



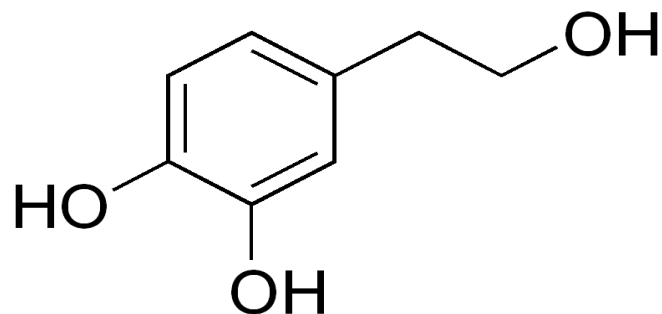
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΥΔΡΟΞΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ (TH) ΥΠΕΥΘΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ L-DOPA ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ»**



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΤΣΑΤΣΟΥ ΜΑΡΙΑ Α.Μ. 3509

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΤΡΑΝΤΑΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2013

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Γενικά στοιχεία	6
1.2 Ιδιότητες υδροξυτυροσόλης.....	7
1.2.1 Μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων	7
1.2.2 Πρόληψη του καρκίνου	8
1.2.3 Νευροπροστασία.....	8
1.2.4 Αντιμικροβιακή δράση	8
1.3 Μεταβολική μηχανική	9
1.4 Τεχνικές μοριακής βιολογίας.....	10
1.4.1 Κλωνοποίηση γονιδίων	10
1.4.2 Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.....	11
1.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	11
1.5 Βιοσυνθετικό μονοπάτι υδροξυτυροσόλης.....	12
1.6 Σκοπός πτυχιακής διατριβής	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ - ΥΛΙΚΑ.....	15
2.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	15
2.1.1 Θρεπτικό μέσο Lysogeny Broth (LB).....	15
2.1.2 Θρεπτικό μέσο Yeast Peptone Dextrose (YPD)	15
2.1.3 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σακχαρομύκητα για επιλογή (CM).....	16
2.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	16
2.2.1 Πλασμίδιο MsTH-ProExHTc	16
2.2.2 Πλασμίδιο pBluescript II SK ⁺	17
2.2.3 Φορείς έκφρασης σακχαρομύκητα pESC.....	18
2.3 Ένζυμα	19
2.4 Στελέχη μικροοργανισμών	19
2.4.1 Βακτηριακά στελέχη	19
2.4.2 Στελέχη σακχαρομύκητα	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20

3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων <i>Escherichia coli</i>	20
3.2 Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα	21
3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%	21
3.4 Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης	22
3.5 Παρασκευή δεκτικών κύτταρων <i>Escherichia coli</i>	22
3.6 Αντίδραση λιγοποίησης.....	23
3.7 Μετασηματισμός βακτηρίων με την χρήση της μεθόδου θερμικής καταπόνησης (heat shock)	23
3.8 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και μετασηματισμός	24
3.9 Καλλιέργεια σακχαρομύκητα	25
3.10 Εκκίνηση καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένου σακχαρομύκητα.....	25
3.11 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
4.1 Κλωνοποίηση γονιδίου TH	27
4.2 Κατασκευή πλασμιδίων.....	29
4.2.1 Κατασκευή πλασμιδίου MsTH-pESC-URA	29
4.2.2 Κατασκευή πλασμιδίου MsTH-pESC-HIS.....	31
4.2.3 Σχέδιο συνολικής στρατηγικής κατασκευής των πλασμιδίων έκφρασης στον σακχαρομύκητα.....	33
4.3 Έλεγχος έκφρασης γονιδίου	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ	39
ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ	40

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος που υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Φυτικής Παραγωγής στο ΤΕΙ Κρήτης.

Με την ολοκλήρωση του έργου θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Βερβερίδη Φίλιππο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του.

Πολλά ευχαριστώ στον επιβλέπων καθηγητή μου Τραντά Εμμανουήλ για όλα όσα μου δίδαξε, για το επιστημονικό υλικό και τις γνώσεις που μου προσέφερε, τις συμβουλές του αλλά και τις ώρες που μου αφιέρωσε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογενειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στους καρπούς αλλά και στα παραγόμενα προϊόντα της ελιάς ανιχνεύονται χημικές ουσίες που ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες και οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερα πολύτιμες φαρμακευτικές ιδιότητες. Μια από τις κατηγορίες αυτών των δευτερογενών προϊόντων είναι οι φαινολικές ενώσεις. Από την εξαιρετικά ετερογενή αυτή κατηγορία, μια ουσία που παρουσιάζει εξαιρετικές ιδιότητες είναι η υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol) που μαζί με την ελευρωπαΐνη, συνιστούν σημαντικό μέρος των παραγόμενων μεταβολιτών της. Η υδροξυτυροσόλη παράγεται *de-novo* και εστεροποιείται με μόρια ελενολικού οξέος για την παραγωγή της ελευρωπαΐνης. Η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης αποτελεί έναν επιπρόσθετο παράγοντα αύξησης της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης και παρατηρείται κυρίως κατά την ωρίμανση του ελαιόκαρπου αλλά και κατά την επεξεργασία των υπολειμμάτων του ελαιολάδου.

Οι λόγοι που μας οδήγησαν στην περαιτέρω έρευνα της συγκεκριμένης χημικής ουσίας είναι πολύ σημαντικοί, αφού η υδροξυτυροσόλη έχει την ικανότητα να αποσβένει τις ελεύθερες ρίζες μέσα στα κύτταρα των οργανισμών και έτσι να λειτουργεί ως ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας. Επίσης παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνα των φυτών και του ανθρώπου. Εξαιτίας αυτών των δυο πολύ σημαντικών ιδιοτήτων της και στοχεύοντας στην άμεση χρήση της πολύτιμης αυτής ουσίας γίνεται μια προσπάθεια για την ετερόλογη βιοσύνθεση της HT με την χρήση καινοτόμων εργαλείων και μεθοδολογιών της επιστήμης της μεταβολικής και γενετικής μηχανικής. Μια τέτοιου είδους προοπτική θα επέτρεπε την άμεση διάθεση και χρήση της χημικής ουσίας σε σκευάσματα αγροχημικών για χρήση στην φυτοπροστασία, αλλά και για την παραγωγή σκευασμάτων για την αντιμετώπιση ανθρώπινων ασθενειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

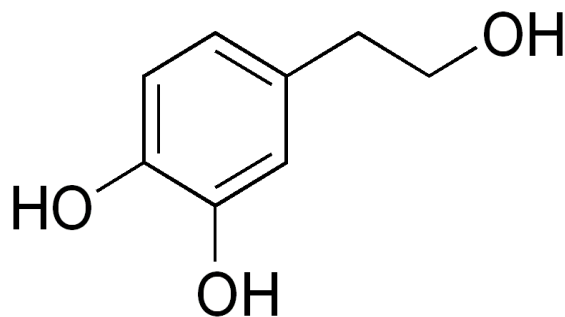
1.1 Γενικά στοιχεία

Το ελαιόλαδο και τα υπόλοιπα προϊόντα του φυτού της ελιάς μελετώνται εδώ και χρόνια από τους επιστήμονες εξαιτίας της πληθώρας των χημικών ουσιών που προσδίδουν στα προϊόντα της ελιάς εξαιρετικές ιδιότητες. Οι ουσίες αυτές ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν αποτελούν βασικά δομικά συστατικά του φυτικού κύτταρου αλλά σχηματίζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα και σε κατάλληλα στάδια ανάπτυξης του φυτού.

Αυτά τα δευτερογενώς παραγόμενα φυτικά προϊόντα είναι ουσίες που βιοσυντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων, μέσω της χρησιμοποίησης κάποιων ενδιάμεσων προϊόντων ως πρόδρομες ενώσεις, σχηματίζοντας ενώσεις που μπορεί να είναι και μεγάλης πολυπλοκότητας. Για τον λόγο αυτό, ο όρος δευτερογενή προϊόντα οφείλεται στον τρόπο της βιοσύνθεσης τους και όχι στην λειτουργική σημασία τους για τα φυτά (Καράταγλης 1994).

Μια πολύ σημαντική ομάδα από την ευρύτερη κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού της ελιάς αποτελούν και οι φαινολικές ενώσεις. Πρόκειται για συστατικά που έχουν ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με δραστικά παράγωγα (Καράταγλης 1994). Στα προϊόντα αλλά και στα υποπροϊόντα του φυτού της ελιάς εμφανίζονται τουλάχιστον 30 διαφορετικά είδη φαινολικών ενώσεων. Ενδεικτικά, κάποια από αυτά είναι η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη (Tuck και Hayball 2002). Η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη, Hydroxytyrosol, HT, Εικόνα 1) εκτός από την *de-novo* βιοσύνθεση της παράγεται και έπειτα από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του ελαιόκαρπου αλλά και κατά την επεξεργασία των

υπολειμμάτων του ελαιόλαδου. Επιπλέον, ένα μικρό αλλά πολύ σημαντικό ποσοστό της υδροξυτυροσόλης ανιχνεύεται και στα φύλλα της ελιάς (Visioli 2008).



Εικόνα 1. Δομή ενός μορίου υδροξυτυροσόλης

1.2 Ιδιότητες υδροξυτυροσόλης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση του αριθμού των επιστημονικών δημοσιεύσεων που αφορούν την μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων της ΗΤ και αυτό οφείλεται στις σημαντικές ιδιότητες που παρουσιάζει και οι οποίες την καθιστούν σημαντικό εργαλείο στα χέρια της επιστήμης (Tuck και Hayball, 2002). Οι έρευνες με την ΗΤ ξεκίνησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990 όταν έγινε ξεκάθαρο ότι μπορεί να απομονωθεί από το ελαιόλαδο αλλά και από τα παράγωγα του φυτού. Έτσι ήταν εύκολο να γίνουν οι απαραίτητες έρευνες ώστε να αποδειχθούν κάποιες από τις ιδιότητες και τα οφέλη που μπορεί να έχει η χρήση της υδροξυτυροσόλης σε διάφορους τομείς της επιστήμης.

1.2.1 Μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων

Η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνει σε μεγάλο βαθμό τα συμπτώματα του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό και άρα τον παράγοντα ο οποίος συμβάλει στην ανάπτυξη διάφορων καρδιαγγειακών νοσημάτων όπως η αρτηριοσκλήρωση και η στεφανιαία νόσος (Granados et al 2010).

