



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Κλωνοποίηση defensin ισομόρφων και παραγωγή
ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σύστημα ετερόλογης
έκφρασης *E. coli***

Βασίλης Πολυβίου

Λεμεσός, Μάης 2023

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος
Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας, και Επιστήμης Τροφίμων

Μεταπτυχιακή διατριβή

Κλωνοποίηση defensin ισομόρφων και παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σύστημα
ετερόλογης έκφρασης *E. Coli*

Του Βασίλη Πολυβίου

Λεμεσός, Μάης 2023

Έντυπο έγκρισης

Μεταπτυχιακή διατριβή

Κλωνοποίηση defensin ισομόρφων και παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σύστημα ετερόλογης έκφρασης *E. Coli*

Παρουσιάστηκε από

Βασίλη Πολυβίου

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Νικόλαος Νικολουδάκης, ΕΕΠ

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Δρ. Δημήτρης Τσάλτας, Αν. Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Δρ. Ιάκωβος Παντελίδης, Επικ. Καθηγητής

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάης 2023

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Βασίλης Πολυβίου, 2023

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας, και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον δρ. Νικόλαο Νικολουδάκη που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια της εκπλήρωσης της μεταπτυχιακής μου διατριβής καθώς και για τις γνώσεις που μου έχει προσφέρει. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και αδερφές μου που με στήριξαν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου και ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	14
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	16
1.1 Ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	16
1.1.1 Επιλογή οργανισμού.....	16
1.1.2 Επιλογή πλασμιδίου.....	17
1.1.3 Ρεπλικόνιο.....	17
1.1.4 Προαγωγέας.....	18
1.1.5 Δείκτες επιλογής.....	24
1.1.6 Ετικέτες συγγένειας.....	25
1.1.7 Αφαίρεση ετικέτας.....	28
1.1.8 Αντιμετώπιση προβλημάτων παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	28
1.1.9 Τοξικότητα πρωτεΐνης.....	29
1.1.10 Μεροληψία χρήσης κωδικονίου.....	32
1.1.11 Περιοριστικοί παράγοντες στην καλλιέργεια κατά παρτίδες.....	35
1.1.12 Σχηματισμός συσσωμάτων πρωτεΐνης σε σώματα εγκλεισμού (Inclusion Bodies-IBs).....	38
1.1.13 Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών.....	39
1.2 Περιγραφή των αμυντικών πρωτεϊνών (defensins).....	40
1.2.1 Η σημασία και η δομή των defensins ως αντιμικροβιακά πεπτιδία.....	40
1.2.2 Φυτικές defensins.....	41
1.2.3 Η εξέλιξη, ποικιλομορφία και δομή των φυτικών defensins.....	41
1.2.4 Σύνδεση των λιπιδίων.....	44
1.2.5 Ποικιλομορφία αλληλουχιών στους επιφανειακούς βρόγχους.....	45
1.2.6 Αναστολή α-αμυλάσης και τρυψίνης.....	46
1.2.7 Αντιβακτηριακή δράση.....	46
1.2.8 Ανεκτικότητα μετάλλων.....	47
1.2.9 Φράξιμο των καναλιών ιόντων.....	47
1.2.10 Αντιπολλαπλασιαστική δράση στα κύτταρα καρκίνου.....	47
1.2.11 Αναστολή ανάπτυξη ρίζας και επιδράσεις στην αύξηση του φυτού.....	48
1.2.12 Ποικιλία μηχανισμών δράσης σε μεγάλο εύρος μυκητιακών ειδών.....	48
1.3 Σκοπός του πειράματος.....	49

