



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Fakulteten för hälso- och livsvetenskap

Examensarbete

Terpenmetabolism i *Artemisia annua*: rekombinant produktion och karaktärisering av seskviterpensyntaser



Författare: Nahil Al-Masaraa

Ämne: Biomedicinsk

laboratorievetenskap

Nivå: Grundnivå

Nr: 2015:BL2

Terpenmetabolism i *Artemisia annua*: rekombinant produktion och karaktärisering av seskviterpensyntaser.

Studentens namn: Nahil Al-Masaraa

Examensarbete i Biomedicinsk laboratorievetenskap, 15 h

Filosofie Kandidatexamen

Handledare: Peter Brodelius, *Professor* och Sinsia Bjelic, *Biträdande lektor*
Institution för kemi och biomedicin, Linnéuniversitetet Kalmar

Examinator: Marlene Norrby, *Forskningsingenjör*
Institution för kemi och biomedicin, Linnéuniversitetet Kalmar

Examensarbetet ingår i biomedicinsk analytiker programmet 180 hp
Utgivningsdatum: 25-05-2015

Sammanfattning

Malaria är en tropisk sjukdom som orsakas av encelliga organismer, protozoer från *Plasmodium* släktet. Varje år drabbas ungefär en halv miljard människor av malaria och cirka en miljon av dessa dör. Okomplicerad malaria är en mild form av malaria som enligt WHO rekommendationer ska behandlas med artemisinin baserad kombinationsterapi (ACT). Artemisinin produceras naturligt i låg mängd från växten *Artemisia annua*. Trots att medicinen har visat sig effektiv mot malaria med färre biverkningar är den höga kostnaden en nackdel. Forskning pågår för att hitta nya syntetiska vägar för framställning av artemisinin i växten genom att studera terpenmetabolism och vilka aktiva enzymer det finns som har en avgörande roll i utbytet av artemisinin i växten.

Syftet med denna studie var att med hjälp av genteknik och molekylärbiologiska metoder producera och identifiera två rekombinanta enzymer, seskviterpensyntaser från *A. annua*.

Experimentet inleddes med att transformera klonade T-DNA (AaTS-1 och AaTS-2) som kodar för seskviterpensyntaser från *A. annua* med hjälp av *Agrobacterium tumefaciens* vartefter transienta transkriptionen av generna som finns i en binär vektor initierades i blad från växten *Nicotiana benthamiana* genom infiltration. Totalt RNA extraherades från växten och översattes till cDNA för att sedan studera förhållandet av transient uttryck i bladen med qPCR. Enzymerna extraherades från bladen och inkuberades med farnesyldifosfat övernatt och produkten identifierades följande dag med gaskromatografi-masspektrofotometri (GC-MS). Resultatet blev att inget genuttryck av AaTS-1 och AaTS-2 kunde detekteras i bladen. Resultat från GC-MS visade att ingen proteinprodukt genererades. De negativa resultaten berodde främst på brist av resultat som verifierar att plasmiderna var konstruerade med selektionsgenerna, men även på grund av en icke effektiv transformation, orsakad av bakteriecellklumpar som förhindrade infiltreringsmedium att nå inre delarna av bladen.

Nyckelord

Artemisinin; *Artemisia annua*; *Agrobacterium*; agroinfiltrering; *Nicotiana*; terpensyntas

Abstract

Malaria is a tropical disease caused by single-cell organisms, protozoa from the *Plasmodium* genus. Every year, about half a billion people are affected by malaria and around one million of them die. Uncomplicated malaria is a mild form of malaria, which according to WHO recommendations should be treated with Artemisinin-based Combination Therapy (ACT). Artemisinin is produced naturally in low amount in the plant *Artemisia annua*. Although the medication has been found effective against malaria with few side effects, the high cost of ACT is a disadvantage. Research is underway to find new synthetic pathways for the production of artemisinin in the plant by studying terpenoid metabolism and the crucial role of active enzymes in the yield of artemisinin. The purpose of this study was to produce and identify two recombinant enzymes, sesquiterpene synthases from *A. annua*.

The experiment was initiated by transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with an expression vector containing T-DNA encoding sesquiterpene synthases and transiently produces the protein in leaves of *Nicotiana benthamiana* plants. By using molecular biological methods, RNA was extracted from the plant and then translated into cDNA to study the relationship of transient expression in leaves with qPCR. A protein extract was incubated with farnesyldiphosphate overnight and the product was identified the following day with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The results showed that no gene expression of AaTS-1 or AaTS-2 had been taken place in leaves and that no protein products were generated as shown by GC-MS. The negative results was mainly due to lack of reliable results which verify that the plasmids were constructed with selection genes, but also because of a non-effective transformation caused by bacterial cell clumps that prevented infiltration medium to reach the inner parts of the leaves.

Förkortningar

ACT: Artemisininbaserad kombinationsterapi

ADS: Amorfadien syntas

Ct-värde: cykeltröskel värde

DBR2: Artemisinic aldehyde reductas

EI: Elektron Impact

FDP: Farnesyldifosfat

GC: gaskromatografi

GC-MS: Gaskromatografi-Masspektrofotometri

LB medium: Lysogeny Broth medium

OD: Optical Density

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RT: Reverse Transcriptase

SIM: *Selected Ion Monitoring*

T-DNA: Transfer DNA

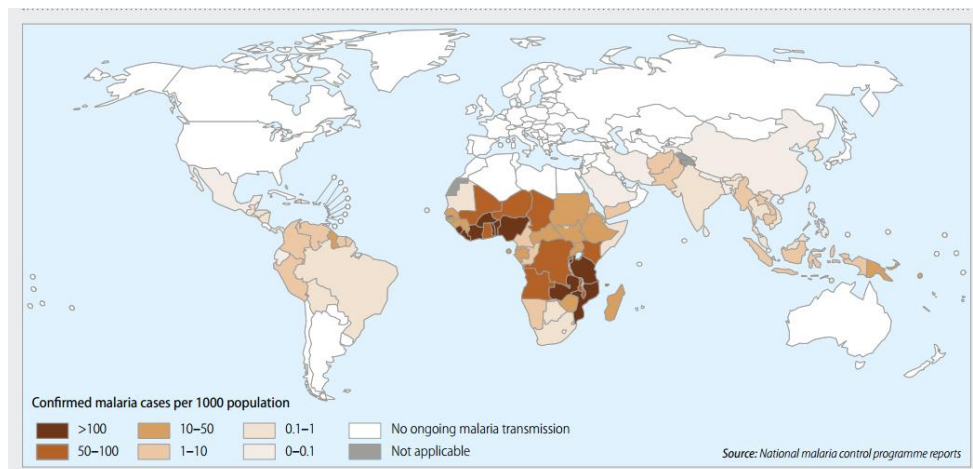
Innehållsförteckning

1. Introduktion	1
1.1 Malaria	1
1.2 Etiologi	1
1.3 Livscykel	2
1.4 Symptombild	3
1.5 Medicinsk behandling	3
1.6 Historik bakgrund av artemisinin	4
2. Molekylärbiologiska metoder	5
2.1 Agrobakterium och transient uttryck	5
2.2 RNA extraktion	6
2.3 Polymerase Chain Reaction	7
2.4 Quantitative polymerase Chain Reaction (qPCR)	8
2.5 Gaskromatografi – Masspektrofotometri	8
2.6 Syfte	10
3. Metod och material	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.1 Initial förberedelse av provmaterial utförd av en forskargrupp	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.2 Provmaterial för experimentet	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.3 Förberedande av bakterieodling och agroinfiltrering	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.4 Proteinextraktion och gaskromatografisk analys	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.5 RNA extraktion med Purelink® Plant RNA Reagent	Fel! Bokmärket är inte definierat.
3.6 DNaseI behandling, cDNA syntes och qPCR	Fel! Bokmärket är inte definierat.
4. Resultat	Fel! Bokmärket är inte definierat.
4.1 Tillväxt av <i>Agrobacterium tumefaciens</i> i LB plattor	Fel! Bokmärket är inte definierat.
4.2 Agroinfiltrering av AaTS-1 och AaTS i <i>Nicotiana. benthamiana</i>	Fel! Bokmärket är inte definierat.
4.3 Enzymaktivitetsanalys med GC-MS	Fel! Bokmärket är inte definierat.
4.4 Bestämning av total RNA koncentrationen och analys av cDNA	Fel! Bokmärket är inte definierat.
5. Diskussion	Fel! Bokmärket är inte definierat.
6. Referenser	Fel! Bokmärket är inte definierat.

