



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΣΑΓΚΟΓΙΑΝΝΗΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

**«Λειτουργικός χαρακτηρισμός διοξυγονασώνσχάσης που μετέχουν
στον μεταβολισμό του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο
εδαφοβακτήριο *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3:
Συμβολή τους στον μεταβολισμό υδροξυβενζοϊκών οξέων»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Η παρούσα διδακτορική έρευνα συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Στους γονείς μου

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Νουκλεϊνικών Οξέων στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με υποτροφία ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω μέσω από την καρδιά μου την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, την επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε δέκα (και πλέον) χρόνια πριν, να γίνω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Αισθάνομαι πραγματικά τυχερός που υπήρξα μέρος της ομάδας αυτής. Μιας ομάδας που με έκανε να αγαπήσω την Έρευνα και το Εργαστήριο όσο ποτέ πριν στη ζωή μου δεν περίμενα να το κάνω. Που με δίδαξε ότι όταν σε μια συνεργασία υπάρχει εμπιστοσύνη, αλληλοϋποστήριξη, κατανόηση και αλληλεγγύη οι αντιξοότητες και οι δυσκολίες γίνονται ασήμαντα προβλήματα. Συγκεκριμένα λοιπόν ευχαριστώ και τους ανθρώπους της ομάδας αυτής. Την Ελπινίκη Βανδέρα και την Ευγενία Καραμπίκα που με καθοδήγησαν τόσο στα πρώτα μου βήματα κατά τη διάρκεια της Μεταπτυχιακής μου διατριβής, όσο και αργότερα κατά τα πρώτα χρόνια του Διδακτορικού μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Ματίνα Ασημακούλα που ήμασταν συνοδοιπόροι στον δύσκολο δρόμο μιας Διδακτορικής έρευνας, που μοιραστήκαμε ευχάριστες και λιγότερο ευχάριστες στιγμές, άπειρες συζητήσεις για θέματα τόσο προσωπικά όσο και επιστημονικά, ώρες μελέτης και συγγραφής εργασιών, αγωνίες, άγχη, προβληματισμούς αλλά και γέλια μέχρι δακρύων (όχι λίγες φορές). Ευχαριστώ ακόμη τον Ορφέα Μαρινάκο και τη Σταυρούλα Λέτσιου τόσο για την ευκαιρία να μεταλαμπαδεύσω μέρος των γνώσεων που απέκτησα σε αυτό εδώ το Εργαστήριο (ελπίζω να μη τα πήγα άσχημα...) αλλά κυρίως για τις τόσες πολλές όμορφες στιγμές που ζήσαμε μέσα στο γραφείο και το εργαστήριο, για την τρέλα και τον αυθορμητισμό τους, που μπορεί κάποιες φορές (ελάχιστες) να προκαλούσε έναν μικρό εκνευρισμό, στο τέλος όμως της μέρας άφηνε απλά ένα χαμόγελο και ένα πολύ ευχάριστο κλίμα! Ματίνα, Σταυρούλα και Ορφέα πέρασα πολύ όμορφα αυτά τα χρόνια (παρόλες τις ιδιαίτερες λόγω COVID συνθήκες) και σας ευχαριστώ γι αυτό! Ευχαριστώ και όλους τους άλλους που μοιραστήκαμε κάποια από αυτά τα χρόνια εδώ: τον Χάρη, τη Μάνια, τη Νάντια, την Ειρήνη, τον Χρήστο, την Αγγελική. Κυρία Άννα, σας ευχαριστώ λοιπόν ξανά που μου δώσατε την ευκαιρία να ζήσω από τα πιο σημαντικά και καθοριστικά χρόνια της ζωής και της επιστημονικής μου σταδιοδρομίας ως μέρος μιας τέτοιας ομάδας που παρά τις δυσκολίες έχει καταφέρει πράγματα για τα οποία ήμουν, είμαι και θα είμαι για πάντα ευγνώμων και περήφανος!

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Αμαλία Αφένδρα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο. Ανδρέα Τζάκο που ήταν εκεί κάθε φορά που χρειάστηκα τη βοήθεια ή τις συμβουλές τους.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κο Ευστάθιο Φριλίγγο, μέλος της Εφταμελούς Επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά τον σχεδιασμό μέρους της πειραματικής πορείας αλλά και για τις συμβουλές του που με βοήθησαν να ξεπεράσω πειραματικούς σκοπέλους που με προβλημάτιζαν για κάποιο διάστημα.

Ακόμη, ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κο. Θεολόγο Μιχαηλίδη και να τον ευχαριστήσω καθώς ήταν εκείνος που στο πλαίσιο των προπτυχιακών

μου σπουδών (μέσω του μαθήματος -επιλογής τότε- «Ερευνητικές Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής») με έκανε να αγαπήσω για πρώτη φορά τον Πάγκο και να θέλω να δοκιμάσω τις δυνατότητές μου στην Έρευνα, και να ξεκινήσω αυτό το ταξίδι.

Ευχαριστώ ακόμη τον Καθηγητή κο. Μιχάλη Σίσκο και τον Επίκουρο Καθηγητή κο. Πασχάλη Δούλια για τον χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη και διόρθωση της διατριβής προς την τελική της διαμόρφωση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR μέσω των οποίων ολοκληρώθηκε ένα σημαντικό τμήμα της διατριβής μου. Θερμά ευχαριστώ ακόμη τη Δρ. Βασιλική Μπότη για την πρόσβαση στη Μονάδα Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής ανάλυσης υψηλής Ευκρίνειας Orbitrap-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τα πειράματα Μεταβολομικής ανάλυσης. Χωρίς τη συμβολή των παραπάνω συναθελφισσών η περάτωση της παρούσας διατριβής στη μορφή που έχει δε θα ήταν εφικτή.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους και φίλους: την Κωνσταντίνα που ήταν δίπλα μου, με στήριξε και έδειξε μεγάλη υπομονή (ειδικά κατά τη συγγραφή της διατριβής)· τον Βασίλη, τον Βαγγέλη, τον Θωμά, τον Παύλο, τον Γιάννη, τον Ηρακλή που με τον τρόπο τους ο καθένας με στήριξαν και ήταν δίπλα μου σε αυτή τη δύσκολη προσπάθεια.

Κλείνοντας δε θα μπορούσα παρά να ευχαριστήσω πάνω απ' όλους και όλα την οικογένειά μου. Τους ανθρώπους που με έκαναν αυτό που είμαι, τον πατέρα, τη μητέρα και την αδερφή μου. Που με έμαθαν να κυνηγάω όλο και υψηλότερους στόχους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη μητέρα μου που, από τότε που ο πατέρας μου έφυγε από τη ζωή, ήταν και είναι πάντα δίπλα σ' εμένα και στην αδερφή μου και μας στηρίζει με όποιον τρόπο μπορεί. Χωρίς αυτή δε θα ήμασταν αυτό που είμαστε σήμερα και την ευχαριστώ βαθιά γι' αυτό.

Περιεχόμενα

Πρόλογος – Ευχαριστίες.....	IV
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-PAHs).	2
1.1.1 1.1.1 Γενικά	2
1.1.2 1.1.2 Προέλευση των PAHs	2
1.1.3 1.1.3 Επίδραση των PAHs στην ανθρώπινη υγεία	2
1.1.4 1.1.4 Παραμονή των PAHs στο περιβάλλον.....	4
1.1.5 1.1.5 Μέθοδοι Αποδόμησης-Απομάκρυνσης των PAH	5
1.1.6 1.1.6 Βιοαποδόμηση του φαινανθρενίου.....	14
1.1.7 1.1.7 Πρωτοκατεχοϊκό Οξύ (PCA).....	15
1.2 Διοξυγονάσεις	21
1.1.8 1.2.1 4,5-Διοξυγονάση του PCA	22
1.1.9 1.2.2 3,4 -Διοξυγονάση του PCA	26
1.3 <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	30
1.4 Καταβολισμός υδροξυβενζοϊκών οξέων.	33
1.5 Σκοπός της εργασίας	38
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 Χημικές ουσίες και όργανα	40
2.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	40
2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	41
1.1.10 2.3.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα βακτήρια <i>E.coli</i> και <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3, Luria Bertani (LB).....	41
1.1.11 2.3.2 Ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 (MM-M9) με 3-υδροξυ-/ 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3HB, 4HB) ως πηγή άνθρακα για το βακτήριο <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	42
1.1.12 2.3.4 Στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	42
2.4 In silico εντοπισμός των γονιδίων της 3,4-διοξυγονάσης και της 4,5-διοξυγενάσης του PCA	42
2.5 Κατασκευή φυλογενετικού δένδρου	42
2.6 Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών για την PCD34 και την PCD45	43
2.7 Αντιβιοτικά	44
2.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα του στελέχους Sphe3 με τη μέθοδο CTAB (mini preparation).....	44
1.1.13 2.8.1 Πειραματική πορεία.....	44

1.1.14	2.8.2. Διαλύματα	45
2.9	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων	46
1.1.15	2.9.1 Αρχή της μεθόδου	46
1.1.16	2.9.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini-preparation)	46
1.1.17	2.9.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel	47
2.10	Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Sambrook & Russell, 2001).	48
1.1.18	2.10.1 Αρχή της μεθόδου	48
1.1.19	2.10.2 Πειραματική πορεία	49
2.11	Ηλεκτροφόρηση του DNA (Sambrook et al., 1989)	49
1.1.20	2.11.1 Αρχή της μεθόδου	49
1.1.21	2.11.2 Πειραματική πορεία	50
1.1.22	2.11.3 Διαλύματα	51
2.12	Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης	51
1.1.23	2.12.2 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey – Nagel	51
2.13	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Mullis et al., 1986)	52
1.1.24	2.13.1. Αρχή της μεθόδου	52
1.1.25	2.13.2. Πειραματική πορεία	53
2.14	Κατευθυνόμενη Σημειακή Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR (Site-directed point mutagenesis with 2-step PCR)	54
1.1.26	2.14.1 In silico ανάλυση των γονιδίων και σχεδιασμός κατάλληλων πριμοδοτικών μορίων:	54
1.1.27	2.14.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης 2 σταδίων (2-step PCR)	58
2.15	Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Sambrook & Russell, 2001).	64
1.1.28	2.15.1. Αρχή της μεθόδου	64
1.1.29	2.15.2 Διαλύματα	68
2.16	Περιοριστική Ανάλυση	68
2.17	Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA (Chung & Miller, 1988)	75
1.1.30	2.17.1. Αρχή της μεθόδου	75
1.1.31	2.17.2. Πειραματική πορεία	75
1.1.32	2.17.3 Διαλύματα	76
2.18	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	76
1.1.33	2.18.1. Αρχή της μεθόδου	76
1.1.34	2.18.2. Πειραματική πορεία	76

2.19 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970).....	76
1.1.35 2.19.1. Αρχή της μεθόδου	76
1.1.36 2.19.2. Πειραματική πορεία.....	78
1.1.37 2.19.3. Διαλύματα	78
2.20 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET System Manual, Novagen 2001) 79	
1.1.38 2.20.1 Αρχή της μεθόδου	79
1.1.39 2.20.2 Πειραματική πορεία.....	80
2.21 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni ²⁺ -NTA (Herz et al., 2000).	83
1.1.40 2.21.1 Αρχή της μεθόδου	83
1.1.41 2.21.2 Πειραματική πορεία.....	83
1.1.42 2.21.3 Διαλύματα	84
2.22 Ενζυμικοί Προσδιορισμοί με φωτομέτρηση.	85
1.1.43 2.22.1 Ενζυμικός προσδιορισμός της 4,5-διοξυγονάσης του PCA (Ono et al., 1970).	85
1.1.44 2.22.2 Ενζυμικός προσδιορισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (Iwagami et al., 2000).	85
1.1.45 2.22.3 Ενζυμικός προσδιορισμός της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al., 1997).....	86
1.1.46 2.22.4 Ενζυμικός προσδιορισμός της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al., 1997).....	86
2.23 Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της 3,4-διοξυγονάσης του PCA.....	87
2.24 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 3,4-διοξυγονάσης του PCA ...	87
2.25 Φασματοσκοπία UV/Vis για αναγνώριση εναλλακτικών υποστρωμάτων	87
2.26 Εκδίωξη πλασμιδιακού DNA (Plasmid curing)	89
1.1.47 2.26.1 Καλλιέργεια παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (Manjusha & Sarita, 2011)	89
1.1.48 2.26.2 Καλλιέργεια παρουσία SDS (Radi & Rahman, 2010)	90
1.1.49 2.26.3 Διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε αυξημένη θερμοκρασία (Trevors, 1986)	90
2.27 Μεταβολομική Ανάλυση	91
1.1.50 2.27.1 Αρχές Μεταβολομικής	91
1.1.51 2.27.2 Υγρή Χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας.....	91
1.1.52 2.27.3 Εκχύλιση μεταβολιτών από καλλιέργειες κυττάρων Sphe3 και Sphe3c σε 3HB και 4HB.	92
1.1.53 2.27.4. Αναλυτική Μέθοδος.....	92
2.28 Μεταγραφομική Ανάλυση	94
1.1.54 2.28.1 Αρχές Μεταγραφομικής.....	94

1.1.55	2.28.2. Real-time RT-PCR (Stryer, 1988).....	94
1.1.56	2.28.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης qPCR και αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR.....	98
1.1.57	2.28.4 Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	100
1.1.58	2.28.5 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.....	104
1.1.59	2.28.6 Μεταγραφομική ανάλυση κυττάρων Sphe3 και Sphe3c που αναπτύχθηκαν παρουσία 3HB και 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας.....	105
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	107
3.1	In situ παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων της PCD45 στον βιοαντιδραστήρα NMR με υποστρώματα πρωτοκατεχοϊκού και γαλλικού οξέος και ταυτοποίηση των προϊόντων	108
1.1.60	3.1.1 Ενζυμική αντίδραση με υπόστρωμα PCA	108
1.1.61	3.1.2 Ενζυμική αντίδραση με υπόστρωμα GA	109
1.1.62	3.2.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων για την 3,4- διοξυγονάση του PCA.	111
1.1.63	3.2.2. Πρωτοταγείς Δομές των α- και β-υπομονάδων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA	112
1.1.64	3.2.3 Δευτεροταγείς Δομές των υπομονάδων της 3,4- διοξυγονάσης του PCA	112
1.1.65	3.2.4 Τριτοταγείς Δομές των υπομονάδων της 3,4- διοξυγονάσης του PCA... ..	114
1.1.66	3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση των α- και β-υπομονάδων της PCD34	115
3.3	Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της PCD34	116
1.1.67	3.3.1 Εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας PCD34 σε κύτταρα Sphe3	116
1.1.68	3.3.2 Απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου της 3,4-διοξυγονάσης του PCA	116
1.1.69	3.3.3 Κλωνοποίηση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript SK(+)	117
1.1.70	3.3.4 Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA	118
3.4	Εισαγωγή της μετάλλαξης R123H στην α-υπομονάδα της PCD34.....	123
1.1.71	3.4.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου για την α-υπομονάδα της PCD34	123
1.1.72	3.4.2 Πρωτοταγής Δομή των PCD34 και PCD34/ R123H.....	124
1.1.73	3.4.3 Πολλαπλή στοίχιση (CLUSTAL-Omega) αμινοξικών αλληλουχιών των υπομονάδων της PCD34.....	124
1.1.74	3.4.4 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης	130
1.1.75	3.4.5 PCR δύο σταδίων για την εισαγωγή της μετάλλαξης R123H.....	131
1.1.76	3.4.6 Έλεγχος αποτελέσματος της R123H.....	134

1.1.77	3.4.6 Έλεγχος αναγνώρισης υποστρωμάτων με φασματοσκοπία UV/Vis.....	135
3.5	Εισαγωγή μεταλλάξεων στην PCD45	144
1.1.78	3.5.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της PCD45	144
1.1.79	3.5.2 Πρωτοταγείς δομές της PCD45 και των μεταλλαγμένων PCD45/F93A – PCD45/VPA	145
1.1.80	3.5.3 Πολλαπλή στοίχιση (CLUSTAL-Omega) της PCD45	146
1.1.81	3.5.4 Πρόβλεψη τριτοταγών δομών των μεταλλαγμένων ενζύμων.....	150
1.1.82	3.5.5 PCR δύο σταδίων για εισαγωγή των μεταλλάξεων	151
3.6	Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών μέσω της εκδίωξης πλασμιδίων (curing)	165
1.1.83	3.6.1 <i>In silico</i> ανάλυση των πλασμιδίων του <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3 ...	165
1.1.84	3.6.2 Προσπάθεια εκδίωξης του πλασμιδίου pASPHE302	165
1.1.85	3.6.2 Ανάπτυξη των στελεχών Sphe3 και Sphe3c σε διάφορες πηγές άνθρακα	166
3.7	Μεταγραφομική Ανάλυση των γονιδίων <i>cat12diox</i> , <i>pcd34</i> και <i>pcd45</i>	170
1.1.86	3.7.1 Απομόνωση RNA	170
1.1.87	3.7.2. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω qRT-PCR σε καλλιέργεια Sphe3c σε υποστρώματα 3HB και 4HB	170
1.1.88	3.7.2.2 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4HB).....	172
1.1.89	3.7.3 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω qRT-PCR σε καλλιέργεια Sphe3 σε υποστρώματα 3HB και 4HB	173
3.8	Μεταβολομική Ανάλυση	176
1.1.90	3.8.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών σε καλλιέργεια Sphe3 και Sphe3c με μοναδική πηγή άνθρακα το 3HB.....	177
1.1.91	3.8.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών σε καλλιέργεια Sphe3 και Sphe3c με μοναδική πηγή άνθρακα το 4HB.....	187
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	198
4.1	Μελέτη των διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού δακτυλίου του PCA του Sphe3.....	199
1.1.92	4.1.1 Ετερόλογη έκφραση και μελέτη της PCD45 μέσω φασματοσκοπίας UV/Vis και NMR.....	199
1.1.93	4.1.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (PCD34).....	201
1.1.94	4.1.3 Διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από τις διοξυγονάσες του PCA του Sphe3.....	207
4.2	Καταβολισμός υδροξυβενζοϊκών οξέων.	214
1.1.95	4.2.1 Καταβολισμός 3HB από κύτταρα Sphe3 και Sphe3c	216
1.1.96	4.2.2 Καταβολισμός 4HB από κύτταρα Sphe3 και Sphe3c	220
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	225
	Περίληψη.....	226

Abstract	228
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	230
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	252
Π1. Ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης της PCD45 με υπόστρωμα PCA στο NMR.	253
Π1.1 Φάσμα STD-NMR της μετατροπής του PCA σε CHMS.....	253
Π1.2 Φάσμα 2D TOCSY NMR της μετατροπής του PCA σε CHMS.....	254
Π1.3 Μελέτη της ισορροπίας μεταξύ των δύο ισομορφών του προϊόντος CHMS.....	254
Π2. Μοριακοί τύποι των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα στις ενζυμικές αντιδράσεις.	256
Π3. Κινητική Michaelis-Menten της PCD45.....	258
Π4. Πορείες καταβολισμού του <i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	259
Π5. LC-MS φάσματα των πρότυπων ενώσεων.....	261
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($m/z = 137,0249$)	261
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($m/z = 137,0249$)	262
PCA ($m/z = 153.0193$).....	263
Γεντισικό οξύ ($m/z = 153,0193$).....	264
Πυροκατεχοϊκό οξύ ($m/z = 153,0193$).....	265
Κατεχόλη ($m/z = 109,0295$).....	266
Υδροκινόνη ($m/z = 109,0295$).....	267
Ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ ($m/z = 167,0349$).....	267

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-PAHs).

1.1.1 Γενικά

Στο διάστημα των τελευταίων δεκαετιών, ο πλανήτης υφίσταται τις σοβαρές συνέπειες της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στη βιομηχανία, τις μεταφορές, την γεωργία καθώς και την επέκταση των αστικών κέντρων. Η βελτίωση του βιοτικού επιπέδου καθώς και οι αυξημένες καταναλωτικές ανάγκες έχουν οδηγήσει στην αυξημένη επιβάρυνση του αέρα, του εδάφους καθώς και του υδροφόρου ορίζοντα με χημικά που είτε παρασκευάζεται από τον άνθρωπο, είτε προκύπτουν από ανθρώπινες δραστηριότητες (εντομοκτόνα, φωσφορικά λιπάσματα, καλλυντικά, είδη καθαριότητας και προσωπικής υγιεινής, φαρμακευτικές ουσίες όπως αντιβιοτικά, βιολογικοί μικρορυπαντές όπως ιοί και βακτήρια, CO₂, NO_x, PAHs κ.α.) (G. liang Li et al., 2014; Patel et al., 2020). Από μελέτες έχει προκύψει ότι μεταξύ 1930 και 2000, η παγκόσμια παραγωγή ανθρωπογενών χημικών έχει αυξηθεί από 1.000.000 σε 400.000.000 τόνους το χρόνο ενώ πάνω από το 70% των χημικών αυτών έχει αντίκτυπο στο περιβάλλον (Gavrilescu et al., 2015).

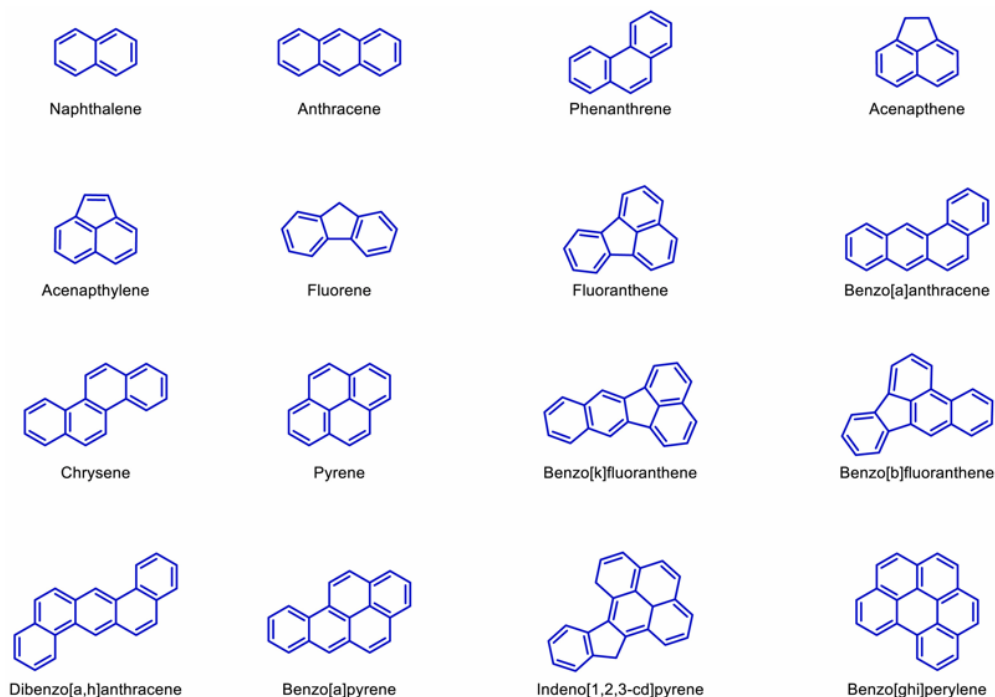
1.1.2 Προέλευση των PAHs

Μεταξύ των ανθρωπογενών ρύπων συγκαταλέγονται και οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs). Πρόκειται για ισχυρούς και σχεδόν απανταχού παρόντες περιβαλλοντικούς ρυπαντές που αποτελούνται από 2 μέχρι 7 συντηγμένους αρωματικούς δακτυλίους (Εικόνα 1.1.1). Σχηματίζονται με ποικίλους τρόπους κυρίως όμως μέσω της ατελούς καύσης οργανικών υλικών όπως το ξύλο, το κάρβουνο, το πετρέλαιο, η βενζίνη κ.α. Συναντώνται επίσης και στο αργό πετρέλαιο, στην άσφαλτο και στη λιθανθρακόπισσα (coal tar). Πέραν της ανθρωπογενούς του προέλευσης, μπορούν να προκύψουν και από φυσικές διαδικασίες όπως δασικές πυρκαγιές, εκρήξεις ηφαιστειών, διαρροές πετρελαίου (oil seeps) καθώς και διάφορες βιολογικές πηγές. Η αυξημένη συγκέντρωση των PAHs όμως στο περιβάλλον έχει συσχετιστεί κυρίως με ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η καύση δασικών εκτάσεων για τη δημιουργία καλλιεργήσιμης γης, η εξόρυξη και η επεξεργασία του αργού πετρελαίου καθώς και η χρήση κάρβουνου και προϊόντων πετρελαίου ως τα βασικότερα καύσιμα (Mojiri et al., 2019; Ukiwe et al., 2013).

1.1.3 Επίδραση των PAHs στην ανθρώπινη υγεία

1.1.3.1 Τοξικότητα

Ένας από τους λόγους που οι PAHs έχουν προκαλέσει το αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες είναι το γεγονός ότι σαν ενώσεις παρουσιάζουν ισχυρές τερατογόνες, καρκινογόνες και τοξικές ιδιότητες (Bolden et al., 2017; Rengarajan et al., 2015). Μέχρι σήμερα 16 είδη PAHs έχουν αναγνωριστεί ως πρωταρχικής σημασίας ρυπαντές (priority pollutants) από τον EPA (US Environmental Protection Agency) με τα ακεναφθένιο, ακεναφθυλένιο, ανθρακένιο, βενζο(g,h,i)περιλένιο, φλουορένιο, φαινανθρένιο και πυρένιο, να ανήκουν στη λίστα χημικών ρυπαντών υψηλής προτεραιότητας του οργανισμού (Assessment, 2009).



Εικόνα 1.1.1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. (Thacharodi et al., 2023).

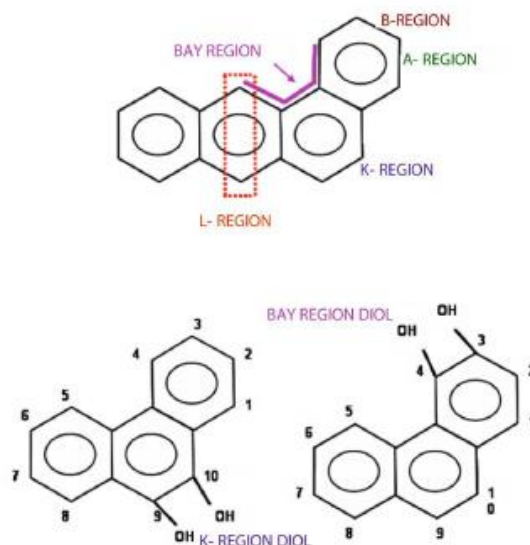
Μετά την είσοδο τους στο πεπτικό σύστημα, οι PAHs απορροφώνται γρήγορα από το γαστρεντερικό σωλήνα λόγω της μεγάλης λιποδιαλυτότητάς τους. Ένας μείζων τρόπος εισόδου των PAHs στον οργανισμό είναι μέσω του δέρματος. Έρευνα που έγινε το 1993 σε εργάτες κλιβάνου παραγωγής κοκ έδειξαν ότι το 75% της συνολικής ποσότητας PAH που απορροφήθηκε από τον οργανισμό (κυρίως το πυρένιο), εισήλθε μέσω του δέρματος (Vanrooij et al., 1993). Μπορούν επίσης να απορροφηθούν τόσο μέσω της δερματικής επαφής όσο και μέσω της εισπνοής τους όμως τα σοβαρότερα συμπτώματα παρατηρούνται μετά την κατάποση αυτών και την είσοδό τους στο πεπτικό σύστημα (Tong et al., 2017).

Τα οξεία συμπτώματα περιλαμβάνουν ερεθισμό των οφθαλμών και του δέρματος, εμετούς, διάρροια, σύγχυση και φλεγμονή (Abdel-Shafy & Mansour, 2016). Τα χρόνια συμπτώματα που προκύπτουν από μακροχρόνια έκθεση στους PAHs περιλαμβάνουν καταρράκτη, βλάβες των νεφρών και του ήπατος, αναπνευστικά προβλήματα, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και αιματολογικά προβλήματα (Abdel-Shafy & Mansour, 2016).

1.1.3.2 Καρκινογένεση

Πολλοί PAHs δεν είναι καρκινογόνοι αυτοί καθ' αυτοί, αλλά μετά το μεταβολισμό τους στον οργανισμό προκύπτουν ενώσεις με ισχυρά καρκινογόνο χαρακτήρα. Οι καρκινογόνες ιδιότητες των PAHs λοιπόν οφείλονται στην «ενεργοποίηση» τους από ένζυμα των θηλαστικών προς αντιδραστικά εποξειδία διολών τα οποία έχουν μεταλλαξογόνο δράση και επηρεάζουν το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα ενδιάμεσα αυτά μπορεί να αλληλεπιδράσουν με το DNA δημιουργώντας σύμπλοκα, κάτι που μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις και κατ' επέκταση καρκίνο (Tarantini et al., 2011). Οι πιο ισχυροί καρκινογόνοι μεταβολίτες των PAHs είναι τα εποξειδία που σχηματίζονται στην περιοχή του κόλπου (bay region) των PAHs (σ.σ. ο χώρος που σχηματίζεται μεταξύ δύο αρωματικών δακτυλίων σε έναν

PAH – Εικόνα 1.1.2.) τα οποία και αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη διπλή αλυσίδα του DNA (Chauhan et al., 2008).



Εικόνα 1.1.2: Χαρακτηριστικές περιοχές των PAHs και καρκινογόνοι μεταβολίτες τους. A, B, K, L και περιοχές κόλπου των PAHs που συμμετέχουν στο σχηματισμό μεταβολικά ενεργών εποξειδίων (Chauhan et al., 2008)

Σε γενικές γραμμές, η οφειλόμενη σε PAH καρκινογένεση μπορεί να προκληθεί όταν ένα σύμπλοκο DNA-PAH δημιουργηθεί σε μια περιοχή που είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της διαφοροποίησης. Αν αυτό το σύμπλοκο δεν απομακρυνθεί προκαλείται μετάλλαξη κατά τη κυτταρική διαίρεση. Λογικό είναι τα κύτταρα που επηρεάζονται περισσότερο από μια οξεία έκθεση του οργανισμού σε PAH να είναι αυτά με τους υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού, όπως κύτταρα του μυελού των οστών, δερματικά και κύτταρα από τον ιστό του πνεύμονα. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα εποξείδια του βένζο(α)πυρενίου, που δημιουργούν σύμπλοκα με διάφορες γουανίνες της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου p53, σε επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα. Τα σύμπλοκα αυτά θεωρούνται υπεύθυνα για καρκινογόνες μεταλλάξεις που οφείλονται στην έκθεση των κυττάρων στον καπνό του τσιγάρου (Denissenko et al., 1996).

1.1.3.3 Τερατογένεση και δυσλειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος

Πέραν των προαναφερθέντων, η έκθεση σε PAHs όπως το ναφθαλένιο, το βενζο(α)ανθρακένιο και το βενζο(α)πυρένιο έχει συσχετιστεί με πρόωρο τοκετό, μειωμένο βάρος του εμβρύου, μέχρι και με δυσμορφίες της καρδιάς. Οι PAHs σχετίζονται ακόμη και με χαμηλότερο IQ στην ηλικία των τριών, αυξημένα συμπεριφορικά προβλήματα στην ηλικία των έξι και οχτώ και με το παιδικό άσθμα (Edwards et al., 2010).

Τέλος οι PAHs έχουν συσχετιστεί και με δυσλειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος όπως μειωμένη ποιότητα σπέρματος, δυσλειτουργίες των όρχεων και των ωοθηκών, μειωμένη βιωσιμότητα των ωαρίων, βλάβες στις ωοθήκες και άλλες ασθένειες (Bolden et al., 2017).

1.1.4 Παραμονή των PAHs στο περιβάλλον

Μια ακόμη παράμετρος που αυξάνει το ενδιαφέρον των PAHs ως ρυπαντών είναι το γεγονός ότι μετά την απελευθέρωσή τους στην ατμόσφαιρα δεν αποδομούνται γρήγορα,

παραμένοντας έτσι στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα ρεύματα του αέρα μπορεί να τους διασπείρουν σε μια μεγαλύτερη περιοχή (Platt & Mackie, 1980).

Η παραμονή των PAHs στο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η χημική τους δομή, η συγκέντρωση και η διασπορά τους και το κατά πόσο είναι διαθέσιμοι στους μικροοργανισμούς προς βιοαποδόμηση. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στο χρόνο παραμονής των PAHs στο περιβάλλον παίζουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως ο τύπος, η δομή και το pH του εδάφους, η θερμοκρασία καθώς και η επάρκεια σε οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και νερό (Cerniglia, 1993).

Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερο το μοριακό βάρος του PAH, τόσο μεγαλύτερη η παραμονή τους στο περιβάλλον αλλά και η τοξικότητά τους. Ακόμη μελέτη που χρησιμοποίησε το φαινανθρένιο ως μοντέλο έδειξε ότι η ικανότητα βιοαποδόμησης μειώνεται αντιστρόφως με το χρόνο παραμονής του φαινανθρενίου στο έδαφος (Hatzinger & Alexander, 1995).

Οι PAHs είναι υδρόφοβα μόρια με την υδατοδιαλυτότητά τους να μειώνεται σχεδόν γραμμικά με την αύξηση του μοριακού τους βάρους (Parrish et al., 2010). Κατατάσσονται σε δυο επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος:

- **PAHs χαμηλών μοριακών βαρών (Low Molecular Weights – LMW)** με δύο ή τρεις βενζοϊκούς δακτυλίους όπως το ναφθαλένιο, το ακεναφθένιο, το φλουορένιο και το φαινανθρένιο.
- **PAHs υψηλών μοριακών βαρών (High Molecular Weights – HMW)** με τέσσερις ή περισσότερους βενζοϊκούς δακτυλίους όπως το φλουορανθένιο, το πυρένιο, το βενζο(α)πυρένιο και το χρυσένιο.

Οι LMW PAHs είναι αρκετά υδατοδιαλυτοί συγκριτικά με τους HMW. Επίσης, όσο μεγαλύτερο το μοριακό βάρος τόσο πιο εύκολα απορροφώνται από σωματίδια του εδάφους, κάτι που τους καθιστά λιγότερο διαθέσιμους, κι έτσι λιγότερο επιδεκτικούς στην εξυγίανση-απομάκρυνση.

Διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διαδικασίες επηρεάζουν το κατά πόσο οι PAHs θα μεταφερθούν κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Η φύση του υπόγειου περιβάλλοντος θα καθορίσει με τη σειρά της το αν ο εκάστοτε PAH θα παραμείνει σε μη υδατική υγρή φάση, αν θα μεταβολιστεί από μικροοργανισμούς, αν θα απορροφηθεί από το ριζικό σύστημα φυτών, αν θα εξατμιστεί σε ενδιάμεσους κενούς χώρους ή αν τέλος, απορροφηθεί από οργανικά σωματίδια του εδάφους. Ακόμη, η αλληλεπίδραση των PAHs με άλλους συνρυπαντές, όπως υδρογονάνθρακες και βαρέα μέταλλα παρατείνουν την παραμονή του στο περιβάλλον (Krzyszczak & Czech, 2021).

1.1.5 Μέθοδοι Αποδόμησης-Απομάκρυνσης των PAH

Υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι αποδόμησης ή απομάκρυνσης των PAHs από το περιβάλλον. Οι τρόποι αυτοί περιλαμβάνουν την χημική αποδόμηση, τη μικροβιακή και φυτική βιοαποδόμηση ή ακόμη και συνδυασμό των μεθόδων αυτών. Τεχνικές που τα τελευταία χρόνια κερδίζουν έδαφος είναι επίσης η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία, η άμεση φωτόλυση καθώς και η χρήση υπερηχητικών συχνοτήτων.

1.1.5.1 Χημική αποδόμηση

Κατά τη χημική αποδόμηση των PAHs γίνεται χρήση χημικών ουσιών προς μετατροπή των PAHs σε απλούστερες χημικές ενώσεις ή σε ενώσεις που μπορούν να μεταβολιστούν από μικροβιακούς παράγοντες (βακτήρια) του εδάφους. Ο σχεδιασμός μιας διαδικασίας χημικής αποδόμησης στο περιβάλλον αποτελεί ένα επίπονο έργο καθώς αυτή εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων όπως η αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων, το pH του εδάφους αλλά και τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες.

Ως πιο αποτελεσματικές θεωρούνται οι αντιδράσεις οξείδωσης, ενώ υπάρχουν αναφορές ότι φωτοχημικές αντιδράσεις θα μπορούσαν να λειτουργήσουν επικουρικά των αντιδράσεων αυτών (Bach et al., 2005). Οι περισσότερες οξειδωτικές αντιδράσεις στο περιβάλλον ξεκινάνε από οξειδωτικά μέσα όπως υπεροξείδια (H_2O_2), όζον (O_3) και ρίζες υδροξυλίου ($OH^\cdot$) που παράγονται κατά τη διάρκεια φωτοχημικών αντιδράσεων. Σε γενικές γραμμές οι ρίζες υδροξυλίου ή το O_3 αλληλεπιδρούν με τους PAHs σε ταχύτητες ελεγχόμενης διάχυσης, αποσπώντας άτομα υδρογόνου ή με προσβολή διπλών δεσμών στον αρωματικό δακτύλιο. Το O_3 μπορεί να προσβάλει διπλούς δεσμούς άμεσα ή μπορεί να συντελέσει στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου (τα οποία με τη σειρά τους προσβάλουν το διπλό δεσμό) μέσω της διάσπασης του νερού. Η παραπάνω αντίδραση προχωρά μέσω πολύπλοκων οδών με πολυάριθμα ενδιάμεσα. Τα τελικά προϊόντα είναι ένα μείγμα κετονών, κινονών, αλδεΐδων, φαινολών και καρβοξυλικών οξέων.

Εδώ να σημειωθεί ότι αν το οξειδωτικό μέσο δεν προστεθεί σε επαρκείς ποσότητες, τότε οι PAHs θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ένα τελικό προϊόν το οποίο δεν μπορεί να υποστεί περαιτέρω αποδόμηση. Το προϊόν αυτό μπορεί να συσσωρευτεί στο περιβάλλον και να μετατραπεί σε ένα νέο παράγοντα ρύπανσης, αν δεν είναι διαθέσιμη μια διεργασία εξυγίανσης του εδάφους (κυρίως η χρήση κάποιου μικροοργανισμού) (Freeman & Harris, 1995).

Τα πιο αποτελεσματικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν δότες ηλεκτρονίων όπως το οξικό, το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό (Bach et al., 2005)

Η αποδόμηση των PAHs υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες φαίνεται να αυξάνεται με τη φυσική ή χημική προεργασία του μολυσμένου εδάφους με φώσφορο. Συγκεκριμένα για την αποδόμηση του φαινανθρενίου, εκτός του φωσφόρου, το άζωτο φαίνεται να έχει βοηθητικό ρόλο (C. R. Johnson & Scow, 1999).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αποτελεσματικότητα της χημικής αποδόμησης των PAHs περιορίζεται από τη μειωμένη υδατοδιαλυτότητα και επιφανειακή τους τάση. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών οι οποίες αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα των PAHs (Boonchan et al., 1998). Η θετική επίδραση των ουσιών αυτών αναιρείται από άλλες ερευνητικές ομάδες λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ των υποστρωμάτων καθώς και της τοξικής δράσης των επιφανειοδραστικών ουσιών εναντίον των βακτηρίων που αποδομούν PAHs στο έδαφος (Liu et al., 2001).

1.1.5.2 Βιοαποδόμηση

Η μικροβιακή αποδόμηση των PAHs, αναφερόμενη και ως βιοαποδόμηση, είναι η οδός που ακολουθείται συχνότερα για την εξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με τις ενώσεις αυτές.

Προτιμάται καθώς αποτελεί την πιο αποτελεσματική, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση με αυξημένη προσαρμοστική ικανότητα. Παρουσιάζει επίσης πλεονεκτήματα όπως η πλήρης αποδόμηση του ρυπαντή σε ορισμένες περιπτώσεις αλλά και η ελάχιστη διαταραχή της ρυπασμένης περιοχής (Peng et al., 2008).

Α) Βακτήρια

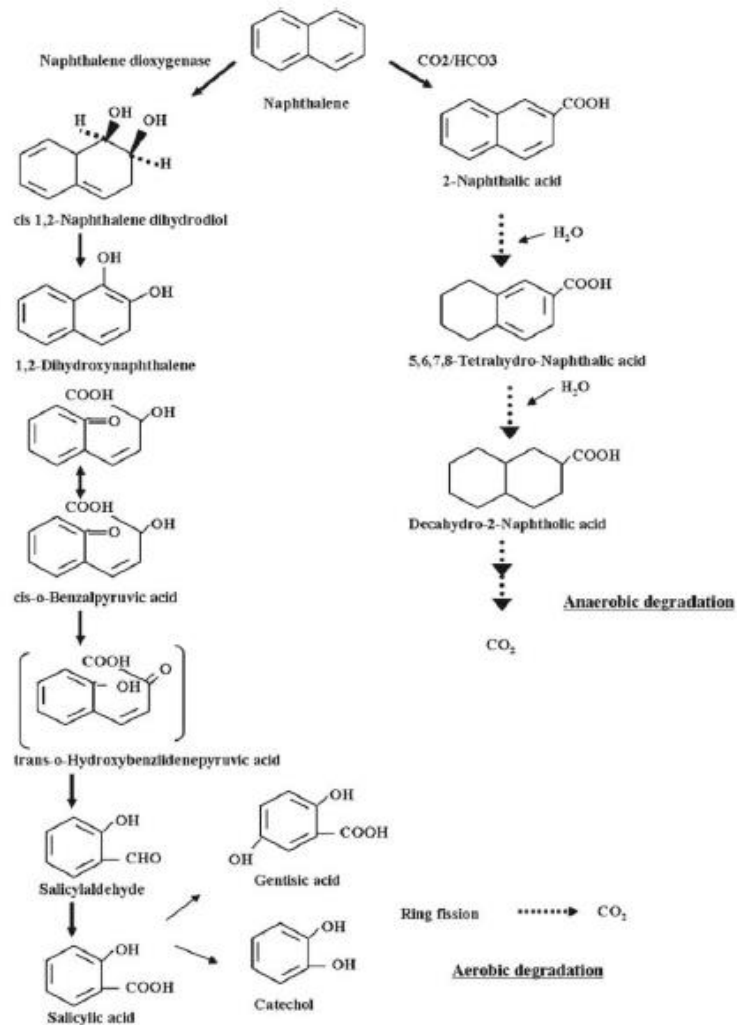
Τα βακτήρια είναι η βασικότερη κατηγορία μικροοργανισμών που συμμετέχουν ενεργά στην αποδόμηση γενικά οργανικών ρυπαντών από μολυσμένες περιοχές και πολλά από αυτά είναι γνωστό ότι αποδομούν PAHs ειδικότερα και κάποια από αυτά μπορούν να αξιοποιήσουν LMW PAHs ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τα περισσότερα βακτήρια με ικανότητα βιοαποδόμησης PAH έχουν απομονωθεί από μολυσμένα εδάφη και ιζήματα (Shahsavari et al., 2019).

Αν και έχει αποδειχθεί η ύπαρξη αναερόβιου μεταβολισμού των PAHs, μεγαλύτερη βαρύτητα έχει δοθεί στον αερόβιο μεταβολισμό και στις κοινές βιοχημικές οδούς μεταξύ των οργανισμών.

Το πρώτο βήμα του αερόβιου καταβολισμού των PAHs περιλαμβάνει κυρίως τη δράση μιας διοξυγονάσης/μονοοξυγονάσης (οξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης), η οποία εισάγει άτομα μοριακού οξυγόνου στον αρωματικό πυρήνα, με αποτέλεσμα την οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου. Ανάλογα με τους υποκαταστάτες του αρχικού μορίου, οι δύο υδροξυλοομάδες μπορούν να τοποθετηθούν είτε σε *ortho* (όπως στην κατεχόλη και στο πρωτοκατεχοϊκό) είτε σε *para* (όπως στο γεντισικό και στο ομογεντισικό) μεταξύ τους θέση. Αυτά τα ενδιάμεσα που παράγονται από την αντίδραση, υφίστανται περαιτέρω οξείδωση πρώτα προς αρωματικές διυδροξυλιωμένες ενώσεις (κατεχόλες), και έπειτα μέσω *ortho*- ή *meta*- σχάσης του αρωματικού δακτυλίου προς ενδιάμεσα του βασικού μεταβολισμού του κυττάρου (κύκλος Krebs) (Samanta et al., 2002).

Οι PAHs είναι κοινοί ρυπαντές και σε αναερόβια περιβάλλοντα (υδροφόρος ορίζοντας, λιμναίοι και θαλάσσιοι πυθμένες κ.α.). Απουσία μοριακού οξυγόνου, χρησιμοποιούνται εναλλακτικοί δέκτες ηλεκτρονίων, όπως νιτρικά και θειικά ιόντα καθώς και ιόντα σιδήρου, για την οξείδωση των αρωματικών ενώσεων.

Στην προσπάθεια να δοθεί ένα γενικό περίγραμμα των αντιδράσεων αυτών θα πάρουμε το ναφθαλένιο ως μόριο-μοντέλο. Ο αερόβιος μεταβολισμός του ναφθαλενίου περιλαμβάνει την ενσωμάτωση μοριακού οξυγόνου σε έναν από τους αρωματικούς δακτυλίους, από μια διοξυγονάση του ναφθαλενίου, σχηματίζοντας μια *cis*-1,2-διυδροδιόλη του ναφθαλενίου. Η τελευταία μεταβολίζεται μέσω μιας σειράς βημάτων σε σαλικυλικό οξύ, κι αυτό με τη σειρά του σε CO₂. Αντίθετα, η αναερόβια αποδόμηση του ναφθαλενίου περιλαμβάνει το σχηματισμό 2-ναφθαλικού οξέος μέσω της καρβοξυλίωσης ενός αρωματικού δακτυλίου. Το 2-ναφθαλικό οξύ καταβολίζεται τελικά σε CO₂ (Εικόνα 1.1.3.) (Chauhan et al., 2008).



Εικόνα 1.1.3. Αερόβιος και αναερόβιος μεταβολισμός του ναφθαλενίου (Chauhan et al., 2008).

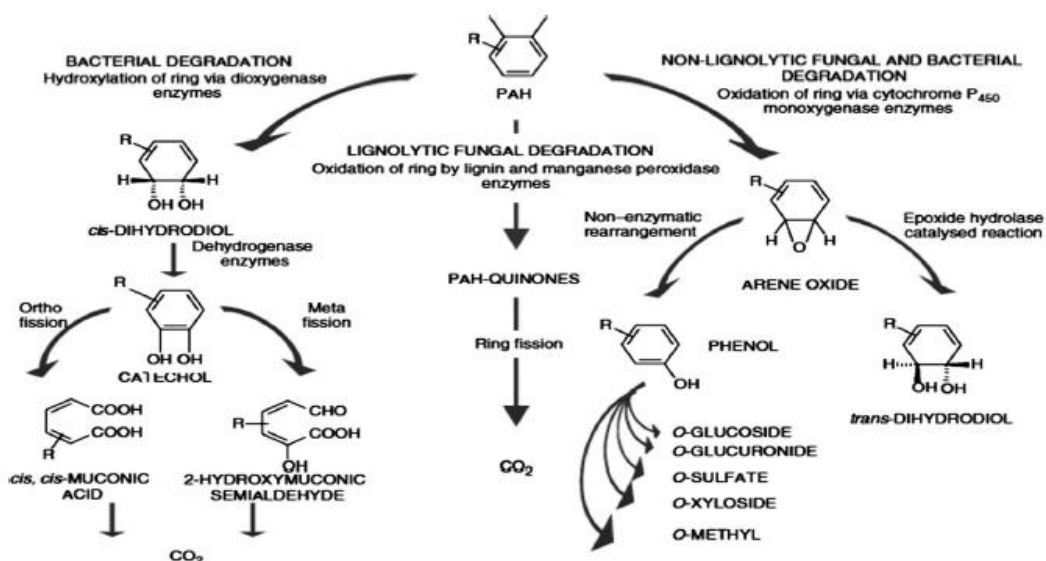
Έχουν χαρακτηριστεί πολλά γονίδια που κωδικεύουν ένζυμα του καταβολισμού των PAHs. Τα γονίδια αυτά οργανώνονται σε οπερόνια, τα οποία εντοπίζονται είτε στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου είτε σε μεγάλα καταβολικά πλασμίδια. Η ανάλυση των γονιδίων αυτών είναι πολύ σημαντική τόσο σε θεμελιώδη όσο και σε εφαρμοσμένα επίπεδα. Η θεμελιώδης γνώση της λειτουργίας των γονιδίων αυτών σε διαφορετικά είδη βακτηρίων θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών αλλά και τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων κάποια βακτήρια προσαρμόστηκαν στα ξενοβιοτικά. Σε εφαρμοσμένα πλαίσια, οι γενετικές αυτές πληροφορίες συντελέσουν σημαντικά στην καταγραφή των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε ρυπασμένες περιοχές αλλά και στο να κατασκευαστούν βακτήρια (με τις μεθόδους της Γενετικής Μηχανικής) με σκοπό την ανάπτυξη στρατηγικών βιοεξυγίανσης (Sakshi & Haritash, 2020).

Β) Μύκητες

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν και μύκητες που έχουν τη δυνατότητα αποδόμησης των PAHs (Sunanda et al., 2023). Αυτοί οι μύκητες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τους μη λιγνινολυτικούς και λιγνινολυτικούς (Εικόνα 1.1.4.).

Οι λιγνινολυτικοί χρησιμοποιούν το σύστημα του κυτοχρώματος P450 για να εισάγουν το οξυγόνο στους PAHs και να προκύψουν έτσι ενδιάμεσα οξείδια αρενίου και είτε μεταβολίζονται περαιτέρω προς σχηματισμό trans-διυδροδιολών, είτε μετατρέπονται μη ενζυμικά σε φαινόλη. Η φαινόλη με τη σειρά της ενώνεται με θειικό ή γλυκουρονικό οξύ είτε με γλυκόζη (Haritash & Kaushik, 2009).

Οι λιγνινολυτικοί μύκητες παράγουν διαλυτά εξωκυττάρια ένζυμα καταβολισμού της λιγνίνης, που περιλαμβάνουν την υπεροξειδάση της λιγνίνης, την υπεροξειδάση εξαρτώμενη από μαγγάνιο, φαινολοξειδάσες (λακάσες, τυροσινάσες), αλλά και ένζυμα που παράγουν H₂O₂. Τα ένζυμα αυτά στερούνται εξειδίκευσης λόγω της ακανόνιστης μοριακής δομής της λιγνίνης.



Εικόνα 1.1.4.: Τα τρία βασικά μονοπάτια αποδόμησης των PAHs από βακτήρια και μύκητες. Υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου με δράσεις διοξυγονασών (βακτήρια), οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου από υπεροξειδάσες λιγνίνης και μαγγανίου (μύκητες, λιγνολυτικά), οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου από μονοοξυγονάσες του κυτοχρώματος P450 (βακτήρια και μύκητες, μη λιγνολυτικά) (Gurta et al., 2015).

Γ) Φύκη

Η αποτελεσματική βιοαποδόμηση των PAHs χρειάζεται το συνδυασμό διάφορων μικροοργανισμών, και τα φύκη δε θα μπορούσαν να αποτελέσουν εξαίρεση. Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά θαλάσσια φύκη είναι γνωστό ότι μεταβολίζουν ναφθαλένιο σε μια σειρά από μεταβολίτες. Άλλα είδη μπορούν να μετατρέψουν το βενζο(α)πυρένιο (BaP) σε διόλες και κινόνες μέσα σε 5-6 μέρες. Σημαντικό στο μεταβολισμό του BaP σε κινόνες φαίνεται να παίζει και το μήκος κύματος του φωτός που απορροφούν, καθώς όσο αυξάνεται η ενέργεια του φωτός από χρυσό φως σε UVA (σε περιοχές που απορροφούν οι PAHs) ακτινοβολία, τόσο αυξάνεται και η παραγωγή κινονών του BaP (Sunanda et al., 2023).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολλά φύκη αποδομούν αποτελεσματικά σαλικυλικό, φαινόλη και φαινανθρένιο (μέχρι και >85%) μόνο όταν καλλιεργηθούν μαζί με κάποια βακτηριακά είδη (*Pseudomonas migulae*, *Sphingomonas yanoikuyae*) και η καλλιέργεια επωαστεί κάτω από συνεχή φωτισμό. Τέτοιες μελέτες αποδεικνύουν συνεργατικές σχέσεις στο μικρόκοσμο βακτηρίων-φυκών (Borde et al., 2003).

Έρευνα που αφορούσε την αποδόμηση φλουορανθενίου, φαινανθρενίου αλλά και συνδυασμού τους από τα φύκη *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* και *Selenastrum capricornutum*, έδειξε ότι η απομάκρυνση των PAHs σχετίζεται με το είδος του μικροοργανισμού. Σε διάστημα 7 ημερών το *S. capricornutum* αποδόμησε το 78% των PAHs ενώ ακολουθεί το *C. vulgaris* που αποδόμησε το 48%. Από την ίδια έρευνα προκύπτει ότι η δυνατότητα απομάκρυνσης είναι μεγαλύτερη όταν τα φύκη καλλιεργούνται στο συνδυασμό των PAHs παρά σε κάθε PAH ξεχωριστά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η παρουσία του ενός PAH δρα καταλυτικά για την αποδόμηση του άλλου (Lei et al., 2007).

Δ) Περιοριστικοί παράγοντες

Εδώ να σημειωθεί ότι μιας και το μεγαλύτερο τμήμα της βιοαποδόμησης γίνεται από βακτήρια, δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα κυρίως στα προβλήματα που αντιμετωπίζονται στη βακτηριακή βιοαποδόμηση.

Παρ' όλες τις έρευνες που έχουν γίνει τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της βιοαποδόμησης η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην εφαρμογή της γνώσης αυτής είναι πολύ περιορισμένη. Οι λόγοι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, όμως η αποτυχία αυτή ίσως να οφείλεται:

- Στη διαλυτότητα των PAHs
- Στη μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο
- Στην έκφραση των καταβολικών γονιδίων
- Στη δραστικότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των PAHs.

Παρακάτω λοιπόν γίνεται μια σύντομη αναφορά στα προβλήματα αυτά και τις στρατηγικές που θα μπορούσαν να βοηθήσουν την αντιμετώπιση τους.

Διαλυτότητα των PAHs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, παράγοντες όπως η υδροφοβικότητα, η πολικότητα και η υδατοδιαλυτότητα παίζουν καθοριστικό ρόλο στο κατά πόσο οι PAHs καθίστανται προσβάσιμοι στους μικροοργανισμούς. Ρυπασμένα εδάφη συνήθως περιέχουν μια ξεχωριστή, μη υδατική υγρή φάση στη μορφή σταγονιδίων ή μεμβράνης. Οι PAHs παραμένουν διαλυμένοι στη φάση αυτή καθώς έχουν μικρή υδατοδιαλυτότητα. Το γεγονός ότι τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διάσπαση εντοπίζονται στο εσωτερικό των βακτηρίων και δεν είναι εκκρινόμενα, υποδεικνύει ότι ο PAH πρέπει να κινητοποιηθεί και να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα πριν μεταβολιστεί. Άρα λοιπόν πρέπει ή οι PAHs να διαλυθούν στην υδατική φάση ή τα βακτήρια να προσκολληθούν στη διεπαφή των δυο φάσεων, ώστε να έχουν άμεση πρόσβαση στην ένωση-στόχο.

Χημικά ή βιολογικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές ουσίες επιτελούν αυτό ακριβώς το έργο. Αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των PAHs μέσω μηχανισμών όπως είναι η γαλακτωματοποίηση της μη υδατικής φάσης, ενίσχυση της υδατοδιαλυτότητας των PAHs ή της κινητοποίησής τους. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι το Tergitol NP-10 και το Tween-80 (Ron & Rosenberg, 2002) αλλά και βιολογικοί γαλακτωματοποιητές όπως αυτοί που παράγονται από το γένος *Acinetobacter* (Rosenberg et al., 1999). Οι βιολογικές επιφανειοδραστικές ουσίες προτιμώνται έναντι των χημικών λόγω του ότι είναι πιο αποδοτικές σε σχέση με το κόστος τους, λιγότερο τοξικές και πιο εύκολα βιοδιασπώμενες (Calvo et al., 2009).

Από τη άλλη πλευρά υπάρχουν και έρευνες που δείχνουν ότι κάποιες τέτοιες ουσίες αναστέλλουν τη βιοαποδόμηση των PAHs (Laha & Luthy, 1992). Ίσως αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι PAHs παγιδεύονται μέσα στα μηκύλια που σχηματίζονται και δεν είναι

προσβάσιμοι στα βακτήρια. Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να λυθεί με την ταυτόχρονη χρήση μικροοργανισμών που παράγουν και εκκρίνουν τις επιφανειδραστικές ουσίες με μικροοργανισμούς που αποδομούν PAHs. Ακόμη καλύτερα, μέσω της χρήσης ενός μόνο μικροοργανισμού που θα έχει την ικανότητα να παράγει βιο-απορρυπαντικά και ταυτόχρονα να αποδομεί PAHs. Οι Garcia-Junko et al. απομόνωσαν ένα τέτοιο στέλεχος, το *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ (García-Junko et al., 2001). Η απομόνωση τέτοιων οργανισμών ή η κατασκευή τους με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής θα είναι μια σημαντική πρόοδος στον τομέα της βιοεξυγίανσης.

Μεταφορά στο εσωτερικό του κυττάρου

Λόγω της μικρής τους υδατοδιαλυτότητας, οι PAHs έχουν την τάση να διαμερισματοποιούνται σε δομές του κυτταρικού τοιχώματος. Οι Miyata et al. και οι Tang et al. αναφέρουν ότι η είσοδος τους στο κύτταρο γίνεται με παθητική μεταφορά κατά μήκος της βαθμίδωσης συγκέντρωσης από το περιβάλλον στο κύτταρο (Miyata et al., 2004; Tang et al., 1998). Η μεταφορά αυτή όμως εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση και η βιοδιαθεσιμότητα του PAH στο περιβάλλον μέσο. Όσο υψηλότερες οι τιμές αυτών των παραγόντων, τόσο μεγαλύτερη και η μεταφορά του PAH στο κύτταρο.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις PAH ή σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του η παθητική μεταφορά μπορεί να μη λειτουργεί αποτελεσματικά, μειώνοντας έτσι την ικανότητα βιοαποδόμησης του μικροοργανισμού, και κατ' επέκταση την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της βιοεξυγίανσης. Το πρόβλημα αυτό φαίνεται όμως να έχει προσπελαστεί από ορισμένα βακτηριακά είδη, τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και συγκεντρώσεις PAHs, αναπτύσσοντας μηχανισμούς όπως η άμεση επαφή με τους PAHs της υδατικής φάσης ή την έκκριση βιο-απορρυπαντικών, όπως προαναφέρθηκε (Tongprim & Pickard, 2011). Σύμφωνα με τους Wick et al. μια άλλη προσαρμογή είναι η ανάπτυξη συστημάτων πρόσληψης υψηλής συγγένειας για κάποιους υδρογονάνθρακες (Wick et al., 2002).

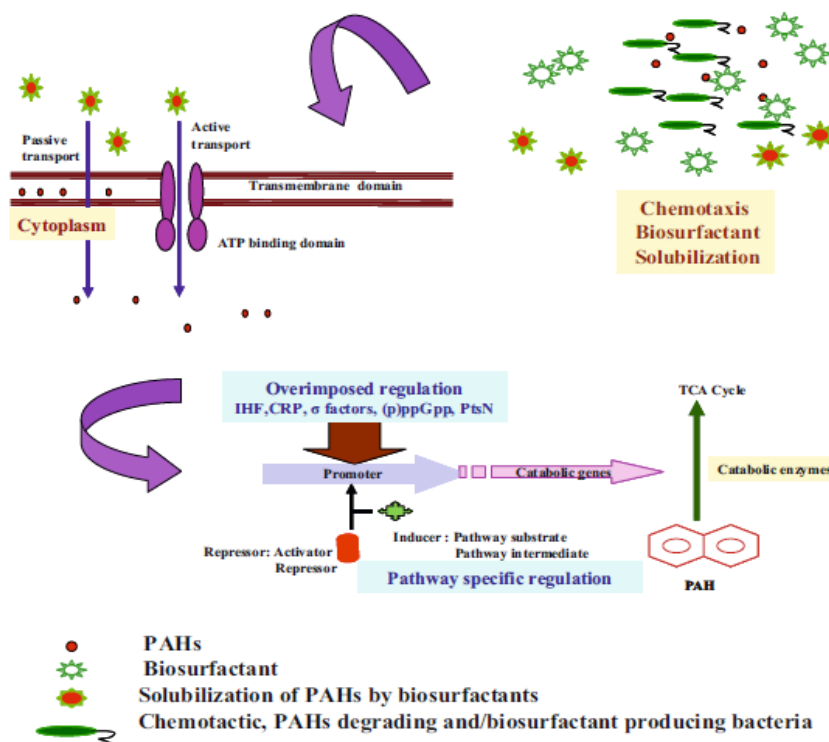
Έκφραση των καταβολικών γονιδίων

Όταν οι PAHs εισέλθουν στο κύτταρο, το επόμενο βήμα είναι να μεταγραφούν τα γονίδια εκείνα που κωδικεύουν για τα απαραίτητα ένζυμα. Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια αυτά είναι επαγόμενα και εκφράζονται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Ο επαγωγέας είναι συνήθως το υπόστρωμα της μεταβολικής οδού, ή/και ένα ενδιάμεσο. Δομικά ανάλογα των φυσικών τελεστών μπορεί να έχουν επαγωγική δράση αν και τα ίδια δεν αποτελούν υποστρώματα των επαγόμενων καταβολικών ενζύμων. Ο ρυθμιστής μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός ενεργοποιητής παρουσία του επαγωγέα και ως μεταγραφικός καταστολέας απουσία του επαγωγέα (Εικόνα 1.1.5.).

Η μεταγραφή των προαναφερθέντων γονιδίων δεν εξαρτάται μόνο από τα εξειδικευμένα ρυθμιστικά ή επαγωγικά σήματα αλλά και από ανοδικούς μηχανισμούς ρύθμισης που καθορίζουν την ενεργοποίηση μεμονωμένων υποδοχέων μέσω της γενικότερης μεταβολικής και ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Η ρύθμιση αυτή γίνεται μέσω καθολικών ρυθμιστικών μορίων όπως ο IHF (Integration Host Factor), η CRP (cAMP Receptor Protein), παράγοντες σ, η ορμόνη (p)ppGpp κ.α. Ακόμη, ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs μπορούν να δράσουν ρυθμιστικά επί του ρυθμού μεταγραφής είτε επιδρώντας ανασταλτικά στην εξειδικευμένη ρυθμιστική πρωτεΐνη είτε καθορίζοντας την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου (Díaz & Prieto, 2000).

Η προαναφερθείσα έλλειψη στην αποτελεσματική εφαρμογή της βιοεξυγίανσης οφείλεται εν μέρει στην ελλιπή επαγωγή των καταβολικών γονιδίων. Εξωτερική χορήγηση των επαγωγέων δεν είναι ούτε οικονομικά αποδοτική αλλά ούτε και φιλική προς το περιβάλλον. Διάφορες στρατηγικές θα μπορούσαν να εφαρμοστούν για ένα καλύτερο αποτέλεσμα. Μια

προσέγγιση θα ήταν να προσδιοριστούν και να παραχθούν φθηνότεροι και μη τοξικοί επαγωγείς. Μια άλλη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η τοποθέτηση των καταβολικών γονιδίων καθοδικά ενός συνεχώς ενεργού υποκινητή μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Chauhan et al., 2008). Κάτι τέτοιο όμως απαιτεί τη διερεύνηση ενός μεγάλου αριθμού υποψήφιων υποκινητών για να βρεθεί ο πιο αποδοτικός.



Εικόνα 1.1.5.: Γενικό μοντέλο απεικόνισης των κυρίαρχων στρατηγικών που εφαρμόζονται από τα βακτήρια κατά την αποδόμηση των PAHs (Chauhan et al., 2008).

Ενζυμική αποδόμηση των PAHs

Το βήμα που ακολουθεί την έκφραση των καταβολικών γονιδίων, είναι η κατάλυση της αποδόμησης των PAHs από τα ένζυμα που τα γονίδια αυτά κωδικεύουν. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης (Ring Hydroxylating Dioxygenases – RHDs), καταλύουν το αρχικό και βασικότερο βήμα της οξείδωσης των PAHs, με αποτέλεσμα την παραγωγή cis-διυδροδιολών. Μέχρι στιγμής είναι λίγες οι RHDs που έχουν απομονωθεί και έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς, περιλαμβανομένων διοξυγονασών φαινανθρενίου, φθαλικού, ναφθαλενίου, διφενυλίου. Από αυτές μόνο μια διοξυγονάση του ναφθαλενίου που απομονώθηκε από το στέλεχος *Sphingomonas* CHY-1 μπορεί να προσβάλει υποστρώματα μεγέθους μέχρι πέντε αρωματικών δακτυλίων, ενώ οι υπόλοιπες μπορούν να προσβάλουν υποστρώματα μέχρι και τριών δακτυλίων. Από αυτές μόνο μια διοξυγονάση του ναφθαλενίου που απομονώθηκε από το στέλεχος *Sphingomonas* CHY-1 μπορεί να προσβάλει υποστρώματα μεγέθους μέχρι πέντε αρωματικών δακτυλίων, ενώ οι υπόλοιπες μπορούν να προσβάλουν υποστρώματα μέχρι και τριών δακτυλίων (Jouanneau et al., 2016). Η χρήση τέτοιων στελεχών με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων θα μπορούσε να είναι μια προσέγγιση προς αποτελεσματικότερη βιοαποδόμηση. Τέτοια ένζυμα θα μπορούσαν να κατασκευαστούν και με Γενετική Μηχανική.

Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί διάφορες οξειδοαναγωγάσες όπως λακάσες και μονοοξυγονάσες του συμπλέγματος του κυτοχρώματος P450 (CYPs). Οι λακάσες καταλύουν

την οξείδωση ενός ευρέος φάσματος φαινολικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και PAHs. Επειδή η προέλευση τους όμως είναι μυκητιασική δεν είναι εύκολο να εκφραστούν σε βακτήρια. Ακόμη οι γνώσεις μας πάνω στη σχέση δομής-λειτουργίας εξακολουθούν να είναι σχετικά περιορισμένες. Έτσι η καλύτερη εναλλακτική θα μπορούσε να είναι η κατευθυνόμενη εξέλιξη. Πράγματι οι Bulter et al. μετέφεραν ένα γονίδιο λακάσης από το *Myceliophthora thermophila* στο *Saccharomyces cerevisiae* το οποίο υποβλήθηκε σε διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης. Μετά από 10 γύρους, προέκυψε ένα ένζυμο το οποίο είχε 170 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα και υψηλή θερμική σταθερότητα. Η θερμική του σταθερότητα ήταν τέτοια που το ένζυμο ήταν σε θέση να δουλέψει στις υψηλές θερμοκρασίες που χρειάζονται για να αυξηθεί η διαλυτότητα δυσδιάλυτων PAHs (Bulter et al., 2003).

Οι CYPs είναι μια από τις μεγαλύτερες υπεροικογένειες ενζύμων και εκφράζονται στους περισσότερους οργανισμούς. Οι PAHs μπορούν να οξειδωθούν από ένζυμα CYP για να δώσουν κατεχόλες οι οποίες αποδομούνται περαιτέρω από άλλα ένζυμα, περιλαμβανομένων των διοξυγονασών, για τις οποίες θα μιλήσουμε αναλυτικότερα, για να δώσουν αβλαβή προϊόντα που μπορούν να ενσωματωθούν στο βασικό μεταβολισμό του κυττάρου (κύκλος Krebs). Τα αγρίου τύπου CYP παρουσιάζουν χαμηλή δραστικότητα οξείδωσης διάφορων PAHs όπως φαινανθρένιο, φλουορανθρένιο, πυρένιο και βενζο(α)πυρένιο. Κι εδώ έχουν γίνει προσεγγίσεις κατευθυνόμενων μεταλλάξεων για να αυξήσουν την δραστικότητα αυτή, με θετικά αποτελέσματα (Tao et al., 2020; Tazdaït & Salah-Tazdaït, 2021).

Βελτίωση της βιοεξυγίανσης

Ένα πρόβλημα στην εφαρμογή των αποτελεσμάτων του εργαστηρίου στο πεδίο είναι τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης των στελεχών που αποδομούν PAHs στο περιβάλλον. Τα ποσοστά αυτά οφείλονται στη θήρευσή τους από πρώτιστα αλλά και στον ανταγωνισμό που υπάρχει με τα αυτόχθονα είδη για θρεπτικά και δέκτες ηλεκτρονίων. Βασικό λοιπόν είναι το να επιλεγεί το κατάλληλο στέλεχος για *in situ* βιοαποδόμηση. Καλοί υποψήφιοι είναι στελέχη που έχουν απομονωθεί από το ίδιο περιβάλλον στο οποίο και επανεντάσσονται. Αν τα στελέχη αυτά υποστούν γενετική τροποποίηση ώστε να αυξηθούν οι βιοαποικοδομητικές τους ικανότητες, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη χάσουν τις ιδιότητες που τα καθιστούν ανταγωνιστικά στο αρχικό τους περιβάλλον.

Μια άλλη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η αύξηση της χημειοταξίας των μικροοργανισμών. Ως χημειοταξία ορίζεται η ικανότητα των μικροοργανισμών να μεταναστεύουν κάτω από την επίδραση χημικών ουσιών. Θεωρείται ότι η χημειοταξία αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα του βιοδιασπώμενου μορίου. Κύτταρα τα οποία έχουν αυτή την ικανότητα, μπορούν να ανιχνεύουν PAHs που είναι απορροφημένοι στα σωματίδια του εδάφους και μετακινούνται προς αυτούς. Έτσι περιορισμοί στην κίνηση των PAHs λόγω μεγάλου μεγέθους που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν σαν περιοριστικοί παράγοντες της βιοαποδόμησης, προσπερνιόνται. Αν και λίγα είναι μέχρι σήμερα γνωστά για τα γονίδια που αφορούν την ιδιότητα αυτή, ή πλήρης διαλεύκανση αυτών των μηχανισμών θα μπορούσε να μας βοηθήσει να κατασκευάσουμε περισσότερα χημειοτακτικά βακτήρια που αποδομούν PAHs.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η ταυτόχρονη χρήση φυτών και βακτηρίων (κυρίως αυτά που εντοπίζονται στη ριζόσφαιρα) σε ρυπασμένα εδάφη φέρει καλύτερα αποτελέσματα λόγω κυρίως της αύξησης της μεταβολικής δραστηριότητας. Τα φυτά και τα βακτήρια επωφελούνται αμοιβαία. Τα φυτά εκκρίνουν ουσίες που ευνοούν την επιβίωση και τη δράση των μικροβίων, κάτι που οδηγεί σε αυξημένη αποδόμηση των ρυπαντών. Το ριζικό σύστημα βοηθά στη διασπορά των βακτηρίων και τους επιτρέπει να εισέλθουν σε κατά τ' άλλα απροσπέλαστες περιοχές. Από την άλλη τα μικρόβια παράγουν μόρια που λειτουργούν ως

ορμόνες απαραίτητες για την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτών, διαλυτοποιούν άλατα, και συνθέτουν βιταμίνες, σιδηροφόρα και άλλους αυξητικούς παράγοντες. Τέτοιες συμβιωτικές σχέσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για εξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα, τολουένιο, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, ναφθαλένιο και 2,4-δινιτροτολουένιο. Τα βασικότερα είδη που χρησιμοποιούνται είναι των γενών *Pseudomonas*, *Comamonas* και *Burkholderia*. Η επιτυχία της εφαρμογής τέτοιων συμβιωτικών σχέσεων για εξυγίανση της ριζόσφαιρας βασίζεται στην *in situ* επίτευξη υψηλής βιοαποδομητικής ικανότητας των εισαχθέντων βακτηριακών στελεχών. Ο εμβολιασμός φυτών με βακτήρια που αποδομούν ρυπαντές θα μπορούσε να λειτουργήσει θετικά προς την κατεύθυνση υψηλής απόδοσης της φυτοαποδόμησης (Ali et al., 2022).

1.1.5.3 Φυτοεξυγίανση

Η φυτοεξυγίανση (αναφερόμενη επίσης και ως φυτομετατροπή) είναι μια διεργασία κατά την οποία γίνεται *in situ* χρήση φυτών καθώς και των σχετιζόμενων μ' αυτά μικροοργανισμών με σκοπό την απομάκρυνση ή την αποτοξικοποίηση ρυπαντών από ρυπασμένα συστήματα. Η φυτοαποδόμηση αναδεικνύει τη σημαντικότητα των εσωτερικών φυτικών μηχανισμών και διεργασιών στην απομάκρυνση των ρυπαντών από το υπόστρωμα.

Διάφορα αγρωστώδη, ψυχανθή και τροπικά φυτά παρουσιάζουν αυξημένη αποτελεσματικότητα φυτοαποδόμησης με τα τελευταία να ευνοούνται από το βαθύ ριζικό τους σύστημα και την αυξημένη ανεκτικότητα τους σε υψηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων και χαμηλές συγκεντρώσεις άλλων θρεπτικών (Anerao et al., 2022).

Έχει δειχθεί ότι τα φυτά *Festuca arundinacea* και *Panicum virgatum* έχουν τη δυνατότητα να αποδομήσουν το 38% του πυρενίου σε 190 ημέρες (Y. C. Chen et al., 2003). Άλλες έρευνες έχουν υποδείξει την αυξημένη αποδόμηση τόσο του φαινανθρενίου όσο και του πυρενίου με χρήση μονών ή μικτών καλλιεργειών των παραπάνω φυτών σε μολυσμένα εδάφη (Cheema et al., 2010; Chouychai et al., 2009). Οι παραπάνω συγγραφείς συμφωνούν ότι παρουσία *Zea mays*, *Medicago sativa* και *Brassica napus* στις καλλιέργειες αυτές ενισχύουν την απορρόφηση των PAHs από τα ρυπασμένα εδάφη.

Υπάρχει ακόμη πληθώρα εργασιών όπου επιτυγχάνεται σε πιλοτική κλίμακα φυτοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών με τη χρήση φυτών κάνναβης (Gabriele et al., 2023; Rheay et al., 2021; Wu et al., 2021).

1.1.6 Βιοαποδόμηση του φαινανθρενίου

Το φαινανθρένιο είναι ένας LMW-PAH που αποτελείται από τρεις αρωματικούς δακτυλίους συντηγμένους υπό γωνία και απαντάται ως κρυσταλλική ουσία κιτρινωπού χρώματος. Η διάταξη των δακτυλίων του έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία bay- και K- περιοχών τα οποία μετατρέπονται σε καρκινογόνα εποξείδια από το μεταβολισμό των θηλαστικών. Μπορεί επίσης να προκαλέσει δερματική φωτοευαισθησία, είναι ήπιο αλλεργιογόνο ενώ μελέτες έχουν αποδείξει ότι παρεμποδίζει και κάποιες μορφές διακυτταρικής επικοινωνίας. Εκτός των άλλων, είναι πολύ τοξικό για τα ψάρια και τα φύκη. Είναι πολύ διαδεδομένο στο περιβάλλον λόγω των ανθρωπογενών και των φυσικών διαδικασιών που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Ακόμη το φαινανθρένιο χρησιμοποιείται στη σύνθεση οργανικών ενώσεων όπως παρασιτοκτόνα, μυκητοκτόνα, απορρυπαντικά και βαφές. Λόγω αυτής του της αφθονίας στο περιβάλλον αλλά και των καρκινογόνων ιδιοτήτων του, αποτελεί μοντέλο μελέτης καταβολισμού άλλων, αποδεδειγμένα, καρκινογόνων PAHs όπως το βενζο(α)πυρένιο και βενζο(α)ανθρακένιο (Waigi et al., 2015).

Γενικά, ο καταβολισμός του φαινανθρενίου στα βακτήρια ξεκινάει με δράση διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης στις θέσεις 1,2-, 3,4- και 9,10- του φαινανθρενίου (Εικόνα 1.1.6.).

Δράσεις διοξυγονάσης σε πολλαπλά σημεία είναι κοινές στα *Mycobacterium* sp. και *Sphingomonas* sp. (Kim et al., 2005; Seo et al., 2012).

Η αρχική αντίδραση που κυριαρχεί στα βακτήρια είναι η δράση διοξυγονάσης στις θέσεις 3,4- του φαινανθρενίου. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το *cis*-3,4-διυδροξυ-3,4-διυδροφαινανθρένιο το οποίο μετατρέπεται ενζυμικά σε 3,4-διυδροξυφαινανθρένιο. Η διόλη αυτή καταβολίζεται έπειτα σε 2-(2-καρβοξυ-βινυλ)-ναφθαλένιο-1-καρβοξυλικό οξύ (*ortho*-σχάση) ή 4-(1-υδροξυ-ναφθαλεν-2-υλ)-2-οξο-βουτ-3-ενοϊκό οξύ (*meta*-σχάση). Το προϊόν της *ortho*-σχάσης αποδομείται σε 1,2-διόλη του ναφθαλενίου μέσω 1,2-δικαρβοξυλικού οξέως του ναφθαλενίου και 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ. Και το προϊόν της *meta*-σχάσης όμως καταλήγει σε 1,2-διόλη του ναφθαλενίου ακολουθώντας διαφορετική πορεία (μετατρέπεται πρώτα σε 1-υδροξυ-ναφθαλεν-2-καρβαλδεΐδη πριν γίνει 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ).

Δράση διοξυγονάσης στις θέσεις 1,2- του φαινανθρενίου δίνει *cis*-1,2-διυδροξυ-1,2-διυδροφαινανθρένιο, το οποίο υφίσταται ενζυμική αφυδρογόνωση προς 1,2-διυδροξυφαινανθρένιο. Η διόλη αυτή καταβολίζεται επίσης σε 1,2- διόλη του ναφθαλενίου τόσο μέσω *ortho*- όσο και μέσω *meta*-σχάσης.

Σε γενικές γραμμές οι 1,2- και 3,2-διόλες του φαινανθρενίου υφίστανται *meta*-σχάση λόγω της γρήγορης απομάκρυνσης των 5,6- και 7,8-βενζοκουμαρίνης, αντίστοιχα.

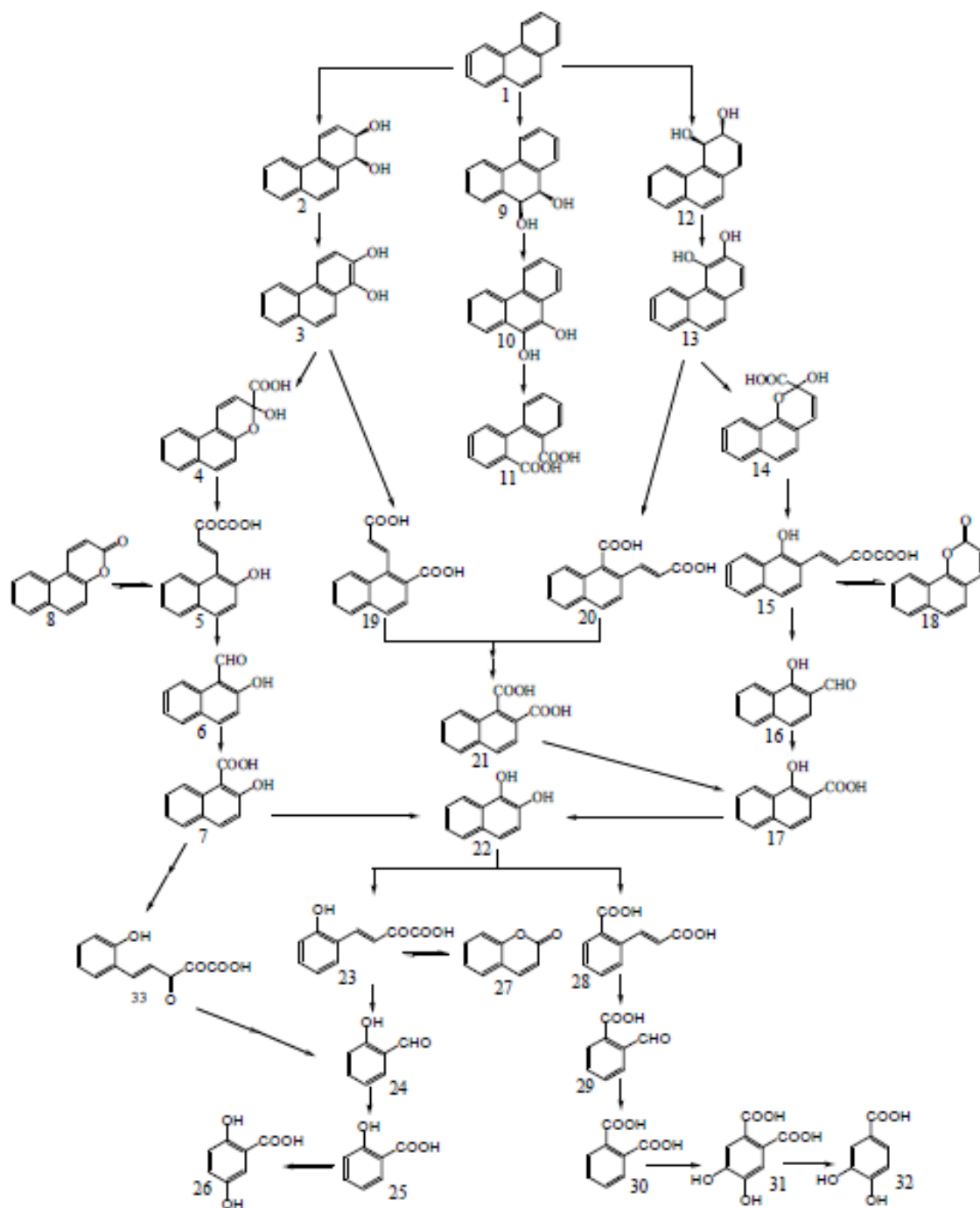
Η 1,2-διόλη του ναφθαλενίου (που έχει προκύψει είτε από 1-υδροξυ-2- είτε από 2-υδροξυ-1-ναφθοϊκό οξύ) είτε ακολουθεί την οδό του φθαλικού οξέως μέσω *ortho*-σχάσης, είτε ακολουθεί την οδό του σαλικυλικού οξέως μέσω *meta*-σχάσης (Seo et al., 2009). Το σαλικυλικό οξύ μετατρέπεται έπειτα είτε σε γεντισικό είτε σε κατεχόλη. Αυτά μεταβολίζονται μέσω μηλόυλο-πυροσταφυλικού οξέος ή 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης αντίστοιχα και εισέρχονται στον κύκλο του Krebs.

Η δράση διοξυγονάσης στις θέσεις 9,10- του φαινανθρενίου δίνει μια *cis*-9,10-διυδροδιόλη του φαινανθρενίου η οποία στη συνέχεια καταβολίζεται σε 2,2'-διφαινικό οξύ. Πρόσφατα βρέθηκε ότι στο βακτηριακό στέλεχος *Mycobacterium aromativorans* JS19b1 το 2,2'-διφαινικό οξύ (αν και με αργούς ρυθμούς) μεταβολίζεται σε διφαινυλο-2-καρβοξυλικό οξύ. Αυτό με τη σειρά του μετατρέπεται σε 2'-υδροξυδιφαινυλ-2-καρβοξυλικό οξύ και έπειτα σε φθαλικό οξύ (Seo et al., 2012).

1.1.7 Πρωτοκατεχοϊκό Οξύ (PCA)

Το PCA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ενδιάμεσο των μεταβολικών πορειών διάφορων αρωματικών ενώσεων (Εικόνα 1.1.7.) όπως τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα που προκύπτουν από τον καταβολισμό της λιγνίνης (βανιλικό και συριγγικό οξύ), ρυπαντών που προέρχονται από ορυκτά καύσιμα (φλουορένιο, φαινανθρένιο κ.α.) αλλά και ξενοβιοτικά που υπάρχουν σε κατασκευασμένα από τον άνθρωπο προϊόντα (φθαλικό οξύ και τα ισομερή του) (Qiu et al., 2023; W. Wang et al., 2010).

Πιο αναλυτικά, η αυξημένη ανάγκη για ανακάλυψη και ανάπτυξη ανανεώσιμων εναλλακτικών πηγών ενέργειας πέραν των ορυκτών καυσίμων τις τελευταίες δεκαετίες, οδήγησε την έρευνα στην κατεύθυνση της εκμετάλλευσης της φυσικής ικανότητας κάποιων μικροοργανισμών να αξιοποιούν ένα μεγάλο εύρος πηγών άνθρακα. Στο πλαίσιο αυτό γίνονται προσπάθειες αποσαφήνισης των μονοπατιών του καταβολισμού της λιγνίνης, του δεύτερου πιο άφθονου φυσικού πολυμερούς. Μικρά αρωματικά μόρια που προκύπτουν από τον αποπολυμερισμό της λιγνίνης έχει βρεθεί ότι είναι αξιοποιήσιμα από το μεταβολισμό κάποιων βακτηρίων σαν πηγές άνθρακα, καθιστώντας τα έτσι ιδανικούς υποψήφιους ως πηγές άνθρακα στην βιοτεχνολογική παραγωγή μιας πληθώρας χημικών ενώσεων. Τέτοια αρωματικά μόρια αποτελούν το φερουλικό και το βανιλικό οξύ, ενδιάμεσο του μεταβολισμού των οποίων είναι το PCA (Barry & Taylor, 2013b; Rafalowski et al., 2023).



Εικόνα 1.1.6.1: Προτεινόμενες καταβολικοί οδοί του φαινανθρενίου από τα βακτήρια. 1: φαινανθρένιο, 2: *cis*-1,2-διυδρόξυ-1,2-διυδροφαινανθρένιο, 3: 1,2-διυδρόξυφαινανθρένιο, 4: 3-υδρόξυ-3H-βενζο[ff]χρωμένιο-3-καρβοξυλικό οξύ, 5: 4-(2-υδρόξυ-ναφθαλεν-1-υλ)-2-οξο-βουτ-3-ενοϊκό οξύ, 6: 2-υδρόξυ-ναφθαλεν-1-καρβαλδεΐδη, 7: 2-υδρόξυ-1-ναφθοϊκό οξύ, 8: 5,6-βενζοκουμαρίνη, 9: *cis*-9,10-διυδρόξυ-9,10-διυδροφαινανθρένιο, 10: 9,10-διυδροξυφαινανθρένιο, 11: 2,2'-διφαινικό οξύ, 12: *cis*-3,4-διυδρόξυ-3,4-διυδροφαινανθρένιο, 13: 3,4-διυδροφαινανθρένιο, 14: 2-υδρόξυ-2H-βένζο[h]χρωμεν-2-καρβοξυλικό οξύ, 15: 4-(1-υδρόξυ-ναφθαλεν-2-υλ)-2-οξο-βουτ-3-ενοϊκό οξύ, 16: 1-υδρόξυ-ναφθαλεν-2-καρβαλδεΐδη, 17: 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, 18: 7,8-βενζοκουμαρίνη, 19: 1-(2-καρβόξυ-βινυλ)-ναφθαλεν-2-καρβοξυλικό οξύ, 20: 2-(2-καρβόξυ-βινυλ)-ναφθαλεν-1-καρβοξυλικό οξύ, 21: ναφθαλεν-1,2-δικαρβοξυλικό οξύ, 22: ναφθαλεν-1,2-διόλη, 23: 2-υδρόξυβενζαλκυροσταφυλικό οξύ, 24: σαλικυλική αλδεΐδη, 25: σαλικυλικό οξύ, 26: γεντισικό οξύ, 27: κουμαρίνη, 28: 2-καρβοξυκιναμικό οξύ, 29: 2-φορμυλβενζοϊκό οξύ, 30: φθαλικό οξύ, 31: διυδροξυφθαλικό οξύ, 32: πρωτοκατεχοϊκό οξύ, 33: *trans*-2,3-διοξο-5-(2'-υδροξυφαινυλ)πεντ-4-ενοϊκό οξύ (Seo et al., 2012).

Από την άλλη πλευρά, ένα μεγάλο πρόβλημα των τελευταίων δεκαετιών, όσον αφορά την ρύπανση, αποτελούν οι εστέρες του φθαλικού οξέος (PETs, PBATs). Οι χημικές αυτές ενώσεις αποτελούν κάποιους από τους πιο συχνά απαντώμενους οργανικούς ρυπαντές στο περιβάλλον. Οι εστέρες του φθαλικού χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή και επεξεργασία πλαστικών από τη δεκαετία του '30 και εντοπίζονται επίσης ως πρόσθετα σε μπογιές, λιπαντικά, συγκολλητικές ουσίες, εντομοκτόνα, συσκευασίες αλλά και καλλυντικά. Ακόμη απελευθερώνονται σταδιακά από εργοστασιακά προϊόντα κατά την παραγωγή, αποθήκευση, χρήση και απόρριψη τους. Η παγκόσμια παραγωγή φθαλικών έχει αυξηθεί κατακόρυφα παγκοσμίως από 1,8 εκατομμύρια τόνους το 1975 σε πάνω από 8 εκατομμύρια τόνους το 2011. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι πλαστικά με βάση αυτούς τους εστέρες παράγονται πλέον σε ποσότητες της τάξεως των εκατοντάδων κυβικών τόνων παγκοσμίως και μόνο ένα πάρα πολύ μικρό μέρος τους παράγεται από ανανεώσιμες πηγές (4Mt) (Gómez-Álvarez et al., 2022). Αυτό που καθιστά το πρόβλημα πιο σοβαρό είναι ο χαμηλός ρυθμός φωτοαποδόμησης και υδρόλυσης αυτών των ρυπαντών με χρόνους ημιζωής κάποιων εξ αυτών από 3 έως 2000 χρόνια. Μετρήσιμες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στον αέρα, στο πόσιμο νερό, στο έδαφος και στους πυθμένες, στα λύματα αλλά και στην οικιακή σκόνη (D. W. Gao & Wen, 2016). Μέρος της λύσης θα μπορούσε να αποτελέσει η πιο εκτεταμένη χρήση βιοπλαστικών. Οι μονομερείς δομικοί λίθοι των βιοπλαστικών (όπως τα δικαρβοξυλικά οξέα πυριδίνης – PDGAs), σε αντίθεση με αυτούς που έχουν ως βάση πετρελαιοειδή και εστέρες του φθαλικού, προέρχονται από συντίθενται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες όπως η λιγνίνη που αναφέρθηκε προηγουμένως (Pellis et al., 2019).

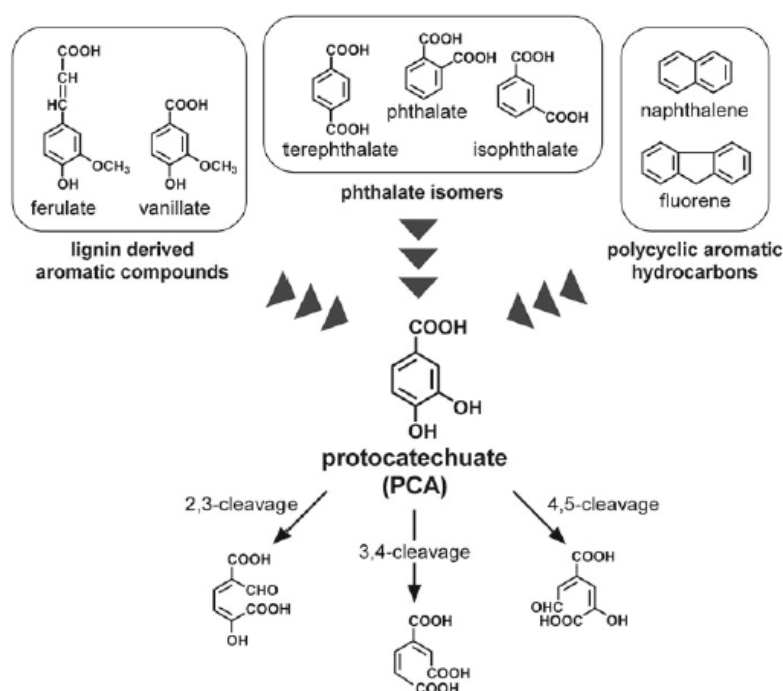
Τέλος, όπως αναπτύχθηκε και ανωτέρω, οι PAHs αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα λόγω της δυσκολίας απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον και τα προβλήματα που δημιουργούν τόσο σε αυτό όσο και στην υγεία του ανθρώπου (καρκινογόνες ιδιότητες και τοξικότητα). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6 το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποτελεί ενδιάμεσο και του καταβολισμού των PAHs.

Είναι γνωστό ότι το PCA αποδομείται μέσω τριών διαφορετικών καταβολικών οδών:

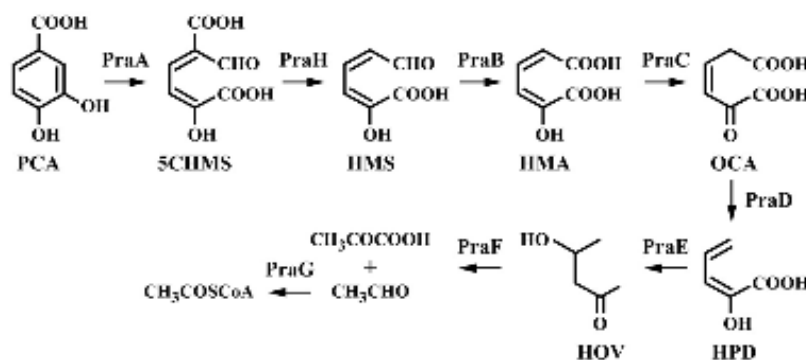
- 2,3-σχάση του PCA (Crawford et al 1979)
- 3,4-σχάση του PCA (Harwood & Parales 1996)
- 4,5-σχάση του PCA (Dagley et al 1960)

Στην περίπτωση της **2,3-σχάσης (meta-σχάση)**, το PCA κόβεται από μια 2,3-διοξυγονάση για να σχηματίσει 5-καρβόξυ-2-καρβοξυμουκονικό-6-ημιαλεϋδη (5CHMS). Η 5CHMS αποκαρβοξυλιώνεται σε 2-υδρόξυμουκονικό-6-ημιαλεϋδη (HMS) η οποία μέσα από μια

σειρά βημάτων (Εικόνα 1.1.8) μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και ακέτυλο-coA (Kasai et al., 2009)

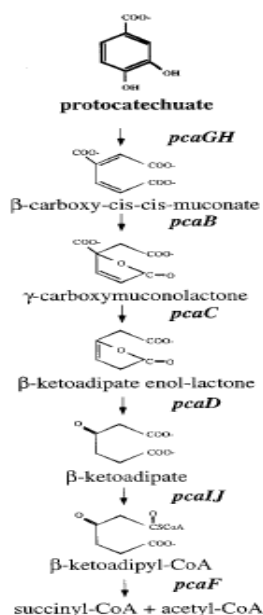


Εικόνα 1.1.7.: Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ως μεταβολικό ενδιάμεσο διαφόρων αρωματικών ενώσεων και ο περεταίρω μεταβολισμός του. Το PCA αποτελεί μεταβολικό ενδιάμεσο σε πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων που προκύπτουν από τη λιγνίνη, καταβολισμού ισομερών του φθαλικού οξέος αλλά και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Kamimura & Masai, 2014).



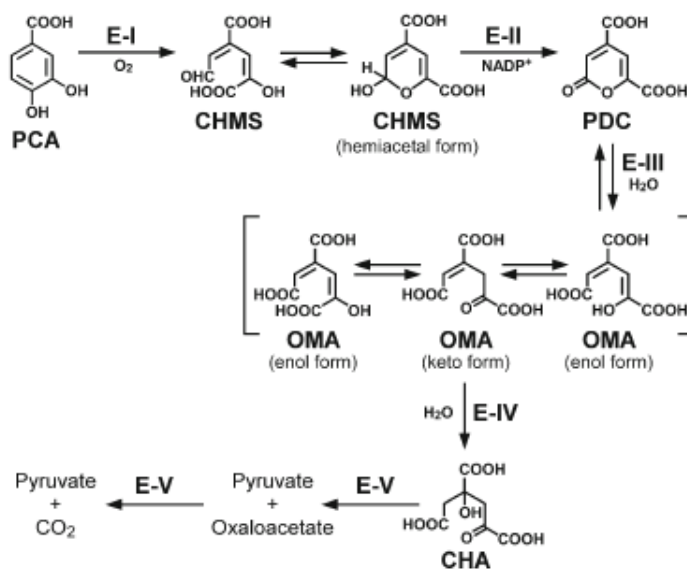
Εικόνα 1.1.8.: Η οδός της 2,3-σχάσης του PCA. PraA: 2,3-διοξυγονάση του PCA, PraH: αποκαρβοξυλάση της 5CHMS, PraB: αφυδρογονάση της HMS, PraC: ταυτομεράση του 4-οξαλοκροτονικού (OCA), PraD: αποκαρβοξυλάση του OCA, PraE: υδρατάση του 2-οξοπεντ-4-ενοϊκού (HPD), PraF: αλδολάση του 4-υδρόξυ-2-κετοβαλερικού (HOV), PraG: αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης (Kasai et al., 2009).

Στην οδό της 3,4-σχάσης (*ortho*-σχάση, επίσης γνωστή και ως οδός β-κετοαδιπικού), το PCA μετατρέπεται σε β-καρβόξυ-μουκονικό οξύ από την 3,4-διοξυγονάση του PCA, το οποίο μετατρέπεται σε γ-καρβόξυμουκονολακτόνη (CML) από μια λακτονάση. Η CML καταλήγει σε β-κετοαδιπικό οξύ, το οποίο αποτελεί και βασικό ενδιάμεσο στο μεταβολισμό PAHs τόσο από ευκαρυωτικούς όσο και από προκαρυωτικούς οργανισμούς. Το β-κετοαδιπικό μετατρέπεται τέλος σε ηλεκτρυλο-coA και ακέτυλο-coA (Εικόνα 1.1.9) (Harwood & Parales, 1996).



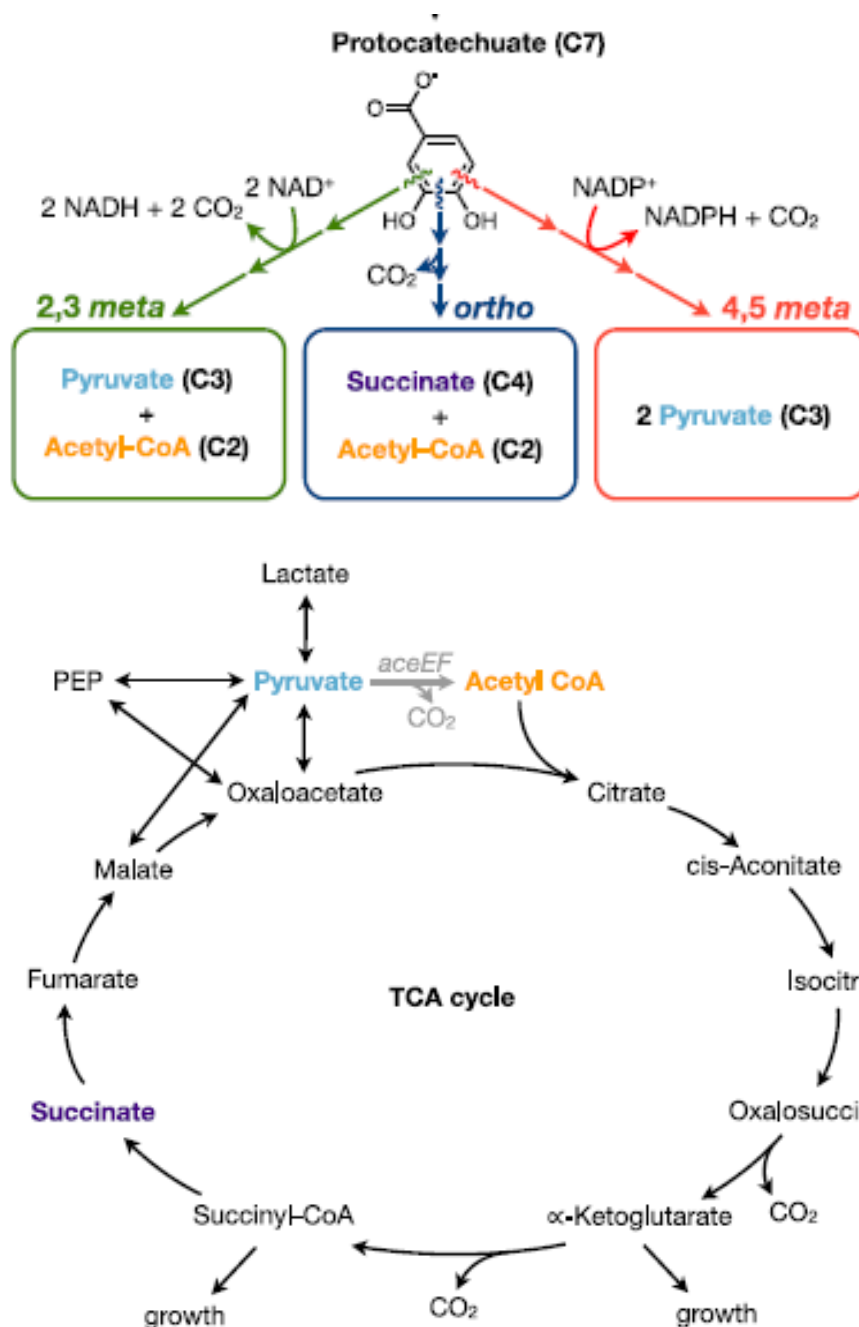
Εικόνα 1.1.9: Η οδός της 3,4-σχάσης του PCA. *pcaGH*: 3,4-διοξυγονάση του PCA (α και β υπομονάδες), *pcaB*: κυκλοϊσομεράση του 3-καρβόξυμουκονικού, *pcaC*: αποκαρβοξυλάση της CML, *pcaD*: υδρολάση της β-κετοαδιπικ-ενόλ-λακτόνης, *pcaIJ*: τρανσφεράση του ηλέκτρυλο-coA (α και β υπομονάδες), *pcaF*: τρανσφεράση του ακέτυλο-coA (Buchan et al., 2000).

Κατά την **4,5-σχάση (meta-σχάση)** του PCA, μια 4,5-διοξυγονάση το μετατρέπει σε 2-υδροξυμουκονο-6-ημιαλδεΐδη (CHMS). Ακολουθεί μια μη ενζυμική μετατροπή σε μια ενδομοριακή μορφή ημιακετάλης και μια οξείδωση από την αφυδρογονάση της CHMS. Προκύπτει ένα 2-πυρόνο-4,6-δικαρβοξυλικό (PDC) υδρολύεται από μια υδρολάση του PDC και δίνει ταυτομερή 4-οξαλομεσακονικού (OMA) τα οποία βρίσκονται σε ισορροπία. Μια υδρατάση μετατρέπει το OMA σε 4-καρβόξυ-4-υδρόξυ-2-οξοαδιπικό (CHA) το οποίο τελικά δίνει δύο μόρια πυροσταφυλικού (Εικόνα 1.1.10) (Kamimura & Masai, 2014).



Εικόνα 1.1.10: Η οδός της 4,5-σχάσης του PCA. Ένζυμα: E-I, 4,5-διοξυγονάση του PCA. E-II, διυδρογονάση της 4-καρβόξυ-2-υδρόξυμουκονικής-6-ημιαλδεΐδης (CHMS). E-III, υδρολάση του 2-πυρον-4,6-δικαρβοξυλικού (PDC). E-IV, υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού (OMA). E-V, αλδολάση του 4-καρβόξυ-4-υδρόξυ-2-οξοαδιπικού (CHA) / αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού (Kamimura & Masai, 2014).

Εν κατακλείδι, τα τελικά προϊόντα των τριών οδών σχάσης του PCA εισέρχονται στον κύκλο των καρβοξυλικών οξέων (TCA κύκλος), που αποτελεί τμήμα του βασικού μεταβολισμού των κυττάρων (Εικόνα 1.1.11). Επιγραμματικά, η 2,3-σχάση έχει ως τελικά προϊόντα ένα μόριο πυροσταφυλικού και ένα μόριο ακέτυλο-coA, η 3,4-σχάση ένα μόριο ηλεκτρικού και ένα μόριο ακέτυλο-coA και η 4,5-σχάση 2 μόρια πυροσταφυλικού (C. W. Johnson & Beckham, 2015b).



Εικόνα 1.1.11: ortho- και meta- σχάσεις του PCA. Κάποια αρωματικά μόρια αποδομούνται αερόβια μέσω οδών που έχουν ως ενδιάμεσο το PCA. Ένζυμα με δραστηριότητα διοξυγονάσης προκαλούν ortho- ή meta-σχάσεις του αρωματικού δακτυλίου του PCA. Τα διαφορετικά προϊόντα των σχάσεων αποδομούνται μέσω επιμέρους οδών (κάθε μια αναπαρίσταται με διαφορετικό χρώμα) και εισέρχονται στον TCA κύκλο ως διαφορετικοί συνδυασμοί των ακέτυλο-coA, ηλεκτρικού και πυροσταφυλικού. aceEF: γονίδιο που κωδικεύει για τμήματα του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, απαραίτητα για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-coA (C. W. Johnson & Beckham, 2015a).

1.2 Διοξυγονάσεις

Μέχρι στιγμής έχει γίνει εκτενής αναφορά στα ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοαποδόμηση. Παρακάτω παρατίθενται κάποιες γενικές πληροφορίες για τα ένζυμα αυτά, καθώς και για το μηχανισμό κατάλυσης τους.

Τα ένζυμα που έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το O_2 χωρίζονται σε δυο γενικές κατηγορίες:

- **Οξυδάσες**, οι οποίες χρησιμοποιούν το ατομικό οξυγόνο ως αναγωγικό και το ανάγουν σε H_2O_2 ή H_2O
- **Οξυγονάσες**, οι οποίες ενσωματώνουν άτομα οξυγόνου από το O_2 στα εκάστοτε προϊόντα. Οι οξυγονάσες μπορούν να ταξινομηθούν περεταίρω σε **μονοοξυγονάσες**, οι οποίες ενσωματώνουν το ένα άτομο του O_2 στο προϊόν και στις **διοξυγονάσες** οι οποίες ενσωματώνουν και τα δυο άτομα (Bugg, 2003; Imam et al., 2022).

Όπως αναφέρθηκε οι οξυγονάσες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην βιοαποδόμηση των PAHs ακολουθώντας είτε αερόβιες είτε αναερόβιες στρατηγικές κατάλυσης. Οι στρατηγικές αυτές περιλαμβάνουν δυο κομβικά βήματα: α) την ενεργοποίηση του θερμοδυναμικά σταθερού βενζοϊκού δακτυλίου και β) την επακόλουθη σχάση του. Στον αερόβιο καταβολισμό, οξυγονάσες ενεργοποιούν τον αρωματικό δακτύλιο εισάγοντας σε αυτόν υποκατάστατα που περιέχουν οξυγόνο (π.χ. υδροξυλομάδες). Έπειτα το βήμα την σχάσης καταλύεται από διοξυγονάσες σχάσης του αρωματικού δακτυλίου (ring-cleaving dioxygenases) (Vaillancourt et al., 2008).

Μηχανισμοί κατάλυσης

Γενικά οι μικροοργανισμοί ακολουθούν διαφορετική καταβολική οδό ανάλογα με το αρωματικό υπόστρωμα. Θα μπορούσαμε να πούμε όμως ότι ο αερόβιος καταβολισμός των υποστρωμάτων συνήθως προχωρά μέσα από ένα από τέσσερα συγκεκριμένα ενδιάμεσα:

- Κατεχόλη
- Πρωτοκατεχοϊκό
- Γεντισικό
- Υδροκινόνη

Οι διοξυγονάσες που καταλύουν τη σχάση του αρωματικού δακτυλίου κατανέμονται σε δυο επιμέρους κατηγορίες, τις **ενδοδιόλες** και τις **εξωδιόλες**. Οι ενδοδιόλες χρησιμοποιούν μη αιμικό $Fe(III)$ για να πραγματοποιήσουν μια *ortho* (μεταξύ των καταλοίπων υδροξυλίου) σχάση του αρωματικού πυρήνα. Αντίθετα, οι εξωδιόλες χρησιμοποιούν μη αιμικό $Fe(II)$ για να πραγματοποιήσουν *meta* (παρακείμενα των καταλοίπων υδροξυλίου) σχάση του αρωματικού πυρήνα.

Γενικά οι εξωδιόλες φαίνεται να είναι πιο ευέλικτα ένζυμα από τις ενδοδιόλες και να αξιοποιούν ένα μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων. Ίσως η αυξημένη αυτή ευελιξία να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ενδοδιόλες χρειάζονται παρακείμενα υδροξύλια για να δράσουν ενώ οι εξωδιόλες δεν παρουσιάζουν μια τέτοια απαίτηση.

Οι ενδοδιόλες και οι εξωδιόλες δεν παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες ούτε στην αλληλουχία τους, ούτε στη δομή τους. Θεωρούνται λοιπόν ως δυο εξελικτικά διαφορετικές τάξεις πρωτεϊνών. Περαιτέρω αναλύσεις της αλληλουχίας αλλά και της δομής των έως σήμερα γνωστών εξωδιόλες, δείχνουν ότι πρόκειται για ένζυμα τα οποία έχουν την ίδια εξελικτικά οικογένεια.

Αντίθετα με τις ενδοδιόλες, οι εξωδιόλες φαίνεται να ανήκουν σε τρεις τουλάχιστον, εξελικτικά ανεξάρτητες οικογένειες:

- **Τύπου I:** Ανήκουν στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών που αποτελούν χηλικούς παράγοντες γειτονικών οξυγόνων (vicinal oxygen chelate superfamily, VOC). Περιλαμβάνουν ένζυμα με μια και με δυο επικράτειες.
- **Τύπου II:** Οι διοξυγονάσες αυτές αποτελούνται από μια ή δύο διαφορετικές υπομονάδες (PCAD-Memo υπεροικογένεια).
- **Τύπου III:** Πρόκειται για διοξυγονάσες που ανήκουν στην *cupin* υπεροικογένεια.

Μεταξύ των τριών αυτών διαφορετικών οικογενειών δε φαίνεται να υπάρχει κάποιος συσχετισμός όσον αφορά στην εξειδίκευση υποστρώματος και στην εξελικτική τους προέλευση.

Άσχετα με τις εξελικτικές τους διαφορές, φαίνεται να μοιράζονται έναν κοινό, σε γενικές γραμμές, καταλυτικό μηχανισμό. Στο πρώτο βήμα της διαδικασίας κατάλυσης, το υπόστρωμα φαίνεται να προσδένεται στο ιόν του σιδήρου. Η πρόσδεση αυτή προετοιμάζει το ιόν του σιδήρου (το ενεργοποιεί) για την επικείμενη πρόσδεση με το O_2 . Τα επόμενα βήματα δεν είναι τόσο καλά μελετημένα όμως φαίνεται να περιλαμβάνουν μια μεταφορά ηλεκτρονίου από το υπόστρωμα στο O_2 διαμεσολαβούμενη από το ιόν του σιδήρου, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο ημικιόννης-Fe(II)-υπεροξειδίου. Το ενδιάμεσο αυτό δίνει με τη σειρά του ένα ενδιάμεσο σιδήρου-αλκυλουπεροξειδίου το οποίο καταλήγει να μας δώσει μετά από μια σειρά βημάτων ένα μη κορεσμένο ενδιάμεσο λακτόνης και ένα ιόν υδροξειδίου προσδεμένο στον Fe(II). Το τελευταίο υδρολύει το ενδιάμεσο της λακτόνης και μας δίνει το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης (Guzik, Hupert-Kocurek, Sitnik, et al., 2014; Vaillancourt et al., 2008).

1.2.1 4,5-Διοξυγονάση του PCA

Η 4,5-διοξυγονάση του PCA, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, καταλύει τη σχάση του PCA σε CHMS. Ανήκει στην οικογένεια των Τύπου II διοξυγονασών και πρώτη φορά απομονώθηκε και μελετήθηκε από τους Dagley et al. το 1968, οι οποίοι μελέτησαν την 4,5-διοξυγονάση του PCA του *Comamonas testosteroni*. Βρήκαν ότι το ένζυμο έχει βέλτιστο pH 7,3 και θερμοκρασία 20°C. Με την προσθήκη Fe^{2+} παρουσίασε μεγάλη αύξηση στη δραστηριότητα, ενώ Co^{2+} , Mn^{2+} και Ni^{2+} είχαν ανασταλτική δράση. Το ένζυμο παρουσίαζε μεγάλη αστάθεια καθώς έχανε μεγάλο μέρος της δραστηριότητας του λίγες ώρες μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του. Τέλος πρόκειται για ένα ένζυμο που παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση καθώς δεν φαίνεται να αξιοποιεί εναλλακτικά του PCA υποστρώματα (κατεχόλη, 4-μεθυλκατεχόλη, 2,3-διυδροξυβενζοϊκό, βανιλικό) (Dagley et al., 1968).

Με τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνεί και η έρευνα των Ono et al (1970) με μια 4,5-διοξυγονάση του PCA από *Pseudomonas* sp. Οι Ono et al δούλεψαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 7 αλλά και με Tris-HCl pH 9 καθώς το προϊόν της αντίδρασης παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε αλκαλικά pH. Εδώ ο Fe^{2+} αλλά και το Mg^{2+} παρουσίασαν επαγωγική δράση ενώ Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , HCN, H_2O_2 αλλά και σουλφυδρικοί παράγοντες (PCMB, sodium mersalyl) έδρασαν ως αναστολείς. Ανασταλτική δράση είχαν και το EDTA και η ο-φαινανθρολίνη, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο χρειάζεται Fe^{2+} για να δράσει. Και σ' αυτή την περίπτωση έχουμε να κάνουμε με ένα ασταθές ένζυμο που χάνει μεγάλο μέρος της δραστηριότητας του μετά από κάποιες ώρες. Τέλος το ένζυμο φαίνεται να είναι εξειδικευμένο καθώς αναγνωρίζει μόνο το PCA ως υπόστρωμα (Ono et al., 1970).

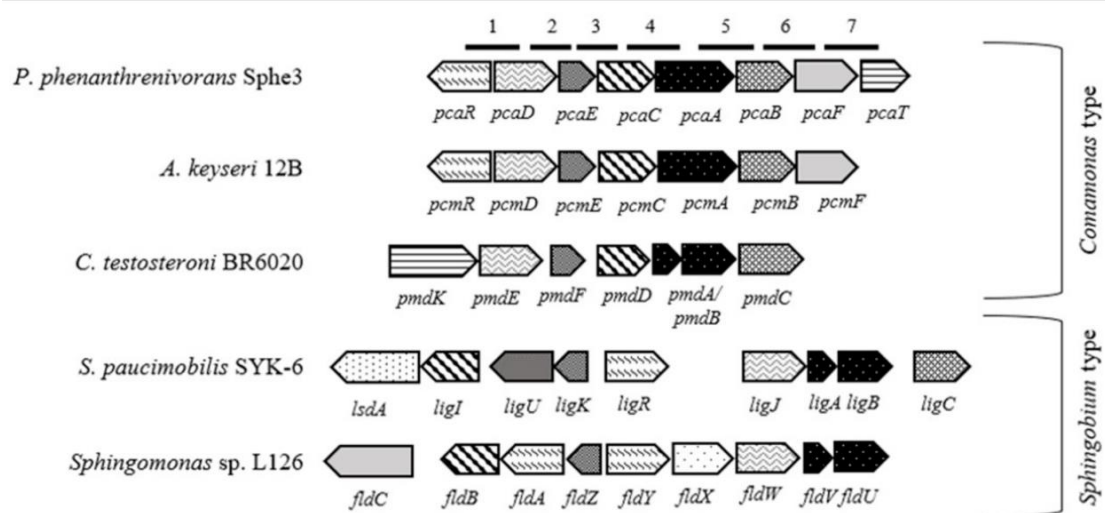
Αρκετά χρόνια αργότερα οι Mampel et al. μελετήσανε μια 4,5-διοξυγονάση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Comamonas testosteroni* T-2. Τα αποτελέσματα δε διαφέρουν πολύ από τις προηγούμενες μελέτες καθώς κι εδώ το ένζυμο έχει βέλτιστο pH

7,5 με τα μεταλλικά ιόντα να έχουν αντίστοιχη δράση. Το K_m της αντίδρασης για PCA είναι 55,5 μM και είναι πολύ κοντά με αυτό που αναφέρανε οι Dagley et al. (46 μM). Η διαφορά εδώ είναι ότι το ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιήσει και το γαλλικό οξύ ως υπόστρωμα, με πολύ μικρότερη όμως συγγένεια σε σχέση με το PCA (Mampel et al., 2005).

Οι Barry and Taylor το 2013 απομονώσανε και μελέτησαν την 4,5-διοξυγονάση του PCA *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 σε αναερόβιες συνθήκες. Κι εδώ το ένζυμο έχει βέλτιστο pH 7,5 και παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για το PCA ($K_m=51 \mu\text{M}$) με δυνατότητα όμως αξιοποίησης και άλλων υποστρωμάτων (γαλλικό, 3-O-μεθυλ-γαλλικό, 3,4-διυδροξυβενζαμίδιο, ομοπρωτοκατεχοϊκό, κατεχόλη και 3,4-διυδροξυβενζονιτρίλιο (Barry & Taylor, 2013b).

Τέλος, στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής μου διατριβής μελετήθηκε η 4,5-διοξυγονάση του PCA (PCD45) από το στέλεχος *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe. Και αυτή η PCD45 όπως και εκείνη του *Pseudomonas* sp που μελετήθηκε από τους Ono et al, έχει βέλτιστη δραστηριότητα στα πιο αλκαλικά pH 9 – 9,5 και σε θερμοκρασία 20°C ενώ παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια για το PCA με $K_m^{PCA} = 21 \mu\text{M}$ (Tsagogiannis et al., 2021).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα που συμμετέχουν στην οδό της 4,5-σχάσης του PCA έχουν απομονωθεί από το *Sphingobium* sp. strain SYK-6 (Noda et al., 1990) το *Sphingomonas* sp. strain LB126 (Wattiau et al., 2001), το *C. testosteroni* BR6020 (Providenti et al., 2001), *P. straminea* NGL1 (Maruyama et al., 2014), *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton, 2001), το *C. testosteroni* T-2 (Mampel et al., 2005) και το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 (Tsagogiannis et al., 2021). Η οργάνωση της συστάδας γονιδίων της οδού της 4,5-σχάσης του PCA μπορεί να χωριστεί σε δυο κατηγορίες: *Sphingobium* και *Comamonas*. Στην κατηγορία *Sphingobium* τα γονίδια φαίνεται να οργάνωνονται σε τρεις μεταγραφικές μονάδες ενώ στην κατηγορία *Comamonas*, τα γονίδια φαίνεται να αποτελούν ένα οπερόνιο (Εικόνα 1.2.1)(Kamimura & Masai, 2014; Tsagogiannis et al., 2021)



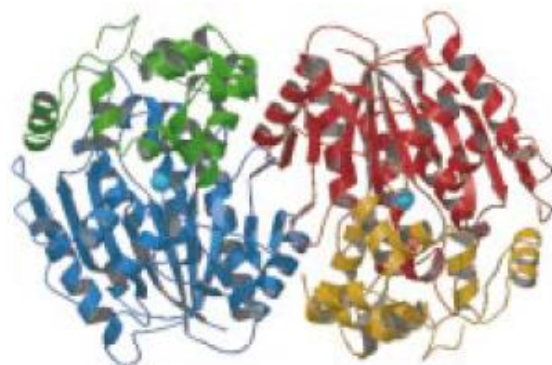
Εικόνα 1.2.1: Σύγκριση της οργάνωσης των γονιδίων της οδού της 4,5-σχάσης του PCA σε διάφορα βακτήρια.

Γονίδια: α-υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του PCA τα *ligA*, *fldV*, *pmdA*, *pmdAII* και *proOa*. β-υπομονάδα τα *ligB*, *fldU*, *pmdB*, *pmdBII* και *proOb*. 4,5-διοξυγονάση του PCA το *pcaA*. Υδρογονάση της 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονικό-6-ημιαλδεΐδης τα *ligC*, *pmdC*, *proD*, *pcaB*. Υδρολάση του 2-πυρόνη-4,6-δικαρβοξυλικού τα *ligI*, *fldB*, *pmdD*, *proL*, *pcaC*. Υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού (OMA) τα *ligJ*, *fldW*, *pmdE*, *proH*, *pcaD*. Αλδολάση του 4-καρβόξυ-υδροξυ-2-οξαδιπικού τα *ligK*, *fldZ*, *pmdF*, *proA*, *pcaE*. Ταυτομεράση του OMA τα *ligU* (*orf1*), *fldA*, *pmdU*, *proX*. Ρυθμιστικό γονίδιο το *ligR*. Πιθανά ρυθμιστικά τα *fldY* και *pcaR*. Πιθανός μεταφορέας PCA τα *pmdK*

και *proT*. Πιθανό γονίδιο *lignostilbene* α,β -διοξυγενάσης το *IsdA*. Πιθανό γονίδιο αλκοολικής διυδρογονάσης *fldC* και *pctmF* (Tsagogiannis et al., 2021).

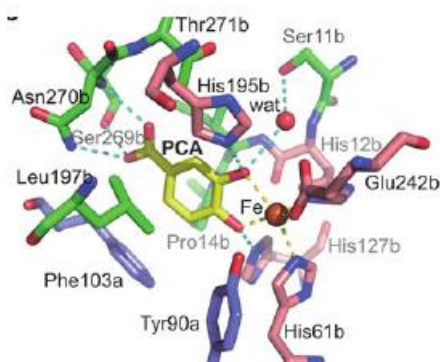
Οι περισσότερες 4,5-διοξυγονάσες που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής αποτελούνται από μια μικρή (α) και μια μεγάλη (β) υπομονάδα σε $\alpha_2\beta_2$ ετεροτετραμερή διάταξη (Sugimoto et al., 1999). Υπάρχουν όμως και 4,5-διοξυγονάσες του PCA, όπως αυτή του *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370, που αποτελεί ομοδιμερές μιας υπομονάδας (Y. P. Chen & Lovell, 1994). Οι διοξυγονάσες των *A. Keyseri* και *P. phenanthrenivorans* Sph3 από την άλλη αποτελούνται επίσης από μια υπομονάδα, όμως φέρει περιοχές που αντιστοιχούν στις α - και β - υπομονάδες των λοιπών διοξυγονασών, στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα (Eaton, 2001; Tsagogiannis et al., 2021).

Οι Sugimoto et al. κατάφεραν να απεικονίσουν την κρυσταλλική δομή της LigAB (4,5-διοξυγονάση) του *S. raucimobilis* SYK-6. Η μεγαλύτερη β -υπομονάδα αποτελείται από 302 κατάλοιπα αμινοξέων που σχηματίζουν μια σφαιρική α/β δομή η οποία αποτελείται από 11 β επιφάνειες, 9 α έλικες και μια 3_{10} έλικα. Η α -υπομονάδα αποτελείται από 139 αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν 10 α -έλικες (Εικόνα 1.2.2) (Sugimoto et al., 1999).



Εικόνα 1.2.2: Κρυσταλλική δομή της LigAB του *S. raucimobilis* SYK-6. Οι β -υπομονάδες απεικονίζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα ενώ οι α -υπομονάδες με πράσινο και κίτρινο. Οι γαλάζιες σφαίρες είναι τα ιόντα σιδήρου που αλληλεπιδρούν με το ένζυμο (Sugimoto et al., 1999).

Το ενεργό κέντρο περιέχει ένα μη αιμικό Fe που βρίσκεται σε συντονισμό με τα αμινοξικά κατάλοιπα His-12 β , His-61 β , Glu-242 β (το “ β ” υποδεικνύει ότι ανήκουν στη β -υπομονάδα) και ένα μόριο ύδατος που βρίσκεται σε μια σχισμή της β -υπομονάδας και η οποία καλύπτεται από την α -υπομονάδα (Εικόνα 1.2.3) (Sugimoto et al., 1999).

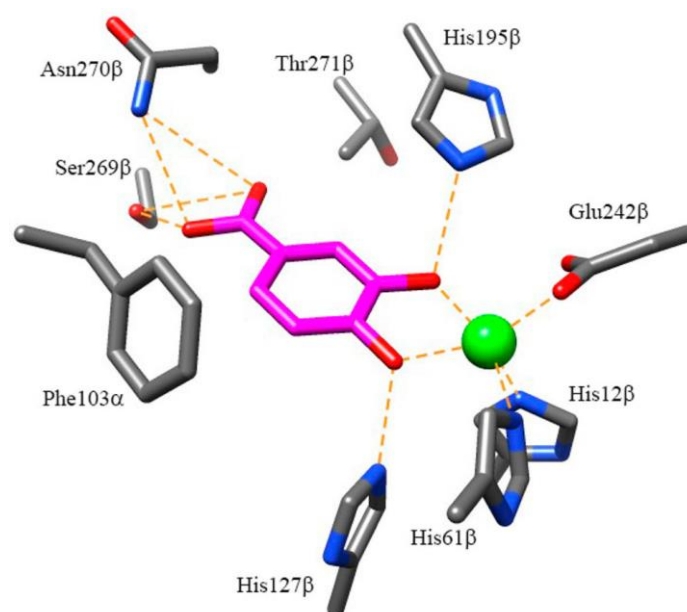


Εικόνα 1.2.3: Διαγραμματική απεικόνιση του ενεργού κέντρου της LigAB αφού έχει προσδέσει το υπόστρωμα PCA. Με ροζ χρωματίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα μεταξύ των Τύπου II διοξυγονασών. Τα κατάλοιπα που προέρχονται από την α -υπομονάδα χρωματίζονται με μπλε. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του PCA και των

αμινοξέων απεικονίζονται με γαλάζιες διακεκομμένες γραμμές ενώ οι δεσμοί του PCA με το ιόν Fe με κίτρινες (Kamimura & Masai, 2014).

Στην καλά μελετημένη LigAB η περιοχή πρόσδεσης (binding pocket) του υποστρώματος είναι μια κοιλότητα που εντοπίζεται στην άνω πλευρά της β-υπομονάδας με 5 Å και οριοθετείται από 4 στροφές (κατάλοιπα 11-15, 58-62, 153-156, 191-197), 2 α-έλικες (κατάλοιπα 126-131, 238-243) και 1 β-κλώνο (κατάλοιπα 270-273). Απουσία υποστρώματος η περιοχή αυτή καταλαμβάνεται από 5 μόρια ύδατος (Sugimoto et al., 1999).

Ο αρωματικός δακτύλιος του PCA συγκεκριμένα αλληλεπιδρά με μια ομάδα υδρόφοβων αμινοξέων της περιοχής αυτής κυρίως μέσω van der Waals αλληλεπιδράσεων: Ile-13β, Pro-14β, Leu-197β, Phe-103α, His-195β και Thr-271β. Η Phe-103α πιο συγκεκριμένα «προστατεύει» τον C5 άνθρακα του υποστρώματος PCA από την επαφή του με τα μόρια του διαλύτη έξω από το ενεργό κέντρο (Sugimoto et al., 1999). Δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των υδροξυλομάδων στις θέσεις 3 και 4 του PCA και των καταλοίπων His-195β και His-127β αντίστοιχα αλλά και των δύο οξυγόνων της καρβοξυλομάδας με τα κατάλοιπα Ser-269β και Asn-270β εξασφαλίζουν στο υπόστρωμα τον κατάλληλο ως προς το ιόν Fe^{2+} προσανατολισμό, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση (Εικόνα 1.2.4) (Sugimoto et al., 1999).



Εικόνα 1.2.4: Διαγραμματική απεικόνιση των αμινοξέων του ενεργού της LigAB που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα PCA και το ιόν Fe^{2+} . Με ροζ απεικονίζεται το υπόστρωμα PCA ενώ η πράσινη σφαίρα αντιστοιχεί στο ιόν $Fe(II)$. Οι πορτοκαλί διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στους σχηματιζόμενους δεσμούς υδρογόνου των αμινοξικών καταλοίπων με τα O του υποστρώματος (Barry & Taylor, 2013b).

Οι 4,5-διοξυγονάσεις που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα φαίνεται να είναι ένζυμα που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη εξειδίκευση για το PCA.

Πιο συγκεκριμένα οι 4,5-διοξυγονάσεις του PCA από τα *Pseudomonas* sp. (Ono et al., 1970) και *Pseudomonas* sp. K82 (Y. P. Chen & Lovell, 1994) αναγνωρίζουν μόνο το PCA ως υπόστρωμα, ενώ τα αντίστοιχα ένζυμα από *C. testosteroni* (Mampel et al., 2005) και *P. phenanthrenivorans* Sphe3 (Tsagogiannis et al., 2021) πέραν του PCA φαίνεται να αναγνωρίζουν και το γαλλικό οξύ (GA). Τέλος η 4,5-διοξυγονάση του PCA από το *S. raucimobilis* SYK-6 (LigAB) φαίνεται να έχει ένα κάπως πιο διευρυμένο σύνολο

υποστρωμάτων, καθώς πέραν του PCA και του GA αναγνωρίζει και το 3,4-διυδροξυβενζαμίδιο και το 3-O-μεθυλγαλλικό (3OMG) αλλά και το ομοπρωτοκατεχοϊκό, το 3,4-διυδροξυβενζονιτρίλιο και την κατεχόλη αλλά με πολύ χαμηλότερη δραστικότητα (μόνο 1% αυτής για το PCA) (Barry & Taylor, 2013).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για τη διεύρυνση των υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν αυτά τα ένζυμα ή να βελτιώσουν τη δραστικότητα ως προς τα υποστρώματα που ήδη αναγνωρίζονται. Στο πλαίσιο αυτό οι Barry et al προέβησαν στην αντικατάσταση της Phe-103α από διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα διαφορετικού μεγέθους και πολικότητας (αλανίνη, σερίνη, θρεονίνη, βαλίνη, λευκίνη και ιστιδίνη) ώστε να βελτιώσουν τη δραστικότητα της LigAB ως προς το GA και το 3OMG (Barry, Cohn, et al., 2015; Barry, Ngu, et al., 2015). Τα μεταλλαγμένα ένζυμα που προέκυψαν διατήρησαν σε γενικές γραμμές τις καταλυτικές τους ιδιότητες (προφίλ pH και θερμοκρασίας) και την ικανότητα πρόσδεσης σιδήρου, καθώς δεν υπήρξε παρέμβαση σε κάποιο αμινοξύ που συμμετέχει είτε στην αντίδραση είτε στην πρόσδεση του ιόντος Fe^{2+} . Παρά το γεγονός ότι η συγγένεια και το k_{cat}/K_m για το PCA μειώθηκαν αρκετά στις περισσότερες περιπτώσεις, στα ένζυμα που έφεραν τις μεταλλάξεις F103H παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου, ειδικά ως προς το 3OMG (Barry, Cohn, et al., 2015). Από τα προαναφερθέντα μεταλλαγμένα ένζυμα οι Barry et al. δεν μπόρεσαν να μελετήσουν τις μεταλλάξεις F103A και F103S καθώς στάθηκε αδύνατος ο καθαρισμός τους μέσω χρωματογραφίας συγγένειας κάτι που, εκτός των άλλων, οδήγησε και στο συμπέρασμα ότι το κατάλοιπο Phe-103α παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του διμερούς (Barry, Cohn, et al., 2015).

Μέχρι τη στιγμή που γράφεται η παρούσα εργασία δεν είναι γνωστές άλλες προσπάθειες διεύρυνσης των υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από την 4,5-διοξυγονάση του PCA. Τέτοιες προσεγγίσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία ενζύμων ικανά να αναγνωρίζουν και άλλα ενδιάμεσα του μεταβολισμού των PAHs.

Στην παρούσα εργασία θα επιχειρηθεί η διεύρυνση των υποστρωμάτων που αναγνωρίζει η PCD45 του Sphe3 μέσω της εισαγωγής σημειακών μεταλλάξεων αμινοξέων που εντοπίζονται στην περιοχή του ενεργού κέντρου και συντελούν στην πρόσδεση του υποστρώματος PCA.

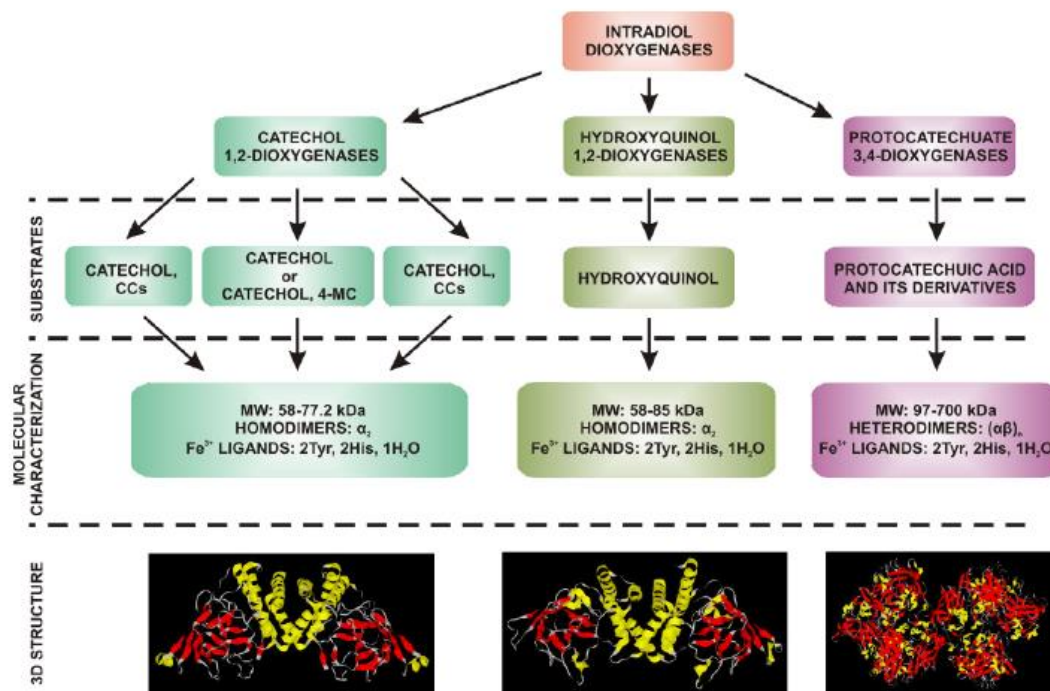
Η PCD45 από το Sphe3, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, φέρει το πλεονέκτημα ότι οι δυο υπομονάδες της συμμεταγράφονται οπότε ο καθαρισμός του ενζύμου που θα φέρει μια αντίστοιχη μετάλλαξη μ' εκείνη που επιχείρησαν να μελετήσουν οι Barry et al. (F103A, F103S), δεν αναμένεται να αποτελέσει πρόβλημα. Επιλέχθηκε λοιπόν η αντικατάσταση της αντίστοιχης Phe-93α με μια αλανίνη. Μια ακόμη μετάλλαξη που θα μελετηθεί είναι η διπλή αντικατάσταση των Val-13β και Pro-14β που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, συμμετέχουν στην πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, με δυο αλανίνες. Και στις δυο περιπτώσεις οι αντικαταστάσεις αναμένεται να δημιουργήσουν περισσότερο χώρο στο ενεργό κέντρο κάτι που ίσως επιτρέψει την πρόσδεση μεγαλύτερων υποστρωμάτων σε αυτό.

1.2.2 3,4 -Διοξυγονάση του PCA

Η 3,4-διοξυγονάση του PCA είναι ένα ένζυμο που καταλύει και αυτή τη σχάση του αρωματικού δακτυλίου του PCA αλλά με διαφορετικό τρόπο απ' ότι οι 4,5-διοξυγονάση, μεταξύ των δύο υδροξυλίων (ortho-σχάση). Πρόκειται δηλαδή για μια διοξυγονάση ενδοδιόλης. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- Τύπου I: οι PCD34 που καταλύουν τη σχάση του αρωματικού δακτυλίου του PCA και παραγώγων του (4-υδροξυβενζοϊκό, βανιλικό, μέθυλπρωτοκατεχοϊκό κ.α.)
- Τύπου II: οι PCD34 που καταλύουν τη σχάση του δακτυλίου ortho διφαινολών με μεγαλύτερους υποκαταστάτες στη θέση-4 του αρωματικού δακτυλίου (κατεχόλη, 4-σουλφοκατεχόλη, 4-νιτροκατεχόλη) (Contzen & Stolz, 2000; Hammer et al., 1996).

Οι Guzik et al. προτείνουν αργότερα την ταξινόμησή τους σε τρεις κατηγορίες: 1,2-διοξυγονάσες της κατεχόλης, 3,4-διοξυγονάσες του PCA και 1,2-διοξυγονάσες της υδροξυκινολής (Εικόνα 1.2.5) (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013).



Εικόνα 1.2.5: Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών των διοξυγονάσων ενδοδιόλης. (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013)

Οι 3,4-διοξυγονάσες του PCD (PCD34s) ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγονάσων μη-αιμικού σιδήρου Fe^{3+} , αποτελούνται από ισομοριακές ποσότητες δύο διαφορετικών α - και β -υπομονάδων και έχουν μοριακό βάρος από 97 έως 700 kDa. Τα ένζυμα αυτά έχουν τετραεδρική δομή με την α -υπομονάδα να αποτελεί την κορυφή του τετραέδρου (Y. P. Chen & Lovell, 1994; Frazee et al., 1993; Guzik, Hupert-Kocurek, Sałek, et al., 2013; Ohlendorf & Vetting, 2006; Sterjiades & Pelmont, 1989). Οι α - και β -υπομονάδες έχουν παρόμοιες τριτοταγείς δομές. Ο πυρήνας κάθε υπομονάδας περιλαμβάνει δύο β -επιφάνειες αποτελούμενες η καθεμία από τέσσερις κλώνους και οι οποίες μεταξύ τους σχηματίζουν μια δομή β -σάντουιτς. Η μια β -επιφάνεια αποτελείται από αντιπαράλληλους κλώνους ενώ η άλλη έχει ανάμικτη τοπολογία. Αυτή η κεντρική δομή του β -σάντουιτς πλαισιώνεται από μια σειρά μικρών ελίκων και μεγαλύτερων ακανόνιστων στροφών. Μια β -επιφάνεια από κάθε υπομονάδα σχηματίζει μέρος της διεπιφάνειας μεταξύ των υπομονάδων και οι γύρω στρόφες σταθεροποιούν το ετεροδιμερές με επιπλέον αλληλεπιδράσεις. Το αμινοτελικό άκρο της α -υπομονάδας εισέρχεται πλήρως εντός της β -υπομονάδας, περνώντας μέσα από την κεντρική δομή β -σάντουιτς αυτής. Παρέχει έτσι μια επιπλέον της τριτοταγούς δομής της

β-υπομονάδας και σχηματίζει παράλληλα το ένα τοίχωμα του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Εικόνα 1.2.6) (Vetting et al., 2000).



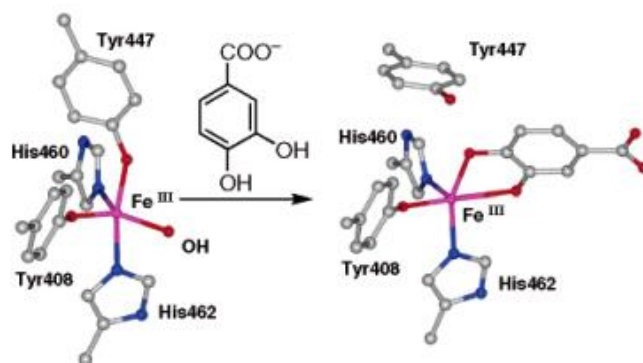
Εικόνα 1.2.6: Μοντέλο τριτοταγούς δομής της PCD34 από το *Acinetobacter baylyi* ADP1 (PDB: 1eo2). Στο παραπάνω μοντέλο με μωβ (πάνω) απεικονίζεται η α-υπομονάδα και με κόκκινο (κάτω) η β-υπομονάδα ενός λειτουργικού μονομερούς από τη PCD34 του *A. baylyi* ADP1. Η κίτρινη σφαίρα αντιστοιχεί στο ιόν Fe^{3+} του ενεργού κέντρου (Πηγή: κατατεθειμένη τριτοταγής δομή στο <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum>).

Ομοπαράθεση αλληλουχιών α- και β-υπομονάδων από 26 διαφορετικούς μικροοργανισμούς έδειξε ότι οι β-υπομονάδες παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους και άρα είναι πιο συντηρημένες εξελικτικά σε σχέση με τις α-υπομονάδες. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι στην β-υπομονάδα εντοπίζεται και το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρόλα αυτά αμινοξέα της α-υπομονάδας φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα σταθεροποιώντας το στο ενεργό κέντρο. Για παράδειγμα η Arg-133α συμμετέχει στο σχηματισμό ιονικού δεσμού με την καρβοξυλική ομάδα του PCA (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013; Hartnett et al., 1990).

Οι PCD34 από διάφορα βακτηριακά στελέχη δομούνται από διαφορετικό αριθμό αβ πρωτομερών (2-12) και κάθε τέτοιο πρωτομερές έχει κυλινδρικό σχήμα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2.6. Η ελάχιστη καταλυτική μονάδα είναι το προαναφερθέν πρωτομερές σε συνδυασμό με ένα ιόν Fe^{3+} ($\alpha\beta Fe^{3+}$) ενώ έχουν αναφερθεί και πρωτομερή του τύπου $(\alpha\beta)_2 Fe^{3+}$ (Bull & Ballou, 1981; Sterjiades & Pelmont, 1989).

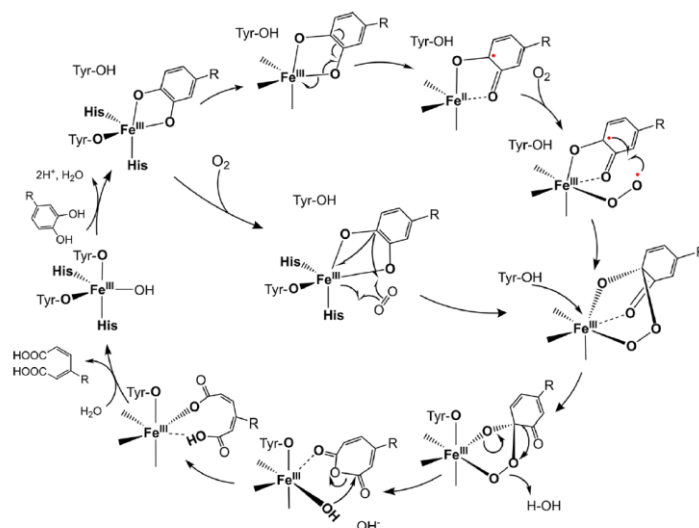
Το ιόν σιδήρου προσδένεται στα αμινοξέα Tyr-408β, Tyr-447β, His-460β και His-462β ενώ αλληλεπιδρά παράλληλα και μ' ένα υδροξύλιο σχηματίζοντας μια τριγωνική διπυραμιδική δομή (Εικόνα 1.2.7) (Guzik, Hupert-Kocurek, Salek, et al., 2013; Hartnett et al., 1990; Kurahashi et al., 2006; Orville et al., 1997a; Petersen et al., 1996).

Η πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο γίνεται μέσω μιας οπής 18*10 Å την οποία σχηματίζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα Arg-123α, Gly-124α, Tyr-69β, Ser-71β και Lys-193β. Τα Arg-123α, Gly-124α και Tyr-69β είναι απολύτως συντηρημένα σε όλες τις PCD34 που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα ενώ και στα υπόλοιπα αμινοξέα που μπορεί να διαφέρουν (Ser-71β, Lys-139β) τηρείται πάντα ο γενικός κανόνας της επικράτησης βασικών αμινοξέων μέσα και γύρω από την περιοχή του ενεργού κέντρου (Vetting et al., 2000).



Εικόνα 1.2.7: Περιοχή πρόσδεσης σιδήρου Fe^{3+} στην PCD34 από το *A. baumannii* ADP1 πριν και μετά τη πρόσδεση του υποστρώματος PCA (Kurahashi et al., 2006).

Ο καταλυτικός μηχανισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA δεν διαφέρει σε τίποτα από τον μηχανισμό της ενδοδιολικής σχάσης του δακτυλίου της κατεχόλης (Elgren et al., 1997; Y. Wang et al., 2017). Κατά την πρόσδεση του υποστρώματος (ως διανιόν) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, η αξονική (axial) Tyr-447β αποδεσμεύεται από το ιόν σιδήρου. Αυτό προκαλεί δομικές μεταβολές στο ενεργό κέντρο και τελικά στη δημιουργία του χηλικού συμπλόκου Fe^{3+} -PCA. Σύμφωνα με τους Vetting et al αυτές οι δομικές μεταβολές διευκολύνουν την αντίδραση του O_2 με το υπόστρωμα (Vetting et al., 2000). Ακολουθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στο O_2 και η πρόσδεση του τελευταίου στο ιόν Fe^{3+} . Η ενεργοποίηση του υποστρώματος για ηλεκτροφιλική προσβολή από το μόριο O_2 , οδηγεί στο σχηματισμό μιας γέφυρας υπεροξειδίου μεταξύ του σιδήρου και του άνθρακα C4 του υποστρώματος. Η σχάση του δεσμού O-O γίνεται μετά τη μεταφορά του ακυλίου (acyl migration) στο υπεροξείδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυκλικού ανυδρίτη και η υδρόλυση αυτού στο τελικό ευθυγραμμισμένο προϊόν 4-καρβόξυ-cis,cis-μουκονικό οξύ (Εικόνα 1.2.8) (Y. Wang et al., 2017).



Εικόνα 1.2.8: Γενικός καταλυτικός μηχανισμός διοξυγονασών ενδοδιόλης. Ο μηχανισμός δράσης των διοξυγονασών αυτών είναι κοινός. Στην περίπτωση της PCD34 το υπόστρωμα είναι το PCA όπου στη θέση της πλευρικής αλυσίδας R υπάρχει μια καρβοξυλομάδα ($-COO^-$) (Y. Wang et al., 2017).

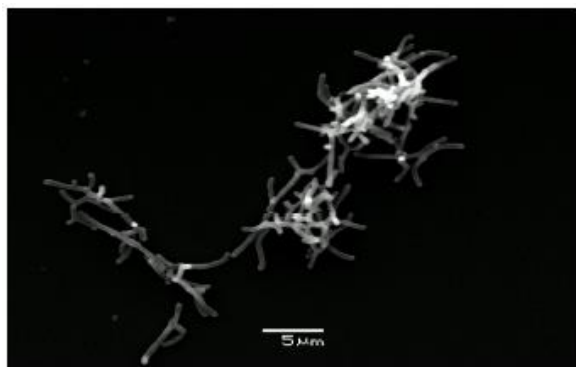
1.3 *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Όπως έχουμε αναφέρει, έχει απομονωθεί ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών με την ικανότητα να αποδομούν επαρκώς PAHs. Μεταξύ αυτών υπάρχουν και πολλά είδη του γένους *Arthrobacter* (Grifoll et al., 1992; Kallimanis et al., 2007; Seo et al., 2006). Στο εργαστήριο μας έχει απομονωθεί το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (πρώην *Arthrobacter*) που έχει την ικανότητα να αποδομεί φαινανθρένιο και ανθρακένιο (Kallimanis et al., 2007). Έρευνες έδειξαν ότι το Sphe3 μπορεί να αποδομήσει και πυρένιο παρουσία των επιφανειοδραστικών ουσιών Tween 20 και 80 αλλά και Triton X-100. Οι ίδιες ουσίες αυξάνουν και το βαθμό αποδόμησης του φαινανθρενίου.

Το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 απομονώθηκε από μια περιοχή της Ηπείρου μολυσμένη με κρεοζτέλαιο (Περίβλεπτος). Η μόλυνση οφείλεται στην παρουσία εγκαταστάσεων επεξεργασίας ξύλου και η οποία λειτουργούσε στην περιοχή για 30 περίπου χρόνια.

Αναμειγνύοντας δείγματα χώματος με ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 (MM-M9) στο οποίο είχε διαλυθεί 0.01 % (w/v) φαινανθρενίου και επωάζοντας τα δείγματα στους 30°C για μια εβδομάδα, απομονώθηκαν τελικά 5 στελέχη (Sphe3-Sphe8) με την ικανότητα να αναπτύσσονται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδικής πηγής άνθρακα. Και τα πέντε στελέχη ανήκαν στο είδος *P. phenanthrenivorans* όπως προέκυψε από 16s rRNA ανάλυση. Τελικά επιλέχθηκε το Sphe3 για περεταίρω μελέτη καθώς σχημάτιζε νωρίτερα από τα υπόλοιπα διαυγείς ζώνες σε τρυβλία MM-M9 επιστρωμένα με φαινανθρένιο (μετά από 2-3 μέρες).

Πρόκειται για ένα θετικό κατά Gram, αερόβιο, μη κινητικό βακτήριο, που παρουσιάζει κυτταρικό κύκλο που κυμαίνεται από βάκιλο σε κόκκο και ανήκει στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων. Έχει μέγεθος κυττάρου περίπου 1,0-1,5*2,5-4,0 μm (Εικόνα 1.3.1). 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 εύρος pH από 6,5 έως 8,5 με τη βέλτιστη τιμή να βρίσκεται στο pH 7,0-7,5. Παρουσιάζει ευαισθησία σε διάφορα αντιβιοτικά όπως αμπικιλίνη (20 mg*I⁻¹), χλωραμφενικόλη (10 mg*I⁻¹), ερυθρομυκίνη (10 mg*I⁻¹), νεομυκίνη (20 mg*I⁻¹), ριφαμικίνη (10 mg*I⁻¹), τετρακυκλίνη (10 mg*I⁻¹).



Εικόνα 1.3.1: Ηλεκτρονική μικρογραφία του *A. phenanthrenivorans* Sphe3 (Kallimanis et al., 2011).

Σε βιοχημικά τεστ που πραγματοποιήθηκαν, παρουσίασε ενεργότητα αμυλάσης, καταλάσης και νιτρικής αναγωγάσης. Αρνητικές ήταν οι δοκιμές για διϋδρολάση της αργινίνης,

γελατινάση, λιπάση, αποκαρβοξυλάση της λυσίνης και της ορνιθίνης, οξειδάσης και ουρεάσης. Ακόμη δεν παρατηρήθηκε ικανότητα αφομοίωσης του κιτρικού, ούτε παραγωγή H_2S . Τέλος δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οξέων παρουσία γλυκόζης, λακτόζης ή σακχαρόζης.

Η περιεκτικότητα σε G+C του στελέχους *Sphe3* προσδιορίστηκε στο 65,7 %, τιμή χαρακτηριστική για το γένος *Arthrobacter* τα οποία έχουν περιεκτικότητα σε G+C 59-70 %.

Πραγματοποιήθηκε επίσης φυλογενετική ανάλυση συγκρίνοντας την αλληλουχία των γονιδίων 16S rRNA και *recA* με άλλα αντιπροσωπευτικά είδη. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε στενή σχέση με τα *A. oxydans* και *A. polychromogenes*. Περεταίρω δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση του *Sphe3* από φυλογενετικά συγγενικά είδη (Πίνακας 1.3.1) (Kallimanis et al., 2009)

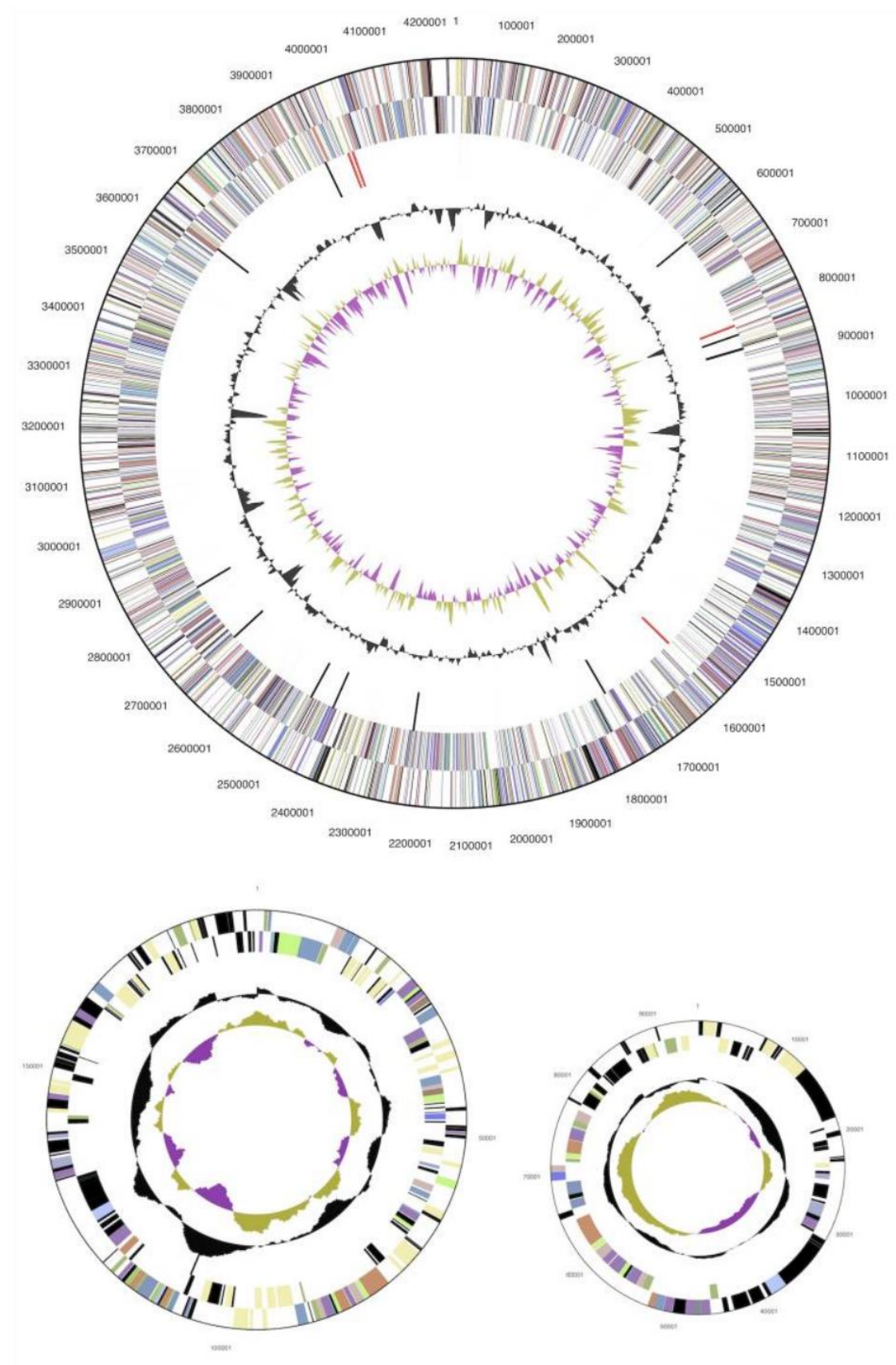
Πίνακας 1.3.1: Διαφορικά χαρακτηριστικά μεταξύ του στελέχους *Sphe3* και τα κοντινότερα συγγενικά είδη του γένους *Arthrobacter* (Kallimanis et al., 2009).

Characteristic	Strain <i>Sphe3</i> ^T	<i>A. oxydans</i>	<i>A. polychromogenes</i>	<i>A. chlorophenicus</i>
Motility	—	—	—	+
Growth with nicotine	+	+	—	+
Xenobiotic compounds allowing growth	Phenanthrene, anthracene	—	—	Phenols
Colony pigmentation on:				
Nicotine agar	Cream to yellow	Blue	NA	Pearl grey
Peptone medium	Cream to yellow	Pearl grey to yellow	Blue	Pearl grey
Biotin requirement	—	+	+	—
Temperature range (°C)	4–37	ND	10–37	3–37
Gelatinase	—	+	+	+
Isolation source	Soil	Tobacco leaves and air	Airborne infection	Soil

Έχει πραγματοποιηθεί πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *Sphe3*. Αποτελείται από ένα χρωμόσωμα μήκους 4.250.414 bp και δύο πλασμίδια (Εικόνα 1.3.2). Ένα μεγάλο, με μήκος 190.450 bp (pASPH301), και ένα μικρό, με μήκος 94.456 bp (pASPH302). Από τα 4.288 γονίδια τα 4.212 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα 76 RNA ενώ αναγνωρίστηκαν και 77 ψευδογονίδια. Το 73,8% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες φαίνεται να επιτελούν γνωστές λειτουργίες ενώ τα υπόλοιπα έχουν επισημανθεί ως «υποθετικές πρωτεΐνες» (Kallimanis et al., 2011).

Το στέλεχος *Sphe3* μπορεί να καταβολίσει σχεδόν πλήρως (90%) φαινανθρένιο σε συγκεντρώσεις μέχρι και 400 mg/l ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας σε ρυθμούς μάλιστα μεγαλύτερους απ' ό,τι έχουν αναφερθεί για άλλα είδη *Arthrobacter*. Το φαινανθρένιο εισέρχεται με δύο τρόπους στα κύτταρα: είτε με **παθητική μεταφορά** σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε γλυκόζη, είτε με **ενεργητική μεταφορά** που επάγεται από φαινανθρένιο και εξαρτάται από πρωτονιοκίνητη δύναμη σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε φαινανθρένιο. Όσο αφορά στο μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς, φαίνεται να παρουσιάζει εξειδίκευση για το φαινανθρένιο με την ικανότητα όμως να αναγνωρίζει κι άλλους PAHs όπως ανθρακένιο και φλουρανθρένιο (Kallimanis et al., 2007).

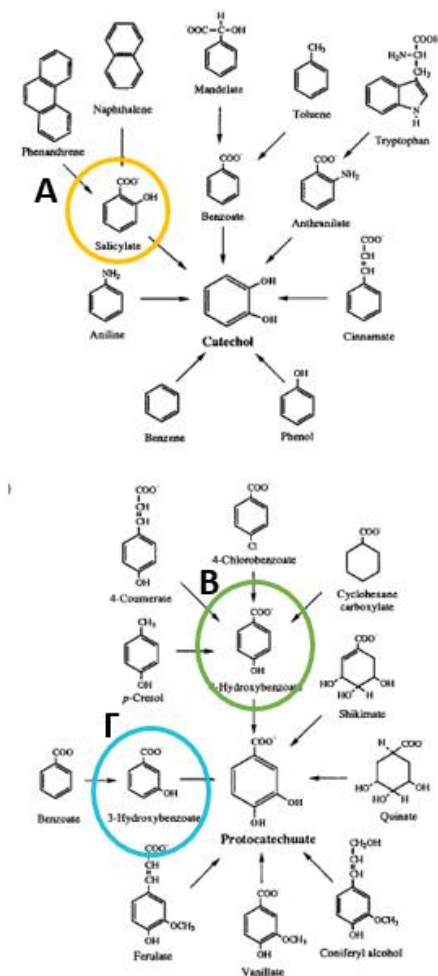
Τέλος, φαίνεται ότι το *Sphe3* υφίσταται μεταβολές στη σταθερότητα και στη διαπερατότητα της κυτταρικής του μεμβράνης ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με σκοπό την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση υποστρωμάτων όπως το φαινανθρένιο. Έτσι παρατηρήθηκαν αλλαγές στη σύσταση φωσφολιπιδίων και λιπαρών οξέων της μεμβράνης σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε φαινανθρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας συγκρινόμενα με κύτταρα που αναπτύσσονται σε γλυκόζη. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πολλών μελετών που έχουν δείξει ότι βακτήρια που έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται παρουσία οργανικών διαλυτών και άλλων στρεσογόνων παραγόντων, αλλάζουν τη σύσταση των λιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης (Kallimanis et al., 2007).



Εικόνα 0.3.2: Χάρτης γονιδιώματος του στελέχους *P. phenanthrenivorans* Sphe3. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το χρωμόσωμα του στελέχους και στο κάτω μέρος τα πλασμίδια rASPHE301 και rASPHE302.

1.4 Καταβολισμός υδροξυβενζοϊκών οξέων.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η βιοαποδόμηση μιας πληθώρας περιβαλλοντικών ρυπαντών, όπως οι PAHs και η λιγνίνη, περνάει από ένα πολύ μικρότερο σύνολο κοινών ενδιάμεσων μεταβολιτών όπως για παράδειγμα τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το PCA, η κατεχόλη και το γεντισικό οξύ (Εικόνα 1.4.1) (Harwood & Parales, 1996; Kamimura & Masai, 2014; Prathibha & Sumathi, 2008).



Εικόνα 0.4.1: Κοινά ενδιάμεσα της βιοαποδόμησης διαφόρων αρωματικών ενώσεων. Με τους κύκλους περιγράφονται συγκεκριμένα τα (A) 2-υδροξυβενζοϊκό οξύ (σαλικυλικό), (B) 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και (Γ) 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Harwood & Parales, 1996).

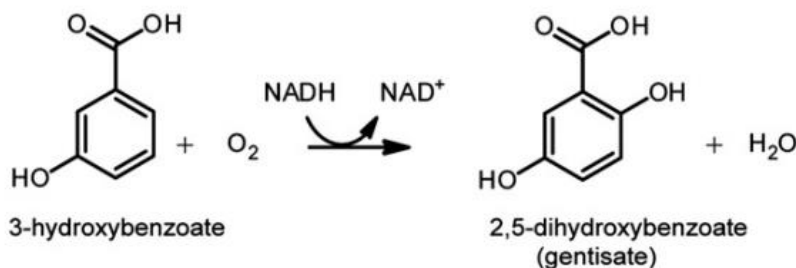
Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα - πέρα από κοινά μεταβολικά ενδιάμεσα – και εστέρες αυτών, αποτελούν καθαυτά περιβαλλοντικούς ρυπαντές καθώς λόγω της όλο και πιο διαδεδομένης χρήσης τους στην κοσμητική και φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και ως συντηρητικά τροφίμων, παρατηρείται εκτεταμένη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον και προκαλούν προβλήματα τόσο στις καλλιέργειες όσο και στην ανθρώπινη υγεία (Prathibha & Sumathi, 2008). Αποτελούν ακόμη σημαντικό τμήμα των ρυπαντών που εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω των βιομηχανικών λυμάτων από βιομηχανίες τροφίμων και ελαιοτριβεία (Waigi et al., 2015)(Di Gioia et al., 2001; Pérez-González et al., 2012; W. Wang et al., 2022).

Διάφοροι μικροοργανισμοί όπως το *Azotobacter chroococcum*, η *Candida parapsilosis*, η *Klebsiella pneumoniae*, διάφορα είδη *Streptomyces* και *Pseudomonas*, έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν τα υδροξυβενζοϊκά οξέα ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας (Prathibha & Sumathi, 2008 και αναφορές). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα υφίστανται μια υδροξυλίωση του αρωματικού τους δακτυλίου από ένζυμα που ονομάζονται μονοοξυγονάσες (ή υδροξυλάσες) προς κοινά μεταβολικά ενδιάμεσα όπως το PCA, το γεντισικό και η κατεχόλη, και ανάλογα με τον μικροοργανισμό ακολουθούνται διαφορετικά μονοπάτια για τον καταβολισμό των ενδιάμεσων αυτών όπως το μονοπάτι του β-κετοαδικοτικού και η *meta*-σχάση του PCA (Errpink et al., 2000; Reddy et al., 2018; Romero-Silva et al., 2013; Westphal et al., 2021; Yao et al., 2023; Yun et al., 2014).

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο καταβολισμός του **2-υδροξυβενζοϊκού οξέος** (2HB, σαλικυλικό) γίνεται είτε μέσω της κατεχόλης είτε μέσω του γεντισικού ανάλογα με τον μικροοργανισμό. Οι μύκητες το καταβολίζουν μέσω πυροκατεχοϊκού οξέος ενώ στο στέλεχος *Pseudaminobacter salicylatoxidans* BN12 παρατηρήθηκε μια ασυνήθιστη απευθείας σχάση του σαλικυλικού μέσω μιας αντίδρασης 1,2-σχάσης του δακτυλίου, προς 2-οξο-3,5-διενεδιοϊκό οξύ (Fuenmayor et al., 1998; Grund et al., 1990; Hintner et al., 2001).

Το **3-υδροξυβενζοϊκό οξύ** (3HB, *m*-υδροξυβενζοϊκό)) είναι μια ευρέως διαδεδομένη ουσία στο περιβάλλον καθώς αποτελεί ενδιάμεσο του καταβολισμού του φυτικού βιοπολυμερούς λιγνίνη (Erickson et al., 2022), αλλά και άλλων διαδεδομένων ρυπαντών όπως διάφοροι PAHs, η *m*-κρεζόλη, αλκυλοφαινόλες όπως η 2,5- και η 3,5-ξυλελόλη και άλλες φαινολικές ενώσεις (X. Gao et al., 2005b; Y. Ren et al., 2014; Sucharitakul et al., 2012; Yao et al., 2023). Το 3HB καταβολίζεται κυρίως μέσω της οδού του γεντισικού και σπανιότερα, μέσω PCA.

Πιο συγκεκριμένα, το 3HB μετατρέπεται σε γεντισικό μέσω μιας υδροξυλάσης, της **3-υδροξυβενζοϊκής-6-υδροξυλάσης (3HB6H)**, που καταλύει την υδροξυλίωση του σε *para*-θέση (X. Chen et al., 2018). Η 3HB6H είναι ένα διμερές που ανήκει στην οικογένεια των φλαβινοεξαρτώμενων οξυγονασών όπου το FAD λειτουργεί ως ο απαραίτητος για την κατάλυση αναγωγικός συμπράγοντας του ενζύμου και η αντίδραση που καταλύεται χαρακτηρίζεται από δύο επιμέρους ημιαντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής: αρχικά το υπόστρωμα 3HB προσδένεται στο ένζυμο και ακολουθεί η πρόσδεση του NADH το οποίο και ανάγει τον συμπράγοντα FAD προς FADH. Το NAD⁺ απελευθερώνεται και μέσω του FADH πραγματοποιείται η υδροξυλίωση του 3HB προς γεντισικό (Εικόνα 1.4.2) (Montersino & Van Berkel, 2012; Sucharitakul et al., 2012).



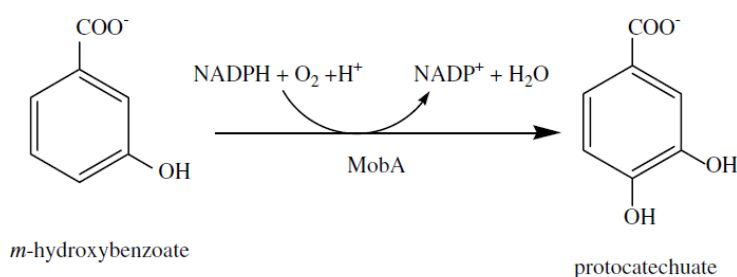
Εικόνα 0.4.2: Υδροξυλίωση του 3HB σε *para*-θέση προς γεντισικό οξύ από την 3HB6H (Montersino & Van Berkel, 2012)

Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί διάφορες 3HB6H, συμπεριλαμβανομένων και αυτών από τα στελέχη *Burkholderia cepacia* (L. H. Wang et al., 1987), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Yang et al., 2010), *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 (Park et al., 2007),

Rhodococcus jostii RHA1 (MonTERSINO & Van Berkel, 2012), *Micrococcus* sp. (Rajasekharan et al., 1990), *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Suárez et al., 1995), *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 (X. Gao et al., 2005b) και της 3HB6H από το αλόφιλο Martelella sp AD-3 (X. Chen et al., 2018).

Ακολουθώντας το γενετικό υφίσταται σχέση προς μαλεΐλπουρουβικό και εισέρχεται στον βασικό μεταβολισμό του κυττάρου.

Εναλλακτικά το 3HB μπορεί να καταβολιστεί ακολουθώντας την πορεία του PCA, όπου μια 3-υδροξυβενζοϊκή-4-υδροξυλάση (3HB4H) καταλύει την υδροξυλίωση του σε *ortho* θέση προς PCA (Εικόνα 1.4.3). Η πορεία αυτή φαίνεται να είναι αρκετά πιο σπάνια από την προαναφερθείσα στα βακτήρια, καθώς μέχρι στιγμής έχει μελετηθεί μόνο η 3HB4H από το στέλεχος *Comamonas testosteroni* (πρώην *Pseudomonas*). Αυτές οι υδροξυλάσες φέρουν μεγάλη αμινοξική ομολογία με τις υδροξυλάσες του 4HB (Chang & Zylstra, 2008; Hiromoto et al., 2006; Michalover & Ribbons, 1973).



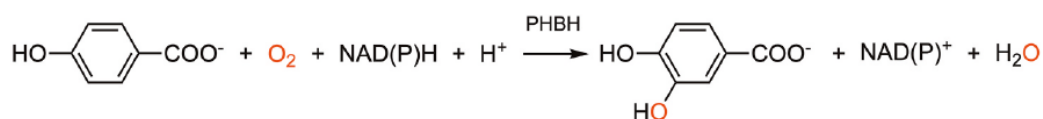
Εικόνα 0.4.3: Υδροξυλίωση του 3HB σε *ortho*-θέση προς PCA από την 3HB4H (MobA) στο *Comamonas testosteroni* (Chang & Zylstra, 2008).

Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4HB, *p*-υδροξυβενζοϊκό) είναι ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας που χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική και κοσμητική βιομηχανία καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό (Distelmaier, 2018; Lu et al., 2022; Tian et al., 2018). Η κατακόρυφη αύξηση της χρήσης αυτής τις τελευταίες δεκαετίες έχει οδηγήσει στη συσσώρευση του στο περιβάλλον προκαλώντας έτσι προβλήματα τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στο ίδιο το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα το 4HB μπορεί να εισέλθει το σώμα μέσω του καταβολισμού των προαναφερθέντων συντηρητικών (όπως η ανθοκυανίνη) από το μικροβίωμα του εντέρου αλλά και του λιπιδικού μεταβολισμού των εστέρων του (parabens) που εντοπίζονται στα συντηρητικά αυτά, και να επηρεάσει τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος (Matsui et al., 2006; Nobile et al., 2020; Sannino et al., 2018; Schug et al., 2011; L. Wang et al., 2015).

Ακόμη, φαίνεται να προκαλεί και προβλήματα στις καλλιέργειες καθώς αναστέλλει την αναγωγή των σπόρων σε φυτά, αναστέλλει την ριζοβολία αλλά και επηρεάζει την βιοποικιλότητα του εδάφους ευνοώντας πολλές φορές την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Y. Chen et al., 2011).

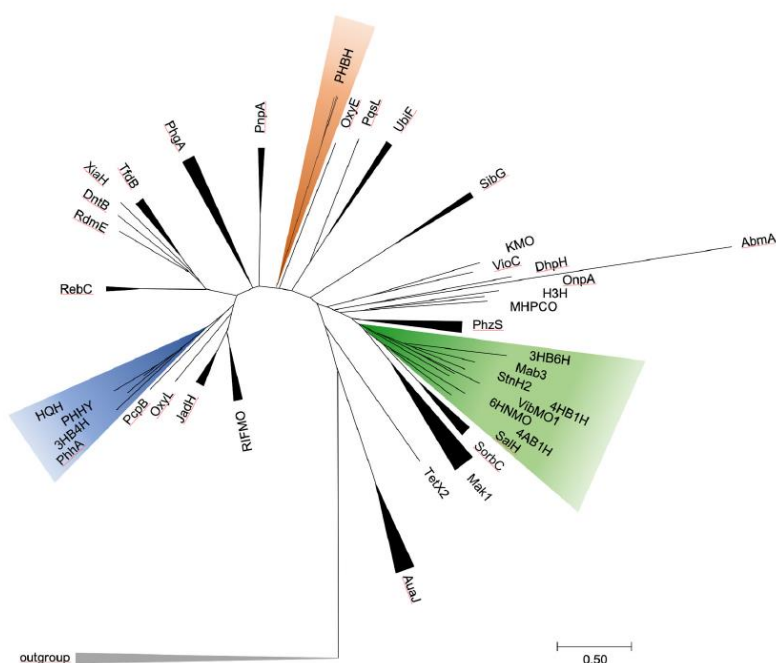
Το 4HB συνήθως καταβολίζεται μέσω PCA (Εικόνα 1.4.4). Η υδροξυλίωση του 4HB προς PCA καταλύεται από την 4-υδροξυβενζοϊκή-3-υδροξυλάση (4HB3H), η οποία ανήκει στην τάξη A φλαβινοεξαρτώμενων μονοοξυγενασών (Chenprakhon et al., 2019). Οι 4HB3H αποτελούνται από μια υπομονάδα και φέρουν έναν συμπαραγοντα FAD, ενώ δεσμεύουν και τον αναγωγικό παράγοντα NAD(P)H σε μια κοιλότητα στην επιφάνειά τους ως συν-υπόστρωμα. Μελέτες εξόρυξης γονιδιωμάτων (genome mining) έδειξαν ότι αυτά τα ένζυμα

απαντώνται συνηθέστερα στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων και αρκετά πιο σπάνια (10%) στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων. Ελάχιστες τέτοιες υδροξυλάσες απαντώνται σε άλλες επικράτειες οργανισμών (Westphal et al., 2018).



Εικόνα 0.4.4: Υδροξυλίωση του 4HB προς PCA από την 4-υδροξυβενζοϊκή-3-υδροξυλάση (Westphal et al., 2021).

Οι Westphal et al πραγματοποιήσαν μια φυλογενετική ανάλυση των υδροξυλασών που περιέχουν FAD και είναι εξαρτώμενες από τον αναγωγικό παράγοντα NAD(P)H (Westphal et al., 2021). Στο δέντρο που προέκυψε (Εικόνα 1.4.5) φαίνεται ότι οι βακτηριακές 4HB3H ομαδοποιούνται σε διαφορετικό κλάδο (πορτοκαλί) και έχουν μεγάλη εξελικτική απόσταση από τα αντίστοιχα ένζυμα που απαντώνται στις ζύμες (PhhA, μπλε κλάδος). Οι τελευταίες συγκαταλέγονται στον ίδιο κλάδο με άλλες ortho-υδροξυλάσες όπως η υδροξυλάση της φαινόλης (PHHY) του *Trichosporon cutaneum*, η υδροξυλάση της υδροκινόννης (HQH) του *C. parapsilosis* αλλά και η 3HB4H του *C. testosteroni* στην οποία έγινε αναφορά προηγουμένως. Από την άλλη μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ αυτών των δύο κλάδων και των 4-υδροξυβενζοϊκών-1-υδροξυλασών-αποκαρβοξυλασών (4HB1H, πράσινο κλάδος), οι οποίες ανήκουν στον ίδιο κλάδο εξελικτικά με διάφορες άλλες υδροξυλάσες αποκαρβοξυλίωσης όπως η 4-αμινοβενζοϊκή-1-υδροξυλάση (4AB1H) που απαντάται στις ζύμες, και τα βακτηριακά ένζυμα SALH, VibMO1, η 6-υδροξυνικοτινική-6-υδροξυλάση (Mab3), η 3-υδροξυ-2-αμινοβενζοϊκή-6-υδροξυλάση (StnH2) και οι 3HB6H στις οποίες γίνεται αναφορά ανωτέρω (Westphal et al., 2021).



Εικόνα 0.4.5: Δέντρο (Condensed bootstrap consensus tree) των υδροξυλασών που περιέχουν FAD (φλαβινοπρωτεΐνες) και εξαρτώνται από το NAD(P)H της τάξης A [NAD(P)H-dependent flavoprotein monooxygenases, FPMOs]. Με πορτοκαλί χρωματίζεται ο κλάδος που κατατάσσονται οι 4HB3H, με μπλε ο κλάδος όπου κατατάσσονται οι 4HB3H των ζυμών (PhhA) και η 3HB4H του *C. testosteroni* και με πράσινο ο κλάδος όπου απαντώνται οι 3HB6H (Westphal et al., 2021).

Ο μηχανισμός δράσης των 4HB3H είναι παρόμοιος με εκείνον που περιγράφηκε προηγουμένως για τις 3HB6H και αποτελείται από δύο ημιαντιδράσεις αναγωγής και οξείδωσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ημιαντίδραση της αναγωγής, το 4HB προσδένεται στο ένζυμο και ακολουθεί η πρόσδεση του αναγωγικού παράγοντα NAD(P)H στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Το NAD(P)H προκαλεί την αναγωγή του συμπαραγόντα FAD προς FADH. Στην αντίδραση της οξείδωσης, το ανηγμένο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και δίνει ένα ενδιάμεσο C4a-υδροξύυπεροξύφλαβίνης, το οποίο και πραγματοποιεί την υδροξυλίωση του 4HB. Τέλος το προϊόν απελευθερώνεται από το ένζυμο και το FAD αναγεννάται (Chenprakhon et al., 2019).

Οι βακτηριακές 4HB3H είναι πολύ καλά μελετημένα ένζυμα. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι 4HB3H από τα στελέχη *Corynebacterium glutamicum* (Huang et al., 2008), *C. cyclohexanicum* (Iwaki et al., 2005), *K. pneumoniae* (Suárez et al., 1995), *Pseudomonas* sp. CBS3 (Seibold et al., 1996), *A. calcoaceticus* (Fernandez et al., 1995), *Rhodococcus* sp. (Jadan et al., 2001), *P. putida* (Arunachalam et al., 1994), *Enterobacter cloacae* (Matsui et al., 2006), *Alcaligenes* sp. PPH και *Pseudomonas* sp. PPD (Deveryshetty et al., 2007).

Το PCA που προκύπτει από την υδροξυλίωση του 4HB καταβολίζεται, ανάλογα με τον μικροοργανισμό, μέσω δύο διαφορετικών πορειών: της **3,4-σχάσης** του αρωματικού (*ortho*-σχάση)δακτυλίου και της πορείας του *β*-κετοαδιπικού, ή της **4,5-σχάσης** του αρωματικού δακτυλίου (*meta*-σχάση). Η 3,4-σχάση έχει βρεθεί ότι ακολουθείται σε στελέχη όπως το *P. putida* KT2440 (Kim et al., 2006), *R. opacus* (Henson et al., 2018), *Xanthomonas campestris* (L. Wang et al., 2015) και *Cupriavidus necator* JMP134 (Donoso et al., 2011). Από την άλλη η πορεία της *meta*-σχάσης του PCA έχει εντοπιστεί σε στελέχη όπως *Comamonas* sp. 7D-2 (K. Chen et al., 2013), *Delftia* sp EOB-17 (K. Chen et al., 2015), *C. testosteroni* CNB-1 (Ni et al., 2013) και *Novosphingobium aromativorans* US6-1 (Yun et al., 2014).

Εκτός από την υδροξυλίωση του 4HB προς PCA από την 4HB3H, έχει αναφερθεί και ο καταβολισμός του μέσω γεντισικού στο *Haloarchaea* sp. D1 αλλά και μέσω υδροκινόνης στην *Candida parapsilopsis* (Berkel et al., 1994; Fairley et al., 2002).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στο εργαστήριο μας γίνεται αφενός μια προσπάθεια ολιστικής προσέγγισης του μεταβολισμού αρωματικών ενώσεων από απομονωμένα βακτηριακά στελέχη και αφετέρου μελέτη ενζύμων που κωδικοούνται από γονίδια των στελεχών αυτών τα οποία παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

Στο προαναφερθέν πλαίσιο μελετάται και το στέλεχος *Pseudoarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που ανήκει στο γένος *Arthrobacter* και έχει απομονωθεί από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν από περιοχή μολυσμένη με κρεοζωτέλαιο (Περίβλεπτος, Ιωάννινα).

Το γένος *Arthrobacter* αποτελεί σημαντική ομάδα εδαφοβακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης αρωματικών ενώσεων. Ενώ η ποικιλία των αρωματικών ενώσεων στο περιβάλλον, που προέρχονται είτε από ανθρωπογενείς είτε από φυσικές πηγές ρύπανσης είναι τεράστια, η αποδόμησή τους πραγματοποιείται από περιορισμένο αριθμό μεταβολικών πορειών προς σχηματισμό κοινών ενδιάμεσων αρωματικών μεταβολιτών που υπόκεινται σε οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα μέσω της δράσης διοξυγονασών σχάσης. Ένας τέτοιος κεντρικός ενδιάμεσος μεταβολίτης είναι το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (PCA), το οποίο καταβολίζεται περαιτέρω μέσω της όρθο- (3,4-σχάση), πάρα- (2,3-σχάση) και μέτα-πορείας (4,5-σχάση). Το στέλεχος *P. phenanthrenivorans* Sphe3 καταβολίζει φαινανθρένιο και παρουσιάζει το ιδιαίτερο πλεονέκτημα να φέρει στο γονιδίωμά του γονίδια που κωδικοούνται και τις δύο κατηγορίες 3,4- και 4,5- διοξυγονασών σχάσης του PCA στο χρωμόσωμα και στο πλασμίδιο αντίστοιχα.

Οι άμεσοι στόχοι της παρούσας διατριβής, σύμφωνα με την υποβληθείσα πρόταση υποτροφίας ήταν:

- Η περαιτέρω μελέτη της 4,5-διοξυγονάσης του PCA στο Sphe3, η οποία είχε υπερεκφραστεί και χαρακτηριστεί στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διατριβής του κ. Τσαγκογιάννη
- Ο πλήρης γενετικός και βιοχημικός χαρακτηρισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA στο Sphe3
- Η μελέτη των δύο ανωτέρω διοξυγονασών μέσω μοριακής προσέγγισης με κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις σε συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα με πιθανό ρόλο στη δραστηριότητα και την εξειδίκευσή τους.
- Η εκδίωξη του μικρού καταβολικού πλασμιδίου rASPHE302 με σκοπό τη περαιτέρω μελέτη μεταβολισμού ενώσεων όπου εμπλέκονται τα γονίδια που κωδικοούνται τις ανωτέρω διοξυγονάσεις, μέσω μεταγραφομικής και μεταβολομικής ανάλυσης.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χημικές ουσίες και όργανα

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (pro analysi) των εταιρειών Merck, Fluka και Sigma. Τα θρεπτικά υλικά ήταν των εταιρειών LAB M και ... (NaCl).

Τα περιοριστικά ένζυμα ήταν της εταιρείας TAKARA, η λιγάση TaKaRa (Japan), η Phusion πολυμεράση Finnzymes (Finland).

2.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη του *A. phenanthrenivorans* και του *E. coli* καθώς και οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή την εργασία φαίνονται στους Πίνακες 2.1 και 2.2 αντίστοιχα.

Πίνακας 2.1: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή την εργασία.

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφία
<u>Escherichia coli</u>		
DH5a	F ⁻ , φ80d <i>lacZ</i> ΔM 15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁻), <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> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<u>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</u>		
Sphe3	Άγριος Τύπος	
Sphe3c	Μεταλλαγμένο: Έχει εκδιωχθεί το καταβολικό πλασμίδιο pASPHE301	Μεταπτυχιακή Διατριβή: Αλέξανδρος Δραΐνας

Πίνακας 2.2: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή την εργασία.

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα	Περιγραφή	Μέγεθος (bp)	Αναφορές
pET29c(+)	Km	Φορέας υπερέκφρασης	5.372	Novagen
pRSFDuet	Km	Φορέας υπερέκφρασης	3.529	Novagen
pCR-blunt	Km	Φορέας κλωνοποίησης	3.512	Invitrogen
pBlueScript SK+	Amp	Φορέας κλωνοποίησης	2961	Agilent Technologies
pET29c::pcd45	Km	-		MSc Τσαγκογιάννης
pCR-blunt::pcd45	Km	-		MSc Τσαγκογιάννης
pBlueScript::pcd45	Amp			Αυτή η εργασία
pBlueScript::pcd34	Amp			Αυτή η εργασία
pBlueScript::pcd45/F93A	Amp			Αυτή η εργασία
pBlueScript::pcd45/VPA	Amp			Αυτή η εργασία
pBlueScript::pcd34/R123H	Amp			Αυτή η εργασία
pRSFDuet::pcd34	Km			Αυτή η εργασία
pET29c::pcd45/F93A	Km	-		Αυτή η εργασία
pET29c::pcd45/VPA	Km	-		Αυτή η εργασία
pRSFDuet::pcd34/R123H	Km			Αυτή η εργασία

2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

2.3.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα βακτήρια *E.coli* και *P. phenanthrenivorans* Sphe3, Luria Bertani (LB)

1% (w/v) NaCl

0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης

1% (w/v) τρυπτόνη

pH 7.5 με διάλυμα NaOH 1N

2.3.2 Ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 (MM-M9) με 3-υδροξυ-/ 4-υδροξύβενζοϊκό οξύ (3HB, 4HB) ως πηγή άνθρακα για το βακτήριο *P. phenanthrenivorans* Sphe3

20% (v/v) 5X MM-M9

1% (v/v) CaCl₂ (0.01M)

2% (v/v) MgSO₄·7H₂O (0.1M)

1% (v/v) 100 X Trace Elements (T.E.)

5 mM 3HB/ 4HB

dH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

2.3.4 Στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Παρασκευάζονται με την προσθήκη 2% άγαρ στα παραπάνω υγρά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

2.4 In silico εντοπισμός των γονιδίων της 3,4-διοξυγονάσης και της 4,5-διοξυγενάσης του PCA

Η αναζήτηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την 3,4- και την 4,5-διοξυγενάση του PCA καθώς και των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών, έγινε στη βάση δεδομένων του Joint Genome Institute (JGI - <https://img.jgi.doe.gov/>) στο γονιδίωμα του *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3.

2.5 Κατασκευή φυλογενετικού δένδρου

Με βάση την αλληλουχία της 3,4-διοξυγονάσης του PCA του *P. phenanthrenivorans* Sphe3, εντοπίστηκαν πρωτεϊνικές αλληλουχίες που παρουσίαζαν ομολογία με αυτή, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων BLASTP του NCBI. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες με τουλάχιστον 40% ομολογία για κάθε υπομονάδα της υπό μελέτη διοξυγονάσης.

Επιλέχθηκε αυτό το όριο ομολογίας καθώς ήταν η μέγιστη σε κάποιες περιπτώσεις ομολογία στις κατατεθειμένες στο Protein Data Bank κρυσταλλικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη των τρισδιάστατων δομών αλλά και των πειραμάτων Μοριακής Δυναμικής κατ' επέκταση.

Ακολούθησε στοίχιση (alignment) των αλληλουχιών με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTAL Omega (Sievers & Higgins, 2014) και η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για τις

συγκεκριμένες αλληλουχίες με τη χρήση του προγράμματος MEGA, έκδοση 4.1 (Tamura et al., 2007).

Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν από την μέθοδο Neighbor-Joining και οι επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν (Bootstrap value) είναι 500 για κάθε υπομονάδα.

Να σημειωθεί ότι οι αλληλουχίες των υπομονάδων α - και β - του ενζύμου μελετήθηκαν χωριστά σ' αυτό το επίπεδο.

2.6 Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών για την PCD34 και την PCD45

Η πρόβλεψη των δευτεροταγών δομών για τις διοξυγονάσες PCD34 και PCD45 έγινε μέσω του διακομιστή (server) της Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V2.0) . Ως εκμαγεία χρησιμοποιήθηκαν:

- Για την PCD34 η 3,4-διοξυγονάση του PCA από το *Acinetobacter baylyi* ADP1 (PDB: 2bum) που παρουσιάζει 41,3% ομολογία με την PCD34
- Για την PCD45 η 4,5-διοξυγενάση του *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 (PDB: 1b4u) που παρουσιάζει 61% ομολογία με την PCD45.

Γενικά

Το Phyre2 είναι ένας διακομιστής που βασιζόμενος στην αμινοξική ομολογία μεταξύ των υπό μελέτη πεπτιδικών αλυσίδων με αλυσίδες με γνωστή τριτοταγή (μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού κ.α.) παράγει μια πρόβλεψη της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς δομής της υπό μελέτης πρωτεΐνης με αρκετά μεγάλη ακρίβεια.

Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής

Μετά την εισαγωγή της υπό μελέτης αλληλουχίας στο κατάλληλο πεδίο στον Phyre2 και το πέρας της διεργασίας, προκύπτουν διάφορα μοντέλα τριτοταγούς δομής βασιζόμενα (όπως προαναφέρθηκε) σε πεπτίδια γνωστής δομής, με πρώτες να εμφανίζονται αυτές που παρουσιάζουν μεγαλύτερη κάλυψη και ομολογία με το υπό μελέτη μόριο. Επιλέγοντας ένα από αυτά (συνίσταται αυτό με τη μεγαλύτερη ομολογία), και πραγματοποιώντας στοίχιση των δύο αλληλουχιών προκύπτει μια εικόνα στην οποία παρατίθενται τα εξής χαρακτηριστικά:

- Αλληλουχίες της υπο μελέτη πρωτεΐνης και της πρωτεΐνης εκμαγείου (Query Sequence, Template Sequence) όπου τα αμινοξικά κατάλοιπα χρωματίζονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους
 - Μικρά/πολικά (A, S, T, G, P) → πορτοκαλί
 - Υδρόφοβα (M, I, L, V) → πράσινο
 - Φορτισμένα (K, R, E, N, D, H, Q) → κόκκινο
 - Αρωματικά και κυστεΐνη (W, Y, F, C) → κυανό

Με γκρι πλαισιώνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα στις δυο αλληλουχίες.

- Προβλεπόμενη και γνωστή δευτεροταγής δομή (Predicted secondary structure, Template known secondary structure) όπου με μπλε βέλος συμβολίζονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες, με πράσινες έλικες οι α-έλικες και οι διακεκομμένες ενδιάμεσες γραμμές συμβολίζουν τους βρόχους. Στο πεδίο της γνωστής δευτεροταγούς δομής παρατηρούνται πολλές φορές και μια σειρά από λατινικούς χαρακτήρες που απεικονίζουν επιμέρους στοιχεία της δευτεροταγούς δομής πέραν των προαναφερθέντων α-ελίκων, β-πτυχωτών φύλλων και βρόχων όπως 3_{10} και π έλικες, β -γέφυρες κλπ.
- Βαθμός βεβαιότητας δευτεροταγούς δομής (SS confidence) όπου απεικονίζεται όπως γίνεται εύκολα κατανοητό το πόσο πιθανά σωστή είναι η πρόβλεψη των εκάστοτε στοιχείων της δευτεροταγούς δομής με μια κλίμακα από το κόκκινο (υψηλός βαθμός βεβαιότητας) έως το μπλε (χαμηλός βαθμός βεβαιότητας).
- Εξελικτικά συντηρημένα αμινοξέα (Query conservation, Template conservation) όπου με γκρι μπάρες και το πάχος αυτών απεικονίζεται ο βαθμός συντήρησης των αμινοξέων της εκάστοτε αλυσίδας.

2.7 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά προστίθενται μετά την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων ανάπτυξης και όταν η θερμοκρασία αυτών έχει μειωθεί στους 45-50°C.

Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών γίνεται με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων μεγέθους πόρων 0.45μm.

Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήτανε υδατικό διάλυμα καναμυκίνης (Km) σε τελική συγκέντρωση 50 μg/ml στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Η καναμυκίνη προσδένεται στο 70S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη βασίζεται στην ύπαρξη του γονιδίου *kam* το οποίο κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με το ριβόσωμα.

2.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα του στελέχους *S. pneumoniae* με τη μέθοδο CTAB (mini preparation)

2.8.1 Πειραματική πορεία

1. Από Ο/Ν καλλιέργεια κυττάρων φυγοκεντρούμε 1,5 ml σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι για 5 min και ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου.
2. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 740 μl TE.
3. Προσθήκη 20 μl διαλύματος λυσοζύμης (100 mg/ml) και επώαση για 12 ώρες στους 37°C.
4. Προσθήκη 40 μl διαλύματος SDS 10%.

5. Προσθήκη 4 μl διαλύματος προνάσης (20 mg/ml) και επώαση για 12 ώρες στους 37°C.
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος 5M NaCl και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB/ NaCl προθερμασμένου στους 65 °C και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
8. Επώαση για 10 min στους 65 °C.
9. Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και καλή ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της (άνω) υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
11. Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και καλή ανάδευση.
12. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της (άνω) υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Στο σημείο αυτό μετράμε τον όγκο της υδατικής φάσης.
13. Προσθήκη 0,6 X του όγκου ισοπροπανόλη (-20 °C) και ακολουθεί επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 15 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
15. Έκπλυση του ιζήματος με 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση για 15 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
16. Γίνεται προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.
17. Το ίζημα επαναιωρείται σε 20 μl διαλύματος TE και RNase [99 μl TE + 1 μl RNase (10 mg/ml)], μεταφέρεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και επωάζεται στους 37 °C για 20 min.
18. Φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση.

2.8.2. Διαλύματα

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 ώρες ή και περισσότερο. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH = 8.

2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων

2.9.1 Αρχή της 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.

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

2.9.2.1. Πειραματική πορεία

Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας και ακολουθεί την εξής πειραματική διαδικασία:

1. Από καλλιέργεια 1.5 ml τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 λεπτά.
2. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl διαλύματος I και το εναιώρημα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στο παραπάνω εναιώρημα 200 μl διαλύματος II και το μίγμα επωάζεται σε μίγμα πάγου-νερού (0°C) για 10 λεπτά.
4. Ακολουθεί προσθήκη 150 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε μίγμα πάγου-νερού (0°C) για 5 λεπτά.
5. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Στη συνέχεια συλλέγονται 400 μl από το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο στο οποίο προστίθενται 320 μl ψυχρής (-20°C) ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
7. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
8. Ακολουθεί συλλογή του ιζήματος, ξήρανση και επαναιώρηση σε 300 μl TE.
9. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 30 μl CH₃COOK 3M pH=5.5 και 800 μl ψυχρής (-20°C) αιθανόλης και το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 30 λεπτά.

10. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά στους 4 °C, το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται και επαναιωρείται στον κατάλληλο όγκο νερού ή διαλύματος TE.

2.9.2.2. Διαλύματα

Διάλυμα I: 50 mM γλυκόζης

25 mM Tris (τρις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH=8

10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

5 mg/ml λυσοζύμης

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα II: 0.2 N NaOH

1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του.

Διάλυμα III: 3M CH₃COOK pH=4.8

Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA pH=8

2.9.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel

2.9.3.1 Πειραματική πορεία

1. Καλλιέργεια και συλλογή των κυττάρων

Φυγοκέντρηση καλλιέργειας κυττάρων 1-5 ml για 30 s σε 11.000 g και απομάκρυνση με πιπέτα όσο το δυνατόν περισσότερου υπερκλειμένου.

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 λεπτά το πολύ. Προσθήκη 300 μl διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση για 6-8 φορές. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου

3. Δέσμευση του DNA

Τοποθέτηση του υπερκείμενου σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό σε 11.000 g. Απόχυση του υπερκείμενου.

4. Έκπλυση και ξήρανση της στήλης

Προσθήκη 600 μl A4 και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό σε 11.000 g. Προσθήκη 500 μl προθερμασμένου διαλύματος AW (50 °C) και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό σε 11.000 g.

5. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA.

Προσθήκη 50 μl διαλύματος AE σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό και φυγοκέντρηση σε 11.000 g για ένα λεπτό.

Η καθαρότητα και συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα μετά την απομόνωση του μετρείται ως εξής:

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνεται μια μέτρηση απορρόφησης στα 260nm και μια στα 280nm. 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 (Sambrook et al 2001).

2.10 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Sambrook & Russell, 2001).

2.10.1 Αρχή της 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 διασπούν 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 1μg DNA του φάγου λ σε 1ώρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου (Sambrook & Russell, 2001).

2.10.2 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 ($\text{ds H}_2\text{O}$), 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 (0.5-1.0 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: ο χρόνος της αντίδρασης μειώνεται σε 1-15 min και η συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου είναι 10 έως 100 φορές μικρότερη.

2.11 Ηλεκτροφόρηση του DNA (Sambrook et al., 1989).

2.11.1 Αρχή της 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 $\leq 5 \text{ Volt/cm}$.

Η διαμόρφωση του DNA. Τα μόρια του DNA μπορούν να έχουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις:

- Κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιικό DNA)
- Κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια τα οποία έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα)
- Ευθύγραμμα 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).

2.11.2 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 TAE 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. Η φωτογράφιση του πηγματος γίνεται με συσκευή Kodak.

2.11.3 Διαλύματα

Διάλυμα TAE (Tris-acetate): 0.04 M Tris-acetate

0.001 M EDTA pH=8.0

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 αρραίωση του διαλύματος 50X.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 0.25% κυανό της βρωμοφαινόλης

0.25% κυανολικό ξυλένιο

30% γλυκερόλη

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

2.12 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης

2.12.2 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey – Nagel.

2.12.2.1 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. Για κάθε 100 mg αγαρόζης προστίθενται 200 μl διάλυμα NT.
3. Το δείγμα επωάζεται στους 50°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μείγμα ενώ αναδεύεται ανά 2-3 λεπτά.
4. Το μείγμα τοποθετείται σε στήλη Nucleospin Extract II και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 11.000 g. Το υπερκείμενο αποχύνεται.
5. Προστίθενται 600 μl διάλυμα NT3 ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 11.000 g και γίνεται απόχυση υπερκείμενου.
6. Γίνεται φυγοκέντρωση για 2 λεπτά σε 11.000 g για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.
7. Προστίθενται 15-50 μl διάλυμα NE, ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και τέλος φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 11.000 g.

2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Mullis et al., 1986).

2.13.1. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική PCR προσφέρει με έναν απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων.

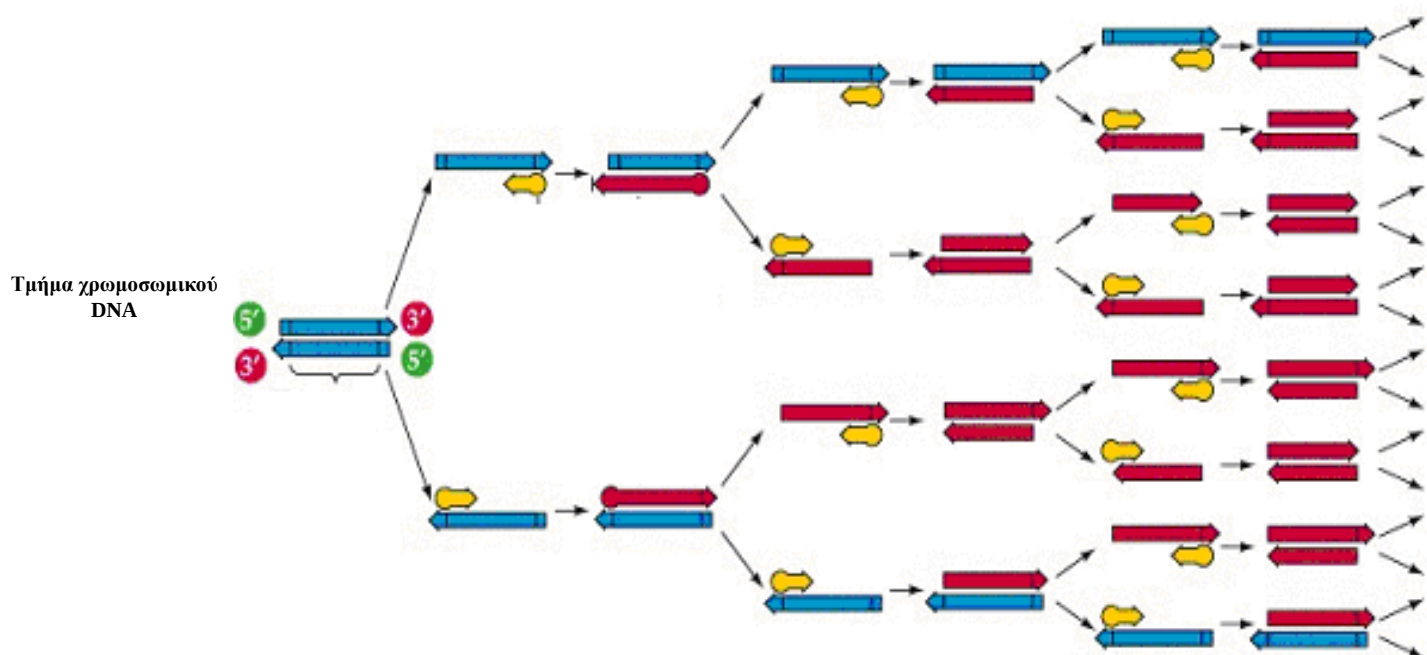
Η τεχνική PCR εκμεταλλεύεται δυο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου.

Όμως για να μπορέσει να αρχίσει τη σύνθεση χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δυο 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 υβρίδισε το ολιγονουκλεοτίδιο-πριμοδοτικό μόριο (primer). Επομένως μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δυο πριμοδοτικά μόρια 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 2.1).

Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος της αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Διαχωρισμός των δυο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους 94 °C.
2. Ψύξη του μίγματος για να υβριδίσουν οι πριμοδοτικά μόρια 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 2.1: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

2.13.2. Πειραματική πορεία

Οι αντιδράσεις γίνονται σε τελικό όγκο 50 ή 100 μ l και οι συνθήκες επιλέγονται ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Οι πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Phusion. Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω (Πίνακας 2.3)

Πίνακας 2.3: Τυπική σύσταση αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ l)
ddH ₂ O	12,1
5X Phusion HF buffer	4
dNTPs (2,5mM το καθένα)	0,4
Πριμοδοτικό μόριο 1 (#4,5-PCA for)	1
Πριμοδοτικό μόριο 2 (#4,5-PCA rev)	1
Εκμαγείο DNA	1 (30 – 100 ng)
DNA Polymerase (Phusion)	0.5
Τελικός όγκος	20

Παρακάτω δίνεται το πρόγραμμα του κυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε:

1. 98°C για 3 min
2. 98 °C για 1 min
3. 58 °C (T_m) για 2 min
4. 72 °C για 3 min
5. 72 °C για 10 min
6. 4 °C soak

Τα βήματα 2 με 4 επαναλαμβάνονται 30 φορές (30 κύκλοι αντίδρασης)

2.14 Κατευθυνόμενη Σημειακή Μεταλλαξιγένεση μέσω PCR (Site-directed point mutagenesis with 2-step PCR)

2.14.1 In silico ανάλυση των γονιδίων και σχεδιασμός κατάλληλων πριμοδοτικών μορίων:

1. Αναζήτηση των αμινοξικών αλληλουχιών των ενζύμων που θα υποστούν σημειακές μεταλλάξεις στη βάση δεδομένων JGI
 - a. **Protocatechuate 3,4-dioxygenase** (PCD34, ADX74973.1: α-υπομονάδα, ADX74974.1: β-υπομονάδα)
 - b. **Protocatechuate 4,5-dioxygenase** (PCD45, ADX75303.1)
2. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (CLUSTALW) με κατατεθειμένες στη βιβλιογραφία αλληλουχίες και αλληλουχίες που παρουσίασαν υψηλό βαθμό ομολογίας μετά από BLASTP, ώστε να εντοπιστούν τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα και ο ρόλος τους (θέσεις δέσμησης Fe, αμινοξέα ενεργού κέντρου κτλ). Συνήθως αποφεύγεται η παρέμβαση σε τέτοια κατάλοιπα.
3. Επιλέγονται κρυσταλλικές δομές ενζύμων που είναι κατατεθειμένες στην Protein Data Bank, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (>60%) και ακολουθούν *in silico* πειράματα μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής, ώστε να προκύψουν υποψήφια αμινοξέα προς μετάλλαξη στο κάθε ένζυμο αλλά και οι πιθανές επιπτώσεις κάθε μετάλλαξης στην αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα διάφορα υποστρώματα.
4. Από τα ανωτέρω πειράματα και από βιβλιογραφική ανασκόπηση σχεδιάστηκαν 3 συνολικά μεταλλάξεις:

- a. **PCD34/ R123H:** Αντικατάσταση της Arg-123 (α-υπομονάδα) με His αναμένεται να προσδώσει δραστικότητα 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στο ένζυμο (επιπρόσθετα της δραστικότητας 3,4-διοξυγονάσης του PCA)
 - b. **PCD45/ F93A:** Η μετάλλαξη αυτή επιλέχθηκε μετά από μελέτη της βιβλιογραφίας. Οι Barry & Taylor (Barry, Ngu, et al., 2015) παρατήρησαν ότι η αντικατάσταση της Phe103 με άλλα κατάλοιπα οδηγούσε σε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης με τα εναλλακτικά υποστρώματα του γαλλικού (GA) και του 3-O-μεθυλγαλλικού οξέος (3OMG). Μεταξύ των μεταλλάξεων ήταν και η F103A (F93A στην PCD45 του Sphe3) ή οποία δεν μπόρεσε να μελετηθεί καθώς μετά την μετάλλαξη κατέστη αδύνατος ο καθαρισμός των δυο υπομονάδων του ενζύμου σε στήλη NTI-αγαρόζης. Στην περίπτωση του Sphe3 ο καθαρισμός και η μελέτη του μεταλλαγμένου ενζύμου δεν αναμένεται να προκαλέσει πρόβλημα καθώς οι δύο υπομονάδες είναι συγχωνευμένες.
 - c. **PCD45/ VPA:** Μετά από πειράματα μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής προέκυψε ότι η διπλή αντικατάσταση των Val159 και Pro160 (αμινοξέα της περιοχής του ενεργού κέντρου που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τον αρωματικό δακτύλιο του PCA) με Ala, θα επέτρεπε στερεοχημικά την πρόσδεση μεγαλύτερων υποστρωμάτων στην περιοχή.
5. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων χωρίζονται σε κωδικόνια και κάθε κωδικόνιο αντιστοιχείται σε αμινοξύ σύμφωνα με τον γενετικό κώδικα. Επιλέγονται τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στα αμινοξέα των δυο ενζύμων που θα υποστούν μετάλλαξη:
- a. PCD34/ R123H: Arg-123 → CGC
 - b. PCD45/ F93A: Phe-93 → TTT
 - c. PCD45/ VPA: Val-159 → GTG, Pro-160 → CCG
6. Επιλέγονται τα κωδικόνια που θα αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα ώστε να προκύψει η επιθυμητή σημειακή μετάλλαξη για κάθε ένζυμο. Προτιμώνται τα κωδικόνια εκείνα που «χρησιμοποιούνται» συχνότερα στην πρωτεϊνοσύνθεση (codon usage) από τον μικροοργανισμό όπου θα γίνει η ετερόλογη έκφραση (εν προκειμένω *E. coli*, Πίνακας 2.4), όπου αυτό είναι δυνατόν.
- a. PCD34/ R123H: Arg-123 → His-123: **CGC → CAC**
 - b. PCD45/ F93A: Phe-93 → Ala-93: **TTT → GCG**

c. PCD45/ VPA: Val-159 → Ala-159, Pro-160 → Ala-160: **GTG → GCG, CCG → GCG**

Σημείωση: Προτιμώνται τα κωδικόνια εκείνα που θα επιφέρουν το δυνατότερο λιγότερες μεταβολές στην αλληλουχία

Πίνακας 2.4: Χρήση κωδικονίων στο E. coli βάσει του οποίου επιλέγονται τα κωδικόνια που θα αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα κατά την κατευθυνόμενη μεταλλαξίγηση.

Triplet	Amino acid	Fraction	Frequency/ Thousand	Number	Triplet	Amino acid	Fraction	Frequency/ Thousand	Number
TTT	F	0.58	22.1	80995	TCT	S	0.17	10.4	38027
TTC	F	0.42	16.0	58774	TCC	S	0.15	9.1	33430
TTA	L	0.14	14.3	52382	TCA	S	0.14	8.9	32715
TTG	L	0.13	13.0	47500	TCG	S	0.14	8.5	31146
TAT	Y	0.59	17.5	63937	TGT	C	0.46	5.2	19138
TAC	Y	0.41	12.2	44631	TGC	C	0.54	6.1	22188
TAA	*	0.61	2.0	7356	TGA	*	0.30	1.0	3623
TAG	*	0.09	0.3	989	TGG	W	1.00	13.9	50991
CTT	L	0.12	11.9	43449	CCT	P	0.18	7.5	27340
CTC	L	0.10	10.2	37347	CCC	P	0.13	5.4	19666
CTA	L	0.04	4.2	15409	CCA	P	0.20	8.6	31534
CTG	L	0.47	48.4	177210	CCG	P	0.49	20.9	76644
CAT	H	0.57	12.5	45879	CGT	R	0.36	20.0	73197
CAC	H	0.43	9.3	34078	CGC	R	0.36	19.7	72212
CAA	Q	0.34	14.6	53394	CGA	R	0.07	3.8	13844
CAG	Q	0.66	28.4	104171	CGG	R	0.11	5.9	21552
ATT	I	0.49	29.8	109072	ACT	T	0.19	10.3	37842
ATC	I	0.39	23.7	86796	ACC	T	0.40	22.0	80547
ATA	I	0.11	6.8	24984	ACA	T	0.17	9.3	33910
ATG	M	1.00	26.4	96695	ACG	T	0.25	13.7	50269
AAT	N	0.49	20.6	75436	AGT	S	0.16	9.9	36097
AAC	N	0.51	21.4	78443	AGC	S	0.25	15.2	55551
AAA	K	0.74	35.3	129137	AGA	R	0.07	3.6	13152
AAG	K	0.26	12.4	45459	AGG	R	0.04	2.1	7607
GTT	V	0.28	19.8	72584	GCT	A	0.18	17.1	62479
GTC	V	0.20	14.3	52439	GCC	A	0.26	24.2	88721
GTA	V	0.17	11.6	42420	GCA	A	0.23	21.2	77547
GTG	V	0.35	24.4	89265	GCG	A	0.33	30.1	110308
GAT	D	0.63	32.7	119939	GGT	G	0.35	25.5	93325
GAC	D	0.37	19.2	70394	GGC	G	0.37	27.1	99390
GAA	E	0.68	39.1	143353	GGA	G	0.13	9.5	34799
GAG	E	0.32	18.7	68609	GGG	G	0.15	11.3	41277

7. Σχεδιάζονται «εσωτερικά» ζεύγη πριμοδοτικών μορίων για κάθε μετάλλαξη. Με τον όρο «εσωτερικά» ορίζονται τα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων τα οποία σχεδιάζονται στο εσωτερικό του γονιδίου, εκατέρωθεν της σημειακής μετάλλαξης και τα οποία φέρουν και τη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Σε αντιδιαστολή, τα «εξωτερικά» ζεύγη είναι εκείνα που σχεδιάζονται στα 5' και 3' άκρα του εκάστοτε γονιδίου. Κατά το σχεδιασμό των πριμοδοτικών μορίων λαμβάνονται κατά το δυνατό υπόψη οι εξής παράγοντες για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων:

- a. Το μέγεθος είθισται να κυμαίνεται στα 18-24 νουκλεοτίδια.
 - b. Αποφεύγεται να υπάρχουν πολλές βάσεις G και C σε σειρά. Αν χρειαστεί μπορεί να πραγματοποιηθούν σιωπηλές μεταλλάξεις (αλλαγές νουκλεοτιδίων που οδηγούν σε συνώνυμο κωδικόνιο)
 - c. Η περιεκτικότητα σε GC συνίσταται να κυμαίνεται στο 40-70%
 - d. Το T_m τους δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 5°C από το T_m του «εξωτερικού» πριμοδοτικού μορίου με το οποίο θα μπουν σε ζεύγος στο πρώτο βήμα της PCR (βλ. παρακάτω).
 - e. Συνήθως διατηρείται μια βάση G/C στα 3' και 5' άκρα που θα ευνοήσουν τον διμερισμό με το εκμαγείο.
 - f. Τα πριμοδοτικά μόρια ελέγχονται για σχηματισμό διμερών μεταξύ τους.
8. Τα «εσωτερικά» πριμοδοτικά μόρια που σχεδιάστηκαν για τις σημειακές μεταλλάξεις παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5: Πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των ανασυνδυασμένων ενζύμων PCD34 και PCD45. Με έντονη γραφή σημειώνονται τα κωδικόνια των αμινοξέων που άλλαξαν και υπογραμμισμένα είναι τα νουκλεοτίδια που χρειάστηκε να αλλάξουν για να προκύψουν οι μεταλλάξεις.

Μετάλλαξη	Πριμοδοτικό Μόριο	Αλληλουχία (5'→3')	T_m (°C)	Περιεκτικότητα GC
PCD34/R123H	ForR123H	ATTTTCGCGC <u>A</u> CGGCCTCACC (21nt)	63,7	61,9%
	RevR123H	GGTGAGGCC <u>G</u> TGCGCGAAAAT (21nt)	63,7	61,9%
PCD45/ F93A	For_PheAla_new	GCCTGAG <u>CGC</u> ACAGCAGATG (20nt)	63,5	65%
	Rev_PheAla_new	CATCTGCTGT <u>GCG</u> GCTCAGGC (20nt)	63,5	65%
PCD45/ VPA	For_ValProAla_new	CTCGCAC <u>G</u> <u>CAG</u> <u>C</u> AGCGATC (19nt)	63,1	68,4%
	Rev_ValProAla_new	GATCGC <u>T</u> <u>GCT</u> <u>G</u> CGTGGCGAG (19nt)	63,1	68,4%

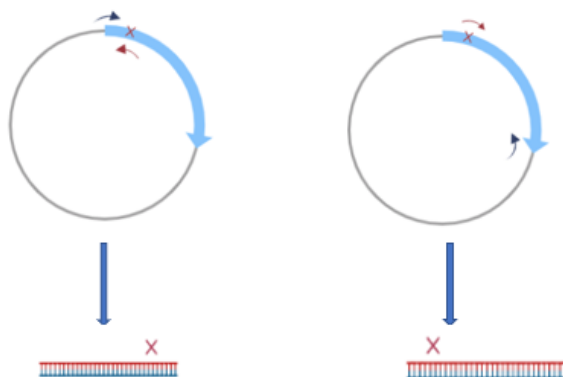
2.14.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης 2 σταδίων (2-step PCR)

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξίγνεση μέσω PCR δύο σταδίων βασίζεται στην εισαγωγή της μετάλλαξης «τμηματικά» με τη χρήση των πριμοδοτικών μορίων που φέρουν τη μετάλλαξη («εσωτερικά» πριμοδοτικά μόρια) σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα πριμοδοτικά μόρια που είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του γονιδίου («εξωτερικά» πριμοδοτικά μόρια) (1^ο στάδιο). Τα τμήματα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο σ' ένα επόμενο βήμα PCR (2^ο στάδιο) ώστε να προκύψει το γονίδιο που θα φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Πιο συγκεκριμένα:

1. Κατά το πρώτο βήμα, χρησιμοποιούνται σε δυο διαφορετικές αντιδράσεις PCR, ανά ζεύγη, το «εξωτερικό» forward πριμοδοτικό μόριο, με το «εσωτερικό» reverse και αντίστροφα, ώστε να προκύψουν δύο διαφορετικά προϊόντα PCR που θα φέρει το καθένα τη μετάλλαξη στο 3' και στο 5' άκρο αντίστοιχα. Ως εκμαγείο προτιμάται ένας ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας με το γονίδιο ενδιαφέροντος ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση των πριμοδοτικών μορίων και τα παραπροϊόντα που θα προκύψουν από αυτή (Εικόνα 2.2).

Τα ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα στο 1^ο στάδιο για τις μεταλλάξεις στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- a. PCD34/R133H: **PCD34_pRSF_for/ RevR123H** και **ForR123H/ PCD34_pRSF_rev.**
- b. PCD45/ F93A: **For_pET29c::pcd45/ Rev_PheAla_new** και **For_PheAla_new/ Rev_pET29c::pcd45.**
- c. PCD45/VPA: **For_pET29c::pcd45/ Rev_ValProAla_new** και **For_ValProAla_new/ Rev_pET29c::pcd45.**

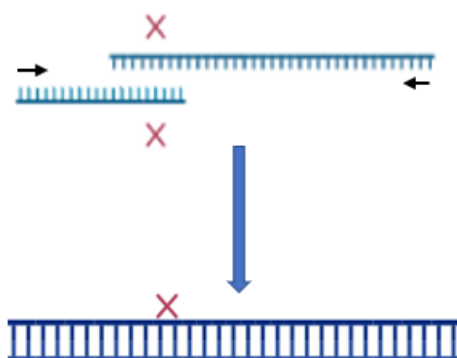


Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους αντιδράσεων του πρώτου σταδίου της PCR δύο σταδίων για την εισαγωγή των σημειακών μεταλλάξεων. Με X απεικονίζεται το σημείο της μετάλλαξης και με βέλη τα δύο ζεύγη πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιούνται στο πρώτο στάδιο.

2. Τα προϊόντα PCR φορτώνονται σε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Είναι σημαντικό να είναι ξεκάθαρο ποια ζώνη αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν και να είναι μόνο ΜΙΑ.
3. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα κάθε αντίδρασης του 1^{ου} σταδίου, αποκόπτονται από την πηκτή αγαρόζης, τοποθετούνται σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο τύπου Eppendorf, ζυγίζονται και καθαρίζονται με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey-Nagel.

Οι ζώνες που αναμένονται από το 1st step για κάθε μετάλλαξη είναι οι εξής:

- a. PCD34/R133H: ~200bp και ~1200bp
 - b. PCD45/ F93A: ~300bp και ~1000bp
 - c. PCD45/VPA: ~500bp και ~800bp
4. Προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση των καθαρισμένων προϊόντων στο nanodrop καθώς είναι σημαντικό στο επόμενο βήμα που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR, να είναι σε ισομοριακή αναλογία. Ο υπολογισμός των moles έγινε με τη βοήθεια του online λογισμικού Bioline (https://www.bioline.com/media/calculator/01_07.html).
 5. Τα προϊόντα PCR του πρώτου σταδίου χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο στο επόμενο στάδιο PCR (Εικόνα 2.3). Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιούνται στο βήμα αυτό είναι τα εκάστοτε «εξωτερικά»:
- a. PCD34/R133H: **PCD34_pRSF_for/ PCD34_pRSF_rev**
 - b. PCD45/ F93A: **For_pET29c::pcd45/ Rev_pET29c::pcd45**
 - c. PCD45/VPA: **For_pET29c::pcd45/ Rev_pET29c::pcd45**



Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης του δεύτερου σταδίου της PCR δύο σταδίων για την εισαγωγή των σημειακών μεταλλάξεων.

6. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR φορτώνονται σε πηκτή αγαρόζης, οι ζώνες που αντιστοιχούν σε αυτά αποκόπτονται και ακολουθεί ο καθαρισμός τους όπως ανωτέρω.
7. Ακολουθεί κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBluecript SK+ ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου και έλεγχος της επιτυχίας της σημειακής μεταλλαξιγένεσης.
8. Πραγματοποιείται περιοριστική ανάλυση με διάφορα περιοριστικά ένζυμα σε κάθε ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα πριν αποσταλούν για αλληλούχιση.
9. Πραγματοποιείται επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης μέσω αλληλούχισης του εκάστοτε γονιδίου από την Eurofins, Γερμανία.

Σύσταση των αντιδράσεων PCR – Προγράμματα θερμοκυκλοποιητή

PCD34/R123H

1^ο στάδιο

Σύσταση της Αντίδρασης

Αντιδραστήριο		Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος		10
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)		1
5' τμήμα	3' τμήμα	
PCD34_pRSF_for	ForR123H	1
RevR123H	PCD34_pRSF_rev	1
Εκμαγείο DNA*		1
Phusion DNA Polymerase		0,5
ddH ₂ O		35,5
Τελικός Όγκος		50

*Ως εκμαγείο DNA χρησιμοποιήθηκε 1:100 αραιώση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pRSFDuet-1::pcd34.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	30
Μετουσίωση	98°C	30 s	
Υβριδισμός	62°C	30 s	

Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

2° στάδιο

Σύσταση της αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος	10
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)	1
PCD34_pRSF_for	1
PCD34_pRSF_rev	1
Εκμαγείο 5'-τμήμα*	5
Εκμαγείο 3'-τμήμα*	5
Phusion DNA Polymerase	0,5
ddH ₂ O	26,5
Τελικός Όγκος	50

*Στα 5'- και 3'-τμήματα που προέκυψαν από το πρώτο βήμα της PCR έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις, ώστε στο διάλυμα της αντίδρασης PCR να είναι σε ισομοριακή αναλογία μεταξύ τους.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	
Μετουσίωση	98°C	30 s	30
Υβριδισμός	62°C	30 s	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

PCD45/F93A

1° στάδιο

Σύσταση της Αντίδρασης

Αντιδραστήριο		Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος		4
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)		0,4
5' τμήμα	3' τμήμα	
For_pET29c::pcd45	For_PheAla_new	0,4

Rev_PheAla_new	Rev_pET29c::pcd45	0,4
Εκμαγείο DNA*		0,5
Phusion DNA Polymerase		0,2
ddH₂O		14,1
Τελικός Όγκος		20

*Ως εκμαγείο DNA χρησιμοποιήθηκε 1:10 αραιώση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET-29c::pcd45.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	30
Μετουσίωση	98°C	30 s	
Υβριδισμός	60°C	30 s	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

2^ο στάδιο

Σύσταση της αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος	10
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)	1
PCD34_pRSF_for	1
PCD34_pRSF_rev	1
Εκμαγείο 5'-τμήμα*	1,25
Εκμαγείο 3'-τμήμα*	4,5
Phusion DNA Polymerase	0,5
ddH ₂ O	30,75
Τελικός Όγκος	50

*Στα 5'- και 3'-τμήματα που προέκυψαν από το πρώτο βήμα της PCR έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις, ώστε στο διάλυμα της αντίδρασης PCR να είναι σε ισομοριακή αναλογία μεταξύ τους.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	30
Μετουσίωση	98°C	30 s	
Υβριδισμός	60°C	30 s	

Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

PCD45/VPA

1^ο στάδιο

Σύσταση της Αντίδρασης

Αντιδραστήριο		Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος		4
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)		0,4
5' τμήμα	3' τμήμα	
For_pET29c::pcd45	For_ValProAla_new	0,4
Rev_ValProAla_new	Rev_pET29c::pcd45	0,4
Εκμαγείο DNA*		0,5
Phusion DNA Polymerase		0,2
ddH ₂ O		14,1
Τελικός Όγκος		20

*Ως εκμαγείο DNA χρησιμοποιήθηκε 1:10 αραιώση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET-29c::pcd45.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	
Μετουσίωση	98°C	30 s	30
Υβριδισμός	60°C	30 s	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

2^ο στάδιο

Σύσταση της αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
5X ρυθμιστικού διαλύματος	10
dNTPs (10 mM, 4*2.5 mM)	1
PCD34_pRSF_for	1
PCD34_pRSF_rev	1

Εκμαγείο 5'-τμήμα*	1,25
Εκμαγείο 3'-τμήμα*	1,25
Phusion DNA Polymerase	0,5
ddH ₂ O	34
Τελικός Όγκος	50

*Στα 5'- και 3'-τμήματα που προέκυψαν από το πρώτο βήμα της PCR έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις, ώστε στο διάλυμα της αντίδρασης PCR να είναι σε ισομοριακή αναλογία μεταξύ τους.

Πρόγραμμα Θερμοκυκλοποιητή

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική μετουσίωση	98°C	3 min	
Μετουσίωση	98°C	30 s	30
Υβριδισμός	60°C	30 s	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

2.15 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Sambrook & Russell, 2001).

2.15.1. Αρχή της μεθόδου

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

- Φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (συνήθως κωδικεύει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).
- Μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους (μετασχηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).
- Είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες.
- 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.

- v. 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.

Η επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης γίνεται ως εξής:

1. Μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA γίνεται καταβύθιση του και επαναιώρηση του σε 100 μl Tris pH=7.5. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 11 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl αλκαλικής φωσφατάσης.
2. Το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h.
3. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται δυο όγκοι φαινόλης : χλωροφορμίου, 1:1, για την απομάκρυνση της αλκαλικής φωσφατάσης. Το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 10 λεπτά στους 0 °C.
4. Η πάνω φάση (υδατική), μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και προστίθενται 2 όγκοι ψυχρής αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους -80 °C για 30 λεπτά
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 0 °C
6. Το ίζημα εκπλένεται με 200 μl αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται όπως στο προηγούμενο βήμα.
7. Γίνεται ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρηση του σε 10 μl ds H₂O.

Αν η πέψη του πλασμιδιακού φορέα ή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί δημιουργεί απότομα άκρα τότε η κλωνοποίηση δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο στην περίπτωση των κολλωδών άκρων.

Σε περίπτωση που η πέψη του ενός τμήματος DNA δημιουργεί απότομα άκρα και του άλλου κολλώδη, μπορούν να δημιουργηθούν απότομα άκρα στο τμήμα του DNA που έχει κολλώδη άκρα χρησιμοποιώντας την T₄ DNA πολυμεράση.

Η T₄ DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για να γεμίσει τα 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα με σημασμένα ή μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs)

Το γέμισμα με T₄ DNA πολυμεράση ακολουθεί την εξής διαδικασία:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται τα εξής:
 - a. Το γραμμικό DNA το οποίο είναι επαναιωρημένο σε 35 μl dH₂O.
 - b. 5 μl BSA.

- c. 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος T₄ DNA πολυμεράσης
 - d. 1 μl από κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs συγκέντρωσης 10mM.
 - e. 1 μl DNA T₄ DNA πολυμεράση.
2. Το παραπάνω μίγμα τοποθετείται στους 37 °C για 1 h.
 3. Η αντίδραση της πολυμεράσης σταματάει με την προσθήκη 1 μl EDTA 0.5 M και 50 μl TE.

Γίνεται καταβύθιση του DNA και έκπλυσή του με 70% αιθανόλη

4. Το DNA επαναιωρείται σε 15 μl dH₂O.

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
 - a. 6-8 μl (0.2 μg) ευθύγραμμου πλασμιδιακού φορέα.
 - b. 6-8 μl (0.8 μg) ευθύγραμμου DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακού φορέα.
 - c. 2 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης.
 - d. 1-2 μl T₄ DNA λιγάση (10 U/μl).
 - e. Ο απαιτούμενος όγκος ds H₂O 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 ωρών.

Στάδιο τρίτο

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στην παρούσα εργασία η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έγινε με την ανίχνευση της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης απουσία του οποίου οι μετασυζευγμένες αποικίες παραμένουν λευκές.

1. Ετοιμάζονται τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό.

2. Επιστρώνεται όλη η επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου των τρυβλίων με 20 μl διαλύματος X-gal και 8 μl διαλύματος IPTG.
3. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37 °C για μια ώρα ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.
4. Ακολουθεί μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εμβολιασμός τους στα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο επιλογής από κατάλληλη αραιώση ώστε να προκύψουν 150 – 200 αποικίες ανά τρυβλίο. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για μια νύχτα.
5. Την επομένη τα τρυβλία μεταφέρονται στους 4 °C για 3-4 ώρες, ώστε να γίνει πιο έντονο το μπλε χρώμα των μη ανασυνδυασμένων αποικιών.
6. Στη συνέχεια επιλέγονται οι λευκές αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ελέγχονται με απομόνωση και ανάλυση του περιέχοντος πλασμιδιακού DNA.

2.15.2 Διαλύματα

- **X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)**

100 mg/ml σε διμεθυλοφορμαμίδιο

Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινά φυαλίδια στους -20 °C

- **IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)**

Διαλύονται 2 g IPTG σε 10 ml τελικό όγκο ds H₂O και το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm.

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

2.16 Περιοριστική Ανάλυση

Μετά την κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript-SK(+) [pBlueScript-SK(+):pcd34, pBlueScript-SK(+):pcd34/R123H, pBlueScript-SK(+):pcd45/F93A, pBlueScript-SK(+):pcd45/VPA] ακολουθούν πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ανά περίπτωση, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής κλωνοποίηση του ενθέματος στον φορέα πριν αποσταλούν για αλληλούχιση.

Η κατασκευή των εικονικών ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων έγινε μέσω της πλατφόρμας GenScript (<https://www.genscript.com/gensmart-design/>) ενώ οι εικονικές πέψεις με τις διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιήθηκαν στην πλατφόρμα Benchling (<https://www.benchling.com>).

Λόγω του ότι η κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript-SK(+) βασίζεται στην πέψη του με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI, η οποία δημιουργεί απότομα άκρα, το

εκάστοτε ένθεμα μπορεί να κλωνοποιηθεί υπό τον έλεγχο είτε του T7 είτε του T3 προαγωγών του φορέα. Ανάλογα με τον προσανατολισμό της ένθεσης αναμένονται και διαφορετικά τμήματα με την πέψη με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα ή συνδυασμό τους.

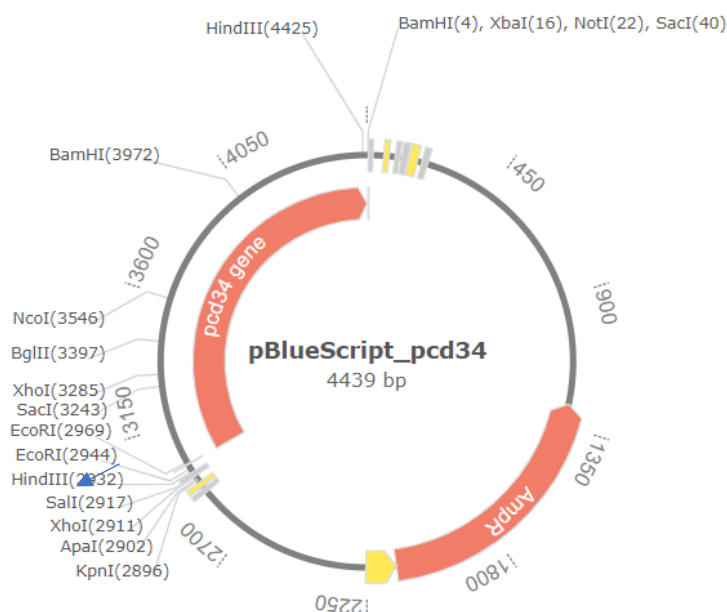
Παρακάτω παρατίθενται εικονικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια και τα αναμενόμενα κατά περίπτωση τμήματα για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή:

- pBlueScript::pcd34
- pBlueScript::pcd34/R123H
- pBlueScript::pcd45/F93A
- pBlueScript::pcd45/VPA

Σημείωση: Οι μεταλλάξεις που εισήχθησαν δεν επηρεάσουν καμία από τις εξεταζόμενες θέσεις περιορισμού. Οπότε για την κατασκευή των εικονικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα αγρίου τύπου γονίδια pcd34 και pcd45, με τους δυο διαφορετικούς προσανατολισμούς ένθεσης (κατά σύμβαση προσανατολισμοί T7 και T3 όταν το ένθεμα μπαίνει υπό τον έλεγχο των αντίστοιχων προαγωγών) στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript-SK(+). Οι εικονικές πέψεις διεξήχθησαν στα αντίστοιχα εικονικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

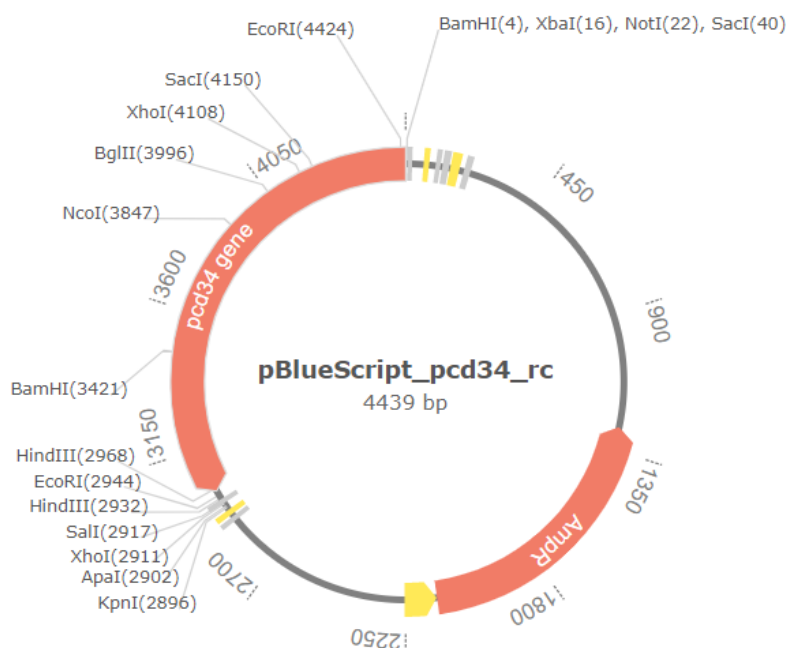
pBlueScript::pcd34 και pBlueScript::pcd34/R123H

«προσανατολισμός T7»



Εικόνα 2.4: T7 Προσανατολισμός της ένθεσης pcd34

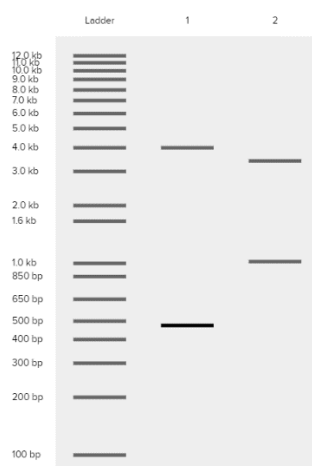
«Προσανατολισμός T3»



Εικόνα 2.5: T3 Προσανατολισμός της ένθεσης *pcd34*

BamHI

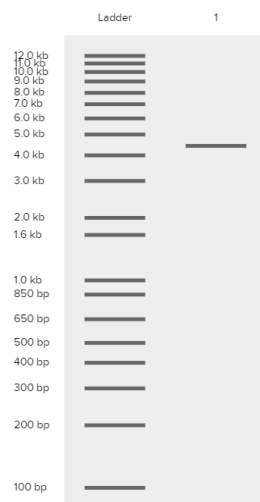
Η πέψη με BamHI πραγματοποιείται για να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα. Αυτό θα βοηθήσει στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης. Αν το γονίδιο έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού αναμένονται ο ζώνες των 3968bp και 471bp. Αν το γονίδιο έχει μπει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού αναμένονται δυο ζώνες των 3417bp και 1022bp (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Εικονική πέψη (virtual digestion) με την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI: (1) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα *pcd34* έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού (3968bp, 471bp), (2) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα έχει μπει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού (3417bp, 1022bp)

BglIII

Η BglIII κόβει μία φορά μέσα στο ένθεμα οπότε αναμένεται μια ζώνη 4439bp ανεξαρτήτως προσανατολισμού ένθεσης. Η πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο πραγματοποιείται για να επιβεβαιωθεί ότι το ένθεμα είναι το επιθυμητό (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7: Εικονική πέψη (*virtual digestion*) με την περιοριστική ενδονουκλεάση BglIII: Αναμένεται μια ζώνη 4439bp ανεξαρτήτως προσανατολισμού ένθεσης του γονιδίου.

EcoRI – HindIII

Οι θέσεις που αναγνωρίζονται από τις EcoRI και HindIII είναι αυτές που εισήχθησαν με τον κατάλληλο σχεδιασμό πριμοδοτικών μορίων, στο 5' και στο 3' άκρο του γονιδίου αντίστοιχα, ώστε να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pRSFDuet-1. Η πέψη με τα συγκεκριμένα ένζυμα αναμένεται να δώσει δυο ζώνες, ~3000bp και ~1500bp και γίνεται για να επιβεβαιωθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί ένθεση του σωστού τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα (Εικόνα 2.8).

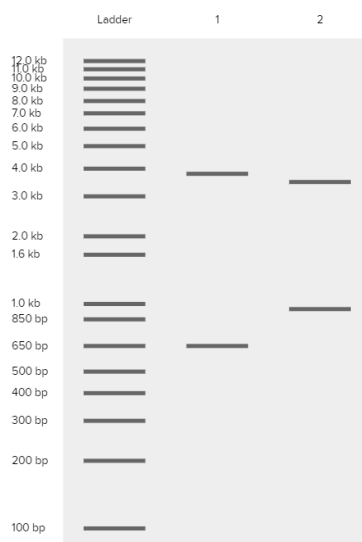


Εικόνα 2.8: Εικονική πέψη (*virtual digestion*) με την περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII: Αναμένονται δύο ζώνες 2946bp (φορέας) και 1456bp (ένθεμα). Η τρίτη ζώνη (25bp) δεν θα είναι ορατή στην πηκτή αφαρόζη.

NcoI – KpnI

Η NcoI κόβει μια φορά μέσα στο ένθεμα: στη θέση 3546 όταν μπαίνει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού και στη θέση 3847 όταν μπαίνει υπό τον έλεγχο του T3. Η KpnI κόβει μια φορά τον πλασμιδιακό φορέα στη θέση 2896.

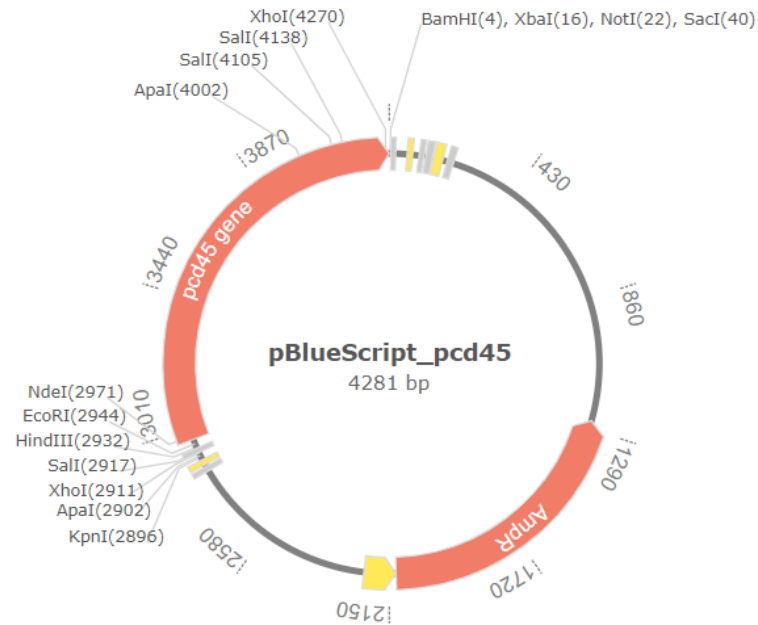
Μετά από διπλή πέψη με NcoI και KpnI, αν το γονίδιο έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού αναμένονται δύο ζώνες των ~3800bp και ~650bp. Αν το γονίδιο έχει μπει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού αναμένονται δυο ζώνες των ~3500bp και ~950bp (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Εικονική πέψη (virtual digestion) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NcoI και KpnI: (1) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα *pcd34* έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού (3793bp, 646bp), (2) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα έχει μπει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού (3492bp, 947bp).

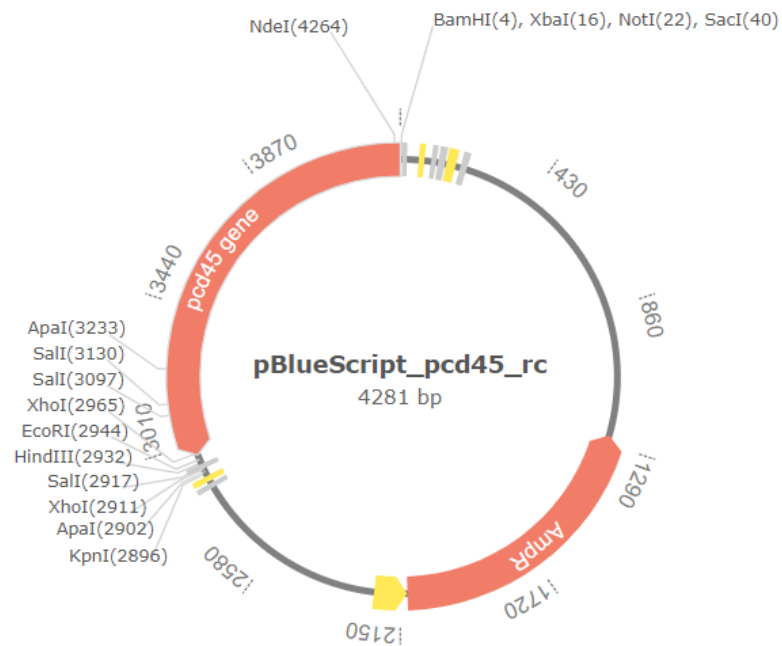
pBlueScript::pcd45, pBlueScript::pcd45/F93A και pBlueScript::pcd45/VPA

«προσανατολισμός T7»



Εικόνα 2.10: T7 Προσανατολισμός της ένθεσης pcd45

«προσανατολισμός T3»

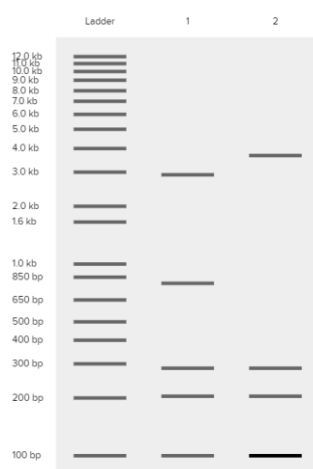


Εικόνα 2.11: T3 Προσανατολισμός της ένθεσης pcd45

AvaI

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *AvaI* αναγνωρίζει πολλές θέσεις (4 αν ή ένθεση έχει γίνει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού και 3 αν έχει γίνει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού) και μια στον πλασμιδιακό φορέα. Μια πέψη με *AvaI* επιβεβαιώνει τόσο την ορθότητα του ενθέματος όσο και τον προσανατολισμό ένθεσής του.

Αν το γονίδιο έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού αναμένονται 5 ζώνες των ~2800bp, ~800bp, ~300bp, ~200bp και 75bp. Αν η ένθεση έχει γίνει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού αναμένονται 4 ζώνες των ~3600bp, ~300bp, ~200bp, ~80bp (2.11).



Εικόνα 2.11: Εικονική πέψη (virtual digestion) με την περιοριστική ενδονουκλεάση *AvaI*: (1) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα *pcd34* έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού (2.9 kb, 792bp, 285bp, 204bp, 75bp), (2) αναμενόμενες ζώνες αν το ένθεμα έχει μπει υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού (3.7 kb, 285bp, 204bp, 78bp).

NdeI-XhoI

Οι θέσεις που αναγνωρίζονται από τις *NdeI* και *XhoI* είναι αυτές που εισήχθησαν με τον κατάλληλο σχεδιασμό πριμοδοτικών μορίων, στο 5' και στο 3' άκρο του γονιδίου αντίστοιχα, ώστε να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET-29c. Ανεξάρτητα με τον προσανατολισμό ένθεσης, η πέψη με τα συγκεκριμένα ένζυμα αναμένεται να δώσει δυο ζώνες, ~3000bp και ~1300bp που αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα και στο ένθεμα αντίστοιχα (Εικόνα 2.12).

(Σημείωση: θέση περιορισμού που αναγνωρίζεται από την *XhoI* φέρει και ο φορέας αλλά το τμήμα που προκύπτει λόγω αυτής είναι 60bp και δεν αναμένεται να είναι ορατό στην πηκτική αгарόζης.)



Εικόνα 2.12: Εικονική πέψη (*virtual digestion*) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*: Αναμένονται δύο ζώνες 2946bp (φορέας) και 1302bp (ένθεμα). Η τρίτη ζώνη (61bp) δεν θα είναι ορατή στην πηκτή αγαρόζης.

2.17 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με πλασμιδιακό DNA (Chung & Miller, 1988).

2.17.1. Αρχή της μεθόδου

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

2.17.2. Πειραματική πορεία

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* σε 20 ml L.B., μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.): 0.3-0.6 στα 600 nm.
2. 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης απορρίπτεται και ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 µl TSB.
4. Επώαση για 10 λεπτά σε μίγμα νερού-πάγου (0°C).
5. Προστίθεται πλασμιδιακό DNA
6. Επώαση για 5-30 λεπτά σε μίγμα νερού-πάγου (0°C).
7. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 900 µl TSB + 20mM γλυκόζη.
8. Ακολουθεί 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.

2.17.3 Διαλύματα

TSB: Luria Broth pH 6.1

10% PEG 3.350

5% DMSO

10mM MgCl₂

10mM MgSO₄

2.18 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

2.18.1. Αρχή της 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.

2.18.2. Πειραματική πορεία

1. Γίνεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm της συγκέντρωσης του πρότυπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2.5 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 µg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60 s και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα ως 40 µl δείγματος σε 2.5 ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 sec και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm.

2.19 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970).

2.19.1. Αρχή της μεθόδου

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου. 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 πολυπεπτίδια 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 πηγματος επιστοιβάξης το οποίο είναι αρκετά πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πηγματος διαχωρισμού.

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στο πήγμα επιστοιβάξης 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 πηγματος διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH του πηγματος ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στο πήγμα διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Τα πηγματα πολυακρυλαμιδίου συντίθενται 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 (Υπερθεϊκό αμμώνιο). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στο πήγμα.

2.19.2. Πειραματική πορεία

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

1. Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
2. Η δεξαμενή γεμίζεται 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. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 Volts μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος το πήγμα.
5. Το πήγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο υπάρχει διάλυμα χρώσης (staining solution) και βάφεται για 1 ώρα περίπου σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
6. Τέλος ακολουθεί ξήρανση του πηγματος στους 80 °C για 30 – 45 λεπτά.

2.19.3. Διαλύματα

1X διάλυμα φόρτωσης:	50mM Tris pH 6.8
	2% SDS
	0.1% μπλε βρωμοφαινόλης
	10% γλυκερόλη
	5% 2-μερκαπτοαιθανόλη
10X διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1L):	144 g γλυκίνη (250 mM pH 8.3)
	20 g Tris base (25 mM)
	50 ml SDS 10%
Διάλυμα χρώσης (100 ml):	0.1 g Coomassie Brilliant Blue R-250
	40 ml ds H ₂ O
	50 ml μεθανόλη
	10 ml οξικό οξύ
Διάλυμα αποχρωματισμού:	10% μεθανόλη ή αιθανόλη
	10% οξικό οξύ

Πήγμα διαχωρισμού	8%	10%	12%	15%	Πήγμα επιστοίβαξης (5%)
ακρυλαμίδιο:bis (29:1)	2.67 ml	3.33ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
dsH ₂ O	4.75 ml	4.09 ml	3.2 ml	2.2 ml	2.8 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl
10 % APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	20 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	5 μl

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

2.20.1 Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα pET (Εικόνα 18.1) 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
- στον ανασυνδυασμένο φορέα στον προαγωγό T7 *lac* προκειμένου να καταστείλει τη μεταγραφή του στοχευόμενου γονιδίου.

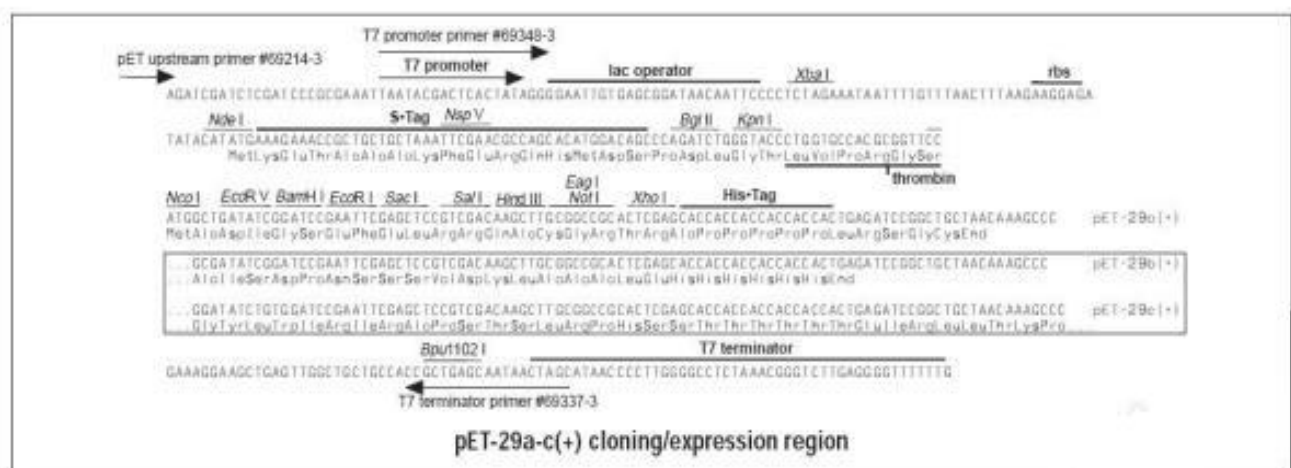
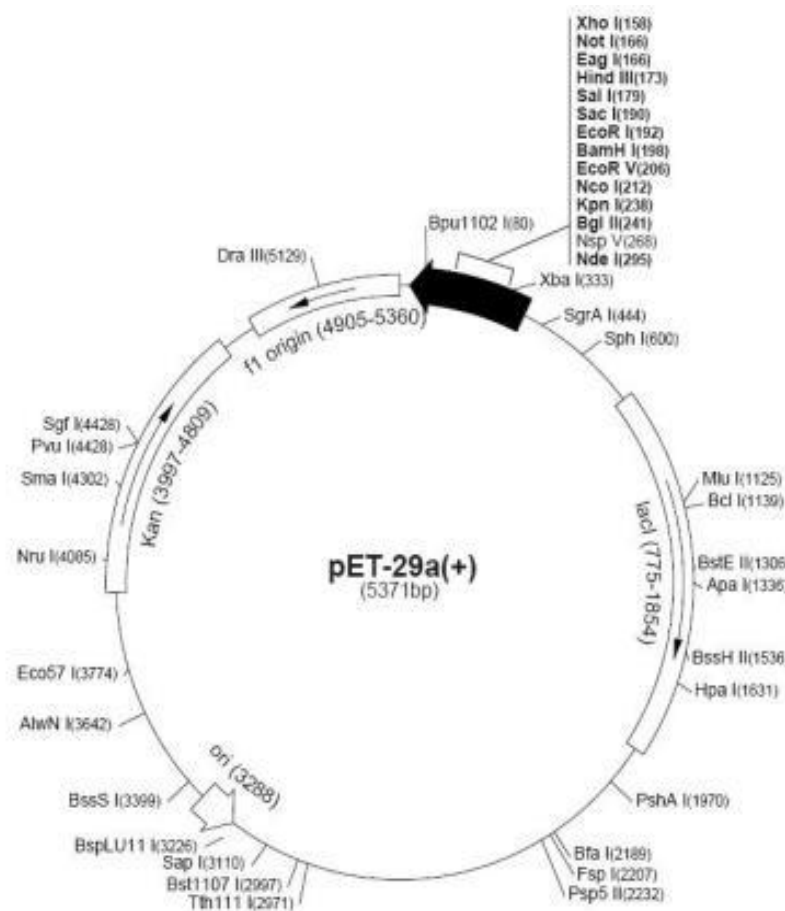
2.20.2 Πειραματική πορεία

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

1. Κλωνοποίηση γονιδίων στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης. Στην εργασία αυτή επιλέχθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pET-29c(+) και pRSFDuet-1.
2. Μετασχηματισμός με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο των ξενιστών BL21(DE3).
3. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5 ml L.B. 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 μl/ 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.

T7 promoter	368-384
T7 transcription start	367
S ⁺ Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His ⁺ Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	775-1854
pBR322 origin	3288
Kan coding sequence	3997-4809
f1 origin	4905-5360

The maps for pET-29b(+) and pET-29c(+) are the same as pET-29a(+) (shown) with the following exceptions: pET-29b(+) is a 5370bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-29c(+) is a 5372bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198.



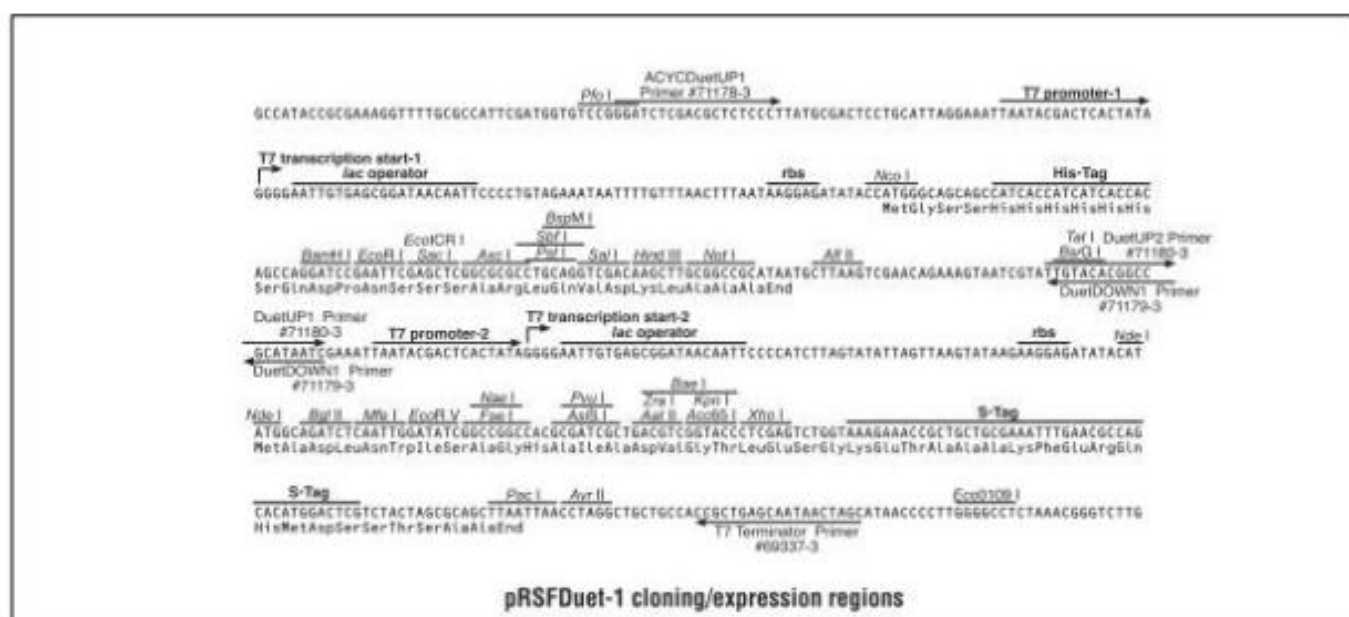
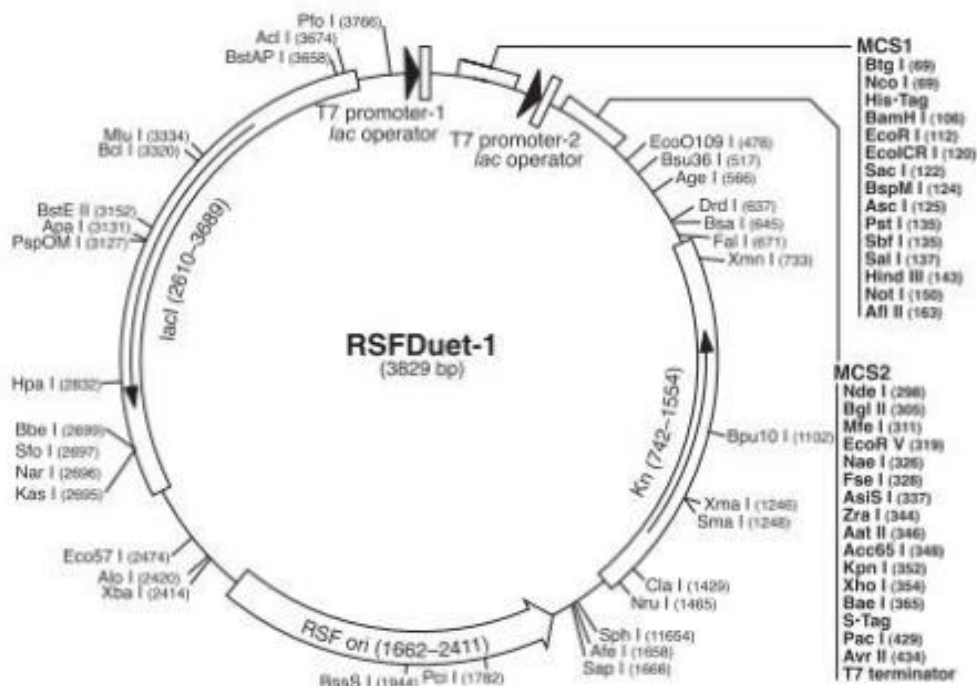
Εικόνα 1.14: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pET-29.

pRSFDuet-1 Vector

TB391 0903

	Cat. No.
pRSFDuet-1 DNA	71341-3
pRSFDuet-1 sequence landmarks	
T7 promoter-1	3582-3598
T7 transcription start-1	1
His•Tag [®] coding sequence	83-100
Multiple cloning sites-1 (<i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II)	69-168
T7 promoter-2	214-230
T7 transcription start-2	231
Multiple cloning sites-2 (<i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II)	297-438
S•Tag [™] coding sequence	366-410
T7 terminator	462-509
kan (<i>Kn^r</i>) coding sequence	742-1554
RSF origin	1662-2411
<i>lacI</i> coding sequence	2610-3689

pRSFDuet[™]-1 is designed for the coexpression of two target ORFs. The vector contains two multiple cloning sites (MCS), each of which is preceded by a T7*lac* promoter and ribosome binding site (rbs). The vector also carries the RSF1030-derived RSF replicon, *lacI* gene and kanamycin resistance gene (*Kn^r*). This vector can be used in combination with pACYCDuet[™]-1 (Cat. No. 71147-3), pCDFDuet[™]-1 (Cat. No. 71340-3), and pETDuet[™]-1 (Cat. No. 71146-3) in an appropriate host strain for the coexpression of 4 to 8 target proteins. ORFs inserted into MCS1 can be sequenced using the ACYCDuetUP1 Primer (Cat. No. 71178-3) and DuetDOWN1 Primer (Cat. No. 71179-3). ORFs inserted into MCS2 can be sequenced using the DuetUP2 Primer (Cat. No. 71180-3) and T7 Terminator Primer (Cat. No. 69337-3). Unique sites are shown on the circle map.



Εικόνα 2.15: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pRSFDuet-1.

2.21 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni^{2+} -NTA (Herz et al., 2000).

2.21.1 Αρχή της μεθόδου

Η στήλη Ni^{2+} -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 οξέος (IDA, η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τέτοιου είδους χρωματογραφίες)

2.21.2 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 αποθηκευτεί 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. Φυγοκέντρωση 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 Α 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 Α.
4. Η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 20 ml διαλύματος Β 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 πηγμένα σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.21.3 Διαλύματα

Διάλυμα Α: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

20 mM ιμιδαζόλιο

0.3 mM PMSF

Διάλυμα Β: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

20 mM (B_{20}) και 100 mM (B_{100}) ιμιδαζόλιο

Διάλυμα Γ: 100 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM NaCl

100 mM (C_{100}) και 500 mM (C_{500}) ιμιδαζόλιο

2.22 Ενζυμικοί Προσδιορισμοί με φωτομέτρηση.

2.22.1 Ενζυμικός προσδιορισμός της 4,5-διοξυγονάσης του PCA (Ono et al., 1970).

Το μίγμα της αντίδρασης (Πίνακας 2.6) τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα θερμοστατούμενη στους 20°C. Η ενζυμική δραστηριότητα μετρείται ως γραμμική μεταβολή (αύξηση) της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου από τον σχηματισμό α-υδρόξυ-γ-καρβοξυμουκονικής ημιαλδεΐδης στα 410 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού φωτός και για χρονικό διάστημα 60 sec ($\epsilon_{410} = 11.200 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ σε pH=9,5).

Πίνακας 2.6: Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς της 4,5-διοξυγονάσης του PCA.

Είδος Αντιδραστηρίου	Όγκος στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα: Γλυκίνη-NaOH, 100mM, pH=9.5	880
Υπόστρωμα: 3mM PCA σε 10mM Γλυκίνη-NaOH pH=9.5	100
Ενζυμικό παρασκεύασμα	20
Ολικός όγκος	1000

2.22.2 Ενζυμικός προσδιορισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (Iwagami et al., 2000).

Το ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με το ένζυμο – ή το κυτταρικό εκχύλισμα - (Πίνακας 2.7) τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα και επωάζεται για 1 min στους 25 °C. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζύμου. Μετράμε μείωση της απορρόφησης στα 290 nm που οφείλεται στην κατανάλωση του υποστρώματος PCA. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από το ένζυμο είναι η μετατροπή του PCA σε 3-καρβόξυ-*cis,cis*-μουκονικό οξύ ($\epsilon_{290} = 2.300 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ σε pH=8,5).

Πίνακας 2.7: Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς της 3,4- διοξυγονάσης του PCA.

Είδος Αντιδραστηρίου	Όγκος στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris-HCl, 50mM, pH=8.5	850
Υπόστρωμα: 3mM PCA σε 10mM Tris-HCl pH=9.5	100
Ενζυμικό παρασκεύασμα	50
Ολικός όγκος	1000

2.22.3 Ενζυμικός προσδιορισμός της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al., 1997).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος κατεχόλης (Πίνακας 2.8). Μετράμε την αύξηση της απορρόφησης στα 375 nm που οφείλεται στο σχηματισμό 2-υδρόξυ-6-οξοεπτα-2,3-διενοϊκού οξέος που είναι το προϊόν της αντίδρασης.

Πίνακας 2.8: Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς της 2,3- διοξυγονάσης της κατεχόλης.

Είδος Αντιδραστηρίου	Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα: φωσφορικό, pH=7.5	45
Υπόστρωμα: κατεχόλη	0,5
Ενζυμικό παρασκεύασμα	0,02-0,2 mg
Ολικός όγκος	1000 μl

2.22.4 Ενζυμικός προσδιορισμός της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (Mars et al., 1997).

Η αντίδραση (Πίνακας 2.9) πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με την προσθήκη του υποστρώματος. Πριν την αντίδραση επάζουμε το κυτταρικό εκχύλισμα με τα υπόλοιπα διαλύματα (εκτός του υποστρώματος) για 10 min ώστε να χάσει την ενεργότητα 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης που μπορεί να παρουσιάζει. Μετράμε την αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm που οφείλεται στο σχηματισμό του προϊόντος *cis,cis*-μουκονικού οξέος.

Πίνακας 2.9: Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης.

Είδος Αντιδραστηρίου	Συγκέντρωση στο διάλυμα της αντίδρασης (mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα: φωσφορικό, pH=7.5	33
Na ₂ EDTA	1,3
H ₂ O ₂	2,6
Υπόστρωμα: κατεχόλη	0,5
Ενζυμικό παρασκεύασμα	0,02-0,2 mg
Ολικός όγκος	1000 μl

2.23 Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

Με βάση τον ενζυμικό προσδιορισμό της 4,5-διοξυγονάσης του PCA προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου.

Για τιμές pH από 7 μέχρι 9 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl ενώ για τις τιμές 9,5, 11, 12 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-NaOH.

2.24 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη διεξαγωγή του ενζυμικού προσδιορισμού της 4,5-διοξυγονάσης του PCA σε θερμοστατούμενο φωτόμετρο σε θερμοκρασίες 16, 18, 20, 25, 30, 35, 37, 40 και 45°C.

2.25 Φασματοσκοπία UV/Vis για αναγνώριση εναλλακτικών υποστρωμάτων

Ο έλεγχος της αναγνώρισης εναλλακτικών (πλην του PCA) υποστρωμάτων από τις PCD34 και PCD45 και τις αντίστοιχες μεταλλάξεις τους πραγματοποιήθηκε μέσω της παρακολούθησης των αλλαγών στο φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης σε μήκη κύματος **230 - 450 nm**.

Η αντιδράσεις διεξήχθησαν σε μικροπλάκα κατάλληλη για μέτρηση απορρόφησης σε UV μήκη κύματος, σε αυτοματοποιημένο μετρητή απορρόφησης 96 κυψελίδων TECAN που περιέχει το λογισμικό Magellan.

Οι αντιδράσεις ετοιμάζονται σε μικροσωληνάρια του 1,5 ml όπως γίνεται στους ενζυμικούς προσδιορισμούς που περιγράφονται ανωτέρω και μετά την έναρξη της αντίδρασης με την προσθήκη του κυτταρικού εκχυλίσματος με το υπερεκφρασμένο ένζυμο (είτε καθαρισμένου ενζύμου), 200 μl από κάθε αντίδραση μεταφέρονται σε καθορισμένη θέση της μικροπλάκας 96 θέσεων και αυτή τοποθετείται στον αυτοματοποιημένο μετρητή TECAN.

Λαμβάνονται μετρήσεις σε χρόνους 0 – 10 min ανά ένα λεπτό και 0, 30, 60, 90 και 120 min. Λαμβάνεται επίσης μέτρηση και με το πέρας των 24h.

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από κυτταρικό εκχύλισμα συγκέντρωσης ~5 mg/ml (1:10 αραίωση του αρχικού κυτταρικού εκχυλίσματος). Η τελική συγκέντρωση του εκάστοτε υποστρώματος στην αντίδραση είναι 0,024 mM ενώ τα υποστρώματα που ελέγχθηκαν είναι τα εξής:

- PCA
- 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4HB)
- 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3HB)
- p-Κουμαρικό οξύ
- Καφεϊκό οξύ
- 2,4-δινιτροφαινόλη
- 1,3,5-τριχλωροφαινόλη
- Φαινόλη
- Πυρογαλλόλη
- Υδροκινόννη
- Κατεχόλη
- Γαλλικό οξύ
- 3-O-μεθυлгаλλικό οξύ
- 3,4-διφαινυλοξικό οξύ
- 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό
- Βενζοϊκό οξύ
- Φθαλικό οξύ
- 4-αμινοβενζοϊκό οξύ
- p-κρεζόλη
- 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ

Ταυτόχρονα εξετάστηκαν οι μεταβολές του φάσματος του κάθε υποστρώματος στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης απουσία ενζύμου για να αποκλειστούν τυχόν μεταβολές ως αποτέλεσμα βιομετατροπής διαμεσολαβούμενης από το ένζυμο.

2.26 Εκδίωξη πλασμιδιακού DNA (Plasmid curing)

Τα πλασμίδια είναι ανεξάρτητα, κυκλικά στοιχεία DNA, αντιγράφονται ανεξάρτητα από την αντιγραφή του γενωμικού DNA και ο αριθμός των αντιγράφων του εκάστοτε πλασμιδίου είναι χαρακτηριστικός του είδους του μικροοργανισμού. Τα πλασμίδια συνήθως φέρουν γονίδια που κωδικεύουν για διάφορες ιδιότητες που προσδίδονται στο κύτταρο, όπως για παράδειγμα ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα, αποδόμηση διαφόρων υδρογονανθράκων, σύνθεση των αντιμικροβιακών βακτηριοσινών και αντιβιοτικών κτλ. Τα πλασμίδια είναι δυνατόν να μεταφερθούν εύκολα από ένα κύτταρο σε κάποιο άλλο με διαδικασίες όπως ο μετασχηματισμός, η βακτηριακή σύζευξη και η κινητοποίηση (Oral et al., 2000).

Υπάρχουν χημικοί και φυσικοί παράγοντες που επάγουν την «εκδίωξη» ενός πλασμιδίου από ένα κύτταρο (plasmid curing) αναστέλλοντας τη διαδικασία αντιγραφής τους. Η αναστολή αυτή οδηγεί τελικά στην απαλοιφή του πλασμιδίου από το κύτταρο ξενιστή έπειτα από κάποιους κύκλους κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιοι παράγοντες είναι το SDS, το βρωμιούχο αιθίδιο, το πορτοκαλί της ακριδίνης κ.α. ενώ και οι συνεχείς ανακαλλιέργειες του βακτηριακού κυττάρου σε θερμοκρασία ελαφρώς αυξημένη από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού έχει βρεθεί ότι έχει αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των συνεχόμενων ανακαλλιεργειών σε αυξημένη θερμοκρασία, καθώς και η καλλιέργεια παρουσία SDS και βρωμιούχου αιθιδίου.

2.26.1 Καλλιέργεια παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (Manjusha & Sarita, 2011)

- 1) Προκαλλιέργεια *P. phenanthrenivorans* Sphe3 σε 3ml LB (overnight, O/N).
- 2) Εμβολιάζονται 200 μl από την προκαλλιέργεια σε σωληνάκια με 5 ml LB και διαφορετικές συγκεντρώσεις βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), από 50 έως 500 μg/ml.
- 3) O/N καλλιέργεια στους 30°C υπό ανάδευση.
- 4) Επιλέγεται η μέγιστη συγκέντρωση που έχει επιτρέψει την ανάπτυξη.
- 5) Πραγματοποιείται O/N καλλιέργεια του Sphe3 σε 5 ml LB παρουσία της προαναφερθείσας συγκέντρωσης EtBr.
- 6) Ακολουθούν σειριακές αραιώσεις και γίνεται επίστρωση σε τρυβλίο LA ώστε να προκύψουν μονές αποικίες.
- 7) Επιλέγεται τυχαία ένα πλήθος αποικιών (>30%) και εμβολιάζονται σε αντίστοιχες υγρές καλλιέργειες των 5 ml LB, 30°C, O/N.
- 8) Πραγματοποιείται απομόνωση γενετικού υλικού (CTAB – phenol/ chloroform).
- 9) Ελέγχεται η παρουσία του μικρού καταβολικού πλασμιδίου rASPHE302 με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικά πριμοδοτικά μόρια για το γονίδιο της 4,5-διοξυγονάσης του PCA που εντοπίζεται μόνο σε αυτό το πλασμίδιο.
 - Παράλληλα ελέγχεται και ότι πρόκειται για DNA από το στέλεχος Sphe3 και όχι από κάποια μόλυνση με PCR με πριμοδοτικά μόρια ειδικά για το γονίδιο της 3,4-διοξυγονάσης του PCA που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα.

2.26.2 Καλλιέργεια παρουσία SDS (Radi & Rahman, 2010)

- 1) Αντίστοιχα με τη μέθοδο για το EtBr που περιγράφηκε προηγουμένως (2.26.1) δοκιμάζονται διάφορες συγκεντρώσεις SDS (0,01%, 0,02%, 0,05%, 1% και 2%) SDS σε υγρές καλλιέργειες 5ml *Srhe3* και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν O/N υπό ανάδευση στους 30°C.
- 2) Από τη συγκέντρωση 0,01% που είναι και η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της ανάπτυξης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) εμβολιάζεται εκ νέου 1% καλλιέργειας σε φρέσκο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB 5ml και τα κύτταρα αναπτύσσονται στους 30°C O/N υπό ανάδευση.
- 3) Πραγματοποιούνται 7 διαδοχικές ανακαλλιέργειες όπως περιγράφεται στο βήμα 2.
- 4) Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.26.1 από το βήμα 6 και μετά.

2.26.3 Διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε αυξημένη θερμοκρασία (Trevors, 1986)

Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους Trevors et al (1986) και τις εκεί αναφορές, καλλιέργεια ενός βακτηρίου σε θερμοκρασίες κατά 5-7°C υψηλότερες από την βέλτιστη από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εκδίωξη πλασμιδίου.

Σε αυτή τη βάση πραγματοποιήθηκαν 7 διαδοχικές ανακαλλιέργειες του *Srhe3* σε θερμοκρασία 37°C. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται και στην προηγούμενη Παράγραφο.

2.27 Μεταβολομική Ανάλυση

2.27.1 Αρχές Μεταβολομικής

Η μεταβολομική ανάλυση είναι ο επιστημονικός τομέας που ασχολείται με τη μελέτη οργανικών μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους (συνήθως < 3000 m/z) εντός ενός κυττάρου, ιστού ή βιορευστού (Bundy et al., 2009). Ως μεταβόλομα περιγράφεται το σύνολο των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος. Οι μεταβολίτες είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία παράγονται από τους οργανισμούς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν από αυτούς για περαιτέρω μεταβολικές αντιδράσεις. Οι μεταβολίτες είναι απόλυτα συνυφασμένοι με τη γονιδιακή έκφραση και το μεταβολικό προφίλ ενός βιολογικού συστήματος είναι ενδεικτικό όλων των διεργασιών που επιτελούνται στο σύστημα αυτό. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία ανάπτυξη στο πεδίο της μεταβολομικής και προσεγγίζεται με πολλές τεχνικές (LC-MS, GC-MS, HPLC, NMR κτλ.) καθώς μια τεχνική δεν δύναται να καλύψει το σύνολο των μεταβολιτών ενός δυναμικού βιολογικού συστήματος που επηρεάζεται από τις διαφορετικές συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. η πηγή άνθρακα ή η φάση ανάπτυξης μιας βακτηριακής καλλιέργειας) ή ακόμη και από γενετικές τροποποιήσεις (Fraga-Corral et al., 2022).

Η συνηθέστερη προσέγγιση στην μεταβολομική ανάλυση είναι η μεταβολή των συνθηκών ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού και η παρατήρηση των διαφορών του μεταβολομικού προφίλ ως συνεπαγωγή της μεταβολής αυτής (Fraga-Corral et al., 2022).

Ακόμη μέσω της μεταβολομικής ανάλυσης μπορεί να γίνει και ταυτοποίηση μικροοργανισμών όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των Cevallos-cevallos et al. (2011) όπου μέσω των μεταβολομικών προφίλ που προέκυψαν από GC-MS ανάλυση κατέστη εφικτή η διάκριση παθογόνων στελεχών *E. coli* και *Salmonella* spp. από ένα γενικότερο σύνολο μικροοργανισμών σε τρόφιμα (Cevallos-Cevallos et al., 2011).

2.27.2 Υγρή Χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας

Μια από τις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιείται για μεταβολομική ανάλυση είναι η υγρή χρωματογραφία συνδυαστικά με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αυτή και ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI). Σημαντικό ρόλο σ' αυτή τη μέθοδο για τον διαχωρισμό των μορίων παίζει η σύσταση της κινητής φάσης καθώς επηρεάζει τον χρόνο έκλουσης των μορίων. Παρέχει ικανοποιητική ακρίβεια αλλά έχει μικρότερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την αέρια χρωματογραφία (GC-MS) και δεν υπάρχουν τόσο ενημερωμένες βιβλιοθήκες κορυφών ταυτοποίησης όσο για την GC-MS. Από την άλλη βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι είναι μια πολύ πιο οικονομική προσέγγιση, δεν χρειάζεται παραγωγή των δειγμάτων όπως στην αέρια χρωματογραφία και είναι κατάλληλη για μη πτητικές ή θερμοευαίσθητες ενώσεις (Wilson et al., 2005).

Κάθε κορυφή που προκύπτει στα χρωματογραφήματα μιας LC-MS μεταβολομικής ανάλυσης αντιστοιχούν σε έναν μεταβολίτη, εκτός και αν στο δείγμα υπάρχουν και άλλοι μεταβολίτες που εκλούνται στον ίδιο χρόνο (χρόνος κατακράτησης, retention time, R.T.). Στο φάσμα μάζας κάθε κορυφής εμφανίζεται το μοριακό ιόν του μεταβολίτη ενώ μπορεί να είναι ορατά και κάποια άλλα ιόντα που ενδέχεται να προκύψουν ως θραύσματα ή προσθήκες ιόντων.

Η επαγόμενη θραυσματοποίηση σε συνδυασμό με το RT χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του εκάστοτε μεταβολίτη. Η ταυτοποίηση αυτή γίνεται με βεβαιότητα μόνο αν

υπάρχει κάποια πρότυπη ένωση της οποίας το MS ή MS/MS φάσμα και το RT είναι ταυτόσημο με αυτά του υπό εξέταση μεταβολίτη, σε ανάλυση που έγινε στις ίδιες συνθήκες.

2.27.3 Εκχύλιση μεταβολιτών από καλλιέργειες κυττάρων *Srhe3* και *Srhe3c* σε 3HB και 4HB.

1. Από κάθε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3* και *Srhe3c* σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με 3HB και 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, λαμβάνονται 50 ml δείγματος από 4 συνολικά φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων: εκθετική, ύστερη εκθετική, στατική και ύστερη στατική.
2. Φυγοκέντρηση 6000 rpm/ 15min/ 4°C για απομάκρυνση των κυττάρων.
3. Οξίνιση με HCl 4N μέχρι το pH 2 του υπερκείμενου μέσου της καλλιέργειας που προκύπτει από το βήμα 2.
4. Προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1 (στην προκειμένη περίπτωση 50 ml) σε προχοΐδα όπου έχει μεταφερθεί προηγουμένως το δείγμα και εκχύλιση. Η εκχύλιση πραγματοποιείται εις διπλούν.
5. Συλλογή των αιθερικών φάσεων.
6. Προσθήκη αφυδατικού παράγοντα όπως το NH_4Cl ώστε να απορροφήσει υπολείμματα νερού που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα. Η προσθήκη γίνεται εμπειρικά μέχρι το σημείο το NH_4Cl να σταματήσει να σχηματίζει συσσωματώματα.
7. Μεταφορά του δείγματος σε καθαρή εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη με τη χρήση ηθμού από διηθητικό χαρτί ώστε να κατακρατηθεί το NH_4Cl .
8. Απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.
9. Επαναιώρηση διαλυτών σε 10 ml μεθανόλης τμηματικά («ξεπλένουμε» την σφαιρική φιάλη με 1 ml μεθανόλης και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 10 φορές.).
10. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την LC-MC ανάλυσή τους.

2.27.4. Αναλυτική Μέθοδος

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε διαδοχική φασματομετρία μαζας σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (LC-MS/MS). Ως αναλυτής μαζών χρησιμοποιήθηκε ο LTQ Orbitrap XL εφοδιασμένος με αντλία και αυτόματο δειγματολήπτη από την εταιρεία Thermo-Scientific, Germany. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hypersil GOLD analytical column (50 mm x 2.1 mm, 1.9 μm) from Thermo (Bremen, Germany). Πραγματοποιήθηκε πλήρη σάρωση (full-scan) αλλά και MS/MS ανάλυση. Ο όγκος της έκχυσης ήταν 10 μL . Η θερμοκρασία στήλης ήταν σταθερή στους 40°C. Ο διαλύτης έκλουσης A περιείχε νερό με 0,1% φορμικό οξύ και 5 mM φορμικό αμμώνιο ενώ ο διαλύτης B περιείχε ακετονιτρίλιο. Το σύστημα βαθμωτής έκλουσης φαίνεται στον πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10: Συγκέντρωση των διαλυτών της κινητής φάσης κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων.

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
2	98	2
15	5	95
16	5	95
16,1	98	2
20	98	2

Η ταχύτητα ροής ήταν 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ο ιονισμός βρισκόταν στην αρνητική πολικότητα. Το εύρος μάζας στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ήταν 100 με 1200 m/z . Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη μέθοδο πλήρους σάρωσης με διακριτική ικανότητα $R = 60,000$ με βάση το μοριακό ιόν. Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν τα χαρακτηριστικά ιόντα θραυσματοποίησης με τύπο ενέργειας CID (Collision Induced Dissociation) 35% (top 5).

Η θερμοκρασία του τριχοειδούς βρισκόταν στους 320°C και για την υποβοήθηση της εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο, το οποίο εισέρχεται στο όργανο από δύο κατευθύνσεις. Το κυρίως αέριο με 45 a.u. και το βοηθητικό αέριο με 15 a.u. Η τάση που παρείχε η πηγή ήταν 3.0 kV και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν το Xcalibar Version 2.1.

2.28 Μεταγραφομική Ανάλυση

2.28.1 Αρχές Μεταγραφομικής

Με τον όρο μεταγράψωμα (transcriptome) ορίζεται το σύνολο των μορίων RNA σε έναν οργανισμό, ιστό ή κύτταρο. Αποτελείται κυρίως από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το ριβοσωμικό RNA (rRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και μια σειρά από μη κωδικεύοντα μόρια, όπως τα μικρά RNA (sRNA). Στο πλαίσιο αυτό τα μόρια mRNA συγκεντρώνουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελούν τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του γονότυπου και του φαινότυπου ενός οργανισμού και για το λόγο αυτό είναι μόρια-κλειδιά στην κατανόηση των λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος και του κυτταρικού μηχανισμού. Σε αντίθεση με το χαρακτηριστικά σταθερό γονιδίωμα ενός κυττάρου, του μεταγράψωμα παρουσιάζει μια πλαστικότητα καθώς επηρεάζεται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες. Για την ακρίβεια, ο στόχος της μεταγραφομικής είναι η αναγνώριση της μεταβαλλόμενης έκφρασης των γονιδίων υπό διαφορετικές συνθήκες, δίνοντας έτσι πληροφορίες για τον ρόλο των γονιδίων αυτών. Ουσιαστικά υπάρχουν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις για μια μεταγραφομική ανάλυση:

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR)
- Μικροσυστοιχίες (microarrays)
- Αλληλούχιση RNA επόμενης γενεάς (NGS RNA-seq) (Lamas et al., 2019)

2.28.2. Real-time RT-PCR (Stryer, 1988)

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης το RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση. Σε αυτή την περίπτωση οι γενετικές πληροφορίες μεταβιβάζονται από το RNA στο DNA, το αντίστροφο από την κανονική κατεύθυνση της μεταφοράς πληροφοριών (από αυτό πήρε και το όνομά του το ένζυμο που καταλύει αυτό το βήμα).

Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει μια αλυσίδα συμπληρωματική του εκμαγείου RNA, αν της δοθεί ένα πριμοδοτικό μόριο που να περιέχει ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο και να διαθέτει βάσεις συμπληρωματικές του RNA. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτό το ένζυμο για να συνθέσουμε DNA από mRNA δίνοντας έναν ολιγο-dT ως πριμοδοτικό μόριο, γιατί αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία mRNA. Η υπόλοιπη αλυσίδα cDNA συντίθεται παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών. Το RNA αυτού του υβριδίου RNA-DNA υδρολύεται εν συνεχεία σε υψηλότερο pH. Το 3' άκρο του DNA που σχηματίστηκε δημιουργεί μια κάμψη φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

2.28.2.1 Απομόνωση ολικού RNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Nucleospin® RNA της Macherey Nagel

Γενικές παρατηρήσεις για το χειρισμό του RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι πολύ σταθερά και ενεργά ένζυμα, τα οποία δεν απαιτούν άλλους παράγοντες για να δράσουν. Οι ριβονουκλεάσες είναι πολύ δύσκολο να αδρανοποιηθούν, ενώ ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες είναι αρκετές για να καταστρέψουν το RNA, για αυτό το λόγο δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλαστικό ή γυάλινο σκεύος χωρίς

να εξαλειφθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης με ριβονουκλεάσες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του RNA όσο και μετά από αυτήν, έτσι ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του RNA με ριβονουκλεάσες. Για την εξασφάλιση ενός περιβάλλοντος ελεύθερου RNAσών, λήφθηκαν τα εξής μέτρα:

Κατά το χειρισμό του RNA θα πρέπει να ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές. Τα χέρια καθώς και η σκόνη είναι πιθανοί φορείς βακτηρίων και μούχλας που είναι οι πιο διαδεδομένες πηγές μόλυνσεων με ριβονουκλεάσες. Η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό των διαλυμάτων και των δειγμάτων RNA είναι επιβεβλημένη για την αποφυγή επιμόλυνσης με ριβονουκλεάσες, οι οποίες μπορεί να προέρχονται είτε από το δέρμα είτε από σκόνη στο εργαστηριακό περιβάλλον. Τα γάντια θα πρέπει να αλλάζονται τακτικά και τα μπουκαλάκια να παραμένουν με τα καπάκια κλειστά όταν δεν χρησιμοποιούνται. Το RNA που απομονώνεται θα πρέπει να διατηρείται σε πάγο.

Συνίσταται η χρήση αποστειρωμένου πλαστικού εξοπλισμού μιας χρήσεως (μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια, ρύγχη πιπετών κλπ.). Τα ανωτέρω είναι συνήθως ελεύθερα RNAσών και δεν απαιτούν καμιά διαδικασία απομάκρυνσης των ριβονουκλεασών. Η απαλλαγή των διαλυμάτων από ριβονουκλεάσες επιτυγχάνεται με την κατεργασία τους με DEPC (διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ).

Κατεργασία με DEPC (Diethylpyrocarbonate)

Η κατεργασία με DEPC, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εξάλειψη των ριβονουκλεασών από το νερό και άλλα διαλύματα. Το διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (DEPC) καταστρέφει την ενζυμική δραστηριότητα των ριβονουκλεασών καθώς και άλλων πρωτεϊνών, τροποποιώντας τις ομάδες -NH, -SH και -OH, όπου αυτές υπάρχουν. Για την κατεργασία διαλυμάτων με DEPC, προστίθεται 0.1% DEPC και μετά από ανάδευση το διάλυμα αφήνεται για τουλάχιστον 12 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται όπου και το DEPC διασπάται, παράγοντας μια μικρή ποσότητα αιθανόλης, η οποία αντιδρώντας με ίχνη καρβοξυλικών οξέων, παράγει πτητικούς εστέρες στους οποίους οφείλεται και η χαρακτηριστική οσμή των κατεργασμένων διαλυμάτων. Αντιδραστήρια που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες (π.χ. Tris και EDTA), δευτεροταγείς ή τριτοταγείς αμίνες (π.χ. HEPES) καθώς και αντιδραστήρια που δεν αποστειρώνονται, δεν μπορούν κατεργαστούν με DEPC.

Η απομόνωση του RNA του βακτηριακού στελέχους *Srhe3* περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων

25 ml καλλιέργειας φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 11.000 g στους 4° C.

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE το οποίο περιέχει λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 10 mg/ml.

Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και επώαση για 1 ώρα στους 37° C.

2. Λύση κυττάρων

Στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος RA1 και 3.5 μl β-μερκαπτοαιθανόλη, με καλή ανάδευση (vortex).

3. Φιλτράρισμα του εναιωρήματος

Το μίγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη Nucleospin® Filter Column, η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής (2 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 1 λεπτό, με την οποία επιτυγχάνεται φιλτράρισμα του μίγματος μέσω της στήλης και μείωση του ιξώδους και της θολερότητας του.

4. Ρύθμιση των συνθηκών δέσμησης του RNA

Στο διαυγές πλέον μίγμα προστίθενται 350 μl αιθανόλη 70% με καλή ανάδευση.

5. Δέσμηση του RNA

Μετά από καλή ανάδευση με πιπेटάρισμα, το ελαιώδες μεταφέρεται στην ειδική στήλη Nucleospin® RNA II Column η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g.

Το υγρό απορρίπτεται και η ειδική στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

6. Αφαλάτωση της μεμβράνης της στήλης

Προστίθενται στη στήλη 350 μl ρυθμιστικό διάλυμα αφαλάτωσης της μεμβράνης (MDB, Membrane Desalting Buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 g. Το υγρό απορρίπτεται.

7. Αποδόμηση του DNA

Στη στήλη προστίθενται 95 μl DNase reaction mixture και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

8. Έκπλυση και ξήρανση της μεμβράνης

Πρώτη έκπλυση

Προστίθενται 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA2 στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Δεύτερη έκπλυση

Προστίθενται 600 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Τρίτη έκπλυση

Προστίθενται 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής erpendorf απαλλαγμένο από νουκλεάσες.

9. Έκλυση του ολικού RNA

Προστίθενται στη στήλη 60 μl νερού, απαλλαγμένου από RNases, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 g και συλλογή του εκλυόμενου RNA.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH:8.0

Διάλυμα λυσοζύμης 100 mg/ml

β-μερκαπτοαιθανόλη

Αιθανόλη 70%

2.28.2.2 Αντίδραση σύνθεσης cDNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa)

Η αυτοματοποιημένη μέθοδος PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser προσφέρει τη σύνθεση του cDNA καθώς και την αντίδραση εξάλειψης του γενωμικού DNA. Τα δείγματα RNA μπορούν να προεπεξεργαστούν με DNase I, αλλά σε αυτή την προεπεξεργασία η DNase I πρέπει να απενεργοποιηθεί και να εξαλειφθεί, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση ή απώλεια του RNA. Η σύνθεση του cDNA από RNA μπορεί να επιτευχθεί χωρίς απώλεια σε μια γρήγορη αντίδραση διάρκειας μικρότερης από 20 λεπτά. Το γενωμικό DNA εξαλείφεται με προσθήκη του gDNA Eraser, το οποίο έχει ισχυρή δραστηριότητα αποδόμησης του DNA, για 2 λεπτά στους 42°C. Στη συνέχεια προστίθεται ένα αντιδραστήριο της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, που περιλαμβάνει ένα συστατικό που αναστέλλει εντελώς την αποδόμηση του DNA και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης λαμβάνει χώρα για 15 λεπτά.

Πειραματική πορεία

1. Αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA

Η προετοιμασία του διαλύματος για την αντίδραση εξάλειψης του γενωμικού DNA πραγματοποιείται στον πάγο.

Για κάθε αντίδραση	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
5x gDNA Eraser ρυθμιστικό διάλυμα	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
συνολικό RNA	*1
H ₂ O απαλλαγμένο από RNάσες	*2
Συνολικός όγκος	10.0 μl

Ακολουθεί επώαση στους 42°C για 2 λεπτά.

*1: μέχρι 1 μg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση χρωστικής SYBR® Green και μέχρι 2 μg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση ιχνηθετών Taqman® Probe, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης συνολικού όγκου 20 μl.

*2: συμπληρώνεται μέχρι την πλήρωση του συνολικού όγκου.

2. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Η προετοιμασία του διαλύματος για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματοποιείται στον πάγο.

<Για κάθε αντίδραση>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Διάλυμα αντίδρασης από το βήμα 1	10.0 μl
5x PrimeScript ρυθμιστικό διάλυμα 2 (για Real Time)	4.0 μl
PrimeScript RT μίγμα ενζύμων I	1.0 μl
RT μίγμα πριμοδοτιών μορίων	1.0 μl
H ₂ O απαλλαγμένο από RNάσες	4.0 μl
Συνολικός όγκος	20.0 μl

Ακολουθεί επώαση στους 42° C για 20 λεπτά και αμέσως επώαση στους 85° C για 5 δευτερόλεπτα. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20° C.

2.28.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης qRCR και αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR

Στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου προσδιορίζουμε την ποσότητα του PCR προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR αντίδραση στην οποία η ποσοτικοποίηση γίνεται στο τελικό προϊόν το οποίο και προκύπτει μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων. Στη δε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR, γίνεται ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

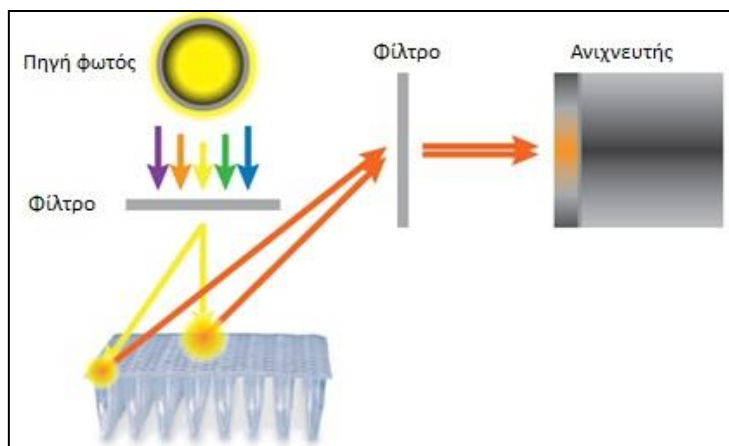
Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας.

Το RNA μεταγράφεται σε cDNA το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την qPCR αντίδραση και σε αυτή την περίπτωση μιλάμε για αντίδραση 2 βημάτων. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση του προϊόντος στόχου κατά την πορεία της αντίδρασης είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με τη χρήση φθορίζοντων μορίων που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του DNA. Το σήμα του φθορισμού παρακολουθείται κατά την πορεία της αντίδρασης και η ένταση του φθορισμού συσχετίζεται με την ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική συνδυάζουν τη λειτουργία θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του DNA, οπτικού συστήματος για τη διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φθορισμού και διαθέτουν κατάλληλο λογισμικό για τη συλλογή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η βασική αρχή λειτουργίας ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου συνοψίζεται στην Εικόνα 2.16. Πηγή φωτός παράγει φως, το οποίο στη συνέχεια φιλτράρεται για να επιλεγεί το συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης της φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Η συσσώρευση των προϊόντων PCR παρακολουθείται μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού. Το

αντανakλώμενο φως διέγερσης περνά από φίλτρο πριν την ανίχνευση και μόνο τα επιλεγμένα μήκη κύματος φθορισμού επιτρέπεται να περάσουν στον ανιχνευτή.

Ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την



Εικόνα 3.16: Βασική αρχή ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου.

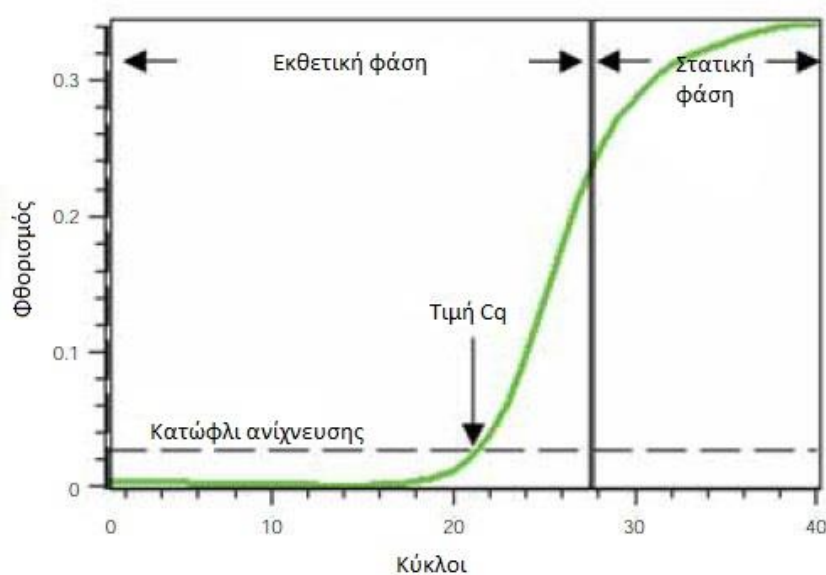
PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, πριμοδοτικά μόρια, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντικό παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

Βασικές έννοιες

Στην αρχή της αντίδρασης το σήμα φθορισμού είναι πολύ ασθενές και δεν μπορεί να ξεχωρίσει από το θόρυβο. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης η ποσότητα της DNA αλληλουχίας στόχου διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της έντασης του σήματος φθορισμού όταν ξεπεραστεί ένα κατώφλι ανίχνευσης (threshold line) κάτω από το οποίο διακρίνουμε μόνο τον ενδογενή φθορισμό των αντιδρώντων μορίων (background fluorescence). Η απόδοση της ενίσχυσης μιας ιδανικά σχεδιασμένης qPCR αντίδρασης είναι

πολύ υψηλή (προσεγγίζει το 100%) και παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της εκθετικής φάσης (exponential phase). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση, όπου η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή και συνεπώς τα αποτελέσματα πιο αξιόπιστα. Στο τέλος της εκθετικής φάσης και στο σημείο κορεσμού (plateau), τα επίπεδα του σήματος μειώνονται, οπότε και η ένταση του φθορισμού δεν σχετίζεται με τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού υποστρώματος DNA. Η ουδός κύκλου C_t (threshold cycle) είναι μια παράμετρος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR και αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων που χρειάζονται για να επιτευχθεί ένα ανιχνεύσιμο επίπεδο φθορισμού μεγαλύτερο εκείνου του αρχικού υποστρώματος. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έξοδο της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο στις αντιδράσεις.



Εικόνα 4.17: Γράφημα ενίσχυσης μιας αντίδρασης PCR.

2.28.4 Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Η χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας επιτρέπει τον διαρκή έλεγχο της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ειδικούς θερμοκυκλοποιητές εξοπλισμένους με μονάδες ανίχνευσης φθορισμού. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του πολλαπλασιασμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο. Η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης qPCR γίνεται είτε με την ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας που δεσμεύεται μη ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA, είτε με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

2.28.4.1 Ανίχνευση μέσω μη ειδικής δέσμησης φθορίζουσας ουσίας σε δίκλινα μόρια DNA

Η ανίχνευση γίνεται με χρήση φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες προσδένονται χωρίς διάκριση σε δίκλινα μόρια DNA. Αποτελεί την απλούστερη και οικονομικότερη προσέγγιση της μεθόδου ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτούνται συγκεκριμένες πληροφορίες για την αλληλουχία στόχο. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μεθόδου καθορίζεται από το σχεδιασμό των πριμοδοτικών μορίων.

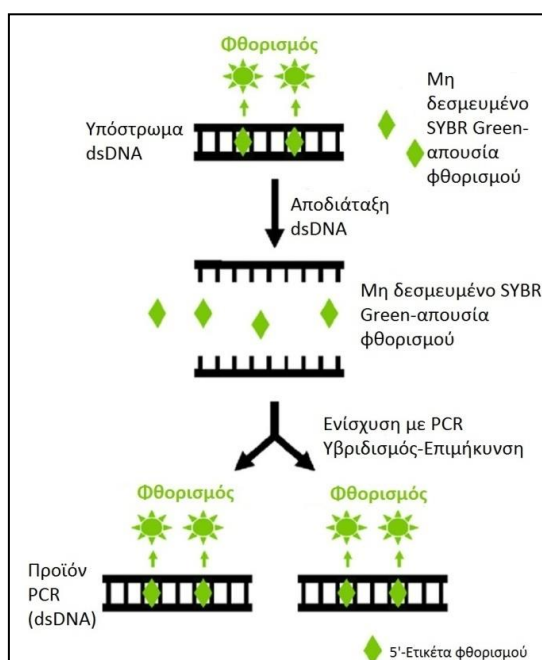
Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν ελάχιστα επίπεδα φθορισμού όταν υπάρχουν αδέσμευτες σε διάλυμα, ενώ ξεκινούν να φθορίζουν έντονα στο κατάλληλο μήκος κύματος μετά τη δέσμευσή τους σε δίκλωνο DNA.

Μία από τις πιο συνηθισμένες φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αυτή είναι το SYBR®Green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα.

Το πλεονέκτημα του SYBR®Green είναι η απλότητά του. Η δράση του είναι παρόμοια με εκείνη του βρωμιούχου αιθιδίου, με τη διαφορά ότι το SYBR®Green δεν παρεμποδίζει τις DNA πολυμεράσες, οπότε μπορεί να προστεθεί απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης PCR.

Το SYBR®Green έχει χαμηλότερο background φθορισμό από ότι το βρωμιούχο αιθίδιο, μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλότερες συγκεντρώσεις δίκλωνου DNA και δεν είναι τοξικό.

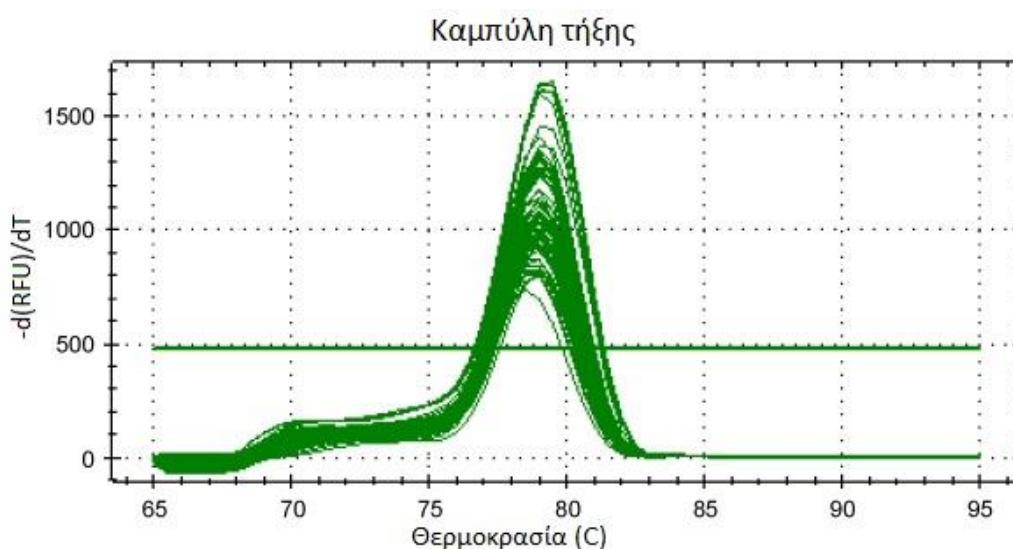
Στα πλεονεκτήματα του SYBR®Green συγκαταλέγονται ο απλός σχεδιασμός, η ικανότητα γρήγορης μελέτης πολλών γονιδίων, το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα ανάλυσης καμπύλης τήξης (melting curve) η οποία επιτρέπει να εκτιμήσουμε την εξειδίκευση της αντίδρασης πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 5.18: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης του SYBR Green.

Το βασικότερο μειονέκτημα στη χρήση φθορίζουσών ουσιών μη ειδικής δέσμευσης σε δίκλωνα μόρια DNA είναι ότι μπορούν να εκπέμπουν παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου DNA, ακόμα και ανεπιθύμητων προϊόντων ή διμερών των πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η σύνθεση και ανίχνευση των συγκεκριμένων προϊόντων στόχων και κατά συνέπεια αλλοιώνεται η πρότυπη καμπύλη. Πάραυτα, ο σωστός σχεδιασμός ειδικών πριμοδοτικών μορίων όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των πριμοδοτικών μορίων.

Σε αντιδράσεις που έχει χρησιμοποιηθεί η φθορίζουσα χρωστική SYBR®Green, είναι απαραίτητη η ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Η μελέτη της καμπύλης-τήξης μετά το πέρας της αντίδρασης επιτρέπει να διακριθούν τα προϊόντα της αντίδρασης και να αναλυθεί η εξειδίκευσή της, χωρίς να χρειαστεί ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης. Η αρχή της ανάλυσης αυτής είναι ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από χαμηλή τιμή (κατά την οποία όλες οι αλληλουχίες είναι υβριδοποιημένες) σε υψηλή, προκαλώντας διαχωρισμό των αλυσίδων. Καθώς το DNA αποδιατάσσεται, το SYBR®Green απελευθερώνεται και παρατηρείται μείωση του φθορισμού. Στη θερμοκρασία τήξης δύο είναι οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο: το μέγεθος του δίκλωνου DNA και το περιεχόμενο σε κατάλοιπα GC. Όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο σε GC κατάλοιπα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθος της αλυσίδας, τόσο υψηλότερη θα είναι η θερμοκρασία τήξης. Συγκρίνοντας τις θερμοκρασίες τήξης των αναμενόμενων προϊόντων, η παρουσία ενός μη ειδικού προϊόντος ή σχηματισμού διμερών από τα πριμοδοτικά μόρια ανιχνεύεται εύκολα. Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται από το λογισμικό του οργάνου βάση των δεδομένων της καμπύλης τήξης, από την αρνητική πρώτη παράγωγο της αλλαγής του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία ($-dF/dT$).

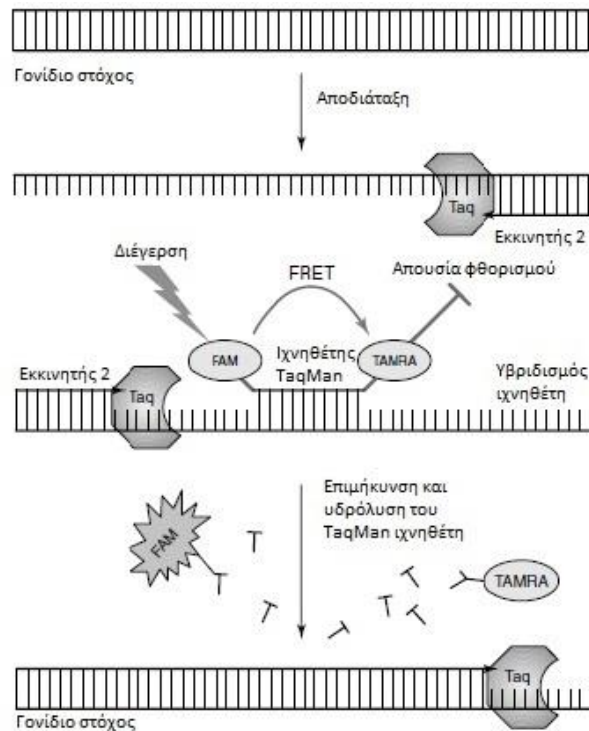


Εικόνα 6.19: Καμπύλη τήξης στην *real-time* PCR.

2.28.4.2 Ανίχνευση με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών που υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου

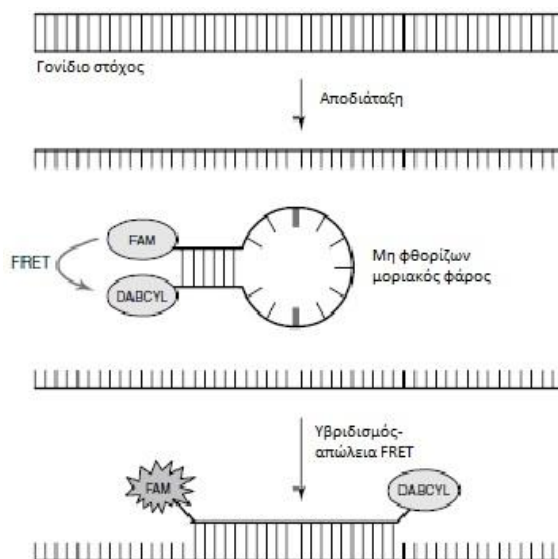
Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη χρήση ιχνηθετών ολιγονουκλεοτιδίων που φέρουν φθορίζουσες ετικέτες και έχουν σχεδιαστεί για να υβριδίζουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι υδρολυόμενοι ιχνηθέτες ή αλλιώς TaqMan® ιχνηθέτες (TaqMan probes) καθώς και εκείνοι δομής φουρκέτας, με συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους τους μοριακούς φάρους (molecular beacon probes).

Στην τεχνολογία των TaqMan® ιχνηθετών τοποθετείται φθορίζουσα ουσία στο 5' άκρο του ιχνηθέτη, ενώ στο 3' άκρο τοποθετείται ομάδα απορρόφησης φθορισμού, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο ένα ζευγάρι δότη-δέκτη με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Ο τρόπος δράσης τους φαίνεται στην Εικόνα 2.20 που ακολουθεί.



Εικόνα 7.20: Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου ιχνηθετών TaqMan.

Στην τεχνολογία των ιχνηθετών με δομή φουρκέτας, πιο διαδεδομένοι είναι οι μοριακοί φάροι. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια που σχηματίζουν δομές στελέχους-βρόγχου, λόγω των συμπληρωματικών αλληλουχιών στα άκρα του νουκλεοτιδίου, ενώ οι αλληλουχίες του βρόγχου είναι συμπληρωματικές με μια περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Στο 5' άκρο τοποθετείται φθορίζουσα ουσία, ενώ στο 3' άκρο ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Η δομή βρόγχου διατηρεί σε κοντινή απόσταση τη φθορίζουσα ουσία και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να σβένεται με μεταφορά ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) από τη μία ομάδα στην άλλη. Η δομή και ο τρόπος δράσης των μοριακών φάρων αναλύεται στην Εικόνα 2.21 που ακολουθεί.



Εικόνα 8.21: Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου μοριακών φάρων.

2.28.5 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

1. Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων ή της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Διαδοχικές αραιώσεις δείγματος γνωστής ποσότητας συσχετίζονται γραμμικά με τις τιμές Ct. Το δείγμα μπορεί να είναι: ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA, γονιδιωματικό DNA, προϊόν PCR ή και cDNA που να περιέχει το γονίδιο στόχο. Καθίσταται έτσι εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων με βάση τις Ct τιμές τους. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση η απόδοση της ενίσχυσης (amplification efficiency) θα πρέπει να είναι ίδια τόσο στα δείγματα όσο και στα πρότυπα.

Απόδοση της ενίσχυσης(amplification efficiency)

Η απόδοση μιας αντίδρασης qPCR μπορεί να υπολογιστεί από την πρότυπη καμπύλη. Τυπικά μια πρότυπη καμπύλη δεν είναι παρά η γραμμική εξάρτηση $Ct=f(\log \text{ ng DNA/cDNA/copies κλπ})$, οπότε και η κλίση αυτής της εξάρτησης σχετίζεται με την απόδοση της αντίδρασης PCR. Όσο πιο κοντά είναι οι αποδόσεις των αντιδράσεων των δειγμάτων και των προτύπων, τόσο πιο ακριβής είναι και η ποσοτικοποίηση.

Για ένα γράφημα όπου στον γ άξονα έχουμε την τιμή Ct και στον x άξονα την τιμή $\log (\text{ng DNA/cDNA/copies κλπ})$ ισχύει: **Απόδοση PCR (E)=[(10^{-1/κλίση})-1]x100%**

2. Σχετική ποσοτικοποίηση

Στη σχετική ποσοτικοποίηση υπολογίζεται ο λόγος της ποσότητας ενός μορίου στόχου σε δείγμα προς την αντίστοιχη ποσότητα σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο συχνά καλείται και βαθμονομητής (calibrator). Τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση αναφέρονται σαν σχετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Κατά τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων με την qRT-PCR είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να διορθωθούν διάφορες μεταβλητές όπως η ποσότητα νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα, μεταβλητότητα του φθορισμού του οργάνου, η διακύμανση των αποδόσεων της αντίδρασης καθώς και η ποιότητα και καθαρότητα του δείγματος. Η κανονικοποίηση γίνεται με βάση ένα γονίδιο που χρησιμοποιείται σαν γονίδιο αναφοράς (reference gene). Ένα γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να έχει σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα και τις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται. Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνηθέστερα γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) όπως για παράδειγμα τα γονίδια των: GAPDH, 18S ή 16S rRNA, β-ακτίνης, γυράσης, κ.ά. Βέβαια η έκφραση ακόμα και των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας ποικίλλει σε κάποιο βαθμό και προτείνεται η εξέταση της σταθερότητας της έκφρασης διαφόρων γονιδίων για κάθε πείραμα.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[\Delta\Delta CT]}$, όπου $[\Delta\Delta CT] = [\Delta CT, \text{δείγματος}] - [\Delta CT, \text{αναφοράς}]$. Η $[\Delta CT, \text{δείγματος}]$ είναι η κανονικοποιημένη τιμή CT για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου συστατικής έκφρασης, ενώ η τιμή $[\Delta CT, \text{αναφοράς}]$ είναι η, αντίστοιχα, κανονικοποιημένη τιμή CT για το δείγμα αναφοράς. Εξ'

ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2-\Delta\Delta CT = 20 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

2.28.6 Μεταγραφομική ανάλυση κυττάρων Sphe3 και Sphe3c που αναπτύχθηκαν παρουσία 3HB και 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα του στελέχους Sphe3 και του μεταλλαγμένου στελέχους Sphe3c, που καλλιεργήθηκαν με γλυκόζη, 3HB και 4HB ως πηγές άνθρακα και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και τη σύνθεση cDNA ακολούθησε η ποσοτική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων.

Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα γονίδια που κωδικοποιούν για την β-υπομονάδα της PCD34, την PCD45 και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης. Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν από την κα Ασημακούλα στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής της διατριβής (Ασημακούλα, 2017) και δίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.11)

Πίνακας 2.11: Πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση RT-qPCR

Ονομασία	Tm (°C)	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)
pca34β_{for}	60.23	CGTACCCATGGAAGAACCAC	248
pca34β_{rev}	59.77	GGTCAGGATGATGTCCCAGT	
pca45αβ_{for}	60.00	ACACCTCGGCACTATTCACC	162
pca34β_{for}	60.23	CGTACCCATGGAAGAACCAC	
cat12diox_{for}	60.31	AAACGGATACCCGAAAGAG	198
cat12diox_{rev}	59.76	GGGCGTTGTACTCCTCGTAG	

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλακέτες με 96 πηγαδάκια (PCR-Platten Low Profile 96 well, Kisker, Germany) και σε όργανο CFX96 Real-Time PCR (Bio Rad). Σαν χρωστική χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR® FAST qPCR kit Master Mix (2x) Universal, με την ιδιότητα να δεσμεύεται σε δίκλιωνα μόρια DNA. Μια τυπική σύσταση της αντίδρασης σε τελικό όγκο 20μl περιέχει 19μl SYBR Green Master mix το οποίο περιέχει και τη DNA πολυμεράση KAPA SYBR™, 200nM από τον κάθε πριμοδοτικό μόριο και τέλος 1μl από το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής σε διαφορετικές αραιώσεις.

Η εξειδίκευση των πριμοδοτικών μορίων καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης προσδιορίστηκαν αρχικά με συμβατική αντίδραση PCR. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής:

Μετουσίωση για 3 min στους 95° C ακολουθούμενη από 40 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:

- Μετουσίωση για 10 sec στους 95° C
- Αναδιάταξη για 20 sec στους 58° C

- Επιμήκυνση για 30 sec στους 72° C

Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο (1 min) στους 72° C.

Καμπύλη τήξης από 50° C έως 90° C, ανάγνωση κάθε 0.2° C για 2 sec.

Επώαση στους 4° C.

Το κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ακρίβεια και επαναληψιμότητα της qPCR. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν μολύνσεις με μια αντίδραση χωρίς εκμαγείο για κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος πριμοδοτικών μορίων. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το γονίδιο της γυράσης β (*gyrB*), λόγω της σταθερής του έκφρασης στις εξεταζόμενες συνθήκες. Η ποσότητα σε mRNA κάθε αγνώστου δείγματος κανονικοποιήθηκε με το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς. Οι πρότυπες καμπύλες σχεδιάστηκαν με κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος πριμοδοτικών μορίων χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 5, 2, 1, 0.5, 0.2 και 0.1 ng ολικού RNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη και αποτελούν το βαθμονομητή (M. R. Johnson et al., 2000). Οι αποδόσεις των αντιδράσεων προσδιορίστηκαν από τις κλίσεις των πρότυπων καμπυλών (Corbella & Puyet, 2003; Pfaffl, 2001). Τα αποτελέσματα της qRT-PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με δείγμα βαθμονομητή, το υπόστρωμα γλυκόζης, και η ποσότητά τους υπολογίστηκε σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς, τη γυράση β . Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ο λόγος της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το βαθμονομητή με το λόγο της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς (Dobs & Hansen, 2006).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 In situ παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων της PCD45 στον βιοαντιδραστήρα NMR με υποστρώματα πρωτοκατεχοϊκού και γαλλικού οξέος και ταυτοποίηση των προϊόντων

Για την περαιτέρω μελέτη της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA) η οποία είχε υπερεκφραστεί και χαρακτηριστεί στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διατριβής μου πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η in situ παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης της 4,5-διοξυγονάσης του PCA, με υπόστρωμα PCA ή γαλλικό οξύ (GA), μέσω ενός 5 mm NMR βιοαντιδραστήρα.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας 1mM από το εκάστοτε υπόστρωμα σε 8 μ M ενζύμου μέσα σε σωληνάκι NMR 5 mm (NMR tube bioreactor) και ελήφθησαν δεδομένα από 1D και 2D NMR.

Το υπόστρωμα GA επιλέχθηκε καθώς είναι το μόνο υπόστρωμα – μεταξύ ενός συνόλου υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν (μεταπτυχιακή διατριβή Τσαγκογιάννης) – που φαίνεται να αναγνωρίζει η PCD45, πέραν του PCA.

3.1.1 Ενζυμική αντίδραση με υπόστρωμα PCA

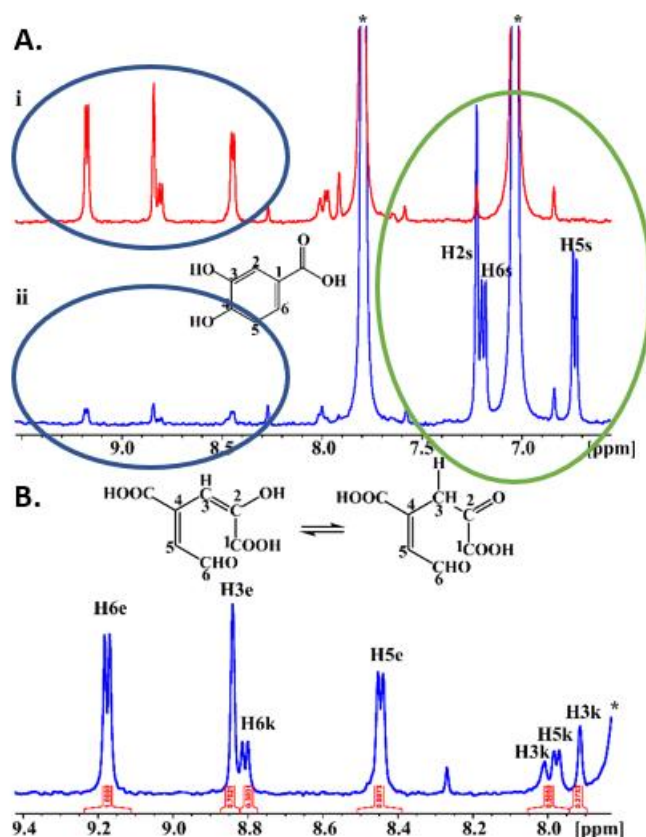
Στην Εικόνα 3.1.1 απεικονίζεται η εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης 2 και 24 ώρες μετά την προσθήκη PCA στο σωληνάκι NMR. Παρατηρείται ότι μετά τις πρώτες 2 ώρες το 8% του PCA έχει μετατραπεί στο προϊόν 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεϋδή (CHMS) (Εικόνα 3.1.1 A.i), ενώ 24 ώρες μετά φαίνεται ότι το PCA έχει καταναλωθεί πλήρως από την PCD45 (Εικόνα 3.1.1 A.ii).

Εκτός από την παρακολούθηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε και ταυτοποίηση του προϊόντος αυτής. Το φάσμα 1D ^1H NMR του προϊόντος CHMS παρουσιάζει μια χαρακτηριστική διπλή κορυφή στα 9,17 ppm η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H6e, μια διπλή κορυφή στα 8,45 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο H5e και μια μονή κορυφή στα 8,84 ppm που αποδίδεται στο H3e (Εικόνα 3.1.1 B).

Από την in situ παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης προέκυψε επίσης και η διαπίστωση ότι το προϊόν CHMS παρουσιάζει μια ισορροπία μεταξύ της κετονικής και της ενολικής μορφής του, με την κετονική ισομορφή να απαντάται σε χαμηλότερη συγκέντρωση όπως είναι ορατό και στην Εικόνα 3.1.1 B. Αυτό έγινε αντιληπτό καθώς στο φάσμα της ενζυμικής αντίδρασης παρατηρούνται κορυφές που αντιστοιχούν σε δύο προϊόντα (Εικόνα 3.1.1 B). Πιο συγκεκριμένα η πιο αποπροστατευμένη διπλή κορυφή στα 8,81 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H6k της κετονικής ισομορφής του CHMS, η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7,98 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H5e και οι δύο κορυφές στα 7,91 και στα 8,01 ppm αντιστοιχούν στο πρωτόνιο H3k. Οι κορυφές στα 8,85 ppm και 9,15 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3e και H6e αντίστοιχα.

Η εξαιρετική ανάλυση και ο υψηλός λόγος σήματος/θορύβου στο φάσμα 1D ^1H επέτρεψαν και τη διεξαγωγή μιας σειράς πειραμάτων 2D NMR είχαν ως αποτέλεσμα την πλήρη ταυτοποίηση των δυο ισομορφών του CHMS.

Τόσο τα αποτελέσματα των ανωτέρων πειραμάτων, όσο και τα αποτελέσματα του STD NMR που πραγματοποιήθηκε επίσης και επέτρεψε την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης του υποστρώματος PCA με την PCD45, παρατίθενται στο Παράρτημα Π1.



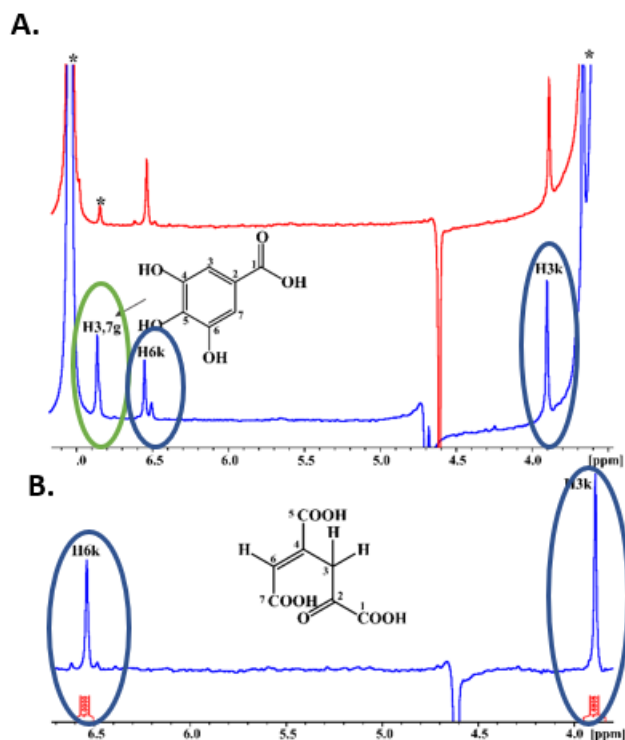
Εικόνα 3.1.1: *In situ* παρακολούθηση της σχάσης του PCA από την PCD45 στο σωληνάκι NMR. (A): φάσμα 1D ¹H NMR της ενζυμικής αντίδρασης 2 ώρες [μπλε φάσμα, (ii)] και 24 ώρες [κόκκινο φάσμα, (i)] μετά την έναρξη της αντίδρασης. Με τον πράσινο κύκλο σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος, ενώ με τους μπλε οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του προϊόντος. Με (*) σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα υπολείμματα ιμιδαζολίου από τον καθαρισμό της PCD45. (B): Εστίαση στην περιοχή {7,8 – 9,4 ppm} της A.ii και οι χημικές δομές της ενολικής (αριστερά) και κετονικής (δεξιά) ισομορφές του προϊόντος. Οι λατινικοί χαρακτήρες *s*, *e* και *k* δίπλα στο εκάστοτε πρωτόνιο υποδεικνύουν πρωτόνια του υποστρώματος (substrate), της ενολικής (enol) και της κετονικής (keto) ισομορφής του CHMS αντίστοιχα.

3.1.2 Ενζυμική αντίδραση με υπόστρωμα GA

Στην Εικόνα 3.1.2 παρουσιάζεται η εξέλιξη της αντίδρασης της PCD45 με υπόστρωμα GA 24 και 48 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης στο σωληνάκι NMR. Μετά τις πρώτες 24 ώρες η PCD45 φαίνεται να έχει μετατρέψει το 59% του υποστρώματος στο αναμενόμενο προϊόν σχάσης, 4-οξαλομεσακονικό οξύ (OMA), ενώ 48 ώρες μετά το υπόστρωμα φαίνεται να έχει καταναλωθεί πλήρως.

Η διεξαγωγή 1D και 2D NMR οδήγησε στον χαρακτηρισμό της κέτο-μορφής του προϊόντος. Η κορυφή στα 6,54 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H6k ενώ αυτή στα 3,89 ppm στα δύο πρωτόνια H3k.

Φάσματα από 2D ¹H-¹³C HSQC και HMBC NMR κατέστησαν εφικτή και την αντιστοίχιση των ανθράκων του προϊόντος. Οι κορυφές στα 39,73, 132,7, 137,2, 174,7 και 201,9 ppm αποδίδονται στους άνθρακες C3, C6, C4, C5 και C2 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.1.2: *In situ* παρακολούθηση της σχάσης του PCA από την PCD45 στο σωληνάκι NMR. **(A):** φάσμα $1D\ ^1H$ NMR της ενζυμικής αντίδρασης 24 ώρες (μπλε φάσμα) και 48 ώρες (κόκκινο φάσμα) μετά την έναρξη της αντίδρασης. Με τον πράσινο κύκλο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H3 και H6 του υποστρώματος, ενώ με τους μπλε οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του προϊόντος. Με (*) σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα υπολείμματα ιμιδαζολίου από τον καθαρισμό της PCD45 και στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl όπου διεξήχθη η αντίδραση. **(B):** Εστίαση στην περιοχή που εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων του προϊόντος. Οι λατινικοί χαρακτήρες *g* και *k* δίπλα στο εκάστοτε πρωτόνιο υποδεικνύουν πρωτόνια του υποστρώματος (gallate) και της κετονικής (keto) ισομορφής του OMA αντίστοιχα.

3.2. In silico μελέτη της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

3.2.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων για την 3,4-διοξυγονάση του PCA.

Από την in silico ανάλυση του γονιδιώματος του *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 στη βάση δεδομένων του Joint Genome Institute (JGI), εντοπίστηκαν τα γονίδια για τις α - και β -υπομονάδες ενζύμου με πιθανή ενεργότητα 3,4-διοξυγονάσης του PCA. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του Sphe3 και παρατίθενται παρακάτω:

>650468463 protocatechuate 3,4-dioxygenase, **alpha subunit** [*P. phenanthrenivorans* Sphe3: CP002379] (-) strand (564 bp)

ATG AGC AAC CCC ACC AAA CTC ATC CCC ACG CCC GGC CAG ACC GTC GGC CCG TTT TAC GGC
TAC GCC TTG CCG TTC GAG AAG GAC AAT GAA CTC CTG GCA CCC GGC TCG CCG GGA TCC ATC
CGC CTG CAA GGC ACC GTC TAC GAT GGC GCG GGC CAC ACC ATC CCG GAC GCC ATC CTG GAA
ATC TGG CAG CCG GAC GCC GAG GGC AAG GTG GTC CAG AAG ACC GGC TCC CTG GTC CGG
GAC GGC TAC ACC TTT ACC GGG TGG GGC CGC GGC GCC GTG GGC AAC ACC GGT GTC TTC ACC
TTC ACC ACA GTG AAT CCC GGC CCC ACC AGG CCG GGG GCG GCA CCG TTC ATT TCG GTG GCC
ATT TTC GCG CGC GGC CTC ACC AAC CGG CTG TTC ACC CGG ATC TAC CTC CCT GAA GAC ACC
GAT GCG CTG GCC AAC GAC CCG CTG CTC AGC TCA TTG GAC CCT GAG CGG CGC AGG ACG CTG
ATC GCG CGC CGC GAC CCC GAC GGC GGG CTT ACC TGG GAT GTC CGC CTC CAG GGC GAG
GGC GAG ACA GTC TTC CTG GAC TTC CAG TGA

>650468464 protocatechuate 3,4-dioxygenase, **beta subunit** [*P. phenanthrenivorans* Sphe3: CP002379] (-) strand (873 bp)

GTG CCG GAA GAA ACC AAC GCC CAG CTT GAA ACG GAC GAG TCT GTA CCG CCC GCC GAG
CCG AAG GCA GCA CAC CTG CCG CTG GAC CGT GCC ATC GAA ACC CAG GCT GAC CTC AGT GCC
GAG ATC AGC GCC CTG GGC GAG GCC TAC GCC CGC GCG CTG AAA GAC GGT GCG CCC GCC
GAG ACC CAG CCC CGG CTG GAC TAC CCG CCC TAC CGC TCC AGC ATC CTG CGC CAC CCC ACC
AAG AGC CTG CAG CAC GCG GAC CCG GAA ACC ATC GAG CTC TAC TCG CCG GCG TTC GGC CAC
CAG GAC GTG CAC GCA CTC GAG TCC GAC CTC ACC ATC CAG CAC AAC GGC GAG CCC CAA GGT
GAA CGG ATC ATC GTG ACC GGC AAG GTC CTG GAC GGC GAC GGC CGC CCG GTG GCA GGC
CAG CTG GTG GAG ATC TGG CAG GCC AAC GCC TCC GGC CGC TAC ATC CAC AAG CGT GAC CAG
CAT CCC GCG CCG ATC GAT CCC AAC TTC ACG GGC ATC GGC CGC TGC ATC ACC GGC CCG GAC
GGC TCC TAC CGG TTC ATC ACC ATC AAG CCC GGC GCG TAC CCA TGG AAG AAC CAC CTG AAC
GCC TGG CGC CCC GCG CAC ATC CAC TTC TCC CTG TTC GGC ACC GAG TTC ACC CAG CGC ATC
ATC ACC CAG ATG TAC TTC CCC GGG GAC CAG CTC TTC CCG CTG GAC CCC ATC TAC CAG ACC
ATC GTG GAC CAG GAC GCC CGC GAC CGG CTG GTG GCA ACG TAC GAT CAC AGC ATC ACG
GAG CCC GAA TGG GCG CTC GGC TAC AAC TGG GAC ATC ATC CTG ACC GGC CCC AAG CGG ACC
TGG ACG GAA AAT GAA GCA CTT GGT GCA GCA GGC GAC GAG GAA TAG

3.2.2. Πρωτοταγείς Δομές των α - και β -υπομονάδων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

Παρακάτω παρατίθενται οι αμινοξικές αλληλουχίες (πρωτοταγείς δομές) των α - και β -υπομονάδων της 3,4-διοξυγονάσης PCA.

ADX74973.1 α -υπομονάδα

MSNPTKLIPTPGQTVGPFYGYALPFEKDNELLAPGSPGSIRLQGTVDGAGHTIPDAILEIWQPDAGKVV
QKTGSLVRDGYTFTGWGRGAVGNTGVFTFTTVNPGPTRPGAAPFISVAIFARGLTNRLFTRIYLPEDTDAL
ANDPLLSSLDPERRRTLIARRDPDGGLTWDVRLQGEGETVFLDFQ

pI: 5.00

Mw: 20,2 kDa

ADX74974.1 β -υπομονάδα

MPEETNAQLETDESVPPEAKAAHLPLDRAIETQADLSAEISALGEAYARALKDGAPAETQPRLDYPPYRS
SILRHPTKSLQHADPETIELYSPAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGERIIVTGKVLDDGGRPVAGQLVEI
WQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSYRFITIKPGAYPWKNHLNAWRPAHIHFSLFGTE
FTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVDQDARDRLVATYDHSITEPEWALGYNWDIILTGPKRTWTENEAL
GAAGDEE

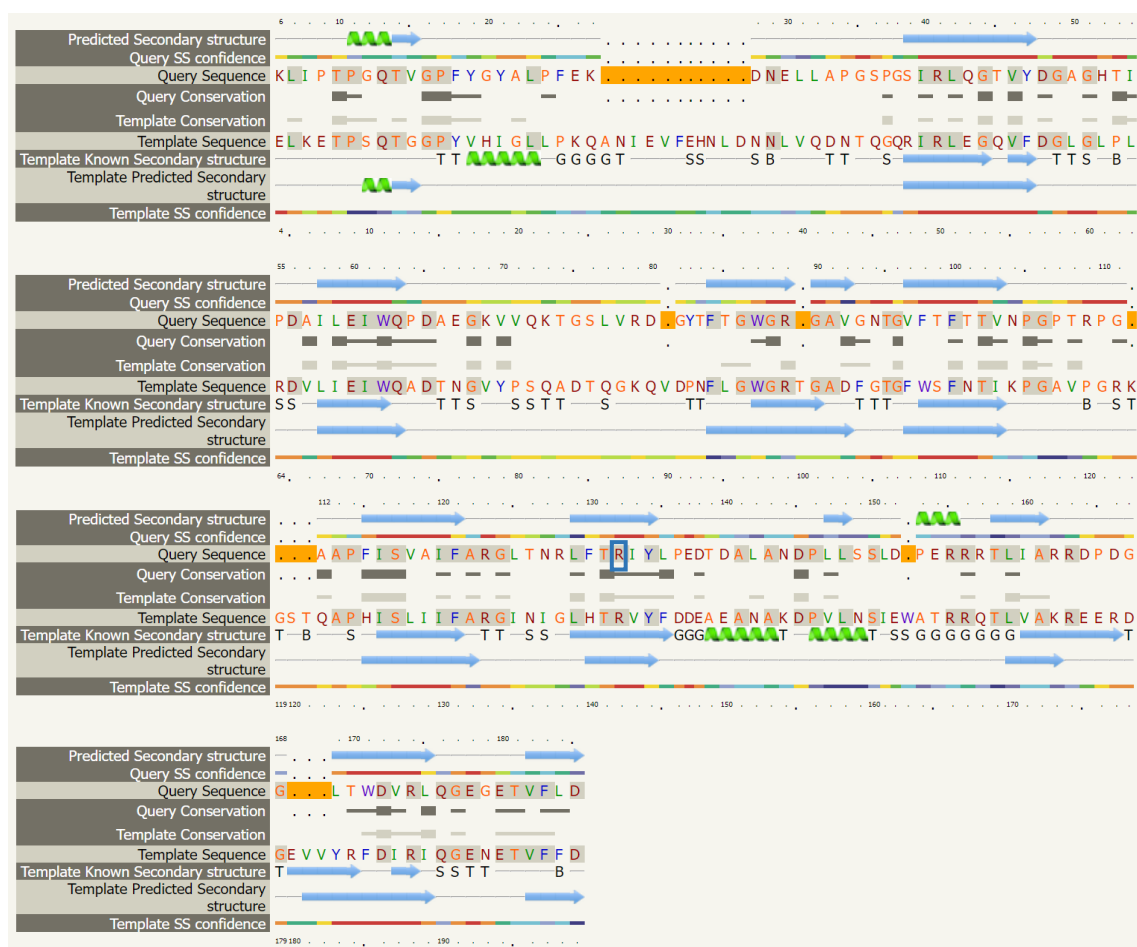
pI: 5.28

Mw: 33,2 kDa

3.2.3 Δευτεροταγείς Δομές των υπομονάδων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

Η δευτεροταγής δομή της PCD34 του *P. phenanthrenivorans* Sphe3 κατασκευάστηκε με τη χρήση της 3,4-διοξυγονάσης του PCA από το *Acinetobacter baylyi* ADP1 ως εκμαγείο (2bum στο Protein Data Bank).

α-υπομονάδα



Εικόνα 3.2.1. : Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της α-υπομονάδας της PCD34. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η κατατεθειμένη στο PDB (**2bum**) 3,4-διοξυγονάση του PCA από το *Acinetobacter baylyi* ADP1. Με πράσινες έλικες και με κυανά βέλη απεικονίζονται οι α-έλικες και οι β-πτυχωτές επιφάνειες αντίστοιχα ενώ οι ενδιάμεσες γραμμές απεικονίζουν τους βρόχους. Με G συμβολίζονται κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό έλικας τριών στrophών (3_{10} έλικα), με T κατάλοιπα που σχηματίζουν β-στροφές, με S κατάλοιπα που σχηματίζουν β-καμψη και με B αμινοξέα που σχηματίζουν β-γέφυρα. Με μπλε πλαίσιο σημειώνεται η αργινίνη που έχει υποστεί μετάλλαξη προς αλανίνη.

β-υπομονάδα



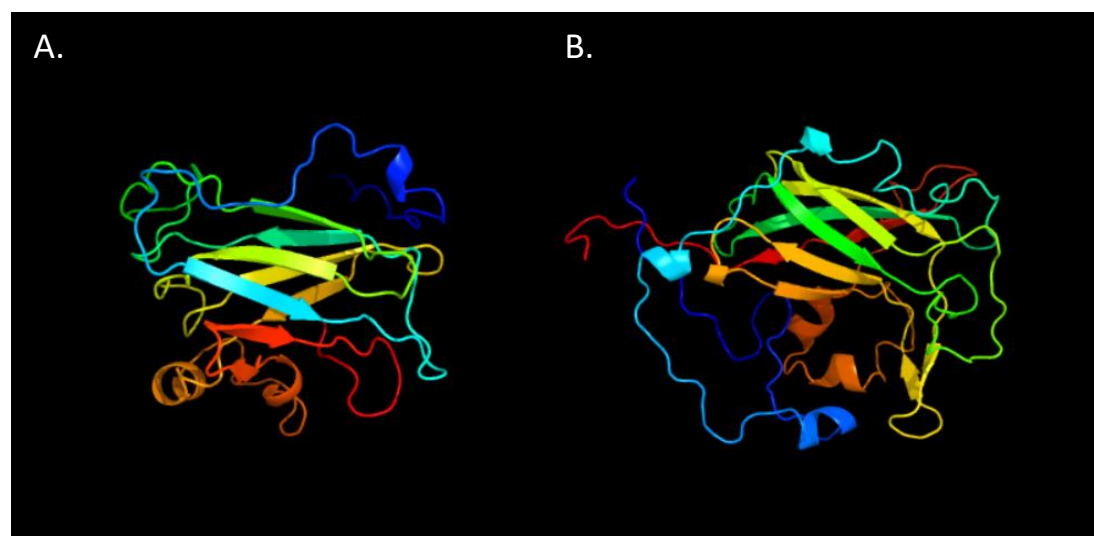


Εικόνα 3.2.2.: Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της β-υπομονάδας της PCD34. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η κατατεθειμένη στο PDB (2bum) 3,4-διοξυγονάση του PCA από το *Acinetobacter baylyi* ADP1. Με πράσινες έλικες και με κυανά βέλη απεικονίζονται οι α-έλικες και οι β-πτυχωτές επιφάνειες αντίστοιχα ενώ οι ενδιάμεσες γραμμές απεικονίζουν τους βρόχους. Με G συμβολίζονται κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό έλικας τριών στροφών (3₁₀ έλικα), με T κατάλοιπα που σχηματίζουν β-στροφές, με S κατάλοιπα που σχηματίζουν β-καμπή και με B αμινοξέα που σχηματίζουν β-γέφυρα. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται τα καταλυτικά αμινοξέα. . Με μπλε πλαίσιο σημειώνεται η αργινίνη που έχει υποστεί μετάλλαξη προς αλανίνη.

3.2.4 Τριτοταγείς Δομές των υπομονάδων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο (όπως προαναφέρθηκε) τις γνωστές δομές της 3,4-διοξυγονάσης του PCA από το στέλεχος *Acinetobacter baylyi* ADP1 (PDB: 1eo2) και με τη βοήθεια του λογισμικού Phyre2 κατασκευάστηκαν μοντέλα τριτοταγούς δομής για την PCD34.

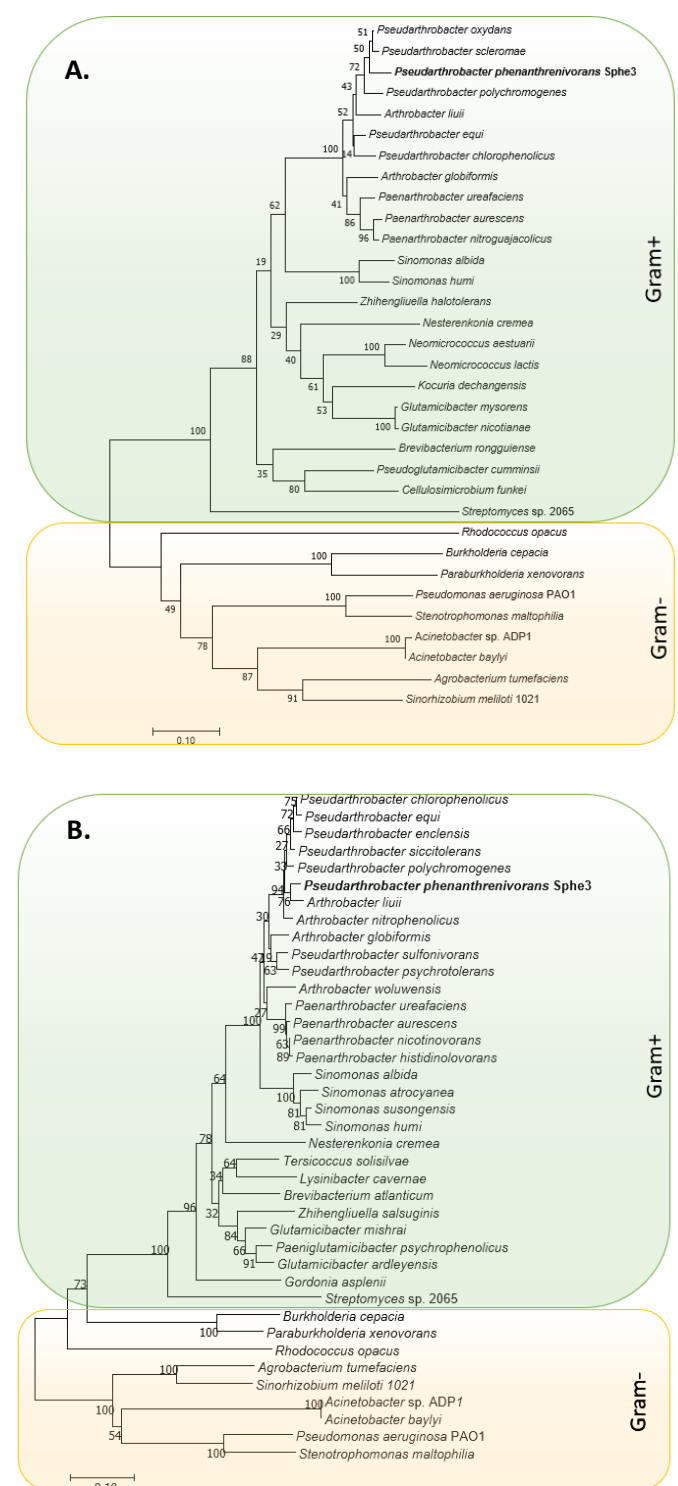
Για την α-υπομονάδα της PCD34 το μοντέλο τριτοταγούς δομής καλύπτει τα 180 από τα συνολικά 187 αμινοξέα (96% κάλυψη) και έχει βαθμό βεβαιότητας 100%, ενώ για την β-υπομονάδα το μοντέλο καλύπτει τα 234 από τα συνολικά 290 αμινοξέα (81% κάλυψη) με βαθμό βεβαιότητας 100% και σε αυτή την περίπτωση (Εικόνα 3.2.3)



Εικόνα 3.2.3.: Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της PCD34. Α) α-υπομονάδα και Β) β-υπομονάδα της PCD34. Το μοντέλο χρωματίζεται κλιμακωτά από το μπλε (αμινοτελικό άκρο) προς το κόκκινο (καρβοξυτελικό άκρο).

3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση των α - και β -υπομονάδων της PCD34

Μετά από ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας της α - και β -υπομονάδας της PCD34 τόσο με αλληλουχίες άλλων 3,4-διοξυγονασών του PCA τόσο από Gram+ όσο και από Gram- βακτήρια κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για τις δυο υπομονάδες.



Εικόνα 3.2.4: Φυλογενετικά δέντρα της α - (A) και της β - υπομονάδας (B) της 3,4-διοξυγονάσης του PCA. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η μπάρα κλίμακας υποδεικνύει τις υποκαταστάσεις ανά αμινοξικό κατάλοιπο.

3.3 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της PCD34

3.3.1 Εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας PCD34 σε κύτταρα Sphe3

Σε κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από καλλιέργεια κυττάρων Sphe3 σε φαινανθρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμές για τον εντοπισμό δραστηριότητας 3,4-διοξυγονάσης του PCA.

Εντοπίστηκε δραστηριότητα PCD34 της τάξεως των $0.08 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Ως 1 Unit ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που οξειδώνει 1 μmol PCA στη μονάδα του χρόνου (min). Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης για το προϊόν της αντίδρασης (3-καρβόξυ-cis,cis-μουκονικό οξύ), $2300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (βλ. Παράγραφο 2.22.2, Υλικά & Μέθοδοι).

3.3.2 Απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

3.3.2.1 Σχεδιασμός πριμοδοτικών μορίων

Κλωνοποίηση σε pET-29c

Κατά το σχεδιασμό των κατάλληλων πριμοδοτικών μορίων για την ενίσχυση του γονιδίου της PCD34 και την μετέπειτα κλωνοποίηση του σε πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης **pET-29c**, λαμβάνεται υπόψη ότι θα πρέπει να δημιουργηθούν θέσεις περιορισμού εκατέρωθεν των γονιδίων για την α - και β -υπομονάδα της PCD34 (για την NdeI: CA/TATG και για την HindIII: A/AGCTT). Η NdeI καθιστά εφικτή την κλωνοποίηση στον pET-29c με τον επιθυμητό προσανατολισμό ενώ παράλληλα η HindIII εξαλείφει και το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου της α -υπομονάδας ώστε να προστεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο της η ουρά ιστιδινών που θα βοηθήσει στον καθαρισμό της μέσω στήλης αγκιστείας Ni-NTA αгарόζης. Βάσει των ανωτέρω, τα πριμοδοτικά μόρια που σχεδιάστηκαν είναι τα εξής:

- **PCD34for:** 5'-CAGAAAGGAGCCACATATGCCGGAA-3'
 - $T_m = 66,4^\circ\text{C}$, nt = 26, GC = 53,8%
- **PCD34rev:** 5'-AGGCCGGCATAAGCTTCTGGAAGTC-3'
 - $T_m = 66,3^\circ\text{C}$, nt = 25, GC = 56%

Κλωνοποίηση σε pRSFDuet-1

Για την κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης **pRSFDuet-1**, όπου είναι δυνατή η προσθήκη αντίστοιχης ουράς ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο της β -υπομονάδας της PCD34, σχεδιάστηκαν κατάλληλα πριμοδοτικά μόρια. Αυτό γίνεται εφικτό καθώς τα κωδικόνια των ιστιδινών επί του φορέα, προηγούνται της περιοχής που φέρει διάφορες θέσεις περιορισμού (multilinker).

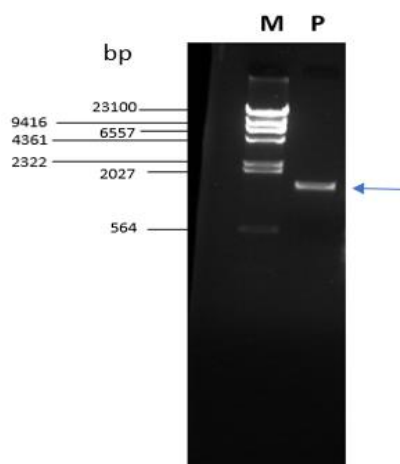
Τα νέα πριμοδοτικά μόρια λοιπόν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εισάγουν θέσεις περιορισμού για την EcoRI (G/AATTC) στο 5'-άκρο του γονιδίου για την β -υπομονάδα, και για την HindIII στο 3'-άκρο του γονιδίου της α -υπομονάδας. Βάσει των ανωτέρω, τα πριμοδοτικά μόρια που προέκυψαν είναι τα εξής:

- **PCD34_pRSF_for:** 5'-GAAAGGAGCCGAATTCTGTGCCGG-3'
 - $T_m = 66,1^\circ\text{C}$, nt = 26, GC = 58,3%
- **PCD34_pRSF_rev:** 5'-GCAGGCCGGAAGCTTCTCACTGG-3'
 - $T_m = 65,8^\circ\text{C}$, nt = 26, GC = 63,6%

3.3.2.2 Ενίσχυση των γονιδίων

Με γενωμικό DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια *Srhe3* σε πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB (5 ml) ως εκμαγείο, και με τη χρήση των εκάστοτε πριμοδοτικών μορίων πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των γονιδίων για τις α - και β -υπομονάδες της 3,4-πολυμεράσης του PCA.

Από την αντίδραση PCR αναμένεται μια ζώνη ~1400bp (Εικόνα 3.3.1) που αντιστοιχεί στην μέγεθος της περιοχής όπου εδράζονται τα δύο γονίδια σύμφωνα με την *in silico* μελέτη που προηγήθηκε (Παράγραφος 3.2).



Εικόνα 3.3.1: Πήγμα αγαρόζης με το προϊόν της αντίδρασης PCR (P). M: μάρτυρας λDNA/*HindIII*. Αριστερά του πηγματος δίνονται τα μεγέθη του μάρτυρα σε ζεύγη θέσεων (bp).

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω φωτογραφία, το ενισχυμένο τμήμα DNA έχει το αναμενόμενο μέγεθος (~1450 bp).

3.3.3 Κλωνοποίηση του προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript SK(+)

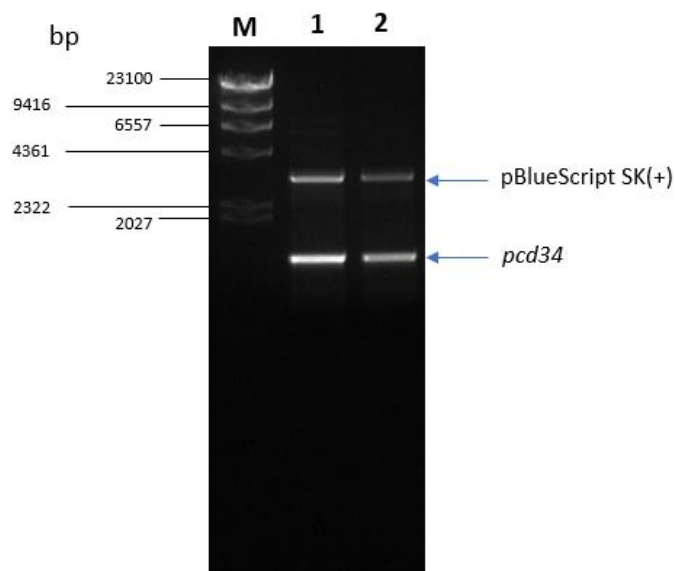
Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την κλωνοποίηση του ανωτέρω προϊόντος PCR στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript-SK (+) ώστε να πραγματοποιηθεί η επιβεβαίωση της αλληλουχίας του ενθέματος μέσω αλληλούχισης.

Με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueScript::*pcd34* μετασχηματίζονται επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε στερεό μέσο ανάπτυξης LA παρουσία του αντιβιοτικού Amp και X-gal, για να καταστεί δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών, οι οποίες έχουν λευκό χρώμα.

Επιλέγεται τυχαία ένας αριθμός αποικιών από τις οποίες απομονώνεται το πλασμιδιακό τους DNA και πραγματοποιούνται πέψεις με τα ένζυμα για τα οποία εισήχθησαν θέσεις περιορισμού στα 5'- και 3'- άκρα στις προαναφερθείσες περιπτώσεις στην παράγραφο 3.2.2.1 (*NdeI*/ *HindIII* για κλωνοποίηση σε pET-29c και *EcoRI*/ *HindIII* για κλωνοποίηση σε pRSFDuet-1).

Στο πήγμα αγαρόζης αναμένονται δυο ζώνες. Η μία ζώνη αντιστοιχεί στον ευθυγραμμισμένο πλασμιδιακό φορέα pBlueScript SK(+) (~3000 bp) και η άλλη στο προϊόν pCR που φέρει τα γονίδια για τις δυο υπομονάδες της PCD34 (~1450 bp).

Ενδεικτικά παρατίθεται παρακάτω φωτογραφία πηγματος αγαρόζης μετά από πέψεις με EcoRI/ HindIII σε πλασμιδιακό DNA από δύο τυχαίες λευκές αποικίες μετασχηματισμένων DH5a (Εικόνα 3.3.2).



Εικόνα 3.3.2: Πήγμα αγαρόζης που απεικονίζει τα προϊόντα πέψεων του ανασυνδυασμένου φορέα *pBlueScript::pcd34* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI/ HindIII*. M: μάρτυρας λDNA/*HindIII*, 1-2: προϊόντα πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα. Αριστερά του πηγματος δίνονται τα μεγέθη κάθε ζώνης του μάρτυρα σε ζεύγη θάσεων.

Τα αποτελέσματα των πέψεων επιβεβαιώνουν ότι η κλωνοποίηση του ενισχυμένου τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript SK(+) πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.

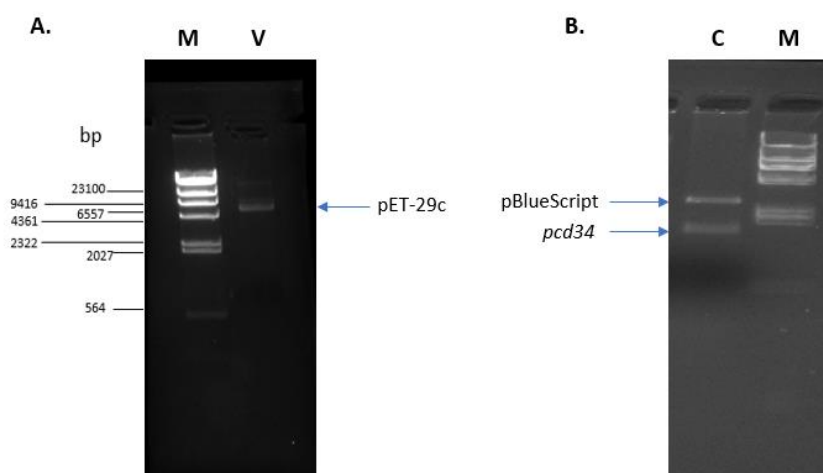
Ο ανασυνδυασμένος φορέας αποστέλλεται στην εταιρία Eurofins προς επιβεβαίωση της ορθότητας της αλληλουχίας του ενθέματος και ακολουθεί κλωνοποίηση του ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης.

3.3.4 Ετερόλογη έκφραση των γονιδίων της 3,4-διοξυγονάσης του PCA

3.3.4.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα *pET-29c*

Μετά από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων DH5a που είναι μετασχηματισμένα είτε με τον πλασμιδιακό φορέα pET-29c είτε με τον ανασυνδυασμένο φορέα pBlueScript::pcd34, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού τους DNA. Ακολούθησαν πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/HindIII οι οποίες δημιουργούν κολλώδη, συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα τόσο στον pET-29c όσο και στα άκρα του τμήματος pcd34.

Όσον αφορά στον pET-29c, μετά την πέψη με τα ένζυμα αυτά, αναμένεται ένα ευθύγραμμο μόριο DNA μήκους ~5300bp καθώς οι θέσεις περιορισμού βρίσκονται στη multilinker περιοχή του φορέα. Για το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueScript::pcd34, αναμένονται δυο ζώνες των ~3000 bp και των ~1450bp που αντιστοιχούν στον φορέα και στην ένθεση αντίστοιχα (Εικόνα 3.3.3).



Εικόνα 3.3.3: Πήγματα αγαρόζης που απεικονίζουν τα προϊόντα πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI/HindIII* του *pET-29c* (A) και του ανασυνδυασμένου φορέα *pBlueScript::pcd34* (B). M: μάρτυρας λDNA/*HindIII*, V: πέψη του πλασμιδιακού φορέα *pET-29c*, C: πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pBlueScript::pcd34*. Αριστερά της εικόνας (A) παρατίθενται τα μεγέθη κάθε ζώνης του μάρτυρα σε ζεύγη βάσεων (bp).

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στον ευθυγραμμισμένο πλέον πλασμιδιακό φορέα *pET-29c* και στο ενισχυμένο τμήμα *pcd34* κόπηκαν, καθαρίστηκαν και ακολούθησε ο μεταξύ τους ανασυνδυασμός. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pET-29c::pcd34* χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5a (αποθήκευση -80°C) και BL21 (DE3) (ετερόλογη έκφραση της PCD34).

3.3.4.2 Καθαρισμός της υπερεκφρασμένης PCD34 με στήλη Ni^{2+} -NTA αγαρόζης

Κατά την προσπάθεια καθαρισμού της ανασυνδυασμένης PCD34 μετά από κλωνοποίηση των γονιδίων στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης *pET-29c* παρατηρήθηκε αδυναμία κατακράτησης της από τη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας.

Είναι χαρακτηριστικό ότι η συγκέντρωση πρωτεΐνης, μετά από μέτρηση με Bradford, στο ακατέργαστο κυτταρικό εκχύλισμα (6,87 μg/μl) είναι σχεδόν ίδια με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης του κλάσματος που περνά από τη στήλη χρωματογραφίας κατά την πλύση της και πριν την εφαρμογή βαθμίδωσης συγκέντρωσης ψιδαζολίου (6,65 μg/μl). Την ίδια στιγμή, στο κλάσμα που φαίνεται να παρουσιάζει μια μικρή δραστικότητα 3,4-διοξυγονάσης του PCA (C1, ~100 mM ψιδαζολίου) δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω Bradford.

Λόγω αυτής της αδυναμίας καθαρισμού της υπερεκφρασμένης PCD34, σχεδιάστηκαν εκ νέου πριμοδοτικά μόρια για κλωνοποίηση σε νέο πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης *pRSFDuet-1*. Αυτός ο φορέας εισάγει την ουρά ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο της β-υπομονάδας σε αντίθεση με τον *pET-29c* που εισάγει τις ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό άκρο της α-υπομονάδας. Επιλέχθηκε ο φορέας αυτός γιατί μετά από λεπτομερέστερη *in silico* μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της α-υπομονάδας συμμετέχουν στον σχηματισμό ετεροδιμερούς με τη β-υπομονάδα του ενζύμου. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως η ουρά ιστιδίνης «θάβεται» στη διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων και δεν είναι διαθέσιμη προς πρόσδεση στη στήλη.

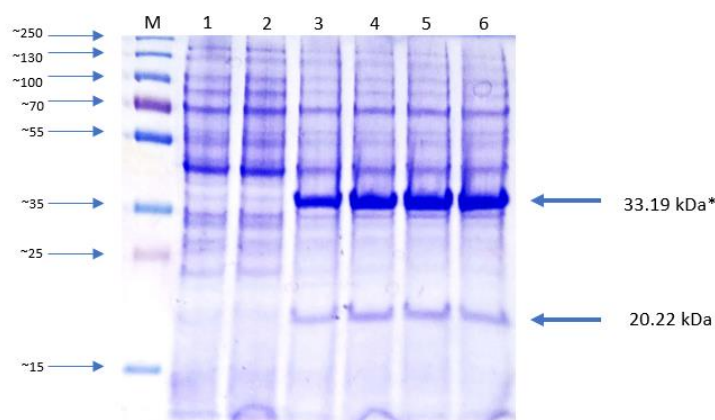
3.3.4.3. Κλωνοποίηση των γονιδίων στον φορέα pRSFDuet-1

Λόγω του προαναφερθέντος προβλήματος καθαρισμού της υπερεκφρασμένης PCD34 πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικεύουν για τις 2 υπομονάδες αυτής σε πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pRSFDuet-1.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αντίστοιχη με ανωτέρω με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*/*HindIII* για την πέψη τόσο του ανασυνδυασμένου φορέα pBlueScript::pcd34 όσο και του νέου πλασμιδιακού φορέα υπερέκφρασης pRSFDuet-1 (Παράγραφος 3.3.2.1).

3.3.4.4 Ετερόλογη έκφραση pcd34 σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3)

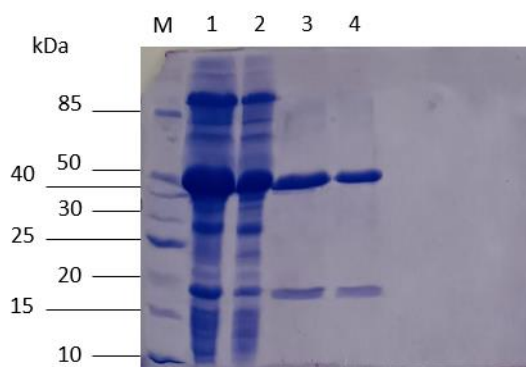
Τα μετασχηματισμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pRSFDuet-1::pcd34 κύτταρα BL21 καλλιεργήθηκαν σε 100 ml πλήρους θρεπτικού μέσου LB. Σε $OD_{600nm} = 0.6$ προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επώαστηκαν στους 37°C. Σε χρόνους 0h, 1h, 2h, 3h και 4h μετά την προσθήκη IPTG λαμβάνονταν δείγματα καλλιέργειας (1 ml), για να καθοριστεί ο βέλτιστος χρόνος επαγωγής της υπερέκφρασης. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων και το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, μέσω του οποίου διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος υπερέκφρασης είναι οι 3 ώρες μετά την προσθήκη IPTG (Εικόνα 3.3.4).



Εικόνα 3.3.4: Πήγμα SDS ηλεκτροφόρησης που απεικονίζονται τα επίπεδα υπερέκφρασης της PCD34 μετά από επώαση με 1 mM IPTG σε χρονικά διαστήματα από 0 έως 4 ώρες. M: μάρτυρας μοριακών βαρών Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained 10 – 250 kDa Ladder: Electrophoresis Reagents Electrophoresis, 1: πριν την προσθήκη IPTG, 2: αμέσως μετά την προσθήκη IPTG, 3: επώαση για 1h, 4: επώαση για 2h, 5: επώαση για 3h, 6: επώαση για 4h.

Παρατηρούνται μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της β-υπομονάδας της PCD34 αυτό είναι το γονίδιο που μπαίνει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού χάρη στον οποίο γίνεται η έκφραση του παρουσία IPTG (βλ. Παράγραφο 2.16, Υλικά & Μέθοδοι).

Ακολούθησε καθαρισμός του υπερεκφρασμένου ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας μέσω στήλης Ni²⁺-NTA αгарόζης (Εικόνα 3.3.5).

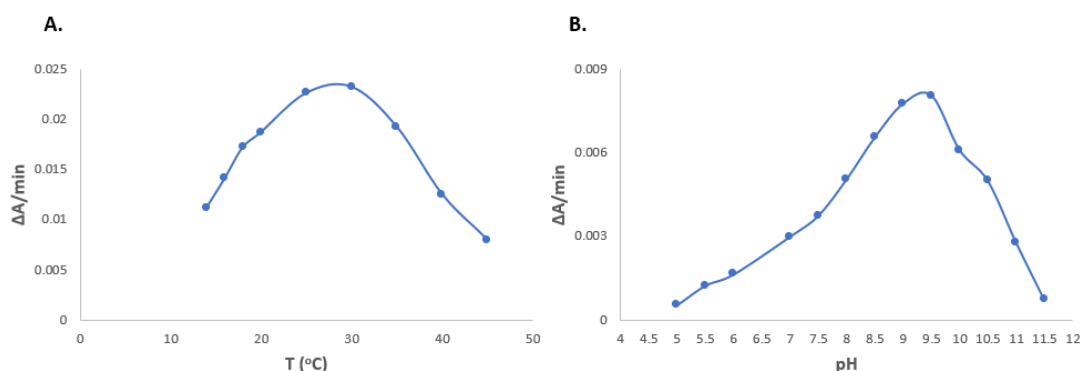


Εικόνα 3.3.5: Πήγμα SDS ηλεκτροφόρησης που απεικονίζονται τα κλάσματα από τα διάφορα στάδια καθαρισμού της PCD34. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών (kDa) FastGene Unstained Protein Marker της NIPPON Genetics, **1:** ακατέργαστο κυτταρικό εκχύλισμα από κύτταρα BL21 όπου πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση της PCD34, **2:** κυτταρικό εκχύλισμα μετά την διέλευση από τη στήλη, **3-4:** κλάσματα με τις καθαρές α- και β-υπομονάδες της PCD34.

3.3.4.5 Χαρακτηρισμός της PCD34

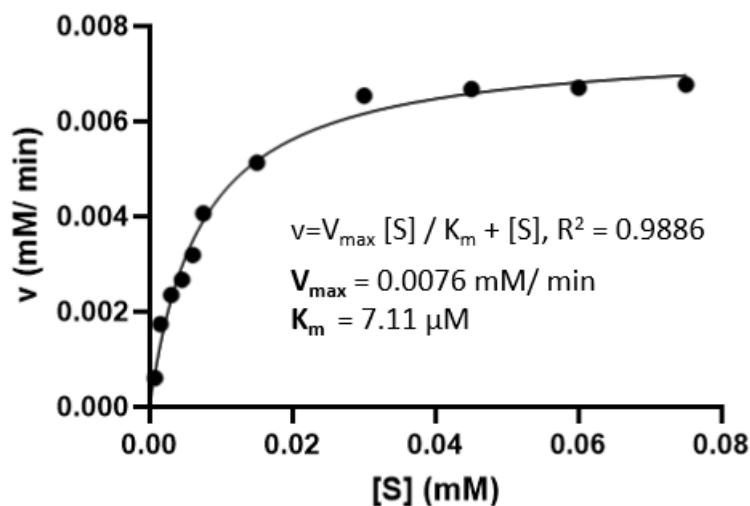
Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δραστηριότητας σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίας ώστε να καθοριστούν αρχικά οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Τόσο οι μετρήσεις αυτές όσο και η κινητική της αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν μετά από επώαση του ενζύμου με 0.2 mM FeSO_4 (Fe^{2+} για 20 min σε θερμοκρασία 0 °C. Η επώαση αυτή προηγήθηκε καθώς μετά από δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις Fe^{2+} για διαφορετικά χρονικά διαστήματα βρέθηκε ότι η δραστηριότητα του ενζύμου επάγεται μέχρι και 2.6 φορές.

Με τις ανωτέρω μετρήσεις προσδιορίστηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης είναι οι 30 °C ενώ το ένζυμο δρα καλύτερα σε τιμές pH 9 – 9.5 (Γράφημα 3.3.1)



Γράφημα 3.3.1: Δραστηριότητα της PCD34 σε (A) διάφορες θερμοκρασίες: Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της PCD34 προσδιορίστηκε στους 30°C. (B) διάφορες τιμές pH: Η καλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε τιμή pH = 9.5.

Ακολούθησε μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος PCA (0,75 – 75 * 10⁻³ mM) στις βέλτιστες συνθήκες δράσης της PCD34 ώστε να προσδιοριστεί το μοντέλο κινητικής που ακολουθεί η αντίδραση που αυτή καταλύει (Γράφημα 3.3.2)



Γράφημα 3.3.2: Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της PCD34. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten που περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$.

Η αντίδραση που καταλύεται από την PCD34 φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$, με $V_{\max} = 0,0076 \text{ mM/min}$ και $K_m = 7,11 \mu\text{M}$.

Η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα με βάση την τιμή $V_{\max}$ υπολογίζεται 270 U/ml ενώ η αντίστοιχη ειδική ενζυμική δραστηριότητα $1,54 \text{ U/}\mu\text{g}$. Ως Unit ορίζεται ως η μετατροπή 1 nmol PCA σε διάστημα 1 min .

3.4 Εισαγωγή της μετάλλαξης R123H στην α -υπομονάδα της PCD34

3.4.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου για την α -υπομονάδα της PCD34

>650468463 protocatechuate 3,4-dioxygenase, **alpha subunit** [*P. phenanthrenivorans* Sphe3: CP002379] (-) strand (564 bp)

ATG AGC AAC CCC ACC AAA CTC ATC CCC ACG CCC GGC CAG ACC GTC GGC CCG TTT
TAC GGC TAC GCC TTG CCG TTC GAG AAG GAC AAT GAA CTC CTG GCA CCC GGC TCG
CCG GGA TCC ATC CGC CTG CAA GGC ACC GTC TAC GAT GGC GCG GGC CAC ACC ATC
CCG GAC GCC ATC CTG GAA ATC TGG CAG CCG GAC GCC GAG GGC AAG GTG GTC CAG
AAG ACC GGC TCC CTG GTC CGG GAC GGC TAC ACC TTT ACC GGG TGG GGC CGC GGC
GCC GTG GGC AAC ACC GGT GTC TTC ACC TTC ACC ACA GTG AAT CCC GGC CCC ACC
AGG CCG GGG GCG GCA CCG TTC ATT TCG GTG GCC ATT TTC GCG **CGC** GGC CTC ACC
AAC CGG CTG TTC ACC CGG ATC TAC CTC CCT GAA GAC ACC GAT GCG CTG GCC AAC
GAC CCG CTG CTC AGC TCA TTG GAC CCT GAG CGG CGC AGG ACG CTG ATC GCG CGC
CGC GAC CCC GAC GGC GGG CTT ACC TGG GAT GTC CGC CTC CAG GGC GAG GGC GAG
ACA GTC TTC CTG GAC TTC CAG TGA

Με έντονη, υπογραμμισμένη και **κόκκινη** γραφή επισημαίνεται το κωδικόνιο που αντιστοιχεί στην αργινίνη-123 (R123) της α -υπομονάδας, το οποίο θα υποστεί μετάλλαξη προς ιστιδίνη (R123H). Πιο συγκεκριμένα, μέσω των ειδικών πριμοδοτικών μορίων που σχεδιάστηκαν αντικαθίσταται η G από A. Η μετάλλαξη δηλαδή σε νουκλεοτιδικό επίπεδο είναι η CGC $\rightarrow$ CAC.

3.4.2 Πρωτοταγής Δομή των PCD34 και PCD34/ R123H

ADX74973.1 α-υπομονάδα

MSNPTKLIPTPGQTVGPFYGYALPFEKDNELLAPGSPGSIRLQGTVDGAGHTIPDAILEIWQPD
AEGKVVQKTGSLVRDGYTFTGWGRGAVGNTGVFTFTTVNPGPTRPGAAPFISVAIFA**H**GLTNR
LFTRIYLPEDTDALANDPLLSSLDPERRRTLIARRDPDGGLTWDVRLQGEGETVFLDFQ

pI: 5.00

Mw: 20,2 kDa

Μετάλλαξη R123H

MSNPTKLIPTPGQTVGPFYGYALPFEKDNELLAPGSPGSIRLQGTVDGAGHTIPDAILEIWQPD
AEGKVVQKTGSLVRDGYTFTGWGRGAVGNTGVFTFTTVNPGPTRPGAAPFISVAIFA**H**GLTNR
LFTRIYLPEDTDALANDPLLSSLDPERRRTLIARRDPDGGLTWDVRLQGEGETVFLDFQ

3.4.3 Πολλαπλή στοίχιση (CLUSTAL-Omega) αμινοξικών αλληλουχιών των υπομονάδων της PCD34

Στο πλαίσιο της *in silico* μελέτης της PCD34 και για να προσδιοριστεί ο ρόλος των αμινοξέων ενδιαφέροντος, πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των δύο υπομονάδων της με άλλες μελετημένες 3,4-διοξυγονάσες του PCA.

Με βάση την ομοπαράθεση αυτή θα προσδιοριστούν τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου αλλά και αυτά που συμμετέχουν τόσο στην αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα όσο και στην πρόσδεση σιδήρου.

(A)

	P	
<i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	-----MSNPTKLIPTPGQTVG PF YGYALPFEKDNE-----	30
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	-----MNGWNFQELKETPSQTGG PY VHIGLLPKQANIE-VFEHNLDNN-L	43
<i>A. tumefaciens</i>	-----MVQPLNYFKETASQTAG PY VHIGCTPNFVGIEGVFEKDLGSGPL	44
<i>B. cepacia</i>	-----MTTLKQTPSQT PG FAYGLCPQQYGYDL---KSLFTPTI	37
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-----MSHELLRET PS QTAG PY VHIGLALAAAGNPTR-DLE-IWNRM	40
<i>R. opacus</i>	MIDTQNPDA PR YPVFAKSQDEV PF GVTPSQT PG VHIGL FPT WENS GE -----	49
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	-----MVQPLNYFKETASQTAG PY VHIGCTPNFVGIEGVFEKDLGSGAL	44
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	-----MRIEAPMTIT PS QT PG FAYCLTPDDYQTI----PPIFGRNL	39
<i>S. meliloti</i> 1021	-----MVQDLSTLKETASQTAG PY VHIGLTPSFCGIGGVYEGDLGAS-M	43
<i>A. baylyi</i>	-----MNGWNFQELKETPSQTGG PY VHIGLLPKQANIE-VFEHNLDNN-L	43
<i>P. xenovorans</i>	-----MTTLKQTPSQT PG FAYGLCPQQYDFDF---RSLFTPVV	37
<i>S. maltophilia</i>	-----MPIELL PET PSQTAG PY VHIGLALEAAGNPTR-DQE-IWNCL	40
<i>Streptomyces</i> sp. 2065	-----MTTIDTSRPESVQ PT PSHTV PG FYGYAL FP GGGD-----	35
	. * .:* **:	
	##	
<i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	LLAPGSPGSIRLQGT VD GAGHTIPDAILEIWQPDAEGKV VQ KTGSL-----VRD	80
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	VQDNTQ Q QRIRLEGQ VF DGLSLPLRDVLEIWQADTNGV PS QADTQ GK -----QV--	94
<i>A. tumefaciens</i>	YNDKARGERISVRGT VD GAGMALKDALIEIWQADTDGY NS PSETRGK-----A--	94
<i>B. cepacia</i>	AAPHADGEHVLLVGQ VF DGDGNVSDAMLEFTQ VD GAGRF PAS RDDV-----A--	85
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	AREGARGQHILL LGH VYDGN HL VRD SF LEFWQADSEGRYQ ERY DP-----	86
<i>R. opacus</i>	AVPEDAPGRIDVSF N VIDGAGQ PI GDAM ETW QADAAGRF NS PTDPRGA-----AEAT	102
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	YNDKARGERISVRGT VD GAGMPLKDALIEIWQADTDGY NS PSETRGK-----A--	94
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	ATDDAVDSAFQFRGRLIDGDDHAI PD GMIELWQPDGNGNFVGAQ INP -----R	87
<i>S. meliloti</i> 1021	VNDKTLGQRITV TGR VIDGAGMPLRDALLEIWQADAAGLY NS PSELRG T -----A--	93
<i>A. baylyi</i>	VQDNTQ Q QRIRLEGQ VF DGLGLPLRDVLEIWQADTNGV PS QADTQ GK -----QV--	94
<i>P. xenovorans</i>	ADREAAGEHITIVGQ VF DGDGKVIGDAMLEVSQVDANGRF PES SREEI-----L--	85
<i>S. maltophilia</i>	AKPDAPGEHILL LGH VYDGN HL VRD SF LEWQADANGEYQ DAY NL-----	86
<i>Streptomyces</i> sp. 2065	IAPVGHPDTITVQGYI YD GEGKPL PD AFVELWGP DE GNLSTTDGSIRRD PAS GGYLGRN	95
	. . : ** . : * ::* * *	

<i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	GYTFTGWGRGAV--GNTGVFTFTTVNPGPT----RPGAAPFISVAIFARGLTNRLFTRIY	134
<i>Acinetobacter</i> sp.ADPl	DPNFLGWGRTGADFGT-GFWSFNTIKPGAVPGRKGSTQAPHISLIIFARGINIGLHTRVY	153
<i>A. tumefaciens</i>	DPNFIGWGRSPGDMDT-GEFIFETIKPGTVPFRDGRPMAPHITFWIVARGINIGLQTRMY	153
<i>B. cepacia</i>	KSGFTGFARVGTGTDAQHRFVETVKPGRI----AADEAPHINVTVMRGLTHAFTRVY	141
<i>P. aeruginosa</i> PA01	ERPFNSFGRATTFFDA-GEWTLHTVKGPGVVRNAQGVPMAPHINVSFLFARGINIHLQTRLY	145
<i>R. opacus</i>	PAGFRSLARVFA--DESGTIVVHTVKGPGALPAEDGAVEAPHINVGFLFARGMLERLYTRLY	160
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	DPNFTGWGRSPGDMDT-GEFIFETIKPGTVPFRDGRPMAPHITFWIVARGINIGLQTRMY	153
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	KSSFTGFGRTHC--NESGSFTFHTVKGPRVPTSAGILQAPHVALSIFGKGLNRRLYTRIY	145
<i>S. meliloti</i> 1021	DPNFTGWGRSPTSDEG-GVFTTFETVKGPRVPFRDGRMAPHISIWIVARGINIGLHTRMY	152
<i>A. baylyi</i>	DPNFLGWGRTGADFGT-GFWSFNTIKPGAVPGRKGSTQAPHISLIIFARGINIGLHTRVY	153
<i>P. xenovorans</i>	KTGFRGFARVGTGTDPHKRFVETVKPGRV----GPDEAPHLNVVVTMRGMLLHTFTRIY	141
<i>S. maltophilia</i>	ENVFNSFGRATTFFDA-GEWTLTYTVKPGVVNNAAGVPMAPHINISLFAARGINIHLHTRLY	145
<i>Streptomyces</i> sp.2065	GVEFTGWGRIQT--DANGHWYARTLRPGA-----RGQSAPYLSACVFARGLLVHLFTRIY	148
	* . . * * : . ** ** . : : * : ** : *	
	##	
<i>P. phenanthrenivorans</i> Sphe3	LPEDTDALANDPLLSSLD-PERRRTLIARRD----PDGGLTWDVRLQG--EGETVFLDFQ	187
<i>Acinetobacter</i> sp.ADPl	FDDEAEANAKDPVLNSIEWATRRQTLVAKREERD-GEVVYRFDIRIQG--ENETVFFDI-	209
<i>A. tumefaciens</i>	FPEEQEANAADPVLARVEQKSRIATLVAQKEE----GNVYRFDIRLQG--EGETVFFDI-	206
<i>B. cepacia</i>	FDDEAAANAADPVLNLVP-AERRATLVAKRDAQPGRPVVYRFDVVMQ--PDETFFFDV-	197
<i>P. aeruginosa</i> PA01	FDDETEANAACPVLNLIEQAPRRDTLLAQRCVD-GQLAYRFDIRIQG--DNETVFFDF-	201
<i>R. opacus</i>	FPEDTDAHASDPVLSAVPEADRPK-LIAEKT-----DRGYHLTIHVQNTGRETPFFAL-	213
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	FPEEEAANAADPVLARVEQKSRIATLVARKEE----GNIYRFDIRLQG--EGETVFFDI-	206
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	FADEV-SNEDPILALLS-SDERATLIAEKID----DAAFHITIRLQG--QRETFFFEV-	196
<i>S. meliloti</i> 1021	FPDEAAANAEDPLLARIEHRHRAETLVAAGQ-----APNYVFDIHLQG--EKETVFLDI-	204
<i>A. baylyi</i>	FDDEAEANAKDPVLNSIEWATRRQTLVAKREERD-GEVVYRFDIRIQG--ENETVFFDI-	209
<i>P. xenovorans</i>	FEDETAANEKDPVLTAVP-ADRRDTLIARRE--PNVANIYRFDIHMQG--EKETVFFDL-	195
<i>S. maltophilia</i>	FDDEAQANAKCPVLNLIEQPQRRETLIAKRCEVD-GKTAYRFDIRIQG--EGETVFFDF-	201
<i>Streptomyces</i> sp.2065	LPGDEPTLTADPLLSGLD-PARRGTLIARDE----GRGTYRFDIRLQG--EGETVFLEFQ	201
	: : : * : * : . * : * : : * . ** * : .	

(B)

P. phenanthrenivorans Sphe3	MPEETNAQLETDESVPPEPKAAHLPLDRAIETQADLSAEISALGEAYARALKDGAPAET	60
<i>Acinetobacter</i> sp.ADP1	-----MS-----QIIWGAYAQRNTED	16
<i>A. tumefaciens</i>	-----MSNQ-----PPETGPFFARNRDI	18
<i>B. cepacia</i>	-----MDSPTILTPRDWPS	14
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-----MH-----DAESRRFVIRDRNW	16
<i>R. opacus</i>	-----MLHLPAHHHAGHEA	14
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	-----MSNQ-----PPETGPFFARDRNI	18
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	-----MALFLPGWPEVPAEYPSDSVGM	22
<i>S. meliloti</i> 1021	-----MPDNQNGRRNG-----KPETGAFFARDRAW	25
<i>A. baylyi</i>	-----MS-----QIIWGAYAQRNTED	16
<i>P. xenovorans</i>	-----MDESFLTARDFAS	13
<i>S. maltophilia</i>	-----MP-----AQDNSRFVIRDRNW	16
<i>Streptomyces</i> sp.2065	-----MTLTQHDIDLEIAAEHATYEKRVADGAPVEH	31
P. phenanthrenivorans Sphe3	QPRLDYPPYRSSILRHPTKSL----QHADPETIELYSPAFGHQDVHALESDLTI--QH-N	113
<i>Acinetobacter</i> sp.ADP1	HPPAYAPGYKTSVLRSPKNALISIAE----TLSEVTAPHFSADKFGPKDNDLILNYAK-D	71
<i>A. tumefaciens</i>	HPLAYAPGYKTSILRSPQRALISLEG----TKSEITGPVFGHGVNLPLDNDLILNYARPG	74
<i>B. cepacia</i>	HPAYVHPDYRSSVKGPRTRPMIPLKE----RLRDQYAPVYGAEDLGPLDHDLTKNVAVK-N	69
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	HPKALTPDYKTSVPRSPSQALVSIPQ----SLSETSGPDFSHLRLGRHDNDLLLNFDFH-G	71
<i>R. opacus</i>	NAPLLFPEYKTTTLRSPKNDLILVPQ----RLGEITGPVFGNADIAGENDMTH--AN-G	67
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	HPLPYSPGYKTSILRSPQRALISLEG----TKSEITGPVFGHGMNLPLDNXLILNYARPG	74
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	HPPYDTPAYIFTRKRAPSRLRYIPQ----TATELYGPVYGHESVRPEDSDLTR--QH-D	75
<i>S. meliloti</i> 1021	HPPAFAPGYKTSVLRSPQKALLSLDG----TISEITGPVFGHSMLGELDNDLIHNFASPG	81
<i>A. baylyi</i>	HPPAYAPGYKTSVLRSPKNALISIAE----TLSEVTAPHFSADKFGPKDNDLILNYAK-D	71
<i>P. xenovorans</i>	HPSYIYPGYGSSVKGPRTRPLIPLKE----KLRDQHVPVYGTEDLGALDHDLTRNAVR-N	68
<i>S. maltophilia</i>	HPKALTPDYKTSVARSPRQALVSIPQ----SISSETTGPDFSHLGFGAHDHDLNLFNN-G	71
<i>Streptomyces</i> sp.2065	HPRRDYAPYRSSTLRHPKQPPVTIDVSKDPELVELASPAFGERDITEIDNDLTR--QH-N	88
	: * : * * . : * :. . : :	
	#	

	F	P	
P. phenanthrenivorans Sphe3	GEPQGERIIIVTGKVLDDGGRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCI		173
<i>Acinetobacter</i> sp.ADPl	GLPIGERVIVHGYVRDQFGRPVKNALVEVWQANASGRYRHPNDQYIGAMDPNFGGCGRML		131
<i>A. tumefaciens</i>	EMPVGPRIILVHGRVLDERGRVDGALVEFWQANAGGRYRHKKESYLAIDPNFGGVGRTI		134
<i>B. cepacia</i>	GEPLGERIIVTGRVLDEGGKPVRLTLVEVWQANAAGRYVHKVDQHDAPLDPNFLGAGRCM		129
<i>P. aeruginosa</i> PA01	GLPQGERIIMFGRVFDQYGKVPHTLVEWQANAGGRYRHKNDRYLAPLDPNFGGVGRTL		131
<i>R. opacus</i>	GEAQQRIIVHGRVLDSAGKPIPDTLIEVWQANAGGRYRHKMDSWPAPLDPHFNGVARCL		127
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	EMPVGPRIILVHGRVLDERGRVDGALVEFWQANAGGRYRHKKESYLAIDPNFGGVGRTI		134
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	GEPIGERIRITGRVIDEDGRGVPNALLEIWQANAAGRYIHKLDQHLAPLDPNFGSAGRTV		135
<i>S. meliloti</i> 1021	ESAIGERIIIVHGRVLDERGHPVHGVLEFWQANAGGRYRHKKESYLAIDPNFGGCGRTI		141
<i>A. baylyi</i>	GLPIGERVIVHGYVRDQFGRPVKNALVEVWQANASGRYRHPNDQYIGAMDPNFGGCGRML		131
<i>P. xenovorans</i>	GEPLGERIIVTGRVLDEGNRPVRNTLVEIWQANAAGRYVHKADQHDAPLDPNFLGAGRCI		128
<i>S. maltophilia</i>	GLPIGERIIVAGRVVDQYGKVPNTLVEWQANAGGRYRHKNDRYLAPLDPNFGGVGRCL		131
<i>Streptomyces</i> sp.2065	GEPIGERITVSGRLDRDGRPIRGQLVEIWQANSAGRYAHQREQHDAPLDPNFTGVGRTL		148
	* *: : * : * .: : *:*.****:.* ** : . :***: * * .* :		
	# #		

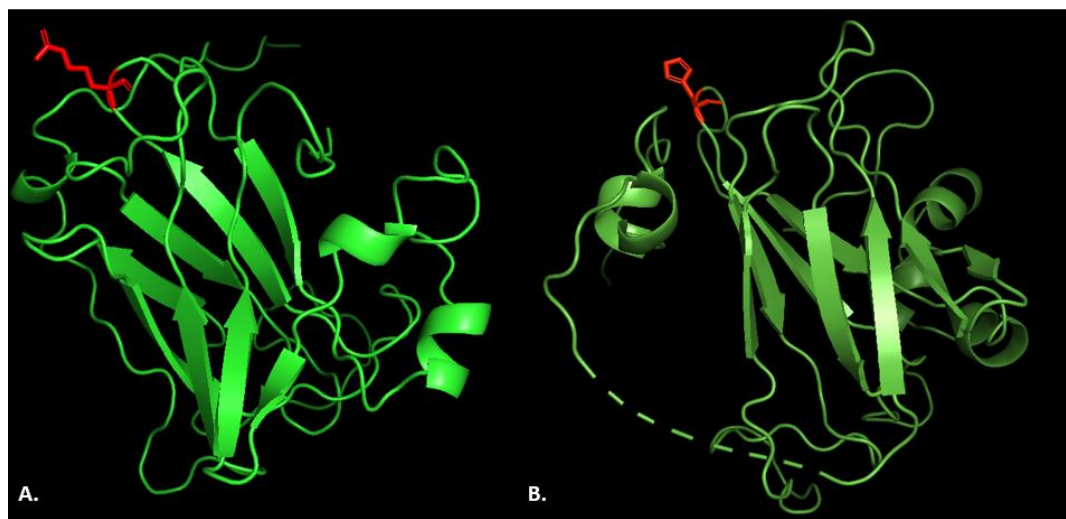
	F	F F	
	P	P P P	
P. phenanthrenivorans Sphe3	TGPDGSYRFITIKPGAYPWKNHLNAWRPAHIHFSLFGEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDP		233
<i>Acinetobacter</i> sp.ADPl	TDDNGYYVFRTIKPGPYPWNRNINEWRPAHIHFSLIADGWAQRLISQFYFEGDTLIDSCP		191
<i>A. tumefaciens</i>	TDENGYWFKTIQPGAYPWPNGVNDWRPAHIHFSVFGHGFAQRLITQMYFEGDPLIWKCP		194
<i>B. cepacia</i>	TDAEGRYRFLTIKPGAYPWGNHPNAWRPNHIHFSLFGDYFGSRLVTQMYFPGDPLLAYDP		189
<i>P. aeruginosa</i> PA01	TDSEGHYYFRTIKPGPYPWNRNGPNDWRPAHIHVSVSGPAIAARLVTQMYFEGDPLIPKCP		191
<i>R. opacus</i>	TDKQGHYEFTTIKPGAYPWGNHNNAWRPAHIHFSLFGQAFTRQLVTQMYFPDDPFFFQDP		187
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	TDENGYWFKTIQPGAYPWPNGVNDWRPAHIHFSVFGHGFAQRLITQMYFEGDPLIWKCP		194
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	TGSDGSYSFITIIPGAYPVVGLHNVRPRHIHISLFGPSFLSRLVTQLYFEGDPLLRYDS		195
<i>S. meliloti</i> 1021	TDEEGRYWFRTVRPGAYPWPNGVNDWRPAHIHFSVFGHGFAQRLITQMYFEGDPMIWKCP		201
<i>A. baylyi</i>	TDDNGYYVFRTIKPGPYPWNRNINEWRPAHIHFSLIADGWAQRLISQFYFEGDTLIDSCP		191
<i>P. xenovorans</i>	TDNEGRYRFMTIKPGAYPWGNHPNAWRPNHIHFSLFGDHFGSRLVTQMYFPGDPLLAFFDP		188
<i>S. maltophilia</i>	TDRDGYYSFRTIKPGPYPWNRNGPNDWRPAHIHFAISGPSIATKLITQLYFEGDPLIPMCP		191
<i>Streptomyces</i> sp.2065	TDDEGGYHFTTVQPGPYPWNRNVNAWRPAHIHFSMFGSAFTQRLVTQMYFPSDPLFPYDP		208
	. : * * *: * * * . * * * * * .: . :*:*: * * .* ::		
	# # # # #		

P. phenanthrenivorans Sphe3	IYQITVDQDARDRLVATYDHSSITEPEWALGYNWDIILTGPKRWTENEALGAAGDEE	290
<i>Acinetobacter</i> sp.ADP1	ILKTIPSEQRRALIALEDKSNFIEADSRCYRFDITLRGRRTYFENDLT-----	241
<i>A. tumefaciens</i>	IVKTIPTDEDAIKRLIAPLDMNAALPMDMLAYKFIDIVLRGRSTLFENRMEGN-----	246
<i>B. cepacia</i>	IFQGTP-EAARDRLISRFSLDTTTEEGHALGYEFDIVLRGRDATPMER-----	235
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	IIRTLADPEAAQSLIGRLDSMANPMDCLAYRFDIVLRGQRKTFFENA-----	239
<i>R. opacus</i>	IYNSVP-EAARERMISTFDYDHTRDNWAVGFKFIDIVLRGQDATPFEDPEGH-----	237
<i>A. radiobacter</i> S2 Type I	IVKTIPTDEDAIRRLIAPLDMNATLPMDMLAYKFIDIVLRGRSTLFENRMEGN-----	246
<i>A. radiobacter</i> S2 Type II	IYNAAP-DFSKRGMVASLDLEATQSEWGPLYRFIDIVLRGRNGNYFEETHAH-----	245
<i>S. meliloti</i> 1021	IVGTVPDRRAIEQLIAALDWGNTPMDARAYRFDIVLRGRSTFFENRPEGN-----	253
<i>A. baylyi</i>	ILKTIPSEQRRALIALEDKSNFIEADSRCYRFDITLRGRRTYFENDLT-----	241
<i>P. xenovorans</i>	IFQGTP-EHARDRLIANFSLDTTQEAYALGYDFDIVLRGRNETPMER-----	234
<i>S. maltophilia</i>	IVKSIANPQAVQQLIAKLDMSNANPMDCLAYRFDILLRGQRKTHFESC-----	239
<i>Streptomyces</i> sp.2065	IIQSVTDDAARQLRVATYDHLSLVPEFSMGYHWDIVLDGPHATWIEEGR-----	257
	* ::: :*** * *	

Εικόνα 3.1.1.: Πολλαπλή στοίχιση αλληλοχυσιών της α- (A) και β-υπομονάδας (B) της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCD34) του *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 με αντίστοιχες διοξυγονάσες που έχουν δημοσιευθεί και παρουσιάζουν ομολογία >40%. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν είτε με το PCA είτε με το άτομο Fe απεικονίζονται με γράμματα πάνω από την στοίχιση: **F→ συντονισμός με το ιόν του σιδήρου Fe³⁺, **P**→ αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Το σύμβολο της δίεσης (#) κάτω από τη στοίχιση, υποδεικνύει αμινοξέα που συγκροτούν το ενεργό κέντρο. Με **κόκκινο** σημειώνεται η αργινίνη που υπέστη μετάλλαξη. Οι αστερίσκοι αντιστοιχούν σε συντηρημένα κατάλοιπα και οι κουκκίδες σε συντηρητικές υποκαταστάσεις (αμινοξέα με παρόμοια δομή ή βιολογική δράση). Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ADX74973.1, -4.1 (α-, β-υπομ., Sphe3), AAC37154.1, -3.1 (α-, β-υπομ., Acinetobacter sp. ADP1), AAF34267.1, -68.1 (α-, β-υπομ. Agrobacterium tumefaciens), AAA25925.1, -4.1 (α-, β-υπομ., Burkholderia cepacia), AAG03544.1, -43.1 (α-, β-υπομ. Pseudomonas aeruginosa PAO1), AAC38244.1, -43.1 (α-, β-υπομ. Rhodococcus opacus), AAG27522.1, -21.1 (α-, β-υπομ. Type I, Agrobacterium radiobacter S2), AAG27524.1, -23.1 (α-, β-υπομ. Type II, Agrobacterium radiobacter S2), NP_438028.1, -29.1 (α-, β-υπομ., Sinorhizobium meliloti 1021), WP_011490591.1, -92.1 (α-, β-υπομ., Paraburkholderia xenovorans), AFH89644.1, -45.1 (α-, β-υπομ., Stenotrophomonas maltophilia), AAD05270.1, -69.1 (α-, β-υπομ., Streptomyces sp. 2065).**

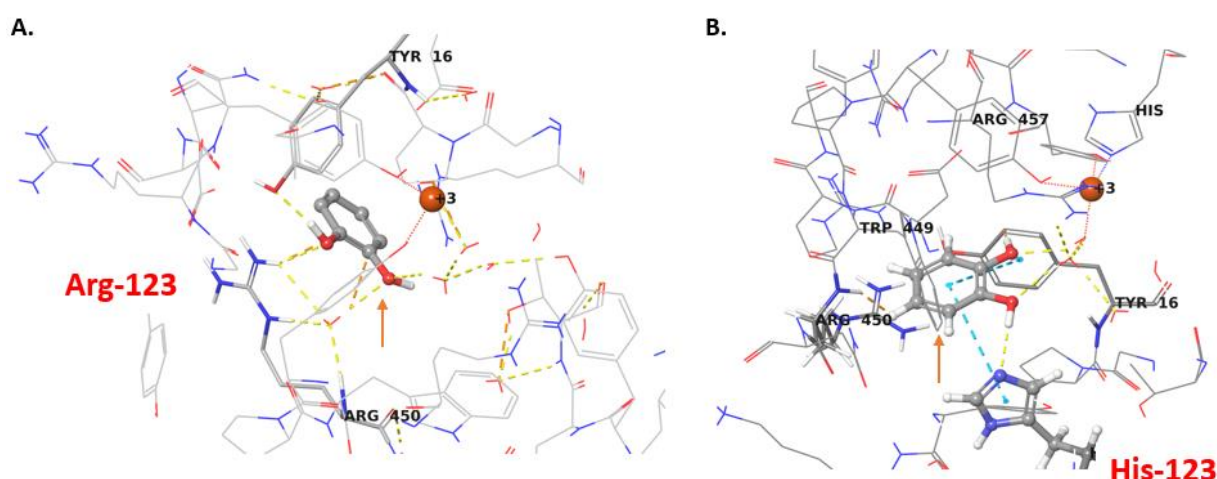
3.4.4 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης

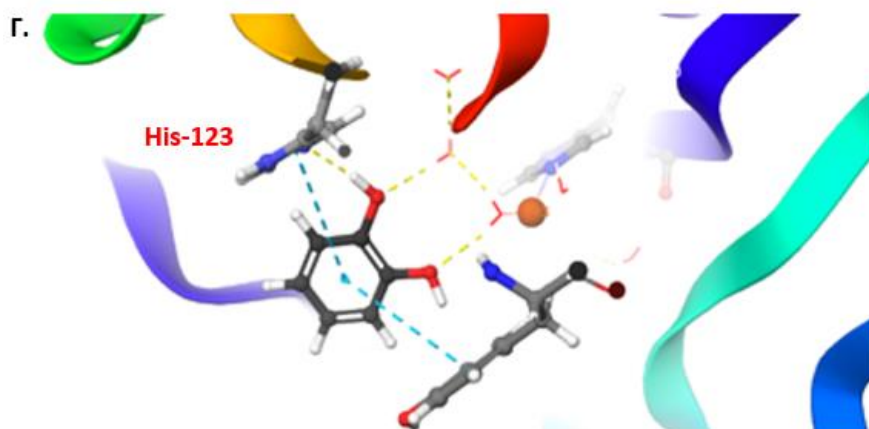
Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση σχεδιάστηκε η αντικατάσταση της Arg-123 προς His-123 (R123H) (Εικόνα 3.4.1) καθώς αναμένεται να προσδώσει στην PCD34 επιπλέον δραστικότητα 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης.



Εικόνα 3.4.1: Απεικόνιση της πρόβλεψης τριτοταγούς δομής της α -υπομονάδας της PCD34 πριν (A) και μετά τη μετάλλαξη R123H. Η απεικόνιση και η επεξεργασία πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PyMol. Με κόκκινο σημειώνονται η Arg-123 στην αγρίου τύπου PCD34 (A) και η His-123 στη μεταλλαγμένη (B).

Της μετάλλαξης αυτής προηγήθηκαν πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης (Docking). Να σημειωθεί ότι τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν από την κα Συριοπούλου Αγγελική (Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ). Από τα ανωτέρω πειράματα προέκυψε ότι στο αγρίου τύπου ένζυμο η κατεχόλη να μην συνδεόταν στο ενεργό κέντρο, όμως ο προσανατολισμός πρόσδεσης δεν ήταν ο κατάλληλος ώστε να πραγματοποιηθεί η σχάση του δακτυλίου μεταξύ των δύο υδροξυλομάδων. Η αντικατάσταση όμως της Arg-123 με μία ιστιδίνη επιτρέπει στον δακτύλιο της κατεχόλης να λάβει τον κατάλληλο προσανατολισμό προς το ιόν σιδήρου που είναι δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην διεξαγωγή της αντίδρασης (Εικόνα 3.4.2).



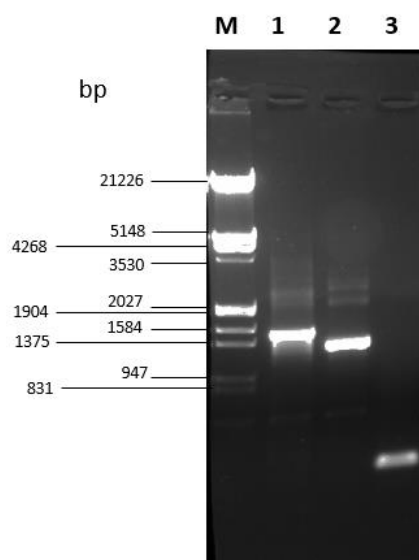


Εικόνα 3.4.2: Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης στην PCD34 με υπόστρωμα κατεχόλης. (Α) Το αγρίου τύπου ένζυμο με προσδεμένη κατεχόλη στο ενεργό του κέντρο, (Β-Γ) Το μεταλλαγμένο PCD34/R123H ένζυμο με προσδεμένη την κατεχόλη. Με το πορτοκαλί βέλος υποδεικνύεται το υπόστρωμα, ενώ η πορτοκαλί σφαίρα αντιστοιχεί σε ένα ιόν Fe^{3+} .

3.4.5 PCR δύο σταδίων για την εισαγωγή της μετάλλαξης R123H

Ακολουθώντας τη διαδικασία όπως αυτή περιγράφεται στην Παράγραφο 2.14, και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων και με εκμαγείο κατάλληλη αραίωση του ανασυνδυασμένου pRSFDuet-1::pcd34 επιτυγχάνεται η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης R123H μέσω της χρήσης PCR δύο βημάτων.

Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο βήμα χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων **PCD34_pRSF_for/ RevR123H** και **ForR123H/ PCD34_pRSF_rev**. Προκύπτουν δυο προϊόντα των 1200 bp και 200 bp αντίστοιχα (Εικόνα 3.4.3).



Εικόνα 3.4.3: Πήγμα αгарόζης όπου απεικονίζονται τα προϊόντα του πρώτου βήματος PCR. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, **1:** προϊόν PCR για το τμήμα που αντιστοιχεί στις δυο υπομονάδες της PCD34 (~1400bp) που χρησιμοποιήθηκε εδώ ως ακριβέστερος μάρτυρας μεγέθους γνωστού μοριακού θάρους, **2:** προϊόν PCR του ζεύγους πριμοδοτικών μορίων PCD34_pRSF_for/ RevR123H (1200 bp), **3:** προϊόν PCR του ζεύγους πριμοδοτικών μορίων ForR123H/ PCD34_pRSF_rev (200 bp).

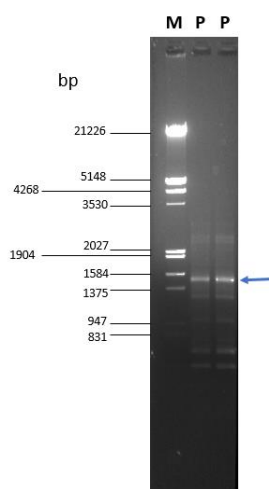
Η συγκέντρωση των προϊόντων αυτών μετρείται καθώς στο δεύτερο βήμα της PCR, όπου και θα έχουν το ρόλο του εκμαγείου, θα πρέπει η αναλογία τους να είναι ισομοριακή ώστε να

υπάρξει το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα όσον αφορά την αποφυγή μη ειδικών προϊόντων PCR. Πιο αναλυτικά οι μετρήσεις στο Nanodrop για τα δυο τμήματα DNA:

- Τμήμα 1200 bp → 32,3 ng/ μl
 - 390 kDa, ~40 fmol/ μl
- Τμήμα 200 bp → 44,3 ng/ μl
 - 69 kDa, ~ 341 fmol/ μl

[Ο υπολογισμός των moles έγινε με τη βοήθεια του online λογισμικού Bioline (https://www.bioline.com/media/calculator/01_07.html).]

Παρατηρείται ότι το τμήμα των 200 bp έχει περίπου 8,5 φορές περισσότερα moles/ μl απ' ότι το τμήμα των 1200 bp. Άρα στο διάλυμα της αντίδρασης PCR χρειάζεται 8,5 φορές υψηλότερη συγκέντρωση από το τμήμα των 1200 bp και σύμφωνα μ αυτό γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις και διεξάγεται το 2^ο βήμα της PCR. Από το βήμα αυτό αναμένεται (μεταξύ άλλων) μια ζώνη ~1400 bp που θα αντιστοιχεί στην μεταλλαγμένη PCD34/R123H (Εικόνα 3.4.4).



Εικόνα 3.4.4.: Πήγμα αγαρόζης όπου απεικονίζονται τα προϊόντα του δεύτερου βήματος PCR. M: μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, P: προϊόντα της αντίδρασης PCR που αντιστοιχούν στη μεταλλαγμένη PCD34/R123H.

Το προϊόν PCR κόβεται, καθαρίζεται και κλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript-SK(+) ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της αλληλουχίας και κατ' επέκταση η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης R123H.

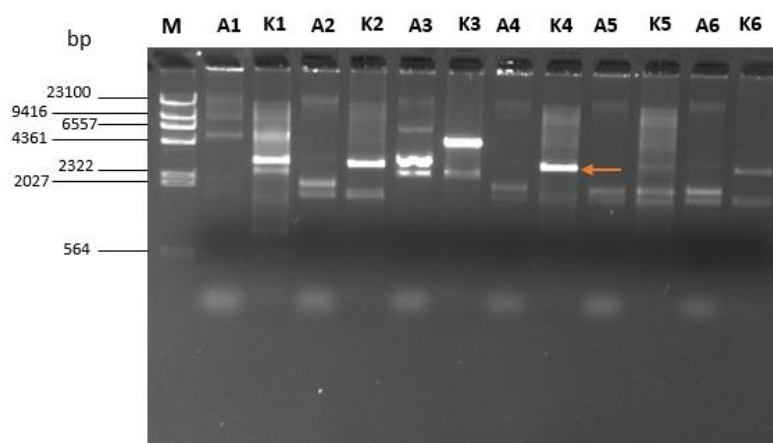
Ο κομμένος με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI φορέας έχει συγκέντρωση ~16 ng/ μl και το καθαρισμένο προϊόν PCR 14 ng/ μl. Η αναλογία όγκων για την κλωνοποίηση είναι 5 μl ένθεσης για κάθε 1 μl φορέα.

Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων DH5a και καλλιέργεια τους σε πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LA παρουσία X-gal και του αντιβιοτικού Amp. Επιλέγονται δέκα αποικίες που αναμένεται να έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueScript::pcd34/R123H, καλλιεργούνται σε 5 ml LB, εξάγεται το πλασμιδιακό τους DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (βλ. Παράγραφο 2.3, Υλικά και Μέθοδοι) και ελέγχεται η παρουσία του pBlueScript::pcd34/R123H. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με μια πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII (βλ. Παράγραφο 2.16) για να ελεγχθεί τόσο η παρουσία της ένθεσης όσο και ο προσανατολισμός αυτής. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της παρουσίας μιας

θέσης περιορισμού στον φορέα και μιας στο 3' άκρο της ένθεσης. Πιο συγκεκριμένα ανάλογα με τον προσανατολισμό ένθεσης (βλ. Παράγραφο 2.16) αναμένουμε:

- **T3 προσανατολισμός:** μια ζώνη ~4400 bp που αντιστοιχεί στο ευθυγραμμισμένο pBlueScript::pcd34/R123H (οι 36 βάσεις που παρεμβάλλονται μεταξύ των δυο θέσεων περιορισμού για την HindIII δεν είναι ορατές στο πηγμα αγαρόζης)
- **T7 προσανατολισμός:** μια ζώνη στα ~1400 bp που αντιστοιχεί στην ένθεση και μια ζώνη στα 3000 bp που αντιστοιχεί στον pBlueScript-SK(+).

Στην Εικόνα 3.4.5 παρατίθενται ενδεικτικά τα αποτελέσματα αυτής της περιοριστικής ανάλυσης στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από έξι αποικίες, από τις δέκα που εξετάστηκαν στο σύνολο.



Εικόνα 3.4.5: Πηγμα αγαρόζης όπου απεικονίζεται το αποτέλεσμα της περιοριστικής ανάλυσης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από 6 αποικίες μετασχηματισμένων DH5a κυττάρων. M: μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/ EcoRI, A1-A6: απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από τις αποικίες 1-6 όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί πέψη με HindIII (Άκοπο), K1-K6: πλασμιδιακό DNA όπου έχει πραγματοποιηθεί πέψη με HindIII (Κομμένο). Το πορτοκαλί θέλος υποδεικνύει το ανασυνδυασμένο pBlueScript::pcd34/R123H που επιλέχθηκε. Αριστερά δίνονται τα μεγέθη κάθε ζώνης του μάρτυρα σε bp.

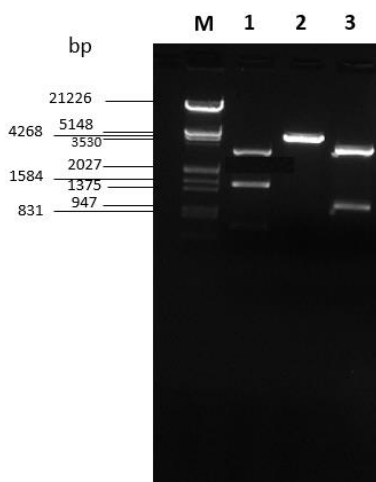
Με βάση τα αποτελέσματα τις πρώτης αυτής περιοριστικής ανάλυσης επιλέχθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από την αποικία 4 για τα επόμενα βήματα.

Πριν την αποστολή προς αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της αλληλουχίας καθώς και η επιτυχής εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης πραγματοποιείται μια εκτενέστερη περιοριστική ανάλυση προκειμένου να υπάρξει περεταίρω επιβεβαίωση ότι το τμήμα που επιλέχθηκε για κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript, ήταν το σωστό επειδή η πιθανότητα σφάλματος αυξάνεται στην PCR δύο βημάτων (ειδικά κατά το δεύτερο βήμα, όπως γίνεται κατανοητό και από την Εικόνα 3.4.4 όπου εκτός του προϊόντος ενδιαφέροντος, υπάρχει και ένας αριθμός μη ειδικών προϊόντων).

Τα ένζυμα που επιλέγονται για την ανάλυση αυτή είναι το ζεύγος **EcoRI-HindIII** που αναγνωρίζουν τις θέσεις περιορισμού που εισήχθησαν στα 5' και 3' άκρα του τμήματος *pcd34* και οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες **BglII** και **BamHI** (χωριστές πέψεις) για την κάθε μια από τις οποίες υπάρχουν θέσεις περιορισμού μέσα στην ένθεση *pcd34*. Σύμφωνα με την Παράγραφο 2.16, τα αναμενόμενα αποτελέσματα για κάθε πέψη είναι τα εξής:

- **EcoRI-HindIII:** ~3000 bp και ~1440 bp
- **BamHI:** ~3400 bp και ~1000 bp
- **BglII:** ~4400 bp

Διευκρινίζεται ότι το ενδεχόμενο να έχει μπει υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού δεν εξετάζεται καθώς αυτό αποσαφηνίστηκε με την προαναφερθείσα πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII.



Εικόνα 3.4.6: Πήγμα αγαρόζης όπου απεικονίζεται το αποτέλεσμα της περιοριστικής ανάλυσης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μετασχηματισμένου κυττάρου DH5a. M: μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA/ EcoRI-HindIII, 1: πέψη με EcoRI/HindIII, 2: πέψη με BglII, 3: πέψη με BamHI. Αριστερά δίνεται το μέγεθος των (ορατών) ζωνών του μάρτυρα σε ζεύγη θάσεων.

Η περιοριστική ανάλυση επιβεβαιώνει ότι η ένθεση είναι η επιθυμητή (Εικόνα 3.4.6). Απομονώνεται εκ νέου πλασμιδιακό DNA από καλλιέργεια του ανωτέρω μετασχηματισμένου κυττάρου και στέλνεται προς αλληλούχιση.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαιώνουν την ορθότητα της αλληλουχίας καθώς και την επιτυχή εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης R123H.

Μετά την επιβεβαίωση ακολουθεί κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου ενζύμου στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pRSFDuet-1 και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pRSFDuet-1::pcd34/R123H μετασχηματίζονται επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a και BL21.

3.4.6 Έλεγχος αποτελέσματος της R123H

Η σημειακή αυτή μετάλλαξη αναμένεται να προσδώσει δραστικότητα 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στην 3,4-διοξυγονάση του PCA.

Αυτό ελέγχεται με διεξαγωγή ενζυμικών δοκιμών (assays) με ακατέργαστο κυτταρικό εκχύλισμα από καλλιέργεια μετασχηματισμένων BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η PCD34/R123H.

Να σημειωθεί ότι κυτταρικό εκχύλισμα τόσο από μη μετασχηματισμένα BL21 όσο και από BL21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί το αγρίου τύπου ένζυμο έχουν ελεγχθεί για παρουσία δραστικότητας 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης και δεν παρατηρήθηκε δραστικότητα σε καμία από τις δυο περιπτώσεις.

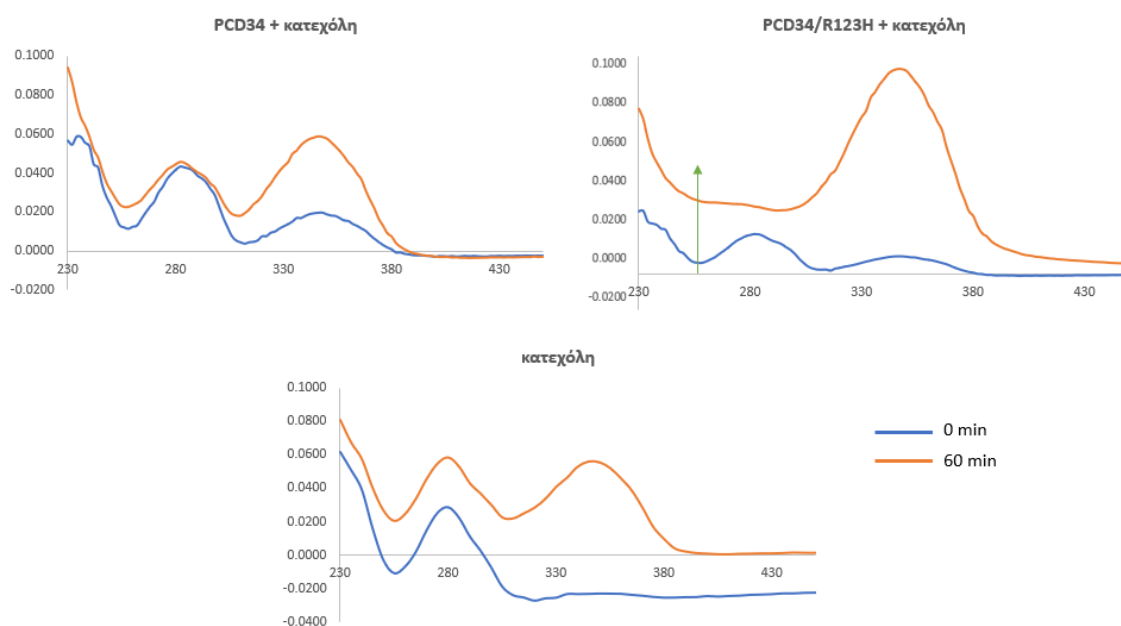
Με την κατεχόλη ως υπόστρωμα το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD34/R123H παρουσίασε δραστικότητα 0.12 U/ml ενώ με υπόστρωμα PCA παρουσίασε δραστικότητα 0,85 U/ml.

Παρατηρείται λοιπόν ότι η σημειακή μετάλλαξη R123H όντως προσδίδει δραστικότητα 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στη 3,4-διοξυγονάση του PCA.

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές εξασθένησης $\epsilon_{260\text{nm}} = 16800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το προϊόν *cis,cis*-μουκονικό (1,2-σχάση του δαχτυλίου της κατεχόλης) και $\epsilon_{290\text{nm}} = 1800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το PCA αντίστοιχα.

Ως 1 U (Unit) ορίζεται ο σχηματισμός/ κατανάλωση 1 μmol προϊόντος *cis,cis*-μουκονικού/ υποστρώματος PCA σε διάστημα ενός λεπτού.

Η δράση της PCD34/R123H σε υπόστρωμα κατεχόλης είναι ορατή και στα παρακάτω φάσματα UV/Vis (Εικόνα 3.4.7).

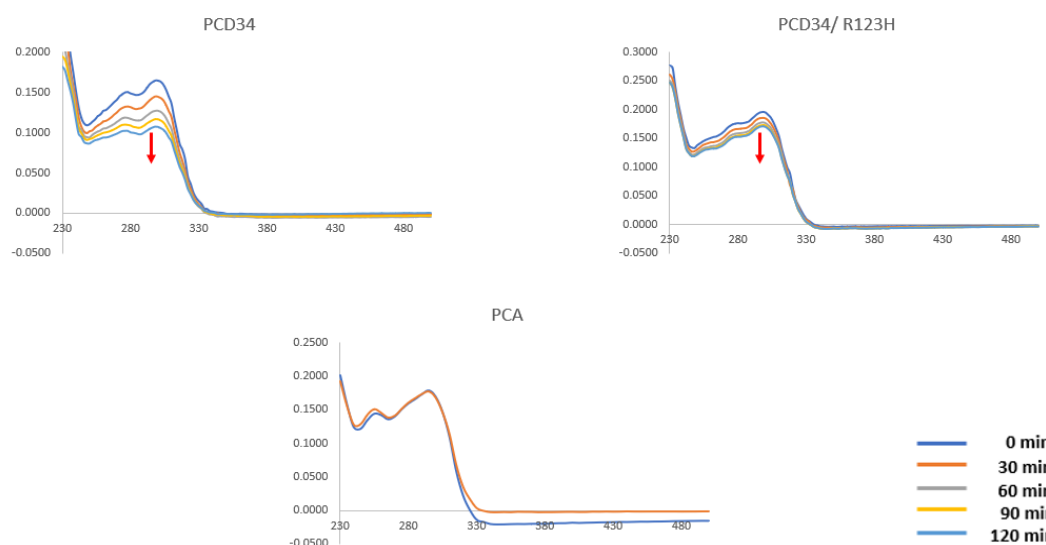


Εικόνα 3.4.7: Φάσματα απορρόφησης της αντίδρασης του αγρίου τύπου ενζύμου (PCD34+κατεχόλη), του μεταλλαγμένου (PCD34/R123H + κατεχόλη) καθώς και της μεταβολής της απορρόφησης που παρουσιάζει το υπόστρωμα της κατεχόλης στο διάλυμα της αντίδρασης Γλυκίνη – NaOH pH 9. Τα φάσματα λήφθηκαν στην αρχή της αντίδρασης ($t = 0 \text{ min}$) και σε χρόνο $t = 60 \text{ min}$. Με το πράσινο βέλος υποδεικνύεται η αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm που οφείλεται στο σχηματισμό του *cis,cis*-μουκονικού οξέος. Το φάσμα απορρόφησης αντιστοιχεί σε μήκη κύματος 230 με 450 nm.

3.4.6 Έλεγχος αναγνώρισης υποστρωμάτων με φασματοσκοπία UV/Vis

Πέραν της κατεχόλης εξετάστηκε η ικανότητα τόσο του μεταλλαγμένου όσο και του αγρίου τύπου ενζύμου να αναγνωρίζουν άλλα υποστρώματα, μέσω της παρακολούθησης του φάσματος της αντίδρασης σε μήκος κύματος από 230-500 nm. Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα αυτά σε χρόνους από 0 έως 120 λεπτά της αντίδρασης τόσο με την **PCD34** όσο και με την **PCD34/ R123H** καθώς και του υποστρώματος απουσία ενζύμου (φάσμα που φέρει τίτλο με το **όνομα του εκάστοτε υποστρώματος** στις εικόνες που ακολουθούν). Όσον αφορά στο φάσμα απορρόφησης του υποστρώματος απουσία ενζύμου υπάρχουν φάσματα για $t = 0\text{h}$ ([μπλε](#)) και $t = 6\text{h}$ ([πορτοκαλί](#)).

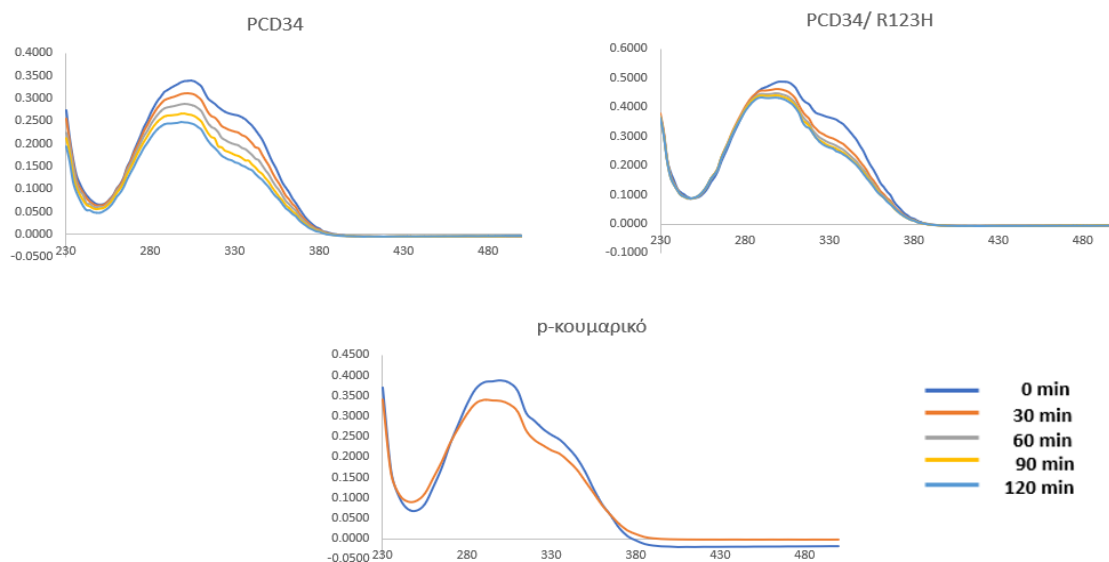
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ (PCA):



Εικόνα 3.4.8: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με PCA.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η μείωση της απορρόφησης στα 290 nm που αντιστοιχεί στην κατανάλωση PCA τόσο από την PCD34 όσο και από την PCD34/ R123H. Δεν παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά στο PCA απουσία ενζύμου.

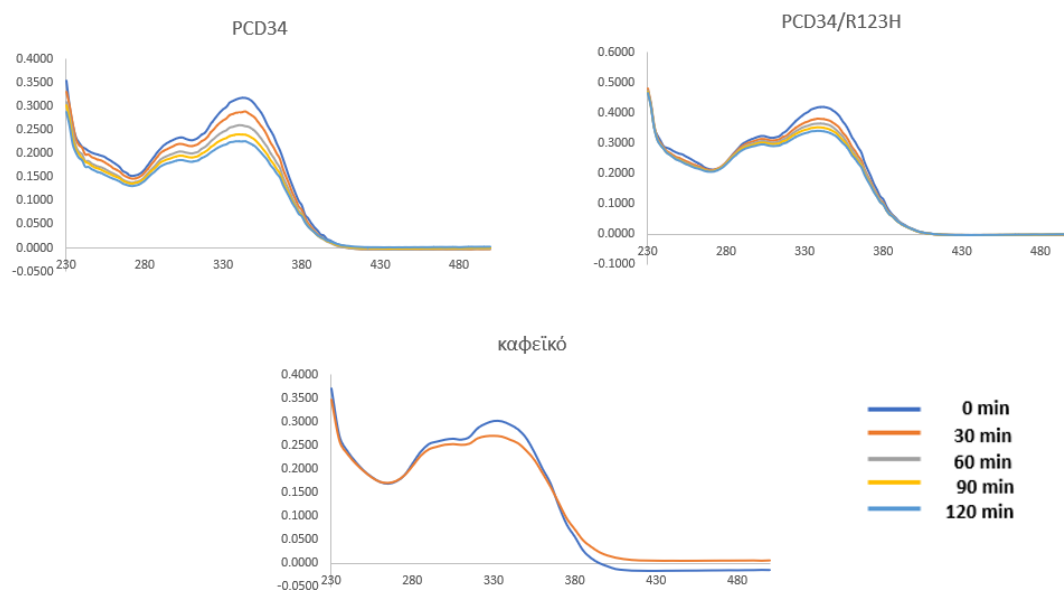
p-κουμαρικό οξύ



Εικόνα 3.4.9: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με p-κουμαρικό οξύ.

Όσον αφορά στο κουμαρικό οξύ φαίνεται να υπάρχει μια μείωση στην περιοχή 290 -350 nm τόσο στην περίπτωση της PCD34 όσο και στην περίπτωση της PCD34/ R123H. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται όμως και στο φάσμα του υποστρώματος.

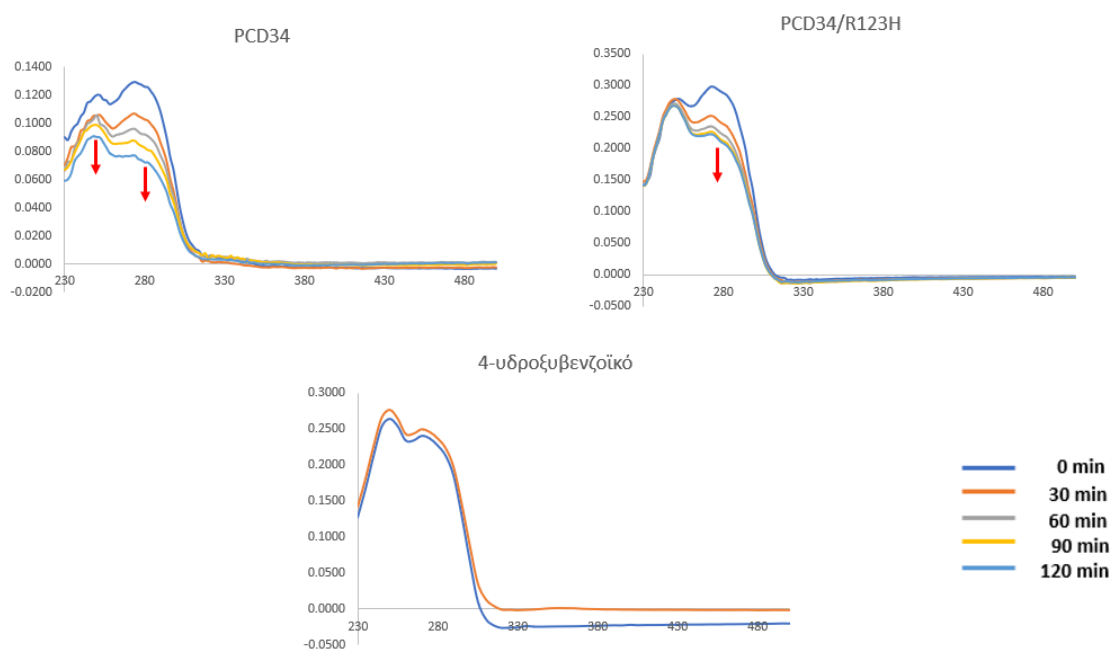
Καφεϊκό οξύ



Εικόνα 3.4.10: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με καφεϊκό οξύ.

Και στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος παρατηρείται ανάλογη μεταβολή στα φάσματα με εκείνη που παρατηρήθηκε με το ρ-κουμαρικό οξύ. Υπάρχει μείωση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου στην περιοχή ~290 – 350 nm είτε παρουσία είτε απουσία ενζύμου.

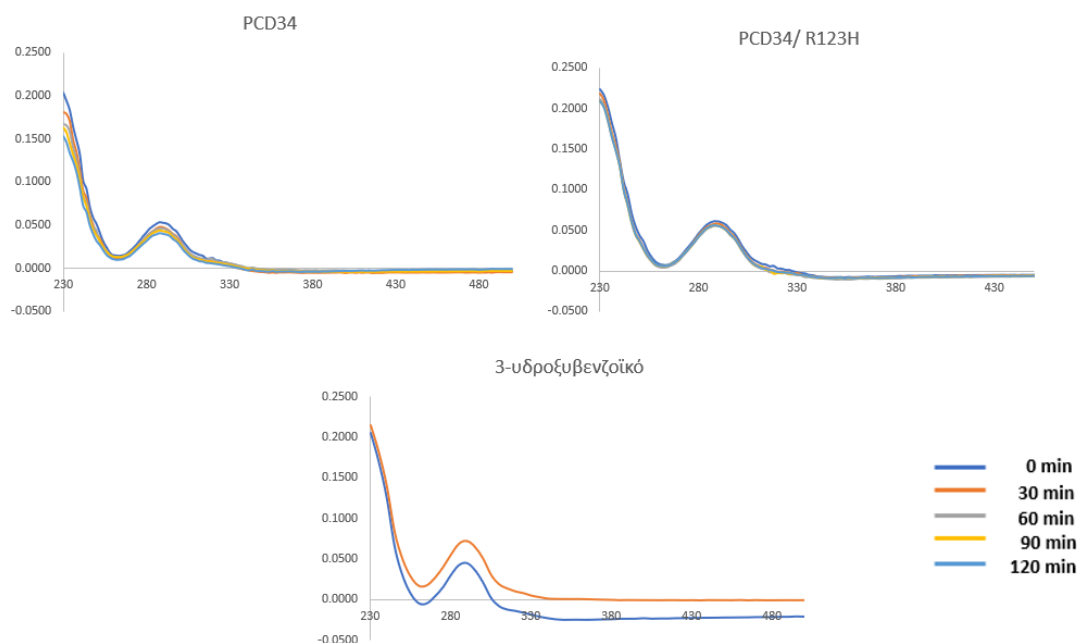
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ



Εικόνα 3.4.11: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Για το 4-υδροξυβενζοϊκό παρατηρείται μείωση της απορρόφησης περίπου στα 260 και στα 290 nm παρουσία είτε του αγρίου τύπου είτε του μεταλλαγμένου ενζύμου, η οποία όμως δεν παρατηρείται απουσία τους.

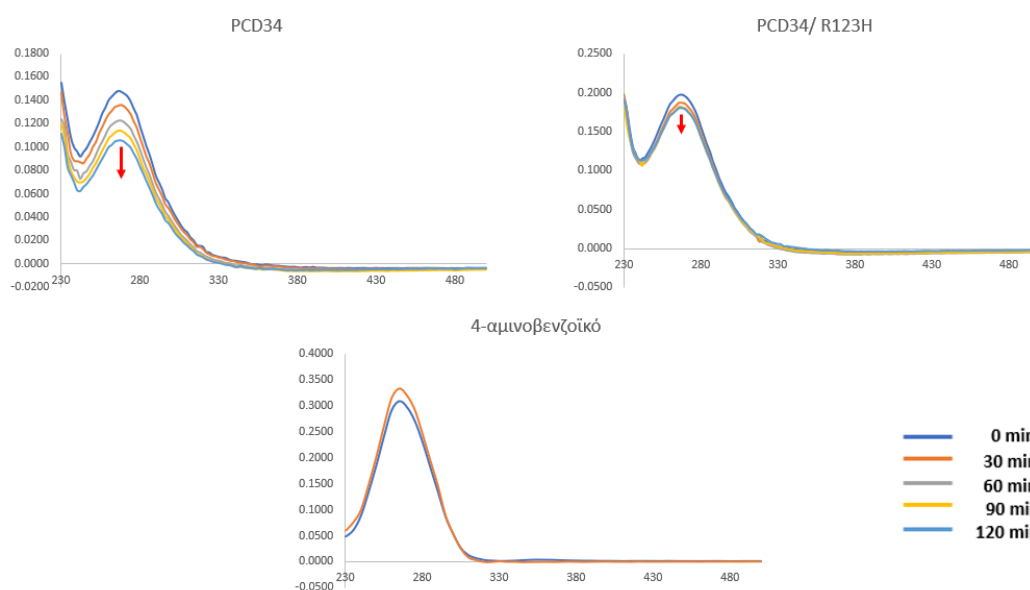
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ



Εικόνα 3.4.12: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Στην περίπτωση του 3-υδροξυβενζοϊκού δεν παρατηρείται καμία ουσιαστική μεταβολή του φάσματος απορρόφησης.

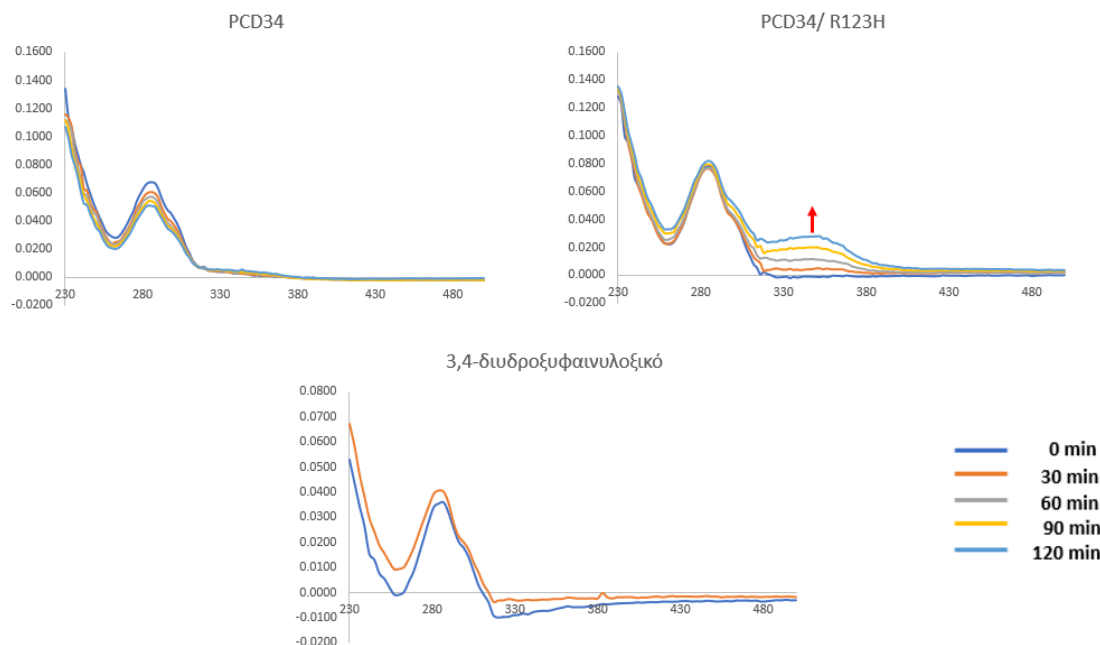
4-αμινοβενζοϊκό οξύ



Εικόνα 3.4.13: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 4-αμινοβενζοϊκό οξύ.

Στην περίπτωση του 4-αμινοβενζοϊκού οξέος παρατηρείται μια έντονη μείωση στην απορρόφηση στα ~260 nm στην αντίδραση με PCD34 που είναι παρούσα αλλά σε μικρότερο βαθμό όταν η αντίδραση έγινε με το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD34/ R123H. Το υπόστρωμα δεν παρουσιάζει καμία ουσιαστική μεταβολή.

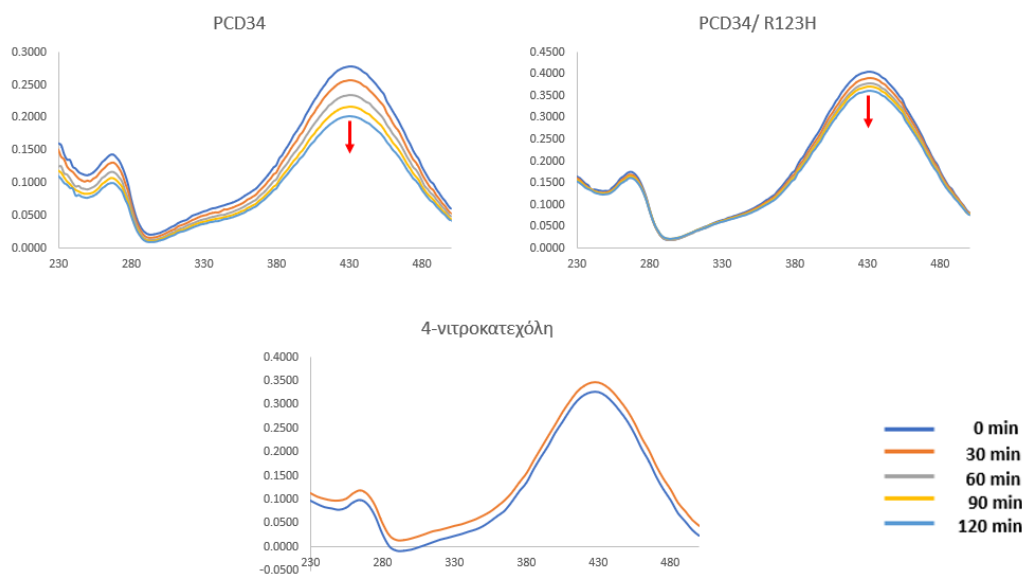
3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ (ομοπρωτοκατεχοϊκό).



Εικόνα 3.4.14: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ.

Το 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς παρατηρείται μια αύξηση της απορρόφησης στα ~340 nm όταν αυτό χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της PCD34/ R123H η οποία όμως δεν υπάρχει ούτε στην περίπτωση του υποστρώματος αλλά ούτε και στην περίπτωση της PCD34

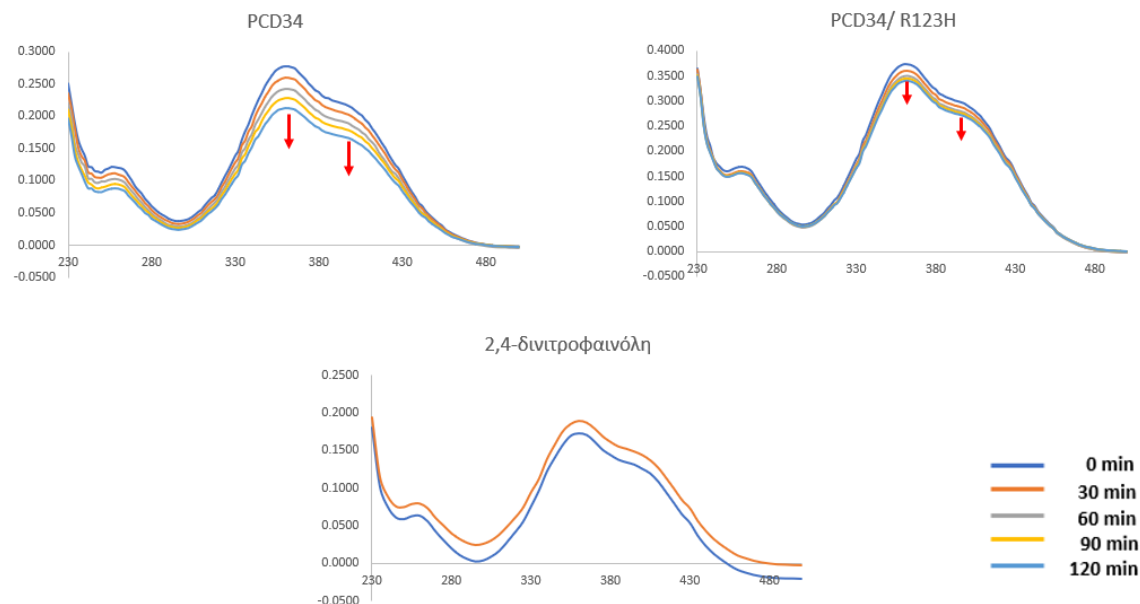
4-νιτροκατεχόλη



Εικόνα 3.4.15: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 4-νιτροκατεχόλη.

Όταν χρησιμοποιείται η 4-νιτροκατεχόλη ως υπόστρωμα τόσο της PCD34 όσο και της PCD34/ R123H είναι εμφανής μια μείωση στην περιοχή των 430 nm. Το υπόστρωμα μόνο του δεν παρουσιάζει αντίστοιχη μεταβολή φάσματος.

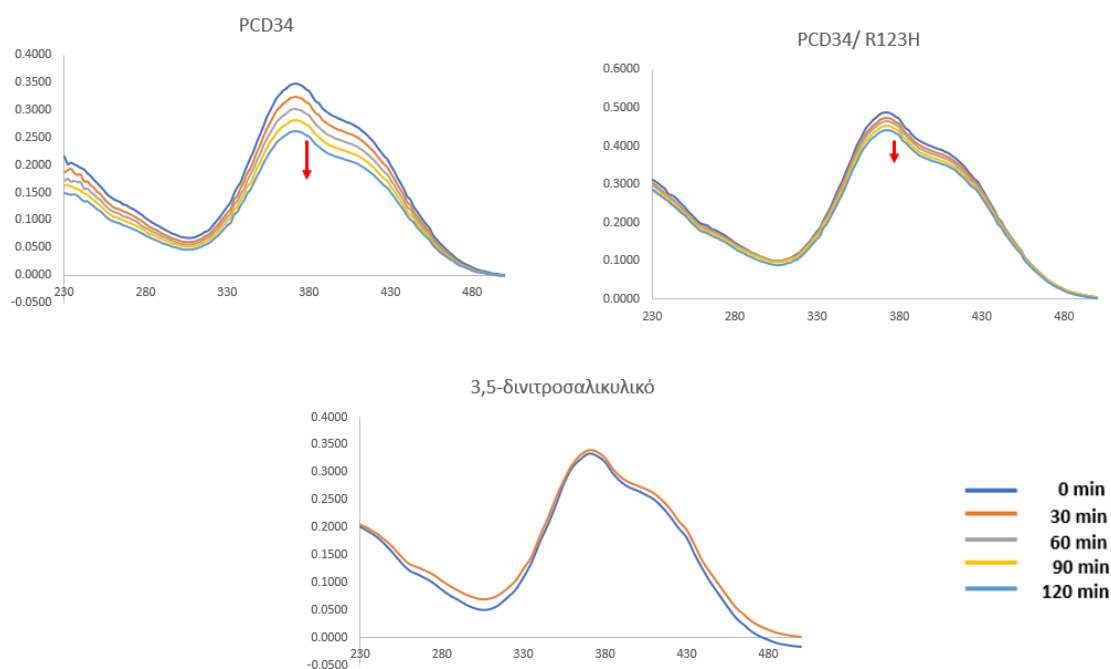
2,3-δινιτροφαινόλη



Εικόνα 3.4.16: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 2,4-δινιτροφαινόλη.

Αντίστοιχα και στην περίπτωση της 2,3-δινιτροφαινόλης υπάρχει μείωση στα ~350 nm και στα ~400 nm τόσο παρουσία PCD34 όσο και παρουσία PCD34/ R123H η οποία όμως δεν παρουσιάζεται στην περίπτωση του υποστρώματος χωρίς ένζυμο.

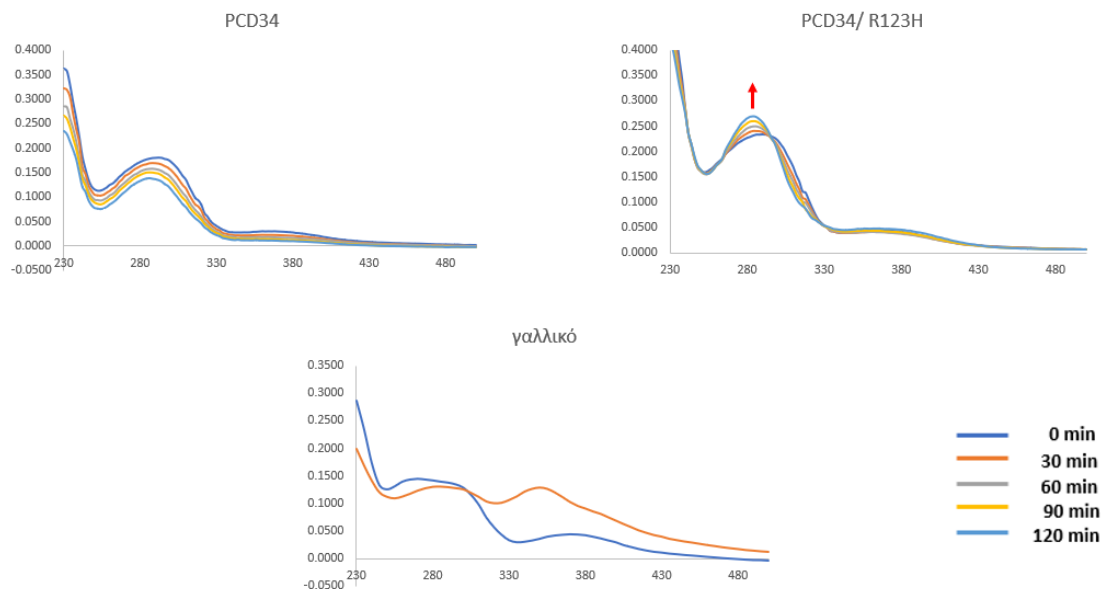
3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ



Εικόνα 3.4.16: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ.

Όταν το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της PCD34 και της PCD34/R123H παρουσιάζεται μείωση της απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου. Το υπόστρωμα δεν παρουσιάζει αντίστοιχη συμπεριφορά.

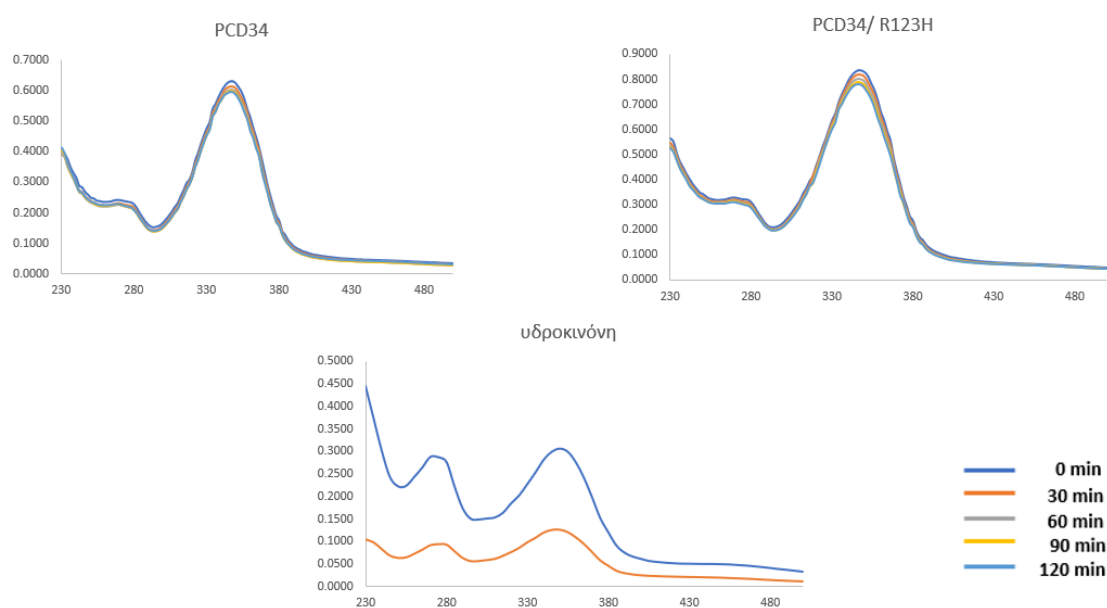
Γαλλικό οξύ



Εικόνα 3.4.17: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με γαλλικό οξύ.

Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στην περίπτωση του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD34/R123H παρατηρείται μια αύξηση της απορρόφησης στα 284 nm. Το μοτίβο αυτό διαφέρει τόσο από την περίπτωση της PCD34 όπου παρατηρείται μείωση στην αντίστοιχη περιοχή όσο και από την περίπτωση του υποστρώματος απουσία ενζύμου, όπου με την πάροδο του χρόνου εμφανίζεται μια κορυφή στα ~350 nm.

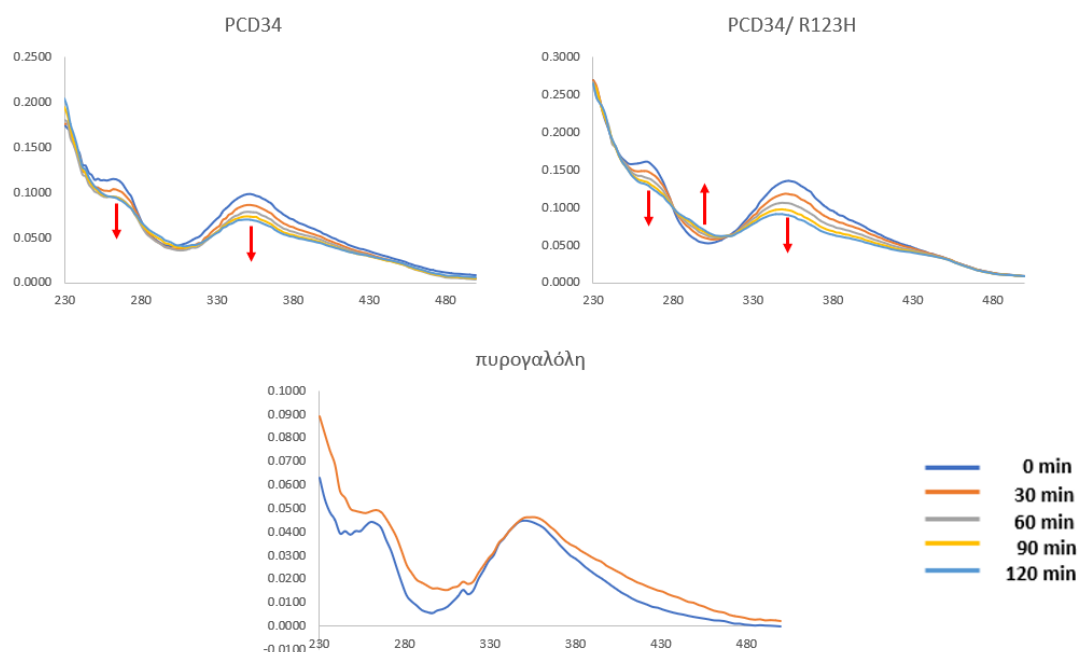
Υδροκινόνη



Εικόνα 3.4.18: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με υδροκινόνη.

Στην περίπτωση της υδροκινόνης δεν παρατηρείται καμία ουσιαστική μεταβολή του φάσματος σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις.

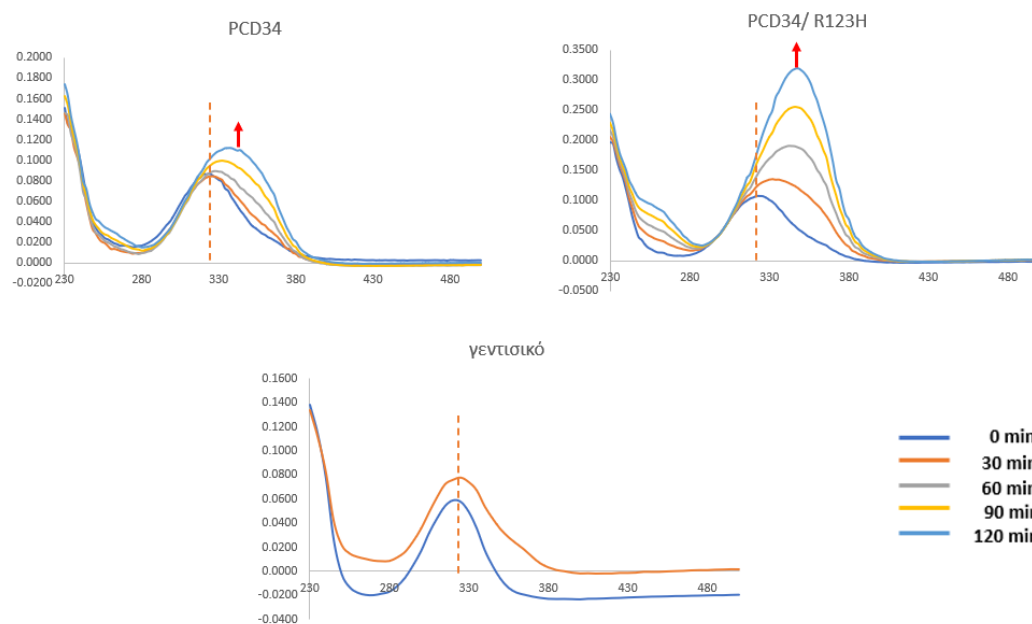
Πυρογαλλόλη



Εικόνα 3.4.19: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με πυρογαλλόλη.

Το φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης της πυρογαλλόλης με την PCD34 και με την PCD34/R123H παρουσιάζει μείωση στα ~270 και ~350 nm. Η μείωση αυτή δεν παρατηρείται στην περίπτωση της πυρογαλλόλης απουσία ενζύμου. Παρατηρείται επίσης αύξηση στα 290 nm μόνο στο φάσμα αλληλεπίδρασης του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD34/R123H με το υπόστρωμα.

Γεντισικό οξύ



Εικόνα 3.4.20: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με γεντισικό οξύ.

Τέλος και η περίπτωση του γεντισικού οξέος παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς στο φάσμα της αντίδρασης βλέπουμε μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 320 στα 350 nm συναρτήσει του χρόνου τόσο στην αντίδραση με PCD34 όσο και με PCD34/R123H, με το φαινόμενο αυτό να είναι πολύ πιο έντονο στην περίπτωση του μεταλλαγμένου ενζύμου. Αντίστοιχη μετατόπιση δεν παρατηρείται στο φάσμα του γεντισικού απουσία ενζύμου.

3.5 Εισαγωγή μεταλλάξεων στην PCD45

3.5.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της PCD45

Το γονίδιο που κωδικεύει για την 4,5-διοξυγονάση του PCA εντοπίζεται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο (pASPHE302). Στο Sphe3 και σε άλλα στελέχη του γένους *Arthrobacter*, οι α- και β-υπομονάδες της PCD45 κωδικεύονται από ένα γονίδιο.

>650468793 protocatechuate 4,5-dioxygenase **alpha and beta subunits**; [*P. phenanthrenivorans* Sphe3 plasmid pASPHE302: CP002381] (+) strand (1302 bp)

ATG ACA CTC GAC AAA CCA TAC AAT GAC GTC CCT GGC ACC ACC ATC TTT GAT GCC
GAC CAG GCC CGA AAG GGC TAC AAC CTA AAC CAG TTC TGC ATG TCG CTG ATG AAA
CCG GAG AAC CGC GAA CGG TAT CTG GCC GAC CGC GGT GCG TAC CTG GAC GAG
TGG CCT CTC AAC CCG GTG CAG CGC CAG GCG GTG CTC GAC ATC GAC CTC AAC ACC
TGC ATC GCC GAG GGC GGG AAC ATC TAC TTC CTG GCC AAG ATC GGC GCC ACT CAC
GGC CTG AGC **TTT** CAG CAG ATG GCC GGC TCG ATG ACG GGC ATG TCT GAG GCC GCG
TAC CGA GAC ATG ATG ATC GGC GGT GGG CGC CGC CCG GAG GGA AAC CGC CTC
AAG GAC CTC GAC GGA TGG ACG CCT CCT GAG CCC GGC GAG AAG GCG GAG ACG
GTG CGG CAG GAT GCT CCG GCG CAG TAC ACC TCG GCA CTA TTC ACC TCG CAC **GTG**
CCG GCG ATC GGC GCA GCG ATG GAC CTC GGT AAG ACC GAG GAG CCG TAC TGG
AAG AAG GTG TTC TCC GGG TAT GAG TGG ACG CGA GAG TGG GCC AAG GAG AAC
CTG CCC GAC GTC GTC ATC CTG GTG TAC AAC GAC CAC GCC ACA GCC TTC GAC TCC
TCG ATC ATC CCG ACC TTC GTA CTC GGC ACC GGC GCG GAG TAC CCG GTC GCG GAC
GAG GGC TAT GGC CCC CGC CCT GTG CCC GAC GTC AAA GGC TAT CCC GAG CTG GCC
GCA CAC ATC GCC CAG TCC GTG ATC CAG GAT GAC TTC GAC CTC ACG CTC GTC AAC
GAG ATG GTC GTG GAT CAC GGC CTC ACG GTG CCG CTG TCG CTT GTG TAT GGC GAT
GTC GAG GAA TGG CCC GTC AGG GTC ATC CCC CTC GCC GTG AAC GTT GTG CAG TAT
CCG GTG CCG TCC GGA CGT CGC TGC TAC GAA CTC GGG CGT GCG CTC CGC CGC GCG
CTG GAC AAG TGG GAC GGT GAG CCG CTC AAC GTT CAA ATT TGG GGA ACC GGC
GGC ATG AGC CAC CAG CTG CAG GGC CCC CGC GCT GGC CTC ATT AAC GAG GAG TGG
GAC AAC GCA TTC CTG GAC CAC CTC ATC GCC GAC CCC GTG GGC CTG ACA GAA TGG
CAG CAC ATG GAG TAC GTC GAC GAG GCC GGT TCC GAG GGC ATC GAG CTA GTC GAC
TGG CTC ATC GCG CGC GGT GCG ATG GAT GAT CAG TTC GGA GGC GAG AGC CCC

GAG GTG AAT CAC CGC TTT TAC CAC GTG CCC GCG TCG AAC ACC GCC GTC GGC CAC
CTT GTT CTC ACG AAC CAG ACC GAC TGA

Με έντονη, υπογραμμισμένη κόκκινη και μπλε γραφή επισημαίνονται τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στην φαινυλαλανίνη-93 και βαλίνη-159, σερίνη-160 που θα υποστούν μετάλλαξη προς αλανίνη (F93A και VPA). Πιο συγκεκριμένα οι αλλαγές που θα πραγματοποιηθούν σε νουκλεοτιδικό επίπεδο είναι TTT → CGC και GTG → GCA, CCG → GCA

3.5.2 Πρωτοταγείς δομές της PCD45 και των μεταλλαγμένων PCD45/F93A – PCD45/VPA

PCD45

MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYNLNQFCMSLMKPENRERYLADRGAYLDEWPLNPVQR
QAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLS**F**QQMAGSMTGMSEAAYRDMMIGGGRRPEGNR
LKDLDGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSH**VPA**IGAAMD LGKTEEPYWKKVFSGYEW
TREWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGAEYPVADEGYGPRPVPDVKGYPELAAHI
AQSVIQDDFDLTLVNEMVVDHGLTVPLSLVYGDVEEWPVRVIPLAVNVVQYPVPSGRRRCYELG
RALRRALDKWDGEPLNVQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINEEWDNAFLDHLIADPVGLTEWQ
HMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGESPEVNHRFYHVPASNTAVGHLVLTNQTD

pI: 4,59

Mw: 49 kDa

Μετάλλαξη F93A

MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYNLNQFCMSLMKPENRERYLADRGAYLDEWPLNPVQR
QAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLS**A**QQMAGSMTGMSEAAYRDMMIGGGRRPEGNR
RLKDLDGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKKVFSGYE
WTREWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGAEYPVADEGYGPRPVPDVKGYPELAA
HIAQSVIQDDFDLTLVNEMVVDHGLTVPLSLVYGDVEEWPVRVIPLAVNVVQYPVPSGRRRCYEL
GRALRRALDKWDGEPLNVQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINEEWDNAFLDHLIADPVGLTEW
QHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGESPEVNHRFYHVPASNTAVGHLVLTNQTD

Μετάλλαξη VPA

MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYNLNQFCMSLMKPENRERYLADRGAYLDEWPLNPVQR
QAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMIGGGRRPEGNR
LKDLDGWTPPEPGKAETVRQDAPAQYTSALFTSH [AA](#)AIGAAMD LGKTEEPYWKVFSGYEW
TREWAKENLPDVVILVYN DHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDVKGYPELAAHI
AQSVIQDDFDLTLVNEMVVDHGLTVPLSLVYGDVEEWPVRVIPLAVNVVQYPVPSGRRRCYELG
RALRRALDKWDGEPLNVQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINEEWDNAFLDHLIADPVGLTEWQ
HMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGESPEVNHRYFHYHPASNTAVGHLVLTNQTD

3.5.3 Πολλαπλή στοίχιση (CLUSTAL-Omega) της PCD45

Ακολουθεί η ομοπαράθεση της αλληλουχίας της PCD45 με άλλες δημοσιευμένες διοξυγονάσες όπου υποδεικνύονται τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα και μοτίβα, καθώς και ο ρόλος αυτών στη λειτουργία των ενζύμων (αμινοξέα ενεργού κέντρου, πρόσδεση υποστρώματος, σιδήρου κλπ).

(A)

S. pausimobilis SYK6
***P. phenanthrenivorans* Sphe3**
A. keyseri 12B
C. testosteroni
P. straminea
R. palustris

```

MTEKKERIDVHAYLAEFDDIPGTRVFTAQRARKGYNLNQFAMSLMKAENRERFKADESAY 60
-----MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYNLNQFCMSLMKPENRERYLADRGAY 50
-----MTLDKPYKDVPGTTIFDADQARKGYNLNQFCMSLMKPENRERYLADRGAY 50
-----MALEKPYLDVPGTTIFDAEQSRKGYWLNQFCMSLMKAENRERFRANERAY 50
-----MALEKPYLDVPGTTIFDAEQSRRGYWLNQFCMSLMKAENRDRFRANERAY 50
-----MPLDKPYKDVPGTTIFDADMSRQGYHLNQFCMSLMKAENRERFKADERAY 50
:  *.*** : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

S. pausimobilis SYK6
P. phenanthrenivorans Sphe3
A. keyseri 12B
C. testosteroni
P. straminea
R. palustris

P

LDEWNLTPAAKAAVLARDYNAMIDEGGNV**Y**FLSKLFSTDGKS**F**QFAAGSMTGMTQEEYAQ 120

LDEWPLNPVQRQAVLDIDLNTCIAEGGNI**Y**FLAKIGATHGLS**F**QQMAGSMTGMSEAAAYRD 110

LDEWPLNPVQRQAVLDIDLNTCIAEGGNI**Y**FLAKIGATHGLS**F**QQMAGSMTGMSEAAAYRD 110

LDEWAMTEEQKQAVLARDLNWCMRTGGNI**Y**FLAKIGATDGKS**F**QQMAGSMTGMTTEEEYRA 110

LDEWAMTEEQKQAVLARDLNWCMRTGGNI**Y**FLAKIGATDGKS**F**QQMAGSMTGMTTEEEYRA 110

LDEWPMTEEQKQAVLDRDLNRCIALGGNI**Y**FLAKIGATDGKS**F**QQMAGSMTGMTTEEEYRN 110

*** : : *** * * : ***:***: :*. * ** *****:: *

#
#

S. pausimobilis SYK6
P. phenanthrenivorans Sphe3
A. keyseri 12B
C. testosteroni
P. straminea
R. palustris

MMIDGGRSPAGVRSIKGGY-----	139
MMIGGRRPEGNR-----	123
MMIGGRRPEGNR-----	123
MMMGGGRSAEGNRIVGEDGDAQAHHPQGSAGNQNQEGN	149
MMMGGGRSAEGNRIVGEDGDAQAHHPQGSAGNQNKEGN	149
MMVGGGRPIEGNRVYGEKK-----	129
:	* *

B)

S. pausimobilis SYK6
P. phenanthrenivorans Sphe3
A. keyseri 12B
R. palustris
C. testosteroni
P. straminea

PFPF **F**

MARVTTGITS**SHIPAL**GAAIQGTSDNDYWGPFVKGYQPIRDWIKQPGNMPDVVILVY**ND** 60
PAQYTSALFT**SHVPA**IGAAMD LGKTEEPYWKVFSGYEWTREWAK--NLPDVVILVY**ND** 57
PAQYTSALFT**SHVPA**IGAAMD LGKTEEPYWKVFSGYEWTREWAKE--NLPDVVILVY**ND** 58
MARITASVYT**SHVPA**IGAAIDMQKTGEDYWKPVFKGYEFSKQWLKD--QKPDVIFLV**FND** 58
MARITASVFT**SHVPA**IGAAMD MGKTQEAYWAPLFKG YDFSRQWMKD--NKPDVVFLVY**ND** 58
MARITASVFT**SHVPA**IGAAMD MGKTQEAYWAPLFKG YDFSRQWMKD--NKPDVIFLVY**ND** 58
*: *: : *: *: *: *: : . : : * : *. **: :.* * : ***: **:*
#

<i>S. pausimobilis</i> SYK6	F		
P. phenanthrenivorans Sphe3		HASAFDMNIIPTFAIGCAETFKPADEGWGPRPVPDVKGHPDLAWHIAQSLILDEFDMTIM	120
<i>A. keyseri</i> 12B		HATAFDSSIIPTFVLGTGAEYPVADEGYGPRPVPDVKGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLV	117
<i>R. palustris</i>		HATAFDSSIIPTFVLGTGAEYPVADEGYGPRPVPDVKGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLV	118
<i>C. testosteroni</i>		HATAFSLDLIPTFAIGTAAEQPADEGWGPRPVPKVVGHPRLAAHIAQSVIQDDFDLTIV	118
<i>P. straminea</i>		HATAFSLDCIPTFAIGTAAEQPADEGWGPRPVPKVVGHDPDLASHIAQSVIQQDFDLTIV	118
		:* . . ***:* . : *****:*****.* *: * ** *****:* :*:*:*: :	
	#		
	P		
<i>S. pausimobilis</i> SYK6		NQMDVDHGLCTVPLSMIFGEP----EEWPCKVIPFPVNVVTPPPSGKRCFALGDSIRAAV	176
P. phenanthrenivorans Sphe3		NEMVVVDHGLTVPLSLVYGDV-----EWPVRVIPLEAVNVVQYPVPSGRRCYELGRALRRAL	172
<i>A. keyseri</i> 12B		NEMVVVDHGLTVPLSLVYGDV----EEWPVRVIPLEAVNVVQYPVPSGRRCYELGRALRRAL	174
<i>R. palustris</i>		NKMDVDHGLTVPLSLMCGEP----QAWPCVIPFAVNVVQYPVPSGRRCYMLGQAIGRAI	174
<i>C. testosteroni</i>		NKMDVDHGLTVPLSLMCGEQDPKTGSWPCVIPFAVNVVQYPVPTGQRCFNLGRAIRKAV	178
<i>P. straminea</i>		NKMDVDHGLTVPLSLMCGEQDPKTGSWPCVIPFAVNVVQYPVPTGQRCFNLGRAIRKAV	178
		: ******: *: ** ***: ***** ** *:*:*: *: *: *: *	
	#		
	P		
<i>S. pausimobilis</i> SYK6		ESFP-EDLNHVWGTGGMSHQLQGPRAGLINKEFDLNFIDKLISDPEELSKMPHIQYLRE	235
P. phenanthrenivorans Sphe3		DKWD-EPLNVQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINEEWDNAFLDHLIADPVGLTEWQHMEYVDE	231
<i>A. keyseri</i> 12B		DKWDGEPLKVQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINEEWDNAFLDHLIADPVGLTEWQHMEYVDE	234
<i>R. palustris</i>		RSYD-EDLNQIWGTGGMSHQLQGPRAGLINREWDNAFLDQIINDPDGLSQKPHIDYVRE	233
<i>C. testosteroni</i>		ESYD-QDINVHIWGTGGMSHQLQGARAGLINKEDNQFLDLLVENPHGLAQMPHIDYVRE	237
<i>P. straminea</i>		ESYD-QDINVHIWGTGGMSHQLQGARAGLINKEDNQFLDLLVENPHGLAQMPHIDYVRE	237
		.: : :*:*:***** *****.*:* *: * : : * *: : **:*: *	
	#		

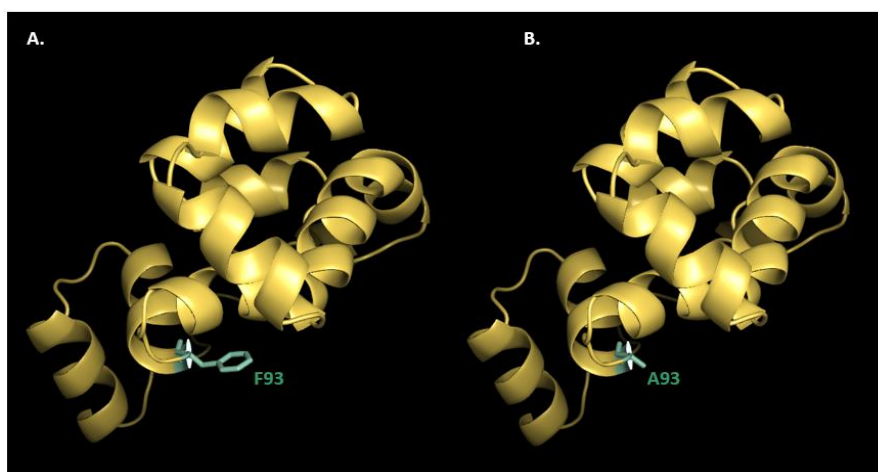
	P	PP	
<i>S. pausimobilis</i> SYK6	SGSEGV EL VMWLIMRGALPEKVR-----DLYTFYHIPA SN TALGAMILQPEETAGTPLE		289
P. phenanthrenivorans Sphe3	AGSEGI EL VDWLIARGAMDDQF-----VNHRFYHVPA SN TAVGHLVLT-----		274
<i>A. keyseri</i> 12B	AGSEGI EL VDWLIARGAMDDQFG-GESPEVNHRFYHVPA SN TAVGHLVLTNPTD-----		287
<i>R. palustris</i>	AGSEGI EL VMWLIARGAMSDVAG-GPKPKVAHRFYHVPA SN TAVGHLILENA-----		284
<i>C. testosteroni</i>	AGSEGI EL VMWLIARGAMSDVDGPAPLPKVAHRFYHVPA SN TAVGHLILENQ-----		289
<i>P. straminea</i>	AGSEGI EL VMWLIARGAMSDVDGPAPLPKVAHRFYHVPA SN TAVGHLILENQ-----		289
	:****:*** *** **: :	: ***:*****:* ::*	
	#	###	

<i>S. pausimobilis</i> SYK6	PRKVMMSGHSLAQA	302
P. phenanthrenivorans Sphe3	-----	274
<i>A. keyseri</i> 12B	-----	287
<i>R. palustris</i>	-----	284
<i>C. testosteroni</i>	-----	289
<i>P. straminea</i>	-----	289

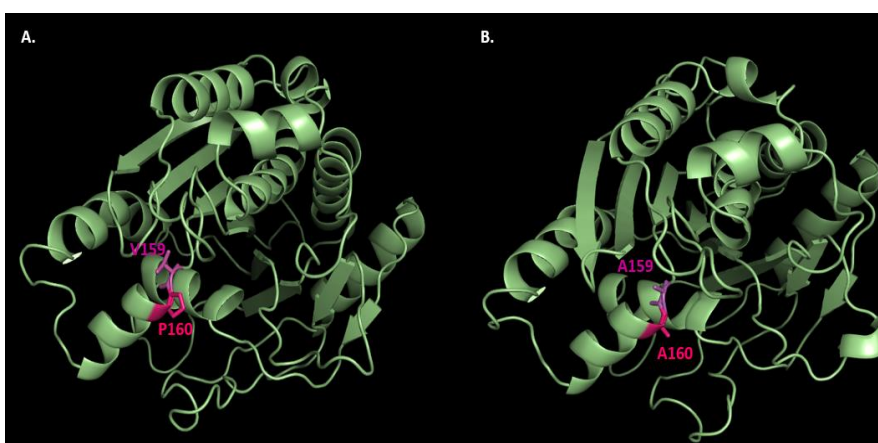
Εικόνα 3.5.1.: Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών της α- (A) και β-υπομονάδας (B) της 4,5-διοξυγονάσης του PCA από το P. Phenanthrenivorans Sphe3 με αντίστοιχες διοξυγονάσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν είτε με το PCA είτε με το ιόν Fe²⁺ απεικονίζονται με γράμματα πάνω από την αλληλουχία: **F** → συντονισμός με το ιόν Fe²⁺, **P** → αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα PCA. Το σύμβολο της δίεσης (#) υποδεικνύει αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Με **κόκκινο** σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται σημειακή μετάλλαξη. Οι αστερίσκοι αντιστοιχούν σε συντηρημένα κατάλοιπα και οι κουκκίδες σε συντηρητικές υποκαταστάσεις (αμινοξέα με παρόμοια δομή ή βιολογική δράση). Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν (Accession Numbers των αλληλουχιών): ADX75303.1 (*P. phenanthrenivorans* Sphe3), AAK16524.1 (*A. Keyseri*), AAK73572.1, AAK73573.1 (α- και β-υπομονάδες, *C. testosteroni*), BAD04057.1, BAD04058.1 (α- και β-υπομονάδες, *P. straminea*), AAA17727.1, AAA17728.1 1 (α- και β-υπομονάδες, *S. paucimobilis*), YP_82931.1 (*Arthrobacter* sp. FB24)

3.5.4 Πρόβλεψη τριτοταγών δομών των μεταλλαγμένων ενζύμων

Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση και προκαταρκτική *in silico* μελέτη επιλέχθηκαν επιμέρους το αμινοξύ φαινυλαλανίνη-93 (F93) της α -υπομονάδας, και τα αμινοξέα βαλίνη-159 και προλίνη-160 (V159, P160) της β -υπομονάδας ώστε να αντικατασταθούν από κατάλοιπα αλανίνης (F93A και V159A/P160A το οποίο στο εξής θα αναφέρεται χάριν συντομίας VPA). Και στις δύο περιπτώσεις πρόκειται για αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα PCA και η αντικατάστασή τους με αλανίνες σχεδιάστηκε στη βάση δημιουργίας μεγαλύτερου χώρου ώστε να διερευνηθεί η ικανότητα των μεταλλαγμένων ενζύμων να προσδένουν μεγαλύτερα μόρια, διευρύνοντας έτσι το περιορισμένο εύρος υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από την PCD45 (Τσαγκογιάννης, 2016). Προέκυψαν λοιπόν τα δύο μεταλλαγμένα ένζυμα PCD45/ F93A και PCD45/ VPA όπου στο πρώτο έχουμε την αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης από αλανίνη (Εικόνα 3.5.1) και στο δεύτερο τη διπλή αντικατάσταση της βαλίνης και της προλίνης από δυο αλανίνες (Εικόνα 3.5.2).



Εικόνα 3.5.1: Απεικόνιση της πρόβλεψης τριτοταγούς δομής της α -υπομονάδας της PCD45 πριν (A) και μετά τη μετάλλαξη F93A. Η απεικόνιση και η επεξεργασία πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0). Με πράσινο απεικονίζεται η Phe-93 που αντικαταστάθηκε με αλανίνη.



Εικόνα 3.5.2: Απεικόνιση της πρόβλεψης τριτοταγούς δομής της β -υπομονάδας της PCD45 πριν (A) και μετά τη μετάλλαξη VPA. Η απεικόνιση και η επεξεργασία πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0). Με μωβ και φούξια απεικονίζονται τα αμινοξέα Val-159 και Ser-160 που αντικαταστάθηκαν με αλανίνη.

3.5.5 PCR δύο σταδίων για εισαγωγή των μεταλλάξεων

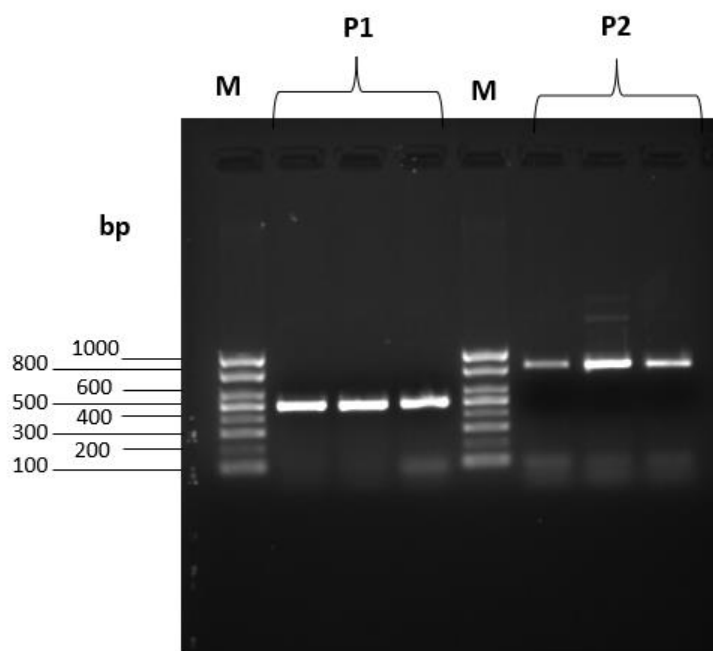
Κατ' αντιστοιχία της διαδικασίας όπως αυτή περιγράφεται για την μεταλλαξιγένεση της PCD34 και με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων για την εισαγωγή της εκάστοτε μετάλλαξης πριμοδοτικών μορίων, πραγματοποιήθηκαν οι προαναφερθείσες σημειακές μεταλλάξεις της PCD45.

Ακολουθούν πιο συγκεκριμένα τα στάδια για τις μεταλλάξεις F93A και VPA. Και στις δυο περιπτώσεις ως εκμαγείο του πρώτου βήματος PCR, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη αραίωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET-29::pcd45 ο οποίος φέρει την αλληλουχία του γονιδίου της PCD45 και κατασκευάστηκε στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής Διατριβής του Υπ. Διδάκτορα.

Χρήζει σημείωσης ότι το αναμενόμενο τελικό προϊόν PCR έχει μέγεθος περί τα 1300 pb και φέρει στα άκρα του θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα NdeI (CA/TATG) και XhoI (C/TCGAG) (Τσαγκογιάννης, 2016).

3.5.5.1 Μετάλλαξη VPA

Για την εισαγωγή της μετάλλαξης VPA κατά το πρώτο βήμα της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων For pET29c::pcd45/ Rev ValProAla new και For ValProAla new/ Rev pET29c::pcd45 και όπως αναλυτικά περιγράφεται στην Παράγραφο 2.14.2 (Υλικά & Μέθοδοι), προκύπτουν δύο προϊόντα των 500 bp (5' άκρο της μετάλλαξης) και 800 bp (3' άκρο της μετάλλαξης) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο στο δεύτερο βήμα της PCR (Εικόνα 3.5.3).



Εικόνα 3.5.3: Πήγμα αгарόζης όπου απεικονίζονται τα προϊόντα του πρώτου βήματος PCR. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών 100bp DNA Ladder marker (Minotech), **P1:** προϊόντα PCR για το τμήμα 500 bp στο 5' άκρο της μετάλλαξης, **P2:** προϊόντα PCR για το τμήμα 800bp στο 3' άκρο της μετάλλαξης. Τα προϊόντα αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες T_a για κάθε τμήμα (55°, 57° και 60°C) από αριστερά προς τα δεξιά. Δίνονται τα μοριακά βάρη για τον μάρτυρα μοριακών βαρών σε ζεύγη θέσεων (bp).

Πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των πριμοδοτικών μορίων (T_a) 55°, 57° και 60°C. Για το τμήμα των 500 bp δεν παρατηρείται καμία διαφορά ενώ όσον αφορά στο τμήμα των 800 bp η βέλτιστη θερμοκρασία T_a φαίνεται να

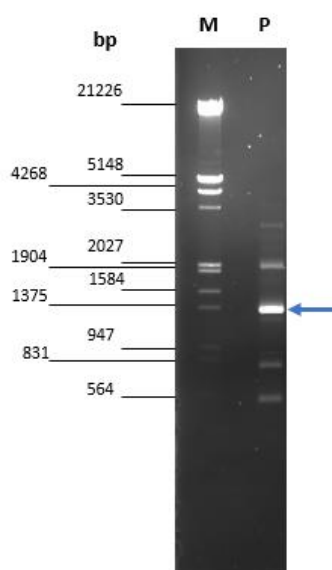
είναι οι 60°C. Μπαίνουν εκ νέου αντιδράσεις σ' αυτή τη θερμοκρασία, τα προϊόντα καθαρίζονται και η μετρείται η συγκέντρωση τους ώστε να υπολογιστούν οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν από το καθένα ως εκμαγείο στο δεύτερο βήμα της PCR, ώστε οι αναλογίες τους να είναι ισομοριακή.

Οι μετρήσεις στο Nanodrop έχουν ως εξής:

- Τμήμα 500 bp → 26,4ng/μl
 - 15 kDa → 81,36 fmol/ μl
- Τμήμα 800 bp → 10 ng/μl
 - 25,8 kDa → 19,26 fmol/ μl

Παρατηρείται ότι το τμήμα των 500 bp έχει περίπου 4 φορές περισσότερα fmols/ μl από το τμήμα των 800 bp. Πραγματοποιείται μια αραιώση 1:4 του τμήματος των 500 bp, και μια αναλογία όγκων 1:1 του τμήματος των 800 bp και της αραιώσης του τμήματος των 500 bp χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για το επόμενο βήμα της PCR. Το ζεύγος πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το For_pET29c::pcd45/ Rev_pET29c::pcd45.

Η ζώνη που αντιστοιχεί στο τελικό προϊόν της αντίδρασης (Εικόνα 3.5.4.) κόβεται και καθαρίζεται ώστε να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript και να αποσταλεί προς αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής εισαγωγή της μετάλλαξης.



Εικόνα 3.5.4.: Πήγμα αгарόζης όπου απεικονίζεται το προϊόν του δεύτερου βήματος της PCR. M: μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, P: προϊόν της αντίδρασης PCR που αντιστοιχούν στη μεταλλαγμένη PCD45/VPA. Με το μπλε βέλος υποδεικνύεται η ζώνη ίσου μεγέθους με το αναμενόμενο προϊόν (~1300 bp).

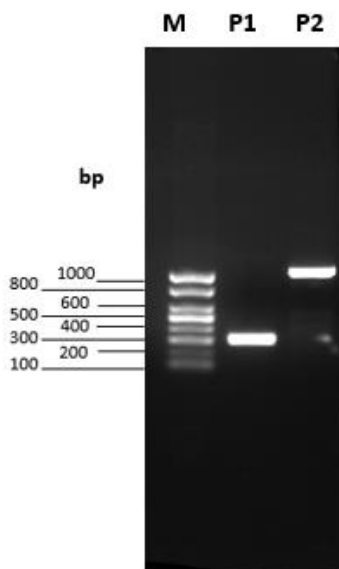
Τόσο η συγκέντρωση του κομμένου (με SmaI) pBlueScript όσο και εκείνη του καθαρισμένου προϊόντος PCR μετρούνται ώστε να ακολουθήσει η αντίδραση κλωνοποίησης:

- Προϊόν PCR = 11,4 ng/ μl
- pBlueScript = 20,3 ng/ μl

Με βάση αυτές τις συγκεντρώσεις, πραγματοποιείται η κλωνοποίηση του προϊόντος στον ευθυγραμμισμένο φορέα χρησιμοποιώντας αναλογία 1:5 (ένθεση : φορέας) και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζονται κύτταρα DH5a τα οποία καλλιεργούνται σε LA παρουσία Xgal και Amp.

3.5.5.2 Μετάλλαξη F93A

Στο πρώτο εκ των δυο βημάτων PCR για την εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης F93A στην PCD45 χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων For pET29c::pcd45/ Rev PheAla new και For PheAla new/ Rev pET29c::pcd45. Προκύπτουν δύο ενισχυμένα τμήματα των 300bp και 1000bp αντίστοιχα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5.5.



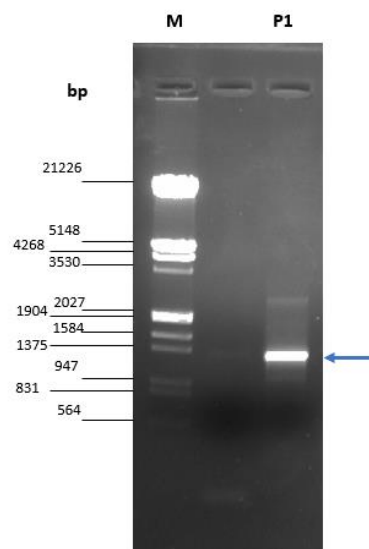
Εικόνα 3.5.5: Πήγμα αγαρόζης όπου απεικονίζονται τα προϊόντα του πρώτου βήματος PCR. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών 100bp DNA Ladder marker (Minotech), **P1:** προϊόν PCR για το τμήμα 300bp στο 5' άκρο της μετάλλαξης, **P2:** προϊόν PCR για το τμήμα 1000bp στο 3' άκρο της μετάλλαξης. Δίνονται τα μοριακά θάρη για τον μάρτυρα μοριακών βαρών σε ζεύγη θάσεων (bp).

Οι γραμμομοριακές συγκεντρώσεις του εκάστοτε τμήματος υπολογίζονται ως εξής:

- Τμήμα 300 bp → 19,1 ng/μl
 - 88,7 kDa → 98,1 fmol/ μl
- Τμήμα 1000 bp → 17,4 ng/μl
 - 320 kDa → 26,1 fmol/ μl

Το τμήμα των 300bp έχει περίπου 3,6 φορές περισσότερα fmol/ μl απ' το τμήμα των 1000 bp και σύμφωνα μ αυτό για κάθε μl από το τμήμα των 300bp θέλω 3,6 μl από το τμήμα των 1000bp ως εκμαγείο για το επόμενο βήμα PCR (ώστε να έχουν στην αντίδραση ισομοριακή αναλογία). Το ζεύγος πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το For pET29c::pcd45/ Rev pET29c::pcd45.

Το προϊόν που προκύπτει από αυτό το βήμα κόβεται και καθαρίζεται από την πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 3.5.6) ώστε μετά από κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript να επιβεβαιωθεί η επιτυχής εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης F93A.



Εικόνα 3.5.6: Πήγμα αгарόζης όπου απεικονίζεται το προϊόν του δεύτερου βήματος της PCR. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, **P:** προϊόν της αντίδρασης PCR που αντιστοιχεί στη μεταλλαγμένη PCD45/F93A. Με το μπλε βέλος υποδεικνύεται η ζώνη ίσου μεγέθους με το αναμενόμενο προϊόν (~1300 bp).

Μετρείται η συγκέντρωση του κομμένου πλασμιδιακού φορέα pBlueScript (9,6 ng/μl) και του υπό κλωνοποίηση προϊόντος (1,6 ng/ μl) και πραγματοποιείται αντίδραση κλωνοποίησης με αναλογία συγκέντρωσης 1:5 (ένθεση : φορέας).

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κυττάρων DH5a που έχουν προηγουμένως καταστεί επιδεκτικά με κατάλληλη επεξεργασία.

3.5.5.3 Περιοριστική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

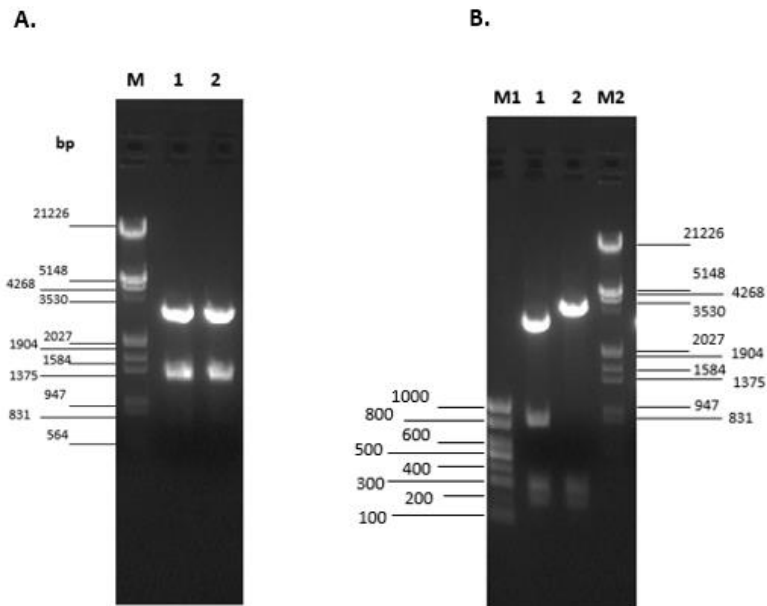
Της επιβεβαίωσης της επιτυχούς μεταλλαξιγένεσης μέσω αλληλούχισης προηγείται περιοριστική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pBlueScript::pcd45/VPA και pBlueScript::pcd45/F93A. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται τυχαία επιλογή αποικιών μετασχηματισμένων DH5a, εξάγεται το πλασμιδιακό τους DNA και σε αυτό πραγματοποιούνται πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα **AvaI** (5'-C/YCGRG-3') και **NdeI/XhoI** (για τα οποία έχουν σχεδιαστεί θέσεις περιορισμού στα άκρα του γονιδίου ώστε να είναι εφικτή η κλωνοποίηση του στον φορέα υπερέκφρασης pET-29c όπως έχει περιγραφεί ανωτέρω) (Εικόνα 3.5.7).

Η πέψη με **AvaI** συντελεί και στον προσδιορισμό του προσανατολισμού της ένθεσης. Πιο συγκεκριμένα οι αναμενόμενες ζώνες ανάλογα με το υπό τον έλεγχο ποιου προαγωγού κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια (βλ. Παράγραφο 2.16, Υλικά & Μέθοδοι):

- T7 προαγωγός: ~2800bp, ~800bp, ~300bp, ~200bp, 75bp
- T3 προαγωγός: ~3600bp, 300bp, ~200bp, 80bp

* οι ζώνες που αντιστοιχούν στα 75 και 80bp μπορεί να μην είναι ορατές στο πήγμα αγαρόζης.

Η πέψη με το ζεύγος περιοριστικών ενζύμων **NdeI/XhoI** αναμένεται να δώσει δύο ζώνες των ~3000bp και ~1300bp.



Εικόνα 3.5.7: Πήγματα αγαρόζης που απεικονίζονται τα προϊόντα της περιοριστικής ανάλυσης. (Α) Προϊόντα πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI – XhoI. **M:** μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, **1:** πέψη του ανασυνδυασμένου pBlueScript::pcd45/F93A, **2:** πέψη του ανασυνδυασμένου pBlueScript::pcd45/VPA. **(Β)** Προϊόντα πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με το περιοριστικό ένζυμο AvaI. **M1:** μάρτυρας μοριακών βαρών 100bp DNA Ladder marker (Minotech), **M2:** μάρτυρας μοριακών βαρών λNDA/ EcoRI-HindIII, **1:** πέψη του ανασυνδυασμένου pBlueScript::pcd45/F93A, **2:** πέψη του ανασυνδυασμένου pBlueScript::pcd45/VPA.

Από την Εικόνα 3.14.4 Α συμπεραίνεται ότι η ένθεση έχει το αναμενόμενο μέγεθος τόσο στην περίπτωση του pBlueScript::pcd45/F93A όσο και στην περίπτωση του pBlueScript::pcd45/VPA.

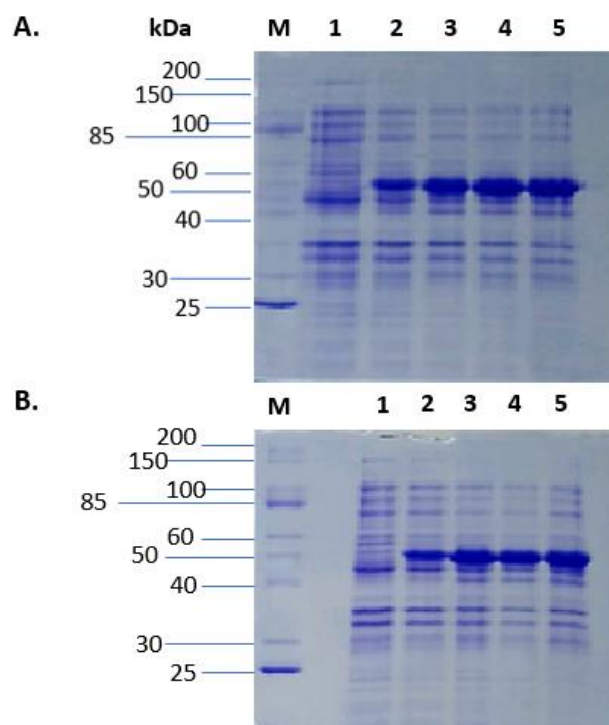
Το πρότυπο ζωνών που δίνει η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο AvaI επιβεβαιώνει περαιτέρω ότι κλωνοποιήθηκαν τα επιθυμητά μεταλλαγμένα γονίδια. Η πέψη με AvaI υποδεικνύει επίσης ότι στην περίπτωση του pcd45/F93A αυτό κλωνοποιήθηκε υπό τον έλεγχο του T7 προαγωγού στον pBlueScript καθώς διακρίνονται οι ζώνες των ~2800bp, ~800bp, ~300bp και ~200bp που αναμένονταν για την περίπτωση αυτή. Όσον αφορά στο μεταλλαγμένο γονίδιο pcd45/VPA αυτό φαίνεται να κλωνοποιήθηκε υπό τον έλεγχο του T3 προαγωγού βάσει την ζώνωσης που παρατηρείται στην παραπάνω εικόνα: ~3600bp, 300bp και ~200bp (Εικόνα3.14.4 Β).

Πραγματοποιείται εκ νέου απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από καλλιέργεια μετασχηματισμένων με αυτά DH5a κυττάρων και αποστέλλονται προς αλληλούχιση.

3.5.5.4 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των PCD45/VPA και PCD45/F93A σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3)

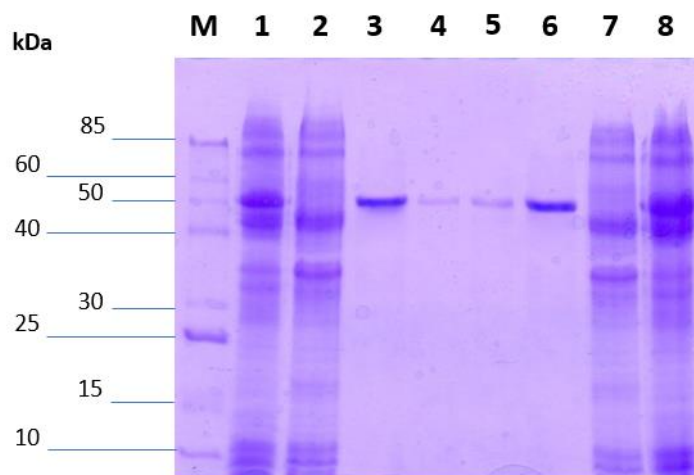
Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς μεταλλαξιγένεσης τα μεταλλαγμένα γονίδια κλωνοποιούνται σε φορείς υπερέκφρασης pET-29c και με τους ανασυνδυασμένους φορείς (pET-29c::pcd45/F93A και pET-29c::pcd45/VPA) πραγματοποιείται μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων BL21 και DH5a.

Σε καλλιέργειες μετασχηματισμένων κυττάρων BL21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια επάγεται η ετερόλογη έκφραση των μεταλλαγμένων ενζύμων με την προσθήκη IPTG και την κατάλληλη επώαση (Εικόνα 3.5.8).



Εικόνα 3.5.8: Πήγματα SDS ηλεκτροφόρησης από ετερόλογη έκφραση των μεταλλαγμένων ενζύμων *PCD45/F93A* (A) και *PCD45/VPA* (B). M: μάρτυρας μοριακών βαρών (kDa) FastGene Unstained Protein Marker της NIPPON Genetics, 1: πριν την προσθήκη IPTG, 2: 1 h, 3: 2 h, 4: 3 h, 5: 4 h μετά την προσθήκη IPTG.

Ακολουθεί ετερόλογη έκφραση σε μεγάλη κλίμακα (1 L καλλιέργειας) και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων μεταλλαγμένων ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη Ni^{2+} -NTA αгарόζης (Εικόνα 3.5.9).

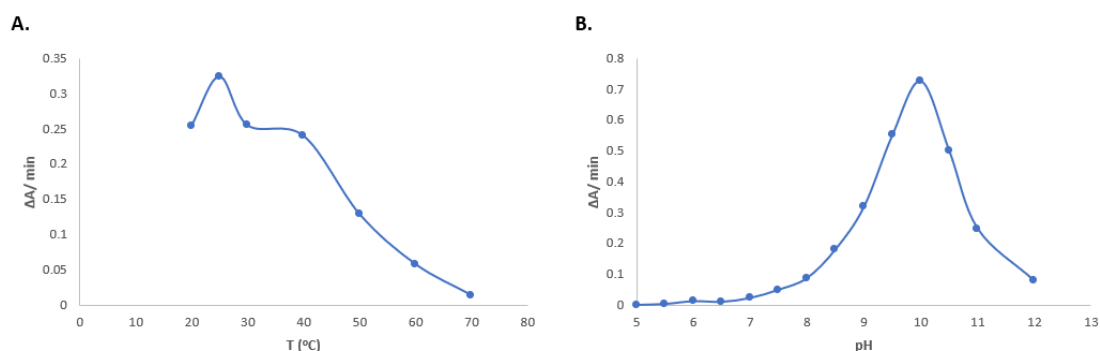


Εικόνα 3.5.9: Πήγματα SDS ηλεκτροφόρησης από ετερόλογη έκφραση και καθαρισμό των μεταλλαγμένων ενζύμων *PCD45/F93A* και *PCD45/VPA*. M: μάρτυρας μοριακών βαρών (kDa) FastGene Unstained Protein Marker της NIPPON Genetics, 1 και 8: κυτταρικό εκχύλισμα BL21 από υπερέκφραση *PCD45/F93A* και *PCD45/VPA* αντίστοιχα, 2 και 7: αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα μετά την εφαρμογή στη στήλη, 3 και 6: κλάσματα B6 (ιμιδαζόλιο 100 mM) με τα καθαρισμένα *PCD45/F93A* και *PCD45/VPA*, 4 και 5: κλάσματα C1 (ιμιδαζόλιο 120 mM) με τα καθαρισμένα *PCD45/F93A* και *PCD45/VPA*.

3.5.5.5 Χαρακτηρισμός της PCD45/VPA

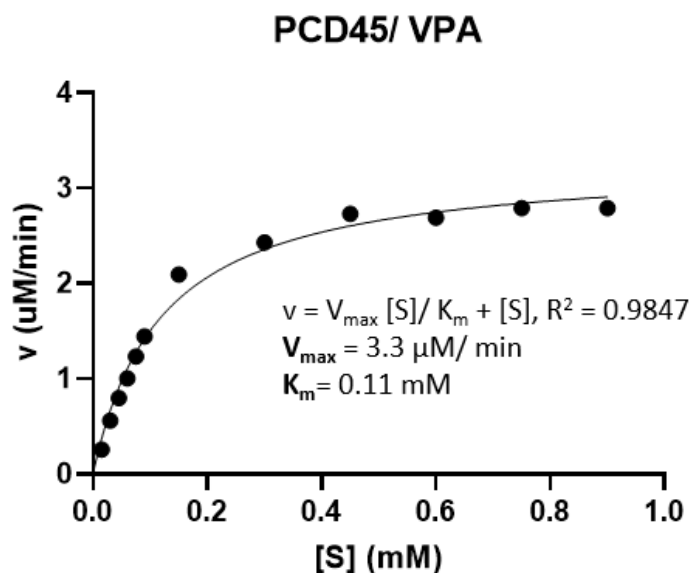
Ακολούθησαν δοκιμές δραστηριότητας σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίας, ώστε να αποσαφηνιστούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της αλλά και οι διαφορές σε σύγκριση με την αγρίου τύπου PCD45. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν μετά από επώαση του ενζύμου με 0.2 mM FeSO₄ που έχει αποδειχθεί ότι επάγει τη δραστηριότητα (Τσαγκογιάννης, 2016).

Με τις ανωτέρω δοκιμές προσδιορίστηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης την μεταλλαγμένης PCD45/ VPA είναι οι 25°C ενώ δρα καλύτερα σε pH = 10 (Γράφημα 3.5.1)



Γράφημα 3.5.1: Δραστηριότητα της PCD45/VPA σε (Α) διάφορες θερμοκρασίες: Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της PCD34 προσδιορίστηκε στους 25°C. (Β) διάφορες τιμές pH: Η καλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε τιμή pH = 10.

Στις ανωτέρω συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της δραστηριότητας σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος PCA (0,015 – 1 mM) ώστε να προσδιοριστεί το μοντέλο κινητικής που ακολουθεί η αντίδραση που καταλύει το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD45/VPA (Γράφημα 3.5.2).



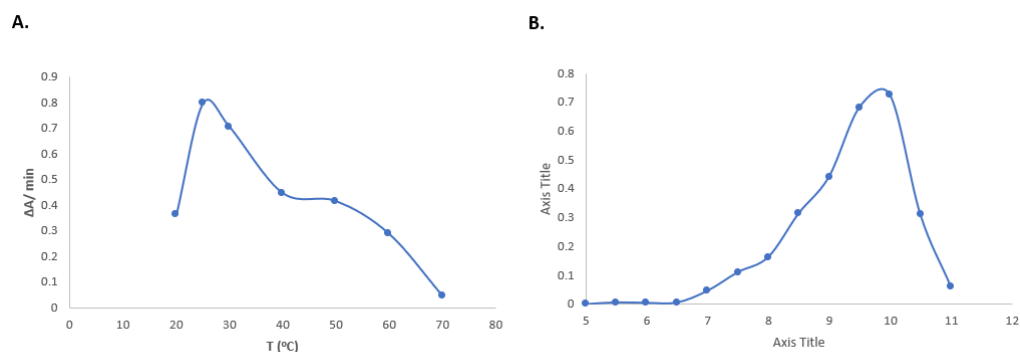
Γράφημα 3.5.2: Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της PCD45/VPA. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten που περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{max} * [S] / (K_m + [S])$.

Φαίνεται ότι η αντίδραση που καταλύεται από το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD45/VPA ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$, με $V_{\max}$ 3,3 $\mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0,11 \text{ mM}$.

Με βάση την τιμή $V_{\max}$ υπολογίζεται ότι η μέγιστη ειδική ενζυμική δραστηριότητα της PCD45/VPA είναι 0,82 U/ μg . Ως Unit ορίζεται ως η μετατροπή 1 nmol PCA σε διάστημα 1 min.

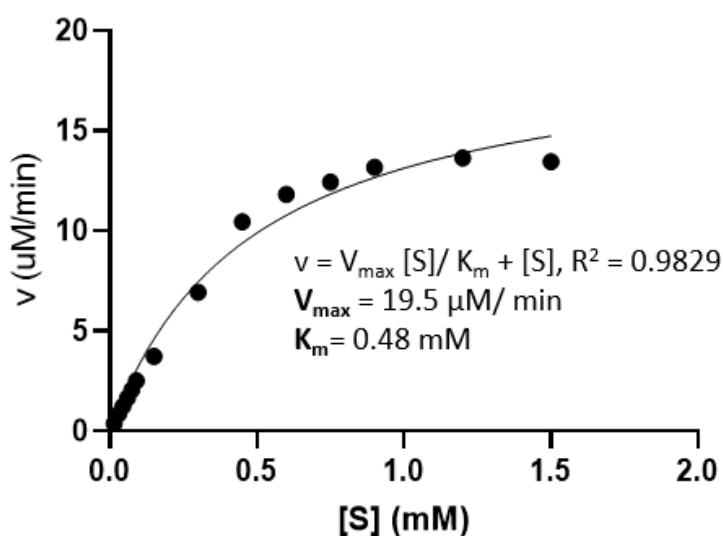
3.5.5.6 Χαρακτηρισμός της PCD45/F93A

Αντίστοιχα με ότι περιγράφεται στην προηγούμενη Παράγραφο (Παράγραφος 3.5.5.5) προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD45/F93A σε 25°C και pH = 9,5-10 (Γράφημα 3.5.3).



Γράφημα 3.5.3: Δραστηριότητα της PCD45/F93A σε (Α) διάφορες θερμοκρασίες: Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της PCD34 προσδιορίστηκε στους 25°C. **(Β) διάφορες τιμές pH:** Η καλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε τιμή pH = 9,5 - 10.

Στις συνθήκες αυτές πραγματοποιήθηκε η μελέτη της κινητικής του μεταλλαγμένου ενζύμου σε αντίστοιχο εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος PCA (0,015 – 1,5 mM) (Γράφημα 3.5.4).



Γράφημα 3.5.4: Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής της PCD45/F93A. Η αντίδραση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten που περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$.

Η αντίδραση που καταλύεται από την PCD45/F93A φαίνεται να ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$, με $V_{\max} = 19,5 \mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0,48 \text{ mM}$.

Η μέγιστη ειδική ενζυμική δραστηριότητα με βάση την τιμή $V_{\max}$ υπολογίζεται στα 4,9 U/μg. Ως Unit ορίζεται ως η μετατροπή 1 μmol PCA σε διάστημα 1 min.

Στον παρακάτω Πίνακα συνοψίζονται τα κινητικά δεδομένα τόσο για το αγρίου τύπου ένζυμο PCD45 όσο και για τις μεταλλάξεις PCD45/F93A και PCD45/VPA (Πίνακας 3.5.1).

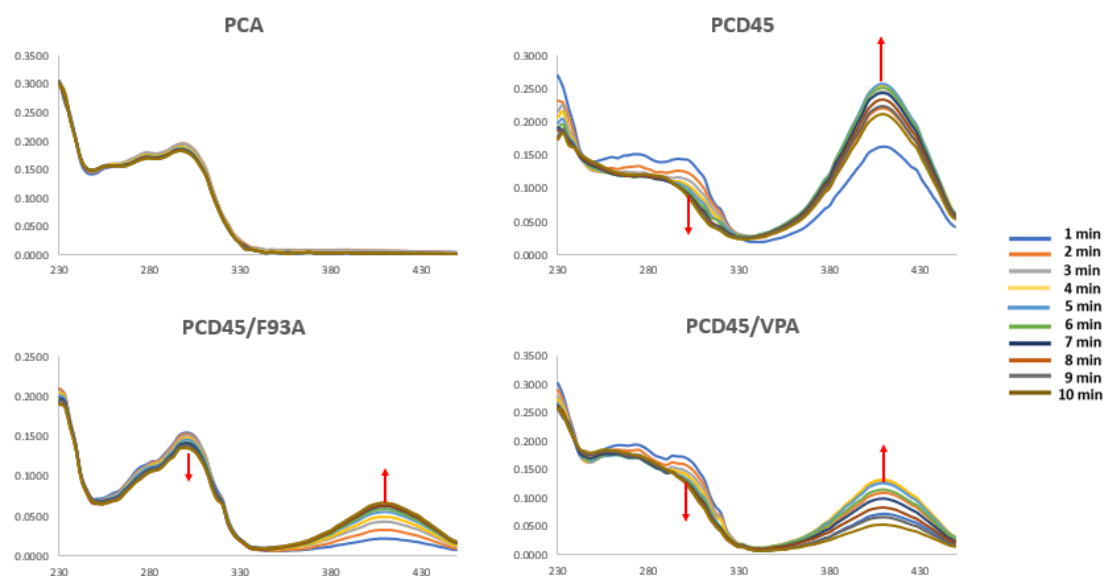
Πίνακας 3.5.1: Κινητικά δεδομένα των PCD45, PCD45/F93A και PCD45/VPA.

Ένζυμο	K_m (mM)	$V_{\max}$ (μM/ min)	Ειδ. Δραστηριότητα (U/ mg)
PCD45	0,05	916	230
PCD45/F93A	0,5	19,5	4,9
PCD45/VPA	0,1	3,3	0,8

3.5.5.7 Έλεγχος αναγνώρισης υποστρωμάτων με φασματοσκοπία UV/Vis

Κατ' αντιστοιχία με όσα έχουν προηγουμένως περιγραφεί για τον μεταλλαγμένο ένζυμο PCD43/ R123H, μέσω φασματοσκοπίας UV/ Vis εξετάστηκε η ικανότητα τόσο της PCD45 όσο και των μεταλλαγμένων PCD45/F93A και PCD45/VPA να αναγνωρίζουν άλλα υποστρώματα πέραν του PCA και το κατά πόσον συνετέλεσε η εισαγωγή των μεταλλάξεων στην αναγνώριση επιπλέον υποστρωμάτων. Η διαφορά εδώ είναι ότι στα φάσματα που ακολουθούν απεικονίζονται οι μεταβολές που παρατηρούνται σε διάστημα **1-10** λεπτών της αντίδρασης καθώς δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές μεταβολές σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Σε κάθε φάσμα δίνεται στον τίτλο το ένζυμο που συμμετείχε στην αντίδραση κάθε φορά, ενώ το φάσμα του υποστρώματος στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης απουσία ενζύμου (τυφλό) δίνεται πρώτο φάσμα και φέρει στον τίτλο του το όνομα του υποστρώματος αυτού.

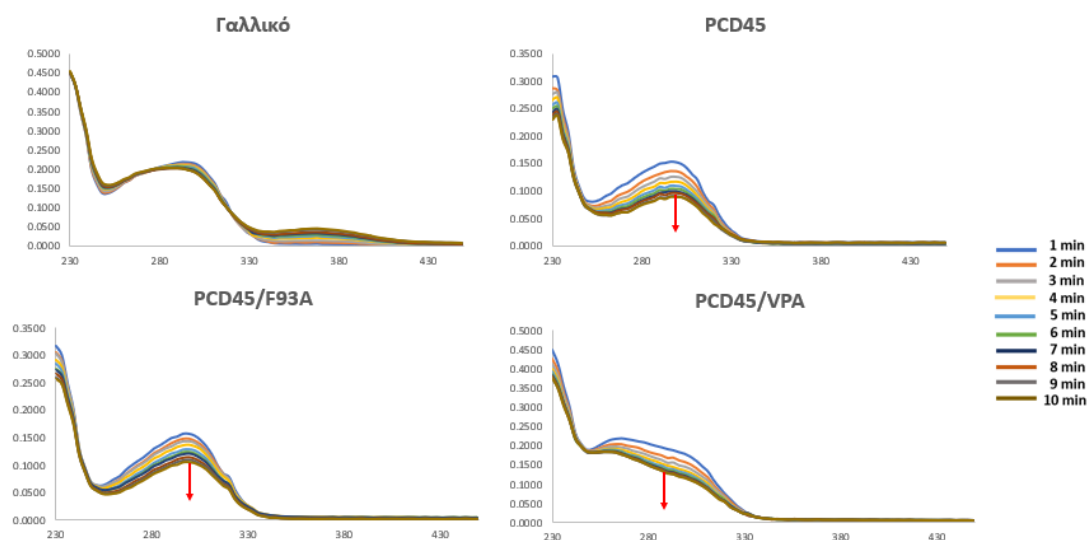
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ



Εικόνα 3.5.10: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με πρωτοκατεχοϊκό οξύ.

Τόσο στην περίπτωση του αγρίου τύπου ενζύμου PCD45 όσο και σε αυτή των μεταλλαγμένων παρατηρείται μια αύξηση της κορυφής στα 410 nm που οφείλεται στο προϊόν 4,5-σπάσης του PCA, 4-καρβόξυ-2υδροξύμουκονικής ημιαλδεΐδης.

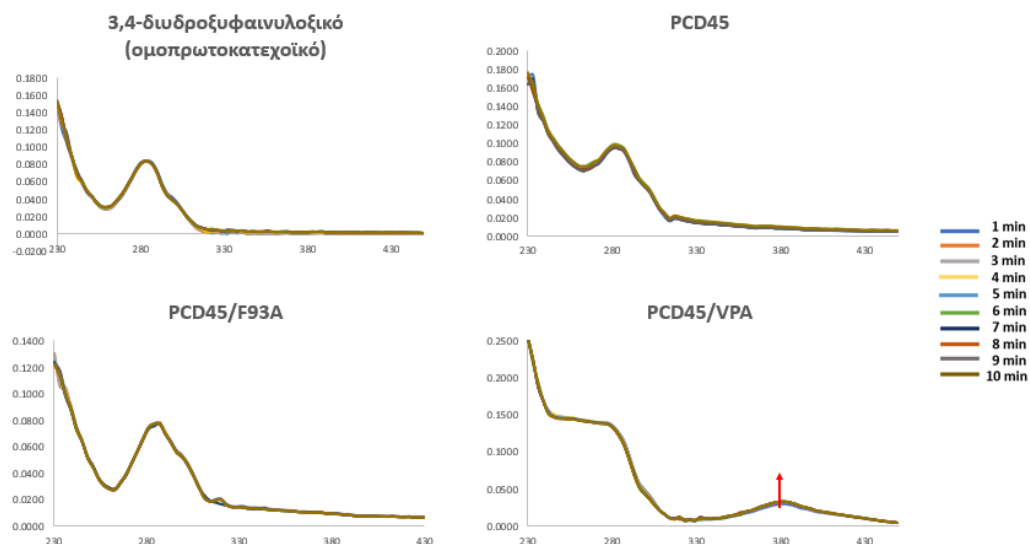
Γαλλικό οξύ



Εικόνα 3.5.11: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με γαλλικό οξύ.

Στην περίπτωση του γαλλικού οξέος είναι εμφανής μια μείωση κορυφής στα ~290nm που μπορεί να αποδοθεί στην κατανάλωση του υποστρώματος από το εκάστοτε ένζυμο καθώς δεν παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά του γαλλικού απουσία ενζύμου στον ίδιο χρόνο.

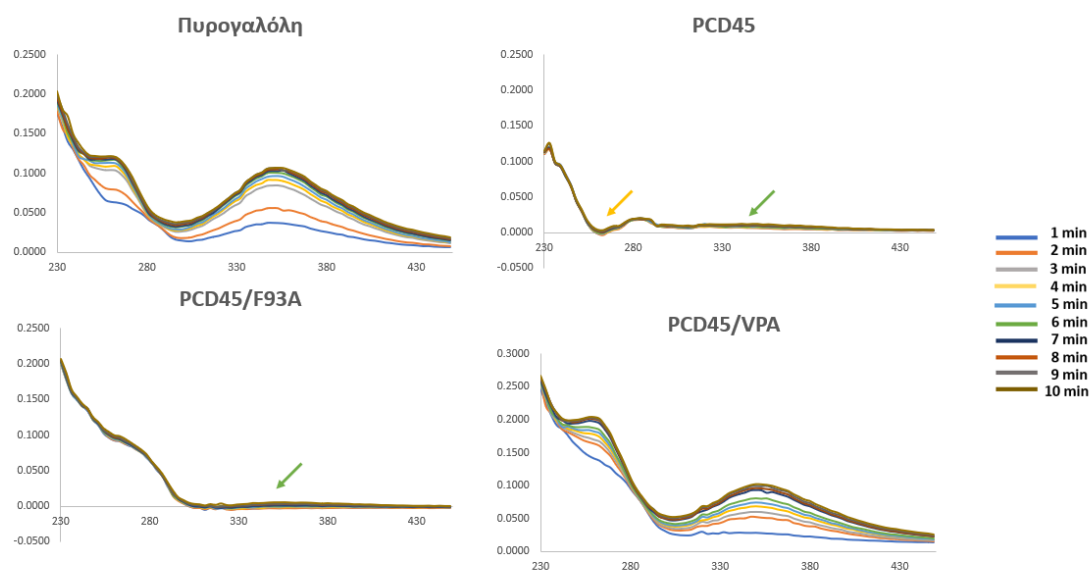
3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ (ομοπρωτοκατεχοϊκό)



Εικόνα 3.5.12: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ.

Στην περίπτωση του 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικού ενδιαφέρον παρουσιάζει το φάσμα της αντίδρασης με το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD45/VPA όπου παρουσιάζεται μια αύξηση της απορρόφησης στα ~380nm.

Πυρογαλλόλη

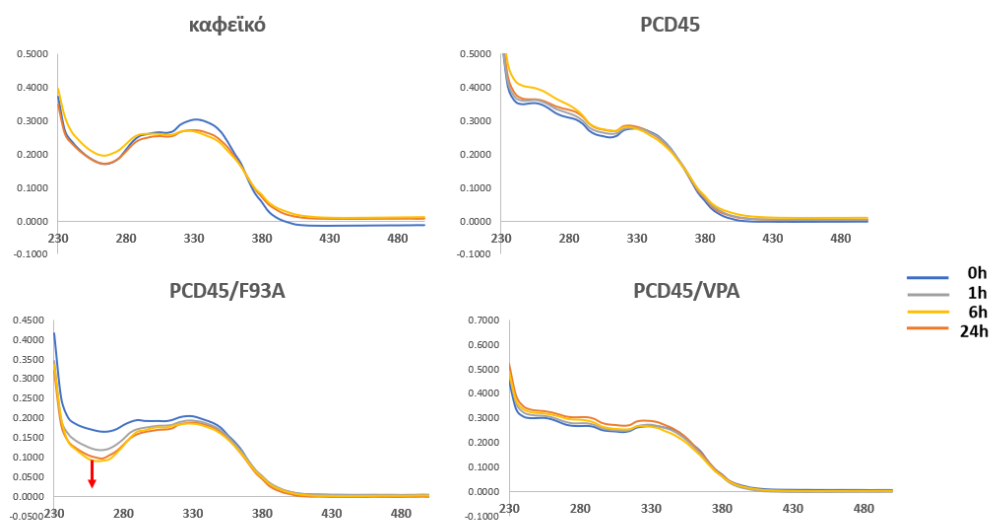


Εικόνα 3.5.13: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με πυρογαλλόλη.

Στην περίπτωση της πυρογαλλόλης παρατηρείται διαφορά στα φάσματα της αντίδρασης με PCD45 και PCD45/F93A σε σύγκριση με τα φάσματα τόσο του υποστρώματος όσο και με της αντίδρασης με PCD45/VPA. Πιο συγκεκριμένα στις δύο αυτές περιπτώσεις φαίνεται να μη προκύπτει η κορυφή στα ~350nm και η οποία οφείλεται στην οξείδωση του υποστρώματος. Στην αντίδραση με PCD45 φαίνεται να εξαφανίζεται και η κορυφή στα 270nm. Και οι δυο κορυφές μπορούν να αποδοθούν στην αυθόρμητη οξείδωση της πυρογαλλόλης προς ορθοκινόνη.

Στο διάστημα των 10 λεπτών δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική διαφορά στο φάσμα των αντιδράσεων με τα υπόλοιπα υποστρώματα που εξετάστηκαν. Παρατηρήθηκαν όμως κάποιες μεταβολές στο φάσμα της αντίδρασης σε διάστημα 24 ωρών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον και χρίζουν περεταίρω διερεύνησης. Πιο συγκεκριμένα:

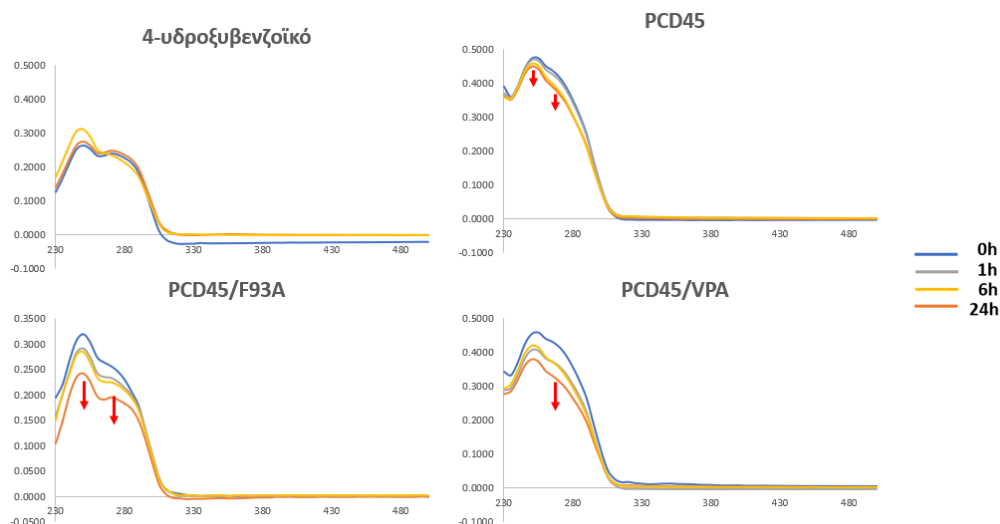
Καφεϊκό οξύ



Εικόνα 3.5.14: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με καφεϊκό οξύ.

Στα ανωτέρω φάσματα φαίνεται μια μείωση στην περιοχή των ~250nm στην αντίδραση με το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD45/F93A. Η ίδια μείωση δεν παρατηρείται στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Θα μπορούσε αυτή η μείωση να αποδοθεί στην κατανάλωση του υποστρώματος καφεϊκού καθώς αυτό παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα ~240nm και στα ~320nm.

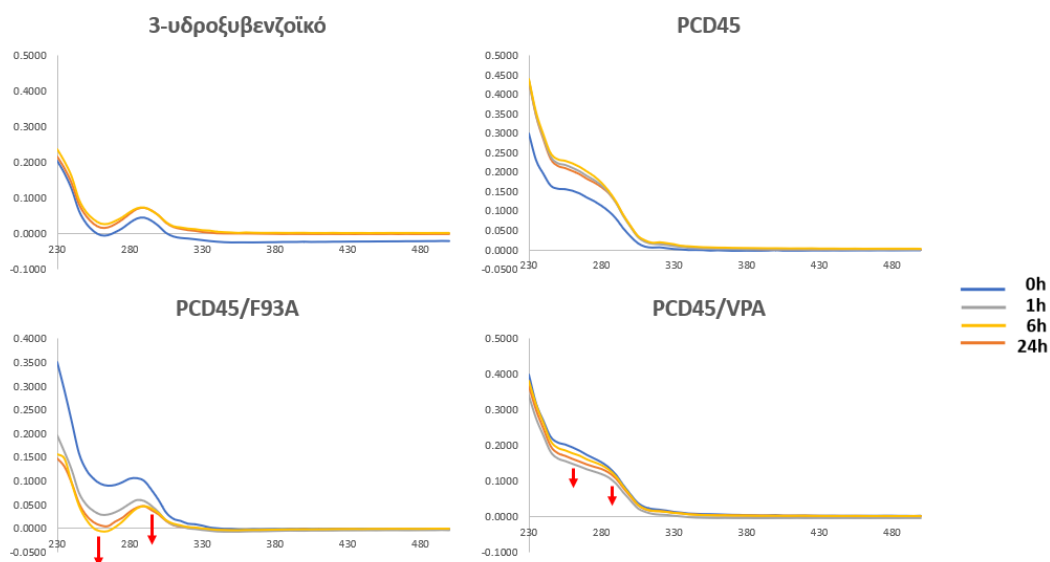
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ



Εικόνα 3.5.15: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Στην περίπτωση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος φαίνεται να υπάρχει μια μείωση της κορυφής στα ~250nm και στα ~280nm στις αντιδράσεις που καταλύονται και από τα δύο μεταλλαγμένα ένζυμα. Η μείωση αυτή φαίνεται να είναι μικρότερη παρουσία της αγρίου τύπου διοξυγονάσης PCD45 ενώ δεν παρατηρείται απουσία ενζύμου.

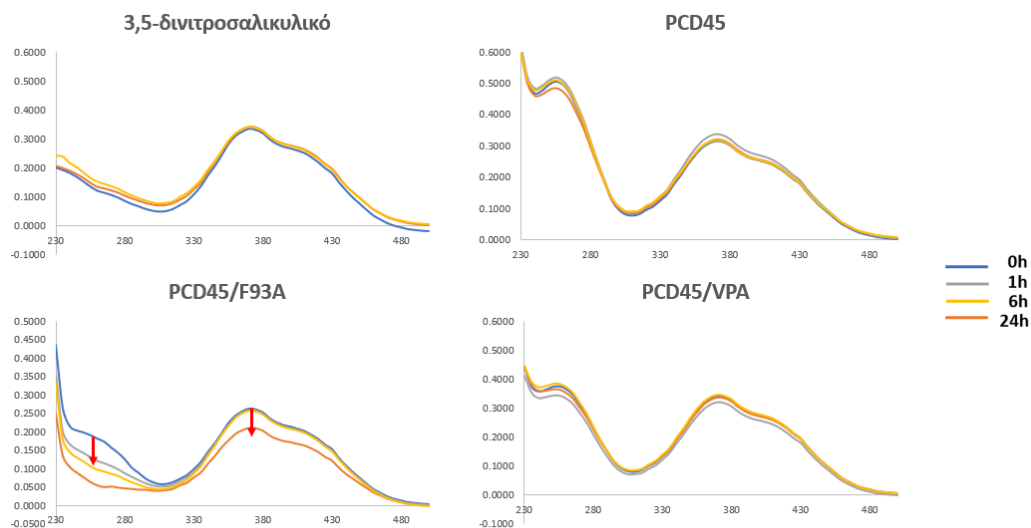
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ



Εικόνα 3.5.16: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Στην περίπτωση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος παρατηρείται μια μείωση της απορρόφησης στην περιοχή των ~250-300nm παρουσία των δυο μεταλλαγμένων ενζύμων ενώ αντίστοιχη μείωση δεν φαίνεται να παρουσιάζεται παρουσία της PCD45.

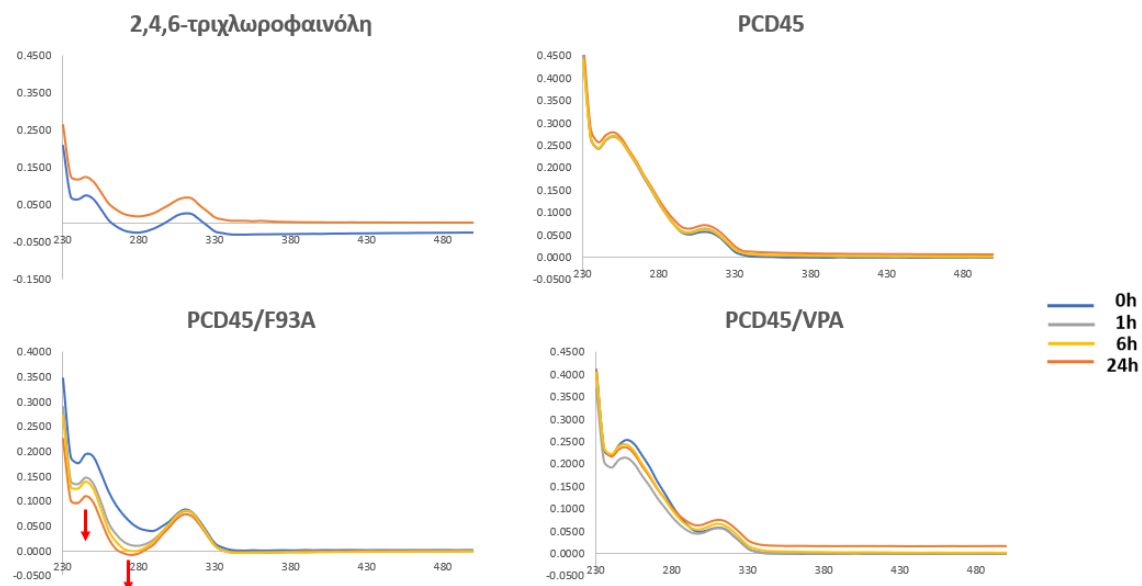
3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ



Εικόνα 3.5.17: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD45/F93A με υπόστρωμα 3,5-δινιτροσαλικυλικό (3,5-DNS). Πιο συγκεκριμένα σ' αυτό το φάσμα παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα ~250nm και στα ~380nm που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα φάσματα.

2,4,6-τριχλωροφαινόλη



Εικόνα 3.5.18: Φάσμα απορρόφησης της αντίδρασης με 2,4,6-τριχλωροφαινόλη.

Αντίστοιχα με το 3,5-DNS και στην περίπτωση της 2,4,6-τριχλωροφαινόλης παρατηρείται μια μείωση της απορρόφησης στην περιοχή ~250-280nm στο φάσμα της αντίδρασης με

PCD45/F93A. Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρείται ούτε στην περίπτωση των άλλων δύο ενζύμων, PCD45 και PCD45/VPA, ούτε στην περίπτωση του υποστρώματος απουσία ενζύμου.

Στα υπόλοιπα υποστρώματα που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές μεταβολές στα φάσματα ακόμη και με το πέρας 24 ωρών.

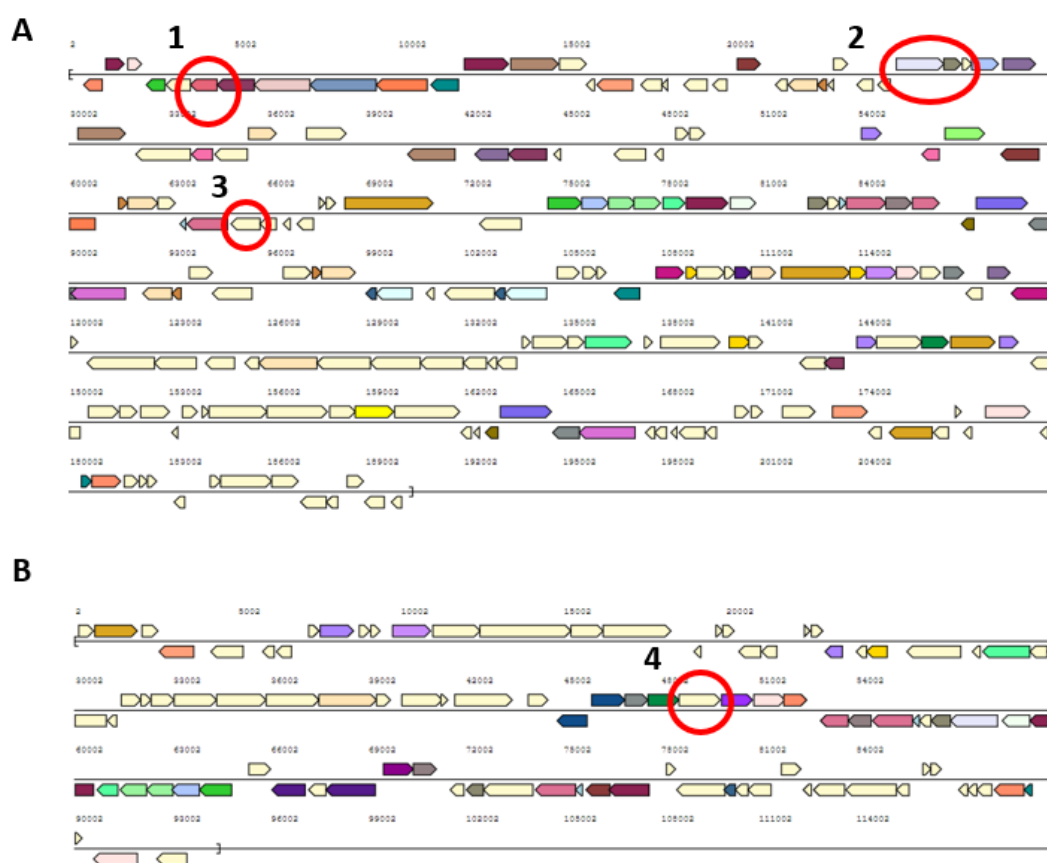
3.6 Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών μέσω της εκδίωξης πλασμιδίων (curing)

3.6.1 *In silico* ανάλυση των πλασμιδίων του *P. phenanthrenivorans* Sphe3

phenanthrenivorans Sphe3

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Παράγραφος 1.3, Εισαγωγή), το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 φέρει δυο καταβολικά πλασμίδια, το rASPHE301 με μέγεθος 190 kbp και το rASPHE302 με μέγεθος 94 kbp. Στα πλασμίδια αυτά εντοπίζονται γονίδια απαραίτητα για τον καταβολισμό πολλών PAH όπως η διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου, η διοξυγονάση του γεντισικού οξέος και η 4,5-διοξυγονάση του PCA.

Παρακάτω παρατίθεται ένας χάρτης των δυο πλασμιδίων όπου σημειώνονται τα γονίδια ενδιαφέροντος (Εικόνα 3.6.1.)



Εικόνα 3.6.1: Χάρτες των πλασμιδίων rASPHE301 (A) και rASPHE302 (B). 1: 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, 2: α- και β- υπομονάδες της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου, 3: 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης, 4: 4,5-διοξυγονάση του PCA.

3.6.2 Προσπάθεια εκδίωξης του πλασμιδίου rASPHE302

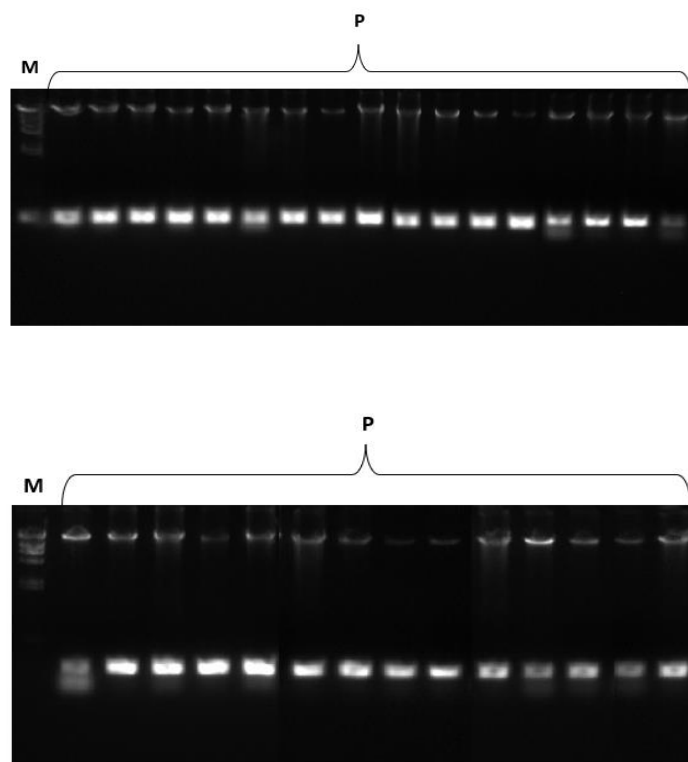
Στο πλαίσιο της παρούσης διατριβής επιχειρήθηκε η εκδίωξη του μικρού πλασμιδίου rASPHE302 που φέρει το *P. phenanthrenivorans* Sphe3, μέσω διαδοχικών ανακαλλιεργειών σε πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης είτε σε αυξημένη θερμοκρασία, είτε παρουσία χημικών παραγόντων όπως είναι το SDS και το βρωμιούχο αιθίδιο (Παράγραφος 2.26, Υλικά & Μέθοδοι).

Να σημειωθεί ότι στην διάθεση της ερευνητικής ομάδας υπάρχει ένα στέλεχος *Srhe3* (το οποίο θα ονομάζεται ***Srhe3c*** – cured) στο οποίο έχει επιτευχθεί η εκδίωξη του μεγάλου πλασμιδίου *pASPHE301* στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής Διατριβής του Δρ. Αλέξανδρου Δραΐνα (Δραΐνας, 2012).

Οι προσπάθειες εκδίωξης του *pASPHE302* είτε από το *Srhe3* είτε από το *Srhe3c* δεν κατέστη εφικτή με τον οποιοδήποτε τρόπο δοκιμάστηκε οδηγώντας στην υπόθεση ότι το πλασμίδιο αυτό πιθανόν φέρει γονίδια που ίσως είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του στελέχους.

Η επιτυχία της προσπάθειας εκδίωξης του *pASPHE302* ελεγχόταν κάθε φορά με τη διεξαγωγή αντιδράσεων PCR με τη χρήση ζεύγους πριμοδοτικών μορίων ειδικών για το γονίδιο της *PCD45* που υπάρχει μόνο στο πλασμίδιο *pASPHE302*.

Παρακάτω δίνονται ενδεικτικά εικόνες από πηγματα αгарόζης όπου απεικονίζονται τα προϊόντα της ανωτέρω αντίδρασης PCR. Επισημαίνεται ότι σε περίπτωση επιτυχούς εκδίωξης του πλασμιδίου αναμένεται απουσία προϊόντος για το γονίδιο *pcd45* (Εικόνα 3.6.2).



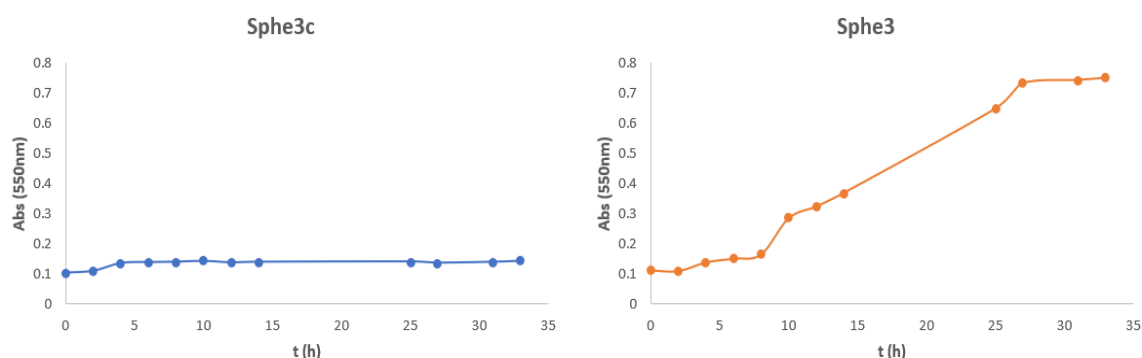
Εικόνα 3.6.2: Πήγματα αгарόζης που απεικονίζονται τα προϊόντα της αντίδρασης PCR για τμήμα του γονιδίου *pcd45* σε DNA από κύτταρα *Srhe3*. M: μάρτυρας μοριακών θαρών λDNA/ *HindIII*, P: προϊόν της αντίδρασης PCR.

3.6.2 Ανάπτυξη των στελεχών *Srhe3* και *Srhe3c* σε διάφορες πηγές άνθρακα

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους *Srhe3* καθώς και του μεταλλαγμένου *Srhe3c* παρουσία διαφόρων ενώσεων ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας.

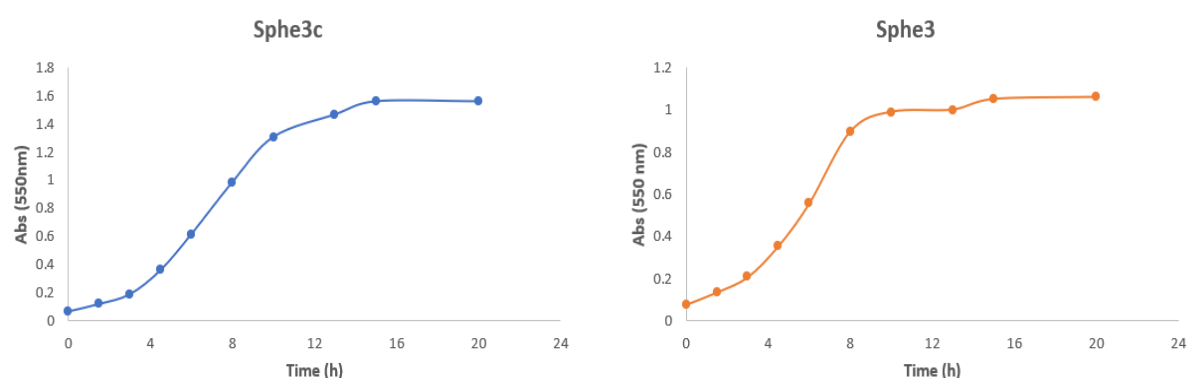
Οι ενώσεις που εξετάστηκαν ήταν το φαινανθρένιο (Εικόνα 3.6.3), το φθαλικό (Εικόνα 3.6.4), το πρωτοκατεχοϊκό (Εικόνα 3.6.5), το βενζοϊκό (Εικόνα 3.6.6), το 3- υδροξυβενζοϊκό (Εικόνα 3.6.7), το 4-υδροξυβενζοϊκό (Εικόνα 3.6.8) καθώς και η γλυκόζη (Εικόνα 3.6.9).

Η ανάπτυξη μελετήθηκε μετρώντας την απορρόφηση σε μήκος κύματος 550nm, αραιώσης 1:3 της εκάστοτε καλλιέργειας σε διάφορα χρονικά διαστήματα (Εικόνες 3.6.3 – 3.6.9).



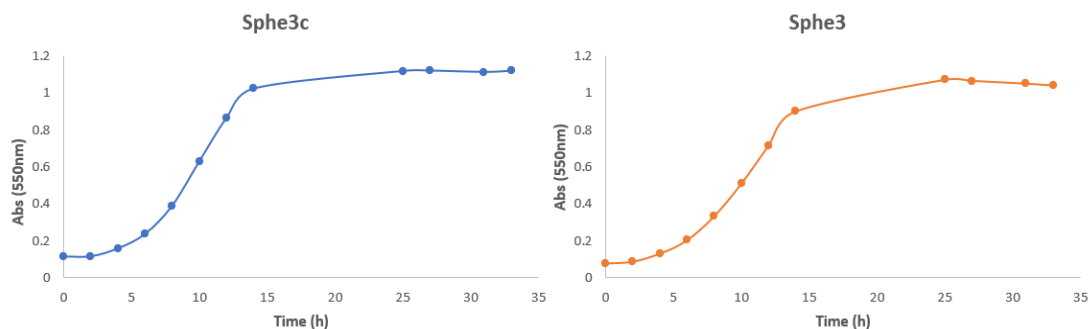
Εικόνα 3.6.3: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε φαινανθρένιο.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6.2, το μεταλλαγμένο στέλεχος *Sphe3c* δεν αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας σε αντίθεση με το *Sphe3*. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς στο pASPH301 εδράζονται γονίδια που είναι απαραίτητα για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου, όπως για παράδειγμα τα *Asphe_40070* και *Asphe_40080* που κωδικοποιούν υπομονάδες για μια διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (Vandera et al., 2015).



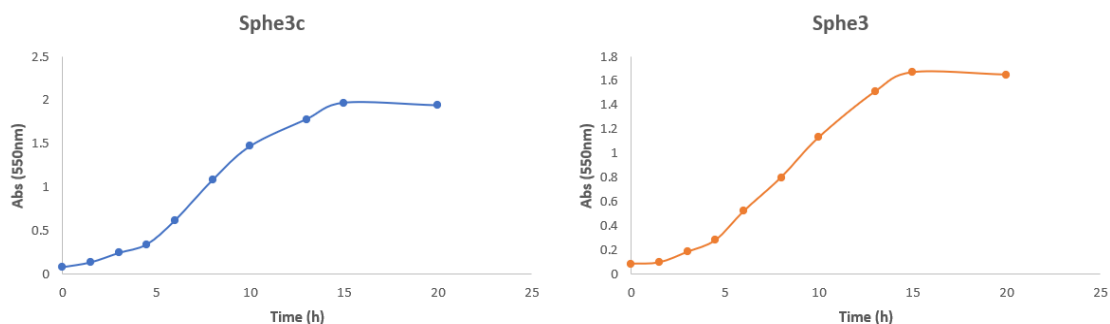
Εικόνα 3.6.3: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε φθαλκικό οξύ.

Στην περίπτωση του **φθαλκικού οξέος** και τα δύο στελέχη αναπτύσσονται κανονικά και φαίνεται ότι ακολουθούν τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης καθώς εισέρχονται στην εκθετική και στη στατική φάση περίπου στις 5 και 11 ώρες αντίστοιχα (Εικόνα 3.6.3).



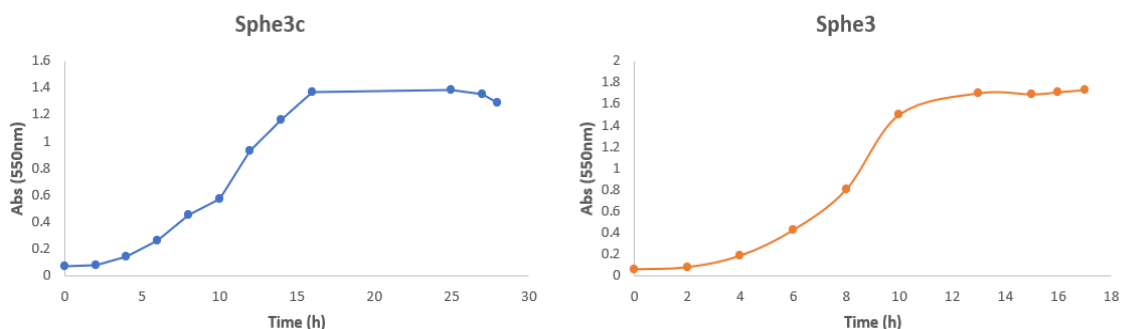
Εικόνα 3.6.4: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε PCA.

Και στην περίπτωση του **PCA** η ανάπτυξη των δύο στελεχών είναι παρόμοια. Παρατηρείται ότι εισέρχονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 5 ώρες περίπου ενώ στην στατική στις 12 ώρες (Εικόνα 3.6.4).



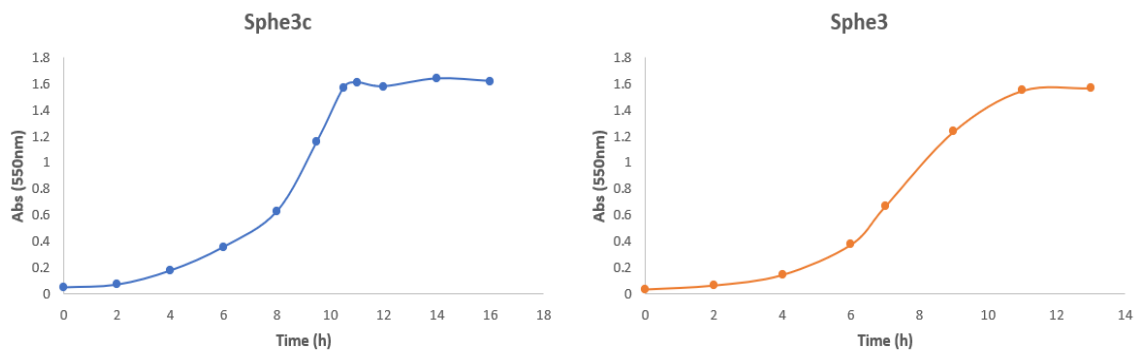
Εικόνα 3.6.5: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε βενζοϊκό οξύ.

Αντίστοιχα στο **βενζοϊκό οξύ** τα *Sphe3c* και *Sphe3* εισέρχονται στην εκθετική περίπου στις 6 ώρες και στη στατική περίπου στις 15 ώρες (Εικόνα 3.6.5).



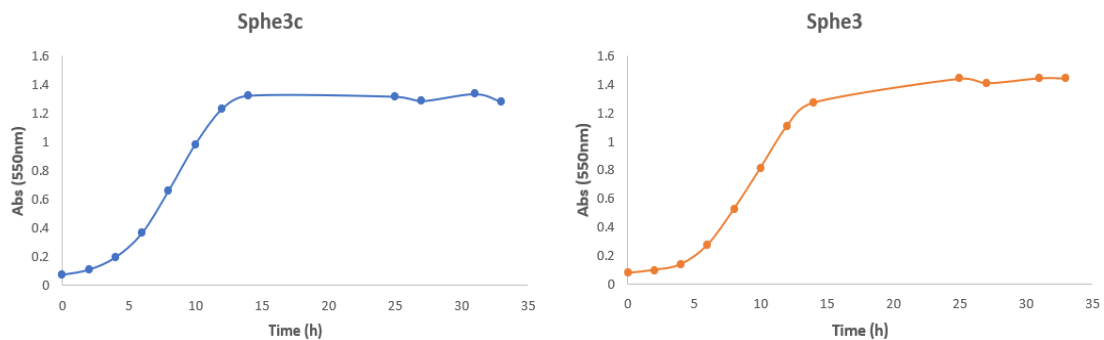
Εικόνα 3.6.6: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε 3HB.

Στην περίπτωση του **3-υδροξυβενζοϊκού οξέος** ενώ φαίνεται ότι τα δύο στελέχη εισέρχονται περίπου την ίδια ώρα στην εκθετική φάση (κοντά στις 5 ώρες), το *Sphe3* σταματά να αναπτύσσεται μετά από 10-11 ώρες ενώ το *Sphe3c* εισέρχεται στη στατική φάση ανάπτυξης μετά το πέρας των 15 ωρών, κάτι που σημαίνει ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος φαίνεται να έχει μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης στο 3HB απ' ότι το αγρίου τύπου *Sphe3* (Εικόνα 3.6.6).



Εικόνα 3.6.7: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε 4HB.

Τα δύο στελέχη φαίνεται να εμφανίζουν το ίδιο μοτίβο ανάπτυξης όταν καλλιεργούνται παρουσία **4-υδροξυβενζοϊκού** καθώς εισέρχονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης μετά τις 4 ώρες και στην στατική μετά τις 10 ώρες (Εικόνα 3.6.7).



Εικόνα 3.6.8: Καμπύλες ανάπτυξης των *Sphe3c* και *Sphe3* σε γλυκόζη.

Τέλος μελετήθηκε η ανάπτυξη σε **γλυκόζη** όπου και σε αυτή την περίπτωση τα δύο στελέχη παρουσιάζουν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης εισερχόμενα την εκθετική φάση μετά τις 5 ώρες και στην στατική μετά τις 12-13 ώρες περίπου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο καταβολισμός των υδροξυβενζοϊκών οξέων (3-υδροξυβενζοϊκού οξέος και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος), τόσο στο *Sphe3* όσο και στο *Sphe3c*, καθώς στο μεγάλο πλασμίδιο έχουν εντοπιστεί γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό αυτών των οξέων. Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, ο μεταβολισμός αυτών των ενώσεων προχωράει κυρίως είτε μέσω του γεντισικού οξέος, είτε μέσω του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, είτε μέσω της κατεχόλης. Συγκεκριμένα το πλασμίδιο *pASPHE302* το οποίο λείπει από το μεταλλαγμένο στέλεχος *Sphe3c*, φέρει τουλάχιστον τα γονίδια για το μονοπάτι του γεντισικού οξέος (Asimakoula et al., 2022). Επομένως πραγματοποιήθηκε μεταγραφομική ανάλυση ενζύμων ενδιαφέροντος και μεταβολομική ανάλυση των *Sphe3* και *Sphe3c* παρουσία 3HB και 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, ως μια προσπάθεια διερεύνησης των πορειών καταβολισμού των ανωτέρω αυτών υποστρωμάτων.

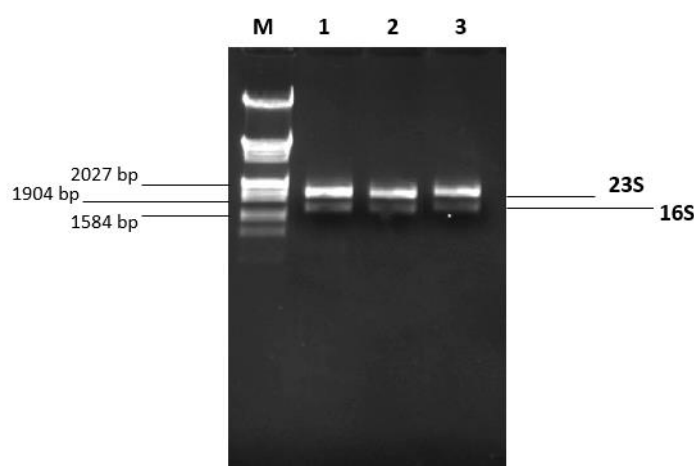
3.7 Μεταγραφομική Ανάλυση των γονιδίων *cat12diox*, *pcd34* και *pcd45*.

Μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (*cat12diox*) και για τις 3,4- (*pcd34*) και 4,5- (*pcd45*) διοξυγονάσες του PCA όταν το στέλεχος *Srhe3c* αναπτύχθηκε παρουσία του 3-υδρόξυ (3HB) ή του 4-υδρόξυβενζοϊκού (4HB) οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής τους όταν αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα του στελέχους *Srhe3*, η ανάλυση των οποίων έγινε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της κας Ασημακούλα, η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη.

3.7.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *Srhe3c* που αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης, 3HB, 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους.

Η απομόνωση διεξήχθη σύμφωνα με τη διαδικασία όπως αυτή περιγράφεται στην Παράγραφο 2.28.2.1 και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3.7.1) παρατίθεται το αποτέλεσμα αυτής.

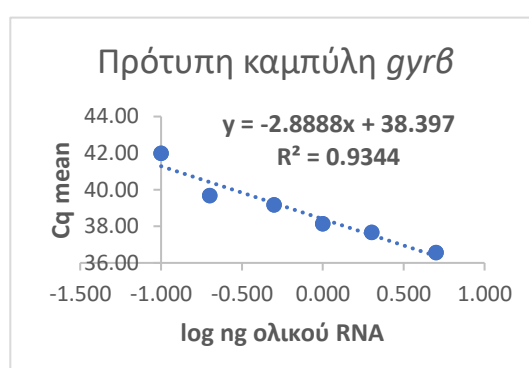
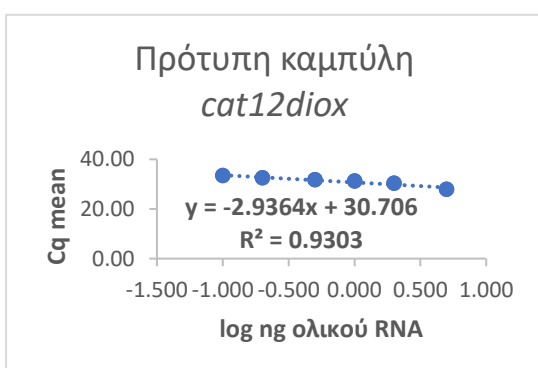
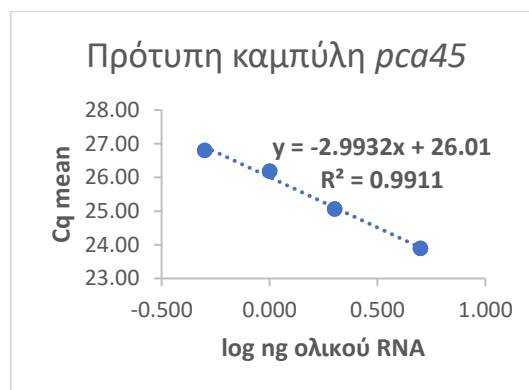
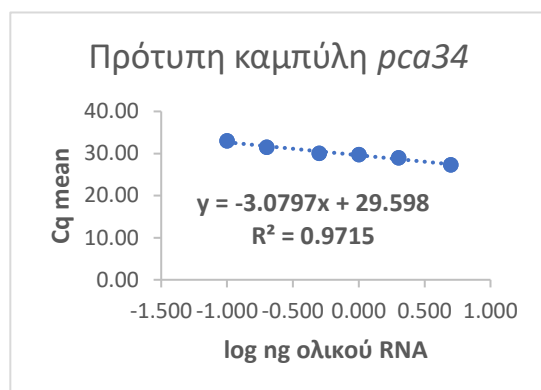


Εικόνα 3.7.1: Πήγμα αгарόζης που απεικονίζεται το εξαχθέν RNA από καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3c* σε γλυκόζη (1), 3HB (2) και 4HB (3). M: μάρτυρας μοριακών βαρών λDNA-EcoRI/HindIII. Οι δύο εμφανείς ζώνες αντιστοιχούν στα 23S και 16S RNAs όπως υποδεικνύεται και δεξιά του πηγματος.

3.7.2. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω qRT-PCR σε καλλιέργεια *Srhe3c* σε υποστρώματα 3HB και 4HB

Το RNA που απομονώθηκε με την προαναφερθείσα διαδικασία μετατράπηκε σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.28.2.2 και ακολούθησε η ποσοτική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *cat12diox*, *pcd34* και *pcd45* του στελέχους *Srhe3c* με ανάπτυξη αυτού σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 εμπλουτισμένο με μοναδικές κάθε φορά πηγές άνθρακα τη γλυκόζη, το 3HB και το 4HB.

Τα επίπεδα του mRNA (και κατ' επέκταση τα επίπεδα έκφρασης) για τα προαναφερθέντα γονίδια προσδιορίστηκαν σε σχέση με την ποσότητα mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB* και κάθε άγνωστο δείγμα κανονικοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού. Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με χρήση εκμαγείου ολικού RNA καθορισμένης συγκέντρωσης (5, 2, 1, 0,5, 0,2 και 0,1 ng) από κύτταρα ανεπτυγμένα σε γλυκόζη, το οποίο ενισχύθηκε με τη χρήση κατάλληλου για κάθε γονίδιο ζεύγους πριμοδοτικών μορίων (βλ. Παράγραφος 2.28.6). Ακολουθούν οι πρότυπες καμπύλες:



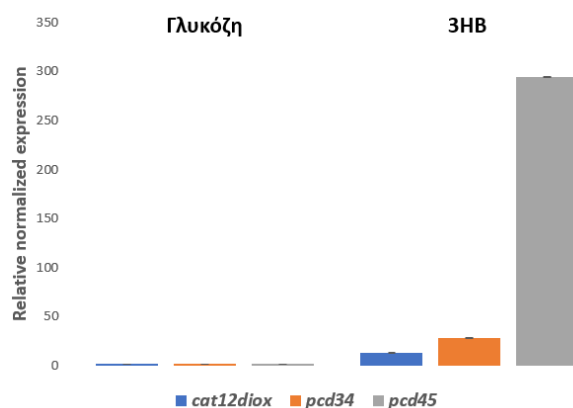
Στα γραφήματα για τις πρότυπες καμπύλες του εκάστοτε γονιδίου δίνονται και οι αντίστοιχες εξισώσεις βάσει των οποίων έγινε η σχετική ποσοτικοποίηση καθώς και οι παράγοντες συσχέτισης R^2 οι οποίοι υποδεικνύουν μια καλή γραμμικότητα ($0,9303 < R^2 < 0,9911$). Τα επίπεδα έκφρασης κάθε υπό μελέτη γονιδίου τόσο στο 3- όσο και στο 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης με βάση τα επίπεδα έκφρασης του σε υπόστρωμα γλυκόζης και συνοψίζονται στους πίνακες και στα γραφήματα που ακολουθούν.

3.7.2.1 Μεταγραφή των γονιδίων παρουσία 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (3HB)

Παρακάτω παρατίθενται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την PCD45, την β -υπομονάδα της PCD34 και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης σε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3c* σε 3HB σε σύγκριση με τα επίπεδα σε αντίστοιχη καλλιέργεια σε γλυκόζη, κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gyrB* (Πίνακας 3.7.1, Γράφημα 3.7.1).

Πίνακας 3.7.1: Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *pcd45*, *pcd34* και *cat12diox* σε καλλιέργεια *Srhe3c* σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Υποστρώματα		
Γονίδια	Γλυκόζη	3-υδροξυβενζοϊκό οξύ
<i>pcd45</i>	1 ± 0,373	294,82 ± 0,289
<i>pcd34</i>	1 ± 0,458	28,09 ± 0,339
<i>cat12diox</i>	1 ± 0,435	13,08 ± 0,323



Γράφημα 3.7.1: Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

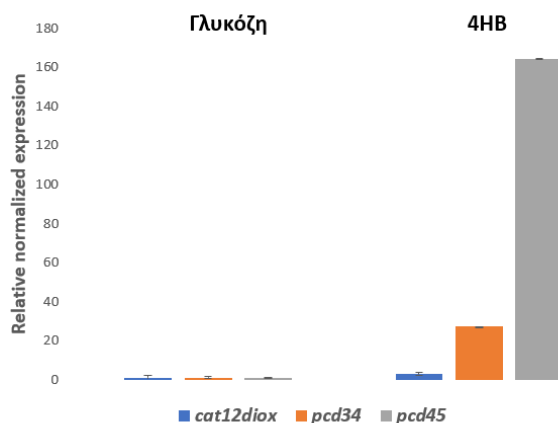
Είναι εμφανές ότι παρουσία 3HB, στο μεταλλαγμένο στέλεχος *Srhe3c*, η έκφραση της PCD45 επάγεται κατά σχεδόν 295 φορές σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού στη γλυκόζη. Η επαγωγή αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από την επαγωγή των *pcd34* και *cat12diox* των οποίων τα επίπεδα έκφρασης σε 3HB είναι 28 και 13 φορές υψηλότερα αντίστοιχα, σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής τους όταν το στέλεχος αναπτύσσεται σε γλυκόζη.

3.7.2.2 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4HB)

Παρακάτω παρατίθενται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την PCD45, την β-υπομονάδα της PCD34 και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης σε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3c* σε 4HB σε σύγκριση με τα επίπεδα σε αντίστοιχη καλλιέργεια σε γλυκόζη, κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gyrB* (Πίνακας 3.7.2, Γράφημα 3.7.2).

Πίνακας 3.7.2: Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *pcd45*, *pcd34* και *cat12diox* σε καλλιέργεια *Srhe3c* σε υποστρώματα γλυκόζης και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Υποστρώματα		
Γονίδια	Γλυκόζη	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
<i>pcd45</i>	1 ± 0,373	164,48 ± 0,068
<i>pcd34</i>	1 ± 0,458	27,20 ± 0,092
<i>cat12diox</i>	1 ± 0,435	2,85 ± 0,143



Γράφημα 3.7.2: Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* σε υποστρώματα γλυκόζης και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Αντίστοιχα με το υπόστρωμα 3HB, και στο 4HB παρατηρείται μια επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου για την 4,5-διοξυγονάση του PCA κατά 164 φορές συγκρινόμενη με τα επίπεδα μεταγραφής στη γλυκόζη. Και στην περίπτωση του 4HB έχουμε μια επαγωγή της έκφρασης της PCD34 αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό (~27 φορές). Η διαφορά στο 4HB είναι ότι έκφραση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης είναι σχεδόν αμελητέα (~3 φορές μεγαλύτερη έκφραση συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης αυτής σε υπόστρωμα γλυκόζης).

3.7.3 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω qRT-PCR σε καλλιέργεια *Srhe3* σε υποστρώματα 3HB και 4HB

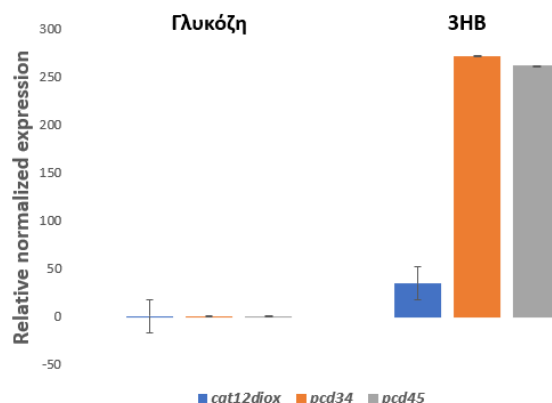
Επισημαίνεται ότι τα αποτελέσματα της έκφρασης που αφορούν το στέλεχος *Srhe3* αποτελούν μέρος της διδακτορικής διατριβής της κας Ασημακούλα (η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη) και παρατίθενται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύγκριση των μεταβολικών πορειών στα δύο διαφορετικά στελέχη.

3.7.3.1 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3HB)

Παρακάτω παρατίθενται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την PCD45, την β-υπομονάδα της PCD34 και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης σε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3* σε 3HB σε σύγκριση με τα επίπεδα σε αντίστοιχη καλλιέργεια σε γλυκόζη, κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gyrB* (Πίνακας 3.7.3, Γράφημα 3.7.3).

Πίνακας 3.7.3: Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *pcd45*, *pcd34* και *cat12diox* σε καλλιέργεια *Srhe3* σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Γονίδια	Υποστρώματα	
	Γλυκόζη	3-υδροξυβενζοϊκό οξύ
<i>pcd45</i>	1 ± 0,476	262,38 ± 0,144
<i>pcd34</i>	1 ± 0,494	272,72 ± 0,0,174
<i>cat12diox</i>	1 ± 0,468	35,4 ± 0,323



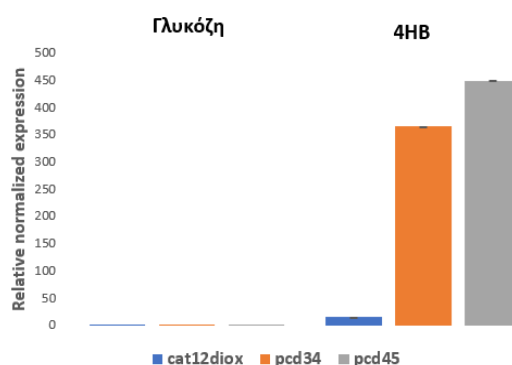
Γράφημα 3.7.3: Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του στελέχους *Srhe3* σε υποστρώματα γλυκόζης και 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

3.7.3.2 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4HB)

Παρακάτω παρατίθενται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την PCD45, την β-υπομονάδα της PCD34 και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης σε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3* σε 4HB σε σύγκριση με τα επίπεδα σε αντίστοιχη καλλιέργεια σε γλυκόζη, κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gyrB* (Πίνακας 3.7.4, Γράφημα 3.7.4).

Πίνακας 3.7.4: Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *pcd45*, *pcd34* και *cat12diox* σε καλλιέργεια *Srhe3* σε υποστρώματα γλυκόζης και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Υποστρώματα		
Γονίδια	Γλυκόζη	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
<i>pcd45</i>	1 ± 0,476	448,89 ± 0,163
<i>pcd34</i>	1 ± 0,494	365,56 ± 0,201
<i>cat12diox</i>	1 ± 0,391	15,22 ± 0,08



Γράφημα 3.7.4: Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του στελέχους *Srhe3* σε υποστρώματα γλυκόζης και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Το mRNA των γονιδίων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Παρακάτω παρατίθεται συγκεντρωτικός πίνακας των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος στα προαναφερθέντα υποστρώματα στα στελέχη *Sphe3* και *Sphe3c* (Πίνακας 3.7.5). Τα επίπεδα είναι στρογγυλοποιημένα και παραλείπονται οι τυπικές αποκλίσεις προς διευκόλυνση της σύγκρισης.

Πίνακας 3.7.5: Επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *pcd45*, *pcd34* και *cat12diox* σε καλλιέργειες *Sphe3* και *Sphe3c* σε υποστρώματα γλυκόζης, 3-υδρόξυβενζοϊκού και 4-υδρόξυβενζοϊκού οξέος.

Γονίδια	Υποστρώματα			
	<i>Sphe3</i>		<i>Sphe3c</i>	
	Γλυκόζη	3HB	Γλυκόζη	3HB
<i>pcd45</i>	1	262	1	295
<i>pcd34</i>	1	272	1	28
<i>cat12diox</i>	1	35	1	13
	Γλυκόζη	4HB	Γλυκόζη	4HB
<i>pcd45</i>	1	449	1	164
<i>pcd34</i>	1	366	1	27
<i>cat12diox</i>	1	15	1	3

Τα μοτίβο έκφρασης των γονιδίων που εξετάστηκαν στο στέλεχος *Sphe3c* διαφέρει σημαντικά από εκείνο που παρατηρείται σε αντίστοιχες καλλιέργειες του στελέχους *Sphe3* όπου τα επίπεδα έκφρασης των διοξυγονασών του PCA (*PCD34* και *PCD45*) παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα επαγωγής τόσο παρουσία 3HB (272 και 262 φορές αντίστοιχα) όσο και παρουσία 4HB (366 και 449 φορές αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης τους σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (Πίνακας 3.7.5). Αντίθετα το *cat12diox* παρουσιάζει πολύ μικρότερη επαγωγή της έκφρασης του και στα δύο υποστρώματα, 3HB και 4HB (35 και 15 φορές αντίστοιχα).

3.8 Μεταβολομική Ανάλυση

Για τη διερεύνηση των πορειών καταβολισμού του 3-υδροξυβενζοϊκού (3HB) και του 4-υδροξυβενζοϊκού (4HB) σε κύτταρα *Srhe3* όσο και κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c*, τα στελέχη καλλιεργήθηκαν παρουσία 3HB ή 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων από διάφορες φάσεις ανάπτυξης (εκθετική, ύστερη εκθετική, στατική, ύστερη στατική) όπως αυτές προκύπτουν από τις καμπύλες ανάπτυξης που έχουν προηγηθεί (βλ. Παράγραφο 3.6.2), ακολούθησε φυγοκέντρηση, εκχύλιση του υπερκείμενου των κυττάρων και ανάλυση με υγρή χρωματογραφία - συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο με αρνητικό ($[M-H]^-$) όσο και με θετικό ιοντισμό ($[M+H]^+$) σε οξινισμένα και σε ουδέτερα δείγματα με τη χρήση δύο διαφορετικών στηλών ανάστροφης φάσης: Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) και Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm).

Μεταβολίτες εντοπίστηκαν μόνο στα οξινισμένα δείγματα και η ανάλυση που ακολουθεί αφορά στον αρνητικό ιονισμό καθώς στον θετικό δεν εντοπίστηκε κάποιος επιπλέον μεταβολίτης. Τα φάσματα που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια φασμάτων διαλυμάτων των αντίστοιχων πρότυπων ενώσεων και η ταυτοποίηση έγινε με βάση τρία σημεία: την ακρίβεια μάζας, τον χρόνο κατακράτησης (Retention Time, R.T.) και το MS/MS φάσμα. Για την Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων, οι ουσίες διαλύθηκαν σε μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 5 ppm.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.8.1 και 3.8.2) παρατίθενται οι χρόνοι κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων στις δύο στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Αναλυτικά τα Χρωματογραφήματα και τα MS και MS/MS φάσματα των προτύπων παρατίθενται στο Παράρτημα Π5

Πίνακας 3.8.1: Χρόνοι κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων σε στήλη Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm).

Ένωση	R.T. (min)
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	4,3
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	3,5
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	1,9
Γεντισικό οξύ	2,4
Κατεχόλη	2

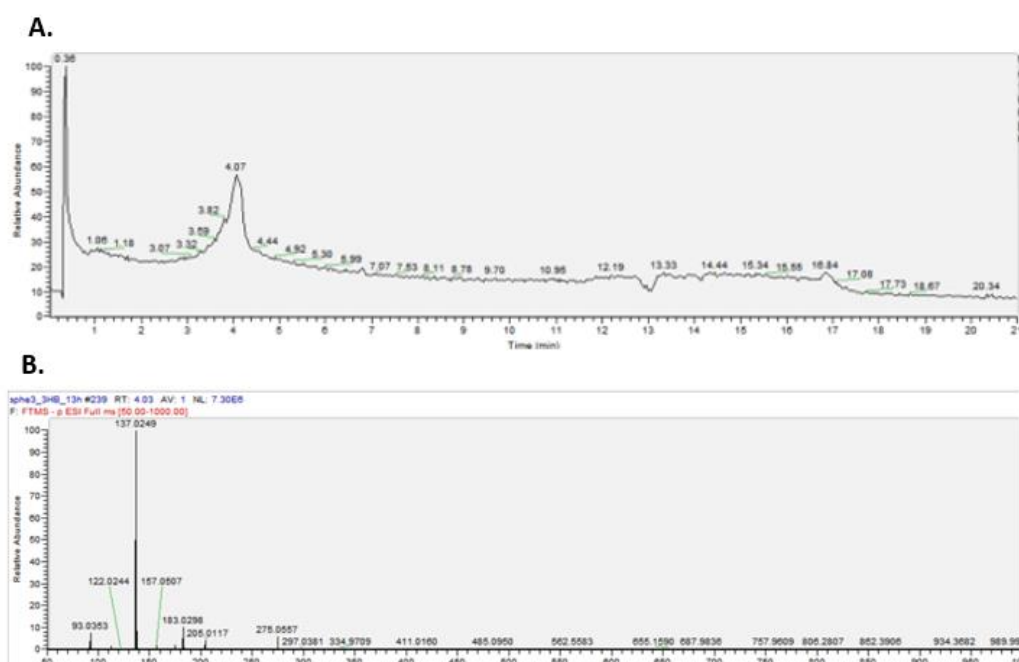
Πίνακας 3.8.2: Χρόνοι κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων σε στήλη Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm).

Ένωση	R.T. (min)
3-υδροξυβενζοϊκό οξύ	5,8
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	4,9
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	3,2
Γεντισικό οξύ	4,8
Πυροκατεχοϊκό οξύ	5,8
Ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ	4,4
Υδροκινόνη	0,58
Κατεχόλη	3,2

3.8.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών σε καλλιέργεια *Srhe3* και *Srhe3c* με μοναδική πηγή άνθρακα το 3HB

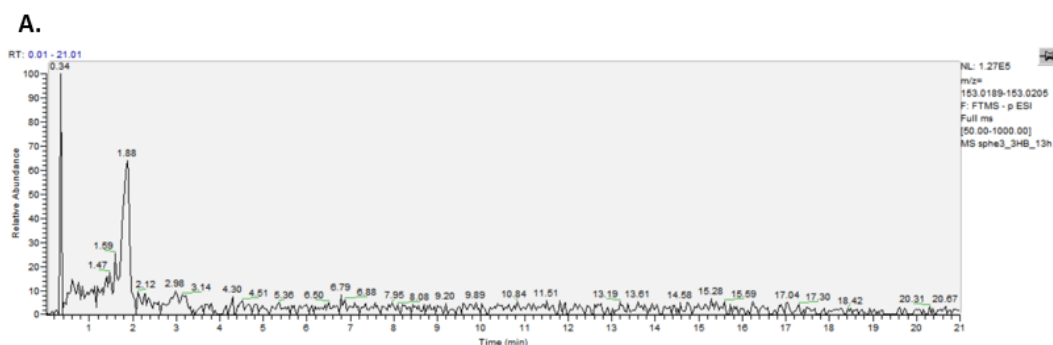
3.8.1.1 *Srhe3*

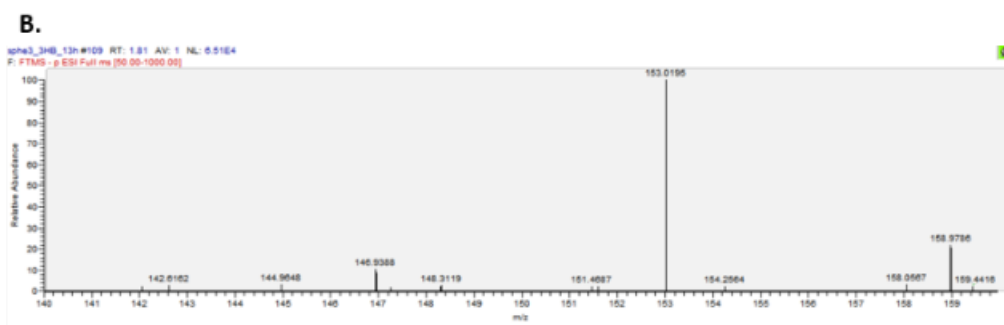
Στα δείγματα που προέρχονται από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων *Srhe3* παρουσία 3HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας εντοπίστηκε, σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, η ένωση με $m/z = 137,0244$ με **R.T. = 4,07 min** (Εικόνα 3.8.1). Τόσο το μοριακό ιόν όσο και ο χρόνος κατακράτησης αντιστοιχεί στο υπόστρωμα **3HB**.



Εικόνα 3.8.1: **A.** LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 137,0244$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος 3HB. **B.** Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 137,0249.

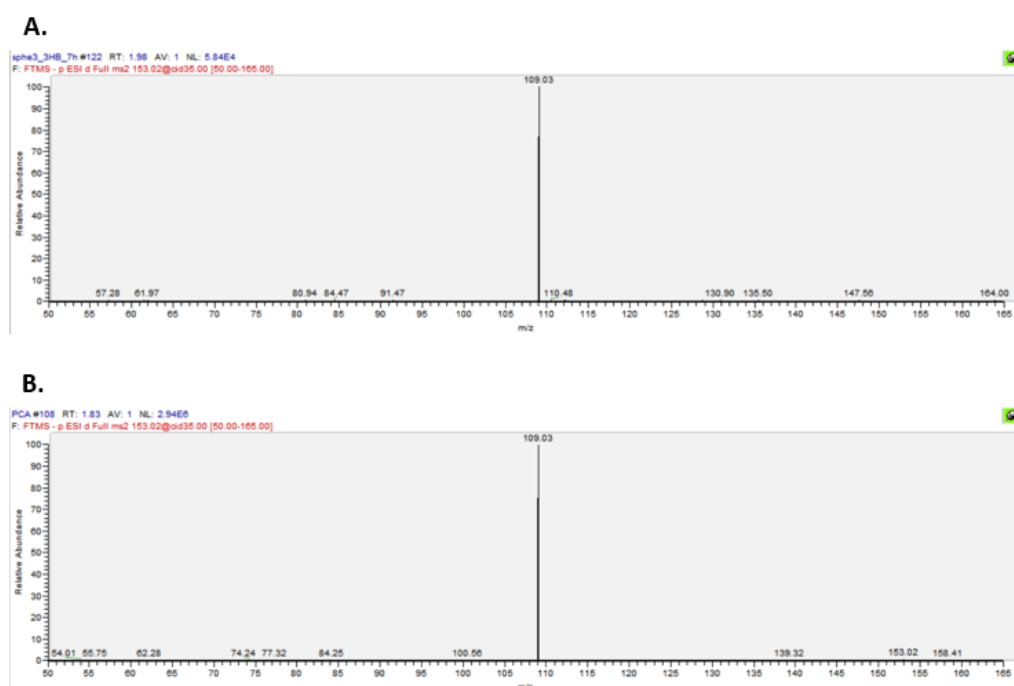
Στα δείγματα που προέρχονται από το μέσο της εκθετικής ή την ύστερη εκθετική εντοπίζεται η ένωση με $m/z = 153,0193$ και **R.T. = 1,88 min** (Εικόνα 3.8.2). Αυτός ο μεταβολίτης μπορεί εύκολα να ταυτοποιηθεί ως **PCA** με βάση το R.T. της πρότυπης ένωσης που είναι 1,9 min (Πίνακας 3.7.1). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της Hypersil Gold (100 × 2.1 mm) στήλης όπου το R.T. της ένωσης στα δείγματα είναι 3,2 min και είναι ταυτόσημο με το R.T. του προτύπου (Πίνακας 3.7.2).





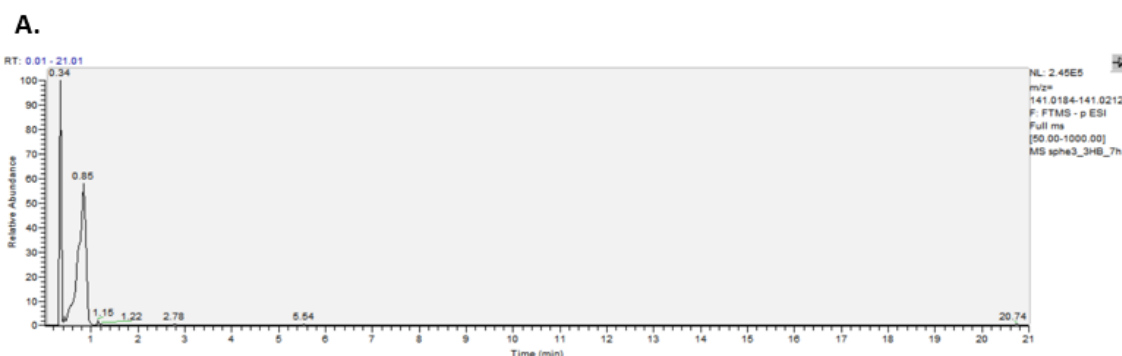
Εικόνα 3.8.2: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 153,0193$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA). Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 153,0195.

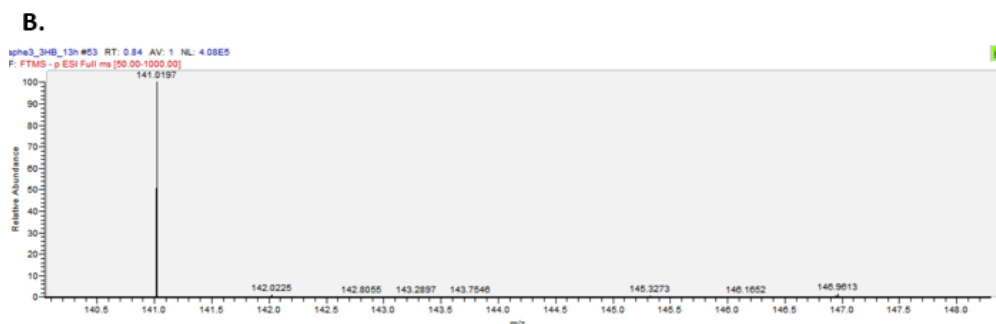
Το MS/MS φάσμα της ένωσης ταυτίζεται επίσης με εκείνο του πρότυπου διαλύματος PCA (Εικόνα 3.8.3). Το $m/z = 109,03$ αντιστοιχεί στην απώλεια της καρβοξυλικής ομάδας ($-COO$) του PCA.



Εικόνα 3.8.3: Α. MS/MS φάσμα της κορυφής με R.T. = 1,88 min. Β. MS/MS φάσμα του πρότυπου διαλύματος PCA. Και στις δύο περιπτώσεις το μόνο θραύσμα είναι αυτό με $m/z = 109,03$.

Σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης εντοπίζεται ακόμη ένας μεταβολίτης με $m/z = 141,0193$ με R.T. = 0,67-0,85 min (Εικόνα 3.8.4) ενώ σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, εκτός της ύστερης στατικής, εντοπίζεται και ο μεταβολίτης με $m/z = 185,0091$ και R.T. = 0,57 min (Εικόνα 3.8.5).

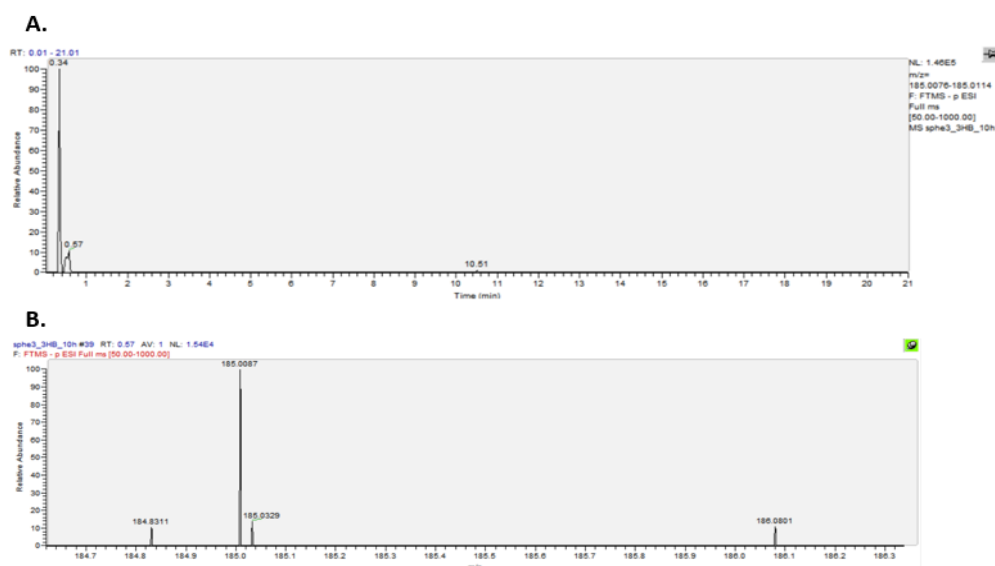




Εικόνα 3.8.4: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 141,0193$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 141,0197.

Το $m/z = 141,0193$ μπορεί να αντιστοιχηθεί στις εξής ενώσεις:

- i. *cis,cis*-4-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη → προϊόν της 1,2-διοξυγονάσης της υδροκινόνης
- ii. *cis,cis*-μουκονικό οξύ → προϊόν της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης
- iii. (+)-μουκονολακτόνη → μονοπάτι της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης
- iv. 3-οξοαδιπικό → μονοπάτι της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης
- v. 2- υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη → προϊόν της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης



Εικόνα 3.8.5: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 185,0091$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 185,0087.

Το $m/z = 185,0091$ μπορεί να αντιστοιχηθεί στις ενώσεις:

- i. 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη → προϊόν PCD45
- ii. 2-υδρόξυ-2-υδροπυρον-4,6-δικαρβοξυλικό → μονοπάτι της PCD45
- iii. β-καρβόξυ-*cis,cis*-μουκονικό → προϊόν της PCD34
- iv. γ-καρβόξυ-μουκονολακτόνη → μονοπάτι της PCD34
- v. μηλοπυροσταφυλικό → προϊόν της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού
- vi. 3-φουμάρυλπυροσταφυλικό → μονοπάτι της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού
- vii. 3-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη → προϊόν της 3,4-διοξυγονάσης του πυροκατεχοϊκού.

Στον Πίνακα 3.8.3 που ακολουθεί δίνονται συνοπτικά τα μοριακά ιόντα που εντοπίζονται στα δείγματα από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων **Sphe3** σε **3HB**, οι χρόνοι κατακράτησης κάθε μοριακού ιόντος στις στήλες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι καταβολικές πορείες όπου απαντώνται.

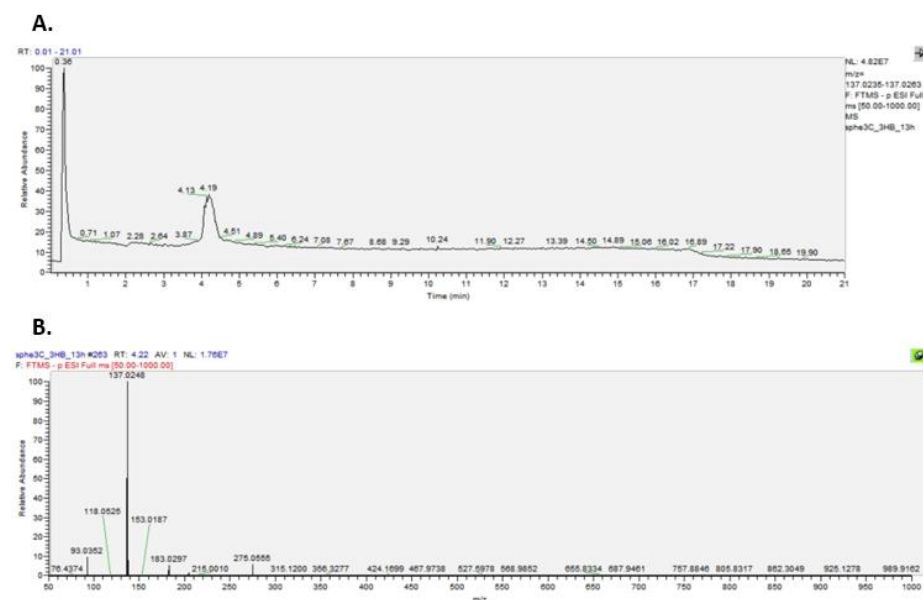
Κάθε μοριακό ιόν μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορετικές ενώσεις οι οποίες έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο. Στον πίνακα δίνονται τόσο οι μοριακοί τύποι των ενώσεων μετά την απώλεια ενός H^+ , όσο και οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να αντιστοιχούν στους τύπους αυτούς.

Πίνακας 3.8.3: Μεταβολίτες που εντοπίζονται στα δείγματα από καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3* σε 3HB. Οι διαφορετικοί χρόνοι κατακράτησης (R.T.) αντιστοιχούν στα R.T. κάθε μεταβολίτη στις στήλες Fortis H2O και Hypersil GOLD που χρησιμοποιήθηκαν.

m/z	Μοριακός Τύπος (M-H)	R.T. (min)		Ένωση	Καταβολική Πορεία	Εκθετική	Ύστερη εκθετική	Στατική	Ύστερη στατική
		Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)						
137,0244	C7H5O3	4,07	6	3HB	Υπόστρωμα καλλιέργειας	+	+	+	+
141,0193	C6H5O4	0,67-0,85	1,31-1,37	cis,cis-4-hydroxymuconate semialdehyde	1,2-διοξυγονάση υδροκινόνης	+	+	+	+
				cis,cis-muconate	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				(+)-muconolactone	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				3-oxoadipate	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				2-hydroxymuconate semialdehyde	2,3-διοξυγονάση κατεχόλης				
153,0193	C7H5O4	1,88	3,2	PCA	-	+	+	+	-
				Gentisate	-				
				Pyrocatechuate	-				
185,0091	C7H5O6	0,57	0,7	4-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	4,5-διοξυγονάση PCA	+	+	+	-
				2-hydroxy-2-hydropyrone-4,6-dicarboxylate	4,5-διοξυγονάση PCA				
				β-carboxy-cis,cis-muconate	3,4-διοξυγονάση PCA				
				γ-carboxymuconolactone	3,4-διοξυγονάση PCA				
				2-carboxy-2,5-dihydro-5-oxofuran-2-acetate	3,4-διοξυγονάση PCA				
				maleylpyruvate	1,2-διοξυγονάση γεντισικού				
				3-fumarylpyruvate	1,2-διοξυγονάση γεντισικού				
				3-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	3,4-διοξυγονάση πυροκατεχοϊκού				

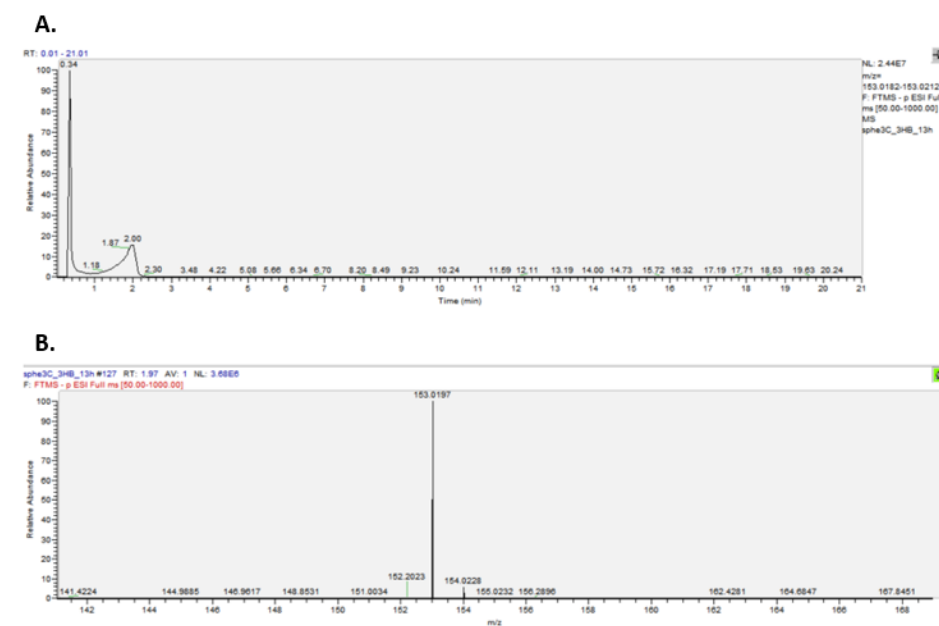
3.8.1.2 Sphe3c

Αντίστοιχα με τα δείγματα από διάφορες φάσεις της καλλιέργειας Sphe3, στα δείγματα που προέρχονται από καλλιέργεια κυττάρων που έχουν χάσει το πλασμίδιο pASPHE301, Sphe3c, σε 3HB εντοπίστηκε σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης η ένωση με $m/z = 137,0244$ και **R.T. = 4,2 min** (Εικόνα 3.8.6). Τόσο το μοριακό ιόν όσο και το R.T. αντιστοιχεί και εδώ στο **3HB**.



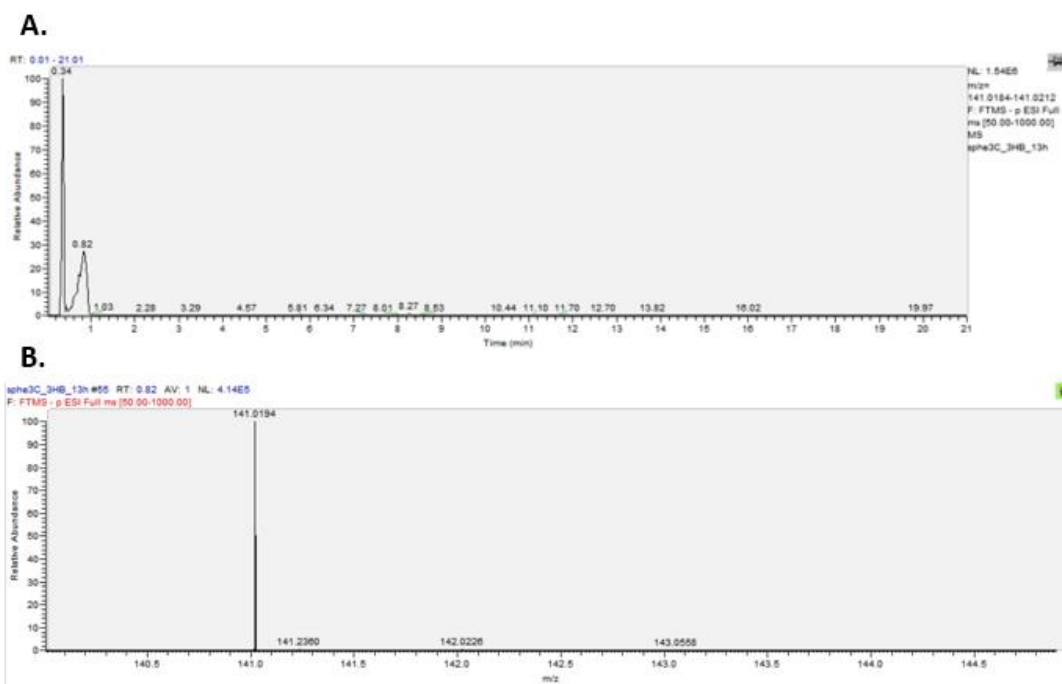
Εικόνα 3.8.6: **A.** LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 137,0244$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος 3HB. **B.** Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 137,0248.

Και στην περίπτωση των Sphe3c κυττάρων η ένωση με $m/z = 153,0193$ και **R.T. = 2 min** (Εικόνα 3.8.7) εντοπίζεται στην εκθετική (μέσο και ύστερη) φάση ανάπτυξης και μπορεί να αντιστοιχηθεί στο **PCA** με βάση όσα αναφέρθηκαν και προηγουμένως (βλ. Sphe3)

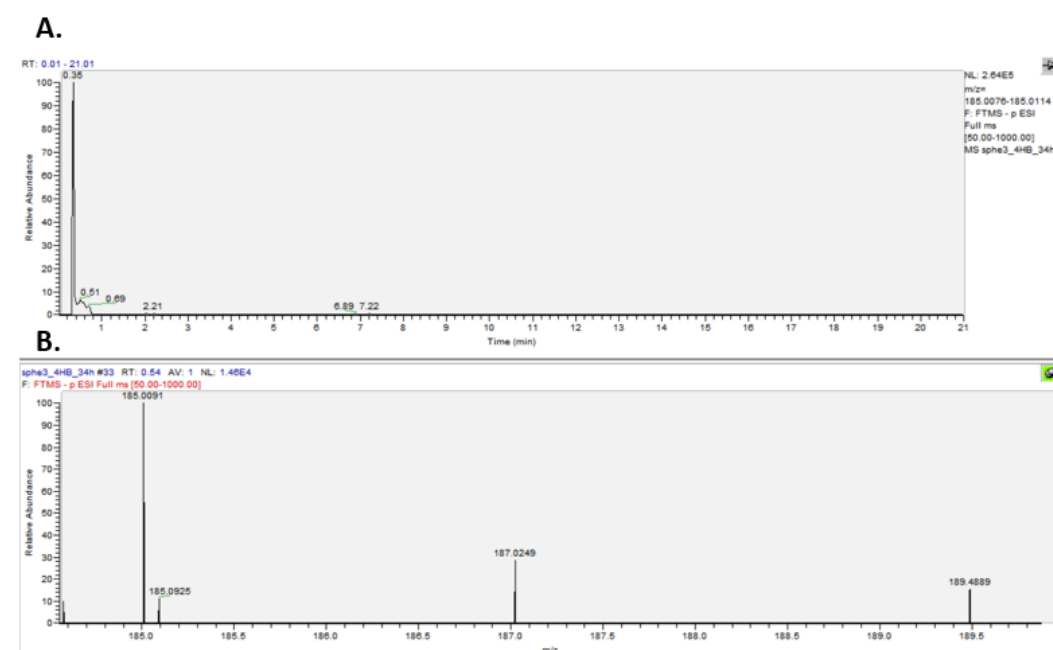


Εικόνα 3.8.7: **A.** LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 153,0193$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA). **B.** Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 153,0195.

Σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης εντοπίζεται και εδώ οι ένωση με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 0,8 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.8) αλλά και η ένωση με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,54 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.9).



Εικόνα 3.8.8: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 141,0193$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 141,0197.



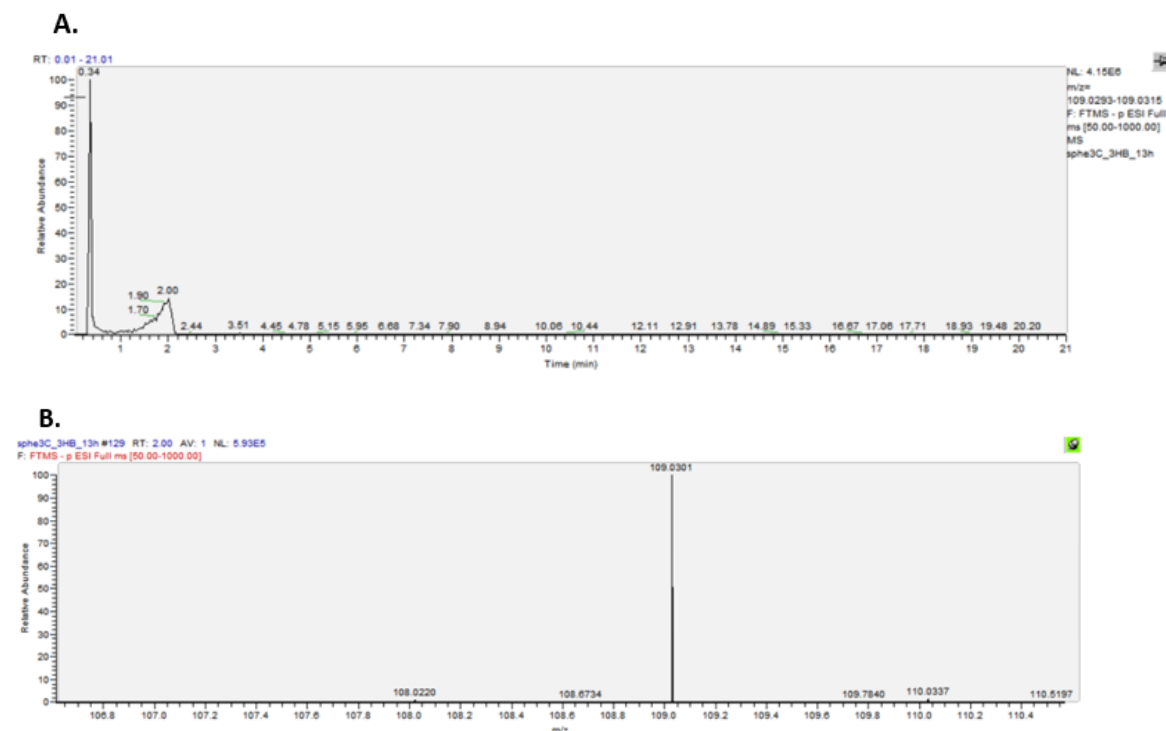
Εικόνα 3.8.9: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 185,0091$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 185,0087.

Επιπλέον των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στα δείγματα από την καλλιέργεια *Srhe3* σε 3HB, στα δείγματα από καλλιέργεια *Srhe3c* εντοπίζονται τρεις επιπλέον ενώσεις.

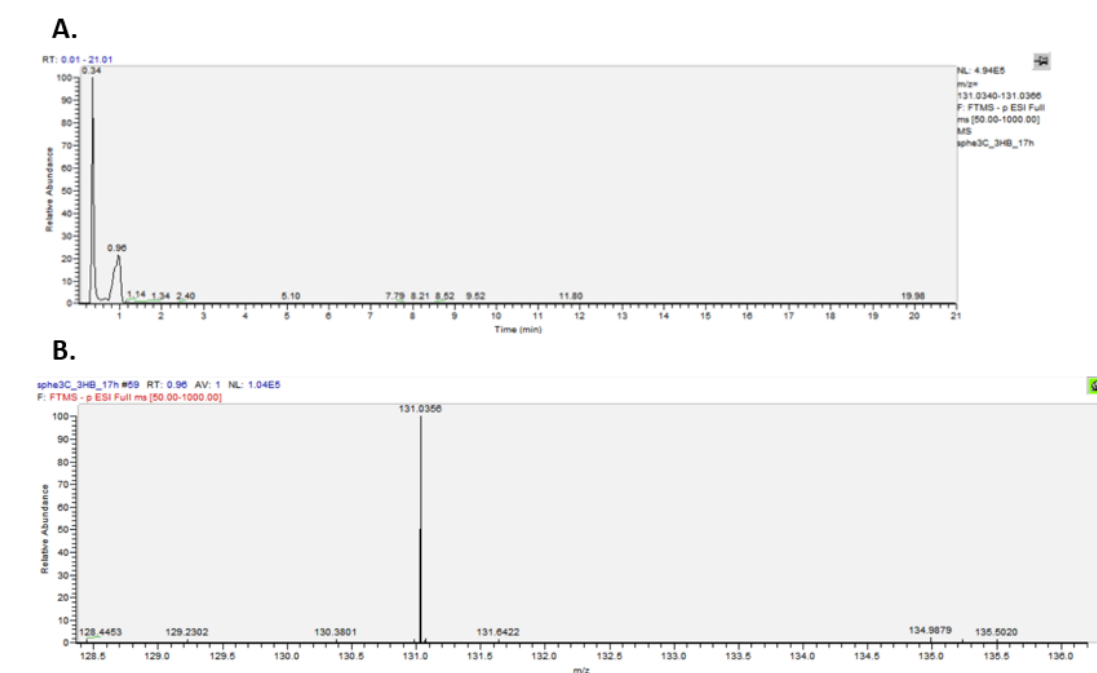
Κατά την εκθετική φάση εντοπίζεται μεταβολίτης με $m/z = 109,0295$ και $R.T. = 2 \text{ min}$ στη στήλη Fortis H₂O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) (Εικόνα 3.8.10) και $R.T. = 3 \text{ min}$ στην Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm). Σύμφωνα με τα R.T. των πρότυπων διαλυμάτων κατεχόλης και

υδροκινόνης (βλ. Πίνακα 3.8.2), ο προαναφερθέν μεταβολίτης μπορεί να ταυτοποιηθεί ως κατεχόλη.

Κατά τη στατική και ύστερη στατική εντοπίζεται η ένωση με **$m/z = 131,0349$** και **$R.T. = 0,96$** min (Εικόνα 3.8.11) και αντιστοιχεί στον μεταβολίτη **4-υδρόξυ-2-οξοπεντανοϊκό οξύ** που αποτελεί μέρος των καταβολικών πορειών της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης και της 3,4-διοξυγονάσης του πυροκατεχοϊκού οξέος.



Εικόνα 3.8.10: **A.** LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 109,0295$. Το $R.T.$ προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος κατεχόλης. **B.** Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 109,0301.



Εικόνα 3.8.11: **A.** LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 131,0349$. **B.** Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 131,0359. Το μοριακό αυτό ιόν αντιστοιχεί στον μεταβολίτη 4-υδρόξυ-2-οξοπεντανοϊκό οξύ.

Στον Πίνακα 3.8.4 δίνονται συνοπτικά τα μοριακά ιόντα που εντοπίζονται στα δείγματα από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων **Sphe3c** σε **3HB**, οι χρόνοι κατακράτησης κάθε μοριακού ιόντος καθώς και οι καταβολικές πορείες όπου απαντώνται.

Κάθε μοριακό ιόν μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορετικές ενώσεις που οποίες έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο. Στους πίνακες δίνονται τόσο οι μοριακοί τύποι των ενώσεων μετά την απώλεια ενός H^+ , όσο και οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να αντιστοιχούν στους τύπους αυτούς.

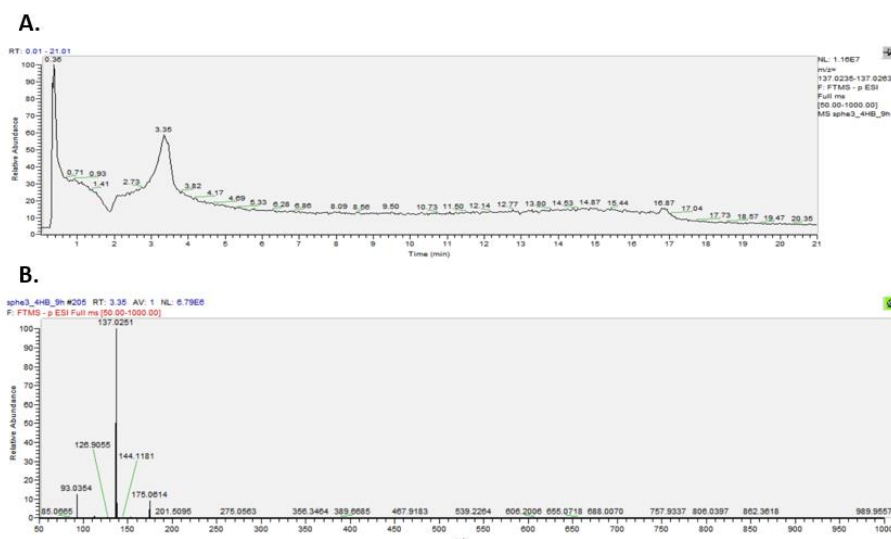
Πίνακας 3.8.4: Μεταβολίτες που εντοπίζονται στα δείγματα από καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3c* σε 3HB. Οι διαφορετικοί χρόνοι κατακράτησης (R.T.) αντιστοιχούν στα R.T. κάθε μεταβολίτη στις στήλες Fortis H2O και Hypersil GOLD που χρησιμοποιήθηκαν.

m/z	Μοριακός Τύπος (M-H) ⁻	R.T. (min)		Ένωση	Καταβολική Πορεία	Εκθετική	Ύστερη εκθετική	Στατική	Ύστερη στατική
		Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)						
109,0295	C6H5O2	1,84	3	catechol	-	+	+	-	-
				hydroquinone	-				
131,0357	C5H7O4	0,96	1,8	4-hydroxy-2-oxopentanoate	2,3-διοξυγονάση κατεχόλης	-	-	+	+
137,0244	C7H5O3	4,07	6	3HB	Υπόστρωμα καλλιέργειας	+	+	+	+
141,0193	C6H5O4	0,67-0,85	1,31-1,37	cis,cis-4-hydroxymuconate semialdehyde	1,2-διοξυγονάση υδροκινόνης	+	+	+	+
				cis,cis-muconate	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				(+)-muconolactone	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				3-oxoadipate	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης				
				2-hydroxymuconate semialdehyde	2,3-διοξυγονάση κατεχόλης				
153,0193	C7H5O4	1,88	3,2	PCA	-	+	+	+	-
				Gentisate	-				
				Pyrocatechuate	-				
185,0091	C7H5O6	0,57	0,7	4-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	4,5-διοξυγονάση PCA	+	+	+	-
				2-hydroxy-2-hydropyrone-4,6-dicarboxylate	4,5-διοξυγονάση PCA				
				θ-carboxy-cis,cis-muconate	3,4-διοξυγονάση PCA				
				γ-carboxymuconolactone	3,4-διοξυγονάση PCA				
				2-carboxy-2,5-dihydro-5-oxofuran-2-acetate	3,4-διοξυγονάση PCA				
				maleylpyruvate	1,2-διοξυγονάση γεντισικού				
				3-fumarylpyruvate	1,2-διοξυγονάση γεντισικού				
				3-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	3,4-διοξυγονάση πυροκατεχοϊκού				
					3,4-διοξ. πυροκατεχοϊκού				

3.8.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών σε καλλιέργεια *Srhe3* και *Srhe3c* με μοναδική πηγή άνθρακα το 4HB

3.8.2.1 *Srhe3*

Στα δείγματα που προέρχονται από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων *Srhe3* σε 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, εντοπίστηκε σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης η ένωση με **$m/z = 137,0244$** και **R.T. = 3,3 min** [στήλη Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)] (Εικόνα 3.8.12) ή **5,18 min** [στήλη Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)]. Με βάση την ομοιότητα των R.T. και στις δυο περιπτώσεις ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποιείται ως 4HB.



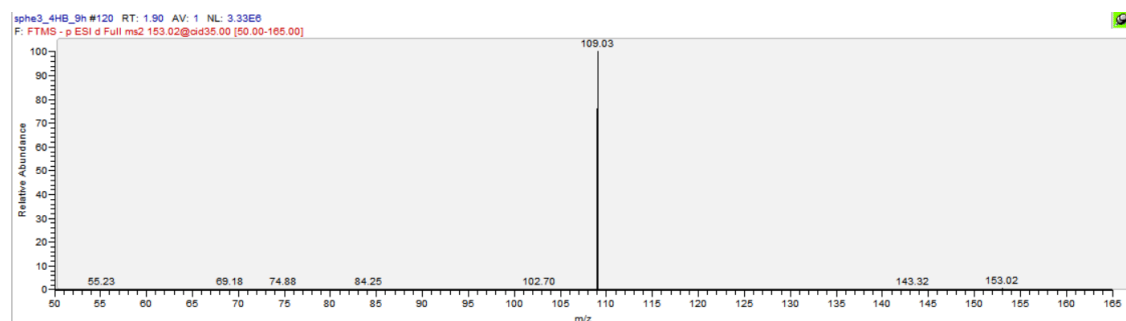
Εικόνα 3.8.12: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 137,0244$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος 4HB. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 137,0251.

Στην εκθετική φάση αλλά και στην αρχή της στατικής εντοπίζεται ο μεταβολίτης με **$m/z = 153,0193$** και **R.T. = 1,87 min** (Εικόνα 3.8.13) [R.T. = 3,11 στη Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)] ο οποίος όπως αναλύθηκε ανωτέρω αντιστοιχεί στο PCA σύμφωνα και με τα R.T. του πρότυπου διαλύματος.



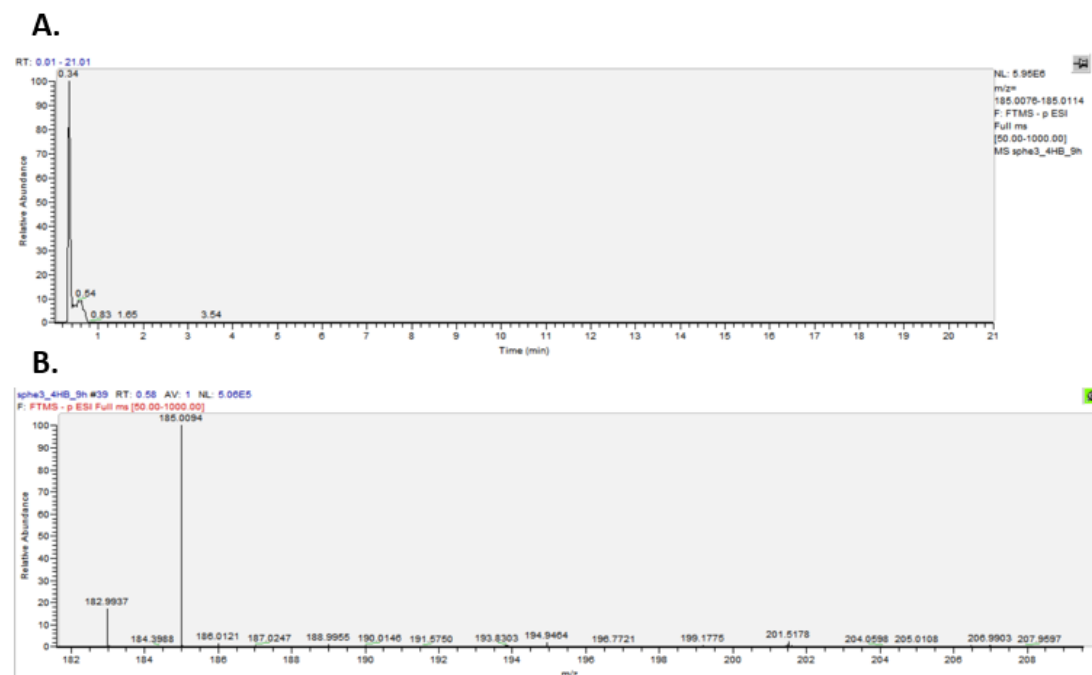
Εικόνα 3.8.13: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 153,0193$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA). Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 153,0195.

Το φάσμα MS/MS της ένωσης (Εικόνα 3.8.14) που ταυτίζεται με εκείνο του πρότυπου PCA αποτελεί περαιτέρω ένδειξη ότι ο προαναφερθέν μεταβολίτης είναι το PCA. Πιο συγκεκριμένα το μοναδικό θραύσμα στο $m/z = 109,02$ αντιστοιχεί στην απώλεια μιας καρβοξυλομάδας ($-\text{COO}^-$) όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.



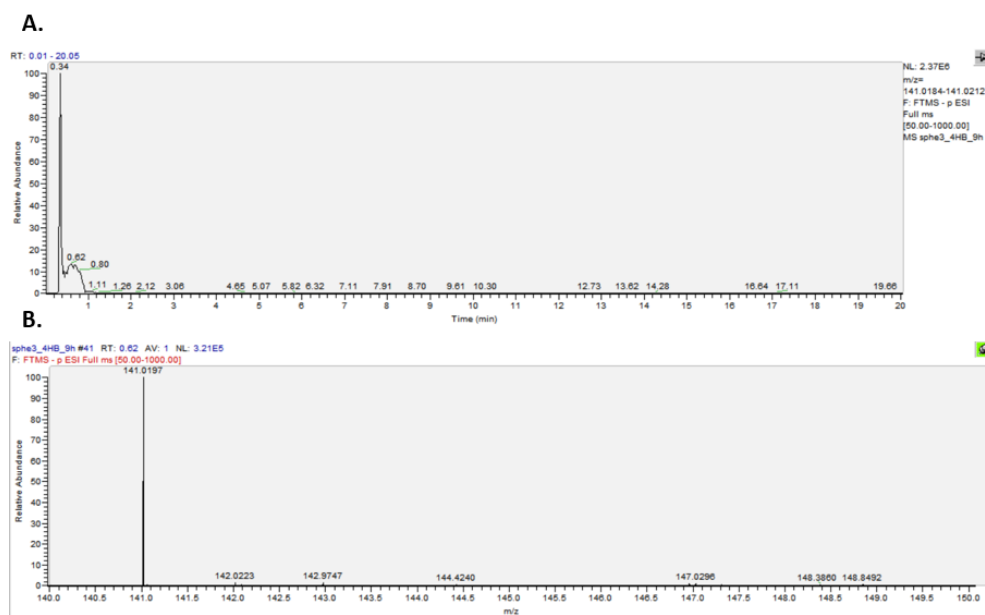
Εικόνα 3.8.14: MS/MS φάσμα της κορυφής με $R.T = 1,87 \text{ min}$ με μόνο θραύσμα αυτό με $m/z = 109,03$.

Σε κάθε φάση ανάπτυξης εντοπίζεται και στη συγκεκριμένη περίπτωση τόσο ο μεταβολίτης με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,54 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.15) όσο και ο μεταβολίτης με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 0,62 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.16).



Εικόνα 3.8.15: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 185,0091$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 185,0094.

Σε αντίθεση με την ανάπτυξη των κυττάρων σε 3HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας όπου ο μεταβολίτης με $m/z = 109,0295$ εντοπίζεται μόνο σε δείγματα από καλλιέργεια του μεταλλαγμένου στελέχους, *Srhe3c*, ο μεταβολίτης αυτός εντοπίζεται τόσο στα *Srhe3* όσο και στα *Srhe3c* κύτταρα σε καλλιέργεια με πηγή άνθρακα και ενέργειας το 4HB. Και στην περίπτωση του υποστρώματος 4HB το $R.T.$ της ένωσης αυτής ταυτίζεται με εκείνο της πρότυπης ένωσης κατεχόλης και κυμαίνεται στα **1,8-2 min [3 min]** στην Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) (Εικόνα 3.8.17).

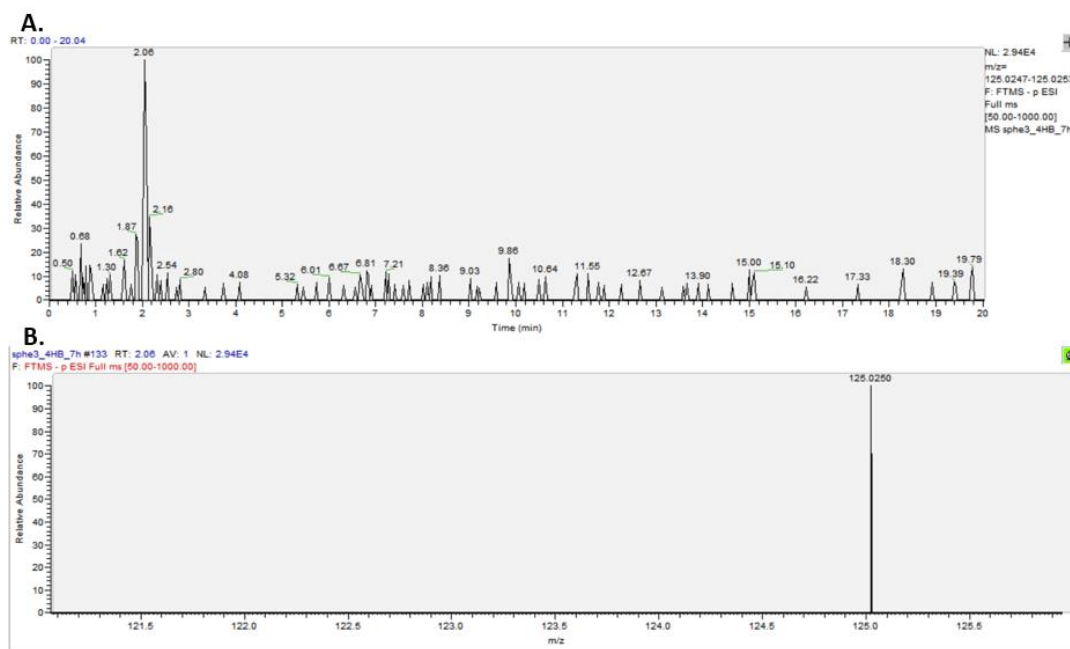


Εικόνα 3.8.16: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 141,0193$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 141,0197.

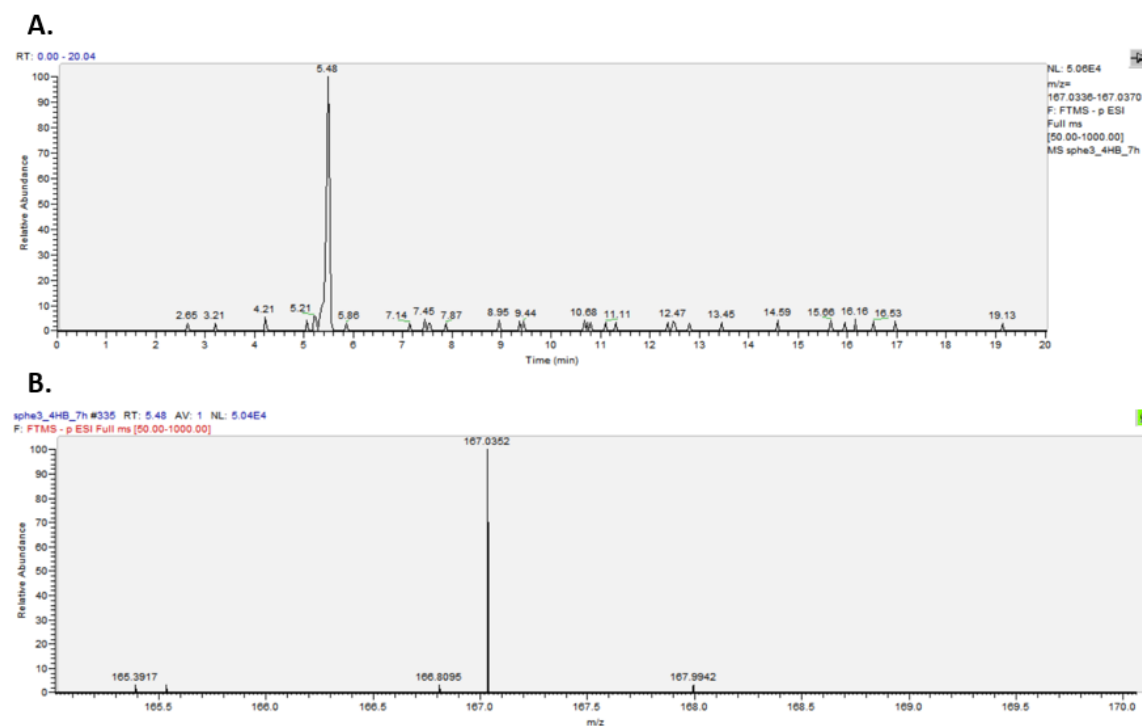


Εικόνα 3.8.17: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 109,0295$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος κατεχόλης. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 109,0302.

Σε υπόστρωμα 4HB απαντώνται δύο κορυφές που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και δεν εντοπίστηκαν σε κανένα δείγμα όταν το υπόστρωμα της καλλιέργειας ήταν το 3HB. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τον μεταβολίτη με $m/z = 125,0244$ και **R.T. = 2,06 min** και ο οποίος αντιστοιχεί στην ένωση υδροξυκινόλη (1,2,4-βενζενετριόλη) (Εικόνα 3.8.18), και για τον μεταβολίτη με $m/z = 167,0349$ και **R.T. = 5,48 min** [7,27 min στη Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)] (Εικόνα 3.8.19). Όσον αφορά στον μεταβολίτη αυτό, θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί είτε στο ομοπρωτοκατεχοϊκό είτε στο ομογεντισικό (σύμφωνα με τον μοριακό τους τύπο), όμως με κριτήριο το R.T. της πρότυπης ένωσης ομοπρωτοκατεχοϊκού οξέος (3,8 min) ο μεταβολίτης ταυτοποιείται ως ομογεντισικό.



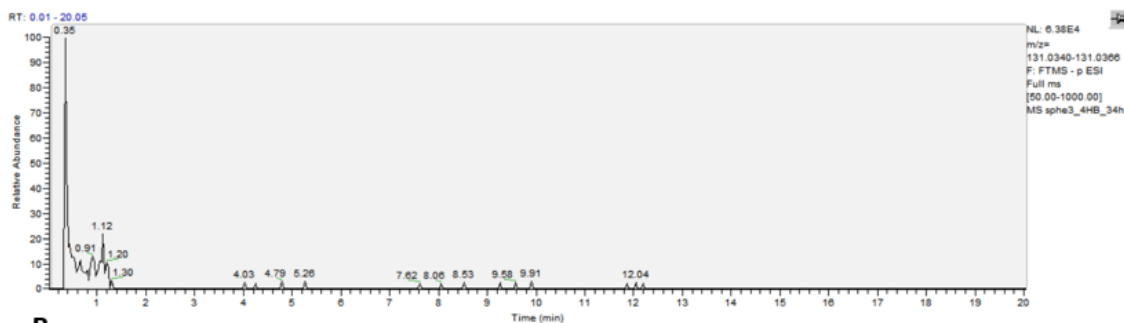
Εικόνα 3.8.18: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 125,0250$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 125,0250. Με βάση το m/z η ένωση ταυτοποιείται ως 1,2,4-βενζενετριόλη.



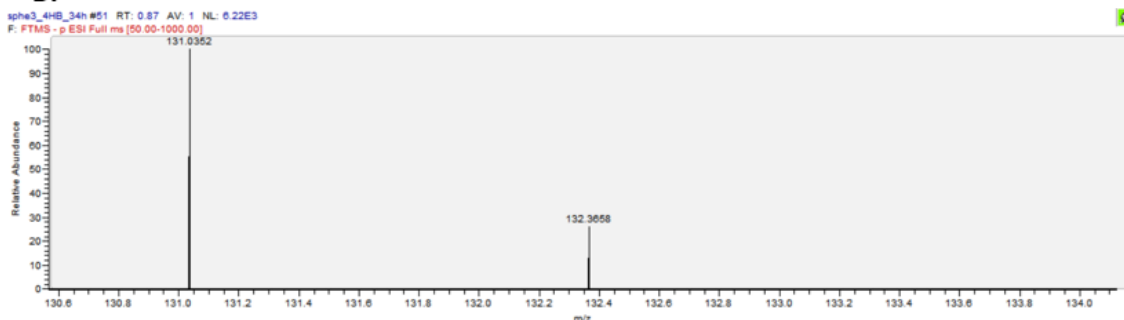
Εικόνα 3.8.19: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 167,0349$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 167,0252. Με βάση το m/z και το R.T. η ένωση ταυτοποιείται ως ομογεντισικό.

Τέλος εντοπίζεται και ο μεταβολίτης $m/z = 131,0349$ και R.T. = 0,8 min και ο οποίος ταυτοποιείται, όπως έχει προαναφερθεί, ως 4-υδρόξυ-2-οξοπεντανοϊκό οξύ (Εικόνα 3.8.20).

A.



B.



Εικόνα 3.8.20: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 131,0349$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 131,0359. Το μοριακό αυτό ιόν αντιστοιχεί στον μεταβολίτη 4-υδροξυ-2-οξοπεντανοϊκό οξύ.

Στον Πίνακα 3.8.5 δίνονται συνοπτικά τα μοριακά ιόντα που εντοπίζονται στα δείγματα από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων **Sphe3** σε **4HB**, οι χρόνοι κατακράτησης κάθε μοριακού ιόντος σε κάθε στήλη καθώς και οι καταβολικές πορείες όπου απαντώνται.

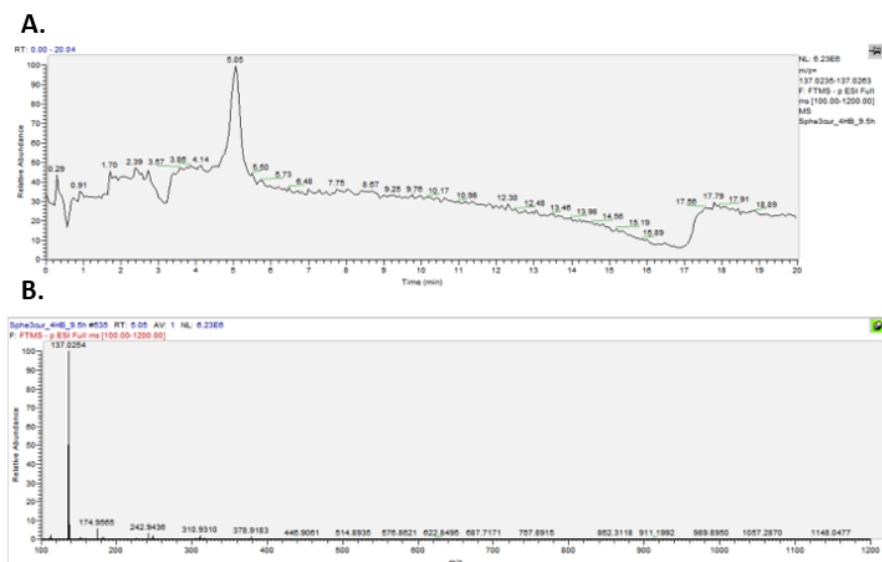
Κάθε μοριακό ιόν μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορετικές ενώσεις που οποίες έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο. Στον πίνακα δίνονται τόσο οι μοριακοί τύποι των ενώσεων μετά την απώλεια ενός H^+ , όσο και οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να αντιστοιχούν στους τύπους αυτούς.

Πίνακας 3.8.5: Μεταβολίτες που εντοπίζονται στα δείγματα από καλλιέργεια κυττάρων *Sph3* σε 4HB .

m/z	(M-H) ⁻	R.T. (min)		Ένωση	Καταβολική Πορεία	Εκθετική	Ύστερη εκθετική	Στατική	Ύστερη στατική
		Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)						
109,0295	C6H5O2	1,84	3	catechol	-	+	+	-	-
				hydroquinone	-				
125,0250	C6H5O3	2,06	-	hydroxyquinol	-	+	-	-	-
131,0357	C5H7O4	0,91-1,2	1,78	4-hydroxy-2-oxopentanoate	2,3-διοξ. κατεχόλης 3,4-διοξ. πυροκατεχοϊκού	-	-	+	+
137,0244	C7H5O3	3,3	5,18	3HB	-	+	+	+	+
141,0193	C6H5O4	0,62	1,34	cis,cis-4-hydroxymuconate semialdehyde	1,2-διοξ. υδροκινόνης	+	+	+	+
				cis,cis-muconate	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				(+)-muconolactone	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				3-oxoadipate	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				2-hydroxymuconate semialdehyde	2,3-διοξ. κατεχόλης				
153,0193	C7H5O4	1,88	3,1-3,27	PCA	-	+	+	-	-
				Gentisate	-				
				Pyrocatechuate	-				
167,0349	C8H6O4	5,48	7,27	homoprotocatechuate	-	+	+	-	-
				homogentisate					
185,0091	C7H5O6	0,54	0,67	4-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	4,5-διοξ. PCA	+	+	+	-
				2-hydroxy-2-hydroxypyrone-4,6-dicarboxylate	4,5-διοξ. PCA				
				6-carboxy-cis,cis-muconate	3,4-διοξ. PCA				
				γ-carboxymuconolactone	3,4-διοξ. PCA				
				2-carboxy-2,5-dihydro-5-oxofuran-2-acetate	3,4-διοξ. PCA				
				maleylpyruvate	1,2-διοξ. γεντισικού				
				3-fumarylpyruvate	1,2-διοξ. γεντισικού				
				3-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	3,4-διοξ. πυροκατεχοϊκού				

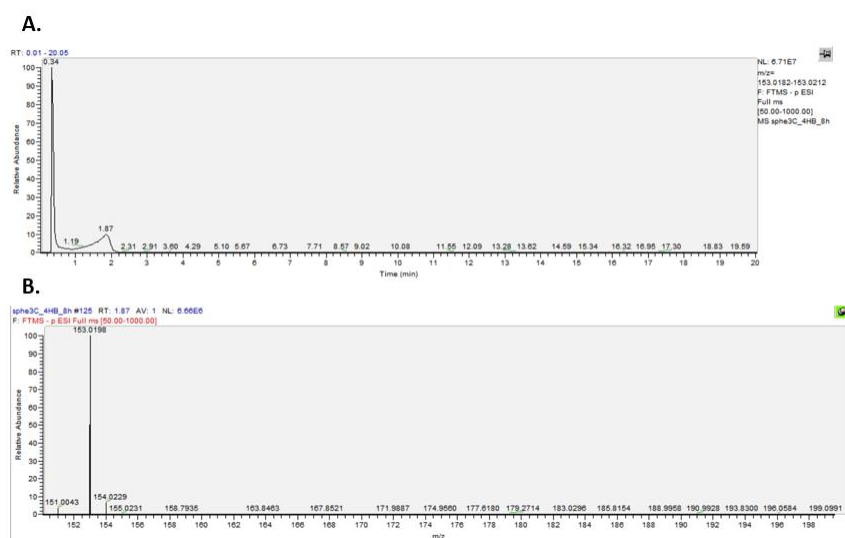
3.8.2.2 Sphe3c

Στα δείγματα που προέρχονται από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων Sphe3c σε 4-υδρόξυβενζοϊκό οξύ, εντοπίστηκε σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης η ένωση με **$m/z = 137,0244$** και **R.T. = 3,3 min** [στήλη Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)] (Εικόνα 3.8.21) ή **5,05 min** [στήλη Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)] που όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο αντιστοιχεί στην πηγή άνθρακα και ενέργειας της καλλιέργειας, το 4HB.



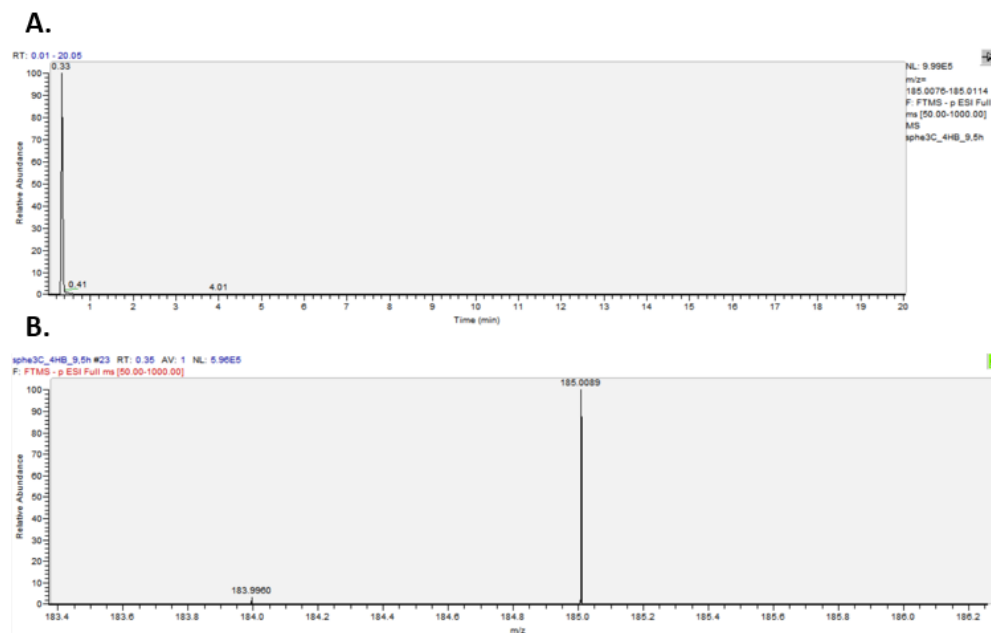
Εικόνα 3.8.21: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 137,0244$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος 4HB. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 137,0251.

Αντίστοιχα με τα αγρίου τύπου κύτταρα Sphe3 και στην περίπτωση των μεταλλαγμένων κυττάρων Sphe3c εντοπίζεται ο μεταβολίτης με **$m/z = 153,0193$** και **R.T. = 1,9 min** (Εικόνα 3.8.22) [R.T. = 3,11 Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)]. Το γεγονός ότι δεν αλλάζει ο χρόνος κατακράτησης υποδεικνύει ότι και στην περίπτωση των Sphe3c κυττάρων σε 4HB, ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποιείται ως PCA.

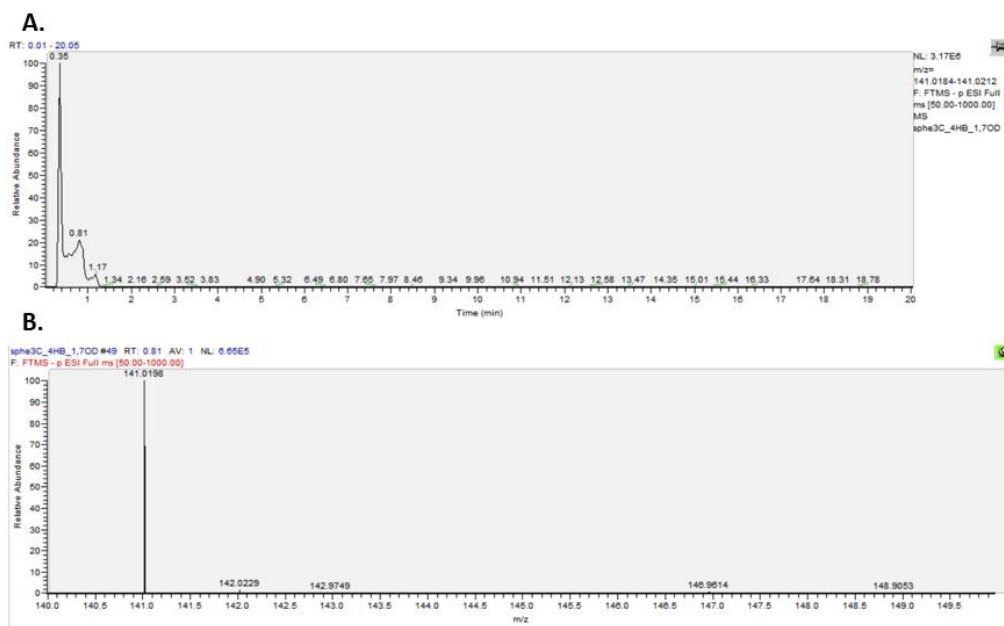


Εικόνα 3.8.22: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 153,0193$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος πρωτοκατεχοϊκού οξέος (PCA). B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 153,0195.

Σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης εντοπίζεται και στην περίπτωση των Sphe3c κυττάρων τόσο ο μεταβολίτης με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,35 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.23) όσο και ο μεταβολίτης με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 0,81-1,17 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.24).

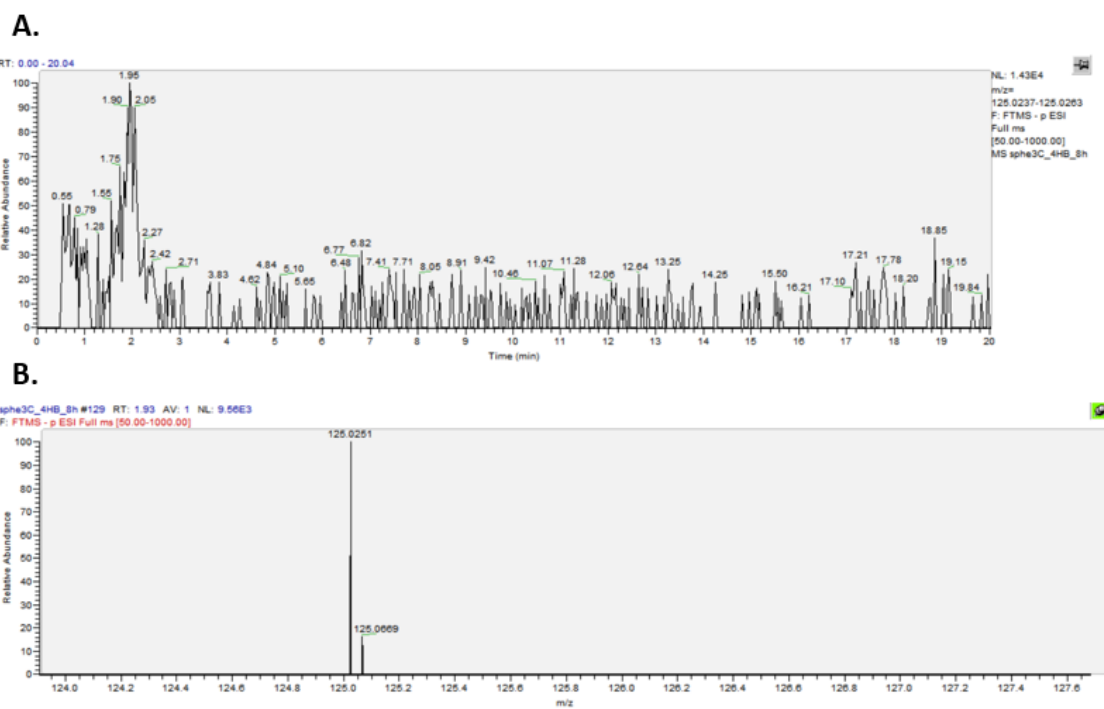


Εικόνα 3.8.23: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 185,0091$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 185,0089.



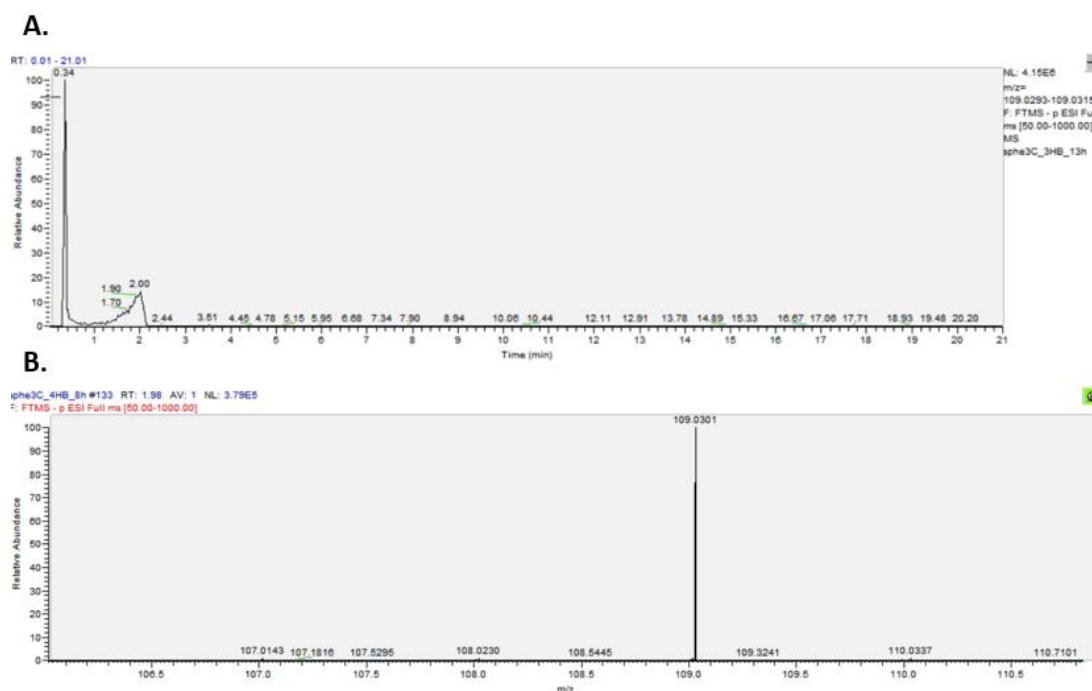
Εικόνα 3.8.24: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 141,0193$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος 141,0198.

Και στα κύτταρα Sphe3c κατά την μέση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ανιχνεύεται (σε χαμηλή σχετικά συγκέντρωση) ο μεταβολίτης με $m/z = 125,0250$ και $R.T. = 1,96 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.25) που αντιστοιχεί στην ένωση 1,2,4-βενζενετριόλη (υδροξυκινόλη).



Εικόνα 3.8.25: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 125,0250$. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος $125,0250$. Με βάση το m/z η ένωση ταυτοποιείται ως 1,2,4-βενζενετριόλη.

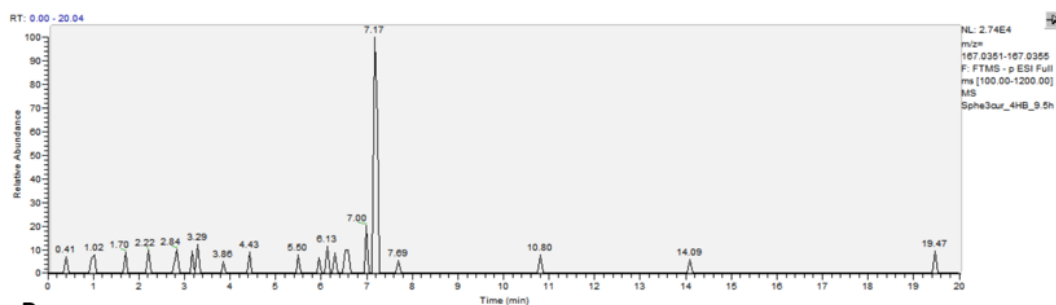
Ανιχνεύεται επίσης ο μεταβολίτης με $m/z = 109,0295$ και **R.T. = 2 min** (Εικόνα 3.8.26) που ταυτοποιείται ως κατεχόλη σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί.



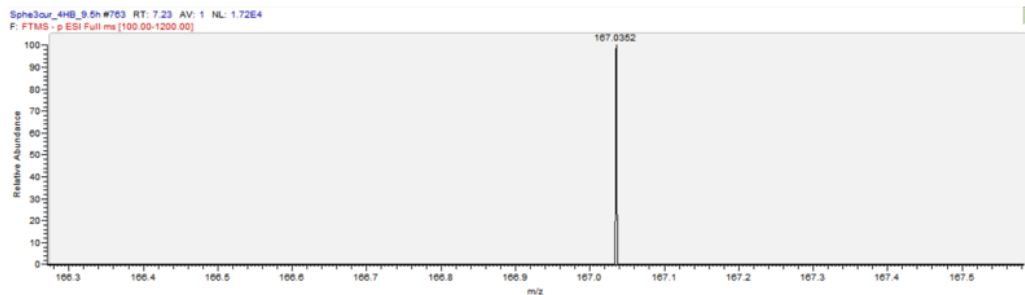
Εικόνα 3.8.26: Α. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 109,0295$. Το R.T. προσεγγίζει εκείνο του πρότυπου διαλύματος κατεχόλης. Β. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος $109,0301$.

Τέλος στα δείγματα από την εκθετική φάση της ανάπτυξης του Sphe3c ανιχνεύεται ο μεταβολίτης με $m/z = 167,0349$ και **R.T. = 7,27 min** (Εικόνα 3.8.27) ο οποίος ταυτοποιείται ως ομογεντισικό οξύ, σύμφωνα με το R.T. του και τα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως (Παράγραφος 3.8.2.1).

A.



B.



Εικόνα 3.8.27: A. LC-MS χρωματογράφημα της ένωσης με $m/z = 167,0349$. B. Φάσμα MS του μοριακού ιόντος $167,0252$. Με βάση το m/z και το R.T. η ένωση ταυτοποιείται ως ομογεντισικό.

Στον Πίνακα 3.8.6 δίνονται συνοπτικά τα μοριακά ιόντα που εντοπίζονται στα δείγματα από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων **Sphe3c** σε **4HB**, οι χρόνοι κατακράτησης κάθε μοριακού ιόντος για κάθε στήλη που χρησιμοποιήθηκε καθώς και οι καταβολικές πορείες όπου απαντώνται.

Κάθε μοριακό ιόν μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορετικές ενώσεις που οποίες έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο. Στον πίνακα δίνονται τόσο οι μοριακοί τύποι των ενώσεων μετά την απώλεια αυτούς H^+ , όσο και οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να αντιστοιχούν αυτούς τύπους αυτούς.

Πίνακας 3.8.6: Μεταβολίτες που εντοπίζονται στα δείγματα από καλλιέργεια κυττάρων *Sph3c* σε 4HB.

m/z	(M-H) ⁻	R.T. (min)		Ένωση	Καταβολική Πορεία	Εκθετική	Ύστερη εκθετική	Στατική	Ύστερη στατική
		Fortis H2O (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Hypersil GOLD (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)						
109,0295	C ₆ H ₅ O ₂	2	3	catechol	-	+	+	+	-
				hydroquinone	-				
125,0250	C ₆ H ₅ O ₃	1.96	-	hydroxyquinol	-	+	-	-	-
137,0244	C ₇ H ₅ O ₃	3,3	5,05	3HB	-	+	+	+	+
141,0193	C ₆ H ₅ O ₄	0,79-1,17	1,34	cis,cis-4-hydroxymuconate semialdehyde	1,2-διοξ. υδροκινόνης	+	+	+	+
				cis,cis-muconate	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				(+)-muconolactone	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				3-oxoadipate	1,2-διοξ. κατεχόλης				
				2-hydroxymuconate semialdehyde	2,3-διοξ. κατεχόλης				
153,0193	C ₇ H ₅ O ₄	1,9	3,11	PCA	-	+	+	+	+
				Gentisate	-				
				Pyrocatechuate	-				
167,0349	C ₈ H ₆ O ₄	5,48	7,27	homoprotocatechuate	-	+	+	-	-
				homogentisate					
185,0091	C ₇ H ₅ O ₆	0,35	0,79	4-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	4,5-διοξ. PCA	+	+	+	+
				2-hydroxy-2-hydropyrone-4,6-dicarboxylate	4,5-διοξ. PCA				
				β-carboxy-cis,cis-muconate	3,4-διοξ. PCA				
				γ-carboxymuconolactone	3,4-διοξ. PCA				
				2-carboxy-2,5-dihydro-5-oxofuran-2-acetate	3,4-διοξ. PCA				
				maleylpyruvate	1,2-διοξ. γεντισικού				
				3-fumarylpyruvate	1,2-διοξ. γεντισικού				
				3-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde	3,4-διοξ. πυροκατεχοϊκού				

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη των διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού δακτυλίου του PCA του Sphe3

4.1.1 Ετερόλογη έκφραση και μελέτη της PCD45 μέσω φασματοσκοπίας UV/Vis και NMR

4.1.1.1 *In situ παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων της PCD45 στον βιοαντιδραστήρα NMR με υποστρώματα PCA και GA και ταυτοποίηση των προϊόντων*

Στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής μου διατριβής η 4,5-διοξυγονάση του PCA (PCD45) εκφράστηκε ετερόλογα σε κύτταρα BL12 (DE3), καθαρίστηκε μέσω χρωματογραφίας αγγιστείας και προσδιορίστηκε η κινητική σταθερής κατάστασης αλλά και οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της. Διαπιστώθηκε επίσης ότι πρόκειται για ένα ένζυμο που παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για το PCA καθώς πέραν αυτού αναγνωρίζει ως υπόστρωμα μόνο το γαλλικό οξύ (GA) (από τα υποστρώματα που είχαν δοκιμαστεί εκείνη την περίοδο).

Κατά την διδακτορική μου διατριβή ολοκληρώθηκε η μελέτη του ενζύμου αυτού καθώς ταυτοποιήθηκαν με βεβαιότητα τα προϊόντα των προαναφερθέντων αντιδράσεων μέσω φασματοσκοπίας NMR. Τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την δρ. Πριμηκύρη Αλεξάνδρα.

Πιο συγκεκριμένα, μέσω πειραμάτων 1D ^1H NMR κατέστη για πρώτη φορά εφικτή η *in situ* παρακολούθηση μιας ενζυμικής αντίδρασης με ελεύθερο ένζυμο. Παρατηρήθηκε ότι μετά από 2 ώρες αντίδρασης είχε καταναλωθεί το 8% του υποστρώματος PCA ενώ 24 ώρες μετά το υπόστρωμα είχε καταναλωθεί πλήρως.

Μέσω αυτών των πειραμάτων επιβεβαιώθηκε ότι το προϊόν της αντίδρασης της PCD45 με το PCA είναι η 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεΐδη (CHMS) και ότι στο διάλυμα της αντίδρασης απαντάται σε δύο ισομορφές: την κετονική και την ενολική. Είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύονται οι δυο ισομορφές με φασματοσκοπία NMR και επιπλέον καθορίζεται η ισορροπία που υπάρχει μεταξύ των δυο αυτών ισομορφών, αν και η ύπαρξη των δύο ισομορφών είχε αναφερθεί στο παρελθόν με μελέτη φασματομετρίας μάζας (Masai et al., 2000; Ribons & Evans, 1962). Η *in situ* παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης με πειράματα STD (saturation-transfer difference) NMR οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της κετονικής και της ενολικής ισομορφής (Παράρτημα Π1.1). Πειράματα ^1H NMR σε διάφορες θερμοκρασίες προσδιόρισαν την ισορροπία των ισομορφών αυτών. Ενώ η κέτο-ισομορφή φαίνεται να ευνοείται ως προς την ενθαλπία, ίσως λόγω των δεσμών υδρογόνου στην καρβονυλική ομάδα, η ισορροπία «γέρνει» προς την ενολική ισομορφή, η οποία είναι και η επικρατούσα, καθώς η κετονική δεν ευνοείται ως προς την εντροπία (Παράρτημα Π1.3) (Tsagogiannis et al., 2021). Είναι γνωστό ότι η ισορροπία μεταξύ ενολικής και κετονικής ισομορφής μιας ένωσης είναι ευαίσθητη και εξαρτάται από την πολικότητα του εκάστοτε διαλύτη και την ικανότητα αυτών να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη (I. Chakraborty et al., 2014). Στην προκειμένη περίπτωση, η ενολική ισομορφή ευνοείται ως προς την εντροπία καθώς σχηματίζει ασθενέστερους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη επιτρέποντας έτσι τη μεγαλύτερη «αταξία» των τελευταίων (Tsagogiannis et al., 2021).

Επίσης, μέσω πειραμάτων 1D ^1H NMR, επιβεβαιώθηκε ότι η PCD45 αναγνωρίζει το GA ως υπόστρωμα και το προϊόν της αντίδρασης είναι το 4-οξαλομεσακονικό οξύ (OMA). Ενώ το προϊόν OMA έχει ταυτοποιηθεί στο παρελθόν μέσω φασματοσκοπίας NMR (Nogales et al.,

2011), για πρώτη φορά επετεύχθη η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, η οποία έδειξε συγκεκριμένα ότι μετά από 24 ώρες η PCD45 είχε καταναλώσει το 60% του υποστρώματος. Εφόσον οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ίδιες με εκείνες με υπόστρωμα PCA προκύπτει ότι η ταχύτητα της αντίδρασης με GA είναι 40% περίπου μικρότερη.

Στις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ελεύθερο και όχι ακινητοποιήσιμο ένζυμο στην *in situ* παρακολούθηση μιας ενζυμικής αντίδρασης στο σωληνάκι NMR και επετεύχθη ένας πλήρης χαρακτηρισμός αυτού και της αντίδρασης που καταλύει, μέσω της συνδυαστικής χρήσης των εργαλείων 1D, 2D, ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C HSQC και HMBC της φασματοσκοπίας NMR. Η βασική διαφορά από αντίστοιχες μελέτες που έχουν προηγηθεί (Chatzikonstantinou et al., 2018, 2020; Primikyri et al., 2018) είναι ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ότι το ελεύθερο ένζυμο δεν υπόκειται στους ενδεχόμενους περιορισμούς του μέσου ακινητοποίησης. Μπορεί να πάρει έτσι τη φυσική του διαμόρφωση, η οποία είναι και ένα απαραίτητο χαρακτηριστικό για την εξέλιξη μιας ενζυμικής βιομετατροπής ως μιας δυναμικής διαδικασίας.

4.1.1.2. Διερεύνηση εύρους υποστρωμάτων της PCD45 μέσω φασματοσκοπίας UV/Vis.

Ένας από τους σκοπούς της παρούσας διατριβής ήταν και η διεύρυνση των υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από την PCD45 μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Σε αυτή τη βάση παρατηρήθηκαν οι αλλαγές στο φάσμα UV/Vis της αντίδρασης του αγρίου τύπου ενζύμου με διάφορα υποστρώματα, ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα σύγκριση αυτών των φασμάτων με εκείνα των αντιδράσεων με τα μεταλλαγμένα ένζυμα.

Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν τα πρωταρχικά πειράματα της μεταπτυχιακής διατριβής όπου η PCD45 από το Sph3 φαίνεται να είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αναγνωρίζει ένα πολύ περιορισμένο εύρος υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα πέραν του PCA η PCD45 φαίνεται να αναγνωρίζει μόνο το γαλλικό οξύ (GA) σαν υπόστρωμα (Tsagogiannis et al., 2021). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα από άλλους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα η 4,5-διοξυγονάση του *C. testosteroni* αναγνωρίζει και αυτή μόνο το GA (Mampel et al., 2005) ενώ η εκείνη του *S. paucimobilis* SYK-6 αναγνωρίζει τόσο το GA όσο και το 3-O-μεθυλγαλλικό οξύ (Barry & Taylor, 2013a).

Πιο αναλυτικά, κατά την ανάλυση των φασμάτων των αντιδράσεων της PCD45 με τα διάφορα υποστρώματα κατανάλωση υποστρώματος παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο και με τα όσα έχουν αναφερθεί προηγουμένως, στα φάσματα της αντίδρασης με το PCA (Εικόνα 3.5.10) και το GA (3.5.11).

Όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το 4-υδρόξυβενζοϊκό οξύ (4HB), εμφανίζεται επίσης μια μικρή μείωση των κορυφών του φάσματος συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης (Εικόνα 3.5.15), ενώ προβληματισμό προκαλεί η πυρογαλλόλη ως υπόστρωμα. Το φάσμα απουσία ενζύμου εμφανίζει αύξηση της απορρόφησης στα ~260nm και στα 350nm συναρτήσει του χρόνου το οποίο οφείλεται σε οξείδωση (Groseclose & Ribbons, 1981). Παρουσία του ενζύμου όμως δεν παρατηρείται αυτή η αύξηση (Εικόνα 3.5.13). Το αν αυτή η διαφορά στο φάσμα της αλληλεπίδρασης οφείλεται σε ενζυμική αντίδραση μένει να αποσαφηνιστεί μέσω ταυτοποίησης του ενδεχόμενου προϊόντος ή παρακολούθηση της αντίδρασης *in situ* στο NMR.

4.1.2 Ετερόλογη έκφραση και χαρακτηρισμός της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (PCD34)

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε επίσης η 3,4-διοξυγονάση του PCA (PCD34), ενός ενζύμου που καταλύει την οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου του PCA μέσω *ortho*-σχάσης μεταξύ των δύο υδροξυλομάδων στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου. Όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 1.1.7 της Εισαγωγής το PCA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ένα από τα βασικά κοινά ενδιάμεσα (όπως η κατεχόλη και το γεντισικό οξύ) του καταβολισμού μιας πληθώρας αρωματικών ενώσεων, όπως προϊόντα το αποπολυμερισμού της λιγνίνης, PAHs και διάφορα άλλα ξενοβιοτικά.

Το *P. phenanthrenivorans* Sphe3 παρουσιάζει το ιδιαίτερο πλεονέκτημα να φέρει στο γονιδιώμα του γονίδια που κωδικοποιούν τόσο την 3,4- όσο και την 4,5-διοξυγονάση του PCA τα οποία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα και στο πλασμίδιο pASphe302 αντίστοιχα.

Μετά την *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του Sphe3 στη βάση δεδομένων του Joint Genome Institute (JGI) εντοπίστηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν την α - και β -υπομονάδα της PCD34. Πιο συγκεκριμένα τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στην παρανοσηματική αλυσίδα του DNA (- strand) στις συντεταγμένες 4139909 με 4140472 (α -υπομονάδα) και 4140485..4141357 (β -υπομονάδα). Το γονίδιο για την α -υπομονάδα (JGI locus tag: Asphe3_38850, A.N.: ADX74973) αποτελείται από 564 bp ενώ αυτό για την β -υπομονάδα (JGI locus tag: Asphe3_38860, A.N.: ADX74974) από 873 bp.

Όπως φαίνεται και από την ομοπαράθεση των αλληλουχιών των α - και β -υπομονάδων της PCD34 με άλλες δημοσιευμένες αλληλουχίες τόσο από Gram (+) όσο και από Gram (-) βακτήρια (Παράγραφος 3.4.3.1), παρατηρείται ένας αρκετά υψηλός βαθμός ομολογίας, ιδιαίτερα στην καταλυτική β -υπομονάδα των ενζύμων. Αυτό έρχεται να προστεθεί σε προηγούμενα ευρήματα από μελέτες που έχουν προηγηθεί (Buchan et al., 2000; Contzen & Stolz, 2000; Eulberg et al., 1998; Hammer et al., 1996; Petersen et al., 1996). Μάλιστα τα μοτίβα πρόσδεσης του σιδήρου Fe^{3+} και του υποστρώματος PCA, καθώς και τα αμινοξέα που απαρτίζουν την περιοχή του ενεργού κέντρου φαίνεται να είναι σχεδόν απόλυτα συντηρημένα σε όλες τις διοξυγονάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ομοπαράθεση.

Στην PCD34 του Sphe3 η περιοχή πρόσδεσης του Fe^{3+} εντοπίζεται στη β -υπομονάδα του ενζύμου και αποτελείται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και δυο κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr-151, Tyr-190, His-203 και His-205), σύμφωνα με την παραπάνω ομοπαράθεση αλληλουχιών. Σε όλες τις μελετημένες ενδοδιόλες τα 4 αυτά κατάλοιπα είναι αυστηρά συντηρημένα και μαζί με ένα μόριο διαλύτη είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση του ιόντος σιδήρου Fe^{3+} . (Mayilmurugan et al., 2010).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο σχετικά υψηλός βαθμός ομοιότητας μεταξύ της α - και β -υπομονάδας της PCD34 όπως προκύπτει μετά από ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών μέσω Clustal Omega . Πιο συγκεκριμένα η α -υπομονάδα παρουσιάζει 96% ομολογία και 28,3% ταυτότητα με την β -υπομονάδα κάτι που υποδεικνύει ότι έχουν κοινή προέλευση όπως προτείνεται και από τους Guzik et al (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013).

Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν για τις α - και β -υπομονάδες χρησιμοποιώντας αντίστοιχες κατατεθειμένες αλληλουχίες από Gram (+) και από Gram (-) βακτήρια (Παράγραφος 3.1.6) δείχνουν έναν ξεκάθαρο διαχωρισμό μεταξύ των υπομονάδων

που προέρχονται από Gram (+) από αυτές από Gram (-) βακτήρια χωρίς να φαίνεται όμως οι δύο κατηγορίες να απέχουν πολύ (εξελικτικά) μεταξύ τους.

Τόσο τα αποτελέσματα από την ομοπαράθεση των αλληλουχιών όσο και αυτά που προκύπτουν από την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι οι 3,4-διοξυγονάσες του PCA προέρχονται εξελικτικά από ένα κοινό πρόγονο.

Η α -υπομονάδα της PCD34 αποτελείται από 187 αμινοξέα με το συνολικό μοριακό βάρος να είναι 20,2 kDa και η β -υπομονάδα αποτελείται από 290 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ίσο με 33,2 kDa.

Αντίστοιχα μοριακά βάρη έχουν παρατηρηθεί και για την α -υπομονάδα των στελεχών *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (22,4 kDa) (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014), *Acinetobacter calcoaceticus* (23 kDa) (Hartnett et al., 1990), *Burkholderia* sp. NCIMB1046 (23kDa) (Luo, 2008), *Pseudomonas putida* (20,3 kDa) (Frazee et al., 1993) αλλά και για την α -υπομονάδα της PCD34 από τα στελέχη *Agrobacterium radiobacter* S2 (23 kDa) και *Hydrogenophaga palleroni* S1 (22 kDa) (Hammer et al., 1996).

Όσον αφορά στην β -υπομονάδα αντίστοιχα μοριακά βάρη έχουν παρατηρηθεί στις β -υπομονάδες των PCD34 από τα στελέχη *Hydrogenophaga palleroni* S1 (31 kDa), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (34,3 kDa) (Sim et al., 2013), *Streptomyces* sp. 2065 (33,7 kDa) (Iwagami et al., 2000) και στο *Moraxella* sp (29,5 kDa). Σε αντίθεση με την α -υπομονάδα φαίνεται ότι η β -υπομονάδα παρουσιάζει μια μεγαλύτερη ετερογένεια όσον αφορά στο μοριακό βάρος που έχει παρατηρηθεί σε 3,4-διοξυγονάσες του PCA από άλλα στελέχη. Ενδεικτικά αναφέρονται οι β -υπομονάδες από *Brevibacterium fuscum* με Mw = 40 kDa (Whittaker et al., 1984), *A. calcoaceticus* με Mw = 27 kDa (Hartnett et al., 1990), *Rhodococcus ruber* OA1 με Mw = 21,3 kDa (C. Li et al., 2016) και το *S. maltophilia* KB2 με Mw = 26,8 kDa (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014).

Όλες οι 3,4-διοξυγονάσες του PCA που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία αποτελούνται από έναν ποικίλο αριθμό πρωτομερών τα οποία σε κάθε περίπτωση συνίστανται από μία α - και μια β -υπομονάδα. Ο αριθμός των πρωτομερών που συνθέτουν την τεταρτοταγή δομή του ενζύμου της 3,4-διοξυγονάσης διαφέρει μεταξύ των οργανισμών και μπορεί να κυμαίνεται από 2 μέχρι και 12. Κάθε μονομερές έχει κυλινδρικό σχήμα και η ελάχιστη καταλυτική μονάδα είναι η $\alpha\beta\text{Fe}^{3+}$. (Bubinas et al., 2008; Bull & Ballou, 1981; Y. P. Chen et al., 1984; Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013; Hammer et al., 1996; Sterjiades & Pelmont, 1989; Vetting et al., 2000).

Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της PCD34 του Sphe3 (Εικόνα 3.1.7) φαίνεται να ακολουθεί ένα κοινό μοτίβο με όλες τις μέχρι σήμερα χαρακτηρισμένες 3,4-διοξυγονάσες του PCA, με τις α - και β -υπομονάδες να παρουσιάζουν μεταξύ τους πολλές ομοιότητες (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013; Ohlendorf et al., 1994; Petersen et al., 1996; Vetting et al., 2000). Ο πυρήνας και των δύο υπομονάδων αποτελείται από 2 β -πτυχωτές επιφάνειες αποτελούμενες από 4 κλώνους οι οποίες μεταξύ τους σχηματίζουν μια δομή β -σάντουιτς. Η μια πτυχωτή επιφάνεια αποτελείται αποκλειστικά από αντιπαράλληλους κλώνους ενώ η άλλη έχει μικτή τοπολογία. Αυτή η κεντρική δομή περιστοιχίζεται από μικρές έλικες και μεγάλες ακανόνιστες στροφές. Μία β -πτυχωτή επιφάνεια από κάθε υπομονάδα αποτελεί το σημείο αλληλεπίδρασης με μία β -πτυχωτή επιφάνεια από την έτερη υπομονάδα ενώ οι τριγύρω στροφές παρέχουν επιπλέον θέσεις αλληλεπίδρασης. Η δομή του πρωτομερούς $\alpha\beta$

σταθεροποιείται καθώς το αμινοτελικό άκρο της α -υπομονάδας περνά στο εσωτερικό της δομής του β -σάντουιτς της β -υπομονάδας δημιουργώντας παράλληλα και τον ένα τοίχο του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Παρά τις διαφορές στην αλληλουχία, οι 3,4-διοξυγονάσεις του PCA φαίνεται να παρουσιάζουν έναν αρκετά υψηλό βαθμό δομικής ομοιότητας, τουλάχιστον όσον αφορά στους πρωτομερείς δομικούς λίθους όπως αναφέρεται και από τους Vetting et al οι οποίοι ανέλυσαν τη δομή της 3,4-διοξυγονάσης του PCA από το *Acinetobacter baylyi* ADP1 (Vetting et al., 2000), η οποία και χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της PCD34 που μελετάται στην παρούσα διατριβή. Καθώς ο βαθμός βεβαιότητας του παραχθέντος μοντέλου είναι 100% τόσο για την α - όσο και για τη β - υπομονάδα, με κάλυψη 96% και 81% αντίστοιχα (Παράγραφος 3.2.4), μπορεί με σχετική ασφάλεια να γίνει μια ανάλυση της τριτοταγούς δομής της PCD34 βασιζόμενη στην τριτοταγή δομή της 3,4-διοξυγονάσης του PCA από το *A. baylyi* ADP1.

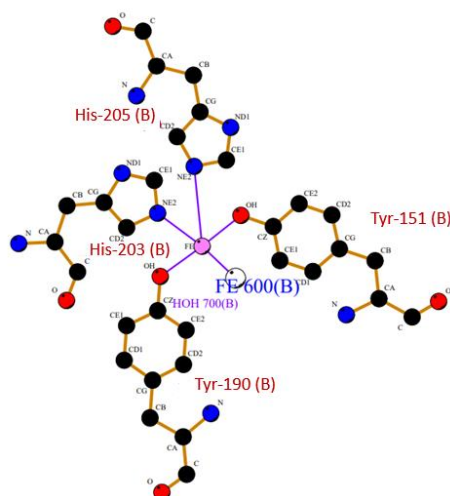
Πιο συγκεκριμένα, το ενεργό κέντρο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, βρίσκεται στην διεπιφάνεια μεταξύ α - και β -υπομονάδας. Η πρόσβαση σε αυτό γίνεται μέσω ενός ανοίγματος μεγέθους $18 \times 10 \text{ \AA}$ που σχηματίζεται από την Arg-123 και τη Gly-124 της α -υπομονάδας και τις Tyr-69, Ser-71 και Lys-193 της β -υπομονάδας. Τα κατάλοιπα Arg-123α, Gly-124α και Tyr-69β φαίνεται να είναι απολύτως συντηρημένα σε όλες τις γνωστές αλληλουχίες ενώ η Ser-71β απαντάται με την ίδια συχνότητα και ως τυροσίνη. Από την άλλη η Lys-193β παρουσιάζει τον χαμηλότερο βαθμό συντήρησης αλλά ακολουθεί πάντα τον κανόνα της γενικότερης επικράτησης βασικών αμινοξέων μέσα και γύρω από την περιοχή του ενεργού κέντρου (για παράδειγμα στο *A. baylyi* ADP1 στην ίδια θέση απαντάται μια αργινίνη ενώ στο *A. tumefaciens* μια προλίνη). Σε γενικές γραμμές υπάρχει ένα δίκτυο από τουλάχιστον δύο βασικά αμινοξέα σε αυτή την περιοχή τα οποία στο αλκαλικού pH της αντίδρασης είναι θετικά φορτισμένα και ευνοούν ηλεκτροστατικά την αλληλεπίδραση του ενεργού κέντρου του ενζύμου με το αρνητικά φορτισμένο υπόστρωμα PCA (Vetting et al., 2000).

Το μέσο τμήμα του ενεργού κέντρου αποτελείται από ένα επίπεδο σχετικά άνοιγμα μεγέθους $8 \times 10 \text{ \AA}$ το οποίο σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Thr-10, Val-11, Gly-12 και Pro-13 της α -υπομονάδας και Trp-192 και Ile-234 της β -υπομονάδας. Η Trp-192β είναι σχεδόν απόλυτα συντηρημένη και η Ile-234β είναι απόλυτα συντηρημένη σε όλες τις γνωστές μέχρι σήμερα 3,4-διοξυγονάσεις του PCA. Τόσο ο υδρόφοβος χαρακτήρας αυτών των αμινοξικών καταλοίπων, όσο και το επίπεδο σχήμα τους, υποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ σημαντικά στο να περιορίζουν τον αριθμό των πιθανών προσανατολισμών που μπορεί να λάβει το υπόστρωμα PCA μέσα στο ενεργό κέντρο (Orville et al., 1997b).

Η εσωτερική περιοχή του ενεργού κέντρου είναι μια κοιλότητα μεγέθους $5 \times 7 \text{ \AA}$. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται τα αμινοξέα Tyr-151β, Tyr-190β, His-203β και His-205β, που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αποτελούν τις θέσεις πρόσδεσης του ιόντος Fe^{3+} , καθώς και τα αμινοξέα Phe-18α, Arg-200β και Gln-220β. Η Phe-18α αντικαθίσταται συχνά από τυροσίνη. Η γεωμετρία πρόσδεσης του ιόντος Fe^{3+} είναι τριγωνική διπυραμιδική με τα κατάλοιπα Tyr-151β και His-205β να λειτουργούν ως αξονικοί προσδέτες και τα Tyr-190β και His-203β μαζί με ένα μόριο διαλύτη να λειτουργούν ως ισημερινοί προσδέτες (Εικόνα 4.1) (Orville et al., 1997b).

Τον *in silico* εντοπισμό και μελέτη της PCD34 ακολούθησε η διερεύνηση για την ύπαρξη δραστηριότητας PCD34 σε κυτταρικό εκχύλισμα *Sphe3*. Το αποτέλεσμα αυτής ήταν ο

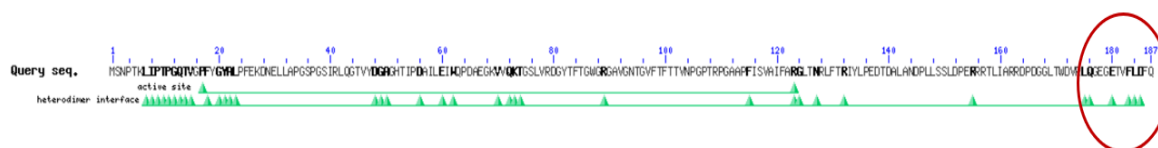
εντοπισμός δραστηριότητας για το PCA της τάξεως των $0,08 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Ως 1 Unit ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη διάσπαση 1 μmol PCA σε ένα λεπτό αντίδρασης.



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση της θέσης δέσμευσης Fe^{3+} στο ενεργό κέντρο της PCD34.

Ακολούθησε η ενίσχυση των γονιδίων για την PCD34 με τη χρήση κατάλληλων πριμοδοτικών μορίων ώστε να πραγματοποιηθεί ετερόλογη έκφραση τους σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν πριμοδοτικά μόρια κατάλληλα για μετέπειτα κλωνοποίηση του προϊόντος στον φορέα υπερέκφρασης pET-29c ο οποίος εισάγει μια ουρά έξι ιστιδινών (6-His) στο καρβοξυτελικό άκρο της α -υπομονάδας της PCD34. Μετά από επαγωγή της υπερέκφρασης των γονιδίων της PCD34 με IPTG, οι επανειλημμένες προσπάθειες καθαρισμού του ενζύμου αποδείχθηκαν ανεπιτυχείς.

Στη προσπάθεια επίλυσης του προβλήματος της μη ικανοποιητικής δέσμευσης του ενζύμου στη στήλη, πραγματοποιήθηκε πιο επισταμένη *in silico* ανάλυση της αλληλουχίας όπου φαίνεται ότι πέρα από το αμινοτελικό άκρο της α -υπομονάδας που σταθεροποιεί τη δομή του πρωτομερούς αFe^{3+} (όπως αναφέρθηκε προηγουμένως), κάποια αμινοξέα και του καρβοξυτελικού άκρου φαίνεται να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των δύο υπομονάδων, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4.2):



Εικόνα 4.2: Αλληλουχία της α -υπομονάδας της PCD34. Κάτω από την αλληλουχία σημειώνονται τα αμινοξέα της α -υπομονάδας που συμμετέχουν είτε στο ενεργό κέντρο είτε στο σχηματισμό του διμερούς αβ. Με κόκκινο περιγράφονται τα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου που φαίνεται να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της α - με τη β -υπομονάδα.

Δημιουργείται λοιπόν η υπόθεση ότι θα μπορούσαν τα 6 κατάλοιπα ιστιδίνης που είναι απαραίτητα για τον καθαρισμό του υπερεκφρασμένου ενζύμου να «θάβονται» στη διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να μην είναι εφικτή η ισχυρή πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στη στήλη.

Δοκιμάστηκε ένας άλλος πλασμιδιακός φορέας υπερέκφρασης, ο pRSFDuet-1 και τα πριμοδοτικά μόρια για την κλωνοποίηση των γονιδίων στον φορέα αυτό σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε μια αντίστοιχη ουρά 6-His να εισαχθεί στο αμινοτελικό άκρο της β-υπομονάδας. Η αλλαγή αυτή επέτρεψε τον επιτυχή καθαρισμό της ανασυνδυασμένης PCD34.

Ακολούθησαν πειράματα κινητικής σταθερής κατάστασης και προσδιορισμού των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου στο κλάσμα που παρουσίασε δραστικότητα PCD34.

Η PCD34 από το Sph3 που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία παρουσιάζει βέλτιστη δραστικότητα σε τιμές pH = 9 - 9,5. Πολλές από τις μέχρι σήμερα 3,4-διοξυγονάσες του PCA φαίνεται να παρουσιάζουν βέλτιστη δραστικότητα σε τόσο αλκαλικό φάσμα pH. Πιο συγκεκριμένα η PCD34 από το *Streptomyces* sp. στέλεχος 2065 έχει βέλτιστο pH = 9,5 – 9,8 (Iwagami et al., 2000), από το *S. maltophilia* pH = 9,2 (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014) και από το *Rizobacterium trifolli* pH = 9,5 (Y. P. Chen et al., 1984) ενώ και οι 3,4-διοξυγονάσες που προέρχονται από τα στελέχη *A. calcoaceticus* (Hou et al., 1976), *B. cepacia* (Bull & Ballou, 1981), *Azotobacter vinelandii* (Durham et al., 1980) και το θερμόφιλο *Geobacillus* sp. (Bubinas et al., 2007) παρουσιάζουν βέλτιστη δραστικότητα στο αλκαλικό εύρος pH = 8,5 – 9. Η PCD34 από το *P. putida* έχει βέλτιστη δραστικότητα σε pH = 8 (Fujisawa et al., 1972) ενώ αυτές των *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Sim et al., 2013) και *Rhizobium* sp LMB-1 (Zhang et al., 2017) λειτουργούν καλύτερα στο πιο ουδέτερο pH = 7,5.

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 30°C, όση είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του Sph3. Ένζυμα που έχουν απομονωθεί από άλλους μικροοργανισμούς φαίνεται να έχουν αυξημένες βέλτιστες θερμοκρασίες σε σύγκριση με την PCD34 του Sph3. Για παράδειγμα η PCD34 από τα στελέχη *P. putida* (*P. aeruginosa* στην αναφορά) και *A. calcoaceticus*, έχουν βέλτιστη θερμοκρασία τους 35 °C (Hou et al., 1976) και εκείνη από το στέλεχος *P. pseudoalcaligenes* KF707 τους 38°C (Kang et al., 2015; Sim et al., 2013). Η PCD34 που έχει απομονωθεί από το *S. maltophilia* έχει ακόμη υψηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία, στους 45°C (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014), ενώ όπως θα ήταν αναμενόμενο, η μέγιστη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης έχει παρατηρηθεί στην PCD34 του θερμόφιλου στελέχους *Geobacillus* sp. αγγίζει τους 60°C (Bubinas et al., 2007).

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω οι PCD34 είναι ένζυμα που βασίζονται στον μη αιμικό Fe^{3+} για να καταλύσουν την αντίδραση *όρθο-σχάσης* του αρωματικού δακτυλίου. Με βάση αυτό θα αναμενόταν η επώαση του καθαρισμένου ενζύμου PCD34 με διάφορες συγκεντρώσεις FeCl_3 (Fe^{3+}) να επάγει τη δραστικότητά του. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε. Από την άλλη, επώαση του ενζύμου με 0,2 mM FeSO_4 (Fe^{2+}) για 20 min φαίνεται να επάγει τη δραστικότητά της κατά 2,6 φορές (Παράγραφος 3.3.4.5). Αυτό το μη αναμενόμενο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε ενδοδιόλες από άλλους μικροοργανισμούς όπως η PCD34 από το *S. maltophilia* KB2 (Guzik, Hupert-Kocurek, Sałek, et al., 2013) και στην 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης από το *Alcaligenes xylosoxidans* Y234 (Ho Yeom & Je Yoo, 1997). Οι Guzik et al. μάλιστα αναφέρουν ότι επώαση με Fe^{3+} προκαλεί απώλεια δραστικότητας μέχρι και 80%. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι στοιχεία μετάπτωσης όπως ο Fe^{3+} αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα κυστεΐνης προκαλώντας έτσι αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή του ενζύμου. Έτσι η καταστολή του ενζύμου μπορεί να προκαλείται από την πρόσδεση των ιόντων Fe^{3+} σε θέσεις διαφορετικές από αυτή του ενεργού κέντρου (Guzik, Hupert-Kocurek, Sałek, et al., 2013). Ενώ κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εξηγήσει την απώλεια δραστικότητας, η επαγωγή του ενζύμου από τα ιόντα Fe^{2+} χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

Η PCD34 του Sph3 παρουσιάζει από τις υψηλότερες συγγένειες για το PCA που έχουν αναφερθεί με $K_m^{PCA} = 7,1 \mu M$, ίσο με εκείνο που έχει παρατηρηθεί για την PCD34 του θερμόφιλου *Geobacillus* sp. (Bubinas et al., 2007). Παρόμοιες συγγένειες για το PCA ($K_m^{PCA} = 15 - 18 \mu M$) έχουν αναφερθεί για τις PCD34 από τα στελέχη *B. ceracia* (Bull & Ballou, 1981), *R. trifolli* (Y. P. Chen et al., 1984), *A. vinelandii* (Durham et al., 1980) και *P. pseudoalcaligenes* (Kang et al., 2015). Λίγο χαμηλότερες συγγένειες για το PCA φαίνεται να παρουσιάζουν οι PCD34 από *S. maltophilia* (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014) και *P. putida* (Fujisawa et al., 1972) με $K_m^{PCA} = 30 \mu M$. Οι 3,4-διοξυγονάσες του PCA από τα *A. radiobacter* και *H. palleroni* παρουσιάζουν με $K_m^{PCA} = 58 \mu M$ και με $K_m^{PCA} = 54 \mu M$ αντίστοιχα (Hammer et al., 1996). Σε παρόμοια επίπεδα κυμαίνεται και η PCD34 από *A. calcoaceticus* με $K_m^{PCA} = 70 \mu M$ (Hou et al., 1976) και εκείνη του *Rhizobium* sp LMB-1 με $K_m^{PCA} = 65 \mu M$ (Zhang et al., 2017). Τέλος έχει αναφερθεί και η PCD34 τύπου II από το *H. palleroni* που έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για το PCA με $K_m^{PCA} = 205 \mu M$ (Hammer et al., 1996).

Πολλές διοξυγονάσες ενδοδιόλης και συγκεκριμένα 3,4-διοξυγονάσες του PCA έχουν πολύ στενό εύρος υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν (Fujisawa et al., 1972; Hammer et al., 1996; Hou et al., 1976) και συνήθως πρόκειται για άλλα διυδροξυβενζοϊκά – πλην του PCA - οξέα όπως τα 2,3- , 2,5- , 2,6-, 3,5-διυδροξυβενζοϊκά και το καφεϊκό οξύ (Guzik, Hupert-Kocurek, Krysiak, et al., 2014).

Η PCD34 που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή φαίνεται να έχει ένα σχετικά περιορισμένο σύνολο υποστρωμάτων που αναγνωρίζει (Παράγραφος 3.4.4.3). Πέραν της αντίδρασης με PCA (Εικόνα 3.4.8) παρατηρούνται διαφορές και στα φάσματα των αντιδράσεων τόσο με το γεντισικό (2,5-διυδροξυβενζοϊκό, Εικόνα 3.4.20) όσο και με το γαλλικό (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό, Εικόνα 3.4.17) ως υποστρώματα. Στην περίπτωση του γεντισικού, έχουμε ένα διυδροξυβενζοϊκό οξύ με υδροξυλιωμένους τους C2 και C5 άνθρακες και στην περίπτωση του γαλλικού, μια ένωση που φέρει ένα επιπλέον υδροξύλιο στον C5 (Παράρτημα Π2). Στα φάσματα των αντιδράσεων της PCD34 με το καφεϊκό (Εικόνα 3.4.10) και το *p*-κουμαρικό οξύ (Εικόνα 3.4.10) παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα μήκη κύματος ~290-350 nm. Η διαφορά μεταξύ των δυο υποστρωμάτων είναι ότι το καφεϊκό οξύ φέρει μια επιπλέον υδροξυλομάδα στον C3 του δακτυλίου (Παράρτημα Π2). Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης στο φάσμα της αντίδρασης της PCD34 με το 4HB (Εικόνα 3.4.11) ενώ καμία αντίστοιχη μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην αντίδραση με το 3HB (Εικόνα 3.4.12). Στις παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσε να στηριχτεί η υπόθεση ότι η ύπαρξη ενός -OH στον C4 είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του εκάστοτε υποστρώματος από την PCD34. Ενδιαφέρουσα εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση του γεντισικού οξέως στο οποίο τα -OH βρίσκονται στους άνθρακες C2 και C5. Περεταίρω πειράματα μοριακής πρόσδεσης και μοριακής δυναμικής αλλά και η παρακολούθηση των αντιδράσεων αυτών in situ στο σωληνάκι του NMR, θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν αρχικά τον τρόπο με τον οποίο προσδένεται το κάθε υπόστρωμα στην περιοχή του ενεργού κέντρου αλλά και τον μηχανισμό των αντιδράσεων.

Διαφορές παρατηρούνται επίσης και στα φάσματα της αντίδρασης του ενζύμου με νιτροξυλιωμένες αρωματικές ενώσεις όπως για παράδειγμα η 4-νιτροκατεχόλη (μείωση στα 430 nm, Εικόνα 3.4.15), η 2,3-δινιτροφαινόλη (Εικόνα 3.4.16) και το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (Εικόνα 3.4.16, μείωση στα 350-400 nm).

Όσον αφορά στην 4-νιτροκατεχόλη έχει αναφερθεί αλληλεπίδραση της με 3,4-διοξυγονάση του PCA του *A. baylyi* ADP1 και έχει μελετηθεί και η δομή του ενζύμου καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του ενεργού του κέντρου με το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Vetting et al., 2000). Στην μελέτη αυτή αναφέρεται μάλιστα ότι τα υδροξύλια του δακτυλίου της 4-

νιτροκατεχόλης αλληλεπιδρούν με το Fe^{3+} του ενεργού κέντρου με παρόμοιο τρόπο με τα υδροξύλια του υποστρώματος PCA. Αναφέρεται ακόμη ότι η νίτρο-ομάδα της 4-νιτροκατεχόλης αλληλεπιδρά με το απόλυτα συντηρημένο κατάλοιπο Tyr-69β (Tyr-324 στην αναφορά) σχηματίζοντας αντίστοιχο δεσμό υδρογόνου όπως η καρβοξυλομάδα του PCA (Vetting et al., 2000). Αντίστοιχη μεταβολή του φάσματος της αλληλεπίδρασης της PCD34 με την 4-νιτροκατεχόλη (μείωση στα 430 nm) αναφέρεται και στην περίπτωση της σχάσης του αρωματικού δακτυλίου αυτής από μια Mn(II)-εξαρτώμενη διοξυγονάση της κατεχόλης του βακτηρίου *Arthrobacter globiformis* (Reynolds et al., 2003), αλλά και κατά τη μετατροπή της 4-νιτροκατεχόλης σε υδροξυκινόλη μέσω μιας 4-μονοοξυγενάσης της *p*-νιτροφαινόλης του *Pseudomonas* sp. WBC-3 (Wei et al., 2010).

Στην περίπτωση της 2,3-δινιτροφαινόλης και του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι κάποια από τις δυο νιτρο-ομάδες αλληλεπιδρά με αντίστοιχο τρόπο με την νιτρο-ομάδα της 4-νιτροκατεχόλης με την Tyr-69β ενώ στην περίπτωση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού με το κατάλοιπο Tyr-69β θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει και η καρβοξυλομάδα του.

Τέλος, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην αλληλεπίδραση της PCD34 με την κατεχόλη, την βανιλίνη, τη 2,4,6-τριχλωροφαινόλη, το 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, την *p*-κρεζόλη, την υδροκινόνη, το φθαλικό, το βενζοϊκό το 3,4-διυδροξυφαινοξυλικό (ομοπρωτοκατεχοϊκό) και το 3-*O*-μεθυлгаλλικό.

4.1.3 Διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από τις διοξυγονάσεις του PCA του Sphe3

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, και οι δύο διοξυγονάσεις του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του Sphe3 (PCD45 και PCD34) είναι ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν ένα σχετικά στενό εύρος υποστρωμάτων, με την PCD45 να είναι το πιο εξειδικευμένο από τα δύο ένζυμα.

Αυτή η σχετικά μεγάλη τους εξειδίκευση, τις καθιστά ιδανικά εργαλεία για την παραγωγή εξειδικευμένων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (όπως χημικά, φαρμακευτικές ουσίες και συστατικά τροφίμων). Όταν όμως πρόκειται για διαδικασίες βιοαποδόμησης ένζυμα με χαμηλότερη εξειδίκευση και μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων, θα μπορούσαν να θεωρηθούν πιο χρήσιμα.

Στην προσπάθεια να επιτευχθεί διεύρυνση των υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από τις PCD34 και PCD45 πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε αμινοξέα που εντοπίζονται στην περιοχή του ενεργού κέντρου και φαίνεται να επηρεάζουν την πρόσδεση του υποστρώματος. Η επιλογή των προς μετάλλαξη αμινοξέων έγινε μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση αλλά και *in silico* μελέτη μέσω πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης [τα πειράματα της Μοριακής Πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του κυρίου Μαυρομούστακου (Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ) από την κα Συριοπούλου Αγγελική].

4.1.3.1 Μετάλλαξη R123H της PCD34 (PCD34/R123H)

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής επιχειρήθηκε η διεύρυνση του συνόλου των υποστρωμάτων που αναγνωρίζει η PCD34. Με βάση το γεγονός ότι οι διοξυγονάσεις ενδοδιόλης, 3,4-διοξυγονάση του PCA και 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, φαίνεται να έχουν κοινή εξελικτική προέλευση (Guzik, Hupert-Kocurek, & Wojcieszysk, 2013), η προσέγγιση εστίασε στο να αναγνωρίζει το ένζυμο την κατεχόλη, που αποτελεί ένα κοινό μεταβολικό ενδιάμεσο πολλών πορειών βιοαποδόμησης, καθώς και άλλες υποκατεστημένες κατεχόλες.

Η PCD34 είναι ένα ένζυμο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης τα οποία διαλεύκαναν τόσο τον μηχανισμό της αντίδρασης που αυτή καταλύει όσο και τη σημασία των συντηρημένων αμινοξέων της περιοχής του ενεργού κέντρου (Brown et al., 2004). Στο πλαίσιο των πειραμάτων αυτών παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση ενός και μόνο αμινοξέος, και συγκεκριμένα της Arg-133 της α -υπομονάδας της PCD34 του στελέχους *A. baylyi* ADP1, από ένα κατάλοιπο ιστιδίνης (R133H) προσέδωσε στο ένζυμο την ικανότητα να προκαλεί 1,2-σχάση του δακτυλίου της κατεχόλης, που το αγρίου τύπου ένζυμο δεν την είχε (D'Argenio et al., 1999).

Η συγκεκριμένη αργινίνη είναι συντηρημένη και στην PCD34 το Sphe3 (Arg-123), γεγονός που οδήγησε στο ερώτημα αν μια αντίστοιχη αντικατάσταση θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιώντας την αμινοξική αλληλουχία του αγρίου τύπου ενζύμου και του ενζύμου που είχε υποστεί τη μετάλλαξη (στο εξής αναφερόμενο ως PCD34/R123H) και με υποστρώματα PCA και κατεχόλης. Στην περίπτωση της PCD34 η κατεχόλη δεν λάμβανε τον κατάλληλο προσανατολισμό ως προς το ιόν Fe^{3+} ώστε να πραγματοποιηθεί η σχάση του δακτυλίου της. Σε αντίθεση με την Arg-123 της PCD34, ο δακτύλιος της His-123 φαίνεται να αλληλεπιδρά με εκείνον της κατεχόλης με τέτοιο τρόπο που επιτρέπει στα -OH της να λάβουν τον απαραίτητο για την αντίδραση προσανατολισμό (Εικόνα 3.4.2).

Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ανάγκη διερεύνησης αν η σημειακή μετάλλαξη R123H προσδίδει δραστηριότητα 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης στην PCD34. Μέσω του σχεδιασμού κατάλληλων ζευγών πριμοδοτικών μορίων τα οποία εισήγαγαν τη μετάλλαξη αυτή στην α -υπομονάδα του ενζύμου, την ετερόλογη έκφραση αυτού και ενζυμικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι όντως το μεταλλαγμένο ένζυμο PCD34/R123H αναγνωρίζει την κατεχόλη ως υπόστρωμα χωρίς να χάνει την ικανότητά του να αναγνωρίζει το PCA – αν και η ταχύτητα της αντίδρασης με αυτό είναι αρκετά μειωμένη (Παράγραφος 3.4.4.2).

Οι D'Argenio et al κάνουν μια υπόθεση που εξηγεί την αλλαγή αυτή. Στην αγρίου τύπου PCD34 του *A. baylyi* ADP1 η Arg-133 αλληλεπιδρά με ένα γειτονικό κατάλοιπο γλουταμινικού (Gln-220 στην PCD34 του Sphe3). Η His-133 του μεταλλαγμένου ενζύμου από την άλλη δεν αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο αυτό, κάτι που της επιτρέπει να περιστρέφεται με μεγαλύτερη ελευθερία στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση της με τον δακτύλιο της κατεχόλης, διευκολύνοντας τους «παραγωγικούς» προσανατολισμούς του τελευταίου (D'Argenio et al., 1999).

Ακολούθησαν ενζυμικές δοκιμές και παρακολούθησή τους μέσω μεταβολών στο φάσμα UV/Vis της εκάστοτε αντίδρασης ώστε να προσδιοριστεί αν το μεταλλαγμένο ένζυμο μπορούσε να αναγνωρίσει και άλλα υποστρώματα.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η PCD34/R123H φαίνεται να αλληλεπιδρά και με άλλα υποστρώματα πέραν της κατεχόλης, ενώ παράλληλα δε φαίνεται να χάνει την ικανότητα να αναγνωρίζει τα υποστρώματα που αναγνωρίζει και το αγρίου τύπου ένζυμο PCD34.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μια αύξηση της απορρόφησης στα ~340nm στο φάσμα της αντίδρασης της PCD34/R123H με το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό (ομοπρωτοκατεχοϊκό) η οποία δεν παρατηρείται στην αλληλεπίδραση της PCD34 με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Το προϊόν της 2,3-σχάσης του ομοπρωτοκατεχοϊκού, 5-καρβοξυμέθυλ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη, έχει παρόμοιο μέγιστο απορρόφησης στα 380nm (Emerson et al., 2005).

Ακόμη, οι μεταβολές στα φάσματα των αντιδράσεων της PCD34/R123H τόσο με το γαλλικό οξύ όσο και με την πυρογαλλόλη διαφέρουν από εκείνες που παρατηρούνται στις αντίστοιχες αντιδράσεις με την PCD34, καθώς παρατηρείται μια επιπλέον αύξηση στα ~290 nm και στις δυο περιπτώσεις. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην υπόθεση σχηματισμού κάποιου προϊόντος που απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Τέλος παρατηρείται μια πιο έντονη μεταβολή (αύξηση στα ~350nm) στην αντίδραση της PCD34/R123H με το γεντισικό οξύ σε σχέση με την αντίδραση αυτού με την PCD34, κάτι που υποδεικνύει αυξημένη ταχύτητα αντίδρασης του μεταλλαγμένου ενζύμου με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

4.1.3.2 Μετάλλαξη F93A της PCD45 (PCD45/F93A)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η PCD45 του *Sphe3* που μελετήθηκε και στην παρούσα διατριβή, είναι ένα ένζυμο με πολύ στενό εύρος υποστρωμάτων καθώς αναγνωρίζει μόνο το PCA και το GA ως υποστρώματα, αν και παρατηρείται μια μικρή μεταβολή και στο φάσμα της αντίδρασης του ενζύμου με το 4HB η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης. Στην προσπάθεια διεύρυνσης του εύρους αυτού, ύστερα από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση αλλά και *in silico* μελέτη της τριτοταγούς δομής αλλά και των αμινοξέων που απαρτίζουν την περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου, μια από τις αλλαγές που έγιναν είναι η αντικατάσταση της Phe-93 από μια αλανίνη (F93A).

Από μελέτες που έχουν προηγηθεί στην LigAB του *S. paucimobilis* SYK-6, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του οποίου κατασκευάστηκε και το μοντέλο της PCD45 (Παράγραφος 3.4.5), η Phe-93α (Phe-103α στο LigAB) φαίνεται να είναι ένα αμινοξύ του ενεργού κέντρου το οποίο αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα PCA μέσω van der Waals αλληλεπιδράσεων. Πιο αναλυτικά το PCA αλληλεπιδρά με ένα σύνολο υδρόφοβων αμινοξέων όπως η Val-13β (Ile-13β στο LigAB) και η Pro-14β (στις οποίες γίνεται εκτενέστερη αναφορά παρακάτω), η Leu-193β, η Phe-93α, η His-191β και η Thr-265β (Barry & Taylor, 2013b; Sugimoto et al., 1999). Όσον αφορά συγκεκριμένα στην Phe-93α αυτή φαίνεται να λειτουργεί σαν «καπάκι» του ενεργού κέντρου και να αλληλεπιδρά με τον C5 άνθρακα (που είναι και το σημείο προσβολής του δακτυλίου από το ενεργοποιημένο οξυγόνο) προστατεύοντας τον από τα μόρια του διαλύτη (Sugimoto et al., 1999). Οι Barry et al. αναλύοντας την κρυσταλλική δομή του LigAB (PDB: 1B4U) διαπίστωσαν ότι η Phe-103 βρίσκεται συγκεκριμένα σε απόσταση 5 Å από τον C5 του PCA και ότι όσο μεγαλύτερος ήταν ο υποκαταστάτης σ' αυτή τη θέση του υποστρώματος, τόσο μικρότερη ήταν η καταλυτική ικανότητα του ενζύμου (k_{cat}/K_m) για το υπόστρωμα. Μια αντικατάσταση του συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου με άλλα μικρότερα όπως η ιστιδίνη, η λευκίνη και η βαλίνη προκαλούσε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου για τα υποστρώματα GA και 3-ο-μεθυλγαλλικού οξέος. Απέδειξαν έτσι ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος και στην εκλεκτικότητα του ενζύμου η οποία βασίζεται και στην λειτουργική ομάδα στη θέση C5 του εκάστοτε υποστρώματος (Barry, Cohn, et al., 2015).

Η ανωτέρω ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε επίσης αντικατάσταση της Phe-103 τόσο με αλανίνη όσο και με σερίνη αλλά δεν κατέστη εφικτή η μελέτη των ανωτέρω μεταλλαγμάτων καθώς δεν επετεύχθη ο καθαρισμός της υπομονάδας LigB παρά μόνο της υπομονάδας LigA που έφερε και την ουρά ιστιδίνης, υποδεικνύοντας ότι τόσο το μέγεθος όσο και η πολικότητα του αμινοξέος στη θέση 103α επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα της διεπιφάνειας του καταλυτικά ενεργού διμερούς LigAB (Barry, Ngu, et al., 2015).

Επομένως, με δεδομένο ότι οι δύο υπομονάδες του αντίστοιχου ενζύμου στο Sphe3 (PCD45) συμμεταγράφονται, θεωρήθηκε ευκαιρία μελέτης της συγκεκριμένης μετάλλαξης, καθώς ο καθαρισμός της καταλυτικά ενεργής PCD45 δεν αναμενόταν να αποτελέσει πρόβλημα.

Η εισαγωγή της μετάλλαξης και η μελέτη αυτής πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως εξετάστηκε η αλληλεπίδραση του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD45/F93A, με διάφορα υποστρώματα μέσω μεταβολών στα φάσματα UV/Vis των αλληλεπιδράσεων αυτών (Παράγραφος 3.4.5.3).

Παρατηρείται ότι η PCD45/F93A εξακολουθεί να έχει δραστηριότητα τόσο για το PCA (Εικόνα 3.5.10) όσο και για το GA (Εικόνα 3.5.11) καθώς το κατάλοιπο που υπέστη τη μετάλλαξη δε συμμετέχει άμεσα ούτε στην κατάλυση αυτή καθαυτή ούτε στην πρόσδεση του ιόντος Fe^{2+} και η αντικατάστασή του αυτή συντελεί στη δημιουργία μεγαλύτερου χώρου στο ενεργό κέντρο. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση του PCA παρατηρείται κατανάλωση του υποστρώματος (μείωση στα 290 nm) με ταυτόχρονο σχηματισμό του προϊόντος CHMS (αύξηση απορρόφησης στα 410 nm) ενώ στην περίπτωση του GA είναι ξεκάθαρη η κατανάλωση του υποστρώματος όπως φαίνεται και από τη μείωση που παρατηρείται στα 290 nm.

Μεταβολή παρατηρείται και στο φάσμα της αλληλεπίδρασης του PCD45/F93A με το καφεϊκό οξύ (Εικόνα 3.5.14), όπου είναι ορατή μια μείωση της απορρόφησης στα ~240 nm που δεν παρατηρείται στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του υποστρώματος με την PCD45 αλλά ούτε και στην περίπτωση του υποστρώματος απουσία ενζύμου. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ο μεγαλύτερος χώρος που δημιουργήθηκε αντικαθιστώντας την ογκώδη φαινυλαλανίνη με την κατά πολύ μικρότερη αλανίνη επέτρεψε στο πιο μεγάλο (συγκριτικά με το PCA) καφεϊκό να εισέλθει στο ενεργό κέντρο και να προσανατολιστεί κατάλληλα ώστε να πραγματοποιηθεί η *meta*-σχάση του.

Αλλαγές παρατηρούνται και στην περίπτωση του 4HB (Εικόνα 3.5.15), όπου φαίνεται η μείωση στα ~250 και ~280 nm να είναι πολύ πιο έντονη στην αλληλεπίδραση με PCD45/F93A απ' ό τι στην περίπτωση της PCD45. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και στην περίπτωση του 3HB με τη σημαντική διαφορά ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα δε φαίνεται να αλληλεπιδρά με το αγρίου τύπου ένζυμο (Εικόνα 3.5.16). Η υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει εδώ είναι ότι ο μεγαλύτερος χώρος που έχει δημιουργηθεί επιτρέπει στερεοχημικά στο εκάστοτε υπόστρωμα να «δοκιμάσει» πιο εύκολα περισσότερους προσανατολισμούς κάποιοι από τους οποίους είναι και παραγωγικοί.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υποστρώματα 3,5-δινιτροσαλυκυλικό οξύ (Εικόνα 3.5.17) και 2,4,6-τριχλωροφαινόλη (Εικόνα 3.5.18). Στην περίπτωση του 3,5-δινιτροσαλυκυλικού παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα ~250 nm και στα ~380 nm ενώ στην περίπτωση της 2,4,6-τριχλωροφαινόλης είναι ορατή μια μείωση στην περιοχή των 250-280 nm. Σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν παρατηρούνται αντίστοιχες μεταβολές είτε με την PCD45 είτε απουσία ενζύμου. Τόσο ο μεγαλύτερος χώρος όσο και η ικανότητα της μεθυλομάδας της αλανίνης να σχηματίζει αλληλεπιδράσεις van der Waals με τους υποκαταστάτες των υποστρωμάτων ίσως επιτρέπουν σε αυτά να πάρουν την κατάλληλη θέση ως προς το ιόν Fe^{2+} ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σχάσης του αρωματικού δακτυλίου.

Επίσης, όπως και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης της PCD45 με το υπόστρωμα πυρογαλλόλης, καμία αλλαγή δεν παρατηρείται στο φάσμα, σε αντίθεση με τη συμπεριφορά

του υποστρώματος απουσία ενζύμου όπου, με την πάροδο του χρόνου, είναι ορατή μια αύξηση της απορρόφησης στα 350 nm που ίσως οφείλεται στην αυθόρμητη οξείδωση της πυρογαλλόλης PCA (Εικόνα 3.5.13).

Τέλος καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην αλληλεπίδραση του μεταλλαγμένου ενζύμου με το p-κουμαρικό, το ομοπρωτοκατεχοϊκό, το 4-αμινοβενζοϊκό, το 3-Ο-μεθυλγαλλικό, την 4-νιτροκατεχόλη, την 2,4-δινιτροφαινόλη, την βανιλίνη, το 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό, την p-κρεζόλη, την υδροκινόνη, την κατεχόλη, το γεντισικό και το φθαλικό.

Να σημειωθεί εδώ ότι κατά το στάδιο της συγγραφής της παρούσας διατριβής οι Rafalowski et al αποσαφήνισαν τον λόγο της αδυναμίας καθαρισμού της προαναφερθείσας μεταλλαγμένης διοξυγονάσης. Προσδιόρισαν συγκεκριμένα ότι ενώ τα μικρότερα υδρόφοβα αμινοξέα, όπως η αλανίνη, μπορούν να στοιβαχτούν πιο εύκολα στο ενεργό κέντρο απ' ότι η φαινυλαλανίνη, παρόλα αυτά χαμηλώνουν το φράγμα της απαιτούμενης ενέργειας για την διάλυση των δυο υπομονάδων καθώς δεν έχουν τη λειτουργία «καπακιού» που είχε η φαινυλαλανίνη και επιτρέπουν σε περισσότερα μόρια του διαλύτη να εισέλθουν στην περιοχή του ενεργού κέντρου (Rafalowski et al., 2023).

4.1.3.3 Μετάλλαξη VPA της PCD45 (PCD45/VPA)

Η μετάλλαξη αυτή αφορά τα αμινοξέα Val-13 και Pro-14 τα οποία όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω είναι δύο από τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον αρωματικό δακτύλιο του PCA στο ενεργό κέντρο της PCD45 ώστε να πάρει τον κατάλληλο προσανατολισμό για τη διεξαγωγή της αντίδρασης (Sugimoto et al., 1999). Σε αντίθεση με την Phe-93α που η συμβολή της στην πρόσδεση του εκάστοτε υποστρώματος είναι καλύτερα μελετημένη και αναφέρθηκε παραπάνω, δεν υπάρχουν περαιτέρω στοιχεία στη βιβλιογραφία για τα δύο αυτά αμινοξέα και το πως η αντικατάστασή τους θα επηρεάσει τη δραστηριότητα του ενζύμου αλλά κυρίως το εύρος των υποστρωμάτων που αυτό αναγνωρίζει. Στο πλαίσιο αυτό σχεδιάστηκε διπλή αντικατάσταση της Val-13 και της Pro-14 με δύο αλανίνες (στο εξής θα αναφέρεται για λόγους συντομίας VPA). Όπως γίνεται αντιληπτό, οι μεταλλάξεις αυτές σχεδιάστηκαν με γνώμονα τη διατήρηση του μη-πολικού χαρακτήρα και της υδροφοβικότητας των αμινοξέων τα οποία αντικαθίστανται. Αυτή η μετάλλαξη αναμένεται αφενός να δημιουργήσει μεγαλύτερο χώρο στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου και αφετέρου η αντικατάσταση της πιο άκαμπτης σερίνης (λόγω της κυκλικής δομής της) με την πιο εύκαμπτη αλανίνη να συντελέσει προς τη μεγαλύτερη «ευλυγισία» του ενεργού κέντρου σε εκείνη την περιοχή και κατ' επέκταση ίσως σε μεγαλύτερη ευκολία πρόσδεσης ογκωδέστερων υποστρωμάτων στην περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Μετά την επιτυχή αντικατάσταση των δύο αμινοξικών καταλοίπων και τον καθαρισμό του υπερεκφρασμένου ενζύμου PCD45/VPA, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διάφορα υποστρώματα και αξιολόγησή τους, όπως και στις δυο προαναφερθείσες περιπτώσεις, με καταγραφή των μεταβολών στα φάσματα UV/Vis με την πάροδο του χρόνου (Παράγραφος 3.4.5.3)

Το συγκεκριμένο ένζυμο εξακολουθεί να αναγνωρίζει το PCA και το GA ως υποστρώματα (Εικόνες 3.5.10 και 3.5.11). Στην περίπτωση του PCA παρατηρείται μια μείωση της απορρόφησης στα 290 nm και μια αύξηση στα 410 nm που υποδεικνύει ότι σχηματίζεται το προϊόν CHMS. Όσον αφορά στο GA παρατηρείται κατανάλωση του υποστρώματος μέσω της μείωσης της απορρόφησης στα 290 nm.

Επίσης και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μια μείωση στα ~250 και ~280 nm όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα το 4HB και το 3HB, αντίστοιχα (Εικόνες 3.5.15 και 3.5.16). Όσον αφορά στο τελευταίο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στη μετάλλαξη F93A, αυτή η μείωση δεν παρατηρείται στην αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την αργίου τύπου PCD45.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του ομοπρωτοκατεχοϊκού (3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος) όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, όπου εμφανίζεται μια κορυφή στα 380 nm που δεν παρατηρήθηκε ούτε στο αργίου τύπου ένζυμο PCD45 ούτε στη μετάλλαξη PCD45/F93A (Εικόνα 3.5.12). Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, μια υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει είναι ότι το μεγαλύτερο 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό μπορεί να δοκιμάσει διαφορετικούς συνδυασμούς θέσεων ως προς το καταλυτικό κέντρο Fe^{2+} κάποιος από τους οποίους είναι επιτυχημένοι οδηγώντας τελικά στη σχάση του δακτυλίου. Αυτό που προκαλεί όμως ερωτηματικά είναι ότι η κορυφή στα 380 nm δεν φαίνεται να μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου κάτι που χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

Σε κάθε μια από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις μεταλλαγμένων ενζύμων, περαιτέρω πειράματα θα μπορούσαν να επαληθεύσουν ή όχι τις υποθέσεις ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές στα UV/Vis φάσματα οφείλονται σε βιομετατροπή των υποστρωμάτων διαμεσολευόμενη από τα υπό μελέτη ένζυμα. Ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο που μπορεί τόσο να επιβεβαιώσει αυτή την υπόθεση όσο και να δώσει περισσότερα δεδομένα που αφορούν τις ενδεχόμενες αντιδράσεις, όπως αποδείχθηκε και στην περίπτωση της PCD45 (βλ. Παράγραφο 4.1.1.1), είναι σαφώς η φασματοσκοπία NMR. Για παράδειγμα η ανάλυση φασμάτων 1D 1H αλλά και 2D NMR (1H - 1H COSY, 1H - 1H TOCSY, 1H - ^{13}C HSQC και HMBC NMR) μπορεί να διαλευκάνει σε μεγάλο βαθμό τους μηχανισμούς των αντιδράσεων όπου αυτές επιτελούνται αλλά και την κινητική τους ενώ μέσω STD NMR είναι εφικτό να προκύψουν συμπεράσματα όσον αφορά στην αλληλεπίδραση των μεταλλαγμένων και των αργίου τύπου ενζύμων με τα εκάστοτε υποστρώματα.

4.1.3.4 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων ενζύμων PCD45/F93A και PCD45/VPA

Ένζυμο	K_m (mM)	V_{max} ($\mu M/ min$)	Ειδ. Δραστηριότητα (U/ mg)
PCD45	0,05	916	230
PCD45/F93A	0,5	19,5	4,9
PCD45/VPA	0,1	3,3	0,8

Αφού διερευνήθηκαν τα υποστρώματα που αναγνωρίζει το κάθε ένζυμο ακολούθησε μελέτη της κινητικής τους και προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης τους.

Και τα δύο μεταλλαγμένα ένζυμα ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{max} * [S] / K_m + [S]$ με $V_{max}^{VPA} = 3,3 \mu M/ min$ και $K_m^{VPA} = 0,11 mM$ για την PCD45/VPA (Παράγραφος 3.5.5.5.) και $V_{max}^{F93A} = 19,5 \mu M/ min$ και $K_m^{F93A} = 0,48 mM$ για την PCD45/F93A και (Παράγραφος 3.5.5.6.).

Την ίδια στιγμή το αργίου τύπου ένζυμο έχει $V_{max}^{PCD45} = 915,9 \mu M/ min$ και $K_m^{PCD45} = 0,05 mM$ (Παράρτημα Π3). Όπως φαίνεται και από τη σύγκριση των τιμών K_m και όπως ήταν αναμενόμενο, και στις δύο περιπτώσεις η συγγένεια των μεταλλαγμένων ενζύμων για το υπόστρωμα PCA μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα η μεταλλαγμένη PCD45/VPA φαίνεται να διατηρεί το 1/2 της συγγένειας του αργίου τύπου ενζύμου για το PCA ($K_m^{VPA} = 2 K_m^{PCD45}$) ενώ η συγγένεια της μεταλλαγμένης PCD45/F93A για το PCA είναι 10 φορές μικρότερη από εκείνη

του αγρίου τύπου ενζύμου ($K_m^{F93A} = 10 K_m^{PCD45}$). Παρατηρείται ακόμη μια κάμψη της δραστηριότητας των μεταλλαγμένων ενζύμων με υπόστρωμα PCA. Πιο συγκεκριμένα η μέγιστη δραστηριότητα του αγρίου τύπου ενζύμου είναι ~230 U/μg (Παράρτημα Π3), ενώ η μεταλλαγμένη διοξυγονάση PCD45/F93A παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα ~5 U/μg (σχεδόν 50 φορές μικρότερη από εκείνη της PCD45, Παράγραφος 3.5.5.6) και η PCD45/VPA ~1 U/μg (σχεδόν 230 φορές μικρότερη από την PCD45, Παράγραφος 3.5.5.5).

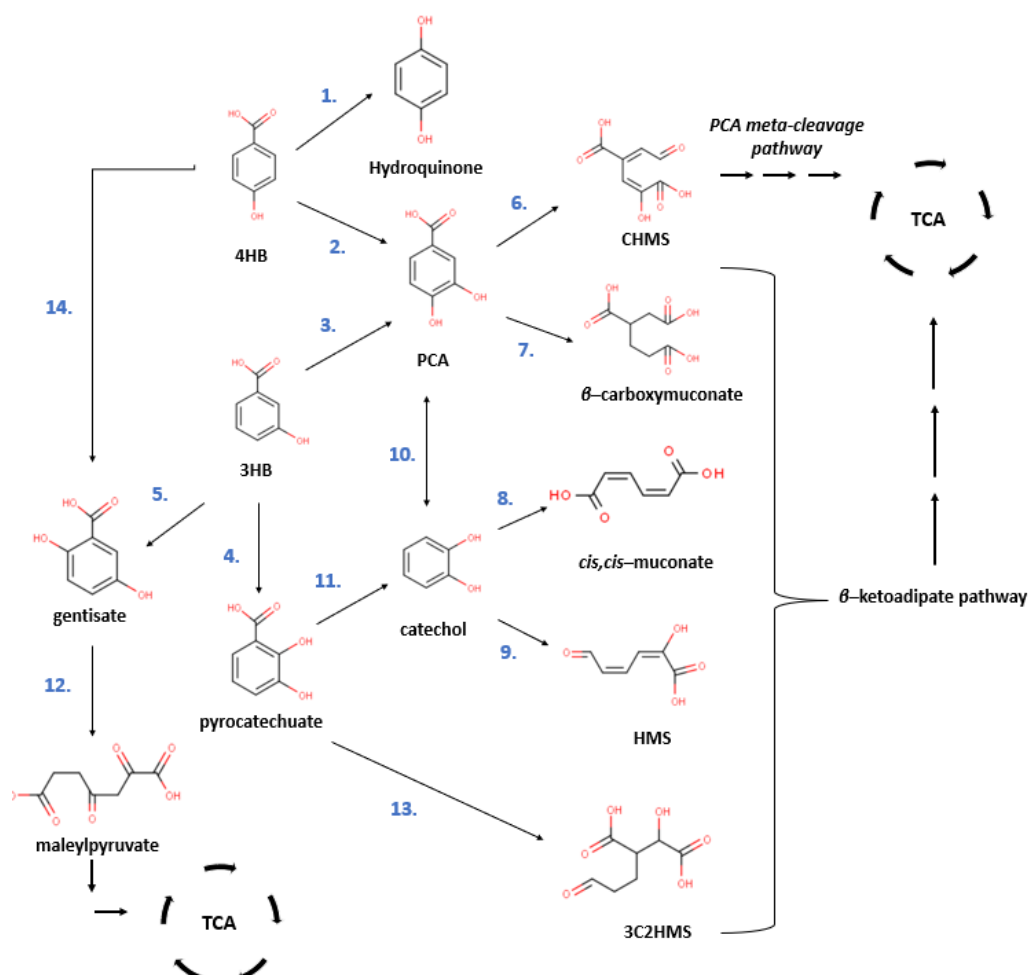
Η μείωση στη συγγένεια των μεταλλαγμένων ενζύμων με το υπόστρωμα PCA είναι αναμενόμενη καθώς τα αμινοξέα που επιλέχθηκαν για αντικατάσταση είναι αμινοξέα της περιοχής του ενεργού κέντρου που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα PCA.

Όσον αφορά στις βέλτιστες συνθήκες δράσης των δύο μεταλλαγμένων ενζύμων δε φαίνεται να παρουσιάζεται κάποια ουσιαστική διαφορά σε σύγκριση με το αγρίου τύπου ένζυμο. Και τα δύο φαίνεται να παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 25°C και pH = 9,5-10 (Παράγραφοι 3.5.5.5 και 3.5.5.6).

4.2 Καταβολισμός υδροξυβενζοϊκών οξέων.

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής (Παράγραφος 1.4) το 3- και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σαν μόρια καθώς αποτελούν κοινά ενδιάμεσα του μεταβολισμού τόσο πολλών ρυπαντών όπως κάποιοι PAHs όσο και της αποικοδόμησης της λιγνίνης, ενώ αποτελούν ρυπαντές και τα ίδια μόρια, λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους τις τελευταίες δεκαετίες στην κοσμητική και φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και ως συντηρητικά στα τρόφιμα, ενώ αποτελούν και σημαντικό τμήμα των ρυπαντών που εισέρχονται στα διάφορα οικοσυστήματα μέσω των βιομηχανικών λυμάτων (Pérez-González et al., 2012; Prathibha & Sumathi, 2008; Waigi et al., 2015; W. Wang et al., 2022). Σαν ρυπαντές έχει βρεθεί ότι δημιουργούν προβλήματα τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στις αγροκαλλιέργειες (Prathibha & Sumathi, 2008).

Η βιοαποδόμηση των υδροξυβενζοϊκών οξέων προχωράει συνηθέστερα μέσω των προαναφερθέντων κοινών κατεχολικών καταβολικών ενδιάμεσων: το PCA, το γεντισικό οξύ και την κατεχόλη, ενώ μπορεί να γίνει και μέσω του ενδιαμέσου της υδροκινόνης ή του πυροκατεχοϊκού οξέος (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Πορείες καταβολισμού του 3HB και του 4HB. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ένζυμα που συμμετέχουν στις πορείες αυτές. **1:** 1-υδροξυλάση (μονοξυγονάση) του 4HB (4HB1H), **2:** 3-υδροξυλάση του 4HB (4HB3H), **3:** 4-υδροξυλάση του 3HB (3HB4H), **4:** 2-υδροξυλάση του 3HB (3HB2H), **5:** 6-υδροξυλάση του 3HB (3HB6H), **6:** PCD45, **7:** PCD34, **8:** 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (CDO12), **9:** 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης (CDO23), **10:** αποκαρβοξυλάση του PCA, **11:** αποκαρβοξυλάση του πυροκατεχοϊκού, **12:** 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού (GDO),

13: 3,4-διοξυγονάση του πυροκατεχοϊκού, **14:** 1-υδροξυλάση του 4-υδροξυβενζοϊλο-coA (NIH shift) **CHMS:** 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη, **HMS:** 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη, **3C2HMS:** 3-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη.

Σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των υδροξυβενζοϊκών οξέων παίζουν ένζυμα που ονομάζονται υδροξυλάσες (συχνά απαντώνται και ως μονοοξυγονάσες) και εισάγουν μια υδροξυλομάδα σε κάποιον άνθρακα του αρωματικού τους δακτυλίου. Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν ανάλογα με τον μικροοργανισμό όπως διαφέρουν και οι πορείες σχάσης των παραγώγων τους (*meta*-σχάση του PCA, πορεία του β-κετοαδιπικού, πορεία του γεντισικού κλπ.).

Όπως προκύπτει από *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του *Sphe3* φαίνεται ότι αυτό παρουσιάζει το βασικό πλεονέκτημα να φέρει γονίδια για τον καταβολισμό τόσο του 3HB όσο και του 4HB. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τα locus tags **Asphe3_36590** και **Asphe3_38690** (βάση δεδομένων JGI), που φαίνεται να κωδικεύουν για ένζυμα με δραστηριότητα 4-υδροξυλάσης του 3HB και 3-υδροξυλάσης του 4HB αντίστοιχα, που υδροξυλιώνουν τα 3HB και 4HB προς PCA.

Ακόμη στο γονιδίωμα του *Sphe3* εντοπίζονται γονίδια που συμμετέχουν σε εναλλακτικές πορείες καταβολισμού του PCA όπως είναι η 4,5- και η 3,4-διοξυγονάσες του PCA (Tsagogiannis et al., 2021) αλλά και των ενδιάμεσων της κατεχόλης (1,2- και 2,3-διοξυγονάσες) και του γεντισικού οξέος (Asimakoula et al., 2022, 2023). Κάποια από τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στα δύο καταβολικά πλασμίδια του στελέχους *Sphe3* ενώ κάποια άλλα στο χρωμόσωμα του. Πιο συγκεκριμένα στο χρωμόσωμα βρίσκονται τα γονίδια που κωδικεύουν για την 3,4-διοξυγονάση του PCA και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης ενώ στο πλασμίδιο *pASPHE301* εντοπίζονται οι 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης και η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος και στο πλασμίδιο *pASPHE302* το γονίδιο για την 4,5-διοξυγονάση του PCA (Εικόνα 3.6.1).

Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν και η μελέτη των καταβολικών πορειών των 3HB και 4HB και κατ' επέκταση η μελέτη της συμμετοχής των προαναφερθέντων στις πορείες αυτές. Στο πλαίσιο αυτό σχεδιάστηκε η εκδίωξη του καταβολικού πλασμιδίου *pASPHE302* που φέρει το γονίδιο για την 4,5-διοξυγονάση του PCA. Επανεπιλημμένες προσπάθειες εκδίωξης του *pASPHE302* δεν έφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι το πλασμίδιο αυτό μπορεί να φέρει γονίδια που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κυττάρου. Ένα τέτοιο γονίδιο θα μπορούσε να είναι το *Asphe_42180* που κωδικεύει για μια ATPάση που συμμετέχει στο διαχωρισμό των αντιγράφων του χρωμοσώματος κατά την κυτταρική διαίρεση, καθώς και οποιοδήποτε από τα γονίδια που κωδικεύουν για τις (μέχρι τη στιγμή της συγγραφής της Διατριβής) αγνώστου λειτουργίας πρωτεΐνες (*hypothetical proteins*).

Στη διάθεση του εργαστηρίου υπάρχει στέλεχος από το οποίο έχει εκδιωχθεί το πλασμίδιο *pASPHE301* όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 3.6 των αποτελεσμάτων (Δραΐνας, 2012). Σκοπός επομένως ήταν να διερευνηθεί η επίδραση στον μεταβολισμό των ανωτέρω υποστρωμάτων όταν απουσιάζει το πλασμίδιο *pASPHE301* μέσω μεταβολομικής ανάλυσης των στελεχών αυτών (*Sphe3* και *Sphe3c*) και μελέτης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος.

Πραγματοποιήθηκε λοιπόν μεταβολομική ανάλυση και μελέτη της έκφρασης των γονιδίων για την 3,4- και την 4,5-διοξυγονάση του PCA και την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης σε αγρίου τύπου κύτταρα (*Sphe3*) και κύτταρα από τα οποία είχε εκδιωχθεί το μεγάλο

καταβολικό πλασμίδιο (Sphe3c) και τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία 3HB ή 4HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, ώστε να προσδιοριστούν οι καταβολικές πορείες που ακολουθούνται.

4.2.1 Καταβολισμός 3HB από κύτταρα Sphe3 και Sphe3c

4.2.1.1 Sphe3

Μεταξύ των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν σε εκχυλίσματα καλλιέργειας αγρίου τύπου κυττάρων Sphe3 παρουσία 3HB οξέος ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως ήταν αναμενόμενο, ανιχνεύτηκε το **3HB** (Εικόνα 3.8.1, Πίνακας 3.8.3) σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του κυττάρου.

Επίσης ανιχνεύτηκε ως μεταβολίτης το PCA (Εικόνα 3.8.2, Εικόνα 3.8.3) με $m/z = 153,0193$ και $R.T. = 1.88$ min (Εικόνα 3.8.2). Το m/z του μεταβολίτη αυτού θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί και με τις ενώσεις γεντισικό ή πυροκατεχοϊκό που απαντώνται καθοδικά του 3HB στην πορεία καταβολισμού του (Εικόνα 4.2). Όμως με βάση το R.T. του, και το MS/MS φάσμα της ένωσης που ταυτίζεται με εκείνο του προτύπου PCA (Εικόνα 3.8.3), αποδεικνύεται ότι είναι το PCA.

Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο καταβολισμός του 3HB προχωράει μέσω PCA και ενισχύει την υπόθεση ότι το locus tag Asphe3_36590 είναι ένα ένζυμο με δραστηριότητα 3HB4H, που είναι απαραίτητη για την υδροξυλίωση του 3HB προς PCA. Η πορεία αυτή απαντάται αρκετά σπάνια στα βακτήρια καθώς μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί μόνο σε διάφορα στελέχη *C. testosteroni* (Chang & Zylstra, 2008; Michalover & Ribbons, 1973; Ni et al., 2013). Όπως έχει αναφερθεί και στην Παράγραφο 1.4 της Εισαγωγής, συνηθέστερα το 3HB υδροξυλιώνεται προς γεντισικό μέσω της δράσης μιας 6-υδροξυλάσης του 3HB (3HB6H). Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα στελέχη *K. pneumoniae* (Jones & Cooper, 1990; Suárez et al., 1995), *P. cepacia* (L. H. Wang et al., 1987), *P. aeruginosa* (Groseclose & Ribbons, 1981), *P. alcaligenes* NCIMB 9867 (X. Gao et al., 2005a), *Martella* sp. AD-3 (X. Chen et al., 2018), *C. farmeri* (Y. Ren et al., 2014), *S. typhimurium* (Goetz & Harmuth, 1992), όπου το 3HB μετατρέπεται σε γεντισικό και από εκεί εισέρχεται στον βασικό μεταβολισμό του κυττάρου μέσω της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος.

Τα επίπεδα έκφρασης των 3,4- και 4,5-διοξυγονασών σχάσης του PCA παρουσία του 3HB (Παράγραφος 3.7.3.1) ενισχύουν την ανωτέρω παρατήρηση. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η PCD34 επάγεται 270 φορές και η PCD45 262 φορές σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής τους σε υπόστρωμα γλυκόζης. Είναι μάλιστα η πρώτη φορά που παρατηρείται επαγωγή της πορείας της 3,4-διοξυγονάσης του PCA κατά τον καταβολισμό του 3HB από βακτήρια, καθώς από τις λίγες αναφορές που έχουν γίνει για καταβολισμό 3HB μέσω PCA, αυτή φαίνεται να προχωράει μέσω της 4,5-σχάσης του τελευταίου (Ni et al., 2013).

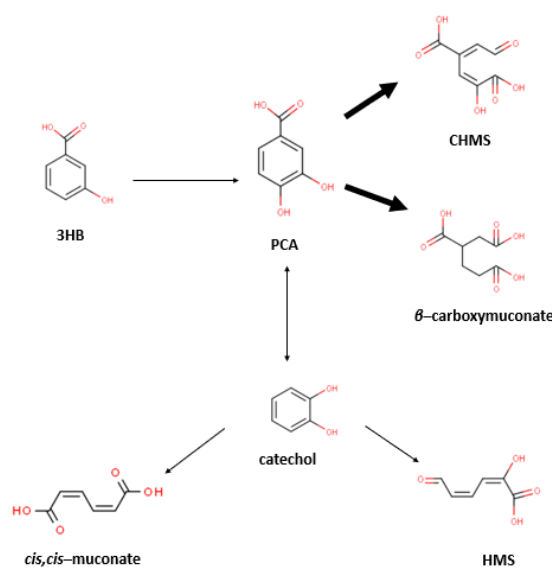
Ανιχνεύεται ένωση με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 0,67-0,85$ min (Εικόνα 3.8.4) σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης (Πίνακας 3.8.4). Αυτό το m/z μπορεί να αντιστοιχηθεί σε διάφορους μεταβολίτες που απαντώνται στις πορείες καταβολισμού της κατεχόλης όπως το cis,cis-μουκονικό οξύ (1,2-σχάση) και η 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη (2,3-σχάση). Παρόλα αυτά, απουσία πρότυπων ενώσεων δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση του συγκεκριμένου μεταβολίτη με απόλυτη βεβαιότητα. Το γεγονός ότι ανιχνεύονται μεταβολίτες της κατεχόλης προκαλεί εντύπωση καθώς κατά τον καταβολισμό του 3HB κατεχόλη μπορεί να προκύψει μόνο μέσω αποκαρβοξυλίωσης του PCA (Παράρτημα Π4) με τη δράση μιας

αποκαρβοξυλάσης του PCA και μέχρι τη στιγμή της συγγραφής της παρούσας Διατριβής δεν έχει εντοπιστεί κάποιο ένζυμο με τέτοια δραστικότητα στο *Srhe3*.

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (CDO12) προκύπτει ότι παρουσιάζει πολύ μικρότερη επαγωγή σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της σε υπόστρωμα γλυκόζης (μόνο 35 φορές) σε αντίθεση με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως για τις διοξυγονάσεις του PCA.

Τέλος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.8.3, στα εκχυλίσματα από όλες τις φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας πέραν της ύστερης στατικής εντοπίζεται μεταβολίτης με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,57\text{min}$ (Εικόνα 3.8.5). Δεδομένου ότι το 3HB, όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να καταβολίζεται μέσω PCA, η ένωση αυτή μπορεί να αντιστοιχηθεί σε μεταβολίτες είτε της 3,4-σχάσης (β-καρβόξυ-cis,cis-μουκονικό) είτε της 4,5-σχάσης του PCA (4-καρβόξυ-2-υδρόξυ-μουκονική ημιαλδεΐδη). Και στη συγκεκριμένη περίπτωση η περαιτέρω ταυτοποίηση του μεταβολίτη δεν κατέστη εφικτή απουσία πρότυπων των ενώσεων αυτών.

Ανακεφαλαιώνοντας, μέσω της συνδυαστικής προσέγγισης μεταβολομικής και μεταγραφομικής ανάλυσης, στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής αποσαφηνίστηκε ότι η πορεία καταβολισμού στο *Srhe3* γίνεται μέσω PCA και κατεχόλης και όχι μέσω γεντισικού οξέος που απαντάται συνηθέστερα στα βακτήρια (Εικόνα 4.4). Φαίνεται μάλιστα να προτιμάται είτε η πορεία της *ortho*- (PCD34) είτε της *meta*-σχάσης (PCD45) του PCA έναντι αυτής της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης με βάση τα όσα προκύπτουν από τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων διοξυγονασών (Παράγραφος 3.7.3.1).



Εικόνα 4.4: Πορεία καταβολισμού του 3HB σε κύτταρα *Srhe3*. Σύνοψη των πιθανών πορειών καταβολισμού του 3HB στο *Srhe3* με βάση τους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση. Με έντονα βέλη απεικονίζονται οι πορείες των PCD45 PCD34 που φαίνεται να επάγονται παρουσία 3HB.

4.2.1.2 *Srhe3c*

Η μεταβολομική ανάλυση του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* σε 3HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας έδειξε επίσης την παρουσία του 3HB (Εικόνα 3.8.6, Πίνακας 3.8.4) σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του κυττάρου, καθώς και του μεταβολίτη **PCA** (Πίνακες 3.8.1 και 3.8.2). Άρα και στην περίπτωση του *Srhe3c* ο καταβολισμός του 3HB προχωράει μέσω PCA.

Πέραν του μεταβολίτη που ταυτοποιείται ως PCA, στα εκχυλίσματα που προέρχονται από όλες τις φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας πέραν της ύστερης στατικής, ανιχνεύεται επίσης ένωση με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,57\text{min}$ (Εικόνα 3.8.9), που αντιστοιχεί σε μεταβολίτες που απαντώνται καθοδικά του PCA είτε στην πορεία της 3,4-σχάσης (β-καρβοξυ-cis,cis-μουκονικό οξύ, γ-καρβοξυμουκονολακτόνη, 2-καρβοξυ-2,3-διυδρο-5-οξοφουραν-οξικό οξύ) είτε στην πορεία της 4,5-σχάσης (CHMS, 2-υδρόξυ-2-υδροπυρον-4,6-δικαρβοξυλικό οξύ) του αρωματικού του δακτυλίου.

Ενώ απουσία πρότυπων ενώσεων δεν μπορεί να γίνει ταυτοποίηση του μεταβολίτη αυτού, τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης (Παράγραφος 3.7.2.1) συνηγορούν στο ότι προτιμάται η πορεία της *meta*-σχάσης του PCA (PCD45). Πιο συγκεκριμένα όταν κύτταρα *Srhe3c* αναπτύσσονται παρουσία 3HB η έκφραση της PCD45 επάγεται κατά σχεδόν 300 φορές σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της σε υπόστρωμα γλυκόζης. Αντίθετα παρατηρείται πολύ μικρότερη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων για την PCD34 και για την CDO12 (28 και 13 φορές σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης τους σε υπόστρωμα γλυκόζης). Παρατηρείται δηλαδή ότι υπάρχει σημαντική διαφορά κυρίως στα επίπεδα έκφρασης της PCD34 μεταξύ του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους όταν αυτά καλλιεργούνται παρουσία 3HB, με την έκφραση αυτής να επάγεται κατά 270 φορές στο *Srhe3* ενώ μόνο κατά 28 φορές στο *Srhe3c*. Το αποτέλεσμα αυτό δημιουργεί ερωτηματικά που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Πως δηλαδή η απουσία του μεγάλου πλασμιδίου επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα.

Ένας ακόμη μεταβολίτης που ανιχνεύεται κατά την εκθετική και ύστερη εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων *Srhe3c* σε 3HB, είναι η ένωση με $m/z = 109,0295$ και $R.T. = 3\text{ min}$ (στήλη Hypersil GOLD, Εικόνα 3.8.10). Αυτός ο μεταβολίτης θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί είτε με την υδροκινόνη είτε με την κατεχόλη. Μέσω όμως του $R.T.$ των πρότυπων ενώσεων (0,58 min για την υδροκινόνη και 3,2 min για την κατεχόλη) ταυτοποιείται ως **κατεχόλη**. Φαίνεται πως μέρος του PCA μετατρέπεται σε κατεχόλη μέσω της ενδεχόμενης δράσης κάποιας αποκαρβοξυλάσης. Ενώ στη βιβλιογραφία υπάρχουν κάποιες αναφορές για τη μετατροπή του PCA προς κατεχόλη μέσω αποκαρβοξυλασών του PCA, αυτή η πορεία απαντάται πολύ σπάνια και μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί τέτοια ένζυμα από λίγους μικροοργανισμούς, όπως η *Klebsiella aerogenes* (Grant & Patel, 1969), το *Clostridium hydroxybenzoicum* (He & Wiegel, 1996) και το *Enterobacter cloacae* (Yoshida et al., 2010), ενώ στο *Srhe3* δε φαίνεται να εντοπίζεται αντίστοιχο ένζυμο. Παρόλα αυτά, οι Chakraborty et al. πρόσφατα ανακάλυψαν ότι στο θερμοφίλο *Thermus oshimai* JL-2 η αποκαρβοξυλίωση του PCA προς κατεχόλη καταλύεται από μια αποκαρβοξυλάση της γ-καρβοξυμουκονολακτόνης (J. Chakraborty et al., 2021). Η γ-καρβοξυμουκονολακτόνη αποτελεί μεταβολίτη της πορείας της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (Παράρτημα Π4) και στο γονιδίωμα του *Srhe3* εντοπίζεται ένζυμο με δραστικότητα αποκαρβοξυλάσης γ-καρβοξυμουκονολακτόνης (locus tag *Asrhe3_38820*) η οποία μάλιστα φαίνεται να επάγεται σε μεγάλο βαθμό όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία βενζοϊκού ή πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Τα στοιχεία αυτά έχουν προκύψει από πρωτεομική ανάλυση καλλιεργειών *Srhe3* κυττάρων που διενεργείται από άλλα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας. Η ετερόλογη έκφραση και ο χαρακτηρισμός αυτού του ενζύμου θα απαντούσε μετά βεβαιότητας στο αν και στο *Srhe3* το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει το PCA και το μετατρέπει σε κατεχόλη.

Στα εκχυλίσματα από όλες τις φάσεις ανάπτυξης του *Srhe3c* ανιχνεύεται (όπως και στην περίπτωση του *Srhe3*) ο μεταβολίτης με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 0,67-0,85\text{ min}$ (Εικόνα 3.8.8) που όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη Παράγραφο θα μπορούσε να αποδοθεί

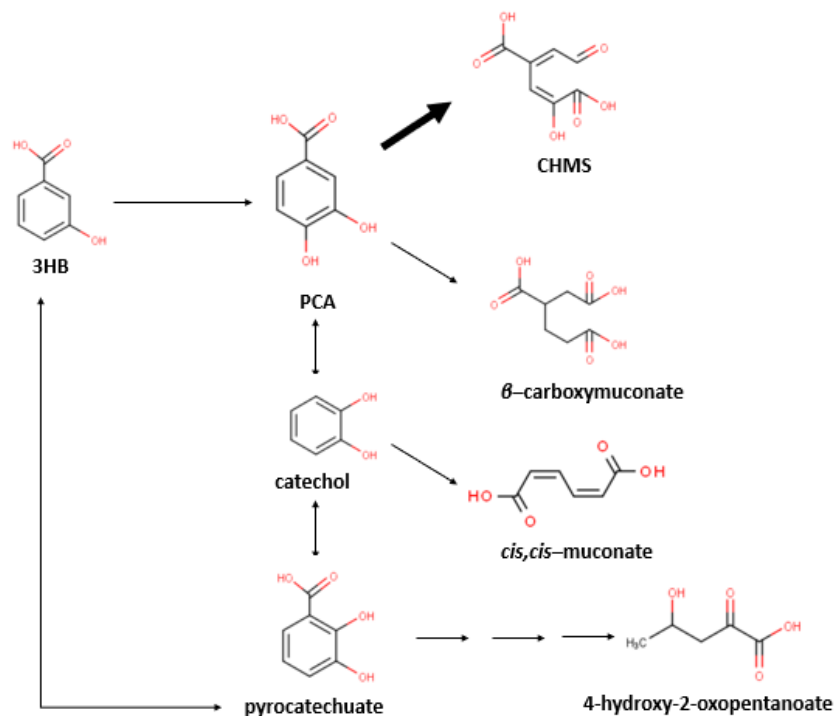
σε διάφορους μεταβολίτες του καταβολισμού της κατεχόλης (Πίνακας 3.8.4). Στην περίπτωση όμως του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* απουσιάζει το γονίδιο για την 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης (CDO23) που εντοπίζεται στο πλασμίδιο *pASrHE301* (Εικόνα 3.6.1.1, Κεφάλαιο 3.6) το οποίο και έχει εκδιωχθεί. Άρα ο μεταβολίτης αυτός μπορεί να αντιστοιχηθεί με κάποιον από τους μεταβολίτες της πορείας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης όπως το *cis,cis*-μουκονικό, η μουκονολακτόνη και το 3-οξοαδιπικό (Πίνακας 3.8.4 και Παράρτημα Π4).

Τέλος, πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μεταβολίτης με $m/z = 131,0357$ και $R.T. = 0,96 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.11) ο οποίος αντιστοιχεί στην ένωση **4-υδροξυ-2-οξοπεντανοϊκό οξύ** (Πίνακας 3.8.4). Ο μεταβολίτης αυτός είναι κοινό ενδιαμέσο των καταβολικών πορειών της CDO23 και της 3,4-διοξυγονάσης του πυροκατεχοϊκού οξέος (Παράρτημα Π4). Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι, όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο για τη CDO23 απουσιάζει από το μεταλλαγμένο στέλεχος και στο ότι το *Srhe3* δε φαίνεται να φέρει στο γονιδίωμα του γονίδια τόσο για τη 2-υδροξυλάση του 3HB (3HB2H, υδροξυλίωση 3HB προς πυροκατεχοϊκό) όσο και για την 3,4-διοξυγονάση του πυροκατεχοϊκού.

Εύλογα δημιουργείται το ερώτημα του πως προκύπτει το πυροκατεχοϊκό από το 3HB και πως αυτό διασπάται προς 4-υδροξυ-2-οξοπεντανοϊκό. Ως προς την προέλευση του πυροκατεχοϊκού οξέος, αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου ενζύμου με δραστηριότητα 3HB2H το οποίο δεν έχει εντοπιστεί ακόμη στο *Srhe3*. Μια ακόμη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η κατεχόλη μετατρέπεται σε πυροκατεχοϊκό μέσω μια αντίδρασης καρβοξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου της κατεχόλης σε θέση τέτοια ώστε να δώσει πυροκατεχοϊκό οξύ. Αυτή η αντίδραση θα μπορούσε να καταλύεται από την προαναφερθείσα καρβοξυλίωση της γ -καρβοξυμουκονολακτόνης ή κάποια αποκαρβοξυλίωση του πυροκατεχοϊκού (δεν έχει αποδοθεί τέτοια λειτουργία σε κάποια πρωτεΐνη του *Srhe3* μέχρι τη στιγμή της συγγραφής της Διατριβής). Η τελευταία καταλύει συνήθως την αποκαρβοξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου του πυροκατεχοϊκού προς κατεχόλη, όμως οι Sato et al. παρατήρησαν την αντίστροφη αντίδραση καρβοξυλίωσης της κατεχόλης προς πυροκατεχοϊκό από μία αποκαρβοξυλίωση του πυροκατεχοϊκού, στο *Rhizobium radiobacter* WU-0108 (Sato et al., 2015).

Όσον αφορά στη διάσπαση του πυροκατεχοϊκού μέσω της 3,4-σχάσης του αρωματικού του δακτυλίου ώστε να προκύψει τελικά το 4-υδροξυ-2-οξοπεντανοϊκό, θα μπορούσε το πυροκατεχοϊκό να αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από κάποια άλλη διοξυγονάση (όπως για παράδειγμα κάποια από τις διοξυγονάσες του PCA). Θα μπορούσε επίσης να υπάρχει κάποιο ένζυμο με δραστηριότητα 3,4-διοξυγονάσης του πυροκατεχοϊκού η οποία δεν έχει όμως αποδοθεί μέχρι την περίοδο της συγγραφής της Διατριβής.

Καταλήγοντας, φαίνεται ότι ο καταβολισμός του 3HB και στο μεταλλαγμένο στέλεχος *Srhe3c* προχωράει κυρίως μέσω PCA και συγκεκριμένα μέσω της πορείας της 4,5-σχάσης του προς CHMS. Φαίνεται όμως να υπάρχουν και περιφερειακές πορείες καταβολισμού του 3HB, όπως η πορεία της 3,4-σχάσης του PCA, η αποκαρβοξυλίωση αυτού προς κατεχόλη και στη συνέχεια η σχάση της μέσω της 1,2-διοξυγονάσης ενώ υπάρχουν και στοιχεία καταβολισμού μέσω της πορείας της 3,4-σχάσης του πυροκατεχοϊκού οξέος τα οποία χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης ώστε να αποσαφηνιστούν τα ενδιάμεσα βήματα της πορείας αυτής. Στην Εικόνα 4.5 συνοψίζονται τα όσα αναφέρονται παραπάνω.



Εικόνα 4.5: Πορεία καταβολισμού του 3HB σε κύτταρα *Sphe3c*. Σύνοψη των πιθανών πορειών καταβολισμού του 3HB στο *Sphe3c* με βάση τους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση. Με έντονα βέλη απεικονίζονται η πορεία της PCD45 ή έκφραση της οποίας φαίνεται να επάγεται παρουσία 3HB.

4.2.2 Καταβολισμός 4HB από κύτταρα *Sphe3* και *Sphe3c*

4.2.2.1 *Sphe3*

Μεταξύ των μεταβολιτών που ανιχνεύονται σε εκχυλίσματα καλλιέργειας αγρίου τύπου κυττάρων *Sphe3* παρουσία 4HB οξέος ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως ήταν αναμενόμενο, ανιχνεύεται το υπόστρωμα 4HB (Εικόνα 3.8.12, Πίνακας 3.8.3) σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του.

Επίσης, ανιχνεύτηκε ως μεταβολίτης το **PCA** (Εικόνα 3.8.13). Σύμφωνα με τα όσα απεικονίζονται στην Εικόνα 4.3 ο καταβολισμός του 4HB προχωράει είτε μέσω υδροκίνησης είτε μέσω PCA. Το $m/z = 153,0193$ θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί μόνο με το **PCA** εκ των δυο ενώσεων. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από το R.T. όσο και από το MS/MS φάσμα της ένωσης (Εικόνα 3.8.14).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.8.5, ένας ακόμη μεταβολίτης που ανιχνεύεται είναι η ένωση με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,54\text{min}$ (Εικόνα 3.8.15). Καθώς ο καταβολισμός του 4HB προχωρά μέσω PCA αυτή η ένωση θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί σε μεταβολίτες είτε της 4,5- είτε της 3,4-σχάσης του PCA (Πίνακας 3.8.5). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως δεν κατέστη εφικτή η περαιτέρω ταυτοποίηση του συγκεκριμένου μεταβολίτη λόγω απουσίας πρότυπων ενώσεων.

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων για την PCD45 και την PCD34 (Παράγραφος 3.7.3.2) δείχνει ότι οι δύο διοξυγονάσεις του PCA φαίνεται να επάγονται σε παρόμοια επίπεδα σε υπόστρωμα 4HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Πιο συγκεκριμένα η έκφραση της PCD45 φαίνεται να επάγεται σχεδόν 450 φορές και εκείνη της PCD34 σχεδόν 370 φορές αντίστοιχα σε υπόστρωμα 4HB συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης τους σε υπόστρωμα γλυκόζης.

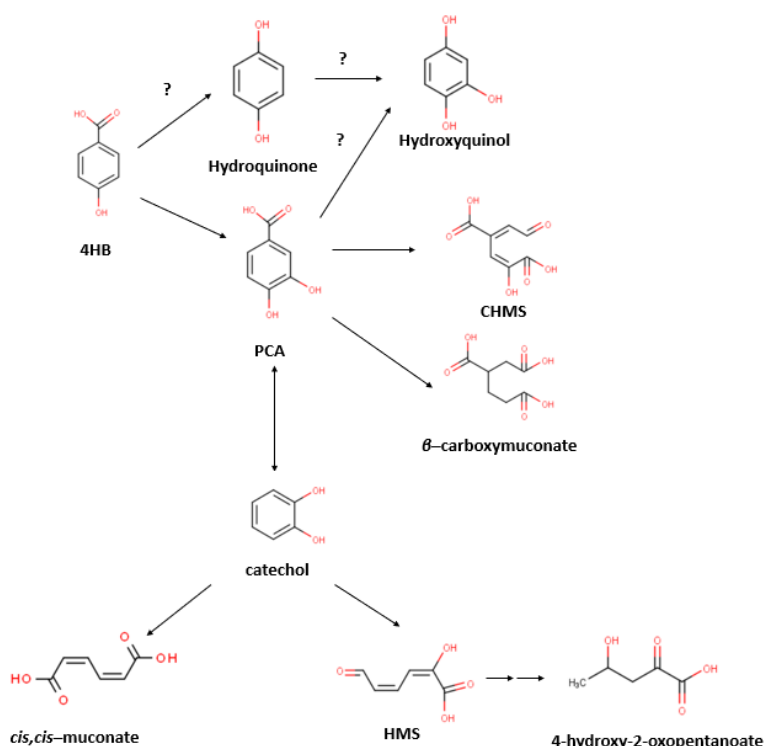
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο καταβολισμός του 4HB στο *Sphe3* προχωράει μέσω του PCA ενώ επάγεται τόσο η *ortho*- όσο και η *meta*-σχάση αυτού (PCD34 και PCD45 αντίστοιχα. Η επαγωγή και των δύο πορειών σχάσης του PCA κατά τον αερόβιο καταβολισμό του 4HB, φαίνεται να είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται. Στους μικροοργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι την περίοδο της συγγραφής της Διατριβής η σχάση του PCA γίνεται είτε μέσω της οδού της *meta*-σχάσης του (PCD45) είτε μέσω της οδού του *β*-κετοαδιπικού (PCD34, GDO12). Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα στελέχη *Novosphingobium pentaromativorans* (Yun et al., 2014), *Acinetobacter* sp. (Allende et al., 2000), *C. testosteroni* CNB-1 (Ni et al., 2013), *Comamonas* sp. 7D-2 (K. Chen et al., 2013) και *Delftia* sp. EOB-17 (K. Chen et al., 2015) όπου ακολουθείται η *meta*-σχάση του αρωματικού δακτυλίου του PCA. Πιο συχνή φαίνεται να είναι η πορεία του *β*-κετοαδιπικού είτε μέσω της 3,4-σχάσης του PCA είτε μέσω της αρχικής αποκαρβοξυλίωσης αυτού προς κατεχόλη και έπειτα μέσω της 1,2-σχάσης αυτής. Στελέχη στα οποία ακολουθείται η πορεία του *β*-κετοαδιπικού κατά τον καταβολισμό του 4HB είναι τα *R. oracus* (Henson et al., 2018), *R. erythropolis* (Suemori et al., 1995), *P. putida* (Kim et al., 2006), *Xanthomonas campestris* (J. Y. Wang et al., 2015), *Cupriavidus necator* JMP134 (Donoso et al., 2011), *Glutamicibacter* sp. 0426 (C. Ren et al., 2023), *A. baylyi* ADP1 (Brzostowicz et al., 2003) και *Variovorax* sp. PAMC26660 (Ghimire et al., 2022).

Στο στέλεχος *Sphe3* φαίνεται να ακολουθείται και η περιφερική πορεία της κατεχόλης καθώς μεταξύ των μεταβολιτών που ανιχνεύονται κατά τη μεταβολομική ανάλυση βρίσκεται και μια ένωση με $m/z = 109,0295$ και $R.T. = 1,84 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.17, Πίνακας 3.8.5). Σύμφωνα με το $R.T.$ της πρότυπης ένωσης της **κατεχόλης** (2 min, Πίνακας 3.8.1) ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποιείται ως κατεχόλη. Εκτός της κατεχόλης ανιχνεύεται και ένωση με $m/z = 141,0193$ και $R.T. = 1,34 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.16) που θα μπορούσε να αντιστοιχηθεί με διάφορους μεταβολίτες της σχάσης της κατεχόλης (Πίνακας 3.8.5) απουσία όμως πρότυπων ενώσεων δεν μπορεί να προκύψει ασφαλές συμπέρασμα για το αν ακολουθείται η πορεία της 1,2- ή της 2,3-σχάσης της κατεχόλης. Ένα στοιχείο θα μπορούσε να αποτελέσει και η ανίχνευση του μεταβολίτη με $m/z = 131,0357$ και $R.T. = 0,91-1,2 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.20) που αντιστοιχεί στο **4-καρβόξυ-2-οξοπεντανοϊκό** (Πίνακας 3.8.5). Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν και στην Παράγραφο 4.2.1.2, ο μεταβολίτης αυτός αποτελεί μέρος τόσο της πορείας της 3,4-σχάσης του πυροκατεχοϊκού όσο και της 2,3-σχάσης της κατεχόλης (Παράρτημα Π4). Η παρουσία του λοιπόν σε καλλιέργεια κυττάρων *Sphe3* σε 4HB θα μπορούσε να είναι μια ένδειξη ότι για τον καταβολισμό του ακολουθείται και η πορεία της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης πέραν των πορειών της 3,4- και 4,5-διοξυγονασών του PCA.

Αίσθηση προκαλεί η παρουσία του μεταβολίτη με $m/z = 125,025$ και $R.T. = 2,06 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.18) ο οποίος, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.8.5 ταυτοποιείται ως η ένωση **υδροξυκινόλη** (1,2,4-βενζενετριόλη). Ο μεταβολίτης αυτός μπορεί να προκύψει είτε μέσω της δράσης μιας 1-υδροξυλάσης του 4HB (4HB1H) η οποία μετατρέπει το 4HB σε υδροκινόνη (Εικόνα 4.3) και την μετέπειτα μετατροπή αυτής σε υδροξυκινόλη, είτε μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του δακτυλίου του PCA πάλι μέσω της 4HB1H. Η ανίχνευση της υδροξυκινόλης σε καλλιέργεια κυττάρων *Sphe3* σε 4HB προκαλεί ενδιαφέρον καθώς παρουσία τέτοιων ενζύμων αλλά και οι προαναφερθείσες αντιδράσεις έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής μόνο σε στελέχη μυκήτων όπως η *Candida parapsilosis* (Errpink et al., 1997) και ο *Aspergillus niger* (Semana & Powlowski, 2019) ενώ δεν υπάρχει καμία αναφορά τέτοιων ενζύμων σε βακτήρια.

Τέλος ο μεταβολίτης με $m/z = 167,0349$ και $R.T. = 7,27 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.19) που ανιχνεύεται κατά την εκθετική και ύστερη εκθετική φάση ανάπτυξης και ταυτοποιείται ως **ομογεντισικό** (Πίνακες 3.8.2 και 3.8.5), αποτελεί βασικό μεταβολίτη της τυροσίνης (Ghimire et al., 2022).

Συνοψίζοντας τα όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα Παράγραφο ο καταβολισμός του 4HB στο *Srhe3* προχωράει μέσω του PCA και πιο συγκεκριμένα μέσω της 3,4- και 4,5-σχάσης του. Φαίνεται ακόμη ότι το PCA υφίσταται και αποκαρβοξυλίωση προς κατεχόλη η οποία στη συνέχεια διασπάται μέσω τόσο της 1,2- όσο και της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης. Τέλος υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ίσως λαμβάνει χώρα μια οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση είτε του 4HB προς υδροκινόνη (η οποία μετατρέπεται σε υδροξυκινόλη) είτε του PCA απευθείας προς υδροξυκινόλη παρόλο που αυτή η υπόθεση χρήζει περεταίρω διερεύνησης καθώς για να επιβεβαιωθεί θα πρέπει να προσδιοριστούν τα ένζυμα που θα μπορούσαν να καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης.



Εικόνα 4.6: Πορεία καταβολισμού του 4HB σε κύτταρα *Srhe3*. Σύνοψη των πιθανών πορειών καταβολισμού του 4HB στο *Srhe3* με βάση τους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση.

4.2.2.2 *Srhe3c*

Στην περίπτωση της καλλιέργειας του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* σε 4HB ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.8.6, ανιχνεύεται επίσης σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης το υπόστρωμα της καλλιέργειας **4HB** (Εικόνα 3.8.21, Πίνακες 3.8.1 και 3.8.6).

Ανιχνεύεται επίσης σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης ως μεταβολίτης το **PCA** (Εικόνα 3.8.22). Επίσης ανιχνεύεται ένωση με $m/z = 185,0091$ και $R.T. = 0,35 \text{ min}$ (Εικόνα 3.8.23) που θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε διάφορους μεταβολίτες είτε της 3,4- είτε της 4,5-σχάσης του PCA (Πίνακας 3.8.6). Σύμφωνα όμως με τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης, τα οποία δείχνουν πολύ μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *pcd45* απ' ό,τι του *pcd34* σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης τους σε υπόστρωμα γλυκόζης, φαίνεται ότι

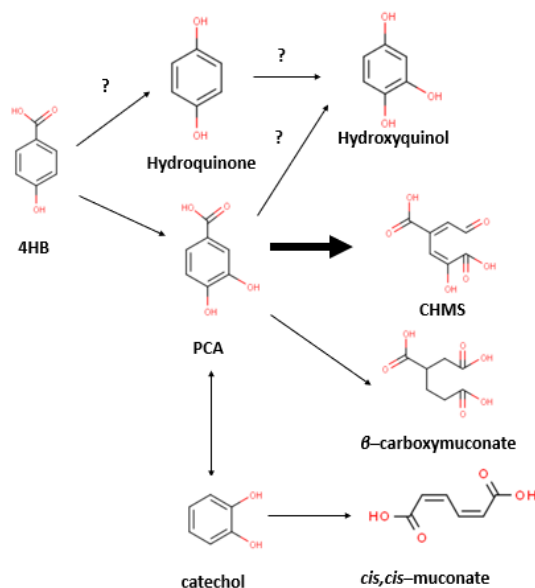
προτιμάται η πορεία της 4,5-σχάσης του PCA (*meta*-σχάση) και ότι ο προαναφερθέν μεταβολίτης αντιστοιχεί είτε σε CHMS είτε σε 2-υδρόξυ-2-υδροπυρον-4,6-δικαρβοξυλικό (Πίνακας 3.8.6). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 3.7.2.2, όταν τα κύτταρα *Srhe3c* καλλιεργούνται παρουσία 4HB, τότε η έκφραση του γονιδίου *pcd45* επάγεται κατά σχεδόν 165 φορές ενώ του *pcd34* κατά 27 φορές. Το αποτέλεσμα αυτό δημιουργεί ερωτηματικά που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω. Πως δηλαδή η απουσία του μεγάλου πλασμιδίου επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα.

Ανιχνεύεται επίσης ο μεταβολίτης με **$m/z = 109.0295$** και **R.T. = 2 min** (Εικόνα 3.8.26) που σύμφωνα με το R.T. της πρότυπης ένωσης ταυτοποιείται ως **κατεχόλη** (Πίνακες 3.8.1 και 3.8.2) ενώ ανιχνεύεται και ένωση με $m/z = 141,0193$ και R.T. = 0,79 – 1,17 min (Εικόνα 3.8.24) που θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε κάποιον από τους μεταβολίτες είτε της 1,2- είτε της 2,3-σχάσης της κατεχόλης. Σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί όμως μέχρι στιγμής, πρόκειται για κάποιον από τους μεταβολίτες της πορείας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης καθώς το γονίδιο για την 2,3-διοξυγονάση απουσιάζει από τα μεταλλαγμένα κύτταρα.

Ακόμη, ανιχνεύεται μεταβολίτης με **$m/z = 125,0250$** και **R.T. = 1,96 min** (Εικόνα 3.8.25). Πρόκειται για τον μεταβολίτη **υδροξυκινόλη** και στην προηγούμενη Παράγραφο (Παράγραφος 4.2.2.1) αναφέρθηκε ότι μπορεί να αποτελεί μέρος του καταβολισμού της υδροκινόνης ή της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του PCA. Η 4HB1H που είναι το απαραίτητο ένζυμο για την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 4HB προς υδροκινόνη που υδροξυλιώνεται μετέπειτα προς υδροξυκινόλη, όσο και του PCA προς υδροξυκινόλη δεν έχει εντοπιστεί μέχρι στιγμής στο γονιδίωμα του *Srhe3*. Το γεγονός όμως ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανιχνεύθηκε μόνο σε καλλιέργειες τόσο του αγρίου τύπου όσο και του μεταλλαγμένου στελέχους σε 4HB, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι στο γονιδίωμα των κυττάρων αυτών υπάρχει ένζυμο με δραστηριότητα 4HB1H.

Τέλος, ανιχνεύεται και στην περίπτωση του μεταλλαγμένου στελέχους *Srhe3c* η ένωση με **$m/z = 167,0349$** και **R.T. = 7.27 min** (Εικόνα 3.8.27) που ταυτοποιείται ως το **ομογεντισικό οξύ**, το οποίο αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη του καταβολισμού της τυροσίνης.

Συνοψίζοντας τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής για τη μεταβολομική ανάλυση καλλιέργειας *Srhe3c* σε 4HB ως τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Εικόνα 4.7), ο καταβολισμός αυτού φαίνεται να προχωράει κυρίως μέσω της 4,5-σχάσης του PCA και δευτερευόντως μέσω της 3,4-σχάσης του και της αποκαρβοξυλίωσης του προς κατεχόλη, η οποία με τη σειρά της διασπάται μέσω της δράσης της 1,2-διοξυγονάσης της. Υπάρχουν ακόμη και στη συγκεκριμένη περίπτωση (όπως και στην περίπτωση των αγρίου τύπου κυττάρων *Srhe3*) ενδείξεις ύπαρξης ενζύμου με δραστηριότητα 4HB1H λόγω της ανίχνευσης του μεταβολίτη της υδροξυκινόλης.



Εικόνα 4.7: Πορεία καταβολισμού του 4HB σε κύτταρα *Sphe3c*. Σύνοψη των πιθανών πορειών καταβολισμού του 4HB στο *Sphe3* με βάση τους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση.

Εν κατακλείδι, μέσω της Μεταβολομικής και Μεταγραφομικής ανάλυσης των αγρίου τύπου (*Sphe3*) και μεταλλαγμένων (*Sphe3c*) κυττάρων σε καλλιέργειες παρουσία 3HB ή 4HB ως τις μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας αποσαφηνίστηκε μέρος των πορειών που ακολουθούνται για τον καταβολισμό των ενώσεων αυτών, ενώ παράλληλα αποσαφηνίστηκε και η συμβολή διαφόρων ενζύμων στις πορείες αυτές. Προέκυψαν έτσι στοιχεία για το ποιες από τις πορείες αυτές προτιμώνται για τη διάσπαση των ενώσεων αυτών και ποιες συμμετέχουν δευτερογενώς. Ακόμη μέσω της παρούσας Διατριβής όσο και μέσω προηγούμενων μελετών που διεξήχθησαν στο εργαστήριό μας, υπογραμμίζεται το μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζει το *P. phenanthrenivorans* *Sphe3* ως οργανισμός για τη βιοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών καθώς φαίνεται να έχει την ικανότητα να αξιοποιεί ποικίλες πορείες για τον καταβολισμό διαφόρων αρωματικών ενώσεων ή άλλων ρυπαντών φέροντας στο γονιδίωμα του ένα μεγάλο ρεπερτόριο από καταβολικά γονίδια η έκφραση των οποίων φαίνεται να επάγεται παρουσία των ρυπαντών αυτών.

Το ρεπερτόριο αυτό καθιστά το *Sphe3* πέραν από ένα εργαλείο βιοεξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών, και μια δεξαμενή ενζύμων μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με τη χρήση μεθόδων Βιοχημικής Μηχανικής. Τέτοια ένζυμα είναι η 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης, οι υδροξυλάσες του 3HB και του 4HB αλλά και ένζυμα με δραστηριότητα αποκαρβοξυλάσης του PCA που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η κατασκευή «μικροβιακών εργοστασίων» για την παραγωγή *cis,cis*-μουκονικού οξέος μέσω της αποδόμησης ρυπαντών όπως η κατεχόλη, η φαινόλη, το 4HB και το PCA, που βρίσκεται σε εξέλιξη από μέλη της ερευνητικής ομάδας.

Η περαιτέρω αποσαφήνιση των καταβολικών μονοπατιών αλλά και ο προσδιορισμός των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτές καθώς και ο χαρακτηρισμός τους, θα επιτρέψει χρήση τέτοιων ενζύμων τόσο για σκοπούς βιοαποδόμησης όσο και βιοσύνθεσης ενώσεων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψη

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι διαδεδομένοι περιβαλλοντικοί ρυπαντές που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των τοξικών και/ή καρκινογόνων ιδιοτήτων τους. Οι PAHs αποτελούνται από δυο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους διατεταγμένους σε διάφορους σχηματισμούς. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις εξυγίανσης μολυσμένων περιοχών και η βιοαποδόμηση είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές. Οι διοξυγονάσες, ένζυμα που καταλύουν την εισαγωγή δυο ατόμων O_2 , παίζουν τον κεντρικό ρόλο στην αερόβια βιοαποδόμηση των PAHs.

Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που απομονώθηκε από μια μολυσμένη με κρεοζοτέλαιο περιοχή στην Ήπειρο, έχει την ικανότητα να αποδομεί φαινανθρένιο και άλλους ρυπαντές με υψηλούς ρυθμούς. Φαίνεται επίσης να συνδυάζει στο γονιδίωμα του τις πληροφορίες για διαφορετικές πορείες καταβολισμού των ενώσεων αυτών. Μπορεί λοιπόν να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός μοντέλο για την αποδόμηση των PAHs και τη μελέτη των διαφόρων πορειών μέσω των οποίων αυτή επιτυγχάνεται.

Εξετάζοντας συγκεκριμένα την βιοαποδόμηση των PAHs αλλά και άλλων ευρέως διαδεδομένων περιβαλλοντικών ρυπαντών όπως η λιγνίνη, γίνεται αντιληπτό ότι η βιοαποδόμηση πληθώρας τέτοιων ενώσεων διεξάγεται μέσω ενός περιορισμένου αριθμού κοινών μεταβολικών ενδιάμεσων. Τέτοια ενδιάμεσα είναι το πρωτοκατεχοϊκό (PCA), το γεντισικό και η κατεχόλη αλλά και τα 3- και 4-υδροξυβενζοϊκά οξέα.

Η παρούσα εργασία εστίασε κατά ένα μέρος στον καταβολισμό του PCA και συγκεκριμένα στη μελέτη των διοξυγονάσεων που καταλύουν τη σχάση του αρωματικού του δακτυλίου. Ο καταβολισμός του PCA μπορεί να γίνει μέσω τριών πορειών: την πορεία της 2,3-, την πορεία της 3,4- και την πορεία της 4,5-σχάσης του.

Στο γονιδίωμα του Sphe3 υπάρχει η πληροφορία τόσο για την 3,4- (*ortho*-σχάση) όσο και για την 4,5-σχάση (*meta*-σχάση) του PCA. Στην παρούσα Διατριβή ολοκληρώθηκε η μελέτη της 4,5-διοξυγονάσης του PCA (PCD45), η οποία είχε ξεκινήσει στο πλαίσιο της Μεταπτυχιακής μου Διατριβής, ενώ πραγματοποιήθηκε μελέτη και της 3,4-διοξυγονάσης του PCA (PCD34).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα Διατριβή ταυτοποιήθηκαν μέσω NMR τα προϊόντα της αντίδρασης της PCD45 με υπόστρωμα PCA και γαλλικού οξέος ως 4-καρβόξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεΰδη (CHMS) και 4-οξαλομεσακονικό οξύ (OMA) αντίστοιχα. Ήταν η πρώτη φορά που επετεύχθη η παρακολούθηση ενζυμικών αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο (*in situ*) με τη χρήση ελεύθερου και όχι ακινητοποιημένου ενζύμου. Ήταν επίσης η πρώτη φορά που μελετήθηκε η ισορροπία μεταξύ των δύο ισομορφών (κετονική και ενολική ισομορφή του CHMS) που παρουσιάζει το προϊόν της αντίδρασης με PCA, μέσω φασματοσκοπίας NMR.

Σε μια προσπάθεια διεύρυνσης του συνόλου των υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται από την PCD45 σχεδιάστηκαν σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων της περιοχής του ενεργού κέντρου με γνώμονα τη δημιουργία μεγαλύτερου χώρου στην περιοχή αυτή. Δημιουργήθηκαν δύο μεταλλαγμένα ένζυμα: η PCD45/F93A όπου η Phe-93 αντικαταστάθηκε με ένα κατάλοιπο αλανίνης και η PCD45/VPA όπου πραγματοποιήθηκε διπλή αντικατάσταση των καταλοίπων Val-13 και Pro-14 με δύο αντίστοιχα κατάλοιπα αλανίνης. Στην περίπτωση της PCD45/F93A διαφορές παρατηρούνται (UV/Vis φάσμα) στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με το καφεϊκό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το 3,5-δινιτροσαλικυλικό και την 2,4,6-

τριχλωροφαινόλη. Στην περίπτωση του μεταλλαγμένου ενζύμου PCD45/VPA διαφορές παρατηρούνται στο φάσμα της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με το 3- και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και με το ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ. Αντίστοιχες μεταβολές δεν παρατηρούνται στα φάσματα των αντιδράσεων με το αγρίου τύπου ένζυμο PCD45.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας προσδιορίστηκε και η κινητική σταθερής κατάστασης της έτερης διοξυγονάσης του PCA που εντοπίζεται στο γονιδίωμα του *Sphe3*, της PCD34. Η PCD34 ακολουθεί και αυτή κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{max} * [S] / ([S] + K_m)$, με $V_{max} = 0,0076 \text{ mM} / \text{min}$ και $K_m = 7,11 \text{ }\mu\text{M}$ και η βέλτιστη δραστηριότητα της παρουσιάζεται σε τιμές pH = 9 – 9,5 και σε θερμοκρασία 30 °C. Από τα υποστρώματα που εξετάστηκαν, η PCD34 φαίνεται να αναγνωρίζει (πέραν του PCA) και το γεντισικό, το γαλλικό, το κουμαρικό, το καφεϊκό και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, ενώ διαφορές σημειώθηκαν και στα UV/Vis φάσματα της αντίδρασης της PCD34 με την 4-νιτρικατεχόλη, τη 2,3-δινιτροφαινόλη και το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ.

Επιχειρήθηκε ακόμη και στην περίπτωση της PCD34 η διεύρυνση του συνόλου των υποστρωμάτων που αναγνωρίζει, ώστε να είναι σε θέση να καταλύει τη σχάση και άλλων κατεχολικών υποστρωμάτων. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε η σημειακή μετάλλαξη R123H, όπου η Arg-123 της α -υπομονάδας της PCD34 αντικαταστάθηκε με ένα κατάλοιπο ιστιδίνης. Η μετάλλαξη αυτή είχε ως αποτέλεσμα το μεταλλαγμένο ένζυμο (PCD34/R123H) να αναγνωρίζει τα υποστρώματα της κατεχόλης και του ομοπρωτοκατεχοϊκού οξέος.

Μεταξύ των ενώσεων που το *Sphe3* μπορεί να αξιοποιήσει ως πηγή άνθρακα και ενέργειας βρίσκονται και τα 3- και 4-υδροξυβενζοϊκά οξέα (3HB και 4HB αντίστοιχα). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα αλλά και οι εστέρες αυτών αποτελούν ρυπαντές που παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση στο περιβάλλον κατά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους στην κοσμητική και φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και ως συντηρητικά τροφίμων, ενώ αποτελούν δυνητικούς κινδύνους τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για τομείς της οικονομίας όπως οι καλλιέργειες.

Μέρος της παρούσας έρευνας εστίασε στην αποσαφήνιση των καταβολικών πορειών των ενώσεων αυτών στο *P. phenanthrenivorans* *Sphe3* καθώς και του ρόλου διαφόρων ενζύμων που συμμετέχουν ενδεχομένως σε αυτές. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε μεταβολομική και μεταγραφομική ανάλυση σε αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία των 3HB ή 4HB ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Από τα μεταλλαγμένα κύτταρα έχει εκδιωχθεί το ένα εκ των δύο καταβολικών πλασμιδίων του *Sphe3*, στο οποίο εντοπίζονται τα γονίδια για κάποια ένζυμα που φαίνεται να συμμετέχουν στις ανωτέρω πορείες καταβολισμού, όπως η διοξυγονάση του γεντισικού οξέος και η 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης.

Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε ότι και τα δύο στελέχη καταβολίζουν τα 3HB και 4HB μέσω του PCA ενώ φαίνεται να ακολουθείται επικουρικά και η πορεία της 1,2-σχάσης της κατεχόλης. Προέκυψαν επίσης μη αναμενόμενες, για το *Sphe3*, ενδείξεις για την παρουσία πορειών καταβολισμού των ενώσεων αυτών όπως η πορεία της 3,4-σχάσης του πυροκατεχοϊκού οξέος ή η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 4HB ή του PCA, πορείες για τις οποίες το *Sphe3* δε φαίνεται να φέρει την γενετική πληροφορία όπως έχει προκύψει από την *in silico* ανάλυση του γονιδιώματος του.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτές τις πορείες θα επιτρέψει το σχεδιασμό συστημάτων τόσο για την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών όσο και για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως το *cis,cis*-μουκονικό, αξιοποιώντας χαμηλότερου κόστους υποστρώματα όπως το 4HB, το PCA και η κατεχόλη.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are omnipresent environmental pollutants that pose great interest due to their toxic and/or carcinogenic properties. PAHs consist of two or more aromatic rings arranged in various configurations. There are various approaches for the remediation of contaminated areas, and biodegradation is one of the most effective and sustainable methods. Dioxygenases, enzymes that catalyze the incorporation of two oxygen atoms (O_2), play a central role in biodegradation and more specifically, in the aerobic biodegradation of PAHs.

Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3, isolated from a creosote-contaminated area in Epirus, has the ability to degrade phenanthrene and other pollutants at high rates. It also appears to combine information for different degradation pathways of these compounds in its genome. Therefore, it can be used as a model organism for the degradation of PAHs and the study of the various pathways through which this degradation is achieved as well as a “tank” of enzymes that could be used in designing systems for the bioremediation of polluted area (e.g., sequential immobilization of enzymes in nanomaterials to form an artificial biodegradative pathway).

By specifically examining the biodegradation of PAHs as well as other widely distributed environmental pollutants such as lignin, it becomes apparent that the degradation of a variety of such compounds occurs through a limited number of common metabolic intermediates. Such intermediates include protocatechuic acid (PCA), gentisic acid, catechol, as well as 3- and 4-hydroxybenzoic acids.

This study focuses in part on the metabolism of PCA, specifically on the study of dioxygenases that catalyze the cleavage of its aromatic ring. The metabolism of PCA can proceed through three pathways: the 2,3-cleavage pathway, the 3,4-cleavage pathway, and the 4,5-cleavage pathway.

In the genome of Sphe3, information is present for both the 3,4- (*ortho*-cleavage) and 4,5-cleavage (*meta*-cleavage) of PCA. In the present dissertation, the study of 4,5-dioxygenase of PCA (PCD45) was completed (the majority of the characterization experiments have been conducted as part of my Master thesis) and the study of 3,4-dioxygenase of PCA (PCD34) was conducted.

Specifically, using NMR spectroscopy, the reaction products of PCD45 with PCA or gallate as substrates have been identified as 4-carboxy-2-hydroxymuconic-6-semialdehyde (CHMS) and 4-oxalomesaconic acid (OMA), respectively. This was the first time that enzymatic reactions were monitored in real-time (in situ) using free and not immobilized enzyme. It was also the first time that the PCA or gallate biotransformation have been monitored in situ using a 5mm NMR tube bioreactor. It was also the first time that the keto-/ enol- forms of CHMS equilibrium has been studied through NMR spectroscopy.

In an effort to expand the range of substrates recognized by PCD45, substitutions of amino acids in the active site region were designed with the aim of creating a larger space in this region. Two mutated enzymes were generated: PCD45/F93A, where Phe-93 was replaced with an alanine residue and PCD45/VPA, where double substitution of Val-13 and Pro-14 with two alanine residues was performed.

In the case of PCD45/F93A, changes were observed (in UV/Vis spectrum) in the interaction of the enzyme with caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,5-dinitrosalicylic acid, and 2,4,6-trichlorophenol. In the case of the mutated enzyme PCD45/VPA, changes were observed in the spectrum of the enzyme's interaction with 3- and 4-hydroxybenzoic acid and with protocatechuic acid. Similar changes were not observed in the spectra of reactions with the wild-type enzyme PCD45.

As it was mentioned earlier PCD34, that is also present in the *Sphe3* genome, has been heterologously expressed and characterized. Steady-state kinetic experiments showed that it follows Michaelis-Menten kinetics, described by the equation $v = V_{max} * [S] / ([S] + K_m)$, where $V_{max} = 0,0076 \text{ mM/ min}$ and $K_m = 7,11 \text{ }\mu\text{M}$. The pH and temperature optima have been also specified as 9-9.5 and 30 °C respectively. From a broad range of substrates tested, PCD34 seems to recognize (apart from PCA) gentisate, gallate, p-cumarate, caffeate, 4-nitrocatechol, 2,3-dinitrophenol and 3,5-dinitrosalicylate.

Similar (with the case of PCD45) experiments were conducted in order to broaden the range of substrates that PCD34 recognizes. Arg-123 of the α -subunit was substituted with a His residue leading to an enzyme (PCD34/R123H) with the ability to recognize catechol as a substrate. Wild-type PCD34 lacked this ability. PCD34/R123H seems also to recognize homoprotocatechuate as a substrate.

Among the compounds that *Sphe3* is able to use as sole sources of carbon and energy there are 3-hydroxy- (3HB) and 4-hydroxybenzoic (4HB) acids. Apart from being common intermediate in many biodegradative pathways, hydroxybenzoic acids and their esters pose severe environmental pollutants due to their accumulation in the environment, as they are extensively used in the cosmetic and pharmaceutical industries as well as food preservatives. These pollutants pose potential risk for human health as well as agriculture.

Part of the present thesis focused in the elucidation of 3HB and 4HB catabolic pathways in *P. phenanthrenivorans* *Sphe3* as well as of the role of various catabolic enzymes in these pathways. To achieve this, Metabolomic and Transcriptomic analyses have been conducted in wild-type and mutant *Sphe3* cells grown either on 3HB or 4HB. Mutant cells (*Sphe3c*) were cells that one of the two catabolic plasmids of *Sphe3* was cured. The absent plasmid carries the genes encoding for various enzymes that would take part in the above-mentioned catabolic pathways, such as gentisate and catechol dioxygenases.

The afore-mentioned analyses lead to the conclusion that both 3HB and 4HB are catabolized mainly through PCA in *Sphe3* and *Sphe3c* cells while the catechol pathways are also present. There are also some indications for, unexpected for *Sphe3* and *Sphe3c* cells, the presence of pyrocatechuate 3,4-dioxygenase pathway, and the degradation of 4HB via oxidative decarboxylation leading to hydroxyquinol intermediate. These pathways were a surprise as *Sphe3* strains doesn't have the information for enzymes catalyzing the respective reactions in its genome.

The isolation and characterization of the enzymes involved in these pathways will allow the design of systems for the remediation of contaminated soils as well as the production of high-value-added products, such as *cis,cis*-muconic acid, using low-cost substrates like 4HB, PCA, and catechol.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2015.03.011>
- Ali, M., Song, X., Ding, D., Wang, Q., Zhang, Z., & Tang, Z. (2022). Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: Challenges and enhancement strategies. *Environmental Pollution*, 295, 118686. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118686>
- Allende, J. L., Gibello, A., Fortún, A., Mengs, G., Ferrer, E., & Martín, M. (2000). 4-Hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp. *Current Microbiology*, 40(1), 34–39. <https://doi.org/10.1007/S002849910007/METRICS>
- Anerao, P., Kaware, R., Khedikar, A. K., Kumar, M., & Singh, L. (2022). Phytoremediation of persistent organic pollutants: Concept challenges and perspectives. *Phytoremediation Technology for the Removal of Heavy Metals and Other Contaminants from Soil and Water*, 375–404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85763-5.00018-0>
- Arunachalam, U., Massey, V., & Miller, S. M. (1994). Mechanism of p-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 150–155. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)42327-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)42327-1)
- Asimakoula, S., Giannakopoulou, A., Lappa, E., Tsagogiannis, E., Primikyri, A., Stamatis, H., & Koukkou, A.-I. (2022). Characterization of Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and Its Stabilization by Immobilization on Nickel-Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Applied Microbiology*, 2(1), 113–132. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010007>
- Asimakoula, S., Marinakos, O., Tsagogiannis, E., & Koukkou, A. I. (2023). Phenol Degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020524>
- Assessment, U. E. N. C. for E. (2009). *POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS TOXICITY IN ANIMALS AND HUMANS*.
- Bach, Q., Kim, S., Choi, S., & Oh, Y. (2005). Enhancing the intrinsic bioremediation of PAH-contaminated anoxic estuarine sediments with biostimulating agents. *Journal of Microbiology-Seoul*, 43, 319–325. <https://koreascience.kr/article/JAKO200504840583880.pdf>
- Barry, K. P., Cohn, E. F., Ngu, A., & Taylor, E. A. (2015). Improving alternate lignin catabolite utilization of LigAB from *Sphingobium* sp. strain SYK-6 through site directed mutagenesis. *Process Biochemistry*, 50(10), 1634–1639. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.05.024>
- Barry, K. P., Ngu, A., Cohn, E. F., Cote, J. M., Burroughs, A. M., Gerbino, J. P., & Taylor, E. A. (2015). Exploring allosteric activation of LigAB from *Sphingobium* sp. strain SYK-6 through kinetics, mutagenesis and computational studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 567, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.019>
- Barry, K. P., & Taylor, E. A. (2013a). Characterizing the promiscuity of LigAB, a lignin catabolite degrading extradiol dioxygenase from *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Biochemistry*, 52(38), 6724–6736. <https://doi.org/10.1021/bi400665t>
- Barry, K. P., & Taylor, E. A. (2013b). *Characterizing the Promiscuity of LigAB, a Lignin Catabolite Degrading Extradiol Dioxygenase from Sphingomonas paucimobilis SYK-6*.

<https://doi.org/10.1021/bi400665t>

- Berkel, W. J. H., Eppink, M. H. M., Middelhoven, W. J., Vervoort, J., & Rietjens, I. M. C. M. (1994). Catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* proceeds through initial oxidative decarboxylation by a FAD-dependent 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase. *FEMS Microbiology Letters*, 121(2), 207–215. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1994.TB07100.X>
- Bolden, A. L., Rochester, J. R., Schultz, K., & Kwiatkowski, C. F. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. *Reproductive Toxicology*, 73, 61–74. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2017.07.012>
- Boonchan, S., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (1998). *Surfactant-Enhanced Biodegradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Stenotrophomonas maltophilia*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980820\)59:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980820)59:4)
- Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Muoz, R., Hatti-Kaul, R., Nugier-Chauvin, C., Patin, H., & Mattiasson, B. (2003). Synergistic relationships in algal–bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology*, 86(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00074-3)
- Brown, C. K., Vetting, M. W., Earhart, C. A., & Ohlendorf, D. H. (2004). Biophysical analyses of designed and selected mutants of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Annual Review of Microbiology*, 58, 555–585. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090927>
- Brzostowicz, P. C., Reams, A. B., Clark, T. J., & Neidle, E. L. (2003). Transcriptional cross-regulation of the catechol and protocatechuate branches of the beta-ketoadipate pathway contributes to carbon source-dependent expression of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 *pobA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1598–1606. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1598-1606.2003>
- Bubinas, A., Giedraitytė, G., & Kal, L. (2007). *Protocatechuate 3,4-dioxygenase from thermophilic Geobacillus sp. strain*. 18(1), 31–34.
- Bubinas, A., Giedraitytė, G., Kalėdienė, L., Nivinskiene, O., & Butkiene, R. (2008). Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid. *Central European Journal of Biology*, 3(1), 61–68. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0042-x>
- Buchan, A., Collier, L. S., Neidle, E. L., & Moran, M. A. (2000). Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4662–4672. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4662-4672.2000>
- Bugg, T. D. H. (2003). Dioxygenase enzymes: Catalytic mechanisms and chemical models. In *Tetrahedron* (Vol. 59, Issue 36, pp. 7075–7101). [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00944-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00944-X)
- Bull, C., & Ballou, D. P. (1981). Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. A new iron to subunit stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24), 12673–12680. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42947-X)
- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., & Arnold, F. H. (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 987–995.

<https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.987-995.2003/ASSET/D0F521AE-0205-455D-8232-3D3EE0D73395/ASSETS/GRAPHIC/AM0231300006.JPEG>

- Bundy, J. G., Davey, M. P., & Viant, M. R. (2009). Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. In *Metabolomics* (Vol. 5, Issue 1, pp. 3–21). <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597–601. <https://doi.org/10.1677/JME.1.01755>
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. A., Uad, I., & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of The Total Environment*, 407(12), 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.07.008>
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331–338. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)
- Cevallos-Cevallos, J. M., García-Torres, R., Etxeberria, E., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2011). GC-MS Analysis of Headspace and Liquid Extracts for Metabolomic Differentiation of Citrus Huanglongbing and Zinc Deficiency in Leaves of ‘Valencia’ Sweet Orange from Commercial Groves. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 236–246. <https://doi.org/10.1002/PCA.1271>
- Chakraborty, I., Bodurtha, K. J., Heeder, N. J., Godfrin, M. P., Tripathi, A., Hurt, R. H., Shukla, A., & Bose, A. (2014). Massive electrical conductivity enhancement of multilayer graphene/polystyrene composites using a nonconductive filler. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(19), 16472–16475. <https://doi.org/10.1021/am5044592>
- Chakraborty, J., Suzuki-Minakuchi, C., Tomita, T., Okada, K., & Nojiri, H. (2021). A Novel Gene Cluster Is Involved in the Degradation of Lignin- Derived Monoaromatics in *Thermus oshimai* JL-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(11), 1–23. https://doi.org/10.1128/AEM.01589-20/SUPPL_FILE/AEM.01589-20-S0001.PDF
- Chang, H., & Zylstra, G. J. (2008). *Biochemical and Biophysical Research Communications Examination and expansion of the substrate range of m -hydroxybenzoate hydroxylase*. 371, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.032>
- Chatzikonstantinou, A. V., Chatziathanasiadou, M. V., Ravera, E., Fragai, M., Parigi, G., Gerothanassis, I. P., Luchinat, C., Stamatis, H., & Tzakos, A. G. (2018). Enriching the biological space of natural products and charting drug metabolites, through real time biotransformation monitoring: The NMR tube bioreactor. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.09.021>
- Chatzikonstantinou, A. V., Tsailanis, A. D., Gerothanassis, I. P., Stamatis, H., Ravera, E., Fragai, M., Luchinat, C., Parigi, G., & Tzakos, A. G. (2020). The NMR tube bioreactor. *Methods in Enzymology*, 633, 71–101. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2019.10.032>
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J. G., & Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 2008 48:1, 48(1), 95–113. <https://doi.org/10.1007/S12088-008-0010-9>
- Cheema, S. A., Imran Khan, M., Shen, C., Tang, X., Farooq, M., Chen, L., Zhang, C., & Chen, Y. (2010). Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 384–389.

<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.12.044>

- Chen, K., Huang, L., Xu, C., Liu, X., He, J., Zinder, S. H., Li, S., & Jiang, J. (2013). Molecular characterization of the enzymes involved in the degradation of a brominated aromatic herbicide. *Molecular Microbiology*, 89(6), 1121–1139. <https://doi.org/10.1111/MMI.12332>
- Chen, K., Jian, S., Huang, L., Ruan, Z., Li, S., & Jiang, J. (2015). Reductive dehalogenation of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoate by an aerobic strain of *Delftia* sp. EOB-17. *Biotechnology Letters*, 37(12), 2395–2401. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1932-z>
- Chen, X., Tang, H., Liu, Y., Xu, P., Xue, Y., & Lin, K. (2018). *Purification and Initial Characterization of From a Halophilic Martelella Strain*. 9(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01335>
- Chen, Y. C., Banks, M. K., & Schwab, A. P. (2003). Pyrene Degradation in the Rhizosphere of Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) and Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5778–5782. <https://doi.org/10.1021/ES030400X/ASSET/IMAGES/LARGE/ES030400XF00003.JPEG>
- Chen, Y. P., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1984). Aromatic metabolism in *Rhizobium trifolii*-protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Arch Microbiol*, 138, 87–190.
- Chen, Y. P., & Lovell, C. R. (1994). Purification and properties of a homodimeric protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Rhizobium leguminosarum*. *Archives of Microbiology*, 161(2), 191–195. <https://doi.org/10.1007/BF00276482/METRICS>
- Chen, Y., Peng, Y., Dai, C. C., & Ju, Q. (2011). Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. *Applied Soil Ecology*, 51(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2011.09.004>
- Chenprakhon, P., Wongnate, T., & Chaiyen, P. (2019). *Monooxygenation of aromatic compounds by fl avin-dependent monooxygenases*. 28, 8–29. <https://doi.org/10.1002/pro.3525>
- Chouychai, W., Thongkukiatkul, A., Upatham, S., Lee, H., Pokethitiyook, P., & Kruatrachue, M. (2009). Plant-enhanced phenanthrene and pyrene biodegradation in acidic soil. *Journal of Environmental Biology*, 30(1), 139–144. <http://www.jeb.co.ininfo@jeb.co.in>
- Chung, C. T., & Miller, R. H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Research*, 16(8), 3580. <https://doi.org/10.1093/NAR/16.8.3580>
- Contzen, M., & Stolz, A. (2000). Characterization of the genes for two protocatechuate 3,4-dioxygenases from the 4-sulfocatechol-degrading bacterium *Agrobacterium radiobacter* strain S2. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6123–6129. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6123-6129.2000>
- Corbella, M. E., & Puyet, A. (2003). Real-time reverse transcription-PCR analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2269–2275. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2269-2275.2003/ASSET/0560DE1E-C509-44F4-BA1C-38C627A40344/ASSETS/GRAPHIC/AM0431701003.JPEG>
- D’Argenio, D. A., Vetting, M. W., Ohlendorf, D. H., & Ornston, L. N. (1999). Substitution, insertion, deletion, suppression, and altered substrate specificity in functional protocatechuate 3,4-dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6478–6487.

<https://doi.org/10.1128/jb.181.20.6478-6487.1999>

- Dagley, S., Geary, P. J., & Wood, J. M. (1968). The metabolism of protocatechuate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemical Journal*, 109(4), 559–568.
<https://doi.org/10.1042/BJ1090559>
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S., & Pfeifer, G. P. (1996). Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science*, 274(5286), 430–432. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5286.430>
- Deveryshetty, J., Suvekbala, V., Varadamshetty, G., & Phale, P. S. (2007). Metabolism of 2-, 3- and 4-hydroxybenzoates by soil isolates *Alcaligenes* sp. strain PPH and *Pseudomonas* sp. strain PPD. *FEMS Microbiology Letters*, 268(1), 59–66.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00561.x>
- Di Gioia, D., Bertin, L., Fava, F., & Marchetti, L. (2001). Biodegradation of hydroxylated and methoxylated benzoic, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains. *Research in Microbiology*, 152(1), 83–93.
[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01171-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01171-2)
- Díaz, E., & Prieto, M. A. (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 467–475.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00126-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00126-9)
- Distelmaier, F. (2018). 4-Hydroxybenzoic acid for multiple system atrophy? *Parkinsonism and Related Disorders*, 50, 119–120. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.01.019>
- Dobs, K., & Hansen, P. (2006). *Guide to using the Bio Rad CFX96 Real-Time PCR Machine*.
- Donoso, R. A., Pérez-Pantoja, D., & González, B. (2011). Strict and direct transcriptional repression of the *pobA* gene by benzoate avoids 4-hydroxybenzoate degradation in the pollutant degrader bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1590–1600. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02470.x>
- Durham, D. R., Stirling, L. A., Nicholas Ornston, L., & Perry, J. J. (1980). Intergeneric Evolutionary Homology Revealed by the Study of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 19, 149–155.
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Eaton, R. W. (2001). Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3689–3703.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3689-3703.2001/ASSET/A088BA86-2BEA-4205-B7E8-51F885328A2A/ASSETS/GRAPHIC/JB1210086006.JPEG>
- Edwards, S. C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E., Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., & Perera, F. (2010). Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland. *Environmental Health Perspectives*, 118(9), 1326.
<https://doi.org/10.1289/EHP.0901070>
- Elgren, T. E., Orville, A. M., Kelly, K. A., Lipscomb, J. D., Ohlendorf, D. H., & Que, L. (1997). Crystal Structure and Resonance Raman Studies of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase Complexed with 3,4-Dihydroxyphenylacetate[†], [‡]. *X Abstract Published in AdVance ACS Abstracts*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Emerson, J. P., Wagner, M. L., Reynolds, M. F., Que, L., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2005). The role of histidine 200 in MndD, the Mn(II)-dependent 3,4-

- dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2, a site-directed mutagenesis study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(7), 751–760. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0017-1>
- Eppink, M. H. M., Boeren, S. A., & Vervoort, J. (1997). *Purification and Properties of 4-Hydroxybenzoate 1-Hydroxylase (Decarboxylating), a Novel Flavin Adenine Dinucleotide- Dependent Monooxygenase from Candida parapsilosis CBS604*. 179(21), 6680–6687.
- Eppink, M. H. M., Cammaart, E., Van Wassenaar, D., Middelhoven, W. J., & Van Berkel, W. J. H. (2000). Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependent monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604. *European Journal of Biochemistry*, 267(23), 6832–6840. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01783.x>
- Erickson, E., Bleem, A., Kuatsjah, E., Werner, A. Z., DuBois, J. L., McGeehan, J. E., Eltis, L. D., & Beckham, G. T. (2022). Critical enzyme reactions in aromatic catabolism for microbial lignin conversion. *Nature Catalysis* 2022 5:2, 5(2), 86–98. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00747-w>
- Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, L. A., & Schlömann, M. (1998). Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for a merged enzyme with 4- carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone- hydrolyzing activity. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1072–1081. <https://doi.org/10.1128/jb.180.5.1072-1081.1998>
- Fairley, D. J., Boyd, D. R., Sharma, N. D., Allen, C. C. R., Morgan, P., & Larkin, M. J. (2002). Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration (NIH shift). *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6246–6255. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6246-6255.2002>
- Fernandez, J., Dimarco, A. A., Ornston, L. N., & Harayama, S. (1995). Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* 4-hydroxybenzoate 3-hydroxylase after its overexpression in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 117(6), 1261–1266. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124853>
- Fraga-Corral, M., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(4), 712–734. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1823811>
- Frazer, R. W., Livingston, D. M., LaPorte, D. C., & Lipscomb, J. D. (1993). Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *Journal of Bacteriology*, 175(19), 6194–6202. <https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6194-6202.1993>
- Freeman, H., & Harris, E. (1995). *Hazardous Waste Remediation: Innovative Treatment Technologies*. https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=6jTJglvNHtYC&oi=fnd&pg=PR15&dq=Hazardous+waste+remediation:+innovative+treatment+technologies.+&ots=nEOg6FZPB&sig=j899BNkl_Ix6PYOiNNDiM-frOiY&redir_esc=y#v=onepage&q=Hazardous+waste+remediation%3A+innovative+treatment+technologies
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., & Williams, P. A. (1998). A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2522–2530. <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2522-2530.1998>

- Fujisawa, H., Uyeda, M., Kojima, Y., Nozaki, M., & Hayaishi, O. (1972). Protocatechuate 3,4-Dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(13), 4414–4421.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45088-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45088-6)
- Gabriele, I., Bianco, F., Race, M., Papirio, S., & Esposito, G. (2023). Phytoremediation of PAH- and Cu-Contaminated Soil by Cannabis sativa L.: Preliminary Experiments on a Laboratory Scale. *Sustainability* 2023, Vol. 15, Page 1852, 15(3), 1852.
<https://doi.org/10.3390/SU15031852>
- Gao, D. W., & Wen, Z. D. (2016). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 541, 986–1001.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.09.148>
- Gao, X., Tan, C. L., Yeo, C. C., & Poh, C. L. (2005a). Molecular and biochemical characterization of the xlnD-encoded 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase involved in the degradation of 2,5-xynol via the gentisate pathway in Pseudomonas alcaligenes NCIMB 9867. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7696–7702.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7696-7702.2005/ASSET/27C5B4B2-A569-4C0C-8E0B-10E46A32469E/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0220552160003.JPEG>
- Gao, X., Tan, C. L., Yeo, C. C., & Poh, C. L. (2005b). Molecular and Biochemical Characterization of the xlnD-Encoded 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase Involved in the Degradation of 2,5-Xynol via the Gentisate Pathway in Pseudomonas alcaligenes NCIMB 9867. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7696.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7696-7702.2005>
- García-Junco, M., De Olmedo, E., & Ortega-Calvo, J. J. (2001). Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa 19SJ. *Environmental Microbiology*, 3(9), 561–569.
<https://doi.org/10.1046/J.1462-2920.2001.00223.X>
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147–156.
<https://doi.org/10.1016/J.NBT.2014.01.001>
- Ghimire, N., Kim, B., Lee, C. M., & Oh, T. J. (2022). Comparative genome analysis among Variovorax species and genome guided aromatic compound degradation analysis emphasizing 4-hydroxybenzoate degradation in Variovorax sp. PAMC26660. *BMC Genomics*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08589-3>
- Goetz, F. E., & Harmuth, L. J. (1992). Gentisate pathway in Salmonella typhimurium: metabolism of m-hydroxybenzoate and gentisate. *FEMS Microbiology Letters*, 97, 50.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05437.x>
- Gómez-Álvarez, H., Iturbe, P., Rivero-Buceta, V., Mines, P., Bugg, T. D. H., Nogales, J., & Díaz, E. (2022). Bioconversion of lignin-derived aromatics into the building block pyridine 2,4-dicarboxylic acid by engineering recombinant Pseudomonas putida strains. *Bioresource Technology*, 346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126638>
- Grant, D. J. W., & Patel, J. C. (1969). The non-oxidative decarboxylation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by Klebsiella aerogenes (Aerobacter aerogenes). *Antonie van Leeuwenhoek*, 35(3), 325–343.
<https://doi.org/10.1007/BF02219153>

- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J. M., & Solanas, A. M. (1992). Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2910–2917. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.9.2910-2917.1992>
- Grinsted, J., & Bennett, P. M. (1988). 5 Preparation and Electrophoresis of Plasmid DNA. *Methods in Microbiology*, 21(C), 129–142. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70072-2)
- Groseclose, E. E., & Ribbons, D. W. (1981). Metabolism of resorcinyl compounds by bacteria: new pathway for resorcinol catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 146(2), 460–466. <https://doi.org/10.1128/JB.146.2.460-466.1981>
- Grund, E., Knorr, C., & Eichenlaub, R. (1990). Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1459–1464. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1459-1464.1990>
- Gupta, S., Pathak, B., & Fulekar, M. H. (2015). Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(2), 241–269. <https://doi.org/10.1007/S11157-014-9353-3/TABLES/9>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Krysiak, M., & Wojcieszynska, D. (2014). Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/138768>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Sałek, K., & Wojcieszynska, D. (2013). Influence of metal ions on bioremediation activity of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 267–273. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1178-z>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Sitnik, M., & Wojcieszynska, D. (2014). Protocatechuate 3,4-dioxygenase: A wide substrate specificity enzyme isolated from *stenotrophomonas maltophilia* kb2 as a useful tool in aromatic acid biodegradation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 150–160. <https://doi.org/10.1159/000362791>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszysk, D. (2013). Intradiol Dioxygenases — The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation. *Biodegradation of Hazardous and Special Products*, May 2014. <https://doi.org/10.5772/56205>
- Hammer, A., Stolz, A., & Knackmuss, H. J. (1996). Purification and characterization of a novel type of protocatechuate 3,4-dioxygenase with the ability to oxidize 4-sulfocatechol. *Archives of Microbiology*, 166(2), 92–100. <https://doi.org/10.1007/s002030050361>
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.03.137>
- Hartnett, C., Neidle, E. L., Ngai, K. L., & Ornston, L. N. (1990). DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 956. <https://doi.org/10.1128/JB.172.2.956-966.1990>
- Harwood, C. S., & Parales, R. E. (1996). The β -ketoadipate pathway and the biology of self-

- identity. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 50, pp. 553–590). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
- Hatzinger, P. B., & Alexander, M. (1995). Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extirpability. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 537–545.
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- He, Z., & Wiegel, J. (1996). Purification and characterization of an oxygen-sensitive, reversible 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3539–3543. <https://doi.org/10.1128/JB.178.12.3539-3543.1996>
- Henson, W. R., Campbell, T., DeLorenzo, D. M., Gao, Y., Berla, B., Kim, S. J., Foston, M., Moon, T. S., & Dantas, G. (2018). Multi-omic elucidation of aromatic catabolism in adaptively evolved *Rhodococcus opacus*. *Metabolic Engineering*, 49, 69–83.
<https://doi.org/10.1016/j.YMBEN.2018.06.009>
- Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A., & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2486–2490. <https://doi.org/10.1073/PNAS.040554697>
- Hintner, J. P., Lechner, C., Riegert, U., Kuhm, A. E., Storm, T., Reemtsma, T., & Stolz, A. (2001). Direct ring fission of salicylate by a salicylate 1,2-dioxygenase activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6936–6942.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6936-6942.2001>
- Hiromoto, T., Fujiwara, S., Hosokawa, K., & Yamaguchi, H. (2006). Crystal Structure of 3-Hydroxybenzoate Hydroxylase from *Comamonas testosteroni* Has a Large Tunnel for Substrate and Oxygen Access to the Active Site. *Journal of Molecular Biology*, 364(5), 878–896. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.031>
- Ho Yeom, S., & Je Yoo, Y. (1997). OVERCOMING THE INHIBITION EFFECTS OF METAL IONS THE DEGRADATION OF BENZENE AND TOLUENE BY *ALCALIGENES XYLOSOXIDANS* Y234. *Korean J. of Chem. Eng.*, 14(3), 204–208.
- Hou, C. T., Lillard, M. O., & Schwartz, R. D. (1976). Protocatechuate 3,4-Dioxygenase from *Acinetobacter Calcoaceticus*. *Biochemistry*, 15(3), 582–588.
<https://doi.org/10.1021/bi00648a020>
- Huang, Y., Zhao, K. X., Shen, X. H., Jiang, C. Y., & Liu, S. J. (2008). Genetic and biochemical characterization of a 4-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 75–83.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1286-0>
- Imam, A., Kumar Suman, S., Kanaujia, P. K., & Ray, A. (2022). Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. *Bioresource Technology*, 343, 126121. <https://doi.org/10.1016/j.BIORTECH.2021.126121>
- Iwagami, S. G., Yang, K., & Davies, J. (2000). Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1499–1508. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1499-1508.2000>
- Iwaki, H., Saji, H., Abe, K., & Hasegawa, Y. (2005). *Cloning and Sequence Analysis of the 4-*

- Hydroxybenzoate 3-Hydroxylase Gene from a Cyclohexanecarboxylate-degrading Gram-positive Bacterium, "Corynebacterium cyclohexanicum" Strain ATCC 51369.* 20(3), 144–150. <http://www.soc.nii.ac.jp/jsme2/>
- Jadan, A. P., van Berkel, W. J. H., Golovleva, L. A., & Golovlev, E. L. (2001). Purification and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylases from *Rhodococcus* strains. *Biokhimiya*, 66(8), 1104–1110.
- Johnson, C. R., & Scow, K. M. (1999). Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation*, 10(1), 43–50. <https://doi.org/10.1023/A:1008359606545/METRICS>
- Johnson, C. W., & Beckham, G. T. (2015a). Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metabolic Engineering*, 28, 240–247. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2015.01.005>
- Johnson, C. W., & Beckham, G. T. (2015b). Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metabolic Engineering*, 28, 240–247. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2015.01.005>
- Johnson, M. R., Wang, K., Smith, J. B., Heslin, M. J., & Diasio, R. B. (2000). Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 278(2), 175–184. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4461>
- Jones, D. C. N., & Cooper, R. A. (1990). Catabolism of 3-hydroxybenzoate by the gentisate pathway in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Arch Microbiol*, 154, 489–495.
- Jouanneau, Y., Meyer, C., & Duraffourg, N. (2016). Dihydroxylation of four- and five-ring aromatic hydrocarbons by the naphthalene dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1253–1263. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-7050-Y/TABLES/4>
- Kallimanis, A., Frilingos, S., Drainas, C., & Koukkou, A. I. (2007). Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 709–717. <https://doi.org/10.1007/S00253-007-1036-3/TABLES/2>
- Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C., & Koukkou, A. I. (2009). *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), 275–279. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.000984-0/CITE/REFWORKS>
- Kallimanis, A., Labutti, K. M., Lapidus, A., Clum, A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Pagani, I., Liolios, K., Ivanova, N., Goodwin, L., Pitluck, S., Chen, A., Palaniappan, K., Markowitz, V., Bristow, J., Velentzas, A. D., Perisynakis, A., Ouzounis, C. C., Kyrpides, N. C., ... Drainas, C. (2011). Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Standards in Genomic Sciences*, 4(2), 123–130. <https://doi.org/10.4056/SIGS.1393494/TABLES/4>
- Kamimura, N., & Masai, E. (2014). The protocatechuate 4,5-cleavage pathway: Overview and new findings. *Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve*, 207–226. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54520-0_10/FIGURES/6
- Kang, T., Kim, S. H., Jung, M. J., & Cho, Y. K. (2015). Inhibition and Chemical Mechanism of

- Protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of Life Science*, 25(5), 487–495. <https://doi.org/10.5352/jls.2015.25.5.487>
- Kasai, D., Fujinami, T., Abe, T., Mase, K., Katayama, Y., Fukuda, M., & Masai, E. (2009). Uncovering the protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6758–6768. https://doi.org/10.1128/JB.00840-09/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_MATERIALS.ZIP
- Kim, Y. H., Cho, K., Yun, S. H., Kim, J. Y., Kwon, K. H., Yoo, J. S., & Kim, S. II. (2006). Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics*, 6(4), 1301–1318. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500329>
- Kim, Y. H., Freeman, J. P., Moody, J. D., Engesser, K. H., & Cerniglia, C. E. (2005). Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 275–285. <https://doi.org/10.1007/S00253-004-1796-Y/FIGURES/5>
- Krzyszczak, A., & Czech, B. (2021). Occurrence and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives in environmental matrices. In *Science of the Total Environment* (Vol. 788, p. 147738). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147738>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.12.007>
- Kurahashi, T., Oda, K., Sugimoto, M., Ogura, T., & Fujii, H. (2006). *Trigonal-Bipyramidal Geometry Induced by an External Water Ligand in a Sterically Hindered Iron Salen Complex, Related to the Active Site of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase*. <https://doi.org/10.1021/ic060650p>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 190 227:5259, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laha, S., & Luthy, R. G. (1992). Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil–water systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(11), 1367–1380. <https://doi.org/10.1002/BIT.260401111>
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2019). Transcriptomics: A powerful tool to evaluate the behavior of foodborne pathogens in the food production chain. *Food Research International*, 125(July), 108543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108543>
- Lei, A. P., Hu, Z. L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*, 98(2), 273–280. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.01.012>
- Li, C., Zhang, C., Song, G., Liu, H., Sheng, G., Ding, Z., Wang, Z., Sun, Y., Xu, Y., & Chen, J. (2016). Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OA1 involved in naphthalene degradation. *Annals of Microbiology*, 66(1), 469–478. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1132-z>
- Li, G. liang, Lang, Y. hai, Gao, M. sheng, Yang, W., Peng, P., & Wang, X. mei. (2014).

- Carcinogenic and mutagenic potencies for different PAHs sources in coastal sediments of Shandong Peninsula. *Marine Pollution Bulletin*, 84(1–2), 418–423.
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2014.04.039>
- Liu, Y., Zhu, L., & Shen, X. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, China. *Environmental Science and Technology*, 35(5), 840–844.
<https://doi.org/10.1021/ES001354T/ASSET/IMAGES/LARGE/ES001354TF00004.JPEG>
- Lu, P., Huang, H., Sun, Y., Qiang, M., Zhu, Y., Cao, M., Peng, X., Yuan, B., & Feng, Z. (2022). Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Acinetobacter johnsonii* FZ-5 and *Klebsiella oxytoca* FZ-8 under anaerobic conditions. *Biodegradation*, 33(1), 17–31.
<https://doi.org/10.1007/s10532-021-09963-w>
- Luo, S. (2008). Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Protocatechuate 3,4-dioxygenase in *Burkholderia* sp. NCIMB 10467. *Microbiology*, 35(5), 712–719.
<http://dx.doi.org/>
- Mampel, J., Providenti, M. A., & Cook, A. M. (2005). Protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Comamonas testosteroni* T-2: Biochemical and molecular properties of a new subgroup within class III of extradiol dioxygenases. *Archives of Microbiology*, 183(2), 130–139.
<https://doi.org/10.1007/S00203-004-0755-4/FIGURES/5>
- Manjusha, S., & Sarita. (2011). Plasmid associated antibiotic resistance in *Vibrios* isolated from coastal waters of Kerala. *International Food Research Journal*, 18(3), 1171–1181.
- Mars, A. E., Kasberg, T., Kaschabek, S. R., Van Agteren, M. H., Janssen, D. B., & Reineke, W. (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology*, 179(14), 4530–4537.
<https://doi.org/10.1128/JB.179.14.4530-4537.1997>
- Maruyama, K., Shibayama, T., Ichikawa, A., Sakou, Y., Yamada, S., & Sugisaki, H. (2014). Cloning and Characterization of the Genes Encoding Enzymes for the Protocatechuate Meta-degradation Pathway of *Pseudomonas ochracea* NGJ1. *OUP*, 68(7), 1434–1441.
<https://doi.org/10.1271/BBB.68.1434>
- Masai, E., Momose, K., Hara, H., Nishikawa, S., Katayama, Y., & Fukuda, M. (2000). Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6651–6658.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6651-6658.2000>
- Matsui, T., Yoshida, T., Hayashi, T., & Nagasawa, T. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P240. *Archives of Microbiology*, 186(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0117-5>
- Mayilmurugan, R., Sankaralingam, M., Suresh, E., & Palaniandavar, M. (2010). Novel square pyramidal iron(III) complexes of linear tetradentate bis(phenolate) ligands as structural and reactive models for intradiol-cleaving 3,4-PCD enzymes: Quinone formation vs. intradiol cleavage. *Dalton Transactions*, 39(40), 9611–9625.
<https://doi.org/10.1039/C0DT00171F>
- Michalover, J. L., & Ribbons, D. W. (1973). 3-Hydroxybenzoate 4-hydroxylase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 55(3), 888–896. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91227-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91227-8)

- Miyata, N., Iwahori, K., Foght, J. M., & Gray, M. R. (2004). Saturable, Energy-Dependent Uptake of Phenanthrene in Aqueous Phase by Mycobacterium sp. Strain RJGII-135. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 363–369. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.363-369.2004/ASSET/600953F6-6570-4C2F-AD6A-468D7F594766/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0010412070004.JPEG>
- Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of The Total Environment*, 696, 133971. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.133971>
- Monterisino, S., & Van Berkel, W. J. H. (2012). Functional annotation and characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from Rhodococcus jostii RHA1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(3), 433–442. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2011.12.003>
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G., & Eriich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.*
- Ni, B., Zhang, Y., Chen, D. W., Wang, B. J., & Liu, S. J. (2013). Assimilation of aromatic compounds by Comamonas testosteroni: Characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13), 6031–6041. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4402-8>
- Nobile, M., Arioli, F., Pavlovic, R., Ceriani, F., Lin, S. K., Panseri, S., Villa, R., & Chiesa, L. M. (2020). Presence of emerging contaminants in baby food. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(1), 131–142. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1682686>
- Noda, Y., Nishikawa, S., Shiozuka, K. I., Kadokura, H., Nakajima, H., Yoda, K., Katayama, Y., Morohoshi, N., Haraguchi, T., & Yamasaki, M. (1990). Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of Pseudomonas paucimobilis. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2704–2709. <https://doi.org/10.1128/JB.172.5.2704-2709.1990>
- Nogales, J., Canales, Á., Jiménez-Barbero, J., Serra, B., Pingarrón, J. M., García, J. L., & Díaz, E. (2011). Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from Pseudomonas putida. *Molecular Microbiology*, 79(2), 359–374. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2010.07448.X>
- Ohlendorf, D. H., Orville, A. M., & Lipscomb, J. D. (1994). Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from Pseudomonas aeruginosa at 2.15 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 244(5), 586–608. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1754>
- Ohlendorf, D. H., & Vetting, M. W. (2006). Protocatechuate 3,4-Dioxygenase. *Handbook of Metalloproteins*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/0470028637.met145>
- Ono, K., Nozaki, M., & Hayaishi, O. (1970). Purification and some properties of protocatechuate 4,5-dioxygenase. *BBA - Enzymology*, 220(2), 224–238. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(70\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(70)90008-2)
- Opal, S. M., Mayer, K. H., & Medecros, A. A. (2000). Mechanisms of bacterial resistance. In R. Dolin (Ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (5th ed., pp. 236–253). Churchill Livingstone.
- Orville, A. M., Lipscomb, J. D., & Ohlendorf, D. H. (1997a). Crystal structures of substrate and

- substrate analog complexes of protocatechuate 3,4-dioxygenase: Endogenous Fe³⁺ ligand displacement in response to substrate binding. *Biochemistry*, 36(33), 10052–10066. <https://doi.org/10.1021/bi970469f>
- Orville, A. M., Lipscomb, J. D., & Ohlendorf, D. H. (1997b). Crystal Structures of Substrate and Substrate Analog Complexes of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase: Endogenous Fe³⁺ Ligand Displacement in Response to Substrate Binding^{†,‡}. *Biochemistry*, 36(33), 10052–10066. <https://doi.org/10.1021/BI970469F>
- Park, M., Jeon, Y., Ho, H. J., Ro, H. S., Park, W., Madsen, E. L., & Che, O. J. (2007). Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Pseudomonas naphthalenivorans* CJ2. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5146–5152. <https://doi.org/10.1128/AEM.00782-07>
- Parrish, Z. D., Banks, M. K., & Schwab, A. P. (2010). Effectiveness of Phytoremediation as a Secondary Treatment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Composted Soil. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/16226510490454803>, 6(2), 119–137. <https://doi.org/10.1080/16226510490454803>
- Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2675. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.562813/BIBTEX>
- Pellis, A., Comerford, J. W., Weinberger, S., Guebitz, G. M., Clark, J. H., & Farmer, T. J. (2019). Enzymatic synthesis of lignin derivable pyridine based polyesters for the substitution of petroleum derived plastics. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-09817-3>
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927–955. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00127.X>
- Pérez-González, D., Gómez, J., & Beristain-Cardoso, R. (2012). Biological removal of p-cresol, phenol, p-hydroxybenzoate and ammonium using a nitrifying continuous-flow reactor. *Bioresource Technology*, 120, 194–198. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.06.052>
- Petersen, E. I., Zuegg, J., Ribbons, D. W., & Schwab, H. (1996). Molecular cloning and homology modeling of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas marginata*. *Microbiological Research*, 151(4), 359–370. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80004-8)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), E45. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>
- Platt, H. M., & Mackie, P. R. (1980). Distribution and fate of aliphatic and aromatic hydrocarbons in Antarctic fauna and environment. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33(1–4), 236–245. <https://doi.org/10.1007/BF02414749/METRICS>
- Prathibha, K., & Sumathi, S. (2008). Biodegradation of mixture containing monohydroxybenzoate isomers by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 813–823. <https://doi.org/10.1007/S11274-007-9545-X/TABLES/1>
- Primikyri, A., Sayyad, N., Quilici, G., Vrettos, E. I., Lim, K., Chi, S. W., Musco, G.,

- Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2018). Probing the interaction of a quercetin bioconjugate with Bcl-2 in living human cancer cells with in-cell NMR spectroscopy. *FEBS Letters*, 592(20), 3367–3379. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13250>
- Providenti, M. A., Mampel, J., MacSween, S., Cook, A. M., & Wyndham, R. C. (2001). Comamonas testosteroni BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology*, 147(8), 2157–2167. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2157/CITE/REFWORKS>
- Qiu, L., Li, C., Fu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Zuo, Z., Chen, R., Yin, X., Li, T., & Wu, S. (2023). Biodegradation of phthalate isomers by newly isolated Klebsiella variico SY1 and its functional genomic analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 178, 105557. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2022.105557>
- Radi, R. O., & Rahman, F. H. (2010). Study the effects of Ethidium Bromide, SDS elevated temperature on stability of multiple antibiotic resistance plasmids of Pseudomonas aeruginosa. *Iraqi J. Biotech*, 9(4), 797–811. www.pdfactory.com
- Rafalowski, A., Hassan, B. A., Lou, K., Nguyen, M. C., & Taylor, E. A. (2023). How Single Amino Acid Substitutions Can Disrupt a Protein Hetero-Dimer Interface: Computational and Experimental Studies of the LigAB Dioxygenase from Sphingobium sp. Strain SYK-6. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 6319, 24(7), 6319. <https://doi.org/10.3390/IJMS24076319>
- Rajasekharan, S., Rajasekharan, R., & Vaidyanathan, C. S. (1990). Substrate-mediated purification and characterization of a 3-hydroxybenzoic acid-6-hydroxylase from Micrococcus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90225-N](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90225-N)
- Reddy, P. V., Karegoudar, T. B., Monisha, T. R., Mukram, I., & Nayak, A. S. (2018). Biodegradation of fluoranthene by Paenibacillus sp. strain PRNK-6: a pathway for complete mineralization. *Archives of Microbiology*, 200(1), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1431-9>
- Ren, C., Wang, Y., Wu, Y., & Li, L. (2023). Complete degradation of di-n-butyl phthalate by Glutamicibacter sp. strain 0426 with a novel pathway. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2696404/v1>
- Ren, Y., Peng, L., Zhao, G., & Wei, C. (2014). Degradation of m-cresol via the ortho cleavage pathway by Citrobacter farmeri SC01. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 108–114. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2014.03.021>
- Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., & Nishigaki, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3), 182–189. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30003-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30003-4)
- Reynolds, M. F., Costas, M., Ito, M., Jo, D. H., Tipton, A. A., Whiting, A. K., & Que, L. (2003). 4-Nitrocatechol as a probe of a Mn(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase (MndD): Comparison with relevant Fe(II) and Mn(II) model complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8(3), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s00775-002-0411-x>
- Rheay, H. T., Omondi, E. C., & Brewer, C. E. (2021). Potential of hemp (Cannabis sativa L.) for paired phytoremediation and bioenergy production. *GCB Bioenergy*, 13(4), 525–536. <https://doi.org/10.1111/GCBB.12782>

- Ribons, D. W., & Evans, W. C. (1962). Oxidative metabolism of protocatechuic acid by certain soil. *The Biochemical Journal*, 83(3), 482–492. <https://doi.org/10.1042/bj0830482>
- Romero-Silva, M. J., Méndez, V., Agulló, L., & Seeger, M. (2013). Genomic and Functional Analyses of the Gentisate and Protocatechuate Ring-Cleavage Pathways and Related 3-Hydroxybenzoate and 4-Hydroxybenzoate Peripheral Pathways in Burkholderia xenovorans LB400. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056038>
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Rosenberg, E., Barkay, T., Navon-Venezia, S., & Ron, E. Z. (1999). Role of Acinetobacter Bioemulsans in Petroleum Degradation. *Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution*, 171–180. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4749-5_17
- Sakshi, & Haritash, A. K. (2020). A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2033–2058. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-01929-5/FIGURES/3>
- Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243–248. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01943-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01943-1)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 2.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sannino, F., Sansone, C., Galasso, C., Kildgaard, S., Tedesco, P., Fani, R., Marino, G., De Pascale, D., Ianora, A., Parrilli, E., Larsen, T. O., Romano, G., & Tutino, M. L. (2018). Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 produces 4-hydroxybenzoic acid that induces pyroptosis in human A459 lung adenocarcinoma cells. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19536-2>
- Sato, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., & Kino, K. (2015). Enzymatic carboxylation of hydroxystilbenes by the γ -resorcylic acid decarboxylase from Rhizobium radiobacter WU-0108 under reverse reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 348–352. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2015.10.006>
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 204–215. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2011.08.007>
- Seibold, B., Matthes, M., Eppink, M. H. M., Lingens, F., Van Berkel, W. J. H., & Müller, R. (1996). 4-Hydroxybenzoate hydroxylase from Pseudomonas sp. CBS3 - Purification, characterization, gene cloning, sequence analysis and assignment of structural features determining the coenzyme specificity. *European Journal of Biochemistry*, 239(2), 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0469u.x>
- Semana, P., & Powlowski, J. (2019). Four Aromatic Intradiol Ring Cleavage Dioxygenases from Aspergillus niger. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(23). <https://doi.org/10.1128/AEM.01786-19>
- Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E., & Li, Q. X. (2006). Phenanthrene degradation in Arthrobacter sp. P1-1: 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*, 65(11), 2388–2394. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.04.067>
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2009, Vol. 6, Pages 278–309, 6(1), 278–309. <https://doi.org/10.3390/IJERPH6010278>
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2012). Mycobacterium aromativorans JS19b1T degrades phenanthrene through C-1,2, C-3,4 and C-9,10 dioxygenation pathways. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 96–103. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2012.02.005>
- Shahsavari, E., Schwarz, A., Aburto-Medina, A., & Ball, A. S. (2019). Biological Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in Soil: a Current Perspective. *Current Pollution Reports*, 5(3), 84–92. <https://doi.org/10.1007/S40726-019-00113-8/FIGURES/3>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1079, 105–116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Sim, H. W., Jung, M. J., & Cho, Y. K. (2013). Purification and characterization of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(4), 401–408. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3080-2>
- Sterjiades, R., & Pelmont, J. (1989). Occurrence of two different forms of protocatechuate 3,4-dioxygenase in a *Moraxella* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 340. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.2.340-347.1989>
- Stryer, L. (1988). Molecular Basis of Visual Excitation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 53(1), 283–294. <https://doi.org/10.1101/SQB.1988.053.01.035>
- Suárez, M., Martín, M., Ferrer, E., & Garrido-Pertierra, A. (1995). Purification and characterization of 4-hydroxybenzoate 3-hydroxylase from a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Archives of Microbiology*, 164(1), 70–77. <https://doi.org/10.1007/BF02568737>
- Sucharitakul, J., Wongnate, T., Montersino, S., Van Berkel, W. J. H., & Chaiyen, P. (2012). Reduction kinetics of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry*, 51(21), 4309–4321. https://doi.org/10.1021/BI201823C/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2011-01823C_0011.JPEG
- Suemori, A., Nakajima, K., Kurane, R., & Nakamura, Y. (1995). o-, m- and p-Hydroxybenzoate degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*. *FJZMS Microbiology Letters*, 125, 31–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07331.x>
- Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M., & Mitsui, Y. (1999). Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure*, 7(8), 953–965. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80122-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80122-1)
- Sunanda, S., Varsha, V., Prajakti, P., Chattopadhyay, S., & Ghosh Sachan, S. (2023). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the impact of various genes for their enhanced degradation. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), 1–15. <https://doi.org/10.1093/LAMBIO/OVAC062>

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSM092>
- Tang, W. C., White, J. C., & Alexander, M. (1998). Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(1), 117–121. <https://doi.org/10.1007/S002530051147/METRICS>
- Tao, S., Gao, Y., Li, K., Lu, Q., Qiu, C., Wang, X., Chen, K., & Ouyang, P. (2020). Engineering substrate recognition sites of cytochrome P450 monooxygenase CYP116B3 from *Rhodococcus ruber* for enhanced regiospecific naphthalene hydroxylation. *Molecular Catalysis*, 493, 111089. <https://doi.org/10.1016/J.MCAT.2020.111089>
- Tarantini, A., Maître, A., Lefèbre, E., Marques, M., Rajhi, A., & Douki, T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology*, 279(1–3), 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2010.09.002>
- Tazdaït, D., & Salah-Tazdaït, R. (2021). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Toxicity and Bioremediation Approaches. *Biotechnology for Sustainable Environment*, 289–316. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1955-7_12/FIGURES/3
- Thacharodi, A., Hassan, S., Singh, T., Mandal, R., Chinnadurai, J., Khan, H. A., Hussain, M. A., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2023). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: An updated microbiological review. *Chemosphere*, 328, 138498. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138498>
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0* (2.0). (n.d.). Schrödinger, LLC.
- Tian, J., Zhu, L., Wang, W., Zhang, L., Li, Z., Zhao, Q., Xing, K., Feng, Z., & Peng, X. (2018). Genomic Analysis of *Microbulbifer* sp. Strain A4B-17 and the Characterization of Its Metabolic Pathways for 4-Hydroxybenzoic Acid Synthesis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3115. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03115/BIBTEX>
- Tong, R., Yang, X., Su, H., Pan, Y., Zhang, Q., Wang, J., & Long, M. (2017). *Levels, sources and probabilistic health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in the agricultural soils from sites neighboring suburban industries in Shanghai*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.179>
- Tongpim, S., & Pickard, M. A. (2011). Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. <https://doi.org/10.1139/M96-042>, 42(3), 289–294. <https://doi.org/10.1139/M96-042>
- Trevors, J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria (Curing; plasmids; protoplasts; intercalating dyes; incompatibility). *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01189.x>
- Tsagogiannis, E., Vandra, E., Primikyri, A., Asimakoula, S., Tzakos, A. G., Gerothanassis, I. P., Koukkou, A.-I., & Leitão, J. H. (2021). Characterization of Protocatechuate 4,5-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and In Situ Reaction Monitoring in the NMR Tube. *International Journal of Molecular Sciences Article*. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Ukiwe, L. N., Egereonu, U. U., Njoku, P. C., Nwoko, C. I. A., & Allinor, J. I. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review. *International Journal of Chemistry*, 5(4). <https://doi.org/10.5539/ijc.v5n4p43>
- Ullmann, A., Jacob, F., & Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a

- peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 24(2), 339–343.
- Vaillancourt, F., Bolin, J., & Eltis, L. (2008). The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. <http://dx.doi.org/10.1080/10409230600817422>, 41(4), 241–267.
<https://doi.org/10.1080/10409230600817422>
- Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G., & Koukkou, A. I. (2015). Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *Journal of Proteomics*, 113, 73–89.
<https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.08.018>
- Vanrooij, J. G. M., Bodelier-Bade, M. M., Jongeneelen, F. J., Vanrooij, J. G. M., Bodelier-Bade, M. M., & Jongeneelen, F. J. (1993). Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 50(7), 623–632. <https://doi.org/10.1136/OEM.50.7.623>
- Vetting, M. W., D'Argenio, D. A., Ornston, L. N., & Ohlendorf, D. H. (2000). Structure of *Acinetobacter* strain ADP1 protocatechuate 3,4- dioxygenase at 2.2 Å resolution: Implications for the mechanism of an intradiol dioxygenase. *Biochemistry*, 39(27), 7943–7955. <https://doi.org/10.1021/bi000151e>
- Waigi, M. G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., & Gao, Y. (2015). Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 333–349.
<https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.06.008>
- Wang, J. Y., Zhou, L., Chen, B., Sun, S., Zhang, W., Li, M., Tang, H., Jiang, B. Le, Tang, J. L., & He, Y. W. (2015). A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity. *Scientific Reports*, 5(November), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep18456>
- Wang, L. H., Hamzah, R. Y., Yu, Y., & Tu, S. C. (1987). *Pseudomonas cepacia* 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase: Induction, Purification, and Characterization. *Biochemistry*, 26(4), 1099–1104.
https://doi.org/10.1021/BI00378A017/ASSET/BI00378A017.FP.PNG_V03
- Wang, L., Liu, T., Liu, F., Zhang, J., Wu, Y., & Sun, H. (2015). Occurrence and Profile Characteristics of the Pesticide Imidacloprid, Preservative Parabens, and Their Metabolites in Human Urine from Rural and Urban China. *Environmental Science and Technology*, 49(24), 14633–14640.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B04037/SUPPL_FILE/ES5B04037_SI_001.PDF
- Wang, W., Chang, J. S., Show, K. Y., & Lee, D. J. (2022). Anaerobic recalcitrance in wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, 363, 127920.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.127920>
- Wang, W., Mazurkewich, S., Kimber, M. S., & Seah, S. Y. K. (2010). Structural and kinetic characterization of 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate/4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase, a protocatechuate degradation enzyme evolutionarily convergent with the HpaI and DmpG pyruvate aldolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36608–36615. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.159509>
- Wang, Y., Li, J., & Liu, A. (2017). Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(2–3), 395–405. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1436-5>

- Wattiau, P., Bastiaens, L., Van Herwijnen, R., Daal, L., Parsons, J. R., Renard, M. E., Springael, D., & Cornelis, G. R. (2001). Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Research in Microbiology*, 152(10), 861–872. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01269-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01269-4)
- Wei, M., Zhang, J. J., Liu, H., & Zhou, N. Y. (2010). para-Nitrophenol 4-monooxygenase and hydroxyquinol 1,2-dioxygenase catalyze sequential transformation of 4-nitrocatechol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Biodegradation*, 21(6), 915–921. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9351-2>
- Westphal, A. H., Tischler, D., Heinke, F., Hofmann, S., Gröning, J. A. D., Labudde, D., & Van Berkel, W. J. H. (2018). Pyridine nucleotide coenzyme specificity of p-hydroxybenzoate hydroxylase and related flavoprotein monooxygenases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3050. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03050/BIBTEX>
- Westphal, A. H., Tischler, D., & van Berkel, W. J. H. (2021). Natural diversity of FAD-dependent 4-hydroxybenzoate hydroxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 702(March), 108820. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108820>
- Whittaker, J. W., Lipscomb, J. D., Kent, T. A., & Munck, E. (1984). Brevibacterium fuscum protocatechuate 3,4-dioxygenase. Purification, crystallization, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 259(7), 4466–4475. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43071-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43071-7)
- Wick, L., De Munain, A., Springael, D., & Harms, H. (2002). Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 378–385. <https://doi.org/10.1007/S00253-001-0898-Z/METRICS>
- Wilson, I. D., Plumb, R., Granger, J., Major, H., Williams, R., & Lenz, E. M. (2005). HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 817(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2004.07.045>
- Wu, Y., Trejo, H. X., Chen, G., & Li, S. (2021). Phytoremediation of contaminants of emerging concern from soil with industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): a review. *Environment, Development and Sustainability* 23:10, 23(10), 14405–14435. <https://doi.org/10.1007/S10668-021-01289-0>
- Yang, Y. F., Zhang, J. J., Wang, S. H., & Zhou, N. Y. (2010). Purification and characterization of the ncgl2923 -encoded 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Basic Microbiology*, 50(6), 599–604. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201000053>
- Yao, N. H., Du, Y. N., Xiong, J. X., Xiao, Y., He, H. H., Xie, Z. F., Huang, D., Song, Q., Chen, J., Yan, D., & Chao, H. J. (2023). Microbial detoxification of 3,5-xyleneol via a novel process with sequential methyl oxidation by *Rhodococcus* sp. CHJ602. *Environmental Research*, 220(68), 115258. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115258>
- Yoshida, T., Inami, Y., Matsui, T., & Nagasawa, T. (2010). Regioselective carboxylation of catechol by 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P. *Biotechnology Letters*, 32(5), 701–705. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0210-3>
- Yun, S. H., Choi, C. H., Lee, S. Y., Lee, Y. G., Kwon, J., Leem, S. H., Chung, Y. H., Kahng, H. Y., Kim, S. J., Kwon, K. K., & Kim, S. Il. (2014). Proteomic characterization of plasmid pLA1 for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine bacterium, *novosphingobium pentaromativorans* 6-1. *PLoS ONE*, 9(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090812>

Zhang, L. S., Fang, Y., Zhou, Y., & Ye, B. C. (2017). Improvement of the Stabilization and Activity of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase Isolated from *Rhizobium* sp. LMB-1 and Immobilized on Fe₃O₄ Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(3), 1035–1048. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2481-9>

Ασημακούλα, Σ. (2017). Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται σε καταβολικές πορείες αποδόμησης αρωματικών ενώσεων από το βακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans*, *Sphe3*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Δραΐνας, Α.-Π. (2012). Μελέτη των δυο καταβολικών πλασμιδίων του εδαφοβακτηρίου *Arthrobacter phenanthrenivorans* *Sphe3*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Τσαγκογιάννης, Ε. (2016). Βακτηριακή αποδόμηση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων: Βιοχημικός και γενετικός χαρακτηρισμός της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέως του *A. phenanthrenivorans*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

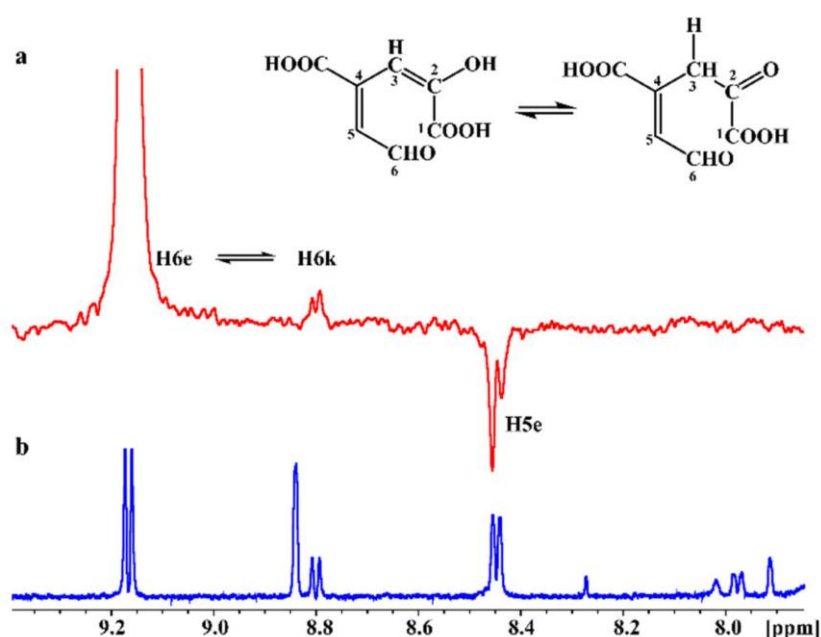
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π1. Ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης της PCD45 με υπόστρωμα PCA στο NMR.

Στο παρόν παράρτημα παρατίθενται 2D TOCSY και STD NMR μέσω των οποίων ταυτοποιήθηκαν οι δυο ισομορφές (κετονική και αλδεϋδική) του προϊόντος της αντίδρασης 4-καρβόξθ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης (CHMS), αλλά και η ισορροπία μεταξύ τους. Τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας από την δρ. **Πριμηκύρη Αλεξάνδρα**.

Π1.1 Φάσμα STD-NMR της μετατροπής του PCA σε CHMS

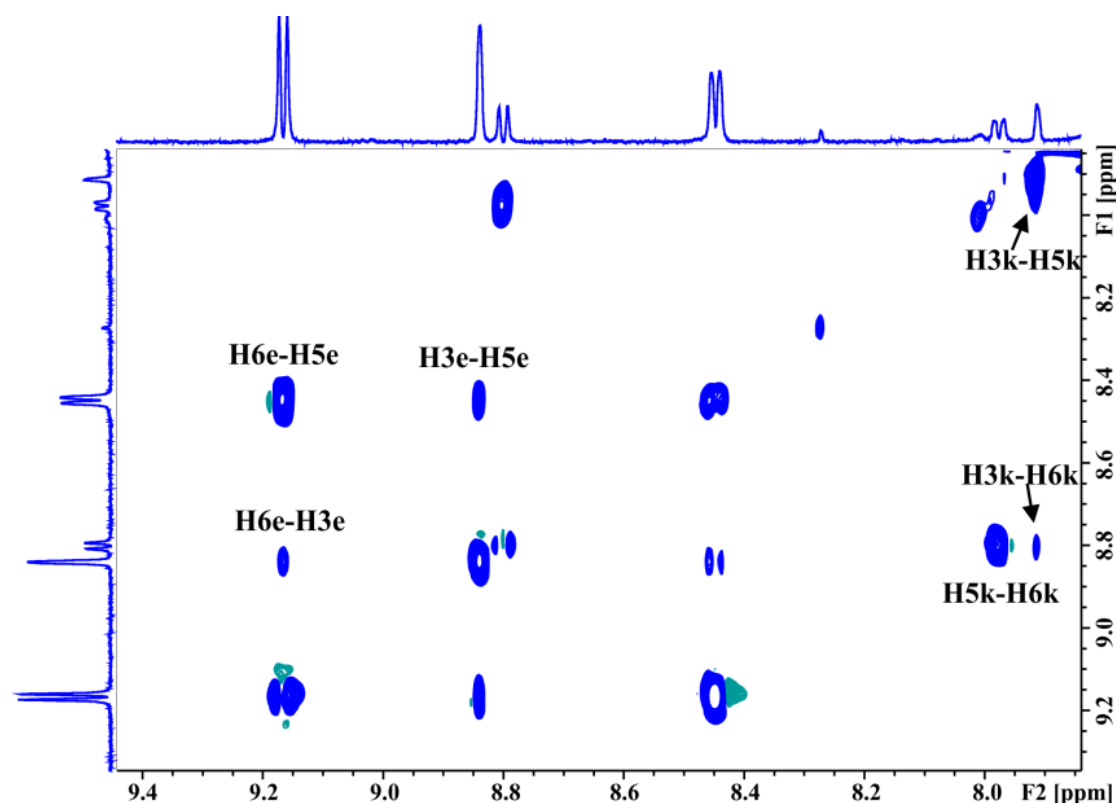
Η μεθοδολογία STD NMR έχει χρησιμοποιηθεί παλαιότερα για την διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ προϊόντων βιομετατροπής με πρωτεΐνες-στόχους μέσα στο σωληνάκι NMR (Chatzikonstantinou et al., 2018, 2020). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενδομοριακή μεταφορά του μαγνητισμού από τη διεγερμένη πρωτεΐνη στα πρωτόνια του προσδέτη αυτής που βρίσκονται σε απόσταση ίση ή μικρότερη των 5 Å (στην προκειμένη περίπτωση PCD45 και PCA) (Primikyri et al., 2018). Στην παρούσα εργασία την αντίστροφη διαδικασία διεγείροντας το H6e της ενολικής ισομορφής του προϊόντος. Με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε ότι ο μαγνητισμός μεταφέρθηκε πέραν του γειτονικού H5e, αλλά και στο H6k της κετονικής ισομορφής ίσως λόγω της γρήγορης εναλλαγής μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών (Εικόνα Π1.1). Όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται κάτι τέτοιο.



Εικόνα Π1.1: (α) Φάσμα STD NMR της ενζυμικής μετατροπής του PCA από την PCD45 στο προϊόν CHMS μέσα στο σωληνάκι NMR. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτική διεγέρση της κορυφής του πρωτονίου H6e (β) Φάσμα ^1H NMR του ίδιου δείγματος.

Π1.2 Φάσμα 2D TOCSY NMR της μετατροπής του PCA σε CHMS

Μέσω της φασματοσκοπίας 2D TOCSY (Total correlation spectroscopy) NMR είναι δυνατή η παρακολούθηση όλων των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτονίων μιας ένωσης. Αξιοποιώντας τη δυνατότητα αυτή στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε και μέσω αυτού του φάσματος η ισορροπία μεταξύ ενολικής και κετονικής ισομορφής του προϊόντος CHMS (Εικόνα Π1.2)



Εικόνα Π1.2: Φάσμα TOCSY NMR της κετονικής και της ενολικής ισομορφής του προϊόντος CHMS. Αριθμός σαρώσεων = 64, χρόνος ανάδευσης = 0,06 s, συνολικός χρόνος πειράματος = 4h 40min)

Π1.3 Μελέτη της ισορροπίας μεταξύ των δύο ισομορφών του προϊόντος CHMS

Μελετήθηκε τέλος η ισορροπία των δύο ισομερών του προϊόντος CHMS πραγματοποιώντας πειράματα σε μια διαβάθμιση θερμοκρασίας σε pH 8. Να σημειωθεί ότι σε αυτό το pH η καρβοξυλομάδες είναι αποπρωτονιωμένες.

Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από την σταθερά ισορροπίας K_{eq} και η οποία προκύπτει από την εξής εξίσωση:

$$K_{eq} = [\text{enol}]/[\text{keto}] \quad (1)$$

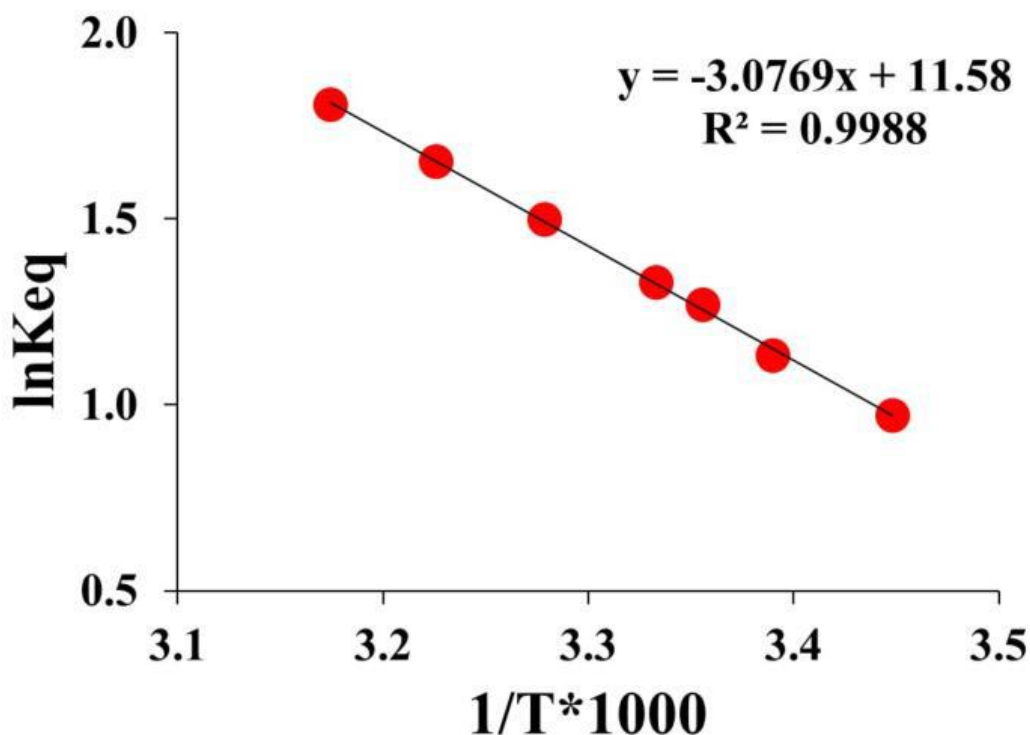
Η σταθερά K_{eq} σχετίζεται άμεσα με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG°) όπως περιγράφεται παρακάτω:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (2)$$

Εφόσον λοιπόν η σταθερά ισορροπίας μπορεί να προσδιοριστεί σε διάφορες θερμοκρασίες, τότε σύμφωνα με την εξίσωση του Van't Hoff έχουμε:

$$\ln K_{eq} = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad (3)$$

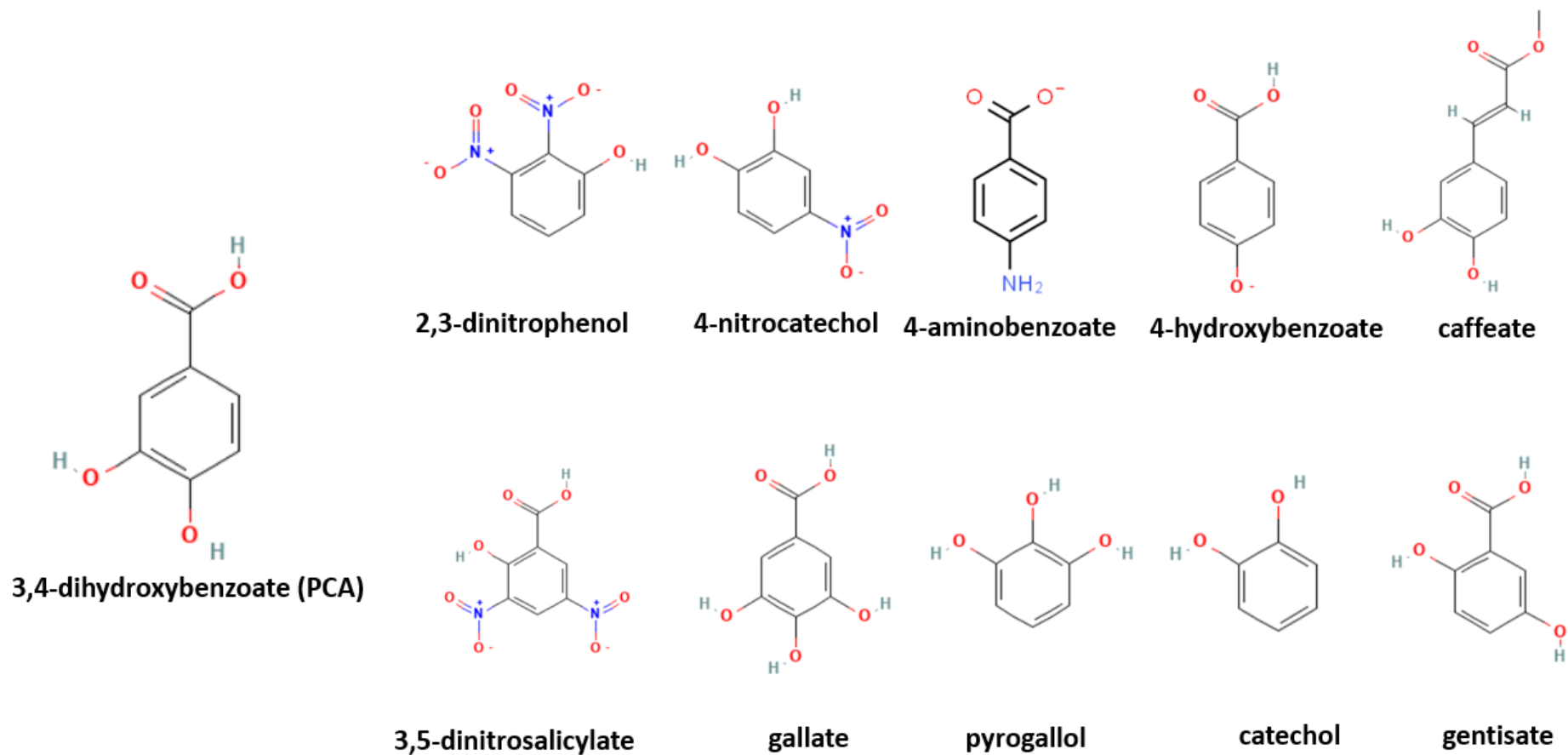
και οι τιμές ΔH° και ΔS° μπορούν να προσδιοριστούν από την εξίσωση της ευθείας της μεταβολής του $\ln K_{eq}$ ως προς το αντίστροφο της θερμοκρασίας ($1/T$) (Εικόνα Π1.3).

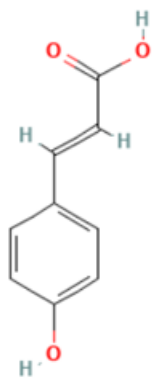


Εικόνα Π1.3: Διάγραμμα Van't Hoff της ισορροπίας κέτο/ένολ ισομορφών του CHMS των κορυφών H3 σε NMR buffer 90% H₂O (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 0,25 mM DTT, pH = 8) με 10% DMSO-d₆.

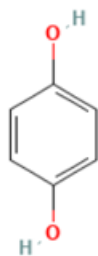
Με βάση την παραπάνω εξίσωση προσδιορίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι ΔH° και ΔS° της προαναφερθείσας ισορροπίας: $\Delta H^\circ = 25.58$ kJ/mol και $\Delta S^\circ = 0.10$ kJ/molK. Προσδιορίστηκαν επίσης, σε T=298 K, οι παράμετροι $-T \Delta S^\circ = -28.69$ kJ/mol και η διαφορά ελεύθερης ενέργειας Gibbs $\Delta G^\circ = -3.11$ kJ/mol.

Π2. Μοριακοί τύποι των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα στις ενζυμικές αντιδράσεις.

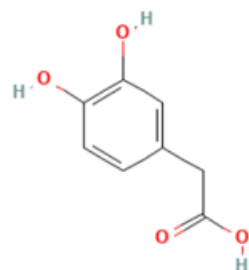




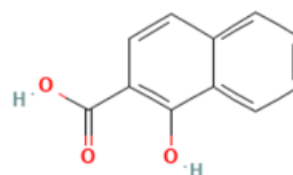
p-cumarate



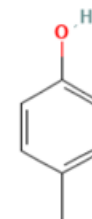
hydroquinone



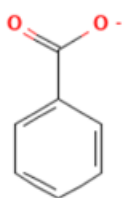
3,4-dihydroxyphenylacetate



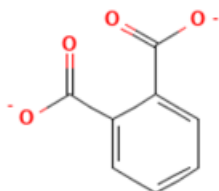
1-hydroxy-2-naphthoate



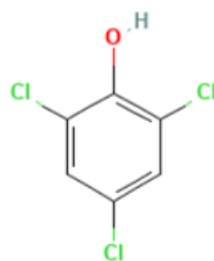
p-cresol



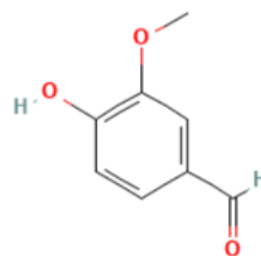
benzoate



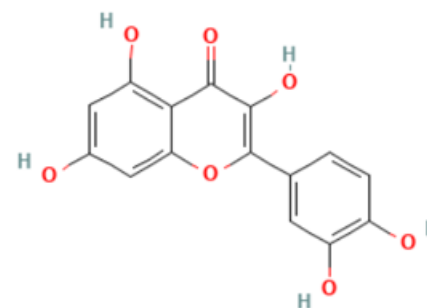
phthalate



2,4,6-trichlorophenol

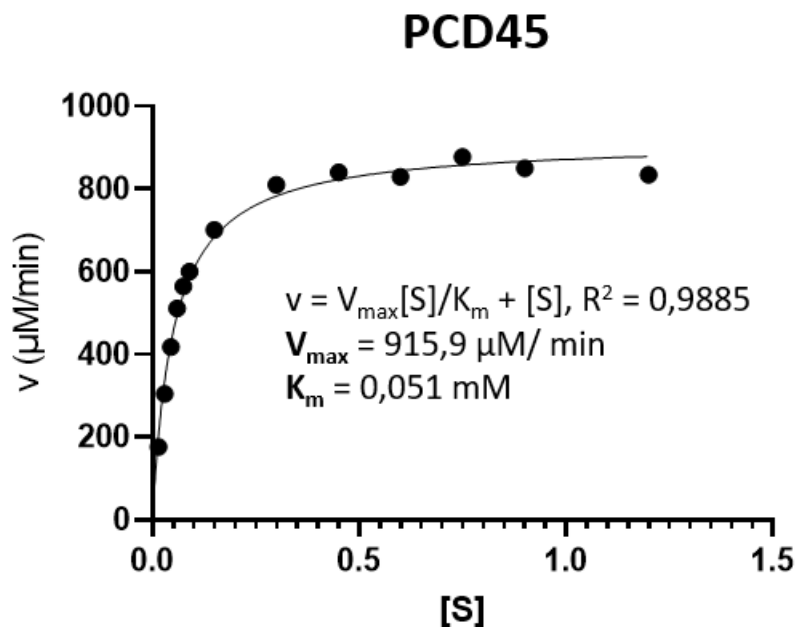


vanillin



quercetin

Π3. Κινητική Michaelis-Menten της PCD45



Φαίνεται ότι η αντίδραση που καταλύεται από το αγρίου τύπου ένζυμο PCD45 ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $v = V_{\max} * [S] / K_m + [S]$, με $V_{\max}$ 915,9 $\mu\text{M}/\text{min}$ και $K_m = 0,05 \text{ mM}$.

Με βάση την τιμή $V_{\max}$ υπολογίζεται ότι η μέγιστη ειδική ενζυμική δραστηριότητα 230 $\text{U}/\mu\text{g}$. Ως Unit ορίζεται ως η μετατροπή 1 nmol PCA σε διάστημα 1 min.

Π4. Πορείες καταβολισμού του *P. phenanthrenivorans* Sphe3

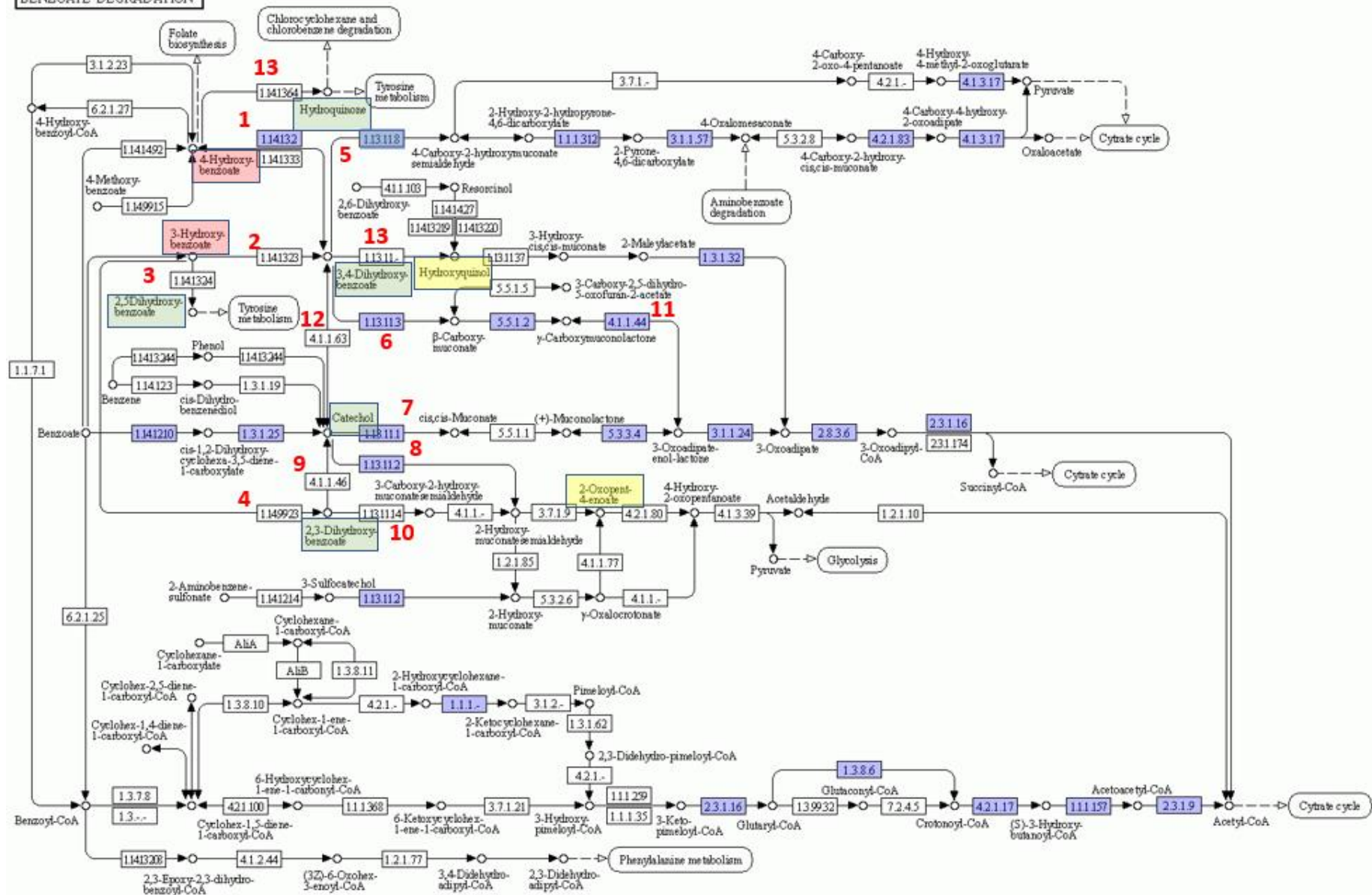
Στην παρακάτω εικόνα δίνονται οι πιθανές πορείες καταβολισμού του βενζοϊκού οξέος όπως αυτές είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων KEGG (https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?section=KeggMap&page=keggMap&map_id=map00362&gene_oid=650468464&myimg=0).

Με μπλε απεικονίζονται τα ένζυμα τα οποία έχουν εντοπιστεί στο *P. phenanthrenivorans* Sphe3. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται τα 3- και 4-υδροξυβενζοϊκά οξέα. Με πράσινο πλαίσιο οι πρωτογενείς μεταβολίτες των οξέων αυτών όπως το PCA (3,4-dihydroxybenzoate), το γεντισικό (2,5-dihydroxybenzoate), το πυροκατεχοϊκό (2,3-dihydroxybenzoate), η κατεχόλη και η υδροκινόνη. Με κίτρινο πλαίσιο σημειώνονται οι μη αναμενόμενοι μεταβολίτες κατά τον καταβολισμό των 3HB και 4HB από το Sphe3, που αναφέρονται στο κεφάλαιο της Συζήτησης και εντοπίστηκαν κατά τη Μεταβολομική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το 4-καρβόξυ-2-οξοπεντανοϊκό και την υδροξυκινόλη.

Τέλος με την αρίθμηση δίνονται τα γονίδια στα οποία γίνεται αναφορά στη Συζήτηση ως εξής:

1. 3-υδροξυλάση του 4HB (4HB3H)
2. 4-υδροξυλάση του 3HB (3HB4H)
3. 6-υδροξυλάση του 3HB (3HB6H)
4. 2-υδροξυλάση του 3HB (3HB2H)
5. 4,5-διοξυγονάση του PCA (PCD45)
6. 3,4-διοξυγονάση του PCA (PCD34)
7. 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (CDO12)
8. 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης (CDO23)
9. Αποκαρβοξυλάση του πυροκατεχοϊκού οξέος
10. 3,4-διοξυγονάση του πυροκατεχοϊκού οξέος
11. Αποκαρβοξυλάση της γ-καρβοξυμουκονολακτόνης
12. Αποκαρβοξυλάση του PCA
13. 1-υδροξυλάση του 4HB (4HB1H)

BENZOATE DEGRADATION



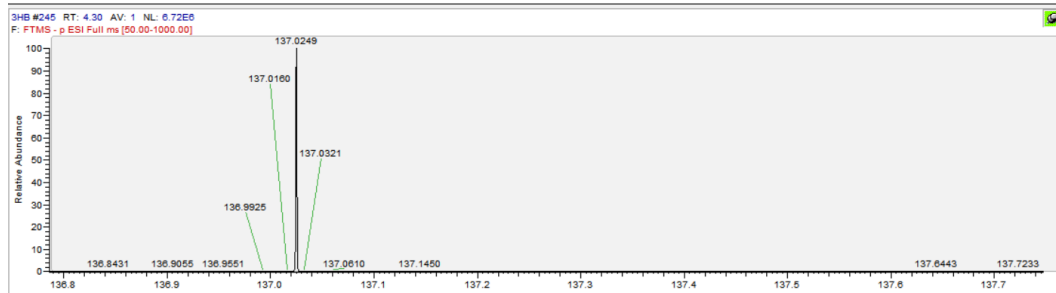
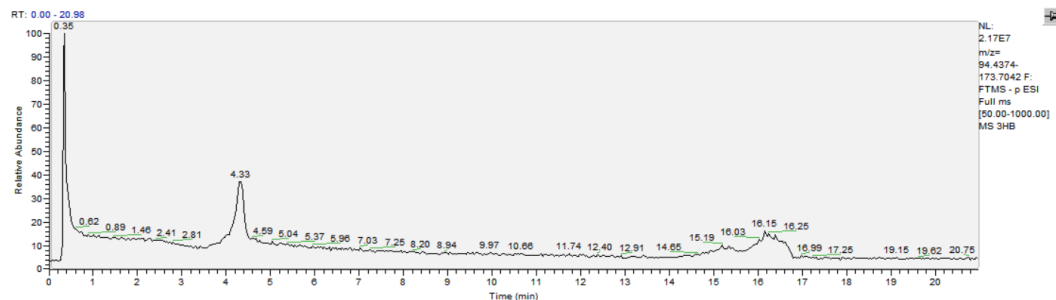
Π5. LC-MS φάσματα των πρότυπων ενώσεων

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα LC-MS από τις πρότυπες ενώσεις, όπου απεικονίζονται τόσο οι χρόνοι κατακράτησης κάθε ένωσης στις στήλες που χρησιμοποιήθηκαν, όσο και το μοριακό ιόν της εκάστοτε ένωσης. Διευκρινίζεται κάθε φορά η στήλη από την οποία προέκυψε το κάθε φάσμα. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι Fortis H2O (50 mm * 2.1 mm, 1.7 μm) και η Hypersil Gold (100 mm * 2.1 mm, 1.9 μm).

3-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($m/z = 137,0249$)

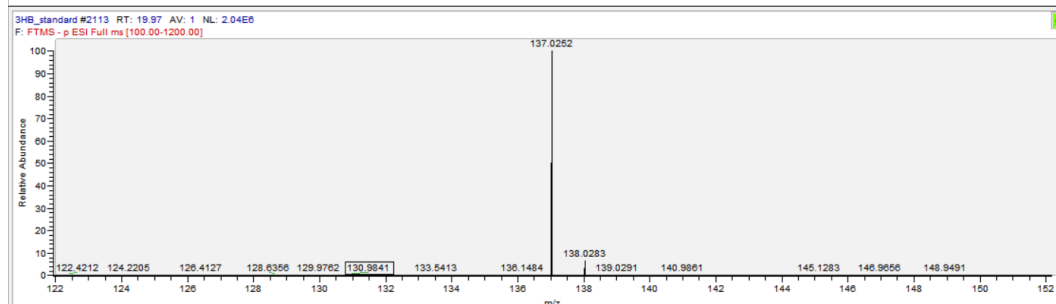
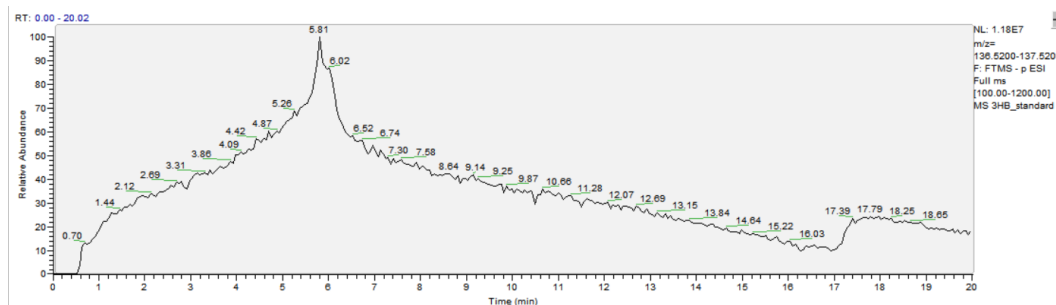
Fortis H2O

R.T. = 4,33 min



Hypersil Gold

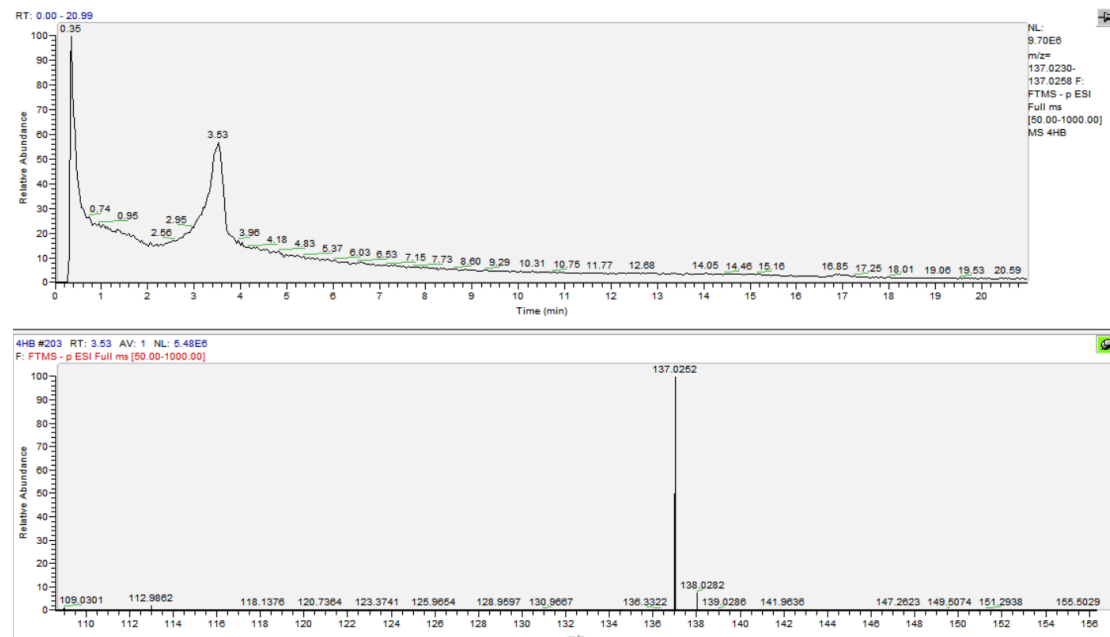
R.T. = 5,81 min



4-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($m/z = 137,0249$)

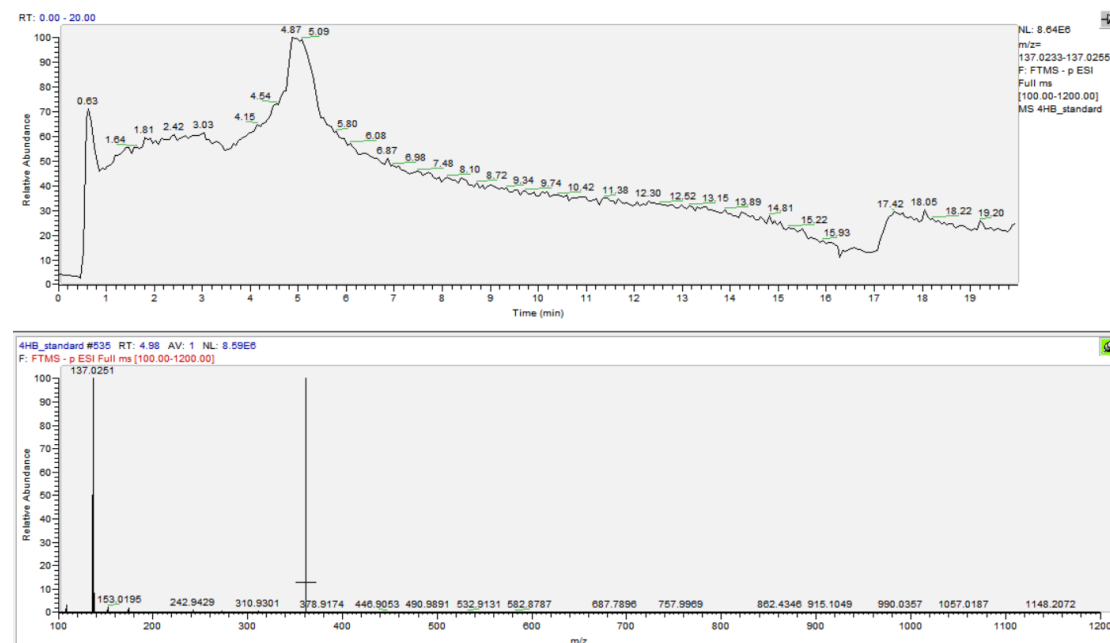
Fortis H2O

R.T. = 3,53 min



Hypersil Gold

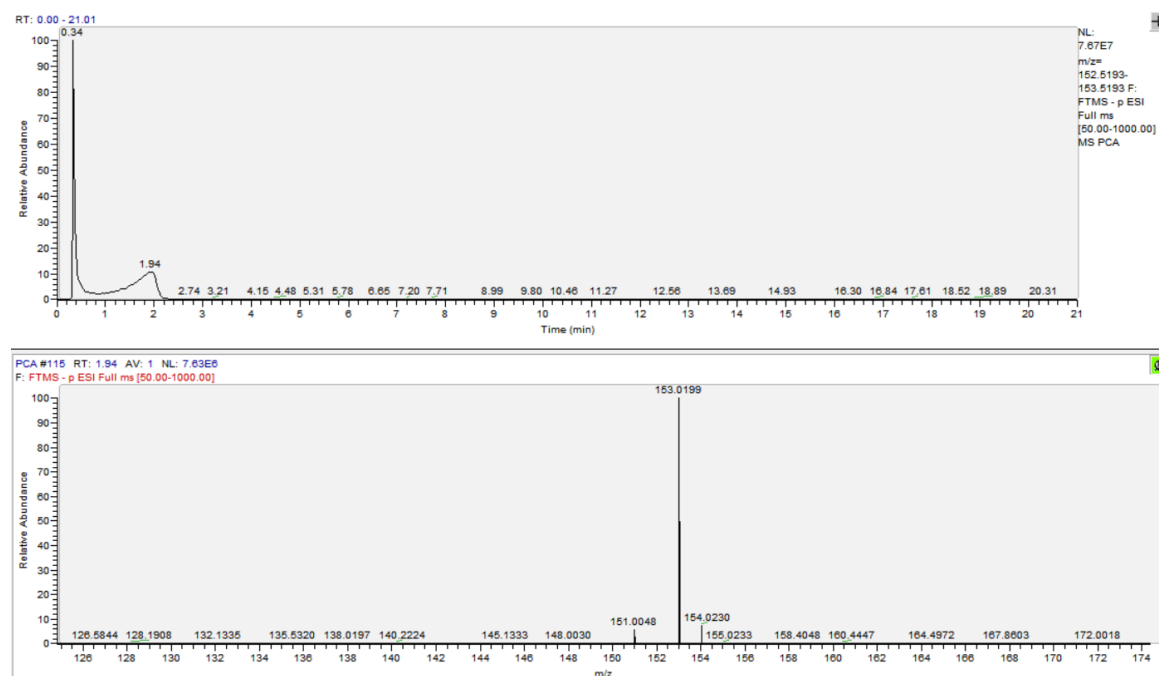
R.T. = 4,9 min



PCA (m/z = 153.0193)

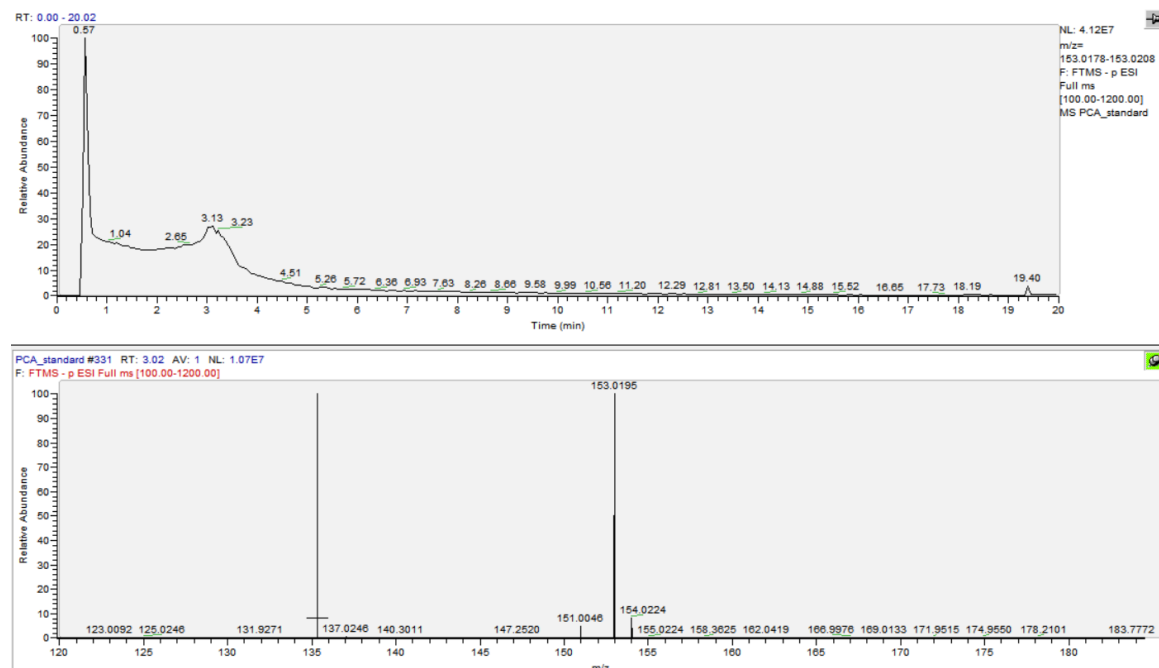
Fortis H2O

R.T. = 1,94 min



Hypersil Gold

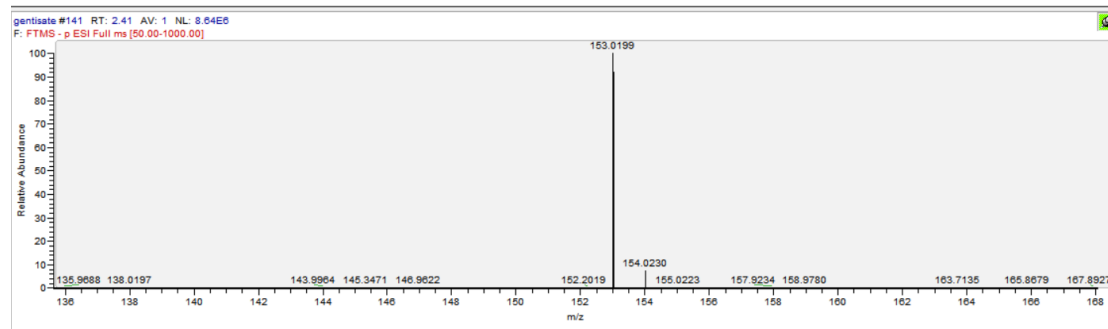
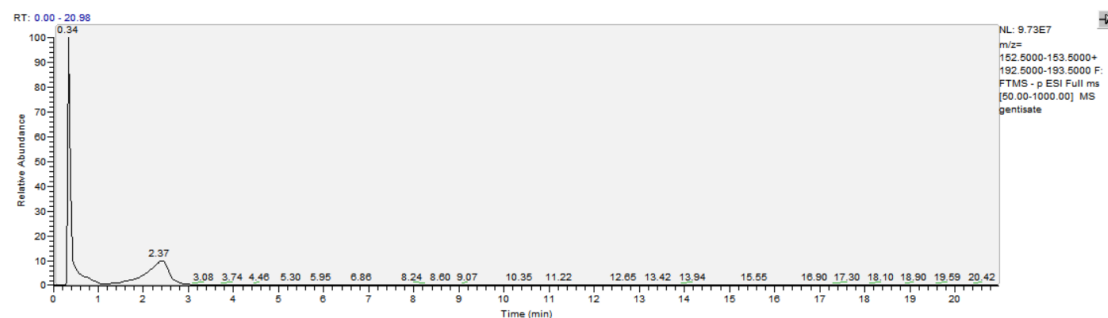
R.T. = 3,2 min



Γεντισικό οξύ ($m/z = 153,0193$)

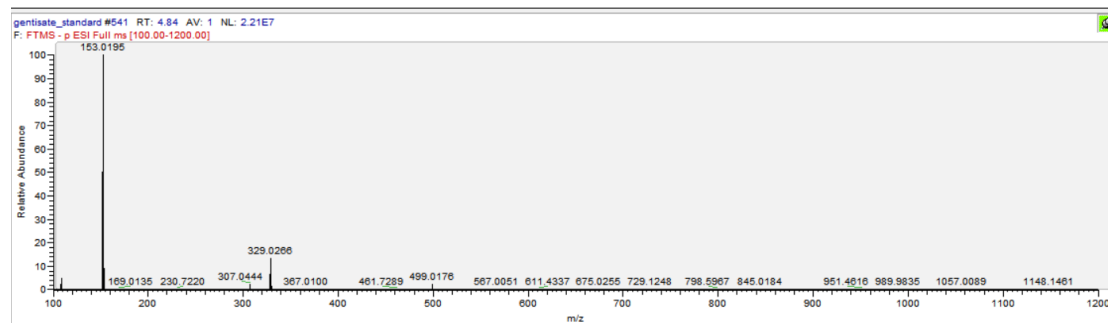
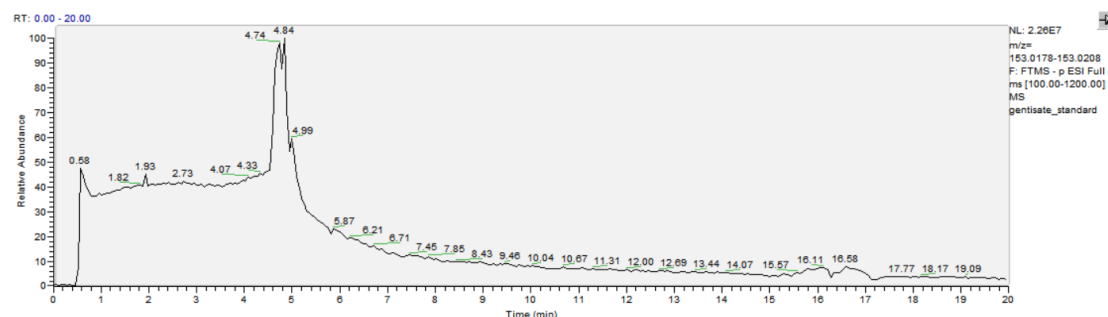
Fortis H2O

R.T. = 2,37 min



Hypersil Gold

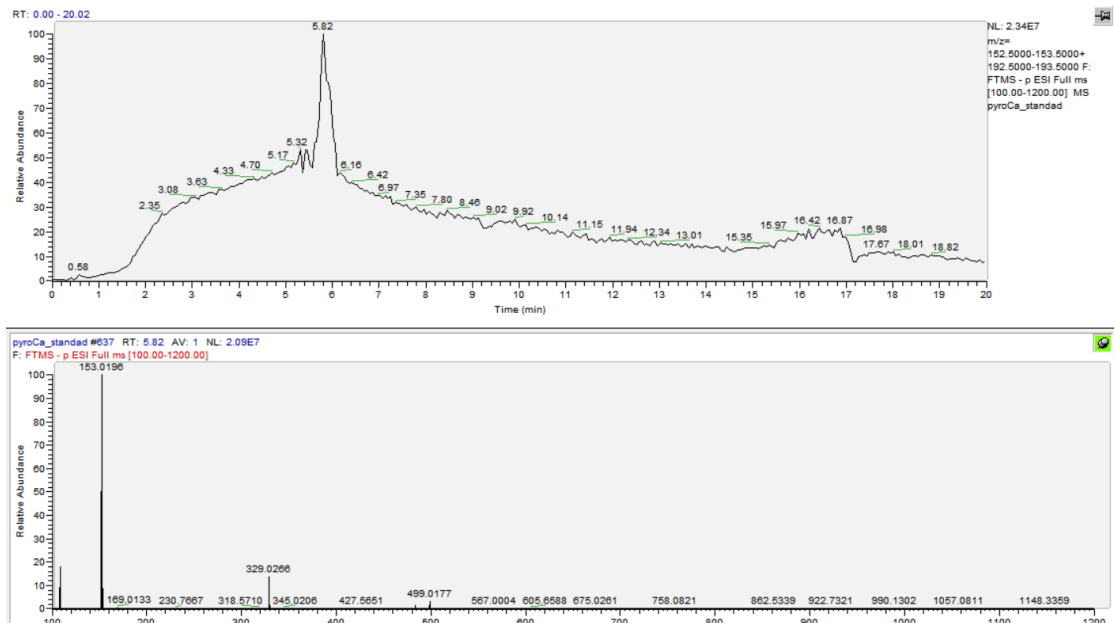
R.T. = 4,8 min



Πυροκατεχοϊκό οξύ ($m/z = 153,0193$)

Hypersil Gold

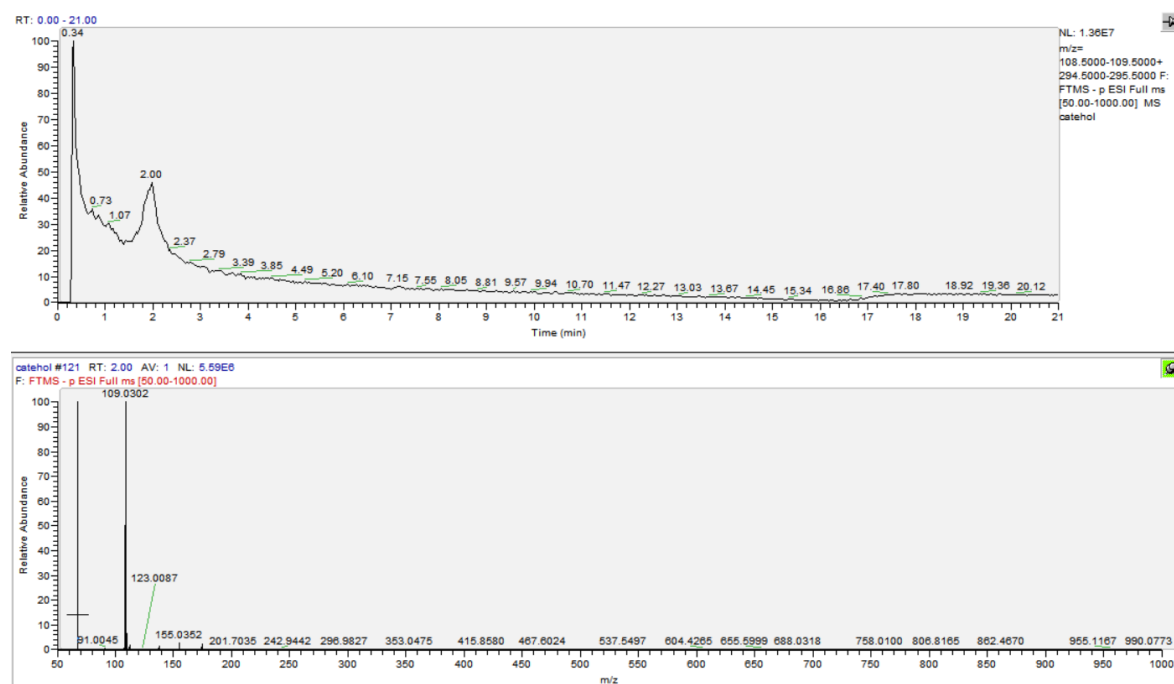
R.T. = 5,82 min



Κατεχόλη ($m/z = 109,0295$)

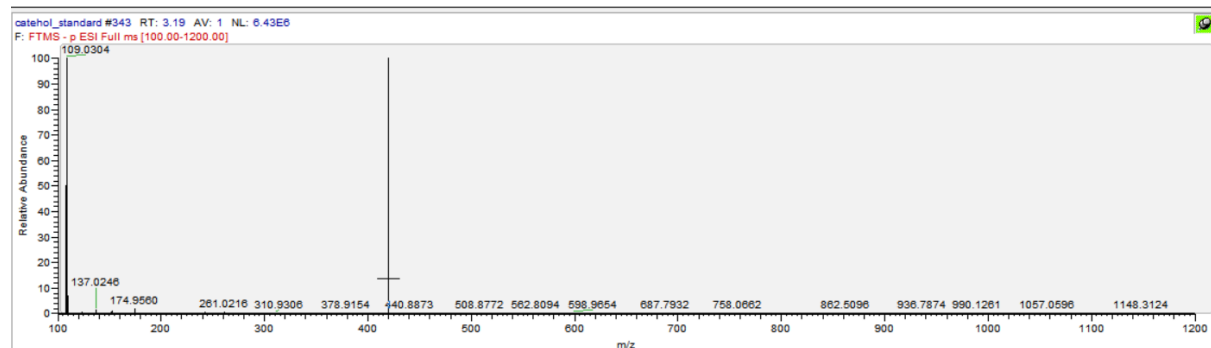
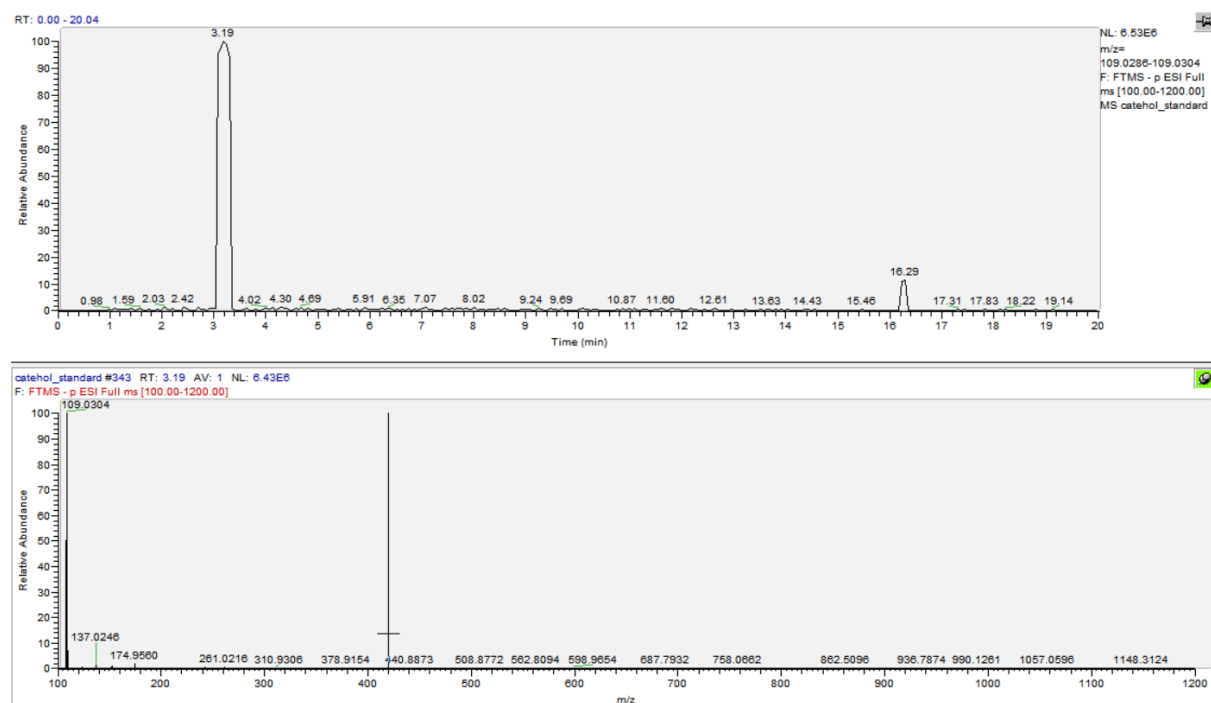
Fortis H2O

R.T. = 2 min



Hypersil Gold

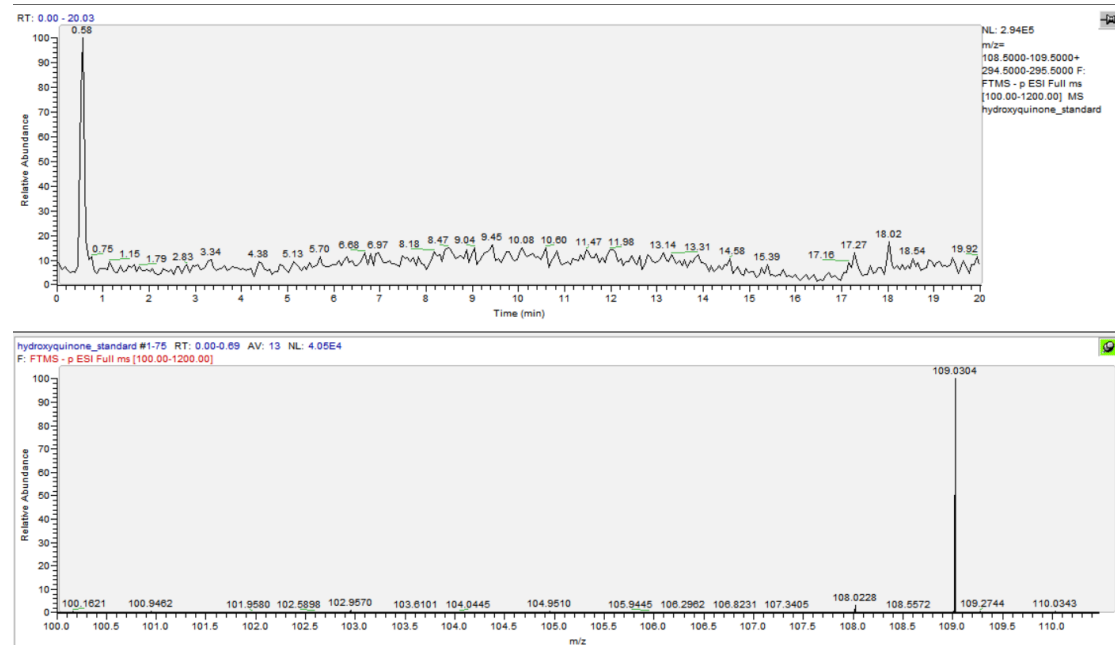
R.T. = 3,19 min



Υδροκινόνη ($m/z = 109,0295$)

Hypersil Gold

R.T. = 0,58 min



Ομοπρωτοκατεχοϊκό οξύ ($m/z = 167,0349$)

Hypersil Gold

R.T. = 4,38 min

