

Η πρωτεΐνη Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) του Θυσανόποδου *Amphibalanus amphitrite* ως ένας αξιόπιστος δείκτης μέτρησης της θαλάσσιας βιοεπίστρωσης

Κοτσίρη, Μ.¹, Πρωτοπαπά, Μ.¹, Κλείδας, Ι.¹, Ιωάννου, Ε.², Ρούσσης, Β.², Βερροϊόπουλος, Γ.¹, Ντέντος Σ.¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, madokot@yahoo.gr, mariaaprot@hotmail.com, giannis_kl@hotmail.com, gverriop@biol.uoa.gr, sdedos@biol.uoa.gr

²Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, eioannou@pharm.uoa.gr, roussis@pharm.uoa.gr

Περίληψη

Η χρήση της πρωτεΐνης Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) του Θυσανόποδου *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854), για την εκτίμηση της βιοεπίστρωσης, αλλά και της εξάπλωσης και εγκατάστασης θαλάσσιων βενθικών οργανισμών, σε επιφάνειες ποντισμένες στη θάλασσα αποτελεί μια πρόκληση στην προσπάθεια να αποτραπεί το οικονομικά δαπανηρό φαινόμενο της βιοεπίστρωσης.

Λέξεις κλειδιά: βιοδείκτες, εισβλητικό είδος, φερομόνη, αγελαία εγκατάσταση

Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*: a reliable indicator of marine biofouling

Kotsiri, M.¹, Protopapa, M.¹, Kleidas, I.¹, Ioannou, E.², Roussis, V.², Verriopoulos, G.¹, Dedos, S.¹

¹Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, madokot@yahoo.gr, mariaaprot@hotmail.com, giannis_kl@hotmail.com, gverriop@biol.uoa.gr, sdedos@biol.uoa.gr

²Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, eioannou@pharm.uoa.gr, roussis@pharm.uoa.gr

Abstract

A challenging aspect of the management of marine biofouling is the use and effectiveness of reliable biomarkers that can safely forecast the financial burden of biofouling on human activities in the marine environment. Using the protein Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) of the barnacle, *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854), a cosmopolitan species well known as a major fouling organism of ship hulls and other marine structures, we developed a series of chimaeric molecules and methodologies that can identify not only the presence of this species, but also provide a reliable assessment of the extent and spread of biofouling on man-made marine structures.

Keywords: biomarkers, invasive species, pheromone, gregarious settlement

1. Εισαγωγή

Η εγκατάσταση βενθικών οργανισμών σε επιφάνειες ποντισμένες στη θάλασσα (βιοεπίστρωση) αποτελεί σοβαρό παράγοντα αύξησης του κόστους σε οποιαδήποτε ανθρώπινη δραστηριότητα στο θαλάσσιο περιβάλλον (Callow & Callow, 2002). Οι ερευνητικές προσπάθειες εστιάζονται στην αποτροπή της βιοεπίστρωσης μέσω της εύρεσης και χρήσης βιοαποικοδομησιμων ουσιών και βαφών που αποτρέπουν την βιοεπίστρωση (Armstrong et al., 2000). Ο κοσμοπολίτης οργανισμός, που ευθύνεται σε μεγάλο ποσοστό για το φαινόμενο της βιοεπίστρωσης, είναι το Θυσανόποδο, *Amphibalanus amphitrite* (Aldred & Clare, 2008). Ο βιολογικός κύκλος του *A. amphitrite* περιλαμβάνει το πελαγικό προνυμφικό στάδιο του ναυπλίου, το νυμφικό στάδιο της κυπρίδας και το ακμαίο που είναι εδραίο (Aldred & Clare, 2008). Μόλις μεταμορφωθεί η κυπρίδα αναζητεί το κατάλληλο υπόστρωμα όπου και εγκαθίσταται (Aldred & Clare, 2008). Για την ανίχνευση του χρησιμοποιεί ένα έκκριμα πρωτεϊνικής φύσεως που φέρει την πρωτεΐνη Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) που δρα ως φερομόνη για την πρόκληση εγκατάστασης και άλλων ατόμων του ίδιου είδους (Dreanno et al., 2006). Ο κοσμοπολίτικος αυτός οργανισμός έχει χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για τον έλεγχο της προτίμησης εγκατάστασής του σε επιφάνειες παρουσία

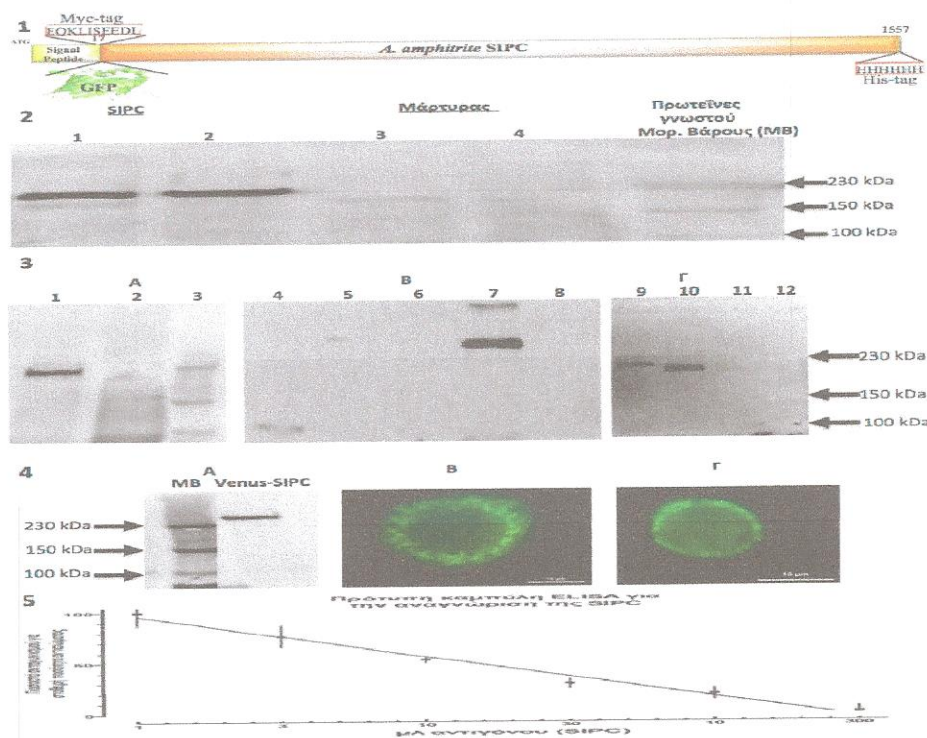
βιοαποικοδομησίμων ουσιών και βαφών που αποτρέπουν την βιοεπίστρωση (Piazza et al., 2011), αλλά λίγα είναι τα δεδομένα σχετικά με τη δυναμική εξάπλωσής του, και κατά επέκταση, τη δυναμική επέκτασης της βιοεπίστρωσης σε επιφάνειες ποντισμένες στη θάλασσα που αποικίζει το είδος αυτό. Η ερευνητική προσπάθεια επικεντρώθηκε στη χρησιμοποίηση της SIPC ως βιοδείκτη εκτίμησης της παρουσίας του Θυσανόποδου σε επιφάνειες ποντισμένες στη θάλασσα και ως δείκτης εκτίμησης της βιοεπίστρωσης. Τα βιομόρια και οι μέθοδοι που παρουσιάζονται στοχεύουν στη χρήση της πρωτεΐνης αυτής για την ποσοτική εκτίμηση της βιοεπίστρωσης και στην ανάπτυξη μεθόδων εκτίμησης της αντι-βιοεπιστρωτικής ικανότητας βαφών και φυσικών χημικών ουσιών.