1.2.2 Πρόληψη του καρκίνου

Εξαιτίας της δράσης της HT στην αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών που αναπτύσσονται στο εσωτερικό των κυττάρων, προστατεύει από τον ογκογόνο μετασχηματισμό των κυττάρων αλλά και από άλλες σημαντικές βλάβες του DNA, που προκαλούνται εξαιτίας της ύπαρξης των ελεύθερων ριζών και που προάγουν τον σχηματισμό των καρκινικών κυττάρων σε ένα οργανισμό (Granados et al 2010).

1.2.3 Νευροπροστασία

Η υδροξυτυροσώλη παρέχει υψηλή προστασία στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και αποτρέπει με αυτό τον τρόπο τον εκφυλισμό τους. Επίσης μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-αμυλοειδής όπου η συσσώρευση της ευνοεί τον εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων και έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου Alzheimer (Thibault et al 2011).

1.2.4 Αντιμικροβιακή δράση

Η HT παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνα του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και των φυτών. Λειτουργεί ως ένας από τους ισχυρότερους αναστολείς της βακτηριακής δραστηριότητας καθώς ρυθμίζει την παραγωγή των τοξικών ουσιών του οργανισμού και έτσι αποφεύγεται η ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών. Σε πειράματα *in vitro* που έγιναν αποδείχτηκε ότι η HT διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε μολυσματικούς παράγοντες που προσβάλλουν το αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα (Bisignano 1999).

Επιστήμονες διεξήγαγαν πειράματα χρησιμοποιώντας ακόμα και τα υποπροϊόντα των ελαιουργιών (κατσιγάρος) όπου ήταν έντονη η παρουσία της υδροξυτυροσώλης. Απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της χημικής ουσίας το οποίο λειτουργεί ενάντια σε παθογόνους παράγοντες που προσβάλλουν τους φυτικούς οργανισμούς όπως για παράδειγμα κατά του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahlia* αλλά και του εντομολογικού εχθρού *Euphyllura olivine* (βαμβακάδα ή ψύλλα της ελιάς, Yangui et al 2010).

1.3 Μεταβολική μηχανική

Η μεταβολική μηχανική (metabolic engineering) αποτελεί έναν σύγχρονο επιστημονικό κλάδο, με ιδιαίτερες πρακτικές εφαρμογές ο οποίος παρουσιάστηκε τα τελευταία χρόνια ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Ο όρος μεταβολική μηχανική αφορά την κατευθυνόμενη βελτίωση των κυτταρικών λειτουργιών των οργανισμών ή ακόμα και την αύξηση της παραγωγής προϊόντων δια μέσου της τροποποίησης συγκεκριμένων κυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων αλλά και της εισαγωγής νέων με την χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.

Η επιστήμη της μεταβολικής μηχανικής είναι το πεδίο το οποίο στοχεύει στην τροποποίηση γενετικών και ρυθμιστικών κυτταρικών διεργασιών προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή συγκεκριμένων ουσιών μέσα στο κύτταρο του οργανισμού αποσκοπώντας στην δημιουργία βιοκαταλυτών ικανών: α) να ενισχύσουν την παραγωγή ενός προϊόντος που είναι ενδογενές ενός μικροοργανισμού, β) να δημιουργηθούν χρήσιμα και ωφέλημα προϊόντα τα οποία ο μικροοργανισμός δεν ήταν σε θέση να συνθέσει, γ) να συνθέσουν νέα προϊόντα (Stephanopoulos 1999).

Ο όρος «Μεταβολική μηχανική» προτάθηκε για πρώτη φορά το 1991 από τον πρωτοπόρο της βιοχημικής μηχανικής Jay Bailey. Η γενετική μηχανική επέτρεψε την τροποποίηση συγκεκριμένων ενζυμικών αντιδράσεων στα μεταβολικά μονοπάτια. Σημαντική ώθηση στην χειραγώγηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών έδωσε η ανάπτυξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας. Το πιο σημαντικό είναι η τροποποίηση ή εισαγωγή συγκεκριμένων βιοχημικών αντιδράσεων χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας ώστε να ενισχυθούν, ανασταλούν ή διαγραφούν, μεταφερθούν ή απορυθμιστούν τα συγκεκριμένα γονίδια ή ένζυμα που αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες αντιδράσεις (Stephanopoulos et al 1998).

1.4 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας πτυχιακής διατριβής βασίστηκε και υλοποιήθηκε βάση των βασικών τεχνικών που χρησιμοποιεί η επιστήμη της μοριακής βιολογίας.

1.4.1 Κλωνοποίηση γονιδίων

Η βασικότερη ίσως τεχνική αφορά την κλωνοποίηση των γονιδίων. Κατά την τεχνική αυτή το τμήμα του DNA που κωδικοποιεί το γονίδιο που μας ενδιαφέρει κλωνοποιείται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και εισάγεται σε έναν βακτηριακό φορέα έκφρασης (πλασμίδιο) ώστε να είναι δυνατή η διατήρησή του μέσα στα κύτταρα ενός βακτηρίου, συνήθως του *Escherichia coli*.

Το πλασμίδιο αυτό φέρει δείκτη ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό ώστε να μπορούν να επιλεγθούν τα κύτταρα εκείνα στα οποία έχει εισαχθεί επιτυχώς το υπό κλωνοποίηση γονίδιο (Brown 2010). Στη συνέχεια ακολουθεί υποκλωνοποίηση σε κατάλληλους φορείς έκφρασης που θα επιτρέψουν την λειτουργική αξιοποίηση της ενεργότητας του γονιδίου.

Τα βασικά βήματα που ακολουθούμε για την υποκλωνοποίηση ενός γονιδίου αφορούν α) την εκχύλιση του DNA από την βακτηριακή καλλιέργεια που φέρει το υπό μελέτη γονίδιο και την πέψη του με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, β) την απομόνωση του βακτηριακού πλασμιδίου στο οποίο θα μεταφερθεί το κλωνοποιημένο γονίδιο από κατάλληλη βακτηριακή καλλιέργεια και πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, γ) την σύνδεση των δύο μορίων DNA με την βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση, δ) την μεταφορά του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε βακτήρια με την μέθοδο του θερμικού σοκ ή την μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης, ε) την επίστρωση των βακτηρίων σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με το κατάλληλο μέσο επιλογής ώστε να γίνει η επιλογή των βακτηρίων που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, και στ) την ταυτοποίηση των αποικιών που φέρουν το υπό μελέτη γονίδιο (Ταμπακάκη, Βερβερίδης 2003).

1.4.2 Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) εξασφαλίζει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA από πολύ μικρή αρχική ποσότητα απομονωμένου DNA ενός οργανισμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της PCR είναι να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε.

Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του τμήματος του DNA που θα αντιγραφεί. Η τεχνική της PCR βασίζεται κυρίως στην επανάληψη τριών απλών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν τόσο στον χρόνο όσο και στην θερμοκρασία και που συνιστούν έναν κύκλο της PCR.

Οι 3 αυτές αντιδράσεις που συνιστούν έναν κύκλο στην τεχνική της PCR είναι οι εξής: α) θέρμανση της αντίδρασης στους 94 για 1 λεπτό για την αποδιάταξη του DNA, β) πτώση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 55-65 °C για 1 λεπτό για τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων με τα συμπληρωματικά τους τμήματα και γ) θέρμανση της αντίδρασης για 1-2 λεπτά στους 72 °C ώστε να γίνει η αντιγραφή (πολυμερισμός) του επιθυμητού τμήματος της αλυσίδας με την δράση της Taq πολυμεράσης.

Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται για 30-35 φορές. Για να ελεγχθεί η επιτυχία της PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που επιτυγχάνει την ανάλυση των ενισχυμένων τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους (Ντούνη 2010).

1.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Είναι η μέθοδος διαχωρισμού των μορίων του DNA με κριτήριο το μήκος τους. Τα δείγματα του DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλακάς από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας

εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μετακίνηση των θραυσμάτων του DNA προς τον θετικό πόλο καθώς αποτελούνται από τμήματα DNA που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα φέρει αρνητικό φορτίο).

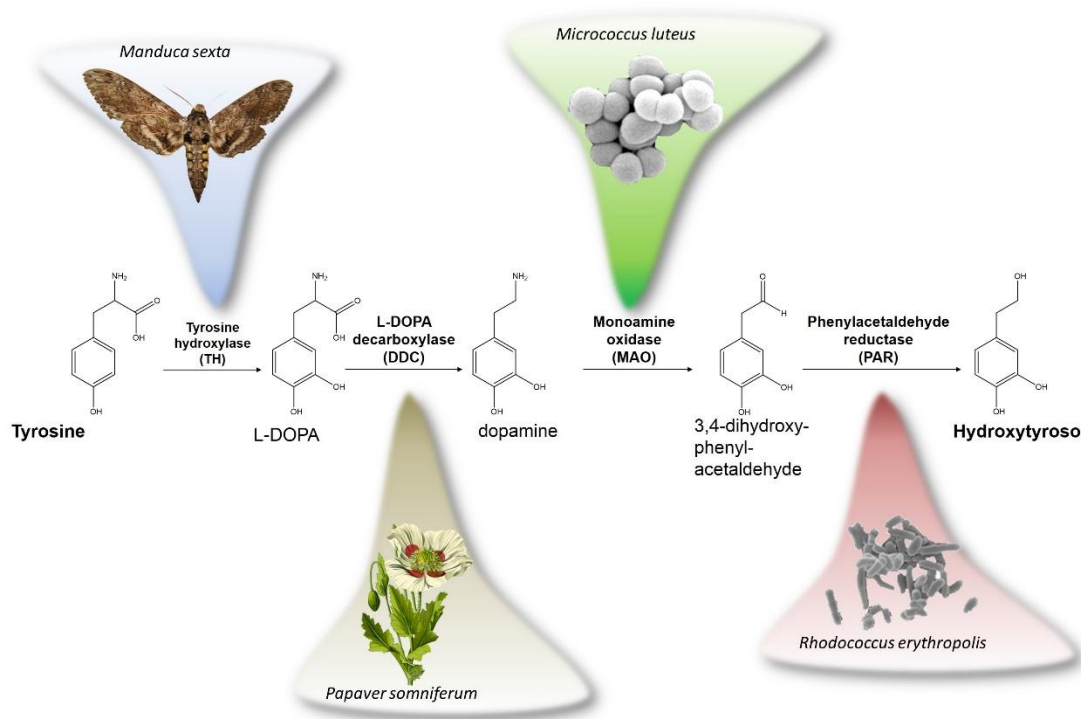
Η ταχύτητα των θραυσμάτων εξαρτάται από το μέγεθος τους αφού τα μεγάλα θραύσματα κινούνται πιο αργά από τα μικρά και έτσι είναι εύκολη η διάκριση μεταξύ τους. Η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν τα τμήματα DNA, με την απόσταση που διανύουν θραύσματα γνωστού μεγέθους που «τρέχουν» παράλληλα, μας πληροφορεί για το μέγεθος των άγνωστων τμημάτων.

