

ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΜΕΣΣΟΓΕΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ



HELLENIC
MEDITERRANEAN
UNIVERSITY
SCHOOL of AGRICULTURE
DEPARTMENT of AGRICULTURE



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ
ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΡΑ ΣΤΟ *ESCHERICHIA COLI*»

ΔΕΛΕΔΑΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΜΑΙΟΣ, 2022

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ,
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ,
2022

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΘ. ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΚΑΘ. ΤΡΑΝΤΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΚΑΘ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

**ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ**

Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στην παλιά και νέα οικογένειά μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών εφαρμογών του τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωπονικών επιστημών του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Εμμανουήλ Τραντά και Φίλιππο Βερβερίδη για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εργαστώ στο εργαστήριό τους και να προσπαθήσω να φέρω σε πέρας ένα, όπως αποδείχθηκε, δύσκολο έργο.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους βρησκόντουσαν στο εργαστήριο κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής, για την βοήθεια και την καθοδήγηση που προσέφεραν απλόχερα. Αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν η οικογένεια και φίλοι μου καθώς και οι μουσικοί μου συνεργάτες για την υποστήριξη, υπομονή και εμπύχωση καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος και της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας. Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω την σύντροφο και γυναίκα της ζωής μου Έφη, για όλη την συμπαράσταση και την ενθάρυνση που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια συγγραφής της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	V
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	VI
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	VIII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IX
ABSTRACT	XI
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΦΥΤΙΚΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	1
1.1.1 ΟΜΑΔΑ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ.....	2
1.1.2 ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ).....	6
1.1.3 ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	12
1.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....	16
1.3 Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ.....	18
1.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ.....	19
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 ΓΟΝΙΔΙΑ	23
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ E. COLI.....	24
2.3 ΣΤΕΛΕΧΟΣ E. COLI ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	24
2.3.1 PCR.....	27
2.3.2 ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ NDEI ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SOE-PCR (SPLICING BY OVERLAP EXTENSION - PCR)	28
2.4 ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	32
2.4.1 ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΛΙΓΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	32
2.4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΕΨΕΩΝ ΚΑΙ ΛΙΓΟΠΟΙΗΣΗΣ	33
2.4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	34
2.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	35
2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ	36
2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	36
2.8 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗ.....	37
2.9 ΡΗΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	38
2.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	38
2.11 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΕΛΕΣΗ IN VITRO ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	39

2.12	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CAPILLARY ELECTROPHORESIS, CE).....	40
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
3.1	ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ.....	43
3.1.1	ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ SDDC ΚΑΙ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ NDEI ΘΕΣΗΣ	43
3.1.2	ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RSTYR ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ PRSF-SDDCMUT.....	47
3.1.3	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ PCDF-SDDCMUT ΚΑΙ ΤΟΥ PCDF-SDDCMUT-RSTYR.....	50
3.2	IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CE).....	54
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΗΛΕΚΤΡΟΦΕΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ...	63
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	78
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Πίνακας 1: Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή.

Σύντμηση	Πλήρες όνομα
DHPAS	Συνθάση των αρωματικών φαινυλακεταλδεΐδων, Dihydroxyphenyl acetaldehyde synthase
IPP	Πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο
DMAPP	Πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο
GPP	Πυροφωσφορικό γερανύλιο
HMG-CoA	Υδροξυμεθυλο-γλουταρυλο-CoA
MVA-PP	Πυροφωσφορικό μεβαλονικό οξύ
FPP	Πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο
GGPP	Πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο
GFPP	Πυροφωσφορικό γερανυλφαρνεζύλιο
PPPP	Πυροφωσφορικό πολυπρενύλιο
PEP	Φωσφοενολική μορφή του πυροσταφυλικού οξέος
RsTyr	Τυροσινάση από το <i>Ralstonia solanacearum</i>
SsDDC	Αποκαρβοξυλάση της Dopa από το <i>Sus scrofa</i>
ADH/ALR-K	Αλδεϋδική αναγωγή
DHPAA	3,4 Διυδροξυφαινυλο ακεταλδεΐδη
HT	Υδροξυτυροσώλη
IPTG	Isopropyl β -d-1thiogalactopyranoside
SOE-PCR	Splicing by Overlap Extension polymerase chain reaction
SsDDCmut	Αποκαρβοξυλάση της Dopa από το <i>Sus scrofa</i> με απενεργοποιημένη την NdeI θέση
Tyr	L-Tyrosine, Τυροσίνη
DOPA	L-3,4 Dihydroxyphenylalanine
PLP	Pyrodoxal 5'-phosphate
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DAD	Παράταξη φωτοδιόδων, Diode array detection
CE	Τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, Capillary Electrophoresis
SsDDCmod	Αποκαρβοξυλάση της Dopa από το <i>Sus scrofa</i> με αντικατάσταση της Τυροσίνης 332 σε φαινυλαλανίνη
PAAS	Συνθάση της φαινυλακεταλδεΐδης, Phenylacetaldehyde synthase
PcTDC	Αποκαρβοξυλάση της τυροσίνης από το <i>Petroselinum crispum</i>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού έχουν όμως βασικό ρόλο στην άμυνά του καθώς και στην προσαρμογή του στο περιβάλλον. Του παρέχουν προστασία ενάντια σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες και κατηγοριοποιούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες, τα αλκαλοειδή, τα τερπένια και την ομάδα των φαινολικών ουσιών. Στην τελευταία ανήκουν διάφορες ουσίες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την θετική επίδραση που έχουν στην υγεία του ανθρώπου με μια απ' αυτές να είναι η υδροξυτυροσόλη.

Η υδροξυτυροσόλη (3,4 Dihydroxyphenylethanol) είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης της ελιάς (*Olea europaea*) ο οποίος συναντάται κυρίως στα φύλλα αλλά και τους καρπούς σε μικρότερες ποσότητες. Είναι γνωστή για τις ευεργετικές, για την υγεία του ανθρώπου και κυρίως για την αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να παραχθεί με την χρήση μεθόδων μεταβολικής μηχανικής όπου ένας μικροοργανισμός, όπως το *Escherichia coli*, τροποποιείται ώστε να την παράγει.

Η βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης επιτυγχάνεται μέσω της τροποποίησης δύο γονιδίων. Το γονίδιο της τυροσινάσης από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* και το γονίδιο της συνθάσης των αρωματικών φαινυλακεταλδεύδων από τον μαϊντανό. Η έκφραση αυτών των δύο γονιδίων στο *E.coli* επιτρέπει την παραγωγή της υδροξυτυροσόλης μέσα από την δημιουργία ενός διπλού βιοσυνθετικού μονοπατιού που ξεκινάει από την τυροσίνη, επειδή το καθένα από τα δύο προαναφερθέντα γονίδια μπορεί να δεχτεί δύο διαφορετικά υποστρώματα. Η τυροσινάση μπορεί να δεχθεί την τυροσίνη και την τυροσόλη, ενώ η συνθάση των αρωματικών φαινυλακεταλδεύδων μπορεί να δεχθεί την τυροσίνη και την DOPA. Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση του μονοπατιού με την αντικατάσταση της συνθάσης των αρωματικών φαινυλακεταλδεύδων από ένα γονίδιο που δέχεται ως υπόστρωμα μόνο την DOPA.

Επιλέχθηκε το τροποποιημένο γονίδιο της νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA από τον χοίρο (*SsDDC*) το οποίο δέχεται ως υπόστρωμα μόνο την DOPA δημιουργώντας ένα μονόδρομο μονοπάτι στην παραγωγή υδροξυτυροσόλης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το *SsDDC* μετά από την αλλαγή της τυροσίνης 332 σε φαινυλαλανίνη έχει την ιδιαιτερότητα να

πραγματοποιεί ταυτόχρονη απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση στην DOPA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δράση του SsDDC ως συνθάση των αρωματικών φαινυλακεταλδεΐδων (DHPAS) και την παραγωγή της αντίστοιχης αλδεΐδης πραγματοποιώντας δύο βήματα του μονοπατιού στην ίδια αντίδραση. Για να ελεγχθεί η ενεργότητα του *DHPAS* ως προς το υπόστρωμα και τελικά η παραγωγή της υδροξυτυροσόλης, σχεδιάστηκαν *in vitro* αντιδράσεις με υπόστρωμα την τυροσίνη αλλά και την DOPA. Στις *in vitro* αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* από διαφορετικές επαγωγικές συνθήκες (συγκέντρωσης επαγωγή IPTG).

Τα αποτελέσματα από τις *in vitro* αντιδράσεις δεν έδειξαν καμία ενεργότητα του κλωνοποιημένου γονιδίου DHPAS από τον χοίρο πάνω στην τυροσίνη και την DOPA στις συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος.

ABSTRACT

Plant secondary metabolites are organic compounds that they are not necessary for the plant growth, although, they play major role in the plants defense and environmental adaptation. They are responsible for the plants defense against biotic and abiotic factors and they are classified in three major groups, alkaloids, terpenes and the phenolic compounds. Many deferent compounds belonging in the latter group are interesting for the potential benefits in human health with hydroxytyrosol being one of them.

Hydroxytyrosol (3,4 Dihydroxyphenylethanol) is a secondary metabolite that is produced mainly in the leaves of the olive tree (*Olea europaea*) and also in the fruits in lower concentrations. It is known for its beneficial effects in human health with some of them being, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. Using metabolic engineering methods microorganisms, such as *Escherichia coli*, can be genetically modified to produce hydroxytyrosol.

Biosynthesis of hydroxytyrosol is achieved by modifying two genes. The tyrosinase gene taken from the bacterium *Ralstonia solanacearum* and the synthase of aromatic phenylacetaldehyde gene taken form parsley. The expression of those two genes in *E. coli* allows the production of hydroxytyrosol with the formation of a dual pathway starting from tyrosine, this is due to the fact that the aforementioned genes can bind to two different substrates. Tyrosinase can bind to tyrosine and tyrosol whereas synthase of aromatic phenylacetaldehyde binds to tyrosine and DOPA. This thesis attempts to optimize the biosynthetic pathway of hydroxytyrosol by replacing synthase of aromatic phenylacetaldehyde gene with a gene that binds only to DOPA.

The modified gene DOPA decarboxylase (*SsDDC*), taken from the pig kidney, was chosen which binds to DOPA alone thus generating a singular pathway for the production of hydroxytyrosol. According to the bibliography, after substituting tyrosine 332 to phenylalanine in the *SsDDC* the enzyme is capable of catalyzing decarboxylation and deamination reactions to DOPA at the same time. This means that the *SsDDC* acts as a synthase of aromatic phenylacetaldehyde (DHPAS) and leads to the production of the corresponding aldehyde thus performing two steps of the hydroxytyrosol pathway in the same reactions. For the examination

of DHPAS activity regarding substrate specificity and finally the production of hydroxytyrosol *in vitro* reaction were designed with dopa and tyrosine as substrates. Total protein extracts from *E. coli* bacterial cultures that were previously exposed to different inductive conditions (inducer concentrations, IPTG) were used for the *in vitro* reactions.

The results from the *in vitro* reactions showed no activity of the cloned pig DHPAS gene against tyrosine or DOPA at the given conditions that the experiment was conducted.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τίποτα στην ζωή δεν είναι για να το φοβόμαστε, αλλά για να το κατανοήσουμε.

Marie Curie

1.1 Φυτικοί Δευτερογενής Μεταβολίτες

Μεταβολισμός είναι το σύνολο των βιοχημικών αντιδράσεων που έχουν στόχο, είτε την παραγωγή ενώσεων είτε την διάσπαση/αποικοδόμησή τους. Ο πρωτογενής μεταβολισμός αναφέρεται στην σύνθεση απαραίτητων συστατικών για την επιβίωση και τον σχηματισμό του κυττάρου όπως λίπη, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κ.α. (Καράταγλης, 1994) ενώ ο δευτερογενής μεταβολισμός σε μια ομάδα οργανικών ενώσεων όπου δεν είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου έχουν όμως βασικό ρόλο στην άμυνα του φυτού καθώς και στην προσαρμογή του στο περιβάλλον (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Τα φυτά καθώς δεν μπορούν να μετακινηθούν για να αποφύγουν τους εχθρούς τους και δεν διαθέτουν ανοσοποιητικό σύστημα, παράγουν τα λεγόμενα δευτερογενή φυσικά προϊόντα ή δευτερογενείς μεταβολίτες (Wink, 2010b), οι οποίοι τους παρέχουν προστασία από φυτοφάγα ζώα, παθογόνα (έντομα, μύκητες κ.α.), ανταγωνιστικά φυτά και από αβιοτικούς παράγοντες (Moore *et al.*, 2014). Πρόκειται για περίπλοκα μίγματα ενώσεων χαμηλού

μοριακού βάρους (Wink, 2010b) που παράγονται σε εξειδικευμένα όργανα και ιστούς και αποθηκεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μέρη του φυτού που είναι σημαντικά για την επιβίωσή του (Wink, 2010a).

Για την βιοσύνθεσή τους χρησιμοποιούν μονοπάτια του πρωτογενούς μεταβολισμού και παράγωγα προϊόντα αυτών. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τα πρόδρομα βιομόρια και βιολογικά μονοπάτια απ' όπου προέρχονται. Έτσι προκύπτει η ομάδα των τερπενίων (τερπένια) με το ακετυλο-συνένζυμο Α ως πρόδρομο μόριο μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος, η ομάδα των αλκαλοειδών (συστατικά που περιέχουν άζωτο) όπου βιοσυντίθενται κυρίως από αμινοξέα και η ομάδα των φαινολικών ουσιών (φαινόλες) από το μονοπάτι του σικιμικού και μηλονικού οξέος. Στην κατηγορία των ανενεργών δευτερογενών μεταβολιτών εντάσσονται η κουτίνη, η σουβερίνη και οι κηροί όπου παρέχουν επιφανειακή προστασία και συμβάλουν στην άμυνα των φυτών (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003, Καράταγλης, 1994).

1.1.1 Ομάδα Τερπενίων

1.1.1.1 Μοριακή περιγραφή και ταξινόμηση Τερπενίων

Πρόκειται για την μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών τα μέλη τις οποίας είναι αδιάλυτα στο νερό. Ουσιαστικά είναι λιπίδια όπου ο βασικός σκελετός τους είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με πέντε άτομα άνθρακα. Το ισοπρένιο, το απλούστερο από τα τερπένια, είναι ένας υδρογονάνθρακας με πέντε άτομα άνθρακα (C_5H_8). Όλα τα τερπένια έχουν πάνω από μια μονάδα ισοπρενίου στο μόριό τους και έχουν τον γενικό χημικό τύπο $(C_5H_8)_n$.

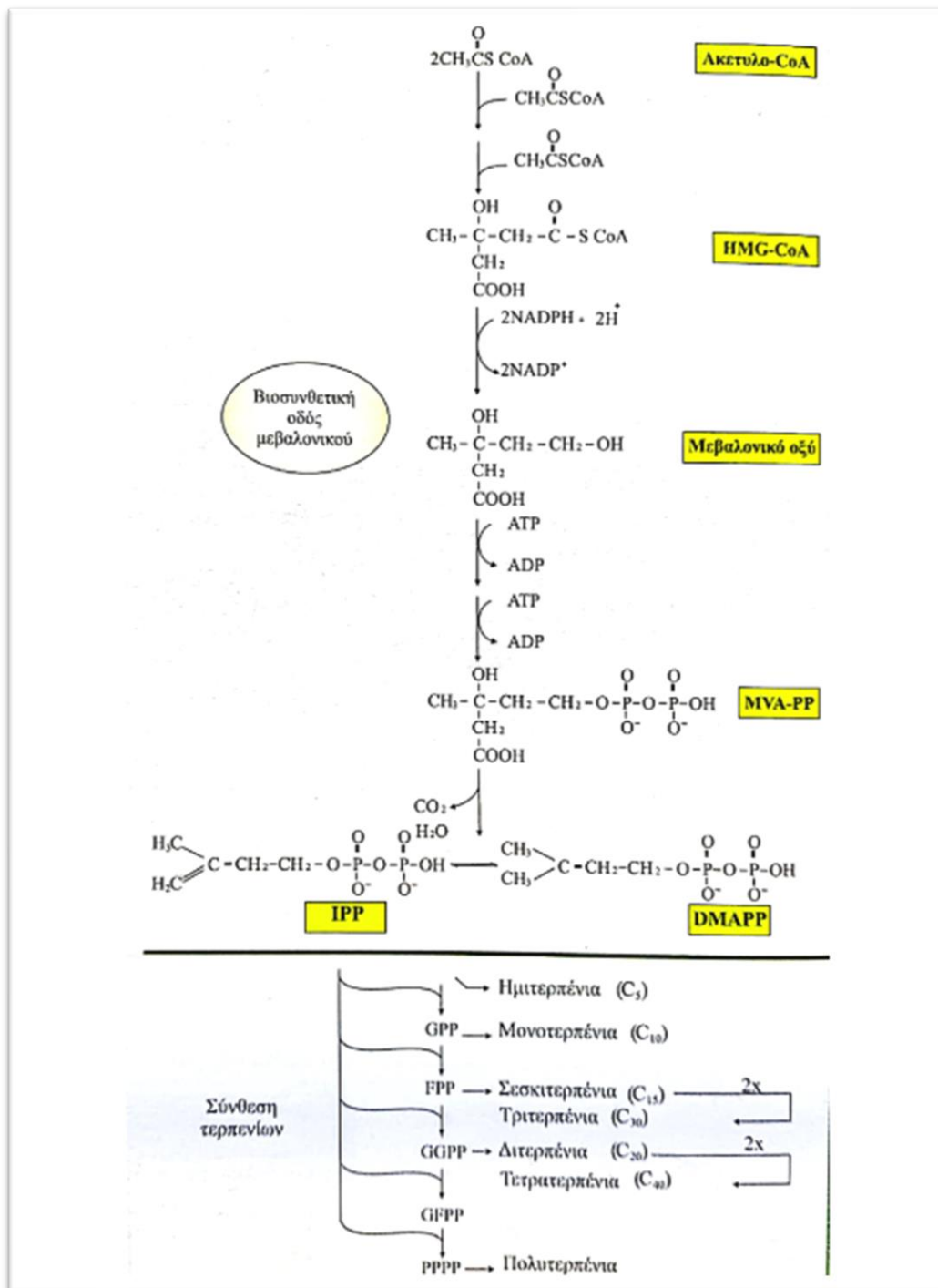
Την ταξινόμησή τους καθορίζει ο αριθμός των ισοπρενικών μονάδων (C5) που συναντώνται στο μόριό τους. Τερπένια με πέντε άτομα άνθρακα περιέχουν μια μονάδα ισοπρενίου στο μόριό τους και ονομάζονται ημιτερπένια (C5), αυτά με δέκα άτομα άνθρακα περιέχουν δυο μονάδες ισοπρενίου και ονομάζονται μονοτερπένια (C10), με τρεις μονάδες ισοπρενίου σεσκιτερπένια (C15), με τέσσερις διτερπένια (C20), με έξι τριτερπένια (C30), με οκτώ τετρατερπένια (C40) και με παραπάνω μονάδες ισοπρενίου ονομάζονται πολυτερπένια $[(C_5)_n]$. Όσον αφορά τον τρόπο ένωσης των ισοπρενικών μονάδων, όταν αυτές ενώνονται σε ανοικτές αλυσίδες τα μόρια ονομάζονται άκυκλα τερπενικά σώματα ενώ όταν σχηματίζουν

κλειστά συστήματα λέγονται κυκλικά τερπενικά σώματα (Ελευθερίου, 2007, Καράταγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

1.1.1.2 Βιοσύνθεση Τερπενίων

Η βιοσύνθεση των τερπενίων πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος με πρόδρομο μόριο το Ακέτυλο-CoA. Το μεβαλονικό οξύ αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν προς την δημιουργία των ενεργών δομικών συστατικών των τερπενίων. Μια σειρά αντιδράσεων που ξεκινάει απ' την σταδιακή συμπύκνωση τριών μορίων Ακέτυλο-CoA σχηματίζει το μεβαλονικό οξύ που έχει έξι άτομα άνθρακα (Εικόνα 1). Στην συνέχεια η ένωση αυτή μετά από διαδοχικές αντιδράσεις πυροφωσφορυλίωσης και αποκαρβοξυλίωσης αφυδατώνεται και σχηματίζει το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Το IPP μαζί με το ισομερές του το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) είναι τα πρόδρομα μόρια των υποομάδων των τερπενίων.

Τα δύο αυτά συστατικά (IPP και DMAPP) βρίσκονται σε ισορροπία εντός του κυττάρου και σχηματίζουν τις διάφορες υποομάδες των τερπενίων με άτομα άνθρακα πολλαπλάσια του πέντε. Πρόδρομος μορφή σχεδόν όλων των μονοτερπενίων με δέκα άτομα άνθρακα αποτελεί το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) το οποίο προκύπτει από αντίδραση του IPP και του DMAPP. Το πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP) με 15 άτομα άνθρακα, προερχόμενο από την ένωση του GPP με ένα άλλο μόριο IPP, είναι η πρόδρομος μορφή σχεδόν όλων των σεσκιτερπενίων και των τριτερπενίων. Με παρόμοιο τρόπο συνδυάζοντας τα βασικά δομικά συστατικά των τερπενίων IPP και DMAPP δημιουργούνται όλες οι πρόδρομες ενώσεις των υποομάδων των τερπενίων. Άλλες τέτοιες είναι το πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP) η πρόδρομος ένωση σχεδόν όλων των διτερπενίων και των τετρατερπενίων και το πυροφωσφορικό πολυπρενύλιο (PPPP) η πρόδρομος μορφή των πολυτερπενίων (Καράταγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).



Εικόνα 1: Βιοσύνθεση κυριότερων υποομάδων τερπενίων. Κυριότερα ενεργά δομικά συστατικά είναι το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) από τα οποία προκύπτουν οι υποομάδες των τερπενίων. GPP, πυροφωσφορικό γερανύλιο. HMG-CoA, υδροξυμεθυλο-γλουταρυλο-CoA. MVA-PP, πυροφωσφορικό μεβαλονικό οξύ. FPP, πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο. GGPP, πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο. GFPP, πυροφωσφορικό γερανυλφαρνεζύλιο. PPPP, πυροφωσφορικό πολυπρενύλιο (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

1.1.1.3 Βιολογικός Ρόλος και Ιδιότητες Τερπενίων

Η εξαιρετικά διαδεδομένη ομάδα των τερπενίων παρουσιάζει ιδιαίτερο οικολογικό, οικονομικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών και στην επιβίωση τους σε αντίξοες συνθήκες. Οι υποομάδες των τερπενίων παράγονται από διάφορες οικογένειες και είδη φυτών σε διάφορα φυτικά όργανα ή σε ολόκληρο το φυτό (Καράταγλης, 1994).

Τα μονοτερπένια είναι συνήθως πτητικές ενώσεις με ευχάριστη οσμή και αδιάλυτα στο νερό. Για παράδειγμα στα φύλλα και τα άνθη του χρυσανθέμου *Chrysanthemum coccineum* και του *Chrysanthemum marhshalii* παράγονται οι εστέρες των μονοτερπενίων, τα πυρεθροειδή, τα οποία προκαλούν παράλυση του νευρικού συστήματος των εντόμων, απώλεια των αισθήσεων καθώς και τον θάνατο τους. Το μικρό χρονικό διάστημα παραμονής τους στο περιβάλλον και η μηδαμινή τοξικότητα στα θηλαστικά καθιστούν τα πυρεθροειδή αποτελεσματικά και διαδεδομένα ως εντομοκτόνα. Από τα κωνοφόρα παράγονται οι ρητίνες όπου είναι μίγματα τερπενίων που συγκεντρώνονται στους ρητινοφόρους πόρους του κορμού, των κλαδιών και των βελονών των φύλλων. Έχουν ρόλο προστατευτικό καθώς παρουσιάζουν τοξικότητα σε διάφορα έντομα.

Τα λεγόμενα αρωματικά φυτά παράγουν διάφορες πτητικές ενώσεις της ομάδας των τερπενοειδών με χαρακτηριστική οσμή, που ονομάζονται αιθέρια έλαια. Παράγονται κατά ομάδες στα αδενικά κύτταρα ή στις αδενώδεις τρίχες σε όλα τα φυτικά όργανα, και σε κάποιες περιπτώσεις συναντώνται και σε ειδικούς αγωγούς των φύλλων και των βλαστών. Οι πιο γνωστές οικογένειες αρωματικών φυτών είναι η *Compositae*, η *Labiatae*, η *Myrtaceae*, η *Pinaceae*, η *Umbelliferae* και η *Rutaceae*. Στα αιθέρια έλαια του κάθε φυτού συναντάται μια κυρίαρχη ένωση στην οποία οφείλεται και η χαρακτηριστική οσμή του. Για τον δυόσμο και την μέντα, κυρίαρχη ουσία είναι η μενθόλη ενώ για την λεμονιά το λιμονένιο. Ο βιολογικός ρόλος των αιθερίων ελαίων φαίνεται να είναι προστατευτικός προς τα φυτοφάγα ζώα και έντομα, χαρακτηριστικό παράδειγμα τα λεμονοειδή που βρίσκονται στα αιθέρια έλαια της λεμονιάς που έχουν πικρή γεύση και απωθητική δράση. Για την εξαγωγή των αιθερίων ελαίων από τα φυτά απαιτείται απόσταξη και έχουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον στην χημεία τροφίμων ως καρυκεύματα και την αρωματοποιεία.

Οι σεσκιτεπενικές λακτόνες παίρνουν το όνομά τους από έναν δακτύλιο λακτόνης που περιέχουν στο μόριό τους. Είναι κυκλικοί εστέρες που συναντώνται στις αδενώδεις τρίχες των φυτών τις οικογένειες *Composite*. Είναι ισχυρά απωθητικά εντόμων και θηλαστικών λόγω τις

πικρής τους γεύσης. Τα στεροειδή ανήκουν στην κατηγορία των τριτερπενίων και αποτελούν αμυντικά δευτερογενή προϊόντα με γνωστότερο παράδειγμα τις φυτοεκδυσόνες. Οι φυτοεκδυσόνες λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζει το μόριό τους με τις ορμόνες ένδυσης των εντόμων διαταράσσουν την διαδικασία δημιουργίας του εξωσκελετού τους. Έτσι τα έντομα που θα τραφούν με φυτικούς ιστούς που περιέχουν φυτοεκδυσόνες παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ένδυση ή και πρόωρο θάνατο.

Οι καρδενολίδες ή καρδιακοί γλυκοζίτες είναι τριτερπένια που περιέχουν στο μόριό τους ένα μόριο σακχάρου (μανόζης ή γλυκόζης). Είναι αμυντικά δευτερογενή προϊόντα έναντι των φυτοφάγων ανώτερων σπονδυλωτών καθώς πέρα από την έντονα πικρή τους γεύση προκαλούν διαταραχές στην λειτουργία των αντλιών Na/K των καρδιακών μυών. Συναντώνται στα είδη των γενών *Digitalis*, *Strophanthus*, *Scylla* και στα φύλλα της πικροδάφνης (*Nerium oleander*) (Καράταγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Άλλη κατηγορία είναι οι σαπωνίνες που είναι τριτερπενικοί γλυκοζίτες στεροειδών. Παρουσιάζουν τοξικότητα στα ζώα αφού έχουν την ιδιότητα να αποδιοργανώνουν μεμβράνες και να προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στα φυτά λειτουργούν και ως ορμόνες φύλλου ή αύξεσης, χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αντισυλληπτικών ουσιών καθώς παρουσιάζουν ομοιότητες με τις στεροειδείς ορμόνες του ανθρώπου (Καράταγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

1.1.2 Ομάδα των Αζωτούχων ενώσεων (αλκαλοειδών)





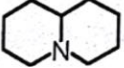
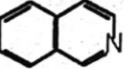
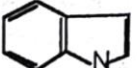
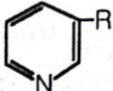
1.1.2.1 Μοριακή Περιγραφή και ταξινόμηση Αλκαλοειδών

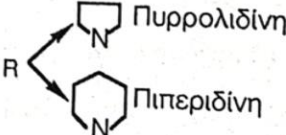
Τα αλκαλοειδή είναι πολύπλοκα μόρια παραγόμενα από τα φυτά που παρουσιάζουν, μεταξύ άλλων, ιδιαίτερες φαρμακολογικές ιδιότητες. Περιέχουν τουλάχιστον ένα άτομο αζώτου σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο και, όπως δηλώνει και το όνομά τους, είναι αλκαλικής φύσεως. Οι δακτύλιοι αυτοί είναι διαφόρων τύπων, πυρρολιδινικός, τροπανικός, πιπεριδινικός, πυρρολιζιδινικός, κινολιζιδινικός, ισοκινολινικός, ινδολικός ή πυριδινικός δακτύλιος είναι μερικοί από αυτούς. Προέρχονται στην πλειονότητά τους από τα αμινοξέα ασπαρτικό οξύ, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ορνιθίνη και λυσίνη (Εικόνα 2).

Συχνά, στην ονοματολογία τους αποδίδονται εμπειρικές ονομασίες από την πηγή προέλευσής τους με την κατάληξη -ίνη, χαρακτηρίζονται δηλαδή ως αμίνες, πχ η ατροπίνη από το φυτό *Atropa belladonna*. Η ποικιλομορφία της χημικής δομής των αλκαλοειδών και ο μεγάλος αριθμός ενώσεων διαφορετικής βιοσυνθετικής προέλευσής προσδίδει ιδιαίτερη δυσκολία στην ταξινόμησή τους. Αυτό οδήγησε στην δημιουργία διαφόρων συστημάτων ομαδοποίησης των αλκαλοειδών (Πίνακας 2) με ορισμένα από αυτά να είναι ανάλογα με την πρόδρομη ένωση τους, την χημική τους δομή, τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες, την οικογένεια ή το φυτικό είδος απ' το οποίο προέρχονται (Καράταγλης, 1994, Ashutosh, 2007).

Στην βιοσυνθετική ομαδοποίηση η κατάταξη των αλκαλοειδών βασίζεται αποκλειστικά στην ένωση απ' την οποία προέρχονται χωρίς να λαμβάνονται υπόψη η χημική τους δομή, οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες ή η φυτική οικογένεια στην οποία βιοσυντίθενται (Ashutosh, 2007). Έτσι όλα τα αλκαλοειδή που έχουν ως αρχικό μόριο το αμινοξύ τρυπτοφάνη ονομάζονται αλκαλοειδή της τρυπτοφάνης, αυτά που προέρχονται από το αμινοξύ τυροσίνη ονομάζονται αλκαλοειδή της τυροσίνης και ούτω καθεξής. Η χημική ομαδοποίηση των αλκαλοειδών εστιάζει στην χημική δομή τους. Το όνομα της κάθε ομάδας αλκαλοειδούς το καθορίζει ο τύπος του βασικού δακτυλίου που εμπεριέχεται στο μόριο της κάθε ένωσης. Τα αλκαλοειδή που περιέχουν δακτύλιο πυρρολιδίνης ονομάζονται πυρρολιδινικά αλκαλοειδή, αυτά που περιέχουν τροπανικό δακτύλιο λέγονται αλκαλοειδή του τροπανίου. Με αντίστοιχο τρόπο ονομάζονται οι υπόλοιπες ομάδες αυτού του τύπου ταξινόμησης για τους υπόλοιπους τύπους δακτυλίων (Εικόνα 2, Πίνακας 2).

Καθώς τα αλκαλοειδή μπορούν να έχουν συγκεκριμένες φαρμακολογικές ιδιότητες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση της ιδιότητες αυτές, να αποκτήσουν δηλαδή φαρμακολογική ομαδοποίηση. Τα αλκαλοειδή της ομάδας αυτής διαχωρίζονται σε ναρκωτικά αναλγητικά με παυσίπονη και ναρκωτική δράση, ανθελονοσιακά που δρουν κατά της ελονοσίας κ.α. Η ταξινομική ομαδοποίηση των αλκαλοειδών περιλαμβάνει όλα τα αλκαλοειδή που παράγονται από την ίδια φυτική οικογένεια ανεξάρτητα με τις χημικές ή τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες και την βιοσυνθετική τους προέλευση. Χαρακτηριστικές ομάδες αυτού του συστήματος ταξινόμησης είναι τα αλκαλοειδή των Σολανοδών (Solanaceous) για τα αλκαλοειδή που παράγονται από τα φυτά της οικογένειας Σολανοδών, τα αλκαλοειδή των Καναβινοειδών (Cannabinaceous) για τα αλκαλοειδή των φυτών της οικογένειας των Καναβινοειδών, αλλά υπάρχουν και αλκαλοειδή παραγόμενα από φυτά άλλων οικογενειών (Πίνακας 2, Ashutosh, 2007).

Κλάση αλκαλοειδούς	Δομή	Πρόδρομος ένωση	Παραδείγματα
Πυρρολιδίνη		Ασπαρτικό οξύ	Νικοτίνη
Τροπάνιο		Ορνιθίνη	Ατροπίνη Κοκαΐνη
Πιπεριδίνη		Λυσίνη	Κωνίνη
Πυρρολιζιδίνη		Ορνιθίνη	Ρετροσίνη
Κινολιζιδίνη		Λυσίνη	Λουπινίνη
Ισοκινολίνη		Τυροσίνη	Μορφίνη Κωδεΐνη
Ινδόλιο		Θρυπτοφάνη	Ρεσερπίνη Στρυχνίνη
Πυριδίνη		Νικοτινικό οξύ Ορνιθίνη Λυσίνη	Νικοτίνη Αναβασίνη



Εικόνα 2: Παραδείγματα αλκαλοειδών με τα αμινοξέα απ' τα οποία βιοσυντίθενται καθώς και οι δομές με τις ονομασίες των δακτυλίων που περιέχουν (Καράταγλης, 1994).

Πίνακας 2: Διάφοροι τρόποι ταξινόμησης αλκαλοειδών και παραδείγματα (Ashutosh, 2007).