1. Introduktion

1.1 Malaria

Malaria är en av de vanligaste tropiska parasitsjukdomar som sprids via myggor. I över hundra år av framgångsrika insatser och ständiga försök att få kontroll över malaria, är sjukdomen fortfarande ett av de största och växande hoten mot den globala hälsan, framför allt i de subtropiska och tropiska delarna av världen. Under år 2013 har andelen människor som lever i områden där det löper hög risk att drabbas av malaria uppskattats till 47 % enligt WHO (World Health Organisation) [1,2]. Utav dessa insjuknade ungefär 198 miljoner varav en miljon avled under samma år. Barn under 5-årsåldern står för cirka 78 % av alla dödsfall som orsakas av malaria. Malaria förekommer endemiskt i världens allra fattigaste länder, främst i Afrika söder om Sahara, där malaria är den näst vanligaste sjukdom efter AIDS, se Figur 1. I västvärlden, i bland annat Europa och USA har malaria varit i princip utrotat sedan mitten av 1950-talet [2,3].



Figur 1. Karta över riskområden för malaria år 2013 (bilden är återgiven med tillstånd från WHO, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/) [2].

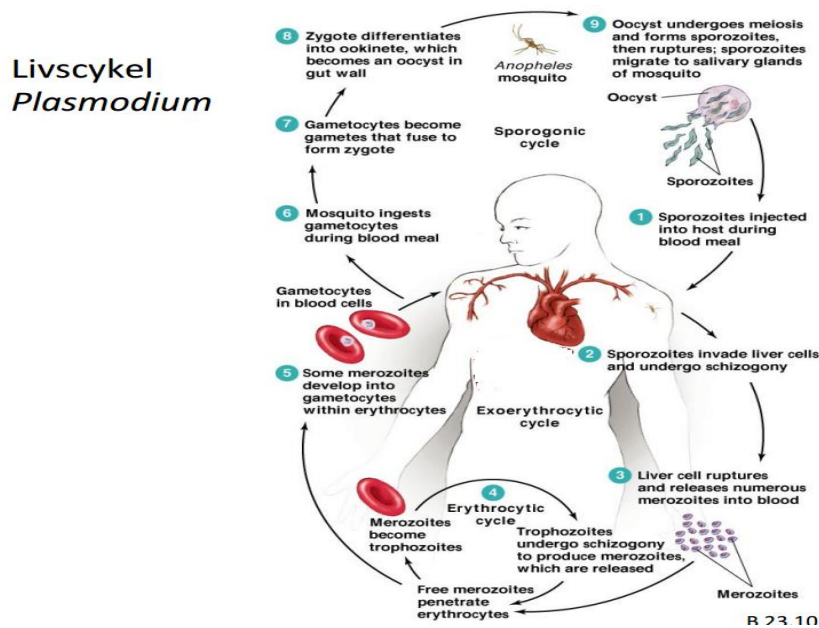
1.2 Etiologi

Malaria orsakas av encelliga organismer, protozoer som tillhör släktet *Plasmodium*. Idag finns det fem kända arter beskrivna som kan orsaka malaria hos människan, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* och *Plasmodium ovale*, där *P. falciparum* är den vanligast förekommande arten i tropikerna och mest virulent med hög dödlighet. De övriga arterna

förekommer väldigt sällan och är mindre farliga [4]. Parasiten överförs mellan människor via honmyggor av släktet *Anopheles* och det finns ca 430 arter som är lokaliserade i olika delar av världen varav ca 30-40 arter är viktiga smittvektorer av malariaparasiten [5].

1.3 Livscykel

Första steget i livscykeln initieras med att en malariainfekterad mygga suger ut blod från en människa samtidigt som den sprutar in sin saliv innehållande sporozoiter i blodbanan, se Figur 2. Sporozoiter förs till levern och börjar infektera en del av levercellerna så kallade hepatocyter. Väl inne i hepatocyterna sker schizogoni, dvs. asexuell celledelning av sporozoiter till så kallade merozoiter. Efter cirka en vecka lämnar merozoiter levern och tränger ut i blodcirkulationen och därutöver infekterar blodceller, erythrocyter. Detta utgör starten för symptomuppträdandet av malaria hos en infekterad individ. Inne i erythrocyterna omvandlas merozoiter vidare till trophozoiter som använder hemoglobin som näring och mognar till schizonter. Dessa genomgår en asexuell förökning och producerar ytterligare nya merozoiter. När erythrocyter brister släpps merozoiter i blodomloppet och angriper nya blodceller. Livscykeln avslutas när en del av merozoiter differentieras till gametocyter och förs över till en icke infekterad mygga via ett stick [6,7].



Figur 2. Schematisk bild av *Plasmodium* livscykel (Bilden är modifierad från referens 8; Bauman RW. Microbiology: with diseases by taxonomy. 2. ed. San Francisco, CA.: Pearson/Benjamin Cummings; 2007. Kapitel 23, Figur 10) [8].

1.4 Symptombild

Hur svåra malariasymptomen är, och hur snabbt de uppträder beror främst på individens fysiska hälsa och vilken parasit som infekterar. Inkubationstid till symptomen är minst 7 dygn efter smittotillfället. Den längsta inkubationstiden för *P. falciparum* är ofta < 4 veckor och för övriga arter upp till 9-12 månader [9].

Den vanligaste formen av malaria ger initialt influensaliknande symptom följt av febertoppar som varar under några timmar vartannat eller vart tredje dygn. Andra typiska symptom är illamående, frossa, kräkningar, diarréer, muskel- och huvudvärk. I detta skede kan patientens hälsa återställas fullständigt om en rätt behandling sätts in i tid [10]. Om diagnos och behandlingen däremot sätts in för sent kommer parasiterna fortsätta att genomgå fler celldelningar och utveckla s.k. komplicerad malaria. Komplicerad malaria kan resultera i livslångt lidande symptom, till exempel anemi, försämrat immunförsvar, andningsstillestånd, hypoglykemi och koma vid cerebral malaria och i värsta fall död. Grupper som riskerar att drabbas av komplicerad malaria är främst icke immuna individer, gravida kvinnor och barn [2,9,10].

1.5 Medicinsk behandling

Det finns idag många läkemedel som används för behandling av malaria. Dock har dessa läkemedel olika verkningsmekanismer mot malariaparasiter, därför finns det rekommendationer om vilka preparat och doser som bör användas, beroende på vilken art som är involverad, symptomens svårighetsgrad och individens fysiska hälsa. De vanligaste läkemedlen som används mot malaria är främst klorokin, meflokin, malarone och deoxycyklin [2,10].

Ett av de största bekymren vid behandling av malaria är parasiternas förmåga att utveckla resistens mot antimalarialäkemedel. Med resistens menas parasiternas motståndskraft och förmåga att dela sig utan att påverkas av läkemedlet. Olika försök pågår i kampen mot malaria och resistensutvecklingen, där forskarvärlden studerar bland annat artemisinin i örten *Artemisia annua* som odlas till stor del i Asien, främst i Kina. Artemisinin och dess derivat är en grupp malarialäkemedel med en endoperoxidbrygga som under en reaktion med hem-järn bildar fria syreradikaler vilka angriper parasiterna och avdödar dem i dess schizontstadium [11,12].

En ny behandlingsform, så kallade artemisininbaserad kombinationsterapi (ACT) har utvecklats mot multiresistenta parasiter. ACT innebär att ett artemisinin-derivat, såsom artemeter, dihydroartemisinin eller artesunate kombineras tillsammans med ett annat effektivt läkemedel vid behandling av malaria. Enligt WHO rekombinationer ska ACT användas i första hand vid behandling av okomplicerad malaria orsakad av *P. falciparum*, då behandlingen är nästan 100 % effektiv mot multiresistenta parasiter [13].

