (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου στο κυτταρόπλασμα (Istvan et al.2000)

Ισομερής μορφή του IPP είναι το διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Τα δύο ισομερή συμπυκνώνονται και σε αυτά προστίθενται ένα ακόμα μόριο IPP που οδηγεί στο σχηματισμό του διφωσφορικού γερανύλιου (GPP). Με προσθήκη ενός ακόμα IPP σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP), το οποίο αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα και είναι η πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλτρανσφερασών στο κυτταρόπλασμα.

Εκτός από την οδό του μεβαλονικού οξέος, τα φυτά εναλλακτικά βιοσυνθέτουν το ισοπρένιο μέσω του μονοπατιού της 4-φωσφορικής-2-μεθυλο-ερυθριτόλης (MEP) που λαμβάνει μέρος στους χλωροπλάστες (Eisenrich et al., 1998; Vranova et al., 2012). Το πλαστιδιακό μονοπάτι θεωρείται υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων, των διτερπενίων και των τετρατερπενίων, καθώς και της φυτόλης, των καροτενοειδών και της πλευρικής αλυσίδας της χλωροφύλλης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, η πρώτη αντίδραση αυτού του μονοπατιού είναι η σύμπτυξη του πυροσταφυλικού και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, ένα ενδιάμεσο που προέρχεται από την γλυκόλυση και τον κύκλο του Calvin, προς παραγωγή 1-δεοξυ-5-φωσφο-ξυλουλόζης (DXP) (McGarvey and Croteau, 1995). Στη συνέχεια, μέσω της ρεδουκτάσης DXP και με κατανάλωση 1 μορίου NADPH, παραγείται η 4-φωσφορική-2-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (CDP). Έπειτα, όπως απεικονίζεται συνοπτικά και στην εικόνα 3, μέσω μιας ρεδουκτάσης και δύο συνθασών, παράγεται το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο. Σήμερα έχει αποδειχτεί ότι μεταξύ των δύο μονοπατιών που λειτουργούν παράλληλα υπάρχει ανταλλαγή πρόδρομων χημικών μορίων, ενώ κάποια τερπένια βιοσυντίθενται μέσω και των δυο μονοπατιών, ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού. Έχει παρατηρηθεί μεταφορά ισοπρενίων από το κυτταρόπλασμα στα πλαστίδια και αντίστροφα. Τελικά, δύο μόρια διφωσφορικού φαρνεσυλίου σχηματίζουν το σκουαλένιο, μετά από μία αντίδραση συμπύκνωσης που καταλύεται από την σκουαλεϊνική συνθάση (SQS) σχηματίζουν το σκουαλένιο, το οποίο μετατρέπεται σε 2,3-οκειδοσκουαλένιο με τη δράση μιας μονοξυγενάσης, της εποξειδάσης του σκουαλενίου (SQE) (Vranova et al., 2012).

οξύ, MPDC: Απόκαρβοξυλάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος, GA-3P: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, DXS: Συνθάση της 1-δεοξυ-5-φωσφοξυλουλόζης, DXR: Ρεδοκτάση της 1-δεοξυ-5-φωσφοξυλουλόζης, MEP: 4-φωσφορική-2-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, MCT: Κυτιδυλτρανσφεράση της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-D-ερυθριτόλης, CDP-ME: 4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, CMK: Κινάση της : 4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλης, CDP-ME2P: 2-φωσφο-4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, MCS: συνθάση της 2,4-δικυκλοφωσφορικής 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολης, HDS: συνθάση του 1-υδροξυ-2-μεθυλ- 4-διφωσφορικού βουτενυλίου, HDR: ρεδοκτάση του 1-υδροξυ-2-μεθυλ-4-διφωσφορικού βουτενυλίου, IPPI: Ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου, DMAPP: διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο, GPS: υνθάση του διφωσφορικού γερανυλγερανυλίου, OPS: Συνθάση του διφωσφορικού ολιγοπρενυλίου, SPS: Συνθάση του διφωσφορικού σολανεσυλίου, PPS: Συνθάση του διφωσφορικού πολυπρενυλίου, SQS: Συνθάση του σκουαλένιου, PSY: Συνθάση του φυτοένιου, IPT: Τρανσφεράση του ισοπεντενυλίου, SS: Συνθάση των σεσκιτερπενοειδών, MS: Συνθάση των μονοτερπενοειδών, DS: Συνθάση των διτερπενοειδών, HPT: Τρανσφεράση του ομογεντισικού οξέος, HST: Τρανσφεράση του ομογεντισικού σολανεσυλίου, DHNAPT: Τρανσφεράση του 1,4-διυδροξυ-2 ναφτοϊκού φυτυλίου, HBPT: πολυπρενυλτρανσφεράση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, GGR: Ρεδοκτάση του γερανυλγερανυλίου, CHS: Συνθάση της χλωροφύλλης. (Pulido et al., 2012)

3. ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ & ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ ΛΟΥΠΕΟΛΗΣ

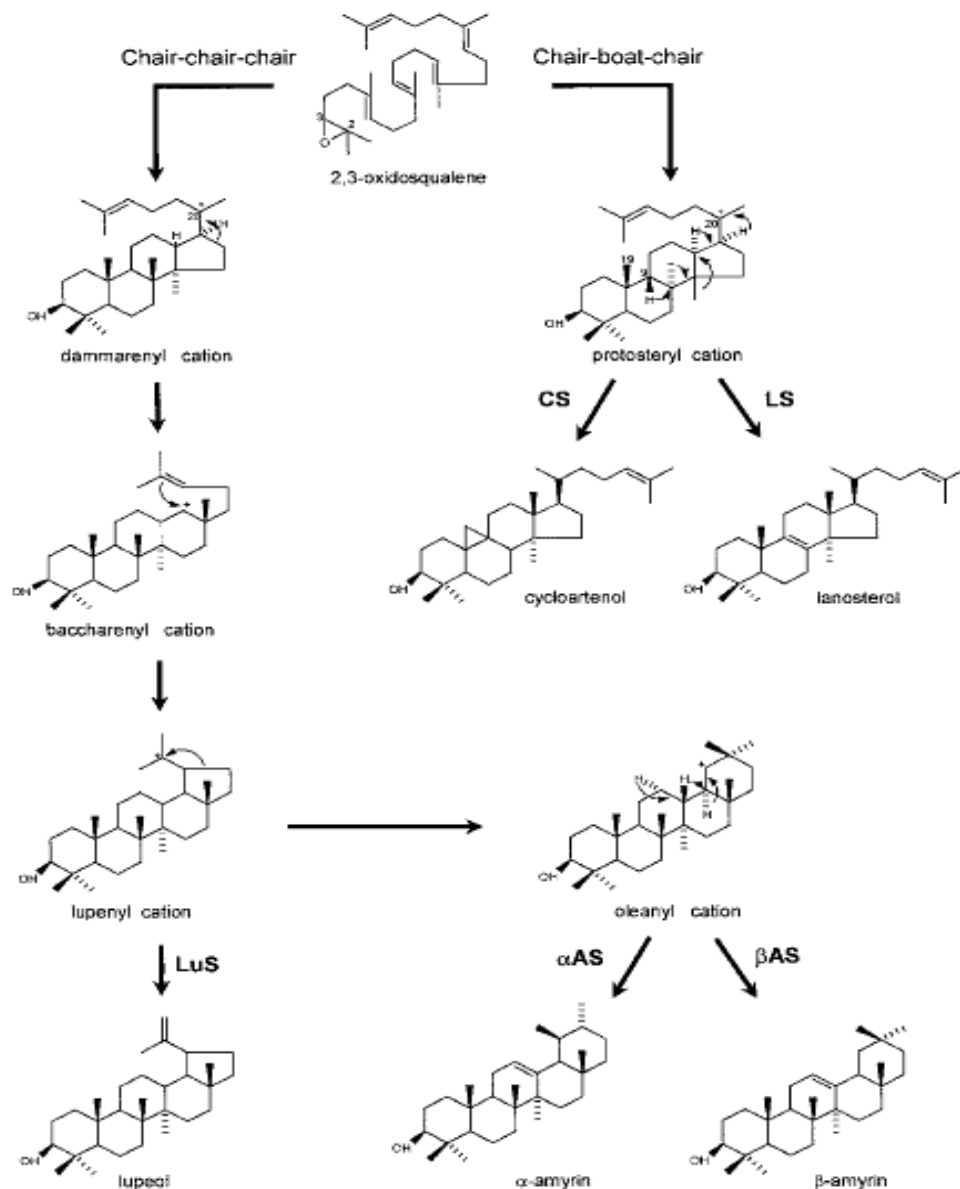
Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο αποτελεί σημείο διακλάδωσης μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού καθώς μπορεί είτε να κυκλοποιηθεί και να παραχθούν στερόλες και στεροειδή (πρωτογενείς μεταβολίτες), τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, είτε να κυκλοποιηθεί προς σχηματισμό τριτερπενοειδών αλκοολών ή αλδεϋδών (δευτερογενείς μεταβολίτες). Τα ένζυμα που καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (συνθάσες ή κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλένιου, OSCs) σταθεροποιούν ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων για να σχηματιστεί μέχρι και εξακυκλικός ανθρακικός σκελετός (Phillips et al,2006).

Η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS) μετατρέπει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σε κυκλοαρτενόλη διαμέσου του ενδιάμεσου κατιόντος του προτοστερυλίου στη “chair-boat-chair” διαμόρφωση προς παραγωγή στερολών και στεροειδών. Οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες προκύπτουν από τη δράση των OSCs διαμέσου σχηματισμού του ενδιάμεσου κατιόντος του νταμαρενυλίου στη μορφή “chair-chair-chair”. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις δύο διαμορφώσεις είναι ότι στη διαμόρφωση “chair-chair-chair”, η μεθυλομάδα του άνθρακα 8 «δείχνει» προς τα πάνω και η μεθυλομάδα του άνθρακα 14 «δείχνει» προς τα κάτω, ενώ στη διαμόρφωση “chair-boat-chair”, εμφανίζεται η αντίθετη στερεοδιάταξη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο ανθρακικός σκελετός στα τριτερπένια είναι πεντακυκλικός. Αυτός προέρχεται από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο στην «pre-chair-

chair-chair» διαμόρφωση και η επαγόμενη από πρωτόνια κυκλοποίηση οδηγεί στην παραγωγή του κατιόντος του νταμαρενυλίου. Μία μετατόπιση δεσμού μεταξύ των ανθράκων 16-17 οδηγεί στο σχηματισμό του τετρακυκλικού καρβοκατιόντος του μπαχαρενυλίου και μετατρέπεται στο πεντακυκλικό καρβοκατιόν του λουπενυλίου, έπειτα από αντίδραση του δεσμού μεταξύ των ανθράκων 24 και 25. Το καρβοκατιόν του λουπενυλίου μπορεί να αναδιοργανωθεί περαιτέρω, πρώτα σε καρβοκατιόν του γερμανικενυλίου του άνθρακα 18 και έπειτα μέσω μιας σειράς μετατόπισης υδρογόνων προκύπτει το κατιόν του ολεανυλίου. (Vincken et al, 2007). Αυτό το κατιόν αποτελεί υπόστρωμα για τη συνθάση της α- και η β-αμυρίνης, οπότε και παράγονται τα αντίστοιχα προϊόντα.

Στις τριτερπενοειδείς αλκοόλες ανήκουν η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη. Η συνθάση της λουπεόλης κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του κατιόντος της λουπεόλης, προωθεί την επέκταση του δακτυλίου και τέλος, αποσπά ένα πρωτόνιο από τον άνθρακα 29 για να σχηματιστεί η λουπεόλη. Η συνθάση της β-αμυρίνης παράγει επίσης το κατιόν της λουπεόλης και επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό την επέκταση του δακτυλίου και ορισμένες αναδιαμορφώσεις, πριν την αποπρωτονίωση προς σχηματισμό β-αμυρίνης (Phillips et al.,2006). Όλα τα παραπάνω ένζυμα δρουν μέσω ηλεκτρονιόφιλων μηχανισμών και χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι η παραγωγή πολλαπλών προϊόντων, η οποία ενδέχεται να είναι απόρροια του μηχανισμού των ηλεκτρονιόφιλων αντιδράσεων που καταλύουν, αποσπώντας πρωτόνια από τους άνθρακες των σκελετών των μορίων (Vincken et al.,2007).



Εικόνα 4:Κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προς παραγωγή τριτερπενίων (α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη) και στερολών (κυκλοαρτενόλη και λανοστερόλη). Τα ένζυμα που καταλύουν τις υπαφαινόμενες αντιδράσεις είναι η συνθάση της α-αμυρίνης (αAS), η συνθάση της β-αμυρίνης (βAS), η συνθάση της λουπεόλης (LuS), η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CS) και η συνθάση της λανοστερόλης (LS) (Kushiro et al,1999).

Στο *Lotus japonicus*, έχουν εντοπιστεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν για συνθάσες της β-αμυρίνης στο χρωμόσωμα 3: Το γονίδιο *LjAMY1* που κωδικοποιεί για μία συνθάση της β-αμυρίνης και το γονίδιο *LjAMY2* που κωδικοποιεί μία συνθάση μικτής δράσης. Οι δραστηρότητες αυτών των ενζύμων έχουν διαπιστωθεί με υπερέκφρασή τους σε ζύμες. Στο *Medicago truncatula*, η συνθάση της β-αμυρίνης παράγεται από το γονίδιο *MtAMY1* (ή β-AS) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο αποτελείται από 2286 νουκλεοτίδια προς παραγωγή της

αντίστοιχης πρωτεΐνης που αποτελείται από 762 αμινοξέα 87 kDa, όπως ισχύει και για το γονίδιο *LjAMY2*. Η έκφραση του *MtAMY1* εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στο μεριστωματικό ιστό και στο βλαστό (Iturbe-Ormaeche et al, 2003). Όπως παρατηρήθηκε και στο μπιζέλι (*Pisum sativum*), η μέγιστη παραγωγή της β-αμυρίνης παρατηρείται δύο ημέρες μετά την εκβλάστηση ενώ η βιοσύνθεση των στερολών πραγματοποιείται ορισμένες ημέρες αργότερα.

Το γονίδιο *OSC3* που κωδικοποιεί τη συνθάση της λουπεόλης, έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 2 του *Lotus japonicus*. Εκφράζεται κυρίως στις ρίζες και στα φυμάτια του φυτού (Delis et al, 2010). Στο φυτό *Lotus japonicus* παράγεται αποκλειστικά λουπεόλη (Delis et al, 2010) και το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο αποτελείται από 2265 νουκλεοτίδια, παράγοντας μία πρωτεΐνη 86,6 kDa (Sawai et al.,2006).

Από την β-αμυρίνη, παράγονται κυρίως γλυκοζυλιωμένες μορφές που ονομάζονται σαπωνίνες, που έχουν αντιμυκητιακή δράση, ενώ σε ορισμένα φυτά έχουν προταθεί επιπρόσθετες δράσεις όπως στην περίπτωση του *Pisum sativum* όπου οι σαπωνίνες συμβάλλουν στον βαρυτροπισμό και στην παραγωγή κυτταρίνης (Rahman et al, 2011). Μετά το σχηματισμό του καρβοκατιόντος από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, ο βασικός σκελετός μπορεί να δεχθεί διάφορους υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες, καρβονυλομάδες και κατάλοιπα σακχάρων σε διαφορετικές θέσεις στο σκελετό από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μία πλειάδα προϊόντων.

4. ENZYMA ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 είναι θειολικά ένζυμα με μία ομάδα αίμης, που συμμετέχουν σε πολυάριθμα βιοσυνθετικά μονοπάτια και εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο (Nelson,2009). Τα βακτηριακά ένζυμα του P450 είναι διαλυτά στα βακτήρια, όμως τα φυτικά είναι προσδεμένα πάνω σε μεμβράνες, συνήθως στην κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω ενός μικρού υδροφοβικού τμήματος στο N-τελικό άκρο και πιθανώς, μέσω ενός υδροφοβικού βρόχου της πρωτεΐνης (Williams et al., 2000). Οι αντιδράσεις που καταλύουν είναι ποικίλες, αλλά συνήθως στηρίζονται στην ενεργοποίηση και στην ετερολυτική πρωτεόλυση ενός μορίου οξυγόνου με την εισαγωγή του ενός ατόμου οξυγόνου στο υπόστρωμα και την αναγωγή του άλλου για

τον σχηματισμό νερού (Bernhardt, 2006). Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται ως μονοξυγενάσες και καταλύουν την εξής αντίδραση, κατά την οποία το μοριακό οξυγόνο που είναι συνδεδεμένο με την ομάδα αίμης, ενεργοποιείται από την μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το NADPH μέσω της ρεδοκτάσης του NADPH-κυτοχρώματος P450. Διαφορετικά, το δεύτερο ηλεκτρόνιο μπορεί να προέρχεται από μία εναλλακτική οδό της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου συμμετέχουν τα NADH, η αναγωγή NADH του κυτοχρώματος b_5 και το κυτόχρωμα b_5 (De Vetten et al., 1999).



Η προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου που καταλύουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, όχι μόνο τροποποιούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των τερπενοειδών αλλά ταυτόχρονα, αυξάνει την δομική ποικιλότητα και εισάγει λειτουργικές ομάδες για περαιτέρω τροποποίηση, όπως είναι η γλυκοσυλίωση και η αλκυλίωση (Bak et al., 2013).