Τύπος Ομαδοποίησης	Ομάδες Αλκαλοειδών	Παραδείγματα/Πρόδρομος ένωση
Βιοσυνθετική Ομαδοποίηση	Αλκαλοειδή της τρυπτοφάνης	Τρυπτοφάνη
	Αλκαλοειδή της Λυσίνης	Λυσίνη
	Αλκαλοειδή της Ορνιθίνης	Ορνιθίνη
	Αλκαλοειδή της Τυροσίνης	Τυροσίνη
	Αλκαλοειδή της Ιστιδίνης	Ιστιδίνη
Χημική ομαδοποίηση	Πυρρολιδινικά Αλκαλοειδή	Υγρίνη
	Πιπεριδινικά Αλκαλοειδή	Λοβελίνη
	Πυρρολιζιδινικά Αλκαλοειδή	Σενεκιονίνη
	Αλκαλοειδή του Τροπανίου	Ατροπίνη
	Κινολινικά Αλκαλοειδή	Κινίνη
	Ισοκινολινικά Αλκαλοειδή	Μορφίνη
	Ινδολικά Αλκαλοειδή	Εργομετρίνη
	Ιμιδαζολικά Αλκαλοειδή	Πίλοκαρπίνη
Πουρινικά Αλκαλοειδή	Καφεΐνη	

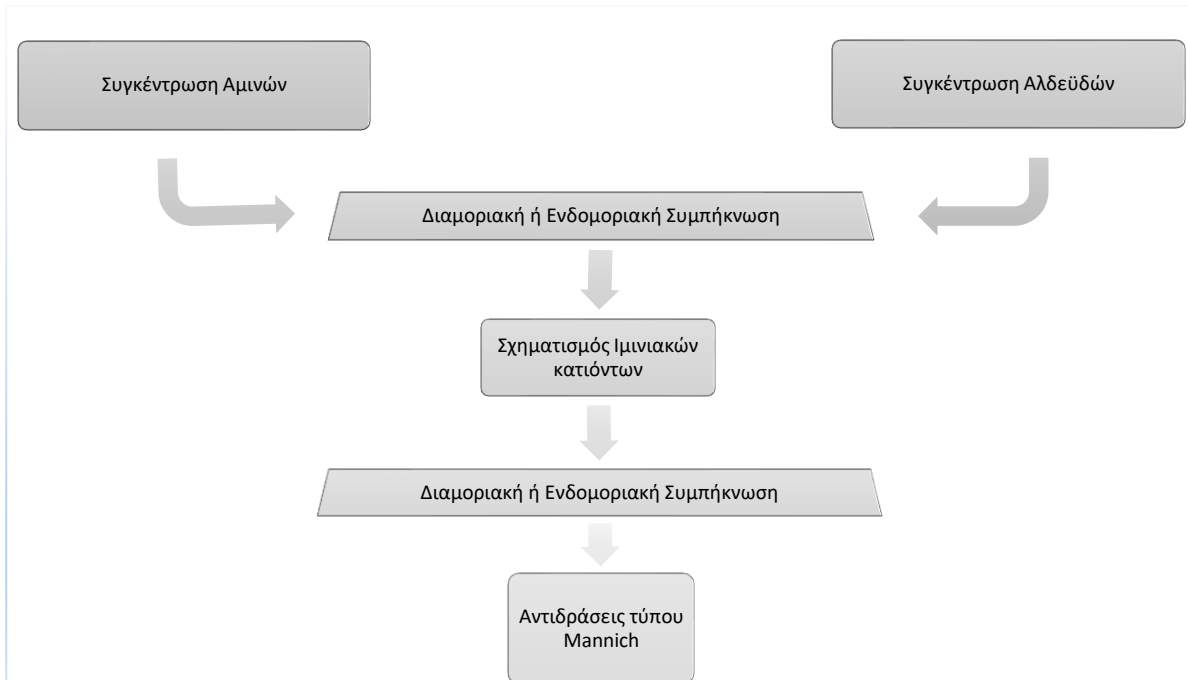
Τύπος Ομαδοποίησης	Ομάδες Αλκαλοειδών	Παραδείγματα/Πρόδρομος ένωση
	Στεροειδικά Αλκαλοειδή	Σολανίνη
Φαρμακολογική Ομαδοποίηση	Ναρκωτικά αναλγητικά	Μορφίνη
	Ανθελονοσιακά	Κινίνη
	Διεγερτικά Αντανακλαστικών	Στρυχνίνη
	Διεγερτικά του Αναπνευστικού	Λοβελίνη
	Θεραπευτικά Νευραλγιών	Ακονιτίνη
	Αντιγλαυκωματικά, Μυωτικά	Πίλοκαρπίνη
Ταξινομική Ομαδοποίηση	Αλκαλοειδή Cannabinaceous	<i>Cannabis sativa</i>
	Αλκαλοειδή Rubiaceous	<i>Pausinystalia johimbe</i>
	Αλκαλοειδή Solanaceous	<i>Capsicum annum</i>

1.1.2.2 Βιοσύνθεση Αλκαλοειδών

Όπως και στα μόρια των αλκαλοειδών έτσι και η βιοσύνθεσή τους χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία καθώς σπάνια ακολουθούν παρόμοιες βιοσυνθετικές οδούς. Με τα περισσότερα αλκαλοειδή να παράγονται από τα αμινοξέα ορνιθίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη, λυσίνη και ασπαρτικό οξύ δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες ομοιότητες στα βιολογικά τους μονοπάτια (Καράταγλης, 1994).

Παρόλη την ποικιλομορφία και την διασπορά των αλκαλοειδών στο φυτικό βασίλειο η βιοσύνθεση τους παρουσιάζει κάποια σταθερά μοτίβα από αμίνες ως πρόδρομα μόρια καθώς και από αλδεϋδες. Με διαμοριακή ή ενδομοριακή συμπύκνωση οδηγούνται στον σχηματισμό ιμινιακών κατιόντων (iminium cation) όπου στην συνέχεια με αντιδράσεις τύπου Mannich (Mannich-like reactions) προκύπτει ο βασικός μοριακός σκελετός της ένωσης (Εικόνα 3, Lichman, 2021).

Οι αμίνες που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των αλκαλοειδών προέρχονται από αμινοξέα και χωρίζονται σε δύο ομάδες, τις πολυαμίνες (polyamines) που προκύπτουν από τα αμινοξέα ορνιθίνη, αργινίνη και λυσίνη και τις αρωματικές αμίνες που προκύπτουν από τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Αλλαγές στον μεταβολισμό προκαλούμενες από διάφορα γονίδια οδηγούν σε αυξημένη συγκέντρωση αμινών. Το πλεόνασμα αυτό των αμινών χρησιμοποιείται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια των αλκαλοειδών αφήνοντας ανεπηρέαστα τα μονοπάτια του πρωτογενούς μεταβολισμού.



Εικόνα 3:Μοτίβα στα αρχικά βήματα της βιοσύνθεσης των αλκαλοειδών.

Για τον σχηματισμό ιμινιακών κατιόντων (γνωστά και ως Schiff bases) προηγείται συμπύκνωση αμινών και αλδευδών, χωρίς την χρήση κάποιου ενζύμου. Στην συνέχεια με αντιδράσεις τύπου Mannich τα ιμινιακά κατιόντα αντιδρούν μη ενζυματικά με άλλες ενώσεις δημιουργώντας δεσμούς άνθρακα-άνθρακα σχηματίζοντας τον βασικό σκελετό του αλκαλοειδούς (Lichman, 2021).

1.1.2.3 Βιολογικός Ρόλος και Ιδιότητες Αλκαλοειδών

Τα αλκαλοειδή είναι μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με τουλάχιστον 50.000 μέλη, παράγονται στην πλειοψηφία τους από ποώδη δικότυλα φυτά. Αποτελούν αμυντικό μηχανισμό για τα φυτά που τα παράγουν καθώς παρουσιάζουν τοξικότητα προς τα φυτοφάγα ζώα και τον άνθρωπο. Μερικές από αυτές τις ενώσεις έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα άλλες την σύνθεση πρωτεϊνών ή την ενζυμική δραστηριότητα και άλλες την περατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Παρουσιάζουν επίσης φαρμακευτικές, ιατρικές καθώς και διεγερτικές ή καταπραϋντικές ιδιότητες στον άνθρωπο (Πίνακας 3) και γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται στην φαρμακοβιομηχανία και στην παραγωγή ροφημάτων (Ελευθερίου, 2007, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

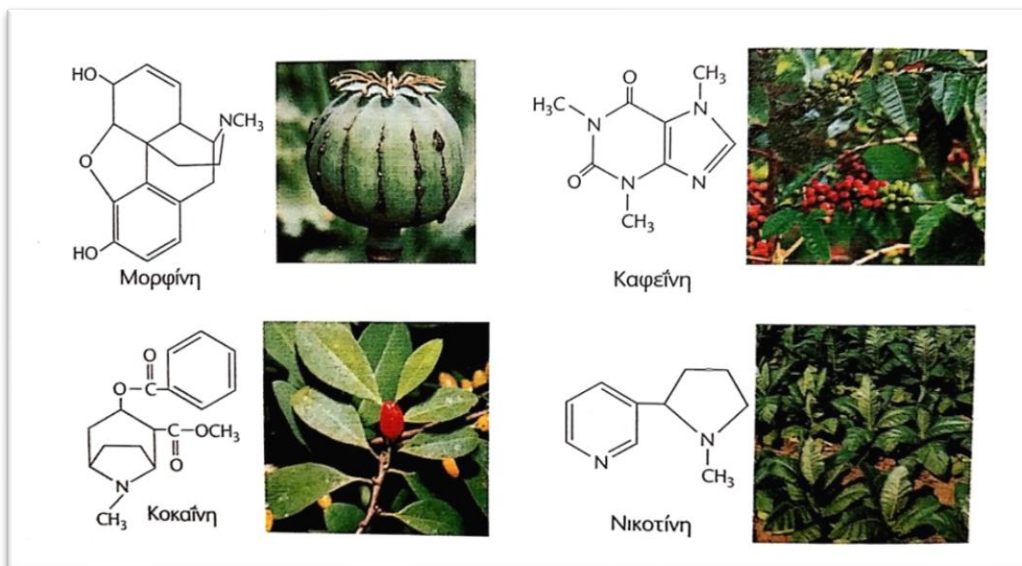
Πίνακας 3: Αλκαλοειδή που χρησιμοποιούνται στην σύγχρονη ιατρική και τα φυτά προέλευσής τους (Ελευθερίου, 2007).

Αλκαλοειδές	Φυτό από το οποίο προέρχεται	Χρήσεις
Ατροπίνη	<i>Hyoscyamus niger</i>	Οφθαλμολογία για διαστολή της κόρης, ανακούφιση κωλικών, αντίδοτο σε δηλητηριάσεις
Βινμπλαστίνη	<i>Catharanthus roseus</i>	Αντινεοπλασμικό, χρησιμοποιείται για την θεραπεία της ασθένειας Hodgkin's και άλλων λεμφωμάτων
Εμετίνη	<i>Uragoga ipecacuanha</i>	Ενεργό εμετικό στοματικά χορηγούμενο, αμοιβαδοκτόνο
Καφεΐνη	<i>Coffea arabica</i>	Διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος
Κινίνη	<i>Cinchona officinalis</i>	Παραδοσιακό αντιμαλαριακό
Κοκαΐνη	<i>Erythroxylon coca</i>	Τοπικό αναισθητικό, διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος, εθιστικό ναρκωτικό
Κωδεΐνη	<i>Papaver somniferum</i>	Αναλγητικό και αντιβηχικό
Κωνεΐνη	<i>Conium maculatum</i>	Εξαιρετικά τοξικό, προκαλεί παράλυση του νευρικού, χρησιμοποιείται στην ομοιοπαθητική σε μικρές δόσεις
Μορφίνη	<i>Papaver somniferum</i>	Ισχυρό αναλγητικό, υπνωτικό, καταπραΰντικό του βήχα, εθιστικό ναρκωτικό
Νικοτίνη	<i>Nicotiana tabacum</i>	Εξαιρετικά τοξικό, προκαλεί παράλυση του αναπνευστικού, εντομοκτόνο, εθιστικό ναρκωτικό
Σκοπολαμίνη	<i>Hyoscyamus niger</i>	Ισχυρό ναρκωτικό, καταπραΰντικό κινητικών ασθενειών
Στροχνίνη	<i>Stychnos nux-vomica</i>	Ισχυρό αντιτετανικό, δηλητήριο ποντικών, χρησιμοποιείται στην ομοιοπαθητική

Το πρώτο αλκαλοειδές που απομονώθηκε για τις αναλγητικές του, μεταξύ άλλων, ιδιότητες ήταν η μορφίνη (Εικόνα 4) και το παράγωγό της η ηρωΐνη. Η μορφίνη βρίσκεται στον γαλακτώδη χυμό της υπνοφόρου παπαρούνας (*Papaver somniferum*) ο οποίος εμφανίζεται μετά από τραυματισμό του φυτού. Μετά από επεξεργασία αυτού του γαλακτώδη χυμού παράγεται το όπιο όπου σε αυτό περιέχονται και άλλα αλκαλοειδή όπως η παπαβερΐνη, η θηβαΐνη και η κωδεΐνη. Άλλο γνωστό αλκαλοειδές είναι η κοκαΐνη (Εικόνα 4) που βρίσκεται στα φύλλα του φυτού της κόκα (*Erythroxylon coca*) και χρησιμοποιείται κυρίως στην ιατρική.

Ροφήματα όπως ο καφές, το τσάι και το κακάο καταναλώνονται κυρίως για τις διεγερτικές ιδιότητές τους που οφείλονται στην καφεΐνη (Εικόνα 4). Το αλκαλοειδές αυτό συναντάται στο καφεόδεντρο (*Coffea arabica*) αλλά και στο κακάο (*Theobroma cacao*) και το τσάι (*Camellia sinensis*). Η συμβολή του στην άμυνα των φυτών γίνεται μέσω της αλληλοπάθειας καθώς παρεμποδίζει την βλάστηση σπερμάτων ανταγωνιστικών φυτών. Άλλη δημοφιλής ένωση είναι η νικοτίνη (Εικόνα 4), βρίσκεται στο φυτό του καπνού (*Nicotiana*

tabacum) και λόγω της υψηλής τοξικότητάς της αποτελεί αποτελεσματικό εντομοκτόνο. Συναντάται στα χυμοτόπια των φύλλων αλλά η παραγωγή της πραγματοποιείται στην ρίζα (Ελευθερίου, 2007, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).



Εικόνα 4: Τα αλκαλοειδή Μορφίνη, Καφεΐνη, Κοκαΐνη και νικοτίνη με τις μοριακές τους δομές και φυτά προέλευσής τους (Ελευθερίου, 2007)

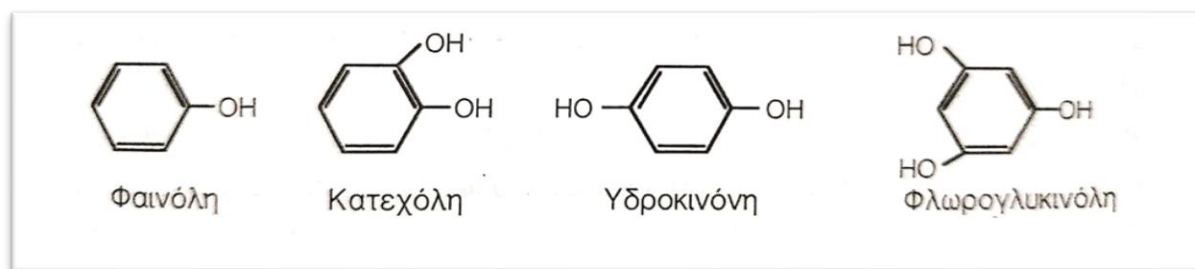
1.1.3 Ομάδα των Φαινολικών ενώσεων

1.1.3.1 Μοριακή Περιγραφή και Ταξινόμηση Φαινολών

Οι φαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός, τουλάχιστον, ανθρακικού δακτυλίου με έξι άτομα άνθρακα συνδεδεμένα μεταξύ τους με εναλλασσόμενους διπλούς δεσμούς, ο λεγόμενος αρωματικός δακτύλιος. Αυτός φέρει μία τουλάχιστον ομάδα υδροξυλίου που μπορεί να ενώνεται είτε με άλλους αρωματικούς δακτυλίους, είτε με καρβοξυλικές και μεθοξυλικές ομάδες, είτε με ετεροκυκλικούς δακτυλίους δίνοντας έτσι μια μεγάλη ποικιλομορφία στις φαινολικές ενώσεις των φυτών.

Με βάση τον βασικό ανθρακικό σκελετό των φαινολικών ενώσεων αυτές ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες. Αυτός ο ανθρακικός σκελετός μπορεί να περιέχει είτε την ομάδα του φαινυλοπροπανίου όπου αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο

συνδεδεμένο με τρία άτομα άνθρακα (C_6-C_3 , Πίνακας 4), είτε την υδροξυβενζοϊκή ομάδα με ένα άτομο άνθρακα συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο (C_6-C_1 , Πίνακας 4), ενώ στην περίπτωση των ακετοφαινολών ο αρωματικός δακτύλιος είναι συνδεδεμένος με δύο άτομα άνθρακα (C_6-C_2 , Πίνακας 4). Οι γνωστότερες και απλούστερες φυτικές φαινολικές ενώσεις στις οποίες ο αρωματικός δακτύλιος δεν είναι συνδεδεμένος με άλλα άτομα άνθρακα είναι η φλωρογλυκινόλη, η υδροκινόνη, η κατεχόλη και η φαινόλη (Εικόνα 5, Καράταγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).



Εικόνα 5: Χημική δομή των φαινολικών ενώσεων φαινόλη, κατεχόλη, υδροκινόνη και φλωρογλυκινόλη (Καράταγλης, 1994).

Οι κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην δομή του βασικού ανθρακικού σκελετού του μορίου τους. Η απλούστερη από αυτές είναι η κατηγορία των απλών φαινολών, αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο όπου φέρει ένα ή παραπάνω υδροξύλια. Άλλες κατηγορίες διαχωρίζονται ανάλογα με τις πρόδρομες ενώσεις τους, από τις οποίες προκύπτει και η δομή του μορίου τους, όπως τα παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος, του οξικού φαινυλίου, του υδροξυκιναμικού φαινυλοπροπανίου (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Υποομάδες των φαινολικών ενώσεων με την γενική δομή τους και χαρακτηριστικές ενώσεις. C_6 : αρωματικός δακτύλιος, C_{1-4} : ανθρακικές δομές οι οποίες συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Αριθμός ατόμων άνθρακα	Τύπος βασικού ανθρακικού σκελετού	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικές ενώσεις
6	C_6	Απλές φαινόλες	Κατεχόλη
7	$C_6 - C_1$	Παράγωγα Υδροξυβενζοϊκού	4-Υδροξυβενζοϊκό
8	$C_6 - C_2$	Ακετοφαινόλες, Παράγωγα Οξικού Φαινυλίου	4-Υδροξακετοφαινόνη, 4-Υδροξακετοφαινυλοξικό
9	$C_6 - C_3$	Παράγωγα Υδροξυκιναμικού Φαινυλοπροπανίου, Κουμαρίνες	Καφεϊκό, Ευγενόλη, Εσκουλετίνη

Αριθμός ατόμων άνθρακα	Τύπος βασικού ανθρακικού σκελετού	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικές ενώσεις
10	$C_6 - C_4$	Ναφθοκινόνες	Γιουγκλόνη
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Ξανθόνες	Ματζιφερίνη
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Στιλβένια, Ανθοκινόνες	Εμοντίνη, Ρεσβερατρόλη
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Φλαβονοειδή	Κερκετίνη
18	$(C_6 - C_3)_2$	Λιγνάνες	Πινορεσινόλη
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Διφλαβονοειδή	Αμεντοφλαβόνη

Σε πιο σύνθετες κατηγορίες φαινολών η ανθρακική δομή συνδέεται με δύο αρωματικούς δακτυλίους όπως οι ξανθόνες, τα στιλβένια, τα φλαβονοειδή. Μετά από αντιδράσεις συμπύκνωσης παρατηρούνται πολυπλοκότερες δομές στον βασικό σκελετό των μορίων των φαινολών όπως φαίνεται στις λιγνάνες και τα διφλαβονοειδή (Πίνακας 4). Με τον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων προκύπτουν κατηγορίες με πολυπλοκότερα μόρια συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες (Πίνακας 5, Καρατάγλης, 1994, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Πίνακας 5: Πολυμερή των Φαινολικών ενώσεων. C_6 : αρωματικός δακτύλιος, C_1 και C_3 : ανθρακικές δομές οι οποίες συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο, Glc : γλυκόζη (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

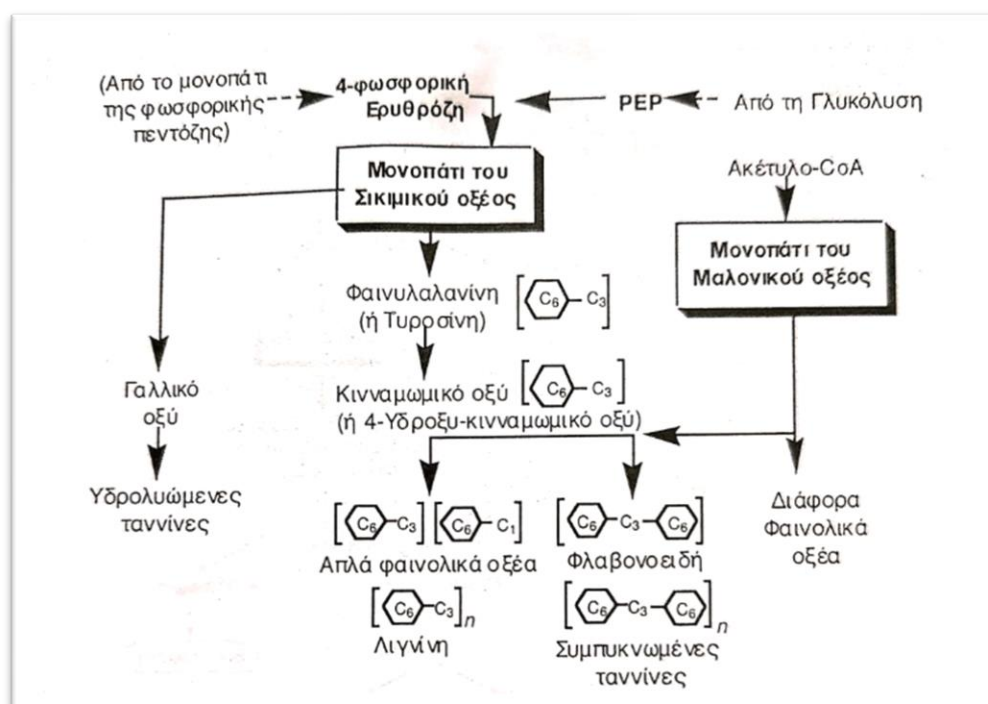
Αριθμός ατόμων άνθρακα	Τύπος βασικού ανθρακικού σκελετού	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικές ενώσεις
n	$(C_6)_n$	Μελανίνες της Κατεχόλης	Πολυμερή του Ναφθαλινίου
	$(C_6 - C_1)_n : Glc$	Υδρολύομενες Ταννίνες	Γαλλοταννίνες
	$(C_6 - C_3)_n$	Λιγνίνες	Πολυμερή της Γουαϊακόλης και της Συρινγκόλης
	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Συμπυκνωμένες Ταννίνες	Πολυμερή της Κατεχίνης

1.1.3.2 Βιοσύνθεση Φαινολών

Για την βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων συμμετέχουν δύο βιολογικά μονοπάτια, το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και του μηλονικού οξέος. Απ' το μονοπάτι του σικιμικού οξέος παράγονται τα αρωματικά αμινοξέα τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη που αποτελούν, μεταξύ άλλων, πρόδρομα μόρια για την παραγωγή των περισσότερων φαινολικών ενώσεων. Συνεπώς οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος προμηθεύονται τον αρωματικό τους δακτύλιο με αυτόν τον τρόπο.

Για την έναρξη του μονοπατιού του σικιμικού οξέος και του μηλονικού οξέος χρησιμοποιούνται προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Το Ακέτυλο CoA για το μονοπάτι

του μηλονικού οξέος και κάποιοι απλοί υδατάνθρακες, η φωσφοενολική μορφή του πυροσταφυλικού οξέος (PEP, Εικόνα 6) από την γλυκόλυση και η 4-φωσφορική ερυθρόζη από το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (Εικόνα 6) για το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Με την συνένωση της PEP και της 4-φωσφορικής ερυθρόζης ξεκινάει το μονοπάτι του σικιμικού οξέος στο οποίο μετά από διαδοχικές βιοχημικές αντιδράσεις παράγονται φαινυλαλανίνη και κινναμωμικό οξύ που οδηγούν στην παραγωγή απλών φαινολικών οξέων και λιγνίνης καθώς και γαλλικό οξύ απ' το οποίο προκύπτουν οι υδρολυώμενες ταννίνες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων από τα μονοπάτια του Σικιμικού οξέος και του Μηλονικού οξέος (Καράταγλης, 1994)

Το μονοπάτι του μηλονικού οξέος οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων φαινολικών οξέων και σε συνδυασμό με το κινναμωμικό οξύ από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος, στην παραγωγή φλαβονοειδών και συμπυκνωμένων ταννινών (Εικόνα 6, Καράταγλης, 1994). Στην βιοσύνθεση των φλαβονοειδών συμμετέχουν το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και του μηλονικού οξέος. Προμηθεύονται τον έναν αρωματικό δακτύλιο με την γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα, φαινυλοπορπανική ομάδα, από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και τον δεύτερο αρωματικό δακτύλιο με τα έξη άτομα άνθρακα από το μονοπάτι του μηλονικού οξέος (Καράταγλης, 1994).

1.1.3.3 Βιολογικός Ρόλος και Ιδιότητες Φαινολών

Η ομάδα των φαινολών είναι η πιο διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο. Φαινολικές ενώσεις παράγονται σχεδόν από όλα τα φυτά και συναντώνται σε διάφορα φυτικά όργανα (φύλλα, άνθη, ρίζα, βλαστούς κ.α.). Είναι και αυτή μια ομάδα που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και οι ιδιότητές τους έχουν να κάνουν, με την προστασία και την άμυνα των φυτών, την προσέλκυση ωφέλιμων εντόμων και ζώων (Ελευθερίου, 2007, Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα άνθη και στους καρπούς των φυτών συναντώνται διάφορες χρωστικές που ανήκουν στα φλαβονοειδή. Τέτοιες χρωστικές προσελκύνουν επικονιαστές για την επίτευξη της σταυρογονμοποίησης και φυτοφάγα ζώα που θα τραφούν με τους καρπούς και θα διασπείρουν τα σπέρματα σε άλλες περιοχές. Άλλα φλαβονοειδή που βρίσκονται στα επιδερμικά κύτταρα των φύλλων απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία προστατεύοντας το φυτό απ' την επιβλαβή επίδραση της UV-B. Στα κυτταρικά τοιχώματα μια από τις φαινολικές ενώσεις που συναντάται είναι η λιγνίνη η οποία συμμετέχει στον σχηματισμό των σκληρογλυματικών και ξυλοπαρεγλυματικών κυττάρων και διασφαλίζει την σταθερότητα των ξυλοποιημένων οργάνων του φυτού. Ο προστατευτικός της ρόλος έχει να κάνει με το γεγονός ότι είναι άπεπτη από τα φυτοφάγα ζώα ενώ με την ξυλοποίηση επιτυγχάνεται μηχανική παρεμπόδιση και αδυναμία προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Οι ταννίνες είναι φαινολικές ενώσεις γενικά τοξικές και με στυφή γεύση που παράγονται σε διάφορα φυτικά μέρη και σε διάφορες μορφές. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις βρίσκονται στα φύλλα και στους άγουρους καρπούς. Ο ρόλος των ταννινών είναι προστατευτικός απέναντι στα φυτοφάγα ζώα και στους παθογόνους μικροοργανισμούς, λόγω της γεύσης και της τοξικότητας που διαθέτουν. Οι ταννίνες έχουν μεγάλη χρήση στην βυρσοδεψία καθώς έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με πρωτεΐνες και να αντιδρούν με το κολλαγόνο στα κύτταρα των ζώων και με αυτόν τον τρόπο το δέρμα δεν αποσυντίθεται (Ελευθερίου, 2007).

1.2 Δευτερογενής Μεταβολίτες της Ελιάς

Από τα προϊστορικά χρόνια ήταν γνωστές οι ευεργετικές ιδιότητες της ελιάς (*Olea europaea* L.), συγκεκριμένα του ελαιόλαδου, των καρπών της ελιάς αλλά και των φύλλων. Σήμερα είναι γνωστό ότι οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στους περιεχόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών που βρίσκονται στην ελιά είναι στερόλες, τοκοφερόλες,

φλαβονοειδή, τριτερπενικά και φαινολικά συστατικά. Οι ιδιότητες των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών αφορούν, μεταξύ άλλων, αντιφλεγμονώδη δράση, προστασία από καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο και διαβήτη (Olmo-García *et al.*, 2018).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στην ελιά συναντώνται στα φύλλα, τους βλαστούς, τα σπέρματα, τον φλοιό και την σάρκα των καρπών καθώς και στο ελαιόλαδο με διαφορετικές χημικές οικογένειες σε διάφορες αναλογίες. Στα παραπάνω φυτικά όργανα και ιστούς έχουν βρεθεί οργανικά οξέα όπως το κινικό οξύ και φαινολικά οξέα, αλδεΐδες όπως κινναμικά οξέα, βενζοϊκά οξέα, βανιλίνη, ευδεσμικό οξύ και βερμπασκοσίδη. Οι κουμαρίνες εσκουλετίνη και εσκολίνη καθώς και ενώσεις φλαβονοειδών που ανήκουν στις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες, τις φλαβονόλες και άλλες. Τριτερπενικές ενώσεις όπως τριτερπενικά οξέα και τριτερπενικές αλκοόλες, τοκοφερόλες (και στις τέσσερις του μορφές α -, β -, γ -, δ -), στερόλες όπως η στιγμοστερόλη, η καμπεστερόλη και η β -σιτοστερόλη. Σεκοϊριδοειδή όπως η ελευροπαΐνη και απλές φαινόλες με τα παράγωγά τους όπως υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη (Πίνακας 6, Olmo-García *et al.*, 2018).

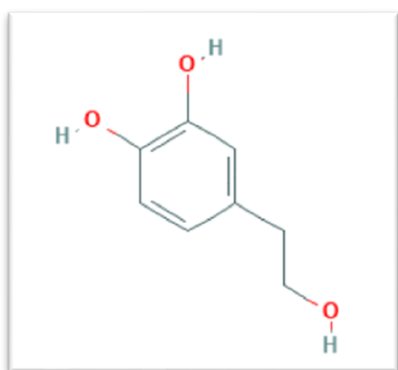
Πίνακας 6: Οι ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών που βρίσκονται στην ελιά (*Olea europaea L.*) με παραδείγματα και την κατηγορία ενώσεων που ανήκει το καθένα από αυτά (Olmo-García *et al.*, 2018).

Χημική Οικογένεια	Κατηγορία ενώσεων	Παραδείγματα
Οργανικά οξέα	-	Κινικό οξύ
Φαινολικά οξέα και αλδεΐδες	Κινναμικά οξέα	Καφεϊκό, π -Κουμαρικό, Φαιρουλικό, Σιναπικό και t -Κινναμικό οξύ
	Βενζοϊκά οξέα	Γαλλικό, Πρωτοκατεχικό, Γεντισικό οξύ κ.α.
	-	Βανιλίνη
	-	Ευδεσμικό οξύ
Κουμαρίνες	-	Βερμπασκοσίδη
	-	Εσκουλετίνη, Σκολίνη
	-	Ναριγκενίνη
Φλαβονοειδή	Φλαβανόνες	Ναριγκενίνη
	Φλαβανόλες	γαλακτοκίνη
	φλαβονόλες	Κερκετίνη
Τριτερπένια	Τριτερπενικά οξέα	Μασλινικό, Βετουλινικό, Ολαινολικό οξύ
	Τριτερπενικές αλκοόλες	Ερυθροδιόλη, Uvaol
Τοκοφερόλες	Όλες οι μορφές της	α -, β -, γ -, δ -
Στερόλες	-	Στιγμοστερόλη, καμπεστερόλη, β -σιτοστερόλη
Σεκοϊριδοειδή	-	Ελευροπαΐνη

Χημική Οικογένεια	Κατηγορία ενώσεων	Παραδείγματα
Απλές Φαινόλες	-	Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη

1.3 Η Περίπτωση της Υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη (3,4 Dihydroxyphenylethanol) με χημικό τύπο $C_8H_{10}O_3$ είναι μια φυτική χημική ένωση φαινολικής φύσεως που ανήκει στις απλές φαινόλες. Φέρει έναν αρωματικό δακτύλιο στον οποίο είναι συνδεδεμένα δύο υδροξύλια και μια γέφυρα δύο ατόμων άνθρακα όπου το ένα συνδέεται με ένα υδροξύλιο (Εικόνα 7, National Center for Biotechnology Information, 2021)



Εικόνα 7: Η δομή της υδροξυτυροσόλης (National Center for Biotechnology Information, 2021)

Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς, στους καρπούς της καθώς και στα απόβλητα των ελαιολιτριβείων. Είναι γνωστή για τις ευεργετικές, για την υγεία του ανθρώπου, ιδιότητες και αυτό οφείλεται στην αντιοξειδωτική της ικανότητα. Δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες η υδροξυτυροσόλη αποκτά την αντιοξειδωτική ικανότητα, συνεπώς μειώνει και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου (Trantas *et al.*, 2019, Fernandez-Bolaños *et al.*, 2012). Στην αντιοξειδωτική της ικανότητα οφείλονται και οι αντικαρκινικές της ιδιότητες καθώς μειώνει την φθορά του DNA και την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σημαντική είναι η επιρροή της υδροξυτυροσόλης στον σχηματισμό και στην συντήρηση των κοκάλων πράγμα που την καθιστά πιθανή ουσία για την καταπολέμηση των συμπτωμάτων της οστεοπόρωσης (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2012).

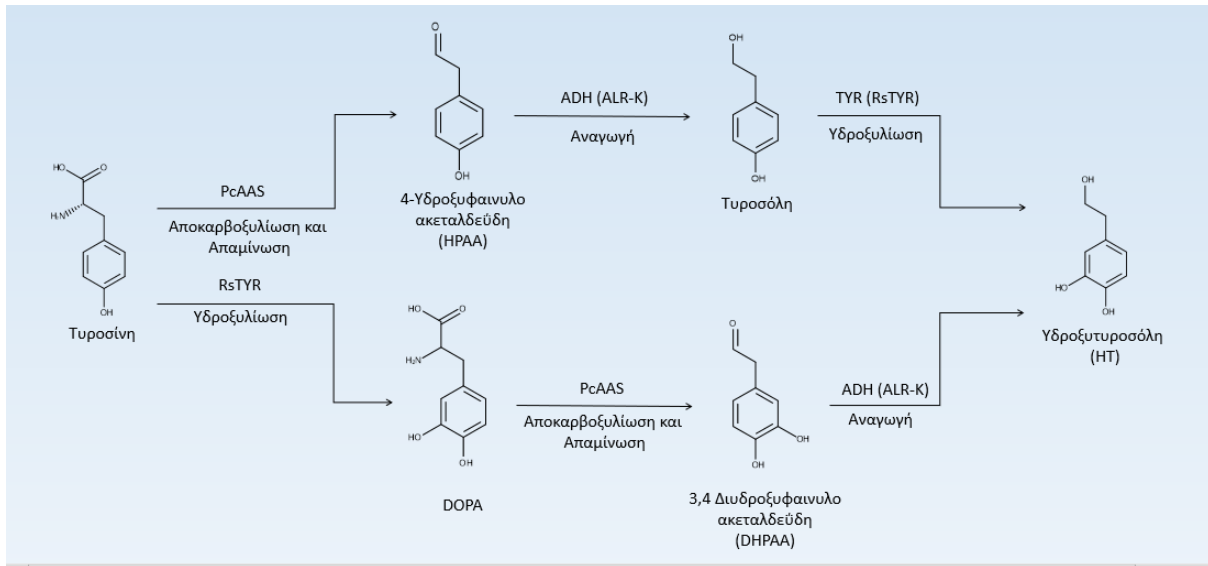
Έχουν ελεγχθεί εργαστηριακά και άλλες ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης όπως η αντιμικροβιακή της ικανότητα όπου έδειξε να έχει μυκοπλασματική δράση, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακό φάρμακο κατά βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Παρουσιάζει και αντιφλεγμονώδη δράση καθώς αναστέλλει διάφορες λειτουργίες που συμβάλουν στον σχηματισμό φλεγμονών, θρομβώσεων κ.α.. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει και η αντική ιδιότητα της υδροξυτυροσόλης, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως αναστολέας του ιού HIV-1 αφού εμποδίζει την είσοδό του στο κύτταρο (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2012).