Για να γίνουν όμως αντιληπτά τα θραύσματα του DNA πρέπει να έχουν βαφεί πρώτα με το φθορίζον μόριο «βρωμιούχο αιθίδιο» και να εκτεθούν σε ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Ντούνη 2010).

1.5 Βιοσυνθετικό μονοπάτι υδροξυτυροσόλης

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι που θα καταλήγει στην σύνθεση της ΗΤ αποτελείται από 4 βιοχημικές αντιδράσεις (Εικόνα 2). Στο προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι η υδροξυτυροσόλη συντίθεται από την πρόδρομη ένωση τυροσίνη με την ενεργότητα 4 γονιδίων και μέσα από 4 ενζυμικά βήματα.

Στο πρώτο βήμα η τυροσίνη υδροξυλιώνεται με την δράση μιας υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH) δίνοντας την L-DOPA. Στο δεύτερο βήμα και με την δράση μιας καρβοξυλάσης της L-DOPA (DDC) προκύπτει η ντοπαμίνη (dopamine) η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται με την δράση της μονοαμινικής οξειδάσης (MAO) για να δώσει την 4-υδροξυφαίνυλακεταλδεΐδη. Στο τελευταίο βήμα, με την δράση μιας αναγωγάσης της φαίνυλακεταλδεΐδης (PAR) προκύπτει η επιδιωκόμενη ένωση που είναι η υδροξυτυροσόλη.



Εικόνα 2. Προτεινόμενο ετερόλογο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ΗΤ όπου φαίνονται τα εμπλεκόμενα γονίδια καθώς και οι οργανισμοί από τους οποίους απομονώθηκαν.

1.6 Σκοπός πτυχιακής διατριβής

Εξαιτίας των σημαντικών ιδιοτήτων της ΗΤ και στοχεύοντας στην άμεση χρήση της πολύτιμης αυτής ουσίας, έγινε προσπάθεια για την ετερόλογη βιοσύνθεση της ΗΤ με την χρήση καινοτόμων εργαλείων και μεθοδολογιών της επιστήμης της μεταβολικής μηχανικής. Μια τέτοιου είδους προοπτική όχι μόνο θα επέτρεπε την βιοσύνθεση της ΗΤ σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλλά θα διευκόλυne και την άμεση διάθεση και χρήση της χημικής ουσίας από τον την βιομηχανία αγροχημικών και φαρμάκων, σαν ένα σκεύασμα απόλυτα φιλικό με το περιβάλλον και τον καταναλωτή εξαιτίας της φυτικής του προέλευσης.

Στόχος της πειραματικής προσπάθειας στην οποία βασίζεται η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία ήταν η λειτουργική έκφραση του πρώτου γονιδίου του μονοπατιού της ΗΤ, της υδροξυλάσης της τυροσίνης σε κύτταρα σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*). Το συγκεκριμένο γονίδιο εκφραζόμενο στα κύτταρα

του σακχαρομύκητα παράγει ένζυμο το οποίο δέχονται σαν υπόστρωμα το αμινοξύ τυροσίνη (4-υδροξυφαινυλαλανίνη) το οποίο υδροξυλιώνεται στην 3- θέση του φαινολικού της δακτυλίου για την παραγωγή της L-DOPA (3,4-διδυδροξυφαινυλαλανίνη (Εικόνα 2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ - ΥΛΙΚΑ

2.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

2.1.1 Θρεπτικό μέσο Lysogeny Broth (LB)

Το θρεπτικό μέσο LB (Lysogeny Broth) είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών. Η σύσταση του περιλαμβάνει 10 gr/L τρυπτόνης, 5 gr/L εκχυλίσματος ζύμης και 10 gr/L χλωριούχου νατρίου. Η χρήση του θρεπτικού μέσου έγινε σε στερεά υποστρώματα και για τον λόγο αυτό προστεθήκαν και 15 gr/L άγαρ. Ρυθμίστηκε το pH στο 7 και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min (Bertani 2004).

2.1.2 Θρεπτικό μέσο Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Για την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 10 gr/L εκχυλίσματος ζύμης, 20 gr/L πεπτόνη, 20 gr/L γλυκόζη ενώ το pH ρυθμίστηκε και σταθεροποιήθηκε στο 5,8 και έγινε αποστείρωση στους 121°C για 15 min.

Το εκχύλισμα ζύμης είναι ένα μείγμα που αποτελείται από αμινοξέα, πεπτίδια, υδροδιαλυτές βιταμίνες και υδατάνθρακες. Για τα στερεά υποστρώματα του YPD (Yeast Peptone Dextrose) που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκαν και 20 gr/L άγαρ (Sherman 2002).

2.1.3 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σακχαρομύκητα για επιλογή (CM)

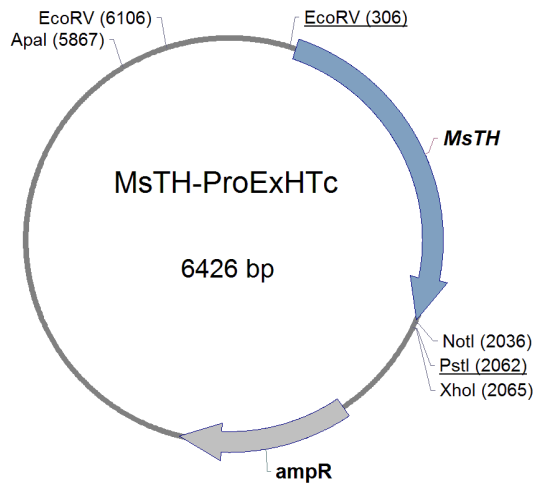
Προκειμένου να επιλεγθούν τα μετασηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα έγινε χρήση πρωτοκόλλων επιλογής με βάση τις αυξοτροφίες του κάθε στελέχους. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά που τους έλειπε ένα βασικό συστατικό, η Ιστιδίνη (HIS), η Λευκίνη (LEU), η Τρυπτοφάνη (TRP) και η Ουρακίλη (URA). Με αυτό τον τρόπο μόνο τα κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που συμπληρώνει την αντίστοιχη μεταλλαγή αυξοτροφίας είναι σε θέση να αναπτυχθούν.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν 6,7 gr/L για το θρεπτικό υλικό πηγής αζώτου και για τον σακχαρομύκητα χωρίς αμινοξέα. 20 gr/L γλυκόζης, 10 mg/L ισολευκίνη, 150 mg/L βαλίνη, 20 mg/L αδενίνη, 20 mg/L αργινίνη, 30 mg/L λυσίνη, 20 mg/L μεθειονίνη, 200 mg/L θρεονίνη, 30 mg/L τυροσίνη και 50 mg/L φαινυλαλανίνη. Το pH του θρεπτικού μέσου κυμαίνονταν κοντά στο 5,8 το οποίο σταθεροποιούνταν με την χρήση γαλακτικού οξέος. Τα αμινοξέα ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη και ουρακίλη προστέθηκαν στην συνέχεια ανάλογα με τις αυξοτροφίες του στελέχους σε συγκεντρώσεις 20 mg/L, 100 mg/L, 20 mg/L και 20 mg/L αντίστοιχα.

2.2 Πλασμιδιακοί φορείς

2.2.1 Πλασμίδιο MsTH-ProExHTc

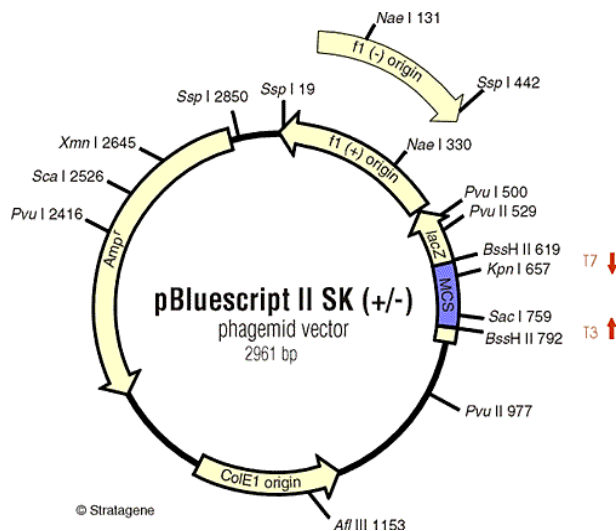
Για την λειτουργική έκφραση του γονιδίου της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH) στα κύτταρα του γενετικά τροποποιημένου σακχαρομύκητα, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο MsTH-ProExHTc το οποίο έφερε το συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο είχε κλωνοποιηθεί προγενέστερα από το έντομο *Manduca sexta* (Gorman et al 2007).



Εικόνα 3. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου MsTH-ProExHTc.