Τα φυσικά υποστρώματα των ενζύμων αυτών περιλαμβάνουν πρόδρομα μόρια μεμβρανικών στερολών και δομικών μορίων, όπως η λιγνίνη, η κουτίνη και η σουβερίνη. Συνεισφέρουν επίσης στην ομοίωση φυτικών ορμονών και σηματοδοτικών μορίων, ελέγχοντας την βιοσύνθεσή τους (γιββερελίνη, αυξίνη, κυτοκινίνες, στρινγκολακτόνες) και τον καταβολισμό τους (γιββερελίνες, βρασσινοστεροειδή, αμπισικό οξύ). Επίσης, συμμετέχουν στην παραγωγή μορίων όπως χρωστικές, πτητικές ενώσεις, αντικαρκινικά, μόρια που συμβάλλουν στην άμυνα και στις συμβιωτικές σχέσεις, συμπεριλαμβανομένου φαινολικών ενώσεων και των συζυγών τους, όπως είναι τα φλαβονοειδή, κουμαρίνες, κυανογόνοι γλυκοζίτες, ισοπρενοειδή και αλκαλοειδή (Morant et al., 2003; Mizutani and Otah, 2010). Τέλος, καταβολίζουν και αποτοξικοποιούν ξеноβιοτικές ουσίες, όπως φυτοφάρμακα και ρύπους (Morant et al., 2003).

Τα φυτικά P450 χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Του τύπου-A και του μη τύπου-A (Durstson and Nelson, 1995). Η πλειοψηφία αυτών που συμμετέχουν στον δευτερογενή μεταβολισμό ανήκουν στην πρώτη ομάδα. Ωστόσο, η δεύτερη ομάδα περιέχει μία περισσότερο αποκλίνουσα ομάδα αλληλουχιών, αποτελούμενη από

κλάδους που τα μέλη της είναι φυλογενετικά πιο κοντά σε μη φυτικά P450 και δρουν στον μεταβολισμό ορμονών και λιπιδίων (Paquette et al., 2000).

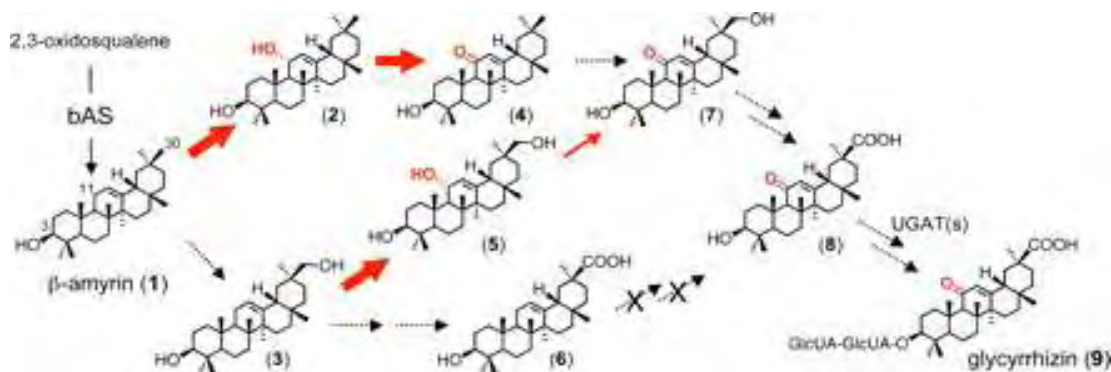
Η οικογένεια CYP71 είναι η πρώτη ομάδα που ταυτοποιήθηκε και η μεγαλύτερη οικογένεια των φυτικών P450 με συστοιχίες που προέρχονται από γονιδιακούς αναδιπλασιασμούς (Nelson and Werck-Reichert, 2010). Άλλες υποοικογένειες CYP71 συμμετέχουν στη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών ινδολίου (CYP71C), τερπενοειδών και φλαβονοειδών (CYP71D), κυανογόνων γλυκοσιδίων (CYP71E), μονο- και σεσκιτερπενοϊδών (CYP71AR, CYP71AV, CYP71BA and CYP71BL), φουρανοκουμαρινών (CYP71AJ) και αλκαλοειδών (CYP71BJ) (Bak et al., 2011). Στην παρακάτω εικόνα, απεικονίζονται τα μέλη της οικογένειας CYP71 και η δράση τους στον μεταβολισμό (Hamberger and Bak, 2013).

clan	subfamily	metabolism	function, class of metabolites
CYP71	CYP71A	specialized	monoterpene
	CYP71AR	specialized	monoterpene
	CYP71AV	specialized	sesquiterpene
	CYP76B	specialized	iridoid monoterpene, xenobiotics detoxification
	CYP71BA	specialized	sesquiterpene
	CYP71BL	specialized	sesquiterpene
	CYP71D	specialized	mixed, including: monoterpene, sesquiterpene, diterpene, indole alkaloid, flavonoid
	CYP71Z	specialized	diterpene
	CYP76M	specialized	diterpene
	CYP82G	specialized	terpene-derived
	CYP93E	specialized	triterpene
	CYP99A	specialized	diterpene
	CYP701A	general	diterpene phytohormone GA
	CYP701A	specialized	diterpene
	CYP705A	specialized	triterpene
	CYP706B	specialized	sesquiterpene

Εικόνα 5: Μέλη της οικογένειας CYP71 στον δευτερογενή μεταβολισμό (Hamberger and Bak, 2013).

Τα ένζυμα CYP88 ανήκουν στην τάξη CYP85 και δρουν στα τερπένια. Μέσω αυτών, στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, παράγονται οι γιββερελίνες (από τα CYP88A3 και CYP88A4, από το ent-καουρενικό οξύ) που είναι τετρακυκλικά διτερπένια με διάφορες δράσεις όπως την αύξηση του βλαστού, την παρθενοκαρπία, την άνθιση και την γονιμοποίηση (Helliwell et al., 2001). Ακόμα, όλα τα μέλη των ενζύμων CYP90 (CYP90A-CYP90D) παράγουν την τριτερπενοειδή ορμόνη μπρασσινολίδη, μέσω υδροξυλιώσεων στους άνθρακες 22 και 23 (Bancos et al., 2002). Το ένζυμο CYP88D καταλύει το σχηματισμό τριτερπενοειδών σαπωνινών, εισάγοντας μία ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα 11 του βασικού σκελετού. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα περιλαμβάνει το σχηματισμό γλυκυριζίνης, μιας σαπωνίνης που

χρησιμοποιείται ως γλυκαντική και αντιφλεγμονώδης ουσία, στη γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra*). Αυτές περιλαμβάνουν διαδοχικές υδροξυλιώσεις στον άνθρακα 11 και 30 της β-αμυρίνης αντίστοιχα από την μονοξυγενάση CYP88D6, που εντοπίζεται αποκλειστικά στην οικογένεια Fabaceae, και από μία γλυκοσυλίωση στη θέση 3 του υδροξυλίου (εικόνα 6) (Seki et al., 2008).



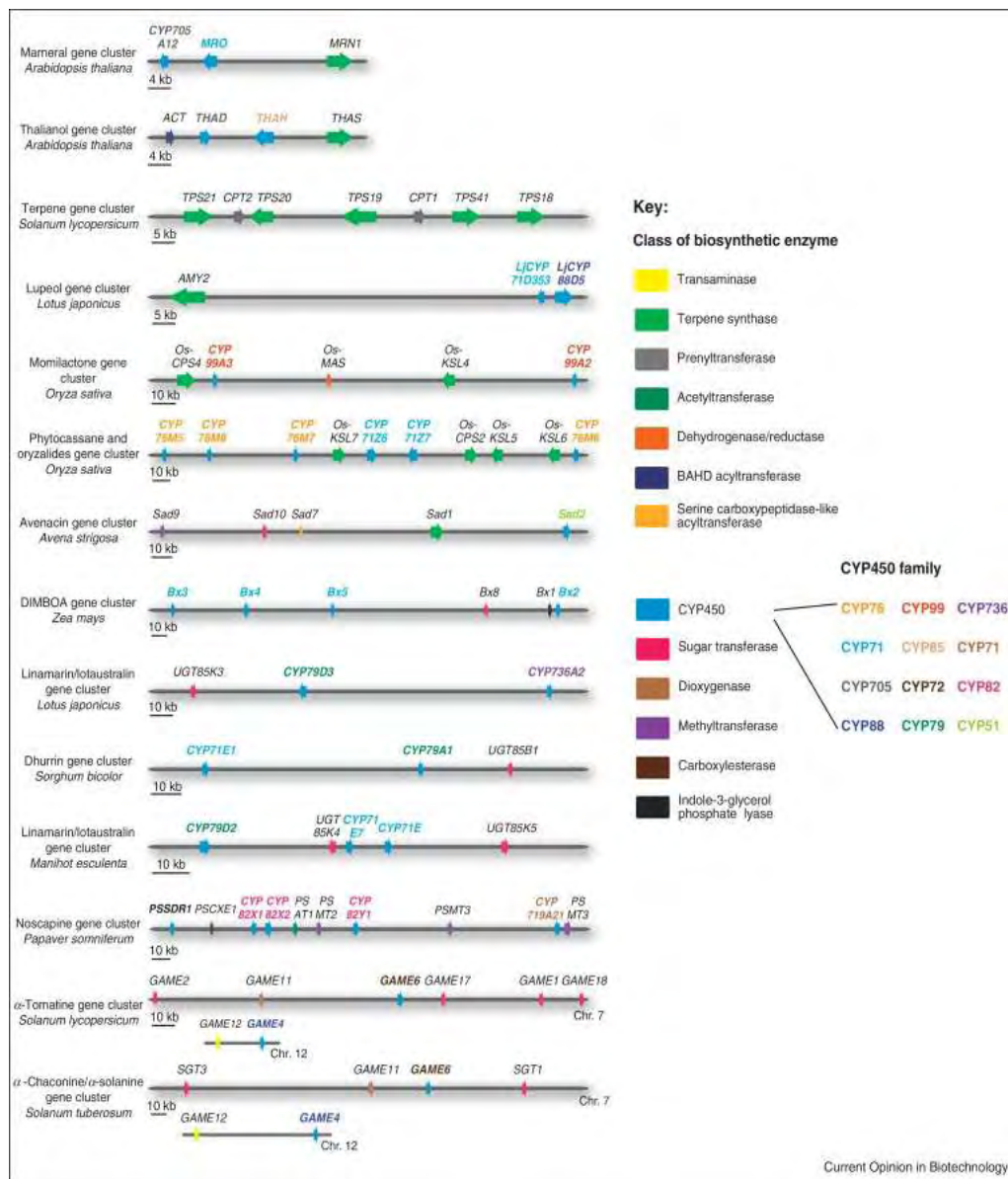
Εικόνα 6: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκυριζίνης στο *Glycyrrhiza glabra* (Seki et al., 2008)

5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Η πρώτη γονιδιακή συστοιχία που εμπλέκεται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά βρέθηκε στον αραβοσίτο (*Zea mays*) για τη σύνθεση των κυκλικών υδροξαμικών οξέων 2,4-διυδροξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIBOA) και 2,4-διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (Osbourne, 2012). Σε αντίθεση με τους προκαρυώτες, των οποίων τα γονίδια είναι οργανωμένα σε οπερόνια, στα φυτά δεν είναι συνηθισμένη αυτή η οργάνωση. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτούς τους σχηματισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά το πιθανότερον είναι ότι η συγκρότηση τους γίνεται *de novo* έπειτα από γονιδιακό διπλασιασμό, αναπρογραμματισμό της λειτουργικότητας των αρχικών γονιδίων και αναπροσαρμογή του γονιδιώματος του φυτού (Osbourne, 2009). Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενζύμων, κυρίως συνθάσεων, που λειτουργούν ως ικρίωμα για το δευτερογενή μεταβολίτη και τη στρατολόγηση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα CYP450 και άλλα ένζυμα (μεθυλοτρανσφεράσες, γλυκοσυλτρανσφεράσες, οξειδοορεδοκτάσες) που εμπλέκονται στην τροποποίηση του βασικού σκελετού των τριτερπενοειδών (Chu et al., 2011). Οι διαφορετικές γονιδιακές συστοιχίες στα φυτά φαίνεται ότι εξελίχθηκαν ανεξάρτητα (Osbourne, 2009).

Μέσω της οργάνωσης των γονιδίων σε γονιδιακές συστοιχίες, παρέχονται μηχανισμοί για τη ρύθμιση της έκφρασής τους σε επίπεδο οργάνωσης πυρήνα ή/και χρωματίνης με τέτοιο τρόπο ώστε τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού να παράγονται στο σωστό μέρος την κατάλληλη στιγμή. Να σημειωθεί ότι αντίθετα με τα οπερόνια, τα γονίδια μεταγράφονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο στις γονιδιακές συστοιχίες. Παράλληλα αποτρέπεται η συγκέντρωση επιβλαβών ενδιάμεσων του μεταβολισμού, που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη ή την επιβίωση του φυτού (Chu et al., 2011).

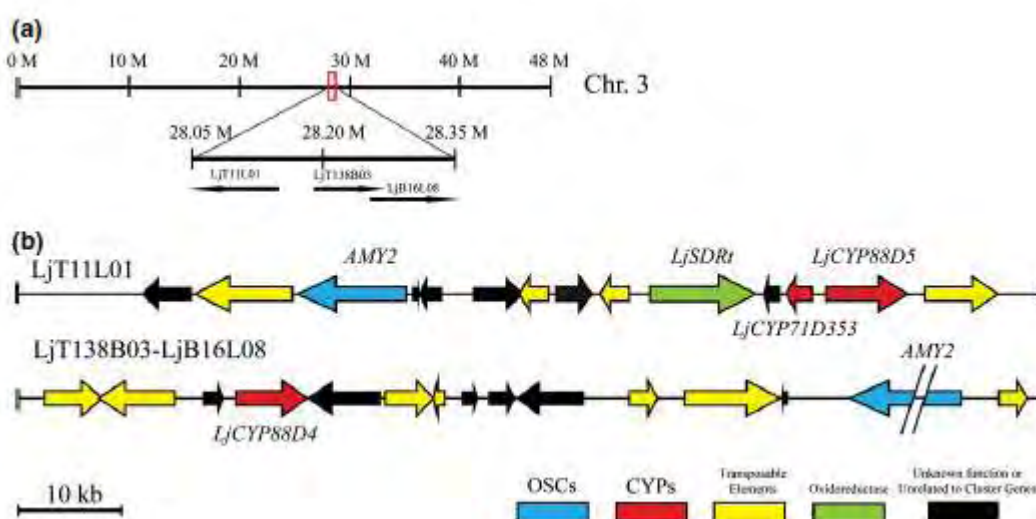
Γενικότερα, έχουν βρεθεί γονιδιακές συστοιχίες για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως είναι οι γονιδιακές συστοιχίες της μομιλακτόνης και της φυτοκασσάνης, που είναι διτερπένια, στο ρύζι (*Oryza sativa*), της νοσκαπίνης, ενός αντικαρκινικού αλκαλοειδούς, στην παπαρούνα (*Papaver somniferum*), της θαλιανόλης και της μαρνεράλης στο *Arabidopsis thaliana*, κυανογόνων γλυκοζιτών σε *Lotus* (lotaustralin και linamarin), *Sorghum bicolor* (dhurrin) και στεροειδών γλυκοαλκαλοειδών στη ντομάτα (α-τοματίνη στο είδος *Solanum lycopersicum*) και στην πατάτα (α-τσακονίνης/α-σολανίνης στο είδος *Solanum tuberosum*) (Nutzmann, 2014).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των γονιδιακών συστοιχιών που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Τα βέλη υποδεικνύουν τα γονίδια που υπάρχουν στις γονιδιακές συστοιχίες και οι διαφορετικοί χρωματισμοί υποδηλώνουν την τάξη των ενζύμων που κωδικοποιούν, όπως φαίνεται στο υπόμνημα (Nutzmann, 2014).

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η γονιδιακή συστοιχία AMY2 του φυτού *Lotus japonicus*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3. Αυτή αποτελείται από το γονίδιο AMY2, που σύμφωνα με την υπερκεραση του γονιδίου σε κύτταρα ζύμης κωδικοποιεί για μία μικτής δράση συνθάση της β-αμυρίνης προς παραγωγή β-αμυρίνης (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003) και δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5*. Τα γονίδια αυτά είναι γειτονικά μεταξύ τους, απέχουν περίπου 60 kb από το γονίδιο της AMY2 και πιθανώς μοιράζονται ένα κοινό ρυθμιστικό στοιχείο 2 kb. Το γονίδιο *LjCYP71D353* είναι φυλογενετικά κοντά με το γονίδιο CYP71A16 του *Arabidopsis thaliana*, το οποίο

κωδικοποιεί για την οξειδάση της μαρνεράλης, που εμπλέκεται στο αντίστοιχο μονοπάτι (Field et al., 2011), ενώ το γονίδιο *LjCYP88D5* έχει 71% ομοιότητα με την 11-οξειδάση που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της γλυκυρριζίνης, όπως ήδη περιγράφηκε. Ανάμεσα στα γονίδια *AMY2* και τα δύο γονίδια του κυτοχρώματος P450, εντοπίζεται άλλο ένα γονίδιο, το *LjSDRt*, το οποίο έχει 82% ομοιότητα με την παρόμοια της κοντής αλυσίδας αφυδρογονάση/ρεδουκτάσης, *HCF173* του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Krokida et al., 2013). Στο ίδιο χρωμόσωμα εδράζεται μία δεύτερη γονιδιακή συστοιχία, 200 kb από την πρώτη και αποτελείται από δύο μόνο γονίδια: Ένα γονίδιο που έχει 99% ομολογία με την *AMY2*, του οποίου η αλληλουχία διακόπτεται από μία ένθεση 5 kb ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μία προβλεπόμενη U-box πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο γονίδιο (*LjCYP88D4*) κωδικοποιεί για το αντίστοιχο ένζυμο του κυτοχρώματος P450 με 72% με το γονίδιο της 11-οξειδάσης της μαρνεράλης. Τα γονίδια αυτά απέχουν μεταξύ τους 70 kb (Krokida et al., 2013).



Εικόνα 8: (α): Γενετικός χάρτης της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2* στο χρωμόσωμα 3 του *Lotus japonicus*. (β): Γονιδιακή οργάνωση των γονιδιακών συστοιχιών *AMY2* (Krokida et al., 2013).

6. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

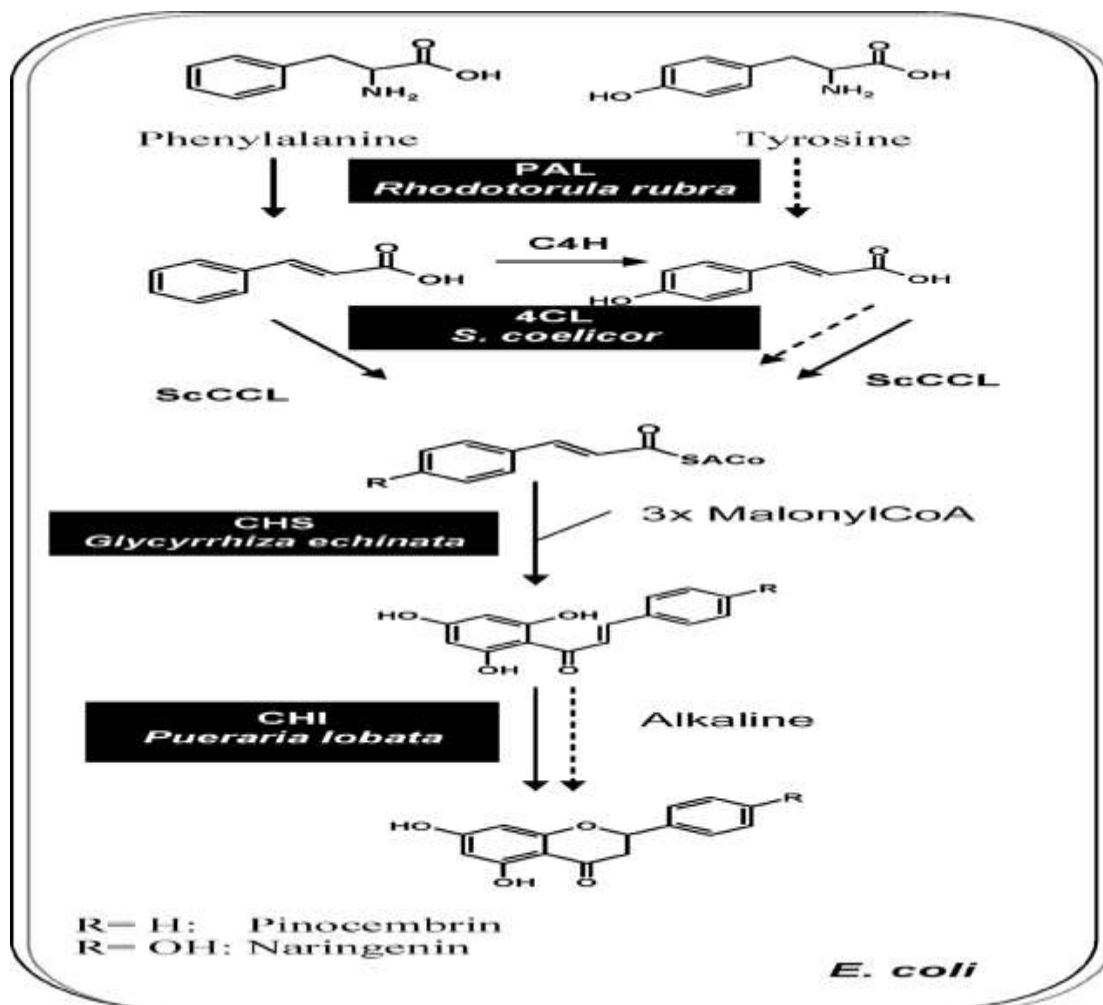
6.1. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ (COMBINATORIAL BIOLOGY)

Η συνδυαστική βιολογία και οι εφαρμογές της αποτελούν ένα σχετικά καινούριο και ισχυρό εργαλείο για την παραγωγή σπάνιων ή ακριβών χημικών

ενώσεων με ποικίλες δράσεις. Η βασική ιδέα είναι η έκφραση μεταβολικών μονοπατιών σε διαφορετικούς οργανισμούς σε γενετικό επίπεδο. Συνεπώς, ετερόλογοι οργανισμοί παρέχουν πρόδρομα μόρια του μεταβολισμού, πρωτογενούς ή δευτερογενούς, προς παραγωγή νέων μορίων χάρη στην έκφραση ετερόλογων γονιδίων.

Ο κλάδος αυτός αναπτύσσεται συνεχώς, από τη στιγμή που έχουν γίνει επιτυχημένες προσπάθειες παραγωγής γνωστών βιοδραστικών μορίων, μέσω της εισαγωγής ελεγχόμενου συνδυασμού γονιδίων, που συμμετέχουν σε ένα συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι (Julsing et al., 2006). Η πρώτη εφαρμογή της συνθετικής βιολογίας αφορούσε την οικογένεια ενζύμων της πολυκετιδικής συνθάσης (PKS), που οφειλόταν στην προβλεψιμότητα των τελικών προϊόντων, δεδομένου ότι κάθε ένζυμο του μονοπατιού καταλύει ένα ειδικό στάδιο στη σύνθεση των πολυκετιδίων, πριν περάσει το παραγόμενο προϊόν της αντίδρασης στο επόμενο μόριο (Wong et al, 2012). Λόγω της ιδιότητας του συμπλόκου αυτού, κατέστη δυνατή η δημιουργία νέων μη φυσικών μορίων με τον διαφορετικό συνδυασμό γονιδίων, όπως έγινε στην περίπτωση της ερυθρομυκίνης, όπου έπειτα από την υποκατάστασή των αντίστοιχων συνθασών με ακυλτρανσφεράσες, παρήχθησαν 61 νέα μόρια, πολλά από τα οποία δεν υπάρχουν στη φύση (McDaniel et al., 1999).

Μία άλλη στρατηγική της συνθετικής βιολογίας είναι ο συνδυασμός για τη de novo σύνθεση μονοπατιών σε ετερόλογους οργανισμούς. (Cobb et al., 2014). Ένα παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή δύο φλαβονονών (pinocerbin και naringenin) στο βακτήριο *Escherichia coli*, μέσω της έκφρασης της λυάσης της αμμωνίας της φαινυλαλανίνης από τον μύκητα *Rhodotorula rubra*, της λιγάσης του 4-κουμαρικού-CoA από το ακτινοβακτήριο *Streptomyces coelicolor*, της συνθάσης της χαλκόνης από το ψυχανθές *Glycyrrhiza echinat* και την ισομεράση της χαλκόνης από το φυτό *Pueraria lobata*.

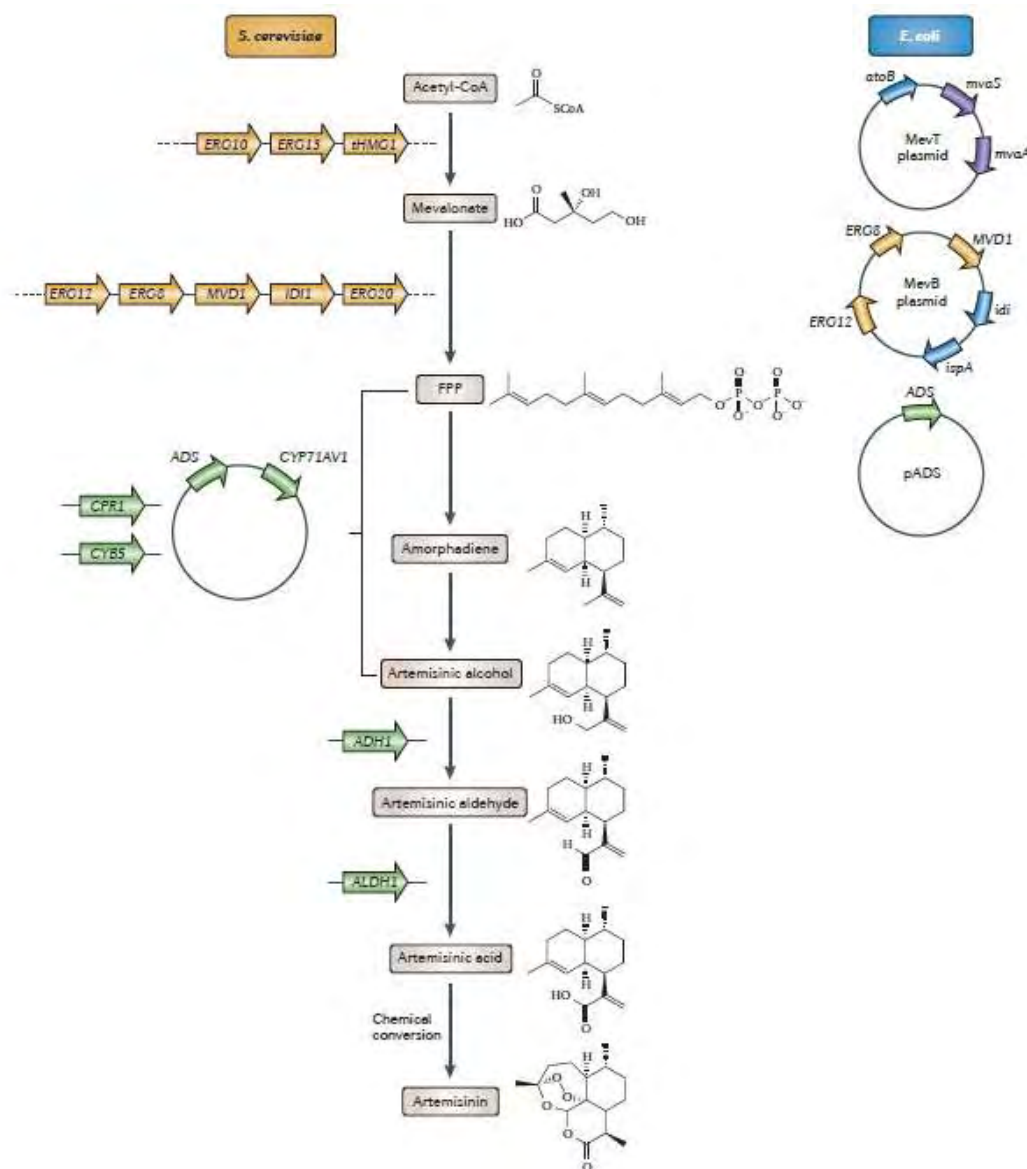


Εικόνα 9: Απεικόνιση της σύνθεσης των флаβονονών pinocembrin και naringenin στο βακτήριο *E.coli*.

Τέλος, για την παραγωγή βιοδραστικών τριτερπενιοδών μορίων, απαιτείται τουλάχιστον μία κυκλάση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου για την μετατροπή ενός γραμμικού πρόδρομου μορίου ισοπρενίου σε κυκλικό τερπένιο. Μέσω συνδυασμών ετερόλογων γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που δρουν πάνω στον βασικό σκελετό των τερπενίων, όπως είναι ένζυμα του κυτοχρώματος P450, γλυκοσυλτρανσφεράσες και ακετυλοτρανσφεράσες, μπορούν να σχηματιστούν ενώσεις με διαφορετικές υποκαταστάσεις που να έχουν βιοδραστικές δράσεις (π.χ. αντικαρκινική) και μάλιστα με μειωμένη τοξικότητα για τον ανθρώπινο οργανισμό (Cobb et al., 2014).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της συνθετικής βιολογίας με πρακτική εφαρμογή είναι η παραγωγή αρτεμισινίνης στη ζύμη. Η αρτεμισινίνη είναι ένα αντιελονοσιακό μόριο, που ανήκει στην οικογένεια των σесκιτερπενίων και παράγεται κανονικά στο φυτό *Artemisia annua*. Αρχικά, το βακτήριο *Escherichia coli* είχε χρησιμοποιηθεί ως ετερόλογος φορέας, ωστόσο ήταν μικρή η παραγωγή του

πρόδρομοι μόριου της αρτεμισίνης, το αμορφαδιένιο, ενώ ταυτόχρονα δεν ήταν δυνατή η πραγματοποίηση των αντιδράσεων, μετά τη σύνθεση του αμορφαδιενίου. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε τελικά η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* στην οποία ενσωματώθηκαν σχεδόν όλα τα γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του αρτεμισινικού οξέος στο γονιδίωμα της και την τελική παραγωγή αρτεμισίνης, έπειτα από την χημική τροποποίηση του αρτεμισινικού οξέος (εικόνα 8) (Paddon and Kaesling, 2014).



Εικόνα 8: Παραγωγή αρτεμισίνης στους ετερόλογους φορείς *E.coli* και *S. cerevisiae*. Αρχικά, είχε χρησιμοποιηθεί το βακτήριο *E.coli* ως φορέας και σε αυτό είχε εκφραστεί το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος μέσω των πλασμιδίων (MevB & MevT), μαζί με τη συνθάση του αμορφαδιενίου από το φυτό *Artemisia annua* (ADS), που μετατρέπει το ακεύλο-CoA σε αμορφαδιένιο. Στον σακχαρομύκητα, ενσωματώθηκαν όλα τα γονίδια στο γονιδίωμά του για την υπερέκφραση του μονοπατιού, εκτός των γονιδίων ADS και CYP71AV1, που εισήχθησαν μέσω πλασμιδιακών φορέων και μετατρέπουν το αμορφαδιένιο σε αρτεμισινική αλκοόλη. Με την ενσωμάτωση των γονιδίων ADH1 και ALDH1 στο χρωμόσωμα της ζύμης, έγινε δυνατή η παραγωγή του αρτεμισινικού οξέος. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που έχουν ληφθεί από το βακτήριο *E. coli*, με κίτρινο από τη ζύμη, με μωβ από το *Staphylococcus aureus* και με πράσινο από το *Artemisia annua*.

Συντομογραφίες: *ADH1*: Αφυδρογονάση αρτεμισινικής αλκοόλης. *ADS*: Συνθάση του αμορφαδιένιου. *ALDH1*: Αφυδρογονάση αρτεμισινικής αλδεΐδης. *atoB* & *ERG10*: Θειολάση ακέτυλο-CoA. *CPR1*: Αναγωγή κυτοχρώματος P450. *CYB5*: κυτόχρωμα b₅. *CYP71AV1*: Ένζυμο του κυτοχρώματος P450 που μετατρέπει το αμορφαδιένιο σε αρτεμισινική αλκοόλη. *ERG8*: Κινάση του φωσφομεβαλονικού οξέος. *ERG12*: Κινάση του μεβαλονικού οξέος. *ERG13* & *mvaS*: Συνθάση του HMG-CoA. *idi* & *IDI1*: Ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου. *ispA* & *ERG20*: Συνθάση του διφωσφορικού φαρνεσυλίου. *mvaA*: Αναγωγή του HMG-CoA. *MVD1*: Αποκαρβοξυλάση του διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος. *tHMG1*: «Περικομμένη» αναγωγή HMG-CoA

6.2 ΪΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

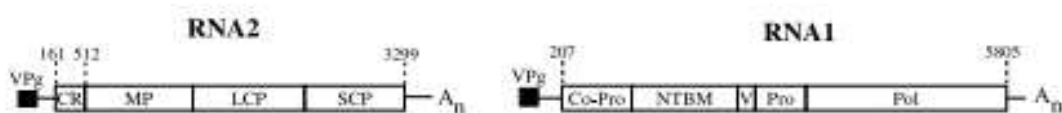
Τα φυτά έχουν αποτελέσει ένα εναλλακτικό και χρήσιμο σύστημα έκφρασης ετερόλογων ή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε σχέση με καλλιέργειες κυττάρων από βακτήρια, ζύμες ή ζώα. Το κόστος είναι χαμηλό, πραγματοποιούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά την επεξεργασία των πρωτεϊνών, ενώ αναλόγως το φυτό που χρησιμοποιείται, είναι δυνατή η παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεϊνών λόγω μεγάλης βιομάζας (Peyrett and Lomanosoff, 2013).

Υπάρχουν δύο τρόποι ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών στα φυτά: Ο σταθερός και ο παροδικός μετασχηματισμός. Κατά τον σταθερό μετασχηματισμό, τα φυτά τροποποιούνται γενετικά ώστε και οι απόγονοι να έχουν την επιθυμητή ιδιότητα και έχουν μεγάλη ικανότητα αναπαραγωγής. Ωστόσο, η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών απαιτεί πολύ χρόνο και είναι πιθανή η χαμηλή έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος που έχει εντεθεί στο φυτικό γονιδίωμα λόγω του φαινομένου θέσης (position effect) (Kusnadi et al., 1997). Στον παροδικό μετασχηματισμό, είναι δυνατή η παραγωγή πρωτεϊνών σε μικρό χρονικό διάστημα, χρησιμοποιώντας τροποποιημένους ιϊκούς φορείς σε αγροβακτήρια. Οι ιϊκοί φορείς πολλαπλασιάζονται στο βακτήριο-ξενιστή και η μεταφορά του γονιδιώματος γίνεται μέσω της διαδικασίας του αγροεμποτισμού (agroinfiltration), κατά την οποία καλλιέργεια αγροβακτηρίων μετασχηματισμένων με τους φορείς, εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο του μεσόφυλλου, έπειτα από ένεση με την χρήση σύριγγας (Gopinath et al., 2000).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μία έντονη εξέλιξη για την ανάπτυξη ιϊκών φορέων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ιοί με γονιδίωμα DNA διπλής αλυσίδας, όπως ο CaMV (Cauliflower Mosaic Virus). Ωστόσο, μπορούσαν να εντεθούν πολύ μικρά τμήματα ξένου DNA, ενώ ταυτόχρονα εμφανιζόταν απώλεια των βασικών λειτουργιών έπειτα από θραύση ή απώλεια μικρών τμημάτων του γονιδιώματος (Brisson et al., 1984). Η επόμενη γενιά φορέων περιλάμβανε RNA ιούς. Μειονεκτούν σε ορισμένα χαρακτηριστικά όπως είναι ο περιορισμός του μεγέθους του ενθέματος

που μπορεί να εντεθεί χωρίς να διακυβευτεί η πιστότητα των μεταγράφων, λόγω της έλλειψης επιδιορθωτικής ικανότητας της RNA-εξαρτώμενης RNA-πολυμεράσης. Ακόμα, φορείς που βασίζονται σε ιούς πλήρους μήκους προκαλούν συστημική εξάπλωση ιϊκών σωματιδίων, τόσο σε ολόκληρο το φυτό, όσο και στα γειτονικά του (Cañizares et al., 2006). Ωστόσο, ο μηχανισμός διπλασιασμού τους και με τις κατάλληλες τροποποιήσεις είναι δυνατή η παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης, χωρίς την δημιουργία πλήρως λειτουργικών ιϊκών σωματιδίων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν οι ιοί PVX (Potato Virus X) και TMV (Tobacco Mosaic Virus). Σε αμφότερους τους ιούς, το γονιδιώμά τους είναι μονομερές, δηλαδή το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μόνο μόριο RNA και αυτό είναι το σημαντικότερο μειονέκτημά τους, επειδή στερείται η δυνατότητα έκφρασης πολλών πρωτεϊνών ταυτόχρονα (Lico et al., 2008). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ιϊκούς φορείς που δρουν συνεργειακά στη φύση, όπως έγινε στην περίπτωση έκφρασης βαρέων και ελαφριών αλυσίδων του ογκο-ειδικού IgG σε φορείς που βασίστηκαν στους ιούς TMV και PVX (Giritch et al., 2006)

Πλέον, ο ιός CPMV (Cowpea Mosaic Virus), μέλος του γένους Comovirus, (Lomonosoff and Johnson, 1995) χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στα φυτά. (Gopinath et al., 2000). Το γονιδίωμα του αποτελείται από δύο μόρια RNA θετικής πολικότητας: το RNA-1 μήκους 5.889 bp και το RNA-2 μήκους 3.481 bp, τα οποία καμνιδιώνονται ξεχωριστά. Αμφότερα τα μόρια περιέχουν ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο, όπου παράγονται ιϊκά μόρια RNA με μία πρωτεΐνη VPg (Viral Protein genome-linked) στο 5' άκρο, που λειτουργεί ως εκκινήτης για τη σύνθεση RNA και μία πολύ(A) ουρά στο 3'-άκρο. Το RNA-1 κωδικοποιεί για μία πρωτεάση, μία ελικάση και μία RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, δηλαδή για ένζυμα που συμβάλλουν στον αναδιπλασιασμό του ιϊκού γονιδιώματος. Το RNA-2 κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μετακίνησης και δύο πρωτεΐνες-κάλυμμα, την μεγάλη (L) και την μικρή (S) (Mandahar, 2006).



Εικόνα 10: Οργάνωση του CPMV γονιδιώματος. Οι θέσεις των κωδικονίων έναρξης και λήξης υποδεικνύονται με τις διακεκομμένες ευθείες. Συντομογραφίες: V, VPg: Viral Protein genome-linked, CR: Συμπαράγοντας για τον διπλασιασμό του RNA-2, MP: Πρωτεΐνη μετακίνησης, LCP: Μεγάλη πρωτεΐνη-κάλυμμα, SCP: Μικρή πρωτεΐνη-κάλυμμα, Co-Pro: Συμπαράγοντας για πρωτεϊνάση, NTBM: Πρωτεΐνη

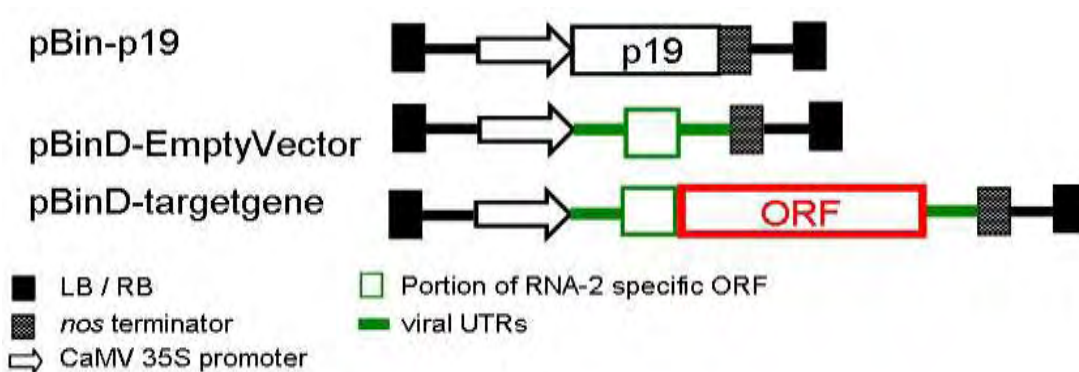
Μελέτες έδειξαν ότι με την αφαίρεση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες-κάλυμμα και την πρωτεΐνη μετακίνησης στο μόριο RNA-2, διατηρούταν η ικανότητα πολλαπλασιασμού του ιού, δεδομένου ότι υπήρχαν οι κατάλληλες αλληλουχίες στο 5'-άκρο, χωρίς να παράγονται λειτουργικά σωματίδια CPMV (Sainsbury et al., 2008). Μάλιστα, η έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος ήταν υψηλή όταν τα φυτά ήταν εφοδιασμένα με μόρια RNA-1, που κωδικοποιούν για την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, είτε μέσω εξωγενούς χορήγησης είτε σε σταθερές φυτικές σειρές που παράγαν μόρια RNA-1 (Cañizares et al., 2006). Μάλιστα, η χορήγηση ενός ισχυρού καταστολέα σίγησης της μεταγραφής, τον p19 από τον ιό Tomato bushy stunt, βοήθησε στην αυξημένη σταθερότητα των mRNAs που παράγονται κατά τη μεταγραφή σε τέτοιο βαθμό που η χορήγηση μορίων RNA-1 δεν είναι απαραίτητη (Sainsbury et al., 2009)

Για τη δημιουργία νέων εύχρηστων φορέων που εκφράζουν ετερόλογες πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε από έναν pBinP-1-GFP φορέα, ολόκληρη η αλληλουχία του RNA-2, με το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης nos (nopaline synthase) και υπό την επίδραση του ισχυρού προαγωγέα 35S από τον ιό CaMV από το πλασμίδιο pBinP-S2NT και εντέθηκε στο πλασμίδιο pM81W) (Liu and Lomanosoff, 2002), έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AscI/PacI (Liu and Lomanosoff, 2006). Το πλασμίδιο αυτό υπεβλήθη σε κατευθυνόμενες μεταλλάξιγενέσεις με αποτέλεσμα την αφαίρεση δύο θέσεων περιορισμού BspHI και την δημιουργία νέων θέσεων περιορισμού, μιας θέσης BspHI στο κωδικόνιο AUG στη θέση 512 και μίας θέσης StuI, μετά το κωδικόνιο λήξης UAA στη θέση 3299 (πλασμίδιο pM81B-S2NT1) (Liu and Lomanosoff, 2006). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/AscI στο πλασμίδιο pBin-NS-1 και το τμήμα που προέκυψε, κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pM81B-S2NT1, που είχε υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα, με αποτέλεσμα την παραγωγή του πλασμιδιακού φορέα pM81-FSC (Liu and Lomanosoff, 2006).



Εικόνα 11: pM81-FSC1 φορέας. Οι διάφορες θέσεις περιορισμού αναγράφονται με τα βέλη. MP: Πρωτεΐνη μετακίνησης L: Μεγάλη πρωτεΐνη-κάλυμμα S: Μικρή πρωτεΐνη-κάλυμμα GFP: Green Fluorescence Protein

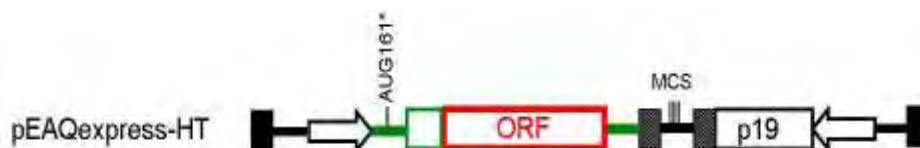
Με αυτόν τον ενδιάμεσο φορέα, είναι δυνατή η αντικατάσταση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ιϊκές πρωτεΐνες με το επιθυμητό γονίδιο, έπειτα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BspHI/StuI, διατηρώντας ταυτόχρονα τις απαραίτητες αλληλουχίες στα άκρα του φορέα, για τον πολλαπλασιασμό μέσα στο φυτό. Έπειτα, το τμήμα που προκύπτει από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού PacI/AscI, μπορεί να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακούς φορείς, όπως τον pBinD.



Εικόνα 12: Φορείς pBin-p19 για καταστολή της σίγησης της έκφρασης και του φορέα για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA.

Το σύστημα αυτό βελτιώθηκε περαιτέρω και οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών έπειτα από την αφαίρεση του κωδικονίου έναρξης στην θέση 161 (Sainsbury and Lomonosoff, 2008). Στο 5' άκρο, το μόριο RNA-2 έχει τρία κωδικόνια έναρξης: Στις θέσεις 115, 161 και 512. Το πρώτο είναι εκτός αναγνωστικού πλαισίου, ενώ τα υπόλοιπα δύο βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Βρέθηκε ότι η αφαίρεση του κωδικονίου 161 οδήγησε σε πολύ μεγαλύτερη έκφραση ετερόλογης πρωτεΐνης. Αυτό το φαινόμενο πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη μετάφραση, όταν τα ριβοσώματα δεν ξεκινούν τη μετάφραση από το κωδικόνιο έναρξης στη θέση 161, δεν μπορούν να προχωρήσουν στο επόμενο κωδικόνιο έναρξης, έτσι ώστε να παραχθούν οι ξένες πρωτεΐνες (Sainsbury and Lomonosoff, 2008). Επιπλέον τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν περιλάμβαναν την ενσωμάτωση του γονιδίου p19 που προκαλεί καταστολή της σίγησης και την

αφαίρεση αλληλουχιών που δεν είναι απαραίτητες στον πολλαπλασιασμό και συμβάλλουν στην ενσωμάτωση μεγαλύτερων γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, προέκυψαν οι φορείς έκφρασης pEAQ που οδήγησε στη δημιουργία του συστήματος υπερέκφρασης CPMV-HT που χρησιμοποιείται πλέον ευρύτατα σε πειράματα συνδυαστικής βιολογίας.



Εικόνα 13: pEAQ-express φορέας για την υπερέκφραση γονιδίων DNA. Στην εικόνα απεικονίζονται τα συνοριακά άκρα LB και RB (μαύρα κουτιά), το μεταλλαγμένο κωδικόνιο έναρξης 161, η θέση πολυσυνδέτη (MCS) και ο καταστολέας της σίγησης p19.

Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για την παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών με φαρμακευτικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, έχει επιτευχθεί η παραγωγή του ανθρώπινου αντι-HIV μονοκλωνικού αντισώματος 2G12 (Sainsbury et al., 2010). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει έναν υψηλά συντηρημένο επίτοπο της πρωτεΐνης φακέλου gp120 του ιού HIV-1, που αποτελείται από N-γλυκάνες μαννόζης (Trkola et al, 1996) και παρεμποδίζει την εξάπλωση του ιού HIV στα υγιή ανθρώπινα κύτταρα (Hessell et al., 2009). Κατά την παραγωγή του αντισώματος, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες παραγωγής του αντισώματος και διαπιστώθηκε αφ' ενός η υπεροχή του συστήματος CPMV-HT συγκριτικά με τα άλλα προαναφερθέντα συστήματα όσον αφορά την ποσότητα αντισώματος ανά κιλό φυτικού ιστού που μπορεί να παραχθεί, αφ' ετέρου η παραγωγή του αντισώματος πλήρους λειτουργικότητας λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και των γλυκοζυλιώσεων που πραγματοποιούνται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο των κυττάρων του καπνού.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR=Polymerase Chain Reaction*) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μία θερμοκρασία στην άλλη, η οποία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR, εκτός του DNA-εκμαγείου, είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Αρχικά, προστίθεται το DNA και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που έχουν αναμειχθεί όλα μαζί (master mix).

PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
DNA-εκμαγείο	2
Ορθόδρομος εκκινητής (5μM)	1,6
Οποσθόδρομος εκκινητής (5μM)	1,6
dNTPs (10 mM)	0,4
Taq DNA πολυμεράση (5 unit/μl)	0,08
10X ρυθμιστικό διάλυμα	2
dH ₂ O	12,32
Τελικός όγκος	20

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν τόσο η απλή PCR για την ενίσχυση ολόκληρη της αλληλουχίας των γονιδίων κατά την κλωνοποίηση τους σε πλασμίδια, όσο και η colony PCR για την ταυτοποίηση ένθεσης ή μη των ετερόλογων γονιδίων, έπειτα από την αντίδραση λιγάσης.

Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Phusion High-Fidelity Polymerase της εταιρείας New England BioLabs. Η πολυμεράση αυτή έχει 50 φορές αυξημένη πιστότητα συγκριτικά με την Kara Taq πολυμεράση, λόγω της δραστηκότητας ως 3'-5' εξωνουκλεάσης, ενώ δημιουργεί τυφλά άκρα.

Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη των κλώνων στους 98°C για 30'', ακολουθούμενη από 35 κύκλους που αρχίζουν στους 98°C για 10 δεύτερα, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για 30'' και στους 72°C για 1 λεπτό για την επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων τμημάτων. Μετά το πέρας των κύκλων, η αντίδραση συνεχίζεται για 10 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση όλων των τμημάτων DNA και αδρανοποιείται στους 4°C.

Η colony PCR περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη των κλώνων στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους που αρχίζουν στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για 30'' και στους 72°C για 30''. Μετά το πέρας των κύκλων, η αντίδραση συνεχίζεται για 5 λεπτά στους 72°C για την επιμήκυνση όλων των τμημάτων DNA και αδρανοποιείται στους 4°C.

2.ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων, πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως, από ένα μίγμα τους. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να μετακινούνται από τον αρνητικό πόλο στον θετικό, λόγω της ύπαρξης φωσφορικών ομάδων που εντοπίζονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό.

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται βάσει μεγέθους και διαμόρφωσης σε πηκτή αγαρόζης. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή. Γενικά, σε πηκτή με 0,8% αγαρόζη, διαχωρίζονται τμήματα DNA μήκους 1-12 kb. Όσον αφορά τη διαμόρφωση, τα υπερελικωμένα μόρια κινούνται πιο γρήγορα από τα μόρια με «χαλαρή» διαμόρφωση και τα κυκλικά πιο γρήγορα από τα γραμμικά.

Με τη μέθοδο αυτή, τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο και η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν με την απόσταση που διανύουν στάνταρ θραύσματα γνωστού μεγέθους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων. Για να γίνουν διακριτά τα μόρια του DNA/RNA, προστίθεται το φθορίζον μόριο βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA/RNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μέχρι να λιώσει.
- Στη λιωμένη αγαρόζη, προστίθεται 0,001 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, προστίθενται οι «χτένες», οι οποίες θα δημιουργήσουν τις υποδοχές των δειγμάτων. Προστίθεται το διάλυμα της αγαρόζης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνονται οι «χτένες» και η πηκτή τοποθετείται στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE, μέχρι την πλήρη κάλυψη της πηκτής.
- Πραγματοποιείται η φόρτωση του μάρτυρα (marker) και των δειγμάτων στις υποδοχές της πηκτής. Στα δείγματα προς ανάλυση, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB για την οπτικοποίηση των δειγμάτων στην πηκτή, καθώς και στην ικανότητα τους να διατηρούν τα δείγματα στις υποδοχές και να μην έξω από αυτές.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.
- Τα δείγματα γίνονται ορατά με τη χρήση του υπεριώδους φωτός και μιας κάμερας που επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών της πηκτής.

Υλικά για ηλεκτροφόρηση	
Υλικά	Συστατικά
TAE (50X)	24,2% w/v Tris (BDH), 57,1 ml/l CH ₃ COOH (BDH), 100 ml/l EDTA συγκέντρωσης 0,5 M (Serva).
Βρωμιούχο αιθίδιο	Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C.
DLB (10X)	0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη.

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε, χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Beer-Lambert, κατά την οποία η απορρόφηση του φωτός

από ένα δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που υφίσταται στο διάλυμα, καθώς και του μήκους της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα. Για τον υπολογισμό των παραπάνω παραγόντων, τοποθετήθηκαν 2 μl από κάθε δείγμα σε 48 μl ddH₂O σε ειδική κυβέττα χαλαζία και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση κάθε δείγματος. Η συγκέντρωση δίνεται από τον τύπο:

C = OD₂₆₀ * D * συντελεστής αραιώσης, όπου:

OD₂₆₀: Η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm. Χρησιμοποιείται αυτό το μήκος κύματος, επειδή οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων εμφανίζουν το μέγιστο απορρόφησης σε αυτό το σημείο.

D: Σταθερά, η οποία εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊκού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 μg/ml, ενώ σε καθαρά διαλύματα RNA και ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 40 και 30 μg/ml, αντίστοιχα.

Συντελεστής αραιώσης: Στην περίπτωση μας είναι 1:24, βάσει των ήδη αναφερόμενων ποσοτήτων που προστέθηκαν.

Για τον υπολογισμό της καθαρότητας ενός δείγματος νουκλεϊκών οξέων, υπολογίζεται ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀. Στα 280 nm, οι πρωτεΐνες εμφανίζουν το μέγιστο απορρόφησης, λόγω απορρόφησης του φωτός από τα αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη, τυροσίνη), συνεπώς η ύπαρξη πρωτεϊνών αυξάνει τον παραπάνω λόγο. Όταν η τιμή του λόγου είναι ανάμεσα στις τιμές 1,8 και 2, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

3.1. ΠΕΨΕΙΣ ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

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

Κατά κανόνα, για 1 μg DNA απαιτείται 1 μg ενζύμου. Στην ολική αντίδραση (50μl), τοποθετείται το κατάλληλο buffer αντίδρασης που προτείνεται από την

εκάστοτε εταιρεία και προαιρετικά, BSA (Bovine Serum Albumin), που αποτρέπει την προσκόλληση του ενζύμου στα erpendorfs και στα tips. Οι κατάλληλες συνθήκες για την πέψη μπορούν να βρεθούν από το πρόγραμμα double digest finder της εταιρείας New England BioLabs.

3.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

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

Η αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής συστατικά:

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

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

4.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli*

4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το βακτήριο *E. coli* χρησιμοποιείται ως ξενιστής για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια υποκλωνοποίησης (βακτηριακό στέλεχος, DH5a).

- 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε. Το LB περιέχει τα εξής συστατικά:

Θρεπτικό υπόστρωμα LB	
Συστατικά	Ποσότητες
Bactotryptone	10 gr
Yeast extract	5 gr
NaCl	10 gr
H ₂ O	1 l
Άγαρ (για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα)	1,5%

- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος να έχει οπτική πυκνότητα στα 600 nm $O.D._{600}=0,2-0,3$.
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου MgCl₂ και επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml 0,1 M διαλύματος MgCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Escherichia coli

- Σωλήνας erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους DH5a ξεπαγώνουν στον πάγο.
- Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου ή της πλασμιδιακής κατασκευής.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση (stress) για 1 λεπτό στους 42 °C, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσα στα βακτήρια.

- Προστίθενται 200 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 60 λεπτά.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και έχουν προθερμανθεί στους 37 °C, ώστε να διατηρηθεί αυτή η θερμοκρασία για τη βέλτιστη ανάπτυξη των βακτηρίων. Στη συγκεκριμένη εργασία, προστέθηκε 50 µg/ml του αντιβιοτικού καναμυκίνη.
- Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37 °C, ενώ η μετέπειτα φύλαξη τους στους 4 °C.

5.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404

5.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 χρησιμοποιείται σε πειράματα υπερέκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών, επειδή διαθέτει τα γονίδια *vir* που είναι απαραίτητα για την μεταφορά του γονιδίου ενδιαφέροντες που περικλείεται από τα συνοριακά άκρα του T-DNA.

- Αποικία μεταφέρεται σε 5 ml YEM με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν 50 mg/ml καναμυκίνη και ριφαμπικίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια επώαζεται στους 30°C στις 250 στροφές για μία ημέρα. Το θρεπτικό υλικό YEM περιέχει τα εξής συστατικά:

Θρεπτικό υλικό YEM	
Συστατικά	Ποσότητες (gr/l)
Yeast extract	1
Mannitol	10
Dipotassium phosphate	0,5
Magnesium sulfate	0,2
NaCl	0,1

Άγαρ (για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα)	15
Τελικό pH: 7±0,2	

- Μεταφορά της καλλιέργειας μέχρι η οπτική πυκνότητα να έχει τιμή OD₆₀₀=0,3.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 20 ml κρύου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου συγκέντρωσης 0,1M, το οποίο έχει αποστειρωθεί με φίλτρο.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 2 ml κρύου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου συγκέντρωσης 0,1M με 12,5% γλυκερόλη.
- Διαχωρισμός 50 μl κυττάρων σε αποστειρωμένα erpendorfs και φύλαξη τους στους -80 °C.

5.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Agrobacterium tumefaciens

- Σωλήνας erpendorf που περιέχει 50 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους LBA 4404 ξεπαγώνουν στους 37 °C και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 500 ng πλασμιδίου ή της πλασμιδιακής κατασκευής.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 20 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε καταπόνηση ψύχους (cold stress) για 2 λεπτά σε υγρό άζωτο, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσα στα βακτήρια.
- Τοποθέτηση του δείγματος στους 37 °C για 5 λεπτά.
- Προστίθενται 700 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε επωστήρα στους 30 °C για 60 λεπτά στις 80 rpm.
- Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά.
- Αφαίρεση 600 μl από το υπερκείμενο.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων

και έχουν προθερμανθεί στους 30 °C, ώστε να διατηρηθεί αυτή η θερμοκρασία για τη βέλτιστη ανάπτυξη των βακτηρίων.

- Ανάπτυξη των βακτηρίων για 2-3 ημέρες μέχρι την εμφάνιση αποικιών, ορατών με γυμνό μάτι.

5.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

- Φυγοκέντρηση 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας για 45 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκείμενου. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται εις διπλούν.
- Μηχανική ανάδευση του ιζήματος σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex), προσθήκη 100 μl διαλύματος MPS1 (50mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0), μηχανική ανάδευση ξανά και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 8 μl λυσοζύμης συγκέντρωσης 50 mg/ml και μηχανική ανάδευση του σωλήνα φυγοκέντρησης. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C.
- Προσθήκη 200 μl MPS2 (0,2 N NaOH, 1% SDS, H₂O), ανάδευση του erppendorf με το χέρι για 3-4 φορές και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθήκη 150 μl διαλύματος MPS3 (5 M οξικού καλίου, άνυδρο οξικό οξύ, νερό), μηχανική ανάδευση τουλάχιστον για 10 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erppendorf.
- Προσθήκη 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, μηχανική ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erppendorf. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται δύο φορές.
- Προσθήκη 300 μl ισοπροπανόλης και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και έπειτα, το υπερκείμενο απομακρύνεται.

- Προσθήκη 70% αιθανόλης, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 25 μl διαλύματος TE και RNάση ή ddH₂O, αφού το ίζημα έχει απαλλαχθεί πλήρως από την αιθανόλη.
- Χρήση 2 μl από τον απομονωμένο πλασμιδιακό φορέα σε αντίδραση PCR για την επαλήθευση απομόνωσης του πλασμιδίου.

6.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ *Nicotiana benthamiana*

Για την ανάπτυξη φυτών *Nicotiana benthamiana*, τοποθετούνται περίπου 30 σπόροι σε τρυβλία Petri με υγρό διηθητικό χαρτί και φυλάσσονται για μία ημέρα στους 4^oC, καλυμμένα με αλουμινόχαρτο. Έπειτα, τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου και δύο ημέρες αργότερα, αφαιρείται το αλουμινόχαρτο. Προαιρετικά, όταν εκβλαστήσουν, τοποθετούνται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS/2 και μετά το πέρας των 7 ημερών, τα φυτάρια φυτεύονται σε γλάστρες με compost και αναπτύσσονται σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών στους 25 ^oC με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκότος.

Θρεπτικό υλικό MS/2	
Συστατικά	Ποσότητα
MS/2 άλατα	0,22 gr
MS/2 βιταμίνες (1000X)	50 μl
Σουκρόζη	0,5 gr
Άγαρ	1 gr
ddH ₂ O	100 ml
Το pH πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμισμένο στο 5,7-5,8, πριν την τελική ογκομέτρηση. Η μεταφορά των φυταριών πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων.	

7.ΑΓΡΟΕΜΠΟΤΙΣΜΟΣ

Με τη διαδικασία του αγροεμποτισμού (agroinfiltration), είναι δυνατή η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε φύλλα καπνού μέσω της έγχυσης καλλιέργειων αγροβακτηρίων του γένους *tumefaciens*, μετασχηματισμένων με τις κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ανάπτυξη 200 ml υγρής καλλιέργειας μετασχηματισμένων αγροβακτηρίων σε θρεπτικό υλικό YEM με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, μέχρι η οπτική πυκνότητα να αποκτήσει την τιμή 1,0.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 4.000 στροφές για 10 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε διάλυμα MMA (10 μ M ακετοσυριγκόνη, 10 μ M MES pH=6,5 και 10 mM $MgCl_2$) σε οπτική πυκνότητα $OD_{600}=0,1-0,5$.
- Προσθήκη μιας σταγόνας ακετοσυριγκόνης και ανακίνηση της καλλιέργειας.
- Επώαση για 60-90 λεπτά της καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε περίπτωση που ο πλασμιδιακός φορέας είναι ο pBin, προστίθεται ίσος όγκος καλλιεργειών αγροβακτηρίων που τον φέρουν μαζί με καλλιέργεια *Agrobacterium tumefaciens* που περιέχει τον φορέα pBin61-p19, που παράγει τον ισχυρό καταστολέα σίγησης. Το ίδιο ισχύει για την περίπτωση που είναι επιθυμητή η έκφραση τουλάχιστον δύο ετερόλογων γονιδίων.
- Στο κάτω μέρος του φύλλου, πραγματοποιείται σχισμή με ένα tip και έπειτα πραγματοποιείται έγχυση 1 ml καλλιέργειας αγροβακτηρίων μέσω μίας σύριγγας (χωρίς τη βελόνα).
- Μετά το πέρας 6 ημερών, οι ιστοί κόβονται και μπορεί να πραγματοποιηθεί απομόνωση των μεταβολιτών, τοποθετώντας δίσκους φύλλων διαμέτρου 1 εκατοστού, σε ethyl acetate για 1 ώρα.
- Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ημέρες και έπειτα είναι δυνατή η ανάλυση των μεταβολιτών μέσω αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας.

8. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC/MS)

Η αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας είναι μία αναλυτική τεχνική για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πτητικών οργανικών ενώσεων σε ένα μείγμα (James and Martin, 1952). Η ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας είναι μια κοινή δοκιμή ταυτοποίησης κατά την οποία το δείγμα εισέρχεται μέσω μικροσύριγγας στη θύρα εγχύσεως της συσκευής και στη συνέχεια, το όργανο εξατμίζει το δείγμα μέσω

ενός φέροντος αερίου (συνήθως H₂, N₂, Ar, He) για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των διάφορων ενώσεων. Ο διαχωρισμός των πολύπλοκων δειγμάτων στα εκάστοτε συστατικά επιτυγχάνεται λόγω της ενδογενούς συγγένειας των ενώσεων με την «στατική φάση» της στήλης και των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Ο χρόνος που παρέρχεται μεταξύ της ένεσης και της έκλουσης ονομάζεται "χρόνος κατακράτησης", ο οποίος μπορεί να βοηθήσει στην διάκριση μεταξύ ορισμένων ενώσεων, ενώ το μέγεθος των κορυφών είναι ανάλογη προς την ποσότητα των αντίστοιχων ενώσεων στο δείγμα που αναλύθηκε. Κάθε ένωση παράγει ιδανικά μια συγκεκριμένη φασματική κορυφή που μπορεί να καταγραφεί σε ένα γράφημα (Brock and David, 2011).

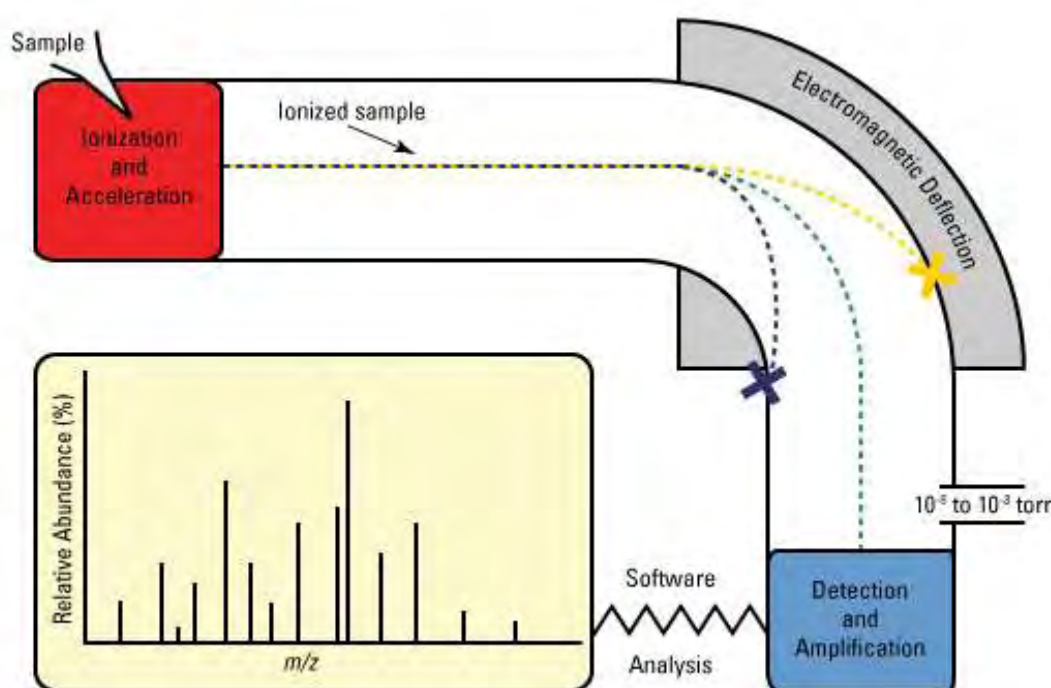


Εικόνα 14: Το φέρον αέριο (συνήθως N₂, He, H₂, Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου (Χατζηγιάννου, 2003).

Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους (Bakhtiar and Tse, 2000).

Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού, όπου η ένωση μετατρέπεται σε ιόντα.

Επίσης, απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση. Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων. Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας, δημιουργείται μια κατιοντική ρίζα μέσω απώλειας ενός ηλεκτρονίου από μέρος της ένωσης, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z και καταλήγουν στον ανιχνευτή, που είναι μικροπολλαπλασιαστές, οι οποίοι εκπέμπουν ηλεκτρόνια, όταν ένα ιόν συναντήσει την πλάκα ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως φάσματα της σχετικής αφθονίας των ανιχνευθέντων ιόντων, συναρτήσει του λόγου μάζας προς φορτίο. Τα άτομα ή τα μόρια του δείγματος μπορούν να ταυτοποιηθούν συσχετίζοντας ήδη γνωστές μάζες με τις προσδιοριζόμενες ή μέσω του χαρακτηριστικού πρότυπου κατακερματισμού (Hoofmann and Stroobant, 2001).



Εικόνα 15: Ένα δείγμα εγχέεται μέσα στο φασματόμετρο μάζας, και τα μόρια ιονίζονται και επιταχύνονται. Τα ιόντα στη συνέχεια διαχωρίζονται κατά μάζα και φορτίο από τον αναλυτή μάζας μέσω ηλεκτρομαγνητικής εκτροπής, και τα ιόντα τα οποία είναι κατάλληλα ευθυγραμμισμένα ανιχνεύονται και ενισχύονται. Το όλο σύστημα είναι υπό κενό κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας. Μετά την ενίσχυση του σήματος από τους ανιχνευτές, τα «χτυπήματα» των ιόντων αναλύονται, και τα δεδομένα που δημιουργούνται, απεικονίζονται ως προς τη σχετική αφθονία του κάθε ιόντος με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (Hoofmann and Stroobant, 2001).

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.ΣΤΟΧΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι η υπερέκφραση της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2* του φυτού *Lotus japonicus*, καθώς και των γονιδίων της συνθάσης της λουπεόλης από το ίδιο φυτό, καθώς και τη συνθάση της β-αμυρίνης από το φυτό *Medicago truncatula*, σε συνδυασμό με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2*, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5*. Βάσει των εφαρμογών της συνθετικής βιολογίας, είναι δυνατή η παραγωγή των μεταβολιτών αυτής της γονιδιακής συστοιχίας, καθώς και την μελέτη εναλλακτικών δομών με κυκλάσες και ένζυμα του κυτοχρώματος P450 από διαφορετικά φυτά στο φυτό *Nicotiana benthamiana* μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών μπορεί να αποτελούν βάση για την ανακάλυψη νέων βιοχημικών μονοπατιών και νέων τριτερπενοειδών δομών, που μπορούν να έχουν κάποια φαρμακευτική δράση.

2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ *AMY2* ΣΕ ΪΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

Στη συγκεκριμένη εργασία, έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης (β -AS) από το φυτό *Medicago truncatula* και των *AMY2* και *OSC3* από το φυτό *Lotus japonicus* (*LjAMY2*), σε συνδυασμό με γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα γονίδια *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* από το φυτό *Lotus japonicus*. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής, ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση αυτών των γονιδίων στους πλασμιδιακούς φορείς pEAQ express (για το γονίδιο β -AS) και pBinD (για τα γονίδια του κυτοχρώματος P450).

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα pM81-FSC-1, τα γονίδια ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας, με εκκινητές των οποίων η αλληλουχία είναι συμπληρωματικοί εν μέρει στο γονίδιο αυτό μαζί με μία αλληλουχία που αποτελεί θέση περιορισμού για τα ένζυμα περιορισμού που θα χρησιμοποιηθούν στην πορεία. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο ορθόδρομος εκκινητής περιείχε την θέση αναγνώρισης του ενζύμου Bsu36ί, εκτός του γονιδίου *AMY2* όπου χρησιμοποιήθηκε η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού

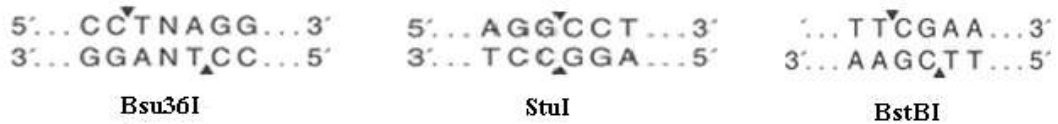
ενζύμου BstBi, ενώ ο οπισθόδρομος εκκινητής του ενζύμου StuI. Η εύρεση του κατάλληλου ζεύγους ενζύμων περιορισμού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Seqbuilder.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
BASIFI-Bsu36iF	CATGC <u>CCTGAGG</u> ATGTGGAAGCTGAAGATTGAAGGC
BASIFI-StuIR	CACTA <u>GGCCTTT</u> AAACTGCAGTGGAAGGC
OSC3-Bsu36iF	CTTGC <u>CCTGAGG</u> TAGGTCGATCGATCAGGTAC
OSC3-StuIR	GTACA <u>GGCCT</u> GCCATCATGAGCGTGGAAGGC
LjAMY2FI-BstBi	AATAT <u>TTCGA</u> ACATGTGGAAGCTGAAGGTAG
LjAMY2FI-StuI	TTATA <u>GGCCTT</u> GCACACAGCTATCTTTACAAG
LjCYP88D5FI-Bsu36i	TACAC <u>CCTGAGG</u> AATGGAACATACTGGGCTTGG
LjCYP88D5FI-StuI	TTAGA <u>GGCCTT</u> TAATTACATGAAACCTTTATCACC
LjCYP71DFI-Bsu36i	TACAC <u>CCTGAGG</u> TGCCCTTTTGCTAATGATGG
LjCYP71DFI-StuI	TTATA <u>GGCCTT</u> TTTTATTCAACAGAAACAGGATTGTAAG

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων στον φορέα pM81-FSC-1. Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες υποδηλώνουν την θέση περιορισμού των ενζύμων περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού δεν λειτουργούν αποτελεσματικά όταν οι θέσεις αναγνώρισης τους βρίσκονται στο τέλος ενός γραμμικού μορίου DNA, οπότε προστίθενται 3-6 επιπλέον βάσεις στο 5' άκρο κάθε εκκινητή για την αύξηση της απόδοσης της πένης.

Μετά την ενίσχυση και τον καθαρισμό (PCR clean-up) των τμημάτων DNA, πραγματοποιήθηκε πέψη τόσο αυτών όσο και του πλασμιδιακού φορέα με τα προαναφερθέντα ένζυμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 4 ώρες βάσει του προγράμματος double digest finder της εταιρείας New English BioLabs.

Συστατικά	Ποσότητα
DNA	1 µg
Buffer 3	5 µl
StuI	1 µl
Bsu36i	1 µl
BSA	0,5 µl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 50 µl



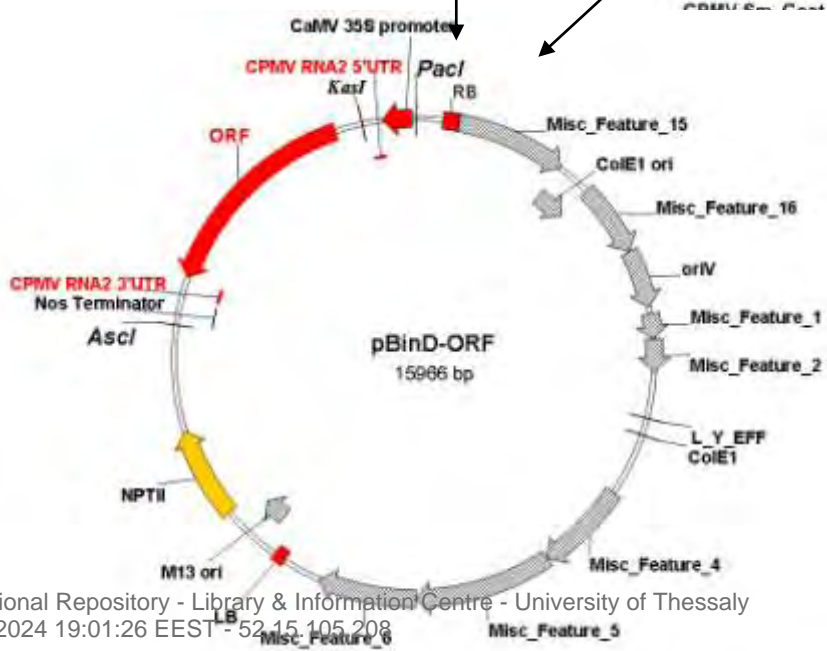
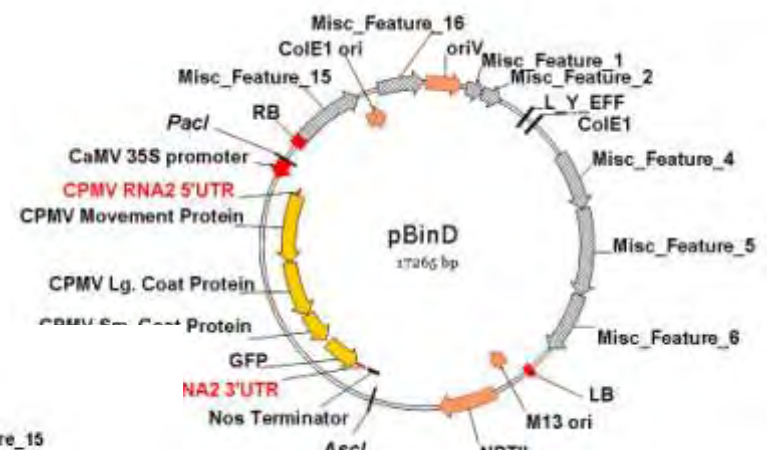
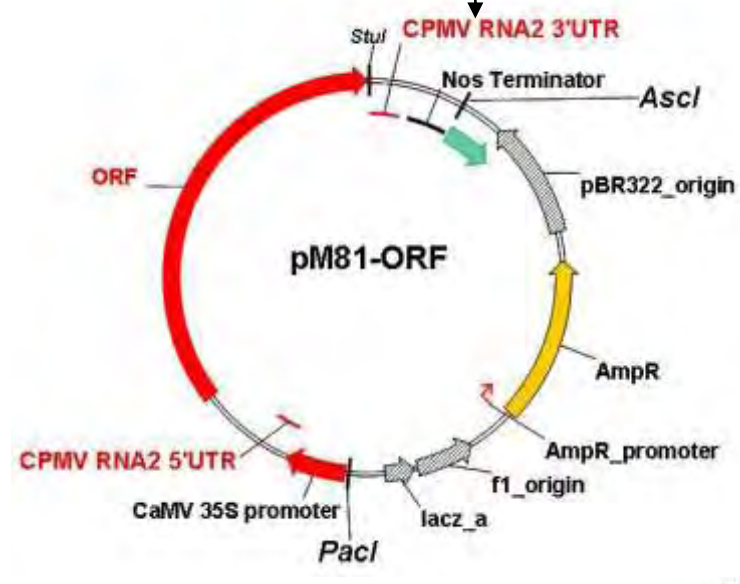
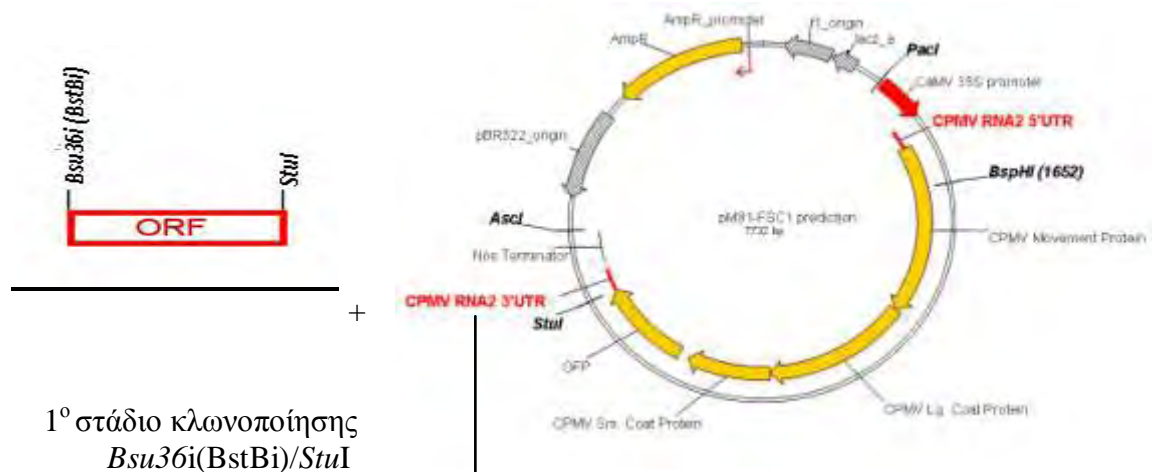
Εικόνα 16: Θέσεις περιορισμού των ενζύμων Bsu36I, StuI και BstBI. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις κοπής.

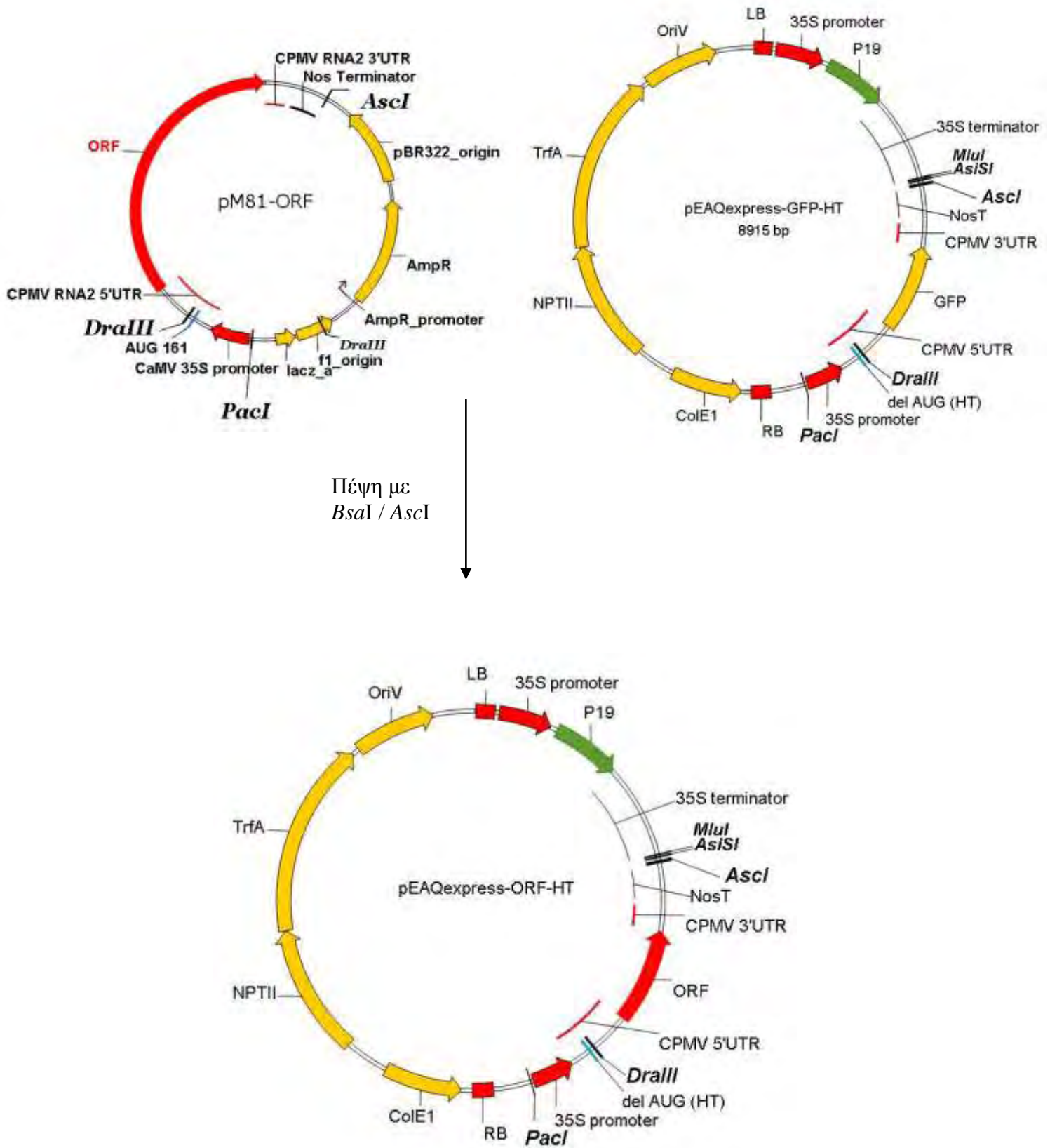
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις λιγάσης για 4 ώρες και η μισή ποσότητα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε κύτταρα *E. coli* ικανά για μετασχηματισμό. Την επόμενη μέρα, λήφθηκαν 6 αποικίες και πραγματοποιήθηκε colony PCR για την ταυτοποίηση ένθεσης των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα. Οι αποικίες που εμφάνισαν τις πιο έντονες μπάντες, μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB των 5 ml με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε mini-PREP για την απομόνωση των πλασμιδίων και υπεβλήθησαν σε πέψη και ηλεκτροφόρηση για την επιβεβαίωση ένθεσης των γονιδίων που μελετώνται στον φορέα.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για την μεταφορά των γονιδίων από τον φορέα pM81-FSC-1 στον pEAQ Express και pBinD. Η διαφορά σε σχέση με την προηγούμενη πέψη έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικά ένζυμα περιορισμού, το AscI και το BsaAI, έτσι ώστε εκατέρωθεν των γονιδίων να εντοπίζονται τα 5' και 3' άκρα του RNA-2 του ιού CPMV που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων μέσα στο φυτό και που εντοπίζονται στον φορέα pM81-FSC-1.

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε τον μετασχηματισμό των πλασμιδιακών κατασκευών pEAQ-BAS, pBin-OSC3, pBin-AMY2, pBin-CYP71, pBin-CYP88 σε κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* του στελέχους LBA 4404. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό YEM και επεξεργάστηκαν έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για αγροεμποτισμό, όπως περιγράφηκε στην ενότητα υλικά και μέθοδοι. Δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί αγροβακτηρίων: pEAQ-BAS, pEAQ-BAS με pBin-CYP71, pEAQ-BAS με pBin-CYP88 και pEAQ-BAS με pBin-CYP71 και pBin-CYP71. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο για τα AMY2 και OSC3. Τα δείγματα ελέγχου ήταν φύλλα καπνού χωρίς κάποια επεξεργασία και φύλλα που είχαν μολυνθεί μόνο με το *Agrobacterium tumefaciens*. Η απομόνωση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε επωάζοντας τα φύλλα σε ethyl acetate για περίπου μία ώρα και τα εκχυλίσματα στέγνωναν σε

θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα στάλθηκαν στο ινστιτούτο John Innes για την ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας μάζας/αέριας χρωματογραφίας (GC/MS).



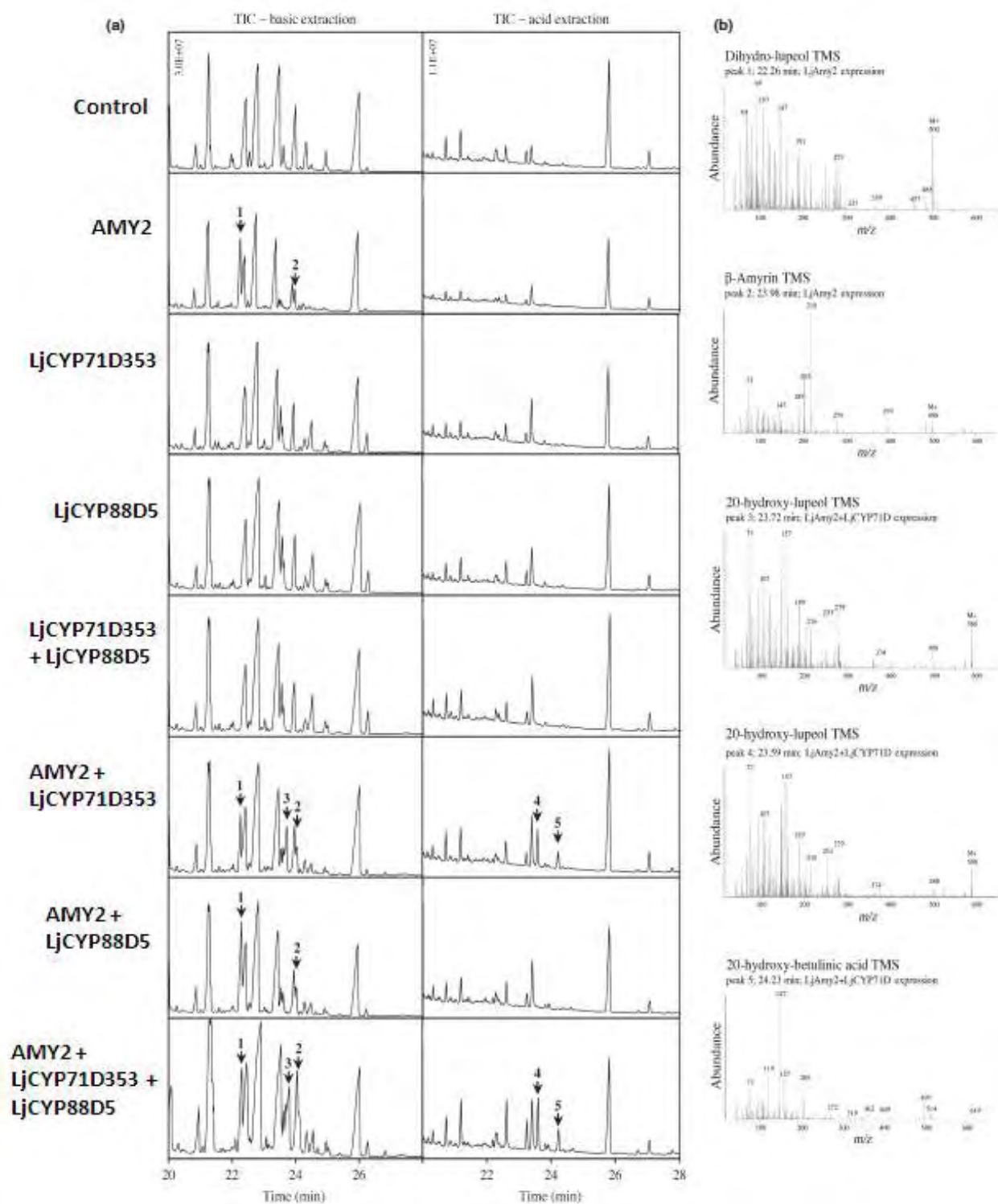


Εικόνα 17: Απεικόνιση των σταδίων κλωνοποίησης στους pBin και pEAQ πλασμιδιακούς φορείς. Απεικονίζονται οι χάρτες των φορέων, όπου περιλαμβάνονται οι υποκινητές, τα γονίδια ανθεκτικότητας καθώς και οι θέσεις περιορισμού.

2. ΑΝΑΛΥΣΗ GC/MS ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ AMY2

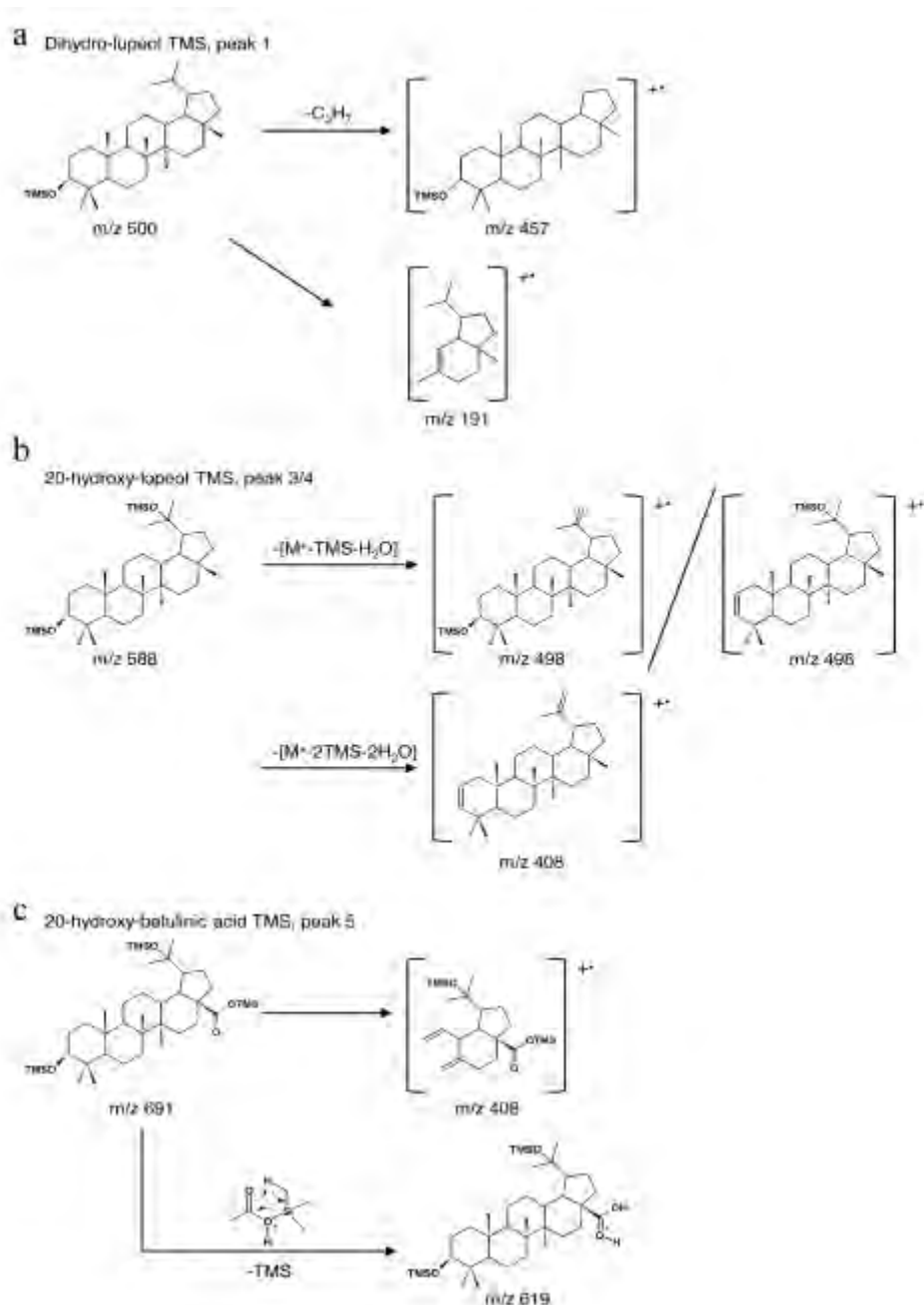
Σε προηγούμενες έρευνες, βρέθηκε ότι το γονίδιο AMY2 κωδικοποιεί για μία κυκλάση μικτής δράσης, παράγοντας β-αμυρίνη και λουπεόλη (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003). Σε φύλλα καπνού, το γονίδιο AMY2 παρήγαγε β-αμυρίνη (κορυφή 2, σχήμα 17), όπως αναμενόταν και το φάσμα μαζών της κορυφής αυτής αντιστοιχούσε σε αυτή του παραγώγου του αιθέρα του τριμεθυλσιλυλίου (trimethylsilyl-TMS), του προτύπου της β-αμυρίνης (σχήμα 17). Παραδόξως, η λουπεόλη δεν ανιχνεύθηκε, ωστόσο ένα λιγότερο πολικό μόριο ανιχνεύθηκε στα εκχυλίσματα (κορυφή 1, σχήμα 17) Ανάλυση του φάσματος μάζας του παραγώγου του αιθέρα του TMS του λιγότερου πολικού μορίου, έδειξε ένα ιόν με λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) 500 (Σχήμα 17,b), ένας αριθμός χαρακτηριστικός για τις κορυφές ιοντικών θραυσμάτων για τα C-3 υδροξυλουπένια (hydroxylupanes) και δύο κορυφές ιοντικών θραυσμάτων στο m/z 457 και m/z 191, προτείνοντας μία κορεσμένη δομή λουπενίου. Η κορυφή του ιοντικού θραύσματος στο m/z 457 είναι γνωστό ότι προκύπτει από την απώλεια μιας ομάδας προπυλίου, ακολουθούμενη από μία θραυσματοποίηση που ευνείται μόνο στα κορεσμένα λουπένια (Budzikiewicz *et al.*, 1964). Παρομοίως, η κορυφή του ιοντικού θραύσματος στο m/z 191 αντιστοιχεί σε ένα θραύσμα που περιέχει δακτυλίους D και E μιας κορεσμένης δομής λουπενίου (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Dantanarayana *et al.*, 1981). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, το λιγότερο πολικό μόριο (κορυφή 1) που ανιχνεύθηκε στα εκχυλίσματα κατά την υπερέκφραση μόνο του γονιδίου AMY2, προτείνεται να είναι η διυδρολουπεόλη.

Δεν παρατηρήθηκαν νέοι μεταβολίτες όταν τα γονίδια *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353* εκφράστηκαν ξεχωριστά στο *N. benthamiana*. Ωστόσο, η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων AMY2 και *LjCYP71D353* οδήγησε στην παραγωγή δύο νέων μεταβολιτών (κορυφές 3 και 5, σχήμα 17α).



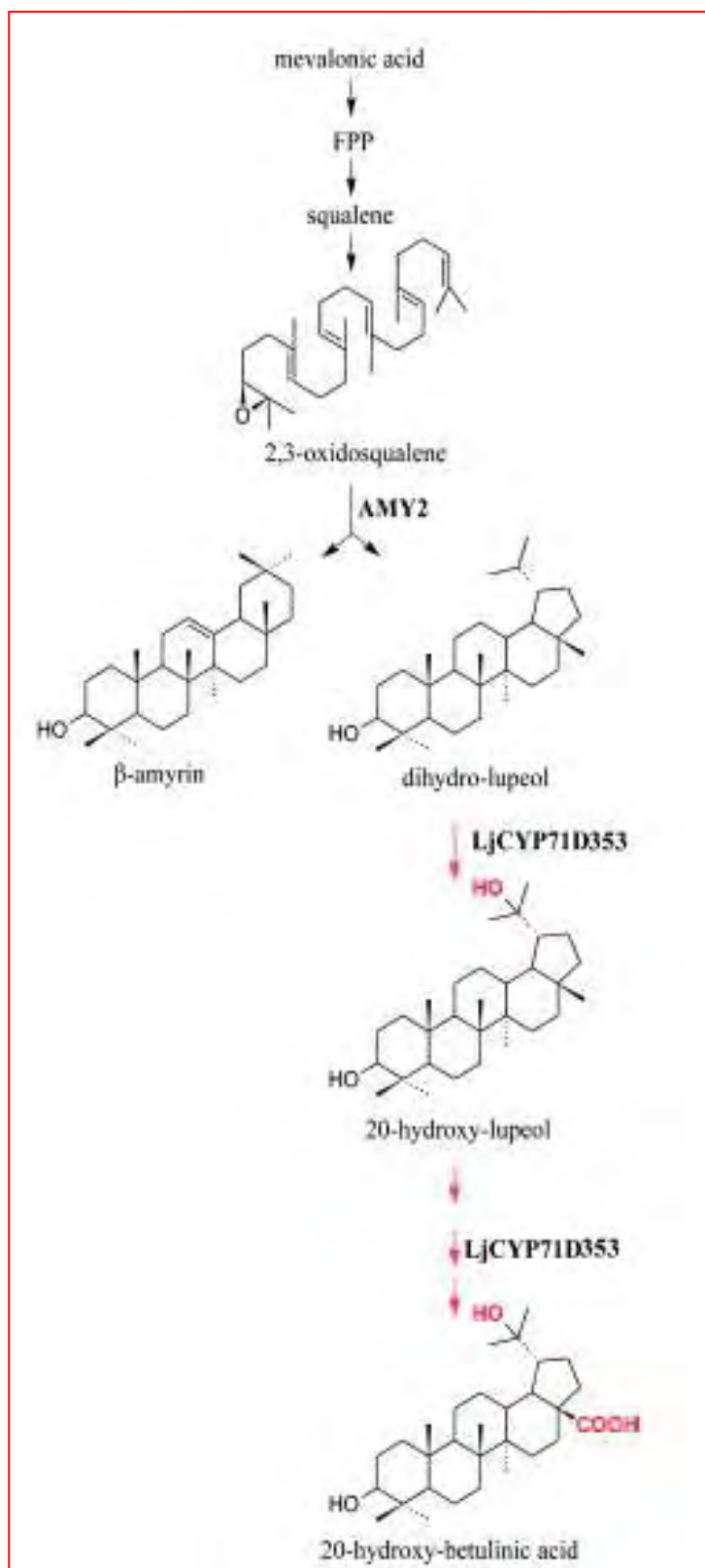
Εικόνα 18: Ανάλυση GC-MS των σαπωνοποιημένων εκχυλίσματων φύλλων του *N. Benthamiana* μετά την παροδική έκφραση των *AMY2*, *LjCYP71D353* ή/και *LjCYP88D5*. (a): Συνολικά ιοντικά χρωματογραφήματα των παραγόμενων δειγμάτων από βασικά και όξινα εκχυλίσματα των φύλλων. Η έκφραση του γονιδίου *AMY2* οδήγησε στην παραγωγή διυδρολουπεόλης (κορυφή 1) και β -αμυρίνης (κορυφή 2). Η συνδυαστική έκφραση των γονιδίων *AMY2* και *LjCYP71D353* οδήγησε στην παραγωγή της 20-υδροξυλουπεόλης (κορυφή 3 με χρόνο κατακράτησης τα 23,7 λεπτά στα βασικά εκχυλίσματα και κορυφή 4 με χρόνο κατακράτησης τα 23,59 λεπτά στα όξινα εκχυλίσματα) και του 20-βετουλινικού οξέος (κορυφή 5, με χρόνο κατακράτησης τα 24,22 λεπτά κατά την όξινη εκχύλιση). Δεν παρατηρήθηκε κάποια δραστηριότητα του γονιδίου *LjCYP88D5*. Οι υπόλοιπες κορυφές αντιστοιχούν στις φυτικές στερόλες. (b): Φάσματα μαζών των κορυφών 1-5 που προέρχονται από τα προφίλ της αέριας χρωματογραφίας του σχήματος (a).

Οι διαδικασίες των όξινων και βασικών εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκε για την εκχύλιση όσο των δυνατών περισσότερων μεταβολιτών. Οι κορυφές 3 και 4 αντιστοιχούν στο ίδιο προϊόν, το παράγωγο TMS της 3,20-λουπανδιόλης, που είναι γνωστή ως 20-υδροξυλουπεόλη. Αμφότερες οι κορυφές έδειξαν το ίδιο πρότυπο θραυσματοποίησης (Σχήμα 17,b) από μία μεγάλη κορυφή στο m/z 588 και χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα στα m/z 573 ($M^+ - CH_3$), 498 ($M^+ - TMS - H_2O$), and 408 ($M^+ - 2TMS - 2H_2O$; Cole *et al.*, 1991; Ulubelen *et al.*, 1994). Η κορυφή 5, που ανιχνεύθηκε μόνο στην όξινη εκχύλιση, ταυτοποιήθηκε ως 3,20-διυδροξυ-28-λουπανοϊκό οξύ, γνωστό και ως 20-υδροξυ-βετουλινικό οξύ, έπειτα από την ανάλυση του φάσματος μαζών που έδειξε κορυφές ιοντικής θραυσματοποίησης στα m/z 619, 513, and 408. Αυτές οι κορυφές μπορούν να εξηγηθούν από την απώλεια μιας ομάδας «προστασίας» του TMS, ακολουθώντας μία ανακατανομή McLafferty από την πρωτονιωμένη πατρική ιοντική κορυφή, τη συνδυασμένη απώλεια μιας προστατευτικής ομάδας TMS, ενός μορίου νερού και μιας μεθυλικής ομάδας και από ένα θράυσμα που έχει πλήρως υποκατεστημένους τους δακτυλίους D και E, αντίστοιχα. Η 20-υδροξυλουπεόλη και το 20-υδροξυβετουλινικό οξύ ανιχνεύθηκαν μόνο όταν το γονίδιο *LjCYP71D353* εκφράστηκε μαζί με το γονίδιο *AMY2*.



Εικόνα 18: Κύρια θραύσματα στα πρότυπα θραυσματοποίησης της φασματοσκοπίας μάζας των TMS-παραγόμενων της διυδρολουπεόλης (a), της 20-υδροξυλουπεόλης (b) και του 20-υδροξυ-βητουλινικού οξέος (c).

Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός της 20-υδροξυλουπεόλης από την διυδρολουπεόλη καταλύεται μέσω μίας μοναδικής αντίδρασης οξείδωσης. Επιπλέον, το γονίδιο *LjCYP71D353* καταλύει το σχηματισμό του 20-υδροξυβητουλινικού οξέος μέσω μιας διαδοχικής οξείδωσης τριών σταδίων στον άνθρακα 28 της 20-υδροξυλουπεόλης (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Προτεινόμενες ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύονται από τα προϊόντα των γονιδίων AMY2 και *LjCYP71D353*. Στην εικόνα εμφανίζονται οι δομές των μορίων και των πιθανών βιοσυνθετικών ενδιάμεσων που παράγονται από τη γονιδιακή συστοιχία AMY2. Η πρωτεΐνη AMY2 καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου σε β-αμυρίνη και διϋδρολουπεόλη, ενώ το ένζυμο που παράγεται από το γονίδιο *LjCYP71D353* καταλύει την αντίδραση σε 20-υδροξυλουπεόλη και τον σχηματισμό του 20-υδροξυβετουλινικού οξέος μέσω διαδοχικών αντιδράσεων οξείδωσης τριών σταδίων στον άνθρακα 28 της 20-υδροξυλουπεόλης.

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων έχουν χαρακτηριστεί στα φυτά, τα οποία συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού. Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσυλιωμένα τριτερπενοειδή, που έχουν μια πλειάδα δράσεων στο φυτό, κυρίως αντιμυκητιακής, αντιμικροβιακής και εντομοκτόνου, αλλά συμβάλλουν ταυτόχρονα στα φαινόμενα αλληλοπάθειας μεταξύ των φυτών και στη γλυκιά ή πικρή γεύση που προσδίδεται στο φυτό (Hostettmann et al, 1991). Συντίθεται από το μονοπάτι των ισοπρενοειδών μέσω κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου οδηγώντας στην παραγωγή κυρίως ολαενικών ή νταμμαρενυλικών τριτερπενοειδών σκελετών (Haralampidis et al, 2002). Οι σκελετοί αυτοί υφίστανται περαιτέρω τροποποιήσεις, όπως οξειδώσεις, υποκαταστάσεις και γλυκοσυλιώσεις από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, προς παραγωγή των σαπωνινών.

Η συνθάση της β-αμυρίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 στο φυτό *Medicago truncatula* και ρόλος της είναι να μετατρέπει το κατιόν του ολεανυλίου σε β-αμυρίνη, μία πρόδρομη ένωση των σαπωνινών (Vranova, 2012). Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό, ενδέχεται να ανήκει σε γονιδιακή συστοιχία, μιας και κοντά στο γενετικό τόπο του β-AS είχε βρεθεί ένα γονίδιο *CYP88* που κωδικοποιεί για μία οξειδάση όπως συμβαίνει στο φυτό *Lotus japonicus*. Συγκεκριμένα, στο χρωμόσωμα 3 του *L. japonicus* ταυτοποιήθηκαν δύο γονιδιακές συστοιχίες όπου υπάρχει το γονίδιο *AMY2* που κωδικοποιεί μία συνθάση μικτής δράσης παράγοντας β-αμυρίνη και λουπεόλη έπειτα από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Στη μία γονιδιακή συστοιχία, βρίσκονται γειτονικά του γονιδίου αυτού δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450, το ένζυμο *LjCYP88D5* με άγνωστη ως τώρα λειτουργία και το ένζυμο *LjCYP71D353* που μετατρέπει την διυδρο-λουπεόλη σε 20-υδροξυλουπεόλη. Η δεύτερη γονιδιακή συστοιχία βρίσκεται 200 kb μακριά από την πρώτη και περιέχει το γονίδιο *LjCYP88D4*, πέραν του γονιδίου *AMY2* (Krokida et al, 2013). Στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών έγιναν πολλές προσπάθειες για την ενίσχυση του γονιδίου *CYP88* στο *Medicago truncatula*, αλλά χωρίς επιτυχία, επομένως η ύπαρξη μιας αντίστοιχης συστοιχίας γονιδίων στο *Medicago truncatula* δεν έχει αποδειχτεί. Με την οργάνωση των γονιδίων βιοσύνθεσης τερπενίων σε γονιδιακές συστοιχίες, εξασφαλίζεται η έκφραση του γονιδίου στο σωστό χρόνο και χώρο για την αποφυγή συσσώρευσης μεταβολιτών που μπορούν να έχουν δυσμενή επίδραση στην επιβίωση και ανάπτυξη του φυτού (Field et al,

2011). Αυτό το φαινόμενο συνείσφερε στη φυσική επιλογή και διατήρηση των συστοιχιών (Chu et al, 2011).

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης σε φύλλα *N. benthamiana* της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2* του *L. japonicus* για την ανίχνευση των παραγόμενων μεταβολιτών, καθώς και η υπερέκφραση του ετερόλογου γονιδίου *β-AS* του φυτού *M. truncatula*, σε διαφορετικούς συνδυασμούς με τα γονίδια *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* της γονιδιακής συστοιχίας *AMY2* για την ανίχνευση τυχών νέων τριτερπενιοδών δομών ή μορίων.

Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατή η παραγωγή μεταβολιτών κατά το συνδυασμό των συνθασών της β-αμυρίνης από το *Medicago truncatula* και της συνθάσης της λουπεόλης με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, ότι το γονίδιο *AMY2* παράγει εκτός της β-αμυρίνης και διυδρολουπεόλη σε φύλλα καπνού, αντί της αναμενόμενης παραγωγής λουπεόλης, όπως είχε παρατηρηθεί κατά την έκφραση του γονιδίου στη ζύμη (Iturbe-Ormaetxe, 2003), ίσως λόγω κάποιας μη εξειδικευμένης ενδογενούς δραστηριότητας του φυτού. Μία άλλη περίπτωση είναι ότι το ένζυμο να μεταφέρει ένα άτομο υδρογόνου λιγότερο στο κατιόν του λουπενυλίου για την παραγωγή διυδρολουπεόλης.

Το γονίδιο *LjCYP71D353* κωδικοποιεί για ένα ένζυμο του κυτοχρώματος P450 και είναι φυλογενετικά κοντά με το γονίδιο *CYP71A16* του *Arabidopsis thaliana*, το οποίο κωδικοποιεί για την οξειδάση της μαρνεράλης, που εμπλέκεται στο αντίστοιχο μονοπάτι (Field et al., 2011). Κατά την ταυτόχρονη έκφραση του γονιδίου αυτού με το γονίδιο *AMY2*, παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο αυτό δρα πάνω στη διυδρολουπεόλη, που έχει έναν ασυνήθιστο σκελετό τριτερπενίων, και προσθέτει μία ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα 20 για την παραγωγή 20-υδροξυλουπεόλης και το σχηματισμό καρβοξυλικής ομάδας για την παραγωγή του υδροξυβουβουλιτικού οξέος. Αν τα μόρια αυτά αποτελούν ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του βιοσυνθετικού μονοπατιού του γονιδίου *AMY2*, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Το γονίδιο *LjCYP88D5* έχει 71% ομοιότητα με το γονίδιο *GuCYP88D6* που παράγει την 11-οξειδάση της β-αμυρίνης, η οποία συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της γλυκυρριζίνης (Seki et al., 2008). Κατά την έκφραση του γονιδίου αυτού με το γονίδιο *AMY2* δεν παρατηρήθηκε η ανίχνευση κάποιου προϊόντος κατά την ανάλυση GC/MS γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε λόγω έκφρασης σε ένα ετερόλογο σύστημα είτε στο διαφορετικό ρόλο από το αναμενόμενο.

Έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες έρευνες ότι τα γονίδια που εντοπίζονται σε γονιδιακές συστοιχίες παράγουν προϊόντα που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς και σε φαινόμενα αλληλοπάθειας. Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί διαφορετικές δράσεις των τερπενίων, κυρίως φαρμακολογικές και κοσμετολογικές. Μελλοντικά, μέσω των εφαρμογών της συνδυαστικής βιολογίας, θα είναι δυνατή η εύρεση νέων βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται στο δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών, καθώς και η δημιουργία νέων ή βελτιωμένων βιοδραστικών μορίων από διάφορους συνδυασμούς γονιδίων που προέρχονται από ετερόλογα φυτά.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S and Werck-Reichhart D Cytochromes P450 The Arabidopsis Book
- Bakhtiar R. and Tse F. L. (2000) Biological mass spectrometry: A primer. *Mutagenesis*. 15, 415-30.
- Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnar G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M. 2002 Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome p450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*. 130, 504–513. (doi:10.1104/pp.005439)
- Barnard D.R., and Xue R. (2004). "Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae)". *J. Med. Entomol.* 41(4): 726–730
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. technol.* 124: 128-45.
- Brisson N, Paszkowski J, Penswick J, Bronenborn B, Potrykus I et al. (1984) Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature* 310: 511-4.
- Brock, David C. (2011). "A Measure of Success". *Chemical Heritage Magazine* 29
- Cañizares M.C., Liu L., Perrin Y., Tsakiris E. and Lomonossoff G.P. A bipartite system for the constitutive and inducible expression of high levels of foreign proteins in plants *Plant Biotechnology Journal* (2006) 4 , pp. 183–193
- Chu HY, Wegel E, Osbourn A. From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *Plant J.* 2011 Apr;66(1):66-79

- Cobb R.E, Ning J.C., Zhao H. DNA assembly techniques for next-generation combinatorial biosynthesis of natural products *J Ind Microbiol Biotechnol* (2014) 41:469–477
- Connolly J.D. and Hill R.A. 1991. *Dictionary of Terpenoids*. 1st Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp:80-182
- De Vetten N., Ter Horst J., Van Schaik H.P., De Boer A., Mol J. and Koes, R. (1999) A cytochrome b₅ is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *PNAs* 96: 778-783.
- Delis C., Krokida A., Georgiou S., Pena-Rodriguez R-M, Kavroulakis N., Ioannou E., Roussis V., Osbourn A.E and Papadopoulou K.K Role of luteol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation *New Phytologist* (2011) 189: 335–346
- Durst, F., and Nelson, D. R. (1995). Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metab. Drug Interact.* 12: 189-206.
- Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk MH., Bacher A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol.* 1998 Sep;5(9):R221-33
- Frank Sainsbury F., Lavoie P-O., D'Aoust M-A., Vizina L-P., Lomonosoff G.P. Expression of multiple proteins using full-length and deleted versions of cowpea mosaic virus RNA-2 *Plant Biotechnology Journal* (2008) 6, pp. 82–92
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, et al. (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14701-14706.
- Gopinath, K., Wellink, J., Porta, C., Taylor, K.M., Lomonosoff, G.P., van Kammen, A., 2000. Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology* 267, 159_173.
- Hamberger B and Bak S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity *Phil Trans R Soc B* 368: 20120426.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2001a). The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase,

catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 2065-2070

- Hessell AJ, Rakasz EG, Poignard P, Hangartner L, Landucci G, et al. (2009) Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. PLoS Pathogens 5: e1000433.
- Hoffmann E. d. and Stroobant V. (2001) Mass spectrometry : Principles and applications. Chichester ; New York: Wiley. xii, 407pp.
- Horinouchi S (2008) Combinatorial biosynthesis of non-bacterial and unnatural flavonoids, stilbenoids and curcuminoids by microorganisms. J Antibiot (Tokyo) 61(12):709–728
- [Istvan E.](#), [Palnitkar M.](#), [Buchanan S. K.](#) and [Deisenhofer J.](#) Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis
- Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K and Osbourn A. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* *Plant Molecular Biology* 51: 731–743, 2003
- Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 51: 731–743.
- James AT, Martin AJP *Biochem. J.* (1952) Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid, *Biochem. J.* 50: 679–680
- Julsing M, Koulman A, Woerdenbag H.J, Wim J. Quax W.J, Kayser O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites *Biomolecular Engineering* 23 (2006) 265–279
- Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C., Tsikou D., Pena-Rodriguez L., Field B., Osbourn A.E. and Papadopoulou K.E. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytologist* (2013)
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y 1999. β -amyrin synthase: Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants

- Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol Bioeng* 56:473–484
- Lico C, Chen Q, Santi L (2008) Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol* 216: 366-377.
- Liu , L. and Lomonosoff , G.P. (2006) A site-directed mutagenesis method utilizing large double-stranded DNA templates for the simultaneous introduction of multiple changes and sequential multiple rounds of mutation: Application to the study of whole viral genomes
- Liu L. and Lomonosoff G.P. (2002) Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *Journal of Virological Methods* 105, 343-348.
- Liu, Y., Wang, H., Ye, H. C., and Li, G. F. (2005) Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering, *J Integr Plant Biol* 47, 769-782
- Lomonosoff G.P., Johnson, J.E., 1995. Eukaryotic viral expression systems for polypeptides. *Semin. Virol.* 6, 257_ 267
- Long S.R 1989 Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14
- Mandahar C.L. 2006, Springer, Multiplication of RNA Plant Virus
- McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, Fu H, Betlach M, Ashley G (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “unnatural” natural products. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5):1846–1851
- McGarvey D. J. and Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism. *The plant cell*,7:1015-1026
- Mizutani, M., and Ohta, D. (2010). Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 291-315.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B.L., and Werck-Reichhart, D. (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin .Biotechnol.* 14: 151-62
- Nelson, D.R. (2009). The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics* 4: 59-65.

- Nutzmann H-W and Osbourn A. Gene clustering in plant specialized metabolism *Current Opinion in Biotechnology* 2014, 26:91–99.
- Osbourn A., Papadopoulou K. K, Qi X., Field B., Wegel E Finding and Analyzing Plant Metabolic Gene Clusters *Methods in Enzymology*, Volume 517; Elsevier Inc
- Osbourn, A., & Field, B. (2009). Operons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 37555–37575.
- Paddon C.D and Keasling J.C Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature reviews*, Volume 12, 2014, 355-367.
- Paquette, S.M., Bak, S., and Feyereisen, R. (2000). Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol.* 19: 307-317.
- Peyrett H., Lomonosoff G.P. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants *Plant Molecular Biology* (2013) 83:51–58
- Philips D. R., Rasbery J. M., Bartel B. and Matsuda S.P.T. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current opinion in Plant Biology*.9:305-314
- Pouwels J., Carette J., Lent J.V., Wellink J. Cowpea mosaic virus : effects on host cell processes, *Molecular Plant Pathology* (2002) 3(6), 411–418
- Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiology*, November 2008, Vol. 148, pp. 1212–1218
- Pulido P., Perello C., Manuel R-C. New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism *Molecular Plant*, September 2012, pages 964–967
- Qi X., Bakht S., Leggett M., Maxwell C., Melton R., Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May 25; 101 (21):8233-8
- R.G. Danka, J.L. Williams and T.E. Rinderer (1990). "[A bait station for survey and detection of honey bees](#)". *Apidologie* 21 (4): 287–292

- Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N. and Tsurumi, S. 2001. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 125: 990–1000.
- Sainsbury F, Liu L, Lomonosoff GP (2009a) Cowpea mosaic virus-based systems for the expression of antigens and antibodies in plants. In: Faye L, Gomord V (eds) *Methods in molecular biology, Recombinant proteins from plants*, vol 483, Humana Press, Totowa, pp 25–39
- Sainsbury F, Sack M, Stadlmann J, Quendler H, Fischer R, et al. (2010) Rapid Transient Production in Plants by Replicating and Non-Replicating Vectors Yields High Quality Functional Anti-HIV Antibody. *PLoS ONE* 5(11): e13976. doi:10.1371/journal.pone.0013976
- Sainsbury F. and Lomonosoff G.P. Extremely High-Level and Rapid Transient Protein
- Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Murunaka T. (2008): Licorice b-amyryn 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc Natl, Acad. Sci.* 105:14204-14209
- Smil V. 1999 Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical cycles* 13:647-662
- Suzuki H., Achnine L., Xu R., Seiichi P. T., Matsuda. SPT, Dixon R.A. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* *The Plant Journal* (2002) 32, 1033–1048
- Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, et al. (1996) Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 70: 1100–1108.
- Vincken JP., Heng L., de Groot A and Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 68:275-297
- Vranova, E., Coman, D., and Grussem, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol. Plant.* 5,318–333.
- Wang Z, Guhling O, Yao R, Fengling Li F, Yeats T, Rose J, Jetter R Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit

Cuticular Triterpenoids *Plant Physiology*, January 2011, Vol. 155, pp. 540–552

- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E., and Mc Ree, D.E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell* 5: 121-131.
- Wong FT, Khosla C (2012) Combinatorial biosynthesis of polyketides— a perspective. *Curr Opin Chem Biol* 16(1–2):117–123
- Χατζηιωάννου, Θ.Π, Κουππάρης, Μ.Α., *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα 2003.