Στην ελιά η ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που παράγεται είναι πολύ χαμηλή για να μπορέσουν να αξιοποιηθούν οι παραπάνω ιδιότητές της, και επιπρόσθετα η συγκέντρωσή της επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, από την ποικιλία της ελιάς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες μέχρι την καλλιεργητική τεχνική και την μέθοδο απομόνωσης που θα εφαρμοστεί. Γενικά, η απομόνωση της υδροξυτυροσόλης από την ελιά, το ελαιόλαδο ή από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελεί περίπλοκη διαδικασία και οικονομικά ασύμφορη για βιομηχανική παραγωγή (Trantas *et al.*, 2019).

1.4 Βιοσυνθετικό Μονοπάτι της Υδροξυτυροσόλης

Η χαμηλή συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης που παράγεται στην ελιά, η περίπλοκη και κοστοβόρα διαδικασία της απομόνωσής της, σε συνδυασμό με τις ευεργετικές ιδιότητες που κατέχει, κινούν το ενδιαφέρον για έναν οικονομικότερο και αποδοτικότερο τρόπο ως προς την συγκέντρωση και τον απαιτούμενο χρόνο παραγωγής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μεθόδους μεταβολικής μηχανικής όπου μπορούν να τροποποιήσουν γενετικά έναν μικροοργανισμό, όπως το *Escherichia coli*, ώστε να παράγει υδροξυτυροσόλη.

Για την βιοσύνθεσή της έχει προταθεί ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι το οποίο ξεκινάει από τα αμινοξέα τυροσίνη ή DOPA και καταλήγει στην υδροξυτυροσόλη έπειτα από διαδοχικές βιοχημικές αντιδράσεις υδροξυλίωσης, αποκαρβοξυλίωσης, απαμίνωσης και αναγωγής (Εικόνα 8).



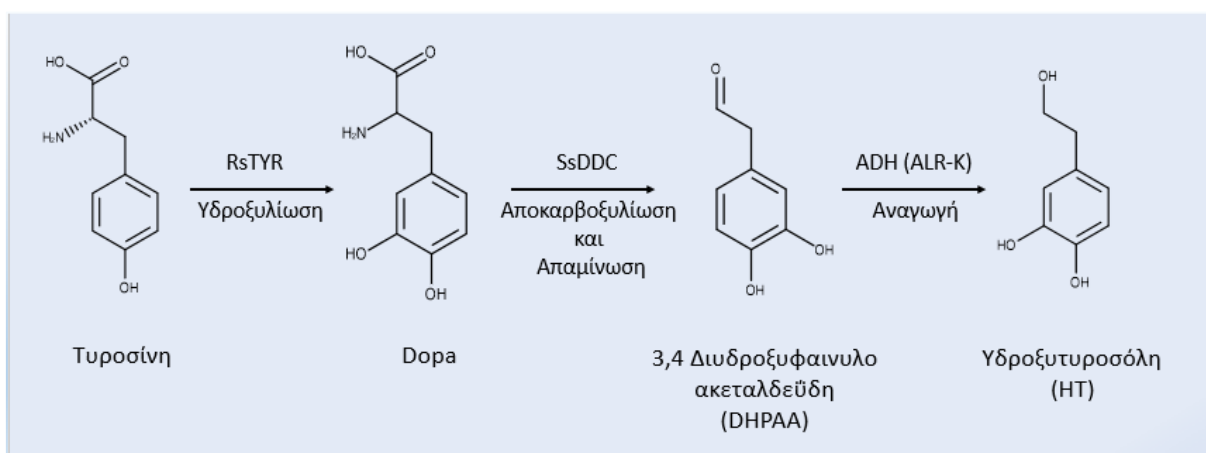
Εικόνα 8: Το διπλό μονοπάτι βιοσύνθεσης υδροξυτυροσόλης από την τυροσίνη ή την DOPA και τα ένζυμα που συμμετέχουν RsTYR, το γονίδιο της τυροσινάσης από το *Ralstonia solanacearum* που επιτελεί αντίδραση υδροξυλίωσης. PcAAS, το γονίδιο της συνθάσης των αρωματικών φαινυλακεταλδεΐδων από τον μαϊντανό (*Petroselinum crispum*) που πραγματοποιεί αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης. ADH (ALR-K), αναγωγή της αλδεΐδης που είναι ενδογενές γονίδιο του *E. coli* και επιτελεί αναγωγική αντίδραση (Trantas *et al.*, 2019).

Για την ανασύσταση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της υδροξυτυροσόλης στο *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν δύο γονίδια τα οποία κλωνοποιήθηκαν σε έναν πλασμιδιακό φορέα (pRSF Duet, Trantas *et al.*, 2019), το γονίδιο της τυροσινάσης από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum* Tyrosinase, RsTYR) και το γονίδιο της συνθάσης των αρωματικών φαινυλακεταλδεΐδων από τον μαϊντανό (*Petroselinum crispum*, PcAAS), στο μονοπάτι συμμετέχει και το γονίδιο της αλδεϋδικής αναγωγής ADH (γνωστό και ως ALR-K) το οποίο είναι ενδογενές του *E. coli*. Καθώς τα γονίδια PcAAS και RsTYR δέχονται το καθένα από δύο διαφορετικά υποστρώματα δημιουργείται ένα διπλό μονοπάτι στην βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης. Η τυροσινάση μπορεί να δεχθεί την τυροσίνη και την τυροσόλη, ενώ η συνθάση μπορεί να δεχθεί την τυροσίνη και την DOPA (Εικόνα 8, Trantas *et al.*, 2019).

1.5 Σκοπός της Πτυχιακής Εργασίας

Για την αποφυγή της δημιουργίας αυτού του διπλού μονοπατιού το γονίδιο PcAAS αντικαταστάθηκε από το γονίδιο της νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA από τον χοίρο (*Sus scrofa* DOPA decarboxylase, SsDDC) το οποίο δέχεται ως υπόστρωμα την DOPA και καθόλου την τυροσίνη. Στο πρώτο βήμα του νέου μονοπατιού το RsTYR με αντίδραση

υδροξυλίωσης προσθέτει ένα υδροξύλιο στην meta θέση του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης και έτσι προκύπτει η DOPA. Στο επόμενο βήμα το *SsDDC* δέχεται ως υπόστρωμα την DOPA και έχοντας διπλή δράση επιτελεί αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης (Bertoldi *et al.*, 2002), απομακρύνει δηλαδή την καρβοξυλομάδα και την αμινομάδα από την DOPA με αποτέλεσμα να παράγει την αλδεΐδη της DOPA, DHPAA (3,4 Διυδροξυφαινυλο ακεταλδεΐδη). Στο τελικό βήμα του μονοπατιού το ενδογενές γονίδιο *ADH* με αναγωγική αντίδραση παράγει την υδροξυτυροσόλη (HT, Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Το μονοπάτι βιοσύνθεσης υδροξυτυροσόλης από την τυροσίνη ή την Dopa και τα ένζυμα με τις αντιδράσεις που επιτελούν. *RsTYR*, το γονίδιο της τυροσινάσης από το *Ralstonia solanacearum* που επιτελεί αντίδραση υδροξυλίωσης. *SsDDC*, το γονίδιο της αποκαρβοξυλίωσης της DOPA από τον χοίρο (*Sus scrofa*) που πραγματοποιεί αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης. *ADH* (ALR-K), αναγωγία της αλδεΐδης που είναι ενδογενές γονίδιο του *E. coli* και επιτελεί αναγωγική αντίδραση.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν αρχικά η αντικατάσταση του γονιδίου *AAS* του μαϊντανού από το γονίδιο *DDC* του χοίρου στο προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι της υδροξυτυροσόλης με στόχο την δημιουργία ενός μονού μονοπατιού που ξεκινάει από την DOPA (Εικόνα 9) και στην συνέχεια ο έλεγχος λειτουργικότητας της πρωτεΐνης σε κύτταρα *E. coli*. Καθώς το γονίδιο της τυροσινάσης οριοθετείται από τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων *NdeI* και *SlaI*, για την υποκλωνοποίηση του *SsDDC* στο πλασμίδιο έκφρασης *pRSF* και την ταυτόχρονη έκφραση του γονιδίου της τυροσινάσης, όπως απαιτεί η στρατηγική παραγωγής της υδροξυτυροσόλης, έπρεπε να απενεργοποιηθεί μια εσωτερική θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *NdeI*. Για τον σκοπό αυτό στην εργασία αυτή εφαρμόστηκε η μέθοδος Splicing by Overlap Extension – Polymerase Chain Reaction (SOE-PCR). Η έκφραση του γονιδίου *SsDDC* σε κύτταρα *E. coli*, η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης

καθώς και η εξειδίκευση του υποστρώματος ελέγχθηκαν με *in vitro* πειράματα με υπόστρωμα την τυροσίνη ή DOPA και ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, CE).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πάνω απ' όλα, μην φοβάστε τις δύσκολες στιγμές, τα καλύτερα προέρχονται απ' αυτές.

Rita Levi-Montalcini

2.1 Γονίδια

Χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο γονίδιο της νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA (*SsDDC*) από τον χοίρο (*Sus scrofa*), το οποίο παραχωρήθηκε από την καθηγήτρια Mariarita Bertoldi. Η τροποποίηση αυτή αναφέρεται σε αλλαγή της τυροσίνης 332 σε φαινυλαλανίνη δίνοντάς του την ιδιαιτερότητα να πραγματοποιεί ταυτόχρονη απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση στην DOPA. Αποτέλεσμα της τροποποίησης αυτής είναι να παράγει την αλδεΐδη της DOPA αντί της αντίστοιχης αμίνης που παράγουν οι κλασικές αποκαρβοξυλάσες (Bertoldi *et al.*, 2002). Για την ανασύσταση του προτεινόμενου βιοχημικού μονοπατιού με υπόστρωμα την τυροσίνη χρειάστηκε να εισαχθεί στον φορέα και το γονίδιο της τυροσινάσης (*RsTYR*) από το *Ralstonia solanacearum*. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε από το πλασμίδιο pRSF-RsTYR11 το οποίο είχε ήδη κατασκευαστεί. Συνδυαστικά για την αποτελεσματική και

ολοκληρωμένη ανασύσταση του βιοχημικού μονοπατιού χρειάστηκε να εισαχθούν στους φορείς pRSF και pCDF τα γονίδια *SsDDC* και *RsTYR*.

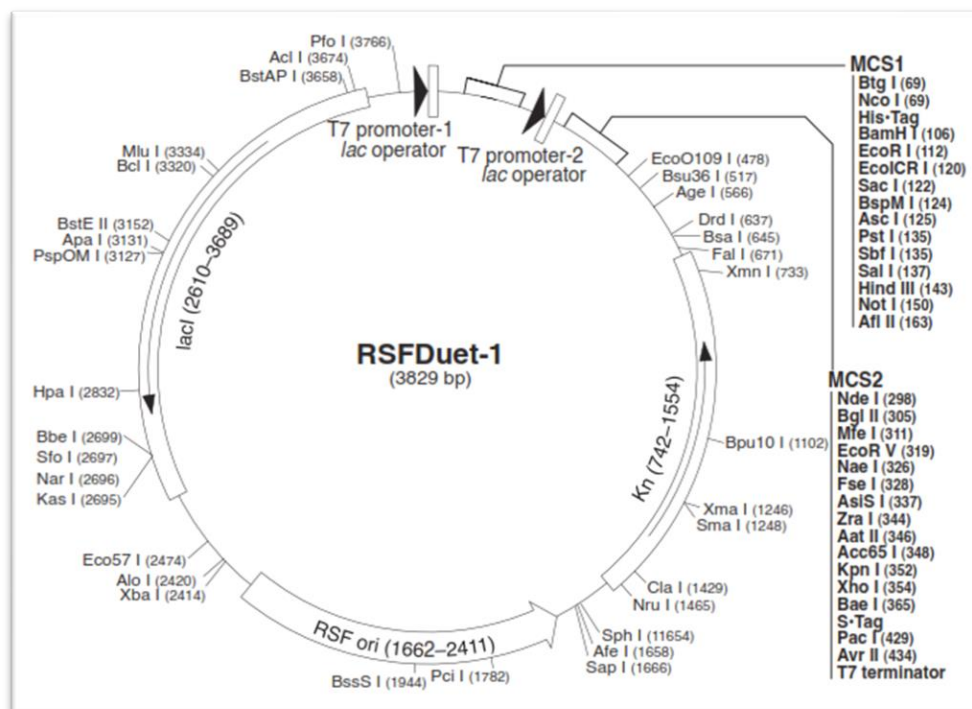
2.2 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli*

Για την ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας *Escherichia coli* ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο είναι το Lysogenic Broth (LB medium). Η σύστασή του περιλαμβάνει 1% τρυπτόνη, 0,5% μυκυλλιακό εκχύλισμα και 1% NaCl, για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος προστέθηκε άγαρ 1,5% ενώ το pH του ρυθμίστηκε στο 7 και στις 2 περιπτώσεις. Η αποστείρωσή του έγινε στους 121°C για 20min (Bertani, 1951).

2.3 Στέλεχος *E. coli* και πλασμιδιακοί φορείς

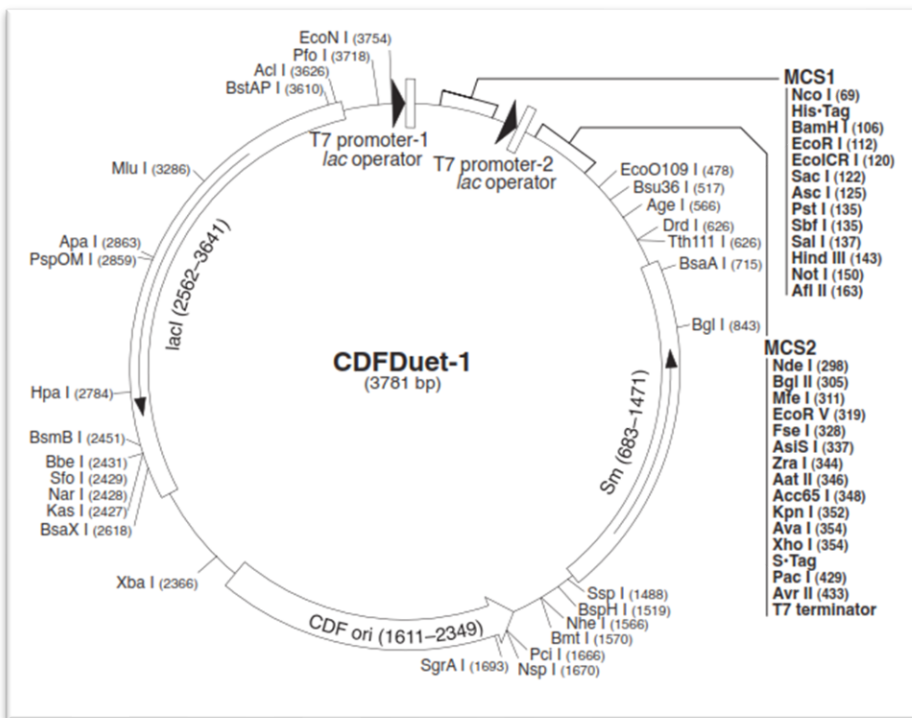
Στην διαδικασία της κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος DH10B str. K-12 του *Escherichia coli* με γενότυπο $F^- \Delta(\text{ara-leu})7697[\Delta(\text{rapA}'\text{-cra}')] \Delta(\text{lac})X74[\Delta(\text{'yahH-mhpE})] \text{duplication}(514341\text{-}627601)[\text{nmpC-gltI}] \text{galK16 galE15 e14}^- (\text{icd}^{\text{WT}} \text{mcrA}) \phi 80\text{dlacZAM15 recA1 relA1 endA1 Tn10.10 nupG rpsL150}(\text{Str}^{\text{R}}) \text{rph}^+ \text{spoT1} \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \lambda^- \text{Missense}(\text{dnaA glmS glyQ lpxK mreC murA}) \text{Nonsense}(\text{chiA gatZ fhuA? yigA ygcG}) \text{Frameshift}(\text{flhC mglA fruB})$. Ενώ στην πρωτεϊνική έκφραση το στέλεχος BL21(DE3) με γενότυπο $F^- \text{ompT gal dcm lon hsdSB}(\text{r}_B \text{m}_B^-) \lambda(\text{DE3} [\text{lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5}]) [\text{malB}^+]_{\text{K-12}}(\lambda^{\text{S}})$ (OpenWetWare, 2010).

Ο ένας από τους πλασμιδιακούς φορείς που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση ήταν ο pRSF duet-1. Έχει μέγεθος 3829bp, φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη, πληθώρα θέσεων αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων και δύο θέσεις εισαγωγής γονιδίων για έκφραση. Επίσης περιέχει το γονίδιο για την σύνθεση του καταστολέα *lacI* και την RSF έναρξη αντιγραφής (*ori*) 1030 όπου επιτρέπει στο πλασμίδιο να πολλαπλασιάζεται μέσα στο κύτταρο κι αν υπάρχουν άλλα πλασμίδια αρκεί να έχουν συμβατές αρχές αντιγραφής. Πριν από κάθε θέση εισαγωγής γονιδίου προηγείται η περιοχή του υποκινητή για την T7 RNA πολυμεράση από τον βακτηριοφάγο T7. Ακολουθεί η θέση του χειριστή *lac* όπου θα προσδεθεί ο καταστολέας *lacI* για την αποτροπή έκφραση των γονιδίων, και η περιοχή πρόσδεσης του ριβοσώματος. Η δεύτερη θέση εισαγωγής γονιδίου καταλήγει στο κωδικόνιο λήξης για την T7 πολυμεράση (Εικόνα 10).

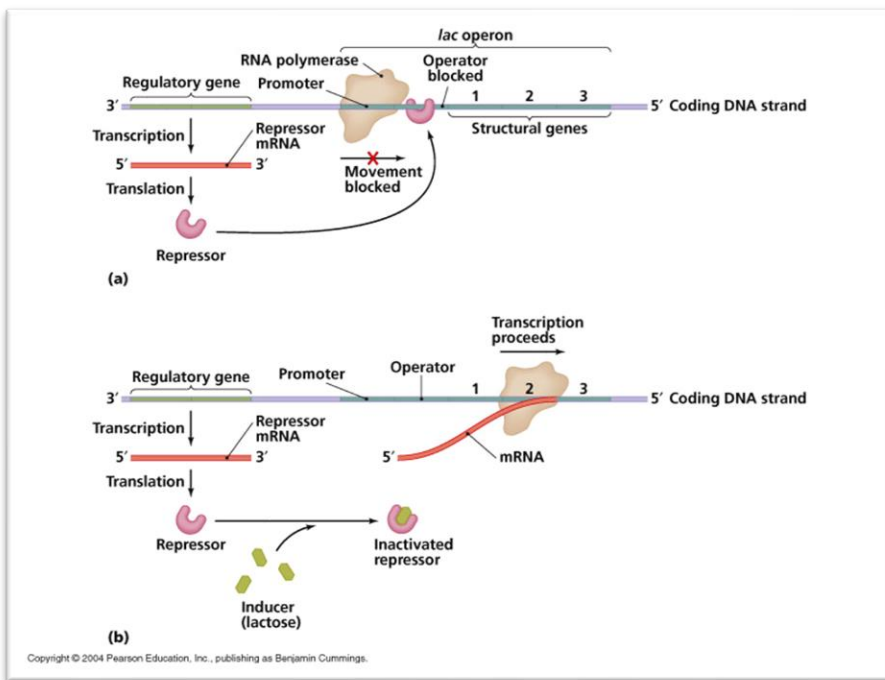


Εικόνα 10: pRSF Duet-1 χάρτης (www.helmholtz-muenchen.de).

Άλλος πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το pCDF Duet-1. Έχει μέγεθος 3781bp, φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην σπεκτινομυκίνη και την στρεπτομυκίνη και για αρχή αντιγραφής έχει την CloDF13 (CDF). Στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του δεν διαφέρει σημαντικά από τον pRSF Duet-1 καθώς και αυτός φέρει δύο θέσεις εισαγωγής γονιδίων όπου ο έλεγχος της έκφρασής τους γίνεται με τον *lacI* καταστολέα (Εικόνα 11). Το γονίδιο *lacI* παράγει τον lacI καταστολέα ο οποίος προσδένεται στην θέση του χειριστή (lac operator, Εικόνα 10, Εικόνα 11, Εικόνα 12) στον οποίο προηγείται ο υποκινητής για την T7 RNA πολυμεράση. Όταν ο lacI καταστολέας προσδεθεί στον χειριστή παρεμποδίζεται η μεταγραφή από την T7 RNA πολυμεράση με αποτέλεσμα να μην γίνεται η έκφραση των γονιδίων. Για την έκφραση λοιπόν των γονιδίων απαιτείται η παρουσία ενός επαγωγέα ο οποίος αντιδρά με τον lacI καταστολέα, του αλλάζει την τρισδιάστατη δομή και τον αποτρέπει να προσδεθεί στην θέση του χειριστή. Ο φυσικός επαγωγέας του βακτηρίου (*E. coli*) είναι το μόριο της λακτόζης. Σε αυτό το πείραμα για την επαγωγή της έκφρασης χρησιμοποιήθηκε ως επαγωγέας το IPTG (Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside) ο οποίος έχει την ίδια επίδραση που έχει η λακτόζη στον χειριστή.



Εικόνα 11: pCDF Duet-1 χάρτης. (www.helmholtz-muenchen.de).



Εικόνα 12: Το φυσικό οπερόνιο της λακτόζης με (a) καταστολή έκφρασης και (b) επαγωγή έκφρασης των γονιδίων παρουσία λακτόζης (www.biologicscorp.com).

2.3.1 PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε το 1984 από το Αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis. Πρόκειται για μια επαναστατική μέθοδο με πλέον ευρεία χρήση στην βιοτεχνολογία και την μοριακή βιολογία κατά την οποία μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αναγνωριστεί ακόμα και μέσα από πολλά μόρια DNA και να πολλαπλασιαστεί από μερικές χιλιάδες σε εκατομμύρια μέσα σε λίγες ώρες. Για την μέθοδο αυτή δεν χρειάζεται η χρήση μικροοργανισμών ή άλλων κυττάρων για τον πολλαπλασιασμό του DNA.

Αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός ενζύμου που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* όπου αναπτύσσεται σε νερά θερμοπηγών με θερμοκρασία έως και 110°C. Το ένζυμο αυτό είναι η θερμοάντοχη Taq DNA πολυμεράση όπου ρόλο έχει να αντιγράψει αλληλουχίες DNA από ένα μονόκλωνο μόριο όταν σε αυτές υπάρχει μια μικρή περιοχή δίκλωνου (Joshi & Deshpande 2010). Απαραίτητη λοιπόν είναι η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών στα 3' άκρα των δύο κλώνων του προς κλωνοποίηση DNA, που είναι οι τεχνητά κατασκευαζόμενοι εκκινητές και χάρης αυτούς ξεκινάει την αντιγραφή η DNA πολυμεράση (Nelson D., Cox M., Lehninger Βασικές αρχές Βιοχημείας, 2007). Τα παραπάνω πραγματοποιούνται με μια σειρά τριών βασικών βημάτων που διαφοροποιούνται σε χρόνο και θερμοκρασία και αποτελούν τα βασικά βήματα της μεθόδου. Η αποδιάταξη του DNA (διαχωρισμός του δίκλωνου μορίου σε δύο μονόκλιωνα), ο υβριδισμός του με τους εκκινητές και η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας αποτελούν τον κάθε κύκλο μιας PCR αντίδρασης.

Στο πρώτο βήμα μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με θέρμανση στους 90-97°C σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τους δύο κλώνους και αποδιάτασσεται το DNA. Στο δεύτερο βήμα με πτώση της θερμοκρασίας στους 50-60°C επιτυγχάνετε ο υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους θέσεις. Στο τρίτο και σημαντικότερο βήμα η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72°C και η Taq DNA πολυμεράση προσκολλάτε στους εκκινητές και ξεκινάει την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA συμπληρωματικής στον κάθε κλώνο του αρχικού μορίου. Έτσι σε κάθε κύκλο PCR (αποδιάταξης, υβριδισμού, σύνθεση νέας αλυσίδας) από ένα μόριο DNA έχουμε δύο, στον επόμενο τέσσερα, στον μεθεπόμενο οκτώ και ούτω καθεξής. Μετά από 30 με 40 κύκλους καταλήγουμε στην «ενίσχυση» της περιοχής μεταξύ των εκκινητών και σε μια ικανοποιητική ποσότητα του επιθυμητού μορίου DNA (Joshi & Deshpande 2010).

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος colony PCR για την ταυτοποίηση των βακτηριακών αποικιών που περιέχουν το πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο ως πρώτο βήμα για τον έλεγχο της εισαγωγής του γονιδίου στον φορέα. Παρακάτω περιγράφονται χρόνοι και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της colony PCR για το κάθε γονίδιο. Για το γονίδιο *SsDDC* στην εκκίνηση της αποδιάταξης η θερμοκρασία ανέβηκε στους 98 °C για 30s, η αποδιάταξη έγινε στους 98 °C για 45s, ο υβριδισμός στους 69 °C για 45s και η σύνθεση της νέας αλυσίδας στους 72 °C για 2min. Μετά από 30 επαναλήψεις των βημάτων αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέας αλυσίδας τα δείγματα παρέμειναν στους 72 °C για 10min και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Για το γονίδιο *RsTYR* η διαδικασία διαφοροποιείται στα βήματα της αποδιάταξης που έγινε στους 98 °C για 10s, του υβριδισμού με την θερμοκρασία να πέφτει στους 67 °C για 30s και στον χρόνο εναπόθεσης των δειγμάτων μετά το πέρας των επαναλήψεων ο οποίος ήταν για 4min.

Χρησιμοποιήθηκε το Kara Taq PCR Kit της εταιρίας Kara Biosystems. Για αντίδραση τελικού όγκου 25μl χρησιμοποιήθηκαν τα εξής, μια βακτηριακή αποικία σε 5μl νερού, ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq buffer with dye τελικής συγκέντρωσης 1x (περιέχει και 1,5mM MgCl₂), 0,2mM dNTPs mix, εκκινητές σε συγκέντρωση 0,4μM (forward and reverse primers) και 0,5U Kara Taq DNA πολυμεράση. Η βακτηριακή αποικία συλλέχθηκε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα με την οποία έγινε εμβάπτιση στα 5μl νερού. Με την ίδια οδοντογλυφίδα απλώθηκαν γραμμικά ότι κύτταρα είχαν απομείνει σε ένα τρυβλίο petri στην βάση του οποίου είχαν σχεδιαστεί αριθμημένα τετράγωνα και περιείχε LB, agar και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες της βακτηριακές αποικίες όπου έγινε colony PCR για τον εύκολο εντοπισμό και συλλογή των θετικών αποικιών.

2.3.2 Απενεργοποίηση εσωτερικής θέσης *NdeI* με την μέθοδο SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension - PCR)

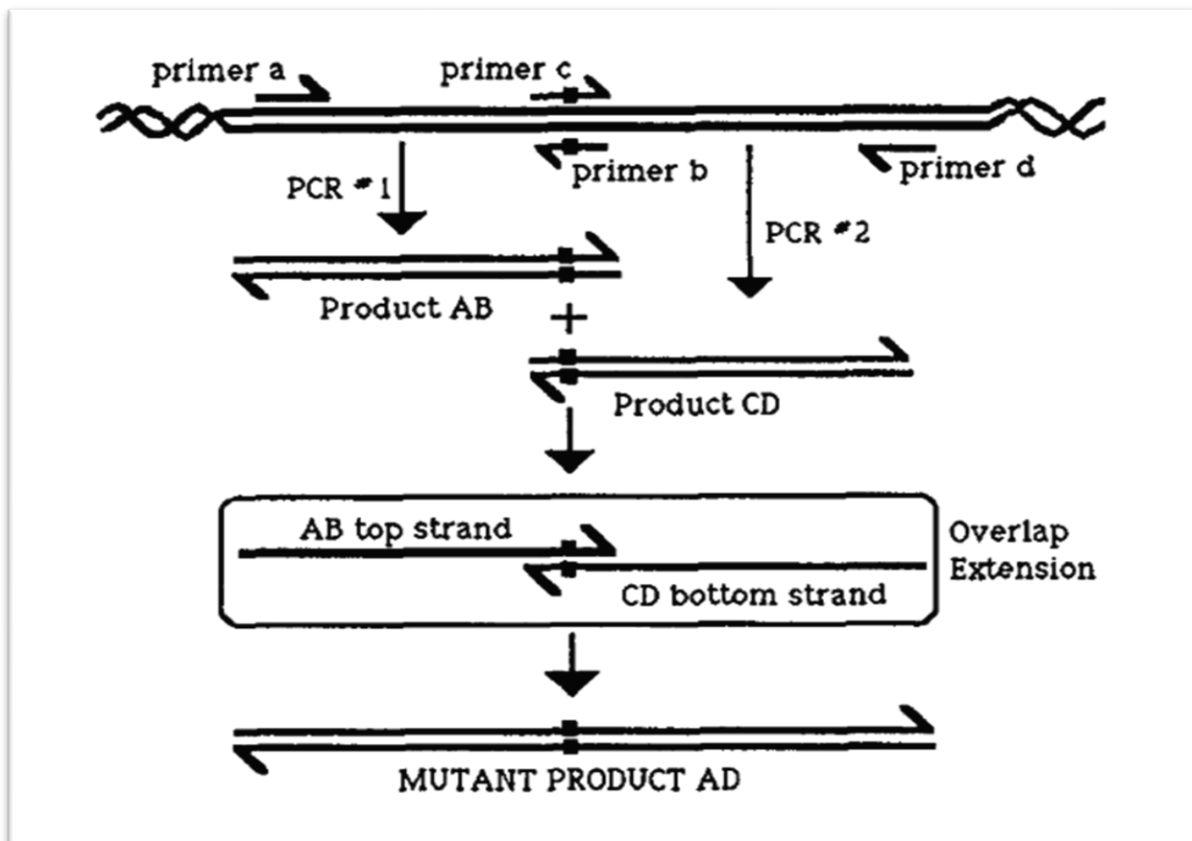
Είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την ένωση διαφορετικών τμημάτων DNA ή την εισαγωγή μεταλλάξεων χωρίς την χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού και αντιδράσεων λιγοποίησης. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητα των εκκινητών να υβριδίζονται με το μόριο DNA ακόμα και όταν οι αλληλουχίες τους δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές. Μια τυπική SOE-PCR, στην περίπτωση που στοχεύουμε στην μετάλλαξη ενός τμήματος DNA, απαιτεί ένα επιπλέον ζευγάρι εκκινητών, σε σχέση με την κλασική PCR, οι οποίοι έχουν κατασκευαστεί

έτσι ώστε να μην είναι πλήρως συμπληρωματικοί με το τμήμα του DNA που θέλουμε να τροποποιήσουμε.

Παρακάτω απεικονίζεται μια τυπική SOE-PCR (Εικόνα 13), οι εκκινητές ονομάζονται primer a και primer b καθώς και primer c και primer d ενώ με μαύρο τετράγωνο συμβολίζεται το σημείο που δεν είναι πλήρως συμπληρωματικό με μόριο DNA και φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές a και d έχουν σχεδιαστεί ώστε να προσδεθούν στα άκρα του μορίου DNA ενώ οι εκκινητές b και c στο σημείο που θέλουμε να γίνει η μετάλλαξη. Η μέθοδος ξεκινάει με δύο αντιδράσεις όπου στην πρώτη ενισχύεται το τμήμα του DNA που οριοθετείται από τους εκκινητές a, b (product AB Εικόνα 13) και στην δεύτερη ενισχύεται το τμήμα που οριοθετείται από τους εκκινητές c, d (product CD Εικόνα 13).

Το ένα άκρο των τμημάτων αυτών είναι όμοιο και φέρει την αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων που συστήθηκε από τους εκκινητές c και b (συμβολίζεται με μαύρο τετράγωνο, Εικόνα 13). Σε επόμενη αντίδραση τα προϊόντα AB και CD υβριδίζονται μεταξύ τους. Σε αυτό το στάδιο έχουμε μια δίκλωνη περιοχή στο κέντρο του μορίου DNA και μονόκλωνες περιοχές στα άκρα. Έτσι ο πάνω κλώνος του AB και ο κάτω κλώνος του CD μπορούν να λειτουργήσουν ως εκκινητές και να προσδεθεί η DNA πολυμεράση στην δίκλωνη περιοχή και να συνθέσει νέα αλυσίδα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες περιοχές (overlap extension). Με αυτόν τον τρόπο το τελικό προϊόν της αντίδρασης θα είναι ένα μόριο DNA όπου θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη (Horton, 1995).

Η μέθοδος SOE-PCR εφαρμόστηκε με σκοπό την μεταλλαξιγένεση του γονιδίου *SsDDC*. Η μετάλλαξη αυτή αφορά αρχικά μια αζωτούχα βάση, συγκεκριμένα στην θέση 801 η αδερίνη αντικαταστάθηκε από θυμίνη, για την απενεργοποίηση της θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *NdeI*. Σε επόμενο στάδιο με τους εκκινητές *SsDDC1/SsDDCmut1* (Πίνακας 7) και την χρήση της ίδιας μεθόδου προστέθηκαν μετά το κωδικόνιο έναρξης στο γονίδιο οι αζωτούχες βάσεις για την αλανίνη με στόχο την δημιουργία της θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *NcoI*.



Εικόνα 13: Παράδειγμα μεταλλαγμένης με την χρήση SOE-PCR. Οι Primer a και primer d είναι οι εκκινητές με χαρακτηριστικά ίδια με μιας κλασικής PCR, οι primer c και primer b είναι οι εκκινητές που φέρουν την αλλαγή στην αλληλουχία του DNA που θέλουμε να μεταφέρουμε. Η μετάλλαξη συμβολίζεται με μαύρο τετράγωνο. Μετά από δύο χωριστές PCR αντιδράσεις έχουν ενισχυθεί τα προϊόντα AB και CD όπου είναι το αρχικό μόριο DNA χωρισμένο σε δύο τμήματα με κοινές περιοχές στο ένα άκρο τους και πλέον φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Στη τρίτο στάδιο φαίνεται ο επιθυμητός συνδυασμός υβριδοποίησης των τμημάτων DNA με τις κοινές τους περιοχές να σχηματίζουν την μοναδική δίκλωνη περιοχή στο κέντρο. Έτσι αυτή η δίκλωνη περιοχή λειτουργεί ως εκκινητής για την DNA πολυμεράση και παράγει το τελικό προϊόν που φέρει την μετάλλαξη, mutant product AD (Horton, 1995).