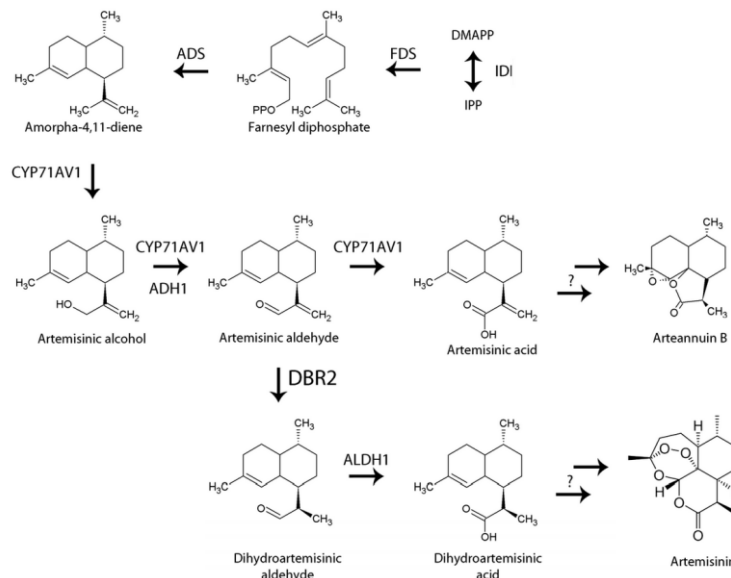
1.6 Historik bakgrund av artemisinin

Artemisia annua eller sommarmalört växer i Sydostasien, främst i Kina och är släkt med malört och gråbo. Sommarmalört innehåller många aktiva ämnen, framförallt kamfer och andra terpenener. Dock samlas uppmärksamheten särskilt kring växtens innehåll av antimalariamedlet artemisinin [14].

A. annua upptäcktes först i Kina för cirka 2000 år sedan och har under en lång tid använts inom traditionell kinesisk folkmedicin mot feber. Det var först i slutet av 1960-talet som man började söka nya antimalariamedel inom traditionell botmedicin. Man försökte då bevisa förekomsten av en aktiv substans mot malaria inom *A. annua*. I början av 1970-talet gjordes extraktioner av artemisinin från *A. annua* med bland annat vatten och etanol, dock misslyckades forskarna att bekräfta antimalariaegenskaper hos växten. Senare studier och extraktioner gav till resultat en neutral fraktion som visade sig ha antimalariaeffekt i apor som var infekterade med *P. cynomolgi* och möss infekterade med *P. bergbei* [12,15]. Mängden artemisinin i växten är väldigt låg vilket gör att medicinen inte blir kostnadseffektiv, främst i utvecklingsländerna där malariasjukdomen dominerar. Många försök pågår för att öka mängden artemisinin i växten genom att studera biosyntesen av substansen och förstå rollen av andra ämnen och enzymer som ingår i växten och dess effekt på produktionen av artemisinin [12].

Kemiskt är artemisinin en seskviterpenlakton med en endoperoxidstruktur och biosyntesen av substansen i *A. annua* är nästan klarlagd. Övergripande inleds biosyntesvägen av artemisinin genom omvandling av farnesyldifosfat (FDP) till amorfa-4,11-dien i ett steg som katalyseras av enzymet amorfa-4,11-diensyntas (ADS), se Figur 3. Reaktionen fortsätter med att ADS hydroxyleras till artemisininalkohol och vidare till artemisininaldehyd. Detta sker med hjälp av ett

enzym kallat amorfa-4,11-dien 12-hydroxylas (CYP71AV1). Genom ett ytterligare enzym, artemisininaldehydreduktas (DBR2), reduceras artemisininaldehyd till dihydroartemisininaldehyd. Ur denna förening och med hjälp av enzymet aldehyddehydrogenas (Aldh1) bildas dihydroartemisininsyra som är prekursor för uppkomsten av artemisinin som bildas i närvaro av solljus [16,17].



Figur 3. Biosynthesvägen för artemisinin i *A. annua* (Figuren är modifierat från referens 18; Soetaert SS, Van Neste CM, Vandewoestyne ML, Head SR, Goossens A, Van Nieuwerburgh FC, et al. Differential transcriptome analysis of glandular and filamentous trichomes in *Artemisia annua*. BMC Plant Biology. 2013;13:220) [18].

2. Molekylärbiologiska metoder

2.1 Agrobacterium och transient uttryck

För drygt 30 år sedan lyckades forskarna att genetiskt modifiera växter första gången genom transformation och det var bakteriearten *Agrobacterium tumefaciens* som kunde möjliggöra det hela [19]. *A. tumefaciens* är en vanlig förekommande gramnegativ jordbakterie som naturligt infekterar växter och orsakar krongallsjuka hos dem. Sjukdomen yttrar sig som tumörer i vissa trehjärtbladiga växter genom att *A. tumefaciens* introducerar sitt T-DNA (transfer DNA) i värdväxten som i sin tur inkorporeras in i cellernas genom [20]. T-DNA är ett segment av DNA som finns på bakteriens Ti-plasmid och innefattar totalt åtta *vir*-gener som utnyttjas av *A. tumefaciens* i överföringsmekanismen till växten och tumörproduktionen. I tumörer växer *A. tumefaciens* genom att använda den närvarande näringsmiljön som finns i

växten [20,21].

Genteknologin har inneburit stora framsteg inom biomedicinska och farmakologiska områden och gjort att T-DNA-uttryck av gener inte är bara begränsat för tumörproduktionen, utan kan även ersättas av vilken gen som helst utan att transformationen påverkas. Detta erbjuder ett nytt kostnadseffektivt, skalbart och säkert system för produktionen av rekombinanta läkemedelproteiner från växter [21]. Flera olika substanser produceras från *A. annua* ur samma substrat, det vill säga FDP som används för biosyntes av artemisinin och därmed minskar utbytet av artemisinin i växten. Denna studie involverade produktion och karaktärisering av två seskviterpensyntaser, enzymer som använder FDP som substrat för sin biosyntes [22].

Ett helt genomsekvenseringsprojekt av *A. annua* har utförts av en forskargrupp följt av kloning av de sekvenserna som kodar för seskviterpensyntaser i Cowpea mosaic virus-baserad viral vektor (pEAQ-HT) med C-terminal histidin-tag. Binära vektorer konstruerade med de optimala generna var sedan transformerade i *A. tumefaciens* (LBA4404) [22].

För att inducera transient uttryck av en gen måste *A. tumefaciens* föras in i värdväxten och komma i kontakt med växtens levande celler i ett steg som kallas för agroinfiltrering. I denna studie utfördes agroinfiltreringen via injektionen av en bakteriesuspension i blad från tobakspplantan *Nicotiana benthamiana* [21,22].

Uttrycket av främmande gener i tobakspplantan kan förhindras av växtens försvarsmekanism och därmed minska gentranskriptionen. Vektorn p19 (pJL3:p19) innehållande Tomato Bush stuntvirus genuttryck (TBSV-p19) är allmänt använd i samband med agroinfiltrering av plasmider, då den har förmåga att öka transkriptionen och proteinuttryck i plantan upp till 50 gånger [23].

2.2 RNA extraktion

RNA (ribonukleinsyra) är en komplicerad makromolekyl som finns i alla levande celler och är uppbyggd som en enkel sträng av sammankopplade ribonukleotider betecknade adenin, uracil, cytosin och guanin. RNA bär det genetiska materialet och fungerar som en mall och konstruktör för proteinsyntesen i cellerna [24]. Isolering av RNA genom extraktion är därför ett viktigt steg för att studera mRNA-uttrycket i växten och kan användas som utgångsmaterial i fortsatta molekylärbiologiska

metoder. PureLink® Plant RNA Reagent är elueringsmedel som används för att extrahera små såväl som stora mängder av total RNA med hög kvalitet från växtmaterial. Extraktionen med PureLink® Plant RNA Reagent sker genom att tillsätta en viss volym av lösningen till växtmaterialet. Detta gör att cellerna och komponenterna bryts ner och fraktioneras efter storlek genom centrifugering där RNA förblir i den översta fasen, d.v.s. organfasen. Tillsats av kloroform separerar lösningen i en vattenfas och organfas, där RNA kvarstår i vattenfasen och kan utvinnas med hjälp av isopropylalkohol [25].

RNA är en icke stabil molekyl och är väldigt känslig för kontaminering och nedbrytning av RNaser. Detta leder till att genetiska informationen kan lätt förloras jämfört med DNA som är mer stabilt. Det är därför viktigt att RNA översätts till komplementär DNA, cDNA, med hjälp av enzymet omvänt transkriptas. cDNA kan sedan användas som utgångsmaterial för många molekylärbiologiska analyser [26].

2.3 Polymerase Chain Reaction

PCR står för Polymerase Chain Reaction och är en molekylärbiologisk metod som används för att framställa stora mängder av specifika DNA-fragment från komplicerade genetiska material inom få timmar. PCR används inom väldigt breda områden, exempelvis klinisk diagnostik, forskning, identifiering av mutationer och genetiska sjukdomar, kriminologi med mera [27].

För att kunna initiera amplifiering av ett DNA-fragment krävs det tillgång av vissa komponenter som har viktiga funktioner i PCR reaktionen. Dessa komponenter är DNAPolymeras, fria nukleotider dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), oligonukleotider (primerpar), templat, buffert och Mg^{2+} [28].

DNAPolymeras är ett enzym som använder byggstenarna dNTP för att syntetisera en ny DNA-sträng i riktning 5' till 3' genom att använda en annan DNA-sträng som mall och därigenom skapa en komplementär sträng till den första strängen i en DNA-replikeringsprocess [28].

Som DNA polymeras används vanligen termostabila enzymer som kan exponeras för temperaturer under vilken DNA-helixen dissocierar utan att denatureras exempelvis *Taq* polymeras isolerade från bakteriearten *Thermus aquaticus* som endast existerar i varma källor [24]. Primers består av en sekvens nukleotider, vanligen av 15-20 baspar som fungerar som startpunkt för syntesen av nya DNA-fragment. Vid PCR

analysen används två primers, forward och reverse primer som binder in till målsekvensen av enkelsträngat DNA så att DNA polymeras kan påbörja polymeriseringen [24].

En PCR-reaktion består av tre steg, denaturering, annealing och extension. Under denaturering höjs temperaturen till 95°C varvid vätebindningar som sammanlänkar DNA-strängarna bryts och resulterar i att strängarna separeras från varandra. Under annealing används en smälttemperatur (T_m) mellan 48-65°C där primerna binder in till målsekvensen som ska undersökas. Under sista steget, extension höjs temperaturen till 72°C, då DNA-polymeras binder in och börjar syntetisera ett nytt DNA-fragment [28].

2.4 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

qPCR är en utvecklad form av PCR-teknik som möjliggör detektionen av PCR-produkten direkt i PCR-röret och är baserad på amplifiering av specifika DNA-fragment i realtid, d.v.s. under reaktionen. Till skillnad från traditionell PCR är qPCR en snabb och enkel metod med ökad specificitet, reproducerbarhet och effektivitet med vilka kvantitativa och kvalitativa analyser kan utföras [29,30].

I qPCR används fluorescerande molekyler som efter varje cykel i PCR-analysen ger upphov till en fluorescenssignal som är direkt proportionell mot mängden ny syntetiserade DNA-fragment. De fluorescerande molekylerna kan vara antingen i fri form, exempelvis SYBR Green I, eller bundna till en probe, vanligtvis TaqMan-probe. Jämfört med traditionell PCR är arbetsmomenten vid qPCR mindre då den har ett eget inbyggt detektionssystem och gelelektrofores inte behöver utföras. Tolkning av resultat sker med hjälp av Ct-värdet (cykeltröskelvärdet) d.v.s. den punkten varvid fluorescensen överskrider bakgrundsignalens tröskelvärde. Ett lägre Ct-värde innebär mer innehåll av templatet i provet [27,29,30].

2.5 Gaskromatografi – Masspektrofotometri

Gaskromatografi (GC) är en analytisk metod som lämpar sig för separation av kemiska föreningar i en provblandning genom att föra dem i mobilfas och låta dem strömma genom en kolonn. Som mobilfas används en bärigas, vanligen kväve eller helium som överför komponenterna genom en stationärfas i en kolonn där de separeras beroende på deras flyktighet. Principen för det kromatografiska systemet

bygger på att ett vätskeformigt prov injiceras först med en spruta i en injektionskammare, där komponenterna förångas omedelbart och överförs med bärgasen till kolonnen [31].

Det finns två typer av kolonner som kan användas i samband med GC, en kapillärkolonn och en packad kolonn. En kapillärkolonn består av ett långt och tunt kapillär rör framställt av silikatbaserat glasmaterial med en innerdiameter mellan 0,1 till 0,7 mm. Kolonnens längd kan variera från 5 till 100 m där stationärfasen är bunden till innerväggarna av rörets insida. Fördelar med kapillärkolonn är att den har förmåga att separera komponenterna med hög effektivitet. Dock är den låga provkapaciteten av kolonnen en stor nackdel. Packad kolonn är en äldre typ och består av bärarmaterial på vilket den stationära fasen är belagd. Packade kolonner ger mindre effektiv separation jämfört med kapillärkolonner. I kolonnen vandrar provföreningar med olika hastighet med avseende på deras kemiska egenskaper, deras samverkan med den stationära fasen och på typen av kolonn som används. Föreningar kan identifieras med hjälp av retentionstiden, d.v.s. den tid som krävs för en analyt att passera kolonnen. Vid gaskromatografisk analys kan detektionen ske med masspektrometrisk (MS) metod. En masspektrometrisk detektion inleds med att analyten först joniseras d.v.s. att en elektron i molekylens stöts bort så att molekylens får en positiv laddning. Som joniseringskälla används Elektron Impact teknik (EI jonisering).

Principiellt bygger EI på att en energirik elektronstråle avges från ett filament vid 70 V spänning. Elektronerna kolliderar med molekylerna som finns i provet och resulterar i att positivt laddade radikaler bildas vid sönderfall av molekylerna.

Den positivt laddade radikalen är inte stabil, utan den sönderfaller så att en fri radikal och en positiv jon bildas. Fragmenten följer ett visst mönster som ger en karaktäristisk struktur för hela molekylens. Dessa joner separeras sedan i ett massfilter med avseende på massa och laddning (m/z) innan de når detektorn som digitaliserar och registrerar jonströmmen i form av en elektrisk signal i datorn [31].

En masspektrometer kan arbeta antingen i *SIM mode* eller i *scan mode*. SIM står för *Selected Ion Monitoring* och innebär att endast utvalda joner detekteras. Detta datamode är lämpligt för kvantitativa analyser med större känslighet inom kort tid. I *scan mode* erhålls spektra hela tiden eftersom mätningen sker inom betydligt större

massintervall och söktiden läggs på fler joner. Scan mode ger maximal information som kan utnyttjas för kvalitativa syften [31].

2.6 Syfte

Syftet med denna studie var att med hjälp av genteknik och molekylärbiologiska metoder producera och identifiera två rekombinanta enzymer, seskviterpensyntaser från *A. annua*.

3. Metod och material

3.1 Initial förberedelse av provmaterial utförd av forskargruppen

Genfragment för respektive seskviterpensyntas AaTS-1 och AaTS-2 klonades i Cowpea mosaic virus-baserad viral vektor (pEAQ-HT) med C-terminal histidin tag. Till transformationen av varje binärvektor och pJL3:p19 användes *Agrobacterium tumefaciens* av stam LB 4404.

3.2 Provmaterial för experimentet

A. tumefaciens LB 4404 med varsin binärvektor konstruerade med optimala gener för två olika seskviterpensyntaser. Hjälpplasmiden pJL3; p19 användes i denna studie för att förhindra nedbrytningen av RNA och gynna transkriptionen av respektive transgen i *N. benthamiana*.

3.3 Förberedande av bakterieodling och agroinfiltrering

Det första steget var att göra ett renutstryk av två kloner, (AaTS-1 och AaTS-2) samt hjälpplasmiden (pJL:p19) på tre LB- plattor (lysogeny broth) innehållande 25 µg/ml rifampicin och 50 µg/ml kanamycin. Plattorna inkuberades vid 27°C över natt i inkubatorn Biometra APT Line model BFED-53. Efter två dygn överfördes kolonier från varje platta till respektive LB medium (60 ml med 25 µg/ml rifampicin och 50 µg/ml kanamycin) och inkuberades vid rumstemperatur på skak 260-290 rpm över natt.

Följande dag mättes OD600 (Optical density) i varje övernattkultur med hjälp av instrumentet Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer. När OD600 nått 1,2-1,4 centrifugerades kulturerna vid 2000xg under 20 minuter.

Supernatanten avlägsnades och varje pellett suspenderades sedan i 50 ml infiltreringsbuffert [10 mM 2-*N*-morpholino-ethanesulfonic acid (MES) pH 5,5, 10 mM MgCl₂ och 100 μM acetosyringone (Sigma)].

Efter ca 3-4 h inkubationstid vid rumstemperatur blandades 25 ml infiltreringsbuffert av pJL:p19 med AaTS-1 och AaTS-2 (50 ml) var för sig. Varje infiltreringsbuffert injicerades därefter med en 1 ml spruta på undersidan av blad från *N. benthamiana*, se Figur 4. I denna experimentdel gjordes tre försök av agroinfiltrering på 6-8 plantor för att få tillräckligt material av infiltrerade blad till nästkommande experiment.



Figur 4: Agroinfiltrering av *A. tumefaciens* transformerade med binära plasmider AaTS-1 och AaTS-2 och pJL:p19 i *N. benthamiana*. Bild a visar trehjärtbladiga tobaksplantan *N. benthamiana*. Copyright Sinisa Bjelic. Bild b visar principen för agroinfiltrering av *A. tumefaciens* i tobaksblad. Bilden är modifierat från referens 21; Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Advanced techniques in biology & medicine*. 2013;1 [21].

3.4 Proteinextraktion och gaskromatografisk analys

Som förberedelse inför nästa analysmetod kontrollerades förekomsten av proteinet i växten genom att mäta enzymaktiviteten med hjälp av GC-MS. Infiltrerade blad (dag 8, försök 2 och 3) från AaTS-1 och AaTS-2 finfördelades med flytande kväve till ett pulver i en steril mortel. Fryst växtpulver (3 gram) extraherades med 1,5 w/v extraktionsbuffert A [20 mM natriumfosfat, pH 7.0, 25 mM natriumskorbat, 0,4 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 mM natriumbisulfid, 1 % polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) och 10 % (v/v) glycerol (Sigma)]. Proverna centrifugerades i 12,000xg i Eppendorf MiniSpin Plus Microcentrifug vid 4°C varefter supernatanten överfördes till två nya rör. Proteinets överfördes till assaybuffert [20 mM Tris-HCL, pH 7.0, innehållande 10

% (v/v) glycerol, 10 μM β -mercaptoetanol och 10 mM MgCl_2 (Sigma)] genom gelfiltering på en PD-10 kolumn innehållande SephadexTM G-25 medium vid 4°C. Varje prov inkuberades med 20 μM farnesyldifosfat [Sigma] vid 27°C över natt. Följande dag extraherades enzymprodukten med hexan vid rumstemperatur med hjälp av vortex och organfasen överfördes därefter till två provburkar med lock för GC-MS analys.

Instrumentet som användes i analysen var GC Agilent 6890 Series gaskromatografi kopplad till en Network Mass Selective Detector (MSD) med Agilent HP5MS 5 % fenylmetylsilohexan kapillärkolonn (30 m x 0,25 mm x 0,2 mm filmtjocklek). Samtliga injektioner utfördes med 1 μL splitless injektion mode i en konstant dualtid (0,7 mL min⁻¹) och en injektionstemperatur på 100°C. För identifiering av produkterna från seskviterpensyntaserna användes följande temperaturgradient: 40 till 50°C under 5 minuter med hastigheten 50°C min⁻¹, 50 till 200°C med 2°C min⁻¹ och 200 till 300°C med 50°C min⁻¹ under en minut. En scan-inställning från 34 till 400 m/z användes med hjälp av elektronfångningsdetektorn (EI) vid 70 eV [22].

3.5 RNA extraktion med Purelink® Plant RNA Reagent

Infiltrerade blad (dag 1,3,5,8, försök 2) från AaTS-1 och AaTS-2 finfördelades med flytande kväve till ett pulver i en steril mortel och förvarades vid -20°C.

Vid RNA extraktion behandlades 100 mg av fruset växtpulver från respektive prov med 500 μL PureLink Plant RNA reagens (Life Technologies) i åtta eppendorfrör. Rören blandades med hjälp av vortex och inkuberades under 5 minuter vid rumstemperatur följt av centrifugering i 12,000xg under 2-4 minuter. Supernatanten överfördes till åtta nya rör och till dessa rör tillsattes 100 μL 5 M natriumklorid (NaCl) och blandades försiktigt [25].

Till rören överfördes sedan 300 μL kloroform och blandades noggrant. Proverna centrifugerades i 12,000xg under 10 minuter vid 4°C för att separera vattenfasen från organfasen. Vattenfasen, som då innehöll RNA överfördes sedan till ytterligare åtta nya rena rör. Till vattenlösningen tillsattes lika mycket volym av isopropylalkohol för utfällning av RNA som finns i vattenfasen. Provrören inkuberades vid rumstemperatur under 10 minuter följt av centrifugering i 12,000xg vid 4°C under 10 minuter. Supernatanten avlägsnades och 100 μL 75% etanol (EtOH) överfördes till respektive pellett. Proverna centrifugerades i 12,000xg vid rumstemperatur under 2

minuter och supernatanten avlägsnades därefter försiktigt. När RNA pelletten torkats färdigt tillsattes 30 μL RNase-fritt vatten och centrifugerades i 12,000xg vid rumstemperatur under en minut. Supernatanten innehållande RNA från respektive rör överfördes till ytterligare åtta rena rör och sparades vid -20°C [25].

3.6 DNaseI behandling, cDNA syntes och qPCR

En DNaseI behandling utfördes för att ta bort eventuellt genomisk DNA från RNA-proven. Till åtta PCR-rör tillsattes 25 μL RNA från respektive prov, 3,5 μL 10x reaktionsbuffert med 25 mM magnesiumklorid (MgCl_2), 4 μL 1 U/ μL DNaseI (Thermo Scientific, USA) och 2,5 μL DEPC-behandlat vatten som sedan inkuberades i instrumentet BIORAD S100TM Thermal Cycler vid 37°C under 30 minuter. För att undvika hydrolysering av RNA vid inaktivering av DNaseI under hög temperatur tillsattes 4 μL 25 mM etylendiamintetraättiksyra (EDTA) till provrören och inkuberades vid 65°C under 10 minuter [32].

RNA proverna kvantifierades med Nanodrop® Spectrophotometer ND-100 vid 260 nm och 280 nm för bestämning av renheten och koncentrationen av RNA [38].

För framställning av cDNA blandades 1 μg RNA från varje prov, 1 μL 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Oligo (dT)₁₈ primer (Thermo Scientific, USA) och DEPC-behandlat vatten med en slutvolym på 12 μL i ytterligare nya rör.

Proverna inkuberades under 5 minuter vid 65°C och till respektive rör tillsattes sedan 4 μL 5x Reaktionbuffert, 1 μL 20U/ μL RiboLock RNase Inhibitor, 2 μL 10 mM dNTP Mix och 1 μL 200 U/ μL RevertAid M-MuLV reverse transkriptase (Thermo Scientific, USA). Proverna inkuberades vid 37°C under 60 minuter, följt av 70°C under 5 min. En RNase behandling utfördes för att undvika eventuella inhiberingar under PCR-amplifiering genom att blanda 2,5 μL 10x RNase H buffert, 0,5 μL 5 U/ μL RNase H (Thermo Scientific, USA) och 2 μL DEPC behandlat vatten i respektive rör som sedan inkuberades vid 37°C under 60 min följt av 65°C under 10 min [32].

En PCR mastermix framställdes med totalvolym 25 μL innehållande komponenter i följande ordning; 5,5 μL DEPC-behandlat vatten, 1 pmol forward primer, 1 pmol reverse primer (Forskargrupp, TAG Copenhagen) och 12,5 μL 2x iQTM Supermix [40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 100 mM KCl, 0,4 mM dNTP, 6 mM MgCl_2 och 50 U/mL iTaq DNA polymeras (BIO RAD)] och 5 μL templat. Totalt konstruerades två PCR-

mixer med olika primerpar för respektive cDNA-templat *AaTS-1,2* och β -*actin*, se tabell I. Som negativ kontroll i PCR reaktionen användes DEPC-behandlat vatten.

Tabell I. Primersekvenser som användes för amplifiering av *AaTS-1,2* och β -*actin*.

