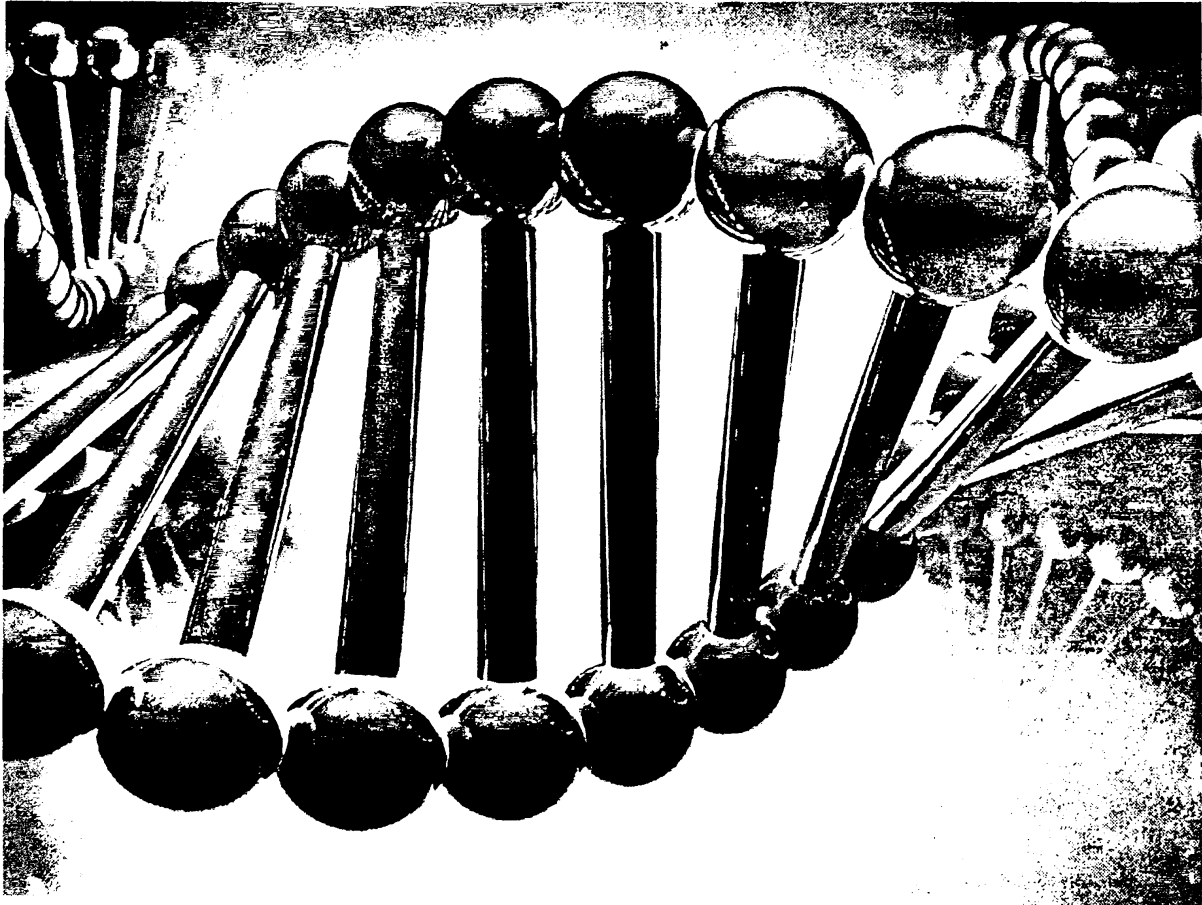




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΠΜΣ: ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ



«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΑΠΟ ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤ

ΚΟΛΛΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2010

Επιβλέπουσα: Αμαλία – Σοφία Αφένδρα (Λέκτορας)



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

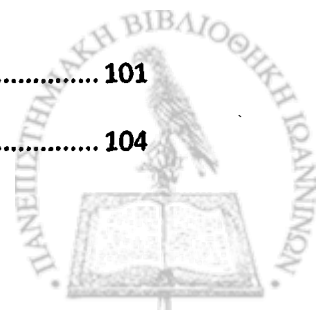
| | |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 1 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 2 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 5 |
| 1. ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ | 6 |
| 1.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ | 7 |
| 1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ | 8 |
| 1.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ | 12 |
| 1.3.1 Μονοπάτι TPS/TPP | 15 |
| 1.3.2 Μονοπάτι TREY/TREZ | 17 |
| 1.4 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ | 17 |
| 1.5 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ | 18 |
| 1.6 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ | 21 |
| 1.7 ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ..... | 23 |
| 1.7.1 Γενικά | 23 |
| 1.7.2 Εφαρμογές..... | 25 |
| 1.7.3 Κορυνοβακτήρια και τρεχαλόζη | 28 |
| 1.8 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Xanthomonas campestris</i> | 31 |
| 1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 34 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 36 |
| 2.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ | 37 |
| 2.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ | 38 |
| 2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ..... | 39 |
| 2.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ | 39 |
| 2.5 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ | 39 |



| | |
|--|----|
| 2.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA | 40 |
| 2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΑΚΕΤΟΥ ΜΕ ΕΤΟΙΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Cat. No. 740588.250) | 41 |
| 2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΖΩΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΑΚΕΤΟΥ ΜΕ ΕΤΟΙΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ NucleoSpin ExtractII (Macherey- Nagel, Cat. No. 740609.250) | 42 |
| 2.9 ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ | 43 |
| 2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA | 45 |
| 2.11 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ | 48 |
| 2.11.1 Αντίδραση δεσμοποίησης (ligation) στον φορέα pCR-Blunt με τη μέθοδο χρήσης πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων ZeroBlunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, Cat. No. K2750-20) | 50 |
| 2.11.2 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA. (Kushner et al., 1978) | 52 |
| 2.11.3 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>Xanthomonas campestris</i> με πλασμιδιακό DNA με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) (White TJ, Gonzalez CF, 1995) | 53 |
| 2.12 ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ | 54 |
| 2.13 ΜΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ DNA-DNA | 54 |
| 2.13.1 Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε νάυλον φίλτρο. (Υβριδισμός κατά Southern-Southern blotting) | 55 |
| 2.13.2 Σήμανση DNA με digoxigenine-11-dUTP (dig-11-dUTP) | 56 |
| 2.13.3 Υβριδισμός του ιχνηθέτη DNA με το ακινητοποιημένο DNA | 57 |
| 2.13.4 Εκπλύσεις και χρωμογόνος αντίδραση | 58 |
| 2.14 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction – PCR) | 59 |
| 2.14.1 Εκκινήτες | 62 |
| 2.14.2 Σύσταση των αντιδράσεων PCR | 62 |
| 2.14.3. Προγράμματα PCR του θερμοκυκλοποιητή | 63 |
| 2.15 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ | 65 |
| 2.15.1 Προετοιμασία κυτταρικού εκχυλίσματος για τις ενζυμικές δοκιμές | 65 |



| | |
|---|-----|
| 2.15.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας | 65 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 67 |
| 3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>treY</i> ΚΑΙ <i>treZ</i> ΑΠΟ ΤΑ <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC21253 & <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799 | 68 |
| 3.1.1 Απομόνωση ολικού DNA από τα <i>C. g.</i> 21253 και <i>B. l.</i> 21799 | 68 |
| 3.1.2 Ενίσχυση των εσωτερικών περιοχών των γονιδίων <i>treY</i> και <i>treZ</i> | 68 |
| 3.1.3 Υβριδισμός της ζώνης A (εικ. 3.3) με πέψη του ολικού DNA των οργανισμών <i>B.l.</i> 21799 και <i>C.g.</i> 21253 | 71 |
| 3.1.4 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν στις εσωτερικές περιοχές των γονιδίων <i>treY</i> και <i>treZ</i> | 72 |
| 3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΟΛΟΚΛΗΡΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>treY</i> ΚΑΙ <i>treZ</i> | 75 |
| 3.2.1 Σχεδιασμός εκκινητών & πειράματα PCR | 75 |
| 3.2.2 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν στα γονίδια <i>treY</i> και <i>treZ</i> | 77 |
| 3.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>treY</i> ΑΠΟ ΤΟ <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799 ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΝ ΚΛΩΝΟ 13 | 81 |
| 3.3.1 Κλωνοποίηση της αλληλουχίας της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου <i>treY</i> | 82 |
| 3.4 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>treY</i> & <i>treZ</i> ΤΩΝ <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21253 & <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 2179 | 85 |
| 3.4.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21253 | 85 |
| 3.4.2 <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 21799 | 85 |
| 3.5 ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ. | 88 |
| 3.6 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>treY</i> ΚΑΙ <i>treZ</i> ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ pET29c | 95 |
| 3.7 Δημιουργία κατάλληλων φορέων κλωνοποίησης και ένθεση γονιδίων βιοσύνθεσης τρεχαλόζης κορυνοβακτηρίων στον οργανισμό <i>Xanthomonas campestris</i> | 99 |
| 3.8 Μεταφορά και έκφραση των γονιδίων <i>otsA</i> και <i>otsB</i> ΣΤΟ <i>Xanthomonas campestris</i> | 101 |
| 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 104 |



| | |
|---|-----|
| 1. Απομόνωση των γονιδίων <i>treY</i> και <i>treZ</i> από τα στελέχη <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21253 και <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 21799 | 105 |
| 2. Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιοσυνθετική πορεία <i>otsAB</i> στο βακτήριο <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951 | 108 |
| 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 110 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 119 |



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτριά μου Λέκτορα κα. Αμαλία - Σοφία Αφένδρα για την καθοδήγηση και οργάνωση, την πολύτιμη βοήθειά της στα εργαστηριακά πειράματα, την επίβλεψη και διόρθωση της διπλωματικής εργασίας και για την ψυχολογική στήριξη και την υπομονή της.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους – συναδέλφους, των οποίων οι ζωηρές συζητήσεις, τα σχόλια, η κριτική και οι γνώσεις τους συνέβαλαν στην αντιμετώπιση εργαστηριακών και προσωπικών δυσκολιών. Ένα ιδιαίτερο «ευχαριστώ» στους φίλους Αναστάσιο Βασιλειάδη και Γεώργιο Αϊνδελή και την επιστήθια φίλη Αντιγόνη Μυλωνά για την αγάπη, τη συμπαράσταση και την ουσιαστική βοήθειά τους.

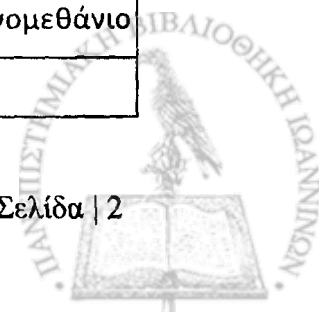
Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τη μητέρα μου Χρύσα και τα αδέρφια μου Τάσο, Φρόσω και Βασίλη για την τεράστια βοήθειά τους, τη συνεχή ηθική και υλική υποστήριξή τους που με ώθησαν στη διατήρηση και εκπλήρωση των στόχων μου. Η εργασία αυτή αφιερώνεται σε καθέναν ξεχωριστά.

«Είναι δύσκολο να γνωρίσει κανείς την έκταση της παγκόσμιας επιστήμης: είναι κρυμμένη μέσα σε μια αδιαπέραστη σκοτεινιά. Βρίσκεται έξω απ' τη δική μας σφαίρα, σ' έναν τόπο μεγαλοπρεπή, που χρησιμεύει σαν όριο σ' όλα τα πράγματα.»

Σόλων

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

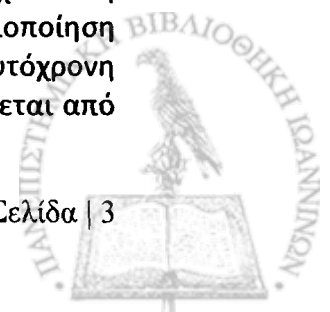
| | | |
|-------------------------|--|--|
| Ap | Ampicillin | Αμπικιλίνη |
| ATCC | American Type Culture Collection | |
| bp | Base pairs | Ζεύγη βάσεων |
| ddH₂O | Double distilled water | Δισαπεσταγμένο νερό |
| dH₂O | Distilled water | Απιονισμένο νερό |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | Διμέθυλο-σουλφοξείδιο |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ |
| dNTPs | Deoxyribonucleotide triphosphate | Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια |
| EDTA | Ethylenedianminetetraacetic acid | Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ |
| EtBr | Ethidium bromide | Βρωμιούχο αιθίδιο |
| GLB | Gel Loading Buffer | Διάλυμα φόρτωσης σε πήκτωμα |
| min | Minutes | Λεπτά |
| MOPS | 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid | 3(N-Μορφολινο) προπανοσουλφονικό οξύ |
| nm | nanometer | νανόμετρο |
| OD | Optical Density | Οπτική πυκνότητα |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης |
| rRNA | Ribosomal ribonucleic acid | Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ |
| rpm | Revolutions per minute | Περιστροφές ανά λεπτό |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | Δωδέκυλο-θειικό νάτριο |
| Sec | Seconds | Δευτερόλεπτα |
| TAE | Tris-acetate-EDTA | Tris-οξικό οξύ-EDTA |
| Tc | Tetracycline | Τετρακυκλίνη |
| TES | N-Tris (hydroxymethyl) methyl- 2-aminoethanesulfonic acid | N-Tris (υδροξυμεθυλ) μεθυλ- 2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ |
| T.O. | | Τελικός όγκος |
| Tris | Tris (hydromethylaminomethane) | Tris (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο |
| Tc | Tetracycline | Τετρακυκλίνη |



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

(Α) Απομόνωση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία *treYZ* της τρεχαλόζης από τα *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21799 και *Corynebacterium glutamicum* ATCC21253 (τροποποιημένα για παραγωγή λυσίνης). Σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών εσωτερικά των περιοχών των πιθανών γονιδίων *treY* και *treZ* σε συντηρημένες περιοχές με βάση τη γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία του *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 καθώς και αντίστοιχων αλληλουχιών γονιδίων συγγενικών βακτηρίων για την ενίσχυση των αντίστοιχων πιθανών περιοχών από το γονιδιωματικό DNA των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253. Προέκυψαν τέσσερα προϊόντα με το αναμενόμενο μέγεθος, εκ των οποίων τα τρία κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς, η δε νουκλεοτιδική τους αλληλουχία κατέδειξε για τα δύο προϊόντα της εσωτερικής περιοχής του πιθανού γονιδίου *treZ* των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253 αξιοσημείωτη ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή γονιδίων τρεχαλοϋδρολάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης και υβριδισμό με το DNA των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253. Εντούτοις, η απομόνωση των γονιδίων από το ολικό DNA των δύο βακτηρίων δεν κατέστη δυνατή. Σχεδιάστηκαν ζεύγη πριμοδοτικών μορίων εκατέρωθεν των περιοχών των πιθανών γονιδίων *treY* και *treZ* βάσει της γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 για την ενίσχυση ολόκληρων των αντίστοιχων πιθανών περιοχών *treY* και *treZ* από το γονιδιωματικό DNA των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253. Προέκυψαν τρία προϊόντα αναμενόμενου μεγέθους, δύο εκ των οποίων (που αντιστοιχούσαν στις πιθανές περιοχές των *treY* και *treZ* του *B. l.* 21799) κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους φορείς. Η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, πλήρης για την περιοχή που αντιστοιχεί στο πιθανό *treZ*, κατέδειξε αξιοσημείωτη ομολογία με γονίδια συνθάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης και τρεχαλοϋδρολάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης, τα προϊόντα των οποίων καταλύουν την πορεία *treYZ*. Τέλος, με κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές ενισχύθηκαν οι περιοχές *treY* και *treZ* των δύο στελεχών με σκοπό την κλωνοποίησή τους σε φορείς υπερέκφρασης.

(Β) Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία *otsAB* της τρεχαλόζης των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253 στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* ATCC 13951. Τα γονίδια της βιοσυνθετικής πορείας *otsAB* της τρεχαλόζης των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253 (τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί) κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά το καθένα καθώς και σε συνδυασμό και των δύο στους φορείς έκφρασης *pCPP33* και *pCPP39*, κατάλληλους για παθογόνα φυτά και επιφυτικά βακτήρια, υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή P_{lac} . Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό του στελέχους *Xanthomonas campestris* με ηλεκτροδιάτρηση. Προέκυψαν μετασχηματισμένα κύτταρα τα οποία εξετάστηκαν ως προς την έκφραση των δύο γονιδίων στο ακατέργαστο κυτταρικό τους εκχύλισμα. Τα *X. campestris* που περιείχαν το κάθε γονίδιο ξεχωριστά κλωνοποιημένο υπό τον έλεγχο του P_{lac} παρουσίασαν υψηλή ενζυμική ενεργότητα, ενώ το *otsB* υπό τον έλεγχο των πιθανών αλληλουχιών του δικού του υποκινητή παρουσίασε πολύ χαμηλή ενεργότητα σε αυτά. Η ετερόλογη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία της τρεχαλόζης αποτελεί ενδιαφέρουσα αξιοποίηση βακτηρίων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος με απώτερο σκοπό την ταυτόχρονη παραγωγή δύο προϊόντων, όπως τρεχαλόζης και ξανθάνης, η οποία παράγεται από το *X. campestris*.



ABSTRACT

(A) Isolation of the genes participating in the trehalose biosynthetic pathway *treYZ* of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21799 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC21253 (modified for production of lysine). Primers flanking internal regions of potential genes *treY* and *treZ* were designed according to conserved regions of the deposited nucleotide sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 as well as *treYZ* sequences of related bacteria for the amplification of similar regions from *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253 genomic DNA. Four products of expected size were amplified, three of which were successfully cloned. The nucleotide sequence of the two products of internal region of potential gene *treZ* by *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253 showed high homology with the corresponding region of genes encoding maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase and hybridisation with the DNA of *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253. Nevertheless, the isolation of genes from the total DNA of two bacteria was not rendered possible. Primers flanking *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *treY* and *treZ* genes were designed according to their nucleotide sequence for the amplification of the entire putative *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253 *treY* and *treZ* regions. Three products of expected size were amplified, two of which (corresponding to the potential regions *treY* and *treZ* by *B.l.* 21799) were cloned in suitable vectors. Their nucleotide sequence (which is complete for the case of putative *treZ*) showed high homology with the genes encoding for maltooligosyl-trehalose synthase and maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase, the products of which catalyze the pathway *treYZ*. These regions were subsequently amplified with suitable primers in order to be cloned in overexpression vectors.

(B) Heterologous expression of the *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253 genes participating in the trehalose biosynthetic pathway *otsAB* in the bacterium *Xanthomonas campestris* ATCC13951. The *B.l.* 21799 and *C.g.* 21253 genes responsible for the trehalose biosynthetic pathway *otsAB* (which have been isolated and characterized) were cloned individually, as well as both, in the expression vectors pCPP33 and pCPP39, suitable for pathogens and epiphytic bacteria, under the control of the strong P_{lac} promoter. The recombinant plasmids were used for transformation of strains *X. c.* ATCC13951 by electroporation. The transformed cells were examined for the expression of two genes in their crude cellular extract. The *X. campestris* transformants that contained each gene separately cloned under the control of P_{lac} exhibited high enzymatic activity, while *otsB* under the control of its own putative promoter sequences showed very low activity. The heterologous expression of genes that participate in the biosynthetic pathway of trehalose in bacteria of biotechnological interest is a remarkable exploitation with final aim the simultaneous production of two products, such as trehalose and xanthan gum, which is produced by *X. campestris*.

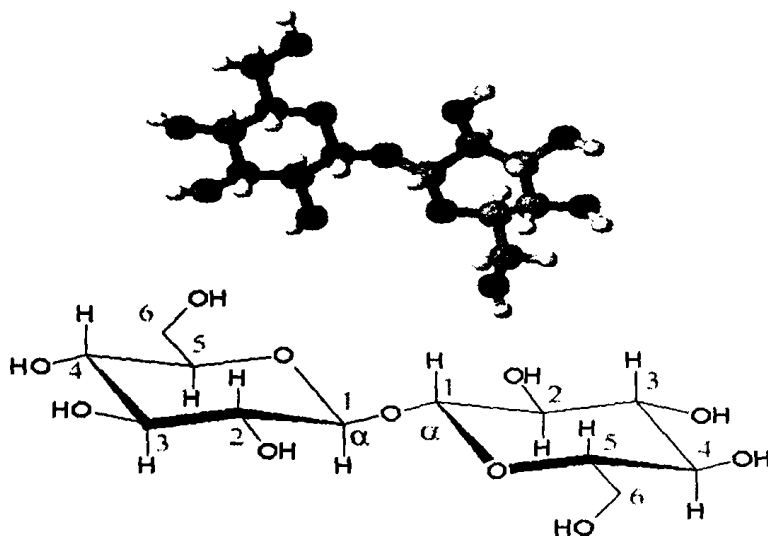
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

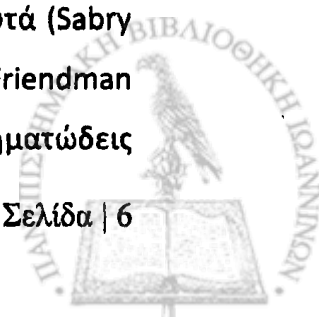
1. ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ

Η τρεχαλόζη είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης που απαντάται σε πλήθος οργανισμών. Αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με έναν α1-α1 γλυκοσιδικό δεσμό και βρίσκεται σε ένυδρη μορφή.



Εικόνα 1.1: Τρεχαλόζη

Ονομάστηκε έτσι από τον Berchelot το 1858 που την ταυτοποίησε στα κουκούλια του σκαθαριού *Larinus*, γνωστά με το όνομα "trehala". Το όνομά της - TREHALOSE - προέρχεται από το TREHALA MANNA MYCOSE, παρόμοια με τη βιβλική ονομασία μάννα. Αυτή όμως δεν ήταν η πρώτη φορά που το ασυνήθιστο αυτό σάκχαρο απομονώθηκε από κάποιο ζωντανό οργανισμό. Αυτό συνέβη το 1832 όταν ο Wiggers ταυτοποίησε τρεχαλόζη στα συστατικά του μύκητα *ergot*, υπεύθυνου για την καταστροφή καλλιεργειών καπνού (Harding, 1923). Με την πάροδο των ετών διαπιστώθηκε ότι η τρεχαλόζη απαντάται σε μεγάλο αριθμό ειδών διάσπαρτων σε όλες σχεδόν τις μορφές ζωής, δηλαδή σε βακτήρια (Shikamata T. And Y. Minatagawa, 2000; Elbein A.D. and M. Mitchel, 1973; Martin et al. 1986; Kaasen et al., 1994), μύκητες (Nwaka S. And H. Holzer, 1997), φυτά (Sabry Z.I. and N.A. Atallah, 1961; Muller et al., 2001) και διάφορα ασπόνδυλα (Friendman S., 1960) όπως έντομα (Fairbairn D., 1958; Evans et al., 1957) και νηματώδεις



σκώληκες (Fairbairn D. And R.F. Passey, 1957). Δεν έχει βρεθεί όμως σε θηλαστικά. Κύριο κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων οργανισμών στους οποίους έχει εντοπιστεί τρεχαλόζη είναι η ικανότητά τους να ανθίστανται σε συνθήκες σχεδόν πλήρους αφυδάτωσης, αναστέλλοντας τη μεταβολική τους δραστηριότητα, και επιστρέφοντας από αυτή τη λανθάνουσα φάση όταν υπάρχει πάλι στο περιβάλλον τους διαθέσιμο νερό (Crowe et al., 1992).

1.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες της τρεχαλόζης συνοψίζονται στον πίνακα 1.1. Επιπλέον είναι μη υγροσκοπική αλλά διαλυτή στο νερό, παρουσιάζει υψηλό ιξώδες, δεν καραμελλοποιείται στις θερμοκρασίες καραμελλοποίησης των υπολοίπων σακχάρων. Πρόκειται για τον πλέον αποτελεσματικό δισακχαρίτη στη προστασία της δομής και λειτουργικότητας βιολογικών μεμβρανών και πρωτεϊνών σε συνθήκες ξήρανσης και αφυδάτωσης. Στους οργανισμούς από τους οποίους απομονώνεται, συντίθεται κυρίως σε μη βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης όπως υψηλή ώσμωση και πίεση, θερμική καταπόνηση και κατάψυξη, ανάπτυξη σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ουσιών κ.α.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: Ιδιότητες της τρεχαλόζης (Higashiyama T., 2002)

| | | |
|---------------------------------|--|---------------------------|
| Σημείο τήξης | Ένυδρη μορφή | 97° C |
| | Άνυδρη μορφή | 210.5° C |
| Θερμότητα τήξης | Ένυδρη μορφή | 57.8 kJ mol ⁻¹ |
| | Άνυδρη μορφή | 53.4 kJ mol ⁻¹ |
| Διαλυτότητα | 68.9g/100g H ₂ O στους 20° C | |
| Σχετική γλυκαντική ικανότητα | 45% της σουκρόζης | |
| Πέψη | Πέπτεται και απορροφάται από το λεπτό έντερο | |
| Σταθερότητα έναντι pH | > 99% (pH 3.5-10, στους 100° C για 24h) | |
| Σταθερότητα έναντι θερμοκρασίας | > 99% (στοους 120° C για 90 min) | |



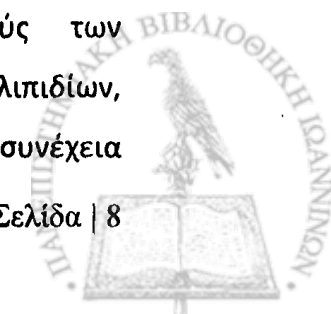
1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η τρεχαλόζη βιοσυντίθεται στο κυτοσόλιο, όταν τα κύτταρα υφίστανται ωσμωτική καταπόνηση, και συντελεί στη σταθεροποίηση της δομής του κυττάρου, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως πηγή άνθρακα (Strøm A.R. and I. Kaasen, 1993; Argöelles J.C., 2000). Σε βακτήρια των γενών *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* και *Corynebacterium* η τρεχαλόζη εμφανίζεται επιπλέον στο κυτταρικό τοίχωμα συνδεδεμένη με γλυκολιπίδια (Argöelles J.C., 2000; De Smet K.A. et al., 2000). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η 6-φωσφοτρεχαλόζη, το ενδιάμεσο της βιοσυνθετικής πορείας της τρεχαλόζης, είναι ρυθμιστής της μεταβολικής ροής γλυκόζης προς την γλυκόλυση (Neves M.J. et al., 1995; Gancedo C. and C.L. Flores, 2004).

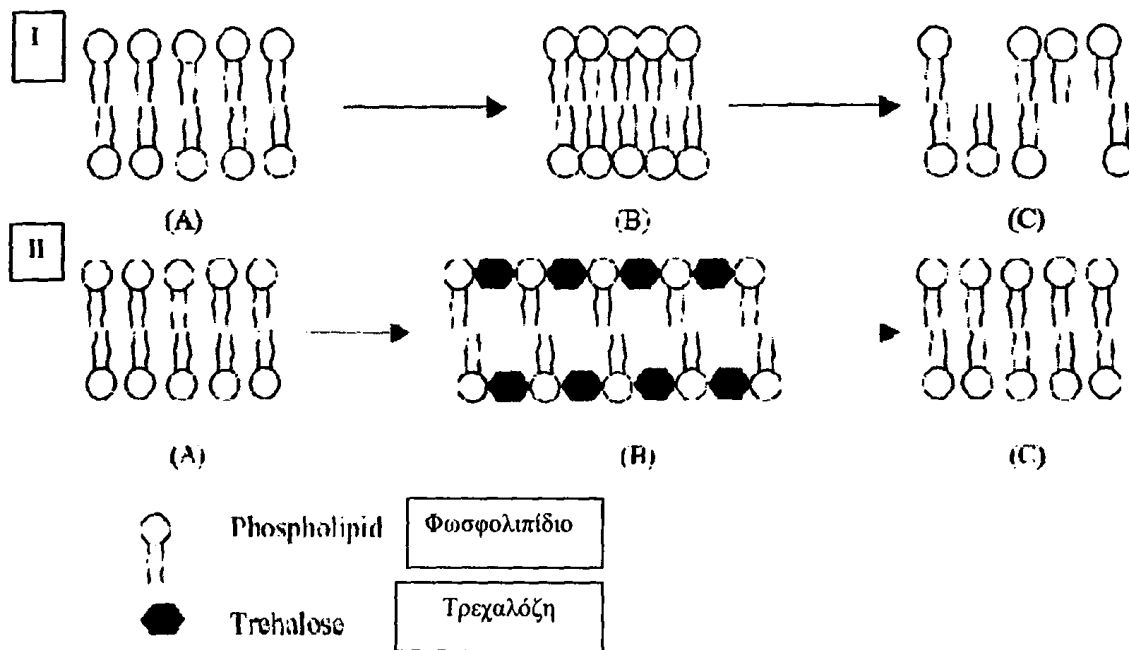
Γενικότερα, η τρεχαλόζη συντελεί στη σταθεροποίηση και την προστασία της δομής των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνών, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο στα κύτταρα ανυδροβιοτικών οργανισμών να επιβιώνουν κατά τη διάρκεια συνεχών κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης (Colano C. et al., 1992). Ο προστατευτικός ρόλος της τρεχαλόζης περιλαμβάνει και άλλες περιπτώσεις της μείωσης διαθεσιμότητας του νερού πέραν της ξηρασίας, όπως είναι η χαμηλή θερμοκρασία και η κατάψυξη (Kandror O. et al., 2002), αλλά επίσης και η υψηλή θερμοκρασία (Bell W. et al., 1992), καθώς και ενδεχόμενες βλάβες από ελεύθερες ρίζες και ειδικότερα τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (Banaroudj N. et al., 2001).

Από σχετικές μελέτες έχει προκύψει ότι η τρεχαλόζη αποτρέπει την αποδιάταξη των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεϊνών. Για τις συνθήκες ξηρασίας και χαμηλών θερμοκρασιών έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί σχετικά με την αλληλεπίδραση της τρεχαλόζης και των δομών τις οποίες προστατεύει:

(i) Υπόθεση αντικατάστασης νερού: Σύμφωνα με αυτήν, η τρεχαλόζη αντικαθιστά τα μόρια του νερού στην επιφάνεια των μεμβρανών και των πρωτεϊνών και συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν τη φυσιολογική δομή των μακρομορίων (Crowe J.H., 1971; Warner D.T., 1962). Όταν η διαθεσιμότητα νερού είναι χαμηλή, οι λιπιδιακές μεμβράνες αλλοιώνονται, επειδή αυξάνεται η ισχύς των αλληλεπιδράσεων Van der Waals μεταξύ των υδρόφιλων κεφαλών των λιπιδίων, οπότε αυτά συσσωματώνονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κενών στη συνέχεια



της μεμβράνης (εικόνα 1.2, I). Η τρεχαλόζη παρεμβάλλεται μεταξύ των υδρόφιλων κεφαλών και αλληλεπιδρά άμεσα με αυτές μειώνοντας την ισχύ των δεσμών Van der Waals και διατηρώντας επομένως τη φυσιολογική δομή των μεμβρανών (Clegg J.S., 1986; Crowe J.H. et al., 1984) (εικόνα 1.2, II).



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση των μεταβολών στη δομή της μεμβράνης υπό ξηρές συνθήκες (I), και της σταθεροποίησής της παρουσία τρεχαλόζης (II) (Patist A. and H. Zoerb, 2005).

(ii) Υπόθεση στρώματος νερού: Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, η τρεχαλόζη αλληλεπιδρά με το νερό: διασπά την τετραεδρική δομή του νερού και με αυτό τον τρόπο η κατανομή νερού στην επιφάνεια των βιομορίων αναδιατάσσεται, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα δομικών αλλοιώσεων κατά την ξήρανση και ακόμα περισσότερο κατά το πάγωμα του νερού (Branca C. et al., 2005). Η αλληλεπίδραση τρεχαλόζης-νερού ευνοεί το σχηματισμό άμορφου πάγου και όχι κρυσταλλικού, που έχει σαν αποτέλεσμα την καλύτερη διατήρηση της δομής των βιολογικών μακρομορίων (Sola-Penna M. and J.R. Meyer-Fernandes, 1998).

(iii) Υπόθεση μηχανικής πανίδευσης: Η τρίτη υπόθεση υποστηρίζει ότι η προστασία των μεμβρανών περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός προστατευτικού στρώματος τρεχαλόζης. Με τον τρόπο αυτό τα βιομόρια εγκλείονται στο εσωτερικό του



κυττάρου και διατηρούν άθικτη τη δομή τους, είτε λόγω παγίδευσης και μορίων νερού, είτε επειδή δεν απειλείται η αποδιάταξή τους (Lins R.D. et al., 2004).

Τα αποτελέσματα μελετών σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο της τρεχαλόζης κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ είναι πολύ πιο σαφή. Σε αυτή την περίπτωση η τρεχαλόζη αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες και εμποδίζει την αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής τους. Έτσι, αυτές σταθεροποιούνται και αποτρέπεται η συσσωμάτωσή τους (De Virgilio C. et al., 1994).

Εκτός όμως από τη δράση της σε λειτουργικές πρωτεΐνες, η τρεχαλόζη εμποδίζει πλέον τη συσσωμάτωση και των ήδη αποδιαταγμένων πρωτεϊνών, οι οποίες θα μπορούσαν να επαναδιαταχθούν και να επανακτήσουν τη δραστηριότητά τους. Για αυτό και πρέπει μετά την πάροδο του θερμικού σοκ η τρεχαλόζη να αποικοδομείται γρήγορα και αποτελεσματικά, γεγονός που συμβαίνει, όπως αποδεικνύεται από την ιδιαίτερα αυξημένη δράση τρεχαλάσης και που παρατηρείται μετά τη λήξη της θερμικής καταπόνησης (Singer M.A. and S. Lindquist, 1998).

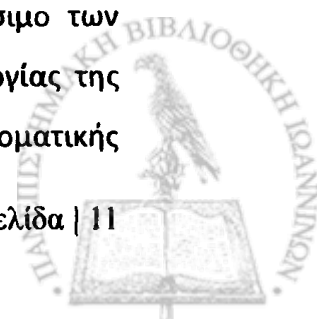
Πέρα από τον προστατευτικό της ρόλο η τρεχαλόζη μπορεί να εγκλωβίσει μόρια γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων, οπότε αυτά να διαθέτουν μία άμεσα προσβάσιμη πηγή άνθρακα. Στα έντομα, η τρεχαλόζη είναι το πλέον άφθονο σάκχαρο στην αιμολέμφο (Wyatt G.R. and G.F. Kalf , 1957) και στους θωρακικούς μύες, όπου καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της πτήσης. Επίσης η τρεχαλόζη αποτελεί σημαντικό συστατικό των σπορίων των μυκήτων, όπου η υδρόλυσή της είναι σημαντικό γεγονός στη αρχή της εκβλάστησης. Είναι πιθανό στους μύκητες αυτούς η δράση της τρεχαλόζης να είναι διττή, αφενός προστατεύοντας τα συστατικά των σπορίων κατά την αφυδατωμένη φάση αλλά και προσφέροντας μία εύκολα μετατρέψιμη πηγή άνθρακα για την παραγωγή ενέργειας στα πρώτα στάδια της εκβλάστησης (Clegg J.S. and M.F. Filosa, 1961; Sussman A.S. and B.T. Lingappa, 1959).





Εικόνα 1.3: Resurrection Plant (Selaginella)

Μέχρι πρόσφατα, ήταν γενικά παραδεκτό ότι στα φυτά η σύνθεσι τρεχαλόζης περιοριζόταν στα λεγόμενα "resurrection plants" (εικόνα 1.3) όποι αποτελεί και το κεντρικό μόριο όσον αφορά την προστασία έναντι παραγόντων καταπόνησης και κυρίως την ξηρασία. Εντούτοις, μια σειρά πειραμάτων με διαγονιδιακά φυτά, σε συνδυασμό με πληροφορίες που προήλθαν από μελέτες της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος διαφόρων φυτών, υποδεικνύουν ότι τρεχαλόζη μπορεί να συντεθεί σε πλήθος άλλων φυτών, ενώ έχει αποδειχθεί ότι στο *Arabidopsis thaliana* η τρεχαλόζη παίζει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Eastmond P.J. et al., 2002) αλλά και στις σηματοδοτικές πορείες αμψισικού οξέος (ABA-abscisic acid) και ελέγχου του σχηματισμού σακχάρων (Avonce N. et al., 2004). Διάφορα διαγονιδιακά στελέχη καπνού στα οποία εισήχθησαν βακτηριακά γονίδια σύνθεσης τρεχαλόζης, παρουσίασαν σοβαρές αναπτυξιακές επιπλοκές, όπως νανισμό και ανεπαρκή ανάπτυξη των ριζών (Vogel G. et al., 1998). Το αμψισικό οξύ που παράγεται προκαλεί μερικό κλείσιμο των στομάτων και επομένως μείωση των απωλειών νερού μέσω της λειτουργίας της διαπνοής. Λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός ότι η μείωση της στοματικής



αγωγιμότητας επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την απώλεια του νερού παρά το ρυθμό της φωτοσύνθεσης, τότε επιτυγχάνεται σημαντική εξοικονόμηση νερού. Παράλληλα με την αύξηση της αποτελεσματικότητας χρήσης του νερού, η μερική ελεγχόμενη έλλειψη του νερού προκαλεί επίσης μείωση της βλαστικής ανάπτυξης.

Στα μυκοβακτήρια και τα κορυνοβακτήρια, η τρεχαλόζη είναι βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, με τη μορφή γλυκολιπιδίων (Ledeger E., 1976). Στα περισσότερα από αυτά, τα γλυκολιπίδια τρεχαλόζης αποτελούν σημαντικές μονάδες στην τοξική τους δράση αλλά και στη μικρή διαπερατότητά τους από εξωγενείς ουσίες (Brennan P.J. and H. Nikaïdo, 1995). Τα περισσότερα από τα γλυκολιπίδια των μεμβρανών αυτών έχουν αδιευκρίνιστες λειτουργίες. Ο σχηματισμός των μυκολικών αυτών γλυκολιπιδίων φαίνεται ότι πραγματοποιείται με τη μεταφορά καταλοίπων μυκολικών οξέων, με πρόδρομο μόριο την μονομυκολική τρεχαλόζη μέσω της δράσης μιας μυκολικής τρανσφεράσης που έχει απομονωθεί από μυκοβακτήρια (Belisle J.T. et al., 1997).

1.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρεις πορείες για τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης και δύο για την αποικοδόμησή της, οι οποίες είναι αντιστρεπτές κάτω από ορισμένες συνθήκες και μπορούν να λειτουργήσουν για τη βιοσύνθεσή της (Εικόνα 1.4).

Η πρώτη από αυτές, που προσδιορίστηκε πριν από 50 χρόνια (Cabib E. And L. Lepoir , 1958) είναι και η πλέον διαδεδομένη, καθώς η ύπαρξή της έχει αναφερθεί σε ευβακτήρια, αρχαία, μύκητες, έντομα και φυτά. Περιλαμβάνει δύο αντιδράσεις, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθάση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) και φωσφατάση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης (trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP). Η TPS καταλύει την μεταφορά γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη σε ένα μόριο 6-φωσφο-γλυκόζης, οπότε και σχηματίζεται 6-φωσφο-τρεχαλόζη. Στη συνέχεια η TPP αποφωσφορυλιώνει την 6-φωσφο-τρεχαλόζη σχηματίζοντας ελεύθερη τρεχαλόζη και ανόργανο φωσφόρο (Elbein A.D. et al., 2003).

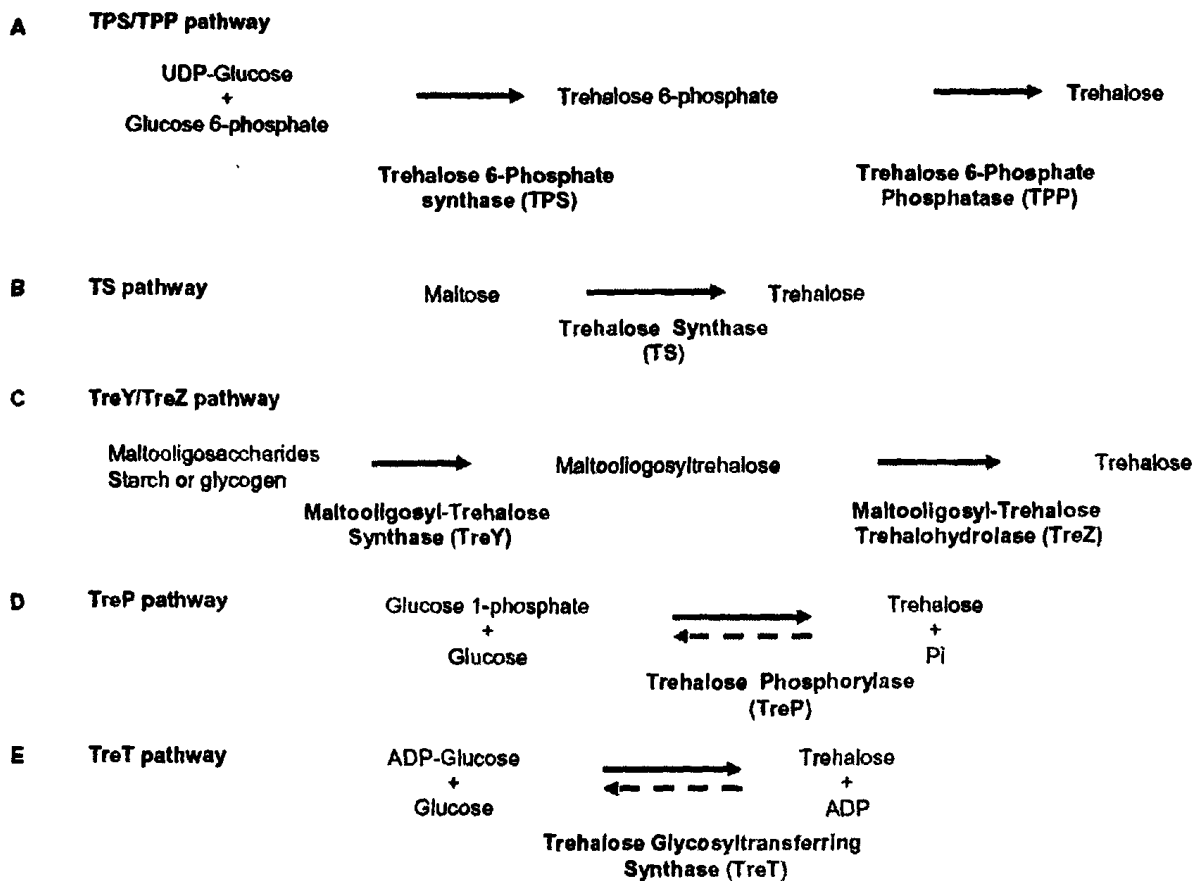


Στο δεύτερο μονοπάτι το ένζυμο συνθάση της τρεχαλόζης καταλύει την ενδομοριακή αναδιάταξη της μαλτόζης, μετατρέποντας τον α1-α4 γλυκοσιδικό δεσμό που υπάρχει σε αυτήν στον α1-α1 γλυκοσιδικό δεσμό της τρεχαλόζης. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε πρώτη φορά σε βακτήρια του γένους *Pimelobacter* και ορθολογικά του έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη ευβακτηρίων.

Το τρίτο μονοπάτι περιλαμβάνει την μετατροπή μαλτοδεξτρινών σε τρεχαλόζη και παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε θερμόφιλα αρχαία του γένους *Sulfolobus*. Η παραγωγή τρεχαλόζης πραγματοποιείται και εδώ σε δύο ενζυμικά καταλυόμενα βήματα. Στο πρώτο από αυτά η συνθάση της μαλτο-ολιγοσουλτοτρεχαλόζης (TreY) καταλύει την τρανσγλυκοζυλίωση του τελευταίου καταλοίπου γλυκόζης της μαλτοδεξτρίνης, μετατρέποντας τον α1-α4 γλυκοσιδικό δεσμό σε α1-α1, με αποτέλεσμα την παραγωγή μαλτο-ολιγοσουλτοτρεχαλόζης, ένα πολυμερές που στο άκρο του φέρει ένα κατάλοιπο τρεχαλόζης. Στο δεύτερο βήμα η τρεχαλοϋδρολάση της μαλτο-ολιγοσουλτοτρεχαλόζης (TreZ) καταλύει την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού που συνδέει το κατάλοιπο τρεχαλόζης με το υπόλοιπο πολυμερές (Streeter J.G. and A. Bhagwat, 1999).

Η πρώτη από τις δύο αντιστρεπτές, αποικοδομητικές αντιδράσεις της τρεχαλόζης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη σύνθεσή της παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε μύκητες. Το ένζυμο που συμμετέχει είναι μια φωσφορυλάση της τρεχαλόζης (TreP) και καταλύει την αντιστρεπτή υδρόλυση της τρεχαλόζης παρουσία ανόργανου φωσφόρου. Η μεταφορά του ενός καταλοίπου γλυκόζης σε φωσφόρο έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης και ελεύθερου σακχάρου (Wannet W.J.B. et al., 1998; Schiraldi Ch. et al., 2002). Η δεύτερη από αυτές τις αντιστρεπτές αντιδράσεις περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα στο υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο *Thermococcus litoralis*, στην οποία συμμετέχει το ένζυμο TreT (trehalose glycosyltransfering synthase, γλυκοζυλομεταφορική συνθάση της τρεχαλόζης) το οποίο καταλύει είτε τον σχηματισμό τρεχαλόζης με υποστρώματα ADP-γλυκόζη και γλυκόζη, είτε την διάσπαση της τρεχαλόζης στα αρχικά αυτά μόρια με κατανάλωση ATP. Το ένζυμο δεν εμφανίζει εξειδίκευση ως προς το δότη γλυκοζυλομάδων και μπορεί να χρησιμοποιήσει για υπόστρωμα GDP-γλυκόζη και UDP-γλυκόζη (Qu Q., 2004).



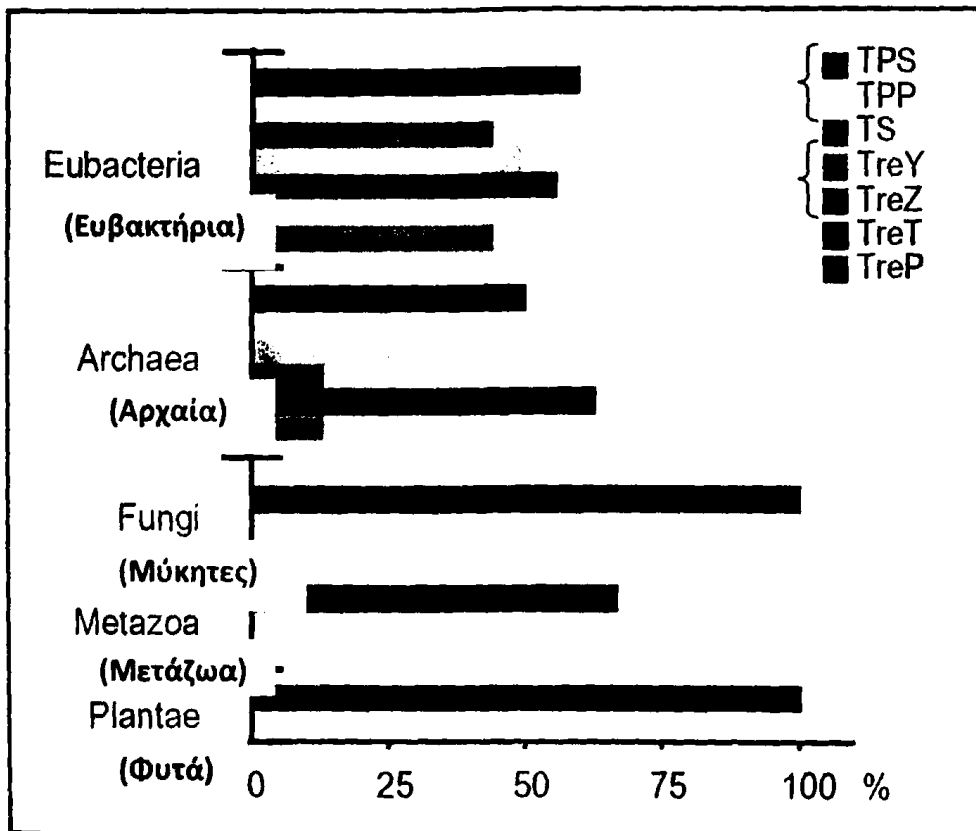


Εικόνα 1.4: Οι πέντε πορείες βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης

Η ανάλυση γονιδιωμάτων κατέδειξε ευρεία διάδοση των γονιδίων που συμμετέχουν σε κάποια από τις βιοσυνθετικές πορείες της τρεχαλόζης. Οργανισμοί και από τα τρία βασίλεια φέρουν γονίδια για τουλάχιστον μία από αυτές. Η μεγαλύτερη ποικιλία παρατηρείται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ειδικότερα, στα ευβακτήρια εντοπίστηκαν και οι πέντε οδοί, αν και όχι όλες στον ίδιο οργανισμό, με τα περισσότερα να χρησιμοποιούν δύο έως τέσσερεις. Η παρουσία πολλών βιοχημικών οδών σύνθεσης της τρεχαλόζης αποτελεί ένδειξη της σημαντικότητας του διασακχαρίτη και της ανάγκης των οργανισμών αυτών να τον παράγουν σε πληθώρα εναλλασσόμενων συνθηκών, οι οποίες περιλαμβάνουν και τη μεταβολή στη διαθεσιμότητα των εκάστοτε υποστρωμάτων. Γονίδια ομόλογα του TS (*treS*) φαίνεται ότι υπάρχουν μόνο στα ευβακτήρια, ενώ το *treT* παρατηρήθηκε μόνο στα αρχαία και στο θερμόφιλο ευβακτήριο *Thermotoga maritima*, μεγάλο ποσοστό του γονιδιώματος του οποίου προέρχεται από τα Αρχαία μέσω οριζόντιας



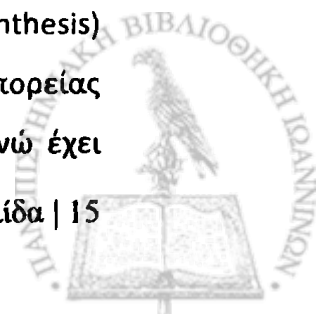
μεταφοράς γονιδίων. Σε μύκητες, φυτά και ασπόνδυλα παρατηρείται μόνο το μονοπάτι TPS/TPP. Κανένα από τα πέντε βιοσυνθετικά μονοπάτια δεν παρατηρείται στα σπονδυλωτά. Εντούτοις, ακόμα και σε αυτούς τους οργανισμούς έχει αναφερθεί η παρουσία της τρεχαλάσης (TreH), του καταβολικού ενζύμου της τρεχαλόζης, κυρίως στο πεπτικό σύστημα όπου προφανώς διασπά το δισακχαρίτη στα δύο μόρια γλυκόζης από τα οποία αποτελείται, ώστε αυτά να συμμετέχουν στο μεταβολισμό των κυττάρων (Avonice N., 2006).



Εικόνα 1.5: Συγκριτική ανάλυση του ποσοστού των γονιδιωμάτων στα οποία έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία και διαθέτουν τουλάχιστον μία βιοσυνθετική πορεία τρεχαλόζης. (Avonice N. et al., 2006).

1.3.1 Μονοπάτι TPS/TPP

Το μονοπάτι TPS/TPP είναι το πλέον διαδεδομένο στη φύση και το καλύτερα μελετημένο. Τα γονίδια της συνθάσης και της φωσφατάσης της τρεχαλόζης ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στο *E. coli* όπου συμμετέχουν στην ωσμωρύθμιση, γι' αυτό και ονομάστηκαν *otsA/B* (Osmotically regulated Trehalose Synthesis) (Kaasen I. et al., 1992). Η αρχική αντίδραση της βιοσυνθετικής αυτής πορείας περιγράφηκε για πρώτη φορά στη ζύμη (Cabib E. And L. Leloir, 1958), ενώ έχει



βρεθεί ότι πραγματοποιείται και σε πληθώρα άλλων οργανισμών. Η συνθάση της φωσφο-τρεχαλόζης των μελών του γένους *Streptomyces* χρησιμοποιούν GDP-γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλομάδων (Elbein A.D., 1968), ενώ το αντίστοιχο ένζυμο του *M. smegmatis* είναι το μόνο το οποίο δεν εμφανίζει εξειδίκευση σε κάποιο από τα φυσικά απαντώμενα νουκλεοτιδικά σάκχαρα της γλυκόζης (Lapp D. et al., 1971).

Τα γονίδια *otsA* και *otsB* κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1992 (Kaasen I. et al., 1992), ενώ τα αντίστοιχα γονίδια της ζύμης το 1993. Έχει αποδειχθεί ότι η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων αυτών σε στελέχη *E. coli* ή ζύμης, στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το φυσιολογικό γονίδιο της συνθάσης, αποκαθιστά εν μέρει την ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών αυτών σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν γλυκόζη και ανόργανα συστατικά (McDougall L., 1993). Αν και τα γονίδια της συνθάσης και της φωσφατάσης της φωσφορικής τρεχαλόζης έχουν χαρακτηριστεί στο *E. coli*, δεν υπάρχουν αντίστοιχα στοιχεία για τις ιδιότητες των αντίστοιχων πρωτεϊνών, πέραν της εξειδίκευσης της συνθάσης για την UDP-γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλομάδων (Giaever H.M. et al., 1988). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών που προκύπτουν από τα γονίδια της συνθάσης διαφόρων οργανισμών έχει καταδείξει την ύπαρξη συντηρημένων καταλοίπων αμινοξέων, σε συνδυασμό δε με στοιχεία από την τρισδιάστατη απεικόνιση της συνθάσης από το *E. coli* έχει δείχθει ότι όλες σχεδόν οι λειτουργικές συνθάσες έχουν παραπλήσια αμινοξική σύσταση στις περιοχές του μορίου που συμμετέχει στη σύνδεση των υποστρωμάτων και την καταλυτική εξειδίκευση. Η μόνη εξαίρεση παρατηρείται στο ένζυμο του *Oryza sativa*, το οποίο δε διαθέτει τη χαρακτηριστική διατηρημένη μορφή των αμινοξικών καταλοίπων. Παρόλα αυτά, στο ρύζι συσσωρεύεται τρεχαλόζη σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια ομόλογα των γονιδίων των άλλων βιοσυνθετικών μονοπατιών τρεχαλόζης (Avonice N. et al., 2006).

Στο *S. cerevisiae*, τα δύο ένζυμα της οδού συνυπάρχουν σε ένα σύμπλοκο μαζί με ακόμα δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Bell W. et al., 1998). Δεν είναι σαφές, για ποιο λόγο χρησιμοποιούν οι ζύμες αυτό το σύμπλοκο. Είναι πιθανό αυτό να σχετίζεται με τη ρύθμιση της σύνθεσης της τρεχαλόζης, ή με την αλληλεπίδραση των μεταβολισμών τρεχαλόζης και γλυκόζης που έχει παρατηρηθεί στις ζύμες (Noubhani A. et al., 2000). Δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνει αυτή



η αλληλεπίδραση. Τρεις είναι οι υποθέσεις που επιχειρούν να εξηγήσουν αυτή τη σχέση. Σύμφωνα με την πρώτη, είναι πιθανό η φωσφορική τρεχαλόζη να παρεμποδίζει την εισροή σακχάρων στη γλυκόλυση αναστέλλοντας τη δράση της εξωκινάσης (Blazquez M.A. et al., 1993). Μια δεύτερη εκδοχή είναι ότι το ρυθμιστικό μόριο που περιορίζει την εισροή γλυκόζης, αλληλεπιδρώντας με τις κινάσες σακχάρων του κυττάρου, είναι η συνθάση της φωσφορικής τρεχαλόζης (Thevelein J.M., 1992), ενώ η τρίτη ότι η σύνθεση τρεχαλόζης αποτρέπει την υπερβολική τροφοδότηση της γλυκόλυσης δεσμεύοντας τα μόρια γλυκόζης στο δισακχαρίτη (Hohmann S. et al., 1993). Αξιοσημείωτο είναι ότι στις ζύμες παρατηρείται και η παρουσία ποσότητας της συνθάσης η οποία δεν βρίσκεται συνδεδεμένη στο σύμπλοκο σύνθεσης τρεχαλόζης. Η ελεύθερη αυτή συνθάση ίσως να συμμετέχει στο μεταβολισμό της τρεχαλόζης με διαφορετικό τρόπο, ή μπορεί να εκδηλώνει ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της γλυκόλυσης.

1.3.2 Μονοπάτι TREY/TREZ

Η βιοσύνθεση τρεχαλόζης από μαλτο-ολιγοσακχαρίτες αν και λιγότερο διαδεδομένη στη φύση συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της. Παρατηρείται μόνο σε ευβακτήρια και αρχαία (Kim J. et al., 2000). Κατ' αυτήν, η τρεχαλόζη συντίθεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου που χρησιμοποιούν οι οργανισμοί αυτοί ως αποθηκευτικό μόριο. Σε αρχαιοβακτήρια του γένους *Sulfolobus* έχει απομονωθεί και ένα τρίτο ένζυμο που συμμετέχει στο μονοπάτι, το *TreX*, δράση του οποίου είναι η αποδιακλάδωση του γλυκογόνου με τη μετατροπή των γλυκοσιδικών δεσμών, ώστε στη συνέχεια να συντεθεί η τρεχαλόζη από τη συνδυασμένη δράση των γονιδίων *treY* και *treZ* (Maruta K. et al., 1996).

1.4 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ

Πέραν από τη σύνθεση τρεχαλόζης μέσω βιολογικών συστημάτων είναι δυνατή και η σύνθεσή της με χημικές μεθόδους. Μία από αυτές είναι η όξινη



αντιστροφή της γλυκόζης (Thompson A. et al., 1954), η μέθοδος χημικής παραγωγής τρεχαλόζης με προσθήκη οξειδίου του αιθυλενίου σε μίγμα 2,3,4,5-τετρα-Ο-ακετυλο-D-γλυκόζης και 3,4,6-τρι-Ο-ακετυλο1,2-ανυδρο-D-γλυκόζης (Lemieux R.U. and H.F. Bauer, 1954), η οποία οδηγεί επιπλέον και στη σύνθεση ενός ακόμα ανωμερούς της, της α,β-τρεχαλόζης (νεοτρεχαλόζη). Νεοτρεχαλόζη, καθώς και ένα δεύτερο ανωμερές της, η ισοτρεχαλόζη (β,β-τρεχαλόζη), μπορούν να συντεθούν χημικά και μέσω της αντίδρασης Koenigs-Knorr (Helfrich B. and K. Weis, 1956; Bredereck H. et al., 1953). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι χημικές μέθοδοι σύνθεσης τρεχαλόζης είναι ο μόνος τρόπος παραγωγής των δύο αυτών ανωμερών της τρεχαλόζης, αφού δεν έχει παρατηρηθεί η ύπαρξή τους σε ζωντανούς οργανισμούς, ενώ και όλες οι βιοσυνθετικές πορείες τρεχαλόζης οδηγούν στη σύνθεση αποκλειστικά και μόνο α,α-τρεχαλόζης.

1.5 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της τρεχαλόζης την καθιστούν ένα από τα πλέον σημαντικά προστατευτικά μόρια *in vivo* και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών βιομηχανικών κλάδων, που έχουν εντοπίσει στην τρεχαλόζη ένα ευέλικτο μόριο ικανό να συντηρεί τη δομή των μακρομορίων και ταυτόχρονα να διατηρεί τη λειτουργικότητά τους. Χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική για την συντήρηση ιστών και οργάνων που προορίζονται για μεταμόσχευση, ιδιαίτερα όταν απαιτούνται εκτεταμένες περίοδοι αποθήκευσης (>24h). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του διαλύματος "ET-Κυτο" το οποίο περιέχει τρεχαλόζη (E=extracellular-εξωκυττάριο, T=trehalose) (Hirata T. et al., 1993). Από τις νεότερες παραλλαγές του διαλύματος "ET-Κυτο" έχουν διευρυνθεί και τα είδη ιστού που μπορούν να διατηρηθούν, αλλά και ο χρόνος αποθήκευσης (Zhao X. et al., 2008). Σημαντικό στοιχείο του μηχανισμού δράσης της τρεχαλόζης σε αυτή την περίπτωση είναι η πιθανή συσσώρευσή της και στις δύο πλευρές των κυτταρικών μεμβρανών (Tunnacliffe A. et al., 2001), σύμφωνα με πειράματα στη ζύμη της αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*, όπου αντοχή έναντι στην ξηρασία παρατηρήθηκε μόνο αφού αυξήθηκε η συγκέντρωση της τρεχαλόζης τόσο στο εσωτερικό των κυττάρων

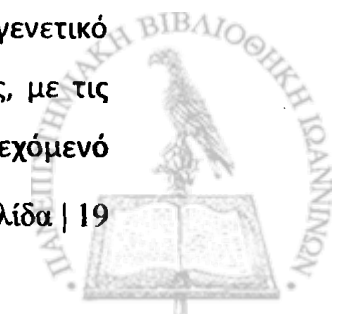


όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον τους (Coutinho C. et al., 1988; Eleutheria E.C.A. et al., 1993).

Η τρεχαλόζη έχει κερδίσει έδαφος στην εφαρμογή για τη σταθεροποίηση και διατήρηση εμβολίων και αντισωμάτων (Gibbon E.M. et al., 1996; Esteves M.I. et al., 2000). Οι μηχανισμοί σταθεροποίησης είναι οι ίδιοι που συναντώνται και στις περιπτώσεις βιολογικών μεμβρανών και πρωτεϊνών. Ξηρά διαγνωστικά τεστ μονοκλωνικών αντισωμάτων για την εύρεση της ομάδας αίματος περιέχουν μικροποσότητες τρεχαλόζης, ώστε να διατηρούν την αξιοπιστία τους ακόμα και μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου επ' αόριστον (Blakeley D. et al., 1990).

Τα τελευταία χρόνια και μετά από ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την παραγωγή της σε βιομηχανική κλίμακα (Schiraldi Ch. et al., 2002), η τρεχαλόζη χρησιμοποιείται και στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών. Σημαντικός παράγοντας σε αυτή την περίπτωση είναι η ικανότητα της τρεχαλόζης να συνδέεται με τις πρωτεΐνες, επομένως να διατηρεί τη διατροφική αξία των τροφίμων, ενώ χρησιμοποιείται και ως γλυκαντικό πρόσθετο προστατεύοντας ταυτόχρονα πρωτεΐνες και λιπίδια από οξείδωση, υψηλή θερμοκρασία και ψύξη (Kubota M. et al., 2004). Επίσης σταθεροποιεί τη δομή των ακόρεστων λιπαρών οξέων, ελαχιστοποιώντας τη διάσπασή τους σε μικρότερα μόρια, αποτρέποντας επιπλέον με αυτό τον τρόπο τη χαρακτηριστική οσμή που δημιουργείται από την ύπαρξη αυτών των μορίων. Αυτό το στοιχείο βρίσκει εφαρμογή και στη βιομηχανία καλλυντικών, όπως για παράδειγμα στην παρασκευή αποσμητικών που καλύπτουν τις χαρακτηριστικές οσμές του δέρματος και ειδικότερα αυτές που παρατηρούνται σε άτομα μεγαλύτερα από 55 ετών. Επίσης, χρησιμοποιείται και ως σταθεροποιητής λιποσωμάτων διατηρώντας την απαραίτητη υγρασία των σκευασμάτων αυτών (Higashiyama T., 2002).

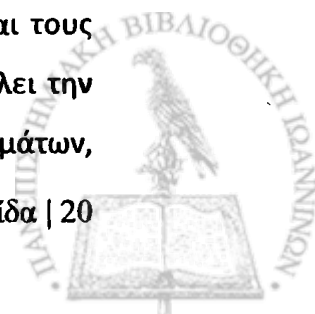
Άλλοι τομείς της βιομηχανίας τροφίμων στους οποίους χρησιμοποιείται η τρεχαλόζη είναι η αρτοποιία και η ζυθοποιία. Το γεγονός ότι η αύξηση του περιεχομένου σε τρεχαλόζη των ζυμών αυτών συνδέεται με την αντοχή στην ψύξη και αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης, έχει δώσει το έναυσμα για το γενετικό χειρισμό των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της τρεχαλόζης, με τις ζύμες της αρτοποιίας να έχουν βελτιωθεί γενετικά ως προς το μέγιστο περιεχόμενο



τους σε τρεχαλόζη, ώστε να χρησιμοποιούνται αποτελεσματικότερα στην παρασκευή κατεψυγμένου ζυμαριού (Nwaka S. and H. Holzer, 1997). Για τις αντίστοιχες ζύμες της ζυθοποιίας, η ολοένα αυξανόμενη αντοχή τους έναντι της αιθανόλης μπορεί να οδηγήσει σταδιακά στη χρήση τροποποιημένων στελεχών όχι μόνο στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και στην παραγωγή αιθανόλης ως εναλλακτική πηγή ενέργειας (Kim Y.H. et al., 1996).

Η τρεχαλόζη έχει βρει τα τελευταία χρόνια εφαρμογή και στη γεωργία με σκοπό την αύξηση της αντοχής των φυτών σε συνθήκες πίεσης όπως η ξηρασία, η χαμηλή θερμοκρασία και οι ωσμωτικές μεταβολές (Zhang H.X. et al., 2001). Σε αυτές τις συνθήκες τα φυτά συσσωρεύουν σάκχαρα και άλλες διαλυτές ουσίες, οι οποίες λειτουργούν προστατευτικά σταθεροποιώντας τη δομή των μακρομορίων. Μία από αυτές τις ουσίες είναι και η τρεχαλόζη. Πρόσφατα στοιχεία σχετικά με τη σύνθεση τρεχαλόζης σε διάφορα φυτικά είδη όπως το *Arabidopsis thaliana* αποτελούν ένδειξη ότι ίσως η σύνθεσή της στα φυτά είναι πολύ πιο διαδεδομένη απ' ό,τι πιστευόταν (Goddijn O.J. and K. Van Dun, 1999). Οι προσπάθειες εστιάζονται στην αύξηση της σύνθεσης της τρεχαλόζης μέσω της δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών που χρησιμοποιούνται εμπορικά. Τα αποτελέσματα των προσπαθειών αυτών είναι αμφιλεγόμενα, αφού σε κάποιες περιπτώσεις έχουν οδηγήσει σε ανεπιθύμητα πλειοτροπικά αποτελέσματα όπως μειωμένη ανάπτυξη και αλλοιωμένο μεταβολισμό (Romero C. et al., 1997). Τα πλέον ενθαρρυντικά αποτελέσματα προέρχονται από την ρυθμιζόμενη υπερέκφραση τρεχαλόζης στο ρύζι, με σημαντική αύξηση της αντοχής και παραγωγικότητας σε συνθήκες πίεσης, χωρίς σημαντικές συνέπειες στην ικανότητα αύξησης ή την απόδοση του φυτού.

Η τρεχαλόζη χρησιμοποιείται τελευταία και στην ιατρική για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών που οφείλονται σε διαμορφωτικές αλλαγές στην αναδίπλωση πρωτεϊνών. Η ασθένεια Huntington ήταν η πρώτη για την οποία αναφέρθηκε ο ευεργετικός ρόλος της τρεχαλόζης (Tanaka M.Y. et al., 2004). Η διαταραχή αυτή προκαλείται από μία ελαττωματική πρωτεΐνη με μία εκτεταμένη πολυγλουταμική περιοχή, εξαιτίας της οποίας επάγεται η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωσή της. Τα συσσωματώματα εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και τους πυρήνες των προσβεβλημένων κυττάρων. Η χορήγηση τρεχαλόζης αναστέλλει την επιβλαβή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και το σχηματισμό συσσωματωμάτων,

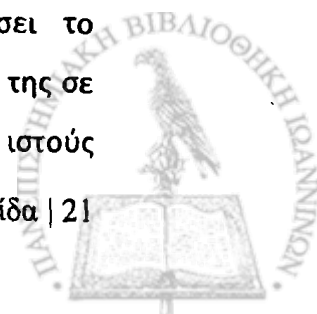


παρατείνοντας τη βιωσιμότητα των λειτουργικών κυττάρων, και επιβραδύνει την πορεία της νόσου και την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα η τρεχαλόζη είναι πλέον το βασικό συστατικό της φαρμακευτικής αγωγής κατά του Huntington (Nguyen H.M. et al., 2005). Η OPMD (Oculopharyngeal Muscular Dystrophy, οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία) είναι μία αυτοσωμική επικρατής μυοεκφυλιστική διαταραχή που παρουσιάζεται κατά την πέμπτη ή έκτη δεκαετία της ζωής του ατόμου. Προκαλείται από τη μη κανονική επέκταση μίας πολυαλανινικής περιοχής της πρωτεΐνης, η οποία προκαλεί στα κύτταρα μία παθολογική κατάσταση παρόμοια με αυτή της ασθένειας Huntington σχηματίζοντας συσσωματώματα. Η τρεχαλόζη επιβραδύνει την πορεία της νόσου, όπως έχει αποδειχτεί από πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια (Davies J.E. et al., 2006). Αντίστοιχη είναι η επίδραση της τρεχαλόζης και σε άλλες ασθένειες με παρόμοια κλινική εμφάνιση που οφείλονται σε ελαττωματική αναδίπλωση πρωτεϊνών, όπως η νόσος Alzheimer (Liu R. et al., 2005), η διαταραχή Creutzfeld-Jakob (Tatzelt J. et al., 1996) και η κυστική ίνωση (Brown C.R. et al., 1996).

Η δράση της τρεχαλόζης όμως δεν περιορίζεται μόνο σε ασθένειες που οφείλονται σε λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών. Έχει αναφερθεί η αντιμικροβιακή δράση της 6-αζιδο-6-δεοξυ-α,α'-τρεχαλόζης και της τρεχαλοζαμίνης (2-αμινο-2-δεοξυ-α-D-γλυκοκυρανοσυλ-α-D-γλυκοκυρανοζίτης), οι οποίες πιθανότατα παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό της τρεχαλόζης. Το γεγονός ότι η τρεχαλόζη αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος παθογόνων μικροοργανισμών την καθιστά πιθανό στόχο αντιμικροβιακών φαρμάκων. Επίσης η ικανότητα της τρεχαλόζης να σταθεροποιεί τα ακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκει εφαρμογή στη διατήρηση της δομής των οστών, καταστέλλοντας πιθανόν την εμφάνιση της οστεοπόρωσης, όπως φαίνεται από πειράματα σε ποντίκια (Arai C. et al., 2001).

1.6 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ

Το μεγάλο εύρος εφαρμογών της τρεχαλόζης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον για την εύρεση αξιόπιστης και αποδοτικής μεθόδου παραγωγής της σε βιομηχανική κλίμακα. Η πρώτη απόπειρα έγινε με τον καθαρισμό της από ιστούς



φυτικής και μυκητιακής προέλευσης με μία σειρά χημικών αντιδράσεων που περιλαμβάνει ανόργανα, κυρίως αντιδραστήρια. Το κόστος αυτής της διαδικασίας ήταν μεγάλο και δεν ευνοούσε τη χρήση του δισακχαρίτη στη βιομηχανία τροφίμων (Birch G.G., 1963). Για αυτό έγιναν προσπάθειες για την ανάπτυξη οικονομικότερης μεθόδου. Έτσι, προέκυψαν αρκετές διαδικασίες παραγωγής τρεχαλόζης, όπως η ζυμωτική υπερπαραγωγή της από κύτταρα ζύμης, μία ενζυματική *in situ* σύνθεση τρεχαλόζης από UDP-γλυκόζη (Haynie S. and G. Whitesides, 1990) σε περιβάλλον ελεύθερο κυττάρων, καθώς και μέσω της χρήσης διαγονιδιακών φυτών (Londesborough J. et al., 2000; Lebel E.G. et al., 2004). Η πλέον πετυχημένη προσέγγιση όμως είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τα εργαστήρια Hayashibara (Σχήμα 1.6.1). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αποικοδόμηση του αμύλου από τα ένζυμα MTSase και MTHase του *Arthrobacter sp.* Q36, τα οποία είναι ομόλογα των προϊόντων των γονιδίων *treY* και *treZ* (Kubota et al., 2004). Αν και η μέθοδος αυτή είχε μεγάλη απόδοση όσον αφορά τη σύνθεση τρεχαλόζης, τα παραπάνω ένζυμα παρουσίαζαν μειωμένη σταθερότητα στους 55° C που είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη διαδικασία αυτή. Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με τη χρήση των αντίστοιχων, σταθερότερων ενζύμων που απομονώθηκαν από το *Arthrobacter ramosus* S34 (Yamamoto T. et al., 2001). Επιπλέον περιορισμός του κόστους παραγωγής τρεχαλόζης έχει επιτευχθεί με τη χρήση φθηνών πρώτων υλών όπως άμυλο από καλαμπόκι. Ο συνδυασμός όλων αυτών των παραγόντων έχει μειώσει το κόστος παραγωγής τρεχαλόζης περίπου στο ένα εκατοστό του αρχικού (από >200\$/kg σε <3\$/kg). Αυτή η μείωση του κόστους έχει ανοίξει το δρόμο για τη χρήση της τρεχαλόζης στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών (Kubota M. et al., 2004).

ΑΜΥΛΟ



Θερμοσταθερή α-αμυλάση

ΥΓΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΑΜΥΛΟ

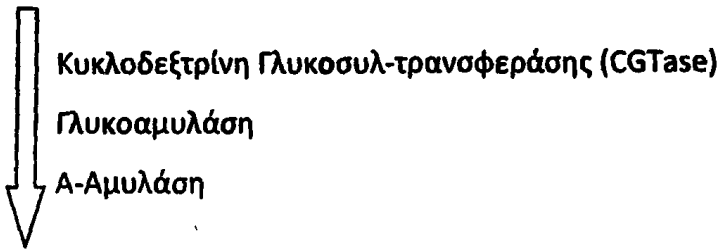


Ισοαμυλάση

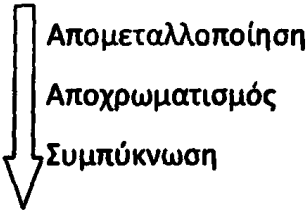
Συνθάση της Μαλτο-ολιγοσυλτρεχαλόζης (MTSase)

Τρεχαλοϋδρολάση της Μαλτο-ολιγοσυλτρεχαλόζης (MTHase)

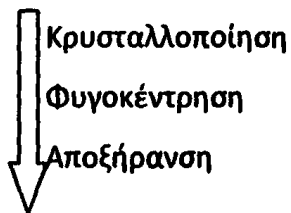




ΣΑΚΧΑΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΔΙΑΛΥΜΑ



ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (περισσότερο από 85% απόδοση)



ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ (άνυδροι κρύσταλλοι 98% καθαρότητας)

Εικόνα 1.6: Βιομηχανική ενζυμική παραγωγή α,α-τρεχαλόζης, όπως αναπτύχθηκε από τα Hayashibara Biochemical Laboratories (Higashiyama, 2002).

1.7 ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.7.1 Γενικά

Τα κορυνοβακτήρια είναι Gram θετικά, ασποριογενή, πλειομορφικά βακτήρια και συνιστούν τον υποτομέα των Gram θετικών ευβακτηρίων, τους Ακτινομύκητες, σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA. Περιλαμβάνουν φυτοπαθογόνα και ζωοπαθογόνα στελέχη, αλλά και εδαφικά μη παθογόνα βακτήρια, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για



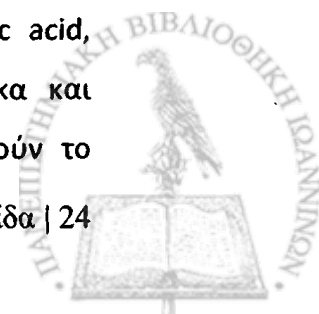
την παραγωγή αμινοξέων και απορρυπαντικών καθώς και στη βιομετατροπή στεροειδών.

Στο παρελθόν είχε καταχωρηθεί στο γένος των κορυνοβακτηρίων ένας αριθμός οργανισμών βάσει μορφολογικών κριτηρίων. Αυτό οδήγησε σε μία ομάδα οργανισμών με μικρή ομοιογένεια. Για το λόγο αυτό, στην ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκαν δείκτες όπως η ανάλυση των μυκολικών οξέων, η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA. Αυτά τα κριτήρια έχουν δώσει σαφέστερη εικόνα σχετικά με τη ταξινόμηση των κορυνοβακτηρίων, αν και το γένος παραμένει ένα από τα πλέον ποικιλόμορφα και ανομοιογενή.

Τα μη παθογόνα στελέχη μπορούν να απομονωθούν από διάφορα ενδιαυτήματα, όπως είναι το έδαφος, το νερό, οι φυτικοί ιστοί και τα ζώα. Τα περισσότερα αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε θερμοκρασία 30 °C και σε θρεπτικό μέσο με βάση την πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, γενικότερα όμως έχουν εξειδικευμένες θρεπτικές απαιτήσεις. Τα στελέχη μπορούν να διατηρηθούν σε τρυβλία με άγαρ στους 4 °C για 4-6 εβδομάδες.

Τα κορυνοβακτήρια έχουν σχήμα ράβδου, οβάλ ή σε μερικές περιπτώσεις V. Μορφολογικές διαφορές όμως εμφανίζονται ανάλογα με το μέσο και το χρόνο ανάπτυξης. Ο μέχρι πρότινος όρος προσδιορισμού των κορυνοβακτηρίων ως κορυνόμορφα, λόγω του σχήματος κορύνας των βακτηρίων, έχει πάψει να είναι κατάλληλος για τον προσδιορισμό τους, καθώς είναι πλέον ταξινομικά μη ικανοποιητικός και γίνεται δεκτός μόνο για αναφορά ως προς τη μορφολογία βακτηρίων (Rogosa M. et al., 1974).

Εξαιτίας των σημαντικών διαφορών στη μορφολογία των κυττάρων ανάλογα με τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης, η πρώτη αδρή ταυτοποίηση, αν και χρήσιμη είναι συνήθως αναξιόπιστη. Τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν το γένος αυτό, βάσει των οποίων μπορεί να ταυτοποιηθεί μια καλλιέργεια βακτηρίων ως κορυνοβακτήρια, είναι η προαιρετικά αναερόβια ή και σε μερικά στελέχη αερόβια απαίτηση προς οξυγόνο, κορυνόμορφη μορφολογία, κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν γαλακτόζη, αραβινόζη και meso-A₂pm (2,6-diaminoheptanedioic acid, C₇H₁₄N₂O₄), μικρές αλυσίδες μυκολικών οξέων με 22-36 άτομα άνθρακα και περιεχόμενο GC στο DNA τους 51-65 mol%. Τα μυκολικά οξέα αποτελούν το



σημαντικότερο ίσως δείκτη που διαχωρίζει τα κορυνοβακτήρια από άλλα γένη. Διαφοροποίηση σε επίπεδο είδους παρατηρείται από χαρακτηριστικά όπως η ικανότητα υδρόλυσης αμύλου, η παρουσία ουρεάσης, η μετατροπή νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη και το εύρος των σακχάρων από τα οποία μπορούν να συνθέσουν γλουταμινικό οξύ.

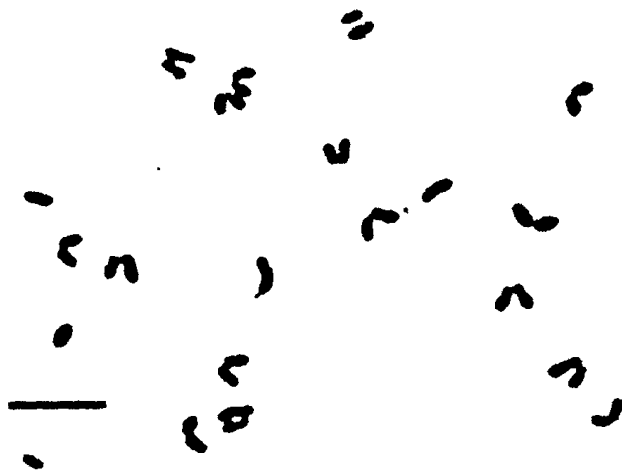
Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό στοιχείο της μορφολογίας των κορυνοβακτηρίων είναι ότι σύγχρονες μελέτες του κυτταρικού τοιχώματός τους δείχνουν ομοιότητες στη δομή και την αρχιτεκτονική του με αντίστοιχα Gram-αρνητικών βακτηρίων, αν και με σαφείς διαφορές στη μοριακή σύστασή του. Υπάρχουν ενδείξεις ότι σχηματίζεται μια κλειστή εξωτερική μεμβράνη από ομοιοπολικά συνδεδεμένα και ελεύθερα μυκολικά οξέα, καθώς και φωσφολιπίδια. Η ύπαρξη μιας τέτοιας μεμβράνης εξηγεί και την περιορισμένη έκκριση πρωτεϊνών που παρατηρείται στα κορυνοβακτήρια.

1.7.2 Εφαρμογές

Τα εδαφικά μη παθογόνα κορυνοβακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή αμινοξέων αλλά και στην αποικοδόμηση παραφινών, την παραγωγή απορρυπαντικών και τη μετατροπή στεροειδών.

Το *Corynebacterium glutamicum*, μη παθογόνο κορυνοβακτήριο απομονώθηκε μεταξύ άλλων βακτηρίων τη δεκαετία του 1950 στην Ιαπωνία στα πλαίσια εντοπισμού ειδών με αυξημένη παραγωγή γλουταμινικού οξέος. (Kinoshita S. and K. Nakayama, 1978).





Εικόνα 1.8: Κύτταρα *Corynebacterium glutamicum*

Το *Corynebacterium glutamicum* χρησιμοποιείται εκτενώς στη ζυμωτική παραγωγή αμινοξέων, κυρίως γλουταμινικού οξέος και λυσίνης, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικά γεύσης. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια για την παραγωγή των συγκεκριμένων αμινοξέων είναι τα ίδια με αυτά που παρατηρούνται σε άλλους οργανισμούς (Leuchtenbrger W., 1996). Εντούτοις, τα κορυνοβακτήρια εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα γλουταμινικού οξέος στο μέσο ανάπτυξης υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Συγκεκριμένα, η έκκριση του γλουταμινικού συμβαδίζει με μεταβολές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ σε βιομηχανική κλίμακα επάγεται με την ανάπτυξη σε μέσα φτωχά σε βιοτίνη. Το *C. glutamicum* παρουσιάζει αυξοτροφία στη βιοτίνη, καθώς είναι από τα ελάχιστα απαραίτητα κυτταρικά συστατικά που αδυνατεί να συνθέσει, σύμφωνα με μελέτες γονιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό της, αλλά και από την αδυναμία να ταυτοποιηθεί γονίδιο ομόλογο του *bioF* στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος του στελέχους *C. glutamicum* ATCC 13032 (Hatakeyama K. et al., 1993a, 1993b), (Kalinowski J. et al., 2003). Η έλλειψη βιοτίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επάγει τις απαραίτητες μεταβολές του κυτταρικού τοιχώματος που συνδέονται άμεσα με την έκκριση υψηλής ποσότητας γλουταμινικού, αν και δεν είναι σαφής ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό. Όταν το υπόστρωμα της ζύμωσης είναι πλούσιο σε βιοτίνη, χρησιμοποιούνται διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο πενικιλίνης ή παραγώγων λιπαρών οξέων κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων.

Σε αντίθεση με την υπερπαραγωγή γλουταμινικού οξέος που βασίζεται σε μεταβολές των κρίσιμων παραμέτρων ανάπτυξης, η υπερπαραγωγή λυσίνης βασίζεται σε καθαρά βιοχημική προσαρμογή των βακτηρίων, και πιο συγκεκριμένα στην απλότητα του συστήματος ρύθμισης του διακλαδιζόμενου μονοπατιού που οδηγεί στη παραγωγή λυσίνης, μεθειονίνης, θρεονίνης και ισολευκίνης (Sahm H. et al., 2000). Για το λόγο αυτό, για την παραγωγή λυσίνης σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιούνται μεταλλαγμένα ή γενετικά τροποποιημένα στελέχη.

Εκτός όμως από αυτά τα δύο αμινοξέα έχουν κατασκευαστεί ή απομονωθεί στελέχη ικανά για υπερπαραγωγή και άλλων αμινοξέων. Συνήθως αυτό βασιζόταν σε επαναλαμβανόμενους κύκλους μεταλλαξιγένεσης και επιλογής (Rowlands R.T, 1984), αλλά τα τελευταία χρόνια υπάρχει ενδιαφέρον για την βελτίωση της αποδοτικότητας των κορυνοβακτηρίων με τεχνικές της γενετικής μηχανικής (Sahm H. et al., 1995). Σε αυτό τον τομέα έχει βοηθήσει ιδιαίτερα η εύρεση της πλήρους αλληλουχίας του *C. glutamicum* ATCC 13032 αλλά και η ανάπτυξη ευέλικτων συστημάτων κλωνοποίησης και φορέων από φυσικά κρυπτικά πλασμίδια των κορυνοβακτηρίων και κάποιους φάγους. Τα περισσότερα γονίδια τα οποία χρησιμοποιούνται προς αυτή την κατεύθυνση είναι ομόλογα γονίδια που συμμετέχουν στις βιοσυνθετικές πορείες παραγωγής αμινοξέων, με απώτερο σκοπό την αύξηση της ενεργότητάς τους. Εφαρμογή βρίσκουν όμως και ετερόλογα συστήματα έκφρασης που αναγνωρίζονται και λειτουργούν στα κορυνοβακτήρια, όπως το οπερόνιο της λακτόζης του *E. coli*.

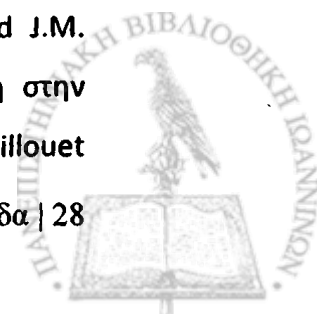
Το *Brevibacterium lactofermentum* είναι ένα είδος στο οποίο η συστηματική ταξινόμηση δεν έχει ολοκληρωθεί. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδεικνύουν, αν όχι ταυτοποίηση, πολύ στενή σχέση με το *C. glutamicum* και λιγότερη με το γένος *Brevibacterium* (Abe S. et al., 1967; Suzuki et al., 1981; Minnikin et al., 1978). Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε την δεκαετία του 1950 στην Ιαπωνία κατά τον εντοπισμό και εξερεύνηση βακτηρίων για εύρεση ειδών με αυξημένη παραγωγή γλουταμινικού οξέος όπου απομονώθηκε και το *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita S. and K. Nakayama, 1978).



1.7.3 Κορυνοβακτήρια και τρεχαλόζη

Στα βακτήρια του γένους των κορυνοβακτηρίων η τρεχαλόζη αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του ιδιότυπου κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αυτών. Το μεγαλύτερο τμήμα των ελεύθερων λιπιδίων του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από δύο εστέρες κορυνομυκολικών οξέων που περιέχουν τρεχαλόζη, την μονοκορυνομυκολική και την δικορυνομυκολική τρεχαλόζη (Puech V. et al., 2000). Εκτός όμως από την παρουσία της στο κυτταρικό τοίχωμα η τρεχαλόζη διαδραματίζει και ρόλο μεταβολίτη απόκρισης στην περιβαλλοντική πίεση στα κορυνοβακτήρια και ειδικότερα στο *Corynebacterium glutamicum*. Σημαντικά ποσά τρεχαλόζης παρατηρούνται στο κυτοσόλιο των βακτηρίων ως απόκριση στην υπερωσμωτική πίεση και ο διασακχαρίτης αποκτά κυρίαρχο ρόλο στη προστασία του κυττάρου όταν το άζωτο είναι περιορισμένο ή μη διαθέσιμο (Skjerdal O.T. et al., 1996). Η τρεχαλόζη είναι επίσης ένα από τα παραπροϊόντα της υπερπαραγωγής λυσίνης (Vallino J.J. and G. Stephanopoulos, 1993).

Η ανάλυση του γονιδιώματος του *C. glutamicum* ATCC 13032 αποκάλυψε την ύπαρξη γονιδίων για τα ένζυμα και των τριών κύριων βιοσυνθετικών οδών της τρεχαλόζης (OtsAB, TreYZ, TreS). Ο λόγος που το *C. glutamicum* διαθέτει τόσο εκτεταμένο δίκτυο γονιδίων σχετικά με τη σύνθεση τρεχαλόζης δεν είναι σαφής. Το μεγαλύτερο ποσοστό της περιεχόμενης τρεχαλόζης προέρχεται από τη δράση του μονοπατιού TreY/TreZ, ενώ είναι αξιοπρόσεκτο το γεγονός ότι ακόμα και κάτω από συνθήκες υπερωσμωτικής πίεσης, η τρεχαλόζη παράγεται από το μονοπάτι TreY/TreZ, σε αντίθεση με πλήθος άλλων μελετημένων οργανισμών στους οποίους κυρίαρχη βιοσυνθετική οδός σε τέτοιες περιπτώσεις είναι αυτή των γονιδίων *otsA/otsB*. Το *C. glutamicum* είναι ο πρώτος οργανισμός στον οποίο το μονοπάτι TreY/TreZ εμπλέκεται στην ωσμωρύθμιση (Wolf A. et al., 2003). Αυτή είναι ίσως μία ευφυής προσαρμογή των βακτηρίων αυτών αφού οι μαλτοδεξτρίνες είναι άμεσα διαθέσιμες στο κύτταρο σε κάθε φάση της κυτταρικής ανάπτυξης και για την πλήρη αποδοτικότητα της οδού δεν απαιτείται κάποιος μηχανισμός πρόσληψης, ο οποίος είναι πιθανό να υπολειτουργεί υπό συνθήκες υπερωσμωτικού σοκ (Wood J.M., 1999). Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι αν και η τρεχαλόζη είναι σημαντική στην ωσμωρύθμιση, το κυρίαρχο μόριο για αυτή τη λειτουργία είναι η-προλίνη (Guillouet

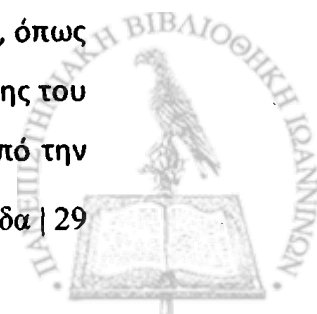


S. and J.M. Engasser, 1995), ενώ η τρεχαλόζη αναλαμβάνει αυτό το ρόλο μόνο σε περιπτώσεις που το υπερωσμωτικό σοκ συνδυάζεται και με έλλειψη άμεσα προσβάσιμης πηγής αζώτου. Αυτό το φαινόμενο είναι πιθανόν αρκετά συχνό στο ιδιαίτερο ενδιαίτημα των εδαφοβακτηρίων αυτών όπου συχνά παρατηρούνται ελλείψεις θρεπτικών συστατικών (Wolf A. et al., 2003).

Καθώς το μονοπάτι TreY/TreZ φαίνεται να είναι επαρκές για τη σύνθεση τρεχαλόζης σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη των τριών διακριτών οδών σύνθεσης τρεχαλόζης αποτελεί αίνιγμα. Το μονοπάτι TreS φαίνεται ότι τελικά στο *C. glutamicum* δε συμμετέχει στη σύνθεση της τρεχαλόζης, παρά μόνο όταν η ο οργανισμός αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη μαλτόζη, αλλά στην αντίθετη αντίδραση αποικοδόμησής της (De Smet K.A. et al., 2000). Τα πειραματικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία, είναι (1) δεν έχει αναγνωριστεί ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ομόλογο με τα γνωστά γονίδια τρεχαλάσης στο *C. glutamicum*, (2) η απαλοιφή του γονιδίου *treS* από το γονιδίωμα του *C. glutamicum* οδηγεί σε αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης της τρεχαλόζης, (3) το μεταγράφημα του *treS* ανιχνεύεται ανεξάρτητα από τη σύνθεση τρεχαλόζης από το μονοπάτι TreS και (4) δεν παρατηρείται αποικοδομητική δραστηριότητα τρεχαλόζης σε στελέχη με απενεργοποιημένο γονίδιο *treS* (Wolf A. et al., 2003).

Όλα τα παραπάνω, καθώς και το γεγονός ότι κύτταρα με ανενεργό γονίδιο *treS* παρουσιάζουν εκτεταμένη φάση προσαρμογής μετά την πάροδο του υπερωσμωτικού σοκ και μέχρι τα ποσά τρεχαλόζης να μειωθούν σε φυσιολογικά επίπεδα (Wolf A. et al., 2003), συνηγορούν ότι στο *C. glutamicum* η ισορροπία του μονοπατιού TreS ευνοεί τη μετατροπή τρεχαλόζης προς μαλτόζη, η συγκέντρωση της οποίας είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες χίλιες περίπου φορές μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση τρεχαλόζης. Το φαινόμενο της αδυναμίας ανάληψης μετά από αβιοτικά σοκ έχει παρατηρηθεί και σε κύτταρα ζύμης με ελαττωματική τρεχαλάση (Nwaka S. et al., 1995a; Nwaka S. et al., 1995b).

Ο ρόλος της μεταβολικής οδού OtsA/OtsB στο *C. glutamicum* αποτελεί επίσης αίνιγμα, με δεδομένο το ότι δε συμμετέχει ενεργά στην ωσμωρύθμιση, όπως συμβαίνει στην πλειοψηφία των οργανισμών. Παρατηρείται αύξηση της δράσης του μονοπατιού σε συνθήκες ωσμωτικού σοκ αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό από την

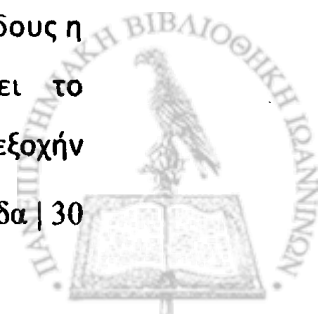


αντίστοιχη ενεργοποίηση του μονοπατιού TreY/TreZ (Wolf A. et al., 2003). Έχει προταθεί ότι η οδός OtsA/OtsB είναι αυτή που παρέχει την απαραίτητη τρεχαλόζη για τον σχηματισμό των εστέρων των κορυνομυκολικών οξέων που απαρτίζουν το κυτταρικό τοίχωμα των κορυνοβακτηρίων. Εντούτοις, σε στελέχη που είχαν υποστεί αποσιώπηση των γονιδίων της οδού OtsA/OtsB το κυτταρικό τοίχωμα περιείχε μυκολικά οξέα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 75% του φυσιολογικού. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το μονοπάτι OtsA/OtsB πράγματι διαθέτει ρόλο στη σύνθεση των τρεχαλομυκολικών οξέων, αλλά η δράση του μπορεί να υποκατασταθεί από τη δράση των άλλων οδών σύνθεσης τρεχαλόζης (Shikamata T. and Y. Minatagawa, 2000). Είναι πιθανό η συγκεκριμένη οδός να συμμετέχει σε προσαρμογές σε ωσμωτική πίεση, όταν αυτή συνδυάζεται με συνθήκες έλλειψης πηγών άνθρακα (Wolf A. et al., 2003).

Ο περίπλοκος μεταβολισμός και μηχανισμός σύνθεσης τρεχαλόζης που παρατηρείται στο *C. glutamicum*, καθώς και η ανάπτυξη εργαλείων μεταβολικής μηχανικής για το σχεδιασμό μικροοργανισμών για αποδοτικότερη παραγωγή μεταβολιτών, έχει ελκύσει ενδιαφέρον στη χρήση του *C. glutamicum* ως εναλλακτικής λύσης για την παραγωγή τρεχαλόζης σε βιομηχανική κλίμακα, για τρεις κυρίως λόγους:

- (1) παράγει και εκκρίνει τρεχαλόζη (Gourdon P. and N.D. Lindley, 1999)
- (2) έχει απλή μεταβολική δομή σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς (Eggeling E. et al., 1996)
- (3) χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανικές, βιοτεχνολογικές διεργασίες (Eggeling E. et al., 1996).

Αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να επιτευχθεί αποδοτικός σχηματισμός και έκκριση τρεχαλόζης από *C. glutamicum*, σε μία προσπάθεια αντικατάστασης της μεθόδου των εργαστηρίων Hayashibara, η οποία είναι η πλέον αποδοτική μέθοδος παρασκευής τρεχαλόζης σε βιομηχανική κλίμακα. Δύο από αυτές είναι η ομόλογη υπερέκφραση των γονιδίων του μονοπατιού TreY/TreZ (Carpinelli J. et al., 2006) και η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων *otsA* και *otsB* του *E. coli* (Padilla L. et al., 2004). Και με τις δύο μεθόδους η παραγωγή τρεχαλόζης πολλαπλασιάστηκε. Η πρώτη προσέγγιση έχει το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιεί την οδό που είναι φυσιολογικά η κατεχοχόν



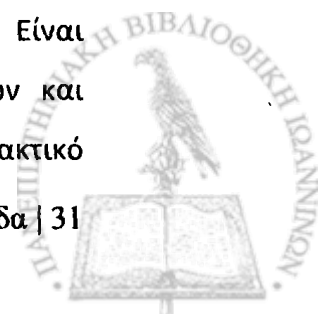
συνθετική πορεία τρεχαλόζης στο *C. glutamicum*, καθώς και το γεγονός ότι το υπόστρωμα είναι ένα άμεσα προσβάσιμο και σε αφθονία κυτταρικό συστατικό των βακτηρίων. Η δεύτερη προσέγγιση έχει τη δυνατότητα να υπεκφεύγει του ρυθμιστικού συστήματος των κορυνοβακτηρίων και είναι πιθανό να αποδειχθεί μακροπρόθεσμα αποδοτικότερη από την ομόλογη υπερέκφραση γονιδίων. Σε κάθε περίπτωση οι έρευνες σε αυτό τον τομέα συνεχίζονται και τα αποτελέσματα μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη βιομηχανική παραγωγή τρεχαλόζης και κατ' επέκταση σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας με δεδομένο το μεγάλο εύρος εφαρμογών του ασυνήθιστου αυτού δισακχαρίτη (Carpinelli J. et al., 2006; Padilla L. et al., 2004).

1.8 TO ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Xanthomonas campestris*

Το *Xanthomonas campestris* είναι ένα Gram αρνητικό, φυτοπαθογόνο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonaceae*. Στην οικογένεια αυτή, τα βακτήρια αποτελούν μεγάλο τμήμα της μικροπανίδας των ελευθερόβιων σαπρόφυτων του εδάφους, του νερού, του θαλάσσιου περιβάλλοντος, ενώ μπορούν να βρεθούν και σε φυτά ή ζώα ως φορείς ασθενειών.

Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων της οικογένειας *Pseudomonaceae* είναι το ραβδόμορφο σχήμα των κυττάρων, ευθύ ή ελαφρώς κυρτό από τη μία πλευρά, η ύπαρξη πολικού μαστιγίου, η Gram αρνητική αντίδραση χρώσης και η απουσία σπορίων (Balows A., 1992).

Τα βακτήρια του γένους *Xanthomonas* είναι ραβδόμορφα, συνήθως μεγέθους από 0,4-0,7 έως 0,7-1,8μm, κυρίως απλά. Δεν παράγουν πολύ-β-υδροξυβουτυρικά έγκλειστα. Η κίνηση γίνεται με απλό πολικό μαστίγιο. Είναι αερόβια με αυστηρά αναπνευστικού τύπου μεταβολισμό. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 25-30°C (ελάχιστη > 5°C και μέγιστη μεταξύ 30 - 39°C). Οι αποικίες είναι συνήθως κίτρινες, λείες και κολλώδεις. Είναι οξειδωτικά αρνητικά ή ελάχιστα θετικά. Διαθέτουν το ένζυμο κατάλυσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι χημειότροφα με ικανότητα να χρησιμοποιούν ποικιλία υδρογονανθράκων και αλάτων οργανικών οξέων ως πηγή άνθρακα. Αναπτύσσονται σε γαλακτικό

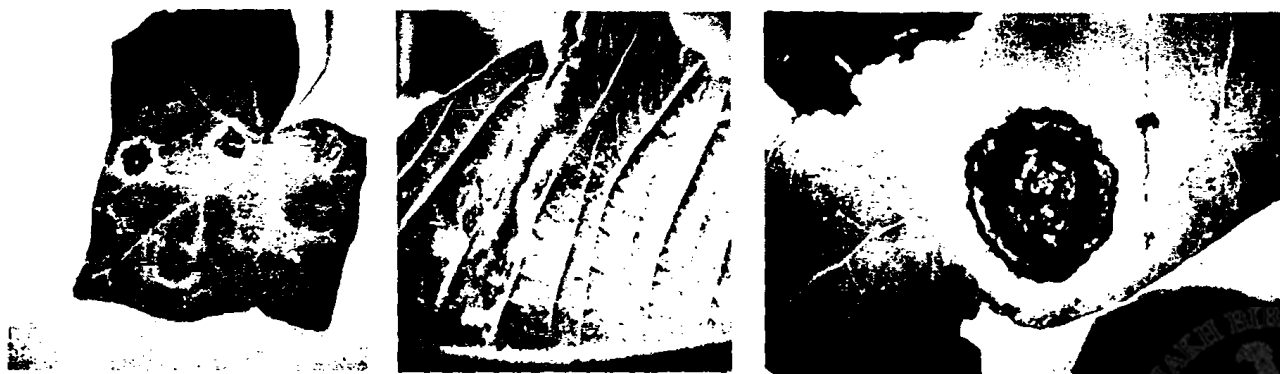


ασβέστιο, αλλά όχι σε γλουταμίνη. Οι παράγοντες ανάπτυξης που συνήθως απαιτούνται περιλαμβάνουν μεθειονίνη, γλουταμινικό οξύ, νικοτινικό οξύ ή συνδυασμό αυτών. Είναι φυτοπαθογόνα. Το επί τοις εκατό ποσοστό G-C στο DNA είναι 63-71 (Wilkins W., Baltimore). Οι ρυθμοί ανάπτυξης ποικίλουν στο γένος των *Xanthomonas*, με το στέλεχος *X. campestris* να εμφανίζει την ταχύτερη ανάπτυξη.



Εικόνα 1.9: Το βακτήριο *Xanthomonas campestris*

Το *Xanthomonas campestris* είναι ένα από τα πιο σημαντικά φυτοπαθογόνα βακτήρια. Συγκεκριμένα, προκαλεί την ασθένεια των μαύρων κηλίδων αποσύνθεσης των φυτών γένους *cruciferae* (σταυρανθή) και είναι υπεύθυνο για τη μεγάλη απώλειά τους παγκοσμίως (Qihong S. et al., 2003).

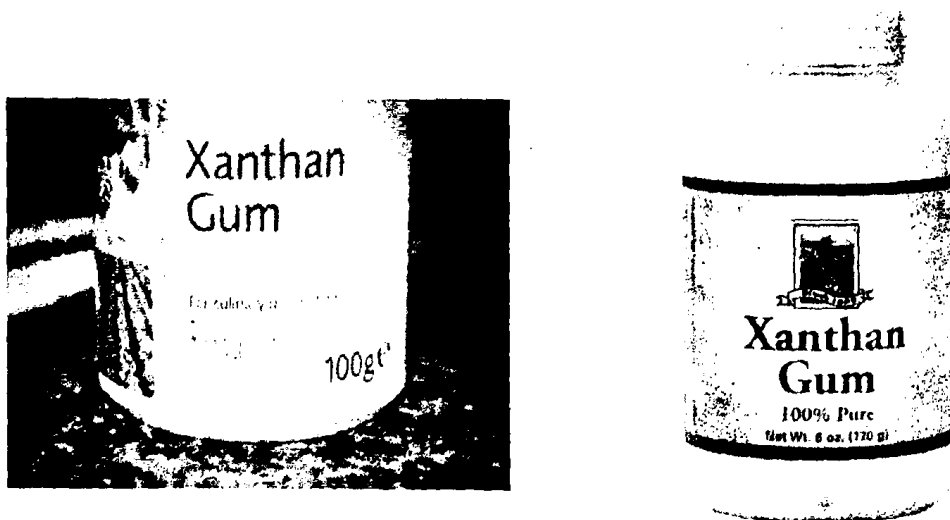


Εικόνα 1.10: Η ασθένεια των μαύρων κηλίδων αποσύνθεσης

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του *Xanthomonas campestris* είναι ότι παράγει την ξανθάνη, έναν εξωκυτταρικό πολυσακχαρίτη με πλήθος εφαρμογών. Η ξανθάνη παράγεται στη στατική φάση ανάπτυξης περίπου μετά από 36 ώρες, με μέγιστη απόδοση στις 72 ώρες, και εκκρίνεται εξωκυττάρια, με αποτέλεσμα το υγρό της καλλιέργειας να παρουσιάζει υψηλό ιξώδες. Για την βιομηχανική της παραγωγή σημαντικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία ανάπτυξης (28°C), το βέλτιστο pH (6.8-7.0), η σχετικά έντονη ανάδευση και η επαρκής οξυγόνωση της καλλιέργειας.

Η ξανθάνη χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητής σε τρόφιμα που η δομή τους είναι δυνατόν να αλλοιωθεί κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος, ως γαλακτωματοποιητής σε τρόφιμα, ως πρόσθετο βελτίωσης της υφής και της γεύσης, καθώς και σε προϊόντα διαίτης, επειδή δε μεταβολίζεται από τον ανθρώπινο οργανισμό. (Robbins DJ. et al., 1964). Επίσης, αποτελεί μέσο αιώρησης σωματιδίων και σταθεροποιητή για γαλακτώματα (Walker RE, 1966).

Η ξανθάνη βρίσκει ακόμα εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων, στην εξόρυξη πετρελαίου, στην παρασκευή απορρυπαντικών, εκρηκτικών υλών, φυτοφαρμάκων, στην επικάλυψη πυρίμαχων σκευών, στην παρασκευή σε στιλβώσεις κεραμικών προϊόντων, σε φωτογραφικά διαλύματα κ.ά.



Εικόνα 1.11: Εμπορικά σκευάσματα ξανθάνης (xanthan gum)

Σε αντιδιαστολή προς τις φυτοπαθογόνες του ιδιότητες, το *Xanthomonas campestris* παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα ως προς τη βιοτεχνολογική του

αξιοποίηση. Έχει μελετηθεί η παραγωγή της ξανθάνης σε πιλοτικούς βιοαντιδραστήρες από υποστρώματα που αποτελούν την πηγή άνθρακα και προέρχονται από παραπροϊόντα βιομηχανιών, όπως η μελάσα και το τυρόγαλα, και έχει βρεθεί πολύ αποδοτική (Afendra A.S. et al., 2002). Επιπλέον, το *X. campestris* έχει αποδειχθεί πολύ καλός δέκτης για τη μεταφορά και έκφραση ετερόλογων γονιδίων σε αυτό, όπως το γονίδιο παγοπυρήνωσης *inaZ* του *Pseudomonas syringae* (Afendra A.S. et al., 2002), το γονίδιο της α-αμυλάσης του υπερθερμόφιλου αρχαίου *Purococcus woesei* (Konsoula Z. et al., 2008) και το *gfp* του *Aequorea victoria* [Baveli & Afendra, unpublished results].

Επομένως, η γενετική βελτίωση αυτού του μικροοργανισμού θα μπορούσε να προσφέρει μια προοπτική για ταυτόχρονη παραγωγή δύο προϊόντων (π.χ. ξανθάνης και πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης (*inaZ*), ξανθάνης και α-αμυλάσης) από υπόστρωμα βιομηχανικών αποβλήτων, προοπτική που παρουσιάζει τόσο οικονομικά, όσο και οικολογικά οφέλη, εφόσον θα συνεισέφερε στην επίλυση του προβλήματος διάθεσης παραπροϊόντων που αποτελούν σημαντική αιτία περιβαλλοντικής ρύπανσης.

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η τρεχαλόζη είναι ένας δισακχαρίτης με ιδιαίτερα σημαντικές ιδιότητες που αφορούν την προστασία του βιολογικού υλικού από συνθήκες καταπόνησης, όπως ξηρασία, θερμοκρασία, κ. ά. Επομένως οι εφαρμογές της στη βιομηχανία, αλλά κυρίως την ιατρική, έχουν ιδιαίτερη σημασία και αξίζει να διερευνηθούν. Η παραγωγή της τρεχαλόζης είναι μία ιδιαίτερα δαπανηρή διαδικασία, η οποία περιπλέκεται από το γεγονός ότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα για κάθε εφαρμογή. Τα κορυνοβακτήρια είναι οργανισμοί που παράγουν μέσω τριών βιοχημικών πορειών μεγάλη ποσότητα τρεχαλόζης, διότι τη χρησιμοποιούν τόσο στην κατασκευή του κυτταρικού τους περιβλήματος, όσο και στο εσωτερικό του κυττάρου, για την προστασία έναντι συνθηκών αφυδάτωσης.

Στην εργασία αυτή δύο είναι τα προς μελέτη ζητήματα:

1. Η απομόνωση των γονιδίων *treY* και *treZ* από τα στελέχη



Corynebacterium glutamicum ATCC 21253 και *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799 που διατίθενται στο εργαστήριο. Η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης μέσω της βιοχημικής πορείας *treYZ* δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο η *otsAB*. Στόχος είναι η απομόνωση των γονιδίων, η εύρεση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας, η σύγκρισή τους με γνωστά ανάλογα γονίδια και η τροποποίησή τους για κλωνοποίηση σε φορείς υπερέκφρασης.

2. Η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιοσυνθετική πορεία *otsAB* στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* ATCC 13951. Ο απώτερος σκοπός είναι η διερεύνηση της παραγωγής τρεχαλόζης από ετερόλογα γονίδια σε ένα βακτήριο που εκφράζει ξένα γονίδια και αναπτύσσεται σε βιομηχανικές συνθήκες όπως είναι το *X. campestris*, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής δύο προϊόντων. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση των γονιδίων *otsA* και *otsB* των *C. glutamicum* ATCC 21253 και *B. lactofermentum* ATCC 21799, τα οποία έχουν απομονωθεί, κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά (Andreou LV et al., 2005) σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης κατάλληλους για ένα εύρος φυτοπαθογόνων βακτηρίων, ώστε να μελετηθεί η δραστηριότητα των αντίστοιχων ενζύμων και επομένως η δυνατότητα παραγωγής τρεχαλόζης στον ξενιστή *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.



2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν των εταιρειών Merck, Sigma, Biolife, Invitrogen, Fluka, Riedel – de – Haën, LAB M. Τα περιοριστικά ένζυμα ήταν της TAKARA.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν:

- 1) Ανακινούμενος επωαστήρας: EDMUND BÜHLER TH30
- 2) Αυτόκαυστο: ASTELL SCIENTIFIC AMB 430
- 3) Αυτόματες πιπέτες: Gilson:P2 (0,2–2μl), P200 (20-200μl), P1000 (200-1000μl), P5000 (1000-5000μl). Finnpiquette Thermo Labsystems 4500 (2-20μl).
- 4) Καταψύκτης: Whirpool Easytronic (-20° C).
- 5) Λυοφιλιοποιητής: Thermo Savant ISS 110 Speedvac System
- 6) ρΗμετρο: inoLab pH Level 2 WTW
- 7) Συσσκευή ακτινοβολίας UV: VILBER LOURMAT
- 8) Συσσκευή ανάδευσης: Maxi Rocket UNITWIST RT
- 9) Συσσκευές ηλεκτροφόρησης DNA: Cansort E844, Roth Karlsruhe HU6, HU10, HU13.
- 10) Σύστημα φωτογράφισης: KODAK 1D Image Analysis SW (KODAK EDAS290)
- 11) Υδατόλουτρο: BIOLINE SCIENTIFIC WB5020
- 12) Υπερκαταψύκτης: Thermo Forma model 994 (-80° C).
- 13) Φούρνος Υβριδισμού: UVP HL-2000 HybriLinker
- 14) Φυγόκεντροι: NF 048- nüve, Universal 16A, Biofuge Stratos Aeraus, Costar
- 15) Φωτόμετρο: U-1500 Spectrophotometer
- 16) Ψυγειοκαταψύκτης: Bosch DuoSystem (+4°, -20° C)
- 17) Dry bath incubator: Kisker MD-02N, Kisker CH100
- 18) HOOD: Bioair Instruments Electronic Autospeed Control m/sec.
- 19) Mini bead-beater (3110BX, Biospec products, Bartesville, Oklahoma, USA)
- 20) GIBCO BRL Cell-Porator Electroporation System & Voltage Booster



2.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Βακτηριακά Στελέχη

| ΣΤΕΛΕΧΟΣ | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ |
|---|--|--|
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799 | τροποποιημένο για παραγωγή λυσίνης | Kumura et al.,1962 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC21253 | τροποποιημένο για παραγωγή λυσίνης | Kinoshira et al., 1958 , Nakayama et al., 1973 (Nakayama K., Araki K. Process for producing L-lysine. US Patented 3,708,395 dated Jan. 2 1973) |
| <i>Escherichia coli</i> DH5a | <i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZ ΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 recA1</i> | Hanahan 1983, BRL, Gaithersburg, MD |
| <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC13951 | Φυσικός τύπος Παράγει ξανθάνη | Afendra et al.,2002 |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2: Πλασμίδια

| ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ | ΜΕΓΕΘΟΣ (kb) | ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ | ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ |
|-----------|--------------|----------------------|---|-----------------------------------|
| pCR-Blunt | 3,500 | Km ^R | Ένθεση προϊόντος PCR ή γονιδίου | Zero Blunt cloning kit Invitrogen |
| pUC19 | 2,686 | Ap ^R | Ένθεση προϊόντος PCR | Yanish-Perron et al., 1985 |
| pET29C | 6,282 | Km ^R | Ένθεση προϊόντος PCR | Papi et al., 2005, Novagen |
| pCPP33 | 7,500 | Tc ^R | Ένθεση γονιδίων <i>otsA</i> , <i>otsB</i> | Afendra et al.,2002 |
| pCPP39 | 8,700 | Tc ^R | Ένθεση γονιδίων <i>otsA</i> , <i>otsB</i> | Afendra et al.,2002 |
| pUCotsA01 | 4,486 | Ap ^R | Παραλαβή <i>otsAB.l</i> . | Andreou L.B., 2005 |
| pUCotsA02 | 4,486 | Ap ^R | Παραλαβή <i>otsAC.g</i> . | Andreou L.B., 2005 |
| pUCotsB03 | 3,886 | Ap ^R | Παραλαβή <i>otsBB.l</i> . | Andreou L.B., 2005 |
| pUCotsB04 | 3,886 | Ap ^R | Παραλαβή <i>otsBC.g</i> . | Andreou L.B., 2005 |

2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Πλήρες θρεπτικό μέσο για τα *E. coli*, *B. lactofermentum* και *C. glutamicum* (Luria Broth, L.B., Luria and Delbruck 1943).

- 1% (w/v) NaCl
- 0,5% (w/v) Yeast extract (εκχύλισμα ζύμης)
- 1% (w/v) τρυπτόνη
- pH 7,5 (με διάλυμα NaOH 1N).

Το *X. campestris* αναπτύχθηκε στο παραπάνω θρεπτικό μέσον με την προσθήκη επιπλέον 0,2 % γλυκόζης.

Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται σε κλίβανο υπό πίεση σε 121°C.

Στερεά θρεπτικά μέσα: παρασκευάζονται με προσθήκη 1,8 – 2% (w/v) άγαρ στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό μέσο πριν την αποστείρωση.

2.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Οι καλλιέργειες του *E. coli* επωάστηκαν στους 37°C, των *B. lactofermentum* και *C. glutamicum* στους 30°C, ενώ του *X. campestris* στους 28 - 30°C, όλες υπό συνεχή ανάδευση 175 – 200 στροφών.

Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C.

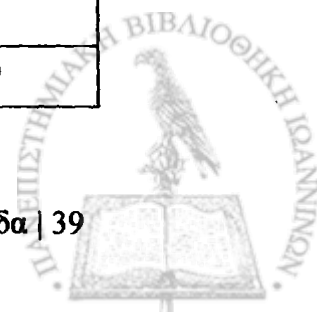
Τα κύτταρα υγρών καλλιεργειών φυλάσσονται στους -80°C παρουσία ~33% γλυκερόλης (500μl γλυκερόλη + 1000μl υγρής καλλιέργειας).

2.5 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων αποθήκευσης έγινε με διήθηση μέσω φίλτρου. Τα διαλύματα αποθήκευσης φυλάσσονται στους -20°C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν

| ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ/ΔΙΑΛΥΤΗΣ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK | ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ (μg/ml) |
|-----------------------|-------------------|--|
| Ap/dH ₂ O | 100mg/ml | 100 |
| Km/ dH ₂ O | 50mg/ml | 50 |
| Tc/αιθανόλη | 5mg/ml | 20 (<i>E. coli</i>), 15 (<i>X. campestris</i>) |



ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4: Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

| ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ | ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ | ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ |
|-------------|---|---|
| Ap | Αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών και προκαλώντας τον τερματισμό της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. | Το γονίδιο <i>bla</i> κωδικοποιεί τη β-λακτασμάση, η οποία διασπά τον β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού. |
| Km | Η Km ανήκει στην ομάδα των αμινογλυκοσιδών και παρουσιάζει μικροβιοκτόνες ιδιότητες. Η επίδρασή της εκδηλώνεται στο στάδιο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στο αντιμικροβιακό φάσμα της Km συμπεριλαμβάνονται τόσο GRAM+ όσο και GRAM- βακτήρια. | Το γονίδιο <i>nptII</i> εκφράζει ένα ένζυμο το οποίο απενεργοποιεί την δράση του αντιβιοτικού. |
| Tc | Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με πρόσδεση στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος και παρεμπόδιση της σύνδεσης του αμινοάκυλο-tRNA. | Το γονίδιο <i>tet</i> κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και εμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου. |

2.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση ολικού DNA από τα *B. lactofermentum* και *C. glutamicum* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Lovett και Keggins (1979) για *Bacillus* με ορισμένες τροποποιήσεις (Marquez et al., 1985).

- Φυγοκέντρηση στις 7.000rpm στους 4°C για 5min κυττάρων από καλλιέργεια 30ml μετά από ανάπτυξη 20 ωρών στους 30°C.
- Έκπλυση των κυττάρων με 2,5ml TES Buffer.
- Φυγοκέντρηση στις 3.500rpm για 20min.
- Επαναιώρηση με 2,5ml TES Buffer.
- Φυγοκέντρηση στις 3.500rpm για 20min.



- Προσθήκη 2,5ml TES Buffer και 40ml λυσοζύμης.
- Επώαση στους 37°C για 30min κυτταρικού αιωρήματος μετά από ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη υδατικού διαλύματος RNάσης 125μl και επώαση διαλύματος στους 37°C για 20min.
- Ακολουθεί αραίωση του δείγματος στο διπλάσιο όγκο με TES Buffer (προσθήκη 2,5ml TES).
- Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη υδατικού διαλύματος πρωτεάσης K 2,5μl καθώς και SDS 50μl.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3.500rpm για 10min για διαχωρισμό φάσεων.
- Επειτα, εκχύλιση της υδατικής φάσης 2 φορές με ίσο όγκο φαινόλης (ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 3.500rpm για 5min).
- Στην τελική υδατική φάση (2,5ml) προσθήκη διπλάσιου όγκου ψυχρής αιθανόλης (5ml), ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
- Παραμονή του διαλύματος στους 4°C για τουλάχιστον 30min. (Μετά την προσθήκη της αιθανόλης στο διάλυμα είναι πλέον ορατό το ολικό DNA ως λευκές ίνες).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm στους 4°C για 20min και στέγνωμα του ιζήματος.
- Τέλος, διάλυση του ιζήματος σε 100μl TE και φύλαξη στους 4°C.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- TES Buffer: 20mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl
- Διάλυμα TE: 10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA pH 8.0

2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΑΚΕΤΟΥ ΜΕ ΕΤΟΙΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Cat. No. 740588.250).

Η μέθοδος αυτή αποδίδει παρασκευές υψηλής καθαρότητας και ικανοποιητικής ποσότητας.



- Ανάπτυξη 5ml καλλιέργειας κυττάρων που περιέχουν το προς απομόνωση πλασμίδιο με ανακίνηση στους 37°C σε θρεπτικό μέσο που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό. Ο χρόνος επώασης δεν πρέπει να ξεπερνά τις 16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση 4,5ml από την παραπάνω καλλιέργεια για 15min/3.500U.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου προσεκτικά με πιπέτα.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 250ml διαλύματος A1 υπό ανάδευση με πιπέτα έως ότου το εναιώρημα εμφανίζεται ομογενές.
- Προσθήκη 250ml διαλύματος A2 και ήπια ανάδευση του μίγματος με περιστροφή του σωλήνα 6-8 φορές.
- Προσθήκη 300ml διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση του μίγματος με περιστροφή του σωλήνα 6-8 φορές.
- Φυγοκέντρηση του μίγματος στις 13.000rpm για 10min.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε στήλη και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min.
- Προσθήκη στη στήλη 600ml διαλύματος A4 και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min. Στο βήμα αυτό απομακρύνονται άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά.
- Στη συνέχεια, ξήρανση της στήλης με φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 2min.
- Προσθήκη στη στήλη 50ml διαλύματος AE και επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο βήμα αυτό πραγματοποιείται η έκλυση του πλασμιδίου από τη στήλη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min.

2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΖΩΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΑΚΕΤΟΥ ΜΕ ΕΤΟΙΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ NucleoSpin ExtractII (Macherey-Nagel, Cat. No. 740609.250).

- Κόψιμο επιθυμητής ζώνης από πήγμα αγαρόζης και ζύγισμα.
- Προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος NT από αυτόν της ζώνης.

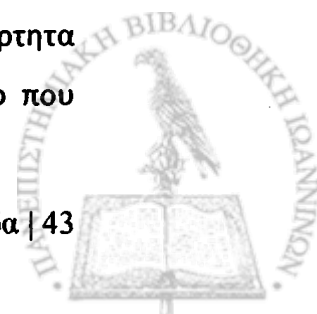


- Επώαση στους 50°C για 10min και ανάδευση ανά 2-3min, ώσπου να λειώσει εντελώς το gel της ζώνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε στήλη.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min.
- Προσθήκη 600μl διαλύματος NT3 και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 2min και ακολούθως επώαση της στήλης στους 70°C για 2-3min. (Υπολειπόμενη αιθανόλη από το διάλυμα NT3 πιθανόν αναστείλει επόμενες αντιδράσεις και γ' αυτό πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως).
- Μεταφορά της στήλης σε καθαρό πλαστικό σωλήνα 1,5ml και προσθήκη 50μl διαλύματος έκλουσης NE.
- Ακολουθεί παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και έπειτα έκλουση του DNA από τη στήλη με φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min.

2.9 ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και καταλύουν τη διάσπαση και των δύο αλυσίδων της διπλής έλικας, μέσω της υδρόλυσης ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε μία από αυτές. Ο φυσιολογικός τους ρόλος στα βακτήρια είναι η προστασία του κυττάρου από εξωγενές DNA.

Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικά ένζυμα έχουν μήκος τέσσερα έως οκτώ ζεύγη βάσεων και είναι συνήθως παλίνδρομες, με τις θέσεις διάσπασης να είναι συμμετρικά τοποθετημένες στο εσωτερικό τους. Από τη διάσπαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορεί να προκύψουν είτε τμήματα DNA με προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα, ικανά να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με συμπληρωματικές αλληλουχίες, είτε τμήματα με αμβλεία άκρα. Με την προσθήκη DNA λιγάσης είναι δυνατόν να αποκατασταθούν οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί μεταξύ δύο περιοριστικών θραυσμάτων και αυτή είναι η βάση της κατασκευής ανασυνδυασμένων μορίων DNA. Το πλεονέκτημα των απότομων άκρων είναι η ικανότητα να συνδέονται με άλλα τμήματα με απότομα άκρα ανεξάρτητα του πως προέκυψαν αυτά (επεξεργασία με το ίδιο ένζυμο ή άλλο ένζυμο που αφήνει αμβλεία άκρα, προϊόν PCR κτλ).



Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται μετά από σύγκριση των αποστάσεων που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, με τις αποστάσεις πρότυπων ζωνών ευθύγραμμου DNA γνωστού μοριακού βάρους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις κατασκευαστικές εταιρείες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1μg DNA του φάγου λ σε 1 ώρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου.

Ως πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε DNA φάγου λ που είχε υποστεί πέψη με *HindIII*. Η πέψη αυτή δίνει χαρακτηριστικά θραύσματα 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 και 125 bp.

i) Πέψεις ολικού DNA

Ο τελικός όγκος των πέψεων ποικίλλει. Τα αποστειρωμένα σωληνάρια στα οποία γίνονται οι πέψεις περιέχουν:

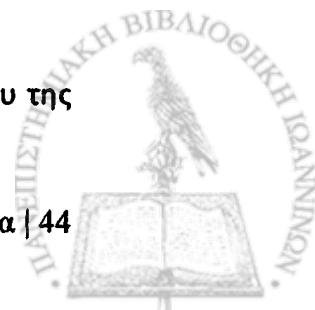
- ποσότητα DNA
- ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης
- κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ώστε να δράσει ικανοποιητικά. Η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου
- κατάλληλη ποσότητα dH₂O, για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Το παραπάνω μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 30°C ή στους 37°C για τον επιθυμητό χρόνο. Ο έλεγχος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση.

ii) Πέψεις πλασμιδιακού DNA

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl, σε σωληνάριο errendorf όπου τοποθετούνται τα εξής:

- ορισμένη ποσότητα DNA
- ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης (1μl)



- κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (συνήθως 0,5μl)
- κατάλληλη ποσότητα dH₂O για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 30°C ή στους 37°C ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου για τον επιθυμητό χρόνο. Ο έλεγχος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση του δείγματος.

2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Όταν φορτισμένα μόρια βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, μετακινούνται προς το θετικό πόλο (άνοδο), αν είναι αρνητικά φορτισμένα, ή προς τον αρνητικό πόλο (κάθοδο), αν είναι θετικά φορτισμένα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται με τον όρο ηλεκτροφόρηση και χρησιμοποιείται ως μέθοδος διαχωρισμού και καθαρισμού μακρομορίων που διαφέρουν στο φορτίο, τη διαμόρφωση ή το μέγεθος.

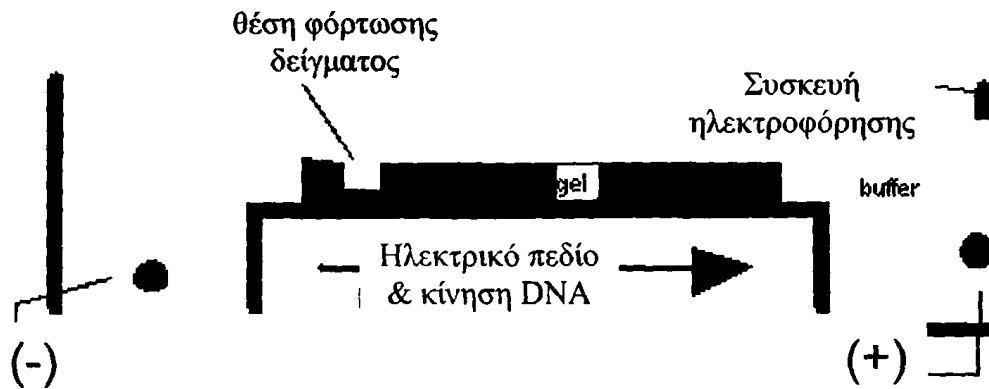
Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA) είναι μακρομόρια που μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, μετά από απομόνωσή τους από τα κύτταρα, καθώς και μετά από πέψη, καθαρισμό, αντίδραση PCR, κ.ο.κ. Το DNA διαθέτει ασθενές αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων, συνεπώς η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνησή του προς την άνοδο.

Το DNA ηλεκτροφορείται σε υλικό που σχηματίζει πλέγμα. Το υλικό που χρησιμοποιείται συνήθως για τις ηλεκτροφορήσεις ρουτίνας του DNA είναι η αгарόζη, ουδέτερος μη τοξικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από θαλάσσια φύκη. Όταν παρασκευαστεί, έχει τη μορφή παραλληλεπίπεδου πηγματος πάχους όχι μεγαλύτερου του 1 cm, με υποδοχές (φρεάτια) στην επιφάνεια της μιας πλευράς για να προστεθεί το DNA. Το πήγμα αгарόζης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή που περιέχει δύο ηλεκτρόδια, καλύπτεται από το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, η δε συσκευή συνδέεται σε μονάδα παροχής τάσης. Τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος είναι υπεύθυνα για τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και διατηρούν το pH σχετικά σταθερό (Εικόνα 2.1).

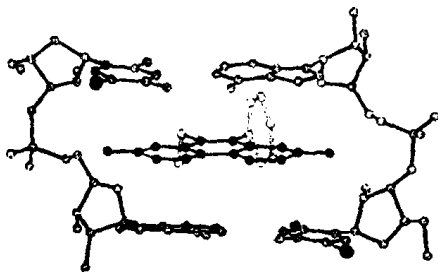
Η ανίχνευση του DNA σε πηγματα αгарόζης γίνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο πήγμα κατά την παρασκευή του. Το βρωμιούχο αιθίδιο εισχωρεί στο μόριο του DNA και δεσμεύεται ανάμεσα στην υπερσπειρωμένη διπλή



έλικα (Εικόνα 2.2). Το σύμπλοκο DNA – βρωμιούχου αιθιδίου ανιχνεύεται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (302 nm), όπου καθίσταται ορατό σε μορφή ζωνών ρόδινου χρώματος.



Εικόνα 2. 1: Σχηματική απεικόνιση οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.



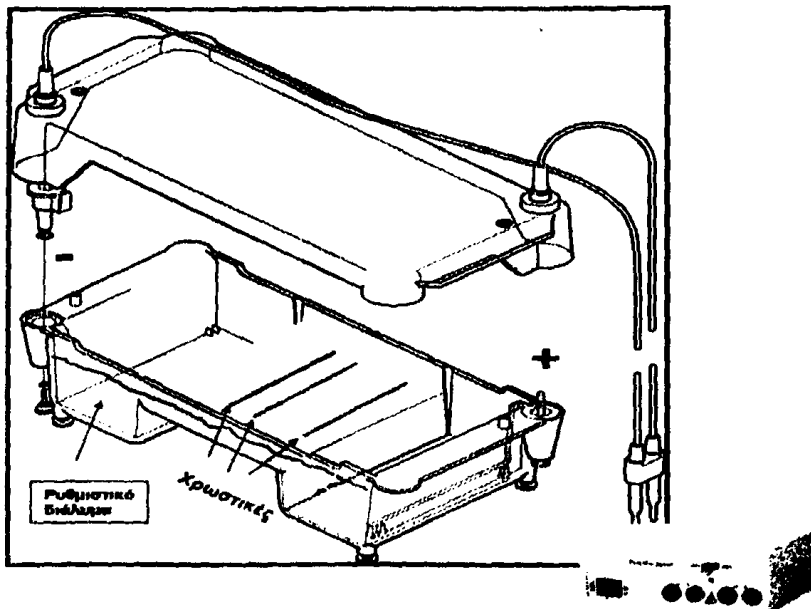
Εικόνα 2.2: Απεικόνιση του τρόπου εισχώρησης του βρωμιούχου αιθιδίου στη διπλή έλικα του DNA.

Πειραματική διαδικασία:

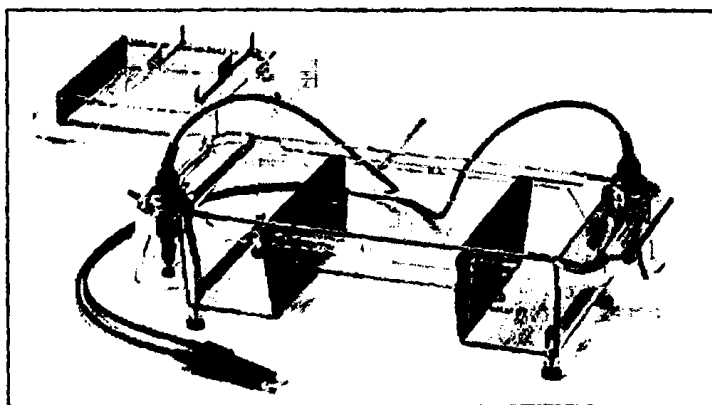
- Ζύγισμα κατάλληλης ποσότητας αραρόζης σε κωνική φιάλη (πυκνότητα πήγματος 1%).
- Προσθήκη στη φιάλη ανάλογη ποσότητα διαλύματος TAE 1x και θέρμανση μέχρι να διαλυθεί τελείως η αραρόζη.
- Όταν η θερμοκρασία της φιάλης κατέλθει στους 50°C, προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0,5μg/ml.
- Απόχυση του παραπάνω μίγματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και πήξη του, οπότε και γίνεται αφαίρεση του κτενακίου για τη δημιουργία των φρεατίων.



- Στα δείγματα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (G.L.B) σε αναλογία 5:1 αντίστοιχα.
- Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια του πήγματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 2-5Volt/cm. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.3: Διάταξη ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 2. 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Διάλυμα TAE (tris acetate): 0,04M Tris acetate, 0,001M EDTA pH 8.0

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50x και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα 1x παρασκευάζεται με αρραίωση του διαλύτη.

- Ρυθμιστικό διάλυμα G.L.B. (gel loading buffer): 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανολικό ξυλένιο, 0,50% γλυκερόλη, διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: EtBr 3 mg/ml (w/v) pH8. Διατηρείται στους 4°C σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο.

2.11 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Στάδιο πρώτο: πραγματοποιείται πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

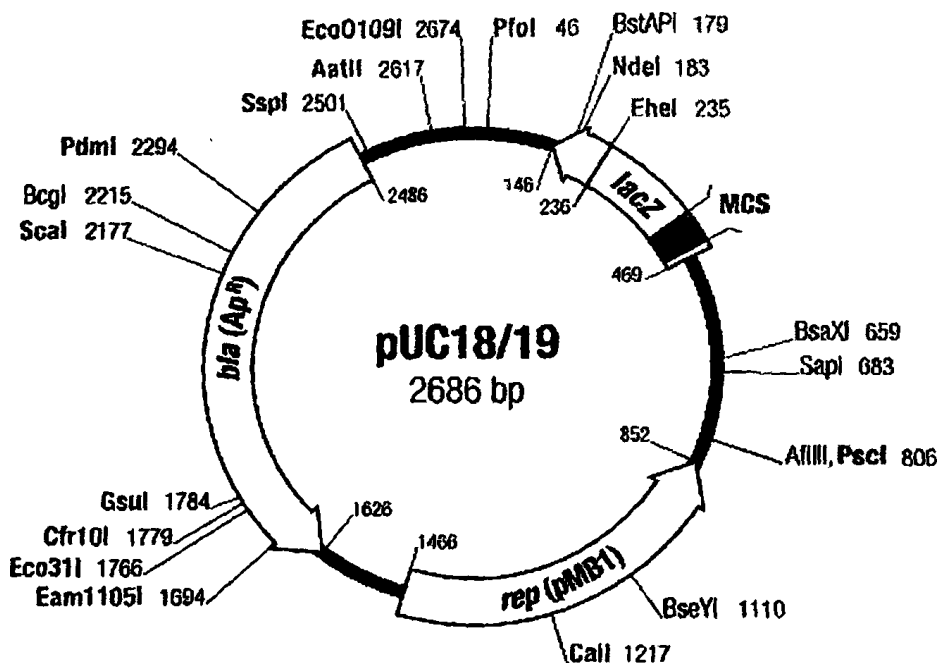
Στάδιο δεύτερο: σ' αυτό το στάδιο γίνεται η σύνδεση (ligation) των δύο γραμμικών μορίων με την επίδραση της λιγάσης. Αυτό το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5' -P - άκρα του τμήματος στόχου και των 3' -OH άκρων του φορέα.

Για την αντίδραση της σύνδεσης προστίθενται σε σωληνάριο erpendorf:

- 2μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος
- Κατάλληλη ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα
- Κατάλληλη ποσότητα (μl) του DNA που αποτελεί την ένθεση
- 1μl T₄ DNA ligase
- Απαιτούμενος όγκος dH₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 20μl

Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται στους 16°C για 1 νύχτα και χρησιμοποιείται κατόπιν για μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* ή *X. campestris*. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις σύνδεσης στους πλασμιδιακούς φορείς pCR-Blunt, pUC19, pCPP33 και pCPP39.

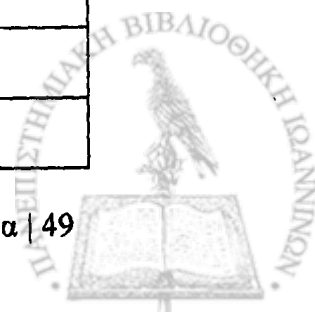


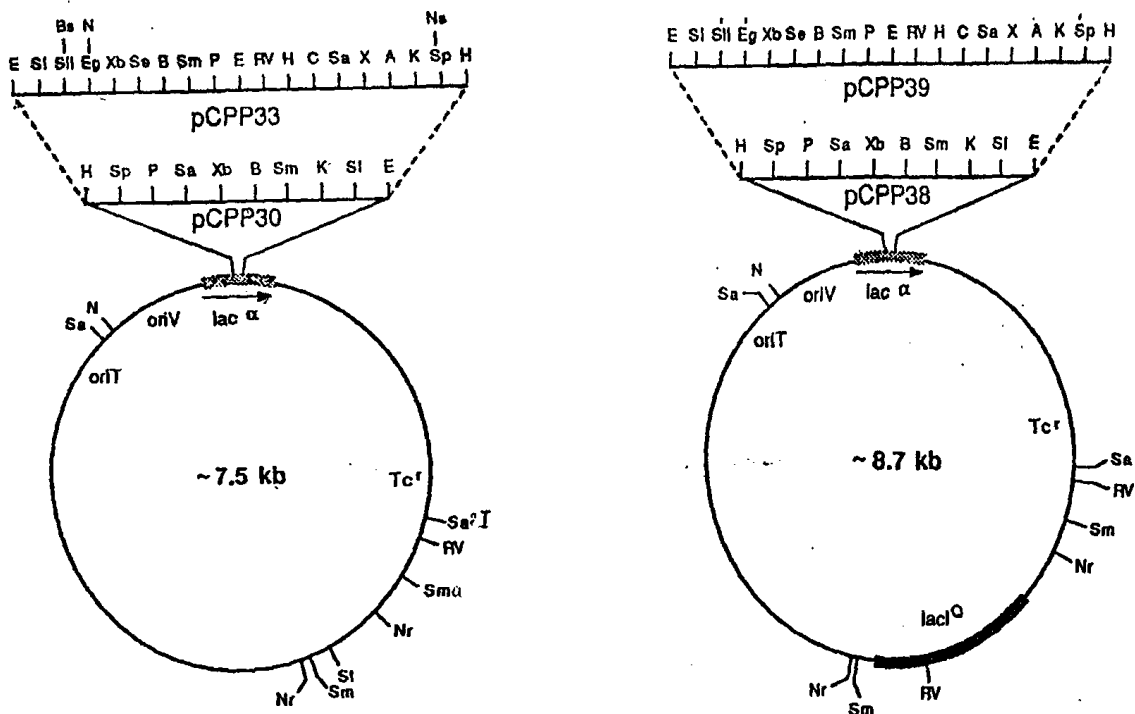


Εικόνα 2.5: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pUC18/19

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5: Στοιχεία για τον πλασμιδιακό φορέα pUC18/19

| ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΟΡΕΑ pUC18/19 | ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ-ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ |
|---|--|
| Περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ρεπλικόνιο) | Αποτελείται από την περιοχή έναρξης της αντιγραφής (<i>oriV</i>) και από τα γονίδια <i>cop</i> και <i>inc</i> που συμμετέχουν στον έλεγχο της αντιγραφής |
| Δείκτης επιλογής | Το γονίδιο <i>bla</i> , του οποίου το προϊόν, παρέχει ανθεκτικότητα έναντι του αντιβιοτικού αμικικιλίνη (<i>Ap^r</i>) |
| Επαγωγίμος υποκινητής <i>lacP</i> (<i>lacZ</i> promoter) | υποκινητής του οπερονίου της λακτόζης |
| Πολυσυνδέτης (MCS: Multiple Cloning Site) | Περιοχή στο εσωτερικό του γονιδίου <i>lacZ</i> , που περιέχει θέσεις περιοριστικών ενδονουκλεασών, για κλωνοποίηση ενθεμάτων εντός αυτής |
| Γονίδιο <i>lacI</i> | Κωδικοποιεί τον καταστολέα του <i>lacP</i> |
| Γονίδιο <i>lacZ</i> | Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση |





Εικόνα 2.6: Χάρτες των πλασμιδίων pCPP33 και pCPP39

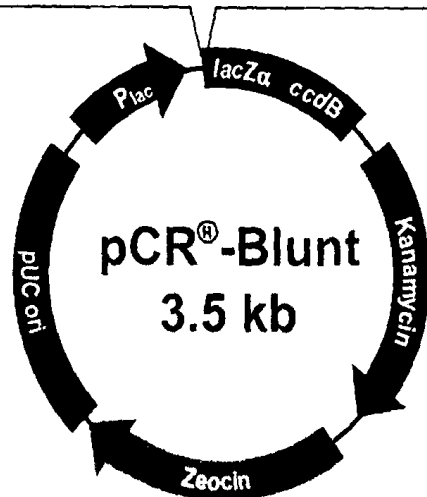
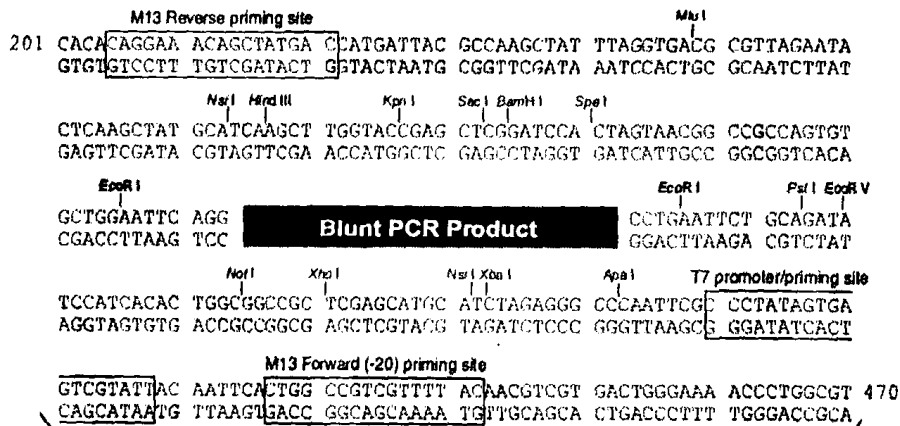
Οι φορείς pCPP33 and pCPP39 (ευγενική χορηγία του Dr D.W. Bauer, Cornell University, Ithaca, NY) έχουν κατασκευαστεί για κλωνοποίηση, μεταφορά και έκφραση ετερόλογων γονιδίων σε φυτοπαθογόνα ή επιφυτικά βακτήρια. Περιέχουν την αρχή αντιγραφής, την αρχή μεταφοράς, το γονίδιο αντοχής στην τετρακυκλίνη του πλασμιδίου RK2 (ομάδα ασυμβατότητας IncP), καθώς επίσης και την περιοχή *lacZα* του πλασμιδιακού φορέα pUC119. Ο φορέας pCPP39 περιέχει επιπλέον το γονίδιο *lacIq* του pRC130, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή P_{lac} .

2.11.1 Αντίδραση δεσμοποίησης (ligation) στον φορέα pCR-Blunt με τη μέθοδο χρήσης πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων ZeroBlunt PCRCloning Kit (Invitrogen, Cat. No. K2750-20).

Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων ZeroBlunt PCRCloning Kit (Invitrogen, Cat. No. K2750-20).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6: Στοιχεία για το πλασμίδιο pCR-Blunt

| ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΟΡΕΑ pCR-Blunt | ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ-ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ |
|---|--|
| Περιοχή έναρξης της αντιγραφης (ρεπλικόνιο) | Αποτελείται από την περιοχή έναρξης της αντιγραφής (<i>oriV</i>) και από τα γονίδια <i>cor</i> και <i>inc</i> που συμμετέχουν στον έλεγχο της αντιγραφής. |
| Δείκτης επιλογής | Το γονίδιο <i>prtII</i> εκφράζει ένα ένζυμο το οποίο απενεργοποιεί την δράση του αντιβιοτικού καναμικίνη (Km). |
| Επαγωγίμος υποκινητής <i>lacP</i> (<i>lacZ</i> promoter) | Υποκινητής του οπερονίου της λακτόζης. |
| Γονίδιο <i>lacZα-ccdB</i> | Εκφράζει τη θανατογόνο πρωτεΐνη CcdB. Η διακοπή της αλληλουχίας του κατά τον επιτυχημένο ανασυνδυασμό αποτελεί δείκτη επιλογής των ανασυνδυασμένων κυττάρων. |



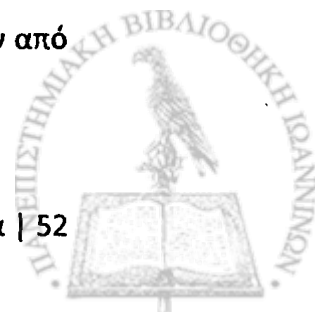
Comments for pCR[®]-Blunt
3512 nucleotides

Εικόνα 2.7: Χάρτης του πλασμιδίου pCR-Blunt



2.11.2 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E.coli* με πλασμιδιακό DNA. (Kushner et al., 1978)

- Εμβολιασμός κυττάρων DH5a σε 5ml θρεπτικού υλικού Luria Broth.
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση για μία νύχτα (μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης).
- Αραίωση 1:20(v/v) της προκαλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό Luria Broth.
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση περίπου 2 ώρες ώστε OD ~ 0,4.
- Φυγοκέντρηση στις 3.800U για 20min.
- Απόρριψη του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού και έκπλυση των κυττάρων με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος πλύσεως «Δ.Ι» και φυγοκέντρησή τους στις 3.500-3.800U για 20min.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος κατασκευής επιδεκτικών κυττάρων «Δ.ΙΙ» και επώαση στον πάγο (0°C) για 30min.
- Φυγοκέντρηση το εναιωρήματος στις 3.500-3.800U για 20min.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε όγκο ίσο με το 1:10 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας «Δ. ΙΙ».
- Διαμερισμός του παραπάνω εναιωρήματος σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια erpendorf σε ένα από τα οποία έχει προστεθεί δείγμα γνωστού πλασμιδίου (το οποίο θα αποτελέσει τον θετικό μάρτυρα), σε ένα άλλο ο φορέας με την ένθεση μετά από τη δεσμοποίηση (το μίγμα της ligation), ενώ σε ένα erpendorf δεν προστίθεται DNA (θα αποτελέσει τον αρνητικό μάρτυρα).
- Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε πάγο (0°C) για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό πλήγμα των κυττάρων με τοποθέτηση των σωληναρίων erpendorfs στους 43,5°C για 45sec.
- Κάθε κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάζεται σε 0,9ml L.B. και επώάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για μία ώρα, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν από τη διαδικασία του μετασχηματισμού.



- Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολισμός 0,2ml από τις καλλιέργειες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria agar και το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Τα τρυβλία επωάζονται για τουλάχιστον 18 ώρες στους 37°C.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Διάλυμα πλύσεως (Δ.I): 10mM RbCl, 10mM MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) pH 7.0.
- Διάλυμα κατασκευής επιδεκτικών κυττάρων (Δ.II): 10mM RbCl, 100mM MOPS pH 6.5, 50mM CaCl₂.

2.11.3 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *Xanthomonas campestris* με πλασμιδιακό DNA με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) (White TJ, Gonzalez CF, 1995).

- Από ολονύκτια προκαλλιέργεια του βακτηρίου εμβολιάζεται δείγμα σε 100 ml LB.
- Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 30°C υπό ανάδευση, μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.5-0.6.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 15 min στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 50 ml κρύου αποστειρωμένου ddH₂O και φυγοκεντρείται στις 4500 rpm για 15 min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25 ml κρύου αποστειρωμένου ddH₂O.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 15 min στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml κρύου διαλύματος γλυκερίνης 10% και φυγοκεντρείται στις 4500 rpm για 15 min στους 4°C.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 600 ml κρύου διαλύματος γλυκερίνης 10% και παραμένει στον πάγο.



- 20 μl κυτταρικού αιωρήματος και 1 μl πλασμιδιακού DNA αναμειγνύονται, μεταφέρονται σε ειδικές κυψελίδες και υποβάλλονται σε ηλεκτροδιάτρηση (4 KΩ, 6.25 KV/cm).
- Ακολουθεί ανάρρωση των κυττάρων σε 1 ml LB+0.2% γλυκόζη για 2 h στους 30°C υπό ανάδευση.
- Εμβολιάζονται τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο Luria agar + 0,2 % γλυκόζης και το κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων, με κατάλληλες αραιώσεις της καλλιέργειας ανάρρωσης (συνήθως μέχρι τρεις).
- Τα τρυβλία αφήνονται για επώαση στους 30°C και οι αποικίες *X. campestris* εμφανίζονται μετά από 3-4 μέρες.

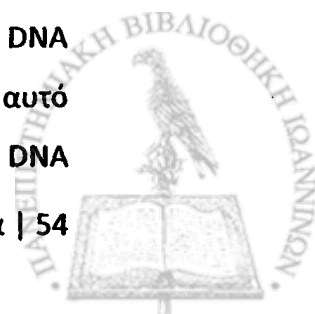
2.12 ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Τα τρυβλία εξετάζονται ως προς το αποτέλεσμα. Στο τρυβλίο του αρνητικού μάρτυρα δεν πρέπει να αναπτυχθούν αποικίες, διότι διαφορετικά ίσως να μην έδρασε το αντιβιοτικό. Στο τρυβλίο του θετικού μάρτυρα πρέπει να αναπτυχθούν αποικίες, διότι αλλιώς δεν πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η κατασκευή επιδεκτικών κυττάρων. Στα τρυβλία των κυττάρων που μετασχηματίστηκαν από το μίγμα δεσμοποίησης, οι αποικίες που αναπτύσσονται είναι υποψήφια κύτταρα που έχουν δεχτεί το φορέα με την ένθεση.

2.13 ΜΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ DNA-DNA

Η μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα μονόκλωνων μορίων DNA να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων τους που περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων, σχηματίζοντας έτσι ένα δίκλωνο μόριο. 100% ομόλογες αλληλουχίες υβριδίζονται με ισχυρούς δεσμούς. Όσο μικρότερη είναι η ομολογία των αλληλουχιών, η σύνδεση είναι χαλαρότερη.

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche, Cat. No. 11 093 657 910). Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη – ένα στεροειδές απτένιο – για την ιχνηθέτηση DNA



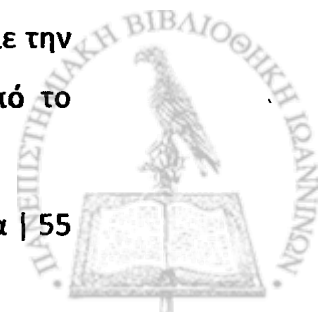
και RNA . Στη σήμανση DNA, η διγοξυγενίνη συνδέεται με dUTP μέσω ενός εστερικού δεσμού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει 3 στάδια:

- 1) σήμανση DNA ιχνηθέτη με digoxigenine-11-dUTP
- 2) υβριδισμός του ιχνηθετημένου DNA με το ακινητοποιημένο DNA σε φίλτρο
- 3) ανίχνευση του υβριδίου με χρωμογόνο αντίδραση.

2.13.1 Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε νάυλον φίλτρο. (Υβριδισμός κατά Southern-Southern blotting)

Με τη μέθοδο αυτή, το DNA μεταφέρεται από πήκτωμα αγαρόζης αντιγραφικά σε ειδικό φίλτρο με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρήσει τις ίδιες θέσεις που κατείχε στο πήκτωμα.

- Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα μετουσίωσης, ώστε το DNA να καταστεί μονόκλωνο.
- Ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 45min.
- Στη συνέχεια, εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα εξουδετέρωσης.
- Ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 45min.
- Σε δοχείο με διάλυμα 10xSSC στερέωση μιας πλάκας μικρότερου μήκους από του δοχείου. Τοποθέτηση πάνω σε αυτή, 2 φύλλων διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM σε σχήμα γέφυρας, οι άκρες των οποίων ακουμπάνε στον πυθμένα του δοχείου και διαβρέχονται από το διάλυμα 10xSSC.
- Τοποθέτηση ανεστραμμένου του πηκτώματος αγαρόζης πάνω στα διηθητικά φύλλα. Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων αέρα με την πίεση μιας γυάλινης ράβδου. Κάλυψη των ακάλυπτων από πήκτωμα τμημάτων των διηθητικών φύλλων με αλουμινόφυλλο.
- Εμβάπτιση σε διάλυμα 2xSSC και τοποθέτηση στην επιφάνεια του πηκτώματος ειδικής μεμβράνης μεταφοράς DNA Roti-Nylon plus ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα.
- Αφαίρεση των φυσαλίδων αέρα με γυάλινη ράβδο.
- Διαβροχή δύο διηθητικών φύλλων Whatman 3MM ίδιων διαστάσεων με την ειδική μεμβράνη, σε διάλυμα 2xSSC και τοποθέτησή τους πάνω από το φίλτρο.



- Πάνω από τα φύλλα Whatman 3MM, τοποθέτηση ενός στρώματος απορροφητικού χαρτιού (~6cm) με επιπλέον πίεση με κάποιο αντικείμενο βάρους 500g περίπου.
- Λόγω διάχυσης του διαλύματος 10xSSC στο διηθητικό χαρτί και στο στρώμα του απορροφητικού χαρτιού (τριχοειδής μετακίνηση) συμπαρασύρεται το DNA από το πήκτωμα και μεταφέρεται στο φίλτρο όπου προσδένεται με ασθενείς δεσμούς. Η μεταφορά διαρκεί περίπου 18-20 ώρες.
- Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, αφαίρεση του βάρους, του απορροφητικού χαρτιού και των 2 φύλλων Whatman. Αφαίρεση προσεκτικά του φίλτρου και του πηκτώματος, αναστροφή, τοποθέτησή τους σε στεγνή επιφάνεια και σημείωση των θέσεων των φρεατίων πάνω στο φίλτρο με μολύβι.
- Απόρριψη του πηκτώματος και εμβάπτιση του φίλτρου σε διάλυμα 2xSSC και έκπλυση με ήπια ανακίνηση για λίγα λεπτά.
- Στη συνέχεια, τοποθέτηση του φίλτρου σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσει.
- Τέλος, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία 0,15J/cm² για 5min, ώστε το DNA να προσδεθεί ισχυρά πάνω στη μεμβράνη.

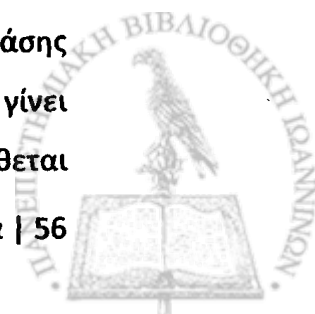
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Διάλυμα μετουσίωσης: NaOH 10N, NaCl 5M, dH₂O
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: Tris 2M pH 8.0, NaCl 5M, dH₂O
- Διάλυμα 20xSSC: NaCl 3M, Κιτρικό Νάτριο 0,3M, pH 7.0

2.13.2 Σήμανση DNA με digoxigenine-11-dUTP (dig-11-dUTP)

Ο μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Roche ως εξής:

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση του τμήματος κlenow της DNA πολυμεράσης I, που έχει δράση πολυμεράσης στην κατεύθυνση 5' → 3', δράση εξωνουκλεάσης στην κατεύθυνση 3' → 5', αλλά δεν έχει δράση εξωνουκλεάσης στην κατεύθυνση 5' → 3'. Το δίκλωνο μόριο του DNA αφού μετουσιωθεί και γίνει μονόκλωνο, με τη βοήθεια του τμήματος κlenow της DNA πολυμεράσης I συντίθεται



συμπληρωματικό DNA με αυτό του μονόκλωνου εκμαγείου. Για την έναρξη της αντιγραφής δίνονται από την εταιρεία πριμοδοτικά μόρια, εξανουκλεοτίδια, τα οποία συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων του DNA. Το ένζυμο της πολυμεράσης αναγνωρίζει αυτές τις δίκλωνες περιοχές ως σημεία έναρξης του πολυμερισμού και αρχίζει να συνθέτει τη νέα αλυσίδα ενσωματώνοντας και το σημασμένο digoxigenine-11-dUTP.

Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται:

- 10ng-30ng γραμμικού και μετουσιωμένου DNA
- 2μl dNTP μίγμα σήμανσης
- Κατάλληλη ποσότητα νερού, αν χρειάζεται, για να γίνει ο όγκος του διαλύματος 19μl.
- 1μl ενζύμου klenow

Το διάλυμα αναδεύεται και επώάζεται στους 37°C για 20 ώρες.

Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2μl EDTA 0,2M.

2.13.3 Υβριδισμός του ιχνηθέτη DNA με το ακινητοποιημένο DNA

- Αρχικά, πραγματοποιείται προϋβριδισμός και περιλαμβάνει επώαση της μεμβράνης με διάλυμα προϋβριδισμού (20ml διαλύματος προϋβριδισμού για 100cm²).
- Το στάδιο του προϋβριδισμού ολοκληρώνεται με επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα προϋβριδισμού υπό περιστροφή, στους 68°C για τουλάχιστον 1 ώρα.
- Λίγο πριν την απόχυση του διαλύματος προϋβριδισμού, γίνεται μετουσίωση του σημασμένου DNA με 10min βρασμό στους 100°C και 2min παραμονή σε πάγο.
- Στη συνέχεια, προσθήκη του μετουσιωμένου σημασμένου DNA σε 5ml διαλύματος υβριδισμού που διατηρείται σε θερμοκρασία 68°C,
- Το στάδιο του υβριδισμού πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα υβριδισμού και το μετουσιωμένο σημασμένο DNA σε κλίβανο υβριδισμού στους 68°C υπό περιστροφή για 18 ώρες.



- Μετά το τέλος του υβριδισμού, έκπλυση του φίλτρου αρχικά 2 φορές για 5min/πλύση με 50ml διαλύματος πλύσης a /100cm² και στη συνέχεια 2 φορές για 15min/πλύση στους 68°C με διάλυμα πλύσης b.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

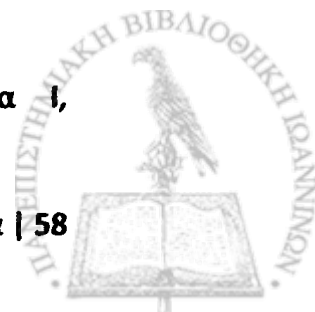
- Διάλυμα προϋβριδισμού – υβριδισμού: 5xSSC, 0,1% (w/v) N-lauroyls-Nasalt (N-λαουροϋλοσαρκονικό νάτριο), 0,02% (w/v) SDS, 1% αντιδραστήριο αποκλεισμού
- Διάλυμα πλύσης a: 2xSSC, 0,1% (w/v) SDS
- Διάλυμα πλύσης b: 0,1xSSC, 0,1% (w/v) SDS

2.13.4 Εκπλύσεις και χρωμογόνος αντίδραση

- Εκπλύσεις της μεμβράνης σε θερμοκρασία δωματίου αρχικά με διάλυμα I για 1min και στη συνέχεια για 30min με διάλυμα II.
- Έκπλυση με διάλυμα I για 1min.
- Στη συνέχεια, παρασκευή του διαλύματος III με το αντίσωμα (antibody-conjugated solution). Πραγματοποιείται επώαση του φίλτρου με 20ml διαλύματος με το αντίσωμα/100cm² για 30min και κατόπιν απομάκρυνση του μη συνεζευγμένου αντισώματος με πλύσεις με διάλυμα I, δύο φορές για 15min.
- Η ανίχνευση του υβριδίου γίνεται με χρωμογόνο αντίδραση.
- Εξισορρόπηση του φίλτρου με διάλυμα IV.
- Στη συνέχεια, επώαση του φίλτρου στο σκοτάδι χωρίς ανάδευση με 10ml χρωμογόνου διαλύματος/100cm² ολονυκτίως.
- Όταν εμφανιστούν οι επιθυμητές ζώνες, έκπλυση του φίλτρου με 50ml διαλύματος V και στέγνωμα.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (A)

- Διάλυμα I: 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5
- Διάλυμα II: 0,5% (w/v) αντιδραστήριο αποκλεισμού, διάλυμα I, παρασκευάζεται στους 50° – 70°C.



- Διάλυμα III: 4μl του αντισώματος, διάλυμα I
- Διάλυμα IV: 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, pH 9.5
- Διάλυμα χρωμογόνο: 200μl NBT/BCIP, 10ml διάλυμα IV
- Διάλυμα V: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (B)

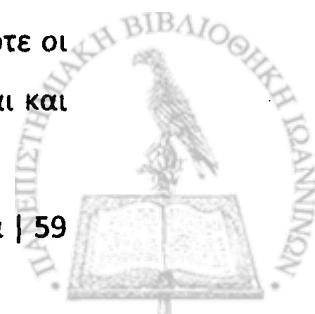
- Διάλυμα I (washing buffer): 0,1M Maleic acid, 0,15M NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20, pH 7.5
- Διάλυμα II (blocking solution 1x): Αραίωση του Blocking solution 10x → 10%(w/v) Blocking reagent, maleic acid buffer, ανάδευση & θέρμανση στους 68°C, φύλαξη στους 2° – 8°C.
- Διάλυμα III (Antibody solution): 1:5000 (150mU/ml) Anti-Digoxigenim-AP, διάλυμα II, διατήρηση στους 2° – 8°C για 12 ώρες.
- Διάλυμα IV (detection buffer): 0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9.5
- Διάλυμα V (colorsubstrate solution): 200μl NBT/BCIP, διάλυμα IV
- Maleic acid buffer: 0,1M maleic acid, 0,15M NaCl, pH 7.5

2.14 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την ενίσχυση συγκεκριμένης περιοχής DNA από γονιδιωματικό ή πλασμιδιακό υπόστρωμα. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από το εκμαγείο DNA, περίσσεια εκκινητών (primers) που έχουν συντεθεί χημικά, ισομοριακό μίγμα dNTPs, MgCl₂, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 10x (DNA polymerase buffer) και μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Η PCR διεξάγεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών αντιδράσεων, οι οποίοι διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (Mullis KB et al., 1994, Rolfs A et al., 1992):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation). Πραγματοποιείται με την ρύθμιση της θερμοκρασίας της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92 - 96°C, οπότε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες του DNA διασπώνται και προκύπτουν μονόκλωνα μόρια .



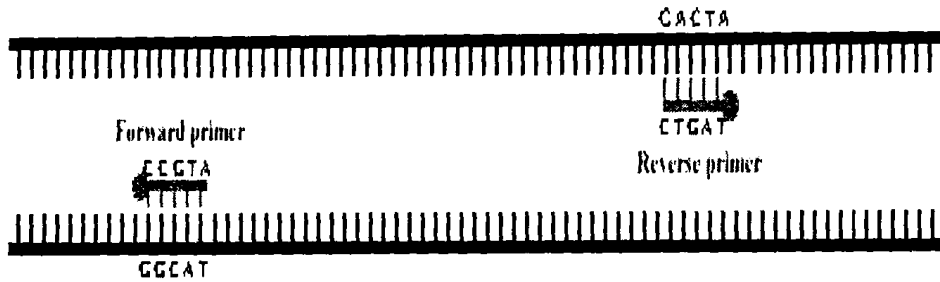
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing). Στο δεύτερο βήμα, η θερμοκρασία μειώνεται (45 - 65°C), ώστε να επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία οριοθετούν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές κατά το δυνατόν αλληλουχίες, ώστε να ευνοείται η πρόσδεσή τους μόνο με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' των εκκινητών μέσω της θερμοσταθερής DNA-πολυμεράσης (primer extension). Η σύνθεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA (Dieffenbach CW et al., 1995).

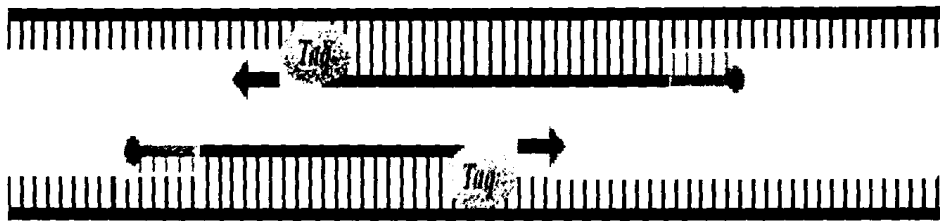
Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά στο διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 βάσεις. Το DNA γίνεται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (DNA Ladder) το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα (Dieffenbach CW et al., 1995).



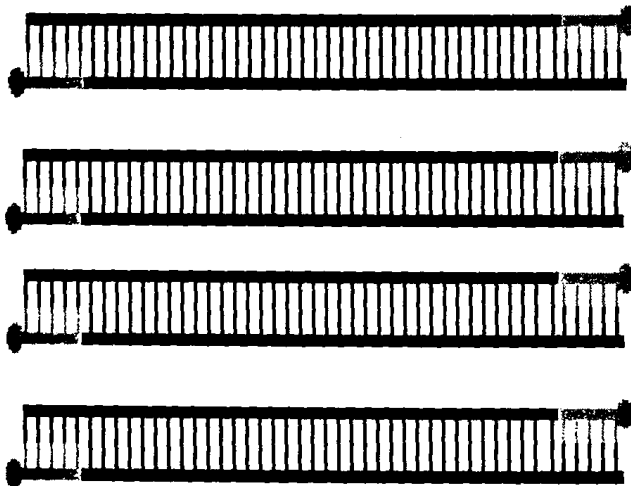
Polymerase Chain Reaction



Primers are added that match specific DNA sequences flanking the region of interest



Taq polymerase copies both strands by extending the primers.



After a number of cycles, many copies of the fragment located between the primers are created.

Εικόνα 2.8: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

2.14.1 Εκκινητές

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.7: Στοιχεία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

| A/A | ΟΝΟΜΑ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ | T _m (°C) |
|-----|------------|---|---------------------|
| 1 | TreYSF | 5' -GCG TTG ATG AAC CAC TCG AT- 3' | 52.3 |
| 2 | TreYSR | 5' -GGT GGT GTC TTC CAC ACC TT- 3' | 50.9 |
| 3 | TreZSF | 5' -GAC CGC CAT CGA ACT TTT AC- 3' | 51.4 |
| 4 | TreZSR | 5' -AGC AAA AGA AGG CGA ATG G- 3' | 52.1 |
| 5 | TreY1F | 5' -TTT CTA GAA GTG GGT GGT GTG GAG G- 3' | 59.3 |
| 6 | TreY1R | 5' -AGT CTA GAT CAA CGA GCC ATC GTT G- 3' | 57.7 |
| 7 | TreZ2F | 5' -ATC GCG AGC GCT TGA TCT CTA GTT CAT- 3' | 63.3 |
| 8 | TreZ1R | 5' -AGC TGC AGG CCA CCT CAA TCG AGG T- 3' | 66.6 |
| 9 | YOEF1NdeI | 5' -AAG GGT GTT TCC ATA TGG CA- 3' | 51.9 |
| 10 | YOER1NcoI | 5' -CTG TCT TCC CAT GGT CCA CC- 3' | 53.9 |
| 11 | ZOEF2NdeI | 5' -CTT TCA TAT GTG GGC TCC AC- 3' | 49.4 |
| 12 | ZOER1BglII | 5' -CTA AAT CAG ATC TCC GGC AA- 3' | 49.6 |

2.14.2 Σύσταση των αντιδράσεων PCR

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.8: Σύσταση των αντιδράσεων PCR

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK | ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ |
|--------------------------------------|---|--|
| dNTPs | 40 mM (4 x 10 mM) | 0.8mM (4 x 0.2 mM) |
| Primers | 10 μM ο καθένας | 0.3 μM ο καθένας |
| Buffer Phusion Buffer Dynazyme II | HF* 5X, 15 mM MgCl ₂ 10x, 15 mM MgCl ₂ | 1x, 1.5 mM MgCl ₂ 1x, 1.5 mM MgCl ₂ |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1 ή 5 mM |
| DMSO | 100% | 3 % |
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | DNA | |
| ENZΥΜΟ | Phusion, 2U/μL Dynazyme II, 2U/ μl | 1 U 3U |
| H ₂ O | | Για τελικό όγκο 50 μl |

*: High Fidelity



2.14.3. Προγράμματα PCR του θερμοκυκλοποιητή

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.9: PCR 1 "TREYZ2" - Primers: TREYSF / TREYSR / TREZSF / TREZSR

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 4 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 94°C | 1 min | 35 |
| Αναδιάταξη | 50°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.10: PCR 2 "TREYFR" - Primers: TREY1F / TREY1R

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 3 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 30 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 61°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 2 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.11: PCR 3 "TREZFR" - Primers: TREZ2F / TREZ1R

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|---------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 3 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 30 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 66°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1.5 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.12: PCR 4 "TREYZ2" - Primers: TREYSF / TREYSR

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 4 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 94°C | 1 min | 35 |
| Αναδιάταξη | 50°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.13: PCR 5 "TREYOEFR" – Primers: YOEF1NdeI / YOER1NcoI

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 3 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 30 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 52°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 2 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.14: PCR 6 "TREZOEFR" – Primers: ZOEF2NdeI / ZOER1BglII

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|---------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 3 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 30 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 49°C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1.5 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.15: PCR 7 "TREY1" – Primers: YOEF1NdeI / YOER1NcoI

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 1 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 10 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 52°C | 20 sec | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 30 sec | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 5 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.16: PCR 8 "TREY2" – Primers: YOEF1NdeI / YOER1NcoI

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-------------------|-------------|--------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 98°C | 2 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 98°C | 30 sec | 30 |
| Αναδιάταξη | 52°C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10 min | 1 |
| Ψύξη | 4°C | | |

2.15 ENZYMIKES ΔΟΚΙΜΕΣ

2.15.1 Προετοιμασία κυτταρικού εκχυλίσματος για τις ενζυμικές δοκιμές

- Εμβολιασμός 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου με προκαλλιέργεια (LB + Ar για *E. coli*, LB + Tc για *X. campestris*)
- Επαγωγή με 1 mM IPTG σε $OD_{600nm} = 0.5$.
- Συλλογή κυττάρων ($OD_{600nm} = 1$) στις 6000 rpm/4°C/15 min
- Πλύση
- Επαναιώρηση σε διάλυμα λύσης (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη)
- Θραύση κυττάρων σε σφαιρόμυλο (σφαιρίδια ζirkονίου με τρίλεπτες δονήσεις (5 φορές), μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται παραμονή στον πάγο για 1 min.
- Φυγοκέντρηση (12000 rpm/4°C/10 min)

Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τις ενζυμικές δοκιμές.

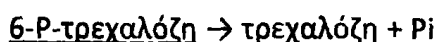
Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Lowry OH et al., 1951.

2.15.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας

Η ενεργότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων προσδιορίστηκε στο ακατέργαστο εκχύλισμα των κυττάρων *E. coli* ή *X. campestris*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των ακόλουθων αντιδράσεων που συνιστούν τη βιοσυνθετική πορεία OtsA/B σε μία συνδυαστική δοκιμασία:



[καταλυόμενη από την συνθάση της φωσφοτρεχαλόζης (TPS)]



[καταλυόμενη από τη φωσφατάση της φωσφοτρεχαλόζης (TPP)]

Η ενζυμική δραστηριότητα του TPS και του TPP αντιστοιχεί στον φωτομετρικό προσδιορισμό της απελευθέρωσης του ανόργανου φωσφόρου που απορροφά στα 630nm



μετά από συμπλοκοποίησή του με μολυβδαινικό αμμώνιο και πράσινο του μαλαχίτη (De Smet K.A.L. et al., 2000).

Το μίγμα της πρώτης αντίδρασης με τελικό όγκο 200 μl περιείχε:

- 10 mM G6P
- 10 mM UDPG
- 10 mM MgCl₂
- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 50 μg ολικής πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα που περιείχε κλώνο *otsA* (αντιστοιχεί στην TPS)

Ακολούθησε επώαση στους 37 °C / 30 min.

Ο τερματισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση στους 100°C/30 sec για την αδρανοποίηση του ενζύμου & ακολούθως ψύξη στους 0°C/5 min.

Κατόπιν προστέθηκαν στο μίγμα 100 μg ολικής πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα που περιείχε κλώνο *otsB* (αντιστοιχεί στην TPP).

Ακολούθησε επώαση στους 37 °C / 30 min.

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου προστέθηκε στο μίγμα διπλάσιος όγκος διηθημένου διαλύματος που αποτελείται από πράσινο του μαλαχίτη 0.15%, μολυβδαινικό αμμώνιο 1% και 12.5% (v/v) HCl.

Ακολούθησε επώαση 2 min για την ανάπτυξη του χρώματος και η απορρόφηση του μίγματος μετρήθηκε στα 630 nm.

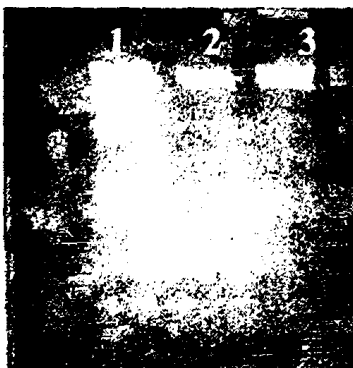
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν παρατηρηθεί ενεργότητα, θα οφείλεται στη δράση και των δύο ενζύμων. Αν, αντίθετα, δεν παρατηρηθεί ενεργότητα, τότε θα απουσιάζει ή η δράση της TPS, ή της TPP, ή και των δύο, αλλά δεν θα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε ποιο ένζυμο δεν είναι ενεργό.

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *treY* ΚΑΙ *treZ* ΑΠΟ ΤΑ *Corynebacterium glutamicum* ATCC21253 & *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21799.

Ο στόχος του ενός σκέλους της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση των γονιδίων που αντιστοιχούν στα *treY* και *treZ* από τα στελέχη *Corynebacterium glutamicum* ATCC21253 και *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21799 (στο εξής, *C. g.* 21253 και *B. l.* 21799). Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε η ενίσχυση μέσω PCR μικρών τμημάτων του εσωτερικού κάθε πιθανού γονιδίου, τα οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιούνταν ως ιχνηθέτες για τον εντοπισμό κάθε γονιδίου από το ολικό DNA κάθε βακτηρίου.

3.1.1 Απομόνωση ολικού DNA από τα *C. g.* 21253 και *B. l.* 21799.

Απομονώθηκε ολικό DNA από τα *C. g.* 21253 και *B. l.* 21799 (Υλικά και Μέθοδοι, §2.6). Η ηλεκτροφόρηση δείγματος αυτών φαίνεται στην Εικόνα 3.1. Το ολικό DNA φαίνεται καθαρό (ένδειξη η απουσία smear). Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για όλες τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR).



Διαδρομή 1: λ/*Hind*III

Διαδρομή 2: ολικό DNA *B. l.* 21799

Διαδρομή 3: ολικό DNA *C. g.* 21253

Εικόνα 3.1: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων άκοπου ολικού DNA

3.1.2 Ενίσχυση των εσωτερικών περιοχών των γονιδίων *treY* και *treZ*.

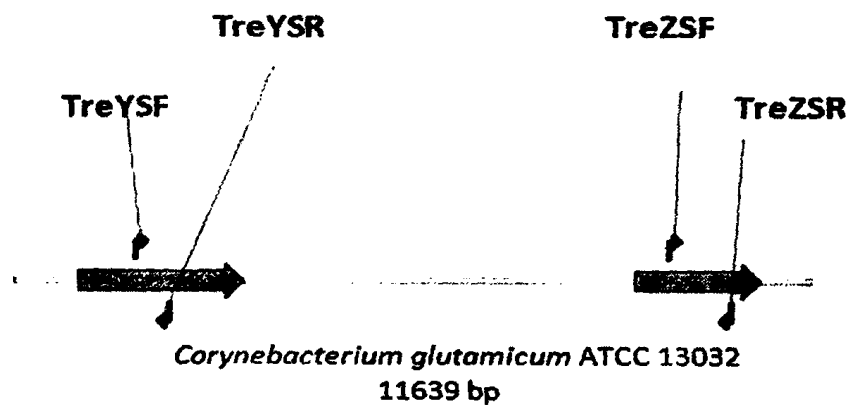
Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν γνωστές γονιδιωματικές αλληλουχίες στελεχών των:

- *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (Acc. No. BA000036)
- *Corynebacterium efficiens* (Acc. No. BA000035)

- *Corynebacterium jeikeium* (Acc. No CR931997)
- *Mycobacterium avium* (Acc. No CP000479),

στις οποίες έχουν βρεθεί *in silico* αναγνωστικά πλαίσια ανάλογα των *treY* και *treZ*.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 4 αυτών βακτηρίων που αντιστοιχούσαν στο αναγνωστικό πλαίσιο *treY* συγκρίθηκαν μεταξύ τους και εντοπίστηκαν οι πιο συντηρημένες περιοχές στο εσωτερικό τους. Πάνω σε αυτές σχεδιάστηκαν οι βέλτιστοι εκκινητές TreYSF – TreYSR με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 (βρίσκεται στο δικτυακό τόπο http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Όμοια επεξεργασία έγινε και για την περιοχή *treZ*, μετά από την οποία σχεδιάστηκαν οι εκκινητές TreZSF – TreZSR (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Θέση εκκινητών TreYSF-TreYSR & TreZSF-TreZSR στο γονιδίωμα του *C.g.* 13032

Οι εκκινητές TreYSF – TreYSR χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* και οι TreZSF – TreZSR γι’ αυτήν του *treZ* στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR1-TREYZ2 (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3) με υπόστρωμα το ολικό DNA των *C.g.* 21253 και *B.l.* 21799 και προσθήκη επιπλέον $MgCl_2$ 5 mM στο μείγμα όλων των δειγμάτων της αντίδρασης. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκαν και άλλες ζώνες εκτός της εκάστοτε αναμενόμενης, ειδικά στην περίπτωση της ενίσχυσης της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treZ*. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν παρουσιάστηκε

ενίσχυση, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Το πείραμα αυτής της PCR έγινε με χρήση της πολυμεράσης *Dynazyme II* και παρατηρήθηκε μικρή απόδοση. Σε όλες τις PCR που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *Phusion*, η οποία παρουσίασε σαφώς καλύτερη απόδοση.

Σύμφωνα με την αλληλουχία του οργανισμού *C. glutamicum* ATCC 13032, το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν 521 bp για το *treY* και 911 bp για το *treZ*.

Διαδρομή 1: λ/*HindIII*

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B.l.* 21799

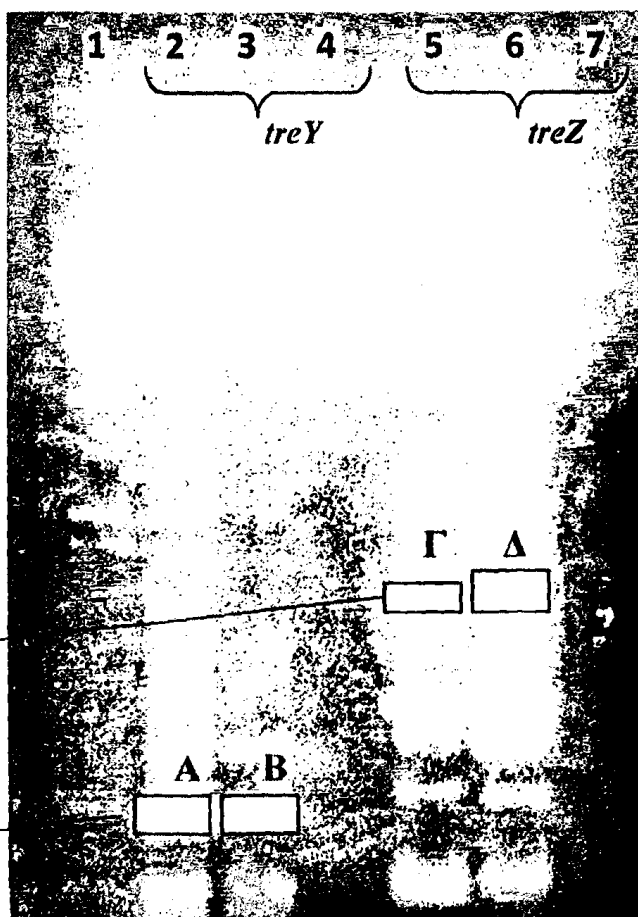
Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C.g.* 21253

Διαδρομή 4: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

Διαδρομή 5: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B.l.* 21799

Διαδρομή 6: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C.g.* 21253

Διαδρομή 7: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)



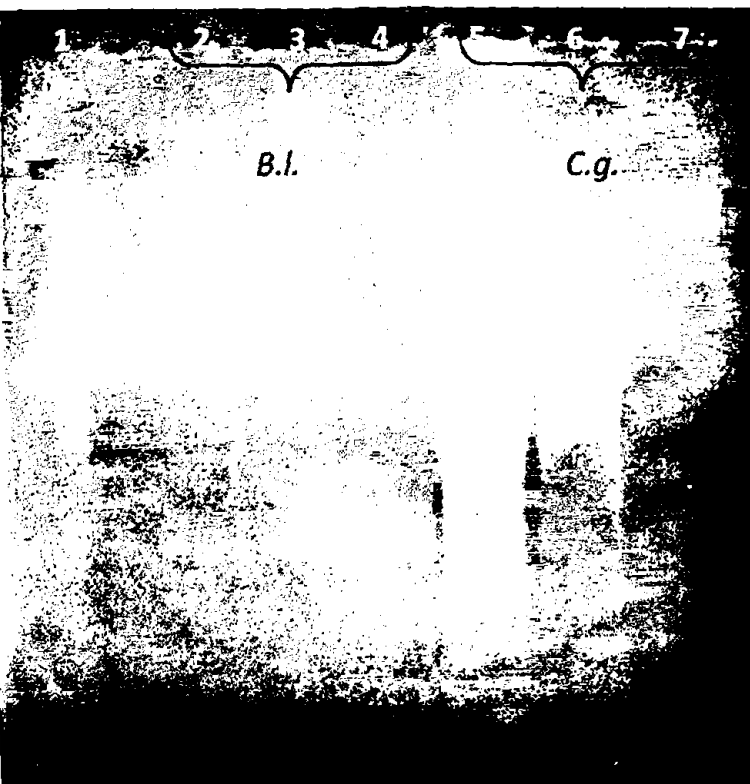
Η ζώνη που προέκυψε είναι μήκους περίπου 910bp και αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος για την εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treZ*.

Η ζώνη που προέκυψε είναι μήκους περίπου 520bp και αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος για την εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treY*.

Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR1-TREY22 (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.4)

3.1.3 Υβριδισμός της ζώνης A (εικ. 3.3) με πέψη του ολικού DNA των οργανισμών *B.l.* 21799 και *C.g.* 21253.

Για να επαληθευτεί η ορθότητα της προέλευσης, επιλέχθηκε ενδεικτικά η ζώνη A, απομονώθηκε σε ικανή ποσότητα, ιχνοθετήθηκε και χρησιμοποιήθηκε ενδεικτικά σε πειράματα υβριδισμού με ολικό DNA των *C. g.* 21253 και *B. l.* 21799, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με ένζυμα περιορισμού. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού φαίνονται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση

Διαδρομή 1: λ/*Hind*III

Διαδρομή 2: ολικό DNA *B. l.* 21799/*Bgl*II

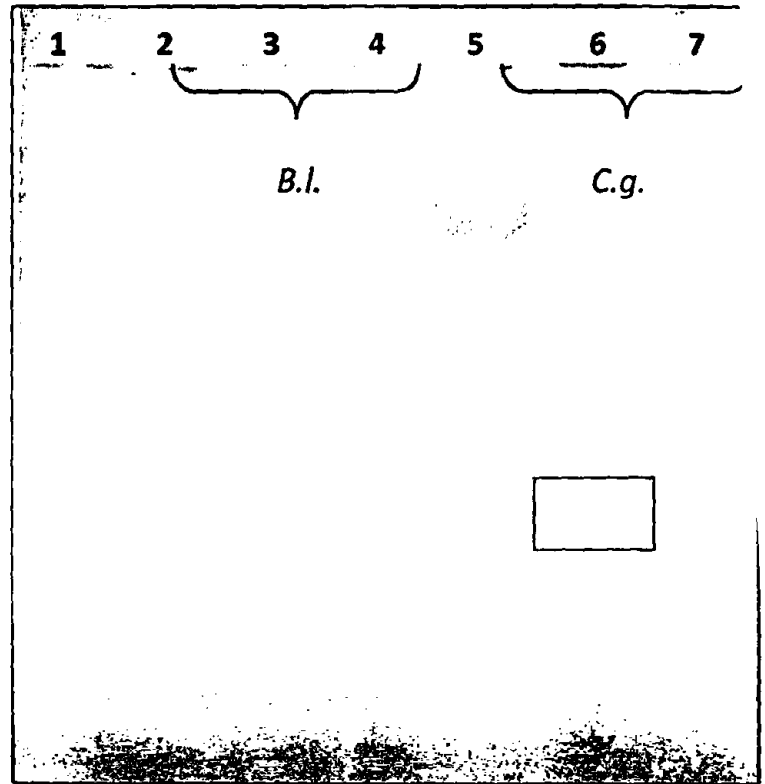
Διαδρομή 3: ολικό DNA *B. l.* 21799/*Pst*I

Διαδρομή 4: ολικό DNA *B. l.* 21799/*Xba*I

Διαδρομή 5: ολικό DNA *C. g.* 21253/*Bgl*II

Διαδρομή 6: ολικό DNA *C. g.* 21253/*Pst*I

Διαδρομή 7: ολικό DNA *C. g.* 21253/*Xba*I



Εικόνα 3.5: Υβριδισμός με ιχνηθέτη τη ζώνη A που αντιστοιχεί σε πιθανό τμήμα του *treY* του *B. lactofermentum*.

Στην ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι η ποσότητα του ολικού DNA του *B.l.* 21799 ήταν πολύ μικρή μετά τις πέψεις. Σε αυτό πιθανόν οφείλεται το γεγονός ότι ο ιχνηθέτης δεν υβρίδισε με τα δείγματα του *B.l.* 21799. Αντίθετα, εμφάνισε υβριδισμό με το *C.g.* 21253,

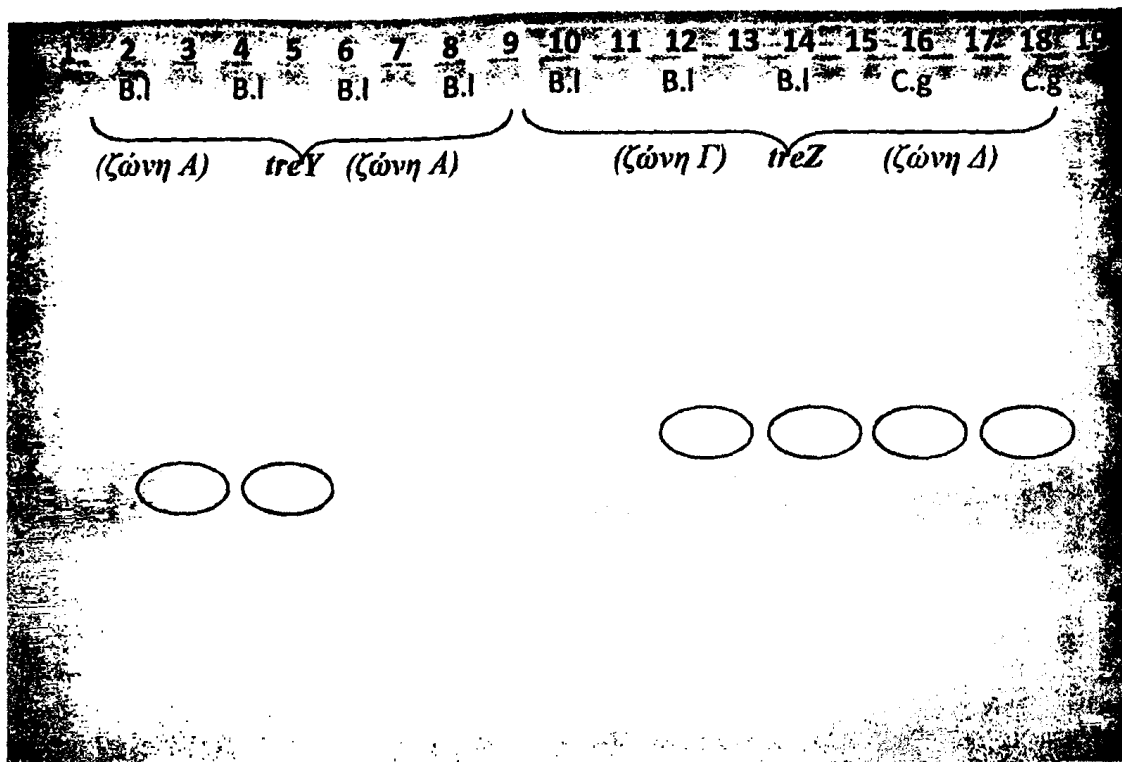
γεγονός αναμενόμενο, καθώς τα 2 βακτήρια είναι συγγενικά και είναι πιθανό να διαθέτουν παρόμοιες αλληλουχίες. Στη διαδρομή 5 παρουσιάζεται έντονο και εκτεταμένο σήμα από τον υβριδισμό, πιθανότατα υπερβολικά μεγάλης ποσότητας DNA, η οποία δεν επέτρεψε την πλήρη πέψη από το ένζυμο και το σωστό διαχωρισμό στην πορεία της ηλεκτροφόρησης. Στη διαδρομή 6 εμφανίζεται ασθενής υβριδισμός με ζώνη μικρού M.B.

Επιχειρήθηκε η απομόνωση και η κλωνοποίηση της περιοχής του ολικού DNA που εμφάνισε κάποιο υβριδισμό με τη ζώνη A για τυχόν εντοπισμό κάποιου κλώνου που θα περιείχε αλληλουχίες του γονιδίου *treY*. Τα πειράματα αυτά δεν είχαν επιτυχία.

3.1.4 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν στις εσωτερικές περιοχές των γονιδίων *treY* και *treZ*.

Για να διατηρηθεί το DNA των ζωνών A, B, Γ και Δ (εικόνα 3.3), ώστε να ανακτώνται για την περαιτέρω χρήση τους, πραγματοποιήθηκε δεσμοποίησή τους με τον φορέα pCR-Blunt μετά από κατάλληλη συμπύκνωσή τους. Ακολούθησε μετασηματισμός σε κύτταρα *E.coli* DH5a. Στη συνέχεια οι αποικίες που εμφανίστηκαν εξετάστηκαν ως προς την παρουσία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Παρατηρήθηκε επιτυχής κλωνοποίηση του DNA των ζωνών A, Γ και Δ που αντιστοιχούν στα προϊόντα PCR της εσωτερικής περιοχής των γονιδίων *treY* του *B. l.* 21799 και *treZ* των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253, όπως κατέδειξαν οι πέψεις των υποψήφιων κλώνων με *EcoRI*, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της ένθεσης (βλ. χάρτη pCR-Blunt, Υλικά & Μέθοδοι § 2.11.1). Στην Εικόνα 3.6 που ακολουθεί φάνηκε ότι οι κλώνοι 1, 2, 6, 7, 9 και 11 περιείχαν τις επιθυμητές ενθέσεις. Στην περίπτωση του DNA της ζώνης B, που αντιστοιχούσε στο προϊόν PCR της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* του *C. g.* 21253, δεν απομονώθηκαν κλωνοποιημένα προϊόντα, παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες.



Εικόνα 3.6: Αποτελέσματα πέψεων για τους υποψήφιους κλώνους με *EcoRI*

Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομές 2,4,6,8,10,12,14,16,18: πλασμιδιακό DNA υποψήφιων κλώνων 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 και 11 αντίστοιχα

Διαδρομές 3,5,7,9,11,13,15,17,19: υποψήφιοι κλώνοι 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 και 11/*EcoRI* αντίστοιχα

Στους κλώνους 1, 2, 6, 7, 9 και 11 πραγματοποιήθηκαν (i) περαιτέρω πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που περιέχουν θέσεις αναγνώρισης εντός της εσωτερικής περιοχής των αντίστοιχων γονιδίων του *C. g.* 13032 (βλ. χάρτες, σελ.112) και (ii) προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

Οι κλώνοι 1 και 2 δεν παρουσίασαν το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο στις παραπάνω πέψεις, η δε αλληλουχία τους παρουσίασε ομοιότητα με γονίδια υδρολασών *E.coli*. Το αποτέλεσμα αυτό σαφώς δεν αναμενόταν, εφόσον οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν βασίστηκαν σε συντηρημένες περιοχές του γονιδίου *treY* που αντιστοιχεί σε γονίδιο συνθάσης της μαλτοολιγοσυλ-τρεχαλόζης.

Οι κλώνοι 6 και 7 παρουσίασαν το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο στις παραπάνω πέψεις, οι δε αλληλουχίες τους εμφάνισαν ταύτιση τόσο μεταξύ τους, όσο και

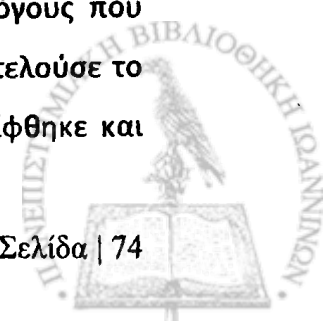
με την αντίστοιχη αλληλουχία της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*, μεγέθους 911 bp, του *C.g* 13032 (ακολουθεί η αλληλουχία).

```
GACCGCCATCGAACTTTTACCCGTGCAGCCCTTTGGCGGCAACCGCAATTGGGGCTACGACGGGGTGC
TGTGGCACGCCGTCCATGCAGGCTACGGCGGTCCGGCGGGCTTGAAAAGCTTATCGACGCCTCCCAC
CAGGCCGGCATCGCCGTCTACTTAGACGTCGTGTACAACCACTTCGGCCCCGACGGCAACTACAACGG
GCAATTTGGCCCCCTACACCTCTGGCGGCAGCACCGGCTGGGGCGACGTGGTCAACATCAACGGCCATG
ATTCAGATGAAGTCCGCAATATATTTCTCGACGCCGCACGCCAGTGGTTTGAAGATTTTCACGTTGAT
GGGCTCCGCCTCGATGCGGTGCATTCTCTCGATGATCGCGGCGCCTATTCCCTACTTGCAGCTGAC
CATGGTGGCCGAGGATGTCTCCGCACAAACAGGCATCCCACGCTCATTGATTGCAGAATCTGAACTCA
ATGACCCCAAGTTCGTTACCTCCCAGGCGGCGGCTTTTGGCCTGGATGCACAGTGGGTTGACGAT
ATCCACCACGCCCTCCATGCCCTCGTTTCTGGCGAACGCAATGGTTATTACAGCGATTTCCGGATCTGT
CGACACATTAGCCAAAACCCCTGCGTGAAGTATTTGAACACACCCGGAACTACTCCACGTACCGCGGAC
GCAACCACGGCCGCCCTGTGCACCCCGATATCACCCCTGCCTCGCGCTTTGTACCTACACCACCACC
CATGATCAGACCGGCAACCGCGCAATCGGGCACCCTCCTTCCACGACTCTCACCCCGGAACAGCAGGT
GTTGAAGGCAGCCATATCTACAGCTCGCCGTATACCCCGATGTTGTTTATGGGTGAAGAATTCGGAG
CCACCACCCCATTCGCCTTCTTTTGCT
```

Οι κλώνοι 9 και 11 παρουσίασαν το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο στις παραπάνω πέψεις. Οι αλληλουχίες ήταν πανομοιότυπες μεταξύ τους και σχεδόν ταυτίζονταν με την αντίστοιχη αλληλουχία της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* (εκτός δύο νουκλεοτιδίων που σημειώνονται με κόκκινο), μεγέθους 911 bp, του *C.g*. 13032 (ακολουθεί η αλληλουχία).

```
GACCGCCATCGAACTTTTACCCGTGCAGCCCTTTGGCGGCAACCGCAATTGGGGCTACGACGGGGTGC
TGTGGCACGCCGTCCATGCAGGCTACGGCGGTCCGGCGGGCTTGAAAAGCTTATCGACGCCTCCCAC
CAGGCCGGCATCGCCGTCTACTTAGACGTCGTGTACAACCACTTCGGCCCCGACGGCAACTACAACGG
GCAATTTGGCCCCCTACACCTCTGGCGGCAGCACCGGCTGGGGCGACGTGGTCAACATCAACGGCCATG
ATTCAGATGAAGTCCGCAATATATTTCTCGACGCCGCACGCCAGTGGTTTGAAGATTTTCACGTTGAT
GGGCTCCGCCTCGATGCGGTGCATTCTCTCGATGATCGCGGCGCCTATTCCCTACTTGCAGCTGAC
CATGGTGGCCGAGGATGTCTCCGCACAAACAGGCATCCCACGCTCATTGATTGCAGAATCTGAACTCA
ATGACCCCAAGTTCGTTACCTCCCAGGCGGCGGCTTTTGGCCTGGATGCACAGTGGGTTGACGAT
ATCCACCACGCCCTCCATGCCCTCGTTTCTGGCGAACGCAATGGTTATTACAGCGATTTCCGGATCTGT
CGACACATTAGCCAAAACCCCTGCGTGAAGTATTTGAACACACCCGGAACTACTCCACGTACCGCGAAC
GCAACCACGGCCGCCCTGTGCACCCCGATATCACCCCTGCCTCGCGCTTTGTACCTACACCATCACC
CATGATCAGACCGGCAACCGCGCAATCGGGCACCCTCCTTCCACGACTCTCACCCCGGAACAGCAGGT
GTTGAAGGCAGCCATATCTACAGCTCGCCGTATACCCCGATGTTGTTTATGGGTGAAGAATTCGGAG
CCACCACCCCATTCGCCTTCTTTTGCT
```

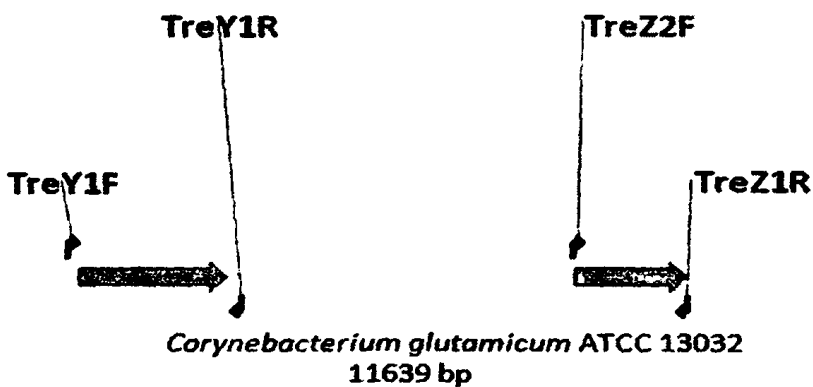
Από τα αποτελέσματα του υβριδισμού (Εικόνα 3.5) συμπεραίνεται ότι η απομόνωση των γονιδίων από το ολικό DNA των οργανισμών ήταν αδύνατη για τους λόγους που αναφέρθηκαν. Επίσης, στάθηκε αδύνατο να κλωνοποιηθεί η ζώνη που θα αποτελούσε το σωστό ιχνηθέτη για το γονίδιο του *treY*. Επομένως η μέθοδος αυτή εγκαταλείφθηκε και επιχειρήθηκε διαφορετική προσέγγιση.



3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΟΛΟΚΛΗΡΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *treY* ΚΑΙ *treZ*.

3.2.1 Σχεδιασμός εκκινήτων & πειράματα PCR

Επιχειρήθηκε η ενίσχυση με PCR περιοχών στο γονιδίωμα των *B.l.* 21799 και *C.g.* 21253 που να περιλαμβάνουν ολόκληρα τα γονίδια *treY* και *treZ* μαζί με τις ανοδικές αλληλουχίες του υποκινητή τους. Για την απομόνωση των γονιδίων *treY* και *treZ* από τα *B.l.* 21799 και *C.g.* 21253 χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του *C.glutamicum* 13032 που αντιστοιχεί στο κάθε αναγνωστικό πλαίσιο και πάνω σε αυτήν σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες TreY1F – TreY1R και TreZ2F – TreZ1R (Εικόνα 3.7) για την ενίσχυση των γονιδίων *treY* και *treZ*, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.7: Θέση εκκινήτων TreY1F-TreY1R & TreZ2F-TreZ1R στο γονιδίωμα του *C.g.* 13032

Για την ενίσχυση της περιοχής *treY* πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR2-TREYFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3). Η επιπλέον προσθήκη $MgCl_2$ (1 mM) ήταν καταλυτική για την εμφάνιση των ζωνών με το επιθυμητό μέγεθος. Στην PCR με υπόστρωμα ολικού DNA από *C.g.* 21253 εμφανιζόταν και πάλι πληθώρα ζωνών επιπλέον της αναμενόμενης ζώνης DNA. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση.

Για την περιοχή του γονιδίου *treY*, σύμφωνα με την αλληλουχία του *C. glutamicum* 13032, το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν 2872 bp.

Διαδρομή 1: λ/HindIII

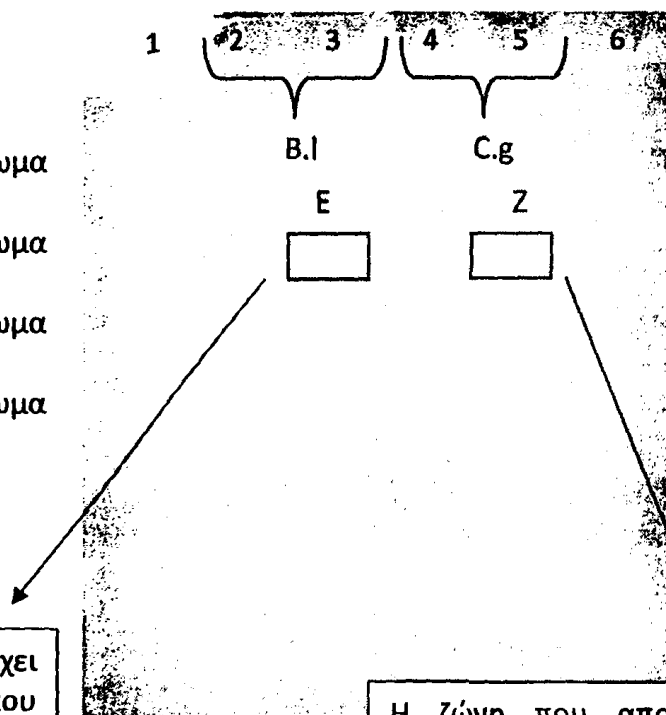
Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B. l.* 21799

Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B.l.* 21799 + MgCl₂

Διαδρομή 4: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. g.* 21253

Διαδρομή 5: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. g.* 21253 + MgCl₂

Διαδρομή 6: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)



Η ζώνη που απομονώθηκε έχει μήκος περίπου 2,9 kb, που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου *treY* με τις εκατέρωθεν αλληλουχίες, βάσει των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Η ζώνη που απομονώθηκε έχει μήκος περίπου 2,9 kb, που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου *treY* με τις εκατέρωθεν αλληλουχίες, βάσει των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR2-TREYFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3)

Για την ενίσχυση της περιοχής *treZ* πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR3-TREZFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3). Σε αυτή την περίπτωση η επιπλέον προσθήκη MgCl₂ (1 mM) είχε ως αποτέλεσμα μάλλον την μείωση της ποσότητας του προϊόντος στο δείγμα με υπόστρωμα ολικό DNA του *B. l.* 21799. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση. Για την περιοχή του γονιδίου *treZ*, σύμφωνα με την αλληλουχία του *C. glutamicum* 13032, το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης ήταν 1892 bp.

Διαδρομή 1: λ/*Hind*III

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B. l.* 21799

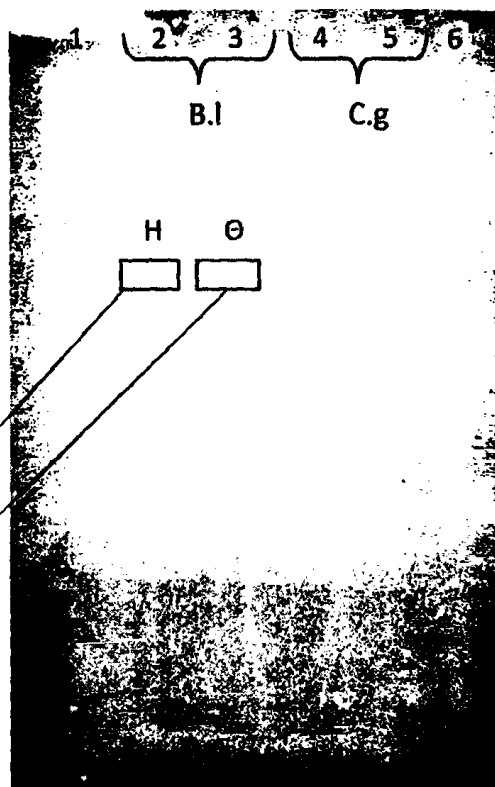
Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *B. l.* 21799 + MgCl₂

Διαδρομή 4: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. g.* 21253

Διαδρομή 5: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. g.* 21253 + MgCl₂

Διαδρομή 6: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

Η ζώνη που απομονώθηκε είναι μήκους περίπου 1,9 kb, που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου *treZ*.

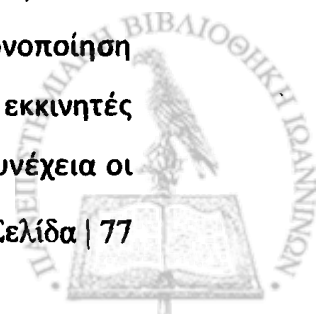


Εικόνα 3.9: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR3-TREZFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3)

Όπως φαίνεται από τις διαδρομές 4 και 5, η περιοχή του γονιδίου *treZ* του *C. g.* 21253 δεν ενισχύθηκε, παρά τις επανειλημμένες απόπειρες. Η συγκεκριμένη περιοχή δεν κατέστη δυνατό να ενισχυθεί στα πλαίσια αυτής της εργασίας, ενώ οι ζώνες E, Z, H και Θ χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για υποκλωνοποίηση σε κατάλληλο φορέα.

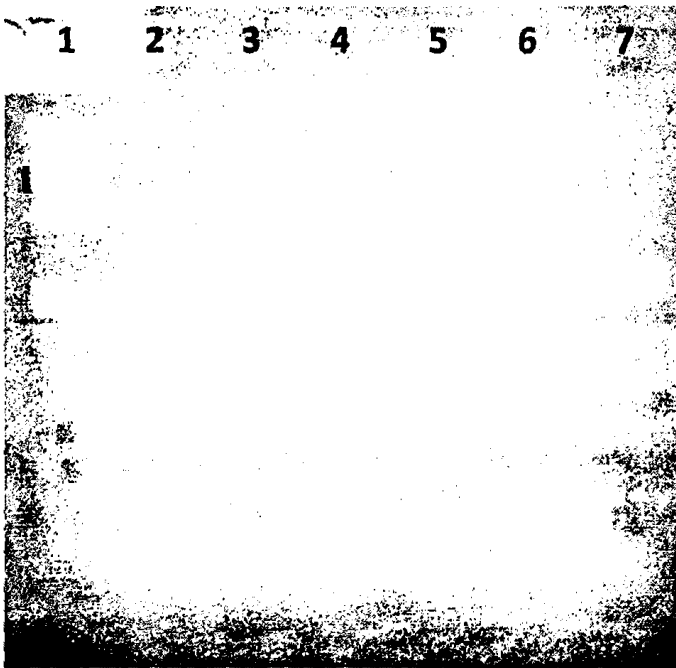
3.2.2 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν στα γονίδια *treY* και *treZ*.

Πραγματοποιήθηκε δεσμοποίηση με το φορέα pCR-Blunt μετά από συμπύκνωση δειγμάτων των απομονωμένων ζωνών E, Z (προϊόντα PCR της περιοχής *treY* των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253, αντίστοιχα), H και Θ (προϊόντα PCR της περιοχής *treZ* του *B. l.* 21799). Για το προϊόν PCR της περιοχής *treY* του *B. l.* 21799 πραγματοποιήθηκε επιπλέον κλωνοποίηση και στο φορέα pUC19 στη θέση *Xba*I, για την οποία φέρουν θέση αναγνώρισης οι εκκινητές TreY1F και TreY1R. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* DH5α. Στη συνέχεια οι



αποικίες που εμφανίστηκαν εξετάστηκαν με περιοριστικές πέψεις ως προς την παρουσία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής για τα προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στις περιοχές *treY* και *treZ* του *B. l.* 21799, ενώ το προϊόν που αντιστοιχεί στην περιοχή *treY* του *C. g.* 21253 (ζώνη Z) δεν εμφανίστηκαν αποικίες με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, παρά τις επανειλημμένες απόπειρες κλωνοποίησης.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των πέψεων στους πιθανούς κλώνους της περιοχής *treY* του *B. l.* 21799 (ζώνη E) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.10.



Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομές 2,4,6: πλασμιδιακό DNA υποψήφιων κλώνων 12, 13, και 14 αντίστοιχα

Διαδρομές 3,5,7: υποψήφιοι κλώνοι 12,13/EcoRI και 14/XbaI αντίστοιχα

Εικόνα 3.10: Ηλεκτροφόρηση υποψήφιων κλώνων με ένθεση την αλληλουχία της ζώνης E (*treY* του *B. l.* 21799). Οι κλώνοι 12 και 13 έχουν ως φορέα το pCR-Blunt και ο 14 το pUC19.

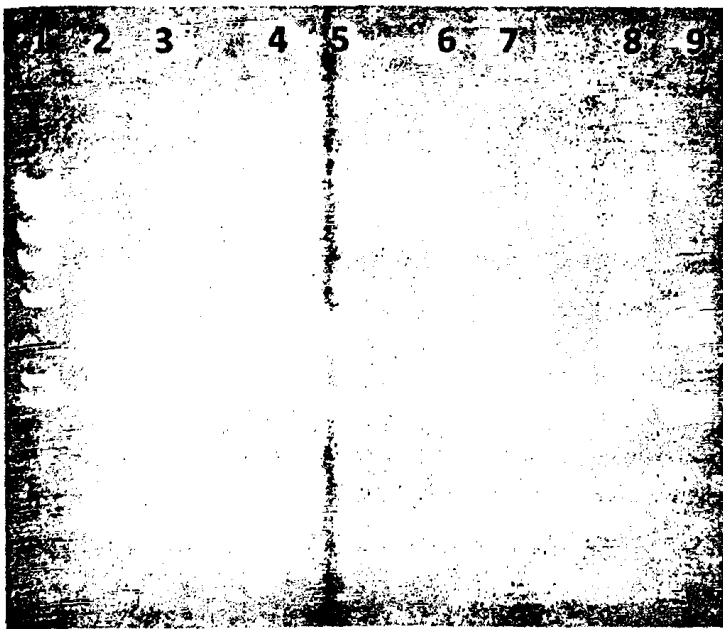
Από την ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι μόνον ο κλώνος 13 παρουσίασε το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο σύμφωνα με το δυνητικό γονίδιο *treY* του *C. glutamicum* 13032 (βλ. χάρτη, σελίδα 112). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του σε μήκος περίπου 1000 bp συνολικά εκατέρωθεν της ένθεσης σχεδόν ταυτιζόταν με το γονίδιο *treY* του *C. glutamicum* ATCC 13032 (εκτός δύο νουκλεοτιδίων που σημειώνονται με κόκκινο).

ΚΛΩΝΟΣ 13

```
AAATCTTTTTCCCACGCAGGGAAGGCGTGAACACTAAGATCGAGGACGTACCGCACGATTTTGCCTAA
CTTTTAAGGGTGTTCATCATGGCACGTCCAATTTCCGCAACGTACAGGCTTCAAATGCGAGGACCTC
AAGCAGATAGCACCGGGCGTTTCTTTGGTTTTTCGCGCAAGCCAAAGCACAGCTTCCCTATCTGAACAAG
CTAGGCATCAGCCACCTGTACCTCTCCCCTATTTTTACAGCCATGCCAGATCCAATCATGGCTACGA
TGCCCTTGATCCCACCGCCATCAATGAATAGCTCGGTGGCCTGGAGGGTCTTCGAGATCTTGCTGTAA
CTACACACC.....ATTACACCGCCAGAGAACAAGTCTGGAGCGCCTGCAAACCTGGGATTGGACGC
AGGTTAATTCCGTAGAAGACTTGGTGGATAACGCCGACATCGCCAAAATGGCCGTGGTCCATAAATCC
CTCGAGTTGCGTGCTGAATTTCTGCAAGCTTTGTTGGTGGAGATCATCAGGCAGTATTTGGCGAAGG
TCGCGCAGAATCCCACATCATGGGCATCGCCCGCGGTACAGACCGAAACCACCTCAACATCATTTGCTC
TTGCTACCCGTGACCACTGATCTTGGAAGACCGTGGCGGATGGTATGACACCACCGTCACGCTTCCT
GGTGGACAATGGGAAGACAGGCTCACCGGGCAACGCTTCAGTGGTGTGTCCCAGCCACCGATTTGTT
CTCACATCTACCCGTATCTTTGTTGGTTTTAGTACCCGATAGTGAGTTTTGATCCCTGCACAGGAAAG
TTAGCGGCGCTACTATGAACGATCGATATGTCTGACAACACTCTCTCCCAATTTGGCAGTTACTACCA
CGAATTCGACGTGCCCATCCCATGGCCGACGTGGAATTCCTCCTAGCAATTGAAGAATTA CTACAG
ACGGTGGTGTCACTTCGATCGCGTCAACCACACGCATCAAAGAATGGTCAAGCCTGAAAGCCAAGGCT
CGCAAGCGTTCGCGACGATGGCTCGTTGATCTAGAC
```

Τα αποτελέσματα των πέψεων στους πιθανούς κλώνους της περιοχής *treZ* του *B. l.* 21799 (ζώνες H, Θ) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.11 που ακολουθεί.

Από την ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι όλοι οι κλώνοι που εξετάστηκαν παρουσίασαν το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο σύμφωνα με το δυνητικό γονίδιο *treZ* του *C. glutamicum* 13032 (βλ. χάρτη, σελίδα 112). Επιλέχθηκαν οι κλώνοι 16 και 18 για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους.



Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομές 2,4,6,8: πλασμιδιακό DNA υποψήφιων κλώνων 15, 16, 17 και 18 αντίστοιχα

Διαδρομές 3,5,7,9: υποψήφιοι κλώνοι 15, 16, 17, 18/*Bam*HI & *Pst*I

Εικόνα 3.11: Ηλεκτροφόρηση υποψήφιων κλώνων 15, 16 και 17 με ένθεση την αλληλουχία της ζώνης H (*treZ* από *B.l.*) και ο κλώνος 18 με ένθεση την αλληλουχία της ζώνης Θ (*treZ* από *B.l.* + $MgCl_2$).

Τα αποτελέσματα του κλώνου 16 έδειξαν πλήρη ομοιότητα με το γονίδιο *treZ* του *C. glutamicum* ATCC 13032 σε μήκος περίπου 1400 bp εκατέρωθεν.

Κλώνος 16

ATCGCGAGCGCTTGATCTCTAGTTCATGCTCAAAGACTTGACCGGCCTGAGGGAGTTGGTATTGCGTG
AGATGTGCCATAGCATCTCACATCTTAGCTCGCCAACCGGCAGCATTTTCACTAGCCTGGTGGCCATG
TTGACCTCGCAAAGCTTTTTCAGTGTGGGCTCCACTTCCCCACGATGTACATCTGATCCTCAACGGCGA
AACCCCTCCCATGCACAAAACGGAGGGCAGCTGGTGGCGCGCCGAGATCGCGCCCAAGGCCGGCGATC
GTTACGGTTTTTCGCTTTTCGACGGCTCCTCCTGGTCAAAAACCCTCCCCGATCCCCGCTCCACATCT
CAACCAGACGGGGTTCATGGTTTAAGTGAAGTCTCCGATGATTCCCTATCTGTGGGGTGACCAGCAGTG
GACTGGCCGAATTCTCCCTGGCTCGGTGTTATATGAGCTGCATGTGGGCACCTTTAGTGAAGATGGAA
CGTTTGAGGGAGTCGTCGACAAGCTTCCTTATCTGCGCGACCTCGGCGTGACCGCCATCGAACTTTTA
CCCGTGCAGCCCTTTGGCGGCAACCGCAATTGGGGCTACGACGGGGTGCTGTGGCACGCCGTCCATGC
AGGCTACGGCGGTCCGGCGGGCTTGAAAAAGCTTATCGACGCCTCCCACCAGGCCGGCATCGCCGTCT
ACTTAGACGTCGTGTACAACCACTTCGGCCCCGACGGCAAC.....ACGTACCGCGGACGCAACCACGGC
CGCCCTGTGCACCCCGATATCACCCCTGCCTCGCGCTTTGTACCTACACCACCACCCATGATCAGAC
CGGCAACCGCGCAATCGGCGACCGTCTTCCACGACTCTCACCCGGAACAGCAGGTGTTGAAGGCAG
CCATTATCTACAGCTCGCCGTATACCCCGATGTTGTTTATGGGTGAAGAATTCGGAGCCACCACCCCA
TTCGCCTTCTTTTGCTCCACACCGACCCCGAGCTCAACCGCCTAACCTCCGAGGGCCGAAACGGGA
ATTTCGCACGCCTTGGCTGGAACGCCGACGACATCCCTCCCCGAGCTGGAATCCACCTTACCTCCT
CCAAACTCGATTGGGAGTTCACTGCGGAGCAGCGCCGCATCAACGACGCTTACAAGCAGCTGTTGCAC
CTGCGGCACACCTTGGGCTTCTCCCAACCAAACTTGTCTCACACTCGAGGTTGAGCACGGCGAGAACTG
GCTATCGATGGCCAATGGTTCGCGGCCGAATTCTGGCGAATTTCTCCGACGACACCATCACCGTCCCGC
TTGGCGGCGAGCTGATTTACAGCTTCACTTCCCCACCGTCAACGACACCTCCACAACCCTTACGCCG
TGGGGCTTTGCGATCCTGACCCGAAACTAGAAAAAGGCCACCTCGATTGAGGTGGCCTGCAGCT

Όμοια με τον προηγούμενο κλώνο, τα αποτελέσματα του κλώνου 18 έδειξαν πλήρη ομοιότητα με το γονίδιο *treZ* του *C. glutamicum* ATCC 13032 σε μήκος περίπου 1400 bp εκατέρωθεν.

Κλώνος 18

ATCGCGAGCGCTTGATCTCTAGTTCATGCTCAAAGACTTGATCAGCCTGAGGGAGTTGGTATTGCGTG
AGATGTGCCATAGCATCTCACATCTTAGCTCGCCAACCGGCAGCATTTTCACTAGCCTGGTGGCCATG
TTGACCTCGCAAAGCTTTTTCAGTGTGGGCTCCACTTCCCCACGATGTACATCTGATCCTCAACGGCGA
AACCCCTCCCATGCACAAAACGGAGGGCAGCTGGTGGCGCGCCGAGATCGCGCCCAAGGCCGGCGATC
GTTACGGTTTTTCGCTTTTCGACGGCTCCTCCTGGTCAAAAACCCTCCCCGATCCCCGCTCCACATCT
CAACCAGACGGGGTTCATGGTTTAAGTGAAGTCTCCGATGATTCCCTATCTGTGGGGTGACCAGCAGTG
GACTGGCCGAATTCTCCCTGGCTCGGTGTTATATGAGCTGCATGTGGGCACCTTTAGTGAAGATGGAA



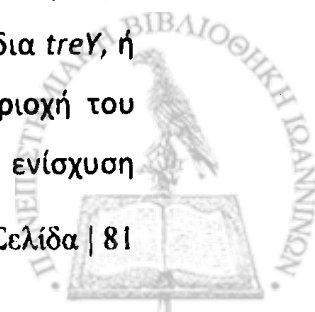
CGTTTGAGGGAGTCGTCGACAAGCTTCCTTATCTGCGCGACCTCGGCGTGACCGCCATCGAGCTTTTACCCGTGCAGCCCTTGGCGGCAACCGCAATTGGGGCTACGACGGGGTGCTGTGGCACGCCGTCCATGCAGGCTACGGCGGTCCGGCGGGCTTGAAAAAGCTTATCGACGCCTCCCACCAGGCCGGCATCGCCGTCTACTTAGACGTCGTGTACAAC.....ACACACCGGAAACTACTCCACGTACCGCGGACGCAACCACGGCCGCCCTGTGCACCCCGATATCACCCCTGCCTCGCGCTTTGTACCTACACCACCACCCATGATCAGACCGGCAACCGCGCAATCGGCGACCGTCTTCCATGACTCTCACCCCGGAACAGCAGGTGTTGAAGGCAGCCATTATCTACAGCTCGCCGTATACCCCGATGTTGTTTATGGGTGAAGAATTTCGGAGCCACCACCCCGTTCGCTTTCTTCTGCTCGCATACCGACCCCGAGCTCAACCGCCTAACCTCCGAGGGCCGCAAACGGGAATTCGCACGCCTTGGCTGGAACGCCGACGACATCCCTCCCGGAGCTGGAATCCACCTTCACCTCCTCCAAACTCGATTGGGAGTTCACTGCGGAGCAGCGCCGCATCAACGACGCTTACAAGCAGCTGTTGCACCTGCGGCACACCTTGGGCTTCTCCCAACCAAACCTTGCTCACACTCGAGGTTGAGCACGGCGAGAACTGGCTATCGATGGCCAATGGTCGCGGCCGAATTCTGGCGAATTTCTCCGACGACACCATCACCGTCCCGCTTGGCGGCGAGCTGATTTACAGCTTCACTTCCCCACCGTCACCGACACCTCCACAACCCCTTCAGCCGTGGGCTTTGCGATCCTGACCCGAAACTAGAAAAAGGCCACCTCGATTGAGGTGGCCTGCAGCT

Επισημαίνεται, ότι οι κλώνοι 16 και 18 προέρχονται από το ίδιο προϊόν PCR με υπόστρωμα το *B.l.* 21799 (ζώνες Η και Θ, αντίστοιχα, Εικόνα 3.9), όπου η Θ προέκυψε με επιπλέον προσθήκη $MgCl_2$.

3.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *treY* ΑΠΟ ΤΟ *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21799 ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΝ ΚΛΩΝΟ 13.

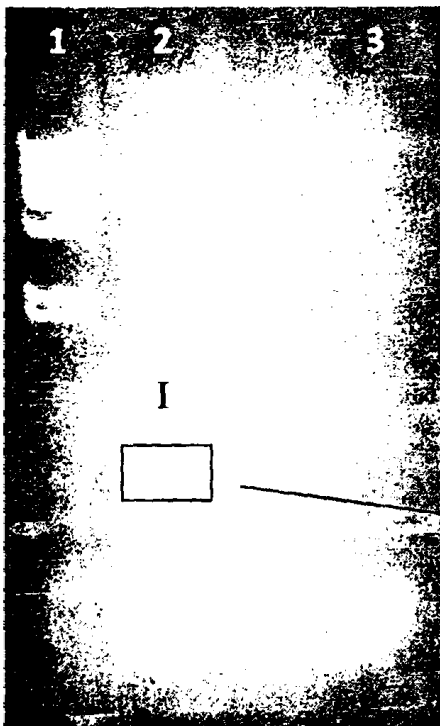
Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.1.4, στην περίπτωση της ενίσχυσης της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* από υπόστρωμα ολικό DNA του *B. l.* 21799, το προϊόν PCR που κλωνοποιήθηκε παρουσίασε νουκλεοτιδική ομολογία με γονίδια υδρολασών *E. coli* και όχι με αντίστοιχες περιοχές γονιδίων *treY*.

Μετά από την απομόνωση και κλωνοποίηση της περιοχής που αντιστοιχούσε σε ολόκληρο το γονίδιο *treY* του *B. l.* 21799, όπως φάνηκε και από μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που προσδιορίστηκε (κλώνος 13), επιχειρήθηκε ξανά η ενίσχυση της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* του *B. l.* 21799, αυτή τη φορά με υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA του κλώνου 13. Ανάλογα με το αποτέλεσμα, θα εξαγονταν συμπεράσματα για το αν το εσωτερικό του γονιδίου παρουσιάζει πράγματι ομολογία με γονίδια υδρολασών *E. coli*, και είναι επομένως διαφορετικό από τα γνωστά γονίδια *treY*, ή το προϊόν της PCR προερχόταν από τη δέσμευση των εκκινητών σε άλλη περιοχή του γονιδιώματος του *B. l.* 21799 με την οποία παρουσίαζαν ομολογία. Για την ενίσχυση



χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές TreYSF – TreYSR που είχαν χρησιμοποιηθεί και στην ενίσχυση της εσωτερικής περιοχής του *treY* από υπόστρωμα το ολικό DNA του *B. l.* 21799 και το ένζυμο *DynaZyme* με επιπλέον προσθήκη $MgCl_2$ 1 mM.

Όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR4 που ακολουθεί (Εικόνα 3.12), προέκυψε μία ζώνη στο επιθυμητό μέγεθος με την αναμενόμενη (521 bp). Στον αρνητικό μάρτυρα δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση.



Διαδρομή 1: λ /HindIII

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA από κλώνο 13 (*treY*, *B. l.* 21799)

Διαδρομή 3: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

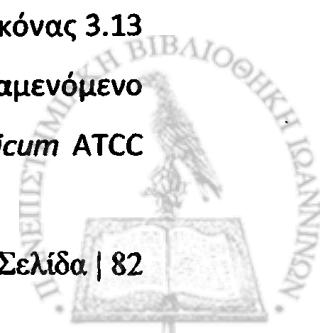
Η ζώνη που προέκυψε, μεγέθους περίπου 520bp, αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*.

Εικόνα 3.12: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR4-TREYZ2 (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3) για την ενίσχυση της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*

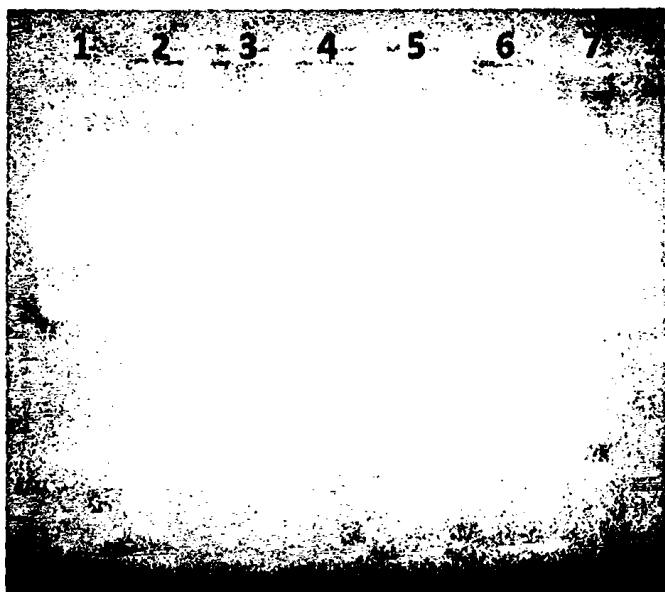
3.3.1 Κλωνοποίηση της αλληλουχίας της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*.

Το προϊόν της παραπάνω PCR δεσμοποιήθηκε στο φορέα pCR-Blunt και ακολούθησε μετασηματισμός σε κύτταρα *E.coli* DH5a. Στη συνέχεια οι αποικίες που εμφανίστηκαν εξετάστηκαν ως προς την παρουσία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με πέψεις από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*.

Τα αποτελέσματα της πέψης παρουσιάζονται στην ηλεκτροφόρηση της εικόνας 3.13 που ακολουθεί, από την οποία φαίνεται ότι ο κλώνος 19 παρουσίασε το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο σύμφωνα με την αντίστοιχη αλληλουχία του *C. glutamicum* ATCC



13032. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του έδειξε σχεδόν πλήρη ταύτιση (διαφορά σε 6 νουκλεοτίδια) με την αντίστοιχη εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treY* του *C. glutamicum* ATCC 13032.



Διαδρομή 1: λ /HindIII
Διαδρομές 2,4,6: πλασμιδιακό DNA
υποψήφιων κλώνων 19, 20 και 21
αντίστοιχα
Διαδρομές 3,5,7: υποψήφιοι κλώνοι 19,
20 και 21/EcoRI

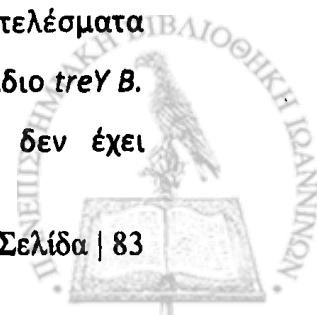
Εικόνα 3.13: Ηλεκτροφόρηση υποψήφιων κλώνων 19, 20, και 21 με ένθεση την αλληλουχία της ζώνης I (*treY* από κλώνο 13).

Κλώνος 19

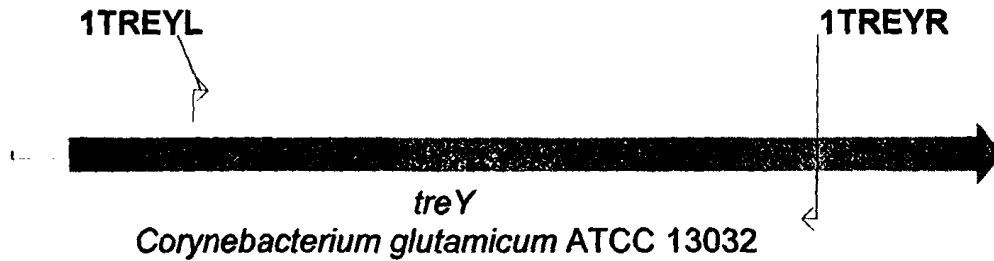
```
CGCAACAAGAACTCGCAGCCGAAATCTTAAGGCTCGCCCGGCCATGCGCCGCGATAACTTCTCCACC  
GCAGGCACCAACGTCACCGAAGACAAACTTAGCGAAACCATCATCGAATTAGTCGCGGCCATGCCCGT  
CTACCGCGCCGACTACATCTCCCTCTCACGCACCACCGCCACCGTCATCGCGGAGATGTCCAAACGCT  
TCCCCCTCCCGGCGCGACGCACTCGACCTCATCTCGGCCGCCCTATTTGGCAATGGCGAGGCCAAAATC  
CGCTTCGCCCAAGTCTGCGGCCCGTCATGGCCAAAGGTGTGGAAGACACCACCTTCTACCGCGCATC  
TAGGCTCGTTGCACTGCAAGAAGTCGGTGGCGCGCCGCACTCGA
```

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η περιοχή που αντιστοιχεί στο γονίδιο *treY* του *B. l.* 21799 παρουσιάζει ομοιότητα με τα συνηθισμένα γονίδια *treY*. Άρα, το προϊόν της PCR που ενισχυόταν με τους εκκινητές TreYSF – TreYSR προερχόταν πιθανότατα από τη δέσμευσή τους σε άλλη περιοχή του γονιδιώματος του *B. l.* 21799.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που προσδιορίστηκε από τα παραπάνω αποτελέσματα καλύπτει συνολικά τα άκρα και το μέσον της περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο *treY* *B. l.* 21799, ενώ παραμένουν δύο ενδιάμεσες περιοχές, στις οποίες αυτή δεν έχει



προσδιοριστεί. Προκειμένου να γίνει αυτό, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές 1TREYL - TGAATCCTTGATGGTGCTCA και 1TREYR - ATCGGGATCTACCAGGGAGT, με σκοπό τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στις δύο αυτές ενδιάμεσες περιοχές (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14: Θέση εκκινητών 1TREYL - 1TREYR στο γονίδιο *treY* του *C.g.* 13032

Η αλληλουχία που προσδιορίστηκε αντιστοιχούσε σε μια περιοχή 802 bp, η οποία αντιστοιχούσε στο κέντρο του γονιδίου και εμφάνισε πολύ μεγάλη ομοιότητα (διαφορά σε 6 νουκλεοτίδια) με την αντίστοιχη κεντρική περιοχή του γονιδίου *treY* του *C. glutamicum* ATCC 13032.

```
ACGTCACCGAAGACAAACTAGCGAAACCATCATCGAATTAGTCGCCGCCATGCCCGTCTACCGCGCCG
ACTACATCTCCCTCTCACGCACCACCGCCACGTCATCGCGGAGATGTCCAAACGCTTCCCTCCCGGC
GCGACGCACTCGACCTCATCTCGGCCGCCCTACTTGGCAATGGCGAGGCCAAAATCCGCTTCGCCCAA
GTCTGCGGGCGCCGTATGGCCAAAGGTGTGGAAGACACCACCTTCTACCGCGCATCTAGGCTCGTTGC
ACTGCAAGAAGTCGGTGGCGCGCCGGCAGGTTCCGGCTCTCCGCTGCAGAATTCACATTGCTGCAGG
AAGAACGCAGCCTGCTGTGGCCACGCACCATGACCACCTTGTCCACGCACGACACCAAACGCGGGCGAA
GATACCCGCGCCCGCATCATCTCCCTGTCCGAAGTCCCCGATATGTA CTCCGAGCTGGTCAATCGTGT
TTTCGCAGTGCTCCCCGCGCCAGACGGCGCAACGGGCAGTTTCTCCTACAAAACCTGCTGGGCGTAT
GGCCCGCCGACGGCGTGATCACCGATGCGCTGCGCGATCGATTTCAGGGAATACGCCCTAAAAGCTATC
CGCGAAGCATCCACAAAACCACGTGGGTGGACCCCAACGAGTCCTTCGAGGCTGCGGTCTGCGATTG
GGTGGAAAGCGCTTTTCGACGGACCCTCCACCTCATTAATCACCGAATTTGTCTCCACATCAACCGTG
GCTCTGTGCAAATCTCCTTAGGTAGGAAACTGCTGCAAATGGTGGGCGCTGGAA
```

Εντούτοις, λόγω κακής ποιότητας κάποιων αποτελεσμάτων, δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός ολόκληρης της αλληλουχίας σε όλη την έκταση των δύο ενδιάμεσων περιοχών.

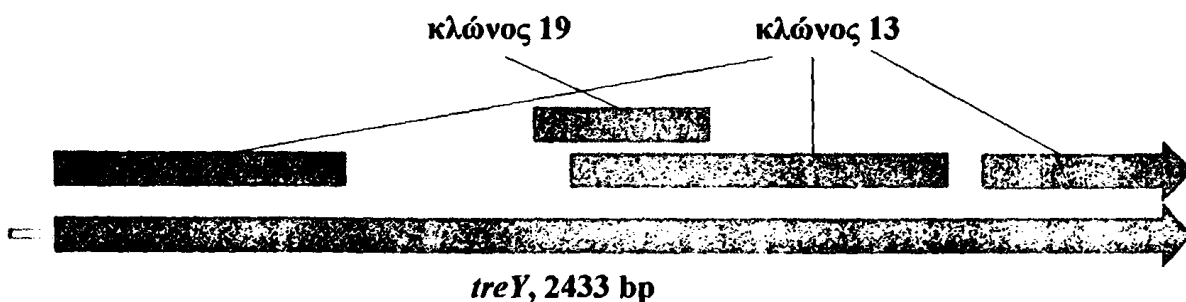
3.4 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *treY* & *treZ* ΤΩΝ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 & *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799.

3.4.1 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253.

Τα μόνα αποτελέσματα που έδωσαν αξιοποιήσιμα στοιχεία για τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων *treY* και *treZ* του *C. g.* 21253 αφορούσαν την αλληλουχία των κλώνων 9 ή 11, η οποία αντιστοιχεί στην εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treZ*. Όπως αναλύθηκε και προηγουμένως, κανένα άλλο πείραμα PCR ή κλωνοποίησης προϊόντων PCR δεν έδωσε αποτελέσματα για ολόκληρη την περιοχή που θα αντιστοιχούσε στο γονίδιο *treZ* ή για οποιαδήποτε περιοχή του γονιδίου *treY* αυτού του στελέχους.

3.4.2 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799.

Τα αποτελέσματα που έδωσαν αξιοποιήσιμα στοιχεία για τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *treY* του *B. l.* 21799 προήλθαν από την αλληλουχία των κλώνων 13 (αλληλουχία E) και 19 (αλληλουχία I), από τους οποίους προσδιορίστηκε η αλληλουχία των άκρων και της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου (συνολικά 1958 bp), όπως φαίνεται από την εικόνα 3.15.



Εικόνα 3.15: Νουκλεοτιδική αλληλουχία που έχει προσδιοριστεί για το πιθανό γονίδιο *treY* του *B. l.* 21799 (πράσινο) ως προς το *treY* του *C. g.* 13032 (πορτοκαλί).

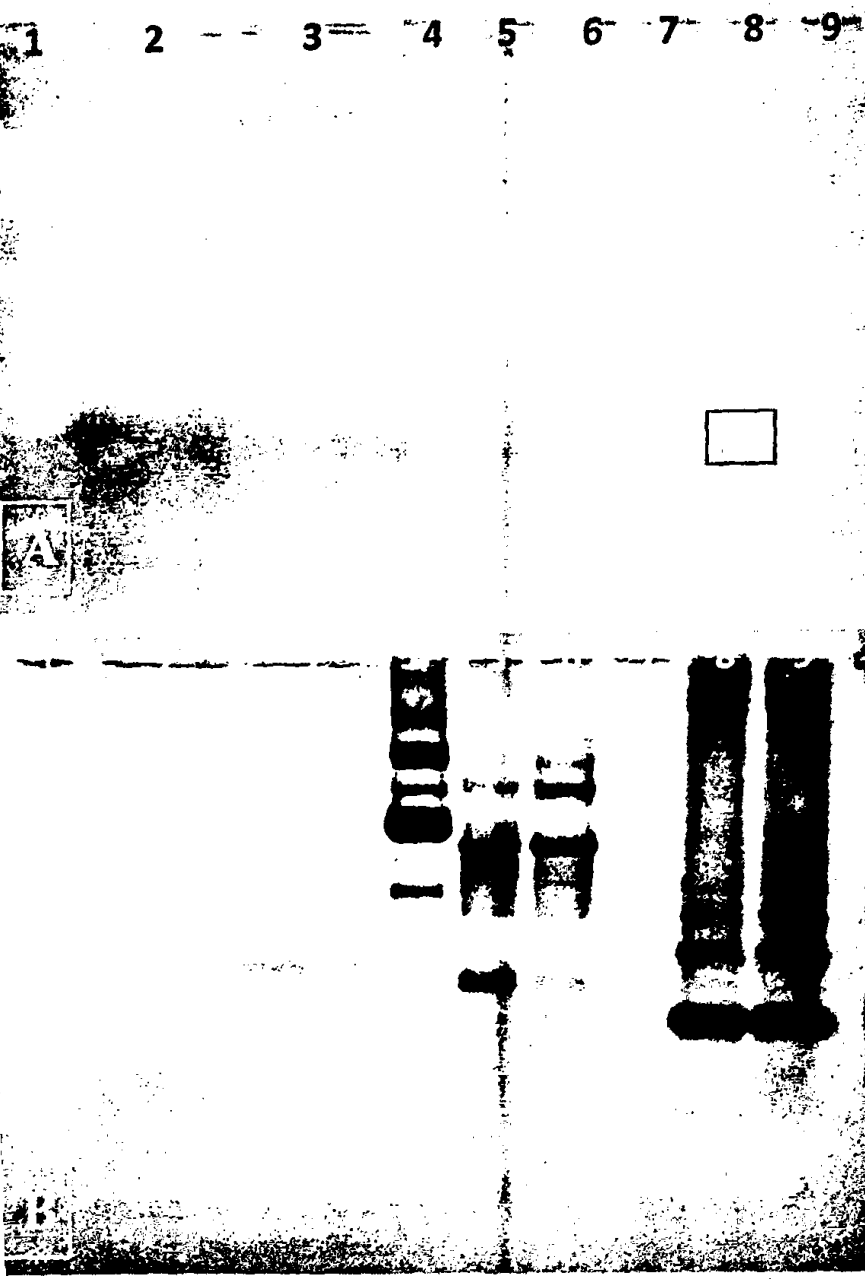
ATGGCACGTCCAATTTCCGCAACGTACAGGCTTCAAATGCGAGGACCTCAAGCAGATAGCGCCGGGCC
TTCATTTGGTTTTTTCGCGAGGCCAAAGCCAGCTTCCCTATCTGAAGAAGCTAGGCATCAGCCACCTGT
ACCTCTCCCCTATTTTTACGGCCATGCCAGATTCCAATCATGGCTACGATGTCATTGATCCCACCACC
ATCAATGAAGAGCTCGGTGGCATGGAGGGTCTTCGAGATCTTGCCGCAGCTACACACGAGTTGGGCAI
GGGCATCATCATTGATATTGTTCCCAACCATTTAGGTGTGCCGTTCCACATTTGAATCCTTGGTGGT
GGGATGTTCTAAAAACGGCAAAGATTCCGCTTTTGAGTTCATTTTCGATATTGACTGGCACGAAGAC
AACGGTCTGGTGGCAAGCTGGGCATGCCGATTCTGGGTGCTGAAGGCGATGAAGACAAGCTGGAATF
CGCGGAGCTTGATGGAGAGAAAGTGCTCAAATATTTTGACCACCTCTTCCCAATCGCGCCTGGTACCG
AGAAGGGACACCGCAAGAAGTCTACAAGCGCCAGCATTACCGCCTGCAGTTCGGCGCGATGGCGTG
ATCAACTTCCGTCGCTCTTTTTCCGCTGAATACGTTGGCTGGCATCAGGCAAGAAGATCCCTTAGTGT
TGAACATACTCATCGTCTGCTGCGCGAATTGGTGGCGGAAGACCTCATTTGACGGCGTGCGCGTCGATC
ACCCCGACGGGCTTTCCGATCCTTTTGATATCTGCACAGACTCCGCGACCTCATTTGGACCTGACCGC
TGGCTGATCATCGAAAAGATCTTGAGCGTTGATGAACCACTCGATCCCCGCCTGGCCGTTGATGGCAC
CACTGGCTACGACGCCCTCCGTGAACCTCGACGGCGTGTATTATCTCCCGAGAATCTGAGGACAAATTC
CCATGCTGGCGCTGACCCACAGTGGATCCACCTGGGATGAACGCGCCCTCAAATCCACGGAGGAAAGC
CTCAAACGAGTCGTCCCAACAAGAACTCGCAGCCGAAATCTTAAGGCTCGCCCGCGCCATGCGCCG
CGATAACTTCTCCACCCGAGGCACCAACGTCACCGAAGACAAACTTAGCGAAACCATCATCGAATTAG
TCGCCGCCATGCCCGTCTACCGCGCCGACTACATCTCCCTCTCACGCACCACCGCCACCGTCATCGCG
GAGATGTCAAACGCTTCCCTCCCGCGTGACGCACTCGACCTCATCGCGCCGCCCTACTTGGCAA
TGGCGAGGCCAAAATCCGCTTCGCTCAAGTCTGCGGCGCCGTCATGGCTAAAGGTGTGGAAGACACCA
CCTTCTACCGCGCATCTAGGCTCGTTGCATTGCAAGAAGTCGGTGGCGCGCCGGGGAGATTCGGCGTC
TCCGCTGCAGAATTCACCTTGCTGCAGGAAGAACGCAGCCTGCTGTGGCCACGCACCATGACCACCTT
GTCCACGCATGACACCAAACGTGGCGAAGATACCCGCGCCCGCATCATCTCCCTGTCTGAAGTCCCCG
ATATGTACTCCGAGCTGGTCAATCGTGTTCGCGGTGCTCCCCGCGCCAGACGGCGCAACGGGCAGT
TTCTCTACAAAACCTGCTGGGCGTATGGCCCGCCGACGGCGTGATCACCGATGCGCTGCGCGATCG
ATTCAGGGAATACGCCCTAAAAGCTATCCGCGAAGCATCCACAAAACCACGTGGGTGGACCCCAACG
AGTCCTTCGAGGCTGCGGTCTGCGATTGGGTGGAAGCGCTTTTCGACGGACCTCCACCTACTAATC
ACCGAATTTGTCTCCACATCAACCGTGGCTCTGTGCAAATCTCCTTAGGCAGGAAACTGCTGCAAAT
GGTGGCGCTGGAATCCCCGACACTTACCAAGGAACTGAGTTTTTAGAAGACTCCCTGGTAGATCCCG
ATAACCGACGCTTTGTTGATTACACCGCCAGAGAACAAGTCTGGAGCGCCTGCAAACCTGGGATTGG
ACGCAGGTTAATTCGGTAGAAGACTTGGTGGATAACGCCGACATCGCCAAAATGGCCGTGGTCCATAA
ATCCCTCGAGTTGCGTGTGAATTTTCGTCAGGCTTTGTTGGTGGAGATCATCAGGCAGTATTTGGCG
AAGGTCGCGCAGAATCCACATCATGGGCATGCCCCGCGGTACAGACCGAAACCACCTCAACATCATT
GCTCTTGCTACCCGTCGACCACTGATCTTGGAAAGACCGTGGCGGATGGTATGACACCACCGTCACGCT
TCCTGGTGGACAATGGGAAGACAGGCTCACCGGGCAACGCTTCAGTGGTGTGTCCAGCCACCGATT
TGTTCTCACATCTACCCGATCTTTGTTGGTTTTAGTACCCGATAGTGAGTTT

Τα αποτελέσματα που έδωσαν αξιοποιήσιμα στοιχεία για τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *treZ* του *B. l.* 21799 προήλθαν από την αλληλουχία των κλώνων 6 ή 7 (αλληλουχία Γ, εσωτερική περιοχή) και 16 (αλληλουχία Η, άκρα του γονιδίου). Οι αλληλουχίες αυτές παρουσίαζαν επικάλυψη, και άρα προσδιορίστηκε όλη η αλληλουχία της περιοχής που αντιστοιχεί σε πιθανό γονίδιο *treZ* του *B. l.* 21799, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.16.



3.5 ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

Τα αποτελέσματα των κλωνοποιήσεων επαληθεύτηκαν με μία σειρά 4 πειραμάτων υβριδισμού. Τα δύο πρώτα περιλάμβαναν ολικό DNA, προϊόντα PCR και κλώνους σχετικούς με αλληλουχίες *treY*, ενώ τα ιχνοθετικά μόρια DNA ήταν στον ένα υβριδισμό το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του *B.l.* 21799 και στον δεύτερο το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του του *C. g.* 21253. Τα άλλα δύο πειράματα υβριδισμού περιλάμβαναν προϊόντα PCR και κλώνους σχετικούς με αλληλουχίες *treZ*, ενώ τα ιχνοθετικά μόρια DNA ήταν στον ένα υβριδισμό το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *B.l.* 21799 και στον δεύτερο το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του του *C. g.* 21253.



Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομή 2: ολικό DNA 21799/PstI

Διαδρομή 3: ολικό DNA 21253/PstI

Διαδρομή 4: κλώνος 13 (π ολόκληρο το τμήμα *treY* τ 21799)

Διαδρομή 5: προϊόν ολόκληρης της περιοχής *tr B.l.* 21799

Διαδρομή 6: προϊόν ολόκληρης της περιοχής *tr C. g.* 21253

Διαδρομή 7: κλώνος 1 (περι εσωτερικό τμήμα του *treY* τ 21799)

Διαδρομή 8: προϊόν PCR εσωτερικού τμήματος *treY* τ 21799 (ιχνοθετικό DNA, περίγραμμα στο A)

Διαδρομή 9: προϊόν PCR εσωτερικού τμήματος *treY* τ *g.* 21253

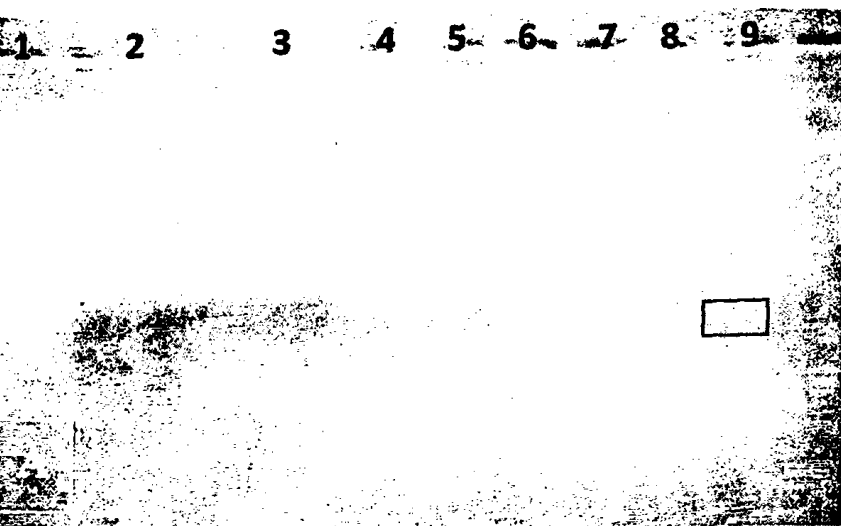
Εικόνα 3.17: Ολικό DNA, προϊόντα PCR και κλώνοι αλληλουχιών *treY*. (A) Ηλεκτροφόρι αгарόζης, (B) φίλτρο υβριδισμού με ιχνηθέτη το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος του *B.l.* 21799. Το ιχνοθετικό DNA υποδεικνύεται με μαύρο περίγραμμα στο A.

Τα αποτελέσματα του υβριδισμού έχουν αναλυτικά ως εξής:

- Παρατηρήθηκε υβριδισμός με αλληλουχίες του ολικού DNA του *C. g.* 21253 (διαδρ 3), γεγονός αναμενόμενο, εφόσον τα στελέχη αυτά είναι ισχυρά συγγενικά μεταξύ τι Στο DNA του *B.l.* 21799 (διαδρομή 2) η πέψη δεν ήταν επιτυχημένη και επομένως εμφανίστηκε σήμα σε κανένα από τα 4 πειράματα υβριδισμού.
- Παρατηρήθηκε ισχυρός υβριδισμός μεταξύ του ιχνοθετικού DNA και όλων προϊόντων PCR που προέρχονταν τόσο από το *B.l.* 21799, όσο και από το *C. g.* 21.

(διαδρομές 5, 6, 8 και 9). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, εφόσον τα στελέχη αυτά είναι ισχυρά συγγενικά μεταξύ τους, και εφόσον λογικά τα προϊόντα PCR ολόκληρης της περιοχής του γονιδίου *treY* (διαδρομές 5 και 6) εμπεριέχουν το τμήμα της εσωτερικής περιοχής του παραπάνω γονιδίου.

- Το ιχνοθετικό DNA παρουσίασε ισχυρό υβριδισμό με τον κλώνο 13 (διαδρομή 4), ο οποίος προέρχεται από την κλωνοποίηση του προϊόντος PCR ολόκληρης της περιοχής *treY* του *B.l.* 21799 (διαδρομή 5). Ο υβριδισμός αυτός ήταν αναμενόμενος από τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της κεντρικής περιοχής του κλώνου 13, αλλά και για τους λόγους που αναφέρθηκαν αμέσως προηγουμένως.
- Το ιχνοθετικό DNA εμφάνισε ελάχιστο υβριδισμό με τον κλώνο 1, γεγονός αναμενόμενο σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου, η οποία παρουσίαζε ομολογία με γονίδια υδρολασών *E. coli* και όχι με την εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treY* (βλ. σχετικά πειράματα και σχόλια σελ.73). Το ιχνοθετικό DNA, το οποίο παρουσίασε συγγένεια με όλα τα δείγματα στα οποία περιέχεται το κεντρικό τμήμα του γονιδίου *treY*, είναι το προϊόν της PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του *B.l.* 21799, από την κλωνοποίηση του οποίου προήλθε ο κλώνος 1. Το γεγονός ότι παρουσιάζει έστω και αυτόν τον ελάχιστο υβριδισμό με τον κλώνο 1 σημαίνει πιθανόν ότι το προϊόν της PCR περιέχει μίγμα αλληλουχιών που αποτελείται τόσο από αλληλουχίες της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*, όσο και από αλληλουχίες μη σχετικές με το γονίδιο αυτό (γονίδια υδρολασών *E. coli* οι οποίες ενισχύθηκαν λόγω τυχαίας ομολογίας τους με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν), οι οποίες ήταν το προϊόν της κλωνοποίησης με αποτέλεσμα τον κλώνο 1.



Διαδρομή 1: λ /HindIII

Διαδρομή 2: ολικό DNA *B. l.* 21799/*Pst*I

Διαδρομή 3: ολικό DNA *C. g.* 21253/*Pst*I

Διαδρομή 4: κλώνος 13 (περιέχει ολόκληρο το τμήμα *treY* του *B.l.* 21799)

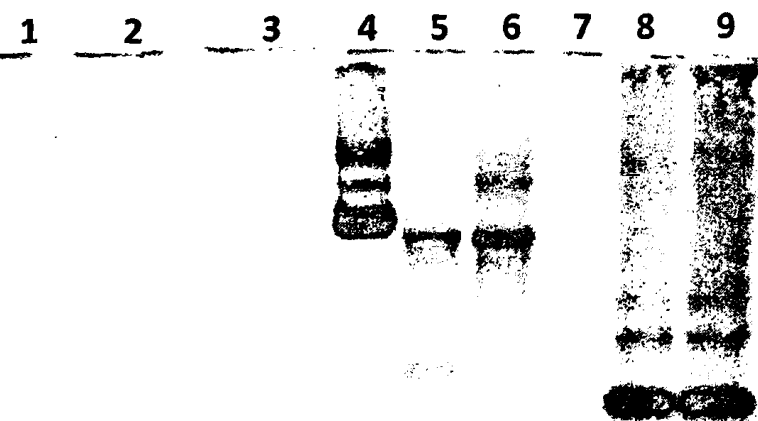
Διαδρομή 5: προϊόν PCR ολόκληρης της περιοχής *treY* του *B.l.* 21799

Διαδρομή 6: προϊόν PCR ολόκληρης της περιοχής *treY* του *C. g.* 21253

Διαδρομή 7: κλώνος 1 (περιέχει το εσωτερικό τμήμα του *treY* του *B.l.* 21799)

Διαδρομή 8: προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του *B.l.* 21799

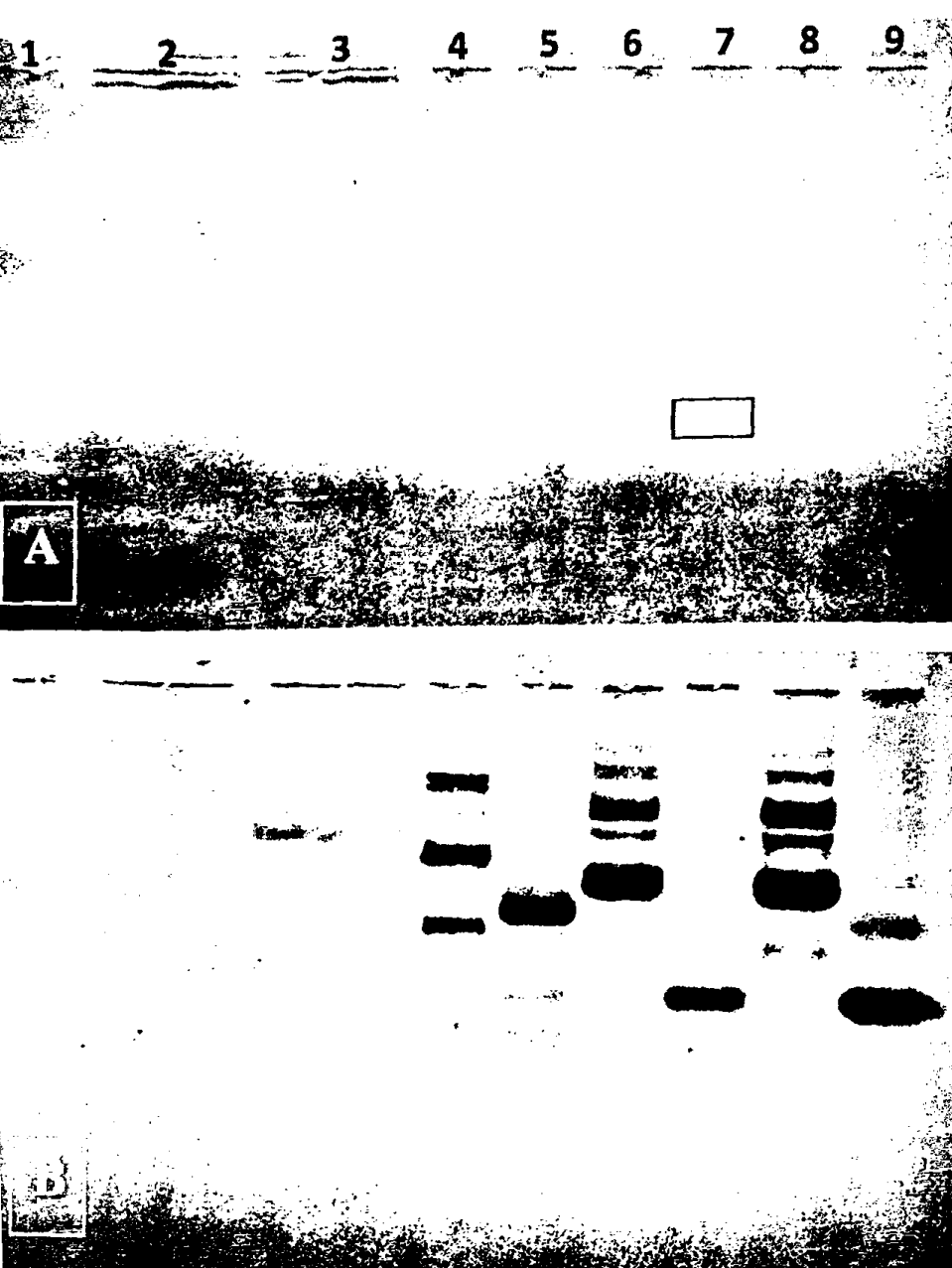
Διαδρομή 9: προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του *C. g.* 21253 (ιχνοθετικό DNA, με περίγραμμα στο A)



B

Εικόνα 3.18: Ολικό DNA, προϊόντα PCR και κλώνοι αλληλουχιών *treY*. (A) Ηλεκτροφόρηση αгарόζης, (B) φίλτρο υβριδισμού με ιχνηθέτη το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treY* του *B.l.* 21799. Το ιχνοθετικό DNA υποδεικνύεται με μαύρο περίγραμμα στο A.

Σε αυτόν τον υβριδισμό, τα δείγματα της πηκτής αгарόζης είναι ουσιαστικά τα ίδια με αυτά του προηγούμενου πειράματος. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού είναι ακριβώς ίδια με αυτά του προηγούμενου πειράματος και καταδεικνύουν την ομολογία των αλληλουχιών των δύο γονιδίων μεταξύ των στελεχών *C. g.* 21253 και *B.l.* 21799.



Διαδρομή 1: λ/*Hind*III

Διαδρομή 2: ολικό DNA του *B.l.* 21799/*Pst*I

Διαδρομή 3: ολικό DNA του *C.g.* 21253/*Pst*I

Διαδρομή 4: κλώνο (περιέχει ολόκληρο τμήμα *treZ* του *B.l.* 21799)

Διαδρομή 5: προϊόν ολόκληρης της περιόδου *treZ* του *B.l.* 21799

Διαδρομή 6: κλώνο (περιέχει το εσωτερικό τμήμα του *treZ* του 21799)

Διαδρομή 7: προϊόν του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *B.l.* 21 (ιχνοθετικό DNA, περιγράμματα στο A)

Διαδρομή 8: κλώνο (περιέχει το εσωτερικό τμήμα του *treZ* του *C.g.* 21253)

Διαδρομή 9: προϊόν του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *C.g.* 21253

Εικόνα 3.19: Ολικό DNA, προϊόντα PCR και κλώνοι αλληλουχιών *treZ*. (A) Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, (B) φίλτρο υβριδισμού με ιχνηθέτη το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *B.l.* 21799. Το ιχνοθετικό DNA υποδεικνύεται με μαύρο περίγραμμα στο A.

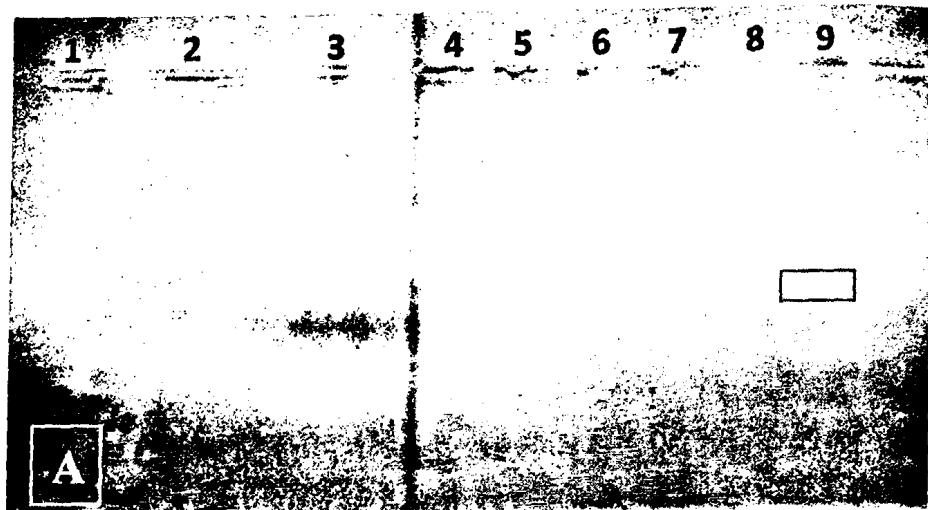
Τα αποτελέσματα του υβριδισμού έχουν αναλυτικά ως εξής:

- Παρατηρήθηκε υβριδισμός με αλληλουχίες του ολικού DNA του *C.g.* 21253 (διαδρομή 3), γεγονός αναμενόμενο, εφόσον τα στελέχη αυτά είναι ισχυρά συγγενικά μεταξύ τους. Στο DNA του *B.l.* 21799 (διαδρομή 2) η πέψη δεν ήταν επιτυχημένη και επομένως δεν εμφανίστηκε σήμα σε κανένα από τα 4 πειράματα υβριδισμού.
- Παρατηρήθηκε ισχυρός υβριδισμός μεταξύ του ιχνοθετικού DNA και όλων των προϊόντων PCR που προέρχονταν τόσο από το *B.l.* 21799, όσο και από το *C.g.* 21253.

(διαδρομές 5, 7 και 9). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, εφόσον τα στελέχη αυτά είναι ισχυρά συγγενικά μεταξύ τους, και εφόσον λογικά το προϊόν PCR ολόκληρης της περιοχής του γονιδίου *treZ* (διαδρομή 5) εμπεριέχει το τμήμα της εσωτερικής περιοχής του παραπάνω γονιδίου.

- Το ιχνοθετικό DNA εμφάνισε ισχυρό υβριδισμό με τον κλώνο 6 (διαδρομή 6). Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον το ιχνοθετικό DNA είναι το προϊόν της PCR του εσωτερικού τμήματος του γονιδίου *treZ* του *B.l.* 21799, από την κλωνοποίηση του οποίου προήλθε ο κλώνος 6.
- Το ιχνοθετικό DNA εμφάνισε ισχυρό υβριδισμό με τον κλώνο 8 (διαδρομή 9), ο οποίος προέρχεται από την κλωνοποίηση του προϊόντος PCR του εσωτερικού τμήματος του γονιδίου *treZ* του *C. g.* 21253. Το γεγονός είναι αναμενόμενο λόγω της νουκλεοτιδικής ομολογίας των δύο κλώνων.
- Το ιχνοθετικό DNA παρουσίασε ισχυρό υβριδισμό με τον κλώνο 16 (διαδρομή 4), ο οποίος προέρχεται από την κλωνοποίηση του προϊόντος PCR ολόκληρης της περιοχής *treZ* του *B.l.* 21799 (διαδρομή 5) γεγονός αναμενόμενο.





Διαδρομή 1: λ /HindIII

Διαδρομή 2: ολικό DNA *B. l. 21799*/PstI

Διαδρομή 3: ολικό DNA *C. g. 21253*/PstI

Διαδρομή 4: κλώνος 16 (περιέχει ολόκληρο το τμήμα *treZ* του *B. l. 21799*)

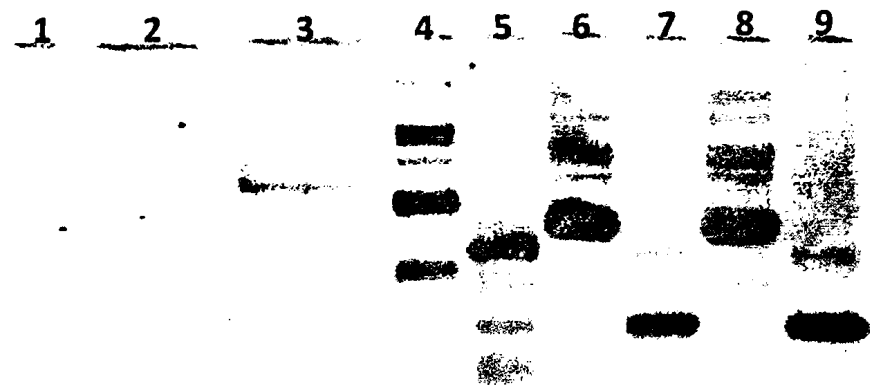
Διαδρομή 5: προϊόν PCR ολόκληρης της περιοχής *treZ* του *B. l. 21799*

Διαδρομή 6: κλώνος 6 (περιέχει το εσωτερικό τμήμα του *treZ* του *B. l. 21799*)

Διαδρομή 7: προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *B. l. 21799*

Διαδρομή 8: κλώνος 9 (περιέχει το εσωτερικό τμήμα του *treZ* του *C. g. 21253*)

Διαδρομή 9: προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *C. g. 21253* (ιχνοθετικό DNA, με περίγραμμα στο A)



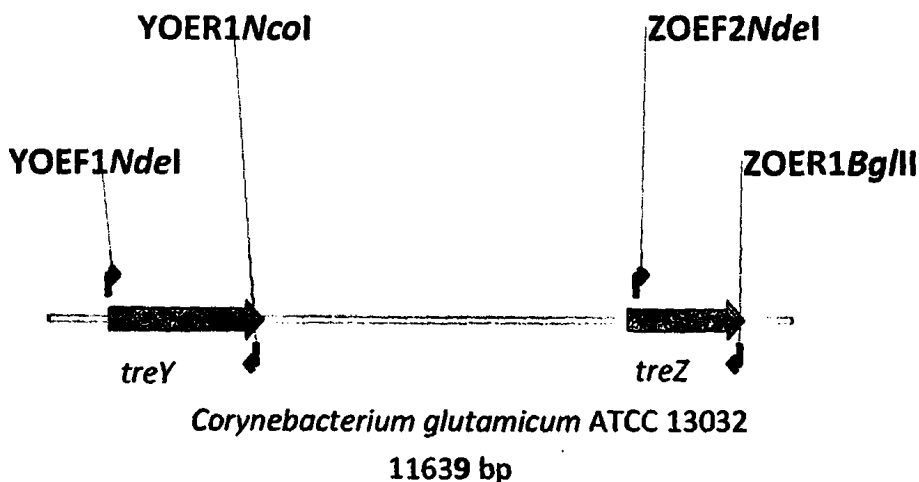
B

Εικόνα 3.20: Ολικό DNA, προϊόντα PCR και κλώνοι αλληλουχιών *treZ*. (A) Ηλεκτροφόρηση αναρόζης, (B) φίλτρο υβριδισμού με ιχνηθέτη το προϊόν PCR του εσωτερικού τμήματος *treZ* του *C. g. 21253*. Το ιχνοθετικό DNA υποδεικνύεται με μαύρο περίγραμμα στο A.

Σε αυτόν τον υβριδισμό, τα δείγματα της πηκτής αναρόζης είναι ουσιαστικά τα ίδια με αυτά του προηγούμενου πειράματος. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού είναι ακριβώς ίδια με αυτά του προηγούμενου πειράματος και καταδεικνύουν την ομολογία των αλληλουχιών των δύο γονιδίων μεταξύ των στελεχών *C. g. 21253* και *B. l. 21799*.

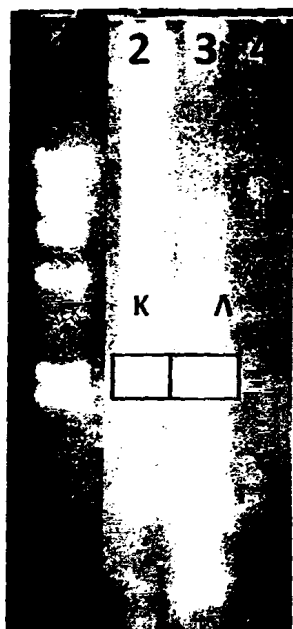
3.6 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *treY* ΚΑΙ *treZ* ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ *pET29c*.

Με απώτερο σκοπό την κλωνοποίηση των γονιδίων *treY* και *treZ* των *B.l.* 21799 και *C.g.* 21253 στον φορέα υπερέκφρασης *pET29c*, σχεδιάστηκαν επάνω στην αλληλουχία των γονιδίων εκκινητές με κατάλληλες θέσεις περιορισμού (Εικόνα 3.21). Μέσω αυτών, τα γονίδια κλωνοποιούνται στον φορέα υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή του φάγου T7, ενώ στο C-τελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης δημιουργείται μια ουρά αποτελούμενη από 6 ιστιδίνες. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η υπερέκφραση των γονιδίων και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών μέσω στηλών κατακράτησης ιστιδίνης.



Εικόνα 3.21: Θέση εκκινητών YOEF1NdeI - YOER1NcoI και ZOEF2NdeI και ZOER1BglII στο γονιδίωμα του *C.g.* 13032

Οι εκκινητές YOEF1NdeI - YOER1NcoI χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *treY* στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR5-TREYOEFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3) με προσθήκη επιπλέον $MgCl_2$ 1 mM στο μείγμα όλων των δειγμάτων της αντίδρασης. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκαν και άλλες ζώνες εκτός της αναμενόμενης (Εικόνα 3.22). Στον αρνητικό μάρτυρα δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση.



Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα τον κλώνο 13 (περιέχει ολόκληρο το γονίδιο *treY* του *B.l.* 21799)

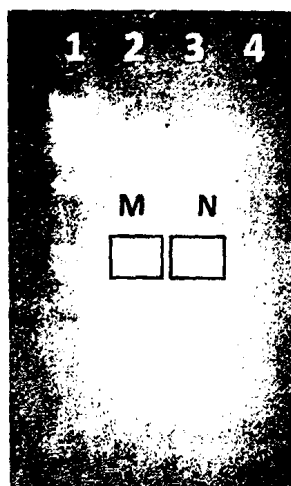
Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C.g.* 21253

Διαδρομή 4: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

Οι ζώνες που απομονώθηκαν είναι μήκους περίπου 2,3 kb (από *C.g.* 21253 ελαφρώς μικρότερη) και αντιστοιχούν στο αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 2.350 bp.

Εικόνα 3.22: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR5-TREYOEFR

Για τον περιορισμό της εμφάνισης και άλλων (πιθανώς μη ειδικών) ζωνών DNA πέραν της επιθυμητής, ενισχύθηκε το γονίδιο *treY* από υπόστρωμα *B.l.* 21799 στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR7-TREY1 (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3), κατά την οποία μεταβλήθηκαν οι χρόνοι που τηρήθηκαν σε κάθε κύκλο.



Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα τον κλώνο 13 + 1 mM MgCl₂

Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα τον κλώνο 13

Διαδρομή 4: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

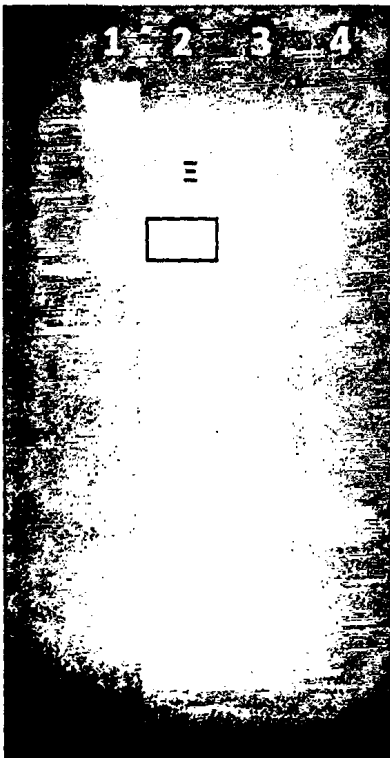
Οι ζώνες που απομονώθηκαν είναι και οι δύο μεγέθους περίπου 2,2 kb και αντιστοιχούν στο αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 2.350 bp.

Εικόνα 3.23: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR7-TREY1

Από την εικόνα 3.23 φαίνεται ότι εμφανίσθηκαν δύο ζώνες στο αναμενόμενο μέγεθος. Η προσθήκη MgCl₂ είχε ως αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη ενίσχυση του

προϊόντος, όπως φαίνεται συγκριτικά στις διαδρομές 2 & 3. Δεν εμφανίσθηκαν άλλες ζώνες.

Για τον ίδιο λόγο της εξάλειψης των μη ειδικών ζωνών DNA πέραν της επιθυμητής, ενισχύθηκε το γονίδιο *treY* από υπόστρωμα *C.g.* 21253 στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR8-TREY2 (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3), όπου κι εδώ μεταβλήθηκαν οι χρόνοι που τηρήθηκαν σε κάθε κύκλο.



Διαδρομή 1: λ/*Hind*III

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. glutamicum* + MgCl₂

Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. glutamicum*

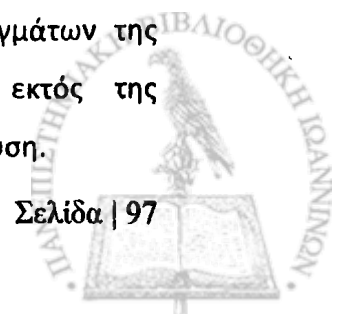
Διαδρομή 4: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

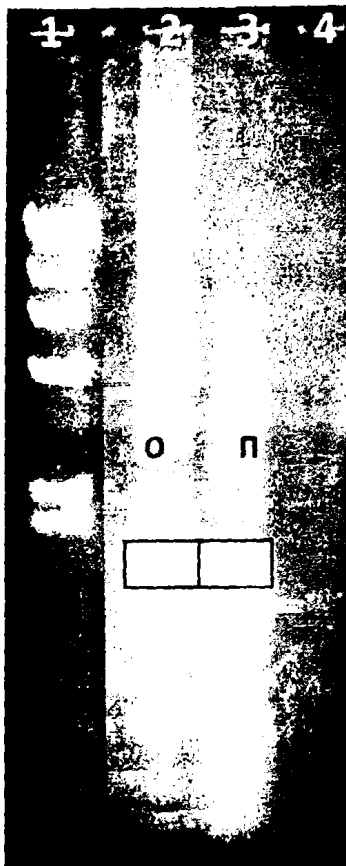
Η ζώνη που απομονώθηκε είναι μήκους περίπου 2,2 kb που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 2.350 bp.

Εικόνα 3.24: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR8-TREY2

Από την εικόνα 3.24 φαίνεται ότι εμφανίσθηκε προϊόν μόνο στο δείγμα που προστέθηκε MgCl₂. Οι άλλες ζώνες που εμφανίσθηκαν ήταν σε αμελητέα ποσότητα.

Οι εκκινητές ZOE2*Nde*I και ZOER1*Bgl*II χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *treZ* στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR6-TREZOEFR (Υλικά & Μέθοδοι, § 2.14.3) με προσθήκη επιπλέον MgCl₂ 5 mM στο μείγμα όλων των δειγμάτων της αντίδρασης. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκαν και άλλες ζώνες εκτός της αναμενόμενης (Εικόνα 3.23). Στον αρνητικό μάρτυρα δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση.





Διαδρομή 1: λ/HindIII

Διαδρομή 2: προϊόν PCR με υπόστρωμα τον κλώνο 16 (γονίδιο *treZ* του βακτηρίου *B.lactofermentum* κλωνοποιημένο σε pCR-Blunt)

Διαδρομή 3: προϊόν PCR με υπόστρωμα ολικό DNA *C. glutamicum*

Διαδρομή 4: προϊόν PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας)

Οι ζώνες που απομονώθηκαν είναι μήκους περίπου 1,8 kb (από *C.g.* 21253 ελαφρώς μικρότερη) και αντιστοιχούν στο αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 1.630 bp.

Εικόνα 3.25: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR6-TREZOEFR

Πραγματοποιήθηκε δεσμοποίηση με το φορέα pCR-Blunt μετά από συμπύκνωση δειγμάτων των απομονωμένων ζωνών Κ, Λ, Μ, Ν, Ξ, Ο και Π. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* DH5a. Στη συνέχεια οι αποικίες που εμφανίστηκαν εξετάστηκαν ως προς την παρουσία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Για περαιτέρω επιβεβαίωση έγιναν πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI*, *NcoI*. Τα αποτελέσματα των πέψεων έδειξαν ότι κανένας υποψήφιος κλώνος δεν περιείχε την ένθεση που αναμενόταν. Τα πειράματα αυτά δε συνεχίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

3.7 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *Xanthomonas campestris*.

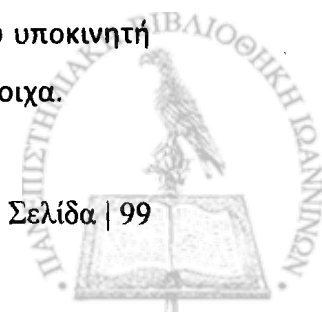
Το δεύτερο σκέλος της παρούσας εργασίας ήταν η αξιοποίηση καλά μελετημένων γονιδίων βιοσύνθεσης τρεχαλόζης, και συγκεκριμένα η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιοσυνθετική πορεία *otsAB* στο *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 (στο εξής *X. c.* 13951), με σκοπό τη διερεύνηση της παραγωγής τρεχαλόζης σε ένα βακτήριο που διαθέτει ευχέρεια έκφρασης ξένων γονιδίων και αναπτύσσεται σε πιλοτικές βιομηχανικές συνθήκες.

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων και τη μεταφορά και έκφρασή τους στο *X. c.* 13951 χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης *pCPP33* και *pCPP39* (Υλικά & Μέθοδοι, σελ.50). Τα γονίδια βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης των *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 και *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799 απομονώθηκαν από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *pUCotsA01* & *pUCotsB01* (*B. l.* 21799), και *pUCotsA02* & *pUCotsB02* (*C. g.* 21253), παράγωγα του φορέα *pUC18*, στα οποία ήταν κλωνοποιημένα (Andreou LV et al., 2005). Η περιοχή κάθε γονιδίου που απομονώθηκε περιείχε και τα ανοδικά του στοιχεία που διαθέτουν αλληλουχίες πιθανού υποκινητή.

Αρχικά, το *otsB* κάθε στελέχους απομονώθηκε από τον φορέα του μετά από πέψη με *EcoRI* και *KpnI* και υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα *pCR-Blunt*. Το ενδιάμεσο αυτό παράγωγο χρησίμευσε για την παραλαβή του *otsB* με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ώστε να είναι εφικτή η κλωνοποίησή τους στους φορείς *pCPP33* και *pCPP39*. Συγκεκριμένα, το *otsB* απομονώθηκε στη συνέχεια από το *pCR-Blunt* μετά από πέψη με *XbaI* και *KpnI* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις των *pCPP33* και *pCPP39*, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των *pCPP33otsB* και *pCPP39otsB* για κάθε *otsB* (*B. l.* 21799 και *C. g.* 21253). Σε αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, το γονίδιο *otsB* τοποθετήθηκε υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης *P_{lac}*.

Το γονίδιο *otsA* κάθε στελέχους απομονώθηκε από τον φορέα του μετά από πέψη με *SacI* και *XbaI* και υποκλωνοποιήθηκε:

- Το καθένα ξεχωριστά στους φορείς *pCPP33* και *pCPP39* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *P_{lac}*, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των *pCPP33otsA* and *pCPP39otsA* αντίστοιχα.

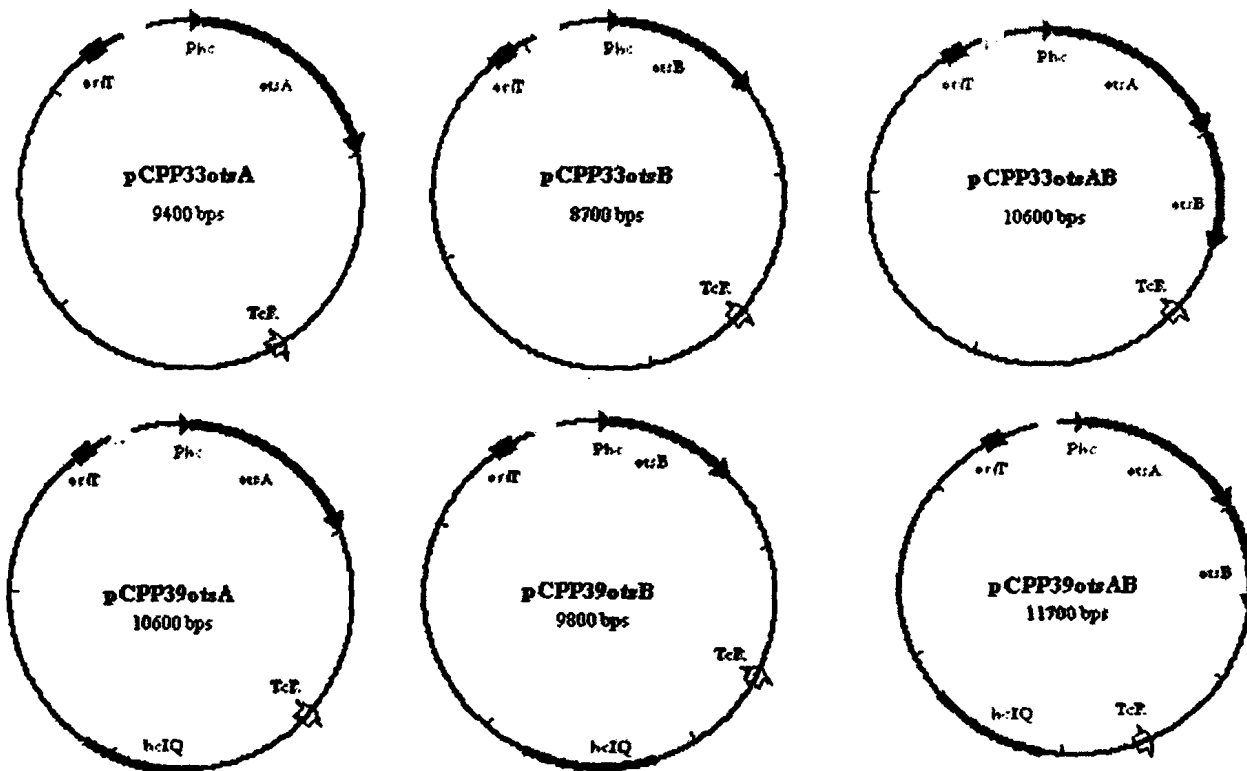


- Στα pCPP33otsB και pCPP39otsB ανοδικά του *otsB*, οπότε προέκυψαν τα pCPP33otsAB και pCPP39otsAB αντίστοιχα. Σε αυτή την περίπτωση, το *otsA* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του P_{lac} ενώ το *otsB* περιέχει στοιχεία του δικού του υποκινητή.

Στον πίνακα και την εικόνα που ακολουθούν παρουσιάζονται όλα τα παράγωγα των φορέων pCPP33 και pCPP39 με τα γονίδια *otsA* και *otsB* στους επιθυμητούς συνδυασμούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Ανασυνδυασμένα παράγωγα που προέκυψαν από την κλωνοποίηση των γονιδίων *otsA* ή / και *otsB* στους φορείς pCPP33 και pCPP39.

| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 21799 | | <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21253 | |
|---|---------------|--|---------------|
| pCPP33otsAB/ | pCPP39otsAB/ | pCPP33otsACg | pCPP39otsACg |
| pCPP33otsBB/ | pCPP39otsBB/ | pCPP33otsBCg | pCPP39otsBCg |
| pCPP33otsABB/ | pCPP39otsABB/ | pCPP33otsABCg | pCPP39otsABCg |



Εικόνα 3.26: Παράγωγα φορέων pCPP33 και pCPP39 με τα γονίδια *otsA* και *otsB* στους επιθυμητούς συνδυασμούς.



3.8 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *otsA* ΚΑΙ *otsB* ΣΤΟ *Xanthomonas campestris*.

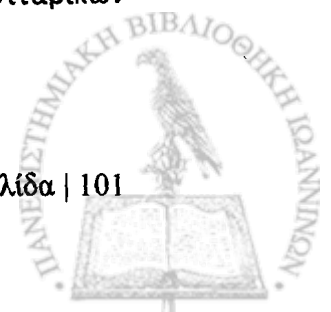
Τα ανασυνδυασμένα παράγωγα των φορέων pCPP33 μεταφέρθηκαν στο *X. c.* 13951 με ηλεκτροδιάτρηση. Σε όλες τις περιπτώσεις απομονώθηκαν αποικίες *X. c.* 13951 ανθεκτικές στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, το οποίο ήταν ο δείκτης επιλογής. Η ύπαρξη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επιβεβαιώθηκε με απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα μετασηματισμένα *X. c.* 13951 και περιοριστική ανάλυση.

Η ενεργότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων προσδιορίστηκε στο ακατέργαστο εκχύλισμα των κυττάρων *E. coli* και *X. campestris*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της εξής σειράς αντιδράσεων:

1. 6-P-γλυκόζη + UDP-γλυκόζη \rightarrow 6-P-τρεχαλόζη + UDP (συνθάση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης, TPS)
2. 6-P-τρεχαλόζη \rightarrow τρεχαλόζη + Pi (φωσφατάση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης, TPP)

Συγκεκριμένα, για τη διεξαγωγή της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων *E. coli* ή *X. campestris* που περιείχαν κλωνοποιημένο το γονίδιο *otsA* (κωδικοποιεί την συνθάση της φωσφο-τρεχαλόζης, TPS), ενώ για την πραγματοποίηση της δεύτερης αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων *E. coli* ή *X. campestris* που περιείχαν κλωνοποιημένο το γονίδιο *otsB* (κωδικοποιεί την φωσφατάση της φωσφο-τρεχαλόζης, TPP). Η ενεργότητα αυτών των ενζύμων προσδιορίζεται έμμεσα και αντιστοιχεί στην ποσότητα του ανόργανου φωσφόρου που απελευθερώνεται. Υπογραμμίζεται ότι, αν η αντίδραση διεξαχθεί με επιτυχία (ανιχνευθεί ανόργανος φωσφόρος), αυτό θα σημαίνει ότι και τα δύο κυτταρικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν ενεργό ένζυμο. Αν, αντίθετα, δεν ανιχνευθεί ανόργανος φωσφόρος, τότε θα απουσιάζει ή η δράση της TPS, ή της TPP, ή και των δύο.

Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η ενζυμική ενεργότητα (αντιστοιχεί στην απορρόφηση του ανόργανου φωσφόρου στα 630nm μετά από συμπλοκοποίησή του με μολυβδαινικό αμμώνιο και πράσινο του μαλαχίτη) η οποία παρατηρήθηκε από τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με τους συνδυασμούς των κυτταρικών εκχυλισμάτων.



ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: Ενζυμική ενεργότητα των ανασυνδυασμένων παραγώγων στα ακατέργαστα εκχυλίσματα ξενιστών *E. coli* και *X. campestris*. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα (Μ.Ο. ± τυπική απόκλιση).

| A/A | TPS (50 μg ολικής πρωτεΐνης) | TPP added (100 μg ολικής πρωτεΐνης) | A ₆₃₀ | |
|-----|---------------------------------|--|------------------|----------------------|
| | | | <i>E.coli</i> | <i>X. campestris</i> |
| 1 | ενδογενής* | ενδογενής* | 0.00 | 0.00 |
| 2 | pCPP33otsAB/ | - | 0.00 | 0.00 |
| 3 | pCPP33otsAB/ | pCPP33otsBB/ | 1.35 ± 0.11 | 1.22 ± 0.10 |
| 4 | pCPP33otsABB/ | - | 0.25 ± 0.01 | 0.20 ± 0.01 |
| 5 | pCPP33otsABB/ | pCPP33otsBB/ | 1.45 ± 0.18 | 1.32 ± 0.18 |
| 6 | pCPP33otsACg | - | 0.00 | 0.00 |
| 7 | pCPP33otsACg | pCPP33otsBCg | 1.77 ± 0.21 | 1.72 ± 0.19 |
| 8 | pCPP33otsABCg | - | 0.34 ± 0.02 | 0.30 ± 0.03 |
| 9 | pCPP33otsABCg | pCPP33otsBCg | 1.93 ± 0.23 | 1.85 ± 0.21 |

* η τυχόν φυσική ενεργότητα των *E. coli* ή *X. campestris*

Ο αρνητικός μάρτυρας για το πείραμα ήταν η διεξαγωγή των αντιδράσεων με την προσθήκη μόνο του εκχυλίσματος που αντιστοιχούσε στο προϊόν του *otsA* (ενεργότητα TPS) (αντιδράσεις 2 & 6). Παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, ότι η ενεργότητα μόνο της TPS δεν ήταν επαρκής για την απελευθέρωση φωσφόρου.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις με κυτταρικό εκχύλισμα των φυσικών ξενιστών *E. coli* ή *X. campestris* που δεν περιείχαν κλωνοποιημένα γονίδια (αντίδραση 1). Και οι δύο ξενιστές περιέχουν ενδογενή γονίδια βιοσύνθεσης τρεχαλόζης ανάλογα της πορείας *otsA/otsB*, τα οποία όμως επάγονται από την επιβολή αντίξων συνθηκών ανάπτυξης, όπως οσμωτικό στρες ή θερμική καταπόνηση. Αναμένεται επομένως ότι η αντίδραση δεν θα πραγματοποιηθεί υπό τις συνθήκες ανάπτυξης στην εργαστηριακή καλλιέργεια ρουτίνας. Πράγματι υπήρξε μηδενική ή αμελητέα ενεργότητα, η οποία αφαιρέθηκε από τις τιμές που παρουσιάζονται στις υπόλοιπες αντιδράσεις.

Από τα αποτελέσματα των ενζυμικών δοκιμών συμπεραίνεται κατ'αρχήν ότι η ενζυμική ενεργότητα που παρατηρήθηκε στα κυτταρικά εκχυλίσματα των ανασυνδυασμένων *E. coli* και *X. campestris* κυμαίνεται σε παρόμοιο επίπεδο.



Παρατηρήθηκε πολύ ικανοποιητική ενεργότητα από την αντίδραση που πραγματοποιήθηκε με τα προϊόντα των γονιδίων *otsA* και *otsB* ανεξάρτητα κλωνοποιημένων υπό τον έλεγχο του P_{lac} (αντιδράσεις 3 & 7).

Αντίθετα, όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το εκχύλισμα κυττάρων που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο $rCPP33otsABCg$ ή $rCPP33otsABB1$, η ενεργότητα ήταν πάρα πολύ μικρή (αντιδράσεις 4 & 8). Στα παράγωγα αυτά, το μεν γονίδιο *otsA* ήταν κλωνοποιημένο υπό τον έλεγχο του P_{lac} , ενώ το γονίδιο *otsB* υπό τον έλεγχο των δικών του αλληλουχιών υποκινητή και καθοδικά του *otsA*. Αυτό σημαίνει ότι οι αλληλουχίες αυτές ίσως είναι ελάχιστα λειτουργικές σε ξενιστή *E. coli* ή *X. campestris*, επομένως μόνο το γονίδιο *otsA* είναι στην ουσία λειτουργικό. Αυτό φαίνεται και από τις αντιδράσεις 5 & 9, στις οποίες χορηγήθηκε επιπλέον το εκχύλισμα κυττάρων που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο $rCPP33otsBB1$ και $rCPP33otsBCg$, αντίστοιχα, οπότε η ενεργότητα αποκαταστάθηκε, παρουσιάζοντας τιμές ελαφρώς υψηλότερες από αυτές των αντιδράσεων 3 & 7.

Τα προϊόντα των γονιδίων *otsA* και *otsB* που προέρχονταν από το *C. g.* 21253 παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερη ενεργότητα από τα αντίστοιχα του *B. l.* 21799 (σύγκριση αντιδράσεων 3 με 7 & 5 με 9).

Συμπερασματικά, τα γονίδια βιοσύνθεσης τρεχαλόζης *otsA* και *otsB* των *B. l.* 21799 και *C. g.* 21253, μετά από κλωνοποίησή τους σε κατάλληλους φορείς, μεταφέρθηκαν και εκφράστηκαν με επιτυχία στον ξενιστή *X. campestris*.



4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



1. Απομόνωση των γονιδίων *treY* και *treZ* από τα στελέχη *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 και *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799.

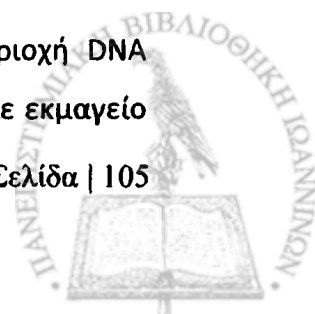
Η απομόνωση των γονιδίων από τα δύο αυτά βακτήρια αποδείχθηκε δύσκολη και επίπονη διαδικασία κυρίως για το βακτήριο *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253.

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, απαραίτητου υποστρώματος για όλες τις αντιδράσεις που θα ακολουθούσαν, ήταν σχετικά απλή διαδικασία, κατά την οποία λαμβανόταν παρασκεύασμα, όχι πάντα πολύ πυκνό, αλλά υψηλής καθαρότητας. Εντούτοις, από το DNA του *C. g.* ATCC21253 δεν λαμβάνονταν με ευκολία προϊόντα PCR, ενώ υπήρχαν συχνά και αρκετά παραπροϊόντα, παρά τις κατάλληλες τροποποιήσεις τόσο των συστατικών, όσο και των συνθηκών της PCR με σκοπό την εξάλειψή τους. Ένα από τα χαρακτηριστικά των κορυνοειδών βακτηρίων είναι η μεγάλη περιεκτικότητα του DNA τους σε GC, γεγονός που καθιστά πολύπλοκη την απομόνωση DNA, τις αντιδράσεις PCR, κλπ. Εντούτοις, η περιεκτικότητα σε GC του γονιδιώματος του *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 είναι περίπου 56 %, δηλαδή όχι ιδιαίτερα μεγάλη για να επιφέρει προβλήματα τεχνικής φύσης. Όμοια, αναμένεται ότι και η περιεκτικότητα του *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 θα είναι παρόμοια. Άρα τα προβλήματα που προκύπτουν στα πειράματα PCR με τη μη λήψη προϊόντος παραμένουν εν πολλοίς μη ερμηνεύσιμα.

Το DNA του *B. l.* ATCC21799, αφετέρου, ενώ δεν παρουσίασε προβλήματα στην ενίσχυση περιοχών DNA και λαμβάνονταν λιγότερα παραπροϊόντα, όταν υφίστατο πέψη με ένζυμα περιορισμού, το DNA μετά την πέψη ή εμφανιζόταν στην ηλεκτροφόρηση σε πολύ μικρότερη ποσότητα, ή εμφανιζόταν να μην έχει υποστεί καθόλου πέψη. Αυτό δημιούργησε προβλήματα και τελικά αδυναμία εφαρμογής της απομόνωσης των γονιδίων σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο προσέγγισης.

Η μεθοδολογία που επιχειρήθηκε αρχικά για την απομόνωση των γονιδίων *treY* και *treZ* από τα βακτηριακά στελέχη *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253 περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Σύγκριση αλληλουχιών που έχουν χαρακτηριστεί ως *treY* και *treZ* από κορυνοβακτήρια και μυκοβακτήρια και εντοπισμός των συντηρημένων περιοχών σε κάθε γονίδιο.
- Σχεδιασμός εκκινητών επάνω σε αυτές, που θα περιέκλειαν μία περιοχή DNA μεγέθους 500 – 1000 bp και ενίσχυση αυτών των περιοχών μέσω PCR με εκμαγείο



το γονιδιωματικό DNA των *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253.

- Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR που θα προέκυπταν και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους.
- Εφόσον η αλληλουχία παρουσίαζε ομοιότητα με τα αντίστοιχα γονίδια, χρησιμοποίησή της ως ιχνοθετικό DNA σε υβριδισμό με το γονιδιωματικό DNA των *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253, με σκοπό την απομόνωση της περιοχής που παρουσίαζε θετικό σήμα και κλωνοποίησή της για την απομόνωση των κλώνων που θα περιείχαν αλληλουχίες των γονιδίων.

Η ενίσχυση της εσωτερικής περιοχής των γονιδίων *treY* και *treZ* στα δύο βακτηριακά στελέχη *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Εντούτοις, μόνο τα προϊόντα PCR που προέκυψαν για την εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treZ* και για τα δύο στελέχη κλωνοποιήθηκαν με επιτυχία, παρουσίασαν δε σχεδόν ταύτιση με την αντίστοιχη περιοχή του *treZ* του *C. g.* ATCC13032, όπως προέκυψε από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

Ως προς την εσωτερική περιοχή του γονιδίου *treY*, το μεν προϊόν PCR του *C. g.* ATCC21253 δεν κλωνοποιήθηκε παρά τις αλλεπάλληλες προσπάθειες, το δε προϊόν PCR του *B. l.* ATCC21799 κλωνοποιήθηκε μεν, αλλά παρουσίασε υψηλή ομοιότητα με γονίδια υδρολασών *E. coli* και όχι με το γονίδιο *treY* κορυνοβακτηρίων ή άλλων βακτηρίων, το οποίο κωδικοποιεί τη συνθάση της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης. Πιθανολογείται ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν παρουσίαζαν ομολογία και με άλλη περιοχή του γονιδιωματικού DNA του *B. l.* ATCC21799, η οποία ενισχύθηκε εξίσου. Επομένως, το προϊόν της PCR περιείχε πιθανότατα μίγμα DNA της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY* και αυτής της άλλης περιοχής (όπως φαίνεται και από τον υβριδισμό στην εικόνα 3.17, σελ. 89 και ερμηνεία των αποτελεσμάτων), αλλά έτυχε να κλωνοποιηθούν τα τμήματα DNA που αντιστοιχούσαν στην άλλη περιοχή. Ο κλώνος αυτός παρουσίασε βεβαίως υβριδισμό με το γονιδιωματικό DNA και των δύο στελεχών, αλλά επειδή δεν επρόκειτο για το υπό μελέτη γονίδιο, δεν χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδίου *treY* στα πλαίσια της παρούσας προσέγγισης. Γενικά η απομόνωση ζώνης του γονιδιωματικού DNA από πηκτώμα ηλεκτροφόρησης, ανάκτησή του και κλωνοποίηση σε κατάλληλο φορέα είχε ελάχιστη απόδοση, και κατά συνέπεια δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω.

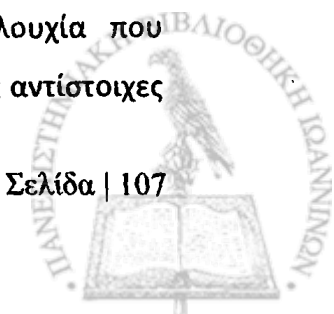


Η μεθοδολογία που επιχειρήθηκε στη συνέχεια για την απομόνωση των γονιδίων *treY* και *treZ* από τα βακτηριακά στελέχη *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253 περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Σχεδιασμός εκκινητών με βάση την αλληλουχία του γονιδιώματος του *C. g.* ATCC13032 εκατέρωθεν των περιοχών που έχουν χαρακτηριστεί ως *treY* και *treZ*, έτσι ώστε να περικλείουν, εκτός από την αλληλουχία του αναγνωστικού πλαισίου, και την ανοδική περιοχή με τα στοιχεία των πιθανών υποκινητών, και ενίσχυση μέσω PCR με εκμαγείο το γονιδιωματικό DNA των *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253.
- Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR που θα προέκυπταν και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των άκρων τους.
- Εφόσον η αλληλουχία παρουσίαζε ομοιότητα με τα αντίστοιχα γονίδια, σχεδιασμός εσωτερικών εκκινητών για περαιτέρω ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Η ενίσχυση της περιοχής ολόκληρων των αναγνωστικών πλαισίων και των ανοδικών περιοχών υποκινητή του γονιδίου *treY* στα δύο βακτηριακά στελέχη *B. l.* ATCC21799 και *C. g.* ATCC21253 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, παρόλο που στο προϊόν από *C. g.* ATCC21253 εμφανίσθηκαν πολλά παραπροϊόντα. Εντούτοις, μόνο το προϊόν PCR από *B. l.* ATCC21799 κλωνοποιήθηκε με επιτυχία. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που προσδιορίστηκε εκατέρωθεν της περιοχής, αλλά και στο εσωτερικό της μετά από ενίσχυσή της με κατάλληλους «εσωτερικούς» εκκινητές, παρουσίασε ισχυρή ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές του *treY* του *C. g.* ATCC13032. Επιπλέον, η εσωτερική περιοχή αυτού του κλώνου ενισχύθηκε με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη μεθοδολογία για τον εντοπισμό της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *treY*, και βρέθηκε ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτού του κλώνου δεν έμοιαζε με γονίδια υδρολασών, αλλά με αλληλουχίες *treY*. Κατά συνέπεια ενισχύονται οι σχετικοί ισχυρισμοί της προηγούμενης παραγράφου.

Η ενίσχυση της περιοχής ολόκληρων των αναγνωστικών πλαισίων και των ανοδικών περιοχών υποκινητή του γονιδίου *treZ* δεν είχε αποτέλεσμα για το *C. g.* ATCC21253, παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες, ενώ στην περίπτωση του *B. l.* ATCC21799 προέκυψε προϊόν PCR το οποίο κλωνοποιήθηκε επιτυχώς. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που προσδιορίστηκε εκατέρωθεν της περιοχής παρουσίασε ισχυρή ομολογία με τις αντίστοιχες



περιοχές του *treZ* του *C. g.* ATCC13032. Σε συνδυασμό με την εσωτερική περιοχή του γονιδίου που προσδιορίστηκε στην πρώτη μεθοδολογία, η αλληλουχία του γονιδίου *treZ* καθίσταται πλήρης για το *B. l.* ATCC21799.

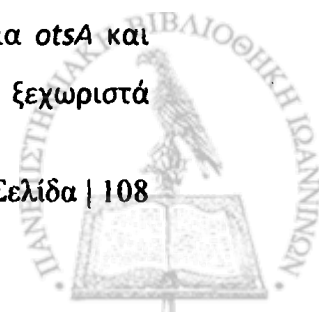
Τα δεδομένα των παραπάνω πειραμάτων, σε συνδυασμό με πειράματα υβριδισμού, κατέδειξαν τη στενή συγγενική σχέση των δύο στελεχών.

Για την καλύτερη μελέτη των δύο πιθανών γονιδίων *treY* και *treZ* από τα *B. lactofermentum* ATCC21799 και το *C. glutamicum* ATCC21253, απαιτείται η υπερέκφρασή τους, ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας με ανάπτυξη κατάλληλης δοκιμής και η ανίχνευση της τρεχαλόζης. Πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με στόχο την υπερέκφραση των δύο γονιδίων. Η ενίσχυσή τους ήταν επιτυχής με χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων ζευγών εκκινητών όμως δεν κλωνοποιήθηκαν στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης.

Σε μελλοντικά πειράματα προτείνεται η διερεύνηση των πιθανών αιτιών αποτυχίας κλωνοποίησης του γονιδίου *treY* και τμημάτων αυτού και στη συνέχεια ο σχεδιασμός νέων πειραμάτων κλωνοποίησης. Επίσης η εύρεση κατάλληλων συνθηκών για την ενίσχυση του γονιδίου *treZ* από το *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253. Συνέχεια της παρούσης μελέτης θα μπορούσε να αποτελεί η ανάπτυξη συστήματος ενζυμικών δοκιμών για την ανίχνευση των βιοσυνθετικών ενζύμων που κωδικεύονται από τα αντίστοιχα γονίδια, ο προσδιορισμός παραγωγής της τρεχαλόζης στα πατρικά στελέχη και ετερόλογη έκφραση και υπερέκφραση των δύο γονιδίων. Για αυτό το σκέλος της μελέτης κρίνεται απαραίτητη η αναθεώρηση των συνθηκών πραγματοποίησης του πειράματος και η επανάληψή του.

2. Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιοσυνθετική πορεία *otsAB* στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* ATCC 13951.

Η κλωνοποίηση των γονιδίων *otsA* και *otsB* των *C. glutamicum* ATCC 21253 και *B. lactofermentum* ATCC 21799 στους πλασμιδιακούς φορείς pCPP33 και pCPP39 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Τα γονίδια αυτά εκφράστηκαν τόσο στο *E. coli*, όσο και στο *X. campestris*, με αποτέλεσμα την ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας και για τα δύο ένζυμα συνθάση της 6-φωσφοτρεχαλόζης και φωσφατάση της 6-φωσφοτρεχαλόζης. Η δραστηριότητα αυτή ήταν συγκρίσιμη με αυτή των αρχικών κλώνων. Τα γονίδια *otsA* και *otsB* εκφράστηκαν με επιτυχία στην περίπτωση που ήταν το καθένα ξεχωριστά



κλωνοποιημένο υπό τον έλεγχο του P_{lac} . Τα προϊόντα των γονιδίων *otsA* και *otsB* που προέρχονταν από το *C. g.* 21253 παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερη ενεργότητα από τα αντίστοιχα του *B. l.* 21799. Η διαφορά αυτή δεν θεωρείται ιδιαίτερα μεγάλη, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την δράση των γονιδίων σε κάθε οργανισμό.

Αντίθετα, όταν και τα δύο γονίδια ήταν κλωνοποιημένα στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα, έτσι ώστε το *otsA* να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του P_{lac} , ενώ το *otsB* υπό τον έλεγχο των δικών του αλληλουχιών υποκινητή, η ενεργότητα ήταν πολύ μικρή. Αυτό σημαίνει ότι ο δυνητικός υποκινητής του *otsB* ίσως είναι ελάχιστα λειτουργικός σε ξενιστή *E. coli* ή *X. campestris*, επομένως μόνο το γονίδιο *otsA* είναι στην ουσία λειτουργικό. Στην αλληλουχία του γονιδιώματος του *C. glutamicum* ATCC13032 (Acc.No BX927155), μεταξύ των γονιδίων *otsA* και *otsB* παρεμβάλλεται ένα αναγνωστικό πλαίσιο που θεωρείται ότι κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Αυτή η πρωτεΐνη δεν φαίνεται να σχετίζεται με αυτό το σύστημα. Επομένως είναι πιθανόν να μην πρόκειται για οπερόνιο, αλλά κάθε γονίδιο να διαθέτει τον δικό του υποκινητή. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν αυτή την άποψη. Μελλοντικά θα μπορούσαν να εκφραστούν με σύντηξη των δύο γονιδίων υπό τον έλεγχο ενός κοινού ισχυρού υποκινητή, όπως είναι ο P_{lac} , στο *X. campestris*.

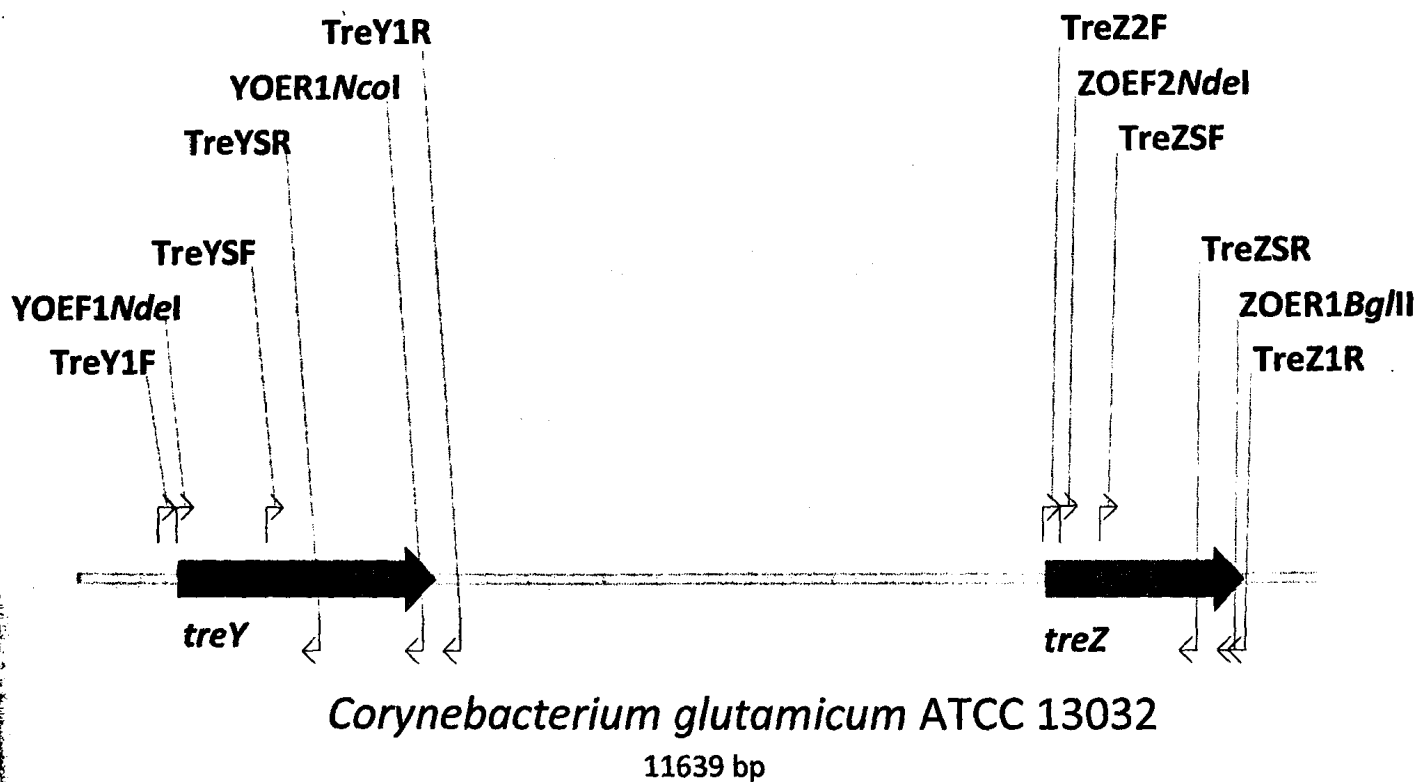
Η ετερόλογη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία της τρεχαλόζης στο *X. campestris* θα μπορούσε να οδηγήσει στην ταυτόχρονη παραγωγή δύο αξιόλογων βιομηχανικών προϊόντων, τρεχαλόζης και ξανθάνης, με την αξιοποίηση ενός οργανισμού σε μία μόνο διεργασία.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

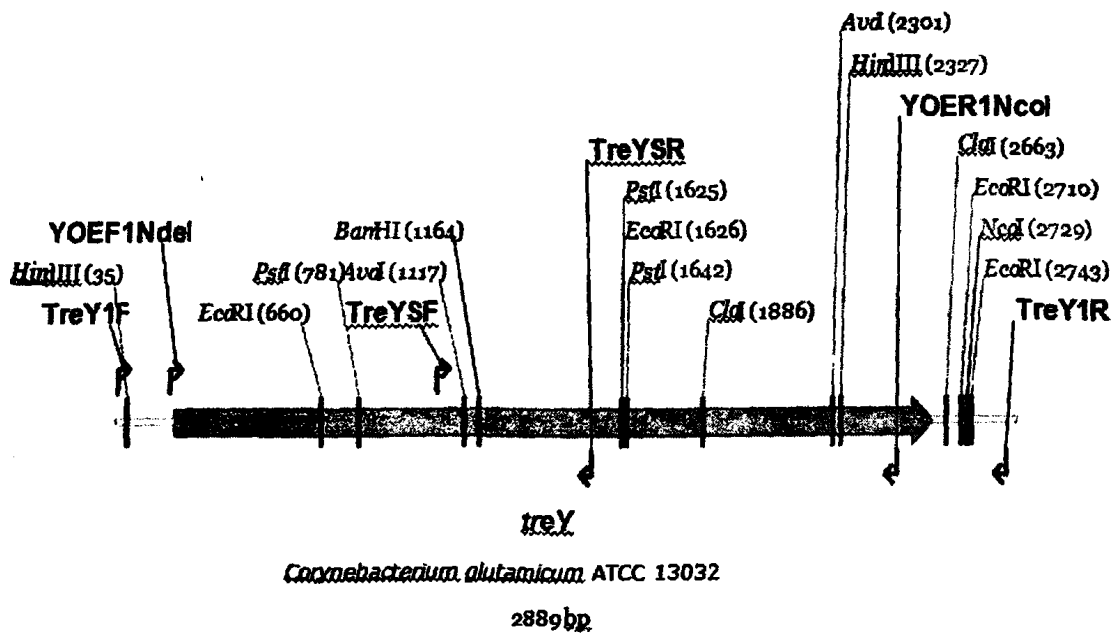


5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

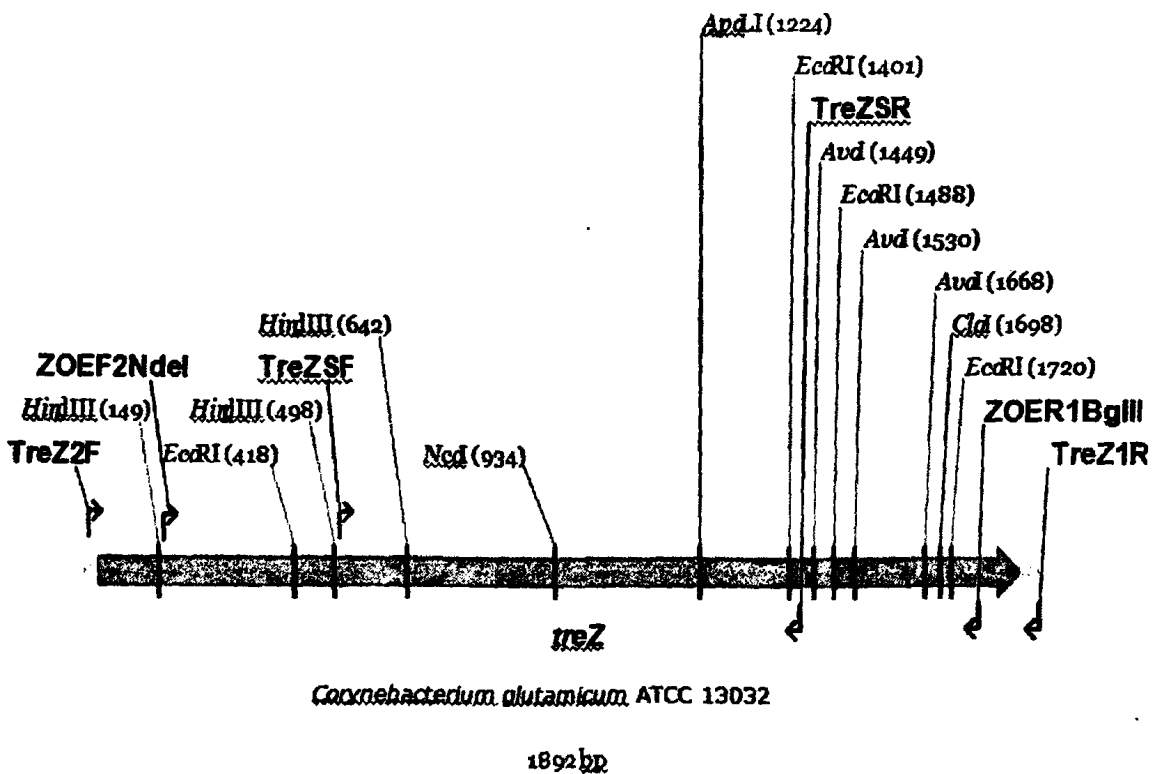




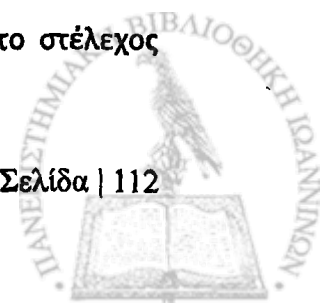
Εικόνα 5.1: Θέση όλων των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία.



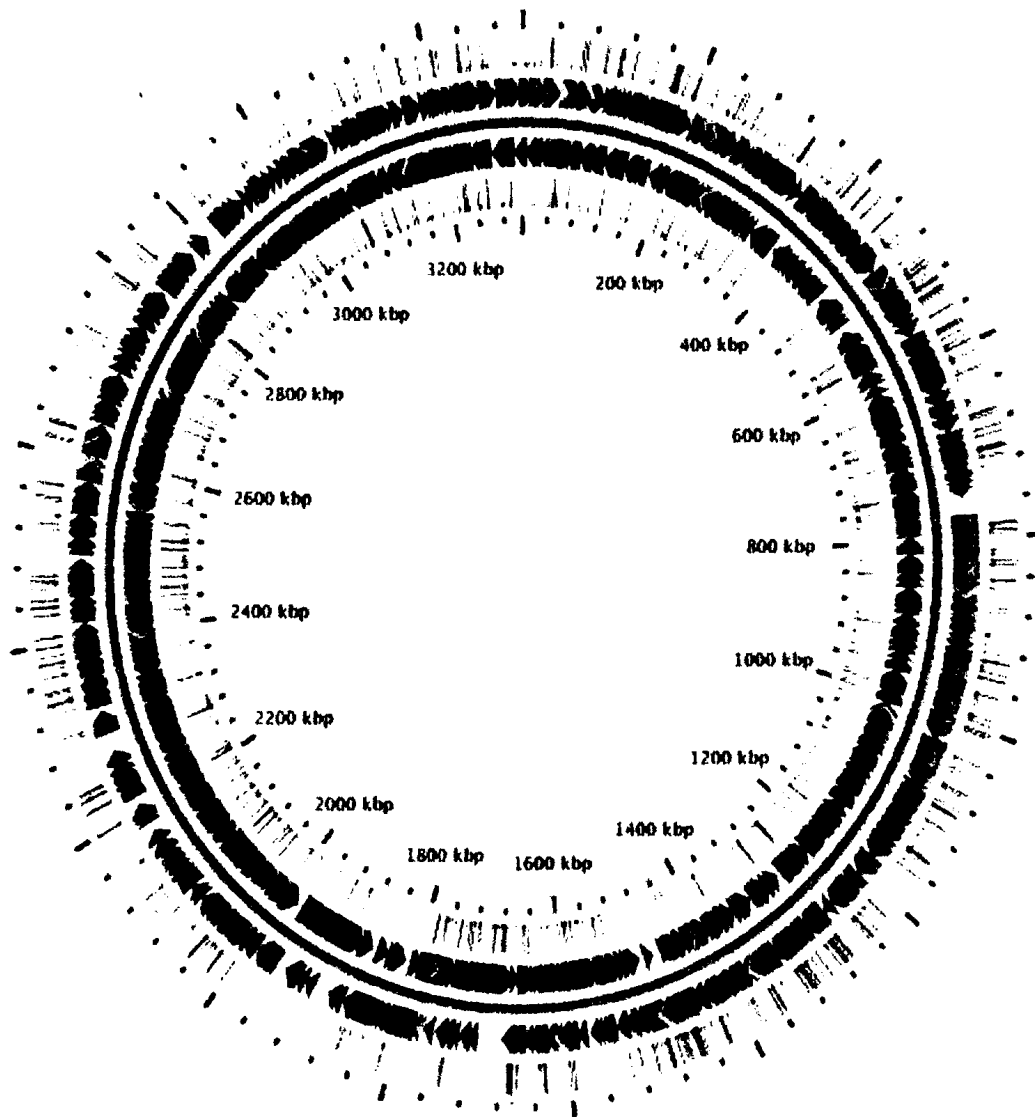
Εικόνα 5.2: Περιοριστικές θέσεις για την αλληλουχία του γονιδίου *treY* για το στέλεχος *C. glutamicum* ATCC13032.



Εικόνα 5.3: Περιοριστικές θέσεις για την αλληλουχία του γονιδίου *treZ* για το στέλεχος *C. glutamicum* ATCC13032.



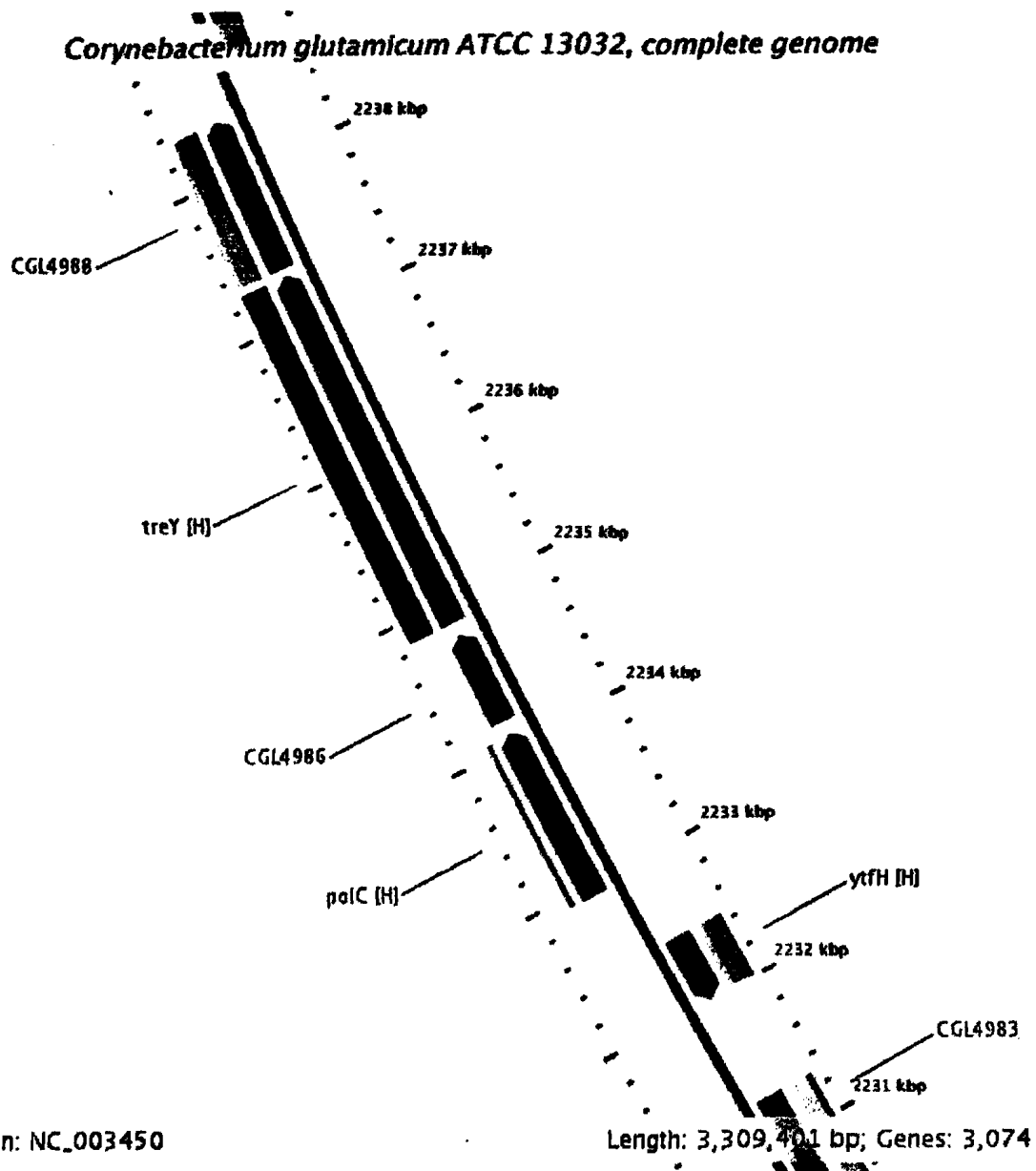
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, complete genome



Accession: NC_003450

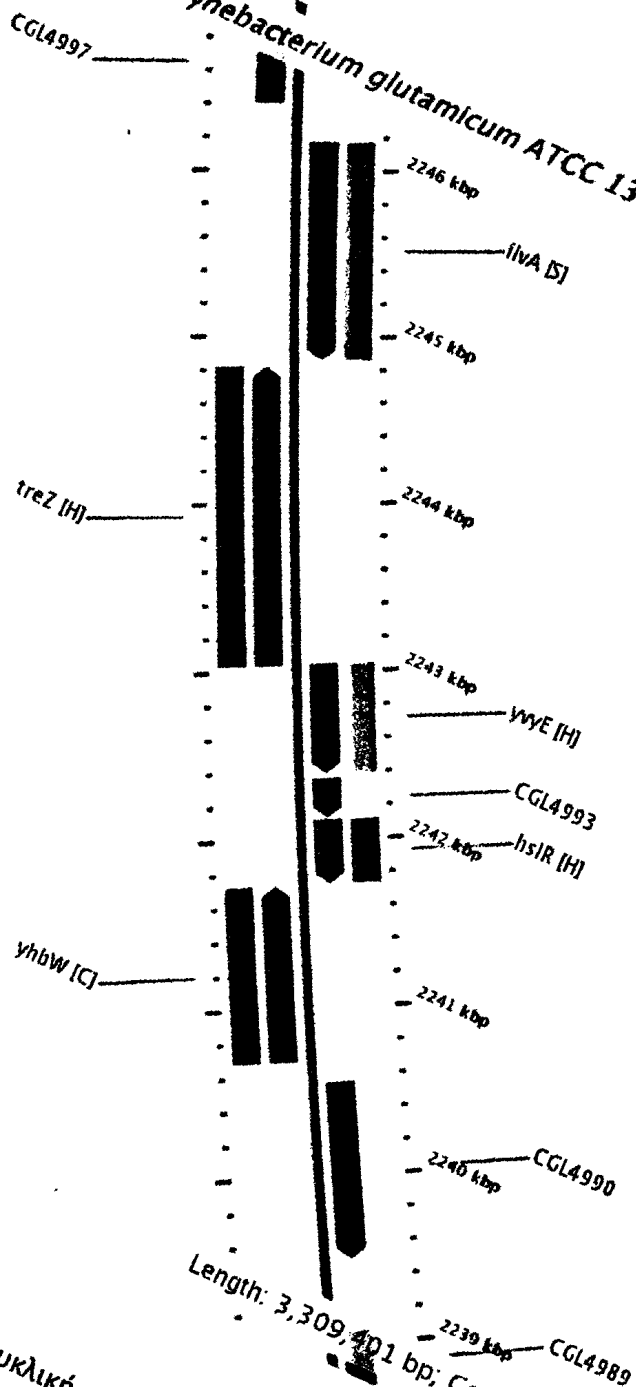
Length: 3,309,401 bp; Genes: 3,074

Εικόνα 5.4: Κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *C. glutamicum* ATCC13032.



Εικόνα 5.5: Θέση του γονιδίου *treY* στην κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *C.glutamicum* ATCC13032.

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, complete genome

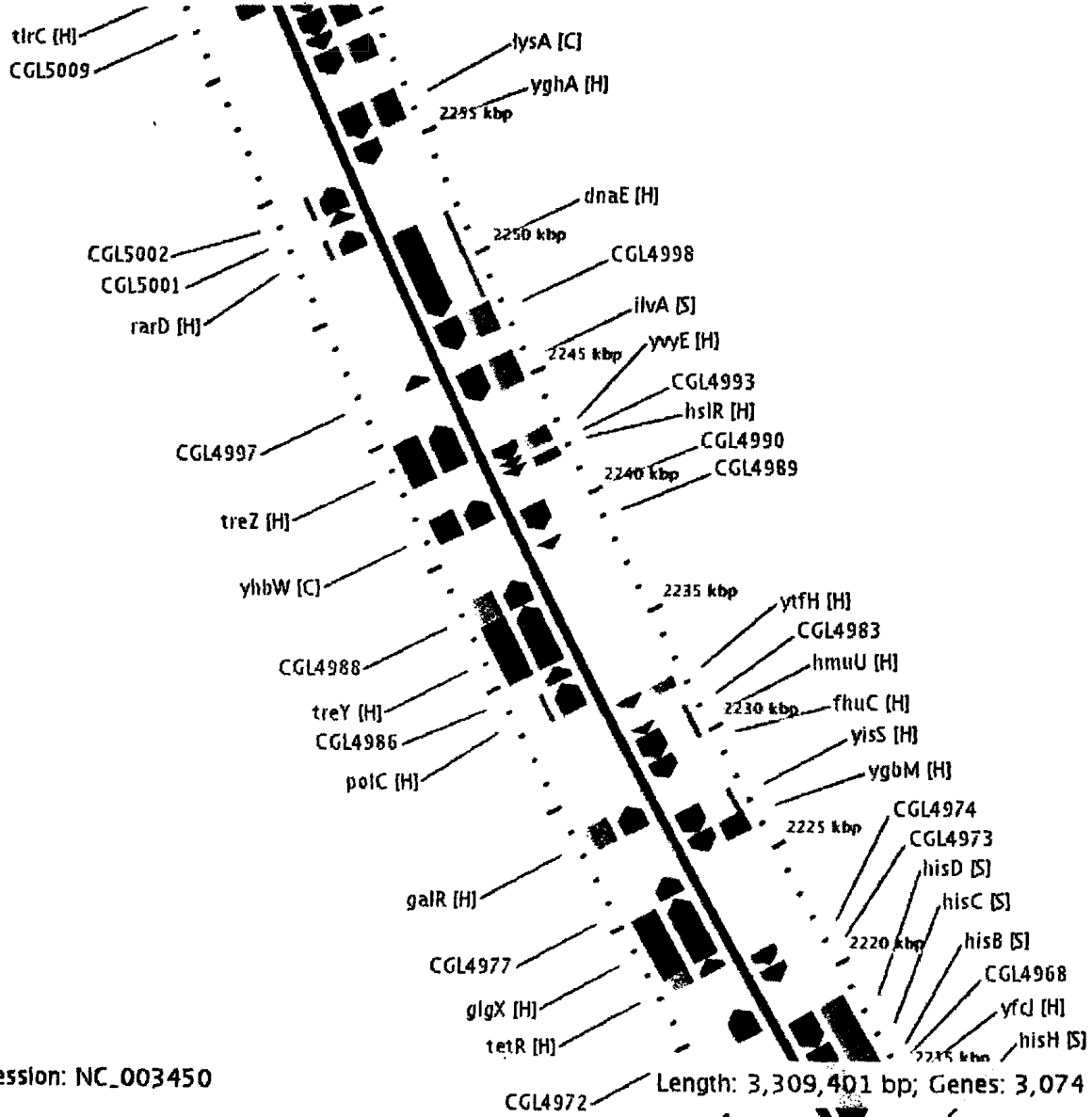


Accession: NC_003450

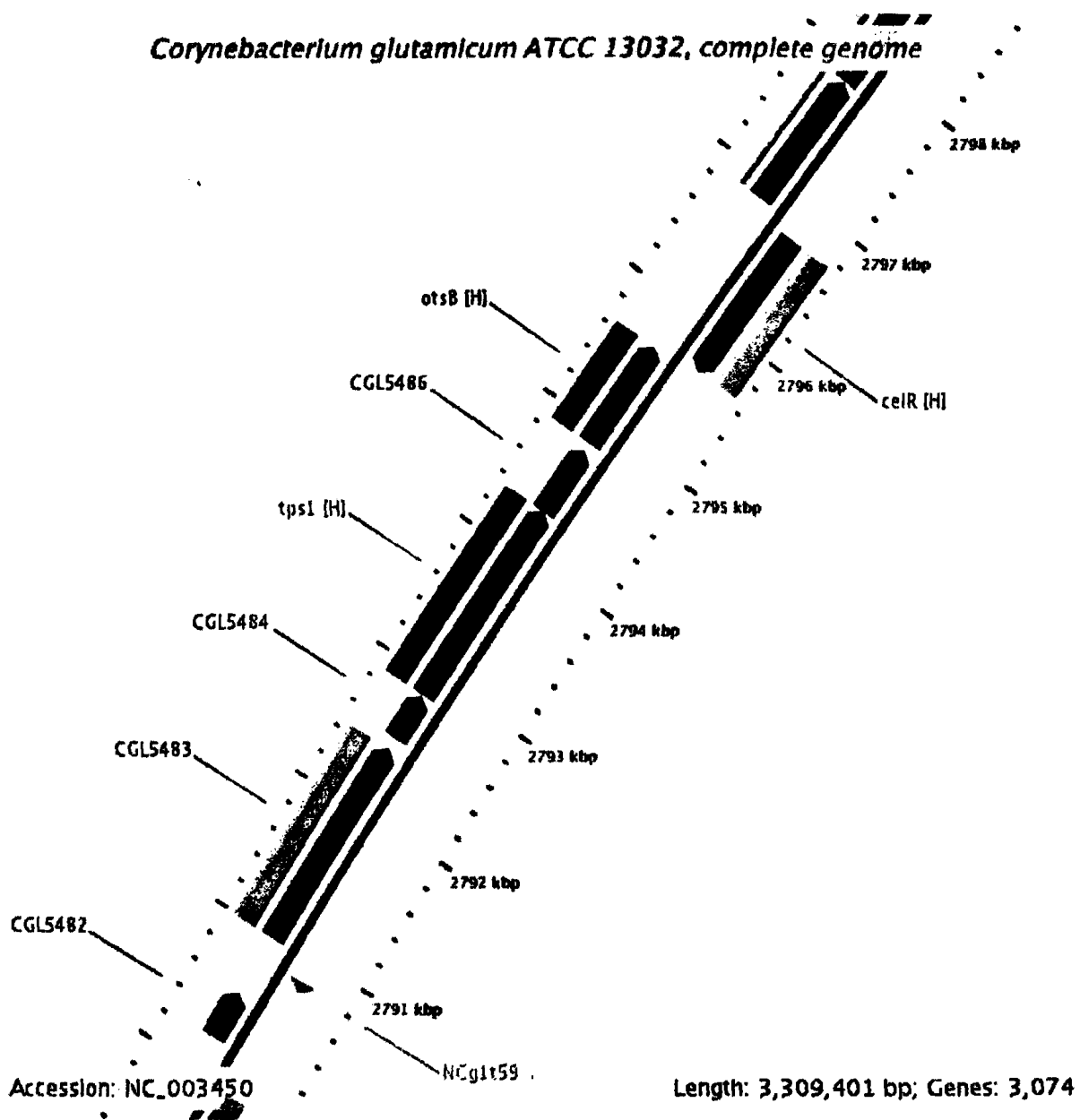
Εικόνα 5.6: Θέση του γονιδίου *treZ* στην κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *C.glutamicum* ATCC13032.



Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, complete genome



Εικόνα 5.7: Θέση των γονιδίων *treY* & *treZ* στην κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *C.glutamicum* ATCC13032.



Εικόνα 5.8: Θέση των γονιδίων *otsA* & *otsB* στην κυκλική απεικόνιση του γονιδιώματος του *C.glutamicum* ATCC13032.

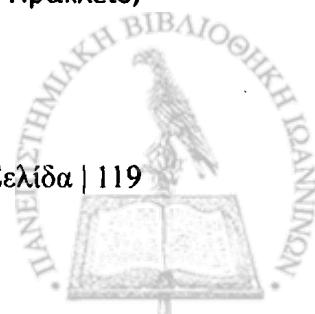
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Συνολικά αποτελέσματα κλώνων και το ποσοστό ομολογίας τους με το στέλεχος *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

| Α/Α | ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΛΩΝΟΥ | ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ / ΓΟΝΙΔΙΟ | ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 |
|-----|-----------------|---|--|
| 1 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treY</i> (εσωτερική περιοχή 521bp) | X - Ομοιότητα με <i>E.coli</i> |
| 2 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treY</i> (εσωτερική περιοχή 521bp) | X - Ομοιότητα με <i>E.coli</i> |
| 6 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (εσωτερική περιοχή 911bp) | 100% |
| 7 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (εσωτερική περιοχή 911bp) | 100% |
| 9 | | <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC21253/ <i>treZ</i> (εσωτερική περιοχή 911bp) | 99% |
| 11 | | <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC21253/ <i>treZ</i> (εσωτερική περιοχή 911bp) | 99% |
| 13 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treY</i> (2.433bp) | 99% |
| 15 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (1.830bp) | 100% |
| 16 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (1.830bp) | 100% |
| 17 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (1.830bp) | 100% |
| 18 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799/ <i>treZ</i> (1.830bp) | 99% |
| 19 | | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC21799 ΚΛΩΝΟΣ 13/ <i>treY</i> (εσωτερική περιοχή 521bp) | 98% |

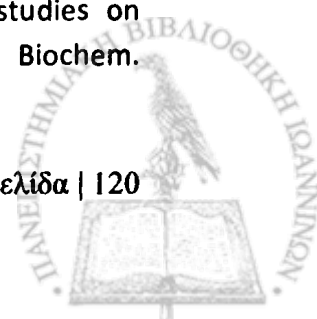


BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

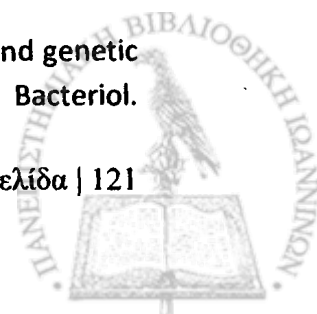
- (1) Abe S., K. Takayama, and S. Kinoshita (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*13: 279-301.
- (2) Afendra A.S., E.E. Yiannaki, M.A. Palaiomylitou, D.K. Kyriakidis, C. Drainas (2002). Co-production of ice nuclei and xanthan gum by transformed *Xanthomonas campestris* grown in sugar beet molasses. *Biotechnol. Lett.* 24: 579-583.
- (3) Andreou LV, A. Perysinakis, C. Drainas, A-S. Afendra (2005). Cloning and heterologous expression and characterization of trehalose biosynthetic genes of corynebacteria. 56^o Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, Newsletter 51, 71.
- (4) Andrew TR. (1977). Extracellular microbial polysaccharides. Sandford PA. and Laskin A. (eds), ACS Symposium Series, An. Chem. Soc.
- (5) Arai C., M. Kohguchi, S. Akamatsu, N. Arai, C. Yoshizane, N. Hasegawa, T. Hanaya, S. Arai, M. Ikeda, M. Kurimoto (2001). Trehalose suppresses lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis bone marrow in mice. *Nutr. Res.* 21:993-999.
- (6) Argöelles J.C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174:217-224.
- (7) Avonce N., A. Mendoza-Vargas, E. Moretti, and G. Iturriaga (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6:109.
- (8) Avonce N., B. Leyman, O. Mascorro-Gallardo, P. Van Dijck, J.M. Thevelein, G. Iturriaga (2004). The *Arabidopsis* Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signalling. *Plant Physiol* 136:3649-59.
- (9) Balows A. (1992). The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. New York.
- (10) Banaroudj N., D.H. Lee, and A.L.Goldberg (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biolo. Chem.* 276:24261-24267.
- (11) Belisle J.T., V.D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P.J. Brennan, and G.S. Bersa (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276:1420-1422.
- (12) Bell W., P. Klaassen, M. Ohnaker, T. Boller, M. Herweijer, P. Schoppink, P. Van der Zee, and A.Wiemken (1992). Characterization of the 56 kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning its gene reveal its identity with the product of CIF1 a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* 209:951-959.
- (13) Bell W., W. Sun, S. Hohman, S. Wera, A. Reinders, C. De Virgilio, A. Wiemken, and J.M. Thevelein (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevesiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 272:33311-33319.
- (14) Berg J.M., John L. Tymoczko, L. Stryer (2004). ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-Τόμος Ι, pp.159. Ηράκλειο, Κρήτη.
- (15) Birch G.G. (1963). Trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem.* 18:201-225.



- (16) Blakeley D., B. Roser, B. Tolliday, C. Colaço (1990). Dry instant blood typing plate for bedside use. *Lancet* 336:854-855.
- (17) Blazquez M.A., R. Lagunas, C. Gancedo, and J.M.Gancedo (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinase. *FEBS Lett.* 329:51-54.
- (18) Branca C., S. Maccarrone, S. Magazu, G. Maisano, S.M. Bennington, J.Taylor (2005). Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures. *J. Chem. Phys.* 122:174513.
- (19) Bredereck H., G. Hoschele, and K.Ruck (1953). Synthesis of nonreducing disaccharides. *Chem. Ber.* 86:1270.
- (20) Brennan P.J. and H. Nikaido (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64:29-63.
- (21) Brown C.R., L.Q. Hong-Brown, L. Biwesi, A.S. Verkman, and W.J. Welch (1996). Chemical chaperons correct the mutant phenotype of the DF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperons* 1:117_125.
- (22) Browning WC., BG. Chesser (1972). U.S. Patent 3,697,498.
- (23) Cabib E. and L. Leloir (1958). The biosynthesis of trehalose-phosphate. *J. Biol. Chem.* 231:259-275.
- (24) Candy D.J. and B.A. Kilby (1958). Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust. *Nature* 183:1584-1595.
- (25) Carpinelli J., R. Kramer, and E. Agosin (2006). Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Trehalose Overproduction: Role of the TreYZ Trehalose Biosynthetic Pathway.
- (26) Carpinelli J., R. Krämer, and E. Agosin (2006). Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Trehalose Overproduction: Role of the TreYZ Trehalose Biosynthetic Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1949-1955.
- (27) Clegg J.S. (1986). The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: the water replacement hypothesis. In *Membranes, Metabolism and Dry Organisms* (Leopold, A.C., ed.) Cornell University Press: New York, pp. 169-187.
- (28) Clegg J.S., M.F. Filosa (1961). Trehalose in the cellular slime mold, *Dictyostelium mucoroides*. *Nature* 192:1077-1078.
- (29) Colano C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder, B. Roser (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (N Y)* 10:1007-1011.
- (30) Coutinho C., E. Bernardes, D. Félix, A.D. Panek (1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.* 7:23-32.
- (31) Crowe J.H., (1971). Anhydrobiosis: An unsolved problem. *Amer. Naturalist* 105:563-573.
- (32) Crowe J.H., F.A. Hoekstra and L.M. Crowe (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:579-599.
- (33) Crowe J.H., L.M. Crowe, D. Chapman (1984). Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 232:400-407.

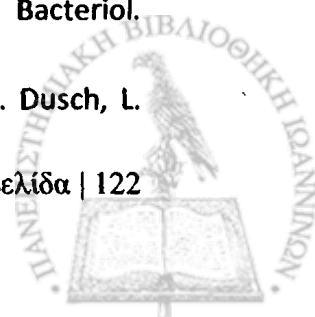


- (34) Davies J.E., S. Sarkar, and D.C. Rubinsztein (2006). Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 15: 23-31.
- (35) De Smet K.A., A. Weston, I.N. Brown, D.B. Young, B.D. Robertson (2000). Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol* 146:199-208.
- (36) De Virgilio C., T. Hottinger, J. Dominguez, T. Boller, and A. Wiemken (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *Eur. J. Biochem.* 219:179-186.
- (37) Dieffenbach CW., GS. Dveksler (1995). *PCR Primer, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (38) Eastmond P.J., A.J.H. Van Dijken, M. Spielman, A. Kerr, A.F. Tissier, H.G. Dickinson, J.D.G. Jones, S.C. Smeekens, I.A. Graham (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant J* 29:225-235.
- (39) Eggeling E., H. Sahm, and A.A. de Graaf (1996). Quantifying and directing metabolite flux: application to amino acid overproduction. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 54:1-30.
- (40) Elbein A.D. (1968). Trehalose phosphate synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. Purification of GDP-glucose:glucose-6-P 1-glycosyl transferase. *J. Biochem. Biol.* 96:1623-1631.
- (41) Elbein A.D. (1974). The metabolism of α, α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30:227-256.
- (42) Elbein A.D. and M. Mitchel (1973). Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis*, and the purification and properties of the glycogen synthase. *J. Bacteriol.* 113:863-873.
- (43) Elbein A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol* 13:17R-27R.
- (44) Eleutheria E.C.A., P.S. de Araujo, A.D. Panek (1993). Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1156:263-266.
- (45) Esteves M.I., W. Quintilio, R.A. Sato, I. Raw, P. Soares de Araujo M.H. Bueno da Costa, (2000). Stabilisation of immunoconjugates by trehalose. *Biotechnol. Lett.* 22:417-420.
- (46) Evans D.R. and V.G. Dethier (1957). The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *J. Insect Physiol.* 1:3-17.
- (47) Fairbairn D. (1958). Glucose, trehalose and glycogen in *Porrocaecum decipiens* larvae. *Nature* 181:1593-1594.
- (48) Fairbairn D. and R.F. Passey (1957). Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. *Exp. Parasitol.* 6:566-574.
- (49) Friedman S. (1960). The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, MEIG. *Arch. Biochem. Biophys.* 87:252-258.
- (50) Gancedo C., C.L. Flores (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeast and fungi. *FEMS Yeast Res* 4:351-359.
- (51) Giaever H.M., I. Kaasen, O.B. Stryod, and A.R. Strom (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*



170:2841-2849.

- (52) Goddijn O.J. and K. Van Dun (1999). Trehalose metabolism in plants. *Trends Plants Sci.* 4:315-319.
- (53) Gourdon P. and N.D. Lindley (1999). Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 1:224-231.
- (54) Gribbon E.M., S.D. Sen, B.J. Roser, J. Kampinga (1996). Stabilisation of vaccines using trehalose (QT4) technology. *Dev. Biol. Stand.* 87:193-199.
- (55) Guillouet S., and J.M. Engasser (1995). Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:496-500.
- (56) Harding T.S. (1923). *Sugars* 25:476-478
- (57) Hatakeyama K., K. Kahama, A.A. Vertès, M. Kabayasi, Y. Kurusu, H. Yukawa, (1993a). Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria : cloning and sequencing of the *bioB* gene from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq.* 4, 87-93.
- (58) Hatakeyama K., K. Kahama, A.A. Vertès, M. Kabayasi, Y. Kurusu, H. Yukawa, (1993b). Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria : cloning and sequencing of the *bioA-bioD* genes from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq.* 4, 177-184.
- (59) Haynie S., G. Whitesides (1990). Enzyme-catalyzed organic synthesis of sucrose and trehalose with in situ regeneration of UDP-Glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 23:155-170.
- (60) Helfrich B. and K. Weis (1956). The synthesis of glucosides and nonreducing disaccharides. *Chem. Ber.* 89:314-321.
- (61) Higashiyama T. (2002). Novel functions and applications of trehalose, *Pure Appl. Chem.*, Vol.74, No. 7, pp. 1263-1269.
- (62) Hirata T., H. Yokomise, T. Fukuse, K. Muro, K. Inui, K. Yagi, S. Hitomi, H. Wada (1993). Effects of trehalose in preservation of canine lung for transplants. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 41:59-63.
- (63) Hohmann S., M.J. Neves, W. deKoning, R. Alijo, J. Ramos, and J.M. Thevelein (1993). The growth and signaling defects of the *ggs1 (fdp1/byp1)* deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase. *Curr. Genetics* 23:281-289
- (64) Hounsa C.G., E.V. Brandt, J. Thevelein, S. Hohmann, B.A. Prior (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol* 144:671-680.
- (65) Jeans A., J. Pol (1974). *Sci.*, 45,209.
- (66) Kaasen I., J. McDougall, and A.R. Strom (1994). Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and omology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145:9-15
- (67) Kaasen I., P. Falkenberg, O.B. Styrvold, and A.R. Strom (1992). Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by *katF* (AppR). *J. Bacteriol.* 174:889-898 (published erratum appears in *J. Bacteriol.* 174:3422).
- (68) Kalinowski J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L.



Eggeling, B.J. Eikmanns, L. Gaigarat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Limke, A.C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D.A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahl, V.F. Wendisch, I. Wiegrabe, A. Tanch, (2003). The complete C.g. ATCC13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Jour. Of Biotechnol.* 104, 5-25.

(69) Kalinowski, et al. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 genome sequence and its impact on the production of L aspartate-derived amino acids and vitamins, Germany, (*Cglut complete genome*).

(70) Kandrór O., A. DeLeon, and A.L. Goldberg (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9727-9732.

(71) Katsuno M., H. Adachi, G. Sobue (2004). *Nature Medicine*. 10(2):123-124.

(72) Kim J., P. Alizadeh, T. Harding, A. Hefner-Gravink, and D.J. Klionsky (1996). Disruption of the yeast ATH1 confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potencial commercial applications. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1563-1569

(73) Kim Y.H., T.K. Kwon, S. Park, H.S. Seo, J.J. Cheong, C.H. Kim, and J.K. Kim (2000). Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehaloydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl. Env. Microbiol.*66:4620-4624.

(74) Kinoshita S., and K. Nakayama (1978). Amino acids p.209-261. In A.H. Rose (ed), *Primary products of metabolism*. Academic Press, London.

(75) Konsoula Z., M. Liakopoulou-Kyriakides, A. Perysinakis, P. Chira, A. Afendra, C. Drainas, DA. Kyriakidis (2008). Heterologous Expression of a Hyperthermophilic α -Amylase in Xanthan Gum Producing *Xanthomonas campestris* Cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* DOI 10.1007/s12010-007-8115-x.

(76) Konsoula Z., M. Liakopoulou-Kyriakides, A. Perysinakis, P. Chira, A. Afendra, C. Drainas and D.A. Kyriakidis (2008). Heterologous Expression of a Hyperthermophilic α -Amylase in Xanthan Gum Producing *Xanthomonas campestris* Cells. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 149: 99-108.

(77) Kubota M., I. Sawatani, K. Oku, K. Takeuchi, S. Murai (2004). The development of α,α -trehalose production and its applications. *J. Appl. Glycosci.* 51:63-70.

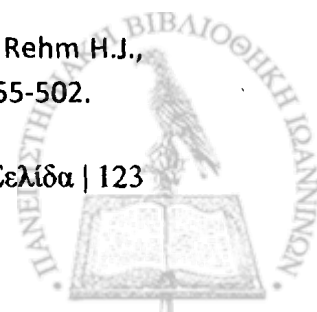
(78) Lapp D., B.W. Patterson, and A.D. Elbein (1971). Properties of a trehalose phosphate synthetase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 246:4567-4579.

(79) Lebel E.G., P.B. Heifetz, S.A. Goff (2004). Expression of trehalose 6-phosphate synthase in plant plastids. *US Pat.* 6,686,516.

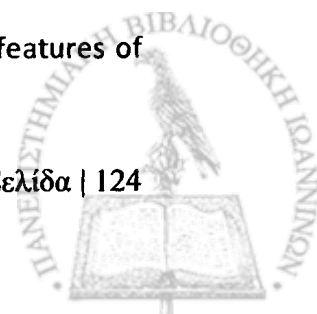
(80) Lederer E. (1976). Cold factor and related trehalose esters. *Chem. Physiol. Lipids* 16:91-106

(81) Lemieux R.U. and H.F. Bauer (1954). A chemical synthesis of D-trehalose. *Can. J. Chem.* 32:340-344.

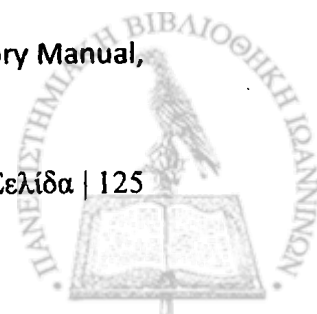
(82) Leuchtenbrger W., (1996). Amino acids-technical production and use. In: Rehm H.J., G. Pühler, P. Stadler (Eds), *Biotechnology*, vol. 6. VCH, Weinheim, Germany, pp. 465-502.



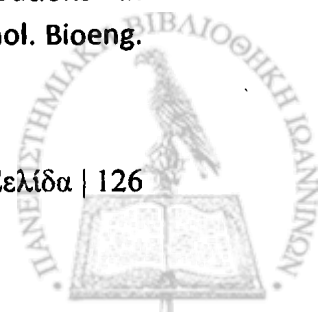
- (83) Lins R.D., C.S. Pereira, P.H. Hünenberger (2004). Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55:177-186.
- (84) Liu R., H. Barkhordarian, S. Emadi, C.B. Park, and M.R.Sierks (2005). Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol Dis* 20: 74-81.
- (85) Londesborough J., O. Tunnela, K.O. Holmstrom, E. Mantyla, B. Welin, A. Mandal, T.E. Palva (2000). Transgenic plants producing trehalose. US Pat. 6,130,368.
- (86) Lowry OH., NJ. Rosenbrough, AL. Farr, RJ. Randall (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- (87) Martin M.C., L.A. Diaz, M.B. Manzanal, and C. Hardison (1986). Role of trehalose in the spores of *Streptomyces*. *FEMS Micro. Lett.* 35:49-54.
- (88) Maruta K., H. Mitsuzumi, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, and M. Kurimoto (1996). Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* 1291:117-181.
- (89) McDougall L., I.Kaasen, and R.A. Strom (1993). A yeast gene for trehalose-6-phosphate synthase and its complementation of an *Escherichia coli otsA* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:25-30.
- (90) Minnikin D.E., M. Goodfellow, and M.D. Collins, (1978). Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa, p. 85 – 160. In: I. J. Bousfield and A. G. Gallely (ed.), *Coryneform bacteria*. Academic Press, London.
- (91) Muller J., R.A. Aeschbacher, A. Wingler, T. Boller, A. Wiemken (2001). Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125:1086-1093.
- (92) Mullis KB, F. Ferre, RA. Gibbs (1994). *The polymerase chain reaction*. Birkhauser.
- (93) Naozumi T., D. Navzer Sachivala, M. Shibata (2008). *Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials*.
- (94) Neves M.J., S.Hohmann, W. Bell, F. Dumortier, K. Luyten, J. Ramos, P. Cobbaert, W. de Koning, Z. Kaneza, J.M. Thevelein (1995). Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Curr Genet* 27:110-122.
- (95) Nguyen H.M., M. Bonin, C. Kuhn, S. Holzmann, v. Horsten and O. Riess (2005). Gene expression pattern in HD transgenic rats and HD knock-in mice: specific effects of trehalose treatment. Society for Neuroscience, Washington, DC.
- (96) Noubhani A., O. Bunoust, M. Rigolet, and J.M. Thevelein (2000). Reconstitution of ethanolic fermentation permabilised spheroplasts of wild type and trehalose-6-phosphate synthase mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 267:4566-4576.
- (97) Nwaka S. and H. Holzer (1997). In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Moldave, K., ed.), pp. 197-237, Academic Press.
- (98) Nwaka S., B. Mechler, M. Destruelle, and H. Holzer (1995b). Phenotypic features of trehalose mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 360:286–290.



- (99) Nwaka S., M. Kopp, and H. Holzer (1995a). Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270:10193– 10198.
- (100) Padilla L., R. Krämer, G. Stephanopoulos, and E. Agosin (2004). Overproduction of Trehalose: Heterologous Expression of *Escherichia coli* Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:370-376.
- (101) Padilla L., S. Morbach, R. Kramer, and E. Agosin (2004). Impact of Heterologous Expression of *Escherichia coli* UDP-Glucose Pyrophosphorylase on Trehalose and Glycogen Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*.
- (102) Patist A. and H. Zoerb (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 40:107–113.
- (103) Puech V., N. Bayan, K. Salim, G. Leblon, and M. Daffe (2000). Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycolyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigen 85. *Mol. Microbiol.* 35:1026-1041.
- (104) Qihong S., W. Wei, Q. Wei, H. Jun, F. Rongxiang, H. Chaozy (2003). High-Quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiology Letters* 226:145-150,2003.
- (105) Qu Q., S.J. Lee, W. Boss (2004). TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem* 279:47890-47897.
- (106) Robbins DJ., JE. Moulton, AN. Nooth (1964). *Food Cosmet. Toxicol.*, 2,102.
- (107) Rogosa M, C.S. Cummins, R.A. Lelliott, and R.M. Keddie (1974). Coryneform group of bacteria. p.599-632. In:R.E. Buchacan, and N.E. Gibbons (ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- (108) Rolfs A., I. Schuller, U. Finkh, I. Weber-Rolfs (1992). *PCR: Clinical diagnostics and research*, Springer Laboratory.
- (109) Romero C., J.M. Belles, J.L. Vaya, R. Serrano, and F.A. Culianez-Macia (1997). Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201:293-297.
- (110) Roth R. and M. Sussmann (1966). Trehalose synthesis in the cellular slime mold, *Dictiostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* 122:225-231.
- (111) Rowlands R.T. (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzymes Microb. Technol.* 6, 3-10.
- (112) Sabry Z.I. and N.A. Atallah (1961). Identification of the sugars in the manna of northern Iraq. *Nature* 190:915-916.
- (113) Sahm H., L. Eggeling, A.A. le Graaf (2000). Pathway analysis and metabolic engineering in *C.g.* *Biol. Chem.* 381, 899-910.
- (114) Sahm H., L. Eggeling, B. Eikmanns, R. Krämer (1995). Metabolic design in amino acid producing bacterium *C.g.* *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 243-252.
- (115) Sambrook J., EF. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.



- (116) Schiraldi Ch., I. Di Lernia, M. De Rosa (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol* 20:420-425.
- (117) Shikamata T. and Y. Minatagawa (2000). Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 380:331-338.
- (118) Singer M.A., S. Lindquist (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* 16:460-468.
- (119) Skjerdal O.T., H. Sletta, S.G. Flenstad, K.D. Josefsen, D.W. Levine, and T.E. Ellingsen (1996). Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Bravibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:635-642.
- (120) Sola-Penna M., J.R. Meyer-Fernandes (1998). Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* 360:10-14.
- (121) Streeter J.G., A. Bhagwat (1999). Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in Rhizobia. *Can J Microbiol* 45:716-721.
- (122) Strøm A.R., I. Kaasen (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 8:205-210.
- (123) Sussman A.S., B.T. Lingappa (1959). Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Science* 130:1343.
- (124) Suzuki K., T. Kaneko, and K. Komagata, (1981). Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:131 – 138.
- (125) Tanaka M.Y., S. Machida, T. Niu, N. Ikeda, H. Jana, M. Doi, M. Kurosawa, Nekooki and N. Nukina (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10: 148-54.
- (126) Tatzelt J., S.B. Prusiner, and W.J. Welch (1996). Chemicals chaperons interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15:6363-6373.
- (127) Thevelein J.M. (1992). The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevesiae*. *Antonie Leewenhoek* 62:109-130.
- (128) Thompson A., K. Anno, M.L. Wolfrom, and M. Inatome (1954). Acid reversion products from D-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 76:1309-1311.
- (129) Tunnacliffe A., A. García de Castro, M. Manzanera (2001). Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: Is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology* 43:124-132.
- (130) Tzvetkov M., C. Klopprogge, O. Zelder and W. Liebl (2003). Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition.
- (131) Vallino J.J. and G. Stephanopoulos (1993). Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 41:633-646.



- (132) Vogel G., R.A. Aeschbacher, J. Müller, T. Boller, and A. Wiemken (1998). Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J.* 13:673-683.
- (133) Walker R.N. (1966). (to ESSO Production Research Co). U.S. Patent 3.245,871.
- (134) Wannet W.J.B., H.J.M. Op. den Camp, H.W. Wisselink, C. van der Drift, L.J.L.D. Van Griensven, G.D. Vogels (1998). Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim Biophys Acta* 1425:177-188.
- (135) Warner D.T. (1962). Some possible relationships of carbohydrates and other biological components with the water structure at 37°C. *Nature* 196:1055-1058.
- (136) White T.J., CF Gonzalez (1995). Electroporation of *Xanthomonas*. In: Nickoloff JA, eds. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 47. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 135-141.
- (137) Wilkins W., Baltimore. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th Edition, pp.100.
- (138) Wilkins W., Baltimore. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1, pp.199-211.
- (139) Wolf A., R. Krämer, and S. Morbach (2003). Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* 49:1119-1134.
- (140) Wood J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:230-262.
- (141) Wyatt G.R., G.F. Kalf (1957). The chemistry of insect hemolymph: II. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.* 40:833-847.
- (142) Yamamoto T., K. Maruta, H. Watanabe, H. Yamashita, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto (2001). Trehalose-producing operon *treYZ* from *Arthrobacter ramosus* S34. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:1419-1423.
- (143) Zhang H.X., J.N. Hodson, J.P. Williams, and E. Blumwald (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12832-12836.
- (144) Zhao X., T. Koshiba, T. Nakamura, T. Tsuruyama, Y. Li, T. Bando, H. Wada, K. Tanaka (2008). ET-Kyoto solution plus dibutyryl cyclic adenosine monophosphate is superior to University of Wisconsin solution in rat liver preservation. *Cell Transpl.* 17:99-109.