Το γονίδιο παραχωρήθηκε από την Mariarita (Mita) Bertoldi και βρισκόταν ήδη στον φορέα pKK223-3 (pKK223-3-SsDDCmod). Η αλληλούχηση του γονιδίου έγινε με τους επιπλέον εκκινητές SsDDC3/SsDDC4 (Πίνακας 7) ώστε να διαβαστεί και το εσωτερικό του γονίδιο. Στην εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών SsDDC1/SsDDCmut1 και SsDDCmut2/SsDDC2 (Πίνακας 7) στον φορέα pKK223-3-SsDDC σε δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης. Με αυτόν τον τρόπο αποκτήθηκαν δύο τμήματα του γονιδίου SsDDC όπου οριοθετούνται από τα ζεύγη εκκινητών και φέρουν τις μεταλλάξεις που περιγράφονται παραπάνω. Η εκτίμησή τους έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθησε καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων από το πήκτωμα.

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εκκινητές	Αλληλουχία
<i>SsDDC3</i>	ATCGGCTCGTATAATGTGTGG
<i>SsDDC4</i>	GTTCTGATTTAATCTGTATCAGG
<i>SsDDC1</i>	ACAGATCCATGGCGAATGCCAGCGATTTCCGTC
<i>SsDDCmut1</i>	GTGCAGCCAAATGTCCCTTTCGTG
<i>SsDDCmut2</i>	CACGAAGAGGACATTTGGCTGCAC
<i>SsDDC2</i>	ACATAAGCTTCGATTCTGCTCTTCAGGGCAC
<i>RsTYRmut 1</i>	AATAGGACATATGGCCGATGCCGCCCCGCTG
<i>RsTYRmut 2</i>	GTTGATCTCGAGTCAATCAAATGACGGCGACCTCGATC
<i>RsTYRmut 3</i>	CATGCCGTACTGGAAGCTGGACC
<i>RsTYRmut 4</i>	CAGATCGCTCAGCCTTGC

Στην συνέχεια σχεδιάστηκε νέα αντίδραση με τα τμήματα του γονιδίου από τις πρώτες PCR αντιδράσεις και το αρχικό γονίδιο. Τα τμήματα αυτά λόγω τις συμπληρωματικότητάς τους με το αρχικό γονίδιο μπορούν να λειτουργήσουν σαν εκκινητές όταν βρεθούν στις κατάλληλες συνθήκες με προϊόν το *SsDDC* με τις επιθυμητές μεταλλάξεις. Για την αντίδραση αυτή φτιάχτηκαν δύο διαλύματα (master mix) όπου στο ένα θα περιέχονται οι εκκινητές *SsDDC1* και *SsDDC2* και ονομάστηκαν master mix A και master mix B.

Το master mix A περιείχε 5μl 5X Phusion Buffer, 2μl 2,5mM dNTPs, 0.25μl Phusion polymerase και 12,75μl αποστειρωμένο νερό για να έχει τελικό όγκο 20μl. Για το master mix B οι ποσότητες διαφοροποιήθηκαν στο αποστειρωμένο νερό που είναι 7,75μl και επιπλέον έχει τους εκκινητές, 5μl απ' τον καθένα, οι οποίοι ήταν σε συγκέντρωση 10μM. Αρχικά πήραμε 1μl DNA για κάθε μια από τις αρχικές PCR αντιδράσεις και συμπληρώθηκε αποστειρωμένο νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 5 μl. Κατασκευάστηκε και μια αντίδραση δέκα φορές πιο αραιή. Στην συνέχεια προστέθηκαν 20μl από το master mix A και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή για τους πρώτους 10 κύκλους. Μετά από δέκα κύκλους προστέθηκαν 25μl από το master mix B όπου περιείχε τους εκκινητές για να γίνει η κυρίως ενίσχυση του γονιδίου.

Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες ήταν στο πρώτο βήμα 94°C για 5 λεπτά, στο δεύτερο 94°C για 30 δευτερόλεπτα, στο τρίτο 60°C για 1,5 λεπτά και στο τέταρτο 72°C για 2,5 λεπτά. Τα βήματα αυτά επαναλήφθηκαν δέκα φορές. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώθηκε στους 10°C και παρέμεινε για δέκα λεπτά, σε αυτό το σημείο προστέθηκε το master mix B. Μετά η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, μειώθηκε στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα και ξανά αυξήθηκε στους 72°C για 2 λεπτά. Τα τρία τελευταία βήματα επαναλήφθηκαν για τριανταπέντε φορές. Τέλος η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για δέκα λεπτά.

2.4 Υποκλωνοποίηση γονιδίου

2.4.1 Ενδονουκλεάσες περιορισμού και λιγοποίησης

Τα βακτήρια συχνά προσβάλλονται από ιούς οι οποίοι εισβάλλουν στο κύτταρο και εκμεταλλεύονται την ενζυμική του δραστηριότητα. Έτσι επιτυγχάνουν την παραγωγή ικών πρωτεϊνών και τον πολλαπλασιασμό τους. Τα περιοριστικά ένζυμα ή αλλιώς ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένας από τους μηχανισμούς άμυνας των βακτηρίων απέναντι στους ιούς. Τα μόρια αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στο DNA τις λεγόμενες θέσεις αναγνώρισης και έχουν την δυνατότητα να προκαλούν τομές σε αυτό καταστρέφοντας έτσι όποιο εξωγενές γενετικό υλικό εισχωρήσει στο κύτταρο (Berg, Tymoczko and Stryer, 2002).

Πλέον τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν ένα βασικό εργαλείο για την εφαρμογή τεχνικών τροποποίησης γενετικού υλικού. Έχουν ομαδοποιηθεί σε τέσσερεις διαφορετικούς τύπους, συμβολιζόμενοι με λατινικούς αριθμούς (I έως IV) ανάλογα με το σημείο τομής στο DNA σε σχέση με την θέση αναγνώρισης, τον αριθμό υπομονάδων, την κατανάλωση ενέργειας, την χρήση συνεχόμενου κ.α. Χρησιμοποιούνται κυρίως τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II για τον λόγο ότι κόβουν το DNA σε συγκεκριμένο σημείο μέσα στην θέση αναγνώρισης. Αναγνωρίζουν παλίνδρομες συνήθως αλληλουχίες DNA πέντε έως δέκα βάσεων και χρειάζονται Mg^{++} για να δράσουν (Χατζόπουλος, 2001).

Μόρια DNA που έχουν υποστεί πέψη με κάποιο περιοριστικό ένζυμο μπορούν να ενωθούν ξανά με την δράση της DNA λιγάσης. Η DNA λιγάση είναι ένα ένζυμο όπου ο βιολογικός του ρόλος είναι, κατά την αντιγραφή, να ενώνει τμήματα του DNA. Μπορεί να ενώσει διαφορετικά τμήματα DNA ανεξάρτητα από την προέλευση και το μέγεθός τους,

συνδυαστικά λοιπόν με της ενδονουκλεάσες περιορισμού αποτελούν αναπόσπαστα εργαλεία στις τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Τμήματα DNA για παράδειγμα γονίδια, μπορούν να κοπούν σε συγκεκριμένα γνωστά σημεία με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων και με την DNA λιγάση υπάρχει η δυνατότητα να ενωθούν με διαφορετικά μόρια DNA όπως ένα πλασμίδιο. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να κατασκευαστεί ένας φορέας όπου μπορεί να φέρει επιλεγμένα γονίδια (Χατζόπουλος, 2001).

2.4.2 Αντιδράσεις πέψεων και λιγοποίησης

Για την εισαγωγή του γονιδίου *SsDDCmut* στον *pRSF* έγιναν πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *HindIII* της εταιρίας *Minotech*. Για την εξαγωγή του γονιδίου *RsTYR* από τον φορέα *pRSF-RsTYR* έγιναν αντιδράσεις πέψεων με τα ένζυμα *HindIII* και *CspAI* της *Minotech*. Για τις αντιδράσεις πέψεων με τα ένζυμα *NcoI*, *HindIII*, *CspAI* χρησιμοποιήθηκαν 1μg DNA, 10u ενζύμου, ρυθμιστικό διάλυμα *buffer K* τελικής συγκέντρωσης 1x και κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού για αντίδραση τελικού όγκου 20μl. Ο χρόνος της κάθε αντίδρασης ήταν 60min στους 37°C.

Καθ' όλη την διάρκεια παρασκευής των αντιδράσεων πέψης του πειράματος τα αντιδραστήρια βρίσκονταν στον πάγο και οι αντιδράσεις έγιναν σε δοχεία τύπου *Eppendorf*. Στην συνέχεια οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στην συσκευή *TDB-120 Dry Block-Thermostat* της *Biosan* στην κατάλληλη θερμοκρασία και για το κατάλληλο χρονικό διάστημα για το κάθε ένζυμο. Μετά από κάθε πέψη έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα *αγαρόζης* για τον διαχωρισμό των μορίων DNA και απομόνωση της κατάλληλης ζώνης (βλ. κεφάλαιο 2.4.3) για να ακολουθήσει αντίδραση λιγοποίησης.

Σε όλες τις λιγοποιήσεις του πειράματος κατασκευάστηκαν αντιδράσεις τελικού όγκου 10μl σε δοχείο τύπου *Eppendorf*. Για τον φορέα τοποθετήθηκαν 20ng DNA και ποσότητα DNA του γονιδίου ώστε τα μόριά τους να έχουν αναλογία 1:4, 10000 μονάδες *T4 DNA* λιγάσης (*Takara*) και *ATP* τελικής συγκέντρωσης 1mM. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία 2-4°C για μια νύκτα.

2.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και ποσοτικής εκτίμησης βιομορίων υψηλού μοριακού βάρους. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρις την κινητικότητα που παρουσιάζουν τέτοια μακρομόρια όταν βρίσκονται σε ηλεκτρικό πεδίο. Η κινητικότητα των μορίων επηρεάζεται από το μέγεθος του φορτίου τους, το μοριακό τους βάρος και το σχήμα τους. Ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται με την χρήση δύο ηλεκτροδίων (ένα αρνητικό και ένα θετικό ηλεκτρόδιο) όπου τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα που επιτρέπει την μεταφορά των ιόντων. Στο διάλυμα αυτό τοποθετείται ένα πορώδες υλικό στο οποίο θα κινούνται τα μόρια και για να παρέχει μερική αντίσταση στην κινητικότητά τους. Στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται κυρίως πήκτωμα αγαρόζης.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης όπου έχει την ιδιότητα, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα να δημιουργεί ένα πήκτωμα με διαμέτρημα πόρων αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης της αγαρόζης. Για το DNA χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα TAE το οποίο περιέχει 1mM EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetate), 40mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane, (HOCH₂)₃CNH₂], 20mM άνυδρο οξικό οξύ (C₂H₄O₂) με pH 8.0. Τα νουκλεϊκά οξέα όντας αρνητικά φορτισμένα κατευθύνονται προς το θετικό ηλεκτρόδιο μέσα από πήκτωμα αγαρόζης. Τα μικρότερα μόρια κινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα και έτσι διαχωρίζονται κατά μέγεθος περνώντας μέσα από τους πόρους του πηκτώματος. Για την ανίχνευση του DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείτε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται στην δίκλωνη αλυσίδα του DNA και όταν βρεθεί σε υπερίωδες ακτινοβολία φθορίζει με ένταση ανάλογη της συγκέντρωσής του DNA. Με την χρήση τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους γίνεται η σύγκριση και η ποσοτική εκτίμηση των δειγμάτων (Mikkelsen and Corton, 2004).

Για την εφαρμογή της μεθόδου, αρχικά παρασκευάστηκε το πήκτωμα αγαρόζης βάζοντας σε μια κωνική φιάλη 150ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1-1,5% αγαρόζη ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA. Για την διάλυση της αγαρόζης τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, όταν η θερμοκρασία ήταν περίπου 50°C προστέθηκε 1mg/ml EtBr. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου θα στερεοποιηθεί και έπειτα συμπληρώθηκε διάλυμα TAE μέχρις ότου να καλυφθεί το πήκτωμα. Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική orange G 6x G190 της εταιρίας Promega σε αναλογία 1:5 με κάθε δείγμα DNA. Για κάθε ηλεκτροφόρηση

χρησιμοποιήθηκαν 2,5μg Lambda DNA PstI Digest της Minotech. Για την δημιουργία πεδίου 75V σταθερού ρεύματος τροφοδοτούνταν στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στο τέλος το πήκτωμα παρατηρήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους φωτός.

Μετά από κάθε παρατήρηση του πηκτώματος αγαρόζης στην τράπεζα υπεριώδους φωτός, απομονώθηκαν τα θετικά δείγματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Για την εφαρμογή του πρωτόκολλου αυτού κόπηκαν τα τμήματα του πηκτώματος που περιείχαν τις επιθυμητές ζώνες DNA και με αύξηση της θερμοκρασίας διαλυτοποιήθηκε το πήκτωμα αγαρόζης. Με την παρουσία χαοτροπικών αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε συγκρατείτε το DNA από την μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου των δοχείων που παρέχονται από την εταιρία. Με αυτόν το τρόπο διαχωρίζονται τα νουκλεϊκά οξέα από το πήκτωμα αγαρόζης, συγκρατούνται από την μεμβράνη πυριτίου και στο τέλος εκλύονται απαλλαγμένα από διάφορες προσμίξεις.

2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Με τον όρο μετασχηματισμός αναφερόμαστε στην μεταφορά και έκφραση εξωγενούς γενετικού υλικού μέσα σε ένα κύτταρο. Μερικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιτρέπουν με φυσικό τρόπο την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού στο κύτταρο. Τέτοια κύτταρα ονομάζονται δεκτικά (competent) κύτταρα. Από το 1970 έχει επινοηθεί ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τεχνητό τρόπο και από τότε έχουν εφαρμοστεί διάφοροι μέθοδοι. Η αρχική μέθοδος αφορούσε τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων με πλασμδιακό DNA χρησιμοποιώντας κρύο ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) σε αναπτυσσόμενα κύτταρα με απότομες εναλλαγές θερμοκρασίας (heat-shock πρωτόκολλο).

Όταν τα βακτηριακά κύτταρα εκτεθούν σε θερμοκρασία κοντά στους 0°C σταθεροποιείται η κυτταρική τους μεμβράνη. Επειδή το DNA και οι κυτταρικές μεμβράνες είναι αρνητικά φορτισμένα απωθούνται. Τα θετικά ιόντα ασβεστίου απ' το ρυθμιστικό διάλυμα προσδένονται στις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA και στις ομάδες φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνονται τα αρνητικά τους φορτία και το DNA μπορεί να πλησιάσει τους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης. Με την απότομη άνοδο της θερμοκρασίας ($40-42^\circ\text{C}$) δημιουργείται μια θερμική αστάθεια (Thermal imbalance) εντός και εκτός των κυτταρικών μεμβρανών η οποία

εξαναγκάζει το DNA να εισχωρήσει στο κύτταρο (Λουλακάκης, Γεωργική Βιοτεχνολογία και Τρόφιμα Εργαστηριακές Ασκήσεις, 2008).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε και για τα δύο βακτηριακά στελέχη, DH10B και BL21, με το παρακάτω πρωτόκολλο. Σε καλλιέργεια 100μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 40ng DNA απ' το προϊόν της λιγοποίησης. Ακολούθησε προσεκτική ανάδευση με το χέρι και εναπόθεση στον πάγο για 15 λεπτά. Στην συνέχεια έγινε επώαση στους 40°C για 1 λεπτό και ξανά εναπόθεση στην πάγο για 15 λεπτά. Προστέθηκαν 900μl LB χωρίς αντιβιοτικό και αφέθηκαν στο 37°C με συνεχή ανάδευση 200rpm για 60 λεπτά. Το θρεπτικό διάλυμα σε αυτό το στάδιο είναι χωρίς αντιβιοτικό για να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος στα κύτταρα εκφράσουν τα γονίδια ανθεκτικότητας. Μετά από μια σύντομη φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα στις 3000rpm αφαιρέθηκαν 900μl υπερκείμενου (LB) και 50μl κυττάρων απλώθηκαν σε τρυβλία petri όπου είχαν LB, άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία έμειναν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C για μια νύχτα.

2.6 Μέθοδοι για τον έλεγχο εισαγωγής των γονιδίων στους πλασμιδιακούς φορείς

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η colony PCR. Με την μέθοδο αυτήν έγινε η ταυτοποίηση των βακτηριακών αποικιών που περιέχουν το γονίδιο. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στο προϊόν της colony PCR και τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Αφού εντοπίστηκαν οι θετικές βακτηριακές αποικίες έγινε απομόνωση DNA απ' αυτές και στην συνέχεια, για τον έλεγχο της εισαγωγής του γονιδίου στον φορέα, πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού, γνωστές ως πέψεις ελέγχου.

2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Οι απομονώσεις πλασμιδιακού DNA αποτελούν διαδικασίες ρουτίνας για την μοριακή βιολογία και βασικό βήμα για τεχνικές γενετικής μηχανικής όπως τροποποίηση γενετικού υλικού, κλωνοποίηση, ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών για πρωτεϊνική έκφραση. Πλασμίδια ονομάζονται κυκλικά μόρια εξωχρωμοσωμικού DNA όπου στην φύση συναντώνται κυρίως σε βακτήρια. Έχουν την ιδιότητα να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα

των βακτηρίων χρησιμοποιώντας όμως τους μηχανισμούς αντιγραφής του κυττάρου. Δεν είναι απαραίτητα για τις φυσιολογικές λειτουργίες και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, του προσδίδουν όμως σημαντικά βοηθητικά χαρακτηριστικά, όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, επιτρέποντάς τους να επιβιώνουν σε τοξικά για αυτά περιβάλλοντα.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα βασίζεται στην χρήση τεχνολογίας του διοξειδίου του πυριτίου με αλκαλική λύση των κυττάρων και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το χρωμοσωμικό και το πλασμιδιακό DNA έχουν διαφορετικό μέγεθος. Με την χρήση διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων αποδιατάσσεται και αναδιατάσσεται το DNA. Το πλασμιδιακό DNA λόγω του μικρού του μεγέθους αναδιατάσσεται με μεγαλύτερη επιτυχία σε σχέση με το χρωμοσωμικό το οποίο δημιουργεί ένα σύμπλεγμα μαζί με πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα συστατικά του διαλύματος. Έτσι διαχωρίζεται το χρωμοσωμικό από πλασμιδιακό DNA και με την χρήση χαοτροπικών αλάτων το δεύτερο συγκρατείται από την μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου μέχρι και την έκλουσή του στο τελικό στάδιο (Pronobis, Deutch and Peifer, 2016).

Αρχικά για την ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας επιμολύνθηκαν 5ml θρεπτικού υποστρώματος LB και κατάλληλου αντιβιοτικού με βακτηριακά κύτταρα όπου είχαν το πλασμίδιο προς απομόνωση. Παρέμειναν για μια νύκτα σε θερμοκρασία 37°C με συνεχή ανάδευση στις 250rpm. Έγινε μεταφορά των καλλιεργειών σε δοχεία τύπου Eppendorf 1,5 ml και ακολούθησαν φυγοκεντρήσεις 30 δευτερολέπτων στα 11.000g. Η επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων έγινε σύμφωνα με το NucleoSpin Plasmid kit της εταιρίας Macherey-Nagel καθώς και όλες οι απομονώσεις πλασμιδιακού DNA του πειράματος. Η έκλυση του πλασμιδιακού DNA έγινε με το προτεινόμενο ρυθμιστικό διάλυμα buffer AE (5mM Tris/HCl, pH 8,5). Με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000c της Thermo Scientific έγινε ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA.

2.8 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών για πρωτεϊνοσύνθεση

Για την πρωτεϊνική έκφραση χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος BL21 (DE3). Μετά από μετασχηματισμό των κυττάρων του στελέχους αυτού με τον pRSF-SsDDCmut ακολούθησε συλλογή μιας αποικίας και ανάπτυξη της σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με καναμικίνη. Μετά από μια νύκτα στους 37°C με συνεχή ανάδευση (250rpm) έγινε επιμόλυνση 100ml θρεπτικού διαλύματος LB με καναμικίνη με 2ml από την προηγούμενη καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες των 500ml. Οι καλλιέργειες παρέμειναν στους 37°C με συνεχή ανάδευση

(250rpm). Η εκτίμηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας έγινε μετρώντας την απορρόφησή της (OD) σε φασματοφωτόμετρο UV-1700 της εταιρίας Shimadzu.

Η επιθυμητή απορρόφηση OD₆₀₀ είναι από 0,05 μέχρι 0,1, τότε η καλλιέργεια είναι στην φάση της εκθετικής ανάπτυξης. Έγινε η προσθήκη του IPTG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (50μM, 200μM, 1000μM, 500μM) σε θερμοκρασία 25°C με συνεχή ανάδευση (250rpm) για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου. Οι δειγματοληψίες των καλλιιεργειών έγιναν μετά από τρεις και είκοσι ώρες απ' την προσθήκη του IPTG.

2.9 Ρήξη κυττάρων και συλλογή πρωτεϊνών από βακτηριακή καλλιέργεια

Η λύση των κυττάρων έγινε με την μέθοδο των υπερήχων (sonication). Η συσκευή υπερήχων (sonicator) φέρει μια ακίδα (probe) η οποία βυθίζεται στο διάλυμα με τα κύτταρα προς λύση και εκπέμπει υπερήχους με ρυθμιζόμενη συχνότητα και ένταση οι οποίοι προκαλούν μηχανική λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Στην συνέχεια με τεχνικές διαχωρισμού στερεών υγρών συλλέγεται το σύνολο των πρωτεϊνών του κυττάρου (Πουλάς and Σιδέρης, 2015).

Με σκοπό την μέτρηση των πρωτεϊνών της καλλιέργειας συλλέχθηκε ποσότητα αντίστοιχη με 100 OD μονάδες. Η απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος έγινε με φυγοκέντρηση στα 6000g και σε θερμοκρασία 4°C για 10min. Ακολούθησε επαναδιάλυση των κυττάρων με Tris HCl 20mM, φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απομάκρυνση του υπερκείμενου για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού υποστρώματος. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε Tris HCl 20mM pH 8 και μεταφέρθηκαν, 2ml από το κάθε δείγμα, σε δοχεία των 5ml.

Η ρήξη των κυττάρων έγινε με την συσκευή υπερήχων Labsonic U της εταιρίας Braun με 0,6 κύκλους και εύρος 70W για 10min για το κάθε δείγμα. Τα δοχεία ήταν συνεχώς στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20000g για 30min στους 4°C. για την καθίζηση των κυτταρικών υπολειμμάτων στον πυθμένα του δοχείου. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε το σύνολο των πρωτεϊνών των κυττάρων.

2.10 Μέτρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Η ποσότητα των πρωτεϊνών που παράχθηκε και συλλέχθηκε από την βακτηριακή καλλιέργεια μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες έπειτα από

την πρόσμιξη με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 απορροφούν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες και να απορροφά στα 595nm ανάλογα με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης (Λουλακάκης, 2008). Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται η παρασκευή του αντιδραστηρίου Bradford (που φέρει την χρωστική) και η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικά διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, μέσω των οποίων θα υπολογισθεί η ποσότητα των πρωτεϊνών.

Κατά την κατασκευή του αντιδραστηρίου Bradford διαλύθηκαν 50mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 σε 25ml αιθανόλης 95%, στην συνέχεια προστέθηκαν 50ml φωσφορικού οξέος 85% (w/v) και όταν διαλύθηκε εντελώς η χρωστική έγινε αραιώση του διαλύματος σε τελικό όγκο 500ml. Πριν την χρήση του αντιδραστηρίου Bradford περάστηκε από διηθητικό χαρτί Whatman βαθμού 1. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA, από 5μg έως 100μg σε όγκο 10μl. Στην συνέχεια προστέθηκαν 990μl αντιδραστηρίου Bradford στο καθένα και μετά από 5min μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm. Τα δείγματα από την συλλογή του συνόλου των πρωτεϊνών της βακτηριακής καλλιέργειας μετρήθηκαν και αυτά σε φασματοφωτόμετρο στα 595nm ενώ για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 10μl πρωτεϊνικού διαλύματος μαζί με 990μl αντιδραστηρίου Bradford. Όλες οι μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων έγιναν μετά από 5min απ' την προσθήκη του αντιδραστηρίου Bradford.

2.11 Σχεδιασμός και εκτέλεση *in vitro* αντιδράσεων

Σχεδιάστηκαν αντιδράσεις για τον έλεγχο ενεργότητας των πρωτεϊνών όταν έχουν ως υπόστρωμα την τυροσίνη (Tyrosine, Tyr) αλλά και την DOPA (L-3,4 Dihydroxyphenylalanine). Παρασκευάστηκε διάλυμα τυροσίνης 2mM διαλύοντας 0,0145g τυροσίνης σε 40ml H₂O και L-DOPA 2mM διαλύοντας 0,0158g DOPA σε 40ml H₂O και 80μl ASA 1M (ασκορβικό οξύ).

Οι πρώτες αντιδράσεις έγιναν με το εκχύλισμα πρωτεϊνών από τις 3h και 20h επαγωγής έκφρασης με 500μM συγκέντρωση IPTG (50μl IPTG 1M σε 100ml). Σε αντίδραση τελικού όγκου 1000μl και 400ng πρωτεϊνών μπήκαν τα υποστρώματα της τυροσίνης και της DOPA χωριστά. Έγινε επανάληψη των αντιδράσεων με τον τελικό όγκο να τροποποιείτε στα 2000μl και την ποσότητα πρωτεϊνών στα 1000μg με υπόστρωμα L-DOPA.

Στις επόμενες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες ξανά από 3h και 20h επαγωγής έκφρασης με συγκεντρώσεις IPTG, 50μM, 200μM και 1000μM. Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν 2000μl με 1000ng πρωτεϊνών. Σε αυτόν τον κύκλο αντιδράσεων το υπόστρωμα ήταν η L-DOPA.

Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και για τις πρώτες αντιδράσεις από την επαγωγή έκφρασης με 500μM IPTG χρησιμοποιήθηκαν 400μg πρωτεϊνών (0,4μg/μl), 1000μM τυροσίνη (ίδια συγκέντρωση και για την DOPA), 50μM PLP (Pyrodoxal 5'-phosphate), 20mM Tris Cl pH 7, 1000μM ASA και νερό μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 1000μl. Ίδιες συγκεντρώσεις εφαρμόστηκαν και για τις αντιδράσεις με τελικό όγκο 2000μl με 1000ng πρωτεϊνών. Για τις δεύτερες αντιδράσεις από την επαγωγή έκφρασης με 50, 200 και 1000μM IPTG χρησιμοποιήθηκαν 1000ng πρωτεϊνών (2μg/μl), 1000μM L-Dopa, 20mM PLP, 20mM Tris Cl pH 7 και νερό μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 2000μl.

Σε όλες τις αντιδράσεις έγιναν δειγματοληψίες σε διαφορετικούς χρόνους για να παρατηρηθεί η εξέλιξη της κατανάλωσης του υποστρώματος με την ταυτόχρονη αύξηση του προϊόντος. Για τις πρώτες αντιδράσεις έγιναν πέντε δειγματοληψίες, η πρώτη με την έναρξη της αντίδρασης στα 0min, η δεύτερη στα 10min, η τρίτη στα 20min, η τέταρτη στα 30min και η πέμπτη στα 60min. Έγιναν οι ίδιες δειγματοληψίες και στις δεύτερες αντιδράσεις, επιπρόσθετα για τις αντιδράσεις με τις 3h επαγωγής έκφρασης πάρθηκε δείγμα και στις 25h ενώ για τις 20h επαγωγής έκφρασης πάρθηκε και στα 120min. Η απενεργοποίηση των ενζύμων έγινε στο 85-90°C για 10min.

2.12 Ανάλυση στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μορίων σε ένα διάλυμα. Στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με την χρήση δύο ηλεκτροδίων (ένα θετικό και ένα αρνητικό) δημιουργείται ηλεκτρικό πεδίο σε ένα ιοντικό διάλυμα. Το ιοντικό διάλυμα αυτό βρίσκεται σε έναν τριχοειδή σωλήνα μικρής εσωτερικής διαμέτρου όπου εκεί τοποθετείται το προς ανάλυση δείγμα. Για την ανίχνευση του δείγματος υπάρχουν διάφορες μέθοδοι με την πιο συνηθισμένη να είναι η μέθοδος απορρόφησης υπεριώδους-ορατού φάσματος. Με την χρήση ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή προκύπτει ηλεκτροφερόγραμμα όπου τα αναλυόμενα συστατικά του δείγματος φαίνονται με κορυφές. Η

ταυτοποίηση γίνεται με σύγκριση με τα ηλεκτροφερογράμματα πρότυπων ενώσεων και η ποσοτική ανάλυση με υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών των συστατικών του δείγματος.

Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή της μεθόδου είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (Capillary Electrophoresis, CE) στην οποία ο τριχοειδής σωλήνας γεμίζει με ένα ρυθμιστικό (ιοντικό) διάλυμα και σε αυτό ασκείται το ηλεκτρικό πεδίο. Το υλικό του τριχοειδή σωλήνα είναι τηγμένο οξείδιο του πυριτίου και η εσωτερική του διάμετρος είναι από 25 έως 100μm. Έχει υψηλή ηλεκτρική αντίσταση που επιτρέπει την χρήση υψηλών τάσεων (10-30 kV) και ηλεκτρικών πεδίων (100-500 V/sec) με ανεκτή παραγωγή θερμότητας. Επιπλέον, χάρις την μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκου του τριχοειδούς, η θερμότητα που παράγεται διαχέεται και έτσι είναι εύκολο να διατηρηθεί η θερμοκρασία σε επιθυμητά επίπεδα.

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος γίνεται κυρίως με βάση το φορτίο. Κατά την εφαρμογή πεδίου δημιουργείται ηλεκτροφορητική ροή στα συστατικά του δείγματος και ηλεκτροωσμωτική ροή στο ρυθμιστικό διάλυμα, με την δεύτερη να κινείται προς την κάθοδο και η πρώτη προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο. Η ηλεκτροωσμωτική ροή παρασέρνει και τα ουδέτερα φορτισμένα συστατικά του δείγματος, χωρίς να διαχωρίζονται μεταξύ τους, και η ταχύτητά της επηρεάζεται μεταξύ άλλων από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Άλλο ένα θετικό αυτής της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται χάρις της μικρής διαμέτρου του τριχοειδούς, 1-2% του συνολικού μήκους του τριχοειδούς επαρκεί. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος εισαγωγής του δείγματος είναι η υδροδυναμική μέθοδος με πίεση 25 έως 100 mbar για 0,5 έως 5 sec.

Η ανίχνευση του δείγματος με την μέθοδο απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) γίνεται επάνω στην στήλη του τριχοειδούς (on column) και συνήθως συνδυάζεται με την χρήση συστήματος ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων (DAD, Diode Array Detection). Με αυτό το σύστημα μπορεί να γίνει μέτρηση της απορρόφησης, των συστατικών του δείγματος, ταυτόχρονα σε διάφορα μήκη κύματος από το υπεριώδες μέχρι το ορατό φάσμα. Η ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος γίνεται μετά από σύγκριση της απορρόφησης τους σε συγκεκριμένα μήκη κύματος με πρότυπες ενώσεις.

Στην ποσοτική ανάλυση υπολογίζεται το εμβαδόν των κορυφών των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος. Σε αυτό το σημείο λαμβάνεται υπ' όψη και ο χρόνος μετανάστευσης (retention time) της προς ανάλυση ένωσης. Ο πρώτος όρος αναφέρεται στην ταχύτητα με την οποία κινείται μια ένωση μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα υπό την άσκηση ηλεκτρικού πεδίου, και ο δεύτερος στο χρόνο που χρειάζεται μια ουσία για να μετακινηθεί απ'

το σημείο εισαγωγής έως την περιοχή ανίχνευσης. Το εμβαδό της κορυφής των συστατικών του αναλυόμενου διαλύματος, επηρεάζεται από το χρονικό διάστημα όπου θα παραμείνει το καθένα στην περιοχή ανίχνευσης του τριχοειδούς. Κατά συνέπεια τα συστατικά που έχουν μικρή ηλεκτροφορητική ευκινησία θα έχουν μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής καθώς παρέμειναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην περιοχή ανίχνευσης του τριχοειδούς. Για αξιόπιστη ποσοτική ανάλυση θα πρέπει να διαιρείτε το εμβαδόν κορυφής με τον χρόνο μετανάστευσης της προς ανάλυση ένωσης (Zώτου, 2015).

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης με το μηχάνημα Capillary Electrophoresis (CE) G1605 της εταιρίας Agilent μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής σωλήνας από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου εσωτερικής διαμέτρου 75μm και μήκους 50cm. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 25mM sodium tetraborate decahydrate με pH 9,2. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με άσκηση πίεσης 50mbar για 2sec και η κυρίως ανάλυση έγινε με τάση 29kV για 10min για το κάθε δείγμα. Καθ' όλη την διάρκεια η στήλη του τριχοειδούς διατηρήθηκε στους 25°C, συνθήκες που έχουν χρησιμοποιηθεί από τους Trantas *et al.*, 2019.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν έχω αποτύχει. Απλά βρήκα
10.000 τρόπους που δεν λειτουργούν.