2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
2.1	Σχεδιασμός πεπτιδίων	50
2.2	Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών που κωδικοποιούν τους δύο ισόμορφους defensin ...	51
2.3	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	52
2.4	Απομόνωση ζωνών DNA από πηκτή αγαρόζης (Freeze & Squeeze Method)	52
2.5	Πέψη προϊόντων και φορέα κλωνοποίησης με περιοριστικά ένζυμα (<i>Sall</i> & <i>EcoRI</i>).....	53
2.6	Ligation.....	54
2.7	Μετασχηματισμός κύτταρων <i>E.coli</i> που δεν εκφράζουν πρωτεΐνη (one shot).....	55
2.8	Colonies PCR & καλλιέργεια κυττάρων	55
2.9	Απομόνωση πλασμιδίων	56
2.10	Αλληλούχιση των κλώνων	58
2.11	Μετασχηματισμός κύτταρων <i>E.coli</i> που εκφράζουν πρωτεΐνη (BL21 DE3)	58
2.12	Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και επαγωγή με IPTG	58
2.13	Εξαγωγή πρωτεΐνης με την μέθοδο Freeze and thaw	58
2.14	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης.....	59
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
3.1	Σχεδιασμός πεπτιδίων	60
3.2	Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών που κωδικοποιούν τους δύο ισόμορφους defensin ...	61
3.3	Πέψη προϊόντων και φορέα κλωνοποίησης με περιοριστικά ένζυμα (<i>Sall</i> & <i>EcoRI</i>).....	62
3.4	Colonies PCR	63
3.5	Αλληλούχιση αποικιών	66
3.6	Μετασχηματισμός κύτταρων <i>E.coli</i> που εκφράζουν πρωτεΐνη (BL21 DE3)	69
3.7	Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και επαγωγή με IPTG	69
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι defensins είναι μικρές κατιονικές πρωτεΐνες, με όμοια και συμπαγή δομή, πλούσιες σε κυστεΐνη και διατηρούν την σταθερότητα τους μέσω των δισουλφιδικών δεσμών. Αυτά τα αντιμικροβιακά πεπτιδία (Anti-microbial peptides-AMPs), εκφράζονται ή είναι δυνατόν να υπάρχουν ήδη και να είναι ενεργά σε περίπτωση βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης. Εκτός από το ότι είναι διαδεδομένες σε όλους του ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν μια τεράστια γκάμα από τρόπους/μηχανισμούς δράσης ενάντια σε παθογόνα και καθιστούν την πρώτη γραμμή άμυνας ως αμυντικός μηχανισμός των φυτών.

Σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται η χρήση του ετερόλογου συστήματος του *E. coli* BL21(DE3) και του φορέα έκφρασης pET6xHN για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα ήταν τα δύο διαφορετικά γονίδια defensins (Solyc04g008470.3.1 και Solyc07g009060.4.1) από τομάτα, τα οποία έχουν δείξει αυξημένη δραστηριότητα έναντι μικροοργανισμών.

Μετά από διαδικασίες που ακολουθήθηκαν καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε τα γονίδια, να τα περάσουμε στους φορείς έκφρασης και να μετασχηματίσουμε τα κύτταρα του *E. coli* που εκφράζουν την πρωτεΐνη. Η επαγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με 0.5 mM IPTG και έγινε έλεγχος της έως τις 4 ώρες, όπου φάνηκε την 4^η ώρα να έχει την μέγιστη επαγωγή.

Λέξεις κλειδιά: Defensins, Anti-microbial peptides, τομάτα, ετερόλογο σύστημα έκφρασης *E. coli* BL21(DE3), IPTG

ABSTRACT

Defensins are small cationic proteins with similar and compact structures, rich in cysteine, and maintain their stability through disulfide bonds. These antimicrobial peptides (AMPs) are expressed or may already exist and be active in cases of biotic or abiotic stress. Besides being widespread in all eukaryotic organisms, they have a wide range of modes/mechanisms of action against pathogens, making them the first line of defense as a plant's defense mechanism.

This study presents the use of the heterologous system of *E. coli* BL21(DE3) and the expression vector pET6xHN for the production of a recombinant protein. The genes used for the experiment were two different defensin genes (Soly04g008470.3.1 and Soly07g009060.4.1) from tomatoes, which have shown increased activity against microorganisms.

After following the procedures, we managed to clone the genes, transfer them into expression vectors, and transform *E. coli* cells expressing the protein. Protein induction was performed with 0.5 mM IPTG, and its expression was monitored for up to 4 hours, showing maximum induction at the 4th hour.

