

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Δ.Π.Μ.Σ.: «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Κλωνοποίηση, υπερέκφραση και χαρακτηρισμός της 1,2-
διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από το
Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3**

ΛΑΠΠΑ ΕΙΡΗΝΗ
Βιολόγος

Επιβλέπουσα:
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Άννα-Ειρήνη Κούκκου

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Μικροβιακής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα – Ειρήνη Κούκκου για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε και την ευκαιρία, που μου έδωσε να εργαστώ υπό την επίβλεψή της, έπειτα τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ευγενία Καραμπίκα και τον υποψήφιο διδάκτορα Επαμεινώνδα Τσακογιάννη για τις γνώσεις, που μου παρείχαν, τη βοήθεια και την καθοδήγηση, που μου προσέφεραν, την υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόηση, που μου έδειξαν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Φανίτσιο και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελπινίκη Βανδέρα για τη φιλική τους στάση απέναντί μου και για τη βοήθεια, που μου προσέφεραν, όταν τη χρειάστηκα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στους υποψήφιους διδάκτορες Ευάγγελο Σφήκα και Μάριο Μητσόπουλο και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Μαυρομάτη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Ηρακλή Μοσχονά, Κατερίνα Τσούκα και Στελίνα Παπαδάκη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Αλεξία Τσαπίνου και Στέλιο Παπαδόπουλο για το ευχάριστο περιβάλλον συνεργασίας, συννενόησης και αλληλοβοήθειας, που αναπτύχθηκε μεταξύ μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Ευστάθιο Φριλίγγο και Θεόδωρο Τζαβάρα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευστάθιο Χατζηλουκά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αμαλία Αφένδρα για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις της διπλωματικής μου εργασίας μεταπτυχιακής ειδίκευσης στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ.: «Βιοτεχνολογία».

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
3.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες.....	9
3.1.1 Πηγές PAHs.....	12
3.1.2 Μεταλλαξιογόνος δράση των PAHs.....	13
3.2 Μικροβιακός μεταβολισμός των PAHs.....	14
3.2.1 Μεταβολισμός των PAHs στα βακτήρια.....	17
3.2.2 Γεντισικό οξύ.....	20
3.3 Διοξυγονάσεις.....	22
3.3.1 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος.....	24
3.4 <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	26
3.5 Σκοπός της εργασίας.....	30
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
4.1 Όργανα – Συσκευές – Υλικά.....	31
4.2 Χημικές Ουσίες.....	32
4.3 Βακτηριακά στελέχη.....	32
4.3.1 Πλασμίδια.....	32
4.3.2 Εκκινητές.....	33
4.3.3 Ένζυμα.....	33
4.4 <i>In silico</i> εντοπισμός του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος...33	
4.5 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος34	
4.6 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων.....	34
4.6.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργειών <i>E. coli</i> και <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	34
4.6.2 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης με γεντισικό οξύ ως πηγή άνθρακα για το βακτήριο <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	35
4.6.3 Στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	35
4.6.4 Αντιβιοτικά.....	36
4.7 Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης M9 με γεντισικό οξύ ως πηγή άνθρακα.....	36

4.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από βακτηριακά κύτταρα του στελέχους Sphe3 με τη μέθοδο CTAB.....	36
4.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα.....	39
4.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Plasmid.....	40
4.11 Καθαρότητα DNA.....	40
4.12 Ηλεκτροφόρηση DNA.....	41
4.13 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	43
4.14 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II.....	44
4.15 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	44
4.16 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια.....	46
4.16.1 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Zero Blunt® pCR Cloning kit.....	49
4.17 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	50
4.17.1 Μέθοδος Kushner.....	51
4.17.2 Μέθοδος Chung and Miller.....	52
4.18 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3 με μηχανική λύση.....	53
4.19 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	53
4.19.1 Μέθοδος Bradford.....	53
4.19.2 Μέθοδος Lowry.....	54
4.20 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	55
4.21 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET.....	58
4.22 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni ²⁺ -NTA αγαρόζης.....	60
4.23 Ενζυμικοί προσδιορισμοί.....	62
4.23.1 Ενζυμικός προσδιορισμός της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	62
4.23.2 Επίδραση του σιδήρου και του L-ασκορβικού οξέος στη δραστικότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	63
4.23.3 Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	63
4.23.4 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	64

4.23.5 Επίδραση διαφορετικών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	64
4.23.6 Τιτλοδότηση ενζυμικού παρασκευάσματος.....	65
4.23.7 Κινητική σταθερής κατάστασης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	65
4.23.8 Επίδραση εναλλακτικών υποστρωμάτων στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	65
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
5.1 Εντοπισμός του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος με <i>in silico</i> μελέτη.....	67
5.2 Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	67
5.3 Σύγκριση αλληλουχιών – Πολλαπλή στοίχιση.....	68
5.4 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	71
5.5 Πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	72
5.6 Φυλογενετική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του υποθετικού γονιδίου.....	73
5.7 Εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	74
5.8 Ενίσχυση του πιθανού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	75
5.8.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	75
5.8.2 Ενίσχυση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	76
5.8.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt.....	77
5.9 Κλωνοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον πλασμιδιακό φορέα pET29c.....	81
5.10 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου.....	83
5.11 Χαρακτηρισμός της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	84
5.11.1 Επίδραση FeSO ₄ (Fe ²⁺)/L-ascorbate στη δραστηριότητα του ενζύμου.....	84
5.11.2 Βέλτιστο pH.....	85
5.11.3 Βέλτιστη θερμοκρασία.....	87
5.11.4 Επίδραση ιόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου.....	88
5.11.5 Τιτλοδότηση του ενζυμικού παρασκευάσματος.....	89
5.11.6 Κινητική σταθερής κατάστασης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	91
5.11.7 Εναλλακτικά υποστρώματα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.....	92

5.11.8 Διατήρηση της ενζυμικής δραστηρότητας.....	92
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	94
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	98
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ουσιών με δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες έχουν επιπτώσεις τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό όλο και πιο έντονο γίνεται το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη διερεύνηση των μεθόδων αποδόμησης των ουσιών αυτών.

Το βακτήριο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 απομονώθηκε από μία περιοχή της Ηπείρου, που είναι μολυσμένη από το κρεόζωτο. Είναι ικανό να μεταβολίζει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως το φαινανθρένιο. Το γεντισικό οξύ αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη, κλειδί στην αερόβια βακτηριακή αποδόμηση αρωματικών ενώσεων.

Στην παρούσα εργασία, ένα γονίδιο μήκους 1112 bp, που κωδικοποιεί την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pET29c και υπερεκφράστηκε στα βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* BL21. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου με στήλη αγκιστείας Ni^{2+} -NTA και μελετήθηκαν τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά. Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Οι τιμές K_m και k_{cat}/K_m για το γεντισικό οξύ είναι $24.9 \mu\text{M}$ και $28.75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} 10^3$, αντίστοιχα. Η δραστητικότητα του ενζύμου είναι βέλτιστη στους 50°C και σε εύρος τιμών pH 7.5-8. Η δραστητικότητα αυξάνεται μετά από επώαση του ενζύμου σε $0.2 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{L-ascorbate}$ για 30 min. Η ο-φαινανθρολίνη παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση, καθώς επίσης και τα ιόντα Cu^{2+} , Ni^{2+} σε μικρότερο βαθμό.

2. SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons are a large group of chemicals with two or more aromatic rings. Their physicochemical properties affect both humans and the environment. This is why the scientific community is increasingly interested in exploring the methods of degradation of these substances.

The bacterium *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 was isolated from a region of Epirus contaminated with creosote. It is capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons, such as phenanthrene. Gentisic acid is an intermediate metabolite, key in the aerobic bacterial degradation of aromatic compounds.

In the present study, an 1112 bp gene encoding gentisate dioxygenase was cloned into the plasmid vector pET29c and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 bacterial cells. Thereafter, the enzyme was purified by Ni²⁺-NTA affinity column and its biochemical characteristics were studied. Gentisate dioxygenase follows Michaelis-Menten kinetics. The values of K_m and k_{cat}/K_m for gentisic acid are 24.9 μM and $28.75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot 10^3$, respectively. The activity of the enzyme is optimal at 50°C and pH 7.5-8. The activity is increased after incubation of the enzyme in 0.2 mM Fe²⁺/L-ascorbate for 30 min. O-phenanthroline has a strong inhibitory effect, as well as Cu²⁺, Ni²⁺ to a lesser influence.

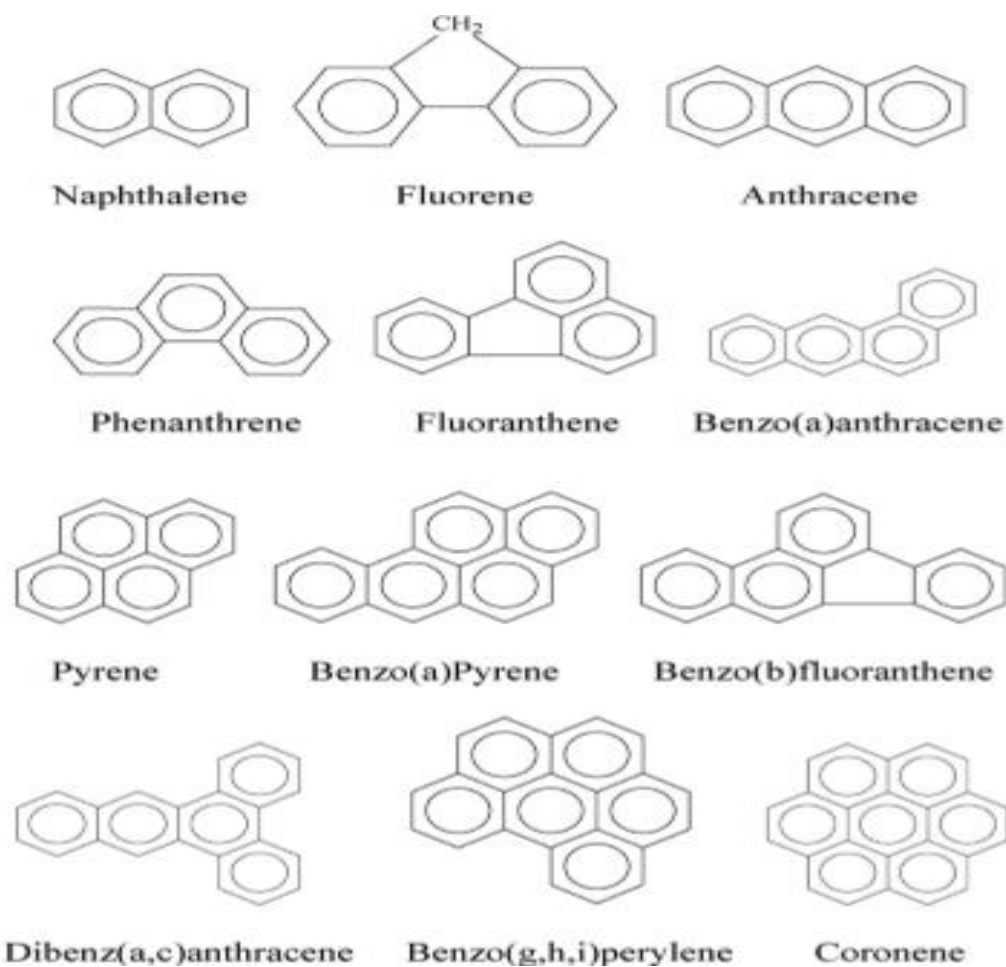
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι χημικές ενώσεις, που αποτελούνται από δύο ή περισσότερους ενωμένους αρωματικούς δακτυλίους με άτομα άνθρακα και υδρογόνου (Agarwal et al., 2009). Οι ενώσεις αυτές δεν περιέχουν ετεροάτομο και δεν φέρουν υποκαταστάτες. Οι PAHs είναι ευρέως διαδεδομένοι οργανικοί ρύποι. Ορισμένοι από αυτούς θεωρούνται μεταλλαξιογόνες ή/και καρκινογόνες ενώσεις και συνδέονται με προβλήματα υγείας, όπως ο καταρράκτης, η βλάβη σε νεφρά και ήπαρ, ακόμη και ίκτερο. Έτσι, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη μελέτη των ενώσεων αυτών (Takada et al., 1990; Lee and Lee, 2004; Boonyatumanond et al., 2007; Hassanien and Abdel-Latif, 2007).

Οι PAHs σχηματίζονται κατά κύριο λόγο από την ατελή καύση των καυσίμων, που περιέχουν άνθρακα, όπως το ξύλο, το κάρβουνο, το πετρέλαιο, το λίπος και ο καπνός (Baek et al., 1991) σε υψηλή θερμοκρασία (500-800°C) (Haritash et al., 2009) και άλλων οργανικών υλικών (Yunker et al., 2002) σε χαμηλή θερμοκρασία (100-300°C) (Haritash et al., 2009). Επίσης, σχηματίζονται κατά τη διάρκεια θερμικής αποσύνθεσης των οργανικών μορίων και του επακόλουθου ανασυνδυασμού τους (Haritash et al., 2009). Οι PAHs με περισσότερους από τέσσερις δακτυλίους προέρχονται κυρίως από πυρετογόνες πηγές (Dahle et al., 2003). Η διαλυτότητα και η τάση ατμών των PAHs μειώνεται, καθώς αυξάνεται το μοριακό τους βάρος. Συνεπώς, οι PAHs με τρεις ή περισσότερους δακτυλίους έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και χαμηλή τάση ατμών. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται οι χημικές δομές μερικών από τους πιο ευρέως γνωστούς PAHs (Haritash et al., 2009). Εξαιτίας των προαναφερθέντων ιδιοτήτων τους, οι PAHs συναντώνται στο περιβάλλον, κυρίως στο έδαφος και τα ιζήματα και συνήθως διασπείρονται με τη βοήθεια του νερού και του αέρα. Η περιβαλλοντική επιβάρυνση των PAHs οφείλεται κυρίως στην παρουσία τους στο έδαφος σε ποσοστό 95% και σε μόλις 0,2% στην ατμόσφαιρα (Smith et al., 1995). Πιθανότατα, αποτελούν τον πρώτο αναγνωρίσιμο περιβαλλοντικό ρύπο. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι δεν αποδομούνται εύκολα υπό κανονικές συνθήκες. Συνεπώς, δεν είναι μόνο η παραμονή τους σε όλα τα συστατικά του περιβάλλοντος, που έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία, αλλά επίσης και η αντίστασή τους στην βιοαποδόμηση και η

καρκινογόνος δραστηριότητά τους. Οι PAHs αποτελούν τους κύριους ρυπαντές του αέρα γι αυτό το λόγο και ο τελικός αποδέκτης όλων των χημικών ουσιών είναι το έδαφος (Haritash et al., 2009). Η πορεία τους στο έδαφος περιλαμβάνει την φωτοοξείδωση, τη χημική οξείδωση, την απορρόφηση από σωματίδια του εδάφους και την μικροβιακή αποδόμηση (Wild et al., 1995).



Εικόνα 3.1 Οι χημικές δομές των πιο γνωστών PAHs (Haritash et al., 2009).

Οι PAHs μπορούν να φθάσουν στα επιφανειακά ύδατα με διάφορους τρόπους, όπως είναι: οι ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις, τα αστικά λύματα, τα βιομηχανικά απόβλητα και οι διαρροές πετρελαίου. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους στο νερό και της ισχυρής υδρόφοβης φύσης τους, οι εν λόγω προσμείξεις τείνουν να συσσωματώνονται με συγκεκριμένα υλικά του υδάτινου περιβάλλοντος, τα οποία καταλήγουν στα ιζήματα. Στα ποτάμια, τα ιζήματα μπορούν να λειτουργήσουν ως χώροι προσωρινής αποθήκευσης των PAHs. Στην περίπτωση όμως των μη φυσιολογικών συνθη-

κών, οι ενώσεις αυτές μπορούν να επαναιωρηθούν, να διαλυθούν ξανά και να επανέλθουν στη βιοδιαθεσιμότητα. Οι οργανισμοί που ζουν σε περιβάλλοντα μολυσμένα με PAHs μπορούν να απορροφήσουν αυτές τις ενώσεις μέσω της επιφάνειας του σώματός τους ή με την κατάποση των μολυσμένων ιζημάτων ή σωματιδίων και τη μετέπειτα μεταφορά τους μέσω του υδάτινου τροφικού πλέγματος. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη χρήση χελιών για την παρακολούθηση αυτών των επιβλαβών ουσιών. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι, λόγω συγκεκριμένων φυσιολογικών και οικολογικών χαρακτηριστικών, τα χέλια βιοσυσσωρεύουν πολλές ουσίες στο μυϊκό τους ιστό (Maes et al., 2007).

Από τεχνικής άποψης είναι ιδιαίτερος δύσκολο να απομακρυνθούν οι μολυσματικοί παράγοντες που έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (Kim et al., 2005). Επιπλέον, ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ο τύπος και η δομή του εδάφους, το pH, η θερμοκρασία και η αλληλεπίδραση των μολυσματικών παραγόντων με άλλους υδρογονάνθρακες ή/και βαρέα μέταλλα, μπορούν να παρατείνουν το χρόνο παραμονής τους στο περιβάλλον (Bamforth et al., 2005). Ως εκ τούτου, αναπτύσσονται νέες τεχνολογίες, προκειμένου να διαλυθούν αυτές οι μολυσματικές ουσίες. Γι' αυτό το λόγο και πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο να αποκαταστήσουν τα μολυσμένα εδάφη από PAHs. Οι νέες αυτές τεχνικές χρησιμοποιούν μοντέλα ρύπων για να επιβεβαιώσουν την απομάκρυνση των μολυσματικών ενώσεων. Ο Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος αναφέρει συγκεκριμένους PAHs (ακεναφθένιο, ακεναφθυλένιο, ανθρακένιο, βενζο(α)ανθρακένιο, βενζο(α)πυρένιο, βενζο(β)φθοροανθένιο, φθοροανθένιο, φλουορένιο, ινδενο(1,2,3-cd)πυρένιο, ναφθαλένιο, φαινανθρένιο και πυρένιο) στις πιο επικίνδυνες ουσίες, οι οποίες αποτελούν σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία σε χώρους με επικίνδυνα απόβλητα (Jin et al., 2007).

Τα εδάφη και τα ιζήματα μπορούν να αποκατασταθούν από τους PAHs με μεθόδους *in situ* και *ex situ*. Ωστόσο, από οικονομικής και περιβαλλοντικής άποψης, η *in situ* αποκατάσταση έχει μεγάλη σημασία, γι' αυτό το λόγο και έχουν γίνει προσπάθειες για να βρεθούν κατάλληλες μη επεμβατικές μέθοδοι αποκατάστασης. Οι *in situ* τεχνολογίες αποκατάστασης του εδάφους από PAHs μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τύπους: φυσικοχημικές και βιολογικές. Οι παλιότερες τεχνολογίες βασίζονται στην ικανότητα αρκετών μικροοργανισμών να αποδομούν ορισμένες οργανικές ενώσεις με αποδεδειγμένη επιτυχία σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα (Peng et al., 2008). Παρόλα αυτά, λόγω των ιδιοτήτων των PAHs, οι βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση των PAHs βασίζονται σε φυσικοχημικές τεχνολογίες. Έ-

τσι, η απομάκρυνση των PAHs επιτυγχάνεται με εκχύλιση με διαλύτη ή με υπερκρίσιμο υγρό ή με ζεστό νερό (Paria et al., 2008; Maturi et al., 2008; Rivas et al., 2009).

Η ηλεκτροδιάβρωση είναι μία εναλλακτική λύση για την αποκατάσταση εδάφους μολυσμένου από PAHs. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την εξόρυξη βαρέων μετάλλων, εφαρμόζοντας ηλεκτρικό ρεύμα για την μετακίνηση των μολυσματικών ουσιών. Σήμερα, η εφαρμογή αυτής της τεχνικής μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, όπως για παράδειγμα το Fenton ή η βιοανάδραση έχει θετικά αποτελέσματα στην απομάκρυνση των PAHs. Παρόλο που η αποκατάσταση του εδάφους από τους PAHs μέσω της ηλεκτροδιάβρωσης βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά της (Pazos et al., 2010).

3.1.1 Πηγές PAHs

Οι PAHs προέρχονται είτε από τη φύση, είτε από τον άνθρωπο. Οι φυσικές πηγές περιλαμβάνουν την έκρηξη ηφαιστειών και την καύση δασών και λιβαδιών. Η παρουσία των PAHs στο νερό οφείλεται στη μεταφορά των αιωρούμενων σωματιδίων μέσα στα οποία βρίσκονται προσροφημένοι οι PAHs. Στο έδαφος, οι PAHs σχηματίζονται από τη διαγένεση των οργανικών ιζημάτων, από την πυρόλυση του ξύλου σε χαμηλές θερμοκρασίες και από τη βιολογική μετατροπή των βιογενών πρόδρομων ενώσεων. Γενικά, οι ποσότητες των PAHs που σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα είναι πολύ μεγαλύτερες (Courter et al., 2007). Συμπερασματικά, τα PAHs βρίσκονται παντού στο περιβάλλον.

Η ανθρώπινη παρουσία θεωρείται ως η κύρια πηγή για την αυξημένη συγκέντρωση των PAHs στο περιβάλλον. Οι ανθρωπογενείς εκπομπές των PAHs προέρχονται κυρίως από την ατελή καύση ή την πυρόλυση οργανικού υλικού όπως το πετρέλαιο, τα αέρια πετρελαίου, ο άνθρακας και το ξύλο, καθώς και από τις εκπομπές οχημάτων, τα οικιακά απόβλητα και τα βιομηχανικά λύματα (Wang et al., 2010). Επίσης, οι αποχετεύσεις, η οδική απορροή, η σκόνη του δρόμου και οι δραστηριότητες που σχετίζονται με το πετρέλαιο είναι άλλες σημαντικές πηγές των PAHs (Hu et al., 2010). Μικρή μερίδα των PAHs προέρχεται επίσης από τυχαίες διαρροές καυσίμων (Nesta et al., 2014). Τα βενζινοκίνητα και τα πετρελαιοκίνητα οχήματα καθώς επίσης και τα τρένα, τα πλοία και τα αεροπλάνα υπάγονται στις κινητές πηγές, ενώ στις σταθερές πηγές ανήκουν οι μηχανές καύσης για την παραγωγή θερμότητας, ηλεκτρισμού

και οι διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες, όπως η διύλιση του πετρελαίου, η παρασκευή ασφάλτου, αλουμινίου, χάλυβα και σιδήρου (Maksic et al., 2006). Στα μεγάλα αστικά κέντρα, τα οδικά οχήματα παράγουν μεγάλες ποσότητες PAHs, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του οχήματος. Είναι γεγονός ότι τα πετρελαιοκίνητα μεταφορικά μέσα εκπέμπουν 30–100 φορές περισσότερο, PAHs σωματιδιακής μορφής από ότι τα καταλυτικά βενζινοκίνητα (Σιταράς, 1998) και ότι τα καταλυτικά αυτοκίνητα εκπέμπουν ποσότητες PAHs μικρότερες έως και 25 φορές ανά χιλιόμετρο, από ότι αυτά που δεν έχουν καταλύτη (Liu et al., 2007). Η αμόλυβδη βενζίνη, που έχει μεγάλο ποσοστό αρωματικών υδρογονανθράκων καθώς και η περιεκτικότητα του καυσίμου με ενώσεις που μπορούν να δώσουν ελεύθερες ρίζες έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη παραγωγή εκπεμπόμενων PAHs (Mitsell, 1995). Ακόμη οι συνθήκες λειτουργίας της μηχανής καθώς και η παλαιότητα του οχήματος προκαλούν αύξηση των ποσοτήτων των PAHs. Συμπερασματικά, το 90% των εκπεμπόμενων PAHs προέρχεται από ανθρωπογενείς πηγές.

3.1.2 Μεταλλαξιόγonos δράση των PAHs

Οι PAHs διανέμονται στην ατμόσφαιρα και είναι ένας από τους πρώτους ατμοσφαιρικούς ρύπους που χαρακτηρίστηκε ως καρκινογόνος παράγοντας. Οι PAHs, που εισέρχονται στην ατμόσφαιρα μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις πριν από την εναπόθεση τους μέσω των ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων πάνω σε εδάφη, βλάστηση ή νερά. Η αύξηση του μοριακού βάρους των PAHs, αυξάνει την καρκινογένεση, μειώνοντας την οξεία τοξικότητα. Οι πιο ισχυροί καρκινογόνοι PAHs έχουν αναγνωριστεί ότι περιλαμβάνουν βενζο[α]ανθρακένιο, βενζο[α]πυρένιο και διβενζο[ah] ανθρακένιο (Kim et al., 2013).

Οι PAHs έχουν τοξικές επιδράσεις στους οργανισμούς. Γενικά, οι PAHs εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών και συνήθως απαντώνται ως ένα μείγμα που περιέχει δύο ή περισσότερες από αυτές τις ενώσεις. Μερικοί PAHs παράγονται από τη βιομηχανία. Η τοξικότητα επηρεάζει τη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και τα ενζυμικά συστήματα. Έχει αποδειχθεί ότι οι PAHs μπορούν να προκαλέσουν καρκινογόνες και μεταλλαξιόγones επιδράσεις και είναι ισχυροί καταστολείς του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι επιπτώσεις, που έχουν κατάγραφοί σχετίζονται με την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, τη χυμική ανο-

σία και την αντίσταση στον ξενιστή (Abdel-Shafy et al., 2016). Η έκθεση του ανθρώπου σε PAHs σχετίζεται με μεταλλάξεις, προσθήκες στο DNA και επιπτώσεις στην αναπαραγωγή (Gaspari et al., 2003; Perea et al., 2002). Επίσης, η έκθεση σε PAHs έχει μεταλλαξιογόνα και καρκινογόνα αποτελέσματα στα θαλάσσια ασπόνδυλα, τα ψάρια και τα αμφίβια (Neff, 1978). Σύμφωνα με τους Bopp and Lettieri, 2007, οι PAHs έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν τον παγκόσμιο κύκλο του άνθρακα. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι PAHs έχουν μεγάλες πιθανότητες να προκαλέσουν καρκίνο του πνεύμονα στον άνθρωπο λόγω των οικιακών στερεών αποβλήτων, τα οποία διανέμονται με τη βοήθεια του αέρα (Straif et al., 2006).

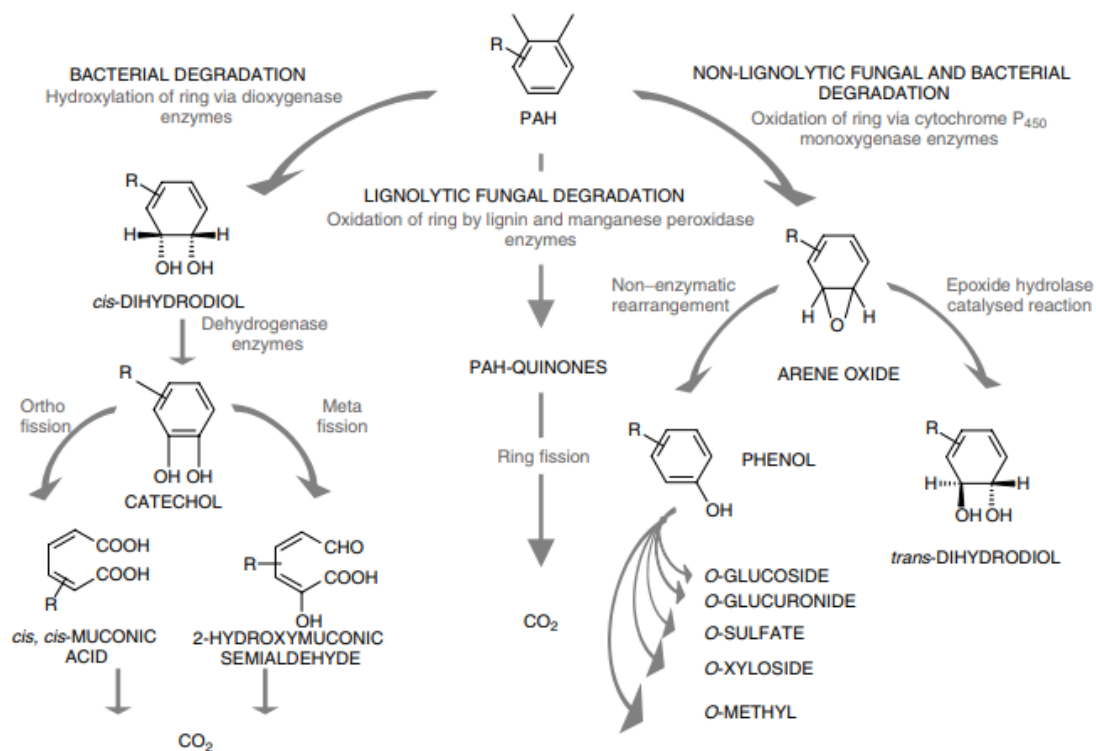
Ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με τους PAHs από το περιβάλλον, την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν PAHs, τον καπνό των τσιγάρων ή το παθητικό κάπνισμα σε δημόσιους χώρους (ACGIH, 2005). Πολλοί PAHs που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου, είναι ύποπτα ανθρώπινα καρκινογόνα (Lannerö et al., 2008). Για τους μη καπνιστές, η κύρια οδός έκθεσης σε PAHs είναι μέσω των τροφίμων. Ορισμένες καλλιέργειες (όπως σιτάρι, σίκαλη και φακές) μπορούν να συνθέσουν PAHs ή να τους απορροφήσουν μέσω του νερού, του αέρα ή του εδάφους (Ciecierska and Obiedziński, 2013). Επιπλέον, η πρόσληψη PAHs μπορεί να προκύψει από μολυσμένο χώμα μέσω της αναπνοής, της δερματικής έκθεσης και της εισπνοή ατμών PAHs (Wang et al., 2012). Οι εργαζόμενοι που εισπνέουν καυσαέρια (όπως οι μηχανικοί, οι πωλητές δρόμων ή οι οδηγοί οχημάτων) και όσοι ασχολούνται με την εξόρυξη, την κατεργασία μετάλλων ή την αποκατάσταση πετρελαίου είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην έκθεση των PAHs (Armstrong et al., 2004; See et al., 2006).

3.2 Μικροβιακός μεταβολισμός των PAHs

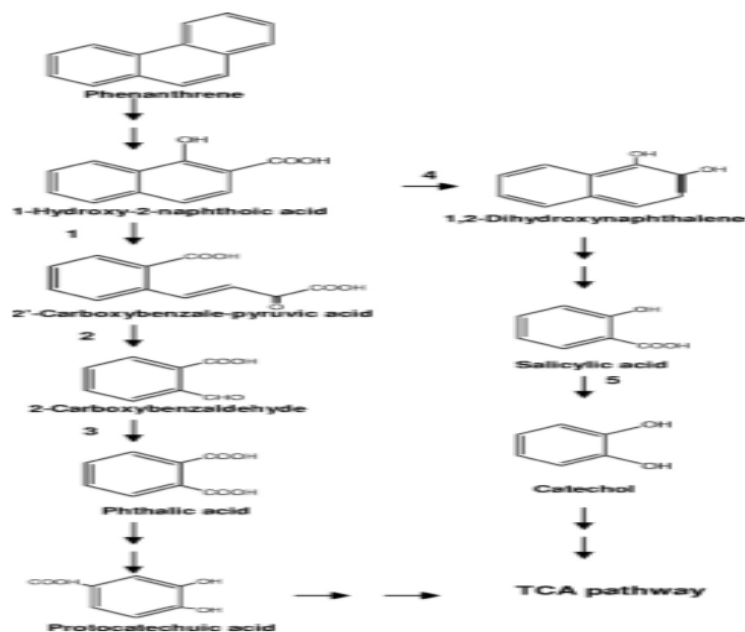
Η μικροβιακή δραστηριότητα μπορεί να επηρεαστεί από το είδος του μικροοργανισμού, τις συνθήκες διαλογής και τα γονίδια των οργανισμών. Η παρουσία των PAHs και των βαρέων μετάλλων μπορούν να επηρεάσουν τις μικροβιακές κοινότητες. Ως εκ τούτου καθίσταται επιτακτική ανάγκη για την εύρεση νέων μικροβιακών κοινοτήτων, οι οποίες θα προσαρμόζονται στο επιβλαβές περιβάλλον. Τα στελέχη που συλλέγονται από μολυσμένες περιοχές συνήθως έχουν μεγάλη ικανότητα να διαχειριστούν τη μόλυνση από PAHs και βαρέα μέταλλα. Αυτά τα στελέχη μπορούν να

ενταχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εξωγενή στελέχη σε άλλα μολυσμένα περιβάλλοντα χωρίς όμως να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός με τα ήδη υπάρχοντα στελέχη (Momose et al., 2008). Τα προαναφερθέντα στελέχη εκτός από το DNA που περιέχουν, το οποίο δίνει τη δυνατότητα αποκατάστασης από τη μόλυνση από PAHs και βαρέα μέταλλα, συνήθως περιέχουν και γονίδια ανθεκτικότητας και αποδόμησης, τα οποία μπορούν να απομονωθούν και να ανασυνδυαστούν, ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της αποκατάστασης (Farmer et al., 2003; Haritash et al., 2009; Mahmoudi et al., 2011). Για παράδειγμα, η 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκή διοξυγονάση, που κωδικεύει το αντίστοιχο γονίδιο, απομονώθηκε από το *Arthrobacter* sp. SA02 και έχει την ικανότητα αποδόμησης του φαινανθρενίου και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των ενδιάμεσων των PAHs (Li et al., 2015). Με αυτό τον τρόπο αυξάνονται οι πιθανότητες αποδόμησης των PAHs και των βαρέων μετάλλων από τα μικρόβια.

Είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που είναι ικανός να αποδομήσει PAHs και βαρέα μέταλλα, περιλαμβάνει βακτήρια και μύκητες (Εικόνα 3.2). Τα περισσότερα είδη απομονώνονται από μολυσμένα ιζήματα ή από το έδαφος (Jiang et al., 2015). Τα πιο γνωστά βακτήρια για την αποδόμηση των PAHs και των βαρέων μετάλλων είναι ο *Bacillus*, η *Escherichia* και το *Mycobacterium*. Αυτά αποδομούν PAHs, όπως το ανθρακένιο, το ναφθαλένιο, το φαινανθρένιο (Εικόνα 3.3) και το πυρένιο, παρουσία βαρέων μετάλλων. Επίσης, οι μικροβιακές κοινότητες που αναπτύσσονται σε φυτά είναι αποτελεσματικές για την αποκατάσταση από βαρέα μέταλλα (Li et al., 2016). Μερικές τεχνικές, όπως η ακινητοποίηση (Huang et al., 2015) και η κομποστοποίηση (Poulsen et al., 2010; Tang et al., 2008) μπορούν είτε να προστατεύσουν τα μικρόβια από τα βαρέα μέταλλα και τους PAHs, είτε να ενισχύσουν τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της αποκατάστασης.



Εικόνα 3.2 Τα κύρια μονοπάτια αποδόμησης των PAHs από βακτήρια και μύκητες (Bamforth et al., 2005).



Εικόνα 3.3. Προτεινόμενο μονοπάτι για τη βακτηριακή αποδόμηση του φαινανθρενίου. 1: 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκή διοξυγονάση, 2: 2-καρβοξυβενζοπυροσταφυλική υδρατάση, 3: καρβοξυβενζαλδεϋδική αφυδρογονάση. 4: 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκή υδροξυλάση, 5: σαλικυλική υδροξυλάση. Τα απλά βέλη υποδεικνύουν αντιδράσεις ενός βήματος, τα διπλά βέλη αντιδράσεις δύο ή περισσότερων βημάτων. TCA, τρικαρβοξυλικό οξύ (Vandera et al., 2012).

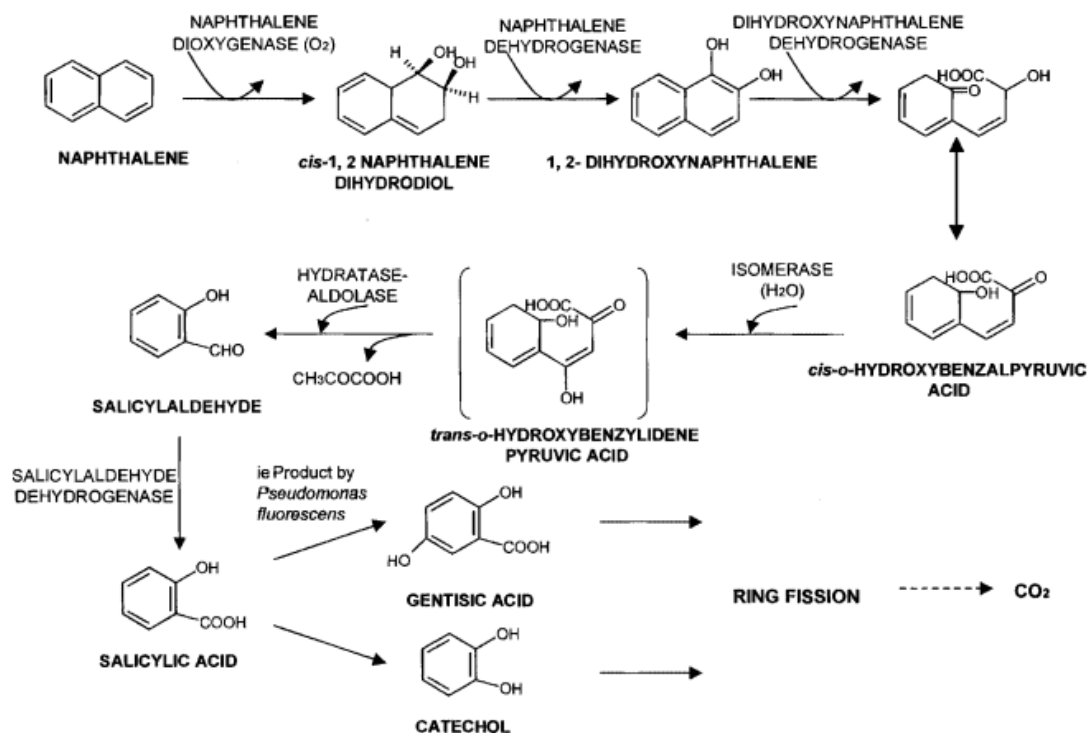
3.2.1 Μεταβολισμός των PAHs στα βακτήρια

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να προσλαμβάνουν την ενέργεια, που τους είναι απαραίτητη από κάθε ένωση. Λόγω της γρήγορης προσαρμοστικότητάς τους, τα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποδόμηση ή την αποκατάσταση των περιβαλλοντικών κινδύνων. Πολλά βακτήρια έχουν βρεθεί ότι αποδομούν τους PAHs, με την αποδόμηση του ναφθαλενίου και του φαινανθρενίου να έχουν μελετηθεί εκτενέστερα (Cerniglia, 1992; Peng et al., 2008; Seo et al., 2009; Mallick et al., 2011).

Τα βιοχημικά μονοπάτια του βακτηριακού μεταβολισμού των PAHs ακολουθούν δύο στρατηγικές, οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία ή μη του οξυγόνου. Στον αερόβιο καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων, το οξυγόνο δεν είναι μόνο ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, αλλά και ένα συνυπόστρωμα για την υδροξυλίωση και τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου. Αντίθετα, ο αναερόβιος καταβολισμός βασίζεται σε αντιδράσεις αναγωγής. Τις τελευταίες δεκαετίες, ο αερόβιος καταβολισμός των αρωματικών ενώσεων έχει μελετηθεί εκτενώς, ενώ ο αναερόβιος ξεκίνησε να μελετάται πρόσφατα. Ωστόσο, οι ανοξικές συνθήκες κυριαρχούν σε πολλά φυσικά ενδιαιτήματα και μολυσμένους τόπους (π.χ. υδροφόροι ορίζοντες και υδρόβια ιζήματα), όπου η βιοαποδόμηση πραγματοποιείται αναερόβια χρησιμοποιώντας εναλλακτικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων όπως νιτρικά, θειικά ή σιδηρούχα ιόντα (Foght, 2008; Carmona et al., 2009).

Κατά κύριο λόγο, οι αερόβιες συνθήκες ευνοούν τα βακτήρια για να αποδομήσουν τους PAHs μέσω του μεταβολισμού στον οποίο συμμετέχουν τα ένζυμα, οξυγονάσες (που περιλαμβάνουν είτε τις μονοοξυγονάσες ή τις διοξυγονάσες). Συνήθως, το πρώτο βήμα στην αερόβια βακτηριακή αποδόμηση των PAHs είναι η υδροξυλίωση ενός αρωματικού δακτυλίου μέσω μιας διοξυγονάσης, με το σχηματισμό μιας *cis*-διϋδροδιόλης, η οποία προσαρμόζεται εκ νέου σε ένα ενδιάμεσο διόλης με τη δράση μιας αφυδρογονάσης. Αυτά τα ενδιάμεσα διόλης μπορούν έπειτα να διασπαστούν σε ενδοδιόλες ή εξωδιόλες είτε μέσω της *ortho*-σχάσης, είτε μέσω της *meta*-σχάσης, οδηγώντας σε ενδιάμεσα, όπως οι κατεχόλες που τελικά μετατρέπονται σε ενδιάμεσα στον κύκλου TCA (Εικόνα 3.4) (Evans et al., 1965; Cerniglia, 1992, Eaton et al., 1992; Mueller et al., 1996; Mallick et al., 2011). Η διοξυγονάση είναι ένα πολυσύνθετο ένζυμο, που αποτελείται γενικά από υπομονάδες αναγωγάσης, φερρεδοξίνης και οξυγονάσης (Mallick et al., 2011). Τα βακτήρια μπορούν επίσης να αποδομή-

σουν τους PAHs μέσω του μονοπατιού του κυτοχρώματος P450, παράγοντας *trans*-διυδροδιόλες (Sutherland et al., 1990; Moody et al., 2004) ή υπό αναερόβιες συνθήκες, π.χ. υπό συνθήκες αναγωγής νιτρικών (Foght, 2008, Carmona et al., 2009).



Εικόνα 3.4 Τα κύρια μονοπάτια της αερόβιας αποδόμησης του ναφθαλενίου από βακτήρια (Bamforth et al., 2005).

Τα βακτήρια, που αποδομούν το ναφθαλένιο είναι παντού στη φύση και υπάρχουν πολλές αναφορές που το τεκμηριώνουν, συμπεριλαμβανομένης της ερμηνείας των βιοχημικών μονοπατιών, των ενζυμικών μηχανισμών και των γενετικών ρυθμίσεων (Cerniglia, 1992; Peng et al., 2008; Seo et al., 2009; Lu et al., 2011; Mallick et al., 2011). Τα καταβολικά γονίδια του ναφθαλενίου που υπάρχουν στο πλασμίδιο NAH7 στο *Pseudomonas putida* G7 είναι καλά χαρακτηρισμένα (Simon et al., 1993). Στο πλασμίδιο NAH7, το καταβολικό γονίδιο του ναφθαλενίου (NaH) οργανώνεται σε δύο οπερόνια: το οπερόνιο nah περιέχει τα γονίδια για τα ένζυμα των αρχικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην μετατροπή του ναφθαλενίου σε σαλικυλικό οξύ και το οπερόνιο sal που περιέχει τα γονίδια για τα ένζυμα των επόμενων μονοπατιών που εμπλέκονται στην μετατροπή του σαλικυλικού οξέος σε πυροσταφυλικό και ακεταλδεΐδη (Simon et al., 1993). Τα οπερόνια ρυθμίζονται από έναν κοινό ρυθμιστή NahR και έναν μεταγραφικό ρυθμιστή τύπου LysR. Ο NahR επάγεται παρουσία σαλικυλι-

κού οξέος που οδηγεί σε υψηλού επιπέδου έκφραση των γονιδίων *nah* στα βακτήρια (Yen et al., 1985; Peng et al., 2008). Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα των αρχικών μονοπατιών σε διαφορετικά στελέχη *Pseudomonas* και τα γονίδιά τους είναι περισσότερο από το 90% πανομοιότυπα (Menn et al., 1993; Simon et al., 1993; Yang et al., 1994; Bosch et al., 2000; Peng et al., 2008).

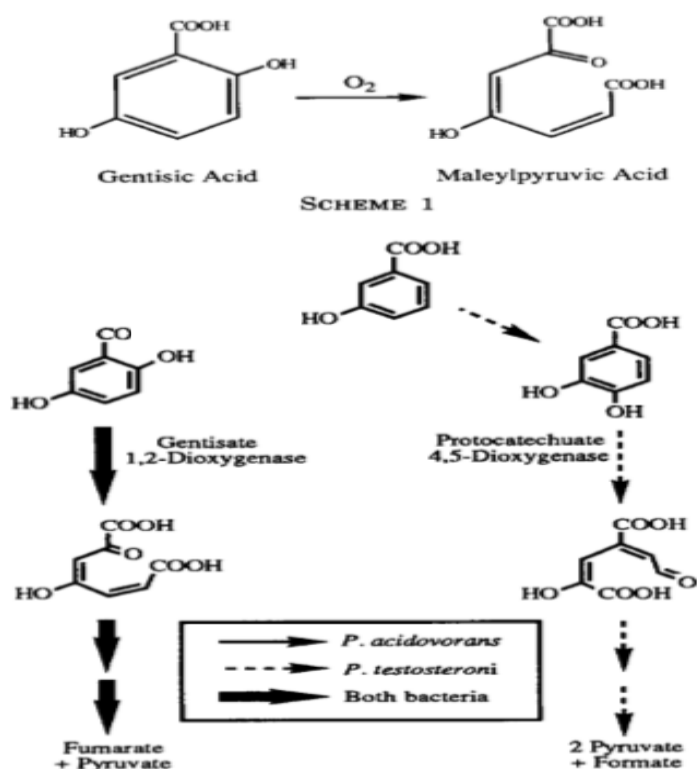
Το γένος *Rhodococcus* ανήκει στα βακτήρια, που αποδομούν τους PAHs και παρουσιάζει μεγάλη καταβολική ικανότητα. Τα Gram θετικά στελέχη του *Rhodococcus* συνήθως εμφανίζουν μόνο τρία δομικά γονίδια, που απαιτούνται για την αποδόμηση του ναφθαλενίου (*narAa*, *narAb* και *narB*), σε αντίθεση με τα Gram αρνητικά βακτήρια και το *Pseudomonas*, των οποίων τα καταβολικά γονίδια του ναφθαλενίου είναι συγκεντρωμένα (Kulakov et al., 2005; Larkin et al., 2005). Έχει διαπιστωθεί ότι η περιοχή *nar* δεν είναι διατεταγμένη σε οπερόνιο, αλλά υπάρχουν αρκετές ομόλογες μεταγραφικές μονάδες σε διαφορετικά στελέχη *Rhodococcus*, που διαχωρίζονται από τις μη ομόλογες αλληλουχίες που περιέχουν άμεσες και αντεστραμμένες επαναλήψεις (Larkin et al., 2005). Τα γονίδια *narAa* και *narAb* κωδικοποιούν την α- και β- υπομονάδα της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου (naphthalene dioxygenase, NDO). Και οι δύο υπομονάδες της NDO του στελέχους *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 έδειξαν αμινοξική ομοιότητα μόνο 30% με τις υπομονάδες της αντίστοιχης NDO στο *P. putida*. Επιπλέον, στα στελέχη *Rhodococcus* δεν υπάρχει γονίδιο που είναι παρόμοιο με τα γονίδια που κωδικοποιούν την αναγωγή μεταφοράς ηλεκτρονίων και την φερρεδοξίνη της NDO, όπως στα στελέχη *Pseudomonas* (Kulakov et al., 2005; Larkin et al., 2005). Τα γονίδια *narA* και *narB* μεταγράφονται ως μία μονάδα μέσω διαφορετικών σημείων έναρξης και η μεταγραφή τους επάγεται από την παρουσία του ναφθαλενίου, σε αντίθεση με τα είδη *Pseudomonas*, στα οποία τα καταβολικά γονίδια του ναφθαλενίου, επάγονται από το σαλικυλικό οξύ.

Παράλληλα με το ναφθαλένιο υπάρχουν αρκετές αναφορές για την αποδόμηση του φαινανθενίου από διάφορα Gram αρνητικά και Gram θετικά βακτηριακά είδη (Peng et al., 2008; Seo et al., 2009; Mallick et al., 2011). Άλλοι PAHs όπως το ανθρακένιο, το φλουορένιο, το ακεναφθένιο και το ακεναφθαλένιο βρίσκονται επίσης σε υψηλές ποσότητες σε θέσεις μολυσμένες από PAHs και διάφορα βακτηριακά είδη έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν αυτές τις ενώσεις μεμονωμένα ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας (Moody et al., 2001; Peng et al., 2008; Seo et al., 2009; Mallick et al., 2011). Οι PAHs, όπως το πυρένιο και το βενζο[α]πυρένιο (BaP), πα-

ρουσιάζουν σημαντική περιβαλλοντική ανησυχία λόγω της εκτεταμένης παραμονής και της υψηλής τοξικότητάς τους καθώς και των μεταλλαξιογόνων ή/και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους (Cerniglia, 1992; Kanaly et al., 2000; Peng et al., 2008; Seo et al., 2009). Η βιοαποδόμηση των PAHs από μικροοργανισμούς συζητείται επαρκώς και επίσης, τα μονοπάτια αποδόμησής τους έχουν απεικονιστεί (Kanaly et al., 2000; Peng et al., 2008; Seo et al., 2009). Ωστόσο, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών σε διάφορους τομείς της βιοαποδόμησης των PAHs και πιο συγκεκριμένα, στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της βιοαποδόμησης των PAHs, τη βιοαποδόμηση των PAHs που σχετίζονται με άλλους υδρογονάνθρακες σε μείγματα, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις μιας σύνθετης μικροβιακής κοινότητας. Όλα αυτά θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση της οικολογίας των μικροβιακών κοινοτήτων που αποδομούν τους PAHs και των μηχανισμών με τους οποίους πραγματοποιείται η βιοαποδόμησή τους. Επιπλέον, το αποτέλεσμα θα βοηθήσει στην πρόβλεψη της περιβαλλοντικής τύχης αυτών των επιβλαβών ενώσεων και στην ανάπτυξη εύκολων και οικονομικών στρατηγικών βιοανάδρασης στο εγγύς μέλλον.

3.2.2 Γεντισικό οξύ

Το γεντισικό οξύ (2,5 διυδροξυβενζοϊκό οξύ, gentisic acid) είναι βασικό ενδιάμεσο και παίζει σημαντικό ρόλο στον αερόβιο βακτηριακό μεταβολισμό πολλών αρωματικών ενώσεων, όπως της β-ναφθόλης (Walker et al., 1965), του σαλικυλικού οξέος (Crawford et al., 1976) και του 3-, 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Arima et al., 1955) και των PAHs συμπεριλαμβανομένου του φαινανθρενίου (Feng et al., 2012; Seo et al., 2007). Η μικροβιακή αποδόμηση του γεντισικού οξέος ξεκινά από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος μέσω της αντίδρασης οξυγονολυτικής διάσπασης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5 (Sugiyama et al., 1958). Το μηλοπυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε κεντρικούς μεταβολίτες είτε απευθείας (Hopper et al., 1968) είτε μετά από τον ισομερισμό σε φουμαρυλοπυροσταφυλικό οξύ (Crawford et al., 1977), παρέχοντας έτσι άνθρακα και ενέργεια στα βακτήρια, τα οποία συμμετέχουν στην αποδόμηση του γεντισικού οξέος ή των προδρόμων του. Επίσης, άλλες περιβαλλοντικά ανθεκτικές ενώσεις όπως η m-κρεσόλη, η 2,5-ξυλενόλη και η 3,5-ξυλενόλη (Hopper et al., 1970) καθώς επίσης και ορισμένες αλογονωμένες ενώσεις (Hagedorn et al., 1980) αποδομούνται με παρόμοιο τρόπο μέσω υποκατεστημένων ενδιάμεσων γεντισικού.



Εικόνα 3.5 Μεταβολισμός του 3-υδροξυβενζοϊκού από το *P. testosteroni* και *P. acidovorans* (Harpel et al., 1990).

Το μονοπάτι αποδόμησης του γεντισικού οξέος έχει ταυτοποιηθεί από πολλά βακτήρια, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα είδη *Bacillus* και *Pseudomonas* (Bayly et al., 1978). Οι Wheelis et al. (1967) ταυτοποίησαν την πορεία του γεντισικού ως ένα σημαντικό σημείο στο οποίο αποκλίνουν ταξινομικά το *P. testosteroni* και το *P. acidovorans*. Αυτά τα δύο είδη διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούν το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ ως υπόστρωμα ανάπτυξης. Το *P. testosteroni* το μεταβολίζει με υδροξυλίωση στον άνθρακα 4 του δακτυλίου για να σχηματίσει πρωτοκατεχοϊκό οξύ, ενώ το *P. acidovorans* με υδροξυλίωση στον άνθρακα 6 του δακτυλίου, για να σχηματίσει το γεντισικό οξύ (Εικόνα 3.5). Συνεπώς, το *P. testosteroni* δεν συνθέτει γεντισικό οξύ από το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, παρόλο που χαμηλά επίπεδα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος και ένζυμα εκφράζονται στην μετέπειτα πορεία. Ο ρόλος του γεντισικού οξέος στο μονοπάτι αποδόμησης δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

3.3 Διοξυγονάσες

Οι οξυγονάσες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη βιοαποδόμηση των αρωματικών υδρογονανθράκων από αερόβιους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των PAHs. Οι πιο γνωστές οξυγονάσες είναι είτε στα κυτοχρώματα P450 που περιέχουν αίμη και καταλύουν απλές υδροξυλιώσεις, είτε οι διοξυγονάσες που ενσωματώνουν και τα δύο άτομα οξυγόνου του μορίου O_2 στο υπόστρωμα. Γενικά, οι διοξυγονάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν σίδηρο χωρίς αίμη στο ενεργό κέντρο και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: 1) τις διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του δακτυλίου, οι οποίες καταλύουν τη διπλή υδροξυλίωση σε δύο γειτονικούς άνθρακες του υποστρώματος και 2) τις διοξυγενάσες διάσπασης του δακτυλίου, οι οποίες καταλύουν το άνοιγμα του δακτυλίου στα κατεχολικά υποστρώματα (Harayama et al., 1992). Οι διοξυγονάσες της πρώτης κατηγορίας είναι πολυένζυμα (EC 1.14.12.-), τα οποία αποτελούνται από μια οξυγονάση που συνδέεται με έναν ή δύο μεταφορείς ηλεκτρονίων. Χρησιμοποιούν NAD(P)H ως αναγωγικό και μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο ενεργό κέντρο για την ενεργοποίηση του διοξυγόνου, που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την υδροξυλίωση του υποστρώματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η οξυγονάση είναι ένα εξαμερές ($\alpha\beta\beta_3$), με την κάθε α -υπομονάδα να περιέχει ένα σύμπλεγμα $[2Fe-2S]$ τύπου Rieske και ένα μονοπυρηνικό κέντρο σιδήρου όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση διοξυγόνωσης. Οι διοξυγονάσες της πρώτης κατηγορίας εμφανίζονται σε διάφορα είδη τόσο σε Gram-θετικά, όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί πάνω από 1300 διοξυγονάσες της πρώτης κατηγορίας με βάση τις ομοιότητες αλληλουχιών που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων του NCBI. Οι τρέχουσες γνώσεις, που βασίζονται σε καλά μελετημένα ένζυμα όπως η διοξυγονάση του ναφθαλενίου, υποδεικνύουν ότι οι προαναφερθείσες διοξυγονάσες παρουσιάζουν ευρείες εξειδικεύσεις υποστρώματος.

Οι διοξυγενάσες της πρώτης κατηγορίας, που ονομάζονται επίσης οξυγονάσες μη αιμικού σιδήρου τύπου Rieske είναι πολυένζυμα με δραστικότητα υδροξυλάσης και με μία ή δύο πρωτεΐνες, φορείς ηλεκτρονίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υδροξυλάση αποτελείται από δύο υπομονάδες, μία α -υπομονάδα περίπου 50 kDa και μία β -υπομονάδα περίπου 20 kDa, οι οποίες συγκροτούνται σε ένα ετεροεξαμερές, $\alpha\beta\beta_3$. Επίσης, μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά, όπως η τεταρταγής δομή, τα συντηρημένα κατάλοιπα τύπου Rieske και τις καταλυτικές περιοχές της α -υπομο-

νάδας που εμπλέκονται στη σύνδεση των μεταλλικών κέντρων. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική διαφορά, μεταξύ της αμινοξικής αλληλουχίας και της δομής των σχετικών φορέων των ηλεκτρονίων.

Οι Nam et al. (2001) πρότειναν ένα σύστημα ταξινόμησης βασισμένο στις ομοιότητες των αμινοξικών αλληλουχιών των α -υπομονάδων της υδροξυλάσης. Στη συνέχεια, οι διοξυγονάσες της πρώτης κατηγορίας οργανώθηκαν σε τέσσερις οικογένειες πρωτεϊνών με φυλογενετικά κριτήρια, με την κάθε οικογένεια να αντιστοιχεί σε διαφορετικό τύπο ενζύμου με παρόμοιες ιδιότητες υποστρώματος. Για παράδειγμα, στα ένζυμα τύπου II συναντάμε τις διοξυγενάσες του βενζοϊκού οξέος/τολουολίου, στα ένζυμα τύπου III διοξυγονάσες των PAHs και του ναφθαλενίου και στα ένζυμα τύπου IV διοξυγονάσες διφαινυλίου. Τα ένζυμα Τύπου I έχουν ως κοινό την υδροξυλάση, που αποτελείται μόνο από α -υπομονάδες και διαφέρουν ως προς τις άλλες οικογένειες στις αλληλουχίες αμινοξέων και την περιοχή του υποστρώματος. Το πλεονέκτημα αυτού του συστήματος ταξινόμησης έγκειται στη δυνατότητα ταξινόμησης οποιασδήποτε νέας οξυγονάσης με οποιαδήποτε αμινοξική αλληλουχία, ακόμη και αν οι σχετιζόμενοι φορείς ηλεκτρονίων είναι άγνωστοι. Μια τέτοια κατάσταση συναντάται στα βακτηριακά γονιδιώματα, όπου τα καταβολικά γονίδια είναι διασκορπισμένα και ειδικά όταν τα γονίδια που κωδικοποιούν την υδροξυλάση δεν βρίσκονται κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τους φορείς ηλεκτρονίων. Αυτό συμβαίνει συχνά σε βακτήρια που αποδομούν τους PAHs, όπως είναι τα *Mycobacteria* και τα *Sphingomonadaceae*. Οι Kweon et al., (2008) πρότειναν ένα πιο εξελιγμένο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο λαμβάνει υπόψη τις ακολουθίες των φορέων ηλεκτρονίων στη φυλογενετική ανάλυση των διοξυγονασών. Εκτός από τις τέσσερις υποκατηγορίες των διοξυγονασών που περιγράφηκαν από τους Nam et al. (2001), προσδιορίστηκε μια νέα ομάδα που περιλαμβάνει ένζυμα που βρίσκονται στα Gram-θετικά βακτήρια και αποδομούν τους PAHs (Saito et al., 2000; Krivobok et al., 2003; Kim et al., 2006). Ένα ξεχωριστό χαρακτηριστικό των διοξυγονασών τύπου V είναι ότι η φερρεδοξίνη τους περιέχει μια συστάδα [3Fe-4S], σε αντίθεση με τις διοξυγονάσες τύπου III στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν τη συστάδα [2Fe-2S].

Από χημικής άποψης, η αρχική οξυγόνωση των αρωματικών δακτυλίων είναι το πιο δύσκολο καταλυτικό βήμα στην αερόβια αποδόμηση των PAHs. Οι βακτηριακές διοξυγονάσες καταλύουν την ενσωμάτωση των δύο ατόμων μοριακού οξυγόνου σε έναν από τους εξαιρετικά σταθερούς αρωματικούς δακτυλίους, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω καταστροφή του μορίου του υποστρώματος, με επακόλουθη αφυδρο-

γόνωση και διάσπαση δακτυλίου. Ο μηχανισμός της αντίδρασης που καταλύεται από τις διοξυγονάσες έχει μελετηθεί λεπτομερώς από τη διοξυγονάση του ναφθαλενίου στο *P. putida* ως ένζυμο μοντέλο, με τη βοήθεια της κρυσταλλικής δομής της οξυγονάσης, η οποία προσδιορίστηκε το 1998 (Kauppi et al., 1998). Η διυδροξυλίωση του ναφθαλενίου λαμβάνει χώρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο οποίο ένα ιόν σιδήρου είναι συνδεδεμένο στην α-υπομονάδα μέσω των πλευρικών αλυσίδων των δύο καταλοίπων His και Asp. Η αντίδραση περιλαμβάνει την αναγωγή και τη διάσπαση του μοριακού οξυγόνου και την επακόλουθη εισαγωγή των ατόμων οξυγόνου στα άτομα άνθρακα C-1 και C-2 του υποστρώματος για να δώσει *cis*-(1R, 2S)-διυδροξυ-1,2-διϋδروναφθαλένιο. Όπως έχει βρεθεί, η οξυγονάση δεν έχει ενεργότητα απουσία οξυγόνου. Ωστόσο, το ναφθαλένιο και το οξυγόνο αντιδρούν με την υδροξυλάση για να σχηματίσουν διϋδροδιόλη.

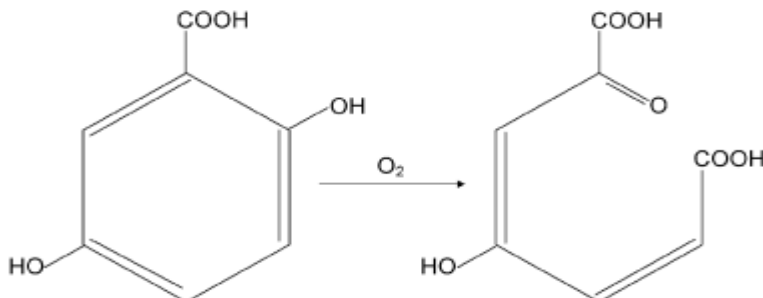
Οι διοξυγονάσες, γενικότερα δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση υποστρώματος, επιτρέποντας στα βακτήρια να αρχίσουν την αποδόμηση ευρέος φάσματος αρωματικών υδρογονανθράκων. Επιπλέον, είναι αξιόλογοι καταλύτες, καθώς συμμετέχουν σε διάφορους τύπους οξειδωσης, όπως είναι η *cis*-διϋδροξυλίωση, η μονοοξυγόνωση και η σουλφοξειδωση. Πολλές από τις αντιδράσεις που καταλύονται από τις διοξυγονάσες της πρώτης κατηγορίας, ειδικά η παραγωγή διαφόρων *cis*-διυδροαρενεδιολών, μπορούν να αξιοποιηθούν στη σύνθεση χρήσιμων προϊόντων για τη χημεία και την ιατρική (Hudlicky et al., 1999). Παρά το γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά μπορούν να προσβάλλουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, τα περισσότερα από αυτά δραστηριοποιούνται μόνο σε έναν περιορισμένο αριθμό από τους 16 βασικότερους PAHs και κυρίως εκείνους που περιλαμβάνουν δύο ή τρεις δακτυλίους.

3.3.1 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος

Το γεντισικό οξύ (2,5-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ) είναι ένα ενδιάμεσο κλειδί στα αερόβια βακτηριακά μονοπάτια, που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό μεγάλου αριθμού αρωματικών ενώσεων. Το κρίσιμο βήμα αυτών των οδών είναι η εξαρτώμενη από οξυγόνο αντίδραση, που καταλύεται από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (gentisate dioxygenase), η οποία ανοίγει τον αρωματικό δακτύλιο του γεντισικού, για να σχηματίσει το μηλοπυροσταφυλικό οξύ. Από το γεντισικό οξύ, το κύτταρο παράγει άνθρακα και ενέργεια μέσω της μετατροπής του μηλοπυροσταφυλικού οξέος σε κεντρικούς μεταβολίτες. Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος έχει επιβε-

βαιωθεί από το παθογόνο στέλεχος *Escherichia coli* O157: H7 και αποτελεί τον πρώτο δομικό χαρακτηρισμό αυτής της οικογένειας ενζύμων. Η ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης διαπιστώθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας. Το οπερόνιο που είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του γεντισικού οξέος σε αυτόν τον οργανισμό παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης με τα οπερόνια αποδόμησης του γεντισικού άλλων παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του *E. coli* O103:H2, που παράγει την τοξίνη Shiga, αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει σε μη παθογόνα στελέχη. Η απόκτηση του οπερονίου του γεντισικού οξέος μπορεί να αντιπροσωπεύει μια ειδική προσαρμογή για την κάλυψη των απαιτήσεων σε άνθρακα υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες και πιθανότατα παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα για αυτό το στέλεχος *E. coli* σε σχέση με τους μη παθογόνους ομολόγους τους (Adams et al., 2006).

Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (EC.1.13.1.4) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση: 2,5-διυδροβενζοϊκό + O₂ και το προϊόν, που παράγεται είναι το μηλοπυροσταφυλικό οξύ (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Η μετατροπή του γεντισικού οξέος σε μηλοπυροσταφυλικό οξύ, που καταλύεται από τη 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (Adams et al., 2006).

Αυτό το ένζυμο ανήκει στις οξειδοαναγωγάσες, συγκεκριμένα εκείνες, που δρουν σε μεμονωμένους δότες οξυγόνου ως οξειδωτικό και ενσωματώνουν δύο άτομα οξυγόνου στο υπόστρωμα (οξυγονάσες). Το οξυγόνο, που ενσωματώνεται δεν χρειάζεται να προέρχεται από το O₂. Αυτό το ένζυμο συμμετέχει στον μεταβολισμό της τυροσίνης και χρησιμοποιεί ως συμπάραγοντα, το σίδηρο (Boyer et al., 1963, Sugiyama et al., 1960). Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος φαίνεται ότι περιέχει Fe²⁺ στο ενεργό κέντρο του *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Suarez et al., 1996).

Στο *Silicibacter pomeroyi*, το ένζυμο αυτό φαίνεται να είναι μια ομοτριμερής πρωτεΐνη. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ομοτετραμερή ή διμερή πρωτεΐνη των

1,2-διοξυγονασών του γεντισικού οξέος. Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος του *Silicibacter pomeroyi* (GDOsp) διαθέτει μια διατηρούμενη τρισδιάστατη δομή της οικογένειας των δικουπινών, σχηματίζοντας ομομετραμερισμό. Ωστόσο, κάθε υπομονάδα της GDOsp περιλαμβάνει δύο σιδηρούχα κέντρα τα οποία βρίσκονται στις δύο ομόλογες περιοχές των δικουπινών, αντίστοιχα. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η ενζυμική δραστηριότητα της GDOsp εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον και τις δύο θέσεις δέσμησης των μετάλλων. Επιπλέον, κατόπιν δομικής σύγκρισης και λειτουργικής μελέτης σε παραλλαγές της GDOsp, παρουσιάστηκε μια ομάδα βασικών λειτουργικά καταλοίπων και προτάθηκε ότι το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή και πιθανότατα μπορεί να επηρεαστεί από αλλαγές στην περιοχή του καρβοξυλίου. Επομένως, η GDOsp μπορεί να αποτελέσει ένα λειτουργικό μοντέλο για τη μελέτη της πρωτεΐνης ή του συμπλέγματός της (Chen et al., 2008).

Μέχρι στιγμής, οι γεντισικές διοξυγονάσες έχουν καθαριστεί και χαρακτηριστεί από *Ralstonia* (*Pseudomonas*) sp. U2, *Klebsiella pneumoniae* M5a1, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Rhodococcus opacus* R7, *Sphingomonas* sp. RW5, *Xanthobacter polyaromaticivorans*, *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 (*xlnE*, *xbzE*), *Haloarcula* sp. D1, *Haloferax* sp. D1227 και *Silicibacter* (*Ruegeria*) *pomeroyi* DSS-3. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις γεντισικές διοξυγονάσες στα αλόφιλα βακτήρια. Συγκριτικές μελέτες σχετικά με τον χαρακτηρισμό διαφορετικών γεντισικών διοξυγενασών στα αλόφιλα βακτήρια θα συμβάλουν στην κατανόηση των μονοπατιών αποδόμησης των PAHs (Huang et al., 2015).

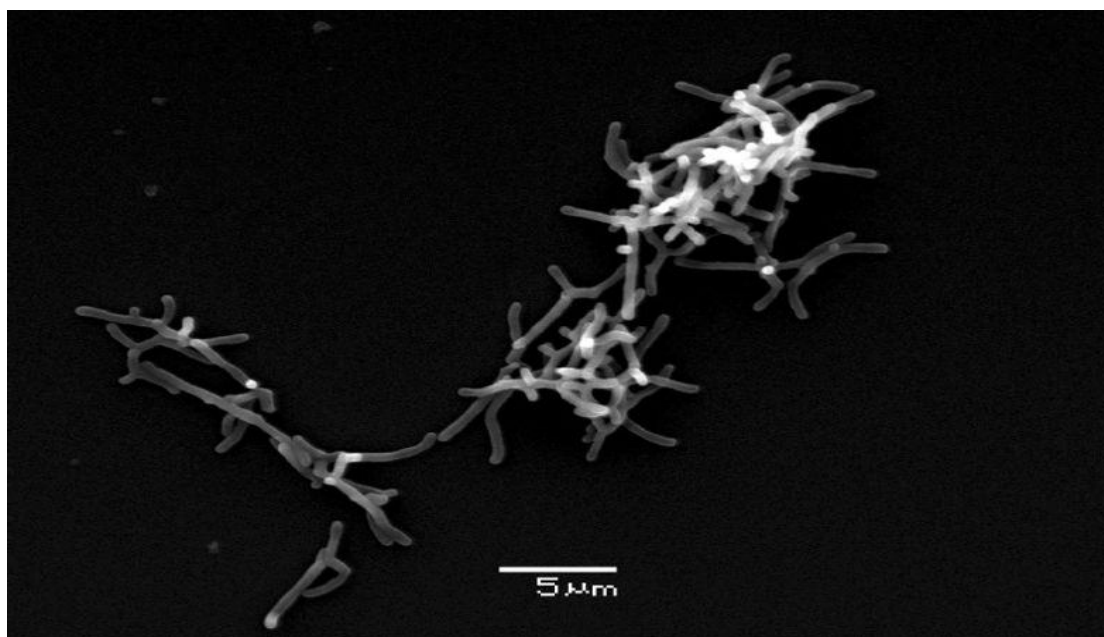
3.4 *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Το γένος *Arthrobacter* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Αρκετά στελέχη του *Arthrobacter* spp. έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν αρωματικές ενώσεις, όπως το *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, το οποίο πρόσφατα μετονομάστηκε σε *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*, το *Arthrobacter* sp. W1, το *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 και το *Arthrobacter* sp. SJCon (Ren et al., 2015). Τα είδη του γένους αυτού είναι Gram θετικά, υποχρεωτικά αερόβια και χημειοργανοτρόφα. Χρη-

σιμοποιούν μια ποικιλία υποστρωμάτων στον οξειδωτικό μεταβολισμό τους, όπως η νικοτίνη, τα νουκλεϊκά οξέα και άλλα οργανικά μόρια, τα οποία είναι λιγότερο συνηθισμένα (Mongodin et al., 2006). Τα είδη του *Arthrobacter* ανήκουν συνήθως στα βακτήρια του εδάφους, αλλά έχουν απομονωθεί και από άλλα μέρη, όπως βαθιά υπόγεια, αρκτικό πάγο, μολυσμένα σημεία από χημικές ουσίες και ραδιενεργά περιβάλλοντα, όπου έχει αναφερθεί ότι ασκούν ενδιαφέρουσες οικολογικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, ορισμένα είδη *Arthrobacter* προσαρμόζονται φυσικά για να ανοργανοποιήσουν εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, καθιστώντας τα στελέχη αυτά, αρκετά δραστικά στην βιοαποκατάσταση ρυπασμένων υπόγειων υδάτων (Michaud et al., 2004). Αυτή η εξέλιξη στην πορεία του μεταβολισμού βασίζεται στην προσαρμοστικότητα των γονιδιωμάτων των ειδών *Arthrobacter*, τα οποία τους επιτρέπουν να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τις συνθήκες στρες. Η πλαστικότητα των γονιδιωμάτων του *Arthrobacter* επιβεβαιώνεται από την ποικιλομορφία των σχεδόν είκοσι ολόκληρων ακολουθιών που έχουν κατατεθεί στις δημόσιες τράπεζες δεδομένων από τον Δεκέμβριο του 2012 (Orlandini et al., 2014).

Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* είναι ένα είδος του γένους *Arthrobacter* και είναι ικανό να μεταβολίζει το φαινανθρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το στέλεχος Sphe3^T (=DSM 18606^T=LMG 23796^T) είναι ένας τύπος του *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*. Απομονώθηκε από την Περιβλεπτο, που είναι μία περιοχή μολυσμένη από κρεόζωτο, 12 χιλιόμετρα βόρεια των Ιωαννίνων, στην Ήπειρο (Ελλάδα). Στην περιοχή αυτή, η βιομηχανία συντήρησης ξύλου λειτουργεί πάνω από 30 χρόνια. Το στέλεχος Sphe3^T παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι είναι ικανό να μεταβολίζει το φαινανθρένιο σε συγκεντρώσεις μέχρι 400 mg/L ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, με γρηγορότερο ρυθμό από εκείνον που αναφέρεται για τα άλλα είδη *Arthrobacter*. Είναι ένα θετικό κατά Gram, αερόβιο, μη κινητό βακτήριο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως και παρουσιάζει κυτταρικό κύκλο, που κυμαίνεται από βάκιλο σε κόκκο (Εικόνα 3.7), 1.0-1.5*2.5-4.0 μm. Όταν αναπτύσσεται σε Luria άγαρ (LA) σχηματίζει κιτρινωπές αποικίες. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 4-37°C αλλά παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη στους 30-37°C. Αναπτύσσεται σε τιμές pH 6.5-8.5 με τη βέλτιστη τιμή να βρίσκεται σε pH 7.0-7.5. Παρουσιάζει ευαισθησία σε διάφορα αντιβιοτικά όπως αμπικιλίνη (20 mg/L), χλωραμφενικόλη (10 mg/L), ερυθρομυκίνη (10 mg/L), νεομυκίνη (20 mg/L), ριφαμικίνη (10 mg/L), τετρακυκλίνη (10 mg/L). Σε βιοχημικά τεστ που πραγματοποιήθηκαν, παρουσίασε ενεργότητα αμυλάσης, καταλάσης και νιτρικής αναγωγής.

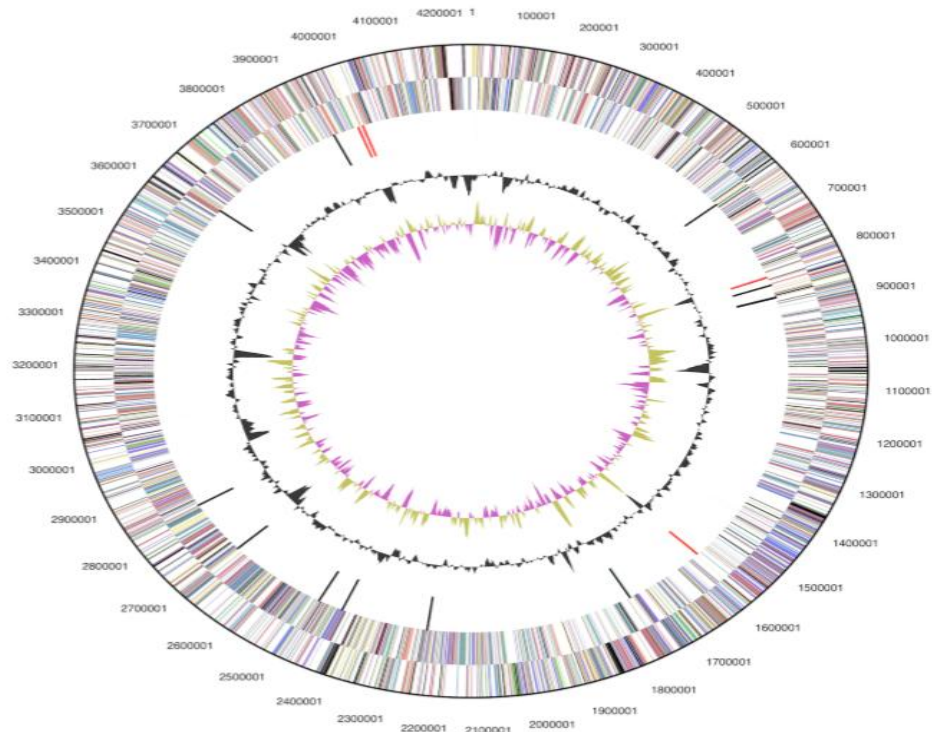
Οι δοκιμές για διϋδρολάση της αργινίνης, γελατινάση, λιπάση, αποκαρβοξυλάση της λυσίνης και της ορνιθίνης, οξειδάσης και ουρεάσης δεν παρουσίασαν ενεργότητα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε ικανότητα αφομοίωσης του κιτρικού, ούτε παραγωγή H_2S . Τέλος, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οξέων παρουσία γλυκόζης, λακτόζης ή σακχαρόζης.



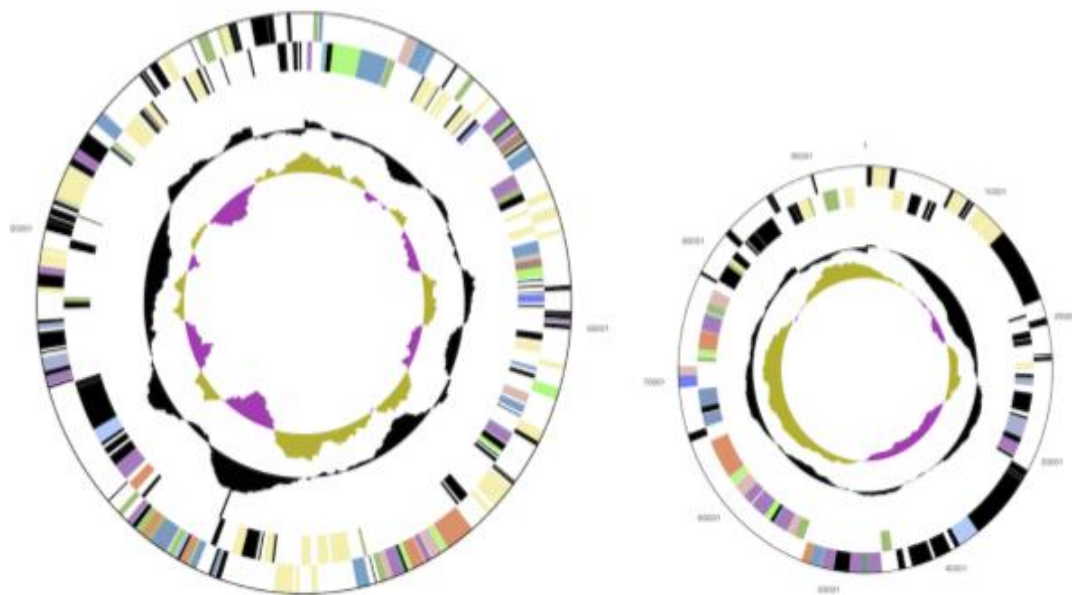
Εικόνα 3.7 Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης του στελέχους $Sphre3^T$ *P. phenanthrivorans* (Kallimanis et al., 2011).

Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα χρωμόσωμα μήκους 4.250.414 bp με περιεκτικότητα σε GC 66% (Εικόνα 3.8) και από δύο πλασμίδια, με περιεκτικότητα σε GC 62% και τα δύο (Εικόνα 3.9). Το μεγαλύτερο πλασμίδιο έχει μήκος 190.450 bp και το μικρότερο 94.456 bp. Από τα 4.288 προβλεπόμενα γονίδια, τα 4.212 ήταν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και η πλειοψηφία τους (73.8%) αποδίδεται με υποθετική λειτουργία, ενώ τα υπόλοιπα σημειώνονται ως υποθετικές πρωτεΐνες. Επίσης, προσδιορίστηκαν και 77 ψευδογονίδια (Kallimanis et al., 2011). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των 1520 bp του 16S rRNA γονιδίου του στελέχους $Sphre3^T$ ευθυγραμμίστηκε με αρκετά ομόλογα από άλλα είδη *Arthrobacter*. Η συγκριτική ανάλυση 16S rRNA γονιδιακής αλληλουχίας έδειξε ότι το στέλεχος $Sphre3^T$ ήταν συγγενικό με τα στελέχη τύπου *A. oxydans* και *A. polychromogenes* (ομοιότητα 99 και 98.9% αντίστοιχα). Η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας του γονιδίου *recA* του στελέχους $Sphre3^T$

με ομόλογα των δύο παραπάνω ειδών αποκάλυψε 91% ομοιότητα (Kallimanis et al., 2009).



Εικόνα 3.8. Κυκλικός χάρτης του χρωμοσώματος. Από το εξωτερικό στο κέντρο: γονίδια στο εμπρόσθιο κλώνο (χρωματισμένα ανά κατηγορίες COG), γονίδια στο αντίστροφο κλώνο (χρωματισμένα ανά κατηγορίες COG), γονίδια RNA [tRNA (πράσινο), rRNA (κόκκινο), άλλα RNA (μαύρο)] {Kallimanis et al., 2011}.



Εικόνα 3.9. Κυκλικός χάρτης των δύο πλασμιδίων. Από το εξωτερικό στο κέντρο: γονίδια στο εμπρόσθιο κλώνο (χρωματισμένα ανά κατηγορίες COG), γονίδια στο αντίστροφο κλώνο (χρωματισμένα ανά κατηγορίες COG), γονίδια RNA [tRNA (πράσινο), rRNA (κόκκινο), άλλα RNA (μαύρο)] {Kallimanis et al., 2011}.

3.5 Σκοπός της εργασίας

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας για την πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Sphe3*, έχουν αποδείξει ότι η πορεία προχωράει μέσω του σχηματισμού του *o*-φθαλικού οξέος το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Vandera et al., 2012; Vandera et al., 2015). Από την *in silico* όμως ανάλυση του γονιδιώματος του *Sphe3* προέκυψε ο εντοπισμός ενός πιθανού γονιδίου που κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος. Ο σχηματισμός του γεντισικού οξέος όμως δεν προκύπτει από την ως τώρα αποδεδειγμένη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου. Επομένως, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η πειραματική απόδειξη της λειτουργίας της πρωτεΐνης που κωδικεύει το γονίδιο αυτό. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου και ο χαρακτηρισμός της δράσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Σε αυτή τη μελέτη, το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από το στέλεχος *Sphe3* ενισχύθηκε με την τεχνική PCR και κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Όργανα – Συσκευές - Υλικά

Τα όργανα, οι συσκευές και τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν τα εξής:

- Αναλυτικός ζυγός: OHAUS 1500
- Αποστειρωμένες σύριγγες (20ml)
- Επωαστήρες: 1) με σταθερή θερμοκρασία στους 30°C και 37°C, της εταιρείας Memmert, 2) ανακινούμενος με σταθερή θερμοκρασία στους 30°C και 3) μεταβλητής θερμοκρασίας, της εταιρείας Chemical Electronics
- Κλίβανοι αποστείρωσης: TRADE Raypa Steam Sterilizer, Prestige Medical SERIES 2100 Media autoclave
- Κυψελίδες: πλαστικές και χαλαζία
- Λυοφιλιωτής: SpeedVac SC100 SAVANT Refrigerated Condensation Trap RT 100
- Ομογενοποιητής ιστών: Bertin technologies Minilys
- Πιπέτες: Autoclavable Nichipet EX II NichiRYO(P2) και Gilson (P20, P200, P1000, P5000)
- Πομπός ακτινοβολίας: 3UV™ Transilluminator UVP Model LMS-2GE
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA: Consort BIORAD
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών: BIORAD
- Τροφοδοτικό: MAJOR SCIENCE MP-250, Biorad POWER PAC 200
- Τροφοδοτικό για στήλη: Miniplus 3 Gilson
- Τρυβλία Petri από την Ιωαννίδα Ελένη
- Υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία στους 16°C
- Υπέρηχοι: Sonics & Materials Inc. Vibra cell™
- Φίλτρα διαμέτρου 0.22 µm, της εταιρείας Millipore Express
- Φυγόκεντροι: Hettich ZENTRIFUGEN EBA 12, 12R και MIKPO 12-24, SIGMA 2K 15, Centrifuge CR 3i Jouan
- Φωτόμετρα: UV-1601 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU, Quawell Q3000 W
- Ψυκτικός θάλαμος με σταθερή θερμοκρασία στους -80°C, της εταιρείας Forma Scientific

- DNA Thermal Cycler: G-STORM ARTHUR McKAY, PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ Research Inc. Peltier-Effect Cycling
- Gradient former: BIORAD MODEL 385
- Microflow biological safety system
- Nanodrop: Quawell
- pH-μετρο: HANNA instruments HI 2211 pH/PRPMeter

4.2 Χημικές ουσίες

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, ήταν των εταιρειών: Ελένη Ιωαννίδη, Lach-Ner PANREAC QUIMICA SAU, Merck, Sigma-Aldrich, Fisher chemical, Ambion, Pierce.

4.3 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Βακτηριακά στελέχη.

Βακτηριακό στέλεχος		Χαρακτηριστικά	Αναφορές
<i>Escherichia coli</i>	DH5a	F, φ80dlacZΔM 15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (r_K^- , m_K^-), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Hanahan 1983
	BL21 (DE3)	F <i>omp T hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) gal <i>dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	Sphe3	Άγριος τύπος	Kallimanis et al., 2009

4.3.1 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα, εμφανίζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Πλασμίδια

Πλασμίδια	Ανθεκτικότητα	Περιγραφή	Μέγεθος (kb)	Αναφορές
pCR-Blunt	Km ^r	Φορέας κλωνοποίησης	3.512	Invitrogen
pET29c ₍₊₎	Km ^r	Φορέας υπερέκφρασης	5.372	Novagen
pCR-Blunt::GDOap	Km ^r	Φορέας κλωνοποίησης	4.654	Αυτή η εργασία
pET29c ₍₊₎ ::GDOap	Km ^r	Φορέας υπερέκφρασης	6.484	Αυτή η εργασία

4.3.2 Εκκινητές

Οι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3 και ήταν της εταιρείας Eurofins genomics.

Πίνακας 4.3. Εκκινητές

Όνομασία	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων (5' → 3')
<i>gentp</i> ET _{for}	AGAGGATTCATATGACTGAGAACATC
<i>gentp</i> ET _{rev}	AGGAGTTTGGATCCTTGGTG

4.3.3 Ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα (EcoRI, EcoRV, NdeI, BamHI, XhoI), η πολυμεράση KAPA HiFi και η λιγάση (T4 ligase DNA) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν από την εταιρεία TaKaRa και KAPA Biosystems.

4.4 *In silico* εντοπισμός του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η αναζήτηση του γονιδίου, που κωδικοποιεί την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος έγινε με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων του DOE Joint Genome Institute (JGI - <https://img.jgi.doe.gov/>) στο γονιδίωμα του βακτηρίου *Pseudarthrobacter phenathrenivorans* Sphe3.

4.5 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Με βάση την αλληλουχία της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος του *P. phenanthrenivorans* Sphe3, εντοπίστηκαν πρωτεϊνικές αλληλουχίες που παρουσίαζαν ομολογία με αυτή, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων BLASTP του NCBI. Ακολούθησε ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTALW (Thompson et al. 1994) και η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για τις συγκεκριμένες αλληλουχίες με τη χρήση του προγράμματος MEGA, έκδοση 4.1 (Tamura et al. 2007).

4.6 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων

4.6.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Luria Bertani Broth, LB) βακτηριακών καλλιεργείων *E. coli* και *P. phenanthrenivorans* Sphe3

Η σύσταση του πλήρους θρεπτικού μέσου ανάπτυξης LB είναι:

- 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)
- 1% (w/v) τρυπτόνη (Tryptone)
- 1% (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- 0,15 (v/v) διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 1N και pH 7.5

Το πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργείων είναι έτοιμο για χρήση, αφού πρώτα αποστειρωθεί. Οι καλλιέργειες των βακτηρίων *E. coli* και *P. phenanthrenivorans* Sphe3 επωάζονται στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση (250rpm).

4.6.2 Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης M9 (MM-M9) με γεντισικό οξύ ως πηγή άνθρακα για το βακτήριο *P. phenanthrenivorans* Sphe3

Για την παρασκευή MM-M9 (100 ml) αποστειρώνονται 75 ml απιονισμένου H₂O και όταν η θερμοκρασία μειωθεί στους 50°C, προστίθενται τα παρακάτω διαλύματα, τα οποία έχουν αποστειρωθεί ξεχωριστά:

- 20 ml διαλύματος 5X M9
- 2 ml διαλύματος MgSO₄ συγκέντρωσης 0,1 M
- 1 ml διαλύματος CaCl₂ συγκέντρωσης 0,01 M
- 1,333 ml διαλύματος γεντισικού οξέος σε διαιθυλαιθέρα συγκέντρωσης 750 mM

Η τελική συγκέντρωση του γεντισικού οξέος ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *P. phenanthrenivorans* Sphe3 σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM-M9 είναι 5 mM.

Παρασκευή διαλύματος 5X M9 (250 ml)

- 10,625 g Na₂HPO₄ 2H₂O
- 3,75 g KH₂PO₄
- 0,625 g NaCl
- 1,25 g NH₄Cl

4.6.3 Στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

- Για την παρασκευή πλήρους στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης καλλιιεργειών LA (Luria Agar) προστίθενται επιπλέον 1,6% άγαρ και ακολουθεί αποστείρωση. Μονές αποικίες του βακτηρίου *E. coli* γίνονται ορατές σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LA μετά από 24 h από την ημέρα εμβολιασμού των κυττάρων.
- Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιιεργειας καθορισμένης χημικής σύστασης MM-M9, αποστειρώνεται νερό με άγαρ (1,6% άγαρ με 75 ml απιονισμένου H₂O για 100 ml θρεπτικού μέσου) και αφού κρυώσει (50°C), προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα, τα οποία αναφέρθηκαν στην § 4.6.2. Μονές αποικίες του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3 γίνονται ορατές σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης μετά από 72 h από την ημέρα εμβολιασμού των κυττάρων.

4.6.4 Αντιβιοτικά

Τα υδατικά διαλύματα αποθήκευσης των αντιβιοτικών αποστειρώνονται με διήθηση με τη βοήθεια αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης μεγέθους πόρων 0.45 μm. Τα αντιβιοτικά προστίθενται μετά την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης των βακτηριακών καλλιέργειών και όταν η θερμοκρασία αυτών έχει μειωθεί στους 45-50°C. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το υδατικό διάλυμα της καναμυκίνης (Km) με τελική συγκέντρωση 50 μg/ml στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Η καναμυκίνη προσδένεται στο 70S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας της καναμυκίνης βασίζεται στην ύπαρξη του γονιδίου *kam*, το οποίο κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο που τροποποιεί το αντιβιοτικό και έτσι παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση του με το ριβόσωμα.

4.7 Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης M9 (MM-M9) με γεντισικό οξύ ως πηγή άνθρακα

Πειραματική πορεία:

1. Εμβολιασμός κατάλληλης ποσότητας O/N καλλιέργειας κυττάρων Sphe3 από LB σε 50 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης MM-M9 με πηγή άνθρακα το γεντισικό οξύ.
2. Μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm κάθε 2 h και για το χρονικό διάστημα των 33 h.

4.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από βακτηριακά κύτταρα του στελέχους Sphe3 με τη μέθοδο CTAB (mini preparation)

Διαλύματα:

- Διάλυμα CTAB/NaCl: 4,1 g NaCl σε 80 ml H₂O και σε αυτά προστίθενται πολύ αργά, με ταυτόχρονη πολύ ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 65°C, 10 g CTAB. Η πλήρης διάλυση του CTAB επιτυγχάνεται σε 3 h ή και περισσότερο. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.
- Διάλυμα TE: Διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM, διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 1 mM pH 8.

Πειραματική πορεία:

1. Φυγοκέντρηση 1,5 ml O/N καλλιέργειας κυττάρων σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι σε 10000 rpm για 5 min.
2. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
3. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 740 μl TE.
4. Προσθήκη 80 μl διαλύματος λυσοζύμης (40 mg/ml) και καλή ανάδευση. Επώαση στους 37°C για 12 h.
5. Προσθήκη 40 μl διαλύματος 10% SDS και καλή ανάδευση.
6. Προσθήκη 4 μl διαλύματος προνάσης (20 mg/ml) και καλή ανάδευση.
7. Επώαση στους 37°C για 12 h.
8. Προσθήκη 100 μl διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 5 M και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
9. Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB/NaCl, προθερμασμένου στους 65°C και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
10. Επώαση στους 65°C για 10 min.
11. Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και καλή ανάδευση.
12. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Συλλογή της (άνω) υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
14. Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και καλή ανάδευση.
15. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Συλλογή της (άνω) υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Μέτρηση του όγκου της υδατικής φάσης και προσθήκη 0,6 X του όγκου, ισοπροπανόλη (-20 °C) [X είναι ο όγκος της υδατικής φάσης που υπολογίστηκε].
17. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
18. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 15 min.
19. Έκπλυση του ιζήματος με 0,5 ml διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 5 min.
20. Απομάκρυνση των υπολειμμάτων του υπερκειμένου με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε Speed Vac.
21. Επαναιώρηση ιζήματος σε 20 μl διαλύματος TE και RNase [99 μl TE + 1 μl

- RNase (10 mg/ml)] και μεταφορά σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
22. Επώαση στους 37°C για 20 min.
 23. Φύλαξη στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

4.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Αρχή μεθόδου:

Οι μέθοδοι αλκαλικής λύσεως για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζονται στα εξής: Σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δυο αλυσίδες του DNA διασπώνται (μετουσίωση). Κατά την ουδετεροποίηση το πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται, ενώ το χρωμοσωμικό παραμένει μετουσιωμένο, διευκολύνοντας έτσι την εκλεκτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Διαλύματα:

- Διάλυμα I: Διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 50 mM
Διάλυμα Tris (τρις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο)-HCl συγκέντρωσης 25 mM, pH 8
Διάλυμα EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) συγκέντρωσης 10 mM
Διάλυμα λυσοζύμης συγκέντρωσης 5 mg/ml
Φύλαξη του διαλύματος στους -20°C για περαιτέρω χρήση.
- Διάλυμα II: Διάλυμα NaOH 0.2 N
Διάλυμα 1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)
Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του.
- Διάλυμα III: Διάλυμα CH₃COOK συγκέντρωσης 3 M, pH 5.5
- Διάλυμα TE: Διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM
Διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 1 mM, pH 8

Πειραματική πορεία:

1. Συλλογή 1,5 ml καλλιέργειας κυττάρων και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 3 min.
2. Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 100 μl διαλύματος I και επώαση του εναιωρήματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
3. Προσθήκη 200 μl διαλύματος II στο εναιώρημα και επώασή του σε μίγμα πάγου-νερού (0°C) για 10 min.
4. Ακολουθεί προσθήκη 150 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε μίγμα πάγου-νερού (0°C) για 5 min.
5. Φυγοκέντρηση του παραπάνω δείγματος σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Συλλογή 400 μl υπερκειμένου και μεταφορά σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο στο οποίο προστίθενται 320 μl διαλύματος ψυχρής (-20°C) ισοπροπανόλης. Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
7. Φυγοκέντρηση του παραπάνω μίγματος σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
8. Συλλογή του ιζήματος, ξήρανση και επαναιώρηση σε 300 μl διαλύματος TE.
9. Προσθήκη στο παραπάνω διάλυμα 30 μl διαλύματος CH₃COOK συγκέντρωσης 3 M, pH 5.5 και 800 μl διαλύματος ψυχρής αιθανόλης (-20°C). Επώαση του μίγματος στους -80°C για 30 min.
10. Φυγοκέντρηση του μίγματος σε 12000 rpm για 10 min στους 4°C. Συλλογή του ιζήματος, έκπλυση με διάλυμα 70% αιθανόλης, ξήρανση και επαναιώρηση στον κατάλληλο όγκο νερού ή διαλύματος TE.

4.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Nucleospin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel (Γερμανίας)

Πειραματική πορεία:

1. Καλλιέργεια και συλλογή των κυττάρων

Φυγοκέντρηση καλλιέργειας κυττάρων 1-5 ml για 30 s σε 11000 rpm και απομάκρυνση με πιπέτα όσο το δυνατόν περισσότερου υπερκείμενου.