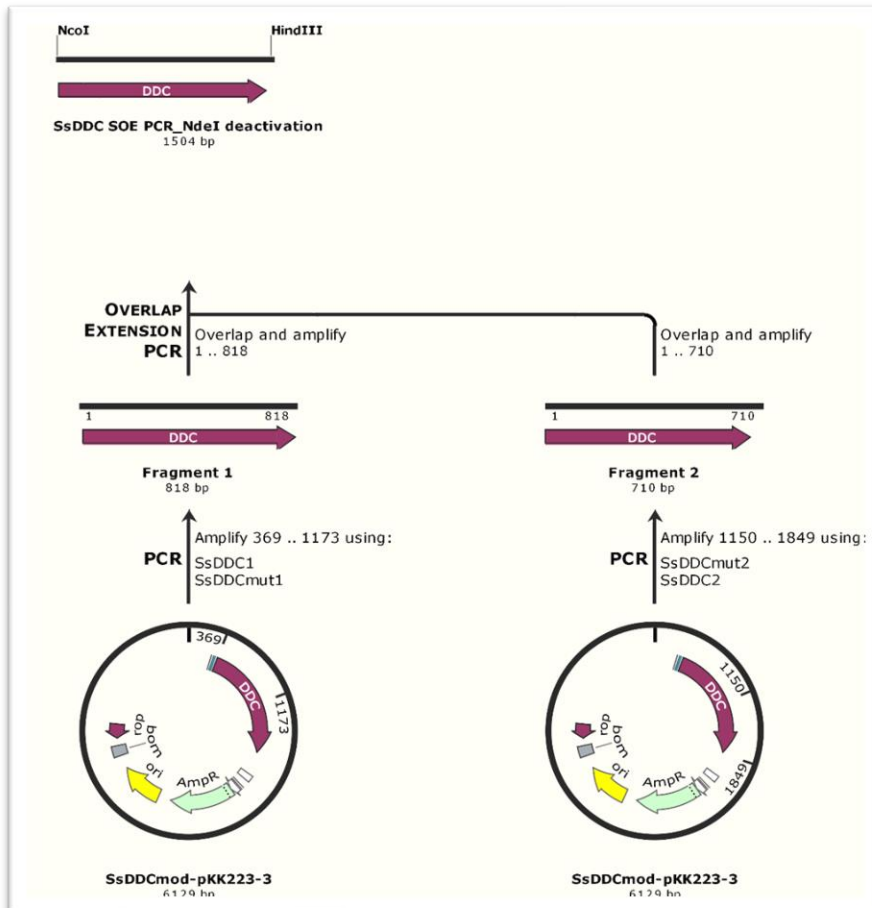
Thomas Edison

3.1 Υποκλωνοποίηση και Κατασκευή πλασμιδίων

3.1.1 Υποκλωνοποίηση *SsDDC* και απενεργοποίηση εσωτερικής *NdeI* θέσης

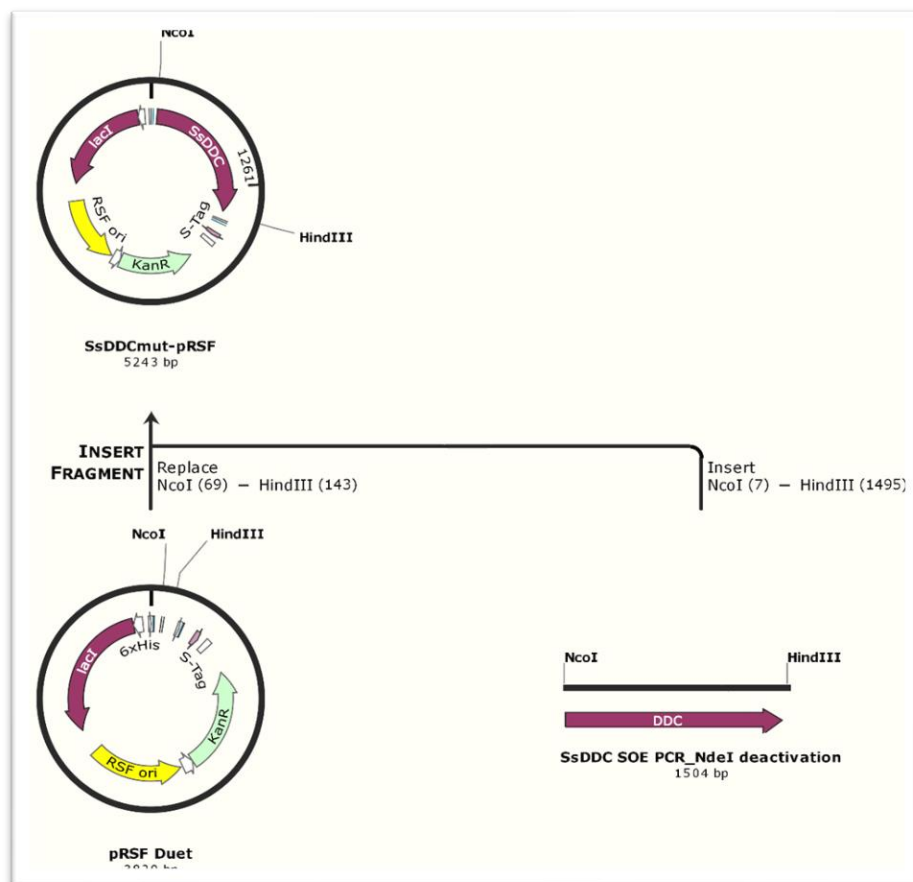
Το τροποποιημένο γονίδιο της νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA (*SsDDCmod*) παραχωρήθηκε από τους Bertoldi *et al.*, 2002 και βρισκόταν ήδη στον φορέα pKK223-3 (pKK223-3-*SsDDCmod*, Εικόνα 14). Για να χρησιμοποιηθεί το γονίδιο αυτό στην ανασύσταση του μονοπατιού της υδροξυτυροσόλης χρειάστηκε να γίνουν δύο μεταλλάξεις. Η πρώτη αφορούσε την απενεργοποίηση της θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *NdeI*. Καθώς το *RsTYR* οριοθετείται από τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων *NdeI* και *SlaI* (Εικόνα 18 κεφάλαιο 3.1.2) η χρήση του πρώτου στην υποκλωνοποίηση θα έκοβε και το *SsDDC* αποτρέποντας έτσι την έκφρασή του. Η δεύτερη μετάλλαξη αφορούσε την δημιουργία θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *NcoI*. Και τα δύο έγιναν εφαρμόζοντας την μέθοδο

SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension-PCR) και την χρήση δύο ζευγών εκκινητών, του SsDDC2/SsDDCmut2 του SsDDC1/SsDDCmut1 (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2, Εικόνα 14). Το προϊόν της SOE-PCR ονομάστηκε *SsDDCmut*.



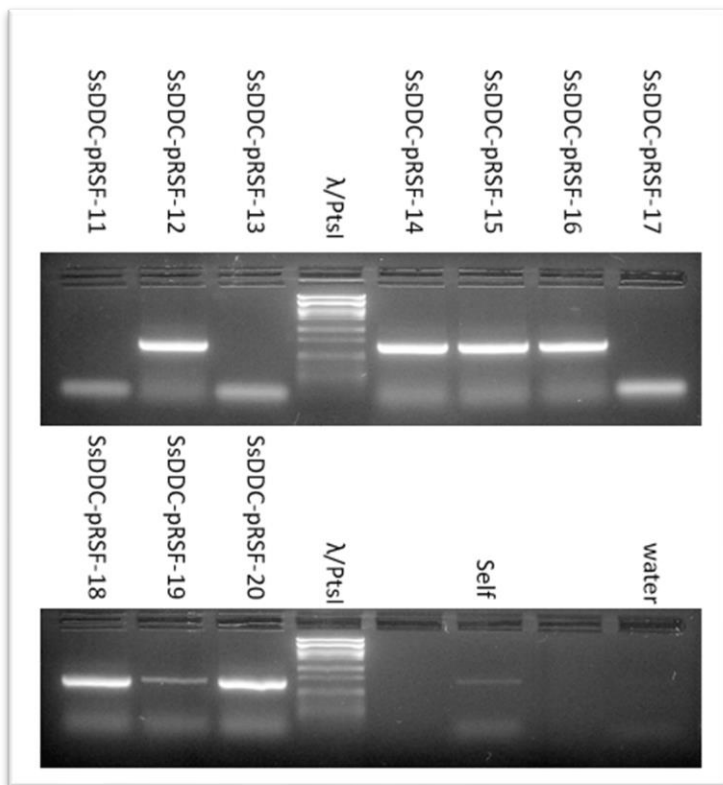
Εικόνα 14: Ενίσχυση του τροποποιημένου γονιδίου της νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA του χοίρου (*SsDDCmod*) απ' τον φορέα pKK223-3 και SOE-PCR για την απενεργοποίηση της εσωτερικής θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *NdeI*. Fragment 1, τμήμα του γονιδίου *SsDDC* που οριοθετείται από τους εκκινητές *SsDDC1/SsDDCmut1* μεγέθους 818bp. Fragment 2, τμήμα του γονιδίου *SsDDC* που οριοθετείται από τους εκκινητές *SsDDCmut2/SsDDC2* μεγέθους 710bp. *SsDDC SOE-PCR_NdeI deactivation*, προϊόν της SOE-PCR όπου ονομάστηκε *SsDDCmut*, με απενεργοποιημένη την εσωτερική *NdeI* θέση.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε το *SsDDCmut* κόπηκε με νυστέρι και απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Mini) της εταιρίας Macherey-Nagel. Στην συνέχεια έγιναν πέψεις του *SsDDCmut* και του άδειου φορέα pRSF με τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *HindIII* (Εικόνα 15), και αντιδράσεις λιγοποίησης με T4 DNA λιγάση Takara σε αναλογία φορέα και γονιδίου 1:4 και ποσότητα γονιδίου 40ng.



Εικόνα 15: Εισαγωγή του τροποποιημένου γονιδίου *SsDDCmut* στον φορέα *pRSF-Duet 1*. Αντιδράσεις πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *HindIII* και αντιδράσεις λιγοποίησης με *T4DNA* λιγάση (*Takara*).

Ποσότητα από την αντίδραση της λιγοποίησης προστέθηκε σε 100μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* του στελέχους DH10B για τον μετασχηματισμό τους σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στα τρυβλία petri όπου απλώθηκαν τα μετασχηματισμένα κύτταρα ήταν η καναμικίνη. Για τον έλεγχο εισαγωγής του *SsDDCmut* στον *pRSF* συλλέχθηκαν δέκα αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα και έγινε colony PCR με σκοπό να ενισχυθεί το *SsDDCmut*, με αναμενόμενο μέγεθος 710bp. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *SsDDCmut2/SsDDC2* και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των δειγμάτων της colony PCR (Εικόνα 16). Οι αποικίες *pRSF-SsDDC-12, 14, 15,16,18* και 20 συλλέχθηκαν για να ακολουθήσουν πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού για επιπλέον έλεγχο της εισαγωγής του *SsDDCmut* στον *pRSF*.

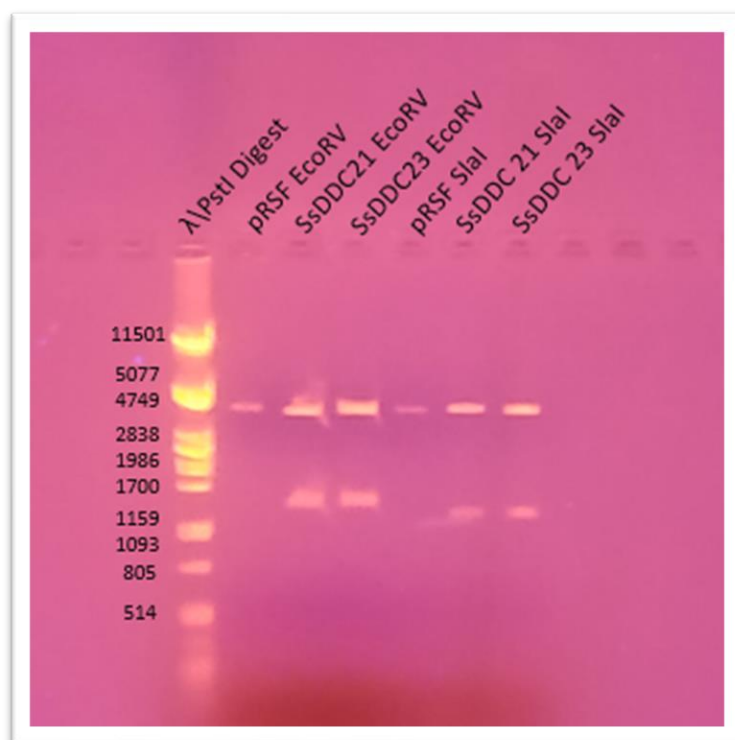


Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης της Colony PCR με εκκινητές SsDDCmut2/SsDDC2 για τον έλεγχο εισαγωγής του πλασμιδίου pRSF-SsDDCmut σε διάφορες αποικίες. Μάρτυρας γνωστού μεγέθους ο λPstI με τα μεγέθη, από πάνω προς τα κάτω, 11501bp, 5077bp, 4749bp, 2838bp, 1986bp, 1700bp, 1159bp, 1093bp, 805bp, 514bp. Δείγμα που περιείχε μόνο νερό για τον έλεγχο επιμόλυνσης (water). Ο φορέας pRSF χωρίς το SsDDCmut (Self). Το μέγεθος των αναμενόμενων τμημάτων DNA είναι 710bp.

Έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* DH10B των παραπάνω αποικιών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoSpin Plasmid kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Το πλασμιδιακό DNA στην συνέχεια ελέγχθηκε με ενδονουκλεάσες περιορισμού για να διαπιστωθεί ότι ο pRSF περιέχει το γονίδιο *SsDDCmut*. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο αυτό είναι τα EcoRV και SmaI της εταιρίας Minotech, ο μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pRSF χωρίς το γονίδιο (Εικόνα 17).

Η πέψη των πλασμιδίων με το ένζυμο EcoRV έχει αναμενόμενες ζώνες τις 3779bp για τον άδειο φορέα, 3748bp και 1495bp για τον φορέα με τον γονίδιο ενώ η πέψη με το SmaI έχει αναμενόμενες ζώνες τις 3779bp για τον άδειο φορέα, 3888bp και 1355bp για τον φορέα με τον γονίδιο (Εικόνα 17, Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2). Μετά τον έλεγχο με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με το πλασμίδιο pRSF-SsDDCmut, το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν καναμικίνη. Από την Εικόνα 17 φαίνεται ότι οι κλώνοι 21 και 23 δίνουν το σωστό προφίλ

ζωνών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν παρακάτω. Οι κλώνοι αυτοί φυλάχτηκαν στους -80°C σε 15% γλυκερόλης. Το πλασμίδιο *pRSF-SsDDCmut* είναι αυτό με το οποίο τροποποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL21(DE3) και χρησιμοποιήθηκε στις *in vitro* αντιδράσεις για να ελεγχθεί η ικανότητά του να παράγει υδροξυτυροσώλη.

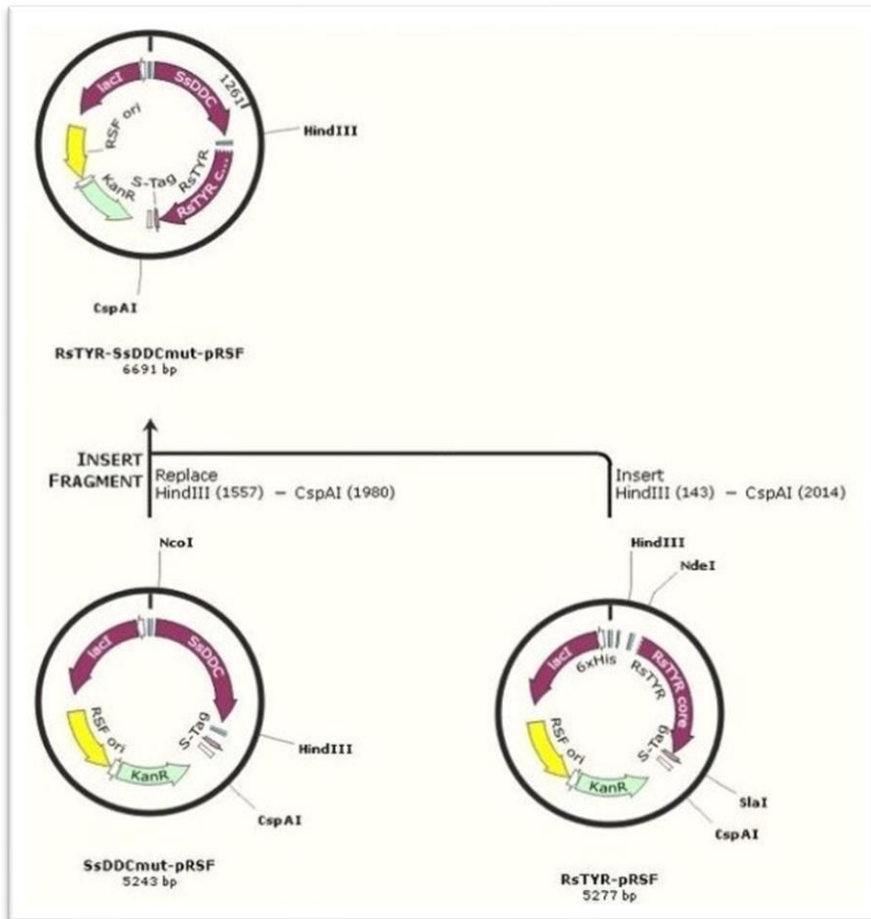


Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, πέψεις ελέγχου του φορέα *pRSF-SsDDCmut* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRV* και *SmaI* της *Minotech*. Πέψεις του φάγου με το περιοριστικό ένζυμο *PstI* (λ *PstI* Digest), δεξιά γράφονται τα μεγέθη των κομμένων τμημάτων σε ζεύγη βάσεων (bp). Πέψη του άδειου φορέα με το ένζυμο *EcoRV* (*pRSF EcoRV*), πέψη του κλώνου *SsDDC21* με το ένζυμο *EcoRV* (*SsDDC21 EcoRV*), πέψη του κλώνου *SsDDC23* με το ένζυμο *EcoRV* (*SsDDC23 EcoRV*), πέψη του κλώνου *SsDDC21* με το ένζυμο *SmaI* (*SsDDC21 SmaI*), πέψη του κλώνου *SsDDC23* με το ένζυμο *SmaI* (*SsDDC23 SmaI*). Τα αναμενόμενα μεγέθη των κομμένων τμημάτων DNA φαίνονται στον Πίνακα 9 στο κεφάλαιο 3.1.2.

3.1.2 Υποκλωνοποίηση του γονιδίου *RsTYR* στον φορέα *pRSF-SsDDCmut*

Το γονίδιο της τυροσινάσης είχε κλωνοποιηθεί στον φορέα *pRSF-RsTYR*. Για την υποκλωνοποίηση του γονιδίου *RsTYR* από τον φορέα *pRSF-RsTYR* στον *pRSF* φορέα που ήδη έφερε το *SsDDCmut* (*pRSF-SsDDCmut*) έγιναν αντιδράσεις πέψεων με τα ένζυμα *CspAI* (ισοσχιζομερές του *AgeI*) και *HindIII* της εταιρίας *Minotech*. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% απομονώθηκε το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε το γονίδιο *RsTYR* με βάση το πρωτόκολλο του *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit* (*Midi*). Με τα ίδια

περιοριστικά ένζυμα έγιναν πέψεις του φορέα pRSF-SsDDCmut και ακολούθησαν λιγοποιήσεις με T4 DNA λιγάση Takara, σε αναλογία φορέα και γονιδίου 1:4 και ποσότητα γονιδίου 40ng (Εικόνα 18, Πίνακας 8).



Εικόνα 18: Υποκλωνοποίηση του γονιδίου *RsTYR* από τον φορέα *pRSF-RsTYR* στον *pRSF-SsDDCmut*. Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *CspAI* και *HindIII* το οποία πέπτουν τους φορείς στις θέσεις 2014 και 143 για τον *pRSF-RsTYR* και στις θέσεις 1980 και 1557 για τον *pRSF-SsDDCmut* αντίστοιχα. Το γονίδιο της τυροσινάσης οριοθετείται από τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NdeI* και *SlaI*. Η αρχή του γονιδίου *SsDDCmut* είναι στην θέση αναγνώρισης του ενζύμου *NcoI*.

Ο έλεγχος της εισαγωγής του γονιδίου της τυροσινάσης στον *pRSF-SsDDCmut* έγινε με colony PCR αρχικά με τους εκκινητές *RsTYRmut1/RsTYRmut2* και στην συνέχεια με τους *RsTYRmut3/RsTYRmut4*. Οι κλώνοι που έδωσαν θετικό σήμα στις colony PCR ελέγχθηκαν με πέψεις με τα ένζυμα *BamHI* και *SlaI* της Minotech.

Πίνακας 8: Πληροφορίες για της ενδονουκλεάσες περιορισμού και τις πέψεις που έγιναν στην υποκλωνοποίηση του γονιδίου *RsTYR* απ' τον *pRSF-RsTYR* στον *pRSF-SsDDCmut*.

Ένζυμα	Αλληλουχία Αναγνώρισης	Πέψη του <i>pRSF-RsTYR</i>			Πέψη του <i>pRSF-SsDDCmut</i>		
		Επ/ληψη Κατ/σης	Σημείο Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)	Επανάληψη Κατάτμησης	Σημεία Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)
<i>CspAI</i>	5' A CCGGT 3' 3' TGGCC A 5'	1	2014	1871	1	1980	4820
<i>HindIII</i>	5' A AGCTT 3' 3' TTCGA A 5'	1	143		1	1557	

Στην colony PCR για τον *pRSF-SsDDCmut* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *SsDDCmut2/SsDDC2* (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2). Η μέθοδος εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.3.1 με τροποποίηση στην θερμοκρασία υβριδισμού όπου έγινε στους 58°C και στον χρόνο της σύνθεσης της νέας αλυσίδας που ήταν για 1min. Τα πρωτόκολλα για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA περιγράφονται στα κεφάλαια 2.4.3 και 2.7 αντίστοιχα. Οι πέψεις ελέγχου για τον *pRSF-SsDDCmut* έγιναν με τα ένζυμα *EcoRV* και *SlaI* της εταιρίας Minotech, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας *pRSF* χωρίς το γονίδιο. Τα παραπάνω ένζυμα πέπτουν τον *pRSF-SsDDCmut* σε δύο σημεία, εντός και εκτός του γονιδίου. Έτσι στα δείγματα όπου υπάρχει το *SsDDCmut* στον *pRSF* θα προκύψουν δύο γραμμικά μόρια DNA και ένα όπου υπάρχει ο *pRSF* χωρίς το γονίδιο. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης των *EcoRV* και *SlaI* καθώς και τα μεγέθη των γραμμικών μορίων DNA που προκύπτουν από τις πέψεις φαίνονται στον Πίνακας 9.

Ο έλεγχος της υποκλωνοποίησης του *RsTYR* στον *pRSF-SsDDCmut* έγινε με δύο διαδοχικές colony PCR. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *RsTYRmut1/RsTYRmut2* και το δεύτερο ζεύγος το *RsTYRmut3/RsTYRmut4* (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2). Σε επόμενο στάδιο ο έλεγχος εισαγωγής του γονιδίου στον φορέα έγινε με πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *SlaI* της Minotech. Για την πέψη του *pRSF-SsDDCmut-RsTYR* με το περιοριστικό ένζυμο *BamHI* υπήρχαν δυο αναμενόμενες ζώνες, μια με μέγεθος 5037bp και μια με 1654bp (Πίνακας 9). Στην πέψη με το *SlaI* υπήρχαν επίσης δύο αναμενόμενες ζώνες και τα μεγέθη τους ήταν 3888bp και 2803bp (Πίνακας 9). Ο έλεγχος με τις δύο διαδοχικές colony PCR καθώς και με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού έδειξε πως δεν ήταν επιτυχημένη η υποκλωνοποίηση του *RsTYR* στον *pRSF-SsDDCmut*.

Πίνακας 9: Πληροφορίες για τις πέψεις ελέγχου των *pRSF-SsDDCmut*, *pRSF*, *pRSF-SsDDCmut-RsTYR*, *pCDF-SsDDCmut* και *pCDF-SsDDCmut-RsTYR* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRV*, *SlaI* και *BamHI* (για τον πίνακα αυτόν χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο http://www.geneinfinity.org/sms/sms_redigest.html, το λογισμικό *SnapGene Viewer 5.3.1* από *Insightful Science*, διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση snapgene.com).

Ένζυμα	Αλληλουχία Αναγνώρισης	Πέψη του <i>pRSF</i>			Πέψη του <i>pRSF-SsDDC</i>		
		Επα/ψη Κα/σης	Σημεία Κατάτμησης	Μεγ. DNA (bp)	Επα/ψη Κα/σης	Σημεία Κατάτμησης	Μεγ. DNA (bp)
<i>EcoRV</i>	5' GAT ATC 3' 3' CTA TAG 5'	1	270-269	3779	2	239-238	3748
						1734-1733	1495
<i>SlaI</i>	5' C TCGAG 3' 3' GAGCT C 5'	1	305-304	3779	2	414-413	3888
						1769-1768	1355
Πέψη του <i>pRSF-SsDDCmut-RsTYR</i>					Πέψη του <i>pCDF-SsDDCmut</i>		
<i>BamHI</i>	5' G GATCC 3' 3' CCTAG G 5'	2	2910-1255	5037	-	-	-
			1256-2909	1654			
<i>SlaI</i>	5' C TCGAG 3' 3' GAGCT C 5'	2	3217-413	3888	2	1769-413	3840
			414-3216	2803		414-1768	1355
<i>EcoRV</i>	5' GAT ATC 3' 3' CTA TAG 5'	-	-	-	2	1734-238	3700
						239-1733	1495
Πέψη του <i>pCDF-SsDDCmut-RsTYR</i>							
<i>BamHI</i>	5' G GATCC 3' 3' CCTAG G 5'	2	2910-1255	4989			
			1256-2909	1654			
<i>SlaI</i>	5' C TCGAG 3' 3' GAGCT C 5'	2	3217-413	3840			
			414-3216	2803			

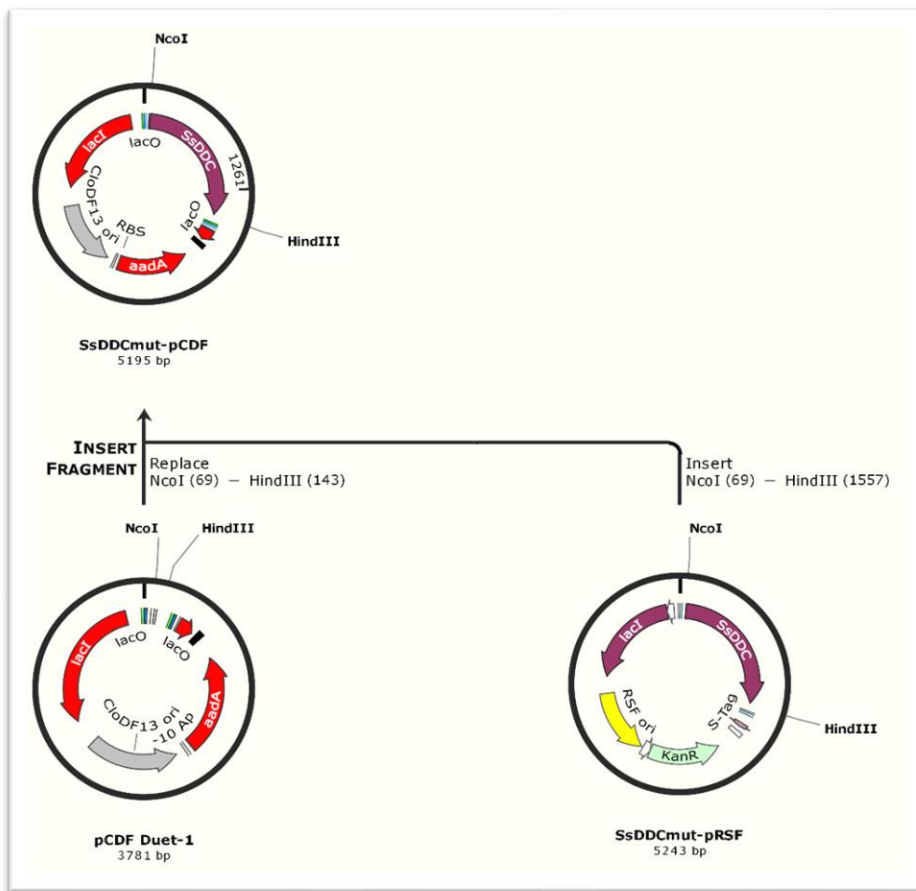
3.1.3 Κατασκευή πλασμιδίου *pCDF-SsDDCmut* και του *pCDF-SsDDCmut-RsTYR*

Για την εισαγωγή του *SsDDCmut* στον φορέα *pCDF* έγινε υποκλωνοποίηση απ' τον *pRSF-SsDDCmut*. Πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *HindIII* της Minotech του άδειου φορέα *pCDF Duet-1* και του *pRSF-SsDDCmut* (Εικόνα 19, Πίνακας 10). Στην συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, απομόνωση DNA των τμημάτων του πηκτώματος που περιέχουν το γονίδιο *SsDDCmut* και τον φορέα *pCDF*. Οι αντιδράσεις λιγοποιήσεων έγιναν όπως και στις προηγούμενες υποκλωνοποιήσεις. Από το προϊόν της λιγοποίησης υπολογίσθηκε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 40ng DNA γονιδίου και μετασχηματίστηκαν 100μl κυττάρων *E.coli* DH10B. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στα τρυβλία petri ήταν η σπεκτινομυκίνη. Για τον έλεγχο της υποκλωνοποίησης έγινε colony PCR με τους εκκινητές *SsDDCmut2/SsDDC2* και πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα *SlaI* και *EcoRV* (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2, Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2).

Η υποκλωνοποίηση του γονιδίου της τυροσινάσης από τον pRSF-RsTYR στον φορέα pCDF-SsDDCmut έγινε με πέψεις των φορέων pRSF-RsTYR και pRSF-SsDDCmut με τα περιοριστικά ένζυμα CspAI και HindIII της εταιρίας Minotech (Εικόνα 20, Πίνακας 11), οι αντιδράσεις λιγοποιήσεων έγιναν όπως περιγράφεται παραπάνω. Ο έλεγχος της υποκλωνοποίησης του *RsTYR* στον pCDF-SsDDCmut έγινε με colony PCR αρχικά με τους εκκινητές RsTYRmut1/RsTYRmut2 και στην συνέχεια με τους RsTYRmut3/RsTYRmut4 καθώς και με πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και SmaI (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2, Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2).

Ο έλεγχος της εισαγωγής του *SsDDCmut* στον pCDF έγινε με colony PCR με τους εκκινητές SsDDCmut2/SsDDC2 (Πίνακας 7 κεφάλαιο 2.3.2) και με πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα SmaI και EcoRV. Το περιοριστικό ένζυμο SmaI πέπτει τον pCDF-SsDDCmut σε δύο σημεία και έτσι έδωσε δύο ζώνες με το μέγεθος της μιας να ήταν 3840bp και της άλλης 1355bp (Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2). Στην πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV υπήρχαν δύο σημεία κατάτμησης στον pCDF-SsDDCmut με αποτέλεσμα δύο τμήματα DNA μεγέθους 3700bp και 1495bp (Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2).

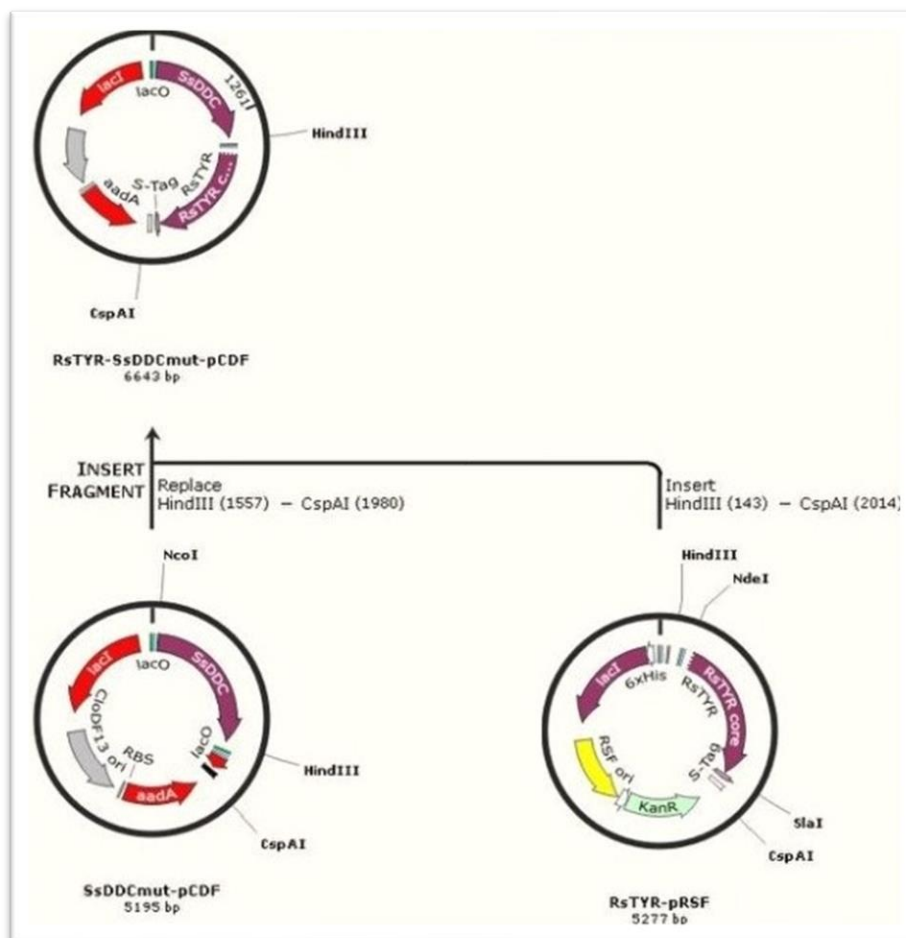
Στην συνέχεια για τον έλεγχο της υποκλωνοποίησης του *RsTYR* στον pCDF-SsDDCmut έγιναν, όπως και παραπάνω, colony PCR με το ζεύγος εκκινητών RsTYRmut1/RsTYRmut2 (Πίνακας 7 κεφ. 2.3.2) και πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και SmaI της Minotech. Οι αναμενόμενες ζώνες για τις πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο BamHI ήταν δύο, με μέγεθος 4989bp και 1654bp (Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2). Στις πέψεις ελέγχου με το SmaI οι αναμενόμενες ζώνες είχαν μέγεθος 3840bp και 2803bp (Πίνακας 9 κεφάλαιο 3.1.2). Οι αντιδράσεις πέψεων έγιναν σε τελικό όγκο 30μl, 240ng DNA χρησιμοποιήθηκαν μαζί με 24u ενζύμου. Τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα για το κάθε ένζυμο, σύμφωνα με την παρασκευάστρια εταιρία, καθώς και 100μg/ml BSA (ορολευκωματίνη, bovine serum albumin) σε ίδια αναλογία, στην συνέχεια παρέμειναν σε θερμοκρασία 37°C για 2,5h.



Εικόνα 19: Υποκλωνοποίηση του *SsDDCmut* απ’ τον *pRSF-SsDDCmut* στον φορέα *pCDF*. Χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI* και *HindIII* τα οποία κόβουν τους φορείς στις θέσεις 69 και 1557 για τον *pRSF-SsDDCmut* και στις 69 και 143 για τον *pCDF Duet-1* αντίστοιχα. *SsDDCmut-pRSF*, ο *pRSF* με το γονίδιο *SsDDCmut*. *pCDF Duet-1*, ο άδειος φορέας *pCDF*. *SsDDCmut-pCDF*, ο φορέας *pCDF* με το γονίδιο *SsDDCmut*.

Πίνακας 10: Πληροφορίες για της ενδονουκλεάσες περιορισμού και τις πέψεις που έγιναν στην υποκλωνοποίηση του γονιδίου *SsDDCmut* απ’ τον *pRSF-SsDDCmut* στον *pCDF* (για τον πίνακα αυτόν χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο http://www.geneinfinity.org/sms/sms_redigest.html, το λογισμικό *SnapGene Viewer 5.3.1* από *Insightful Science*, διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση snapgene.com).

Ένζυμα	Αλληλουχία Αναγνώρισης	Πέψη του <i>pCDF</i>			Πέψη του <i>pRSF-SsDDC</i>		
		Επ/ληψη Κατ/σης	Σημείο Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)	Επανάληψη Κατάτμησης	Σημεία Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)
<i>HindIII</i>	5' A AGCTT 3' 3' TTCGA A 5'	1	2410-5355	2946	1	1558-69	3755
<i>NcoI</i>	5' C CATGG 3' 3' GGTAC C 5'	1	5356-689	2569	1	70-1557	1488



Εικόνα 20: Υποκλωνοποίηση του *RsTYR* από τον φορέα *pRSF-RsTYR* στον φορέα *pCDF-SsDDC*. Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *CspAI* και *HindIII* το οποία πέτουν τους φορείς στις θέσεις 2014 και 143 για τον *pRSF-RsTYR* και στις θέσεις 1980 και 1557 για τον *pCDF-SsDDCmut* αντίστοιχα. Το γονίδιο της τυροσινάσης οριοθετείται από τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NdeI* και *SlaI*. Η αρχή του γονιδίου *SsDDCmut* είναι στην θέση αναγνώρισης του ενζύμου *NcoI*.

Πίνακας 11: Πληροφορίες για της ενδονουκλεάσες περιορισμού και τις πέψεις που έγιναν στην υποκλωνοποίηση του γονιδίου *RsTYR* απ’ τον *pRSF-RsTYR* στον *pRSF-SsDDCmut*.

Ένζυμα	Αλληλουχία Αναγνώρισης	Πέψη του <i>pRSF-RsTYR</i>			Πέψη του <i>pCDF-SsDDCmut</i>		
		Επ/ληψη Κατ/σης	Σημείο Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)	Επανάληψη Κατάτμησης	Σημεία Κατ/σης	Μεγ. DNA (bp)
<i>CspAI</i>	5' A CCGGT 3' 3' TGGCC A 5'	1	2014	1871	1	1980	4820
<i>HindIII</i>	5' A AGCTT 3' 3' TTCGA A 5'	1	143		1	1557	

Οι έλεγχοι της υποκλωνοποίησης του γονιδίου *SsDDCmut* στον *pCDF* καθώς και του γονιδίου *RsTYR* στον *pCDF-SsDDCmut* έδειξαν όλες τις φορές αρνητικά αποτελέσματα συνεπώς δεν

ήταν επιτυχημένες οι υποκλωνοποιήσεις των γονιδίων *SsDDCmut* και *RsTYR* στον φορέα pCDF.

3.2 *In vitro* πειράματα και Ανάλυση στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE)

Μετά από τον μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) με το pRSF-SsDDCmut ακολούθησε συλλογή μιας αποικίας και ανάπτυξη της σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με καναμικίνη. Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.8. Η εκτίμηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας έγινε μετρώντας την απορρόφησή της (OD) στα 600nm σε φασματοφωτόμετρο UV-1700 της εταιρίας Shimadzu. Η προσθήκη του IPTG για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι δειγματοληψίες των καλλιεργειών έγιναν μετά από τρεις και είκοσι ώρες απ' την προσθήκη του IPTG (Πίνακας 12, Πίνακας 13).

Πίνακας 12: Περιεχόμενο *in vitro* αντιδράσεων από τις καλλιέργειες με 3 και 20 ώρες επαγωγής έκφρασης με 500μM IPTG και τελικό όγκο αντίδρασης 1000μl με 400ng πρωτεϊνών.

Ώρες Επαγωγής Έκφρασης (h)	Παρουσία (+) και Απουσία (-) Πρωτεϊνών στην αντίδραση	Παρουσία (+) και Απουσία (-) υποστρώματος στην αντίδραση	Ενζυμικό Υπόστρωμα
3	+	+	Τυροσίνη
	-	+	
	+	+	DOPA
	-	+	
20	+	+	Τυροσίνη
	-	+	
	+	+	DOPA
	-	+	

Μετά τις τρεις και τις είκοσι ώρες συλλέχθηκε ποσότητα καλλιέργειας αντίστοιχη με 600OD μονάδες για να μετρηθεί το σύνολο των πρωτεϊνών που παρήχθησαν. Η ρήξη των κυττάρων έγινε με την συσκευή υπερήχων Labsonic U της εταιρίας Braun με 0,6 κύκλους και εύρος 70W για 10min για το κάθε δείγμα και η μέτρηση των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο Bradford. Οι αντιδράσεις που σχεδιάστηκαν για τον έλεγχο ενεργότητας των πρωτεϊνών είχαν υπόστρωμα την τυροσίνη (L-Tyrosine, TYR) αλλά και την DOPA (L-3,4 Dihydroxyphenylalanine) σε συγκεντρώσεις 1mM. Διαφοροποιούνταν στον τελικό όγκο αντίδρασης, στην ποσότητα πρωτεϊνών που περιείχαν και στην συγκέντρωση IPTG που

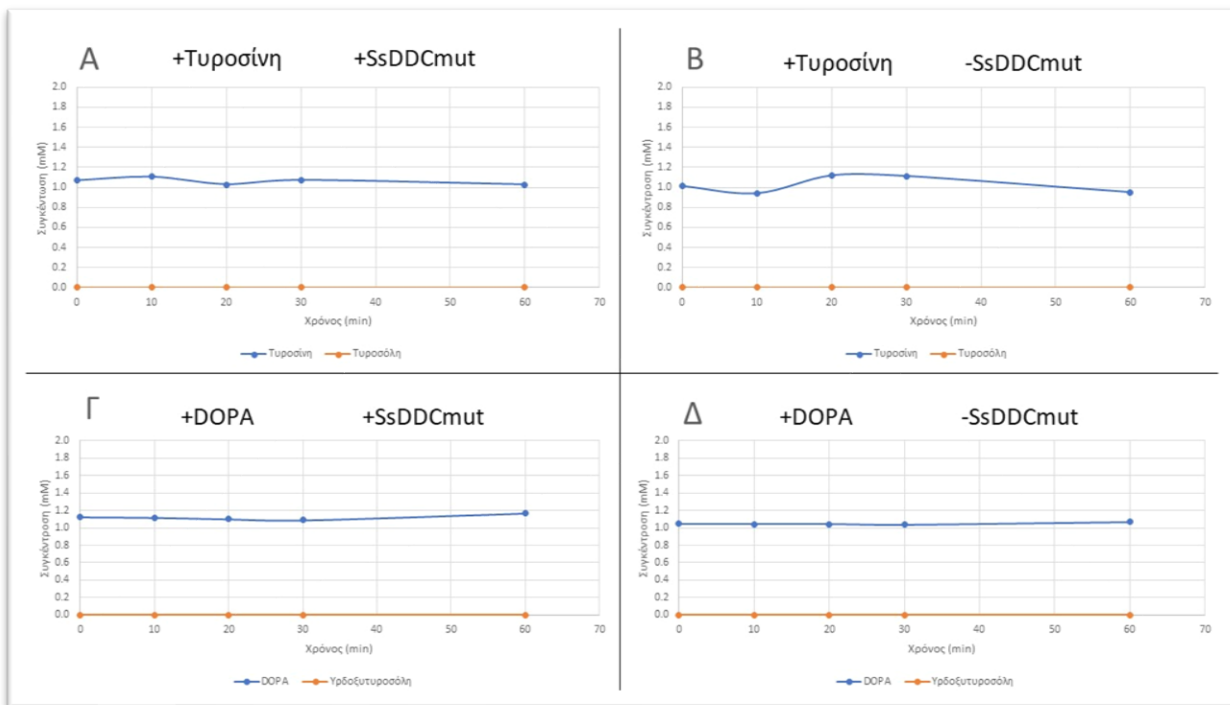
προστέθηκε κατά τις 3h ή 20h επαγωγής έκφρασης του γονιδίου. Οι αρχικές αντιδράσεις είχαν 1000μl τελικό όγκο αντίδρασης με 400μg πρωτεΐνες και 500μM IPTG (Πίνακας 12) ενώ οι επόμενες είχαν 2000μl τελικό όγκο αντίδρασης με την ποσότητα πρωτεϊνών να είναι 1000ng και 50μM, 200μM ή 1000μM συγκέντρωση IPTG (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Περιεχόμενο *in vitro* αντιδράσεων από τις καλλιέργειες με 3 και 20 ώρες επαγωγής έκφρασης με 50μM, 200μM και 1000μM IPTG και τελικό όγκο αντίδρασης 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών.

Ωρες Επαγωγής Έκφρασης (h)	Συγκεντρώσεις IPTG (μM)	Παρουσία (+) και Απουσία (-) Πρωτεϊνών στην αντίδραση	Παρουσία (+) και Απουσία (-) υποστρώματος στην αντίδραση	Ενζυμικό Υπόστρωμα
3	50	+	+	DOPA
		-	+	
		-	-	
	1000	+	+	
		+	-	
20	50	+	+	
		-	+	
		+	-	
	200	+	+	
		+	-	
	0	+	+	
		+	-	

Η εκτίμηση της *in vitro* ενεργότητας έγινε με την μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης στο μηχάνημα Capillary Electrophoresis (CE) G1605 της εταιρίας Agilent μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD). Οι συνθήκες κατά τις οποίες έγινε η ανάλυση των δειγμάτων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.12. Αρχικά αναλύθηκαν οι αντιδράσεις με 1000μl τελικό όγκο, ποσότητα πρωτεϊνών 400ng και 500μM IPTG για την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου (Εικόνα 21, Εικόνα 22).

Στον πρώτο κύκλο αντιδράσεων το ενζυμικό υπόστρωμα ήταν η τυροσίνη και η DOPA. Στις αντιδράσεις με υπόστρωμα την τυροσίνη το αναμενόμενο προϊόν είναι η τυροσόλη εάν το *SsDDCmut* δέχεται την τυροσίνη ως υπόστρωμα διαφορετικά δεν προβλέπεται κατανόηση της τυροσίνης και παραγωγή προϊόντος. Στις αντιδράσεις με υπόστρωμα την DOPA το προϊόν είναι η υδροξυτυροσόλη. Για την παρακολούθηση της *in vitro* ενεργότητας του *SsDDCmut* αναλύθηκαν δειγματοληψίες που έγιναν κατά την διάρκεια της αντίδρασης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (Εικόνα 21).

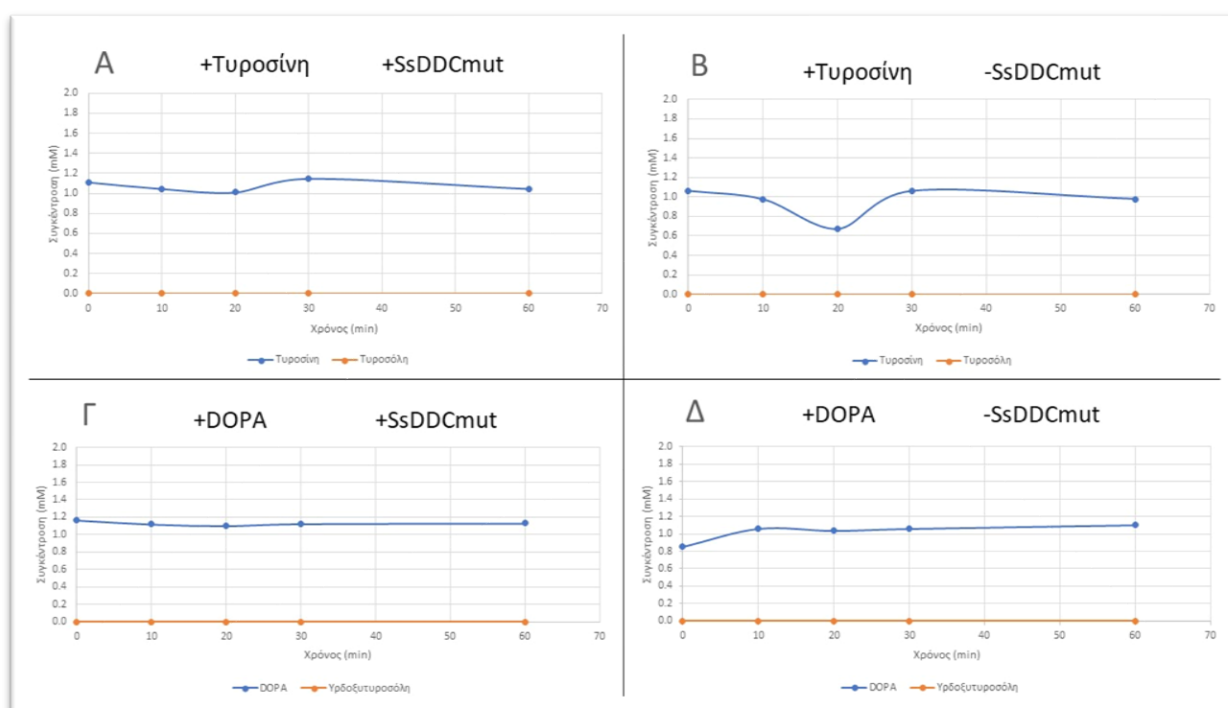


Εικόνα 21: *In vitro* ενεργότητα του pRSF-SsDDCmut με υπόστρωμα DOPA και Τυροσίνη και 3h επαγωγή έκφρασης με 500μM IPTG. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 1000μl και χρησιμοποιήθηκαν 400ng πρωτεϊνών. Η ενεργότητα του SsDDCmut με υπόστρωμα Τυροσίνη και προϊόν την Τυροσόλη (Α). Απουσία πρωτεϊνών και παρουσία Τυροσίνης με το προϊόν να είναι η Τυροσόλη (Β). Η ενεργότητα του SsDDCmut με υπόστρωμα Dopa και προϊόν την Υδροξυτυροσόλη (Γ). Απουσία πρωτεϊνών και παρουσία DOPA το προϊόν είναι η Υδροξυτυροσόλη (Δ).

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στην αρχή της αντίδρασης, η δεύτερη μετά από 10 λεπτά, η τρίτη μετά από 20 λεπτά, η τέταρτη μετά από 30 λεπτά και η πέμπτη μετά από 1 ώρα. Μια ακόμα δειγματοληψία έγινε 25 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης η οποία δεν εμφανίζεται στα διαγράμματα. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων τυροσίνη και DOPA ήταν 1mM. Τα αρχικά δείγματα που αναλύθηκαν για τον έλεγχο της *in vitro* ενεργότητας του SsDDCmut περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες η επαγωγή έκφρασης του γονιδίου είχε γίνει για 3h με συγκέντρωση IPTG 500μM και τυροσίνη για ενζυμικό υπόστρωμα. Επίσης αναλύθηκαν δείγματα από τις *in vitro* αντιδράσεις με σύνολο πρωτεϊνών από τις ίδιες βακτηριακές καλλιέργειες και ενζυμικό υπόστρωμα DOPA. Άλλα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν με το ενζυμικό υπόστρωμα τυροσίνη ή DOPA χωρίς το σύνολο των πρωτεϊνών, με το σύνολο των πρωτεϊνών αλλά χωρίς το ενζυμικό υπόστρωμα και χωρίς ενζυμικό υπόστρωμα ούτε σύνολο πρωτεϊνών (Εικόνα 21).

Επόμενα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν από τις *in vitro* αντιδράσεις του SsDDCmut που περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες όπου είχε γίνει 20h επαγωγή

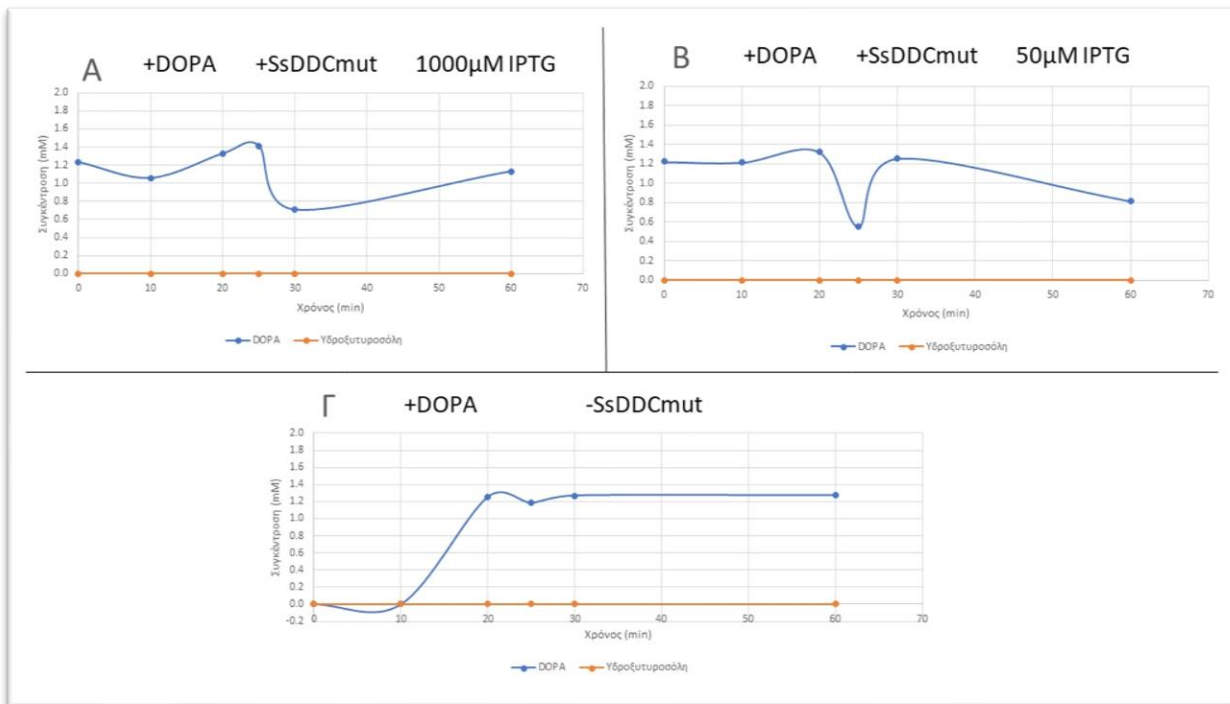
έκφρασης του γονιδίου με 500μM IPTG και ενζυμικό υπόστρωμα τυροσίνη ή DOPA. Αναλύθηκαν δείγματα που περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών και ενζυμικό υπόστρωμα τυροσίνη, ξεχωριστά δείγματα που περιείχαν DOPA και σύνολο πρωτεϊνών. Σε επόμενο στάδιο αναλύθηκαν δείγματα χωρίς σύνολο πρωτεϊνών αλλά με ενζυμικό υπόστρωμα τυροσίνη ή DOPA, δείγματα χωρίς ενζυμικό υπόστρωμα αλλά με σύνολο πρωτεϊνών και δείγματα χωρίς ενζυμικό υπόστρωμα ούτε σύνολο πρωτεϊνών (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: *In vitro* ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα DOPA και Τυροσίνη και 20h επαγωγή έκφρασης με 500μM IPTG. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 1000μl και χρησιμοποιήθηκαν 400ng πρωτεϊνών. Η ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα Τυροσίνη και προϊόν την Τυροσόλη (Α). Απουσία πρωτεϊνών και παρουσία Τυροσίνης το προϊόν είναι η Τυροσόλη (Β). Η ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα DOPA και προϊόν την Υδροξυτυροσόλη (Γ). Απουσία πρωτεϊνών και παρουσία DOPA το προϊόν είναι η Υδροξυτυροσόλη (Δ).

Στην συνέχεια αναλύθηκαν οι αντιδράσεις που είχαν τελικό όγκο 2000μl και περιείχαν ποσότητα πρωτεϊνών 1000ng, το ενζυμικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η DOPA και η επαγωγή έκφρασης του γονιδίου έγινε σε 3h και 20h με 50μM, 200μM και 1000μM IPTG (Εικόνα 23, Εικόνα 24, Εικόνα 25). Στον δεύτερο κύκλο αντιδράσεων αναλύθηκαν πρώτα τα δείγματα που περιείχαν πρωτεΐνες από βακτηριακές καλλιέργειες που είχε γίνει 3h επαγωγή έκφρασης του γονιδίου με 50μM και 1000μM IPTG. Άλλα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν χωρίς σύνολο πρωτεϊνών αλλά με ενζυμικό υπόστρωμα καθώς και δείγματα χωρίς πρωτεΐνες

ούτε ενζυμικό υπόστρωμα. Αναλύθηκαν επτά δείγματα για κάθε αντίδραση που αντιστοιχούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές τις αντίδρασης. Η πρώτη δειγματοληψία που αναλύθηκε ήταν στα 0 λεπτά, η δεύτερη στα 10 λεπτά, η τρίτη στα 20 λεπτά, η τέταρτη στα 25 λεπτά, η πέμπτη στα 30 λεπτά, η έκτη στη 1 ώρα και η έβδομη στις 25 ώρες (Εικόνα 23).



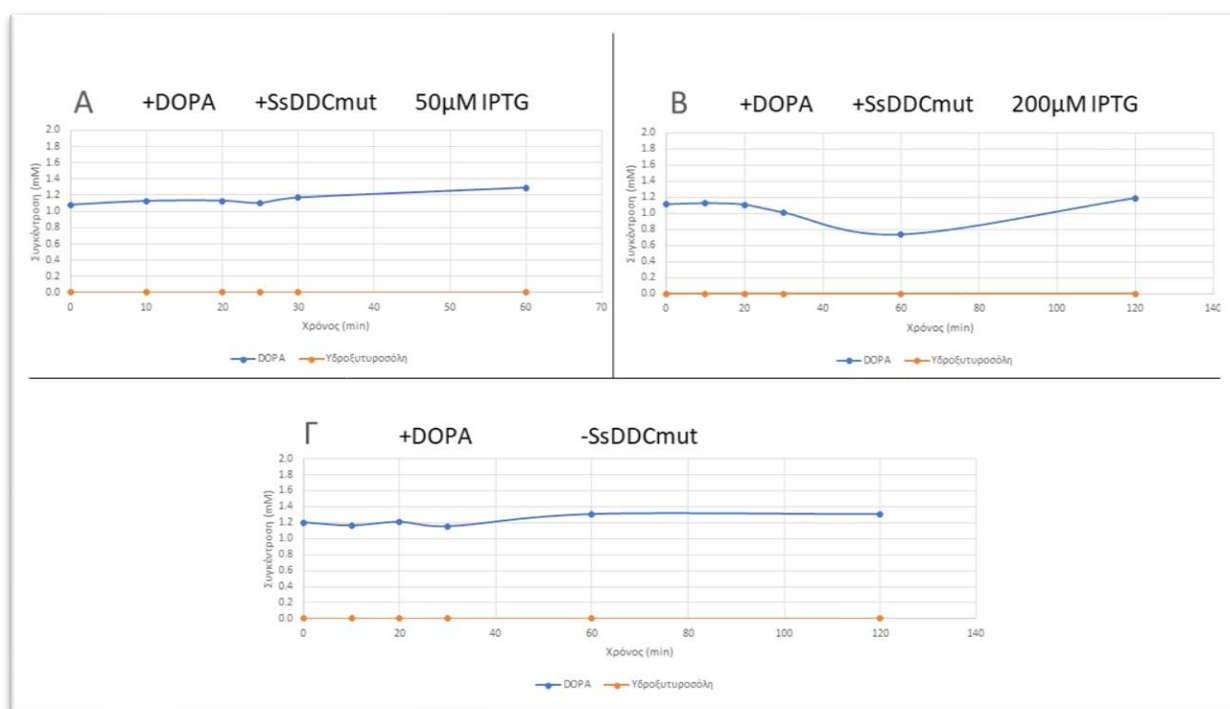
Εικόνα 23: *In vitro* ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα *DOPA*, 3h επαγωγή έκφρασης με 50µM και 1000µM *IPTG*. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης με προϊόν την Υδροξυτυροσώλη ήταν 2000µl και χρησιμοποιήθηκαν 1000ng πρωτεϊνών. Παρουσία πρωτεϊνών και υποστρώματος με 1000µM *IPTG* (A). Παρουσία πρωτεϊνών και υποστρώματος με 50µM *IPTG* (B). Απουσία πρωτεϊνών με υπόστρωμα *DOPA* (Γ).

Οι επόμενες αντιδράσεις που αναλύθηκαν περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες είχε γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου για 20h με 50µM και 200µM *IPTG* και είχαν συνολικό όγκο αντίδρασης 2000µl και ποσότητα πρωτεϊνών 1000ng (Εικόνα 24, Εικόνα 25). Αναλύθηκαν επίσης και δείγματα από αντιδράσεις που περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες δεν είχε γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου (Εικόνα 25).

Για την αντίδραση που περιείχε πρωτεΐνες από βακτηριακή καλλιέργεια που η επαγωγή έκφρασης έγινε με 50µM *IPTG* αναλύθηκαν επτά δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της αντίδρασης. Το πρώτο δείγμα αντιστοιχεί στην αρχή της αντίδρασης (0 λεπτά), το δεύτερο στα 10 λεπτά, το τρίτο στα 20 λεπτά, το τέταρτο στα 25 λεπτά, το πέμπτο

στα 30 λεπτά, το έκτο στα 60 λεπτά και το έβδομο στις 25 ώρες. Εφτά δείγματα αναλύθηκαν για τις αντιδράσεις που περιείχαν πρωτεΐνες από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες είχε γίνει επαγωγή έκφρασης με 200μM IPTG και για τις αντιδράσεις που δεν περιείχαν σύνολο πρωτεϊνών αλλά περιείχαν ενζυμικό υπόστρωμα.

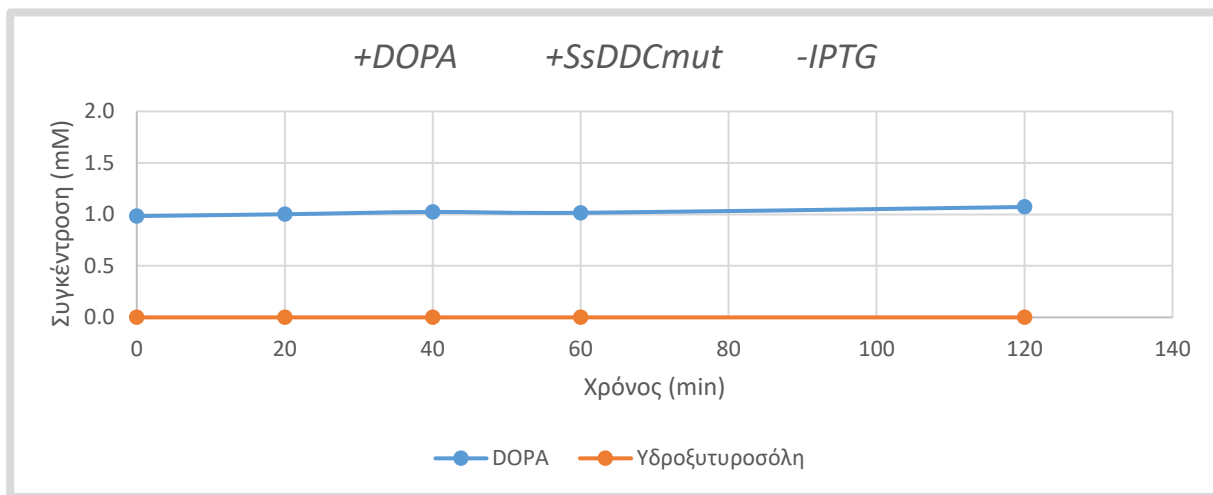
Οι χρονικές στιγμές της αντίδρασης που αντιστοιχούν τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι στην αρχή της αντίδρασης (0 λεπτά), στα 10 λεπτά, στα 20 λεπτά, στα 30 λεπτά, στα 60 λεπτά, στα 120 λεπτά και στις 25 ώρες. Αναλύθηκαν και δείγματα χωρίς σύνολο πρωτεϊνών αλλά με ενζυμικό υπόστρωμα DOPA, δείγματα χωρίς ενζυμικό υπόστρωμα αλλά με σύνολο πρωτεϊνών και δείγματα χωρίς ενζυμικό υπόστρωμα ούτε σύνολο πρωτεϊνών (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: *In vitro* ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα DOPA, 20h επαγωγή έκφρασης με 50μM και 200μM IPTG. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης με προϊόν την Υδροξυτυροσώλη ήταν 2000μl και χρησιμοποιήθηκαν 1000ng πρωτεϊνών. Παρουσία πρωτεϊνών και υποστρώματος με 50μM IPTG (A). Παρουσία πρωτεϊνών και υποστρώματος με 200μM IPTG (B). Απουσία πρωτεϊνών με υπόστρωμα DOPA (Γ).

Τα τελευταία δείγματα που αναλύθηκαν ήταν από τις αντιδράσεις που περιείχαν το ενζυμικό υπόστρωμα DOPA και σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες δεν είχε γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου. Αναλύθηκαν έξι δείγματα για την κάθε αντίδραση όπου αντιστοιχούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της αντίδρασης. Το πρώτο δείγμα αντιστοιχεί στην αρχή της αντίδρασης (0 λεπτά), το δεύτερο στα 20 λεπτά, το τρίτο στα

40 λεπτά, το τέταρτο στα 60 λεπτά, το πέμπτο στα 120 λεπτά, και το έκτο στις 25 ώρες. Η συγκέντρωση του ενζυμικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ήταν 1mM. Η άλλη αντίδραση που αναλύθηκε περιείχε σύνολο πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες δεν είχε γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου αλλά χωρίς το ενζυμικό υπόστρωμα DOPA. τα δείγματα που αναλύθηκαν αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της αντίδρασης όπως περιγράφεται παραπάνω (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: *In vitro* ενεργότητα του *SsDDCmut* με υπόστρωμα *DOPA*, χωρίς επαγωγή έκφρασης (χωρίς *IPTG*). Ο συνολικός όγκος αντίδρασης με προϊόν την Υδροξυτυροσόλη ήταν 2000μl και χρησιμοποιήθηκαν 1000ng πρωτεϊνών.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σημαντικό είναι να μην σταματάει ποτέ κανείς να προβληματίζεται, ή να μαθαίνει.

Albert Einstein

Τα γονίδια *PcAAS* και *RsTYR* με το να δέχονται δύο διαφορετικά υποστρώματα οδηγούν στην δημιουργία ενός διπλού βιολογικού μονοπατιού στην παραγωγή υδροξυτυροσόλης από την τυροσίνη. Το σύστημα αυτό φαίνεται να είναι απαιτητικό ως προς την ποσότητα και την αποδοτικότητα του ενζύμου καθώς τα προαναφερθέντα γονίδια συμμετέχουν σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις το καθένα και σε διαφορετικές διαδρομές του μονοπατιού. Το *RsTYR* μετατρέπει την τυροσίνη σε DOPA και την τυροσόλη σε υδροξυτυροσόλη και το *PcAAS* μετατρέπει την τυροσίνη σε HPAΑ και την DOPA σε DHPAA (Εικόνα 8 κεφάλαιο 1.4). Σύμφωνα με τους Trantas *et al.*, 2019 τα παραπάνω γονίδια επιτελούν της αντιδράσεις αυτές με διαφορετικές ταχύτητες το οποίο μπορεί να συμβάλει αρνητικά στον χρόνο παραγωγής υδροξυτυροσόλης λόγω της ασύγχρονης διαθεσιμότητας προϊόντων και υποστρωμάτων. Επιπλέον, λόγω του πλήθους των αντιδράσεων και της διπλής δεκτικότητας υποστρωμάτων η ποσότητα ενζύμου που θα παραχθεί θα μοιραστεί στις παραπάνω αντιδράσεις οι οποίες, αν και όλες συμβάλουν στην παραγωγή υδροξυτυροσόλης, φαίνονται να είναι με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις.

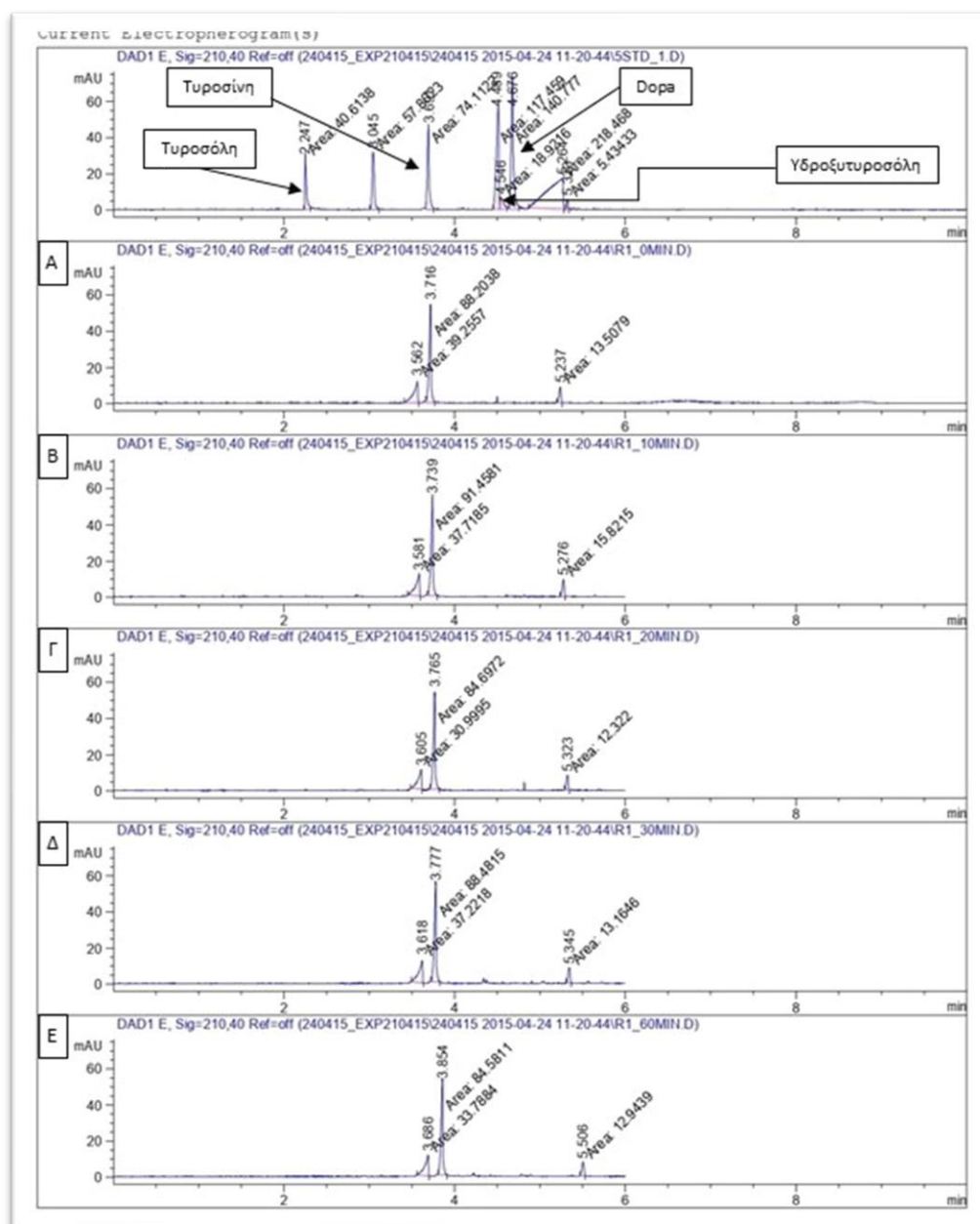
Η χρήση του ενζύμου SsDDCmut στο βιολογικό μονοπάτι βιοσύνθεσης υδροξυτυροσόλης έγινε με στόχο την βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραγωγής της. Λόγω της ικανότητάς του να δέχεται μόνο την DOPA ως υπόστρωμα και να επιτελεί αποκαρβοξυλίωση και ταυτόχρονη απαμίνωση σε αυτήν πιθανώς να συμβάλει στην ταχύτερη και αποδοτικότερη, από πλευράς μεταβολισμού, παραγωγή υδροξυτυροσόλης. Συνεπώς με την χρήση του ενζύμου SsDDCmut η υδροξυτυροσόλη μπορεί να παραχθεί από την L-DOPA μετά από δύο διαδοχικές αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης-απαμίνωσης και αναγωγής.

Στην ανάλυση στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση δεν φάνηκε κατανάλωση της Τυροσίνης ή της DOPA, μερικές διακυμάνσεις που εμφανίστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικές λόγω της λειτουργίας του μηχανήματος συνεπώς δεν υπήρξε μεταβολή στην συγκέντρωση του υποστρώματος ούτε παραγωγή υδροξυτυροσόλης ή κάποιου άλλου προϊόντος. Συμπερασματικά με την χρήση του φορέα pRSF-SsDDCmut στο *E.coli* παράχθηκε πρωτεΐνη χωρίς αυτή να είναι λειτουργική και να οδηγήσει στην βιοσύνθεση υδροξυτυροσόλης.

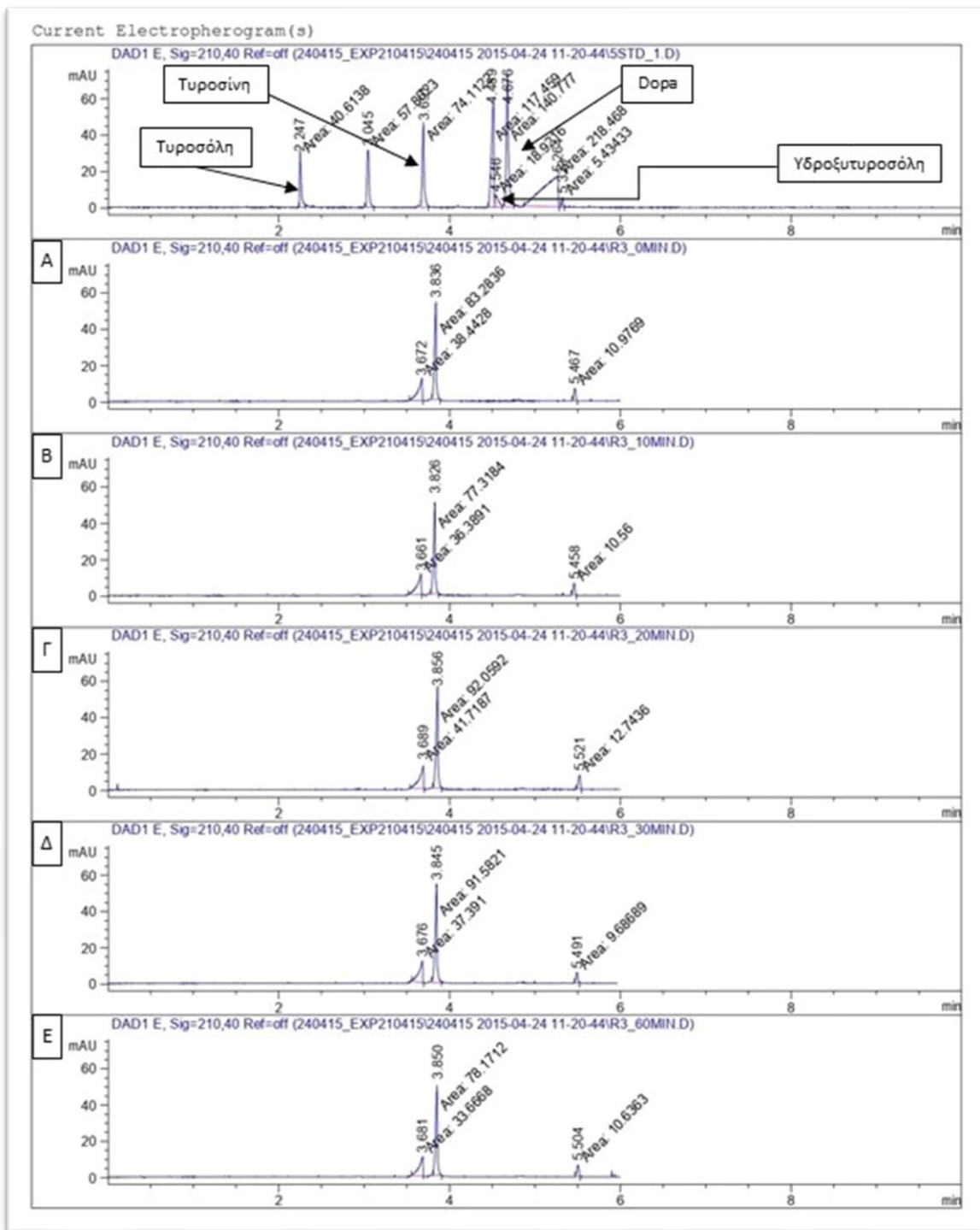
Και άλλοι έχουν παρατηρήσει την έλλειψη ενεργότητας ενζύμων της οικογένειας των συνθασών των φαινυλακεταλδεΐδων σε παρόμοιο σύστημα έκφρασης (Achmon *et al*, 2014) γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες έκφρασης δεν είναι ιδανικές και θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν. Επίσης, μια άλλη προσέγγιση θα μπορούσε να περιλαμβάνει την κλωνοποίηση και πρωτεϊνική έκφραση της τροποποιημένης νεφρικής αποκαρβοξυλάσης της DOPA από τον χοίρο, από τους Bertoldi *et al.*, 2002 χωρίς να γίνει η μεταλλαξιγένεση με SOE-PCR για την απενεργοποίηση της NdeI θέσης για να ελεγχθεί αν η τροποποίηση αυτή επηρέασε την λειτουργικότητα του ενζύμου. Τέλος, στο πλαίσιο αυτής της εργασίας επιχειρήθηκε η κατασκευή των πλασμιδίων pRSF-SsDDCmut-RsTYR, pCDF-SsDDCmut, pCDF-SsDDCmut-RsTYR ώστε σε επόμενα στάδια να αξιολογηθούν ως προς την ικανότητά τους στην παραγωγή υδροξυτυροσόλης. Μετά από αρνητικά αποτελέσματα των υποκλωνοποιήσεων συμπεραίνεται πως χρειάζεται μεγαλύτερη προσπάθεια για την επιτυχή κατασκευή τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΗΛΕΚΤΡΟΦΕΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

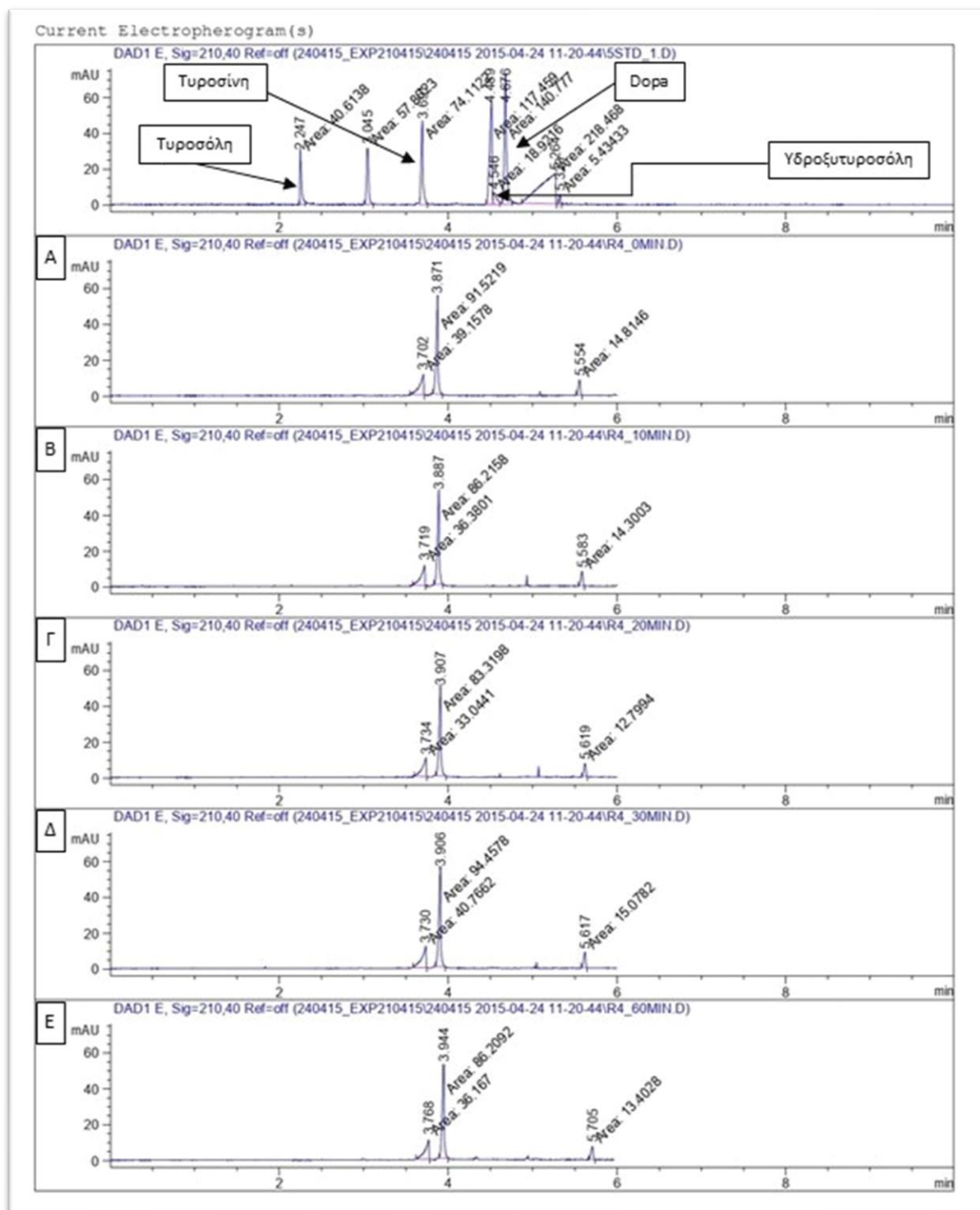
ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ



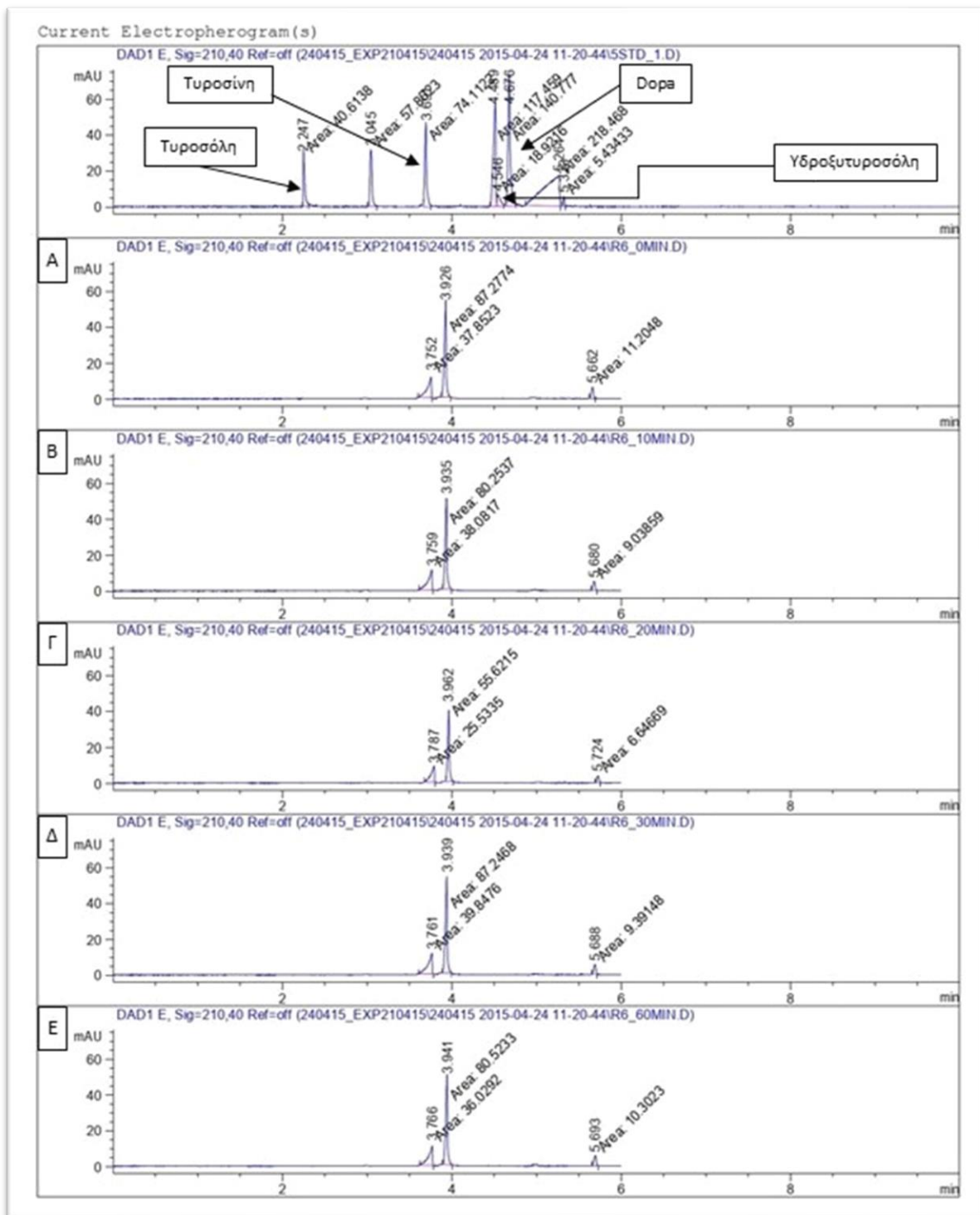
Εικόνα 26: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα αντίγνωσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 3h επαγωγής έκφρασης με 500μM IPTG και υπόστρωμα Τυροσίνη. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



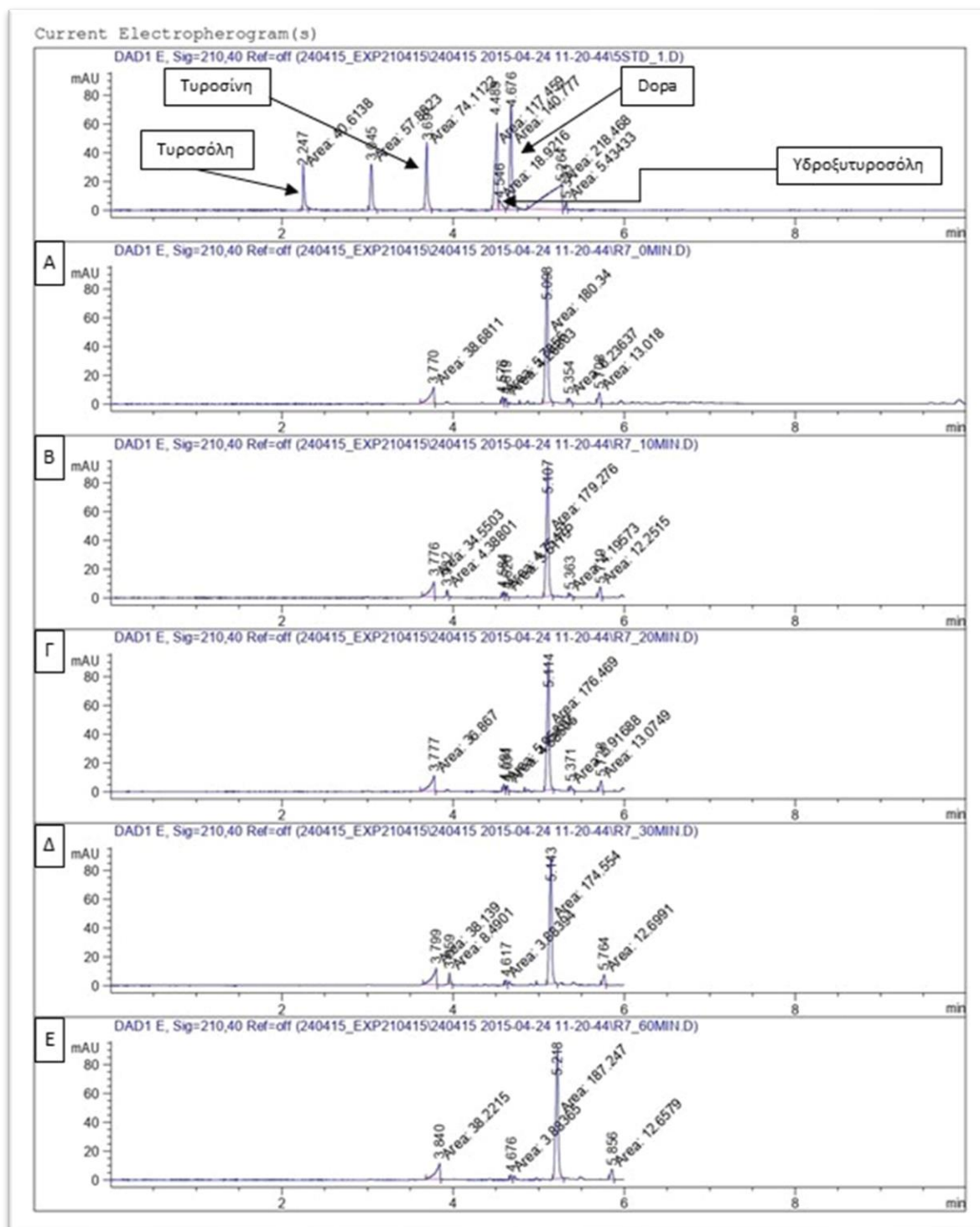
Εικόνα 27: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut χωρίς το σύνολο των πρωτεϊνών και υπόστρωμα Τυροσίνη. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



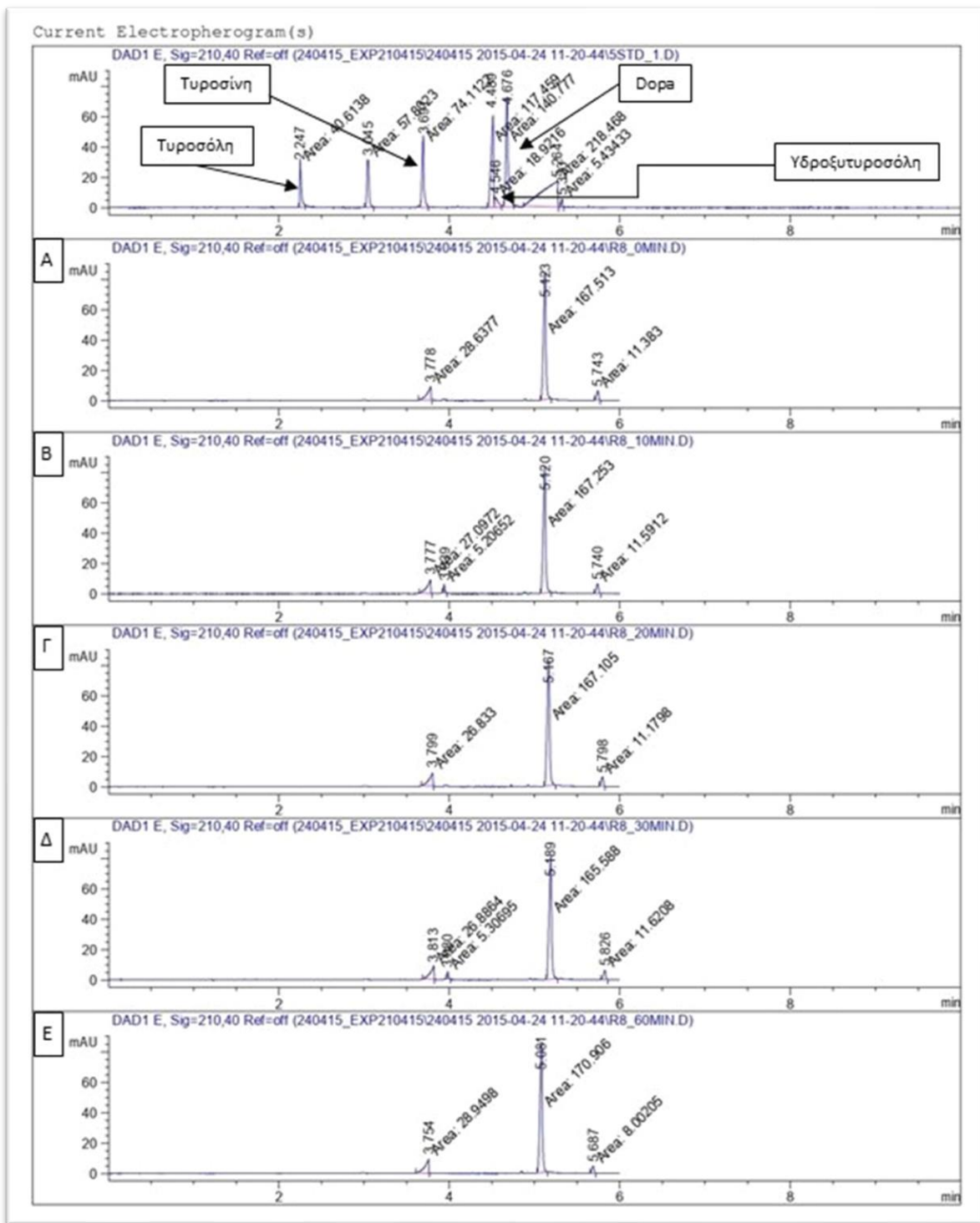
Εικόνα 28: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα αντίγνωσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του rRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 20h επαγωγής έκφρασης με 500μM IPTG και υπόστρωμα Τυροσίνη. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



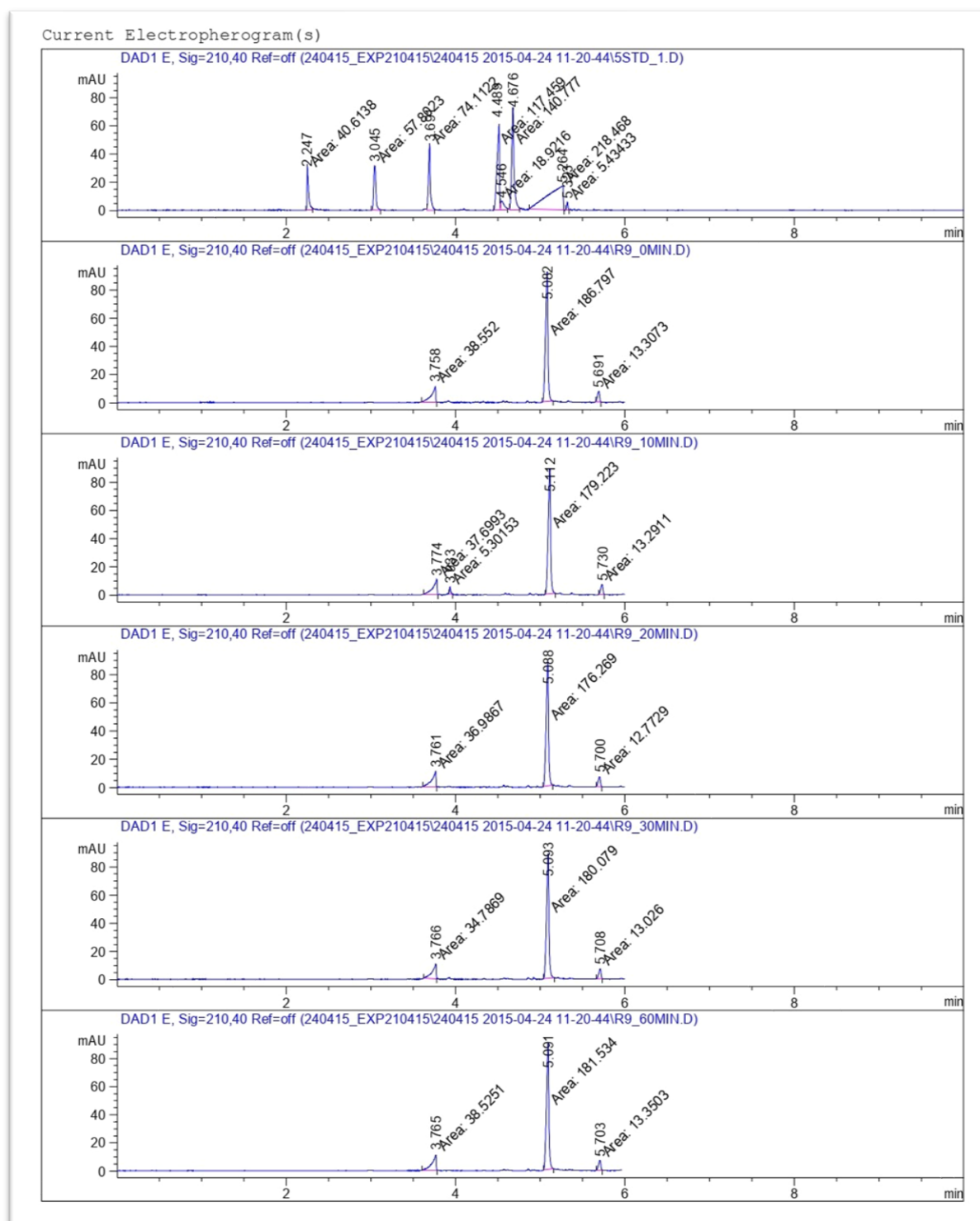
Εικόνα 29: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα αντίγνωσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRsf-SsDDCmt χωρίς το σύνολο των πρωτεϊνών και υπόστρωμα Τυροσίνη. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



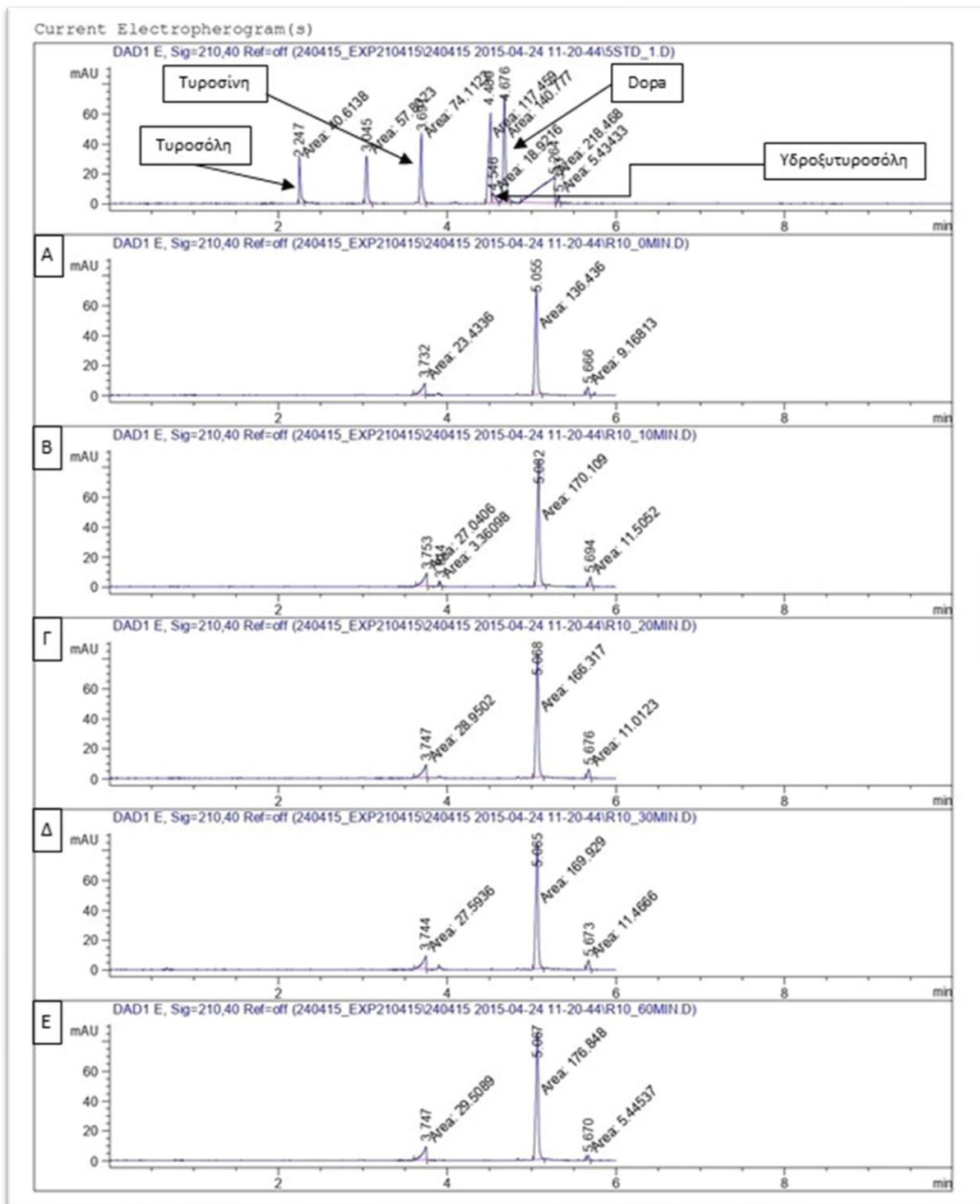
Εικόνα 30: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDC με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 3h επαγωγής έκφρασης με 500μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



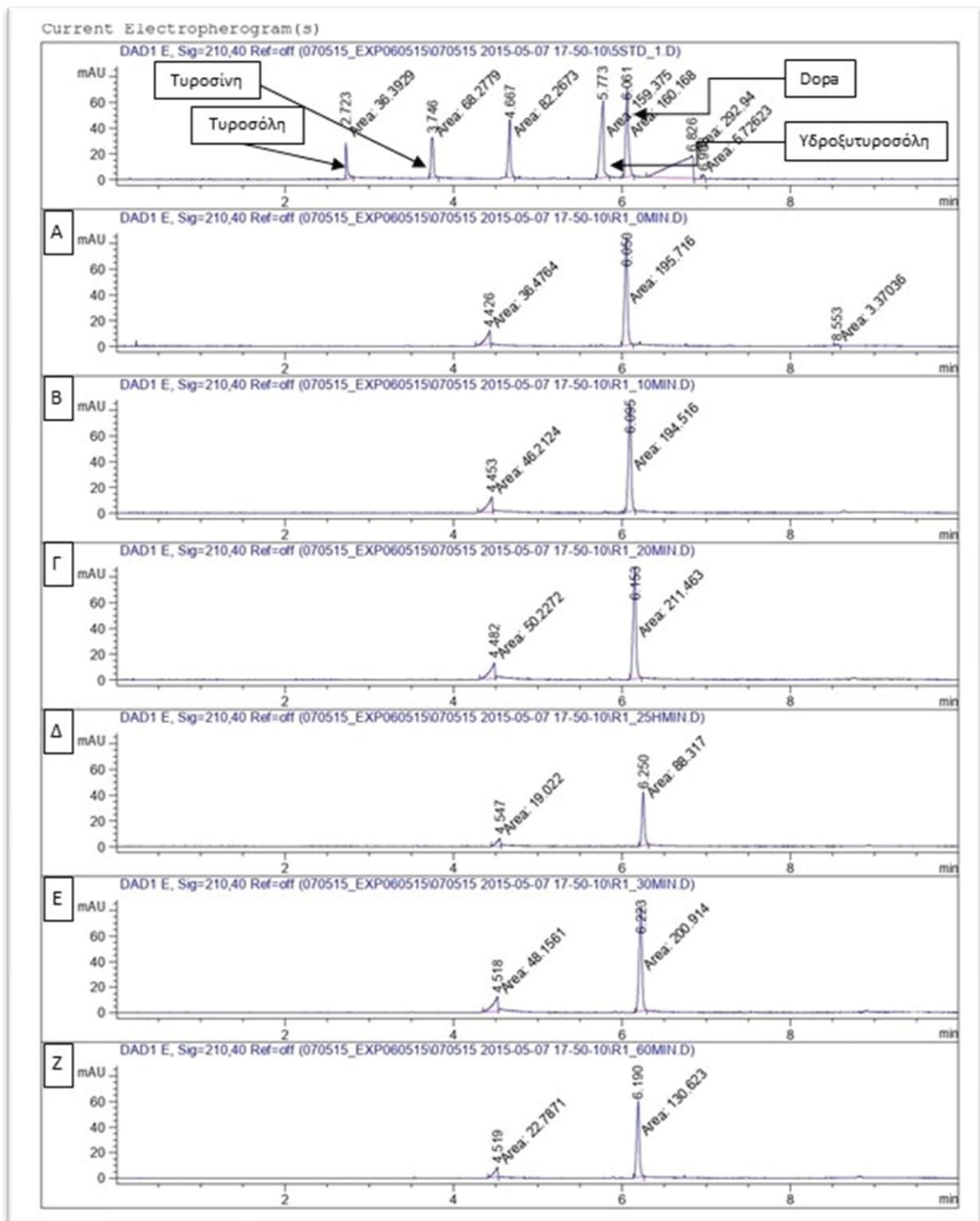
Εικόνα 31: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut χωρίς το σύνολο πρωτεϊνών και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



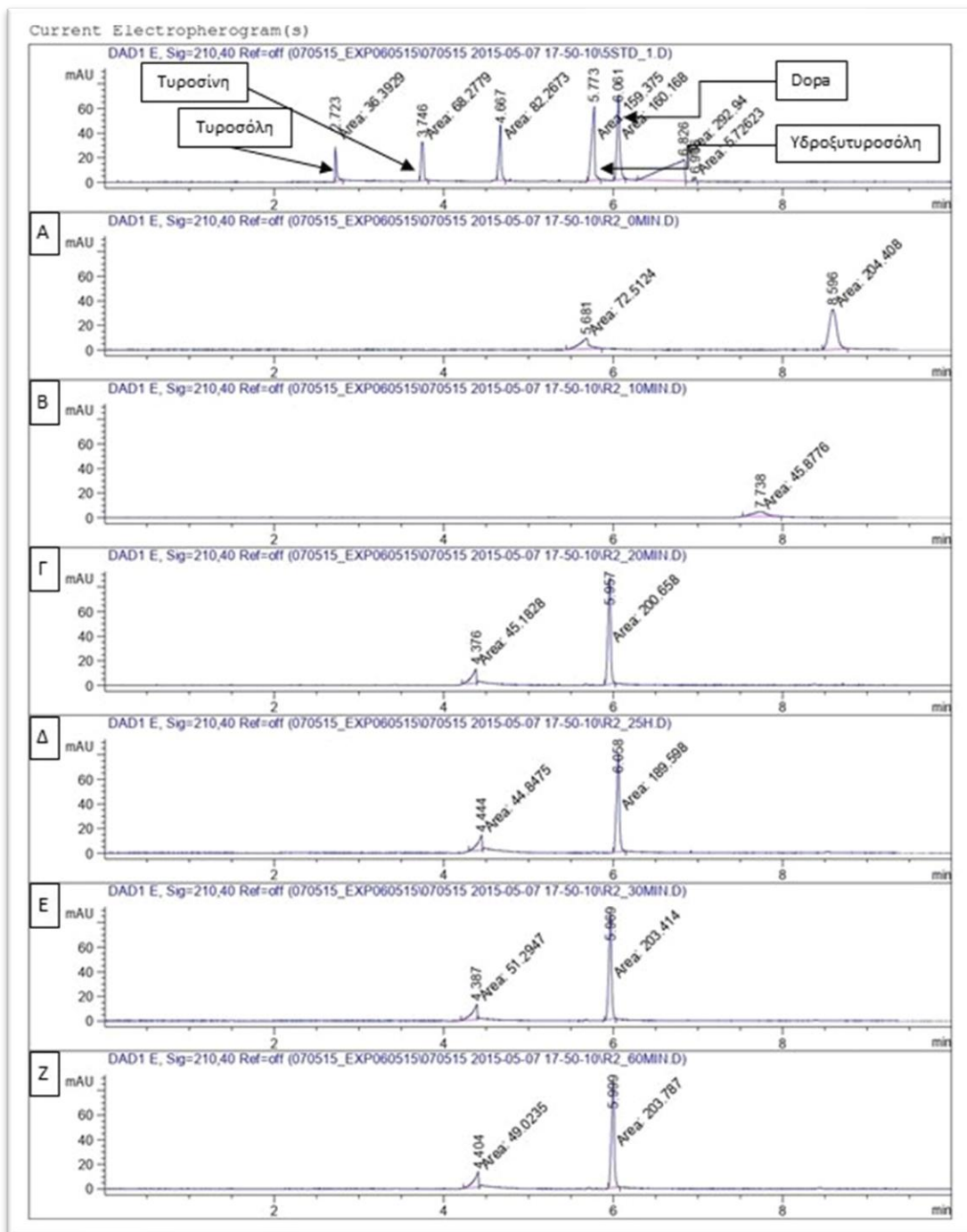
Εικόνα 32: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα αντίγνωσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 20h επαγωγής έκφρασης με 500μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



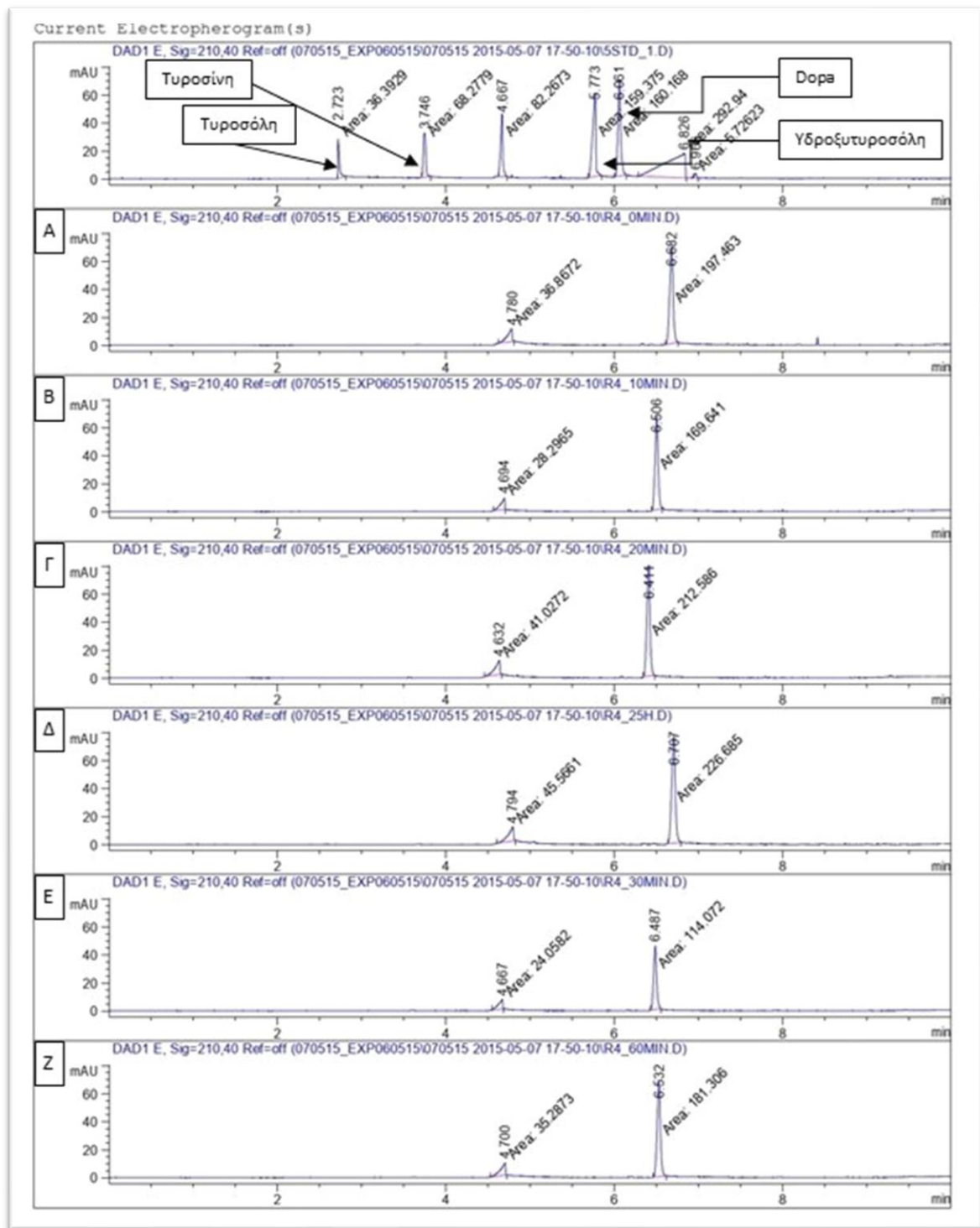
Εικόνα 33: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 1000μl και 400ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut χωρίς το σύνολο πρωτεϊνών και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ) και μετά από 60min (E).