2.2.2 Πλασμίδιο pBluescript II SK⁺

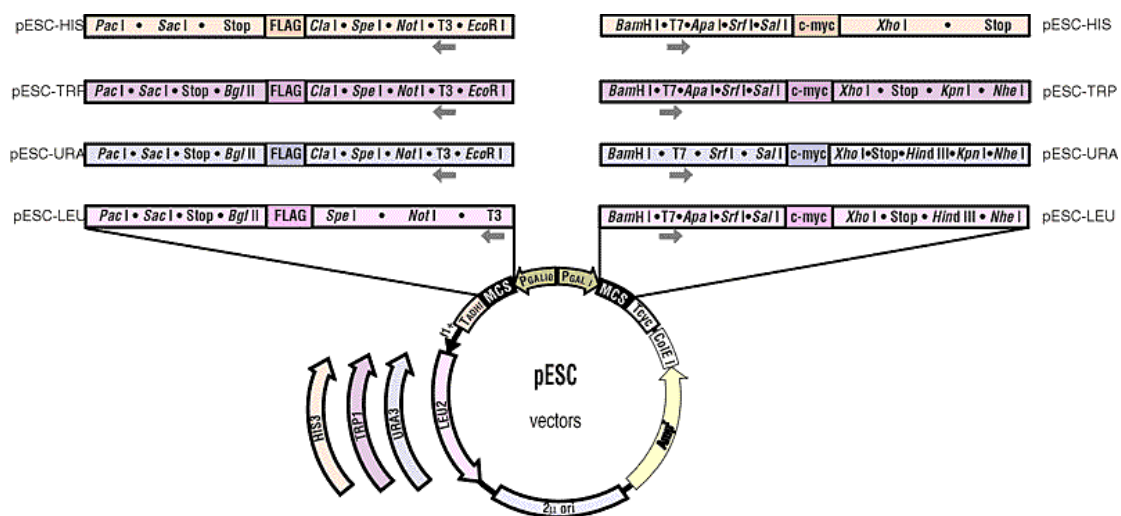
Το πλασμίδιο pBluescript II SK⁺ της εταιρείας Statagene (Εικόνα 4), έχει μέγεθος 3.0 kb και φέρει τα εξής χαρακτηριστικά: pUC ori, Plac, MCS, lac Z, f1(+/-) ori, και εμφανίζει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη



Εικόνα 4. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBluescript II SK⁺

2.2.3 Φορείς έκφρασης σακχαρομύκητα pESC

Οι φορείς pESC της εταιρείας Stratagene (Εικόνα 5) που χρησιμοποιήθηκαν είναι επισωμικά πλασμίδια ζύμης (YEPs) που στηρίζονται στο βασικό κορμό του φορέα pBluescript II SK⁺. Κάθε φορέας φέρει τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: α) αρχή αντιγραφής του πλασμιδίου pUC και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (β-λακταμάση, *bla*), που επιτρέπουν την αντιγραφή και την επιλογή σε στελέχη *E. coli* που περιέχουν το φορέα, β) την αρχή αντιγραφής 2μ που επιτρέπει την αυτόνομη αντιγραφή του σε κύτταρα του *S. cerevisiae* σε πολλαπλά αντίγραφα ανά κύτταρο, γ) ένα γονίδιο που συμπληρώνει μεταλλάξεις αυξοτροφίας του στελέχους (*HIS3*) για την επιλογή σε CM θρεπτικό μέσο που δεν είχε προστεθεί αντίστοιχα ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, λευκίνη ή ουρακίλη, δ) την κασέτα έκφρασης η οποία περιέχει τις αλληλουχίες των υποκινητών του *S. cerevisiae*, ε) δυο περιοχές κλωνοποίησης στ) από μια αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής καθοδικά του κάθε υποκινητή (Τραντάς 2009).



Εικόνα 5. Γενετικός χάρτης φορέων pESC όπου φαίνονται αναλυτικά τα περιοριστικά ένζυμα που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την υποκλωνοποίηση των γονιδίων των οποίων η έκφραση επιζητείται

2.3 Ένζυμα

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι το EcoRI, PstI, Bsecl, EcoRV, PvuII, NotI, Bam, SstI, HincII της εταιρείας Minotech και το HindIII της εταιρείας Sigma.

2.4 Στελέχη μικροοργανισμών

2.4.1 Βακτηριακά στελέχη

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη DH10B του βακτηρίου *Escherichia coli* με γενότυπο: F- mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK λ-, rpsL, nupG.

2.4.2 Στελέχη σακχαρομύκητα

Έγινε χρήση του στελέχους άγριου τύπου YPH499 του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* με γενότυπο: MATα ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his1-Δ200 leu2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli*

Από υγρή καλλιέργεια καλά αναπτυγμένη σε θρεπτικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό λάβαμε 1,5 ml το οποίο μεταφέρθηκε σε δοχείο τύπου Eppendorf και φυγοκεντρήθηκε για 30 sec στους 4 °C με ταχύτητα 14.000 rpm. Έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 μl κρύου διαλύματος I (50 mM γλυκόζης, 25 mM Tris-Cl με pH 8, 10 mM EDTA) με μηχανική ανάδευση (vortex), στην συνέχεια προστέθηκαν 200 μl φρέσκου διαλύματος II (0,2 N NaOH και 1 % SDS). Το μείγμα αναδεύθηκε και αφέθηκαν τα κύτταρα στον πάγο για 5 min, προστέθηκαν 150 μl φρέσκου διαλύματος III (οξικό κάλιο 3 M, 11,5 % καθαρό οξικό οξύ). Μετά την ανάδευση του μείγματος έγινε φυγοκέντρηση με ταχύτητα 14.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Σε καθαρό δοχείο τύπου Eppendorf μεταφέρθηκε προσεκτικά η υδατική φάση και έγινε καθαρισμός με ίσου όγκου ουδέτερη φαινόλη και ίσου όγκου χλωροφόρμιο. Ακολούθησε η ιζηματοποίηση των νουκλειικών οξέων με την προσθήκη 2 όγκων κρύας απόλυτης αιθανόλης, στην συνέχεια έγινε ανάδευση και τοποθέτηση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Μετά από φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία 4 °C απομακρύνθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο και έγινε ο καθαρισμός της πελέτας με 1 ml 70 % αιθανόλης, ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 2 min στους 4 °C. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και φύλαξη με ανοιχτό το καπάκι του δοχείου για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλύθηκε σε 50 μl H₂O και αποθηκεύτηκε στους -20 °C (Engelbrecht et al 1991).

3.2 Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα

Σε αποστειρωμένο δοχείο τύπου Eppendorf αναμείχθηκαν έως τελικού όγκου 25 μl το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, 10 units ενζύμου και 500 μg DNA. Ακολούθησε επώαση του μείγματος για 1,5 h στους 37 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση πέψης.

3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης DNA χρησιμοποιήθηκε αρκετές φορές κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Ακολουθεί η ακριβής περιγραφή της μεθόδου. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης προστέθηκαν σε κωνική φιάλη 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5x TBE και 0,5 gr αγαρόζης, θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 1-2 min ώστε να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και μεταφέρθηκαν στην επαγωγό εστία. Όταν κρύωσε λίγο το διάλυμα προσθέσαμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml.

Παράλληλα προετοιμάσαμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης, έπειτα έγινε και η προσθήκη του διαλύματος αγαρόζης. Το διάλυμα αφέθηκε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σταθεροποιηθεί και τέλος έγινε η προσθήκη 5x TBE έως ότου να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα αγαρόζης.

Προετοιμάστηκαν τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση όπου σε κάθε δείγμα των 25 μl προστέθηκαν και 5 μl χρωστικής (Orange G 6x) και έγινε η τοποθέτηση τους στις θέσεις φόρτωσης του πηκτώματος. Σε γνωστή θέση τοποθετήθηκαν και 5 μl από τον μάρτυρα (φάγος λ μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PstI) ώστε να γίνει η σύγκριση των εμφανιζόμενων ζωνών με αυτόν του μάρτυρα που είναι γνωστού μοριακού βάρους.

Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 55 V και μετά από 1 h παρουσιάστηκε το αποτέλεσμα αφού μεταφέρθηκε το πήκτωμα στην ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.4 Απομόνωση τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος η οποία ακολουθήσαμε για την απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης βασίστηκε στο εγχειρίδιο χρήσης του NucleoSpin Extract II της εταιρείας Macherey-Nagel. Το πρώτο βήμα περιελάμβανε την τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας όπου με την βοήθεια ενός νυστεριού αφαιρέθηκαν προσεκτικά τα τμήματα που περιείχαν τις επιθυμητές ζώνες, στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου Eppendorf και ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας.

Προσθέσαμε ρυθμιστικό διάλυμα NT1 σε αναλογία 2:1 (για κάθε 100 mg πηκτώματος προσθέσαμε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος) και αφήσαμε για επώαση σε υδατόλουτρο των 50 °C για 10 min. Στην συνέχεια έγινε ισχυρή ανάδευση 2-3 min όπου διαλύθηκε πλήρως το πήκτωμα.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε στήλες διαχωρισμού NucleoSpin Extract II και φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec στις 11.000 rpm. Προσθέσαμε 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 το οποίο περιείχε αιθανόλη για να πραγματοποιηθεί το πλύσιμο της μεμβράνης και έγινε φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 rpm. Αδειάσαμε τους σωλήνες και κάναμε φυγοκέντρηση για άλλα 2 min στις ίδιες συνθήκες ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 και να ξηρανθεί πλήρως η μεμβράνη σιλικόνης.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου Eppendorf και όγκου 1,5 ml και αφού προσθέσαμε ακόμα 20 μl νερού τα αφήσαμε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκεντρήσαμε για 1 min ακόμα στις 11.000 rpm και προσθέσαμε 20 μl νερού επαναλαμβάνοντας την διαδικασία της φυγοκέντρησης για 1 min στις 11.000 rpm και τέλος αποθηκεύσαμε τα δείγματα στους -20 °C.

3.5 Παρασκευή δεκτικών κύτταρων *Escherichia coli*

Υγρό θρεπτικό μέσο LB όγκου 100 ml μολύνθηκε με 1 ml από φρέσκια καλλιέργεια του στελέχους DH10B του βακτηρίου *Escherichia coli* και αφέθηκε για επώαση με ισχυρή ανάδευση στους 37 °C. Ελέγξαμε την ανάπτυξη του με την χρήση

φασματοφωτόμετρου μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm να φτάσει στο 0,6 - 0,8. Όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας είχαν την επιθυμητή ανάπτυξη μεταφέρθηκαν σε δοχεία τύπου Falcon και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στους 4 °C στις 2.500 rpm.

Απομακρύναμε το υπερκείμενο υγρό και επαναδιαλύσαμε την πελέτα σε 30 ml Tfb I (30 mM CH₂COOK, 50 mM MnCl₂, 50 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % γλυκερόλη), ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 min και επανάληψη της φυγοκέντρησης για 10 min στους 4 °C στις 2.000 rpm.

Απομακρύναμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε την πελέτα σε 4 ml Tfb II (10 mM MOPS με pH 7, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % γλυκερόλη). Το διάλυμα μοιράστηκε σε δοχεία τύπου Eppendorf των 1,5 ml (προστέθηκαν 100 μl ανά δοχείο) και πραγματοποιήθηκε η άμεση ψύξη τους με υγρό άζωτο και η αποθήκευση τους στους -80°C για διάστημα 4-8 εβδομάδες.