2. Κυτταρική λύση

Προσθήκη 250 μl διαλύματος A1 και επαναιώρηση των κυττάρων με χρήση περιστροφικού αναδευτήρα. Προσθήκη 250 μl διαλύματος A2. Ήπια ανάδευση για 6-8 φορές (χωρίς χρήση περιστροφικού αναδευτήρα) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min το πολύ. Προσθήκη 300 μl διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση για 6-8 φορές. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 11000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Δέσμευση του DNA

Τοποθέτηση του υπερκείμενου σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm. Απόχυση του υπερκείμενου.

4. Έκπλυση και ξήρανση της στήλης

Προσθήκη 600 μl διαλύματος A4 και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm. Προσθήκη 500 μl προθερμασμένου διαλύματος AW (50°C) και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm. Φυγοκέντρηση για 2 min σε 11000 rpm για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.

5. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA.

Προσθήκη 50 μl διαλύματος AE, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 1 min και φυγοκέντρηση σε 11000 rpm για 1 min.

4.11 Καθαρότητα DNA (Sambrook and Russell, 2001)

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκε με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου Quawell Q3000. Μετά από κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνεται μια μέτρηση απορρόφησης στα 260 nm και μια στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι $O.D._{260}=1$ αντιστοιχεί σε 50μg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος. Το διάλυμα DNA είναι καθαρό όταν ο λόγος $O.D._{260}/O.D._{280}$ είναι περίπου 1.8.

4.12 Ηλεκτροφόρηση DNA (Sambrook et al., 1989)

Αργή μεθόδου:

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA στο πήγμα αγαρόζης είναι οι εξής:

- Το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήγμα αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογάριθμου του μεγέθους τους.
- Η συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αγαρόζης δίνεται από τον τύπο $\log \mu = \log \mu_0 - k_r \cdot t$, όπου μ είναι η κινητικότητα του DNA, μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, k_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αγαρόζης.
- Η τάση πεδίου. Ο καλύτερος διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.
- Η διαμόρφωση του DNA. Τα μόρια του DNA μπορούν να έχουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις:
 1. Κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιϊκό DNA).
 2. Κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια τα οποία έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα).
 3. Ευθύγραμμο μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια DNA τα οποία έχουν υποστεί πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Μόρια DNA ίδιου μεγέθους, αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης, έχουν διαφορετική κινητικότητα. Η σειρά κινητικότητας είναι μόριο ανοιχτού κύκλου, ευθύγραμμο μόριο και μόριο υπερσπειρωμένου κύκλου (Grinsted & Bennett 1988).

Διαλύματα:

➤ Διάλυμα ΤΑΕ (Tris-acetate): Διάλυμα Tris-acetate συγκέντρωσης 0,04 M

Διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 0,001 M pH 8

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50X) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα (1X) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος 50X.

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: Διάλυμα 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα 0,25% κυανολικό ξυλένιο

Διάλυμα 30% γλυκερόλης

Φύλαξη του διαλύματος στους 4°C.

Πειραματική πορεία:

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0,7-2 g αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηγματος). Στη φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος ΤΑΕ και τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη.
2. Όταν η θερμοκρασία της παραπάνω φιάλης μειωθεί στους 50°C, προστίθεται ο κατάλληλος όγκος βρωμιούχου αιθιδίου, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα να είναι 0,5 µg/ml.
3. Το παραπάνω μίγμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει, οπότε αφαιρείται το κτένι για τη δημιουργία των φρεατίων.
4. Στα δείγματα του DNA, που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προστίθεται ο κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (G.L.B) σε αναλογία 5:1 αντίστοιχα. Το διάλυμα G.L.B περιέχει γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα να μη διαχέεται και να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου. Επίσης, το διάλυμα αυτό περιέχει δυο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές, των οποίων η μετακίνηση στο πηγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική για το τέλος της ηλεκτροφόρησης.
5. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια του πηγματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πηγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA-βρωμιούχου αιθιδίου, τα οποία εμφανίζονται σαν ζώνες ρόδινου χρώματος.

4.13 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αργή μεθόδου:

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στις κλωνοποιήσεις DNA είναι βακτηριακά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6), και διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δυο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων του DNA που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αгарόζης, με τις αποστάσεις πρότυπων ζωνών DNA γνωστού μεγέθους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις παρασκευαστικές εταιρίες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg DNA του φάγου λ σε 1 h, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου (Sambrook & Russell 2001).

Πειραματική πορεία:

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20 μl, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι, όπου τοποθετούνται τα εξής:

1. Κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (dsH₂O), για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.
2. Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης.
3. Ορισμένη ποσότητα DNA (0,5-1 μg).
4. 1 μl περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 U/μl).

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 30°C ή στους 37°C (ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου) για 1-2 ώρες. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Ορισμένα περιοριστικά ένζυμα απενεργοποιούνται με επώαση στους 65°C. Σε περίπτωση μερικής πέψης οι παραπάνω συνθήκες της αντίδρασης τροποποιούνται. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος της αντίδρασης μειώνεται σε 1-15 min και η συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου είναι 10 έως 100 φορές μικρότερη.

4.14 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey-Nagel (Γερμανίας)

Πειραματική πορεία:

1. Η ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το πήγμα αγαρόζης, ζυγίζεται (1 g = 1 ml) και τοποθετείται σε πλαστικό αποστειρωμένο σωληνάκι.
2. Προσθήκη 200 µl διαλύματος NT για κάθε 100 mg αγαρόζης.
3. Επώαση του δείγματος στους 50°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μείγμα, ενώ αναδεύεται ανά 2-3 min.
4. Τοποθέτηση του μίγματος σε στήλη Nucleospin Extract II και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm. Απόχυση υπερκειμένου.
5. Προσθήκη 600 µl διαλύματος NT3 και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm. Απόχυση υπερκειμένου.
6. Φυγοκέντρηση για 2 min σε 11000 rpm για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.
7. Προσθήκη 15-50 µl διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Τέλος φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 rpm.

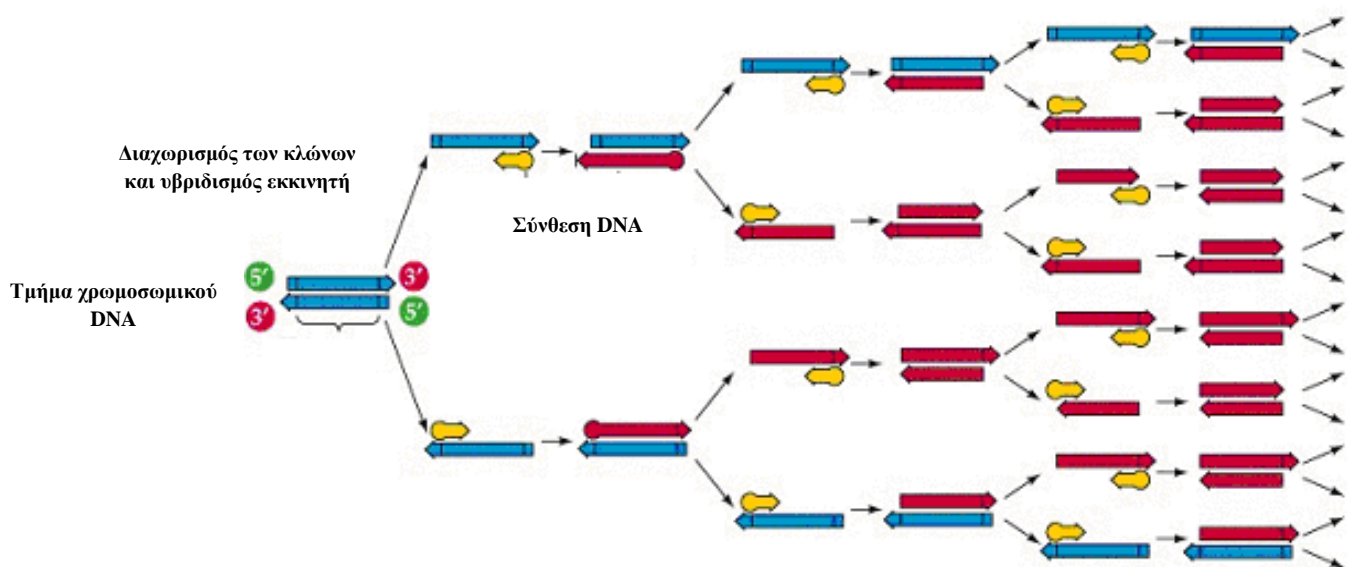
4.15. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Gelfand et al.,1993)

Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική PCR προσφέρει με έναν απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων. Η τεχνική PCR εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Όμως για να μπορέσει να αρχίσει τη σύνθεση χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δύο κλώνοι ενός δίκλωνου μορίου DNA και χρησιμοποιηθεί ένα ολιγονουκλεοτίδιο, που υβριδίζει σε ένα σημείο του ενός κλώνου, τότε θα αρχίσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου από το σημείο, που υβριδίζει το ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητής (primer). Επομένως μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δύο εκκινητές που υβριδίζουν εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τον ένα κλώνο και οι δυο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος (Εικόνα 4.1). Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊ-

όν πρέπει ο κύκλος της αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους 94 °C.
2. Ψύξη του μίγματος για να υβριδιστούν οι εκκινητές με τους δυο κλώνους. Η ακριβής θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας.
3. Λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA, με άνοδο της θερμοκρασίας συνήθως στους 72°C.



Εικόνα 4.1 Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Πειραματική πορεία:

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25 μl και οι συνθήκες επιλέχθηκαν ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν. Η πολυμεράση, που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPA HiFi. Στην παρούσα μελέτη η σύσταση της αντίδρασης είναι η ακόλουθη (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4 Τυπική σύσταση αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
ddH ₂ O	16,25
KAPA HiFi Fidelity Buffer (5X)	5
dNTPs (2,5 mM το καθένα)	0,75
Εκκινητής 1 (Forward primer)	0,75
Εκκινητής 2 (Reverse primer)	0,75
Εκμαγείο DNA	1 (30-100 ng)
KAPA HiFi DNA Polymerase (1 U/μl)	5
Τελικός όγκος	25

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε στις παρακάτω συνθήκες:

1. Μετουσίωση για 5 min στους 95°C ακολουθούμενη από 34 κύκλους με τα εξής στάδια:
 - Μετουσίωση για 20 s στους 98°C.
 - Αναδιάταξη για 15 s στους 66°C.
 - Επimήκυνση για 1 min στους 72°C.
2. Τελική επimήκυνση για 1 κύκλο και για 5 min στους 72°C.

4.16. Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Sambrook et al., 2001)

Αρχή της μεθόδου:

Τα πλασμίδια, που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA πρέπει να ικανοποιούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Να φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (συνήθως κωδικεύει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).
2. Να μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους (μετασχηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).
3. Να είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες.

4. Να περιέχουν ένα μεγάλο εύρος μονών θέσεων περιορισμού, οι οποίες αναγνωρίζονται από διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτές οι θέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση διαφόρων μορίων DNA.

Μερικές από τις θέσεις αυτές βρίσκονται εντός των αλληλουχιών γονιδίων, που κωδικοποιούν ενζυμικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (γονίδια αναφοράς). Ένα κοινό τέτοιο σύστημα αποτελεί τμήμα του οπερονίου της λακτόζης. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον προαγωγό του οπερονίου και τμήμα του γονιδίου *lacZ*, το οποίο κωδικεύει ένα πεπτίδιο του αμινοτελικού άκρου 146 αμινοξέων του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Ως κύτταρα δέκτες χρησιμοποιούνται στελέχη του βακτηρίου *E. coli*, που περιέχουν το λειτουργικό τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί την περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου του ενζύμου. Τα δυο αυτά ατελή πολυπεπτιδικά μόρια της β-γαλακτοζιδάσης που παράγονται από την έκφραση των αντίστοιχων αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του χρωμοσώματος του ξενιστή, μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται και να προκύπτει η λειτουργική πρωτεΐνη (α-συμπλήρωση) (Ullmann et al., 1967). Εντός της αλληλουχίας του αμινοτελικού τμήματος του γονιδίου *lacZ* του πλασμιδίου έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα μια περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης και καλείται πολυσυνδέτης (multilinker). Ο πολυσυνδέτης δεν επηρεάζει την ικανότητα του αμινοτελικού πεπτιδίου να συμπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* ως προς τη δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης. Εισαγωγή ενός ξένου τμήματος DNA σε αυτή την περιοχή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του μηνύματος για την παραγωγή του συμπληρωματικού πεπτιδίου του αμινοτελικού άκρου της β-γαλακτοζιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β-γαλακτοζιδάσης και επομένως η διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδίων γίνεται με τη χρησιμοποίηση δυο ουσιών, της X-gal και του ισοπροπυλοθειο-β-D-γαλακτοζίτη (IPTG). Η πρώτη αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης, η διάσπαση του οποίου δίνει μπλε χρώμα στις αποικίες. Η δεύτερη δρα ως επαγωγός της μεταγραφής του γονιδίου *lacZ*. Έτσι, οι βακτηριακές αποικίες που περιέχουν ανασυνδυασμένα ή μη πλασμίδια διακρίνονται εύκολα σε στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής, ως λευκές ή μπλε αποικίες αντίστοιχα.

5. Να διατηρούνται σταθερά μέσα στα κύτταρα – ξενιστές. Τα πλασμίδια πρέπει να φέρουν κατάλληλη περιοχή έναρξης αντιγραφής (replicon), την οποία αναγνωρίζει το σύστημα αντιγραφής των κυττάρων ξενιστών τα οποία χρησιμοποιούνται.

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

➤ Στάδιο πρώτο: Γίνεται πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί υπόκεινται σε μονή πέψη (πέψη με μία περιοριστική ενδονουκλεάση), πρέπει να γίνεται κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση ώστε να αποφεύγεται η επανακυκλοποίηση του. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδιακού φορέα, αποφωσφορυλιώνοντας τα 5'-P άκρα του. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA, που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί υπόκεινται σε διπλή πέψη (πέψη με δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες), δεν χρειάζεται η κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση, γιατί δεν υπάρχει κίνδυνος επανακυκλοποίησης του.

➤ Στάδιο δεύτερο: Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνδεση (ligation) των δυο ευθύγραμμων μορίων με την επίδραση της λιγάσης. Αυτό το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5' και 3' φωσφορικά άκρα του τμήματος στόχου και του φορέα. Η αντίδραση της λιγάσης γίνεται ως εξής:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται τα εξής:
 - 6-8 μl (0,2 μg) ευθύγραμμου πλασμιδιακού φορέα.
 - 6-8 μl (0,8 μg) ευθύγραμμου DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα.
 - 2 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης.
 - 1-2 μl T₄ DNA λιγάση (10 U/μl).
 - Ο απαιτούμενος όγκος dsH₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 20 μl.
2. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται στους 16°C για την περίπτωση κολλωδών άκρων ή στους 25°C για την περίπτωση απότομων άκρων για τη διάρκεια τουλάχιστον 18 h.

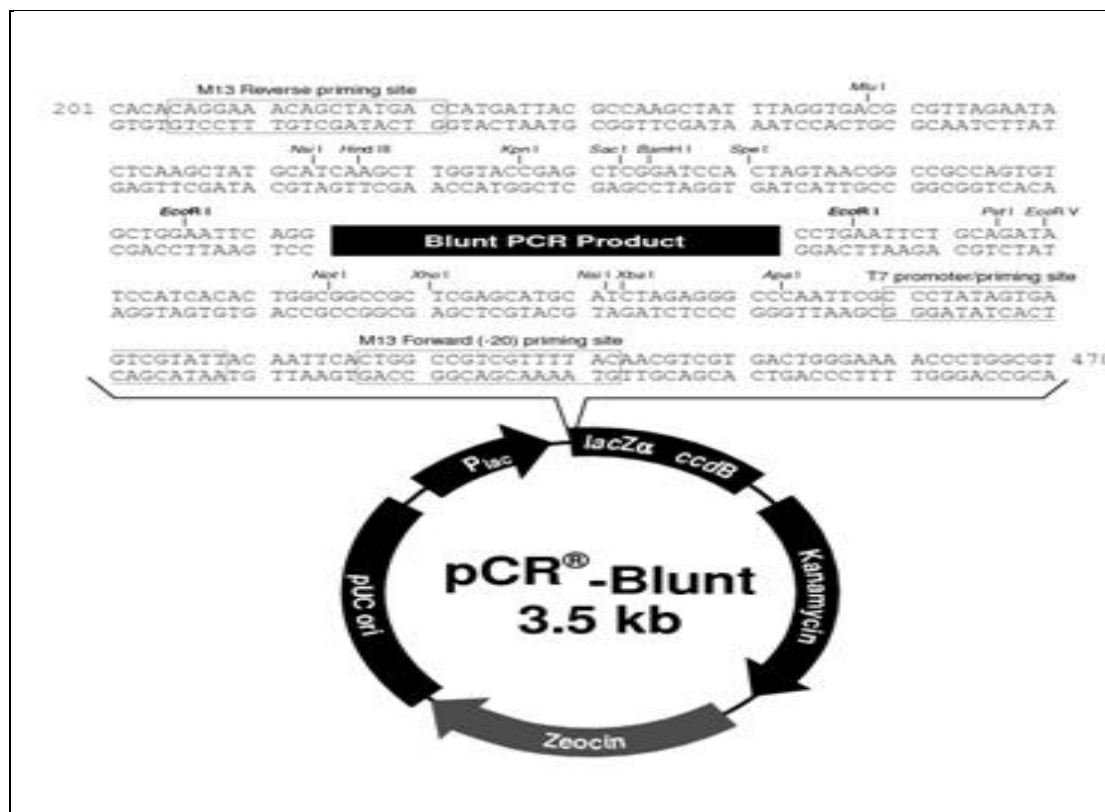
➤ Στάδιο τρίτο: Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

1. Ετοιμάζονται τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη).
2. Ακολουθεί μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εμβολιασμός τους στα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο επιλογής. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για μια νύχτα.

3. Την επόμενη επιλέγονται οι αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ελέγχονται με απομόνωση και ανάλυση του περιέχοντος πλασμιδιακού DNA.

4.16.1 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Zero Blunt[®] pCR Cloning kit της Invitrogen

Ο φορέας pCR[®]-Blunt είναι ένας φορέας μεγέθους 3.5 kb (Εικόνα 4.2) που επιτρέπει την απευθείας επιλογή ανασυνδυασμένων κυττάρων μέσω διακοπής της έκφρασης του θανατηφόρου γονιδίου *ccdB*. Το προϊόν του *ccdB* εκφράζεται ως υβριδική πρωτεΐνη με το τμήμα LacZα του πεπτιδίου LacZ. Αυτό έγινε για να αξιοποιηθεί η αποδεδειγμένη τεχνική της διακοπής έκφρασης του γονιδίου *lacZ* και για να συμπεριληφθούν οι θέσεις universal των εκκινητών M13 (forward και reverse). Ο ανασυνδυασμένος φορέας εισάγεται και αντιγράφεται σε στέλεχος του *E. coli* που δεν περιέχει τον καταστολέα *lac* (π.χ. *lacIq*) και επομένως επιτρέπει την συνεχή έκφραση του γονιδίου *lac*.



Εικόνα 4.2. Γονιδιακός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR-Blunt για κλωνοποίηση προϊόντων με απότομα άκρα.

Λιαδικασία κλωνοποίησης στο φορέα pCR[®]-Blunt

Στην παρούσα μελέτη, τα συστατικά της αντίδρασης της T₄ DNA λιγάσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5. Συστατικά αντίδρασης T₄ DNA λιγάσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Γραμμικός φορέας pCR [®] -Blunt	0,5
Προϊόν PCR με απότομα άκρα	20,1 ng/μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα Ligation	1 μl
T ₄ DNA λιγάση	1 μl
Αποστειρωμένο νερό	16,5
Τελικός Όγκος	20

- Ακολουθεί επώαση στους 16°C για 1 h ή O/N.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται ήπια και τοποθετείται στον πάγο έως ότου προετοιμαστούν τα επιδεκτικά κύτταρα ή στους -20°C για περαιτέρω χρήση.
- Η επιλογή γίνεται κατευθείαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB με αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη με συγκέντρωση 50 μg/ml.

4.17 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσληψη πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, τα οποία έχουν καταστεί επιδεκτικά μετά από επίδραση με ιόντα ασβεστίου.

4.17.1 Μέθοδος Kushner et al., 1978

Διαλύματα:

- Διάλυμα πλύσεως (Δ1): Διάλυμα RbCl συγκέντρωσης 10 mM
Διάλυμα MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) συγκέντρωσης 10 mM και pH 7
- Διάλυμα ασβεστίου (Δ2): Διάλυμα RbCl συγκέντρωσης 10 mM
Διάλυμα MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) συγκέντρωσης 100 mM και pH 6.5
Διάλυμα CaCl₂ συγκέντρωσης 50 mM

Τα διαλύματα Δ1 και Δ2 αποστειρώνονται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm.

Πειραματική πορεία:

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* στέλεχος DH5a σε 20 ml Luria Broth μέχρι οπτικής πυκνότητας O.D.: 0.1-0.2 στα 600 nm.
2. Τοποθέτηση 1,5 ml καλλιέργειας σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 min.
3. Απόρριψη του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και έκπλυση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος πλύσεως (Δ1) και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 min.
4. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2) και επώαση για 30 min σε μίγμα νερού-πάγου (0°C).
5. Φυγοκέντρωση του εναιωρήματος στις 12000 rpm για 1 min.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 0,2 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2).
7. Προσθήκη στο παραπάνω εναιώρημα 3-15 μl πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 0,1-0,5 μg/μl.
8. Τοποθέτηση του εναιωρήματος των κυττάρων σε μίγμα νερού-πάγου (0°C) για 30 min.
9. Ακολουθείται θερμικό πλήγμα με τοποθέτηση του μικροφυγοκεντρικού σωληναρίου σε υδατόλουτρο των 43.5°C για 1 min.
10. Εμβολιασμός του κυτταρικού εναιωρήματος σε 1 ml LB και επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 1 h για την ανάρρωση των κυττάρων, την αντιγραφή και την έκφραση του πλασμιδιακού DNA.

11. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0,2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα υπόλοιπα 0,8 ml της καλλιέργειας, φυγοκεντρώνονται στις 12000 rpm για 1 min. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται και εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

4.17.2 Μέθοδος Chung and Miller, 1988

Διαλύματα:

➤ Διάλυμα TSB: Διάλυμα Luria Broth pH 6.1

Διάλυμα 10% PEG

Διάλυμα 5% DMSO

Διάλυμα MgCl₂ συγκέντρωσης 10 mM

Διάλυμα MgSO₄ συγκέντρωσης 10 mM

Πειραματική πορεία:

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* σε 20 ml LB, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.): 0.3-0.6 στα 600 nm.
2. Τοποθέτηση 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 min.
3. Απόρριψη υπερκείμενου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 μl TSB.
4. Επώαση για 10 min σε μίγμα νερού-πάγου (0°C).
5. Προσθήκη πλασμιδιακού DNA.
6. Επώαση για 5-30 min σε μίγμα νερού-πάγου (0°C).
7. Προσθήκη στο παραπάνω εναιώρημα 900 μl TSB + γλυκόζη συγκέντρωσης 20 mM.
8. Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 1h, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
9. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0,1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

4.18 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους *P. phenathrenivorans* Sphe3 με μηχανική λύση

Πειραματική πορεία:

1. Συλλογή καλλιέργειας κυττάρων στην εκθετική φάση ανάπτυξης (O.D.: 0.3-0.5) του στελέχους Sphe3 και φυγοκέντρωση 3000 rpm/15 min/4°C.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM pH 7.5 και διαλύματος DTT συγκέντρωσης 1 mM.
3. Τοποθέτηση του κυτταρικού αιωρήματος σε σωληνάρια που περιέχουν κατά τα 2/3 του όγκου τους σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0.1 mm.
4. Ακολουθείται σπάσιμο των κυττάρων σε σφαιρόμυλο για 10 min, με εναλλάξ 1 min θραύση και 1 min επώαση σε παγόλουτρο.
5. Φυγοκέντρωση 12000 rpm/20 min/4°C. Συλλογή υπερκειμένου και πραγματοποίηση ενζυμικών προσδιορισμών.

4.19 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

4.19.1 Μέθοδος Bradford (1976)

Αρχή μεθόδου:

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 αλλάζει χρώμα, όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής – πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm.

Πειραματική πορεία

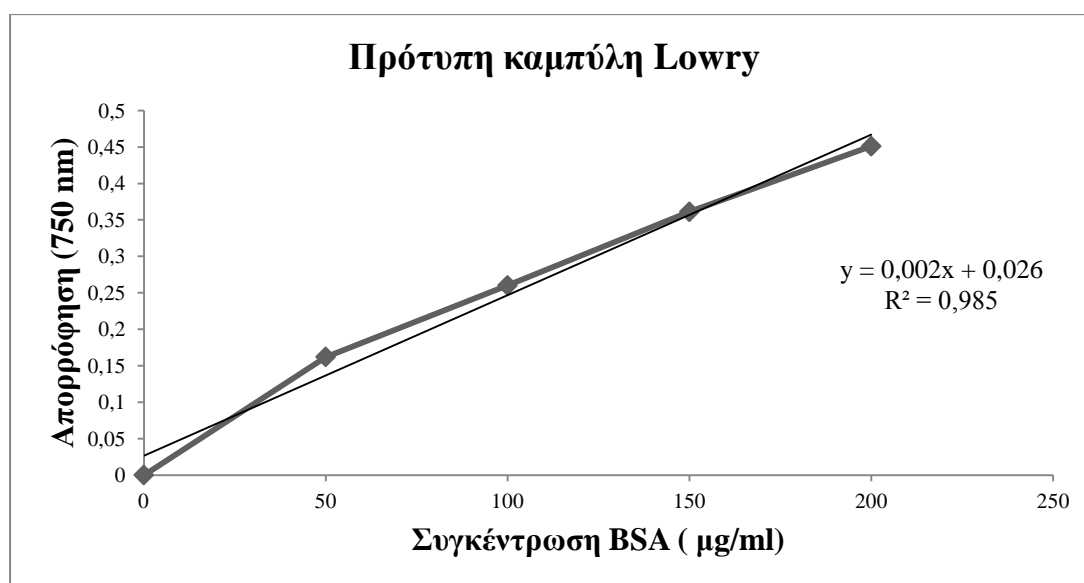
1. Γίνεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm της συγκέντρωσης του πρότυπου διαλύματος BSA (1 mg/ml) σε 2,5 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 μg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60 s και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm.
2. Ποσότητα ως 40 μl δείγματος σε 2,5 ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 s και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm.

4.19.2 Μέθοδος Lowry (1951)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση των αλάτων του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteus με τις πρωτεΐνες κατά την οποία σχηματίζεται μίγμα ανόργανων αλάτων (μπλε χρώμα). Οι δύο ξεχωριστές αντιδράσεις που γίνονται είναι:

- 1) ο σχηματισμός συμπλόκου Cu^{2+} -πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας).
- 2) η αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού και του φωσφορομολυβδαινικού άλατος, που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο προς κυανούν του βολφραμίου και κυανούν του μολυβδαινίου, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3. Πρότυπη καμπύλη με τη μέθοδο Lowry σε αυτή την εργασία.

Αντιδραστήρια:

1. 2% w/v Na_2CO_3 σε απεσταγμένο νερό.
2. 0.5% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου. (Ο θεϊκός χαλκός προστίθενται στο διάλυμα του κιτρικού νατρίου).
3. Ανάμιξη των διαλυμάτων 1 και 2 σε αναλογία 50:1 v/v πριν τη χρήση.
4. Αντιδραστήριο φαινόλης: αναμιγνύεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 v/v λίγο πριν τη χρήση.
5. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) 0,2 mg/ml σε 0.5 N NaOH.
6. Διάλυμα 1 N NaOH.

Προσδιορισμός

Το δείγμα των πρωτεϊνών επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h τουλάχιστον με ίσο όγκο διαλύματος 1 N NaOH. Μετά το τέλος της επώασης συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι 1 ml με 0.5 N NaOH. Στη συνέχεια, προστίθενται 5 ml διαλύματος (3), αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Προστίθενται 0,5 ml αντιδραστηρίου (4), αναδεύεται αμέσως και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Το σχηματιζόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 750 nm. Η περιεχόμενη πρωτεΐνη προσδιορίζεται από μια κατά περιοχές γραμμική πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA (0-200 µg).

4.20 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970)

Αρχή μεθόδου:

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες, οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήγμα. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει το μη σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτιδία προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στο πήγμα πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως N- ή O-γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανών το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα

ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήγμα. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς το θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω του πήγματος επιστοίβαξης το οποίο είναι αρκετά πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού.

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στο πήγμα επιστοίβαξης σχηματίζουν ένα προπορευόμενο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη, ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπτίδια στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH του πήγματος ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στο πήγμα διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Τα πήγματα πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) κατά την παρασκευή των πηγμάτων επιτυγχάνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οι οποίες προέρχονται από το APS (Υπερθειικό αμμώνιο). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στο πήγμα.

Διαλύματα

- 1X διάλυμα φόρτωσης: Διάλυμα Tris συγκέντρωσης 50 mM pH 6.8
 - Διάλυμα 2% SDS
 - Διάλυμα 0,1% μπλε της βρωμοφαινόλης
 - Διάλυμα 10% γλυκερόλης
 - Διάλυμα 5% 2-μερκαπτοαιθανόλης
- 10X διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1L): Διάλυμα 144 g γλυκίνης (συγκέντρωσης 250 mM pH 8.3)
 - Διάλυμα 20 g Tris base (συγκέντρωσης 25 mM)
 - Διάλυμα 10% SDS (50 ml)

- Διάλυμα χρώσης (100 ml): Διάλυμα 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250
 Διάλυμα dsH₂O (40 ml)
 Διάλυμα μεθανόλης (50 ml)
 Διάλυμα οξικού οξέος (10 ml)
- Διάλυμα αποχρωματισμού: Διάλυμα 10% μεθανόλης ή αιθανόλης
 Διάλυμα 10% οξικό οξύ

Πειραματική πορεία:

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

1. Κατάλληλο στήσιμο της συσκευής, που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθέτηση σε ειδική δεξαμενή.
2. Γέμισμα δεξαμενής με 1 L περίπου 1X SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από τη επιφάνεια των πηγμάτων.
3. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρηση τους σε διάλυμα 1X ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης και φόρτωσή τους στο πήγμα.
4. Κάλυψη της δεξαμενής και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 Volts μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος το πήγμα.
5. Τοποθέτηση του πήγματος σε δοχείο στο οποίο υπάρχει διάλυμα χρώσης (staining solution) και βάνιμο για 1 h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
6. Ξήρανση του πήγματος στους 80°C για 30 – 45 min.

Πίνακας 4.6. Σύσταση του πήγματος επιστοίβαξης και διαχωρισμού στην παρούσα μελέτη.

Πήγμα διαχωρισμού	12%	Πήγμα επιστοίβαξης (5%)
Ακρυλαμίδιο:bis (29:1)	4 ml	0,85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2,5 ml	1,3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
dsH ₂ O	3,2 ml	2,8 ml
10% SDS	100 μl	50 μl
10% APS	50 μl	20 μl
TEMED	20 μl	5 μl

4.21 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET System Manual, Novagen 2001)

Αρχή μεθόδου:

Το σύστημα pET (Εικόνα 4.4) είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli*. Τα στοχευόμενα γονίδια κλωνοποιούνται στους φορείς pET κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη T7 RNA πολυμεράσης στα κύτταρα του ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και δραστική που σχεδόν όλη η ενέργεια του κυττάρου χρησιμοποιείται τελικά για την έκφραση του στοχευόμενου γονιδίου. Είναι ενδεικτικό ότι λίγη ώρα μετά την επαγωγή παράγεται σχεδόν το 50% της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ικανότητα να διατηρεί τα στοχευόμενα γονίδια ουσιαστικά μη αντιγραφόμενα σε μη επαγόμενη κατάσταση. Τα υπό έκφραση γονίδια μεταφέρονται αρχικά σε ξενιστές, οι οποίοι δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, μειώνοντας, έτσι την πλασμιδιακή αστάθεια που οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες πιθανόν να είναι τοξικές για τα κύτταρα του ξενιστή. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε ξενιστές έκφρασης οι οποίοι περιέχουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του προαγωγού *lacUV5* και η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG. Ακόμα και απουσία IPTG, υπάρχει έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης από τον προαγωγό *lacUV5* στους ξενιστές DE3. Αν λοιπόν τα στοχευόμενα γονίδια είναι τοξικά για το βακτήριο *E. coli* ακόμα και σε αυτό το χαμηλό επίπεδο έκφρασης μπορεί να εμποδίσει τη σταθεροποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στους ξενιστές DE3. Γι αυτό το πρόβλημα είναι διαθέσιμες πολλές λύσεις. Μια προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση φορέων οι οποίοι περιέχουν τον καλούμενο προαγωγό T7 *lac*. Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν μια αλληλουχία του ρυθμιστή *lac* καθοδικά του προαγωγού T7. Περιέχουν επίσης τον φυσικό προαγωγό και την κωδικεύουσα περιοχή του καταστολέα *lac* (*lacI*), προσανατολισμένο έτσι ώστε οι προαγωγοί T7 *lac* και *lacI* να έχουν διαφορετική κατεύθυνση. Όταν χρησιμοποιούνται οι φορείς στους DE3 ξενιστές για την έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων, ο καταστολέας *lac* δρα:

- στο χρωμόσωμα του ξενιστή στον προαγωγό *lacUV5* για να καταστείλει τη μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης από την πολυμεράση του ξενιστή και

Πειραματική πορεία:

Η διαδικασία που ακολουθείται για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη:

1. Κλωνοποίηση γονιδίων στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης. Στην εργασία αυτή επιλέχθηκε ο φορέας pET29c(+).
2. Μετασηματισμός με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο των ξενιστών BL21(DE3).
3. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5 ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37°C.
4. Εμβολιασμός κατάλληλης ποσότητας (1:20) σε 20 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.)_{600nm}=0.4-0.6.
5. Προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 1 mM).
6. Λαμβάνονται δείγματα του 1 ml σε χρόνους: 0 min, 1 h, 2 h, 3 h και 4 h.
7. Φυγοκέντρωση.
8. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1X διαλύματος φορτώσεως όγκου αναλόγου της οπτικής πυκνότητας του δείγματος (120 μ l/ 0.6 O.D._{600nm}).
9. Αποθήκευση στους -20°C ή πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αφού τα δείγματα επωαστούν για 5 min στους 95°C και φυγοκεντρηθούν.

4.22 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni²⁺-NTA αгарόζης (Herz et al. 2000)

Αρχή μεθόδου:

Η στήλη Ni²⁺-NTA ανήκει σε μια ειδική κατηγορία στηλών χρωματογραφίας αγκιστείας, που ονομάζεται IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Το νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA) έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ιόν νικελίου με το NTA πολύ καλύτερα από άλλες χηλικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, οι στήλες νικελίου με το NTA δεσμεύουν 100-1000 φορές περισσότερο αποτελεσματικά πρωτεΐνες με ουρά έξι ιστιδινών από ότι ανάλογες στήλες ιμινοδιοξικού οξέως (IDA, η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τέτοιου είδους χρωματογραφίες).

Διαλύματα:

- **Διάλυμα Α:** Διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 100 mM pH 8
 - Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 500 mM
 - Διάλυμα μιδαζολίου συγκέντρωσης 20 mM
 - Διάλυμα PMSF συγκέντρωσης 0.3 mM
- **Διάλυμα Β:** Διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 100 mM pH 8
 - Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 500 mM
 - Διάλυμα μιδαζολίου συγκέντρωσης 20 mM (B₂₀) και 100 mM (B₁₀₀)
- **Διάλυμα Γ:** Διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 100 mM pH 8
 - Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 500 mM
 - Διάλυμα μιδαζολίου 100 mM (C₁₀₀) και 500 mM (C₅₀₀)

Πειραματική πορεία:

(I) Επαγωγή καλλιέργειας

1. Επώαση 20 ml καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση, O/N.
2. Εμβολιασμός 1:20 σε 2 L θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση στους 37°C υπό γρήγορη ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm φτάσει περίπου 0.6.
3. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (μη επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1X διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (120 μl/ 0.6 O.D._{600nm}). Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
4. Επαγωγή της καλλιέργειας με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
5. Επώαση της καλλιέργειας για 4 επιπλέον ώρες.
6. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1X διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (120 μl/ 0.6 O.D._{600nm}). Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση της καλλιέργειας σε 5500 rpm/4°C/20 min. Στο στάδιο αυτό το ίζημα μπορεί να αποθηκευθεί στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

(II) Λύση των κυττάρων

1. Αν τα κύτταρα βρίσκονται στους -20°C αφήνονται για 15 min σε πάγο για να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια επαναιωρούνται σε 5 ml διαλύματος A ανά γραμμάριο κυττάρων.
2. Γίνεται λύση των κυττάρων με υπερήχους (Χρησιμοποιούνται 8 παλμοί των 10 sec στα 300 W, με περίοδο ψύξης μεταξύ των παλμών 10 sec).
3. Φυγοκέντρηση 6.000 rpm/ 4°C /20 min
4. Συλλογή του υπερκειμένου για εφαρμογή σε στήλη Ni^{2+} -NTA.

(III) Χρωματογραφία

1. Εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα A με ροή 2 ml/min
2. Πέρασμα από τη στήλη όλου του υπερκειμένου, οπότε φεύγουν από τη στήλη όλες οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες.
3. Ακολουθεί πλύση της στήλης με 20 ml διαλύματος A.
4. Η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 20 ml διαλύματος B με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.
5. Ακολουθεί έκλουση με 120 ml διαλύματος Γ με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που συλλέγονται υπόκεινται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα πρωτεϊνικά πηγμάτα σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.23 Ενζυμικοί προσδιορισμοί

4.23.1 Ενζυμικός προσδιορισμός της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (Feng et al., 1999)

Η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε φωτομετρικά στους 25°C , μετρώντας την αύξηση της απορρόφησης στα 330 nm, που οφείλεται στο σχηματισμό του μηλοπυροσταφυλικού οξέος για το διάστημα του 1 min. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του ενζύμου/κυτταρικού εκχυλίσματος σε τελικό όγκο 1 ml, που περιέχει 0.3 mM γεντισικού οξέος σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7.5 (Πίνακας 4.7). Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης $\epsilon_{330} = 10.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Πίνακας 4.7. Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης για τον ενζυμικό προσδιορισμό της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Αντιδραστήριο	Όγκος στην αντίδραση (μl)
Ενζυμικό παρασκεύασμα	50
Υπόστρωμα: 3 mM gentisate σε 20 mM Tris-HCl pH 7.5	100
Ρυθμιστικό διάλυμα: 50 mM Phosphate Buffer pH 7.5	850
Τελικός όγκος	1000

4.23.2 Επίδραση του σιδήρου [FeSO₄ (Fe²⁺)] και του *L*-ασκορβικού οξέος (*L*-ascorbate) στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Με τη βοήθεια του ενζυμικού προσδιορισμού (§ 4.23.1) η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε μετά από επώαση του καθαρού ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις FeSO₄ /*L*-ασκορβικού οξέος (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 και 1 mM) για τα χρονικά διαστήματα 10, 20 και 30 min.

4.23.3 Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η τιμή/εύρος του pH, στο οποίο δρα βέλτιστα η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του ενζυμικού προσδιορισμού αυτής, όπως περιγράφηκε στην § 4.23.1. Για τις τιμές pH από 4 έως 12 χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα, ίδιας συγκέντρωσης και κάτω από τις ίδιες συνθήκες, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8 Παρουσίαση ρυθμιστικών διαλυμάτων και των τιμών pH τους για το προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Τιμή pH
50 mM Succinic acid	4
	4.5
	5
	5.5
50 mM Phosphate Buffer	6
	6.5
	7
	7.5
	8
50 mM Tris-HCl	8.5
	9
50 mM Glycine – NaOH	9.5
	10
	10.5
50 mM Na ₂ HPO ₄	11
	11.5
	12

4.23.4 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η θερμοκρασία, στην οποία δρα βέλτιστα η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε σε θερμοστατούμενο φωτόμετρο σε θερμοκρασίες: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 και 80°C.

4.23.5 Επίδραση διαφορετικών μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Με τη βοήθεια του ενζυμικού προσδιορισμού (§ 4.23.1) η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε μετά από επώαση του ενζύμου για 30 min σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 και 1 mM) των μεταλλικών ιόντων: Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ και Ni²⁺.

4.23.6 Τιτλοδότηση ενζυμικού παρασκευάσματος

Η τιτλοδότηση του ενζυμικού παρασκευάσματος, δηλαδή ο προσδιορισμός των λειτουργικών ενεργών κέντρων στο κλάσμα, που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, πραγματοποιήθηκε με τη ο-φαινανθρολίνη και το EDTA. Οι δύο αυτές ουσίες είναι χηλικοί παράγοντες, που δεσμεύουν τα ιόντα του σιδήρου, αναστέλλοντας το ένζυμο μη αντιστρεπτά. Η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε μετά από επώαση για 30 min του καθαρού ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων παραγόντων: ο-φαινανθρολίνη (0.005, 0.01, 0.015 και 0.02 mM) και EDTA (0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 και 0.03 mM). Οι δοκιμές σταματάνε στη συγκέντρωση του παράγοντα, που προκαλεί σχεδόν πλήρη αναστολή του ενζύμου (~98%).

4.23.7 Κινητική σταθερής κατάστασης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Για τον προσδιορισμό της κινητικής σταθερής κατάστασης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, καθώς και το μοντέλο που αυτή ακολουθεί, μετρήθηκε η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0.0075, 0.015, 0.03, 0.045, 0.06, 0.075, 0.09, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9 mM) σύμφωνα με τον ενζυμικό προσδιορισμό για την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (§ 4.23.1).

4.23.8 Επίδραση εναλλακτικών υποστρωμάτων στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η επίδραση εναλλακτικών υποστρωμάτων στη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε φωτομετρικά στους 25°C και στο κατάλληλο μήκος κύματος (Πίνακας 4.9). με οδηγό τον ενζυμικό προσδιορισμό του ενζύμου (§ 4.23.1). Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του ενζύμου/κυτταρικού εκχυλίσματος σε τελικό όγκο 1 ml, που περιέχει 0.3 mM υποστρώματος σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7.5.

Πίνακας 4.9. Παρουσίαση του μήκους κύματος των εναλλακτικών υποστρωμάτων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

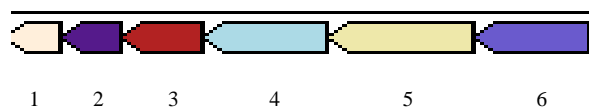
Υπόστρωμα	Μήκος κύματος (nm)	Βιβλιογραφία
Σαλικυλικό οξύ	283	Eppinger et al., 2017
1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ	300	Vandera et al., 2012
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	294	Laempe et al., 2001
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	340	Chen et al., 2011
3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ	290	Das et al., 2016
3,4-διυδροξυφαινολοξικό οξύ	400	Kahn et al., 2000
Κατεχόλη	260	Marga et al., 1970

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Εντοπισμός του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος με *in silico* μελέτη

Η αναζήτηση και ο εντοπισμός του γονιδίου, που πιθανά κωδικοποιεί την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος στο γονιδίωμα του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3 έγινε με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων του DOE Joint Genome Institute (JGI - <https://img.jgi.doe.gov/>). Το πιθανό γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος εντοπίζεται στο μεγαλύτερο από τα δύο πλασμίδια του βακτηρίου (plasmid pASPHE301:CP002380 με μέγεθος 190450 bp και 211 γονίδια). Έχει μέγεθος 1122 bp και η νουκλεοτιδική του αλληλουχία παρατίθεται στο Παράρτημα.

Το γονίδιο αυτό φαίνεται να αποτελεί τμήμα ενός συμπλέγματος γονιδίων, που κωδικοποιούν άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στον καταβολισμό του γεντισικού οξέος στο βακτήριο *P. phenanthrenivorans* Sphe3 (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1 Σύμπλεγμα γονιδίων, που συμμετέχει στον καταβολισμό του γεντισικού οξέος του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3: 1) ισομεράση του μηλοπυροσταφυλικού [Asphe3_39820: maleylpyruvate isomerase (249aa)], 2) 2-κετο-4-πεντενοϊκή υδρατάση/2-οκτεπτα-3-εν-1,7-διοϊκή υδρατάση [Asphe3_39830: 2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (274 aa)], 3) 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος [gtda: gentisate 1,2-dioxygenase {EC 1.13.11.4} (373 aa)], 4) 2,3-διυδροξυβενζοϊκή-AMP λιγάση [Asphe3_39850: 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (557 aa)], 5) συνθετάση ακυλ-CoA (σχηματισμός NDP) [Asphe3_39860: acyl-CoA synthetase {NDP forming} (677 aa)], 6) 2-πολυπρενυλ-6-μεθοξυφαινολική υδρολάση – οξειδοαναγωγάση [Asphe3_39870:2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydrolase-like oxidoreductase (524 aa)]

5.2 Εύρεση της πρωτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η εύρεση της πρωτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, δηλαδή η αλληλουχία των αμινοξέων της έγινε με τη βοήθεια του NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/323471388> και παρατίθεται στο Παράρτημα.

Η αμινοξική αλληλουχία ανήκει στην 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, που είναι πρωτεΐνη με 373 αμινοξέα και μοριακό βάρος 41.45 kDa, όπως βρέθηκε με τη

βοήθεια του αλγορίθμου Protein Molecular Weight στο βακτήριο, Sphe3. Για τη σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας με άλλες ομόλογες που βρίσκονται καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων, πραγματοποιήθηκε είσοδος της αμινοξικής αλληλουχίας στο πρόγραμμα του αλγορίθμου BLASTP.

5.3 Σύγκριση αλληλουχιών – Πολλαπλή στοίχιση

ADC93717.1	-----MKWSNK-DGYPSWKIIHAEKFFDK--V	24
AAQ62856.1	-----MAEQE-----PKELLEMSDTERLLEENDLRPLWEVEK---DFGNQFG-	40
AAQ79814.1	MSQQEEQDSQEQD-----LEDQLELSTNTREILERHNLRLWEVED---DFGNTID-	48
AAZ93402.1	-----MQDQDRFDLGR----LEDLPQDYRDELQHNLVPLWPSLR---AVLPP-KV	44
AAD12619.1	ML-D---EEERITHSHELGR----LEDLPQDYRDELKQLNLVPLWPSLR---AVLPP-NV	48
BAA31235.2	MN-----SSNTGAPEAAQAATLEAFDRRAAEQYLRGQWIAEE---HLMRAIGG	45
ADX73349.1	MD-----SVNIETPAATQAEALAVFDQQAAGQYLRGQWIAEE---HLMRAIGG	45
NP	MGAPGKN DYATEHV KQEVPPATPEEQAE LDTMYKRMDDLHLKPLWTQIG---GLMPN--H	55
AAQ91293.1	MQ-NEKLDHESVTQA----MQPKDTPELRALYKSFEEESIPLWTQLG---DLMPI--H	49
ADX75072	-M-TENITHESVAASHTLPEPTAEAAQLQLYRDFDKENLIPLWTEIG---DLMPM--V	53
ABH01038.1	-----MHTPDP SLDDAPELKQLYTDFEAEHLNPLWTQLG---DLMPM--T	40
ADT78164.1	-----MTATEPHVDDDPALKQLYTDFEAEHLNPLWTQLG---DLMPM--T	40
ABG93677.1	-----MTATEPYVDDAPELKQLYTDFEAEHLNPLWTQLG---GLMPM--T	40
AAV97252.1	MA-PTEI----KPEDDILGRARVRDTPLEAAYDDLAKIETGALWTVAN---DIEPW--E	50
CAA12267.1	MQ-----PVLANDQQAQLTALYDEM RPAGLKPLWEVLH---ALVLA--E	39
BAB36453.1	-----MTDNQNSREQFYQHISGQNLTPLWESLH---HLVPK--T	35
AAD49427.1	MS-----FTEKPAVTKERKEFYSKLESHDLAPLWEVLN---EVVTT--K	39
BAC98955.1	MS-----FAKAPMDTAERQNFYKKIDDQSYTALWTVLN---NIITP--E	39
	* .	
ADC93717.1	IQNDTRPGKWEWADVVSGLRDLKDKDPR----MNSERRYVAIVNEDVGLGETKGIGITPG	79
AAQ62856.1	---GFEADIWKWEDIQASIDAIEDVPIADLPPGFQRRVAVPVNTGYR-----NAISNT	91
AAQ79814.1	---DLEADIWKWEDI EAAIDGVEDDVPIADLPPGFQRRVAVPINASFG-----NAISNT	99
AAZ93402.1	PTRQTRPTSWSYQTLKPLLLKAGELTPI----EKAERRVLVLANPGHGL---EKMQASAA	97
AAD12619.1	PTRQTQPTYWSYQTLKPLLLKAGELTPI----EKAERRVLVLANPGHGL---EKMQASAA	101
BAA31235.2	PRPAGIPYRWEWKSVEVALDEATIALGP----VDTARRHLTFVNPGLMD---RGSATHTT	98
ADX73349.1	PRPAGIPYRWAWDDVEKALAEATIALGP----VDTARRHLTFVNPGLLD---RGSATHTT	98
NP	PEPRAVAHKNDWAE LLLKLAQRSGELVPVG---RGGERRAIGLANPGLDG---N-TYISPT	108
AAQ91293.1	PKSKAVPHVWKWSTLLRLARKSGELVPVG---RGGERRALGLANPGLGG---N-AYISPT	102
ADX75072	PSPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVG---RGGERRAIALANPGLAG---T-PYATPT	106
ABH01038.1	PTSRAVPFVWKWSTLYPLAQRAGDLVPVG---RGGERRAIALANPGLDG---V-PYVTPT	93
ADT78164.1	PTSRAVPFVWKWSTLYPLAQRAGDLVPVG---RGGERRAIALANPGLGG---V-PYVTPT	93
ABG93677.1	PTSRAVPFVWKWSTLYPLAQRAGDLVPVG---RGGERRAIALANPGLGG---V-PYVTPT	93
AAV97252.1	PTPKSAPVHWKWSDLRREVLRAIDLVRP----EDAGRRVVYLRNPQRKD---V-SAACGW	102
CAA12267.1	PASLARAHWHYGEVRDFLLRSGDLISA----EQAERRVLIENPGLGEG---S-SAITPS	91
BAB36453.1	PNANCAPAYWNYQEIRPLLLLESGGLIGA---KEAVRRVLVLENPALRG---Q-SSITAT	87
AAD49427.1	PKSNCAPHLWEFEVAKEFLMEAGTLITA----KEAERRVLIENPGLKG---L-SRITTS	91
BAC98955.1	PRSNCLPHVWRFHAEAKDYLLLEAGGLITA----KEAERRVLVLENPGLRG---Q-SRITTS	91
	* ; ** *	

ADC93717.1	LFCGCQLIHPGEEVTSRRHNSVALYFIVEGT-GE-LEVEGEVYSYKPFDIMTCPAWSYHA	137
AAQ62856.1	IYVGVQTVSPGETAPARRHGANALRFIDGSEDMKTVVAGEEFPMDNDLITTPQWEWHD	151
AAQ79814.1	IYVGVQTVSPGETAPSHRHGANALRFIDGSEDMKTVVAGEEFPMDNDLITTPQWEWHD	159
AAZ93402.1	MYLGMQLLLPGEWAPSHRHTPNAVRMIVEGE-GAYTTVDGKEKCPMRRGDILITPTGLWHE	156
AAD12619.1	IYLGMQLLLPGEWAPSHRHTPNAVRMIVEGE-GAYTTVDGKEKCPMRRGDILITPTGLWHE	160
BAA31235.2	ISAGFQLVKPGEVCSHRHTMSAVRFVTKGHPDAFVAVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHD	158
ADX73349.1	ISAGFQLVKPGEVCSHRHTMGAVRFITKGDPEAFITVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHD	158
NP	LWAAIQYLAPGENAPEHRHSQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVPMRRGDFLLTPGWNHYG	167
AAQ91293.1	MWAGIQYLGPRETAPEHRHSQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVPMRRGDFLLTPGWCFHG	161
ADX75072	LWAAIQYLGPRETAPEHRHSQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVPMRRGDFLLTPGWNHYG	165
ABH01038.1	LWAAIQYLGPKKEVAPEHRHAQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVAMRRGDFLLTPGWHFHG	152
ADT78164.1	LWAAIQYLGPKKEVAPEHRHAQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVAMRRGDFLLTPGWHFHG	152
ABG93677.1	LWAAIQYLGPKKEVAPEHRHAQNAFRFVIEGE-GVWTVVNGDPVAMRRGDFLLTPGWHFHG	152
AAV97252.1	LFSGIQTMKAGERAGARRHAASALRFIMEGS-GAYTIVDGHKVELGANDFVLTPNGTWHE	161
CAA12267.1	LYAGLQLILPGEVAPCHRHTQCALRFILEGE-GAYTAVDGEKAVMSPFDLVLTPGGQWHD	150
BAB36453.1	LYAGLQLILPGEVAPSHRHNSQALRFIVEGK-GAFVAVDGERTPMNEGDFILTPQWRWHD	146
AAD49427.1	LYAGLQLILPGEVAPTHRSQSALRFVVDGG-GACTSVDGERTTMQVGDVFIITPPWAWHD	150
BAC98955.1	LYAGLQIVMPDEVAPARRHSQSALRLVLDGN-GAHTSVDGERTIMSFQDFIITPPWTWHD	150
	: . * : * *** * . : * * . * : : * : *	
ADC93717.1	WRAT-GDKDTLMYVIHDMALLAYM--RALFWEEPKGSE-NIRHMV-KGSTHTWSNTKAPE	192
AAQ62856.1	HVND-GDETAAWLDVLDLPLVLDLSLNARNTFENHELDRQPVTKSQGYNES-QYGRARPF	209
AAQ79814.1	HVND-SDETAAWLDVLDLPLVLDLSLNARNTFENHELDRQPVTKTQGYNAS-QYGRGRPDE	217
AAZ93402.1	HGHD-GDQPVWLDVLDLPLVYYM--EASYHIDGDR--QTVKPRGD---RVYAGG----	204
AAD12619.1	HGHD-GNEPVWLDVLDLPLVYYM--EASYHIDGER--QQVDPGRGD---CAMTRA----	208
BAA31235.2	HHNS-GDADVWLDGLDIGLLQSL--GAVFYEPYGDSSQNVRPSSSEEGIG-TRSH----	209
ADX73349.1	HHNP-SDTDVWLDGLDIGLLFAL--GAVVYEPYGDSSQNVRPSSSEEGIG-TRSH----	209
NP	HHNI-ATEPMAWLDGLDIPFAYQM--DTGFFEFYGTGKLTDESTPDLRSRERLWAHP----	220
AAQ91293.1	HHND-TDQPMWIDGLDIPFSQQM--DVGFFEFGSDRVTDYATPNFSRGERLWCHP----	214
ADX75072	HHND-TDEPMAWIDGLDIPFVHYA--DAGFFEFGTERVTEATPDISRERLWAHP----	218
ABH01038.1	HHNK-TDQPMWIDGLDIPFVHYT--DTGFFEFGSENVTDSTDPVSRERLWAHP----	205
ADT78164.1	HHNE-TDQPMWIDGLDIPFVHYT--DTGFFEFGSENVTDSTDPVSRERLWAHP----	205
ABG93677.1	HHNE-TDQPMWIDGLDIPFVHYT--DTGFFEFGSENVTDSTDPVSRERLWAHP----	205
AAV97252.1	HGILESGETECIQDGLDIPLTNCL--EANFYEVHPNDYQTTDIPLNDSPL-TYGG----	213
CAA12267.1	HGNG-TDQPMIWLGLDIPTRVHF--DASFAEKWPQAQHPMAPPGDLSA-RYGH----	201
BAB36453.1	HGNP-GDEPVIWLGLDPLVNLIL--GCGFAEDYPEEQQPVTRKEGDYLP-RYAA----	197
AAD49427.1	HVND-SDKPMIWMGLDPLMVTLF--DTSFAEGYEDIQEI TRPNGDLSA-RYGA----	201
BAC98955.1	HGNS-TDEPMIWLGLDIWVSLF--DASFAEYGADEQPIVHNIIGDSSA-RYGA----	201
	*:	
ADC93717.1	VSK-----TQAA-KELLKQGE-----	207
AAQ62856.1	DTKEDGIPGPFE---GNCAATPPYRFSWKDTLQTLRQRAENDD-----PDPHDGYSLSY	260
AAQ79814.1	EAKSDGIPGPFE---GIREATPPYRFSWKVMSLHQRADNDE-----PDPYDGYLSY	268
AAZ93402.1	----AMVPTPMF--ERSGKAYPMLRYPVVEARAALVALADDQP-----ELCSVQTTY	250
AAD12619.1	----GVVPTPVF--QRSDKRYPLLRYPWADTRAALLSLAADQP-----EQECVQVTY	254
BAA31235.2	----WLRPTWE---RGRESRLPIRYPWKEVNARLDVYDLD-A-----GTPYDGLALRY	254
ADX73349.1	----WLRPTWE---RGRESRLPVRYPWSEVKARLDLYDLS-A-----GNEFDGLALRY	254
NP	----GLRPVSFP---GKTSYSPIGRYWEHTDAALNDQLALEEAGHPGTVP--GHAAIRF	272
AAQ91293.1	----GLRPLVGL---QNTVASPIGAYRWEFTDRALTEQLLLEDEGQPATVP--GHAAIRY	266
ADX75072	----GLRPLVGL---DDTNSPIAAYRWKYTDAALREQLLLEDEGHPATVSQ--GHAAVRY	270
ABH01038.1	----GLRPLVGL---DAKTSSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGYAATTEP--GHAAVRY	257
ADT78164.1	----GLRPLVGL---DAKTSSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGYAATTEP--GHAAVRY	257
ABG93677.1	----GLRPLVGL---DAKTSSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGYAATTEP--GHAAVRY	257
AAV97252.1	----PALLPQLD--KWDKPYSPLLKYSWEPTYEALLNAYAKASD-----GSPYDGLILRY	261
CAA12267.1	----NLRPMRGTSADRRTSQPLFHYPYKQWRPALDHLASTAQ-----VDPHLGHALF	251
BAB36453.1	----NMLPLRH---QTGNSSPIFNRYDRSREVLHDLTRLGD-----ADEWDGYKMR	243
AAD49427.1	----NMLPVDFK---QKGLSSPIFNYPYERSREALEAMKKANE-----WDPCHGLKMQY	248
BAC98955.1	----NMLPVDFV---HKGLASPIFNYPYERSREALEALKKSQE-----WDRCHGLKMR	248
ADC93717.1	-----	207
AAQ62856.1	VNPATGQPPLFPTMSFRAQLLQEET--DPHFHNAVDAVFVIEGEGATHVGGDDVLEWSE	318
AAQ79814.1	VNPATGSPPLFPTMSFRAQLLQEAT--DAHFNATEVFFVVEGEGATHVDGEALEWSE	326
AAZ93402.1	VNPETGNDQ-QNILGYALMLRPGQTLRLPVRSPAMVFHVIEGGAKVQVEDQAFVLA	309
AAD12619.1	VNPETGDDA-ENILGFYALMLKPGQTLRLPVRSPAVVFHQIEGRSEARIAESTFAL	313
BAA31235.2	ANPVTGGPT-MATMDCWVQLRAGPFGDGKSHRRSSAITYVIVSGSGTMTVETEITFN	313
ADX73349.1	ANPVTGGPT-MPTMDCWVQLRAGPFGDGRTHRRSSAITYVIVSGSGTMTVETEITFN	313
NP	SNPTTGGDV-MTTIRAEFHRLRPGASTAPIHEVGNRCFQVFEQGSATINVGDKTFE	331
AAQ91293.1	VNPTTGGDV-MPTLRCEFHRLRAGTETATRNEVGSTVVFQVFEQAGAVVMNGET	325
ADX75072	TNPTTGGDV-MPTIRAEFHRLRAGATTEVREVGVSSVGVQVFEQGTGTVTLNGET	329
ABH01038.1	TNPTTGGDV-MPTIRAEFHRLRAGARTRPRRDVGSVYQVFDGEGRFVLLGGEART	316
ADT78164.1	TNPTTGGDV-MPTIRAEFHRLRAGARTRPRRDVGSVYQVFEQSGRFVLLGGQTR	316
ABG93677.1	TNPTTGGDV-MPTIRAEFHRLRAGARTRPRRDVGSVYQVFDGSGRFVLLGGQART	316
AAV97252.1	TNPQTGGHP-MLTMGASMQMLRPGHEHTKAHRHTGNVYINVAKGGQYSIVGGKRF	320
CAA12267.1	TNPADGGPV-METISAHVRLIPRGMETAPRRSTDGTIFVVEVGGKQVEIDGVS	310
BAB36453.1	VNPVTGGYP-MPSMGAFLLQPKGFASRVARTTDSTIYHVVEGSGQVIIGNET	302
AAD49427.1	INPLDGMMA-MPTISSFIQLLPKEFRQTQYRSTDATVFSVIEGQKTRIGDKV	307
BAC98955.1	VNPVDGGWA-MPTIATGLQLLPKGFSAAPYRSTDAVVFVLEGGSGKSQIGGKE	307

ADC93717.1	-----	207
AAQ62856.1	IFVIPPDEIHHDP--DGE-AILLGMDTRPVFEAFNFYAEAEPE-----	358
AAQ79814.1	IFVVPDATHHHEP--DGDESILLGMDTRPVFEAMNFYAEASPSS-----	369
AAZ93402.1	TCCAPGYSQVSLSNSSADTPAFIFIADDESPLHRKLGVFENRG-----	351
AAD12619.1	TCCAPGYTEVTLKNLSADQPSFIFMADESPLHRKLGVFENRG-----	355
BAA31235.2	VISLPNWNTNFRWNTNDSSEIEPVLLFSMHDPALAEAFGLLYEEPEAILNATPAPINPTPSLN	373
ADX73349.1	VITLPNWNTNFRWNTNDSATEPVQLFSMHDPALQAFGLLYEEPEAILNATPAPANPSPSLK	373
NP	VINVPSWQKWNIVA--GSDGVDLFCFSDTPIFEALNLARTFTPEGI-----	375
AAQ91293.1	MFVVPSWVPWSLQA--E-TQFDLFRFSDAPIMEALSFMRTKIEGQK-----	368
ADX75072	LFVVPSWAAWLSQA--E-TEFDLFRFSDAPIFERLNFNRTYIEGRK-----	373
ABH01038.1	MIVVPSWTEWSIEA--D-TEFDLFAFSDAPIVERLHFDRTFISEGS-----	359
ADT78164.1	MIVVPSWTEWSIEA--D-TEFDLFAFSDAPIVERLHFHRTYISEGA-----	359
ABG93677.1	MIVVPSWTEWSIEA--D-TEFDLFAFSDAPIVERLHFDRTYISEGA-----	359
AAV97252.1	IFCVPANTWHEHCNTQERDDACLFSFNDPFVMEKLGFWAEQALEDNGGHQIVAD-----	374
CAA12267.1	VVVIPSWKRHRFHA---EDELIIIFGFSDKACQKLGFLFRENL-----	350
BAB36453.1	IFVVPPTWHGVSFQT---TQDSVLFVSFSDRPVQEAALGLFREARY-----	342
AAD49427.1	TFVVPSWYYPVEHEA---SSDAVLFVSYSDRVAQKLGFWRESRN-----	347
BAC98955.1	VFVAPSWHWVTHMP---LEETVFFTYSDRVAQEKLGWLWREDRGNQE-----	350

ADC93717.1	-----	207
AAQ62856.1	-----	358
AAQ79814.1	-----	369
AAZ93402.1	-----	351
AAD12619.1	-----	355
BAA31235.2	PIYRPGAFYDQDE-	386
ADX73349.1	PIYRPGAFYDQDEL	387
NP	-----	375
AAQ91293.1	-----	368
ADX75072	-----	373
ABH01038.1	-----	359
ADT78164.1	-----	359
ABG93677.1	-----	359
AAV97252.1	-----	374
CAA12267.1	-----	350
BAB36453.1	-----	342
AAD49427.1	-----	347
BAC98955.1	-----	350

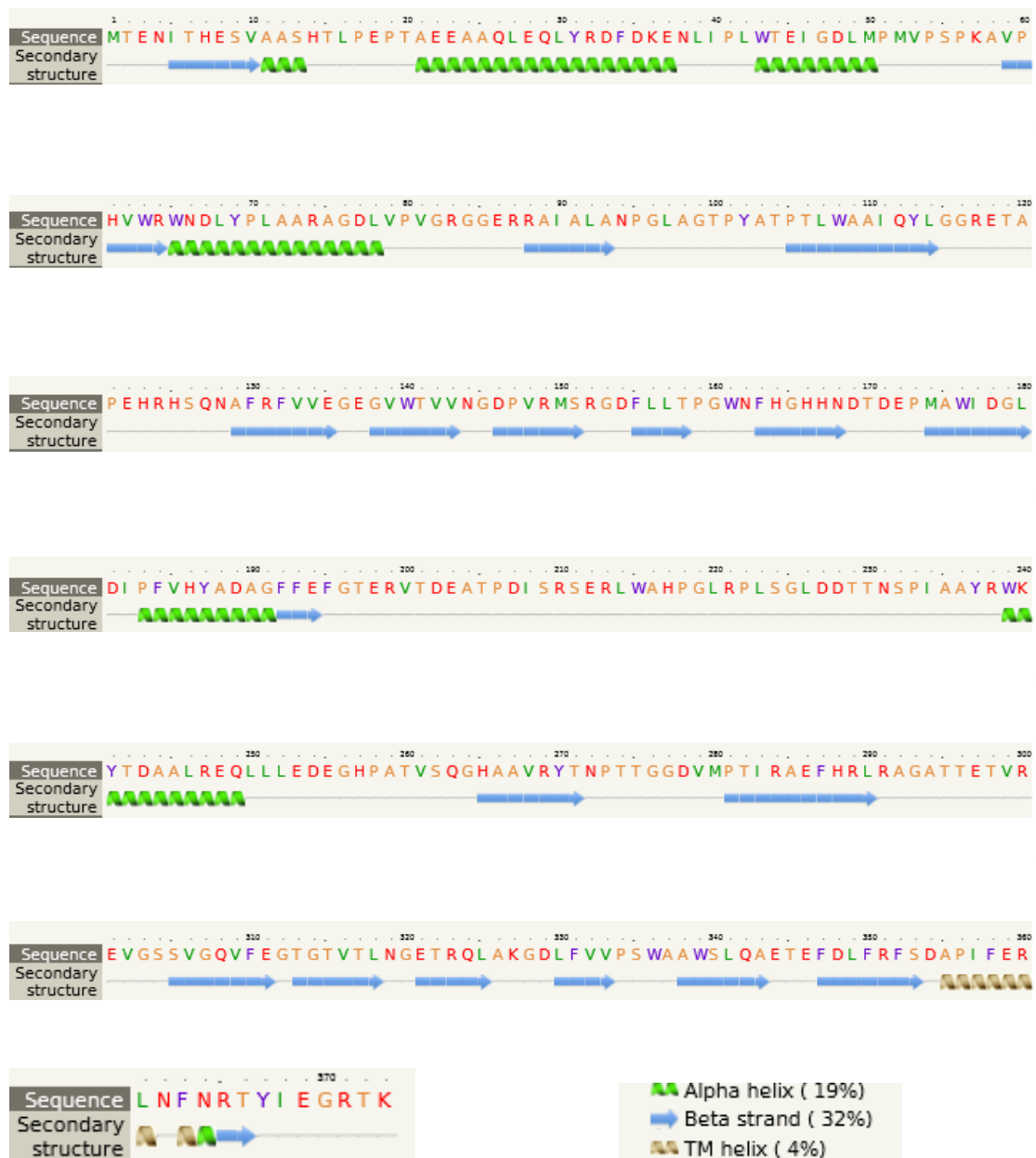
Εικόνα 5.2. Πολλαπλή στοίχιση (CLUSTALW) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 με αντίστοιχες διοξυγονάσεις. Οι αστερίσκοι αντιστοιχούν σε συντηρημένα κατάλοιπα και οι κουκκίδες σε συντηρητικές υποκαταστάσεις (αμινοξέα με παρόμοια δομή ή βιολογική δράση). Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν: ADX75072 (*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3), NP 602217.1 (*Corynebacterium glutamicum*), AAQ91293.1 (*Pseudaminobacter salicylatoxidans*), ABH01038.1 (*Rhodococcus opacus*), ADT78164.1 (*Rhodococcus* sp. NCIMB 12038), ABG93677.1 (*Rhodococcus jostii* RHA1), AAV97252.1 (*Ruegeria pomeroyi* DSS-3), CAA12267.1 (*Sphingomonas* sp. RW5), BAB36453.1 (*Escherichia coli* O157:H7), AAD49427.1 (*Pseudomonas alcaligenes*) BAC98955.1 (*Xanthobacter polyaromaticivorans*), AAZ93402.1 (*Polaromonas naphthalenivorans* CJ2), AAD12619.1 (*Ralstonia* sp. U2), BAA31235.2 (*Nocardioides* sp. KP7), AAQ62856.1 (*Haloferax* sp. D1227), AAQ79814.1 (*Haloarcula* sp. D1), ADC93717.1 (*Bradyrhizobium* sp. JS329), ADX73349.1 (*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3).

Η αμινοξική αλληλουχία της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος εισήχθη με ενδεικτικές αλληλουχίες πρωτεϊνών, ώστε να γίνει πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW. Στην Εικόνα 5.2 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της σύγκρισης αμινοξικών αλληλουχιών από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, ομόλογων με την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος. Με τη βοήθεια των δεδομένων που εμφανίζονται στην παραπάνω εικόνα, διαπιστώνουμε ότι οι απόλυτα συντηρημένες περιοχές είναι λίγες και υποδεικνύονται με το σύμβολο του αστερίσκου, ενώ με το σύμβολο της άνω και κάτω τελείας είναι αυτές με τη μικρότερη διατήρηση συντήρησης. Περαιτέρω, όμως πληροφορίες μπορούμε να αποκτήσουμε γνωρίζοντας τη δευτεροταγή δομή της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Στην § 5.4 παρατίθε-

ται η πιθανή δευτεροταγής δομή της υπό μελέτης πρωτεΐνης και δίνεται περισσότερο φως, όσον αφορά τις συντηρημένες περιοχές.

5.4 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος έγινε με τη βοήθεια του αλγορίθμου Phyre2 (Εικόνα 5.3).

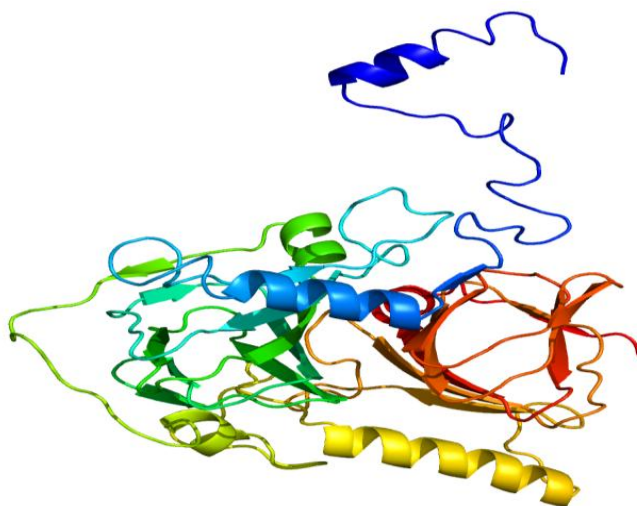


Εικόνα 5.3 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Η αμινοξική ακολουθία της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος εισήχθη στον αλγόριθμο Phyre2. Κατόπιν, έγινε αναζήτηση και εντοπισμός των αμινοξικών αλληλουχιών από άλλους οργανισμούς, των οποίων η αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία και έχει προσδιοριστεί η δευτεροταγής τους δομή. Συνεπώς, η δευτεροταγής δομή της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προβλέπεται να έχει διαμόρφωση σαν τη διοξυγονάση του *Pseudaminobacter salicylatoxidans* με ποσοστό ομολογίας 72%, της οποίας η αμινοξική αλληλουχία παρατίθεται στο Παράρτημα. Στην Εικόνα 5.3 παρουσιάζονται οι προβλεπόμενες διατάξεις στο χώρο των διαφορετικών τμημάτων της πρωτεϊνικής μας αλληλουχίας. Οι συντηρημένες περιοχές είναι πιθανότερο να έχουν κάποια συγκεκριμένη δομή (α-έλικα ή β-πτυχωτή επιφάνεια), ενώ οι περιοχές με πολλά κενά, πιθανότερο να αντιστοιχούν σε βρόχους κι έτσι διαπιστώνουμε, που βρίσκονται οι περιοχές αυτές στην υπό μελέτη πρωτεΐνη μας.

5.5 Πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος έγινε με τη βοήθεια του αλγορίθμου Phyre2 (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4 Πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Οι πραγματικές διαστάσεις του μοντέλου είναι (Å):**X**:56.264 **Y**:73.418 **Z**:67.166.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.4, η προβλεπόμενη τριτοταγής δομή της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος έχει παρόμοιες διαστάσεις με το αντίστοιχο μοντέλο

της ομόλογης διοξυγονάσης του *P. salicylatoxidans*, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στην § 5.4.

5.6 Φυλογενετική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του υποθετικού γονιδίου

Με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA 4.1 κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δέντρο για την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (Εικόνα 5.5).

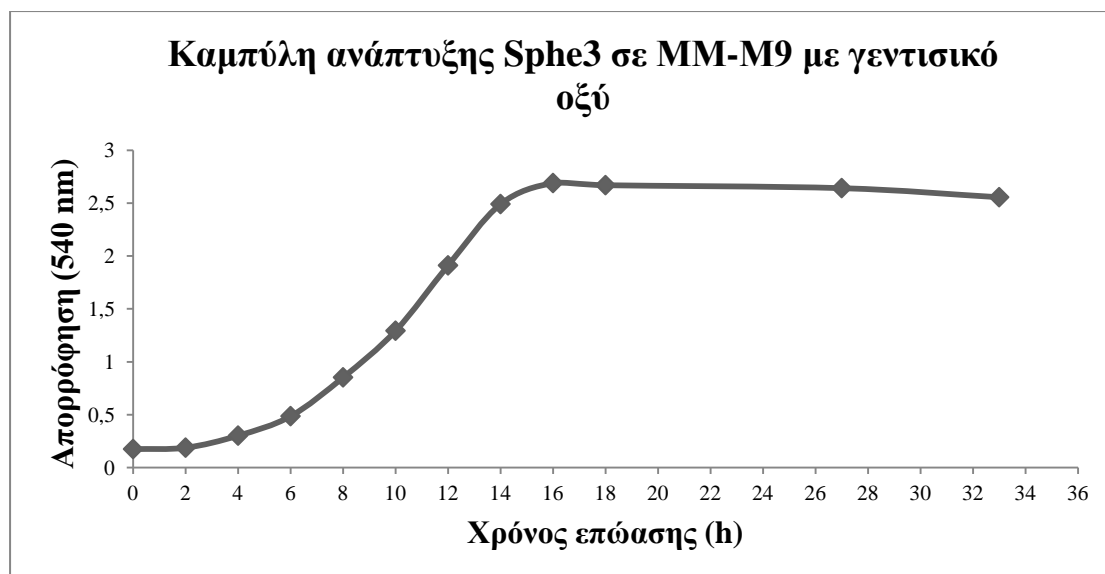


Εικόνα 5.5. Φυλογενετικό δέντρο για την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος. GDO: gentisate dioxygenase (1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος), SDO: salicylate dioxygenase (διοξυγονάση του σαλικυλικού οξέος), HNDO: 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase (διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος), 5NSADO: 5-nitrosalicylate dioxygenase (διοξυγονάση του 5-νιτροσαλικυλικού οξέος).

Το φυλογενετικό δέντρο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικές αλληλουχίες από διαφορετικούς οργανισμούς, που παρουσιάζουν ομολογία στο BLASTP με το Sphe3. Όπως παρατηρείται από το δέντρο, το υποθετικό γονίδιο παρουσιάζει μικρό ποσοστό ομολογίας της αμινοξικής αλληλουχίας με την αντίστοιχη της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος στο ίδιο βακτήριο *P. phenanthrenivorans*. Αντίθετα, μεγαλύτερη ομολογία και άρα περισσότερες απόλυτα συντηρημένες περιοχές και παρόμοια δευτεροταγής δομή έχει με την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος στο *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

5.7 Εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Όπως περιγράφηκε στις § 4.18 και 4.23.1 έγινε συλλογή του κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα Sphe3 και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (βλέπε § 4.19.1). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές για την ανίχνευση και τον υπολογισμό της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Με τη βοήθεια της καμπύλης ανάπτυξης του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphe3 σε θρεπτικό μέσο MM-M9 με πηγή άνθρακα το γεντισικό οξύ (Εικόνα 5.6) συλλέχθηκαν τα κύτταρα του Sphe3 στις 13h (εκθετική φάση) (βλέπε § 4.7) και ακολούθησε συλλογή του κυτταρικού εκχυλίσματος αυτών. Αφού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα του Sphe3, εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές για τον εντοπισμό δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.



Εικόνα 5.6. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου *P. phenanthrenivorans* Sphε3 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορισμένης χημικής σύστασης M9 (MM-M9) με πηγή άνθρακα το γεντισικό οξύ.

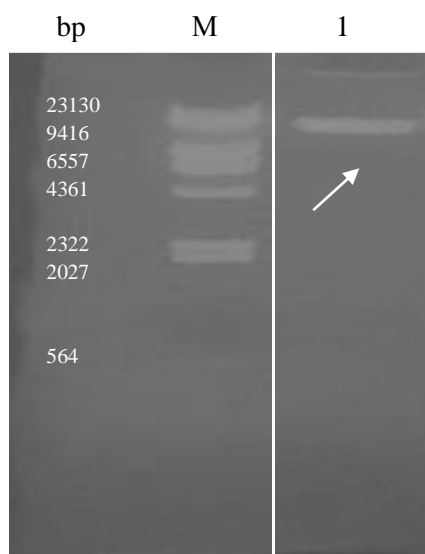
Ύστερα από τις ενζυμικές δοκιμές, που πραγματοποιήθηκαν στο κυτταρικό εκχύλισμα του Sphε3, εντοπίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, η οποία ισούται $2.735 \cdot 10^{-5}$ U/mg. Συνεπώς, αφού τα κύτταρα Sphε3 εμφανίζουν δραστηριότητα στην 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, προχωρήσαμε σε ενίσχυση του υποθετικού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

5.8 Ενίσχυση του πιθανού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Προκειμένου να αποδειχθεί πειραματικά ότι το γονίδιο κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα Sphε3 (βλέπε § 4.8) και ενίσχυση του γονιδίου με την τεχνική PCR (βλέπε § 4.15).

5.8.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο στην αντίδραση PCR, έγινε από βακτηριακές καλλιέργειες Sphε3 σε LB (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 0.8% αραρόζης του απομονωμένου γονιδιωματικού DNA του Sphε3. M: μάρτυρας λDNA (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: γονιδιωματικό DNA από καλλιέργειες Sphε3 σε LB.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται το δείγμα γονιδιωματικού DNA, το οποίο επιλέχτηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR.

5.8.2 Ενίσχυση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η ενίσχυση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος έγινε με την αντίδραση της PCR με εκμαγείο το γονιδιωματικό DNA (δείγμα 3, βλέπε Εικόνα 5.7). Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σχεδιασμός των πριμοδοτικών μορίων. Κατά τη σχεδίαση των πριμοδοτικών μορίων είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν θέσεις περιορισμού ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (για την NdeI: CA|TATG και BamHI: G/GATCC αντίστοιχα) καθώς και να απαληφθεί το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου ώστε να γίνει η ένθεση στον επιλεγμένο πλασμιδιακό φορέα, pET29c, ανοδικά των κωδικονίων που κωδικοποιούν για το εξαμερές ιστιδίνης που θα βοηθήσει στον καθαρισμό του ενζύμου. Στα πλαίσια του ανωτέρου σκεπτικού σχεδιάστηκαν τα πριμοδοτικά μόρια:

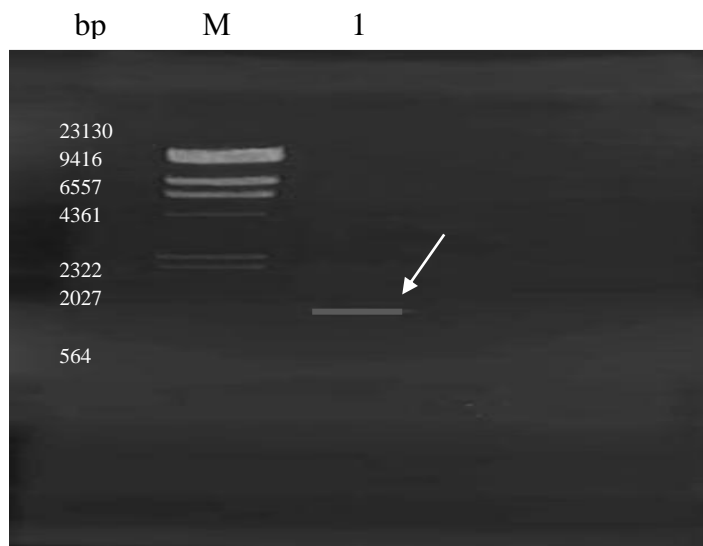
- **gentpETfor:** 5'AGAGGATTCATATGACTGAGAACATC 3'

Tm= 60.1°C nt=26, (169μg)

- **gentpETrev:** 5'AGGAGTTTGGATCCTTGGTG 3'

Tm= 57.3°C nt=20, (115μg)

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR είναι μία ζώνη 1112 bp, που αντιπροσωπεύει το γονίδιο της παρούσας έρευνας, όπως φαίνεται και επιβεβαιώνεται από την Εικόνα 5.8.

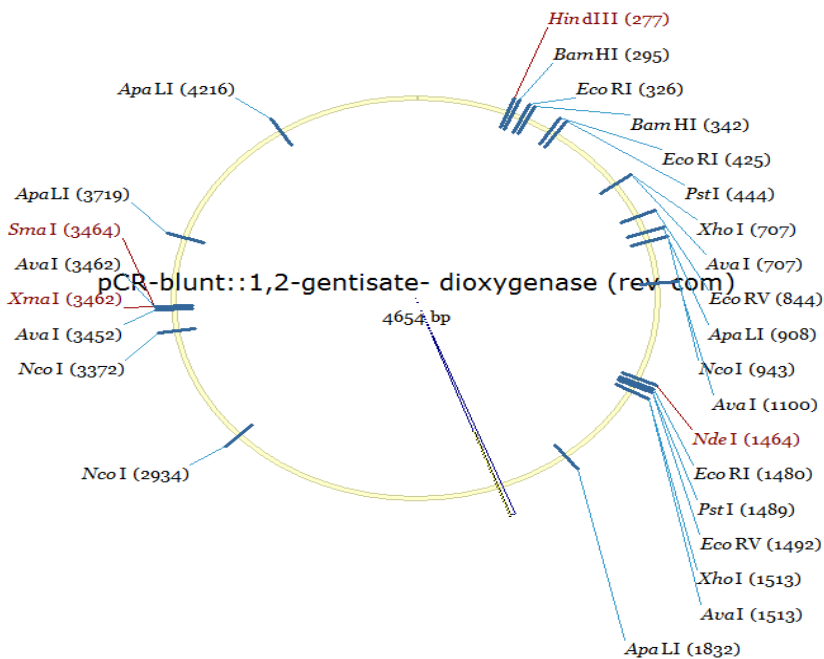


Εικόνα 5.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 0.8% αραρόζης του προϊόντος PCR. M: μάρτυρας λDNA (μεγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: προϊόν PCR.

5.8.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt

Για τον έλεγχο της ορθότητας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος PCR πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt. Η κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt επιτυγχάνεται, αφού κοπεί και καθαριστεί το προϊόν της αντίδρασης PCR (βλέπε § 4.16.1). Η συγκέντρωση του DNA ήταν 20.1 ng/μl (βλέπε § 4.11). Τα επιδεικτικά βακτήρια *E. coli* DH5a μετασηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR-blunt::*gentdiox* και καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο (LA) παρουσία του αντιβιοτικού Km ώστε να καταστεί δυνατή η επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων, καθώς ο pCR-Blunt προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (βλέπε § 4.17.1). Ακολούθησε επιβεβαίωση της κλωνοποίησης και της αλληλουχίας του γονιδίου.

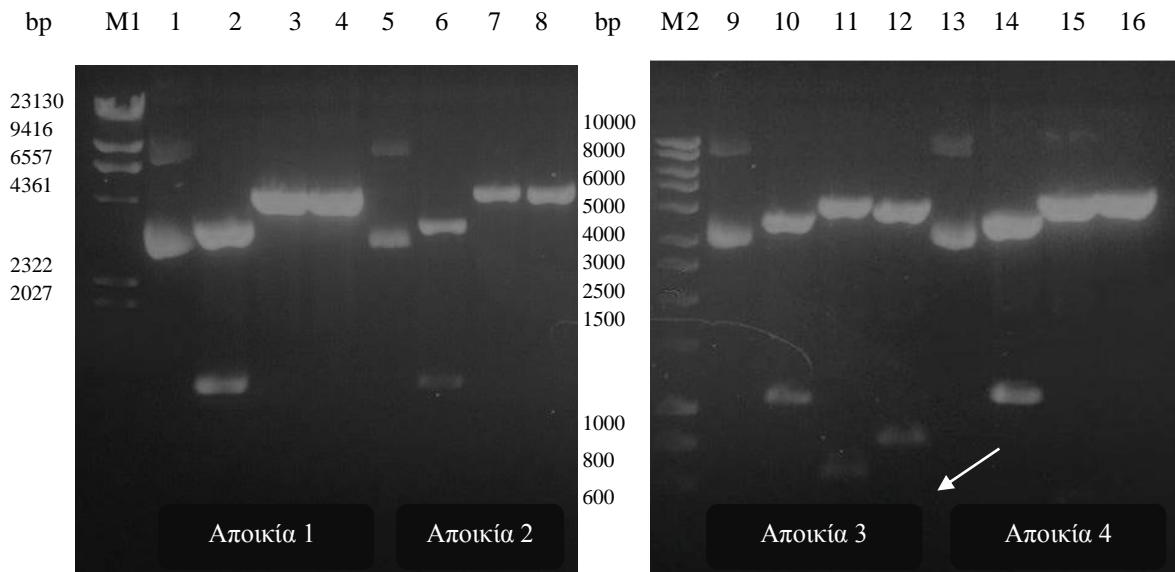
Το πρόγραμμα VectorNTI χρησιμοποιήθηκε ώστε να κατασκευαστεί χάρτης για τις θέσεις περιορισμού των ενζύμων HindIII, SmaI, BamHI, EcoRV, EcoRI, NdeI, XhoI, PstI, AvaI, ApaLI, NcoI, XmaI που φέρει ο πλασμιδιακός φορέας pCR-Blunt με το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (Εικόνα 5.9).



Εικόνα 5.9. Χάρτης των θέσεων περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pCR-Blunt με το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

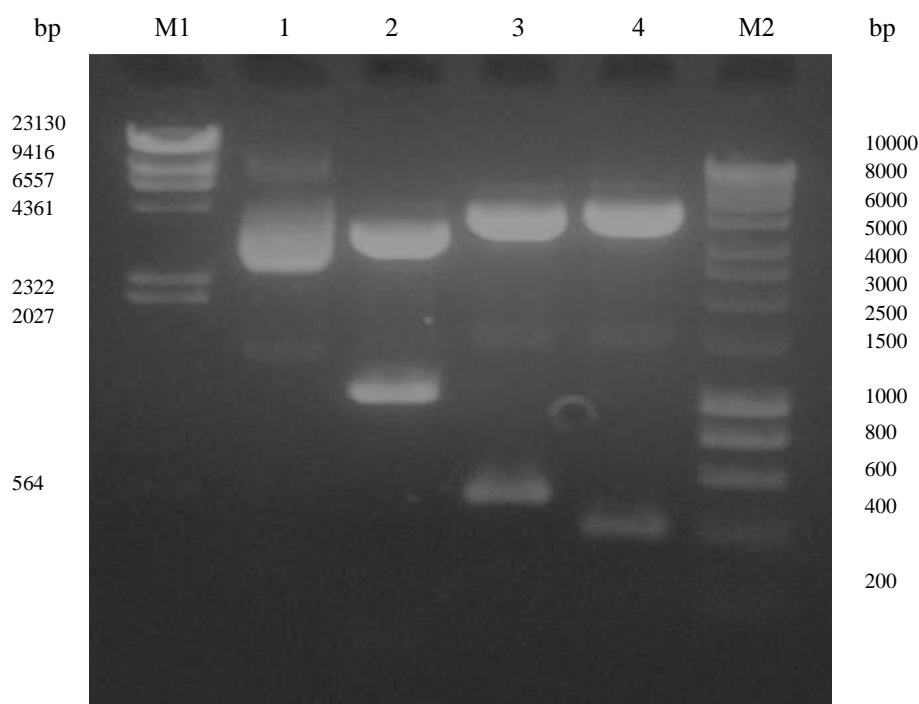
Από τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων DH5a σε στερεό θρεπτικό μέσο LA με αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη, επιλέχθηκαν 4 αποικίες προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο μετασχηματισμός και η αλληλουχία του γονιδίου μας. Από τις επιλέξιμες αποικίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (βλέπε § 4.9) και κατόπιν πραγματοποιήθηκαν μονές πέψεις από τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI, EcoRV και XhoI (βλέπε § 4.13). Η εικόνα στη ηχητή αγαρόζη, που θα έχει τα αποτελέσματα των πέψεων θα είναι διαφορετική, ανάλογα με τον προσανατολισμό του γονιδίου (ορθά ή αντίστροφα) (Εικόνα 5.10). Με τη βοήθεια του χάρτη που εμφανίζεται στην Εικόνα 5.9 αναμένονται τα ακόλουθα:

- EcoRI:
 - Ορθά: 3500, 1055, 99 bp
 - Αντίστροφα: 3500, 1055, 99bp
- EcoRV:
 - Ορθά: 4128, 526 bp
 - Αντίστροφα: 4006, 648 bp
- XhoI:
 - Ορθά: 4240, 414 bp
 - Αντίστροφα: 3848, 806 bp



Εικόνα 5.10 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 0.8% αγαρόζης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCR-Blunt::*gentdiox* ύστερα από πέψη με τα ένζυμα EcoRI, EcoRV, XhoI στις 4 επιλεγμένες αποικίες. M1: μάρτυρας λDNA (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: προϊόν PCR (άκοπο), 2: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRI, 3: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRV, 4: προϊόν PCR μετά από πέψη με XhoI, 5: προϊόν PCR (άκοπο), 6: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRI, 7: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRV, 8: προϊόν PCR μετά από πέψη με XhoI, M2: μάρτυρας HyperLadder I (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200), 9: προϊόν PCR (άκοπο), 10: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRI, 11: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRV, 12: προϊόν PCR μετά από πέψη με XhoI, 13: προϊόν PCR (άκοπο), 14: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRI, 15: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRV, 16: προϊόν PCR μετά από πέψη με XhoI.

Από την παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι στις 4 επιλεγμένες αποικίες, μόνο σε μία έχουμε επιτυχημένη κλωνοποίηση του γονιδίου μας στον πλασμιδιακού φορέα pCR-Blunt και αυτή είναι η αποικία 3. Στις αποικίες 1, 2 και 4 δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα, καθώς το μόνο ένζυμο, το οποίο φαίνεται πως λειτουργεί, είναι η EcoRI, η οποία κόβει και στις τρεις περιπτώσεις στις θέσεις 3500 και 1055. Εμείς, επιλέξαμε την αποικία 3, στη οποία έχουν κόψει και τα τρία περιοριστικά ένζυμα αντίστροφα, δηλαδή: EcoRI: 3500, 1055, EcoRV: 4006, 648, XhoI: 3848, 806. Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε περαιτέρω επιβεβαίωση της ένθεσης, με την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA της αποικίας 3 με kit (βλέπε § 4.10) και την επακόλουθη πραγματοποίηση μονών πέψεων με τα τρία προαναφερθέντα ένζυμα (βλέπε § 4.13).

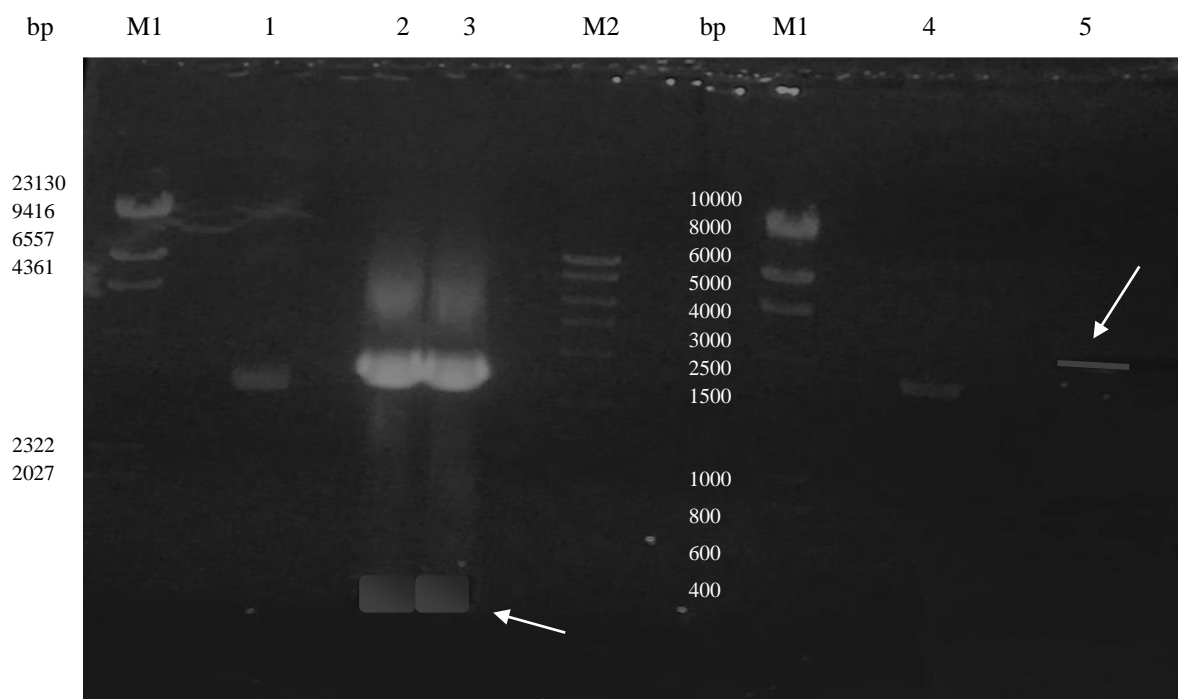


Εικόνα 5.11 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 0.8% αραρόζης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCR-Blunt::*gentdiox* ύστερα από πέψη με τα ένζυμα EcoRI, EcoRV, XhoI. M1: μάρτυρας λDNA (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: προϊόν PCR (άκοπο), 2: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRI (3500, 1055), 3: προϊόν PCR μετά από πέψη με EcoRV (4128, 526), 4: προϊόν PCR μετά από πέψη με XhoI (4240, 414), M2: μάρτυρας HyperLadder I (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200).

Η εικόνα 5.11 δείχνει ότι το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος έχει εισαχθεί ορθά στον πλασμιδιακό φορέα pCR-Blunt. Οπότε συνεχίζουμε με την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος, η οποία είναι 286.4 ng/μl (βλέπε § 4.11). Έπειτα, προσδιορίζεται η αλληλουχία του γονιδίου. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης εισάγεται η αλληλουχία, στο πρόγραμμα του αλγορίθμου BLAST και παρατηρούμε ότι ταυτίζεται με αυτή του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, όπως παρουσιάζεται στη βάση δεδομένων στο Joint Genome Institute. Ακολούθως, εισάγουμε την προαναφερθείσα αλληλουχία, καθώς επίσης και αυτή του υπό διερεύνηση γονιδίου στον αλγόριθμο CLUSTAL, απ' όπου παρουσιάζεται πολλαπλή στοίχιση. Συνεπώς, μπορούμε να συνεχίσουμε στο επόμενο βήμα της εργασίας μας, που είναι η κλωνοποίηση της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον πλασμιδιακό φορέα pET29c και η ετερόλογη έκφρασή του στα κύτταρα *E. coli* BL21.

5.9 Κλωνοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον πλασμιδιακό φορέα pET29c

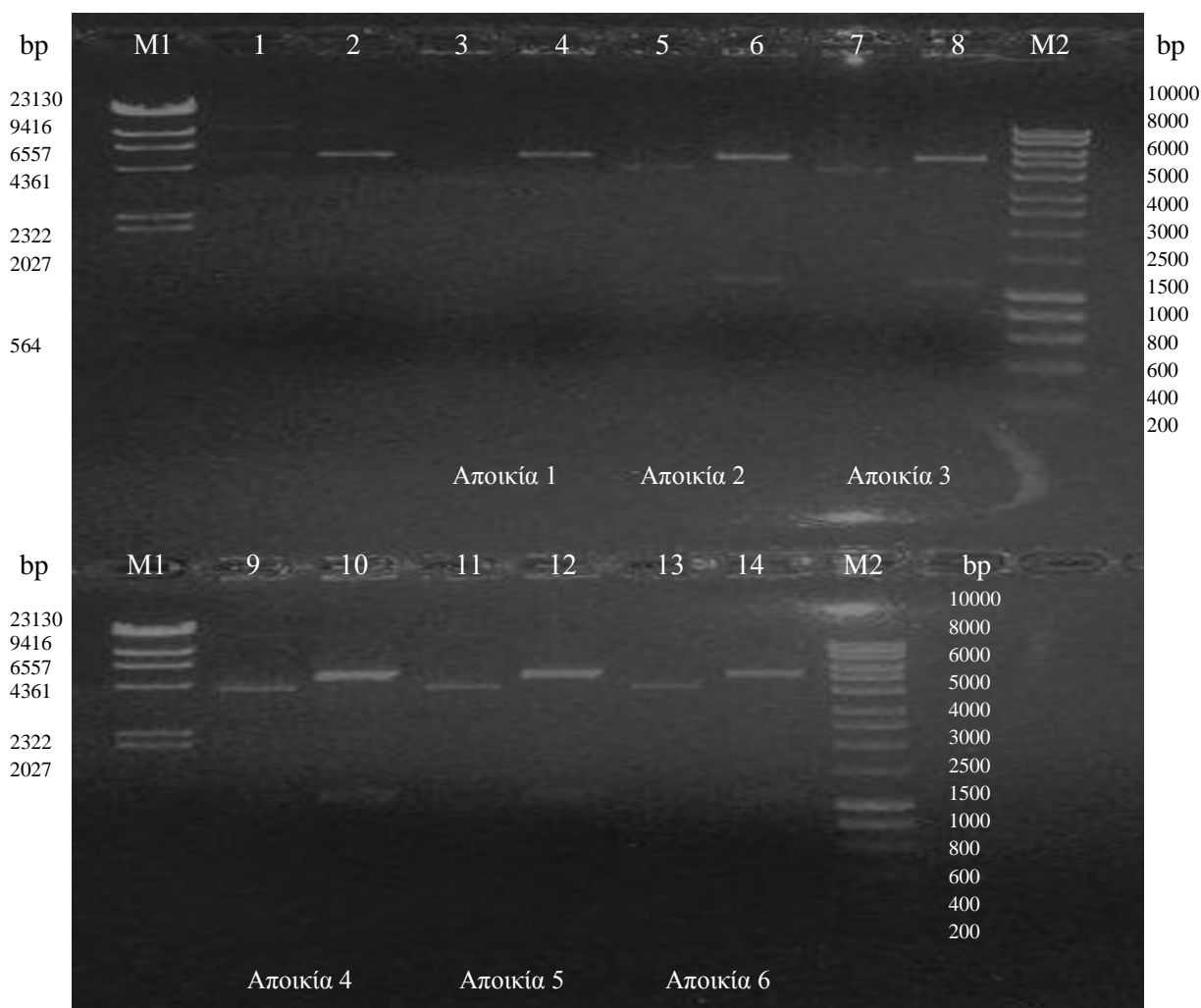
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το επόμενο στάδιο είναι η κλωνοποίηση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στον επιλεγμένο πλασμιδιακό φορέα pET29c. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες DH5a, που περιέχουν το φορέα pET29c, καθώς επίσης και από βακτηριακές καλλιέργειες DH5a, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR-Blunt::*gentdiox*. Ακολούθησε καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA και πραγματοποίηση διπλής πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI (Εικόνα 5.12).



Εικόνα 5.12 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 0.8% αγαρόζης των προϊόντων των πέψεων του πλασμιδίου pET29c και του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCR-Blunt::*gentdiox* με τα ένζυμα BamHI και NdeI. M1: μάρτυρας λDNA (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: άκοπος pCR-Blunt::*gentdiox*, 2-3: pCR-Blunt (πάνω ζώνη) 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, M2: μάρτυρας HyperLadder I (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200), 4: άκοπος pET29c, 5: pET29c μετά από πέψη με BamHI – NdeI.

Όπως ήταν αναμενόμενο ο φορέας pET29c μετά τη διπλή πέψη είναι ευθύγραμμος και ο φορέας pCR-Blunt με την ένθεση εμφανίζει δύο ζώνες, στις θέσεις 3500 και 1112, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, οι ζώνες που αντιπροσωπεύουν τον pET29c και το *gentdiox* καθαρίστηκαν και πραγματοποιήθηκε ανασυνδυασμός, από τον οποίο το α-

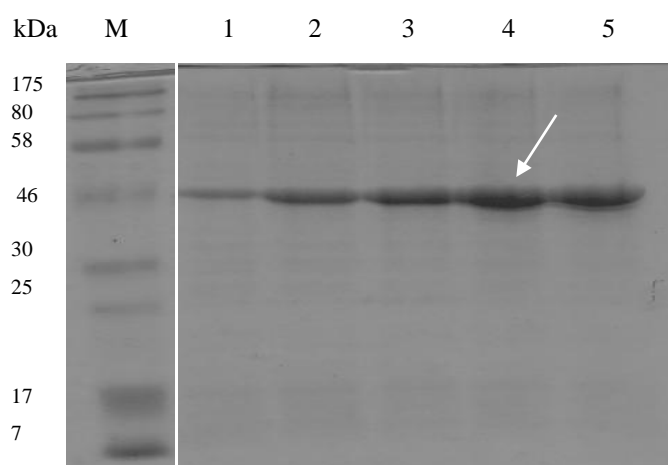
να συνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21 (βλέπε § 4.17.2). Κατόπιν, τα μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (LA) με αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη, όπου αναπτύχθηκαν 6 αποικίες. Οι αποικίες αυτές ελέγχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου στον φορέα pET29c με πέψεις (Εικόνα 5.13).



Εικόνα 5.13 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 0.8% αραρόζης των προϊόντων των πέψεων του pET29c και του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET29c::gntdiox με τα ένζυμα BamHI και NdeI. M1: μάρτυρας λDNA (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564), 1: άκοπος pET29c, 2: pET29c μετά από πέψη με BamHI – NdeI, 3: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 1), 4: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, 5: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 2), 6: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, 7: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 3), 8: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, M2: μάρτυρας HyperLadder I (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200), 9: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 4), 10: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, 11: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 5), 12: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI, 13: άκοπος pET29c::gntdiox (αποικία 6), 14: pET29c (πάνω ζώνη) gntdiox (κάτω ζώνη) μετά από πέψη με BamHI – NdeI.

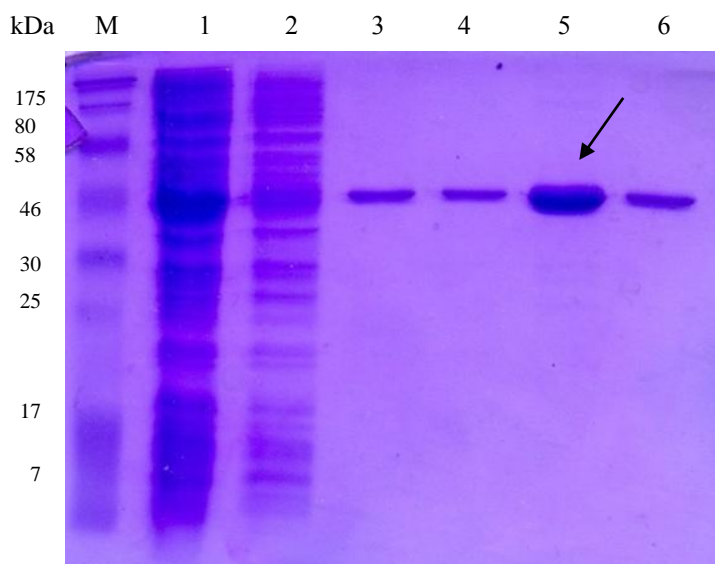
5.10 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου

Τα μετασηματισμένα κύτταρα BL21, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET29c::*gentdiox* καλλιεργήθηκαν σε 100 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης με επιλογή αντιβιοτικού την καναμυκίνη. Η πειραματική πορεία της υπερέκφρασης περιγράφηκε στην § 4.21 για το χρονικό διάστημα 0-4 ώρες. Κατόπιν, τα υπερέκφρασμένα κύτταρα υπέστησαν λύση και το κυτταρικό εκχύλισμα φορτώθηκε σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (βλέπε § 4.20), προκειμένου να διαπιστωθεί η υπερέκφραση και σε ποιο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται.



Εικόνα 5.14. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μετά από υπερέκφραση των κυττάρων BL21 με 0.1 mM IPTG. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας Broad Range Prestained (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε kDa: 175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7), 1: επώαση για 0h, 2: επώαση για 1h, 3: επώαση για 2h, 4: επώαση για 3h, 5: επώαση για 4h.

Η εικόνα 5.14 παρουσιάζει μία επιτυχημένη υπερέκφραση των κυττάρων BL21, καθώς μετά από επώαση αυτών με 0.1 mM IPTG από 0h μέχρι 4h, η ζώνη γίνεται όλο και πιο έντονη. Η εντονότερη έκφραση της πρωτεΐνης παρουσιάζεται στις 3h. Το μοριακό βάρος της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, όπως έχει βρεθεί από την *in silico* μελέτη είναι 41.45 kDa, το οποίο είναι πολύ κοντά σε αυτό, που φαίνεται στο SDS-PAGE (~45kDa, Εικόνα 5.14). Στη συνέχεια, τα μετασηματισμένα κύτταρα BL21 υπέστησαν υπερέκφραση μέχρι την επώαση των 3 ωρών, ακολούθως έγινε λύση τους και καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη αγκιστείας Ni²⁺-NTA. Τα κλάσματα της στήλης αγκιστείας Ni²⁺-NTA συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικόνα 5.15).



Εικόνα 5.15 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών ύστερα από στήλη Ni^{2+} -NTA. M: πρωτεϊνικός μάρτυρας Broad Range Prestained (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε kDa: 175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7), 1: κυτταρικό εκχύλισμα πριν περάσει από τη στήλη, 2: κυτταρικό εκχύλισμα αφού περάσει από τη στήλη, 3: κυτταρικό εκχύλισμα αφού περάσει από τη στήλη – έκλουση διαλύματος Β, 4: κυτταρικό εκχύλισμα αφού περάσει από τη στήλη – έκλουση διαλύματος Β, 5: κλάσμα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, 6: κλάσμα αφού περάσει από τη στήλη – έκλουση διαλύματος Γ (βλέπε § 4.22).

Διαπιστώνουμε ότι το δείγμα 5 περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης, καθώς εμφανίζεται μία μοναδική έντονη ζώνη.

5.11 Χαρακτηρισμός της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

5.11.1 Επίδραση $FeSO_4$ (Fe^{2+})/ L-ascorbate στη δραστηκότητα του ενζύμου

Η δραστηκότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε, αφού επώαστηκε το καθαρό ένζυμο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου και ασκορβικού οξέος και για διαφορετικούς χρόνους επώασης (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1. Μεταβολή δραστηκότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (U/mg) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου και ασκορβικού οξέος και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Χρόνος επώασης (min)	Συγκέντρωση Fe^{2+} / L-ascorbate (mM)					
	0	0.1	0.2	0.4	0.6	1
0	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$9.34 \cdot 10^{-6}$	$10.14 \cdot 10^{-6}$	$7.06 \cdot 10^{-6}$	$10.92 \cdot 10^{-6}$	$11.66 \cdot 10^{-6}$
10		$14.63 \cdot 10^{-6}$	$20.10 \cdot 10^{-6}$		$16.91 \cdot 10^{-6}$	$15.10 \cdot 10^{-6}$
20	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$21.42 \cdot 10^{-6}$	$21.12 \cdot 10^{-6}$	$19.79 \cdot 10^{-6}$	$19.20 \cdot 10^{-6}$	$20.81 \cdot 10^{-6}$
30	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$22.51 \cdot 10^{-6}$	$25.74 \cdot 10^{-6}$	$20.35 \cdot 10^{-6}$	$24.55 \cdot 10^{-6}$	$25.25 \cdot 10^{-6}$

Παρατηρούμε ότι το καθαρό ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα όταν επώαζεται σε συγκέντρωση 0.2 mM σιδήρου και ασκορβικού οξέος μετά από επώαση 30 min, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1.

5.11.2 Βέλτιστο pH

Το βέλτιστο pH για το καθαρό ένζυμο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος προσδιορίστηκε μετά από επώασή του σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και σε διαφορετικά pH (Πίνακας 5.2 και Γράφημα 5.1α, 5.1β).

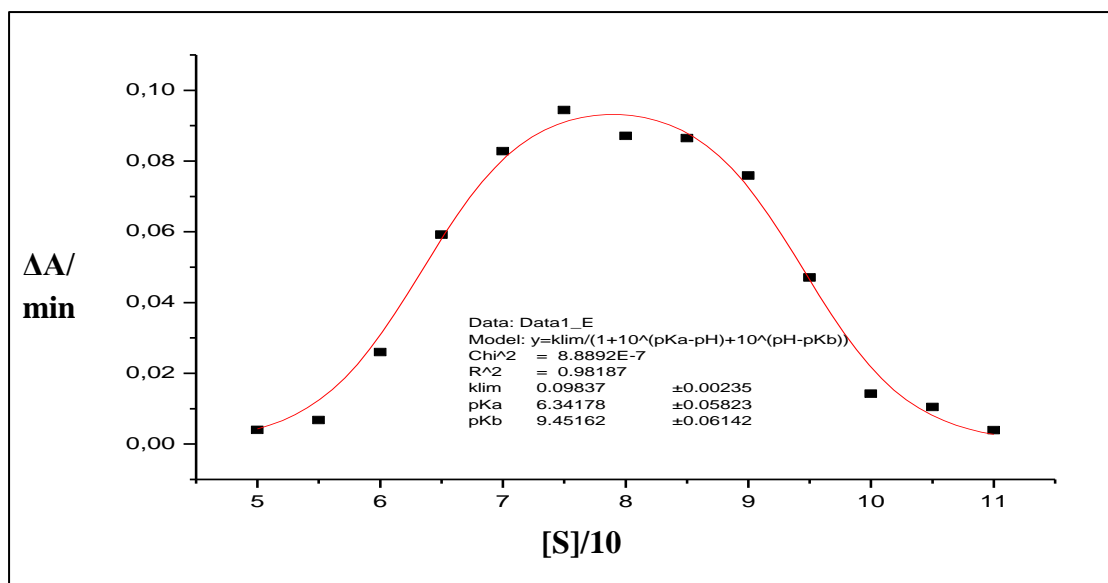
Πίνακας 5.2. Ενζυμική δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος (U/ml) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και διαφορετικά pH.

pH	10Km*	Km**	Km/10***
5	0,532	0,694	0,015
5,5	1,551	8,148	0,185
6	12,014	9,537	3,148
6,5	14,931	10,799	3,148
7	19,167	14,606	6,389
7,5	23,287	17,361	7,477
8	21,019	8,843	7,670
8,5	19,838	6,319	5,602
9	17,569	3,588	2,932
9,5	10,903	1,956	1,528
10	6,574	0,694	0,934
10,5	4,838	8,148	0,015

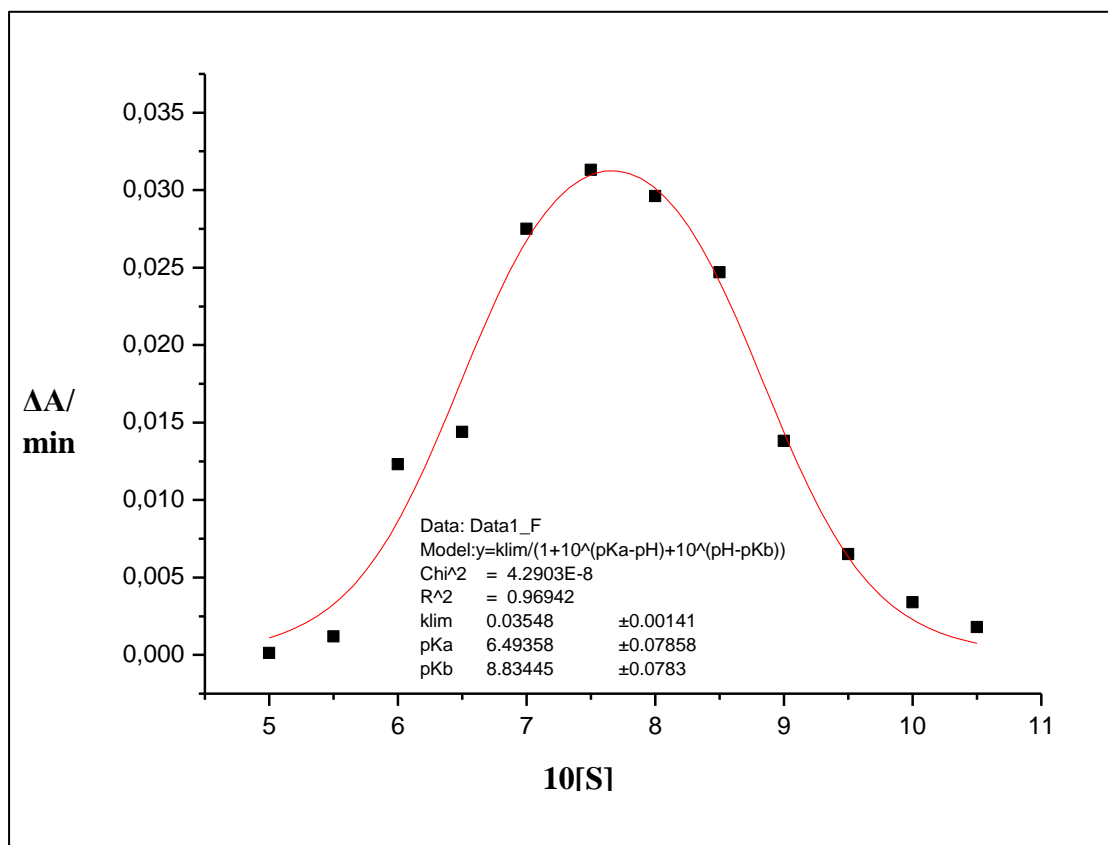
*10Km = 0.3 mM

** Km = 0.03 mM

*** Km/10 = 0.003 mM



Γράφημα 5.1α Μεταβολή δραστηκότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ($[S]/10 = K_m/10 = 0.003$ mM).



Γράφημα 5.1β Μεταβολή δραστηκότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ($10[S] = 10K_m = 0.3$ mM).

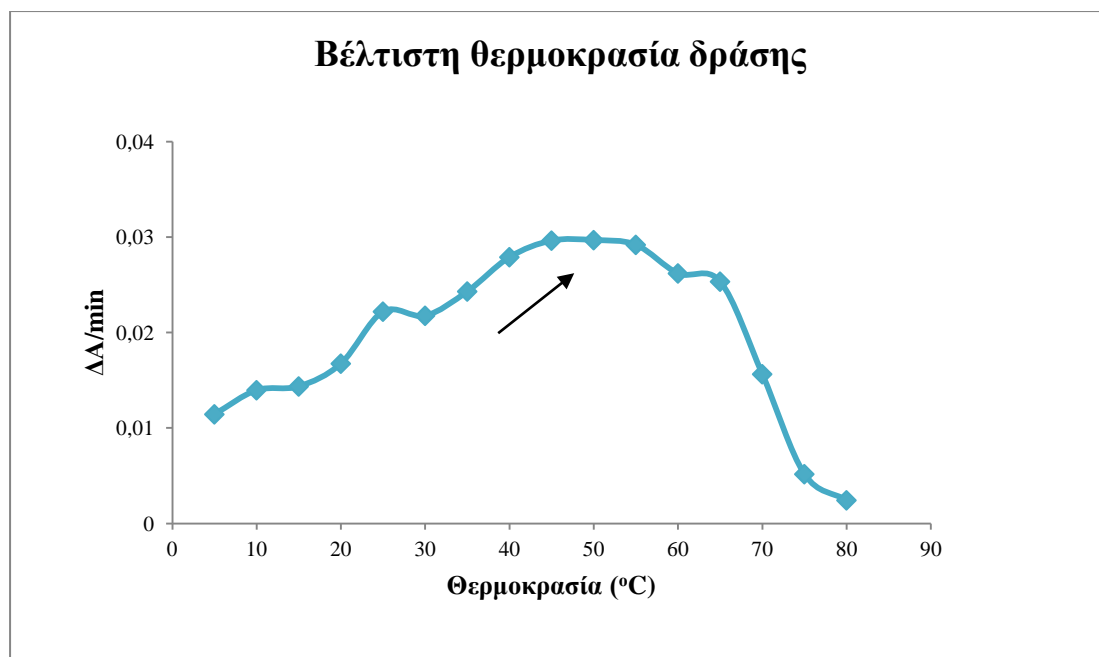
Με τη βοήθεια του Πίνακα 5.2, συμπεραίνουμε ότι η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος έχει ενεργότητα σε ένα εύρος pH από 7 έως 8.5. Η υψηλότερη δραστικότητα εμφανίζεται σε pH 7.5 και έχει την τιμή 17,361 U/ml. Σύμφωνα με το Γράφημα 5.1α, το ένζυμο δουλεύει σε pH 7.5-8 σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπως επίσης το ίδιο παρατηρείται και σε υψηλές συγκεντρώσεις (Γράφημα 5.1β).

5.11.3 Βέλτιστη θερμοκρασία

Στο καθαρό ένζυμο έγιναν διάφορες δοκιμές, όπως αναφερθήκαμε προηγουμένως στην § 4.23.4, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του.

Πίνακας 5.3. Ενζυμική δραστικότητα (U/ml) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία (°C)	Ενζυμική δραστικότητα (U/ml)
5	2,650
10	3,225
15	3,325
20	3,875
25	5,125
30	5,025
35	5,625
40	6,450
45	6,850
50	6,875
55	6,750
60	6,050
65	5,850
70	3,625
75	1,200
80	0,550



Γράφημα 5.2. Μεταβολή δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

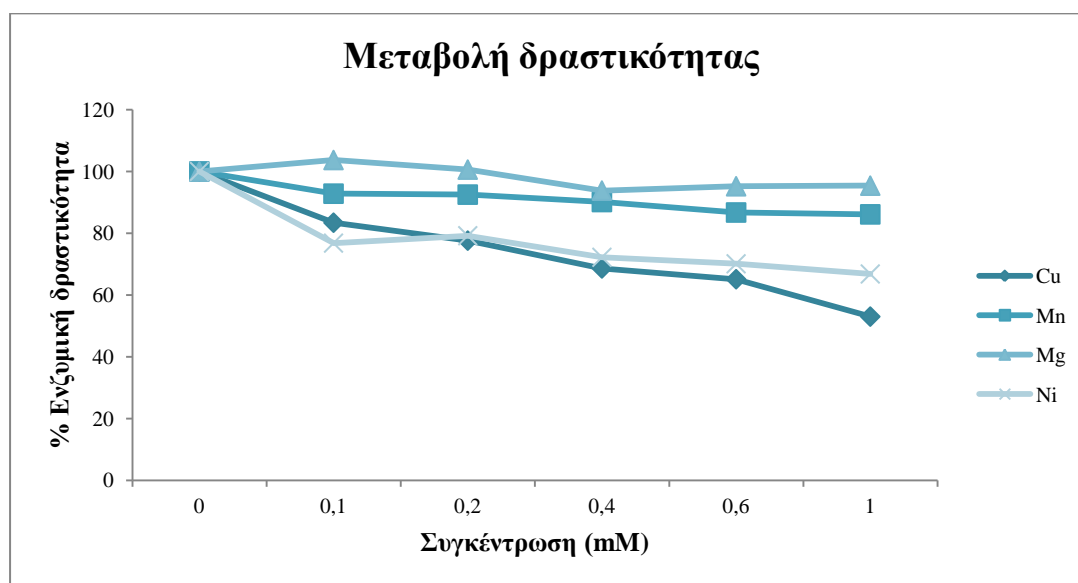
Με τη βοήθεια του Πίνακα 5.3 και του Γραφήματος 5.2, διαπιστώνουμε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος είναι 50°C, η οποία προσδιορίστηκε αφού επώαστηκε το καθαρό ένζυμο σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

5.11.4 Επίδραση ιόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου

Το ενζυμικό παρασκεύασμα επώαστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταλλικών ιόντων για 30 min, όπως περιγράφηκε στην § 4.23.5. Στον Πίνακα 5.4 παρατηρούμε ότι η δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος επηρεάζεται περισσότερο παρουσία χαλκού και λιγότερο παρουσία μαγγανίου και μαγνησίου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται 47% αναστολή του ενζύμου παρουσία χαλκού, αλλά 13.9% και 4.6% παρουσία μαγγανίου και μαγνησίου, αντίστοιχα.

Πίνακας 5.4. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού, μαγνησίου, μαγγανίου και νικελίου.

Συγκέντρωση (mM)	% Δραστηριότητα			
	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Ni ²⁺
0	100	100	100	100
0.1	83.4	92.8	103.7	76.8
0,2	77.6	92.5	100.6	79.2
0,4	68.6	90.1	93.8	72.2
0,6	65.1	86.7	95.2	70.1
1	53	86.1	95.4	66.8



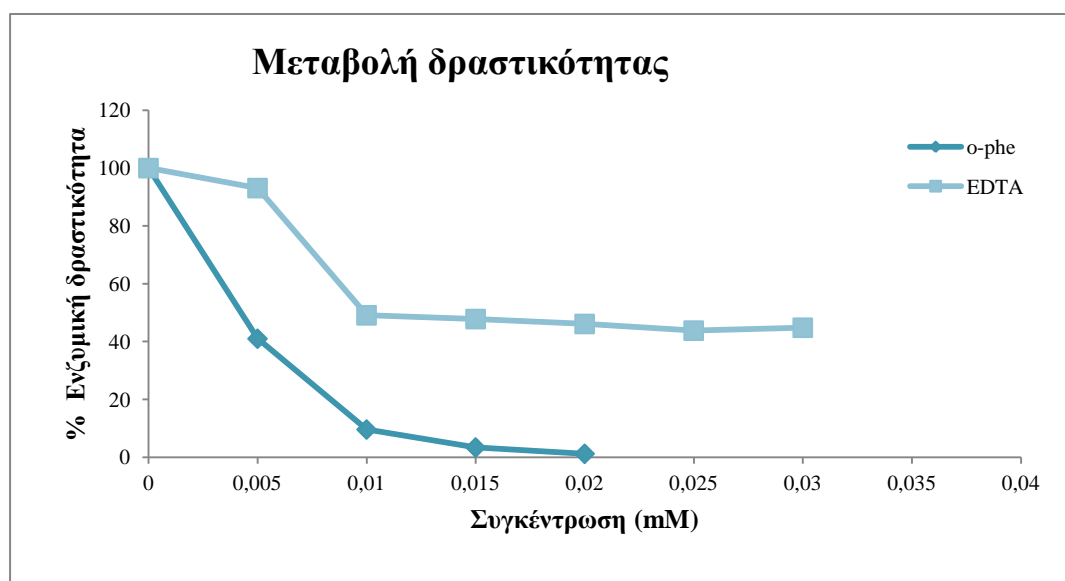
Γράφημα 5.3. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού, μαγνησίου, μαγγανίου και νικελίου.

5.11.5 Τιτλοδότηση του ενζυμικού παρασκευάσματος

Για τον υπολογισμό της k_{cat} χρησιμοποιήθηκαν οι χηλικοί παράντες ο-φαινανθρολίνη και EDTA σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0-0.03 mM, επωάζοντας το καθαρό ένζυμο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος για το χρονικό διάστημα των 120 και 180 λεπτών, αντιστοίχως (Πίνακας 5.5, Γράφημα 5.4).

Πίνακας 5.5. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από ο-φαινανθρολίνη και EDTA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση (mM)	% Δραστηριότητα	
	o-phe	EDTA
0	100	100
0.005	59	5.1
0.01	90.4	50.9
0.015	96.6	52.2
0.02	98.8	53.9
0.025	-	56.2
0.03	-	55.2



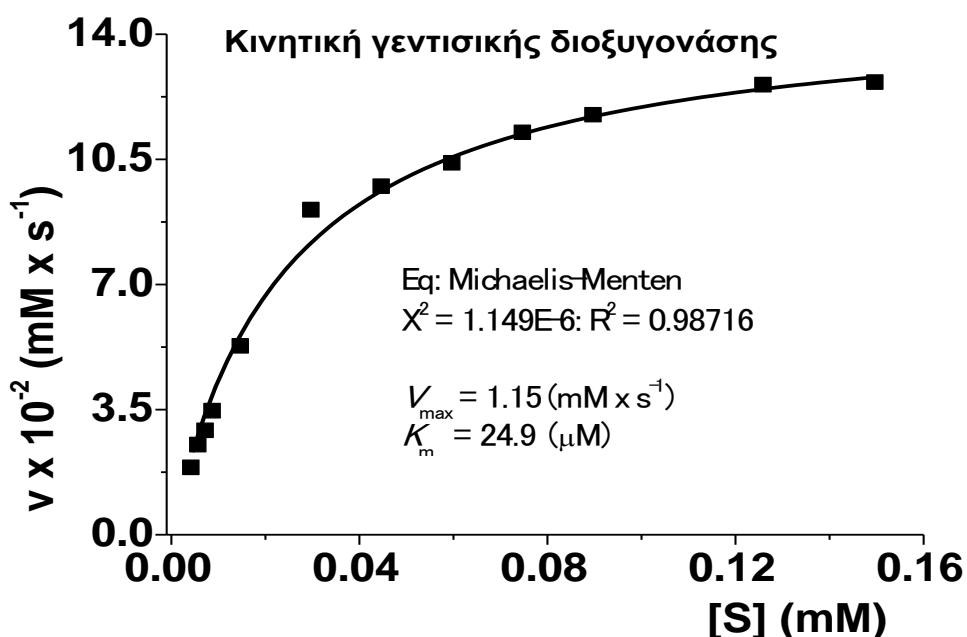
Γράφημα 5.4. Μεταβολή δραστηριότητας (%) της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από ο-φαινανθρολίνη και EDTA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Με τη βοήθεια του Πίνακα 5.5 και του Γραφήματος 5.4 παρατηρούμε ότι παρουσία 0.02 mM ο-φαινανθρολίνης, η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος χάνει το 98.8% της δραστηριότητας του μετά από 2 ώρες επώασης, ενώ σε συγκέντρωση 0.03 mM EDTA και μετά από επώαση 3 ωρών χάνεται μόνο το 55.2%. Οι τιμές του Πίνακα 5.5 εισήχθησαν στο πρόγραμμα Origin, βάσει του οποίου έγινε ο προσδιορισμός των τιμών της παραμέτρου k_{cat} . Η τιμή k_{cat} βρέθηκε να είναι 715.875 s^{-1} .

Πίνακας 5.6. Καταλυτικές ιδιότητες της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Καταλυτικές ιδιότητες		
$K_m = 24.9 \mu\text{M}$	$k_{cat} = 715.875 \text{ s}^{-1}$	$V_{max} = 1.15 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$

5.11.6 Κινητική σταθερής κατάστασης της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος



Γράφημα 5.5 Κινητική της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} \cdot [S] / ([S] + K_m)$. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 5.5, η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Με τη βοήθεια του προγράμματος Origin, διαπιστώθηκε ότι το υπό μελέτη ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, αφού πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές, κατά τις οποίες μελετήθηκε η μεταβολή της ταχύτητας στη μονάδα του ενός λεπτού, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματός μας, το οποίο ήταν το γεντισικό οξύ. Ακολούθως υπολογίστηκε η $V_{\max} = 1.15 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ και το $K_m = 24.9 \mu\text{M}$. Το ένζυμο βρέθηκε ότι έχει καταλυτική ισχύ $k_{\text{cat}}/K_m = 28.75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot 10^3$.

5.11.7 Εναλλακτικά υποστρώματα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος

Η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος μελετήθηκε και παρουσία εναλλακτικών υποστρωμάτων στη θέση του γεντισικού οξέος, όπως αναφερθήκαμε στην § 4.23.8. Έγιναν δοκιμές στα υποστρώματα: σαλικυλικό οξύ, 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, κατεχόλη. Μόνο δύο εκ των προαναφερθέντων υποστρωμάτων εμφάνισαν δραστηριότητα και ήταν το 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ με 0.042 και 0.0016 U/ml, αντίστοιχα με συγκέντρωση υποστρώματος $K_m = 0.3$ mM.

5.11.8 Διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η διατήρηση της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος σε διαφορετικές θερμοκρασίες: 4°C, -20°C και -80°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και με την παρουσία διαφορετικών μέσων: 10% γλυκερόλη, 1% DMSO, 10% DMSO και 10% αιθανόλη. Πριν την αποθήκευση του ενζυμικού παρασκευάσματος στα διάφορα μέσα και στις διαφορετικές θερμοκρασίες, επωάστηκε για 30 min με 0.2 mM Fe^{2+} /L-ascorbate.

Πίνακας 5.7 Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας σε θερμοκρασία 4°C μετά από 48h σε διάφορα μέσα.

Μέσα	4°C - 48h
Καθαρό ένζυμο	75
10% γλυκερόλη	57
10% αιθανόλη	71
10% DMSO	79

Πίνακας 5.8. Ποσοστό μείωσης της δραστηκότητας σε θερμοκρασία -20°C μετά από 7 και 30 ημέρες σε διάφορα μέσα.

Μέσα	$-20^{\circ}\text{C} - 7$ μέρες	$-20^{\circ}\text{C} - 30$ μέρες
Καθαρό ένζυμο	100	100
10% γλυκερόλη	57	82
10% αιθανόλη	99	96
10% DMSO	84	92
1% DMSO	99	98

Πίνακας 5.9 Ποσοστό μείωσης της δραστηκότητας σε θερμοκρασία -80°C μετά από 3 μήνες σε διάφορα μέσα.

Μέσα	$-80^{\circ}\text{C} - 3$ μήνες
Καθαρό ένζυμο	98
10% γλυκερόλη	81
10% αιθανόλη	86
10% DMSO	80
1% DMSO	87

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι το καθαρό ένζυμο χάνει το 75% της δραστηκότητας, όταν φυλάσσεται στους 4°C για 48h, ενώ η παρουσία της γλυκερόλης, της αιθανόλης ή του DMSO δεν επιδράσανε θετικά στη διατήρηση της δραστηκότητας. Επίσης, το καθαρό ένζυμο χάνει πλήρως τη δραστηκότητα του στους -20°C μετά από 7 μέρες, ενώ παρουσία 10% γλυκερόλης χάνει σχεδόν το μισό της δραστηκότητάς του κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Πίνακας 5.8). Με τη βοήθεια του Πίνακα 5.9 διαπιστώνουμε ότι η δραστηκότητα του ενζύμου παρουσία διαφόρων μέσων χάνεται σχεδόν πλήρως, όταν αποθηκεύεται στους -80°C για το χρονικό διάστημα των 3 μηνών.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, το ζήτημα της ρύπανσης από PAHs έχει προκαλέσει ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Η εύρεση μικροοργανισμών με την ικανότητα να αποικοδομούν PAHs είναι πολύ σημαντική. Ένα βακτηριακό στέλεχος που αποικοδομεί PAHs απομονώθηκε από την Περίβλεπτο, μία περιοχή της Ηπείρου (Ελλάδα) που είναι μολυσμένη από το κρεόζωτο και στην οποία η βιομηχανία συντήρησης ξύλου λειτουργούσε για πάνω από 30 χρόνια (Kallimanis et al., 2007). Το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3^T παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι είναι ικανό να μεταβολίζει το φαινανθρένιο σε συγκεντρώσεις έως και 400 mg/L ως μοναδική πηγή ενέργειας και άνθρακα.

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν αποδείξει ότι η πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου προχωράει μέσω του σχηματισμού του *ο*-φθαλικού οξέος το οποίο μετατρέπεται σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Εικόνα 3.3). Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ στη συνέχεια καταβολίζεται, αφού υποστεί 3,4- ή 4,5- σχάση, μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (Vandera et al. 2012, Vandera et al. 2015). Από την *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του Sphe3 προέκυψε ο εντοπισμός ενός πιθανού γονιδίου που κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος. Ο σχηματισμός του γεντισικού οξέος όμως δεν προκύπτει από την ως τώρα αποδεδειγμένη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου (Εικόνα 3.3). Επίσης πρόσφατα πειράματα στο εργαστήριό μας, δείχνουν επαγωγή της έκφρασης του πιθανού αυτού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος παρουσία φαινανθρενίου ή άλλων αρωματικών ενώσεων (Ασημακούλα ΜΔΕ 2017, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επομένως, προκειμένου να αποδειχθεί πειραματικά η λειτουργία του γονιδίου αυτού, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίησή του και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του. Σε αυτή τη μελέτη, το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από το στέλεχος Sphe3 ενισχύθηκε με την τεχνική PCR και κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21. Η πρωτεΐνη απομονώθηκε και πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της.

Το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στο *P. phenanthrenivorans* Sphe3 εντοπίζεται στο μεγαλύτερο από τα δύο πλασμίδια του βακτηρίου (plasmid pASPHE301:CP002380 με μέγεθος 190450 bp και 211 γονίδια). Έχει μέγεθος 1122 bp και φαίνεται να αποτελεί τμήμα ενός συμπλέγματος γονιδίων, που κωδικοποιούν άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στον καταβολισμό

του γεντισικού οξέος (Εικόνα 5.1).

Μετά από πολλαπλή στοίχιση της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος του *Sphe3* με άλλες δημοσιευμένες αντίστοιχες διοξυγονάσες από άλλους οργανισμούς διαπιστώθηκε μικρός βαθμός ομολογίας.

Το μοριακό βάρος της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στο *Sphe3* βρέθηκε ότι είναι 41.45 kDa, όπως προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικόνα 5.14). Επίσης, το μοριακό βάρος της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος βρέθηκε ότι είναι 45 kDa στο *Silibacter pomeroyi* DSS-3 (Liu et al., 2007) και λίγο μικρότερο, δηλαδή 39 kDa στο *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, (Lee et al., 2011), όπως προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος στο *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 εμφανίζεται ως διμερής πρωτεΐνη (Lee et al., 2011), ενώ ως ομοτριμερής πρωτεΐνη στο *Silibacter pomeroyi* DSS-3 (Liu et al., 2007). Από τα αποτελέσματα που υπάρχουν μέχρι στιγμής σε διοξυγονάσες από άλλους οργανισμούς, διαπιστώνεται ότι το συγκεκριμένο ένζυμο σχηματίζει συνήθως ομοτετραμερή ή διμερή πρωτεΐνη.

Η αναζήτηση και ο εντοπισμός της δραστηριότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στο *Sphe3* επιβεβαιώθηκε με την πραγματοποίηση ενζυμικών δοκιμών σε κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων, που καλλιεργήθηκαν παρουσία γεντισικού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα. Έτσι, αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενεργότητας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στα κύτταρα *Sphe3*, πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφρασή του γονιδίου που κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργία του και να προσδιοριστούν τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης που κωδικεύει. Αφότου σχεδιάστηκαν και παράχθηκαν τα κατάλληλα πριμοδοτικά μόρια για το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος, εν συνεχεία ενισχύθηκε και εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET-29c. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-29c::*gentdiox* μετασχηματίστηκε στα βακτήρια *E. coli* BL21, τα οποία ενδείκνυται να χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιτυχία στην υπερέκφραση των πρωτεϊνών. Ακολούθως, το υπό μελέτη ένζυμο καθαρίστηκε με στήλη αγχιστείας Ni^{2+} -NTA και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του, εξετάζοντας διαφορετικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η επίδραση μεταλλικών ιόντων, το pH, η κινητική σταθερής κατάστασης, κ.ά.

Η δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος 5πλασιάστηκε, ύστερα από επώαση με 0.2 mM Fe^{2+} για 30 min (Πίνακας 5.1), ενώ τα ιόντα Cu^{2+} ,

Ni^{2+} σε συγκέντρωση 1 mM αναστέλλουν το ένζυμο. Μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε ότι η παρουσία 0.1 mM Fe^{2+} αύξησε 10% τη δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος στο *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038 (Liu et al., 2011). Επίσης, στο *Silicibacter pomeroyi* σε συγκεντρώσεις 0.1-1 mM Fe^{2+} υπήρξε αύξηση και διατήρηση της δραστηριότητας (Liu et al., 2007). Αντίθετα, στο αλόφιλο στέλεχος *Martellella* παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ενζύμου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος παρουσία 0.25 mM Cu^{2+} , ενώ η παρουσία ίδιας συγκέντρωσης Ni^{2+} δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου (Huang et al., 2015).

Το βέλτιστο εύρος τιμών pH βρέθηκε να είναι 7.5-8, παρόμοιο με αυτό του *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 (pH 7.8) και του *Silicibacter pomeroyi* (pH 8). Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου βρέθηκε στους 50°C, αυξημένη σε σχέση με τους 40°C που έχει αναφερθεί για το *Silicibacter pomeroyi* (Liu et al., 2007). Η αντίδραση που πραγματοποιείται από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} \cdot [S] / ([S] + K_m)$. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 5.5, η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται συναρτησίως της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Υπολογίστηκε η $V_{\max} = 1.15 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ και το $K_m = 24.9 \text{ } \mu\text{M}$. Η τιμή της K_m είναι παρόμοια με την τιμή K_m του ενζύμου στο αλόφιλο στέλεχος *Martellella* ($K_m = 26.64 \text{ } \mu\text{M}$, Huang et al., 2015) και περίπου 10 φορές μικρότερη από την τιμή της K_m στο *Corynebacterium glutamicum* ($K_m = 130 \text{ } \mu\text{M}$, Eppinger et al., 2016). Επίσης, είναι λίγο μεγαλύτερη από τις τιμές K_m που έχουν αναφερθεί για την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος στο *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 ($K_m = 10 \text{ } \mu\text{M}$, Lee et al., 2011) και στο *Silicibacter pomeroyi* ($K_m = 12 \text{ } \mu\text{M}$, Liu et al., 2007). Το ένζυμο βρέθηκε ότι έχει καταλυτική ισχύ $k_{\text{cat}}/K_m = 28.75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot 10^3$, ενώ έχουν αναφερθεί οι τιμές k_{cat}/K_m $24.07 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot 10^3$ και k_{cat}/K_m $2310 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \cdot 10^3$ για την καταλυτική ισχύ του ενζύμου, που απομονώθηκε από τα βακτήρια *Silicibacter pomeroyi* και *Corynebacterium glutamicum*, αντίστοιχα (Liu et al., 2007; Eppinger et al., 2016).

Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος δοκιμάστηκε και σε άλλα υποστρώματα εκτός του γεντισικού οξέος. Μεταξύ των υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν, εμφάνισε δραστηριότητα στο 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ και το 3,4-διυδροξυφαινολοξικό οξύ με 0.042 και 0.0016 U/ml, αντίστοιχα. Επίσης, μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης και μέσα. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι το ένζυμο παρουσία 10% γλυκερόλης ή 10% DMSO διατηρεί μόνο το ~10% της δραστηριότητάς του στους -80°C μετά από 3 μήνες αποθήκευσης. Σε υ-

ψηλότερες θερμοκρασίες το ένζυμο χάνει τη δραστηριότητά του μέσα σε διάστημα λίγων ημερών ή ωρών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα αποτελέσματα στο αλόφιλο στέλεχος *Marteella*, το οποίο έχασε σχεδόν όλη τη δραστηριότητα του ενζύμου σε χρονικό διάστημα 98 ωρών στους -20°C (Huang et al., 2015), όπως επίσης και το καθαρό ένζυμο του *Silicibacter pomeroyi* ήταν ασταθές και έχασε το 51% της δραστηριότητάς του στην ίδια θερμοκρασία για το χρονικό διάστημα των 7 ημερών.

Συμπερασματικά, το γονίδιο GDO, από το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, αποδείχθηκε ότι πράγματι κωδικεύει μια πρωτεΐνη με δραστηριότητα της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Η μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων της, θα συνεισφέρει στην περαιτέρω μελέτη τόσο για τη βελτίωση της καταλυτικής της δράσης, όπως π.χ. διεύρυνση των υποστρωμάτων που καταλύει, όσο και για τη μελέτη των εναλλακτικών πορειών καταβολισμού των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων από το στέλεχος Sphe3.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του πιθανού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος είναι η ακόλουθη:

ATGACTGAGAACATCACCCATGAGTCAGTGGCTGCCAGCCACACGCTGCC
GGAGCCCACGGCGGAGGAGGCTGCCAGCTGGAGCAGCTGTACCGGGAT
TCGACAAAGAGAACCTGATCCCGCTGTGGACCGAGATCGGTGACCTGATG
CCGATGGTCCCCTCCCCAAGGCCGTGCCGCACGTCTGGCGCTGGAATGA
CCTTTACCCGCTGGCTGCCCGTGCCGGCGACCTGGTTCCGGTGGGCCGCG
GCGGCGAACGCCGCGCCATTGCCCTGGCCAACCCCGGCCTGGCCGGCACC
CCGTACGCGACCCCCACACTGTGGGCCGCCATCCAGTACCTGGGCGGGCCG
GGAAACAGCCCCGAGCACCGGCACTCGCAGAACGCGTTCGGTTCGTCTG
TCGAGGGTGAGGGCGTGTGGACCGTGGTCAACGGCGATCCCGTCCGGATG
TCCCGTGGTGACTTCCTGCTCACTCCGGGCTGGAACCTCCACGGCCACCA
CAACGACACCGATGAGCCCATGGCCTGGATCGACGGCCTGGACATCCCGT
TCGTGCACTACGCCGACGCCGGGTTCTTCGAGTTCGGCACGGAGCGCGTC
ACCGACGAAGCCACCCCTGATATCTCCCGTTCGGAGCGGCTTTGGGCCCA
TCCCGGACTCCGTCCGCTCTCCGGGCTCGATGACACCACCAACTCCCCCA
TCGCGGCGTACCGGTGGAAGTACACCGACGCAGCGCTGCGTGAACAGCTG
CTTCTCGAGGATGAGGGCCACCCGGCTACGGTGTCCCAGGGACATGCCGC
CGTCCGGTATAACCAACCCACACGGGCGGGGACGTCATGCCACCATCC
GGGCCGAGTTCACCGGCTGCGCGCCGGCGCCACCACCGAGACGGTCCGC
GAGGTCGGTTCAGCGTGGGGCAGGTCTTCGAAGGCACCGGCACCGTGAC
CCTGAACGGCGAAACCAGGCAGCTGGCCAAGGGCGACCTGTTCGTGGTCC
CGTCCTGGGCCGCTGGTCCCTGCAGGCCGAAACTGAATTCGACCTGTTC
CGCTTCAGCGACGCCCCATTTTCGAGCGCCTGAACTTCAACCGCACCTA
CATCGAAGGACGCACCAAGTAA

Η αμινοξική αλληλουχία του πιθανού γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος είναι η ακόλουθη:

MTENITHESVAASHTLPEPTAEEAAQLEQLYRDFDKENLIPLWTEIGDLMPMV
PSPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIALANPGLAGTPYAT
PTLWAAIQYLGRETAPHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMSRGDF
LLTPGWNFHGHHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFEFGTERVTDEATPD
ISRSERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWKYTDAALREQLLEDEGHPAT
VSQGHAAVRYTNPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATTETVREVGSSVGQVFEG
TGTVTLNGETRQLAKGDLFVVPSWAAWSLQAETFDLFRFSDAPIFERLNFN
RTYIEGRTK

Η αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος από το *Pseudaminobacter salicylatoxidans* είναι η ακόλουθη:

MQNEKLDHESVTQAMQPKDTPELRALYKSFEEESIPLWTQLGDLMPIHPKSK
AVPHVWKWSTLLRLARKSGELVPVGRGGERRALGLANPGLGGNAYISPTM
WAGIQYLGPRETAPHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMSRGDLLLLT
PGWCFHGHNDTDQPMWIDGLDIPFSQQMDVGGFFFEFGSDRVTDYATPNFS
RGERLWCHPGLRPLSGLQNTVASPIGAYRWEFTDRALTEQLLEDEGQPATV
APGHAAIRYVNPTTGGDVMPTLRCEFHLRAGTETATRNEVGSTVVFQVFEGA
GAVVMNGETTKLEKGD MFVVPSWVPWSLQAETQFDLFRFSDAPIMEALSFM
RTKIEGQK

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Shafy H. I., Mansour M. S. M., A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egyptian Journal of Petroleum, Volume 25, Issue 1, March 2016, Pages 107-123
- Adams M. A. , Singh V. K., Keller B. O., Jia Z. (2006) Structural and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* O157:H7, Molecular microbiology 61(6), 1469-1484
- Agarwal, T., Khillare, P. S., Shidhar V., Ray, S., Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India, Journal of Hazardous Materials 163 (2009) 1033-1039
- Arima, K., Komagata, K., Sugiyama, S. i., Kazama, M., and Yano, K. (1955) BuU Agr. Chem.-Sot. Jpn. 19, 51-60
- Baek, S., Field, R.A., Goldstone, M.E., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. Water Air Pollut. 60, 279-300
- Bamforth, S. M. And Singleton, I (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 723-736
- Bayly, R. C., and Barbour, M, G. (1978) in Microbial Degradation of Organic Molecules (Gibson, D. T., ed) pp 274-282, Marcell Dekker, New York
- Boohyatumonond, R. Murakami, M., Wayyatakorn, G., Togo, A., Takada, H., 2007. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust in a tropical Asian mega-city, Bangkok, Thailand. Sci. Total Environ. 384, 420-432
- Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (Eds.), The Enzymes, 2nd ed., vol. 8, Academic Press, New York, 1963, p. 353-371
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal. Biochem. 72:248-254

Carmona, M., Zamarro, M. T., Blazquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juarez, J. F., Valderrama, J. A., et al. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 71–133. doi: 10.1128/MMBR.00021-08

Cerniglia, C. E., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation* 3 (1992) 351-368

Chen J., Wei L., Wang M., Zhu G., Dongqui L., Fei S., Ning H., Xuemei L., Zihe R., and Xuejun C. Zhang, Crystal structure and mutagenic analysis of GDOsp, a gentisate 1,2-dioxygenase from *Silicibacter Pomeroyi*, *Protein Science* (2008), 17:1362–1373

Chen Y., Peng Y., Dai C., Ju Q., Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*, *Applied Soil Ecology*, Volume 51, November 2011, Pages 102-110

Chung, C. T. and Miller, R. H. 1988. A rapid and convenient method for preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 16:3580

Crawford. R. L.. and Frick. T. D. (1977) ADDS. *Environ. Microbial.* 34,170;-174

Courter, L.A., Musafia–Jeknic, T., Fischer, K., Bildfell, R., Giovanini, J., Pereira, V., and Baird, W., *Toxic. Sci.*, 2007, 95, 63-73

Dahle, S., Sanivov, V. M., Matishov, G.G., Evenset, A., Naes, K., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of k kara sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. *Sci. Total Environ.* 306, 57-71

Das R., Hamid S. B. A., Annuar M. A. M., Highly Efficient and Stable Novel NanoBiohybrid Catalyst to Avert 3,4-Dihydroxybenzoic Acid Pollutant in Water, *Scientific Reports* volume6, Article number: 33572 (2016)

Eaton, R. W., and Chapman, P. J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J. Bacteriol.* 174, 7542–7554

Eppinger E. and Andreas Stolz, Expansion of the substrate range of the gentisate 1,2-dioxygenase from *Corynebacterium glutamicum* for the conversion of monohydroxylated benzoates, *Protein Engineering, Design & Selection*, 2017, vol. 30 no. 1, pp. 57–65

Evans, W. C., Fernley, H. N., and Griffiths, E. (1965). Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *pseudomonas*. The ring-fission mechanism. *Biochem. J.* 95, 819–831. doi: 10.1042/bj0950819

Farmer, P.B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T. A., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A., Cebulska-Wasilewska, A., 2003. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage *Mutat Res.-Rev. Mut.* 544, 397-402

Feng Y., Hoon Eng Khoo and Poh C. A., Purification and Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869, *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1999, p. 946–950

Feng TC, Cui CZ, Dong F, Feng YY, Liu YD, Yang XM (2012) Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3. *J Appl Microbiol*, 113(4):779-89.

Ferraro, D. J., Gakhar, L., and Ramaswamy, S., Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 175-190 (2005)

Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* 15,93–120. doi:10.1159/000121324

Gaspari, L., Chana, S.S., Santella, R.M., Garte, S., Pedorti, P., Taioli, E., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as marker of DNA damage and infertility. *Mutation Research* 535, 155-160

Grinsted, J. and Bennett, P. M. 1988. Preparational electrophoresis of plasmid DNA, *Meth. Microbiol.* 21:129-142

Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166:4895-4901

Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E. L., Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann. Rev. Microbiol.*, 46, 565–601 (1992)

Haritash A. K., Kaushik C. P., Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *Journal of Hazardous Materials* 169: (2009) 1-15

Harpel M. S. and Lipscomb J. D., Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudomonas* PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND COMPARISON OF THE ENZYMES FROM *PSEUDOMONAS TESTOSTERONI* AND *PSEUDOMONAS ACIDOVORANS*. Vol. 265, No. 11. Issue of April 15, pp. 63014311, 1990

Hassanien, M.A., Abdel-Latif, N.M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in road dust over Greater Cairo, Egypt, *J. Hazard. Mater.* doi:10.1016/j.ihazmat.2007.05.079

Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Luttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. and Rohdich, F. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *PNAS USA*. 97 (6): 2456-2490

Hopper, D: J., Chapman, P. J., and Dagley, S. (1968) *Biochem. J.* 110,798-800

Hopper, D. J., and Chapman, P. J. (1970) *Biochem. J.* 122, 19-28

Huang, R., Tian, W., Yu, H., 2015. Enhanced biodegradation of HMW-PAHs using immobilized microorganisms in a estuarine reed wetlands simulator. In: Lee, M. S., Wu, H. T. (Eds.) *Proceedings of the 2015 International Power, Electronics and Materials Engineering Conference*, pp. 1151-1154

Kahn V., Ben-Shalom N., Zakin V., p-hydroxyphenylacetic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid as substrates for mushroom tyrosinase, *Journal of Food Biochemistry*, March 2000, Volume 24, Issue 1, Pages 1-19

Kallimanis A, Kavakiotis K, Perisynakis A, Sproer C, Pukall R, Drainas C, Koukkou AI. *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-

degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; **59**:275–279. PubMed doi:10.1099/ijvs.0.000984-0

Kallimanis A, LaButti K M, Lapidus A, Clum A, Lykidis A, Mavromatis K, Pagani I, Liolios K, Ivanova K, Goodwin L, Pitluck S, Chen A, Palaniappan K, Markowitz V, Bristow J, Velentzas A D, Perisynakis A, Ouzounis C C, Kyrpides N C, Koukkou A I, Drinas C, Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3) *Standards in Genomic Sciences* 2011 4:4020123

Kanaly, R. A., and Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067. doi: 10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000

Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2- dioxygenase. *Structure* 6, 571–586

Kim K.-H. Jahan S. A., Kabir E., Brown R. J. C., A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environment International* 60 (2013) 71–80

Kim, S.J., Kweon, O.G., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jhoo, J.W., Edmondson, R.D., and Cerniglia, C.E. (2006). Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase Involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1045–1054

Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J.C., and Jouanneau, Y. (2003). Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. 6PY1: Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Bacteriol.* 185, 3828–3841

Kulakov, L. A., Chen, S., Allen, C. C., and Larkin, M. J. (2005). Web-type evolution of *rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1754–1764. doi: 10.1128/AEM.71.4.1754- 1764.2005

Kushner, S. R., Sheperd, J., Edwards, G. and Maples, V. F. 1978. *uvrD*, *uvrE* and *recI*. represent a single gene. In “DNA repair mechanisms”. Hanawalt, P. C., Friedberg, E. C. and Fox, C. F. (Eds). Academic Press, N.Y. pp. 251-254

Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M., Baek, D.-H., Kim, Y.-C., and Cerniglia, C.E. (2008). A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. BMC Biochemistry 9, 11

Laemmli UK.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 297:680-685

Laempe D., Jahn M., Breese K., Schagger H., Fuchs G., Anaerobic Metabolism of 3-Hydroxybenzoate by the Denitrifying Bacterium *Thauera* aromatic, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 0021-9193/01/\$04.0010 DOI: 10.1128/JB.183.3.968–979.2001

Larkin, M. J., Kulakov, L. A., and Allen, C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. Curr. Opin. Biotechnol. 16, 282– 290. doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.007

Lee, B. K., Lee, C.B., 2004. Development of an improved dry and wet deposition collector and the atmospheric deposition of PAHs onto Ulsan Bay, Korea. Atmos. Environ. 38, 863-871

Lee, H. J., Kim, J. M., Lee, Park, M., Lee, K., Eugene L. Madsen and Che Ok Jeon, Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation, Microbiology (2011), 157, 2891–2903

Li, F., Zhu, L., Wang, L., Zhan, Y., 2015. Gene expression of an *Arthrobacter* in surfactant-enhanced biodegradation of a hydrophobic organic compound. Environ. Sci. Technol. 49, 3698-3704

Li, H., Zhang, X., Liu, X., Hu, X., Wang, Q., Hou, Y., Chen, X., 2016. Effect of rhizodeposition on alterations of soil structure and microbial community in pyrene-lead co-contaminated soils. *Environ. Earth Sci.* 75, 1-8

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275

Lu, X. Y., Zhang, T., and Fang, H. H. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1357–1371. doi: 10.1007/s00253-010-3072-7

Maes, G. E., and Volckaert, F. A. M. 2007. Challenges for genetic research in European eel management. *ICES Journal of Marine Science* DOI: 10.1093/icesjms/fsm108

Mahmoudi, N., Slater, G. F., Fulthorpe, R. R., 2011. Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.*, 57, 623-628

Maksić ZB, Barić D, Müller T: "Clar's sextet rule is a consequence of the sigma-electron framework", *J Phys Chem A.* 110(33):10135-10147, 2006

Mallick, S., Chakraborty, J., and Dutta, T. K. (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 64–90. doi: 10.3109/1040841X.2010.512268

Marga V., Neujahr H. Y., Purification and Properties of Catechol 1,2-Oxygenase from *Trichosporon cutaneum*, *The FEBS Journal*, Volume 12, Issue 3, February 1970, Pages 427-434

Michaud L., A. Lo Giudice, M. Saitta, M. De Domenico, V. Bruni The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment, *Mar Pollut Bull*, 49 (5/6) (2004), pp. 405-409

Mitcell, R.B., *Environment*, 1995, 37, 10-41

Momose, Y., Hirayama, K., Itoh, K., 2008. Competition for proline between indigenous *E. coli* and *E. coli* 0157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* 0157:H7. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 165-171

Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., and Cerniglia, C. E. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1476–1483. doi: 10.1128/AEM.67.4.1476-1483.2001

Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P., and Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 340–345. doi: 10.1128/AEM.70.1.340-345.2004

Mongolín E.F., N. Shapir, S.C. Daugherty, R.T. DeBoy, J.B. Emerson, A. Shvartzbey, *et al.* Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aureescens* TC1, *PLoS Genet*, 2 (12) (2006), p. e214

Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., and Pritchard, P. H. (1996). “Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons,” in *Bioremediation: Principles and Applications*, eds R. L. Crawford and L. D. Crawford (Cambridge: Cambridge University Press), 125–194

Nam, J.W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., and Omori, T. (2001). New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 254–263

Neff, J.M., 1978. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment and cancer risk to aquatic organisms and man. In: *Symposium: Carcinogenic Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment*, pp. 385-409

Orlandini V, Maida I, Fondi M, Perrin E, Papaleo M C, Bosi E, Pascale D, Tutino M L, Michaud L, Guidice A L, Fani R, Genomic analysis of three sponge-associated *Arthrobacter* Antarctic strains, inhibiting the growth of *Burkholderia*

cepacia complex bacteria by synthesizing volatile organic compounds. Volume 169, Issues 7-8, August 2014, Pages 593-601

Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., and Yao, Q.H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 32, 927–955

Perera, F., Hemminki, K., Jedrychowski, W., Whyatt, R., Campbell, U., Hsu, Y., Santella, R., Albertini, R. O Neill, J. P., 2002. *In utero* DNA damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in new borns. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 11, 1134-1137

Poulsen, T. G., Bester, K., 2010. Organic micropollutant degradation in sewage sludge during composting under thermophilic conditions. Environ. Sci. Technol. 44, 5086-5091

Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. (2000). A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: Expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182, 2134–2141

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA

Seo JS, Keum YS, Hu Y, Lee SE, Li QX. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. Pl-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and *meta*- and *ortho*-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere* 2006; **65**:2388–2394

Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E. and Li, Q.X. (2007) Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and *meta*- and *ortho*-cleavage of naphthalene-1,2-diol. Biodegradation 18, 123–131

Seo, J. S., Keum, Y. S., and Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. J. Environ. Res. Public Health 6, 278–309. doi: 10.3390/ijerph6010278

Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., et al. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* 127, 31–37. doi: 10.1016/0378-1119(93)90613-8

Smith, D. J. T., Edelhauser, E. C., Harrison, R. M., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations in road dust and soil samples collected in the United Kingdom and Pakistan, *Environ. Technol.* 16, 45-53

Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F., Cogliano, V., 2006. Carcinogenicity of household solid fuel combustion and high temperature frying, *Lancet-Oncology* 7, 977-978

Suarez M., Ferrer E., Martin M., Purification and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1, *FEMS Microbiology Letters* 143 (1996) 89-95

Sugiyama S, Yano K, Komagata K, Arima K (1960). "Metabolites of aromatic compounds by microbes. Part VII. Gentisic acid oxidase". *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **24**: 243–248

Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Selby, A. L., Fu, P. P., Miller, D. W., and Cerniglia, C. E. (1990). Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Arch. Microbiol.* 154, 260–266. doi: 10.1007/BF00248965

Takada, H., Ondo, T., Ogura, N., 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban street dusts and their source materials by capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1179-1186

Tamura, K., Dudley, J. Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599

Tang, L., Zeng, G. M., Shen, G. L., Li, Y. P., Zhang, Y. Huang, D. I., 2008. Rapid detection of picloran in agricultural field samples using a disposable immunomembrane-based electrochemical sensor. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1207-1212

Thompson, J.D., Higgins, D. G. and Gilson, T. J. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680

Ullmann, A., Jacob, F. and Monod, J. (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to a operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24:339

Vandera E., Kavakiotis K., Kallimanis A., Kyrpides N. C., Constantin Drainas, and Koukkou A. I., Heterologous Expression and Characterization of Two 1-Hydroxy-2-Naphthoic Acid Dioxygenases from *Arthrobacter phenanthrenivorans*, 2012, 0099-2240/12/\$12.00 *Applied and Environmental Microbiology* p. 621– 627

Vandera E., Samiotaki M., Parapouli M., Panayotou G., Koukkou I. A., Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose, *Journal of Proteomics*, Volume 113, 15 January 2015, Pages 73-89

Walker, N., and Lippert, K. D. (1965) *Biochem. J.* 95,5c-6c

Wang, M., Wang, G., 2010. Oxidative damage effects in the copepod *Tidriopus japonicas* Mori experimentally exposed to nickel. *Ecotoxicology* 19, 273-284

Wild, S. R., Jones, K. C., Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environ. Pollut.* 88 (1) (1995) 91-108

Yang, Y., Chen, R. F., Shiaris, M. P., Metabolism of naphthalene, fluorine and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816 *J. Bacteriol.* 176 (1994) 2158-2164

Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* 162, 1008–1013

Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., Sylvestre, S., PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of

PAHs ratios as indicators of PAHs. Source and composition, Org. Geochem. 33 (2002) 489-515

Ασημακούλα ΜΔΕ 2017 αδημοσίευτα αποτελέσματα

Σιταράς, Ι.Ε., Μελέτη της κατανομής Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων μεταξύ αέριας και σωματιδιακής φάσης στην ατμόσφαιρα του λεκανοπεδίου Αττικής, Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1998