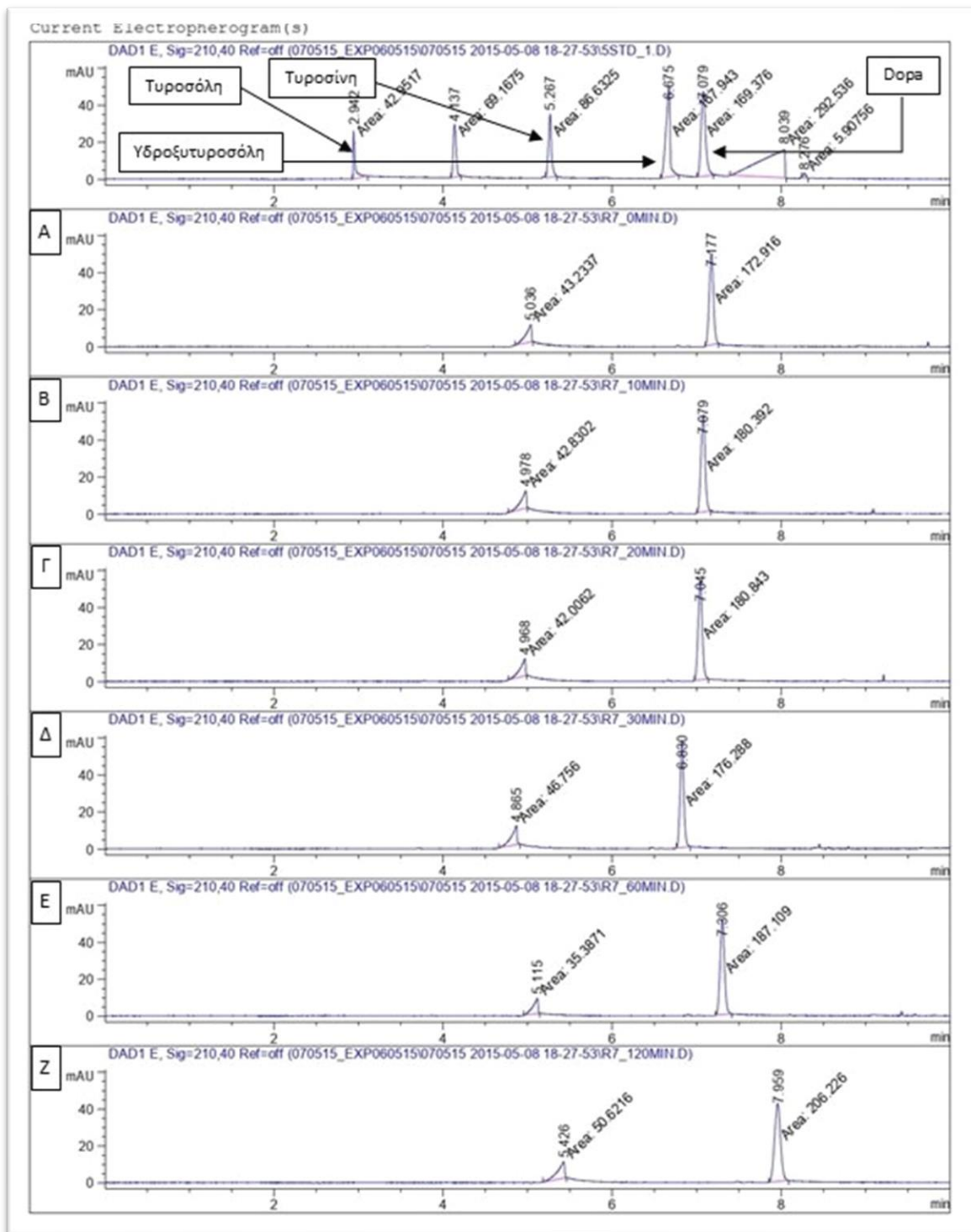
Εικόνα 34: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του rRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 3h επαγωγής έκφρασης με 50μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 25min (Δ), μετά από 30min (E) και μετά από 60min (Z).



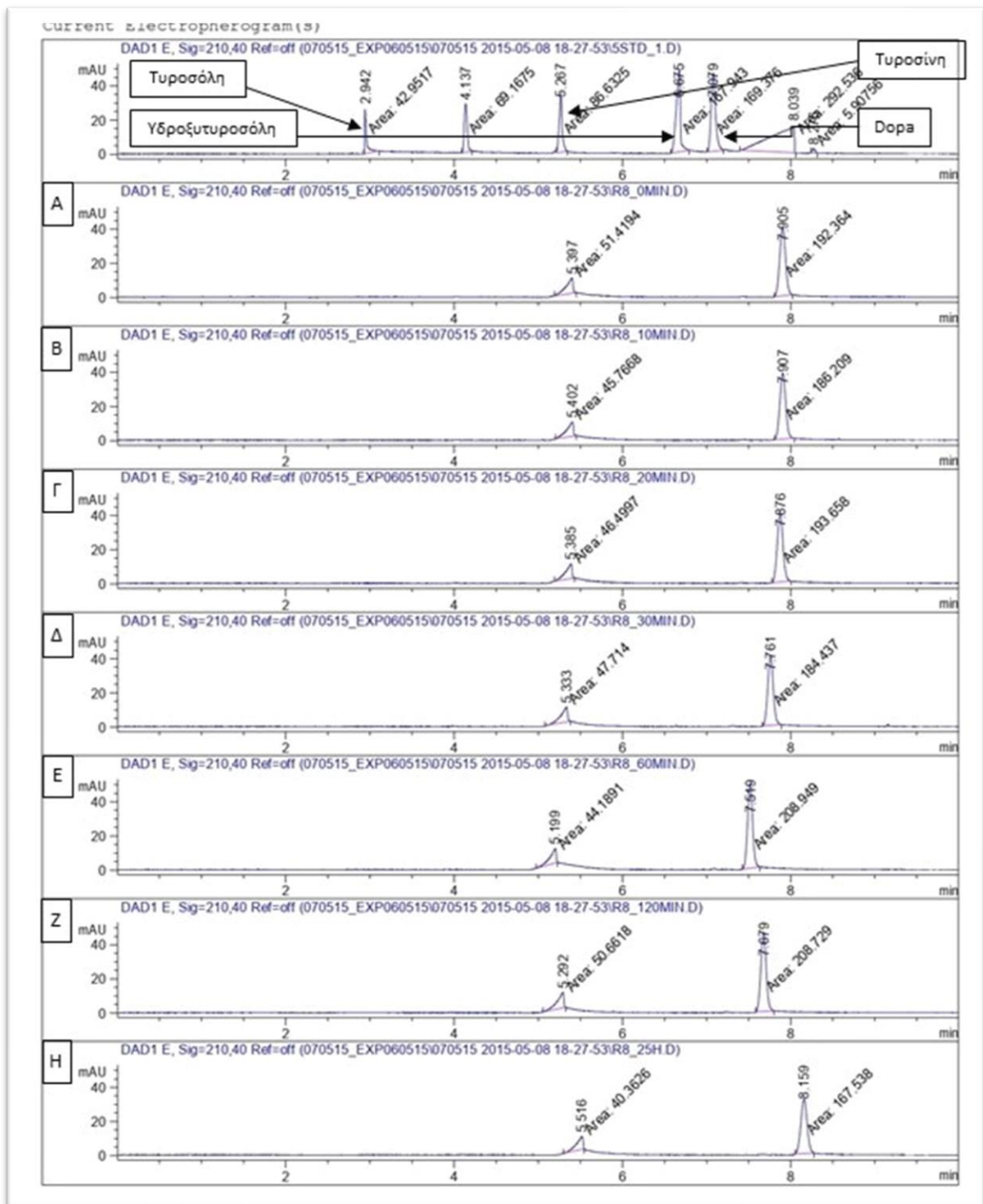
Εικόνα 35: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδρασης, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCμιτωχρίς το σύνολο πρωτεϊνών και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 25min (Δ), μετά από 30min (E) και μετά από 60min (Z).



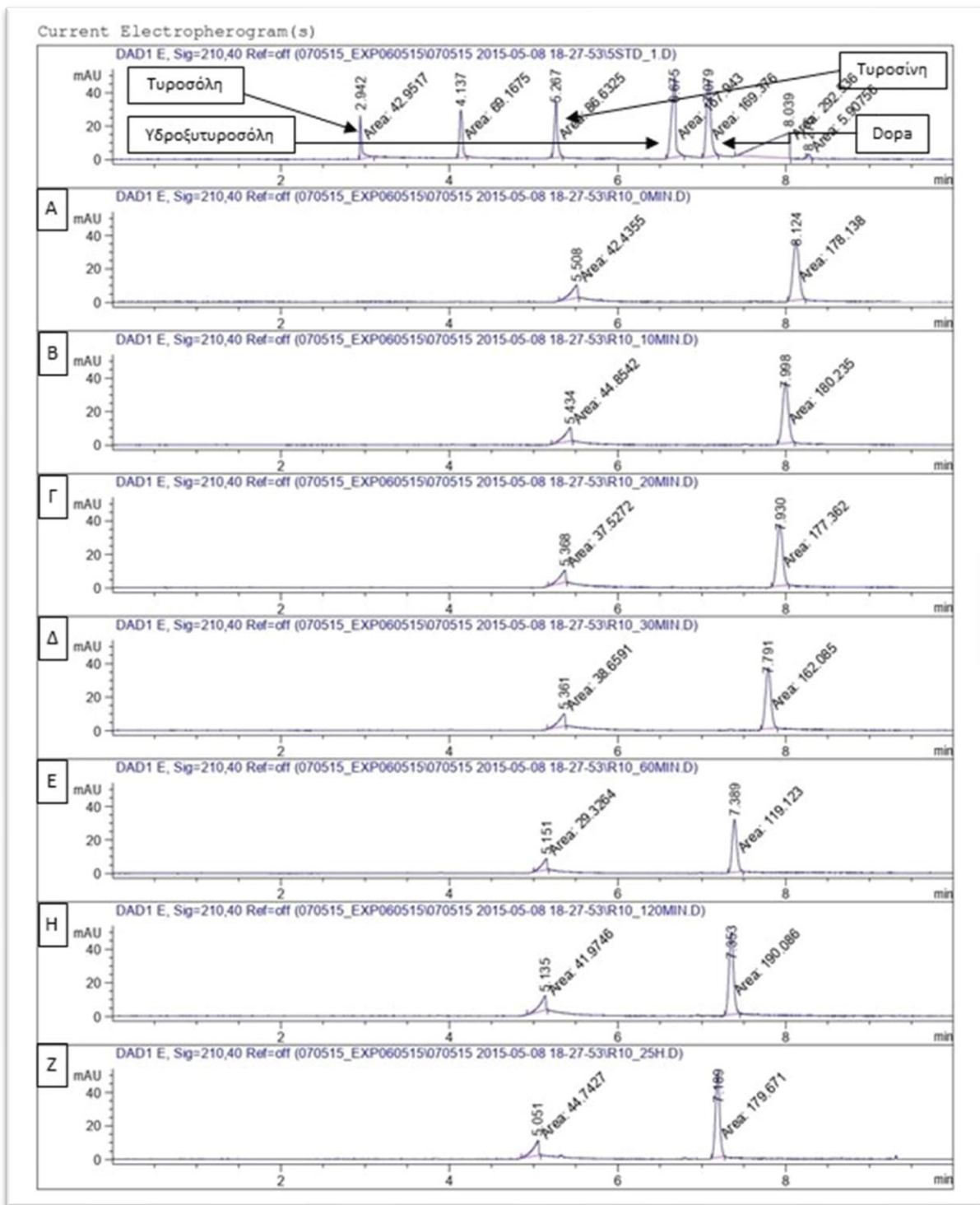
Εικόνα 36: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 3h επαγωγής έκφρασης με 1000μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 25min (Δ), μετά από 30min (E) και μετά από 60min (Z).



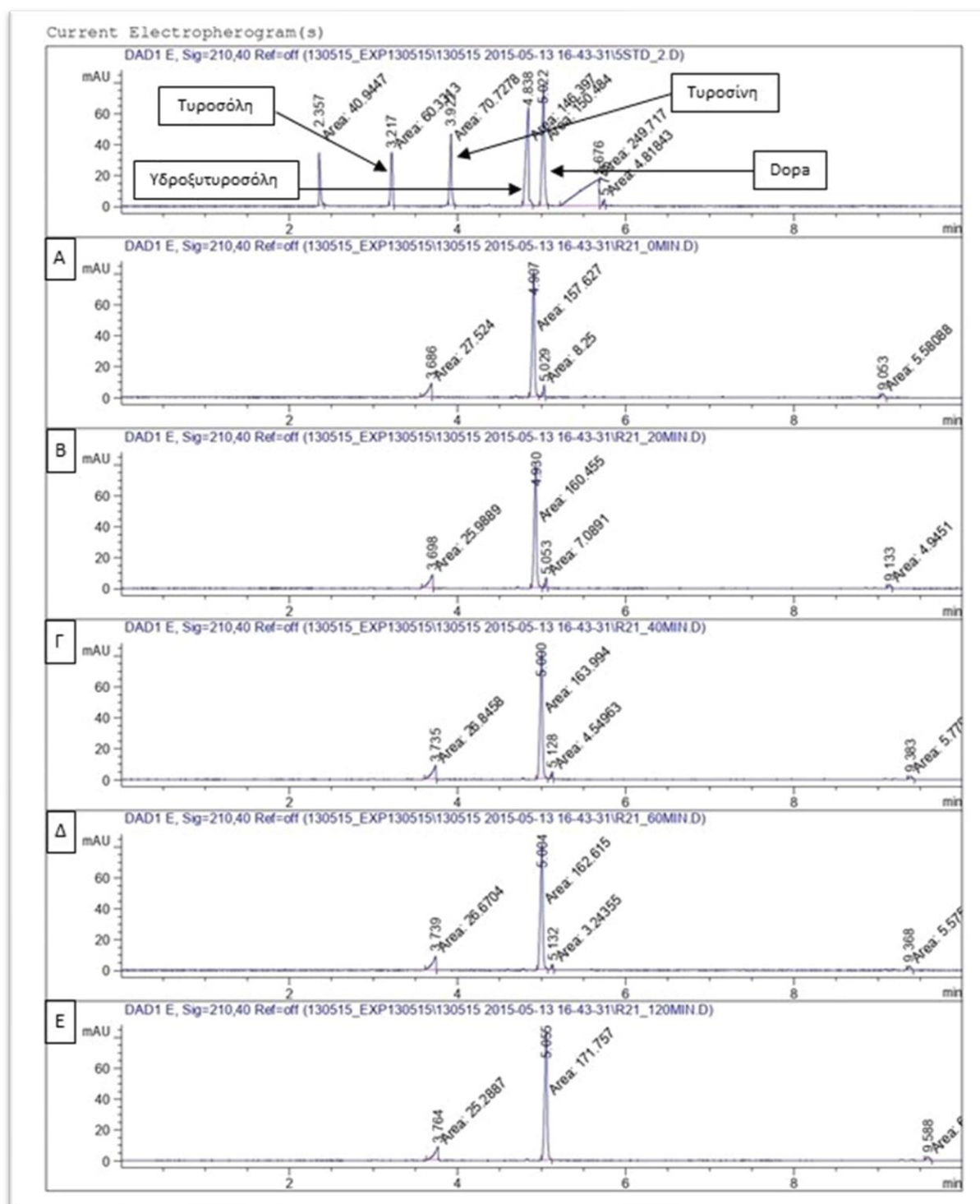
Εικόνα 37: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδρασης, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του rRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 20h επαγωγής έκφρασης με 50μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρώτοντες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ), μετά από 60min (E) και μετά από 120min (Z).



Εικόνα 38: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut χωρίς το σύνολο πρωτεϊνών και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ), μετά από 60min (E), μετά από 120min (Z) και μετά από 25h (H).



Εικόνα 39: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα ανίχνευσης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδρασης, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών από τις 20h επαγωγή έκφρασης με 200μM IPTG και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρώττες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 10min (B), μετά από 20min (Γ), μετά από 30min (Δ), μετά από 60min (E), μετά από 120min (Z) και μετά από 25h (H).



Εικόνα 40: Ηλεκτροφερογράμματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης μαζί με το σύστημα αντίδρασης με παράταξη φωτοδιόδων. Ανάλυση από την *in vitro* αντίδραση, με συνολικό όγκο 2000μl και 1000ng πρωτεϊνών, του pRSF-SsDDCmut με το σύνολο πρωτεϊνών χωρίς επαγωγή έκφρασης και υπόστρωμα DOPA. Στο πρώτο ηλεκτροφερογράμμα φαίνονται οι πρότυπες ενώσεις σε γνωστές συγκεντρώσεις, στα υπόλοιπα η ανάλυση της αντίδρασης σε διάφορους χρόνους. Στην έναρξη της αντίδρασης (0min, A), μετά από 20min (B), μετά από 40min (Γ), μετά από 60min (Δ), μετά από 120min (E).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ – ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Αλληλουχία του γονιδίου *SsDDCmut*

ATGGCGAATGCCAGCGATTTCCGTCGACGCGGCAAAGAAATGGTGGATTACATGGCGGATTA
CCTGGAAGGCATCGAAGGTCGTCAGGTGTACCCGGATGTGCAGCCGGGGTACCTGCGTCCGC
TGATCCCGGCGACCGCCCCGCAGGAACCGGATACCTTCGAAGATATCCTGCAGGATGTGGAA
AAAATCATCATGCCGGGGGTGACCCACTGGCACAGCCCGTACTTCTTCGCGTACTTCCCGAC
CGCCAGCAGCTACCCGGCGATGCTGGCGGATATGCTGTGCGGTGCGATCGGATGCATCGGTT
TCAGCTGGGCGGCTAGCCCGGCGTGCACCGAACTCGAGACCGTGATGATGGATTGGCTGGGC
AAAATGCTCCAGCTTCCGGAAGCGTTCTTGGCGGGCGAAGCCGGTGAAGGCGGCGGCGTGAT
CCAGGGTAGCGCCAGCGAAGCCACCCTGGTGGCGCTGCTGGCGGCGCGTACCAAAGTGGTGC
GACGTCTGCAAGCGGCGAGCCCGGGCCTGACCCAGGGCGCGGTGCTGGAAAACTAGTGGCG
TACGCGAGTGATCAGGCGCACAGCAGCGTGGAACGTGCCGGCCTGATCGGCGGCGTGAAACT
GAAAGCGATCCCGAGCGATGGCAAATTCGCGATGCGTGCAGCGCGCTGCAGGAGGCCCTGG
AGAGAGACAAGGCTGCCGGCCTGATTCCTTTCTTCGTGGTGGCTACGCTGGGGACCACATCG
TGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGTGGGACCCATCTGTCACGAAGAGGACATTTGGCT
GCACGTGGATGCTGCCTACGCAGGCAGTGCCTTCATCTGCCCTGAGTTCGGGCACCTGCTGA
ATGGAGTGGAGTTTGCAGATTCATTTAACTTTAATCCCCACAAATGGCTCTTGGTGAATTTT
GACTGCTCGGCTATGTGGGTGAAAAGGAGAACGGACCTGACTGGAGCCTTCAAATTGGACCC
CGTGTTCCTTAAAGCACAGCCACCAGGGCTCGGGGCTTATCACGGACTACAGGCACTGGCAGC
TGCCACTGGGTTCGGCGATTCGGTCCCTGAAAATGTGGTTTTGTTTTTAGGATGTACGGAGTC
AAGGGACTGCAGGCCTATATCCGCAAGCACGTGCAGCTGTCTCATGAGTTTGAGGCATTTGT
GCTTCAGGATCCCCGCTTTGAAGTCTGTGCCGAAGTACCCTGGGGCTGGTGTGTTTTCCGGC
TGAAGGGCTCCGACGGACTGAATGAAGCGCTTCTGGAAAGGATAAACAGCGCCAGGAAAATC
CACTTGGTTCCCTGTCGCCTGAGGGGCCAGTTCGTGCTGCGGTTCCGCATCTGCTCGCGCAA
GGTGGAGTCGGGCCACGTGCGGCTGGCCTGGGAGCACATCCGAGGGCTGGCGGCCGAGCTGC
TGGCCGCGGAGGAGGGAAAGGCAGAGATCAAAGTTGA

Αλληλουχία του φορέα *pRSF-SsDDCmut*

GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGA
GATATACCATGGCGAATGCCAGCGATTTCCGTCGACGCGGCGCAAAGAAATGGTGGATTACAT
GGCGGATTACCTGGAAGGCATCGAAGGTCGTCAGGTGTACCCGGATGTGCAGCCGGGGTACC

TGCGTCCGCTGATCCCGGCGACCGCCCCGCAGGAACCGGATACCTTCGAAGATATCCTGCAG
GATGTGGAAAAATCATCATGCCGGGGGTGACCCACTGGCACAGCCCGTACTTCTTCGCGTA
CTTCCCGACCGCCAGCAGCTACCCGGCGATGCTGGCGGATATGCTGTGCGGTGCGATCGGAT
GCATCGGTTTTAGCTGGGCGGCTAGCCCCGGCGTGCACCGAACTCGAGACCGTGATGATGGAT
TGGCTGGGCAAAATGCTCCAGCTTCCGGAAGCGTTCCTGGCGGGCGAAGCCGGTGAAGGCGG
CGGCGTGATCCAGGGTAGCGCCAGCGAAGCCACCCTGGTGGCGCTGCTGGCGGGCGCGTACCA
AAGTGGTGCAGCTCTGCAAGCGGCGAGCCCGGGCCTGACCCAGGGCGCGGTGCTGGAAAAA
CTAGTGGCGTACGCGAGTGATCAGGCGCACAGCAGCGTGGAACGTGCCGGCCTGATCGGCGG
CGTGAAACTGAAAGCGATCCCGAGCGATGGCAAATTCGCGATGCGTGCAGCGCGCTGCAGG
AGGCCCTGGAGAGAGACAAGGCTGCCGGCCTGATTCCTTTCTTCGTGGTGGCTACGCTGGGG
ACCACATCGTGCTGCTCCTTTGACAATCTCTTAGAAGTGGGACCCATCTGTACGAAGAGGA
CATTTGGCTGCACGTGGATGCTGCCTACGCAGGCAGTGCCTTCATCTGCCCTGAGTTCGGGC
ACCTGCTGAATGGAGTGGAGTTTGCAGATTCATTTAACTTTAATCCCCACAAATGGCTCTTG
GTGAATTTTACTGCTCGGCTATGTGGGTGAAAAGGAGAACGGACCTGACTGGAGCCTTCAA
ATTGGACCCCGTGTTCTTAAAGCACAGCCACCAGGGCTCGGGGCTTATCACGGACTACAGGC
ACTGGCAGCTGCCACTGGGTGGCGATTCCGGTCCCTGAAAATGTGGTTTGTTTTTAGGATG
TACGGAGTCAAGGGACTGCAGGCCTATATCCGCAAGCACGTGCAGCTGTCTCATGAGTTTGA
GGCATTGTGCTTCAGGATCCCCGCTTTGAAGTCTGTGCCGAAGTCACCCTGGGGCTGGTGT
GTTTCCGGCTGAAGGGCTCCGACGGACTGAATGAAGCGCTTCTGGAAAGGATAAACAGCGCC
AGGAAAATCCACTTGGTTCCCTGTCGCTGAGGGGCCAGTTCGTGCTGCGGTTCCGCATCTG
CTCGCGCAAGGTGGAGTCCGGCCACGTGCGGCTGGCCTGGGAGCACATCCGAGGGCTGGCGG
CCGAGCTGCTGGCCGCGGAGGAGGGAAAGGCAGAGATCAAAAGTTGAAGTGCCCTGAAGAGC
AGAATCGAAGCTTGCGGCCGATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACG
GCCGATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCC
ATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGCAGATCTCAATTGGATAT
CGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCCGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCG
AAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGC
CACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
TGCTGAAACCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCG
GTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGACGACAAGCTG
ACGACCGGGTCTCCGCAAGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTA
TTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGA
GCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGC

CGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAC TCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTA
TCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAA
TAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGT
TTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGGTTCG
TGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCA
TCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGG
GATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAA
GAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACG
CTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGAT
TGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCA
TGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTC
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGA
ATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGCATGCAGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACT
CGCTACGCTCGGTTCGTTTCGACTGCGGCGAGCGGTGTGAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGG
TTATCCACAGAATCAGGGGATAAAGCCGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCAAAGCACCGGA
AGAAGCCAACGCCGAGGCCTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGCCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCC
TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCGGTG
TAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCATTGGTAACTGATTTAGAGGACTTTGTCTTGAAGTTATGCACCTGTTAAGGCTAAAC
TGAAAGAACAGATTTTGGTGAGTGCGGTCCTCCAACCCACTTACCTTGGTTCAAAGAGTTGG
TAGCTCAGCGAACCTTGAGAAAACCACCGTTGGTAGCGGTGGTTTTTCTTTATTTATGAGAT
GATGAATCAATCGGTCTATCAAGTCAACGAACAGCTATTCGGTACTCTAGATTTCAAGTGCA
ATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCAT
GTTAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGGCATCG
GTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
AGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGC
TGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCC
CAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGG

TATCGTCGTATCCCCTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCG
CGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTC
ATTCAGCATTTGCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCG
CTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCC
GAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATG
CTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGT
CAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCC
TGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCAC
CGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCA
GTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTG
GAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGG
AATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGC
TGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCG
TATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGC
CATAACGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGC
GACTCCTGCATTAGGAAATTAATACGACTCACTATA

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achmon, Y., Ben-Barak Zelas, Z. and Fishman, A. (2014) ‘Cloning Rosa hybrid phenylacetaldehyde synthase for the production of 2-phenylethanol in a whole cell Escherichia coli system’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), pp. 3603–3611. doi: 10.1007/s00253-013-5269-z.
- Ashutosh, K. (2007) *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Second Edi. New Delhi: New Age International (P) Ltd., Publishers.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002) *BIOCHEMISTRY*. 5th edn, W. H. Freeman. 5th edn. New York: W. H. Freeman. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Bertani, G. (1951) ‘Studies on lysogenesis. {I}. {T}he mode of phage liberation by lysogenic \emph{{E}scherichia coli}.’, *J Bacteriol*, 62(3), pp. 293–300.
- Bertoldi, M. *et al.* (2002) ‘Mutation of tyrosine 332 to phenylalanine converts dopa decarboxylase into a decarboxylation-dependent oxidative deaminase’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), pp. 36357–36362. doi: 10.1074/jbc.M204867200.
- Fernandez-Bolaños, J. G. *et al.* (2012) ‘Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives.’, in Boskou, D. (ed.) *Olive oil-constituents, quality, health properties and bioconversions*. In tech, pp. 375–396. doi: 10.5772/30743.
- Horton, R. M. (1995) ‘PCR-mediated recombination and mutagenesis’, *Molecular Biotechnology*, 3(2), pp. 93–99. doi: 10.1007/BF02789105.
- Joshi, M. and Deshpande, J. D. (2010) ‘Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr’, *Int J Biomed Res*, 1(5), pp. 81–97. doi: <http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.
- Lichman, B. R. (2021) ‘The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis’, *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry, pp. 103–129. doi: 10.1039/d0np00031k.
- Mikkelsen, S. R. and Corton, E. (2004) *BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Moore, B. D. *et al.* (2014) ‘Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context.’, *The New phytologist*, 201(3), pp. 733–50. doi: 10.1111/nph.12526.

- National Center for Biotechnology Information (2021) *Hydroxytyrosol / C8H10O3 - PubChem*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxytyrosol> (Accessed: 12 May 2021).
- Nelson L. David, Cox M. Michael, Lehninger Βασικές αρχές Βιοχημείας, Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης 2007, κεφ. 9.2 Από τα γονίδια στο γονιδίωμα σελ. 417
- Olmo-García, L. *et al.* (2018) ‘Unravelling the distribution of secondary metabolites in *olea europaea* l.: exhaustive characterization of eight olive-tree derived matrices by complementary platforms (LC-ESI/APCI-MS and GC-APCI-MS)’, *Molecules*, 23(10), pp. 1–16. doi: 10.3390/molecules23102419.
- OpenWetWare (2010) ‘*E. coli* genotypes’, pp. 1–15. Available at: https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#BL21.28DE3.29 (Accessed: 18 June 2020).
- Pronobis, M. I., Deutch, N. and Peifer, M. (2016) ‘The Miraprep: A protocol that uses a Miniprep kit and provides Maxiprep yields’, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0160509.
- Trantas, E. *et al.* (2019) ‘Correction: Dual pathway for metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce the highly valuable hydroxytyrosol (PLOS ONE (2019) 14:11 (E0212243) DOI: 10.1371/journal.pone.0212243)’, *PLoS ONE*, 14(12), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0226760.
- Wink, M. (2010a) *ANNUAL PLANT REVIEWS ANNUAL PLANT REVIEWS VOLUME 39 Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites Edited by.*
- Wink, M. (2010b) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Annual plant reviews ; v. 40.*
- Ελευθέριος Π. Ελευθερίου, Βοτανική Βιολογία Φυτικού Κυττάρου και Ιστολογία Φυτών, University Studio Press Εκδόσεις Θεσσαλονίκη 2007, κεφ. 3 Μοριακή σύσταση Φυτών σελ. 87, κεφ. 16 Μεταβολικά Προϊόντα σελ. 338-341, 392-394, 395-400
- Καράταγλης Σ., Φυσιολογία Φυτών, εκδόσεις art of text Θεσσαλονίκη 1994, κεφ. 5 Ροή της Βιολογικής Ενέργειας και Ρόλος των Ενζύμων σελ. 172, κεφ. 10 Δευτερογενείς Μεταβολίτες σελ. 365, 368-372, 373-374, 376-393
- Λουλακάκης Κ. Α., Γεωργική Βιοτεχνολογία και Τρόφιμα Εργαστηριακές ασκήσεις, Τ.Ε.Ι. Κρήτης Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας Ηράκλειο 2008, Παράστημα The Transformer protocol Student’s guide σελ. 92, 96
- Λουλακάκης Κ. Α. Φυσιολογία Φυτών Εργαστηριακές Ασκήσεις, Τ.Ε.Ι. Κρήτης Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Ηράκλειο 2008, Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών σελ. 55

Πολυδεύκης Χ., Βιοτεχνολογία Φυτών, εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ και Πολυδεύκης Χατζόπουλος Αθήνα 2001, κεφ. 1 Αρχές Γονιδιακού Χειρισμού σελ. 14, 20

Πουλάς, Κ. and Σιδέρης, Σ. (2015) *Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών*. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Available at: <http://hdl.handle.net/11419/2578>.

Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Καλλιόπη Α., Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης Ηράκλειο 2003, κεφ. 10 Δευτερογενής μεταβολισμός σελ. 333, 339-341, 335-337, 343

Ζώτου, Α. Σ. (2015) 'Βιοαναλυτική χημεία', in. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, pp. 1–37. Available at: <http://hdl.handle.net/11419/3667>.