



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Έκφραση και απομόνωση των φυτικών λιπιδικών μεταφορασών SFH6, SFH8 και SFH9 σε ετερόλογο σύστημα *E. coli* και ο ρόλος τους στην κυτταρική μοίρα

Expression and purification of plant lipid transferases SFH6, SFH8 and SFH9 from the heterologous system *E. coli* and their role in cell fate determination

Χατζημιχάλη Βασιλική

Διπλωματική Εργασία

Εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών
Υπεύθυνος Καθηγητής: Μόσχου Παναγιώτης (Τμήμα Βιολογίας)
Συνυπεύθυνος Καθηγητής: Παυλίδης Ιωάννης (Τμήμα Χημείας)

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή κ. Μόσχου Παναγιώτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στο εργαστήριό του. Ακόμη, τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του, καθόλη τη διάρκεια του περασμένου εξαμήνου.

Ευχαριστώ φυσικά και τον συνυπεύθυνο καθηγητή κ. Παυλίδη Ιωάννη, για την γενική εποπτεία του, τις συμβουλές του και την επίλυση των αποριών που τυχόν προέκυπταν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Δερβίση Ειρήνη, για τη βοήθεια, τις γνώσεις, τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Δεν έλειψε στιγμή από το πλευρό μου, ήταν ιδιαίτερα υποστηρικτική και υπομονετική μαζί μου και είμαι βαθύτατα ευγνώμων για την πολύτιμη συνεισφορά της στην παρούσα εργασία, την οποία δε θα μπορούσα να αποπερατώσω χωρίς εκείνη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Περράκη Άρτεμις και τον Κοροβέση Δημήτρη που μου έδωσαν την ευκαιρία να δουλέψω μαζί τους και να εμπλουτίσω έτσι περαιτέρω τις γνώσεις και τις δεξιότητές μου. Ήταν πάντα πρόθυμοι να συνεργαστούν μαζί μου και να με βοηθήσουν, ανά πάσα στιγμή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω γενικότερα, όλα τα μέλη της ομάδας που βρίσκονταν στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ τους Χατζηανέστη Ιωάννη, Μεντζελοπούλου Ανδριανή, Μουντουράκη Φανούρη, Παπαδοβασιλάκη Μαρία, Κατίδου Βασιλική, Βουλγαράκη Άννα και Παρασκευοπούλου Δάφνη για την άψογη συνεργασία τους, τις συμβουλές τους και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε διαρκώς στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν, ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η διαδικασία έκφρασης και απομόνωσης των φυτικών λιπιδικών μεταφορασών, SFH6, SFH8 και SFH9 από ετερόλογο σύστημα *Escherichia coli*. Σε δεύτερο στάδιο, στόχο της εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου της SFH9 στην κυτταρική μοίρα, μέσω της αλληλεπίδρασής της με κοινά φωσφολιπίδια. Για την επίτευξη των σκοπών αυτών, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας για τη μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) και τη πρωτεΐνη δέσμευσης της μαλτόζης (MBP), ενώ η SFH9 υποβλήθηκε και στη δοκιμασία Lipid Overlay Assay. Από τις πρώτες διαδικασίες διαπιστώθηκε ότι, η SFH6 απομονώνεται ικανοποιητικά μέσω σύντηξης με GST, σε αντίθεση με τις άλλες δύο πρωτεΐνες της οικογένειας SFH και για αυτό, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε για αυτές σύντηξη και απομόνωση με MBP, από την οποία λήφθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Όσον αφορά τις SFH8 και SFH9, με την απομονώση με GST όλη η ποσότητα της SFH9 και μέρος της SFH8 παρέμενε στο κυτταρικό ίζημα, ενώ με τη χρήση του MBP το μεγαλύτερο μέρος της λαμβανόταν στο υπερκείμενο. Τέλος, το Lipid Overlay Assay έδειξε ότι, ανάμεσα σε 15 φωσφολιπίδια, το φωσφατιδικό οξύ (PA) αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την SFH9, ενώ σε μικρότερο βαθμό αλληλεπιδρά και η 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns(3)P).

Λέξεις κλειδιά: φυτικές λιπιδικές μεταφοράσες, οικογένεια SFH, απομόνωση με GST, απομόνωση με MBP, Lipid Overlay Assay, φωσφατιδικό οξύ

Abstract

The current diploma thesis describes the methods used for the expression and purification of the plant lipid transferases, SFH6, SFH8 and SFH9 from the heterologous system *Escherichia coli*. Next, the purpose of the thesis was the elucidation of SFH9's role in cell fate determination, through its interaction with common phospholipids. In order to accomplish these goals, affinity chromatography for GST and MBP tags was used, while SFH9 was later subjected to Lipid Overlay Assay. Affinity chromatography showed that, SFH6 was adequately isolated using GST purification, whereas for the isolation of the other two proteins of the SFH superfamily, MBP purification was required. This was due to the fact that, GST purification resulted in SFH9 and most of SFH8 being present only in the pellet, whereas MBP purification resulted in the proteins being present mainly in the supernatant liquid. Last but not least, Lipid Overlay Assay showed that, among 15 phospholipids, phosphatidic acid (PA) interacts strongly with SFH9 and so phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) does, but in a lower degree.

Key words: plant lipid transferases, SFH superfamily, GST purification, MBP purification, Lipid Overlay Assay, phosphatidic acid

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	2
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Ετερόλογη έκφραση.....	6
1.2 Φυτικές Λιπιδικές Μεταφορές.....	7
1.3 Οικογένεια SFH (Sec Fourteen Homologues).....	9
1.3.1 SFH6.....	10
1.3.2 SFH8.....	10
1.3.3 SFH9.....	11
1.4 Φωσφολιπίδια	12
1.5 Φωσφατιδικό οξύ	14
1.6 Σκοπός πτυχιακής εργασίας	14
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	15
2.1 Δημιουργία ανασυνδυασμένων φορέων μέσω αντίδρασης κλωνοποίησης LR.....	15
2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.....	16
2.3 Δοκιμαστική πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	17
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	17
2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. Coli</i> με τους κατάλληλους φορείς.....	18
2.6 Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό υλικό.....	19
2.7 Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών με Ισοπρότυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG).....	19
2.8 Λύση βακτηριακών κυττάρων με υπέρηχους.....	20
2.9 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας.....	21
2.10 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.....	22
2.11 Χρώση πρωτεϊνικών ζωνών με Coomassie Brilliant Blue.....	23
2.12 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	23
2.13 Προσδιορισμός συγγένειας πρωτεϊνών-φωσφολιπιδίων με Lipid Overlay Assay.....	24
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	26
3.1 SFH6.....	26
3.2 SFH8.....	27
3.3 SFH9.....	28
4. Συμπεράσματα.....	33
5. Μελλοντικοί στόχοι.....	35
6. Βιβλιογραφία.....	37

Συντομογραφίες

AE Elution Buffer

Amp Ampicillin

APS Ammonium Persulfate

AW Wash Buffer

BSA Bovine Serum Albumin

Cam Chloramphenicol

ddH₂O Double-distilled water

DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid

EtBr Ethidium Bromide

EtOH Ethanol

GST Glutathione S-Transferase

HIS Histidine

HRP Horseradish Peroxidase

IPTG Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LB Lysogeny Broth/Luria Bertani (broth)

MBP Maltose-Binding Protein

PA Phosphatidic Acid

PBS Phosphate Buffer Saline

PBS-T Phosphate Buffer Saline Tween

PC Phosphatidylcholine

PI Phosphatidylinositol

PMSF Phenylmethylsulfonyl Fluoride

PtdIns(3)P Phosphatidylinositol 3-phosphate

RT Room Temperature

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

SFH Sec Fourteen Homologue

TB Terrific Broth

TBE Tris Borate EDTA

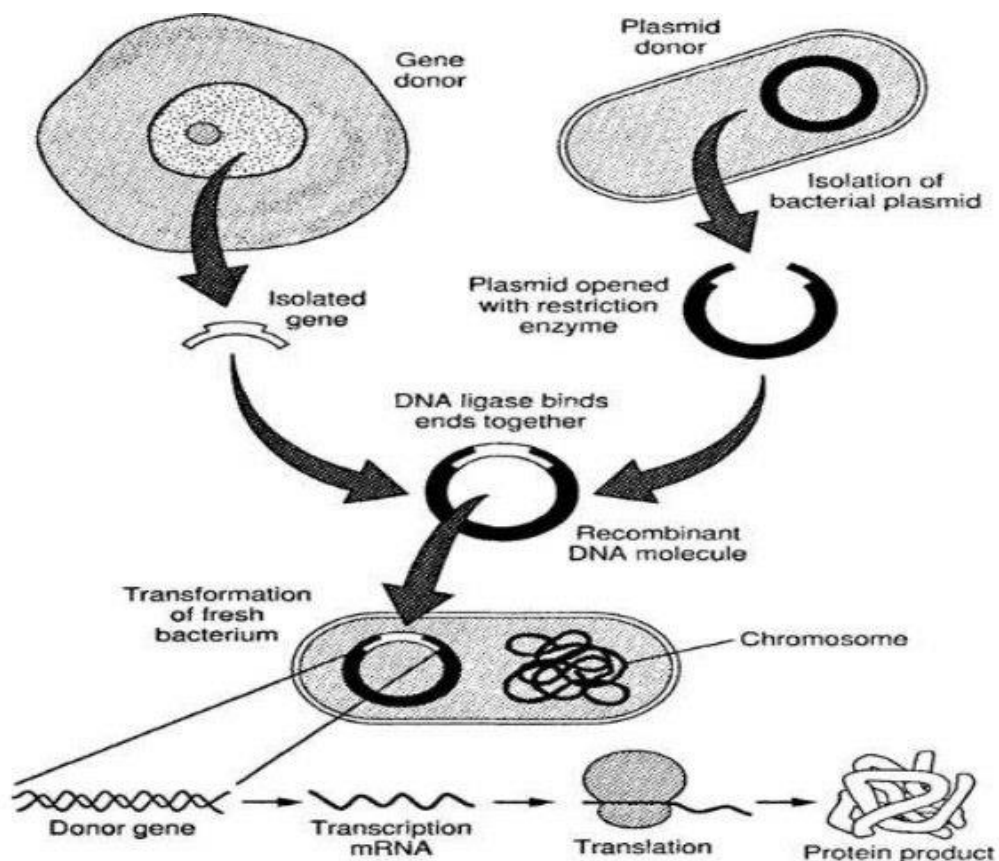
TE Tris EDTA

TEMED Tetramethylethylenediamine

1. Εισαγωγή

1.1 Ετερόλογη Έκφραση

Με τον όρο «ετερόλογη έκφραση» περιγράφεται η διαδικασία της έκφρασης ενός γονιδίου ή τμήματος αυτού από έναν οργανισμό ξενιστή, ο οποίος δεν διαθέτει το γονίδιο αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα ξενιστή-ξένου γονιδίου, το οποίο είναι γνωστό και ως ετερόλογο σύστημα. Ως ξενιστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι προκαρυωτικοί οργανισμοί, όπως βακτήρια (π.χ. *E. coli*), ή ακόμα και ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως κύτταρα ζύμης (π.χ. *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), καρκινικά κύτταρα θηλαστικών και ωκύτταρα αμφιβίων. Η εισαγωγή του ξένου γονιδίου στους οργανισμούς αυτούς γίνεται με κλασικές μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA και στη συνέχεια το γονίδιο μπορεί είτε να παρεμβληθεί στο DNA του ξενιστή, επάγωντας έτσι μόνιμη έκφραση, είτε να εκφραστεί παροδικά, χωρίς όμως να ενσωματωθεί σε αυτό^[1].



Εικόνα 1.1.1. Σχηματική περιγραφή της μεθόδου ετερόλογης έκφρασης, από τον ανασυνδυασμό του DNA μέχρι το τελικό προϊόν (πρωτεΐνη) (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/microbiology/dna-and-gene-expression/recombinant-dna-and-biotechnology>).

Το πρώτο στάδιο στη μέθοδο της ετερόλογης έκφρασης, δηλαδή η ένθεση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σε έναν αρχικό φορέα (πλασμίδιο), είναι και το καθοριστικό. Ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο απομονώνεται η πρωτεΐνη (μαζική παραγωγή ή μελέτη ιδιοτήτων) και τις φυσικοχημικές της ιδιότητες, επιλέγεται και ο κατάλληλος φορέας/τεχνική. Οι πλέον διαδεδομένοι φορείς είναι εκείνοι που ενώνουν την πρωτεΐνη με μικρές, επιπρόσθετες αλληλουχίες αμινοξέων ή μικρά πεπτίδια επισήμανσης

(tags), τα οποία διευκολύνουν κάποια από τις διαδικασίες της απομόνωσης, ταυτοποίησης, ποσοτικοποίησης ή εντοπισμού. Οι φορείς αυτοί ονομάζονται φορείς μεταφραστικής σύντηξης (fusion) και τα κυριότερα πεπτίδια επισήμανσης που φέρουν είναι τα εξής: MBP, GST, HIS (πολυ-ιστιδινικό), FLAG, ARG (πολυ-αργινικό), TrxA, ουβικιτίνη και διάφορες φθορίζουσες πρωτεΐνες (π.χ. GFP, Green Fluorescent Protein). Τα περισσότερα από αυτά βοηθούν στην ταυτοποίηση της πρωτεΐνης, ενώ άλλα όπως το MBP, αυξάνουν δραματικά τη διαλυτότητά της, συνεισφέροντας έτσι στην απομόνωσή της. Γενικά, οι φορείς μεταφραστικής σύντηξης είναι εύχρηστοι, αλλά το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι, για το διαχωρισμό των καθαρών πρωτεϊνών από τα πεπτίδια επισήμανσης απαιτείται η χρήση πρωτεασών, που μπορεί να έχουν υψηλό οικονομικό κόστος^[2].

Αναφορικά με τον οργανισμό ξενιστή που θα δεχτεί το φορέα με το γονίδιο, το πιο διαδεδομένο και μελετημένο σύστημα ετερόλογης έκφρασης είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Η ευρεία χρήση του έγκειται στην απλότητα του ως οργανισμός, την ταχεία του ανάπτυξη, καθώς και στο γεγονός ότι είναι συμβατό με όλους τους εμπορικά διαθέσιμους φορείς κλωνοποίησης. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην έκφραση κυρίως φυτικών πρωτεϊνών, οι οποίες όμως είτε απαιτούν συγκεκριμένες συνθήκες απομόνωσης, είτε μετά την απομόνωση τους χρειάζεται να υποβληθούν σε επαναδιαλυτοποίηση και επαναδίπλωση (αν πρόκειται για μεμβρανικές πρωτεΐνες), ώστε να αποκτήσουν την σωστή τριτοταγή δομή τους. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι, ότι το βακτήριο αδυνατεί να αναγνωρίσει τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ως δικές του και να πραγματοποιήσει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε αυτές. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, να αποτελεί το πλέον προτιμητέο σύστημα ετερόλογης έκφρασης στα εργαστήρια πρωτεομικής ανάλυσης^{[2], [3]}.