3.6 Αντίδραση λιγοποίησης

Σε αποστειρωμένο δοχείο τύπου Eppendorf αναμείχτηκαν έως τελικού όγκου 10μl, η απαιτούμενη ποσότητα από το DNA του φορέα (vector) και το DNA του γονιδίου (insert) σε συνολική ποσότητα 100 ngr, 1 unit T4 DNA Ligase, T4 DNA Ligase Assay buffer, 1 mM ATP . Το μείγμα αφέθηκε μια ολόκληρη νύχτα στο ψυγείο για επώαση ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγοποίησης.

3.7 Μετασχηματισμός βακτηρίων με την χρήση της μεθόδου θερμικής καταπόνησης (heat shock)

Σε παγωμένο δοχείο τύπου Eppendorf προσθέσαμε 100 μl δεκτικών κύτταρων βακτηρίων *Escherichia coli* και 5 μl από το μίγμα της αντίδρασης λιγάσης και ανακινήσαμε ελαφρά, στην συνέχεια ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 min και μετά προκαλέσαμε θερμικό σοκ στους 40 °C για 1 min. Έγινε επανατοποθέτηση των κύτταρων στον πάγο για 3-5 min και προσθέσαμε 1 ml LB χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού, αφέθηκε για επώαση 45–60 min στους 37°C με ανάδευση 200 στροφές/λεπτό.

Έγινε φυγοκέντρηση για 5 sec στις 14.000 rpm και απομακρύναμε 900 μl από το υπερκείμενο υγρό ενώ επαναδιαλύσαμε το ίζημα των κυττάρων στο υπόλοιπο θρεπτικό διάλυμα. Τοποθετήσαμε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB στο οποίο είχε προηγηθεί η προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού και αφήσαμε για επώαση 12 - 16 h στους 37 °C.

3.8 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* και μετασχηματισμός

Η μέθοδος που ακολουθήσαμε για τον μετασχηματισμό των κυττάρων βασίζεται στην μεθοδολογία του Gietz. Για να πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός του στελέχους YPH499 έγινε σε προθερμασμένο στους 30 °C θρεπτικό μέσο YPD με καλά ανεπτυγμένη καλλιέργεια μόλυνση και ανάδευση για 3 - 5 ώρες σε 200 rpm. Όταν η OD₆₀₀ έφτασε στο 0,1 (2×10^7 κύτταρα/ml) συλλέχθηκαν τα κύτταρα με φυγοκέντρηση διάρκειας 3 min στις 3.000 rpm. Τα κύτταρα πλυθήκαν με 25 ml αποστειρωμένο νερό και επαναδιαλύθηκαν σε 1 ml αποστειρωμένου νερού, στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε δοχεία τύπου Eppendorf των 1,5 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec ακόμα.

Αφού απομακρύνθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο έγινε προσθήκη 1 ml αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού και επαναδιάλυση των κυττάρων με έντονη ανάδευση. Από το αιώρημα που αποκτήθηκε μοιράστηκαν 100 μl σε δοχεία τύπου Eppendorf όγκου 1,5 ml και έγινε φυγοκέντρηση ώστε να διευκολυνθεί η απομάκρυνση του υπερκειμένου υγρού. Σε δοχείο που περιείχε τα δεκτικά κύτταρα προστέθηκαν 360 μl από το μείγμα μετασχηματισμού (240 μl PEG 3500 50 % w/v, 36 μl LiAc 1M, 50 μl Boiled SS-carrier DNA, 34 μl plasmid DNA, H₂O) και έγινε επώαση διάρκειας 30 min στους 30 °C και 30 min στους 42 °C.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση 30 sec και απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστέθηκε 1 ml αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού και έγινε ισχυρή μηχανική ανάδευση. Τέλος έγινε τοποθέτηση 100 μl του παραπάνω διαλύματος σε τρυβλία πετρί με στερεό θρεπτικό μέσο CM μαζί με την προσθήκη της κατάλληλης αυξοτροφίας.

3.9 Καλλιέργεια σακχαρομύκητα

Το στέλεχος YPH499 (άγριου τύπου) καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο YPD ενώ τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του καλλιεργήθηκαν σε αυξοτροφικά μέσα με παρουσία γλυκόζης ή γαλακτόζης ανάλογα με το αν επιθυμούσαμε την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου. Οι καλλιέργειες γίνονταν σε κάθε περίπτωση με ισχυρή ανάδευση στις 200 rpm και σε θερμοκρασίες από 25 έως και 30°C.

3.10 Εκκίνηση καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένου σακχαρομύκητα

Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 1,5 ml από το κατάλληλο θρεπτικό μέσο μεταφερόταν μόλυνση από τρυβλίο πετρί και ακολουθούσε επώαση για 24 h στους 30 °C. Από εκεί γινόταν εκκίνηση καλλιέργειας 10 ml η οποία αφού αφηνόταν να αναπτυχθεί καλά για 24 h ακόμα χρησιμοποιούνταν για την εκκίνηση της κύριας καλλιέργειας του γενετικά τροποποιημένου σακχαρομύκητα των 100 ml.

3.11 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis, CE) είναι μια τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης που παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων ενόργανων τεχνικών ανάλυσης. Διαφοροποιείται και πλεονεκτεί σε τρία βασικά σημεία σε σχέση με άλλες μεθόδους α) παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατή διαχωριστική ικανότητα β) απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος γ) η κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών είναι ελάχιστη αφού απαιτούνται όγκοι της τάξης του μικρόλιτρου. Οι παραπάνω λόγοι καθιστούν την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση φιλική προς τον χρήστη και το περιβάλλον (Schwartz, Pritchett 1993).

Για να γίνει η ανάλυση της συγκέντρωσης L-DOPA στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των καλλιέργειών χρησιμοποιήσαμε γυμνή τριχοειδή στήλη πυριτίου ενεργού μήκους 27 cm και εσωτερικής διαμέτρου 50 μm. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM τετραβορικού νατρίου με pH 9,2 σε θερμοκρασία 25 °C. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας τα ρυθμιστικά διαλύματα της ανάλυσης

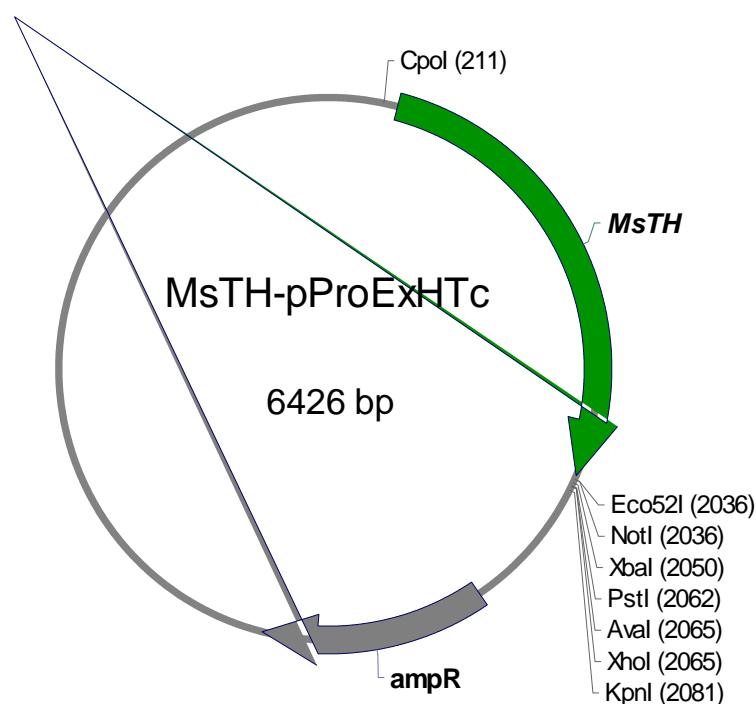
ανανεωνόντουσαν και ακολουθούσε ένα διάστημα όπου η στήλη καθαριζόταν με NaOH για 2 min και προετοιμαζόταν για την ανάλυση αφού ξεπλενόταν με το ρυθμιστικό διάλυμα της ανάλυσης για 4 min.

Για αρχή στα ρυθμιστικά διαλύματα ανάλυσης εφαρμόστηκε σταθερή τάση 29 kV για 2 min, στην συνέχεια ακολούθησε η ένεση με το δείγμα προς μέτρηση υπό πίεση 50 mbar για 4 sec. Η ανάλυση διήρκεσε 20 min και η ανίχνευση των ουσιών έγινε σε ανιχνευτή τύπου DAD ο οποίος και κατέγραψε τις απορροφήσεις που ήταν 192 – 598 nm με εύρος φάσματος 10 nm και σήμα αναφοράς στα 210 nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κλωνοποίηση γονιδίου TH

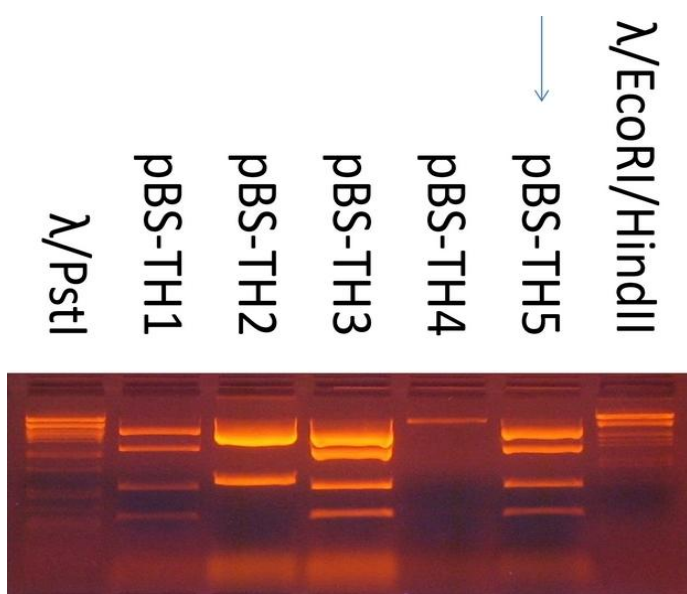
Η *de-novo* ετερόλογη βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης απαιτεί την κλωνοποίηση των εμπλεκόμενων στα βιοσυνθετικά της μονοπάτια γονιδίων, με το πρώτο από αυτά να είναι το γονίδιο της υδροξυλάσης της τυροσίνης (*TH*). Το γονίδιο *TH* που χρησιμοποιήθηκε είχε νωρίτερα κλωνοποιηθεί από τον οργανισμό *Manduca sexta* στον φορέα pProExHTc (Gorman et al. 2007).