2. Υλικά και μέθοδοι

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ΑΠΑ) του γονιδίου που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη SIPC είχε κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pCR[®]4-TOPO (Invitrogen) και ήταν προσφορά του Dr. R. Kirby (Plymouth University) (Dreanno et al., 2006). Το ΑΠΑ του γονιδίου αφαιρέθηκε από το πλασμιδιακό φορέα και μεταφέρθηκε στο φορέα pcDNA3.2/DEST (Invitrogen) για περαιτέρω επεξεργασία. Για να αναγνωρισθεί η σύνθεση της πρωτεΐνης σε ετερόλογο σύστημα μέσω ανοσοοστεπύματος, έγινε εισαγωγή του επιτόπου myc (EQKLISEEDL) στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης με τη χρήση εκκινητών και τη μέθοδο της PCR. Για να επιτραπεί η πρόσδεση του χιμαιρικού μορίου σε δισθενή κατιόντα (π.χ. χαλκό), έγινε εισαγωγή του επιτόπου His (HHHHHH) στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης όπως παραπάνω. Για τη μελέτη της σύνθεσης και έκκρισης της πρωτεΐνης σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης έγινε εισαγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης Venus αμέσως μετά τον επίτοπο Myc του κλώνου 2 με τη χρήση εκκινητών και τη μέθοδο της PCR. Για την υπερέκφραση του χιμαιρικού γονιδίου που κωδικοποιεί τη SIPC χρησιμοποιήθηκαν δύο ετερόλογα συστήματα έκφρασης. Το 1^ο ήταν ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού (HEK293) που επιτρέπουν το εντοπισμό της παραγωγής πρωτεΐνης μέσω επιμόλυνσης. Το 2^ο ήταν το χιμαιρικό σύστημα υπερέκφρασης μέσω του ανασυνδυασμένου βακιλοϊού AcNPV (Invitrogen) με μόλυνση κυττάρων εντόμων με το βακιλοϊό (κύτταρα Sf9) που επιτρέπει τη σύνθεση της πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες και σχετική καθαρότητα. Δεδομένου ότι η SIPC είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη και τα κύτταρα Sf9 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό χωρίς πρωτεΐνες, η καθαρότητα της, είναι υψηλή. Οι αρχικές προσπάθειες υπερέκφρασης της SIPC μέσω βακιλοϊού δεν ήταν επιτυχείς (η παραγόμενη πρωτεΐνη δεν εκκρινόταν από τα κύτταρα Sf9) ενώ εκκρινόταν από τα HEK293 (Σχήμα 1). Έτσι έγινε αλλαγή της πεπτιδικής αλληλουχίας που σηματοδοτεί την έκκριση της SIPC στο εξωκυττάριο περιβάλλον με την αλληλουχία: MNFQNIIFVALILAVFAGQSQSQA της Σαρκοτοξίνης 1A της μύγας *Sarcophaga peregrine*, με τη χρήση εκκινητών και τη μέθοδο της PCR, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί νέος ανασυνδυασμένος βακιλοϊός μέσω του οποίου συντίθεται η SIPC σε εκκρινόμενη μορφή από τα κύτταρα Sf9. Για τη δημιουργία πολυκλωνικού αντισώματος που θα αναγνωρίζει τη SIPC επιλέχθηκε η αλληλουχία: (C)IHKELKGGTERGGE που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 1186-1199 της πρωτεΐνης αυτής και έχει >90% ομοιότητα με όλες τις άλλες 7 γνωστές πρωτεΐνες του γένους *Amphibalanus*. Η σύνθεση του πεπτιδίου, η σύνδεσή του με τη πρωτεΐνη Keyhole limpet hemocyanin (KLH) και η παραγωγή του αντισώματος σε κουνέλια έγιναν από την εταιρεία GeneScrip (New Jersey, USA). Για την αναγνώριση μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων της εκκρινόμενης SIPC έγινε ανάλυση με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) με τη χρήση στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (NanoAcquity UPLC, Waters Corp., Milford, MA) σε συνδυασμό με το σύστημα φασματομετρίας μάζας (LTQ Orbitrap Velos hybrid ion trap mass spectrometer; Thermo Scientific, Waltham, MA). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Protein Discoverer (version 1.4., ThermoFisher) μέσω του αλγόριθμου Mascot (v2.3.02, Matrix Science, London UK) στη βάση δεδομένων UniProt (www.uniprot.org).

3. Αποτελέσματα

Η SIPC είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους και πιστεύεται ότι οι υδατανθρακικές της ομάδες, είναι υπεύθυνες για την αναγνώρισή της από τα *A. amphitrite* (Dreanno et al., 2006). Το ΑΠΑ του γονιδίου κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης 1547 αμινοξέων με θεωρητικό μοριακό βάρος 170 kDa. Ωστόσο, και στα δύο ετερόλογα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν, η παραγόμενη πρωτεΐνη είχε μορ. βάρος περίπου 213 kDa (Σχήμα 1) κατά πολύ μεγαλύτερο του θεωρητικού. Ανάλυση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης για πιθανές μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις έδειξε ότι οι καταγραφόμενες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις πρόσθεταν μόλις 0,7 kDa. Πέψη των υδατανθρακικών ομάδων με γλυκοσιδάσες οδήγησε στην αφαίρεση περίπου 11 kDa (Σχήμα 1) που δείχνει ότι η πρωτεΐνη φέρει περίπου 60 μόρια υδατανθρακικών ισοδύναμων της γλυκόζης. Ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε εκκριτικά κοκκία μετά τις μετα-μεταγραφικές της τροποποιήσεις και δεν υφίσταται πρωτεόλυση μετά την έκκρισή της στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Σχήμα 1). Ωστόσο, η ενδογενής πεπτιδική αλληλουχία που σηματοδοτεί την έκκριση της SIPC δεν ήταν ικανή για την έκκριση της, από τα κύτταρα εντόμων (*Sf9*) ενώ μπορούσε να οδηγήσει στην έκκριση της, από κύτταρα θηλαστικών (HEK293). Αυτό μας κάνει να πιστεύουμε ότι η πρωτεΐνη αυτή ίσως να μην είναι ενεργά εκκρινόμενη στα Αρθρόποδα αλλά να βρίσκεται στην επιδερμίδα τους (Dreanno et al., 2006) και να εναποτίθεται παθητικά κατά τη διαδικασία της εξερεύνησης του υποστρώματος. Με τη σύνθεση πολυκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη επιβεβαιώθηκε ότι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη με το ίδιο μοριακό βάρος αναγνωρίζεται από το αντίσωμα (Σχήμα 1). Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο αντίσωμα αναπτύξαμε μια ενζυμική ανοσοπροσοφορική μέθοδο (ELISA) (Σχήμα 1) με την οποία εντοπίζουμε την πρωτεΐνη με υψηλή εξειδίκευση χρησιμοποιώντας τη χιμαιρική πρωτεΐνη που παράγεται μέσω βακτιοϊού για τη δημιουργία σταθερής καμπύλης τιμών αναφοράς.



Σχήμα 1. Εικ. 1. Απεικόνιση των διαφορετικών συνδυασμών από χιμαιρικά μόρια της SIPC που δημιουργήθηκαν. Εικ. 2. Έκφραση της SIPC σε κύτταρα HEK293. (1) Εκχύλισμα κυττάρων που εκφράζουν τη SIPC (10 µγ), (2) Θρεπτικό υλικό των κυττάρων αυτών (25 µλ), (3) Εκχύλισμα κυττάρων μάρτυρα (HEK293) (10 µγ), (4) Θρεπτικό υλικό των κυττάρων αυτών (25 µλ). Εικ. 3. Τμήμα Α: (1) Έκφραση της χιμαιρικής SIPC σε κύτταρα Sf9, (2) Ανικανότητα έκκρισης της SIPC στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων Sf9, (3) Πρωτεΐνες γνωστού

Μορ. Βάρους. Τμήμα Β: Έκκριση της SIPC από τα κύτταρα Sf9 μετά από αλλαγή του σηματοδοτικού πεπτιδίου έκκρισης. (4) Πρωτεΐνες γνωστού Μορ. Βάρους, (5) Θρεπτικό υλικό κυττάρων Sf9, (6) Εκλουόμενο κλάσμα μετά από πρόσδεση της SIPC σε σφαιρίδια Νικελίου (7) Έκλυση της SIPC από τα σφαιρίδια Νικελίου, (8) Εναπομείνουσα πρωτεΐνη στα σφαιρίδια Νικελίου. Τμήμα Γ: Αφαίρεση υδατανθρακικών ομάδων από τη SIPC: (9) Θρεπτικό υλικό κυττάρων Sf9, (10) Θρεπτικό υλικό κυττάρων Sf9 μετά από πέψη με γλυκοσιδάσες, (11) Αρνητικός μάρτυρας, απλό θρεπτικό υλικό κυττάρων Sf9, (12) Πρωτεΐνες γνωστού Μορ. Βάρους. Εικόνα 4, Τμήμα Α: Έκφραση του χιμαρικού μορίου Venus-SIPC σε κύτταρα Sf9. Τμήμα Β: Κύτταρο Sf9 στο οποίο διακρίνονται τα εκκριτικά κυστίδια (x63). Τμήμα Γ: Κύτταρο Sf9 στο οποίο διακρίνονται η παρουσία της Venus-SIPC στο κυτταρόπλασμα (x40). Εικόνα 5: Πρότυπη καμπύλη της ενζυμικής ανοσοπροσοφθητικής μεθόδου (ELISA) με χρήση ως αντιγόνου του θρεπτικού υλικού κυττάρων Sf9 που παράγουν τη SIPC.

4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματά δείχνουν ότι η SIPC είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη που ίσως δεν είναι ενεργά εκκρινόμενη από τα Θυσανόποδα αλλά βρίσκεται στην επιδερμίδα τους (Dreanno et al. 2006). Αν ισχύει η υπόθεση αυτή, τότε ο εντοπισμός της σε υποστρώματα είναι αποτέλεσμα παθητικής εναπόθεσης κατά τη διάρκεια εξερεύνησης του υποστρώματος από το είδος αυτό. Η διαφορά μεταξύ του θεωρητικού και του πρακτικά εξακριβωμένου μοριακού βάρους είναι προς το παρόν δυσεξήγητη, αν και έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες (Dreanno et al. 2006). Υποθέτουμε ότι η διαφορά είναι αποτέλεσμα άλλων μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που επέρχονται στο μόριο της SIPC κατά τη διάρκεια έκκρισής της από τα κύτταρα και δεν είναι αποτέλεσμα της παρουσίας συμπλόκου με άλλη/άλλες πρωτεΐνες λόγω των αναγωγικών συνθηκών που εφαρμόζουμε κατά την ανάλυσή της. Τα χιμαρικά βιομόρια που έχουμε παράγει μπορούν λόγω της παρουσίας του επιτόπου His να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή τους σε επιφάνειες που φέρουν χαλκό και να προσδένονται έτσι μόνιμα για να μελετηθεί η συμπεριφορά εγκατάστασης των Θυσανόποδων σε συνθήκες υψηλής παρουσίας της πρωτεΐνης αυτής. Επίσης τα χιμαρικά βιομόρια που φέρουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη Venus θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις της συμπεριφοράς εγκατάστασης των Θυσανόποδων με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Τέλος, το πολυκλωνικό αντίσωμα και η ενζυμική ανοσοπροσοφθητική μέθοδος που αναπτύξαμε για τη SIPC επιτρέπουν τη ποσοτική εκτίμηση με υψηλή ακρίβεια τόσο της παρουσίας του είδους αυτού όσο και τη δυναμική επέκτασης της βιοεπίστρωσης σε επιφάνειες ποντισμένες στη θάλασσα.

5. Ευχαριστίες

Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το έργο 11ΣΥΝ-5-1274 «MARIPAINTS», το οποίο υλοποιείται στα πλαίσια της Δράσης «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) και Εθνικούς Πόρους.

6. Βιβλιογραφία

- Aldred, N. and Clare, A.S. 2008. The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. *Biofouling*, 24, 351-363.
- Armstrong, E., Boyd, K.G. and Burgess, J.G. 2000. Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review*, 6, 221-241.
- Callow, M.E. and Callow, J.A. 2002. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*, 49, 10-14.
- Dreanno, C., K. Matsumura, N. Dohmae, K. Takio, H. Hirota, et al. 2006. An alpha2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *PNAS*, 103, 14396-14401.
- Piazza, V., Roussis, V., Garaventa, F., Greco, G., Smyrniotopoulos, V. et al. 2011. Terpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* inhibit the settlement of barnacles. *Marine Biotechnology*, 13, 764-772.