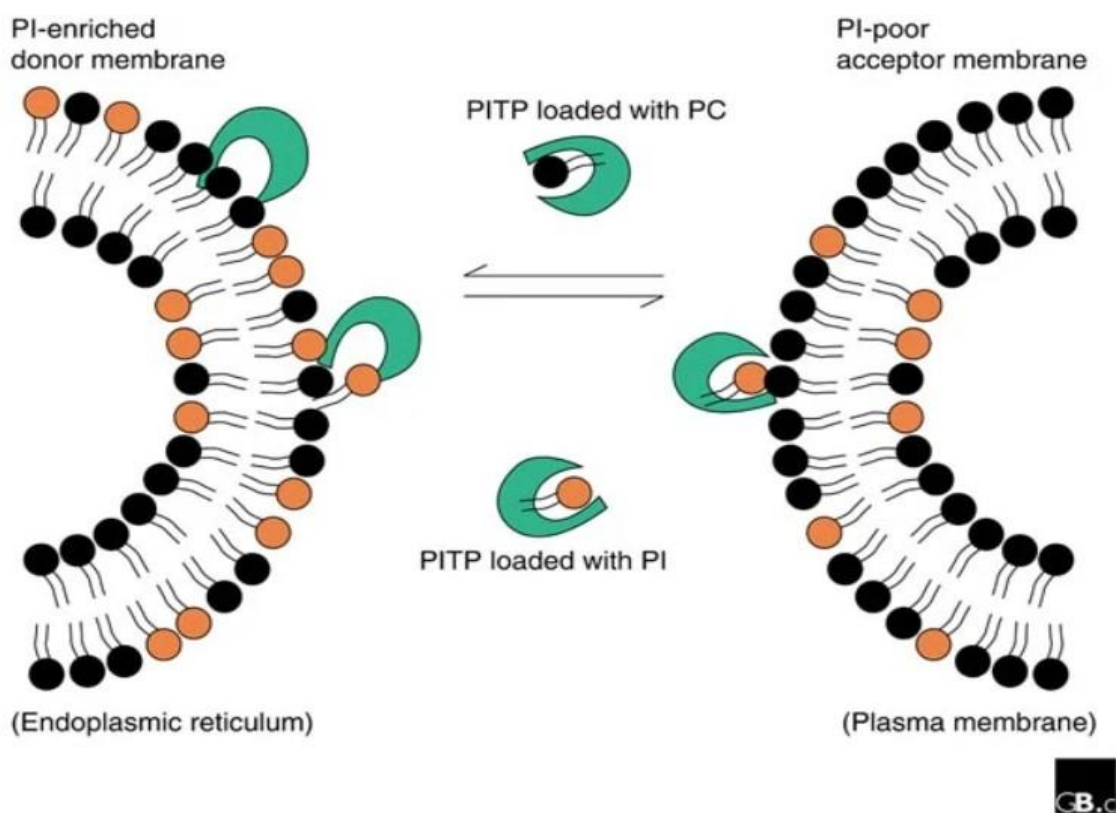
1.2 Φυτικές Λιπιδικές Μεταφορές

Τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν αριθμό μεμβρανών (πλασματική μεμβράνη, μεμβράνες οργανιδίων), οι οποίες αποτελούνται και από φωσφολιπίδια, τα οποία συμμετέχουν σε αναβολικά και καταβολικά μονοπάτια, ενώ παράλληλα τα ίδια ανανεώνονται. Είναι όμως γνωστό, ότι τα περισσότερα οργανίδια ενός φυτικού κυττάρου (π.χ. μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες) δεν διαθέτουν τα κατάλληλα βιοσυνθετικά μονοπάτια, άρα και ένζυμα, για να παράγουν τα απαραίτητα για αυτά φωσφολιπίδια. Συνεπώς, για τη σύνθεση των μεμβρανών τους, απαιτείται ένα ειδικό σύστημα μεταφοράς των φωσφολιπιδίων από το σημείο από όπου παράγονται (ενδοπλασματικό δίκτυο) προς τον ενδοκυττάριο χώρο. Τα μόρια μεταφορείς των λιπιδίων πρέπει να διαθέτουν υδρόφοβες περιοχές δέσμευσης, προκειμένου να καταστεί δυνατή η μεταφορά των αδιάλυτων στο νερό λιπιδίων, μέσα στο υδατικό περιβάλλον του κυττάρου. Για το λόγο αυτό, τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν ένα σύνολο πρωτεϊνών που ονομάζονται φυτικές λιπιδικές μεταφορές^[4].

Οι φυτικές λιπιδικές μεταφορές χωρίζονται σε δύο μεγάλες οικογένειες, τις γενικές λιπιδικές μεταφορές (LTPs) και τους μεταφορείς φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI)/φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Η πρώτη οικογένεια αποτελείται από μικρές πρωτεΐνες, με κύριο χαρακτηριστικό μια ελαστική, υδρόφοβη περιοχή υπό τη μορφή σήραγγας, χάρη

στην οποία δεσμεύουν διάφορα φωσφολιπίδια. Η σήραγγα αυτή μπορεί εύκολα να διασταλεί και να συσταλεί, ανάλογα με τον όγκο του λιπιδίου, επιτρέποντας έτσι ένα εύρος από αυτά να συναρμοστεί πάνω της. Ως εκ τούτου, οι LTPs είναι γενικοί λιπιδικοί μεταφορείς, αφού έχουν συγγένεια για όλα τα φωσφολιπίδια και δεν διαθέτουν καμία εξειδίκευση^[4].

Από την άλλη, η δεύτερη οικογένεια λιπιδικών μεταφορασών χωρίζεται σε δύο περαιτέρω υποκατηγορίες, τους PITPs και την πρωτεϊνική οικογένεια Sec14 ή SFH (Sec14-like proteins/ Sec Fourteen Homologues). Και οι δυο αυτές υποκατηγορίες πρωτεϊνών είναι εξειδικευμένοι μεταφορείς PI και PC, έχουν παρόμοιους ρόλους στα φυτικά κύτταρα, αλληλοσυμπληρώνοντας έτσι η μία την άλλη, όμως δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής καμιά δομική ομοιότητα μεταξύ τους. Η κύρια λειτουργία των PITPs και των SFH πρωτεϊνών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα^{[5], [6]}.



Εικόνα 1.2.1. Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς φωσφολιπιδίων μεταξύ μεμβρανών από τις πρωτεΐνες PIP/SFH. Με μαύρο χρώμα σημειώνονται τα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης και με πορτοκαλί τα μόρια φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης^[5].

Από τις δύο υποκατηγορίες μεταφορέων PI και PC, θα αναλυθεί εκτενώς σε επόμενη υποενότητα οι οικογένεια των πρωτεϊνών SFH, οι οποίες αποτελούν και το βασικό αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.3 Οικογένεια SFH (Sec Fourteen Homologues)

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.2, η οικογένεια SFH αποτελείται από πρωτεΐνες μεταφορείς PI και PC, οι οποίες, όπως δηλώνει και η ονομασία τους, είναι ομόλογες με την Sec14. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στο γονιδίωμα του σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*) και πρόκειται για ένα κυτοσολικό, μη γλυκοζυλιωμένο πολυπεπτίδιο, μοριακού βάρους 37 kD, το οποίο είναι απαραίτητο κυρίως για την εξαγωγή των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το σύμπλεγμα Golgi, καθώς και για τη μεταφορά φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και φωσφατιδυλοχολίνης μεταξύ μεμβρανών *in vitro*. Παρατηρώντας την τριτοταγή δομή της, φαίνεται ότι αποτελείται κυρίως από α-έλικες, ενώ διαθέτει επίσης την αυτοτελή δομική περιοχή CRAL-TRIO, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση μικρών λιπόφιλων μορίων. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή αυτή παρατηρούνται υδρόφοβες κοιλότητες, στις οποίες δημιουργείται κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τη δέσμευση φωσφολιπιδίων. Επίσης, η περιοχή αυτή αναφέρεται και ως sec14 domain και φαίνεται να έχει διατηρηθεί σε όλες τις πρωτεΐνες που είναι ομόλογες της Sec14^{[7], [8]}.

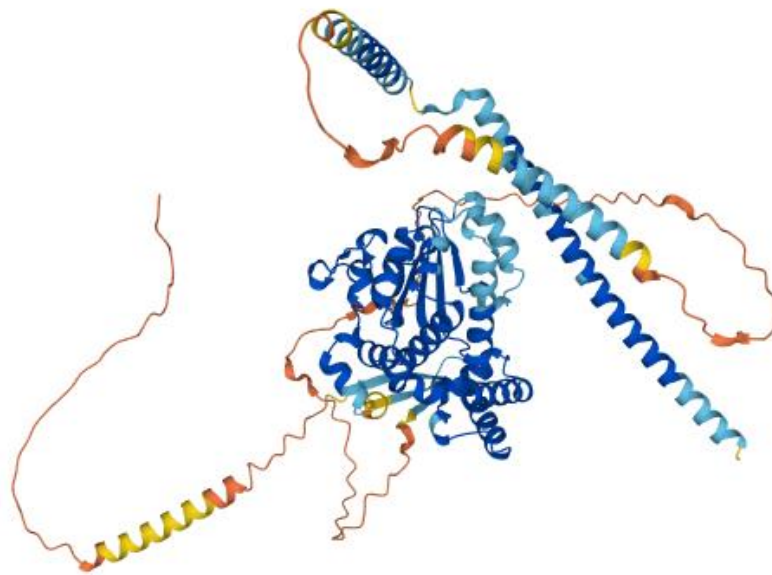


Εικόνα 1.3.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της Sec14 (P24280), η οποία λήφθηκε με τη χρήση ακτίνων Χ (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.uniprot.org/uniprot/P24280>).

Οι ίδιες κοιλότητες (CRAL-TRIO domain) φαίνεται να είναι παρούσες και στις φυτικές ομόλογες πρωτεΐνες της Sec14, με τη διαφορά ότι σε κάθε πρωτεΐνη της οικογένειας SFH, το μικροπεριβάλλον διαφοροποιείται ώστε να συναρμόζονται εκλεκτικά τα διάφορα λιπίδια^{[7], [8]}. Στη συγκεκριμένη εργασία, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί σε τρεις πρωτεΐνες της οικογένειας SFH, στις SFH6, SFH8 και SFH9.

1.3.1 SFH6

Για την πρωτεΐνη SFH6 (F4JVA6), λίγα πράγματα είναι μέχρι στιγμής γνωστά, καθώς οι πληροφορίες που υπάρχουν για αυτήν, προέρχονται είτε από δεδομένα πειραμάτων που αφορούν το mRNA της, είτε μέσω σύγκρισής της με άλλες δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες. Τα υπάρχοντα λοιπόν δεδομένα, τα οποία προέρχονται κυρίως από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, δείχνουν ότι διαθέτει την αυτοτελή δομική περιοχή CRAL-TRIO που χαρακτηρίζει την οικογένεια SFH, οπότε ο ρόλος της πρέπει να σχετίζεται με τη μεταφορά των εκκρινόμενων από το σύμπλεγμα Golgi πρωτεϊνών και την ανταλλαγή PI και PC μεταξύ μεμβρανών *in vitro*. Συνεπώς, η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη του συμπλέγματος Golgi, καθώς και στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.



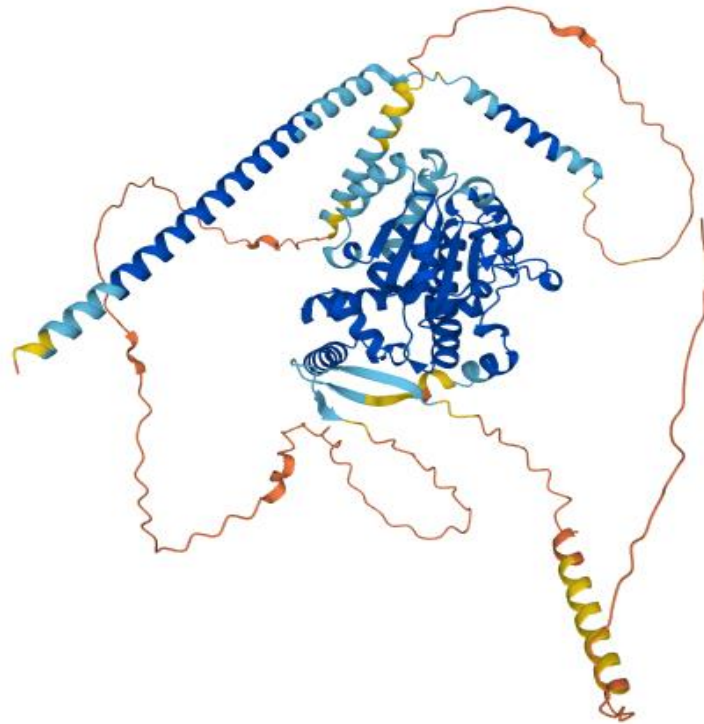
Εικόνα 1.3.1.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της SFH6 (F4JVA6), όπως αυτή προβλέφθηκε από το πρόγραμμα AlphaFold της DeepMind. Με σκούρο μπλε χρωματίζονται οι περιοχές του μοντέλου της πρωτεΐνης με την υψηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα, με γαλάζιο αυτές που είναι αρκετά πιστές, ενώ με κίτρινο και πορτοκαλί εκείνες με τη χαμηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.uniprot.org/uniprot/F4JVA6>).

Στην εικόνα 1.3.1.1 φαίνεται η τρισδιάστατη δομή της SFH6, όπως αυτή προβλέπεται από το πρόγραμμα AlphaFold και μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι, όπως η Sec14 έτσι και το μοντέλο της SFH6, διαθέτει αρκετές α-έλικες, με τη διαφορά όμως ότι είναι διαφορετικά διατεταγμένες στον χώρο. Οι έλικες που απεικονίζονται με σκούρο μπλε χρώμα στο κέντρο του μοντέλου, είναι εκείνες που προβλέπονται με την υψηλότερη ακρίβεια και ανήκουν στην περιοχή CRAL-TRIO, επιβεβαιώνοντας έτσι την ομολογία της πρωτεΐνης αυτής με την Sec14.

1.3.2 SFH8

Όπως συμβαίνει με την SFH6, έτσι και με την SFH8 (F4IHJ0), τα δεδομένα είναι λιγοστά και προέρχονται από τη σύγκρισή της με δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες. Επομένως, προβλέπεται

ότι ο γενικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι παρόμοιος με εκείνον της Sec14 και για το λόγο αυτό εντοπίζεται στη μεμβράνη του συμπλέγματος Golgi, καθώς και στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.



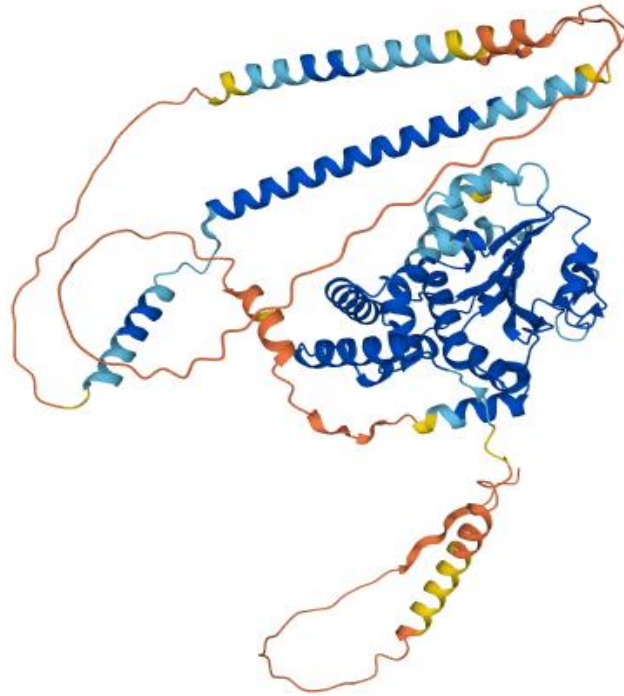
Εικόνα 1.3.2.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της SFH8 (F4IHJ0), όπως αυτή προβλέφθηκε από το πρόγραμμα AlphaFold της DeepMind. Με σκούρο μπλε χρωματίζονται οι περιοχές του μοντέλου της πρωτεΐνης με την υψηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα, με γαλάζιο αυτές που είναι αρκετά πιστές, ενώ με κίτρινο και πορτοκαλί εκείνες με τη χαμηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.uniprot.org/uniprot/F4IHJ0>).

Στην παραπάνω εικόνα, φαίνεται η τρισδιάστατη δομή της SFH8, όπως αυτή προβλέπεται από το πρόγραμμα AlphaFold και αναφορικά με τον χρωματικό κώδικα, ισχύει η ίδια ανάλυση με αυτήν που δόθηκε για την SFH6. Παρατηρείται και σε αυτό το μοντέλο μεγάλος αριθμός α -ελικών, με τις πιο σκούρες να βρίσκονται στην περιοχή CRAL-TRIO, υποδηλώνοντας έτσι την ομολογία της πρωτεΐνης με την Sec14 και την ομοιότητά της με την SFH6. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι φαίνονται και πολλές πορτοκαλί περιοχές που δεν φέρουν συγκεκριμένη οργάνωση (disordered regions), οι οποίες μπορεί να κρύβουν σημαντικές πληροφορίες για τον πιο συγκεκριμένο ρόλο της πρωτεΐνης αυτής, καθώς και για τις ιδιότητές της.

1.3.3 SFH9

Τέλος, σχετικά με την SFH9 (F4J7S8), ισχύουν ακριβώς τα ίδια με τις δύο προηγούμενες πρωτεΐνες, αφού και σε αυτή την περίπτωση τα δεδομένα έχουν παρόμοια προέλευση. Πάλι, λόγω ομοιότητας της πρωτεΐνης με άλλες της ίδιας οικογένειας, θεωρείται ότι κι αυτή

λαμβάνει μέρος στη μεταφορά φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών από το σύμπλεγμα Golgi. Επομένως, είναι λογικό ότι και αυτή θα αποτελείται από αρκετές α-έλικες και θα διαθέτει την περιοχή CRAL-TRIO για τη συναρμογή της με μικρά λιπόφιλα μόρια.



Εικόνα 1.3.3.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της SFH9 (F4J7S8), όπως αυτή προβλέφθηκε από το πρόγραμμα AlphaFold της DeepMind. Με σκούρο μπλε χρωματίζονται οι περιοχές του μοντέλου της πρωτεΐνης με την υψηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα, με γαλάζιο αυτές που είναι αρκετά πιστές, ενώ με κίτρινο και πορτοκαλί εκείνες με τη χαμηλότερη προβλεπόμενη πιστότητα (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.uniprot.org/uniprot/F4J7S8>).

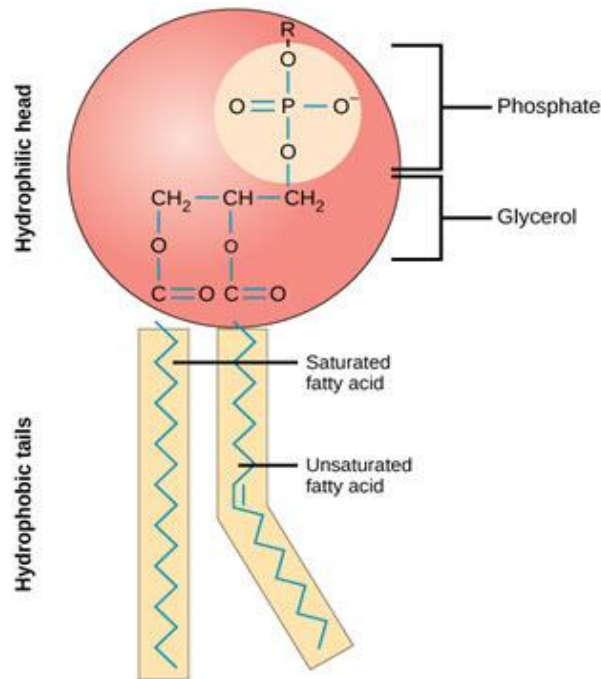
Πράγματι, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.3.3.1, το μοντέλο της πρωτεΐνης αυτής διαθέτει την περιοχή δέσμευσης CRAL-TRIO, της οποίας η πιστότητα είναι αρκετά υψηλή. Παρατηρείται επίσης και στο μοντέλο αυτό, ότι υπάρχουν μεγάλες περιοχές χωρίς διάταξη και με μικρή προβλεπόμενη πιστότητα, οι οποίες χρειάζεται να αποκωδικοποιηθούν για να αποκαλύψουν πληροφορίες για τις περαιτέρω ιδιότητες της SFH9.

1.4 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι μια κατηγορία λιπιδίων που απαντάται σε μεγάλη αφθονία στη φύση και αποτελούν ένα από τα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Βιοσυντίθενται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε μικρότερο ποσοστό, στο σύμπλεγμα Golgi και τα μιτοχόνδρια. Όπως όλα τα λιπίδια, έτσι και αυτά, πρόκειται για αμφιπαθή μόρια, δηλαδή μόρια που διαθέτουν υδρόφιλα αλλά και λιπόφιλα τμήματα, οπότε συνήθως είναι διατεταγμένα σε λιπιδικές διπλοστιβάδες ή δημιουργούν μυκκίλια.

Πιο συγκεκριμένα, τα φωσφολιπίδια είναι εστέρες της γλυκερόλης που στους άνθρακες 1 και 2 του σκελετού τους είναι εστεροποιημένα με λιπαρά οξέα, που ποικίλουν σε μήκος

αλυσίδας και ακορεσότητα, ενώ στον τρίτο άνθρακα η εστεροποίηση γίνεται με φωσφορικό οξύ. Το φωσφορικό οξύ είναι συνήθως και αυτό περαιτέρω εστεροποιημένο με κάποια αλκοόλη μικρής ανθρακικής αλυσίδας, χάρη στην οποία το φωσφολιπίδιο αποκτά τις χαρακτηριστικές ιδιότητές του. Το ζεύγος φωσφορικού οξέος και αλκοόλης αποτελεί την υδρόφιλη κεφαλή του λιπιδίου, ενώ οι δυο εστέρες των λιπαρών οξέων αποτελούν το υδρόφοβο κομμάτι του^[9].



Εικόνα 1.4.1. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός φωσφολιπιδίου. Με κόκκινο κύκλο σημειώνεται η υδρόφιλη κεφαλή του λιπιδίου (γλυκερόλη και εστέρας φωσφορικού οξέος), ενώ με κίτρινα πλαίσια οι υδρόφοβες ουρές του (εστέρες λιπαρών οξέων) (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://www.quyhowto.com/phospholipids-structure-classification-functions/>).

Όπως προαναφέρθηκε, οι αλκοόλες που εστεροποιούν το φωσφορικό οξύ ποικίλουν, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό πολλών και διαφορετικών φωσφολιπιδίων. Τα πιο σύνηθη είναι τα εξής: φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφατιδυλογλυκερόλη και φωσφατιδυλοσερίνη. Βέβαια, πρόδρομο μόριο όλων των προηγούμενων είναι το φωσφατιδικό οξύ. Τα φωσφολιπίδια αυτά, ανάλογα με τις ιδιότητες που τους προσδίδει η αλκοόλη τους, κατατάσσονται και σε διάφορες κατηγορίες. Παραδείγματος χάριν, η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη σε φυσιολογικό pH, βρίσκονται υπό τη μορφή επαμφοτερίζοντος ιόντος, ενώ στο ίδιο pH η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, η φωσφατιδυλογλυκερόλη και η φωσφατιδυλοσερίνη είναι αρνητικά φορτισμένες^[9].

Εκτός από τη συγκρότηση των κυτταρικών μεμβρανών, τα φωσφολιπίδια, καθώς και οι μεταβολίτες τους, επιτελούν πλήθος λειτουργιών στα φυτικά κύτταρα. Πολλά από αυτά, έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δομές γύρω από διάφορα μόρια και ως εκ τούτου παίζουν ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, όπως είναι η ενδοκύττωση και η εξωκύττωση. Στα μιτοχόνδρια των φυτών, τα φωσφολιπίδια μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του οργανιδίου, καθώς και την γενικότερη κυτταρική ομοιόσταση. Τέλος,

πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι, τόσο τα φωσφολιπίδια, όσο και οι μεταβολίτες τους αποτελούν δευτερογενείς αγγελιαφόρους, καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη του φυτού και την κυτταρική απόκριση σε περιβαλλοντικές αλλαγές και διάφορες καταπονήσεις^{[9], [10]}.

1.5 Φωσφατιδικό οξύ

Από τα φωσφολιπίδια, για τα οποία έγινε λόγος στην παραπάνω υποενότητα, ειδική αναφορά γίνεται στο φωσφατιδικό οξύ, διότι, όπως θα αναλυθεί στην ενότητα 4, αλληλεπιδρά ισχυρά με την SFH9.

Στα φυτά, το φωσφατιδικό οξύ εντοπίζεται κυρίως σε διάφορες μεμβράνες, σε χαμηλή όμως αφθονία και τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε ότι, έχει επιπλέον σηματοδοτικό ρόλο. Αν και δεν έχει ακόμα εντοπιστεί το σημείο του κυττάρου στο οποίο συντίθεται το φωσφατιδικό οξύ, είναι γνωστό ότι αυτό παράγεται από την υδρόλυση δομικών φωσφολιπιδίων (π.χ. φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) μέσω της φωσφολιπάσης D, καθώς και από τη φωσφορυλίωση διακυλογλυκερολών, μέσω της κινάσης των διακυλογλυκερολών (DGK)^[11].

Αναφορικά με το ρόλο του ως σηματοδοτικός παράγοντας, είναι γνωστό ότι η σύνθεσή του στα φυτά, ως απόκριση σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα, είναι ταχύτατη και παροδική. Από διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι το φωσφατιδικό οξύ λαμβάνει μέρος σε μηχανισμούς που αφορούν την ανάπτυξη του φυτού και την απόκρισή του σε βιοτικό και αβιοτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, το φωσφατιδικό οξύ δεσμεύεται σε συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς στόχους, τους οποίους αδρανοποιεί μέσω της απομάκρυνσής τους από το σημείο στο οποίο εμφανίζουν δραστικότητα. Οι μέχρι στιγμής γνωστές πρωτεΐνες-στόχοι, ελέγχουν μονοπάτια τα οποία αφορούν στην οργάνωση της αυξίνης, την επιμήκυνση της ρίζας, το μεταβολισμό λιπιδίων, τη δομή των χλωροπλαστών, τον έλεγχο των στομάτων και την ανταπόκριση σε παράγοντες καταπόνησης όπως είναι το αμπισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο. Κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι ότι φέρουν, είτε μια περιοχή πλούσια σε βασικά κατάλοιπα αμινοξέων και τρυπτοφάνη, είτε τη χαρακτηριστική, αυτοτελή, δομική περιοχή Pleckstrin homology domain, στις οποίες φαίνεται να συναρμόζεται το φωσφατιδικό οξύ. Βέβαια, περαιτέρω έρευνα χρειάζεται να πραγματοποιηθεί για να ανακαλυφθούν όλοι οι πιθανοί πρωτεϊνικοί στόχοι του φωσφατιδικού οξέος και ο τρόπος με τον οποίο συναρμόζεται σε αυτούς, ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του ^{[11], [12]}.

Τέλος, όσον αφορά την αλληλεπίδραση του φωσφατιδικού οξέος με την πρωτεΐνη SFH9, αυτή ενδεχομένως να καθίσταται δυνατή μέσω της περιοχής CRAL-TRIO της πρωτεΐνης ή μέσω κάποιας περιοχής που είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα και τρυπτοφάνη.

1.6 Σκοπός πτυχιακής εργασίας

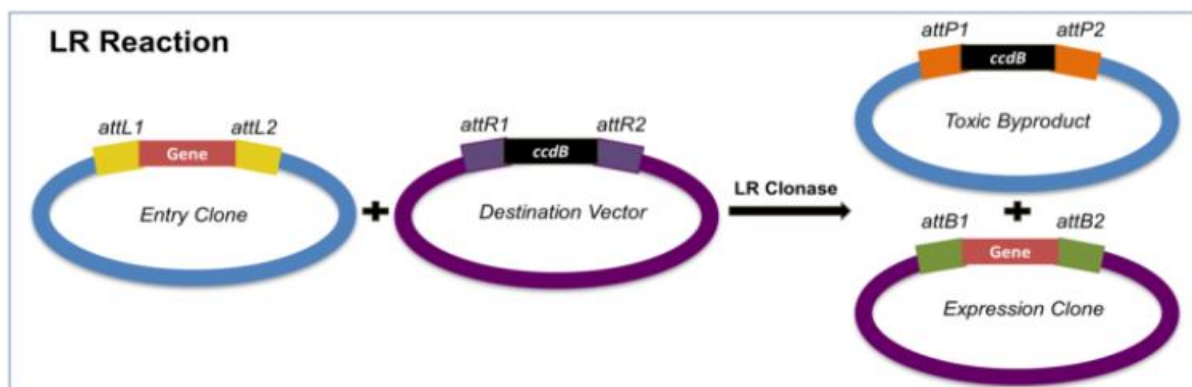
Σκοπό της εργασίας αυτής αποτέλεσε η έκφραση και η απομόνωση των φυτικών λιπιδικών μεταφορασών SFH6, SFH8 και SFH9, ενώ παράλληλα έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού του ρόλου της τελευταίας στη μοίρα των φυτικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν οι ιδιότητες πρόσδεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με διάφορα φωσfolιπίδια και για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας για GST και MBP tag, ενώ λήφθηκαν επίσης κάποια πρώτα αποτελέσματα μέσω της δοκιμασίας Lipid Overlay Assay.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι μεθοδολογίες, οι πειραματικές διαδικασίες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

2.1 Δημιουργία ανασυνδυασμένων φορέων μέσω αντίδρασης κλωνοποίησης LR

Πρώτο βήμα στη διαδικασία της έκφρασης των πρωτεϊνών, αποτελεί η δημιουργία των ανασυνδυασμένων φορέων, δηλαδή των πλασμιδίων που περιέχουν το γονίδιο της εκάστοτε πρωτεΐνης, μέσω αντίδρασης κλωνοποίησης LR. Με τη διαδικασία αυτή, το γονίδιο της προς απομόνωση πρωτεΐνης, περνάει από ένα φορέα δότη (pDONR) σε ένα φορέα δέκτη (pDEST), χάρη στη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού^[13].



Εικόνα 2.1.1. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης κλωνοποίησης LR (Εικόνα από διαδίκτυο, <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>).

Το εργαστήριο ήδη διαθέτει τους pDONR φορείς για τα γονίδια των SFH πρωτεϊνών, επομένως πραγματοποιήθηκαν μόνο οι αντιδράσεις κλωνοποίησης LR. Η αντίδραση LR αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 50-150 ng από τον φορέα δότη (pDONR), 50 ng/μL από τον φορέα δέκτη (pDEST15 ή pET16b), 0,5 μL LR κλωνάσης II και ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA (pH = 8,0) μέχρι τελικού όγκου 5 μL σε μικροσωληνάριο περιεκτικότητας 1,5 mL.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για ένα βράδυ (overnight).

3. Τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη 0,5 μL πρωτεΐνάσης K, ανάδευση και επώαση για 10' στους 37°C.
4. Εισαγωγή μετασηματισμένου φορέα σε στελέγη DH10b του βακτηρίου *E. coli*, μέσω μετασηματισμού (αναλύεται στην υποενότητα 2.5) και έλεγχος του πλασμιδιακού DNA (γίνεται ανάλυση παρακάτω, στην ίδια ενότητα).

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, χρησιμοποιείται το NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit της Macherey-Nagel, το οποίο αποτελεί παραλλαγή της αλκαλικής λύσης και χάρη στο οποίο, το πλασμιδιακό DNA συλλέγεται σε καθαρότερη μορφή, απαλλαγμένο από πρωτεΐνες και RNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας, η διαδικασία έχει ως εξής (σημειώνεται ότι όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στα 11,000 g):

1. Σχηματισμός κυτταρικού ιζήματος από 3 mL φρέσκιας υγρής καλλιέργειας μέσω φυγοκέντρησης για 30'' σε μικροσωληνάριο (1,5 mL) και πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου.
2. Πλήρης επαναιώρηση σε 250 μL διαλύματος A1. Το διάλυμα A1 περιέχει το ένζυμο RNAase A, το οποίο διασπά το RNA, απομακρύνοντας το από το DNA.
3. Προσθήκη 250 μL A2, ήπια ανακίνηση 6-8 φορές και επώαση για 5' σε RT. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του DNA από το κύτταρο.
4. Προσθήκη 300 μL διαλύματος A3, ήπια ανακίνηση 6-8 φορές, μέχρι να αποχρωματιστεί πλήρως. Με το A3 πραγματοποιείται η εξουδετέρωση του διαλύματος και δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες πρόσδεσης του DNA στη μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου της στήλης.
5. Φυγοκέντρηση για 5', ώστε το υπερκείμενο να γίνει διαυγές.
6. Τοποθέτηση στήλης με μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου (από το kit) σε κολώνα συλλογής (2 mL), μεταφορά 750 μL από το διαυγές υπερκείμενο του δείγματος και φυγοκέντρηση για 1'.
7. Απομάκρυνση του διαλύματος που περνά από τη στήλη, προσθήκη 500 μL διαλύματος AW και φυγοκέντρηση για 1'. Σε αυτό το στάδιο, από το πλασμιδιακό DNA απομακρύνονται οι διάφορες προσμίξεις.
8. Απόρριψη του διαλύματος που περνά από τη στήλη, προσθήκη 600 μL διαλύματος A4 που περιέχει EtOH και φυγοκέντρηση για 1'. Η διαδικασία αυτή γίνεται για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA από άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά, κυτταρικά μακρομόρια.
9. Απόρριψη του διαλύματος που περνά στην κολώνα συλλογής, φυγοκέντρηση για 2', ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη και τοποθέτηση της στήλης σε μικροσωληνάριο (1,5 mL).

10. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA με προσθήκη 25 μL AE, επώαση για 1' σε RT και φυγοκέντρηση για 2' χωρίς την απόρριψη του διαλύματος που περνά στο μικροσωληνάριο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά.
11. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύεται στους -20°C .

2.3 Δοκιμαστική πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για τον έλεγχο των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν την επιθυμητή ένθεση, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν απομονωθεί από διάφορα βακτήρια και αποτελούν τον μηχανισμό άμυνας τους έναντι των βακτηριοφάγων. Η επιλογή των ενζύμων γίνεται βάσει του μεγέθους των ζωνών που θα προκύψουν, έτσι ώστε να μπορούν να είναι διακριτές σε πηκτή αγαρόζης. Σημαντικό, επίσης είναι να υπάρχει μια θέση κοπής εσωτερικά στην ένθεση.

Προκειμένου να δράσουν, τα περιοριστικά ένζυμα χρειάζονται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο έχουν τη μέγιστη δραστηριότητα. Το μείγμα της πέψης τοποθετείται για 1 ώρα στους 37°C , θερμοκρασία στην οποία τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα έχουν την μέγιστη δυνατή ενεργότητα.

Πίνακας 2.3.1. Όγκος σε μL κάθε αντιδραστηρίου που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος πέψης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
ddH ₂ O	Μέχρι 20 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα	2
Πλασμίδιο	5-7
Ένζυμο	0,5-0,8

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που διαθέτει ο σκελετός του και κατά συνέπεια, όταν εισαχθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τότε κινείται προς την κάθοδο (θετικό πόλο). Όλα τα κομμάτια DNA που προκύπτουν από μία πέψη διαθέτουν ομοιόμορφο σχήμα και λόγο φορτίου/μάζας, επομένως ο διαχωρισμός τους σε μία πηκτή γίνεται βάσει του μεγέθους τους, που μετριέται σε αριθμό ζευγών βάσεων ή κιλοβάσεων. Η οπτικοποίηση των ζωνών τόσο του δείγματος αναφοράς (ladder), όσο και του αγνώστου δείγματος πραγματοποιείται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο διάλυμα της πηκτής, το οποίο μπορεί και εισάγεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA. Επίσης, το EtBr έχει την ιδιότητα να απορροφά στα 300-360 nm (UV) και ύστερα μέσω φθορισμού να εκπέμπει στα 590-600 nm (πορτοκαλί-κόκκινο), δίνοντας έτσι στα κομμάτια του DNA έντονο πορτοκαλί χρώμα^[14].

Για τον παραπάνω λόγο, η διαδικασία της πέψης συνοδεύεται από την εμφάνιση των ζωνών DNA, που προκύπτουν, κάτω από λάμπα UV σε πηκτή αγαρόζης. Για να επιτευχθεί αυτό, τα δείγματα της πέψης αναμειγνύονται με χρωστική 1x OrangeG (0,15% αζώχρωμα acid orange 10, 2,5% Ficoll-400, 11 mM EDTA, 0,017% SDS και 3,3 mM Tris-HCl) και στη

συνέχεια φορτώνονται σε πηκτή αγαρόζης. Η χρήση της χρωστικής βοηθά στη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή, καθώς και την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και το πλεονέκτημα της έγκειται στο γεγονός ότι το μέγεθος των πόρων της μπορεί να καθοριστεί κατάλληλα, ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση αγαρόζης 1% και εφαρμόστηκε τάση 100 V, διαχωρίζοντας έτσι κομμάτια DNA μεγέθους μεταξύ 500 bp και 2 kbp. Η παρατήρηση των ζωνών του DNA καθίσταται δυνατή με τη χρήση του προγράμματος BioVision.

2.5 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* με τους κατάλληλους φορείς

Ύστερα από την παρατήρηση της πηκτής αγαρόζης στην λάμπα UV, επιλέγονται τα δείγματα πλασμιδίων που περιέχουν τα γονίδια των προς απομόνωση πρωτεϊνών, προκειμένου να εισαχθούν σε 50 μL δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 (μετασηματισμός). Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται χημειοδεκτικά, διότι έχουν ήδη επεξεργαστεί με CaCl_2 και με τον τρόπο αυτό σχηματίστηκαν πόροι στο κυτταρικό τους τοίχωμα που επιτρέπουν την διέλευση πλασμιδίων στον εσωτερικό τους. Για να πραγματοποιηθεί όμως ο μετασηματισμός, απαραίτητη είναι και η διαδικασία του θερμικού σοκ (heat shock). Με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας, η μεμβράνη χάνει ορισμένα φωσfolιπίδια, οπότε οι πόροι της αυξάνουν σε μέγεθος και εσωτερικά αποπολώνεται, δηλαδή μειώνεται το αρνητικό της φορτίο και έτσι έλκει περισσότερο το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA. Από την άλλη, το θερμικό σοκ προκαλεί θερμική ανισορροπία, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να θερμαίνονται ραγδαία και να εισέρχονται ευκολότερα μέσα στους πόρους της μεμβράνης των κυττάρων. Βήματα:

1. Μεταφορά των κυττάρων *E.coli* (BL21) από τους -80°C στον πάγο, προκειμένου να ξεπαγώσουν.
2. Προσθήκη 2 μL πλασμιδίου σε κάθε μικροσωληνάριο που περιέχει κύτταρα, ανάδευση και επώαση στον πάγο για 15'.
3. Πραγματοποίηση του θερμικού σοκ με επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 45''.
4. Επώαση στον πάγο για 2'.
5. Προσθήκη 500 μL υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 37°C .
6. Επίστρωση 100 μL σε τρυβλίο στερεού LB. Το τρυβλίο περιέχει επίσης το κατάλληλο αντιβιοτικό για να γίνει η μετέπειτα επιλογή των αποικιών που περιέχουν το πλασμίδιο. Το αντιβιοτικό (ή αντιβιοτικά) που προστίθεται στο κάθε τρυβλίο, εξαρτάται από το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό που περιέχει το πλασμίδιο, αλλά και από το αντίστοιχο γονίδιο των ίδιων των κυττάρων.
7. Επώαση στους 37°C .

2.6 Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό υλικό

Μία μέρα μετά τον μετασχηματισμό και αφού έχουν εμφανιστεί αποικίες στα τρυβλία, γίνεται επιλογή μερικών από αυτών για ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό, με τον εξής τρόπο:

1. Προσθήκη αντιβιοτικών επιλογής και 3 mL υγρού LB σε μεγάλους δοκιμαστικούς και εμβολιασμός με μονή αποικία.
2. Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 15-18 περίπου ώρες^[15].

2.7 Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών με Ισοπρόπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG)

Για να μπορέσουν τα βακτήρια της υγρής καλλιέργειας να επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου που τους είχε εισαχθεί μέσω του πλασμιδίου και κατά συνέπεια να εκφράσουν την αντίστοιχη πρωτεΐνη, θα πρέπει η καλλιέργεια αυτή να αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό TB (terrific broth), παρουσία του IPTG. Το TB αποτελεί θρεπτικό υλικό παρόμοιο με το LB, που όμως χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στην απομόνωση πρωτεϊνών, καθώς είναι εμπλουτισμένο με φωσφορικά άλατα του καλίου (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) και γλυκερόλη, παρέχοντας έτσι στα κύτταρα περισσότερη ενέργεια, ώστε να πραγματοποιήσουν σε μεγαλύτερο βαθμό την πρωτεϊνική έκφραση^[16]. Από την άλλη, ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της προς απομόνωση πρωτεΐνης, διαθέτει τον χειριστή οπερονίου λακτόζης στον υποκινητή, επιτρέποντας έτσι την εκμετάλλευση του μηχανισμού ρύθμισης του οπερονίου, για την έκφραση της προς απομόνωση πρωτεΐνης. Επομένως, ο λόγος που προστίθεται το IPTG είναι, για να δράσει ως παρεμποδιστής του αναστολέα του οπερονίου της λακτόζης, καθώς έχει παρόμοια δομή με την αλλολακτόζη (φυσικός παρεμποδιστής), και να ξεκινήσει έτσι η μεταγραφή^[17].

Τα βήματα της διαδικασίας της επαγωγής είναι τα ακόλουθα:

1. Αραίωση 1:100 υγρής καλλιέργειας σε TB και προσθήκη αντιβιοτικών επιλογής.
2. Επώαση υπό ανάδευση για 3 ώρες στους 37°C, έως ότου $A_{600} = 0,4-0,8$.
3. Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο, ώστε να φτάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία επαγωγής.
4. Προσθήκη 50 μL IPTG 1 mM στην κωνική ($C_{\text{τελ}} = 0,001 \text{ mM}$) και επώαση υπό ανάδευση στους 28°C για 5 ώρες, προκειμένου να γίνει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης.
5. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30' στους 3,500 rpm (4°C), ώστε να συλλεχθεί το κυτταρικό ίζημα.
6. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου και αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

Σημειώνεται ότι γίνεται λήψη δειγμάτων πριν και μετά την προσθήκη του IPTG, για να διαπιστωθεί η δράση του παράγοντα.

2.8 Λύση βακτηριακών κυττάρων με υπέρηχους

Το κυτταρικό ίζημα που είχε αποθηκευτεί στους -20°C , αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο και ταυτόχρονα παρασκευάζεται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη λύση των κυττάρων της. Ανάλογα με το πεπτίδιο σήμανσης (tag) που διαθέτει η προς απομόνωση πρωτεΐνη, χρησιμοποιείται και διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα. Τα δύο κυριότερα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία, ήταν για πρωτεΐνες που είχαν συντηχθεί με τη μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST-tag) και για πρωτεΐνες επισημασμένες με την πρωτεΐνη δέσμησης της μαλτόζης (MBP-tag). Η σύστασή τους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.8.1. Σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης για πρωτεΐνες επισημασμένες με GST και για πρωτεΐνες επισημασμένες με MBP.

GST	MBP
Tris-HCl, 50 mM pH=8,8	Tris-HCl, 20 mM pH=7,5
NaCl, 200 mM	NaCl, 200 mM
Triton 0,1%	EDTA, 1mM

Εκτός από την σύσταση των διαλυμάτων αυτών, καθοριστικό ρόλο στη δράση τους παίζει και το pH τους, το οποίο εξαρτάται από το μοριακό βάρος της εκάστοτε πρωτεΐνης και το ισοηλεκτρικό της σημείο.

1. Προσθήκη 5 mL διαλύματος λύσης, 2,5 mL διαλύματος αναστολέων πρωτεασών και τέλος 1 mM PMSF στο κυτταρικό ίζημα που προήλθε 50 mL καλλιέργειας. Ο PMSF δρα και αυτός ως μη εξειδικευμένος αναστολέας πρωτεασών και προστίθεται στο τέλος, λίγο πριν την κυτταρική λύση, καθώς η δράση του διαρκεί 30'.
2. Προσθήκη 5 mM DTT στα δείγματα που πρόκειται να απομονωθούν με GST, για να αποφευχθεί η οξειδωση της γλουταθειόνης που χρησιμοποιείται σε επόμενο στάδιο.
3. Ήπια ανάδευση σε vortex, έως ότου να γίνει ομογενοποίηση.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία της κυτταρικής λύσης με υπέρηχους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του οργάνου Vibra-Cell VC-300 της Sonics, το οποίο μέσω βιδωτής κεφαλής εκπέμπει υπέρηχους στο δείγμα.

4. Υποβολή των δειγμάτων σε 5 κύκλους εκπομπής υπέρηχων, οι οποίοι διαρκούν 10'' ο καθένας και ανάμεσα στους οποίους υπάρχει αναμονή 10'', ώστε να προλάβει το δείγμα να παγώσει. Επίσης, το δείγμα είναι τοποθετημένο στον πάγο, για να περιοριστεί η δράση των πρωτεασών από την αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλούν οι υπέρηχοι. Μετά από τη διαδικασία της λύσης, πρέπει το ιξώδες του δείγματος να είναι χαμηλότερο και το χρώμα του πιο σκούρο, λόγω της απελευθέρωσης των διαφόρων κυτταρικών συστατικών. Εάν κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει, τότε το δείγμα υπόκειται σε ακόμα 2 κύκλους εκπομπής υπέρηχων.
5. Φυγοκέντρηση για 30' στους 12,500 rpm (4°C), προκειμένου να διαχωριστεί το πρωτεϊνικό διάλυμα από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά.
6. (Λήψη δείγματος υπερκείμενου και ιζήματος).

7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε σωλήνα φυγοκέντρου (15 mL) και φύλαξη στον πάγο.

2.9 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας

Αναφορικά με τη χρωματογραφία συγγένειας, αυτή αποτελεί το είδος υγρής χρωματογραφίας με τον υψηλότερο βαθμό εκλεκτικότητας στον πρωτεϊνικό διαχωρισμό, καθώς αυτός βασίζεται σε εξειδικευμένες βιολογικές αλληλεπιδράσεις των εκάστοτε πρωτεϊνών. Για να γίνει ο διαχωρισμός, το πρωτεϊνικό διάλυμα, ανάλογα με την επισήμανση της πρωτεΐνης, αναμειγνύεται με κατάλληλο υλικό διαχωρισμού (beads) πάνω στο οποίο αυτή δεσμεύεται, ενώ η έκλουση μπορεί να γίνει με τρεις κυρίως τρόπους:

- Αλλαγή στο pH ή την ιοντική ισχύ του διαλύματος, σε περίπτωση που οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-διαχωριστικού υλικού είναι ιοντικές.
- Προσθήκη ελεύθερων υποκαταστατών, δηλαδή ενώσεων που συναγωνίζονται την πρωτεΐνη για τις θέσεις δέσμευσης του διαχωριστικού υλικού.
- Προσθήκη ενώσεων που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την πρωτεΐνη, αλληλεπιδρούν με αυτή και μπορούν να αντικαταστήσουν έτσι τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-διαχωριστικού υλικού^[18].

Στις συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες, όταν η πρωτεΐνη είναι επισημασμένη με MBP, χρησιμοποιείται διαχωριστικό υλικό αμυλόζης, το οποίο δεσμεύεται στην περιοχή δέσμευσης της μαλτόζης που φέρει το MBP και η έκλουση στη συνέχεια, γίνεται με τη χρήση διαλύματος 10 mM μαλτόζης, η οποία έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το MBP, από ότι το διαχωριστικό υλικό. Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη είναι συζευγμένη με τη μεταφοράση της γλουταθειόνης, τότε ο διαχωρισμός γίνεται με διαχωριστικό υλικό γλουταθειόνης-αγαρόζης και η έκλουση με διάλυμα 20 mM γλουταθειόνης, η οποία επίσης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το συγκεκριμένο πεπτίδιο επισήμανσης (GST). Πιο αναλυτικά:

1. Προσθήκη φίλτρου στη στήλη και έλεγχος της ροής της με απιονισμένο νερό.
2. Προσθήκη 400 μL από το κατάλληλο διαχωριστικό υλικό.
3. Ξέπλυμα διαχωριστικού υλικού με 3 όγκους στήλης απιονισμένου νερού, ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη στην οποία ήταν αποθηκευμένο.
4. Προσθήκη 10 όγκων στήλης κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, ώστε να γίνει η εξισορρόπηση του διαχωριστικού υλικού.
5. Ανάμιξη του διαχωριστικού υλικού με το πρωτεϊνικό διάλυμα, επιστροφή του μείγματος στο σωλήνα φυγοκέντρου (15 mL) και ανάδευση πάνω στον πάγο για 2 ώρες, ώστε να αλληλεπιδράσει όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης με το διαχωριστικό υλικό. Αξίζει να σημειωθεί, ότι από αυτό το βήμα κι έπειτα, η διαδικασία λαμβάνει χώρα στον ψυχρό θάλαμο (4°C).

6. Επιστροφή του πρωτεϊνικού μείγματος στην στήλη (συλλογή μικρής ποσότητας του σε μικροσωληνάριο (1,5 mL), για να χρησιμοποιηθεί αργότερα στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου).
7. Ροή του πρωτεϊνικού διαλύματος μέχρι αυτό να φτάσει στο μέτωπο του διαχωριστικού υλικού, ξέπλυμα της κολώνας και του διαχωριστικού υλικού με 12 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (συλλογή κλάσματος από το ξέπλυμα (wash)).
8. Έκλουση της πρωτεΐνης με προσθήκη κάθε φορά 400 μL κατάλληλου διαλύματος έκλουσης. Συνολικά συλλέχθηκαν 4 πρωτεϊνικά κλάσματα των 400 μL σε μικροσωληνάρια (1,5 mL).
9. Ακολουθεί η αναγέννηση του διαχωριστικού υλικού με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων.

2.10 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Για να διαπιστωθεί η επιτυχία της έκφρασης και της απομόνωσης των πρωτεϊνών, μετά την απομόνωση διενεργείται αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στο συγκεκριμένο είδος ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες δεν διατηρούν την τριτοταγή τους δομή, αλλά αποδιατάσσονται στις πρωτεϊνικές τους υπομονάδες και αυτές στη συνέχεια μπορούν να διαχωριστούν μονάχα βάσει του μοριακού τους βάρους, χάρη στην κατεργασία τους με κατάλληλο διάλυμα επεξεργασίας δειγμάτων (sample buffer) που περιέχει δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) και μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών και καταστρέφει όλες τις αλληλεπιδράσεις τους, πλην των ομοιοπολικών. Επίσης, λόγω του μεγάλου αρνητικού του φορτίου καλύπτει το φυσικό φορτίο των πρωτεϊνών και έτσι, μετατρέπονται σε ισχυρά ανιοντικά μόρια. Από την άλλη, η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς τους, οπότε σε συνδυασμό με τη δράση του SDS, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται στις υπομονάδες τους, οι οποίες μάλιστα αποκτούν γραμμικό σχήμα. Έτσι λοιπόν, αφού το φορτίο ανά μονάδα μάζας παραμένει σταθερό και το σχήμα των υπομονάδων είναι πρακτικά το ίδιο, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου βάσει του μοριακού τους βάρους, γεγονός που αποτελεί και το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου^[19].

1. Ανάμιξη 20 μL από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα που συλλέχθηκε από την επαγωγή μέχρι την έκλουση (input, pellet, flowthrough, wash, elutions 1-4) με 5 μL διαλύματος επεξεργασίας (sample buffer), (αναλογία δείγματος : διαλύματος επεξεργασίας = 1:4).
2. Θέρμανση για 5' στους 100°C και φυγοκέντρηση για 10' στους 13,000 rpm.
3. Φόρτωση 15 μL από κάθε δείγμα στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή στην πραγματικότητα αποτελείται από δυο επιμέρους πηκτές, την επιστοίβασης και τη διαχωρισμού, των οποίων η σύσταση αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.10.1. Όγκος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης και της πηκτής διαχωρισμού.

Πηκτή Επιστοίβασης		Πηκτή Διαχωρισμού 12%	
ddH ₂ O	6 mL	ddH ₂ O	5 mL
Διάλυμα 30% ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου	1,32 mL	Διάλυμα 30% ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου	6 mL
Tris-HCl, 0,5 M pH=6,8	2,5 mL	Tris-HCl, 1,5M pH=8,9	3,75 mL
SDS 20%	50 μL	SDS 20%	75 μL
APS	150 μL	APS	300 μL
TEMED	15 μL	TEMED	30 μL

4. Εφαρμογή αρχικής τάσης 90 V και αύξησή της στα 120 V, όταν το μέτωπο των δειγμάτων περάσει από την πηκτή επιστοίβασης στην πηκτή διαχωρισμού. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί συνολικά περίπου 90'.

2.11 Χρώση πρωτεϊνικών ζωνών με Coomassie Brilliant Blue

Μετά το πέρας της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, η πηκτή βάφεται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R250 (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 10% οξικό οξύ και 50% μεθανόλη), προκειμένου να γίνει η χρώση των πρωτεϊνικών ζωνώσεων, οι οποίες προηγουμένως ήταν άχρωμες. Πιο αναλυτικά:

1. Αφαίρεση της πηκτής επιστοίβασης και τοποθέτηση του υπόλοιπου σε κατάλληλο δοχείο.
2. Προσθήκη διαλύματος χρώσης Coomassie Brilliant Blue R250, έως ότου αυτό να καλύψει ολόκληρη την πηκτή και ήπια ανάδευση για 5'.
3. Απομάκρυνση του διαλύματος χρωστικής, πλύση της πηκτής με απιονισμένο νερό και προσθήκη διαλύματος αποχρωματισμού (40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), μέχρι η πηκτή να καλυφθεί πλήρως.
4. Ήπια ανάδευση. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεώνεται 2 φορές (ανά 15').

Μία μέρα μετά, αφού έχει γίνει πλήρης αποχρωματισμός της πηκτής, οι πρωτεϊνικές ζώνες αποκτούν έντονο μπλε χρώμα και γίνεται η ταυτοποίηση τους με τη βοήθεια του προτύπου αναφοράς (marker).

2.12 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Το δεύτερο σκέλος των πειραμάτων αφορά στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα κλάσματα, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η συγκέντρωσή τους είναι επαρκής για να συνεχιστούν με επιτυχία οι επόμενες δοκιμασίες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προσδιορίστηκε μονάχα η συγκέντρωση της SFH9 μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς, που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Bradford και η επιβεβαίωση έγινε μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους στα 280 nm.

Αναφορικά με τη μέθοδο Bradford, αυτή βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με υδατικά διαλύματα πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον, σχηματίζοντας κυανό σύμπλοκο που εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική διαθέτει αρκετούς αρωματικούς δακτυλίους, καθώς και αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες, οπότε μπορεί από τη μια να αλληλεπιδράσει με αρωματικά κατάλοιπα αμινοξέων (π.χ. τυροσίνη) μέσω αλληλεπιδράσεων π-π επιστοιβάξης (π-π stacking) και από την άλλη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με βασικά κατάλοιπα αμινοξέων και κυρίως αργινίνη. Αν και η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για απευθείας ποσοτικοποίηση με τη χρήση του νόμου Beer-Lambert, εντούτοις τα αποτελέσματά της μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση καμπύλης βαθμονόμησης, που προκύπτει από τη μέτρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων (π.χ. BSA) γνωστής συγκέντρωσης^[20]. Βήματα:

1. Παρασκευή πρότυπων δειγμάτων BSA συγκεντρώσεων, 0,05 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL και 1,5 mg/mL στο διάλυμα λύσης MBP.
2. Παρασκευή αγνώστου δείγματος με αραιώση του πρωτεϊνικού κλάσματος σε διάλυμα λύσης MBP.
3. Προσθήκη 1 mL διαλύματος εργασίας Bradford σε 5 μL από κάθε δείγμα (BSA και άγνωστο)
4. Επώαση για 10' σε RT.
5. Μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα άγνωστα δείγματα, χρησιμοποιείται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων BSA γνωστών συγκεντρώσεων. Για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα θα πρέπει οι τιμές των αγνώστων δειγμάτων να εμφανίζονται στο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης.

Η συγκέντρωση της SFH9 επιβεβαιώθηκε μέσω φασματοφωτομετρίας απορρόφησης υπεριώδους στα 280 nm (περιοχή απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων), με τη χρήση του οργάνου NanoDrop 2000 UV Visible Spectrophotometer της Thermo Scientific.

2.13 Προσδιορισμός συγγένειας πρωτεϊνών-φωσφολιπιδίων με Lipid Overlay Assay

Τέλος, για τον προσδιορισμό του ρόλου των πρωτεϊνών στα φυτικά κύτταρα, πρέπει πρώτα να προσδιοριστεί η συγγένεια που αυτές έχουν με διάφορα φωσφολιπίδια, καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η οικογένεια των πρωτεϊνών SFH αποτελεί μεταφορείς τέτοιων λιπιδίων. Η επίτευξη αυτού του στόχου πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου Lipid Overlay Assay της Echelon Biosciences. Ουσιαστικά πρόκειται για μια λεπτή μεμβράνη που περιέχει συμπυκνωμένα τα εξής δεκαπέντε φωσφολιπίδια: 1-φωσφορική σφιγγοσίνη, λυσοφωσφατιδικό οξύ, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, 3,4-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, 3,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, 4-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφατιδικό οξύ, 5-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη,

φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοχολίνη. Λόγω όμως του υψηλού κόστους της μεμβράνης λιπιδίων που χρησιμοποιείται στη μέθοδο αυτή, η διαδικασία εφαρμόστηκε μόνο μία φορά για την πρωτεΐνη SFH9.

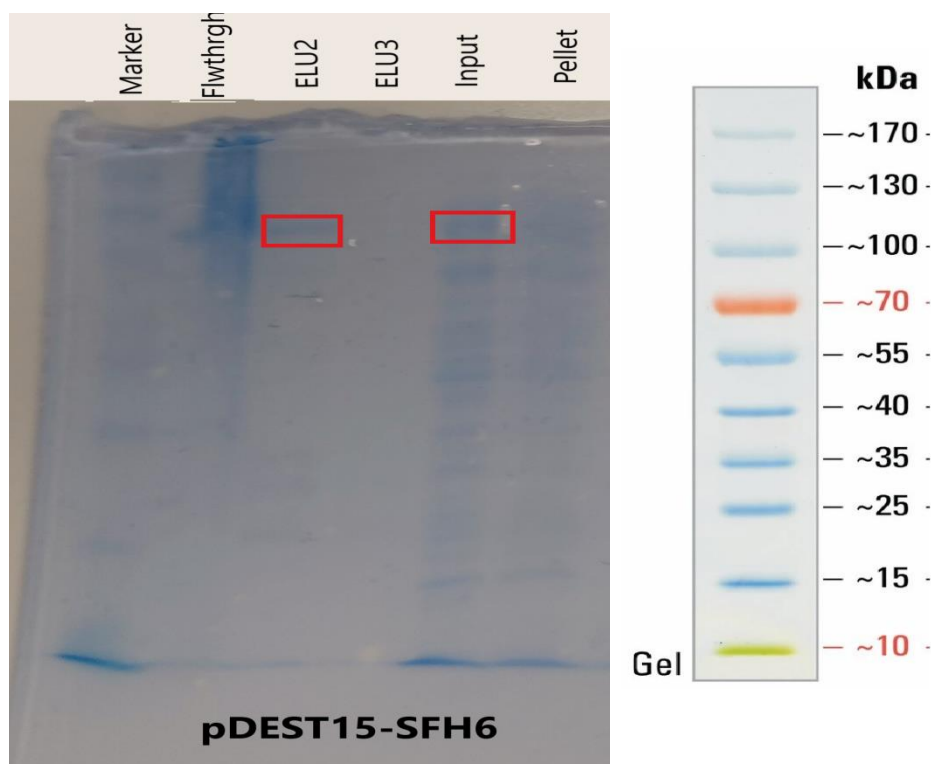
1. Προσθήκη 10 mL PBS-T με 3% BSA στη μεμβράνη φωσφολιπιδίων και ήπια ανακίνηση για 1 ώρα σε RT, προκειμένου να γίνει παρεμπόδιση των θέσεων της μεμβράνης που δεν φέρουν λιπίδια και να αποτραπεί έτσι η πρόσδεση της πρωτεΐνης ή των αντισωμάτων μη ειδικά.
2. Απομάκρυνση του διαλύματος παρεμπόδισης και προσθήκη 5 mL διαλύματος PBS-T με 3% BSA που περιέχει 0,5-2 µg/mL πρωτεΐνης (στη συγκεκριμένη περίπτωση 1,78 µg/mL), η οποία καθορίζεται από τη συγκέντρωσή της στο κλάσμα.
3. Επώαση της μεμβράνης υπό ανάδευση για 2 ώρες σε RT.
4. Πραγματοποίηση 3 πλύσεων από 5 mL PBS, κάθε μια από τις οποίες διαρκεί 10' υπό ανάδευση.
5. Παρασκευή του διαλύματος του πρωτοταγούς αντισώματος (κατά τη διάρκεια της τελευταίας πλύσης, ώστε να μη στεγνώσει η μεμβράνη), το οποίο έχει συγκέντρωση 1:2000 σε 5 mL PBS-T με 3% BSA και επώαση της μεμβράνης σε αυτό για 1 ώρα με ήπια ανακίνηση σε RT.
6. Επανάληψη του βήματος 4.
7. Επώαση της μεμβράνης σε 5 mL διαλύματος δευτεροταγούς αντισώματος σε PBS-T με 3% BSA, αραιώσης 1:10,000, για 1 ώρα σε RT. Το δευτεροταγές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP, το οποίο όταν αντιδράσει σε υπόστρωμα λουμινόλης, τότε την οξειδώνει σε 3-αμινοφθαλικό, το οποίο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και όταν αποδιεγείρεται εκπέμπει φωτόνια. Τα φωτόνια αυτά στη συνέχεια μπορούν, μέσω κατάλληλου ανιχνευτή, να ανιχνευθούν, καθιστώντας έτσι δυνατή την οπτικοποίηση του αντισώματος^[21].
8. Επανάληψη του βήματος 4.
9. Προσθήκη του υποστρώματος της HRP (Bio-Rad), ώστε να γίνει η ανίχνευσή της. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του οργάνου Sapphire RGBNIR™ Biomolecular Imager της Azure Biosystems.
10. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο όργανο και χρήση χημειοφωταύγειας (chemiluminescence), ώστε να γίνει η εμφάνισή της.

Η διαδικασία της ανίχνευσης διαρκεί περίπου 30' και κατά τη διάρκειά της λαμβάνονται πολλαπλές φωτογραφίες από το όργανο.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 SFH6

Αναφορικά με την πρωτεΐνη SFH6, το γονίδιο της κλωνοποιήθηκε και εισήχθει στον φορέα pDEST15, όπου και συντήχθηκε με την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST). Η επιτυχής εισαγωγή του γονιδίου της SFH6 στο φορέα αυτόν διαπιστώθηκε από την πέψη του και τη συνεπακόλουθη ηλεκτροφόρηση (δεδομένα δεν δείχνονται, προσωπική επικοινωνία με Μόσχου Παναγιώτη). Στη συνέχεια, η πλασμιδιακή κατασκευή (construct) εισήχθει σε κύτταρα BL21 και επιστρώθηκε σε τρυβλία με Χλωραμφενικόλη (Cam) και Αμπικικιλίνη (Amp), από όπου έγινε η επαγωγή της έκφρασης και η απομόνωση από μια μονή αποικία. Έπειτα από τη λήψη κατάλληλων δειγμάτων κατά τη διάρκεια της έκφρασης και απομόνωσης, λήφθηκε η εξής πηκτή πολυακρυλαμιδίου.



Εικόνα 3.1.1. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά ο marker και η πλασμιδιακή κατασκευή, pDEST15-SFH6 με την εξής σειρά: Flowthrough, Elution 2 και 3, Input, Pellet. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη της SFH6. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.

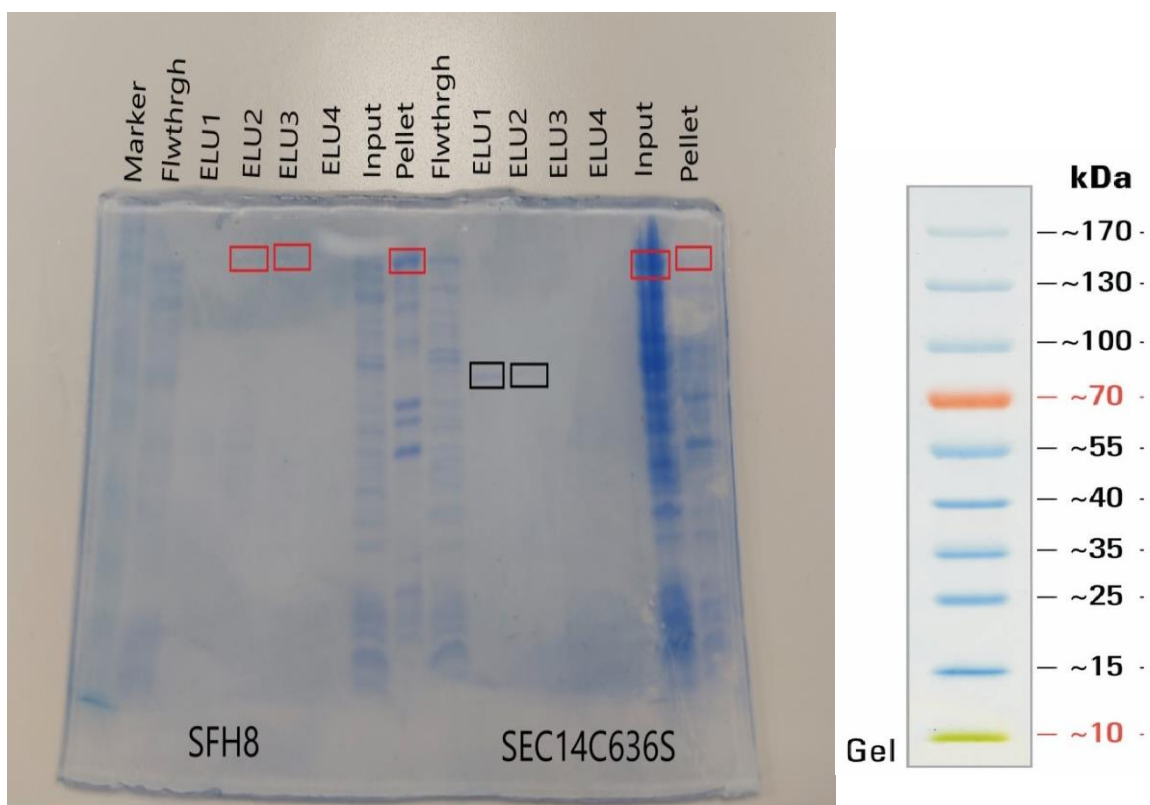
Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, η χρήση του φορέα pDEST15 είχε ως αποτέλεσμα να ληφθεί η SFH6 στο πρωτεϊνικό κλάσμα 2, ενώ μέρος της φαίνεται και στο input. Επομένως, φαίνεται ότι η SFH6 απομονώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό με τη χρήση της μεταφοράς της γλουταθειόνης.

3.2 SFH8

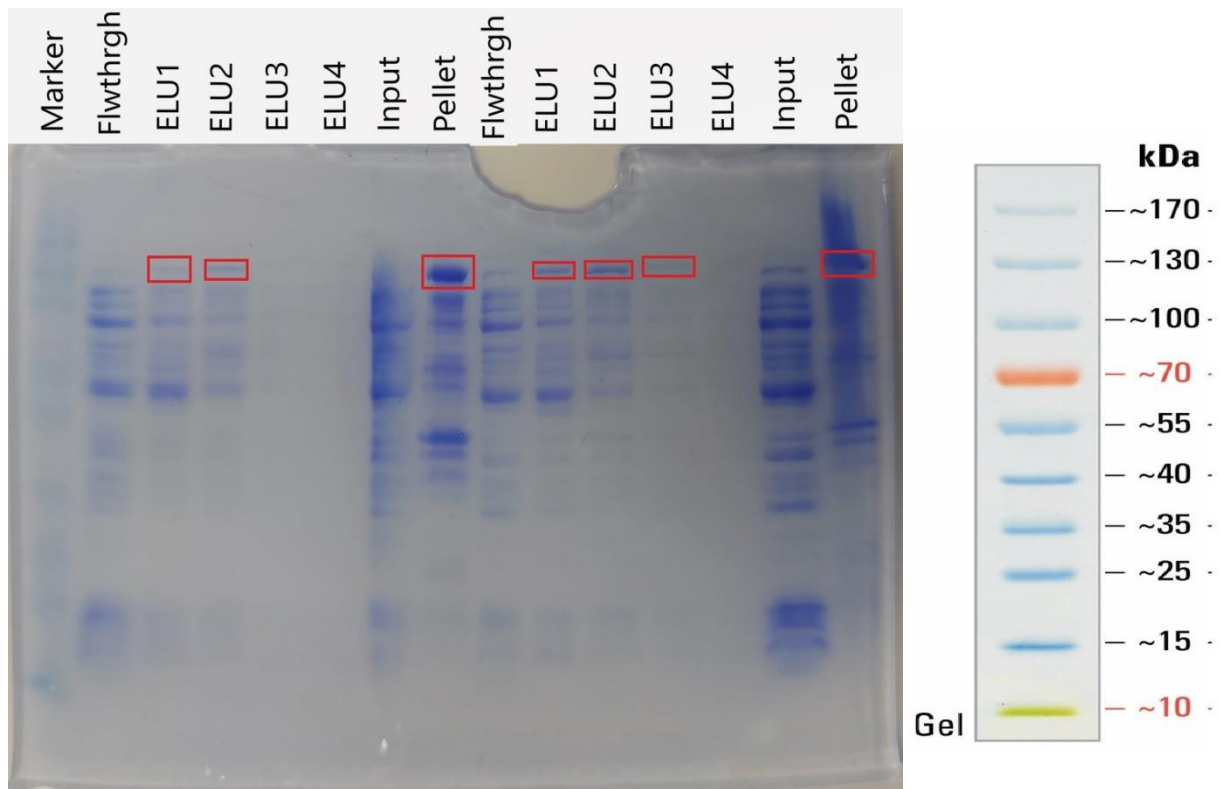
Τα πειράματα έκφρασης και απομόνωσης της SFH8 έγιναν πάνω σε δύο διαφορετικές μορφές της πρωτεΐνης. Από τη μια εξετάστηκε η πρωτεΐνη αυτή καθαυτή (SFH8) και από την άλλη ένα μετάλλαγμα της, που φέρει μεταλλαγή από κυστεΐνη σε σερίνη στη θέση 636 (SEC14C636S).

Όσον αφορά την αυτούσια πρωτεΐνη, το γονίδιο της εισήχθει σε φορέα pET16b, ο οποίος χάρη στην παρουσία του MBP·HIS tag, αύξησε τη διαλυτότητά της. Για να πραγματοποιηθεί έλεγχος του πλασμιδιακού DNA που έφερε το γονίδιο της SFH8, έγινε πέψη και αφού λήφθηκαν τα επιθυμητά αποτελέσματα, αυτό μετασηματίστηκε σε κύτταρα BL21, που επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με Χλωραμφενικόλη και Αμπικικιλίνη.

Αντίθετα, το μετάλλαγμα της SFH8 (SEC14C636S) εισήχθει στον φορέα pDEST15, οπότε η απομόνωσή του, βασίστηκε στο GST tag. Ο έλεγχος της ένθεσης του συγκεκριμένου γονιδίου στον pDEST15 πραγματοποιήθηκε με κατάλληλη πέψη και ο μετασηματισμός έγινε παρομοίως σε κύτταρα BL21, που επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με Χλωραμφενικόλη και Αμπικικιλίνη. Από τις διαδικασίες της επαγωγής και της έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών, λήφθηκαν οι παρακάτω πηκτές πολυακρυλαμιδίου.



Εικόνα 3.2.1. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά ο marker και οι πλασμιδιακές κατασκευές, pET16b-SFH8 και pDEST15-SEC14C636S με την εξής σειρά: Flowthrough, Elutions 1-4, Input, Pellet. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη των δύο πρωτεϊνών, ενώ με μαύρο πλαίσιο μία έντονη μη αναμενόμενη ζώνη της SEC14C636S. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.



Εικόνα 3.2.2. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά ο marker και η πλασμιδιακή κατασκευή, *rET16b-SFH8* με την εξής σειρά: Flowthrough, Elutions 1-4, Input, Pellet. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη της SFH8. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.

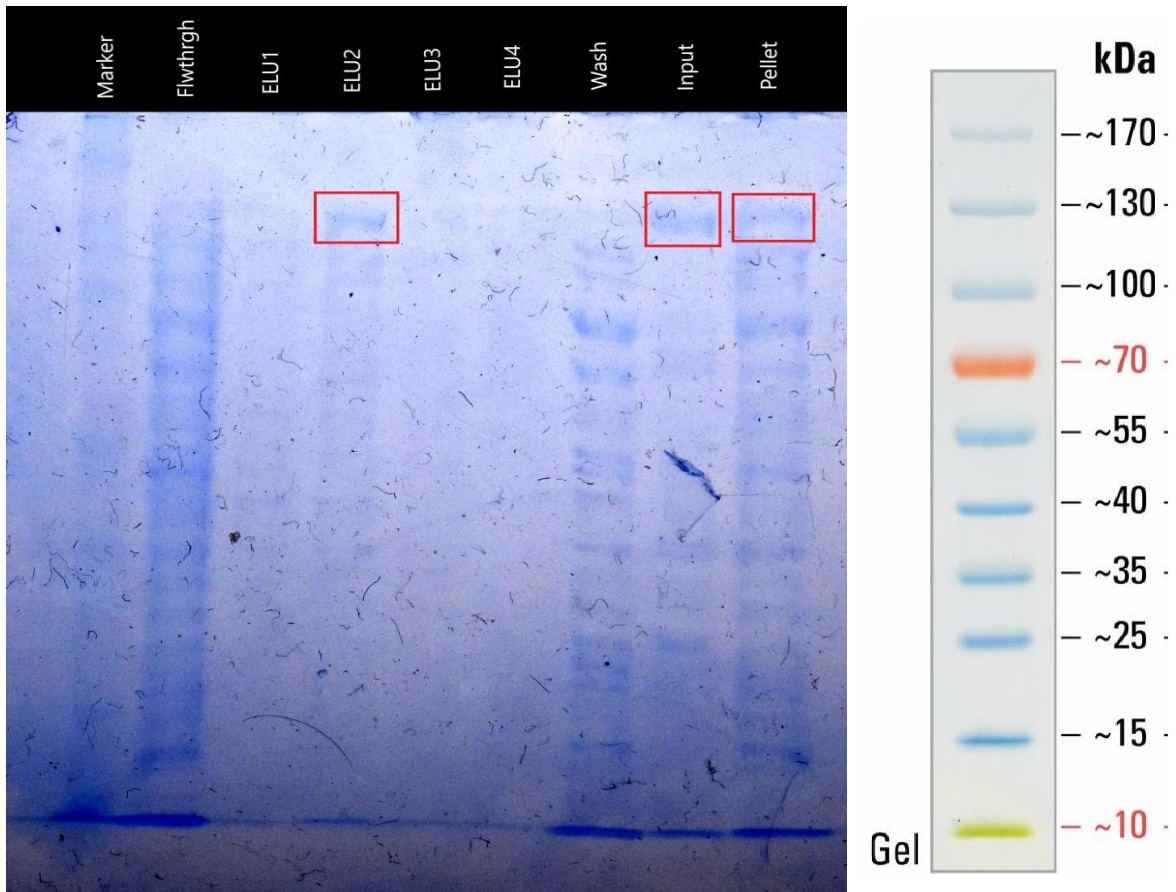
Στην εικόνα 3.2.1 φαίνεται το τελικό αποτέλεσμα της απομόνωσης των *rET16b-SFH8* και *rDEST15-SEC14C636S*. Όσον αφορά την SFH8, διαπιστώνεται ότι, ναι μεν μια μικρή ποσότητα της είναι παρούσα στα κλάσματα 2 και 3, όμως το μεγαλύτερο ποσοστό της παρέμεινε στο κυτταρικό ίζημα, υποδηλώνοντας ότι ακόμα και με τον φορέα *rET16b*, η διαλυτότητά της είναι αρκετά χαμηλή. Από την άλλη, η *SEC14C636S* φαίνεται να υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό στο input και το κυτταρικό ίζημα, ενώ αναφορικά με τα κλάσματά της (1 και 2), αυτά διαθέτουν μία μη αναμενόμενη ζώνη, υποδηλώνοντας ότι υπήρχε διάσπαση του GST-tag της πρωτεΐνης λίγο πριν την έναρξη της χρωματογραφίας.

Επειδή λοιπόν, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την πρώτη απομόνωση δεν ήταν ικανοποιητικά, η διαδικασία επαναλήφθηκε για την αυτούσια SFH8 και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3.2.2. Φαίνεται λοιπόν, ότι και σε αυτή την περίπτωση ένα ποσοστό της SFH8 έχει παραμείνει στο κυτταρικό ίζημα, όμως αυτή τη φορά μία ικανοποιητική ποσότητα της πρωτεΐνης έχει περάσει κυρίως στα κλάσματα 1 και 2, καθιστώντας έτσι την απομόνωση επιτυχή.

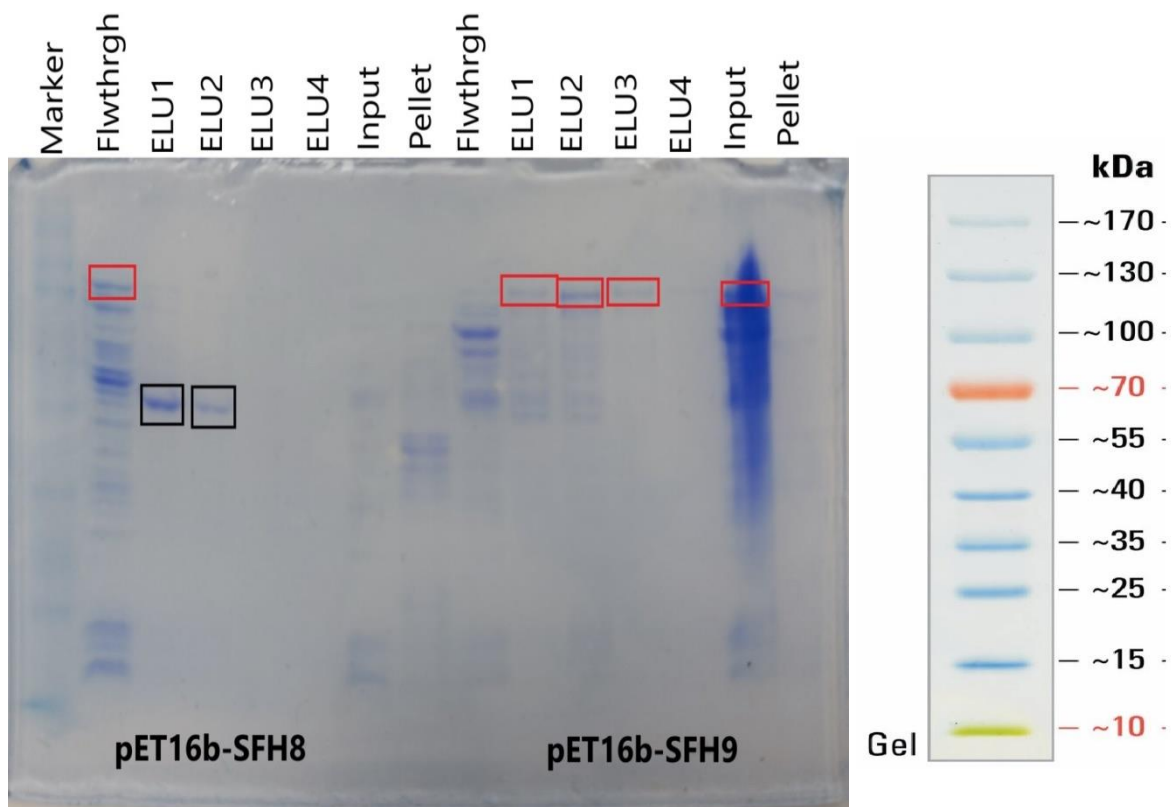
3.3 SFH9

Τέλος, εξετάστηκε και η πρωτεΐνη SFH9, της οποίας το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στον φορέα *rET16b*, για τον ίδιο λόγο που αναφέρθηκε και στην SFH8. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι

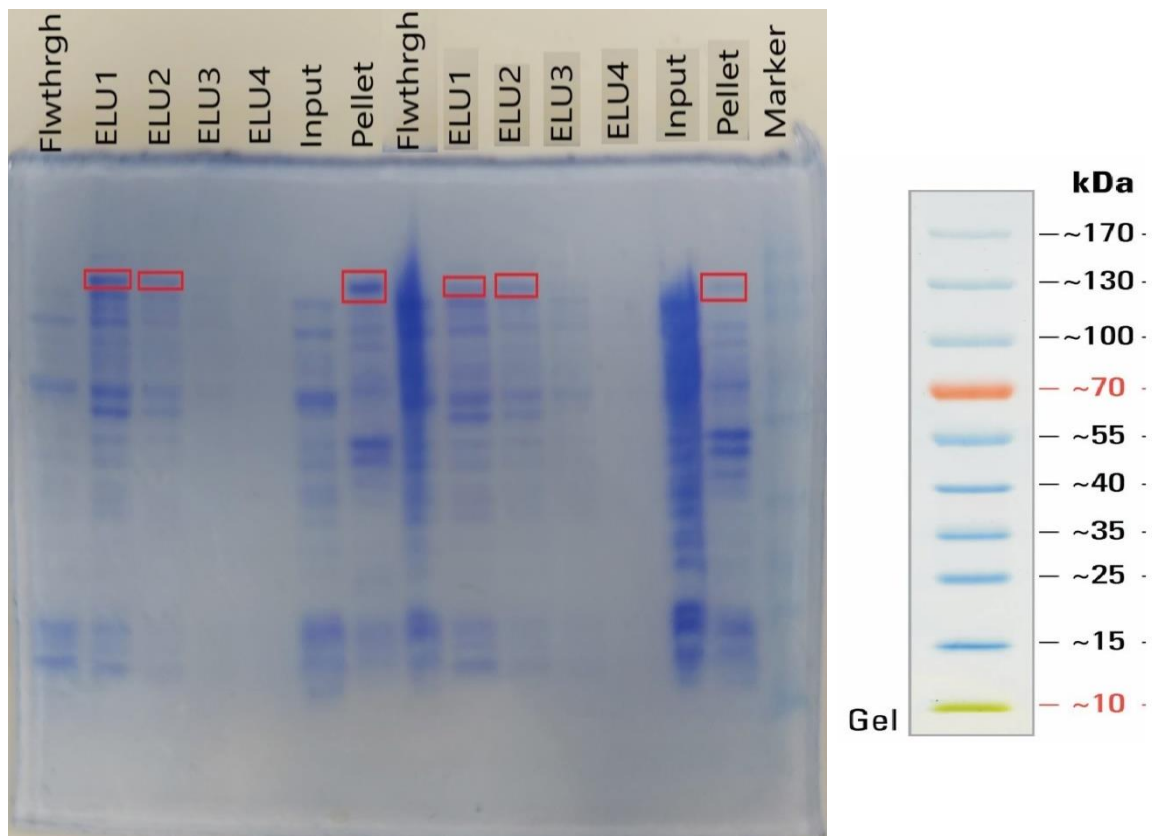
πριν την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας είχε ήδη ελεγχθεί η απομόνωσή της πρωτεΐνης αυτής και με τον φορέα pDEST15, όπου είχε διαπιστωθεί ότι όλη η ποσότητα της παραμένει στο κυτταρικό ίζημα και για το λόγο αυτό δεν ξαναχρησιμοποιήθηκε. Η πλασμιδιακή κατασκευή λοιπόν pET16b-SFH9, ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια μετασχηματίστηκε ομοίως σε κύτταρα BL21, που επιστρώθηκαν σε τρυβλία με Χλωραμφενικόλη και Αμπικικιλίνη. Ακολούθησαν οι υπόλοιπες μέθοδοι που προαναφέρθηκαν στην ενότητα 2 και τελικά λήφθηκαν οι εξής πηκτές πολυακρυλαμιδίου.



Εικόνα 3.3.1. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά ο marker και η πλασμιδιακή κατασκευή, pET16b-SFH9 με την εξής σειρά: Flowthrough, Elutions 1-4, Wash, Input, Pellet. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη της SFH9. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.



Εικόνα 3.3.2. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά ο marker και οι πλασμιδιακές κατασκευές, pET16b-SFH8 και pET16b-SFH9 με την εξής σειρά: Flowthrough, Elutions 1-4, Input, Pellet. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη των δύο πρωτεϊνών, ενώ με μαύρο πλαίσιο μία άλλη έντονη, αλλά μη αναμενόμενη ζώνη της SFH8. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.



Εικόνα 3.3.3. Αριστερά: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά η πλασμιδιακή κατασκευή, pET16b-SFH9 με την εξής σειρά: Flowthrough, Elutions 1-4, Input, Pellet και στο τέλος ο marker. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η κύρια ζώνη της SFH9. Δεξιά: σχηματική απεικόνιση του πρότυπου δείγματος, όπου φαίνεται το βάρος των ζωνών του σε kDa.

Στην εικόνα 3.3.1 φαίνεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου που λήφθηκε από την πρώτη απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής pET16b-SFH9. Όπως μπορεί κανείς να δει, η απομόνωση δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής, καθώς η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης βρίσκεται στο input και το κυτταρικό ίζημα, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό φαίνεται να υπάρχει και στο δεύτερο κλάσμα. Προκειμένου λοιπόν να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της πρωτεϊνικής απομόνωσης, διαφοροποιήθηκε το στάδιο ανάδευσης του πρωτεϊνικού διαλύματος με το υλικό διαχωρισμού, του οποίου η χρονική διάρκεια αυξήθηκε στις δυόμισι ώρες.

Η πρώτη πηκτή πολυακρυλαμιδίου που λήφθηκε χρησιμοποιώντας τις νέες αυτές συνθήκες, φαίνεται στην εικόνα 3.3.2. Παρατηρώντας την εικόνα, φαίνεται πως οι αλλαγές στη διαδικασία της χρωματογραφίας είχαν ως αποτέλεσμα την καλύτερη απομόνωση της SFH9, αφού το μεγαλύτερο μέρος της φαίνεται στο κλάσμα 2, ενώ ικανοποιητικές ποσότητες μπορούν να παρατηρηθούν και στα κλάσματα 1 και 3. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί πως η εικόνα 3.3.2 δεν χρησιμοποιήθηκε στα αποτελέσματα της SFH8, διότι παρατηρήθηκαν στα κλάσματά της κι άλλες ζώνες, οι οποίες δεν έχουν σχέση με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και αυτό μπορεί να οφείλεται σε λάθος χαρακτηρισμό της συγκεκριμένης πλασμιδιακής κατασκευής, σε χρήση λάθος φορέα, ή ακόμα και σε εσφαλμένη διαχείριση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα τη διάσπασή της.

Τέλος, στην εικόνα 3.3.3 φαίνεται και πάλι επιτυχής απομόνωση της πρωτεΐνης, καθώς και μεν υπάρχει μια ποσότητά της στο κυτταρικό ίζημα, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό της ανιχνεύεται στα κλάσματα 1 και 2. Βέβαια, εκτός από την κύρια ζώνη της SFH9 παρατηρούνται επιπλέον ζώνες, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε συσσωματώματα της πρωτεΐνης ή σε διάσπασή της. Περαιτέρω ανάλυση, αναφορικά με τους λόγους για τους οποίους παρατηρούνται παραπάνω ζώνες στις πηκτές των SFH8 και SFH9, παρατίθεται παρακάτω στην ενότητα 4.

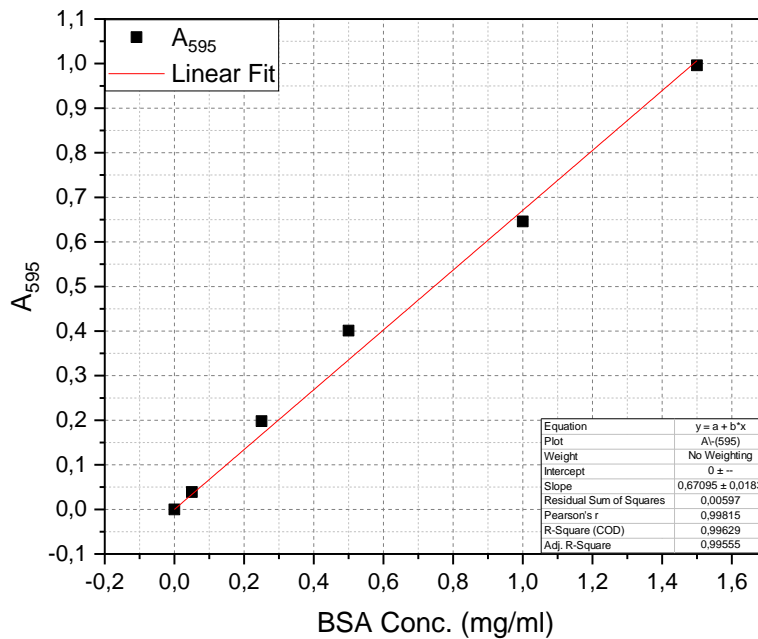
Έπειτα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της SFH9 μέσω της μεθόδου Bradford. Για να γίνει αυτό, παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν πρότυπα δείγματα BSA, των οποίων οι συγκεντρώσεις και οι τιμές απορρόφησης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.3.1. Τιμές συγκέντρωσης σε mg/mL και απορρόφησης στα 565 nm για κάθε πρότυπο δείγμα BSA.

Συγκέντρωση (mg/mL)	A ₅₉₅
0	0
0.05	0.039
0.25	0.198
0.50	0.401

1.0	0.646
1.5	0.996

Στο διάγραμμα 3.3.1 απεικονίζεται η ευθεία που προέκυψε από την γραμμική προσαρμογή των δεδομένων του πίνακα 3.3.1. Το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε (Origin Pro 9), υπολόγισε ότι η εξίσωση της ευθείας είναι $y = 0,67095 \cdot x - 0$ (έγινε προσαρμογή του πρώτου σημείου της ευθείας στο σημείο (0,0), όπως ορίζει ο νόμος Beer-Lambert) και το R^2 της προσαρμογής είναι ίσο με 0,99555.



Διάγραμμα 3.3.1. Γραμμική προσαρμογή της απορρόφησης στα 595 nm (A_{595}) συναρτήσεως της συγκέντρωσης των πρότυπων δειγμάτων BSA σε mg/mL. Η εξίσωση που προέκυψε από την γραμμική προσαρμογή με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος είναι $y = 0,67095 \cdot x - 0$, ενώ το R^2 ισούται με 0,99555.

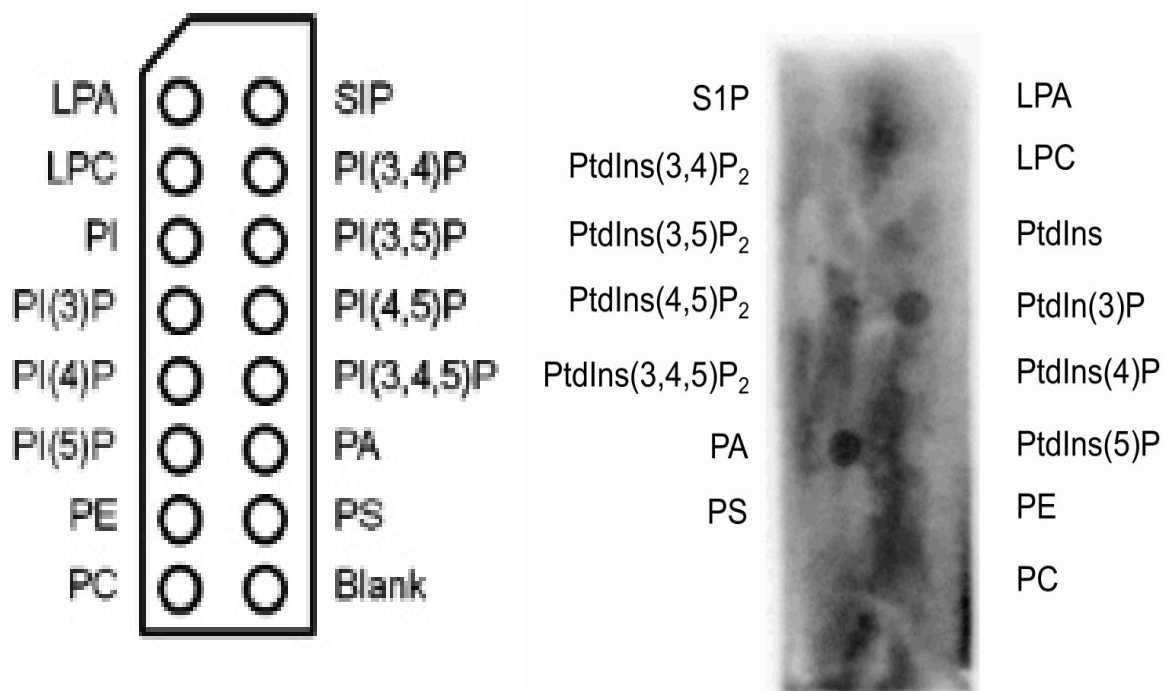
Ύστερα, μετρήθηκε το άγνωστο δείγμα της SFH9, του οποίου η απορρόφηση βρέθηκε ίση με 0,847 και με τη βοήθεια της εξίσωσης του διαγράμματος προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του ως εξής:

$$y = 0,67095x \Rightarrow x = \frac{y}{0,67095} = \frac{0,847}{0,67095} = 1,26$$

Άρα η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος SFH9 ήταν ίση με 1,26 mg/mL.

Η συγκέντρωση αυτή επιβεβαιώθηκε και από το NanoDrop 2000 UV Visible Spectrophotometer της Thermo Scientific, καθώς το όργανο αυτό βρήκε τη συγκέντρωση του δείγματος ίση με 1,27 mg/mL. Σύμφωνα με την τιμή αυτή πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια το Lipid Overlay Assay.

Μια ποσότητα της SFH9 μεταφέρθηκε σε μεμβράνη 15 φωσφολιπιδίων (Lipid Overlay Assay) και στο τέλος της διαδικασίας από το όργανο Sapphire RGBNIR™ Biomolecular Imager, μέσω Chemiluminescence, λήφθηκε η εξής εικόνα.



Εικόνα 3.3.4. Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση της μεμβράνης δεκαπέντε φωσφολιπιδίων της Echelon Biosciences (Εικόνα από το διαδίκτυο). Δεξιά: Μεμβράνη δεκαπέντε φωσφολιπιδίων της Echelon Biosciences μετά την προσθήκη της SFH9 και την ανίχνευσή της με το Sapphire RGBNIR™ Biomolecular Imager. Με μαύρο κυκλικό σχήμα παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-λιπιδίου.

Όπως μπορεί να αντιληφθεί κανείς από την εικόνα 3.3.4, η SFH9 αλληλεπιδρά ισχυρά με το φωσφατιδικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό με την 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. Ενδεχομένως, να έχει ληφθεί πολύ ασθενές σήμα και για την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, αλλά η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί για να θεωρηθεί το αποτέλεσμα αυτό αξιόπιστο. Βέβαια, βάσει της ομοιότητάς της με τη Sec14 του σακχαρομύκητα, αναμενόταν πως η SFH9 θα αλληλεπιδρούσε κυρίως με τη φωσφατιδυλοχολίνη ή/και με κάποια από τις φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες. Ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο, ενδεχομένως να οφείλεται σε στερικούς παράγοντες, δηλαδή σε στερική παρεμπόδιση, εφόσον το φωσφατιδικό οξύ, με το οποίο υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση, είναι το απλούστερο και το πιο μικρό φωσφολιπίδιο που διαθέτει η μεμβράνη.

4. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, από την μελέτη της επαγωγής και της απομόνωσης των τριών πρωτεϊνών, προκύπτει ότι η SFH6 εκφράζεται και απομονώνεται ικανοποιητικά με τη χρήση φορέων σύντηξης που της προσδένουν τη μεταφοράση της γλουταθειόνης, όπως είναι για

παράδειγμα ο φορέας pDEST15. Αντίθετα, για τη λήψη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων από τις πρωτεΐνες SFH8 και SFH9 πρέπει να γίνει χρήση φορέων που τις ενώνουν με την πρωτεΐνη δέσμευσης της μαλτόζης, όπως γίνεται με τον pET16b. Για το μονό μετάλλαγμα της SFH8 (SEC14C636S), χρειάζεται να επαναληφθούν οι διαδικασίες έκφρασης και επαγωγής, ώστε να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Επιπρόσθετα, από τις εικόνες που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 3, φαίνεται ότι, εκτός από την κύρια ζώνη της εκάστοτε πρωτεΐνης, υπάρχουν επιπλέον ζώνες, άλλες πιο αχνές και άλλες εξίσου έντονες. Η εμφάνιση των ζωνών αυτών οφείλεται σε διάφορους λόγους, μερικοί από τους οποίους μπορεί να είναι οι εξής:

- Διάσπαση πρωτεϊνικών ολιγομερών (αν αυτά δημιουργούνται) από το SDS
- Αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών από τη μερκαπτοαιθανόλη, που μπορεί να συγκρατούν πρωτεϊνικές υπομονάδες μεταξύ τους .
- Διάσπαση της τελικής πρωτεΐνης (πρωτεΐνη+πεπτίδιο επισήμανσης) λόγω αστάθειάς της. Στην περίπτωση αυτή, φαίνονται στην πηκτή όλα τα πρωτεϊνικά κομμάτια που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από το πεπτίδιο επισήμανσης που χρησιμοποιήθηκε.
- Διάσπαση της τελικής πρωτεΐνης ακριβώς στο σημείο όπου συνδέεται το πεπτίδιο επισήμανσης και επακόλουθη δημιουργία ολιγομερών. Τα ολιγομερή αυτά μπορεί να συναρμοστούν με την πρωτεΐνη, οπότε στην περίπτωση αυτή μπορεί να φανούν στην πηκτή και κομμάτια με μικρότερο μέγεθος από αυτό του πεπτιδίου επισήμανσης.
- Μη εξειδικευμένη πρόσδεση της πρωτεΐνης πάνω σε άλλες πρωτεΐνες του βακτηρίου, μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.
- Ημιτελής έκφραση της πρωτεΐνης, εξαιτίας της συγκέντρωσης του IPTG, που οδηγεί σε κομμάτια της πρωτεΐνης με διάφορα μοριακά βάρη, τα οποία είτε μένουν ως έχουν είτε δημιουργούν συσσωματώματα.
- Διάσπαση της πρωτεΐνης από πρωτεάσες.

Η διαδικασία απομόνωσης των SFH8 και SFH9, επαναλήφθηκε και από άλλα μέλη του εργαστηρίου, με τη χρήση μεγαλύτερης ποσότητας καλλιέργειας και τις βέλτιστες δυνατές συνθήκες, λαμβάνοντας και πάλι πηκτές με πολλαπλές ζώνες. Το αποτέλεσμα αυτό, ενδεχομένως να αποκλείει, ως πιθανό λόγο εμφάνισης παραπάνω ζωνών, τη διάσπαση της πρωτεΐνης από πρωτεάσες, καθώς η μεταχείριση των πρωτεϊνών ήταν η καλύτερη δυνατή. Αν αποκλειστεί λοιπόν το ενδεχόμενο διάσπασης των πρωτεϊνών από πρωτεάσες και η εμφάνιση των παραπάνω ζωνών οφείλεται σε κάποιους από τους υπόλοιπους λόγους που προαναφέρθηκαν, για την εξάλησή τους μπορούν να πραγματοποιηθούν οι παρακάτω ενέργειες.

Πίνακας 4.1. Λόγοι εμφάνισης παραπάνω πρωτεϊνικών ζωνών στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου και τρόποι αντιμετώπισης

Λόγοι εμφάνισης παραπάνω πρωτεϊνικών ζωνών	Τρόποι αντιμετώπισης
Διάσπαση πρωτεϊνικών ολιγομερών από το SDS	Μεταβολή (μείωση) της συγκέντρωσης του SDS στο sample buffer
Αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών από τη μερκαπτοαιθανόλη, που μπορεί να συγκρατούν πρωτεϊνικές υπομονάδες μεταξύ τους	Μεταβολή της συγκέντρωσης της μερκαπτοαιθανόλης στο διάλυμα επεξεργασίας του δείγματος
Διάσπαση της τελικής πρωτεΐνης λόγω αστάθειάς της	Χρήση διαφορετικών φορέων με άλλα πεπτίδια επισήμανσης
Διάσπαση της τελικής πρωτεΐνης ακριβώς στο σημείο όπου συνδέεται το πεπτίδιο επισήμανσης και επακόλουθη δημιουργία ολιγομερών	Χρήση διαφορετικών φορέων με άλλα πεπτίδια επισήμανσης
Μη εξειδικευμένη πρόσδεση της πρωτεΐνης πάνω σε άλλες πρωτεΐνες του βακτηρίου, μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων	Αλλαγή στη σύσταση του wash buffer. Προσθήκη έως και 1M NaCl, αν πρόκειται για ηλεκτροστατικές αλλ/σεις ή μείωση της συγκέντρωσης NaCl σε 25-50 mM και προσθήκη 5% αιθανόλης ή ακετονιτριλίου, αν πρόκειται για υδρόφοβες αλλ/σεις
Ημιτελής έκφραση της πρωτεΐνης, εξαιτίας της συγκέντρωσης του IPTG, που οδηγεί σε κομμάτια της πρωτεΐνης με διάφορα μοριακά βάρη	Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργειες που έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, μέχρι να βρεθεί η βέλτιστη

Βέβαια, συστήνεται η μεταβολή ενός παράγοντα τη φορά και ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν, να ακολουθεί αλλαγή και σε κάποια άλλη παράμετρο κατά τη διαδικασία είτε της έκφρασης ή της απομόνωσης.

Συνεχίζοντας με τη δοκιμασία Lipid Overlay Assay, από αυτήν παρατηρείται ότι η SFH9 αλληλεπιδρά κυρίως με το φωσφατιδικό οξύ, οπότε εκτός από το ρόλο της κλασικής λιπιδικής μεταφοράσης, ενδέχεται η πρωτεΐνη αυτή να σχετίζεται και με τη λειτουργία του φωσφατιδικού οξέος ως σηματοδοτικό μόριο. Με άλλα λόγια, η SFH9 πιθανότατα να συντελεί σε μηχανισμούς που αφορούν στην απόκριση του φυτού σε εξωγενείς παράγοντες καταπόνησης, στον έλεγχο της ομοιόστασής του, καθώς και στη ανάπτυξή του, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μοίρα.

5. Μελλοντικοί Στόχοι

Στην παρούσα εργασία, επιδιώχθηκε η έκφραση και η απομόνωση των πρωτεϊνών SFH6, SFH8 και SFH9, καθώς και η αποσαφήνιση της λειτουργίας της τελευταίας στα φυτικά κύτταρα. Το δεύτερο κομμάτι της εργασίας αποτελεί ένα μικρό τμήμα, ενός ευρύτερου στόχου, ο οποίος αφορά στη διερεύνηση του ρόλου αλλά και των ιδιοτήτων και των τριών

αυτών πρωτεϊνών. Για την πλήρη λοιπόν επίτευξη του σκοπού αυτού, οι SFH6 και SFH8 θα υποβληθούν στη δοκιμασία Lipid Overlay, προκειμένου σε πρώτο στάδιο να βρεθούν τα φωσφολιπίδια με τα οποία αλληλεπιδρούν αυτές οι λιπιδικές μεταφοράσες. Στη συνέχεια, οι τρεις πρωτεΐνες θα υποβληθούν σε δοκιμασία πρόσδεσης με λιποσώματα (SUVs), ώστε να παρατηρηθούν γενικά οι αλληλεπιδράσεις τους με λιπιδικές διπλοστιβάδες, αλλά και οι πιο εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις τους με τα φωσφολιπίδια από το Lipid Overlay Assay^{[22], [23]}.

Αναφορικά με την εύρεση της δομής και των ιδιοτήτων των τριών SFH πρωτεϊνών, πρόκειται να ακολουθηθούν οι φασματοσκοπίες MALS και cryo-EM. Μέσω της φασματοσκοπίας MALS (Multiangle Light Scattering), μετράται η σκέδαση του φωτός από ένα δείγμα, υπό διάφορες γωνίες. Ο ανιχνευτής MALS συνήθως είναι συζευγμένος με χρωματογράφο HPLC αποκλεισμού μεγέθους (SEC-MALS), ο οποίος μέσω ενός διαγράμματος Debye, που ο ίδιος φτιάχνει από τη σκέδαση του φωτός του δείγματος, προσδιορίζει το μοριακό του βάρος. Άρα, με αυτόν τον τρόπο μπορεί να βρεθεί η μοριακή μάζα των πρωτεϊνών, καθώς και το είδος των ολιγομερών που αυτές τείνουν να δημιουργούν. Επιπλέον, με την τεχνική του cryo-EM, το πρωτεϊνικό δείγμα ψύχεται ταχύτατα, έτσι ώστε να μη δημιουργηθούν κρύσταλλοι πάγου, και στη συνέχεια ακτινοβολείται με ηλεκτρόνια, προκειμένου να παραχθούν εικόνες της πρωτεΐνης στο μικροσκόπιο. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται απεικόνιση των τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών, χωρίς προηγουμένως να απαιτηθεί κρυστάλλωσή τους. Τέλος, χάρη στη συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα σε δομή και ιδιότητες, μπορούν να αποκαλυφθούν και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών^{[24], [25]}.

6. Βιβλιογραφία

1. Heterologous Expression. (2022). *Encyclopedia of Neuroscience*, 1830–1830. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_2190
2. Yesilirmak, F., & Sayers, Z. (2009). Heterologous Expression of Plant Genes. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2009/296482>
3. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
4. Carvalho, A. de O., & Gomes, V. M. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. *Peptides*, 28(5), 1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.004>
5. Hsuan, J., & Cockcroft, S. (2001). The PITP family of phosphatidylinositol transfer proteins. *Genome Biol* 2, reviews3011.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-9-reviews3011>
6. Huang, J., Ghosh, R., & Bankaitis, V. A. (2016). Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins and the biological landscape of phosphoinositide signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.027>
7. Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D., & Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, 108(4), 1271–1281. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1271>
8. Tripathi, A., Martinez, E., Obaidullah, A. J., Lete, M. G., Lönnfors, M., Khan, D., Soni, K. G., Mousley, C. J., Kellogg, G. E., Bankaitis, V. A. (2019). Functional diversification of the chemical landscapes of yeast Sec14-like phosphatidylinositol transfer protein lipid-binding cavities. *Journal of Biological Chemistry*, 294(50), 19081–19098. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.011153>

9. Drescher, S., & van Hoogevest, P. (2020). The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 12(12), 1235. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235>
10. Xue, H.-W., Chen, X., & Mei, Y. (2009). Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal*, 421(2), 145–156. <https://doi.org/10.1042/bj20090300>
11. Testerink, C., & Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2349–2361. <https://doi.org/10.1093/jxb/err079>
12. Yao, H.-Y., & Xue, H.-W. (2018). Phosphatidic acid plays key roles regulating plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 851–863. <https://doi.org/10.1111/jipb.12655>
13. Atanassov, I. I., Atanassov, I. I., Etchells, J. P., & Turner, S. R. (2009). A simple, flexible and efficient PCR-fusion/Gateway cloning procedure for gene fusion, site-directed mutagenesis, short sequence insertion and domain deletions and swaps. *Plant Methods*, 5(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-14>
14. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>
15. Kragh, K. N., Alhede, M., Rybtke, M., Stavnsberg, C., Jensen, P. Ø., Tolker-Nielsen, T., Whiteley, M., & Bjarnsholt, T. (2018). The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5). <https://doi.org/10.1128/aem.02264-17>
16. Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2015). Rich Medium Composition Affects Escherichia coli Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4442–4450. <https://doi.org/10.1128/aem.00722-15>

17. Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep33037>
18. Cuatrecasas, P. (1970). Protein Purification by Affinity Chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, *245*(12), 3059–3065. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)63022-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)63022-4)
19. Manns, J. M. (2011). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *Current Protocols in Microbiology*, *22*(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>
20. Congdon, R. W., Muth, G. W., & Splittgerber, A. G. (1993). The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins. *Analytical Biochemistry*, *213*(2), 407–413. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1439>
21. Yang, L., Jin, M., Du, P., Chen, G., Zhang, C., Wang, J., Jin, F., Shao, H., She, Y., Wang, S., Zheng, L., & Wang, J. (2015). Study on Enhancement Principle and Stabilization for the Luminol-H₂O₂-HRP Chemiluminescence System. *PLOS ONE*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131193>
22. Klingler, J., Vargas, C., Fiedler, S., & Keller, S. (2015). Preparation of ready-to-use small unilamellar phospholipid vesicles by ultrasonication with a beaker resonator. *Analytical Biochemistry*, *477*, 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.015>
23. Starr, M. L., & Fratti, R. (2018). Determination of Sec18-Lipid Interactions by Liposome-Binding Assay. *Methods in Molecular Biology*, 211–220. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8760-3_13
24. Patel, B. A., Gospodarek, A., Larkin, M., Kenrick, S. A., Haverick, M. A., Tugcu, N., Brower, M. A., & Richardson, D. D. (2018). Multi-angle light scattering as a process analytical technology measuring real-time molecular weight for downstream process control. *MAbs*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1505178>
25. Callaway, E. (2020). Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology. *Nature*, *578*(7794), 201–201. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00341-9>