Εικόνα 7 Γενετικός χάρτης κλωνοποιημένου φορέα MsTH-pBS

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα που έφερε το γονίδιο (MsTH-ProExHTc) με τα ένζυμα EcoRV και PstI και το κομμένο κομμάτι DNA που αντιστοιχούσε στο γονίδιο TH υποκλωνοποιήθηκε σε άδειο φορέα pBluescript II SK- που είχε προηγουμένως κοπεί με τα ίδια ένζυμα. Για την υποκλωνοποίηση απαιτήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αποικία βακτηρίων *E. coli* που περιείχε το φορέα MsTH-ProExHTc (Εικόνα 7) καθώς επίσης και από αποικία βακτηρίων *E. coli* που περιείχε τον άδειο φορέα pBluescriptII SK-. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη και των δύο φορέων με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των κομμένων φορέων σε 1% πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση της ζώνης του γονιδίου TH και του κομμένου φορέα pBluescriptII SK- με τη βοήθεια νυστεριού. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA, τόσο του φορέα pBluescriptII SK- όσο και του γονιδίου TH, σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο καθαρισμού που περιέχεται στις στήλες καθαρισμού NucleoSpin Extract II.

Μετά την αντίδραση λιγοποίησης των καθαρισμένων κομματιών DNA, έγινε ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH10B σε θρεπτικό μέσο LB που περιείχε αμπικιλίνη. Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (miniprep) από μερικές μετασχηματισμένες αποικίες *E. coli* πραγματοποιήθηκε ο απαραίτητος έλεγχος για να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή του γονιδίου TH στο φορέα pBluescriptII SK- με πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο PvuII.



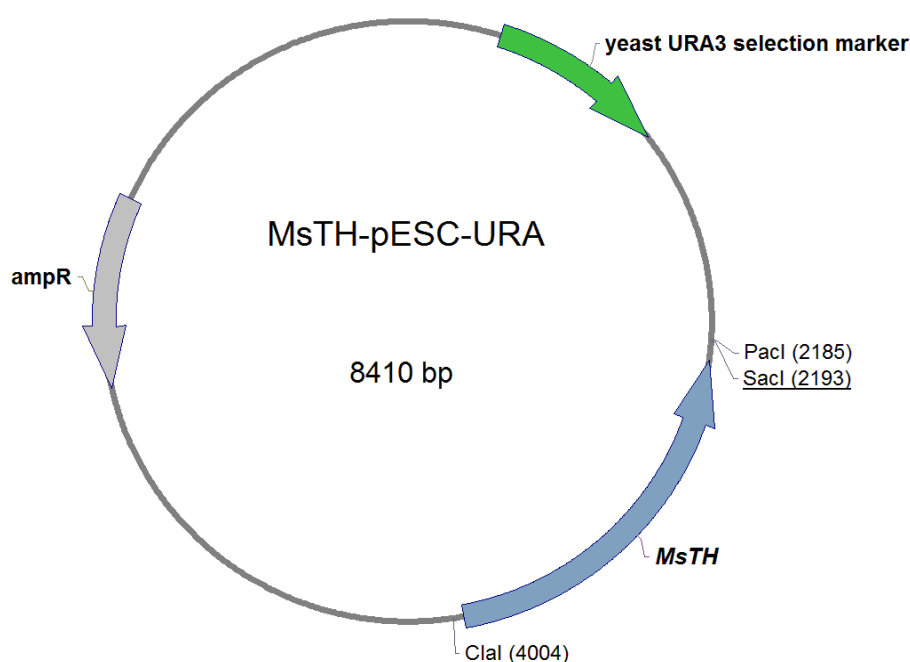
Εικόνα 8 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Στους κλώνους που φάνηκαν σωστοί με τις παραπάνω πέψεις (MsTH-pBS1, 3 και 5), πραγματοποιήθηκε ένας δεύτερος έλεγχος με το περιοριστικό ένζυμο HindII και με αναμενόμενες ζώνες τις 281 bp, 569 bp, 1340 bp, και 2513 bp. Η ορθότητα των επιλεγμένων κλώνων επιβεβαιώθηκε και με αυτή την πέψη.

4.2 Κατασκευή πλασμιδίων

4.2.1 Κατασκευή πλασμιδίου MsTH-pESC-URA

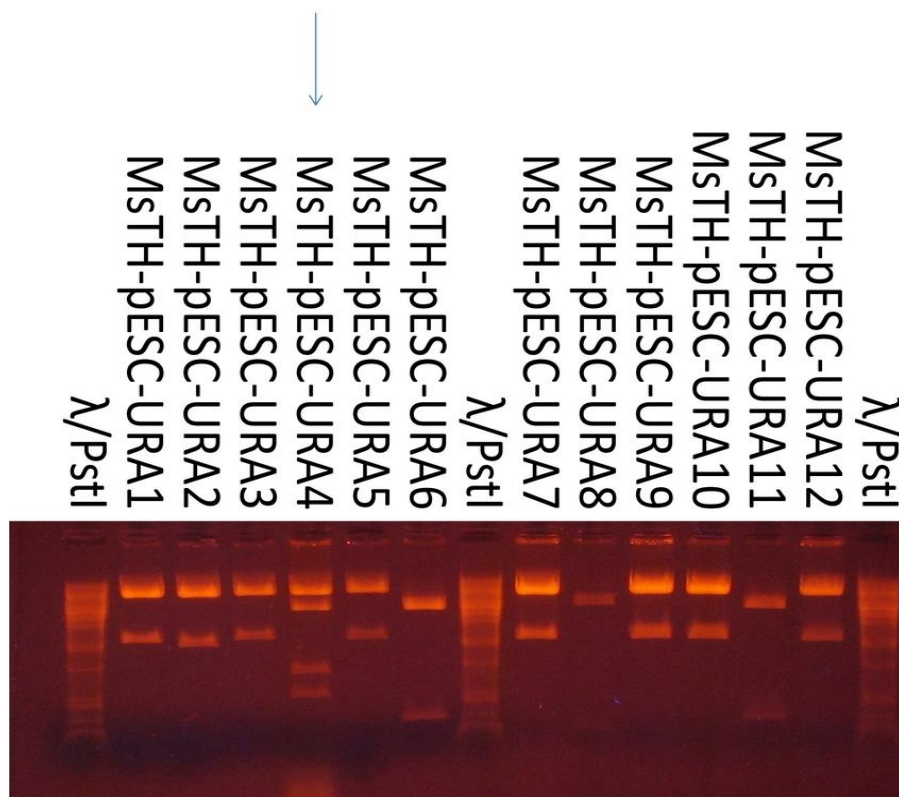
Πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση του γονιδίου *TH* από τον φορέα pBS στον φορέα pESC-URA. Για να επιτευχθεί αυτό έγινε πέψη του φορέα MsTH-pBS και ενός άδειου φορέα pESC-URA με τα περιοριστικά ένζυμα BseCI (ClaI) και SstI (SacI).



Εικόνα 9 Γενετικός χάρτης πλασμιδίου MsTH-pESC-URA

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % και απομόνωση του γονιδίου *TH* και του κομμένου πλασμιδίου pESC-URA από το πήκτωμα αγαρόζης με

την βοήθεια νυστεριού. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με στήλες NucleoSpin Extract II και ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των καθαρισμένων κομματιών DNA για τον έλεγχο της ποσότητας που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση. Μετά την αντίδραση λιγοποίησης των παραπάνω καθαρισμένων κομματιών DNA έγινε ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* σε θρεπτικό μέσο LB με αμικιλίνη για ανάπτυξη αποικιών με επιλογή. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εισαγωγής του γονιδίου *TH* με την πέψη 12 κλώνων του φορέα M₅TH-pESC-URA (Εικόνα 9) καθώς και του σκέτου φορέα pESC-URA, με το περιοριστικό ένζυμο PvuII.

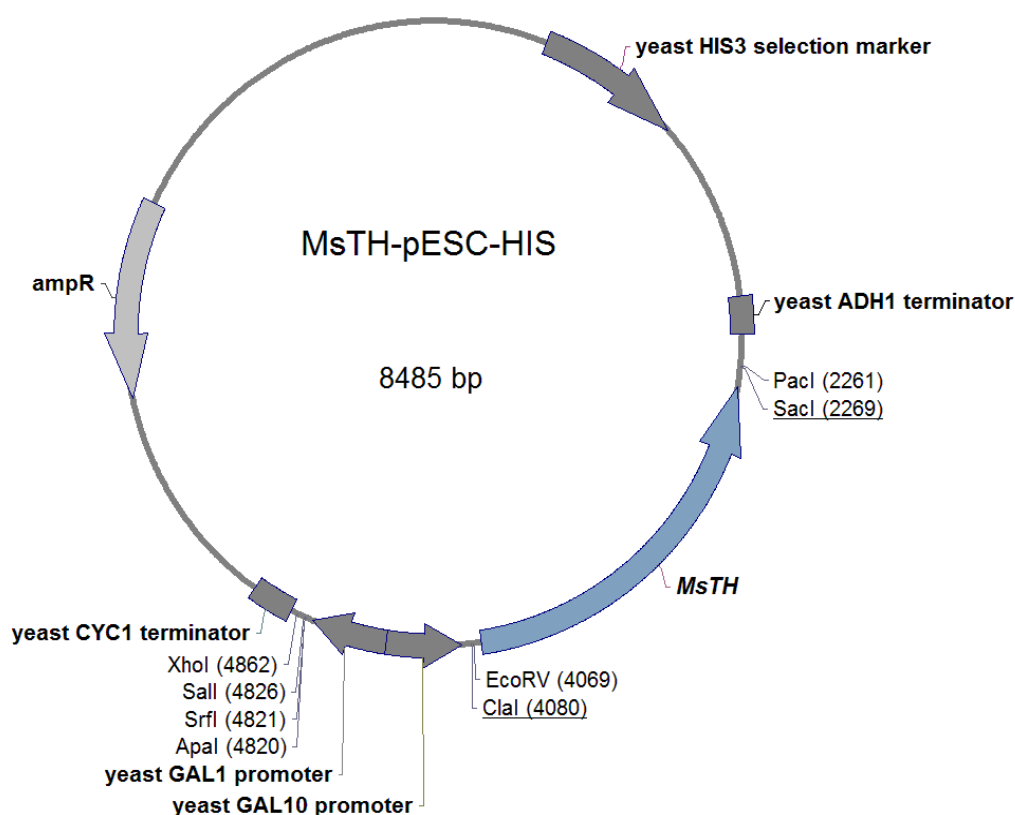


Εικόνα 10 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Οι αναμενόμενες ζώνες μετά την ηλεκτροφόρηση ήταν 281 bp, 757 bp, 2098 bp και 5274 bp για το φορέα M₅TH-pESC-URA και 1357 bp, 5274 bp για τον άδειο φορέα pESC-URA. Σωστός ήταν ο κλώνος M₅TH-pESC-URA-4 (Εικόνα 10).