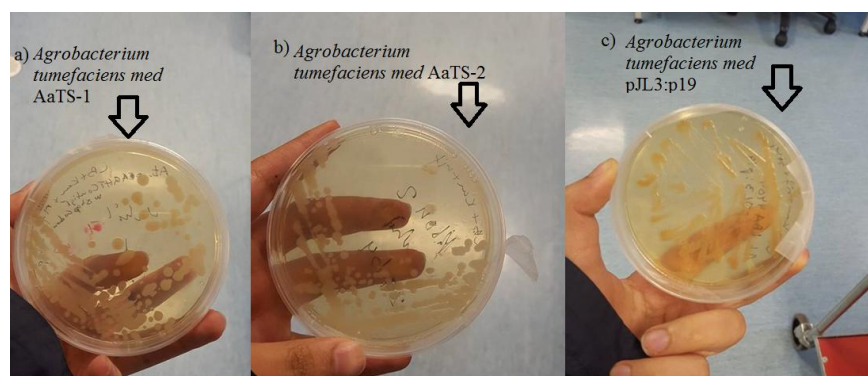
Gen- frag- ment	Forward primer	Reverse primer
<i>AaTS-1,2</i>	5' AAGGCTAGAGGTC AAATCGCAACT3'	5' GAGCAAGATTGAGA ATACGAGTGAG3'
β - <i>actin</i>	5' CCAGGCTGTTTCAGTC TCTGTAT 3'	5' ATAATCAA AACTAG AGGAGTGACCC3'

PCR-proverna placerades sedan i instrumentet S100™ Thermal Cycler och 7500 Real Time PCR System. Programinställning av qPCR reaktionen inleddes med temperaturen 50°C, följt av initierad denaturering i en cykel vid 95°C under 10 minuter. Därefter följde denatureringssteget vid 95°C under 15 sekunder i 40 cykler och annealingssteget vid 60°C under en minut i 40 cykler.

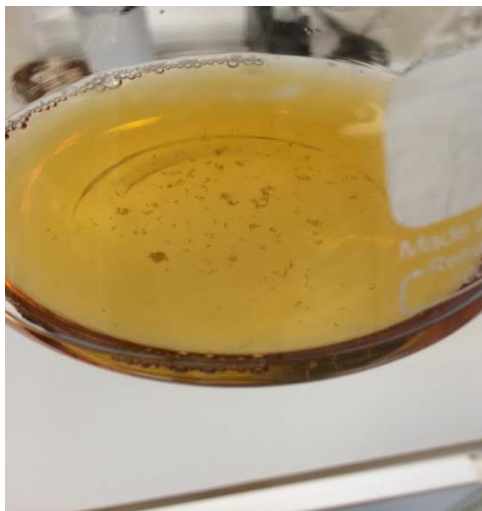
4. Resultat

4.1 Tillväxt av *Agrobacterium tumefaciens* i LB plattor och odlingsmedium.

I Figur 5-6 presenteras resultat från tillväxten av *A. tumefaciens* med varsin binär plasmid i LB-plattor och näringsmedium. En bra tillväxt av bakterierna har skett i samtliga plattor med typiska runda kolonier av *A. tumefaciens*. Odlingen av bakterierna i LB-näringsmedium visade även en bra tillväxt men deras förmåga att klumpa ihop sig var ett problem som påverkade efterföljande analyser.



Figur 5. Odling av *A. tumefaciens* transformerade med binära plasmider i LB-plattor. Bild a-b visar tillväxt av *A. tumefaciens* med binära vektorn Aa-TS-1 och Aa-TS-1. Bild c visar tillväxt av *A. tumefaciens* med hjälpplasmiden pJL3:p19. Copyright: Nahil Al-Masaraa.



Figur 6. Odling av *A. tumefaciens* transformerade med vektorn p19 i LB-medium. Copyright Nahil Al-Masaraa.

4.2 Agroinfiltrering av AaTS-1 och AaTS i *Nicotiana benthamiana*

Resultat av total mängd tobaksblad som kunde agroinfiltreras vid försök 2 och 3 visas i tabell II. Vid det första försöket kunde inga blad infiltreras på grund av långsam tillväxt av övernattskulturen och tidsbrist. I försök 2 erhöles cirka 0,7-0,8 gram infiltrerade blad från dag 1,3,5 och 8. Vid försök 3 kunde ca 3-3,5 gram av infiltrerade blad från dag 8 erhållas.

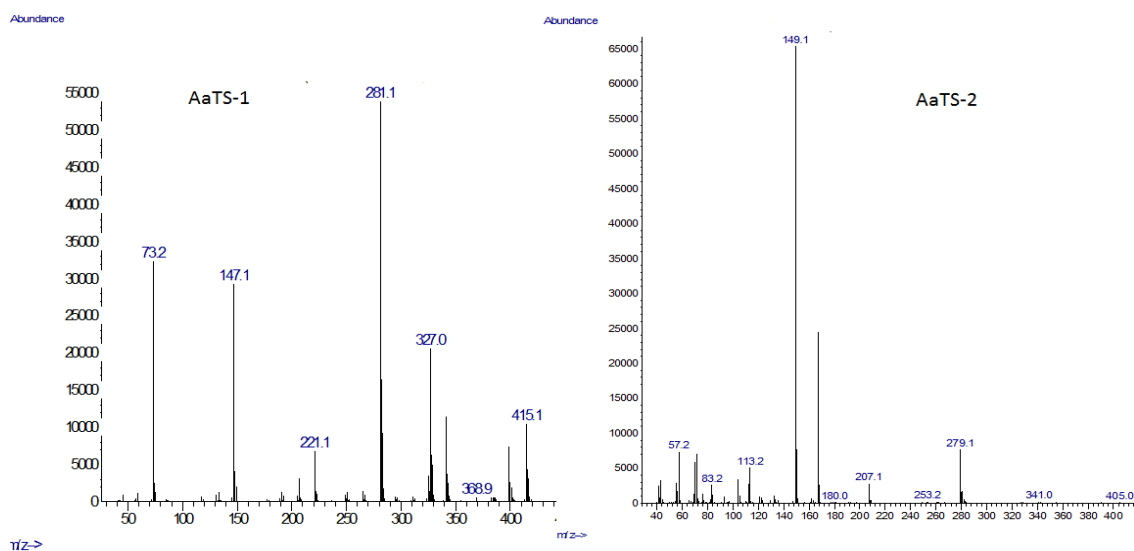
Tabell II. Total mängd infiltrerade tobaksblad av AaTS-1 och AaTS-2 från *N. benthamiana* efter agroinfiltrering från försök 2 och 3.

Prov	Total mängd infiltrerat blad (gram) försök 2	Total mängd infiltrerat blad (gram) försök 3
AaTS-1, dag 1	0,8	-
AaTS-1, dag 3	0,7	-
AaTS-1, dag 5	0,7	-
AaTS-1, dag 8	0,7	3
AaTS-2, dag 1	0,7	-
AaTS-2, dag 3	0,7	-
AaTS-2, dag 5	0,7	-
AaTS-2, dag 8	0,6	3,5

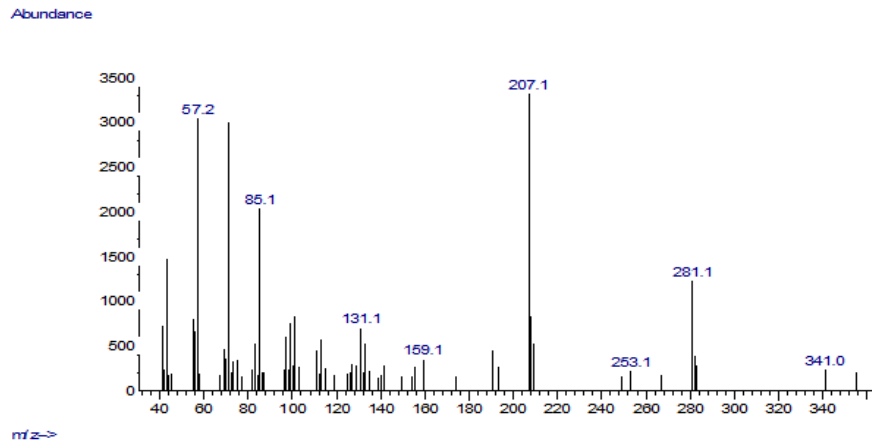
4.3 Enzymaktivitetsanalys med GC-MS

Enzymaktivitetsanalys med GC-MS utfördes en gång från försök 2 och på grund av brist av växtmaterialet utfördes en ytterligare analys med växtmaterial från försök 3. I Figur 7-8 presenteras masspektrum för generade produkter i AaTS-1 respektive AaTS-2 prover från försök 2 och 3. Dessa resultat är främst material från kolonnen och övriga kemiska föreningar som inte har en anknytning till den förväntade enzymprodukten vilket innebär att inga enzymprodukter från AaTS-1 eller AaTS-2 kunde extraheras eller identifieras med GC-MS.