Keywords: Defensins, Antimicrobial peptides, tomato, heterologous expression system *E. coli* BL21(DE3), IPTG.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Πεπτιδιακές ετικέτες.....	26
Πίνακας 2: Διπλή πέψη με περιοριστικά ένζυμα.....	53
Πίνακας 3: Ligation προϊόντων και φορέα στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.....	54
Πίνακας 4: Αντιδρώντα και αναλογίες για τα colonies PCR.....	55
Πίνακας 5: Υλικά για την κατασκευή πηκτής ακρυλαμίδης.....	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1: Ανατομία πλασμιδίων έκφρασης.....	17
Εικόνα 2: Λειτουργία του Lac προαγωγέα.....	19
Εικόνα 3: Μεταβολή της μεταγραφής του lac οπερονίου σε σχέση με την γλυκόζη.....	20
Εικόνα 4: Στοιχεία ελέγχου του συστήματος pET.....	21
Εικόνα 5: Έλεγχος έκφρασης araB, araA και araC σε σχέση με την αραβινόζη.....	22
Εικόνα 6: SOS απόκριση βακτηρίων.....	23
Εικόνα 7: Τρεις περιπλασματικές οδοί μετατόπισης στο <i>E. coli</i>	32
Εικόνα 8: Οι πιθανές επιπτώσεις των ακολουθιών Shine-Dalgarno (SD).....	34
Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα της διάταξης CSTR για ζύμωση τροφοδοτούμενης παρτίδας.....	37
Εικόνα 10: Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης σε κύτταρα <i>E. coli</i> που παράγουν πρωτεΐνη σύντηξης της αλυσίδας A β-gal-ινσουλίνης (x17.500).....	39
Εικόνα 11: Χαρακτηριστική δομή φυτικής defensin.....	42
Εικόνα 12: Σύγκριση μεταξύ cis & trans defensins.....	43
Εικόνα 13: Διατηρημένες δομές μεταξύ των πρωτεϊνών MsDef1 and MtDef4 και αμινοξικές διαφορές.....	45
Εικόνα 14: Διαδικασία για την κλωνοποίηση και έφραση δύο ισομόρφων defensin.....	50
Εικόνα 15: Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση δύο ισομόρφων defensins.....	51
Εικόνα 16: Συνθήκες και αντιδραστήρια για την ενίσχυση των ισομόρφων.....	52
Εικόνα 17: Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.....	57
Εικόνα 18: Σχεδιασμός πεπτιδίου 4, ανάλυση και επανασχεδιασμός κωδικονίων, σχεδιασμός εκκινητών, νουκλεοτιδικό και αμινοξικό alignment του πεπτιδίου.....	60
Εικόνα 19: Σχεδιασμός πεπτιδίου 7, ανάλυση και επανασχεδιασμός κωδικονίων, σχεδιασμός εκκινητών, νουκλεοτιδικό και αμινοξικό alignment του πεπτιδίου.....	61
Εικόνα 20: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης των δύο ενισχυμένων γονιδίων.....	62
Εικόνα 21: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης πένης.....	63
Εικόνα 22: Επιτυχής μετασχηματισμός σε στελέχη <i>E. coli</i> one shot που δεν εκφράζουν πρωτεΐνη....	64
Εικόνα 23: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης μετά την ενίσχυση του γονιδίου του πεπτιδίου 4 από τις αποικίες.....	65
Εικόνα 24: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης μετά την ενίσχυση γονιδίου του πεπτιδίου 7 από τις αποικίες.....	65
Εικόνα 25: Αλληλουχία της αποικίας 4 του πεπτιδίου 4 με το επιθυμητό insert.....	66
Εικόνα 26: Αλληλουχία της αποικίας 1 του πεπτιδίου 7 με το επιθυμητό insert.....	67

Εικόνα 27: Βιοπληροφορική ανάλυση μετάφρασης του πλασμιδίου όπου μας δίνει την defensin 4...68
Εικόνα 28: Βιοπληροφορική ανάλυση μετάφρασης του πλασμιδίου όπου μας δίνει την defensin 7...68
Εικόνα 29: Επιτυχής μετασχηματισμός σε στελέχη <i>E. coli</i> BL21 (DE3) που εκφράζουν πρωτεΐνη....69
Εικόνα 30: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης ακρυλαμίδης μετά την επαγωγή IPTG.....70

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LB: Lurient Broth

DNA: Deoxyribonucleic acid (δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ)

MCS: Multiple cloning site (πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης)

Lac: Λακτόζη

RNApol: Ribonucleic acid polymerase (πολυμεράση του ριβοζονουκλεϊνικού οξέος)

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

Glc: Γλυκόζη

CAP: Cyclic adenosine phosphate (κυκλική φωσφορική αδενοσίνη)

Trp: Τρυπτοφάνη

IPTG: ισοπροπυλ β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη

T7 RNAP: T7 RNA πολυμεράση φάγου

Tt: θερμοκρασία μετάβασης

SRP: Signal recognition particle (μόριο αναγνώρισης σήματος)

Arg: Αργινίνη

Ile: Ισολευκίνη

Leu: Λευκίνη

Pro: Προλίνη

Gly: Γλυκίνη

SB: Super Broth

TB: Terrific Broth

IBs: Inclusion Bodies

AMPs: Antimicrobial peptides (Αντιμικροβιακά πεπτίδια)

PCR: Polymerase chain reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

UV: Ultra Violet

dNTPs: deoxynucleotide triphosphate (Δεοξυνουκλεοτίδια)

RT: Room temperature (Θερμοκρασία δωματίου)

OD: Optical density (Οπτική πυκνότητα)

PBS: Phosphate-buffered saline

SDS: Sodium dodecyl sulfate

APS: Ammonium persulfate

DTT: Dithiothreitol

ISR: Induced systemic resistance (Επαγωγική συστηματική ανθεκτικότητα)

SAR: Systemic acquired resistance (Συστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα)

PRR: Pattern recognition receptor (Υποδοχέας αναγνώρισης μοτίβου)

PR: Pathogenesis related