4.2.2 Κατασκευή πλασμιδίου MsTH-pESC-HIS

Κατά την διάρκεια του πειράματος κατασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο πλασμίδιο που βασίστηκε και αυτό στη χρήση του συστήματος φορέων κλωνοποίησης pESC (Εικόνα 11). Έτσι πραγματοποιήθηκε για δεύτερη φορά υποκλωνοποίηση του γονιδίου *TH* από τον φορέα pBS στον φορέα pESC-HIS. Για να επιτευχθεί αυτό έγινε πέψη των φορέων MsTH-pBS και pESC-HIS με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και στην προηγούμενη κατασκευή, τα BseCI (ClaI) και SstI (SacI).

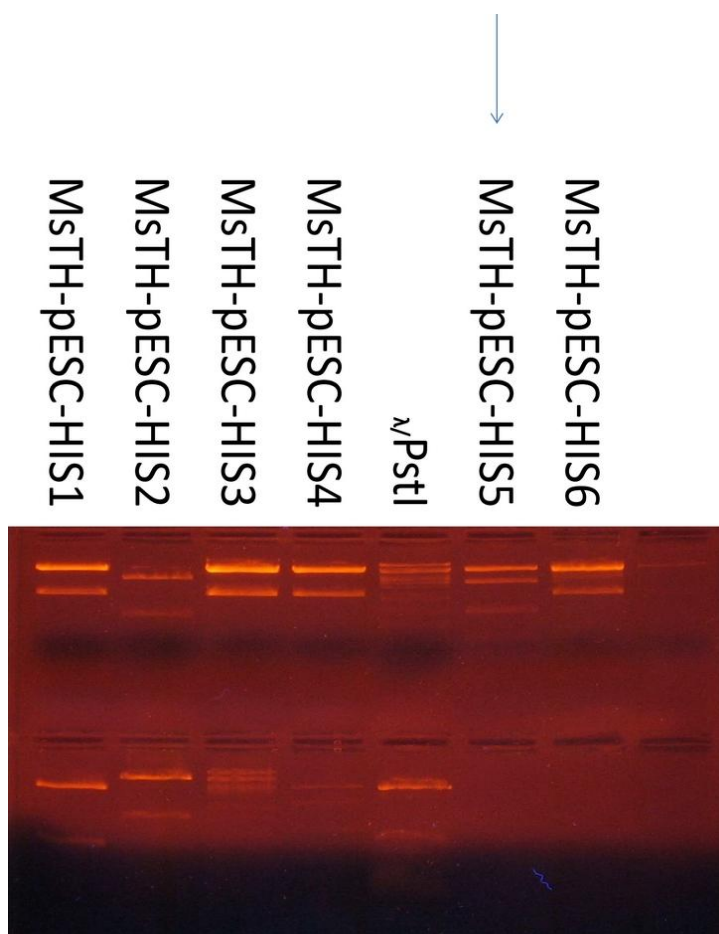


Εικόνα 11 Γενετικός χάρτης πλασμιδίου MsTH-pESC-HIS

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % και απομόνωση του γονιδίου *TH* και του κομμένου πλασμιδίου pESC-HIS από το πήκτωμα αγαρόζης με την βοήθεια νυστεριού. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA με στήλες NucleoSpin Extract II και ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των καθαρισμένων

κομματιών DNA για έλεγχο της ποσότητας που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση.

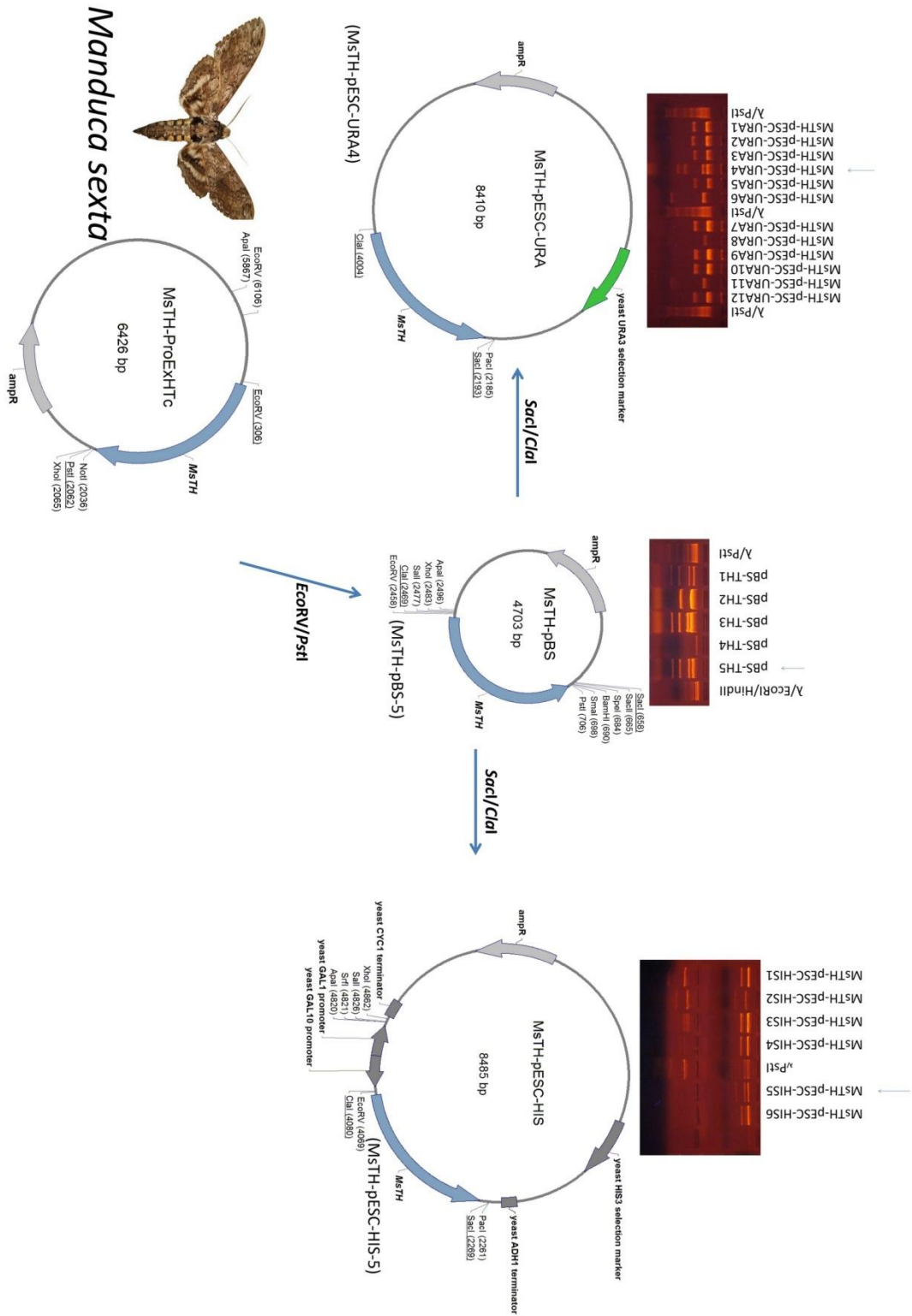
Μετά την αντίδραση λιγοποίησης των παραπάνω καθαρισμένων κομματιών DNA έγινε ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* σε θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλίνη για ανάπτυξη αποικιών με επιλογή. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εισαγωγής του γονιδίου *TH* με την πέψη και των 10 κλώνων του φορέα MsTH-pESC-HIS (Εικόνα 12) με το περιοριστικό ένζυμο PvuII.



Εικόνα 12 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

Οι αναμενόμενες ζώνες για το φορέα MsTH-pESC-HIS μετά την ηλεκτροφόρηση ήταν 281bp, 757 bp, 2098 bp και 5349 bp. Σωστός ήταν ο κλώνος MsTH-pESC-HIS-5 (Εικόνα 12).

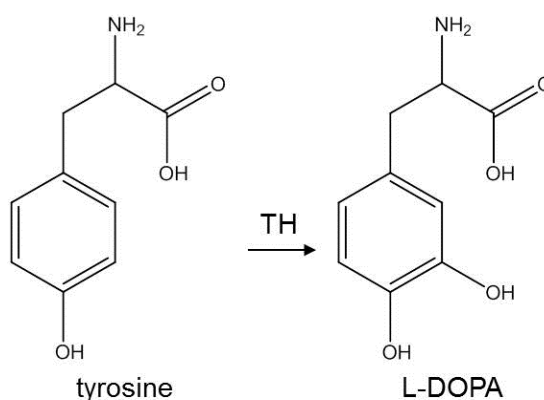
4.2.3 Σχέδιο συνολικής στρατηγικής κατασκευής των πλασμιδίων έκφρασης στον σακχαρομύκητα



4.3 Έλεγχος έκφρασης γονιδίου

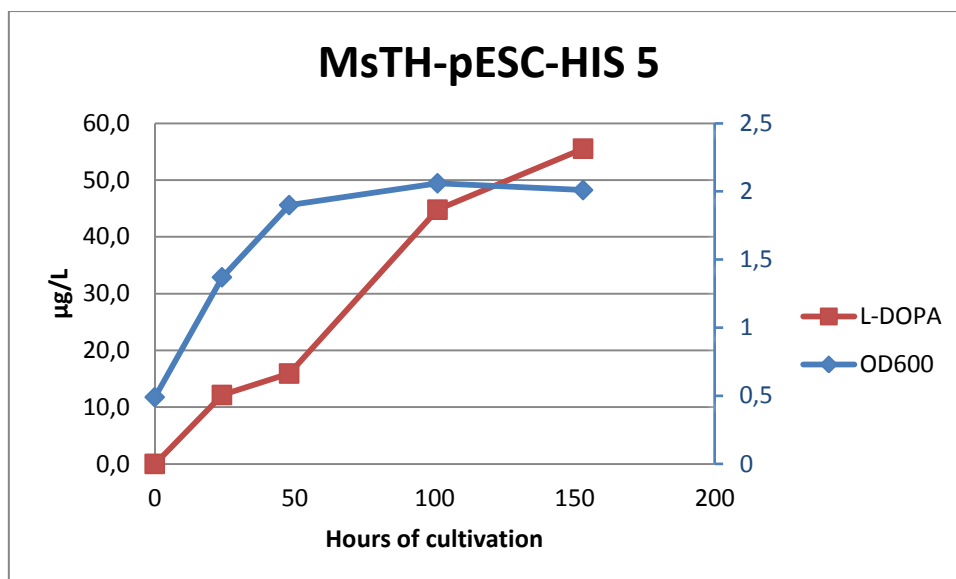
Για τον έλεγχο της λειτουργικής έκφρασης του γονιδίου της υδροξυλάσης της τυροσίνης (*TH*) στο γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του σακχαρομύκητα YPH499 (MsTH-pESC-HIS-YPH499-5) χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό επαγωγικό υπόστρωμα CM που περιείχε γαλακτόζη αντί γλυκόζης και τυροσίνη σε συγκέντρωση 2 mM.