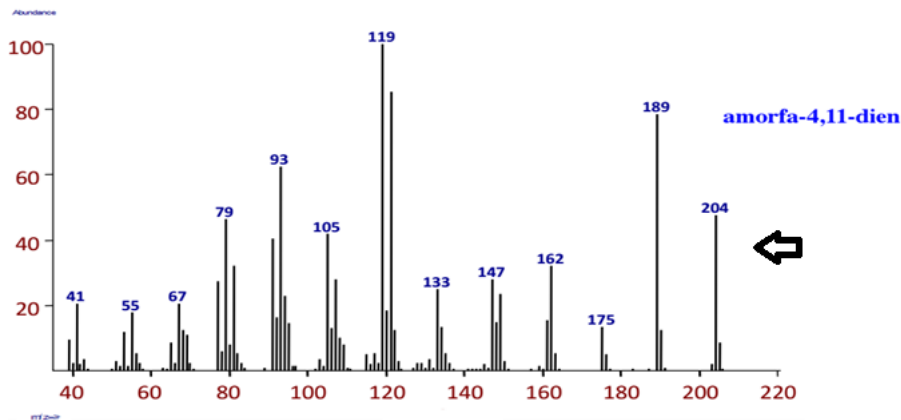
I Figur 9 visas ett känt masspektrum för en typisk seskviterpensyntas, amorpha-4,11-diene från en tidigare liknande studie.



Figur 7. Masspektrum av kemiska föreningar i prover med AaTS-1 och AaTS-2 från försök 2.



Figur 8. Masspektrum av en kemisk förening i prover med AaTS-1 och AaTS-2 från försök 3.



Figur 9. Masspektrum från en känd seskviterpen; amorpha-4,11-diene. (Figuren är modifierad från referens 22; Kanagarajan S, Muthusamy S, Gliszczynska A, Lundgren A, Brodelius PE. Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. Plant cell reports. 2012;31(7):1309-19) [22].

4.4 Bestämning av total RNA koncentrationen och analys av cDNA

Resultat av total RNA-koncentrationer och kvoten 260/280 från AaTS-1 och AaTS-2 visas i tabell III. En relativ god mängd av total RNA kunde erhållas från samtliga proven och kvoten 260/280, det vill säga renheten av nukleinsyran blev runt 2.

Resultat från qPCR visade att ingen amplifiering har skett av transgenen eller β -actin varken i AaTS-1 eller AaTS-2. Data är inte presenterade.

Tabell III. Bestämning av total RNA-koncentration och kvoten 260/280 från AaTS-1 och AaTS-2.

Prov	Total RNA (ng/ μ L)	Kvoten 260/280
AaTS-1, dag 1	1100	2,1

AaTS-1, dag 3	800	2,1
AaTS-1, dag 5	760	2,1
AaTS-1, dag 8	910	2
AaTS-2, dag 1	1050	1,99
AaTS-2, dag 3	580	2
AaTS-2, dag 5	620	2,1
AaTS-2, dag 8	880	1,98

5. Diskussion

Forskarvärlden har länge studerat olika växter i Asien för att utveckla nya botemedel i kampen mot malaria. Växter är därför ett alternativ som kan erbjuda nya syntetiska vägar för att hitta fler lämpliga läkemedel mot sjukdomen. Många studier om växter är under utveckling. Dessutom kan nya substanser och aktiviteter fortfarande hittas i redan kända strukturer och växter. Studier om terpenmetabolism i växten *A. annua* kan ge ledtrådar om vilka enzymer och substanser det finns och som har en avgörande roll i utvinning av antimalariamedlet artemisinin ur växter [21,22].

Syftet med denna studie var att med hjälp av genteknik och molekylärbiologiska metoder producera och identifiera två rekombinanta enzymer, seskviterpensyntaser från *A. annua*.

Vid de genomförda försöken förknippades bakterietillväxt och agroinfiltreringen med ett flertal problem som var mer tidskrävande än väntat. Ett komplicerande problem som inte kunde lösas var att *A. tumefaciens* hade tendens att aggregera och bilda klumpar i näringslösning, se Figur 6. Ett riktigt OD värde kunde inte erhållas eftersom klumparna kan ha gett falska värden. Stora klumpar har även försvårat agroinfiltreringen och förhindrat infiltreringsbuffert att komma i inre delarna av bladen. Rekommendationer om att vortexa kulturmedium före inkubationen, öka skakhastigheten till 290 rpm samt att byta odlingsmedium till YEP-medium (Yeast Extract Peptone) kunde möjligtvis reducera bildning av klumpar i nästa försök, dock påverkade detta inte processen och ytterligare klumpar bildades [33,34].

I en analysprocess med olika steg och metoder kan det vara svårt att förutsäga eller identifiera orsaken till problemet. Eftersom det tar dagar för bakterierna att växa

inför varje agroinfiltrering valdes infiltrerade blad från försök två och tre för vidare analysmoment.

För att bekräfta att agroinfiltreringen genomfördes som förväntat studerades enzymaktiviteten av seskviterpensyntaser i AaTS-1 och AaTS-2 tagna från försök 2 med GC-MS. En positiv kontroll vid enzymaktivitetsanalys saknades och som en negativ kontroll användes infiltrerade blad från försök 2 vid dag 1.

Data som fåtts jämfördes med ett känt masspektra av ett seskviterpensyntas från en tidigare studie, se Figur 9. Ett typiskt masspektra som innehåller en topp vid m/z 204 är karaktäristisk för samtliga seskviterpensyntaser [22]. I detta experiment kunde endast resultat från kolonnmaterial av tidigare analyserade prover och kemiska föreningar erhållas, se Figur 7. Dessa har inte en förbindelse till enzymprodukten och en topp vid m/z 204 saknades i samtliga erhållna data. Detta kunde bero på icke tillräcklig mängd av infiltrerade blad från försök 2, därför utfördes en ytterligare enzymaktivitetsanalys från agroinfiltrering försök 3. Dock kunde enzymprodukten inte identifieras, se Figur 8.

Kloningen som genomfördes av forskargruppen kan vara en trolig orsak till detta. Gener som kodar för seskviterpensyntaser kan förmodligen inte ha klonats in i plasmiderna från början och brist av säkra resultat från sekvenseringen utförd av forskargruppen som bekräftar att kloningen verkligen har fungerat på ett avsett sätt gör det komplicerat att identifiera orsaken till varför ingen enzymprodukt kunde detekteras. En icke effektiv agroinfiltrering, torkade plantor med försämrad metabolisk aktivitet, växtförhållandet, solintensitet och inkubationstid efter agroinfiltreringen är betingelser som har en betydelsefull roll för en effektiv agroinfiltrering [21].

Resultat från GC-MS kan även bero på att enzymet förlorades under extraktionen eller att ett fel uppstod under katalysreaktionen med FDP, därför studerades mRNA nivån och uttrycket av transgenen i åtta prov tagna vid olika tidpunkter, dag 1, 2, 5 och 8 från försök två.

En lyckad extraktion av RNA är ett viktigt steg för att framgångsrikt kunna genomföra den efterföljande metodiken och analys.

Då RNA extraktionen utfördes genom lysning av växtceller, har även nukleinsyra nedbrytande enzymer, så kallade nukleaser frigjorts. Dessa enzymer kan finnas

överallt i omgivningen, främst i luften och på vår hud och kläder.

RNA kan lätt brytas av RNaser och resultera i att genetiska materialet lätt förloras. Risken för nedbrytningen av RNA kan minimeras genom att arbeta med sterilteknik i en RNase fri miljö. Det är viktigt att använda handskar vid arbete med RNA, använda sterila reagenser, rör och pipettspetsar. Kemikalier och material som är avsedda för RNA extraktionen bör hållas separat i ett eget utrymme från övriga kemikalier för att undvika kontaminering [35].

Resultat från RNA kvantifiering visade att ett relativt gott utbyte av nukleinsyran kunde isoleras från det genetiska materialet. Totalkoncentrationer av RNA från samtliga prov var cirka 600-1000 ng/ μL vilka var tillräckliga för att initiera reaktionen för cDNA-syntesen, se tabell III. Renheten av samtliga prov hamnade runt 2,0 och detta innebär att nukleinsyra var fritt från övriga cellkomponenter, salter och proteiner då kvoten A260/A280 bör vara cirka 2,0 [36].

Vid analys av cDNA med qPCR amplifierades transgenen varken i AaTS-1 eller AaTS-2. Ingen amplifiering skedde i den negativa kontrollen vilket innebär att den fungerade på ett avsett sätt. En positiv kontroll i denna analys saknades och ersattes av en intern standard. I denna studie användes β -actin som en referensgen för att jämföra och normalisera uttrycket i proverna. Genuttrycket av β -actin i proverna kunde inte detekteras, ett oförväntat resultat som kunde bero på att ett fel vid cDNA reaktionen uppstod. cDNA kunde inte syntetiseras på grund av icke optimal temperatur av instrumentet, eftersom β -actin ska uttryckas oavsett om agroinfiltreringen har utförts på ett effektivt sätt eller inte. Valet av temperaturen för cDNA-syntesen bör ligga mellan 37- 42 °C för att en tillräcklig mängd av templat ska erhållas [35]. Temperaturinställningen av instrumentet i denna studie inleddes med en stigande temperatur upp till 37 °C och efter cirka 30-40 minuters inkubationstid observerades att temperaturen sjönk under 28 °C. Dessutom kan det även bero på att primerna som användes för respektive gen inte var optimalt designade, då funktionen av dessa primerpar inte verifierades innan qPCR analysen. Andra faktorer som uppstått efter RNA-extraktionen och DNaseI-behandlingen kan också ha en betydande roll exempelvis fel val av koncentrationer och mängder av vissa reagenser [37].

En ekonomisk slösaktighet som har gjorts i detta experiment är att qPCR-reaktionen

av samtliga prov genomfördes direkt efter cDNA-syntesen. Detta kunde ha undvikits genom att kontrollera förekomsten av genuttrycket först med hjälp av agarosgelelektrofores.

I en tidigare liknande studie extraherades två rekombinanta enzymer, ADS (amorfa-4,11-diensyntas), ett nyckelenzym som katalyserar det första steget i biosyntesen av artemisinin i *A. annua* och ECS (epi-cedrol syntas), ett komplicerat seskviterpensyntas vars funktion ännu inte är känd [21]. Uttrycket av respektive transgen studerades under 15 dygn där det högsta uttrycket kunde ses vid dag 9. Säkerställda resultat från kloningen och en lyckad agroinfiltrering i studien underlättade det hela vilket gav tydliga och trovärdiga positiva resultat. En nackdel med en sådan studie är att mer tid krävs för att genomföra varje analys. Dock var väntetiden mellan varje försök ett problem som begränsade antalet analyser. Många känsliga metoder är involverade i den experimentella processen och mycket kan gå fel. Metodoptimering, rätt programinställning och tider är avgörande för slutresultatet.

Slutsats

Experimentet gav negativa resultat och enzymprodukter kunde varken extraheras eller identifieras med GC-MS. Detta beror på flera faktorer, främst på brist av säkra resultat från kloningen som bekräftar att plasmiderna var konstruerade med de optimala generna samt på grund av icke optimal agroinfiltrering då bakterierna hade tendens att klumpa ihop sig vilket försvårade infiltreringen i bladen. I fortsatt forskning med en sådan liknande studie är det viktigt att starta i god tid, då många oförutsedda händelser kan uppstå och förhindra analysprocessen. Det är väldigt tidskrävande att lösa dessa problem, särskilt när orsaken inte är riktigt identifierad. Att verifiera funktionen av utgångsmaterial och primers erhållna från forskargruppen är viktigt då problemet möjligtvis kunde ha uppstått i deras experiment.

Tack

Jag vill tacka Peter Brodelius på institutionen för kemi och biomedicin, som gav mig möjlighet att utföra mitt examensarbete och ställt upp som båda intern och extern handledare för mitt examensarbete. Jag vill även tacka Anneli Lundgren för din initiala handledning och förberedning av kloner, material och utrustning för mitt

projekt. Till Sinsia Bjelic vill jag även rikta ett tack för ditt stöd, tips och tålamod vid genomförandet av experimentet. Jag vill tacka er för den tid som ni lagt ned för att handleda mig med olika praktiska moment och för all råd och idéer ni gav mig.

6. Referenser

1. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419(6906):498-511.
2. World Malaria Report 2014. [Tillgänglig i webbadressen http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/]. Läst 18-03-2015.
3. Malaria dödar över 1 miljon människor varje år. [Tillgänglig i webbadressen <http://www.lakartidningen.se/OldPdfFiles/2003/26387.pdf>]. Läst 18-03-2015.
4. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en1>. Läst 18-03-2015.
5. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. Läst 20-03-2015.
6. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12):4168-78.
7. http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Plasmodium_spp._%28Malaria%29. Läst 24-03-2015.
8. Bauman RW. *Microbiology: with diseases by taxonomy*. 2. ed. San Francisco, CA.: Pearson/Benjamin Cummings; 2007.
9. <http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=596> , 27-03-2015 kl 21:00.
10. Apoteket. *Läkemedelsboken*. 2009/2010. Stockholm: Apoteket AB; 2009. Sida 627-630.
11. Kaiser M, Wittlin S, Nehrbass-Stuedli A, Dong Y, Wang X, Hemphill A, et al. Peroxide bond-dependent antiplasmodial specificity of artemisinin and OZ277 (RBx11160). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(8):2991-3.

12. Brown GD. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules*. 2010;15(11):7603-98.
13. Guidelines Of The Treatment Of Malaria. [Tillgänglig i webbadressen http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546948_eng_full.pdf]. Läst 28-03-2015.
14. Sommarmalört, det nya mot malaria. [Tillgänglig i webbadressen <http://www.linnaeus.uu.se/online/lakemedel/malort.html>]. Läst 12-04-2015.
15. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK, et al. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *Journal of natural products*. 1984;47(4):715-7.
16. Wen W, Yu R. Artemisinin biosynthesis and its regulatory enzymes: Progress and perspective. *Pharmacognosy reviews*. 2011;5(10):189-94.
17. Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(5):355-67.
18. Soetaert SS, Van Neste CM, Vandewoestyne ML, Head SR, Goossens A, Van Nieuwerburgh FC, et al. Differential transcriptome analysis of glandular and filamentous trichomes in *Artemisia annua*. *BMC Plant Biology*. 2013;13:220.
19. Matveeva TV, Lutova LA. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Frontiers in plant science*. 2014;5:326.
20. Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(23):13437-42.
21. Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Advanced techniques in biology & medicine*. 2013;1(1).

22. Kanagarajan S, Muthusamy S, Gliszczynska A, Lundgren A, Brodelius PE. Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. *Plant cell reports*. 2012;31(7):1309-19.
23. Lombardi R, Circelli P, Villani ME, Buriani G, Nardi L, Coppola V, et al. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinkle Virus. *BMC biotechnology*. 2009;9:96.
24. Lodish HF. *Molecular cell biology*. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Co.; 2000. Kapitel 4,4 och 7,7.
25. PureLink® Plant RNA Reagent [Tillgänglig i webbadressen http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/plantrna_man.pdf]. Läst 20-04-2015.
26. Vellore J, Moretz SE, Lampson BC. A Group II Intron-Type Open Reading Frame from the Thermophile *Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus* Encodes a Heat-Stable Reverse Transcriptase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7140-7.
27. qPCR Technical Guide [Webbsida, tillgänglig: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcr-technical-guide.html>]. Läst 07-03-2015.
28. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Webbsida, tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>]. Läst 08-03-2015.
29. Real-Time qRT-PCR [Webbsida tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>]. Läst 09-03-2015.
30. Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier [Webbsida tillgänglig: <http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Realtids-PCR>]. Läst 09-03-2015.
31. Simonsen F. *Analysteknik: instrument och metoder*. Lund: Studentlitteratur; 2005. Sida 257, 266, 268. 271,343-344.

32. Thermo Scientific RevertAid RT Kit. [Tillgänglig i webbadressen http://2014.igem.org/wiki/images/2/29/Thermo_Scientific_RevertAid_RT_Kit.pdf].
33. Wilkins T, Mishra R, Trolinder N. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of cotton. Food, Agriculture & Environment. 2004;2 (1): 179-187.
34. Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F, editors. Plant cell culture protocols. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2005. Sida 318.
35. Provhantering, lysering och metoder för renframställning av nukleinsyra [Tillgänglig i webbsidan; http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Provhantering_lysering_och_metoder_f%C3%B6r_renframst%C3%A4llning_av_nukleinsyra]. Läst 18-05-2015.
36. 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers [Tillgänglig i webbadressen http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf]. Läst 19-05-2015.
37. Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbor protocols. 2009;2009(4):pdb.ip66.

Linnéuniversitetet
Kalmar Växjö
Lnu.se