Η τυροσίνη λειτουργεί σαν υπόστρωμα του ενζύμου *TH* το οποίο και καταλύει την αντίδραση προσθήκης μιας ομάδας υδροξυλίου στην «meta» θέση του φαινολικού δακτυλίου της τυροσίνης (Εικόνα 13) παράγοντας το αμινοξύ L-DOPA.



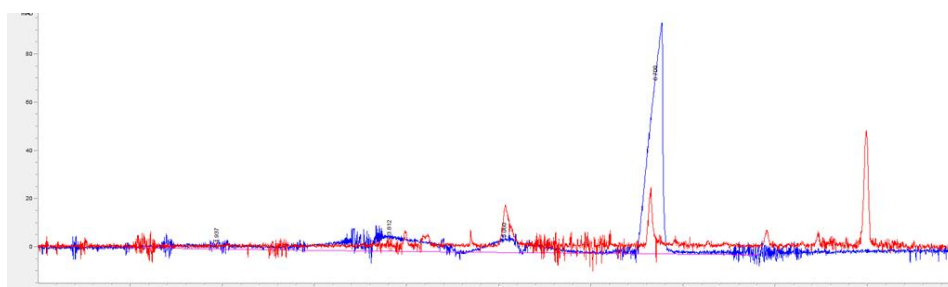
Εικόνα 13 Δομή γονιδίων τυροσίνης και L-DOPA

Η παραγόμενη L-DOPA άρχισε να παράγεται μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα και η συγκέντρωσή της παρακολουθήθηκε έτσι ώστε να αναλυθεί ο ρυθμός ανάπτυξής της. Η ανάλυση της L-DOPA έγινε με την χρήση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis, CE) και η αποτύπωση των αποτελεσμάτων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 14 Αποτελέσματα ανάλυσης τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Για την ταυτοποίηση της παραγόμενης L-DOPA χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος κατακράτησης της πρότυπης ουσίας καθώς και το φάσμα απορρόφησης της. Τα αποτελέσματα δίδονται στις εικόνες που ακολουθούν (εικόνα 15 και 16).



Εικόνα 15 Στοίχιση της παραγόμενης ένωσης (κόκκινη γραμμή) στο θρεπτικό μέσο του σακχαρομύκητα με πρότυπη ένωση (μπλε γραμμή). Φαίνεται ότι ο χρόνος κατακράτησης των δυο ουσιών είναι ο ίδιος.

Με βάση τον χρόνο κατακράτησης της άγνωστης παραγόμενης ουσίας και τον χρόνο κατακράτησης της πρότυπης ένωσης L-DOPA φαίνεται ότι στην καλλιέργεια παράγεται L-DOPA. Η παραχθείσα ένωση όμως ήταν σε πολύ μικρή συγκέντρωση και η παραγωγή της μπορεί να βελτιστοποιηθεί είτε με την χρήση των

απαραίτητων συμπαραγόντων που έχει βρεθεί ότι χρειάζεται το συγκεκριμένο ένζυμο (Torres et al 2010) είτε από την χρήση εναλλακτικών πηγών του γονιδίου.



Εικόνα 16 Στοιχίση της παραγόμενης ένωσης (μπλε γραμμή) με πρότυπη ένωση (κόκκινη γραμμή). Φαίνεται ότι το φάσμα απορρόφησης των δυο ουσιών διαφέρει.

Στα αποτελέσματα που δίδονται όμως σχετικά με το φάσμα απορρόφησης οι δυο αυτές ενώσεις δεν εμφανίζουν το ίδιο αποτέλεσμα (εικόνα 16). Γεγονός που μπορεί να προκύπτει από το ότι η παραγόμενη ουσία μπορεί γρήγορα να μεταβολίζεται σε μια άλλη ένωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας φυτών του Τ.Ε.Ι. Κρήτης που έχει ως τελικό στόχο την κατασκευή ενός νέου βιοσυνθετικού μονοπατιού για την βιοσύνθεση της βιοενεργής χημικής ουσίας υδροξυτυροσόλη.

Τελικός στόχος της πειραματικής προσπάθειας της εργαστηριακής ομάδας είναι η βιοσύνθεση και η παραγωγή της υδροξυτυροσόλης από καλλιέργειες του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η υλοποίηση ενός τέτοιου έργου θα αποτελέσει σίγουρα μια εναλλακτική μέθοδο εκχύλισης σημαντικών χημικών ουσιών από φυτικούς ιστούς αλλά και ένα ελπιδοφόρο βήμα για την μελλοντική χρήση αυτών των ουσιών με διαφορετικούς οικονομικούς και εμπορικούς σκοπούς από αυτούς που ίσχυαν μέχρι τώρα.

Η χρήση του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια μας αφού παρουσιάζει πλεονεκτήματα μιας και είναι απλούστερος ο χειρισμός των γονιδίων στον οργανισμό αυτό του σε σχέση με έναν φυτικό οργανισμό αλλά υπερέχει και εξαιτίας της έλλειψης μηχανισμών απενεργοποίησης μορίων που μπορεί να παρουσιάζουν πολλά είδη φυτών. Πρόκειται για έναν ευκαρυωτικό οργανισμό ο οποίος έχει εξελίξει ένα ιδιαίτερο μεταγραφικό και μεταφραστικό μηχανισμό ο οποίος παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους μηχανισμούς που αναπτύσσουν τα φυτά.

Από τα αποτελέσματα της μέτρησης που κάναμε τα οποία και δίδονται παραπάνω στην Εικόνα 14, το γονίδιο της υδροξυλάσης της τυροσίνης έχει την ικανότητα να εκφράζεται στον σακχαρομύκητα και να μετατρέπει την τυροσίνη σε μια ένωση που μοιάζει με την L-DOPA σε συγκέντρωση 55,5 μg/L έπειτα από 153 ώρες καλλιέργειας. Εξαιτίας όμως του διαφορετικού φάσματος απορρόφησης που παρουσιάζει η παραγόμενη ουσία από την L-DOPA πρέπει να συνεχιστούν τα

πειράματα ώστε να επιβεβαιωθεί η παραγωγή της ουσίας και φυσικά να βελτιστοποιηθεί η έκφρασή της.

Τα πειράματα βελτιστοποίησης μπορεί να περιλαμβάνουν την χρήση κάποιων συμπαραγόντων απαραίτητων για την ενεργότητα του συγκεκριμένου ενζύμου. Μια δεύτερη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση εναλλακτικών πηγών για τα γονίδια του έργου στις οποίες αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενεργότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Bertani G. 2004. "Lysogeny at mid-twentieth century and other experimental systems" *Journal of bacteriology* volume 186.
- Bisignano G. Tomaino A. Lo Cascio R. Crisafi G. Uccella N. Saija A. 1999. "On the in-vitro activity of oleuropein and hydroxytyrosol" *Pharm Pharmacol* Volume 59
- Brown T. 2010. "Gene cloning and DNA analysis: an introduction" Wiley-Blackwell
- Engelbrecht J. Brent R. Kaderbhai M. 1991. "Current protocols in molecular biology" John Wiley & Sons, Inc.
- Gorman M. Chunju A. Kanost M. 2007. "Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*" *Journal of Insect Biochem Mol Biol*.
- Granados S. Quiles J. Ramirez-Tortosa C. Sanchez-Rovira P. Ramirez Tortosa MC. 2010. "Hydroxytyrosol from laboratory investigations to future clinical trials". *Nutrition Reviews* Volume 68.
- Schwartz H. Pritchett T. 1993. "Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis: application to analytical biotechnology" Beckman Instruments, Inc.
- Sherman F. 2002. "Getting started with yeast" *Methods Enzymol*
- Stephanopoulos G. 1999. "Metabolic fluxes and metabolic engineering" Academy press of Department Chemical Engineering of Massachusetts Institute of
- Stephanopoulos G. Aristidou A. Nielsen J. 1998. "Metabolic engineering: principles methodologies" Academy press of San Diego
- Thibault C. Arseneault M. Longpre F. Ramassamy C. 2011. "Current Alzheimer Research" Volume 8. Number 5. Bentham Science Publishers

- Torres P. Winkler M. Glieder A. Fraaije M.W. 2010. "Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications" Journal of Biotechnology. Elsevier.
- Tuck K. Hayball P. 2002. "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects" The journal of Nutritional Biochemistry. Elsevier
- Visioli F. 2008. "Hydroxytyrosol" SciTopics. Retrieved March 2011 from <http://www.scitopics.com/Hydroxytyrosol.html>
- Yangui T. Sayadi S. Gardoubi A. Dhoud A. 2010. "Fungicidal effect of Hydroxytyrosol rich preparations from olive mill waste water against *Verticillium dahliae*" Elsevier Technology Cambridge Massachusetts.

ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Καράταγλης Σ. 1994. "Φυσιολογία φυτών" Art of text
- Ντούνη Ε. 2010. "Εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας" Τμήμα γεωπονικής βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ταμπακάκη Α. Βερβερίδης Φ. 2003. "Εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας φυτών" Τμήμα Φυτικής παραγωγής Τ.Ε.Ι. Κρήτης.
- Τραντάς Ε. 2009. " Ετερόλογη βιοσύνθεση φυτικών φλαβονοειδών από το σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για την αξιοποίησή τους στην φυτοπροστασία της αμπέλου και στην οινοποίηση" Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης.