



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΤΟΥ**  
**ΑΙΘΑΝΟΛΟΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Zymomonas mobilis***

**ΝΙΚΟΛΑΟΥ Κ. ΑΡΒΑΝΙΤΗ**  
**ΧΗΜΙΚΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**2013**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών  
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του  
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Ν. Αρβανίτη: 15-12-1989

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 143<sup>Α</sup>/12-1-1990

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Περισυνάκης Άγγελος, Επικ. Καθηγητής Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Τύπας Μιλτιάδης, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής, Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 156<sup>Α</sup>/4-5-1990

**Θέμα:** «Μελέτη φυσικών πλασμιδίων του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου *Zygotomonas mobilis*.»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:**

871<sup>Α</sup>/17-7-2013

1. Περισυνάκης Άγγελος, Επικ. Καθηγητής Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Τύπας Μιλτιάδης, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
3. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής, Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Βοργιά Κωνσταντίνο, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
5. Κούκου Άννα-Ειρήνη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμ. Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Παππά Αικατερίνη-Μαρία, Επικ. Καθηγήτρια, Τμ. Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
7. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επικ. Καθηγήτρια, Τμ. Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-10-2013.

**Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας  
Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής**

**Η Γραμματέας του Τμήματος  
Ελένη Αδαμαντίου**

*Στην οικογένειά μου...*

*...στη μνήμη του δασκάλου και καθηγητή μου*

*Κωνσταντίνο Δραΐνα*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το βακτήριο *Zygomonas mobilis* (ή Ζυμομονάδα όπως συνήθως το αποκαλούν όσοι ασχολούνται μ' αυτό), παρ' όλες τις δυσκολίες και τις ιδιαιτερότητες που έχει στο χειρισμό του, αναδύει μια φρουτώδη μυρωδιά κατά την ανάπτυξη του αλλά και ένα μυστήριο, που μπορεί να σου σβήσει την οποιαδήποτε κακή ανάμνηση δημιουργήθηκε από την ενασχόλησή σου με αυτό.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας (Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας) του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο αείμνηστος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας Κωνσταντίνος Δραΐνας, ο οποίος, η μοίρα το έφερε να μην είναι εν ζωή την ώρα της υποστήριξης της παρούσας διατριβής ενώπιον της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Παρ' όλα αυτά αισθάνομαι ότι οφείλω να τον ευχαριστήσω θερμά τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση και συνεχή ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλα τα στάδια αυτής της εργασίας, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη συγγραφή της.

Ευχαριστίες χρωστώ φυσικά και στον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ Άγγελο Περισυνάκη για την ανάληψη της επίβλεψης της παρούσας διατριβής, ύστερα από την απώλεια του Κωνσταντίνου Δραΐνα, και για τις εποικοδομητικές υποδείξεις κατά την ολοκλήρωση της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής κ. Μιλτιάδη Τύπα, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και κ. Δημόκριτο Τσουκάτο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις χρήσιμες υποδείξεις του κατά την ολοκλήρωση της εργασίας.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στον Καθηγητή κ Κωνσταντίνο Βοργιά, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκου και στις Επίκουρες Καθηγήτριες κ.κ. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα και Αικατερίνη-Μαρία Παππά της Εξεταστικής Επιτροπής για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής είναι, κατά γενική ομολογία, δύσκολη και επίπονη και θα ήταν, ίσως αδύνατη χωρίς την παρουσία καλών φίλων και συνεργατών στο

εργαστήριο. Από τους ανθρώπους αυτούς θα ήθελα ευχαριστήσω τους κ.κ. Γιώργο Βαρθολομάτο, Αμαλία Αφένδρα, Γιώργο Κολιό, Άγγελο Περισυνάκη, Ευγενία Δούκα και Γιώργο Τέγο για τη βοήθεια, την πάντα πρόθυμη και ευχάριστη συνεργασία και την πολύτιμη συμπαράστασή τους ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές του διδακτορικού.

Φυσικά, μεγάλη ευγνωμοσύνη οφείλω στους γονείς μου, για την αδιάκοπη προσφορά τους, τη συναισθηματική υποστήριξη που μου παρείχαν σε στιγμές αδυναμίας και την υπομονή που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ την σύζυγό μου Έρη, σύντροφο και σύμμαχο ζωής, για την υπομονή της, την συνεχή παρότρυνση, την ουσιαστική της βοήθεια κατά τη συγγραφή της διατριβής, αλλά κυρίως για την απεριόριστη αγάπη και την ισορροπία που έφερε στη ζωή μου.

Ιωάννινα, Οκτώβριος 2013



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	I
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	VII
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	XII
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XIV
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	XVII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	XIX
SUMMARY.....	XXI

## Εισαγωγή

<b>1. Πλασμίδια</b> .....	<b>1</b>
1.1. Τι είναι τα πλασμίδια.....	1
1.2 Είδη πλασμιδίων.....	2
1.2.1 Μεταβιβάσιμα πλασμίδια.....	2
1.2.2 Πλασμίδια αντοχής σε αντιβιοτικά ή μέταλλα (πλασμίδια R).....	3
1.2.3 Μεταβολικά πλασμίδια.....	5
1.2.4 Τοξικά πλασμίδια.....	6
<b>2. Αντιγραφή Πλασμιδιακού DNA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Τρόποι αντιγραφής DNA.....	8
2.1.1 Αντιγραφή θ – τύπου .....	8
2.1.2 Αντιγραφή σ – τύπου.....	10
2.1.3 Αντιγραφή εκτόπισης αλυσίδας.....	12
2.2 Παραδείγματα πλασμιδιακής αντιγραφής εξαρτώμενης από πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου-ξενιστή.....	14
2.3 Παραδείγματα πλασμιδιακής αντιγραφής εξαρτώμενης από πρωτεϊνικά μόρια του ίδιου του πλασμιδίου.....	16

<b>3. Μηχανισμοί Μεταφοράς Γενετικού Υλικού.....</b>	<b>24</b>
3.1 Μετασχηματισμός.....	24
3.2 Μεταγωγή.....	26
3.3 Βακτηριακή σύζευξη.....	28
3.3.1 Η “συζευκτική γέφυρα”.....	35
3.3.2 Περιοχή έναρξης της μεταφοράς ( <i>oriT</i> ).....	36
3.3.3 Χαλαροσώματα (Relaxosomes).....	37
3.3.3.1 Διάσπαση στην περιοχή <i>oriT</i> .....	37
3.3.3.2 Πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στην περιοχή <i>oriT</i> .....	39
3.3.4 Εκτόλιξη του DNA.....	43
3.3.5 Τερματισμός της μεταφοράς .....	45
3.3.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πορείας του DNA και του συζευκτικού πόρου.....	46
3.3.7 Σύνδεση του μεταφερόμενου DNA με το συζευκτικό πόρο .....	47
3.3.8 Σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA .....	49
3.4 Μεταφορά χρωμοσωμικού DNA μέσω της βακτηριακής σύζευξης.....	50
3.5 Σύγχρονες απόψεις για τη μεταφορά DNA μέσω βακτηριακής σύζευξης.....	51
3.6 Συζευκτικά μεταθετά στοιχεία .....	53
3.6.1 Μεταθετές κασέτες κινητοποίησης .....	54
3.6.2 Συζευκτικά τρανσποζόνια .....	55
<b>4. <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>57</b>
4.1 Ιστορική αναδρομή .....	57
4.2 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά .....	60
4.3 Ζύμωση Υδατανθράκων .....	60
4.3.1 Γλυκόζη και φρουκτόζη .....	62
4.3.2 Σακχαρόζη .....	63
4.3.3 Άλλα υποστρώματα .....	63
4.4 Το γονιδίωμα του <i>Z. mobilis</i> .....	65
4.4.1 Ενδογενή πλασμίδια του <i>Zymomonas</i> .....	66

4.5 Φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης ετερόλογων γονιδίων στο <i>Z. mobilis</i> .....	69
4.5.1 Πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστή .....	70
4.5.2 Τροποποιημένοι φορείς .....	71
4.5.3 Υβριδικά πλασμίδια .....	72
4.6 Το <i>Z. mobilis</i> στη βιομηχανία .....	75
<b>Σκοπός της διατριβής.....</b>	<b>77</b>

## Υλικά και Μέθοδοι

<b>5. Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>79</b>
5.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	79
5.2 Θρεπτικά υλικά.....	79
5.3 Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών .....	83
5.4 Διατήρηση των στελεχών.....	83
5.5 Αντιβιοτικά.....	85
5.6 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	86
5.7 Επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη μεταξύ <i>E. coli</i> και <i>Z. mobilis</i> .....	88
5.8 Έλεγχος της σταθερότητας πλασμιδίων σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> .. ..	89
5.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	90
5.9.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μεγάλη κλίμακα. Καθαρισμός σε βαθμίδωση πυκνότητας CsCl.....	90
5.9.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Z. mobilis</i> ... ..	94
5.9.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini preparation). Πρωτόκολλο I .....	96
5.9.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini preparation). Πρωτόκολλο II.....	98
5.10 Καθαρισμός DNA με τη μέθοδο της διαπίδυσης .....	100
5.10.1 Κατεργασία των μεμβρανών διαπίδυσης (dialysis tubing).....	100
5.11 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	101
5.12 Πέψεις πλασμιδιακού DNA .....	102
5.13 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	103

5.13.1 Γενικά.....	103
5.13.2 Παρασκευή πήκτωματος αγαρόζης .....	104
5.14 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης .....	107
5.14.1 Ηλεκτροέκλυση σε μεμβράνες διαπίδυσης .....	107
5.14.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο GENECLEAN II BIO 101.....	108
5.15 Μεταφορά DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε νάιλον φίλτρο .....	110
5.16 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA (Μέθοδος DIG).....	112
5.17 Υβριδισμός DNA-DNA .....	114
5.17.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός .....	114
5.17.1.1 Προϋβριδισμός .....	114
5.17.1.2 Υβριδισμός .....	115
5.17.1.3 Πλύσεις .....	115
5.17.1.4 Εμφάνιση .....	116
5.18 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια .....	117
5.19 Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	124
5.19.1 Γενικά .....	124
5.19.2 Πειραματική διαδικασία .....	126
5.20 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας.....	126
5.20.1 Γενικά .....	126
5.20.2 Πειραματική διαδικασία.....	128
5.21 Εύρεση της πρωτοδιάταξης DNA με μη ραδιενεργό μέθοδο χρησιμοποιώντας Taq DNA πολυμεράση.....	135
5.22 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου .....	140
5.22.1 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες αποδιάταξης .....	140
5.23 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών μορίων κωδικοποιούμενα από πλασμίδια.....	145
5.23.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών μορίων που κωδικοποιούνται από πλασμίδια με τη μέθοδο «maxicells».....	145
5.23.1.1 Γενικά .....	145
5.23.1.2 Πειραματική διαδικασία .....	147
5.25 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία .....	149

## Αποτελέσματα

<b>6. Υποκλωνοποιήσεις των πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3</b> .....	<b>151</b>
6.1 Απομόνωση πλασμιδίων του στελέχους <i>Z. mobilis</i> 10988.....	151
6.2 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO1.....	154
6.3 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO2 .....	162
6.4 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO3 .....	165
<b>7. Συζευκτικές ικανότητες των πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3</b> .....	<b>170</b>
7.1 Μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με βακτηριακή σύζευξη μεταξύ στελεχών <i>E. coli</i> .....	170
7.2 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO3.....	176
7.2.1 Η περιοχή υπεύθυνη για την αντιγραφή (Rep region).....	178
7.2.2 Η περιοχή υπεύθυνη για την κινητικότητα (Mob region).....	179
7.3 Άλλες χαρακτηριστικές περιοχές στο μόριο του pZMO3.....	184
7.4 Συμπεράσματα .....	187
7.5 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης του ORF1 του pZMO3 με τη μέθοδο «maxicells».....	189
<b>8. Προσδιορισμός και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του φυσικού πλασμιδίου pZMO2</b> .....	<b>190</b>
8.1 Μόρια-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του φυσικού πλασμιδίου του <i>Z. mobilis</i> pZMO2.....	191
8.2 Ανάλυση της αλληλουχίας του pZMO2.....	193
8.2.1 Σε επίπεδο πρωτεΐνης.....	193
8.2.2 Σε επίπεδο DNA.....	198
8.3 Οργάνωση των περιοχών έναρξης αντιγραφής ( <i>DSO</i> και <i>SSO</i> ).....	201
8.4 Ανίχνευση μονόκλωνου DNA (ss-DNA).....	205
8.5 Συμπεράσματα.....	206
<b>9. Μεταφορά, Δομική ανάλυση και Σταθερότητα των pZMO1 και pZMO2</b> .....	<b>210</b>
9.1 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21.....	211
9.1.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21 σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> .....	213
9.2 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA11.....	214

9.2.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11 σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> .....	216
9.3 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA12.....	217
9.3.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12 σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> .....	218
9.4 Μεταφορά του πλασμιδίου pBR325.....	219
9.5 Δομική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12 σε μετασυζευγμένα κύτταρα CU1Rif2.....	220

## Συζήτηση

<b>10. Γενικά</b> .....	<b>223</b>
10.1 Ανάλυση και λειτουργία των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 του στελέχους ATCC 10988 του <i>Z. mobilis</i> .....	224
10.1.1 Μηχανισμός αντιγραφής του pZMO2 και περιοχές υπεύθυνες για την αντιγραφή του .....	227
10.1.2 Σταθερότητα αντιγραφής των pZMO1 και pZMO2 σε κύτταρα <i>Z. mobilis</i> CU1Rif2.....	233
10.2 Μελέτη λειτουργικών ιδιοτήτων του πλασμιδίου pZMO3 του στελέχους ATCC 10988 του <i>Z. mobilis</i> .....	238
10.2.1 Δομή και ρόλος του πρωτεϊνικού μορίου του ORF2.....	239
10.2.2 Δομή και ρόλος του πρωτεϊνικού μορίου του ORF1.....	240
10.3 Περιοχή έναρξης της μεταφοράς ( <i>oriT</i> ).....	247

## Βιβλιογραφία

<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>253</b>
---------------------------	------------

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	σελ.
Σ χ ή μ α 1. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου F.....	3
Σ χ ή μ α 2. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου ανθεκτικότητας R100.....	4
Σ χ ή μ α 3. Γενετικός χάρτης του μεταβολικού πλασμιδίου NAH7.....	5
Σ χ ή μ α 4. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου Ti.....	6
Σ χ ή μ α 5. Μοντέλο αντιγραφής θ-μορφής κατά Viret <i>et al.</i> , 1991).....	9
Σ χ ή μ α 6. Μοντέλο αντιγραφής πλασμιδίου με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου ή σ-τύπου.....	11
Σ χ ή μ α 7. Αντιγραφή με τον μηχανισμό εκτόπισης αλυσίδα.....	13
Σ χ ή μ α 8. Σχηματική επεξήγηση του μηχανισμού της έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου ColE1.....	15
Σ χ ή μ α 9. Σχηματική εξήγηση του βασικού ρεπλικονίου του πλασμιδίου pSC101.....	17
Σ χ ή μ α 10. Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου RK2.....	18
Σ χ ή μ α 11. Περιοχές του IncP πλασμιδίου RK2, που εμπλέκονται στην έναρξη της αντιγραφής και στη ρύθμιση αυτής.....	19
Σ χ ή μ α 12. Βασική μονάδα αντιγραφής του IncQ πλασμιδίου RSF1010.....	21
Σ χ ή μ α 13. Νουκλεοτιδιακή αλληλουχία της περιοχής έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου pT181.....	23
Σ χ ή μ α 14. Σχηματική περιγραφή των φάσεων του μετασχηματισμού <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	26
Σ χ ή μ α 15. Σχηματικά παράσταση της μεταφοράς DNA σε βακτηριακά κύτταρα μέσω του μηχανισμού της μεταγωγής (transduction).....	27

**Σ χ ή μ α 16.**

(A). Γενετικός χάρτης του συζευκτικού πλασμιδίου F.

(B). Περιοχή μεταφοράς του πλασμιδίου F (περιοχή *tra*).....31**Σ χ ή μ α 17.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της βακτηριακής σύζευξης.....34**Σ χ ή μ α 18.** Σύγκριση των αλληλουχιών ορισμένων φυσικών πλασμιδίων

στην περιοχή διάσπασής τους από τις πρωτεΐνες χαλάρωσης.....36

**Σ χ ή μ α 19.** Χάρτης της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του

πλασμιδίου ColE1.....38

**Σ χ ή μ α 20.** Χάρτης της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του

πλασμιδίου F.....39

**Σ χ ή μ α 21.** Σχηματικό διάγραμμα του χαλαροσώματος στο πλασμίδιο F.....40**Σ χ ή μ α 22.** Μεταφορά DNA με βακτηριακή σύζευξη.....41**Σ χ ή μ α 23.** Γενετική οργάνωση της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του

πλασμιδίουRSF1010 (Meyer, 2009).....42

**Σ χ ή μ α 24.** Χάρτης συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του πλασμιδίου RP4.....42**Σ χ ή μ α 25.** Περιοχές της πρωτεΐνης TraI.....44**Σ χ ή μ α 26.** Χαρακτηριστικά των αλληλουχιών των πλασμιδίων RSF1010,

F και RP4 στην περιοχή τερματισμού της μεταφοράς.....46

**Σ χ ή μ α 27.** Μοντέλο σύνδεσης TraM-TraD στο συζευκτικό πόρο.....48**Σ χ ή μ α 28.** Μοντέλο συζευκτικής μεταφοράς του πλασμιδίου F.....50**Σ χ ή μ α 29.** Γενικός μηχανισμός πλασμιδιακής μεταφοράς κατά Zechner, *et al.*,

2012.....52

**Σ χ ή μ α 30.** Η παραγωγή αιθανόλης μέσω της καταβολικής πορείας Entner–

Doudoroff.....61



ευρετήριο σχημάτων (συνέχεια)	σελ.
Σ χ ή μ α 31. Διαχωρισμός μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος.....	103
Σ χ ή μ α 32. Διάταξη μεταφοράς DNA κατά Southern.....	111
Σ χ ή μ α 33. Συντακτικός τύπος του DIG-11-dUTP.....	113
Σ χ ή μ α 34. Γενικό σχήμα κλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς.....	123
Σ χ ή μ α 35. Σχηματική παράσταση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	125
Σ χ ή μ α 36. Δομή της δεοξυ- και της διδεοξυ-νουκλεοτιδίου.....	127
Σ χ ή μ α 36α. Σχηματική παράσταση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας.....	128
Σ χ ή μ α 37. Σχηματική παράσταση της μεθόδου «maxicells».....	146
Σ χ ή μ α 38. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pDS212, pDS191 και pDS3270.....	153
Σ χ ή μ α 39. Θέσεις περιορισμού των περιοριστικών ενδονουκλεασών <i>Bam</i> HI και <i>Bgl</i> II.....	154
Σ χ ή μ α 40. Θέσεις περιορισμού των περιοριστικών ενδονουκλεασών <i>Bam</i> HI και <i>Sau</i> 3AI.....	157
Σ χ ή μ α 41. Περιοριστικοί χάρτες των pUZMO1.1, pUZMO1.2 και pUZMO1.3.....	161
Σ χ ή μ α 42. Υποκλωνοποίηση του pZMO2 και περιοριστικοί χάρτες των pUZMO2 και pUZMO2.2.....	164
Σ χ ή μ α 43. Περιοριστικός χάρτης των pUZMO3.11 και pUZMO3.12.....	167
Σ χ ή μ α 44. Περιοριστικός χάρτης των pUZMO3.21 και pUZMO3.22.....	168
Σ χ ή μ α 45. Σχηματική παράσταση επιβοηθούμενης συζευκτικής κινητοποίησης πλασμιδίου με τη βοήθεια του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 (triparental conjugation).....	171
Σ χ ή μ α 46. Κατασκευή του στελέχους κινητοποίησης <i>E. coli</i> SM10.....	174

<b>Σ χ ή μ α 47.</b> Σχηματική παράσταση συζευκτικής κινητοποίησης πλασμιδίου με τη βοήθεια του <i>Hfr</i> στελέχους SM10 (biparental conjugation).....	176
<b>Σ χ ή μ α 48.</b> Φυλογενετική σύγκριση, με βάση την πρωτεΐνη Rep, πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου.....	179
<b>Σ χ ή μ α 49.</b>	
A) Στοίχιση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας (97-192 αμινοξύ) του πολυπεπτιδίου των 66 kD του ORF1 του pZMO3 (PZMO3MOB), με αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων κινητοποίησης από τα πλασμίδια pMV158 (PMV158MOB) και pTB19 (PTB19MOB) του κλάδου A της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου.	
B) Στοίχιση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας (104-188 αμινοξύ) του πολυπεπτιδίου των 66 kD που κωδικοποιείται από το ORF1 του pZMO3 (PZMO3MOB), με αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων κινητοποίησης από τα πλασμίδια pWKS1 (PWKS1MOB), pTS1 (PTS1MOB) και pBBR1 (PBBR1MOB) του κλάδου B της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου .....	181
<b>Σ χ ή μ α 50.</b>	
(A) Μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO3. Οι δύο πιθανές περιοχές <i>oriT</i> φαίνονται με έντονα γράμματα.	
(B) Οι δομές μίσχου – θηλιάς των δύο πιθανών περιοχών <i>oriT</i> (I και II) στο πλασμίδιο pZMO3.....	183
<b>Σ χ ή μ α 51.</b> Στοίχιση της πιθανής περιοχής <i>oriT</i> (II) του pZMO3 με τις αντίστοιχες περιοχές των πλασμιδίων pMV158 και pBBR1.....	184
<b>Σ χ ή μ α 52.</b> Πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία του φυσικού πλασμιδίου pZMO3(pZM2) του <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους Misawa & Nakamura, 1989.....	184-187
<b>Σ χ ή μ α 53.</b> Φυσικός χάρτης του πλασμιδίου pZMO3.....	188

<b>Σ χ ή μ α 54.</b> Στοιχίση της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 με πρωτεΐνες αντιγραφής πλασμιδίων της ομάδας pC194/ pUB110 και με αυτή του pZMO1.....	196
<b>Σ χ ή μ α 55.</b> Η αλληλουχία της περιοχής των 139 bp του pZMO2 που παρουσιάζει 100% ομολογία με το pZMO1.....	200
<b>Σ χ ή μ α 56.</b>	
(Α) Χάρτης του φυσικού πλασμιδίου pZMO2 του <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988, όπως προέκυψε από την εύρεση της νουκλεοτιδιακής του αλληλουχίας.	
(Β) Πλήρης νουκλεοτιδιακή αλληλουχία του πλασμιδίου pZMO2 και προβλεπόμεν αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό.....	207-209
<b>Σ χ ή μ α 57.</b> Υποκλωνοποίηση της περιοχής 1-692 kb του pZMO2 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21.....	212
<b>Σ χ ή μ α 58.</b> Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα <i>Z. mobilis</i> CU1Rif2 υπό μη επιλεκτικές συνθήκες.....	213
<b>Σ χ ή μ α 59.</b> Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO1 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11.....	215
<b>Σ χ ή μ α 60.</b> Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα <i>Z. mobilis</i> CU1Rif2 υπό μη επιλεκτικές συνθήκες.....	216
<b>Σ χ ή μ α 61.</b> Υποκλωνοποίηση μέρους του πλασμιδίου pZMO1 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12.....	217
<b>Σ χ ή μ α 62.</b> Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα <i>Z. mobilis</i> CU1Rif2 υπό μη επιλεκτικές συνθήκες.....	218
<b>Σ χ ή μ α 63.</b> Περιοριστικοί χάρτες των τριών πλασμιδίων 1.7 kb που εντοπίστηκαν από τους Misawa <i>et al.</i> , 1985 στο στέλεχος ATCC 10988. ....	225

ευρετήριο σχημάτων (συνέχεια)	σελ.
<b>Σ χ ή μ α 64.</b> Περιοριστικοί χάρτες των πλασμιδίων pZM2, pZMO3 και pDS3154.....	239
<b>Σ χ ή μ α 65.</b> Στοιχίση των πρωτεϊνών κινητοποίησης της οικογένειας πλασμιδίων pMV158-τύπου .....	244
<b>Σ χ ή μ α 66.</b> Δενδρόγραμμα με βάση τις πρωτεΐνες κινητοποίησης πλασμιδίων που ανήκουν στην οικογένεια pMV158-τύπου .....	245
<b>Σ χ ή μ α 67.</b> Στοιχίση των θέσεων <i>nic</i> πλασμιδίων της οικογένειας pMV158-τύπου.....	248
<b>Σ χ ή μ α 68.</b> Νουκλεοτιδιακή αλληλουχία κομματιού του pZMO3 (θέση 105-524 σύμφωνα με τους Misawa & Nakamura, 1989) στο οποίο εντοπίστηκε η περιοχή <i>oriT</i> .....	249
<b>Σ χ ή μ α 69.</b> Στοιχίση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας μέρους του πολυπεπτιδίου του ORF2 του pZMO3 (PZMO3REP), με αντίστοιχες αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων από τα πλασμίδια pE5, pIM13 και pBI143 της οικογένειας πλασμιδίων pSN2.....	251

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

	σελ.
<b>Ε ι κ ό ν α 1.</b> Βακτηριακή σύζευξη μεταξύ στελεχών <i>E.coli</i> (φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).....	33
<b>Ε ι κ ό ν α 2.</b> Κύτταρα του βακτηρίου <i>Z. mobilis</i> .....	60

<b>Ε ι κ ό ν α 3.</b> Συσκευή Sequi-Gen, Sequencing Cell της εταιρείας BIO-RAD.....	129
<b>Ε ι κ ό ν α 4.</b> Πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 διαχωρισμένα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% .....	152
<b>Ε ι κ ό ν α 5.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO1.1 και pUZMO1.2 .....	156
<b>Ε ι κ ό ν α 6.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUZMO1.3 .....	159
<b>Ε ι κ ό ν α 7.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUZMO1.3 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI και <i>Sal</i> I.....	160
<b>Ε ι κ ό ν α 8.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO2.1 και pUZMO2.2.....	163
<b>Ε ι κ ό ν α 9.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO3.11 και pUZMO3.12.....	166
<b>Ε ι κ ό ν α 10.</b> Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO3.21 και pUZMO3.22.....	169
<b>Ε ι κ ό ν α 11.</b> Αυτοραδιογραφία για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης του ORF1 με τη μέθοδο “maxicells” σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου.....	189
<b>Ε ι κ ό ν α 12.</b> Ανίχνευση ssDNA με υβριδισμό κατά Southern κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες σε ολικό DNA <i>Z. mobilis</i> 10988 εκθετικής φάσης ανάπτυξης.....	205
<b>Ε ι κ ό ν α 13.</b> Περιοριστική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12 καθώς και του πλασμιδιακού φορέα pBR325.....	221

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

σελ.

<b>Πίνακας 1.</b> Κυτταρικές λειτουργίες που κωδικοποιούνται από πλασμίδια .....	7
<b>Πίνακας 2.</b> Τα γονίδια <i>tra</i> του πλασμιδίου F.....	29-30
<b>Πίνακας 3.</b> Ιδιότητες των μεταβιβάσιμων στοιχείων.....	32
<b>Πίνακας 4.</b> Ομολογίες αλληλουχιών της πρωτεΐνης MocA με άλλες πρωτεΐνες Mob. ....	54
<b>Πίνακας 5.</b> Σημαντικά ερευνητικά επιτεύγματα για το <i>Zygomonas</i> .....	58-59
<b>Πίνακας 6.</b> Πλεονεκτήματα του <i>Z. mobilis</i> έναντι των ζυμών κατά την παραγωγή αιθανόλης.....	64
<b>Πίνακας 7.</b> Μέγεθος και αριθμός των φυσικών πλασμιδίων των στελεχών ATCC 10988 και CP4 του <i>Z. mobilis</i> .....	67
<b>Πίνακας 8.</b> Δια-ειδικοί φορείς κλωνοποίησης για το <i>Z. mobilis</i> .....	73
<b>Πίνακας 9.</b> Πιθανοί λόγοι για τη μη εμπορευματοποίηση της διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης από πρώτες ύλες σάκχαρα και αμυλούχα υποστρώματα.....	76
<b>Πίνακας 10.</b> Πλασμίδια.....	80
<b>Πίνακας 11.</b> Βακτηριακά στελέχη.....	81
<b>Πίνακας 12.</b> Τρόπος δράσης των αντιβιοτικών και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των γονιδίων.....	84
<b>Πίνακας 13.</b> Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών .....	85-86
<b>Πίνακας 14.</b> Μεγέθη του πλασμιδίου pUZMO1.3 που προέκυψαν από τις διαφορετικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	158
<b>Πίνακας 15.</b> Επιβοηθούμενη συζευκτική κινητοποίηση των pUZMO ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων που περιέχουν αλληλουχίες των πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3 σε <i>E.coli</i> JM83.....	172

<b>Πίνακας 16.</b> Συζευκτική αυτό-κινητοποίηση των pUZMO ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν αλληλουχίες πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3 σε <i>E. coli</i> RR1.....	175
<b>Πίνακας 17.</b> Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF2 του πλασμιδίου pZMO3 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul <i>et. al.</i> , 1990).....	178
<b>Πίνακας 18.</b> Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF1 του πλασμιδίου pZMO3 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul <i>et. al.</i> , 1990).....	180
<b>Πίνακας 19.</b> Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul <i>et. al.</i> , 1990).....	195
<b>Πίνακας 20.</b> Στοίχιση αμινοξικής αλληλουχίας στο ενεργό κέντρο χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών Rep που κωδικοποιούνται από πλασμίδια της οικογένειας pC194/pUB110.....	197
<b>Πίνακας 21.</b> Περιοριστικές θέσεις του φυσικού πλασμιδίου pZMO2 του στελέχους <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988 όπως προέκυψαν μετά την εύρεση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας .....	198-199
<b>Πίνακας 22.</b> Στοίχιση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας της πιθανής <b>SSO</b> περιοχής του pZMO2 με αντίστοιχες χαρακτηρισμένες περιοχές από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-N (Altschul <i>et. al.</i> , 1990).....	204
<b>Πίνακας 23.</b> Συνοπτική περιγραφή των συζεύξεων <i>E. coli</i> x <i>Z. mobilis</i> και της σταθερότητας των μεταφερομένων πλασμιδίων.....	222
<b>Πίνακας 24.</b> Βακτηριακά πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (Khan, 1997).....	226-230
<b>Πίνακας 25.</b> Βακτηριακά πλασμίδια της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου (Francia <i>et al.</i> , 2004).....	242





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

βλ.	: βλέπε
σελ.	: σελίδα
Ap	: ampicillin, αμπικιλίνη
APS	: ammonium persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: base pair, ζεύγος βάσεων
CCC	: covalently closed circular, ομοιοπολικά κλειστός κύκλος
Cm	: chloramphenicol, χλωραμφαινικόλη
kDa	: χιλιάδες daltons
ddH <sub>2</sub> O	: double distilled H <sub>2</sub> O, δις απεσταγμένο H <sub>2</sub> O
DMSO	: dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
dsDNA	: double stranded DNA, δίκλωνο DNA
DSO	: double strand origin, περιοχή έναρξης αναδιπλασιασμού δίκλωνου DNA
EDTA	: ethylene diamino tetracetic acid, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
<i>et al.</i> ,	: και συνεργάτες
EtBr	: ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
IHF	: integration host factor, παράγοντας ενσωμάτωσης του ξενιστή
IPTG	: isopropylthio-β-D-galactoside, θειοϊσοπροπυλικό γαλακτοσίδιο
IR	: inverted repeat, αντίστροφη επανάληψη
kb	: χιλιάδες ζεύγη βάσεων
Km	: kanamycin, καναμυκίνη
<i>lacZ</i>	: β-γαλακτοσιδάση
M.B.	: μοριακό βάρος
MCS	: multiple cloning site ή polylinker, πολυσυνδέτης
MMS	: methyl-methane-sulphonate, μεθυλο-μεθανο-σουλφονικό οξύ
MOPS	: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 3-(N-μορφολινο) προπανοσουλφονικό οξύ
nt	: nucleotide, νουκλεοτίδιο
OD <sub>600</sub>	: optical density, οπτική πυκνότητα στα 600nm
ORF	: Open Reading Frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

<i>oriT</i>	: origin of transfer, περιοχή έναρξης συζευκτικής μεταφοράς
<i>oriV</i>	: origin of replication, θέση/περιοχή έναρξης αναδιπλασιασμού
PCR	: polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RBS	: ribosome binding site, θέση πρόσδεσης ριβοσώματος
Rif	: rifampicin, ριφαμπικίνη
rpm	: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
SDS	: sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SSB	: single strand binding, μονοκλωνο-προσδετική (πρωτεΐνη)
ssDNA	: single-stranded DNA, μονόκλωνο DNA
SSO	: single strand origin, περιοχή έναρξης αναδιπλασιασμού μονόκλωνου DNA
Str	: streptomycin, στρεπτομυκίνη
T4CP	: type 4 coupling protein, πρωτεΐνη σύζευξης τύπου IV
T4SS	: type 4 secretion system, σύστημα έκκρισης τύπου IV
Tc	: tetracycline, τετρακυκλίνη
TEMED	: N', N', N', N'-tetramethylenediamine, N', N', N', N'- τετραμεθυλενοδιαμίνη
<i>tra</i>	: περιοχή λειτουργιών μεταφοράς
Tris	: tris-hydroxymethyl-aminomethane, τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο
U.V.	: ultra violet, υπεριώδης ακτινοβολία
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, βρωμοχλωριούχο ινδολυλο- γαλακτοσίδιο
L.A.	: Luria agar, πλήρες στερεό θρεπτικό υλικό του <i>E. coli</i>
L.B.	: Luria broth, πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό του <i>E. coli</i>
Z.A.	: Zymo agar, πλήρες στερεό θρεπτικό υλικό του <i>Z. mobilis</i>
Z.B.	: Zymo broth, πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό του <i>Z. mobilis</i>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αιθανολοπααραγωγό Gram<sup>-</sup> βακτήριο *Zymomonas mobilis* έχει προσελκύσει τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητικών ομάδων, προκειμένου να βελτιωθεί γενετικά και να χρησιμοποιηθεί σε εκτεταμένες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μια πιο λεπτομερής ανάλυση των πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3, των λεγόμενων και «μικρών πλασμιδίων» του *Z. mobilis* ATCC10988, εστιάζοντας στην εύρεση της πρωτοδιάταξης του pZMO2 και στη συνέχεια, στον προσδιορισμό των λειτουργικών ιδιοτήτων αυτού. Επίσης αποδείχθηκαν οι συζευκτικές ιδιότητες του pZMO3.

Η εύρεση της πρωτοταγούς δομής του pZMO2 ανέδειξε την ύπαρξη ενός ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη αντιγραφής (Rep), αφού σύγκριση της αμινοξικής της αλληλουχίας με βάσεις δεδομένων έδειξε να υπάρχει σημαντική ομοιότητα με πρωτεΐνες αντιγραφής πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου και που ανήκουν στην οικογένεια pC194/pUB110-τύπου. Η ανίχνευση μονόκλωνου DNA, ύστερα από υβριδισμό κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες, ήταν μια επιπλέον απόδειξη ότι το pZMO2 αντιγράφεται με τον παραπάνω μηχανισμό. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι περιοχές που συμβάλουν στην αντιγραφή αυτού του τύπου (SSO και DSO) καθώς και η περιοχή λήξης της μεταγραφής.

Σε ότι αφορά τις ικανότητες κινητοποίησης των τριών αυτών πλασμιδίων, βρέθηκε για πρώτη φορά ότι το pZMO3 περιέχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί για μια πιθανή πρωτεΐνη κινητοποίησης (Mob), M.B. 66 kDa, καθιστώντας το εν λόγω πλασμίδιο κινητοποιήσιμο. Η πρωτεΐνη αυτή διατηρεί το 3H motif (HxDExxPHxh) στο N-τελικό άκρο της, το οποίο είναι συντηρημένο στις αντίστοιχες πρωτεΐνες της οικογένειας πλασμιδίων pMV158-τύπου όπως επίσης και τα σημαντικά για τη δράση της αμινοξέα Asp (D125) και Glu (E126). Αλλά και η περιοχή *oriT*, που βρίσκεται ανοδικά της Mob πρωτεΐνης, παρουσιάζει ομοιότητα στη διαμόρφωσή της με τις αντίστοιχες περιοχές των πλασμιδίων της παραπάνω οικογένειας. Οι περιοχές αυτές κινητοποίησης του pZMO3 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή πλασμιδιακών φορέων πολλαπλών χρήσεων για το *Z. mobilis*. Στα pZMO1 και pZMO2 αντίθετα δε βρέθηκαν παρόμοιες περιοχές.

Τα ευρήματα των πλασμιδίων αυτών, που φέρουν περιοχές υπεύθυνες για την αντιγραφή τους, όπως και ο εντοπισμός συζευκτικών ιδιοτήτων, τροποποιούν σημαντικά τις υπάρχουσες αντιλήψεις πάνω στα πλασμιδιακά πρότυπα του βακτηρίου και προσφέρουν νέο υλικό προς μελλοντική μελέτη.

## SUMMARY

The Gram<sup>-</sup>, ethanol-producer *Zymomonas mobilis* has attracted the interest of several research groups during recent decades for genetical improvement, in order to be used in extensive biotechnological applications.

In this work was achieved a more detailed analysis of three native plasmids pZMO1, pZMO2 and pZMO3, the so-called “small plasmids” of *Zymomonas mobilis* ATCC10988, focusing on finding the sequence of pZMO2 and identifying its functional properties. Also the results described here provide evidence that pZMO3 contains mobilization sequences.

Finding the complete nucleotide sequence of pZMO2 revealed the existence of an open reading frame (ORF) encoding a replication protein (Rep) which is shown significant homology with replicases of RCR plasmids and in specific those of the pC194/pUB110 family. The detection of single-stranded DNA, after hybridization under non-denaturing conditions, was further proof that pZMO2 uses the above mechanism for its replication. Also identified the sequences responsible for this type of replication (SSO and DSO).

Finally, mobilization ability was revealed for one of the three *Z. mobilis* plasmids tested. Mobilization is possibly conferred by an open reading frame of pZMO3 that codes for a predicted 66-kDa protein molecule – a putative mobilization protein. This protein maintains the 3H motif (HxDExxPHxh) at the N-terminus, which is conserved in Mob proteins belonging to the plasmid family pMV158 as well as the important amino acids Asp (D125) και Glu (E126). The origin of transfer (*oriT*), located upstream of the Mob protein, shows similar conformation with corresponding plasmid origins belonging to the above family. Mobilization sequence of pZMO3 can be exploited for versatile applications in vector engineering of this organism. Furthermore, the *E. coli* conjugation system described here may prove useful for detecting broad host range mobilization ability of new plasmid vectors.

The findings of these plasmids which were found to share a little or no homology each other, modify considerably the current beliefs on the content and the role of the *Z. mobilis* small plasmids and offer a new directions of research.

# ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

### 1.1 Τι είναι τα πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA, μη χρωμοσωμικά, και έχουν την ικανότητα να αντιγράφονται αυτόνομα στα κύτταρα-ξενιστές τους. Πλασμίδια έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικά κύτταρα, όπως το 2μm πυρηνικό πλασμίδιο των ζυμών ή τα μιτοχονδριακά πλασμίδια νηματοειδών μυκήτων (Rush & Misra 1985; Som *et al.*, 1988), ωστόσο, η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των μορίων συναντάται σε βακτηριακά κύτταρα. Μπορούν να υπάρχουν σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα και συχνά να μεταναστεύουν από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο, ακόμα και μεταξύ κυττάρων διαφορετικών ειδών. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από λίγα ζεύγη βάσεων (bp) έως μερικές εκατοντάδες δεκάδες χιλιάδες ζεύγη βάσεων (kb). Αυτό σημαίνει ότι στο *E. coli* μπορεί να έχουν το 0,04% έως 8% του μεγέθους του χρωμοσώματός του. Σε μερικά είδη, μάλιστα, του γένους *Rhizobium*, έχουν βρεθεί πλασμίδια που μοιάζουν με μικρά χρωμοσώματα (mini-chromosomes) και που κωδικοποιούν για εκατοντάδες γονίδια. Το μέγεθος είναι η κυριότερη παράμετρος που κανονίζει τον αριθμό αντιγράφων των πλασμιδίων. Τα μεγάλα πλασμίδια συναντώνται σε λίγα αντίγραφα μέσα στο κύτταρο (1-2) ενώ, τα μικρά έχουν συχνά μεγάλο αριθμό αντιγράφων (μερικές φορές πάνω από 100).

Τα περισσότερα από τα μόρια του πλασμιδιακού DNA των βακτηρίων είναι σε μορφή CCC (covalently-closed circle), που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν εγκοπές σε καμία από τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες τους. Τα πλασμίδια αυτά είναι υπερσπειρωμένα (supercoiled) και φέρουν υπερελικωμένες συστροφές. Όταν μία από τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες ενός κλειστού πλασμιδίου (covalently closed circular, ccc)



κοπεί, σχηματίζεται ένας ανοικτός κύκλος (open-circle, oc). Αν το ccc μόριο ήταν προηγουμένως υπερσπειρωμένο, οι υπερελικωμένες συστροφές χάνονται, το μόριο εκτυλίσσεται και γίνεται χαλαρό. Τέλος υπάρχει και η περίπτωση που κόβονται και οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Τότε σχηματίζεται ένα γραμμικό μόριο. Οι δύο εγκοπές μπορεί να είναι ακριβώς η μία απέναντι στην άλλη ή τουλάχιστον πολύ κοντά, έτσι ώστε, οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις, να μην έχουν την ισχύ να συγκρατήσουν τις δύο αλυσίδες ενωμένες.

Τα πλασμίδια φέρουν περιοχές υπεύθυνες για τη σταθερή κληρονόμηση και διατήρησή τους στο κύτταρο-ξενιστή καθώς και ειδικά γονίδια που είναι απαραίτητα μόνο κάτω από ορισμένες καταστάσεις, βάσει των οποίων είναι δυνατόν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες. Πολλά, αλλά πάντως όχι όλα, μπορούν να μεταφέρονται σε άλλα βακτήρια με το μηχανισμό της βακτηριακής σύζευξης (θα συζητηθεί παρακάτω). Συνήθως αυτό συμβαίνει μεταξύ βακτηρίων του ίδιου γένους αν και υπάρχουν πλασμίδια, τα λεγόμενα ετερόκλητα (promiscuous), που μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων τα γένη των οποίων δεν έχουν καμία σχέση μεταξύ τους.

## 1.2 Είδη πλασμιδίων

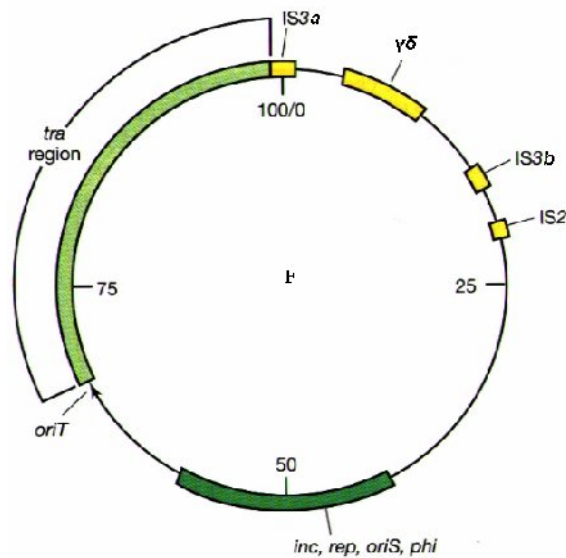
### 1.2.1 Μεταβιβάσιμα πλασμίδια


Τα μεταβιβάσιμα πλασμίδια είναι σε θέση να μεταβιβάζονται από έναν ξενιστή (δότη) σε έναν άλλο (δέκτη) με το φαινόμενο της βακτηριακής σύζευξης.

#### *Το πλασμίδιο F ή πλασμίδια τύπου F (F-like)*

Καλείται και παράγων F (παράγων γονιμότητας). Το μέγεθός του είναι περίπου 100 kb (Willettts & Skurray, 1987), δηλ. 2% του μεγέθους του χρωμοσώματος του *E. coli*. Το F πλασμίδιο έχει δύο χαρακτηριστικές όσο και μη συνηθισμένες ιδιότητες: (α) είναι αυτομεταβιβάσιμο και (β) μπορεί να είναι το ενδιάμεσο για την μεταφορά χρωμοσωμικού DNA σε κύτταρα δέκτες.

Περίπου το ένα τρίτο του μεγέθους του (που αποτελεί την *tra* περιοχή) είναι αφιερωμένο στη μεταφορά του σε κύτταρα δέκτες (Frost *et al.*, 1994). Σε ότι αφορά το υπόλοιπο κομμάτι του, είναι όμως γνωστή η ύπαρξη τεσσάρων αλληλουχιών εισδοχής (IS2, IS3a, IS3b, και γδ) που βρίσκονται μέσα στο κομμάτι αυτό, και οι οποίες εμπλέκονται στη μεταφορά βακτηριακού χρωμοσωμικού γονιδιώματος.



**Σ γ ή μ α 1.** Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου F. Οι αριθμοί δείχνουν το μέγεθος (σε kb) ενώ απεικονίζονται και οι σημαντικότερες λειτουργίες του. *tra*: περιοχή λειτουργιών μεταφοράς, *oriT*: περιοχή έναρξης της μεταφοράς, *oriS*: περιοχή έναρξης της αντιγραφής, *inc*: περιοχή ασυμβατότητας, *rep*: λειτουργίες αντιγραφής. Οι  περιοχές αντιπροσωπεύουν τα μεταθετά στοιχεία.

Το F πλασμίδιο αντιγράφεται με τέτοιο ρυθμό ώστε να υπάρχουν 1-2 αντίγραφα για κάθε βακτηριακό χρωμόσωμα. Έτσι κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις  $F^+$  κυττάρων προκύπτουν και κύτταρα  $F^-$ , δηλ. κύτταρα που έχουν χάσει το πλασμίδιο F.

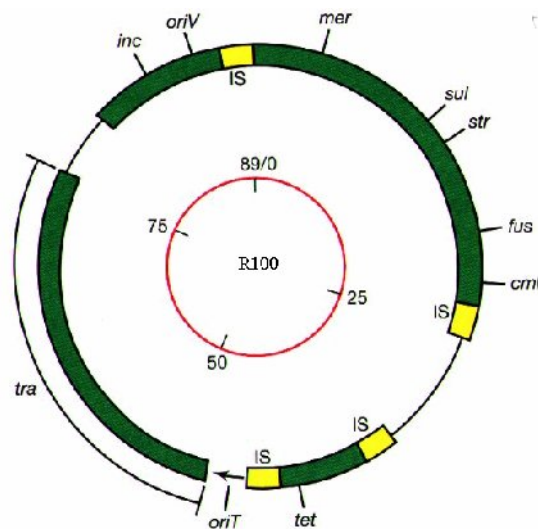
Τα πλασμίδια τύπου F (F-like) είναι αυτά των οποίων οι *tra* περιοχές παρουσιάζουν ομολογία με τα γονίδια του F πλασμιδίου που είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του σε άλλα κύτταρα δέκτες. Τέτοια πλασμίδια είναι τα R100, R1, R6-5, ColB2 (Wang *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Πλασμίδια αντοχής σε αντιβιοτικά ή μέταλλα (πλασμίδια R)

Αποτελούν την πιο διαδεδομένη και πιο μελετημένη ομάδα πλασμιδίων. Ανακαλύφθηκαν στην Ιαπωνία το 1955 κατά τη διάρκεια μίας επιδημίας βακτηριακής δυσεντερίας. Ένα

στέλεχος *Shigella dysenteriae*, παρουσίασε ανθεκτικότητα ταυτόχρονα σε τέσσερα αντιβιοτικά. Τέτοια πολλαπλή ανθεκτικότητα δεν είναι εύκολο να αποκτηθεί στο εργαστήριο με μεταλλαξιγένεση σε ευαίσθητα στελέχη (Foster, 1983).

Τα πλασμίδια R προσδίδουν στο κύτταρο-ξενιστή αντοχή σε αντιβιοτικά ή σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορεί να είναι ιόντα βαρέων μετάλλων π.χ. υδραργύρου (II), διάφορα ανιόντα π.χ. αρσενικά, χρωμικά και η U.V. ακτινοβολία. Ένα παράδειγμα πλασμιδίου R είναι το πλασμίδιο R100.



**Σ γ ή μ α 2.** Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου ανθεκτικότητας R100. Ο εσωτερικός κύκλος δείχνει το μέγεθος (σε kb) του πλασμιδίου. Ο εξωτερικός κύκλος δείχνει τις θέσεις των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά καθώς και άλλων σημαντικών λειτουργιών. *inc*: γονίδια ασυμβατότητας, *oriV*: περιοχή έναρξης της αντιγραφής, *oriT*: περιοχή έναρξης της μεταφοράς, *mer*: ανθεκτικότητα σε ιόντα υδραργύρου, *sul*: ανθεκτικότητα σε σουλφοναμίδες, *tra*: περιοχή λειτουργιών μεταφοράς. Τέλος οι περιοχές  αντιπροσωπεύουν τις ένθετες ακολουθίες (IS).

Διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά έχουν βρεθεί, ότι κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια R, ο πιο κοινός από τους οποίους είναι η σύνθεση ενζύμων που καταστρέφουν τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Άλλος μηχανισμός είναι η μεταβολή της δομής της κυτταρικής μεμβράνης από πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από πλασμίδια R, με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να μην μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Τέλος πλασμίδια R μπορούν να κωδικοποιούν για προϊόντα που τροποποιούν τον στόχο των αντιβιοτικών, καθιστώντας αυτά (και κατ' επέκταση τα κύτταρα) ανθεκτικά στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

### 1.2.3 Μεταβολικά πλασμίδια

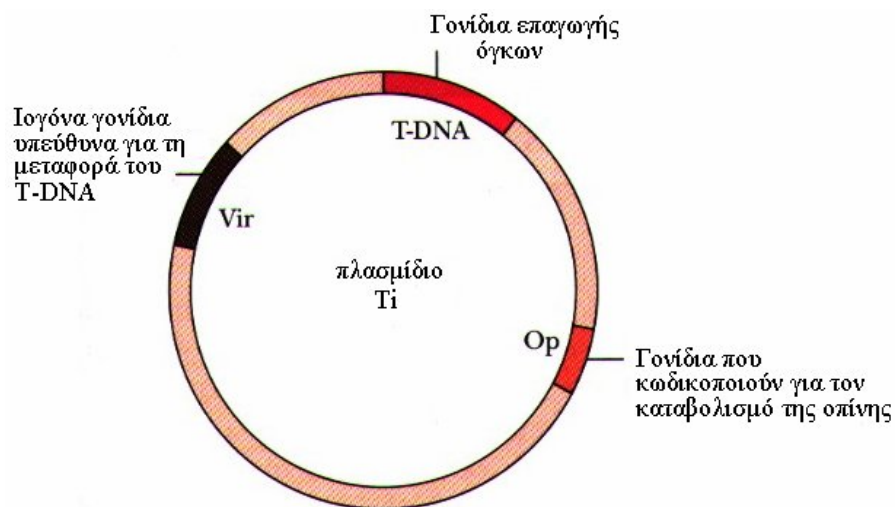
Τα μεταβολικά πλασμίδια προσδίδουν στα βακτήρια-ξενιστές τους την ικανότητα να μεταβολίζουν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, όπως σαλικυλικό και νικοτινικό οξύ, ναφθαλένιο, καμφορά, τολουένιο, ξυλένιο ή καύσιμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε οκτάνια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα βακτήρια αυτά να χρησιμοποιούν τέτοιες ενώσεις σαν πηγή άνθρακα και πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Πολλές φορές μάλιστα έχουν χρησιμοποιηθεί τέτοιου είδους πλασμίδια για να καθαριστούν οργανικά απόβλητα ή/και αποτοξινωθεί το έδαφος από ζιζανιοκτόνα [2,4-D (2,4-διχλωροφαινοξοξικό οξύ)], χλωριωμένους υδρογονάνθρακες και απορρυπαντικά. Παράδειγμα μεταβολικού πλασμιδίου είναι το NAH7 του βακτηρίου *Pseudomonas putida*, ο χάρτης του οποίου φαίνεται στο **Σχήμα 3**. Το πλασμίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια σειρά ενζύμων που καταβολίζουν ναφθαλένιο προς πυροσταφυλικό και ακεταλδεΐδη (Yen & Serdar, 1988).



**Σχήμα 3.** Γενετικός χάρτης του μεταβολικού πλασμιδίου NAH7 του βακτηρίου *Pseudomonas putida*. Το οπερόνιο *nah1* κωδικοποιεί για τα ένζυμα A – F (υπεύθυνα για την οξείδωση του ναφθαλενίου σε σαλικυλικό), ενώ η οξείδωση του σαλικυλικού σε πυροσταφυλικό και ακεταλδεΐδη καταλύεται από τα ένζυμα G – L που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *nah2*.

### 1.2.4 Τοξικά πλασμίδια

Τα πλασμίδια της κατηγορίας αυτής περιέχουν γονίδια υπεύθυνα για το σχηματισμό τοξικών ουσιών που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες, αντίθετα από τα αντιβιοτικά (που έχουν μεγάλο εύρος δραστηριότητας), είναι πρωτεΐνες που δρουν εναντίον άλλων βακτηρίων, πολύ συγγενικών προς το στέλεχος που τις παράγει, με μηχανισμούς που προκαλούν βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης ή αποδόμηση των ριβοσωμάτων. Το όνομα κάθε βακτηριοσίνης εξαρτάται από το γένος των βακτηρίων που τις παράγουν. Όταν π.χ. προέρχονται από το *E. coli* ή άλλα συγγενή εντεροβακτήρια ονομάζονται κολισίνες, κωδικοποιούνται από πλασμίδια Col (κολισινογενή πλασμίδια) και είναι μικροβιοκτόνες για πολλά εντεροβακτήρια. Περίπου το 40% των στελεχών *E. coli* του ανθρώπου παράγουν κολισίνες (Col<sup>+</sup>). Τα κολισινογενή πλασμίδια, μεταφέρουν επίσης πληροφορίες υπεύθυνες για την ανοσοποίηση του κυττάρου-ξενιστή καθώς και για βακτηριακή σύζευξη μέσω της οποίας περνούν σε άλλα κύτταρα «ανταγωνιστές» και τα θανατώνουν.



**Σχήμα 4.** Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου Ti.

Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί το πλασμίδιο Ti (**Σχήμα 4**) που απαντάται στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* και το οποίο μεταφέρεται στα κύτταρα των φυτών και προκαλεί το σχηματισμό καρκινικών όγκων.

**Πίνακας 1. Κυτταρικές λειτουργίες που κωδικοποιούνται από πλασμίδια**

<b>Είδος πλασμιδίου</b>	<b>Λειτουργία</b>	<b>Παράδειγμα</b>
Φυλετικά πλασμίδια	Μεταφορά DNA από κύτταρο σε κύτταρο με βακτηριακή σύζευξη	F πλασμίδια
Πλασμίδια ανθεκτικότητας	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά Ανθεκτικότητα σε κάδμιο ή υδράργυρο Ανθεκτικότητα σε υπεριώδη ακτινοβολία	R πλασμίδια, RP4, R1 R100 R46
Col πλασμίδια	Παραγωγή βακτηριοσινών	ColE1, ColE2
Μεταβολικά πλασμίδια	Χρησιμοποίηση της καμφοράς Χρησιμοποίηση του τολουόλιου	CAM TOL
Πλασμίδια μετασχηματισμού	Σχηματισμός όγκων στα φυτά	Πλασμίδιο Ti

## **2. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA**

Τα πλασμίδια αντιγράφονται εξ' ορισμού αυτόνομα μέσα στο κύτταρο-ξενιστή τους. Οι περιοχές του πλασμιδίου που είναι αναγκαίες για την αντιγραφή και τον έλεγχο αυτής, συνιστούν τις βασικές μονάδες αντιγραφής (replicons) του πλασμιδίου. Τα replicons αποτελούνται από την περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*ori*), περιοχές πλούσιες σε A+T, περιοχές πλούσιες σε C+G, επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδιακές αλληλουχίες, γονίδια “*cop*” και “*inc*” που εμπλέκονται στον έλεγχο της έναρξης της αντιγραφής, και, στις περισσότερες περιπτώσεις, γονίδια “*rep*” που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του πλασμιδίου. Βέβαια υπάρχουν και πλασμίδια που η αντιγραφή τους εξαρτάται από ένα εύρος πρωτεϊνών αντιγραφής που κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα του ξενιστή (όπως το ColE1).

Είναι γνωστό ότι στην αντιγραφή διπλής αλυσίδας DNA γενικότερα, άρα και του πλασμιδίου, εμπλέκεται μια DNA πολυμεράση, που συχνά λειτουργεί σαν μέρος της διχάλας αντιγραφής που διατρέχει την αλυσίδα του DNA, και που οδηγεί σε θυγατρικά μόρια με το ημι-συντηρητικό μοντέλο αντιγραφής (κάθε μόριο έχει μια καθυστερούσα και μια προπορευόμενη αλυσίδα). Ο κύκλος αντιγραφής του πλασμιδίου περιλαμβάνει τρία

στάδια: την έναρξη, την επιμήκυνση της πολυνουκλεοτιδιακής αλυσίδας και τον τερματισμό.

Το πιο σημαντικό στάδιο φαίνεται να είναι η έναρξη της αντιγραφής η οποία συμβαίνει σε μια εξειδικευμένη περιοχή (*ori*) και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία διχάλας αντιγραφής.

Η αντιγραφή του DNA συγχρονίζεται κατά κάποιο τρόπο με τη διαίρεση του κυττάρου, έτσι ώστε τα θυγατρικά κύτταρα τελικά να έχουν το ίδιο ποσό DNA με τα πατρικά τους. Όσον αφορά τα πλασμίδια χαμηλού αριθμού αντιγράφων, η κατάσταση είναι όμοια με αυτή του χρωμοσώματος. Πράγματι είναι πιθανό η αντιγραφή αυτών των πλασμιδίων, να είναι κάτω από τον έλεγχο των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή του χρωμοσωμικού DNA. Αντίθετα για τα πλασμίδια υψηλού αριθμού αντιγράφων δεν είναι απαραίτητη η παρουσία πρωτεΐνης του χρωμοσώματος του κυττάρου-ξενιστή.

## 2.1 Τρόποι αντιγραφής DNA

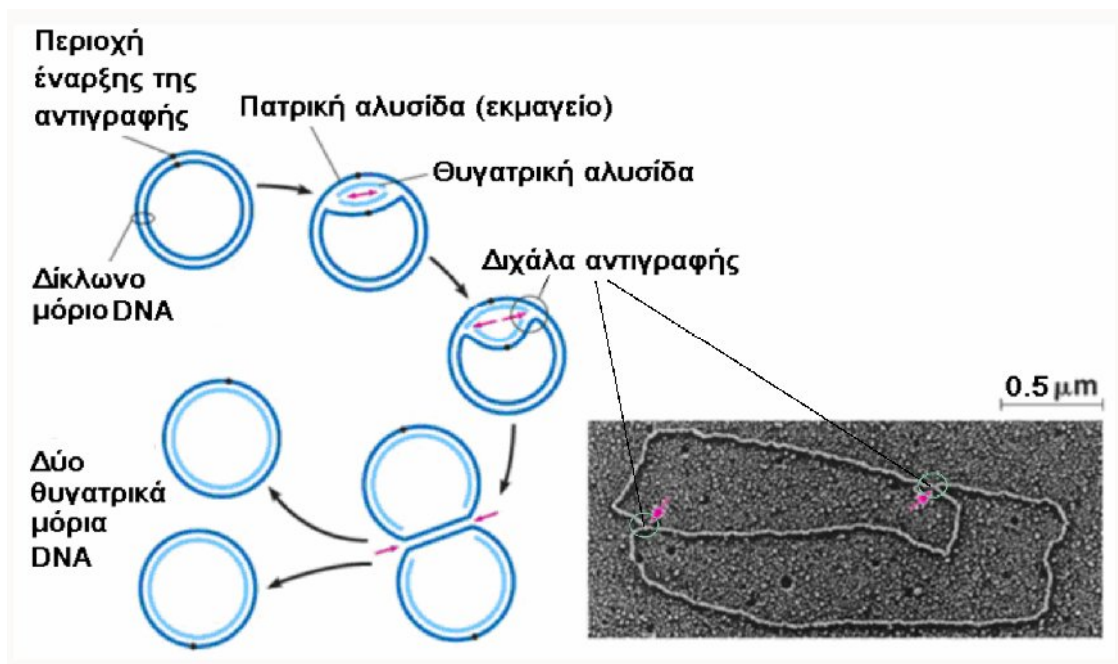
Για την αντιγραφή των πλασμιδίων έχουν αναφερθεί **τρεις** κύριοι μηχανισμοί (del Solar *et al.*, 1998):

- α) **θ – τύπου** (TR – Theta Replication)
- β) **σ – τύπου** (RCR – Rolling Circle Replication) και
- γ) με εκτόπιση αλυσίδας (Strand Displacement)

### 2.1.1 Αντιγραφή θ - τύπου

Η αντιγραφή θ-τύπου (**Σχήμα 5**) η οποία χρησιμοποιείται από τα περισσότερα γνωστά πλασμίδια των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, αλλά και από το χρωμόσωμα των βακτηρίων, χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι, η σύνθεση του DNA μπορεί να αρχίσει σε μία ή περισσότερες περιοχές του πλασμιδίου και είναι συνεχής για την προπορευόμενη (leading) αλυσίδα ενώ είναι μη-συνεχής για την καθυστερούσα (lagging) (Kües & Stahl, 1989). Για την έναρξη της αντιγραφής απαιτείται (i) μια πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής (Rep) κωδικοποιούμενη από το ίδιο το πλασμίδιο, (ii) μια ή περισσότερες θέσεις πρόσβασης της

πρωτεΐνης αυτής (*dnaA* boxes) και (iii) μια περιοχή πλούσια σε A+T που περιέχει ευθέως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, όπου ανοίγει η διπλή αλυσίδα. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η παρουσία τέτοιων επαναλήψεων δεν είναι αποκλειστικό γνώρισμα των πλασμιδίων που αντιγράφονται με  $\theta$  μορφή, καθώς τέτοιες περιοχές έχουν αναφερθεί τόσο σε πλασμίδια που αντιγράφονται με μηχανισμό RCR, όσο και σε πλασμίδια που αντιγράφονται χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό εκτόπισης αλυσίδας (Lin *et al.*, 1987; Scholz *et al.*, 1989; Lacks *et al.*, 1989).



**Σχήμα 5.** Μοντέλο αντιγραφής  $\theta$  μορφής κατά Viret *et al.* (1991).

Οι πατρική αλυσίδα του DNA παρουσιάζεται με μπλε γραμμή. Με θαλασσί γραμμή παρουσιάζεται η θυγατρική αλυσίδα.

Η επιμήκυνση της αλυσίδας μπορεί να γίνεται είτε προς μια κατεύθυνση (unidirectionally [π.χ. R1, ColE1]), με τη διχάλα αντιγραφής να κινείται κατά μήκος του DNA προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση ( $3' \rightarrow 5'$  για την προπορευόμενη αλυσίδα) μέχρι να ξανασυναντήσει την αρχή αντιγραφής, είτε και προς τις δύο κατευθύνσεις (bidirectionally [π.χ. F]), που σημαίνει ότι (i) σχηματίζονται δύο διχάλες κινούμενες προς αντίθετες κατευθύνσεις πάνω στην αλυσίδα του DNA, έτσι ώστε η μια να συναντά την άλλη πιθανώς σε θέση  $180^\circ$  από την αρχή αντιγραφής ή (ii) η διχάλα αντιγραφής κινείται από την αρχή προς τη θέση τερματισμού της αντιγραφής, τη στιγμή που κάποια άλλη



διχάλα αντιγραφής, κινείται από την ίδια αρχή αντιγραφής αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση, έτσι ώστε να προσεγγίσει τη θέση τερματισμού από την άλλη πλευρά του κύκλου του πλασμιδίου. Εξάλλου υπάρχει περίπτωση να υπάρχουν περισσότερες από μια αρχές αντιγραφής πάνω στο ίδιο πλασμίδιο (π.χ. R6K).

Ο τερματισμός της αντιγραφής λαμβάνει χώρα με το χωρισμό των δυο θυγατρικών μορίων και τον σχηματισμό της υπερσπειρωμένης δομής τους. Το άνοιγμα στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες κάθε μορίου κλείνει με τη δράση της DNA λιγάσης. Τα μόρια παραμένουν για λίγο χαλαροί κύκλοι, αλλά σύντομα αποκτούν την υπερσπειρωμένη δομή με τη δράση της DNA γυράσης.

Σε όλη αυτή την πορεία, εκτός βέβαια του βήματος της ανάλυσης, οι δυο αλυσίδες DNA παραμένουν ομοιοπολικά συνδεδεμένες.

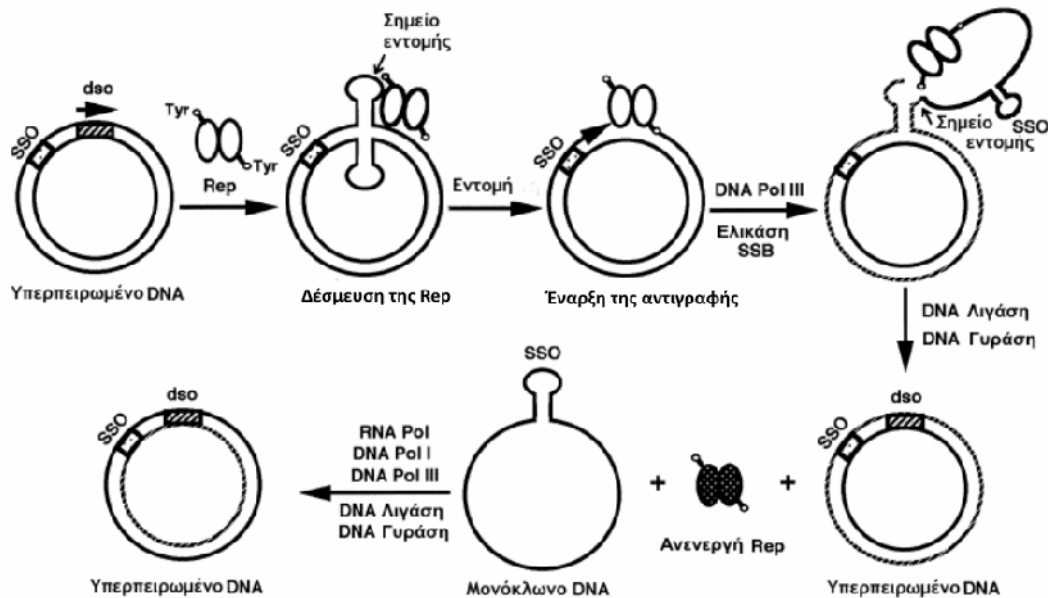
### 2.1.2 Αντιγραφή $\sigma$ - τύπου

Η σίγμα μορφή αντιγραφής (**Σχήμα 6**), μελετήθηκε κατ' αρχήν στους μονόκλωνους φάγους των εντεροβακτηρίων καθώς και για μια σειρά μικρών κυρίως πλασμιδίων των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων (Khan, 1997; 2000). Σύμφωνα μ' αυτή, η πριμοδότηση για τη σύνθεση της προπορευόμενης και της καθυστερούσας αλυσίδας συμβαίνει σε δυο διαφορετικές περιοχές. Παρ' όλα αυτά έχουν αναφερθεί πλασμίδια Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, Κυανοβακτηρίων και Αρχαίων που χρησιμοποιούν τον RCR μηχανισμό για την αντιγραφή τους (Kleanthous *et al.*, 1991; Yasukawa *et al.*, 1991; Erauso *et al.*, 1996). Τα πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου έχουν συνήθως μικρό μέγεθος (<10 kb) και βρίσκονται σε περισσότερα του ενός αντιγράφου μέσα στο κύτταρο. Όλα τα πλασμίδια αυτά περιέχουν τουλάχιστον τρία στοιχεία:

- i) Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής (Rep).
- ii) Την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της προπορευόμενης αλυσίδας (DSO-double stranded origin)
- iii) Την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της καθυστερούσας αλυσίδας (SSO – single stranded origin)

Αντίθετα από τη  $\theta$  μορφή, η αντιγραφή  $\sigma$  μορφής χαρακτηρίζεται από ένα μηχανισμό κατά τον οποίο, η έναρξη της εξαρτάται από μια εγκοπή σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία

βάσεων (DSO-double strand origin) στη μια από τις δύο αλυσίδες του DNA. Η εντομή αυτή προκαλείται από μια νουκλεάση (την πρωτεΐνη Rep) που κωδικοποιείται από το ίδιο το πλασμίδιο.



**Σ γ ή μ α 6.** Μοντέλο αντιγραφής πλασμιδίου με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (RCR-Rolling Circle Replication) ή **σ-τύπου** (Khan, 2005). Η πρωτεΐνη Rep εμφανίζεται σαν διμερές (περίπτωση ομάδας πλασμιδίων pT181), σε περιπτώσεις όμως άλλων ομάδων πλασμιδίων οι πρωτεΐνες Rep μπορεί να δρουν σαν μονομερή ή και ολιγομερή.

Το ελεύθερο 3'-OH τελικό άκρο που δημιουργείται, χρησιμεύει ως υποκινητής για τον πολυμερισμό της προπορευόμενης αλυσίδας του DNA, όπου εμπλέκονται τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες αντιγραφής του ξενιστή: η DNA πολυμεράση III για να επιμηκύνει το 3'-OH άκρο, μία ελικάση για να ξεδιπλώνει το DNA και η SSB (SS DNA Binding Protein) η οποία βοηθά στην αποφυγή πυρηνόφιλων προσβολών στο μονόκλωνο DNA που παράγεται. Η επιμήκυνση από το 3'-OH, που συνοδεύεται από τον εκτοπισμό της πατρικής προπορευόμενης αλυσίδας, συνεχίζεται μέχρις ότου φτάσει στην ανασυγκροτημένη DSO. Παράγονται έτσι δύο κυκλικά μόρια DNA ένα **δίκλωνο (ds DNA)**, που αποτελείται από την πατρική καθυστερούσα αλυσίδα εκμαγείο και την νεοσυντιθέμενη, και το οποίο υπερελικώνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών του ξενιστή, και ένα **μονόκλωνο (ss DNA)** ενδιάμεσο που αντιστοιχεί στην προπορευόμενη πατρική αλυσίδα. Η πρωτεΐνη Rep, η οποία παραμένει δεσμευμένη στο 5' τελικό άκρο της εκτοπιζόμενης αλυσίδας, ενεργοποιεί

πάλι τη νουκλεολυτική της δράση και καταλύει το διαχωρισμό των μορίων ds και ss καθώς και την επανασύνδεση των άκρων του μονόκλωνου μορίου ώστε να σχηματιστεί κύκλος. Τέτοια ενδιάμεσα μόρια είναι ανιχνεύσιμα πειραματικά, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχουν ελεύθερα μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τέλος το μονόκλωνο μόριο μετατρέπεται σε δίκλωνο με τη δράση πάλι πρωτεϊνών του ξενιστή με εκκίνηση από το σημείο SSO (single strand origin).

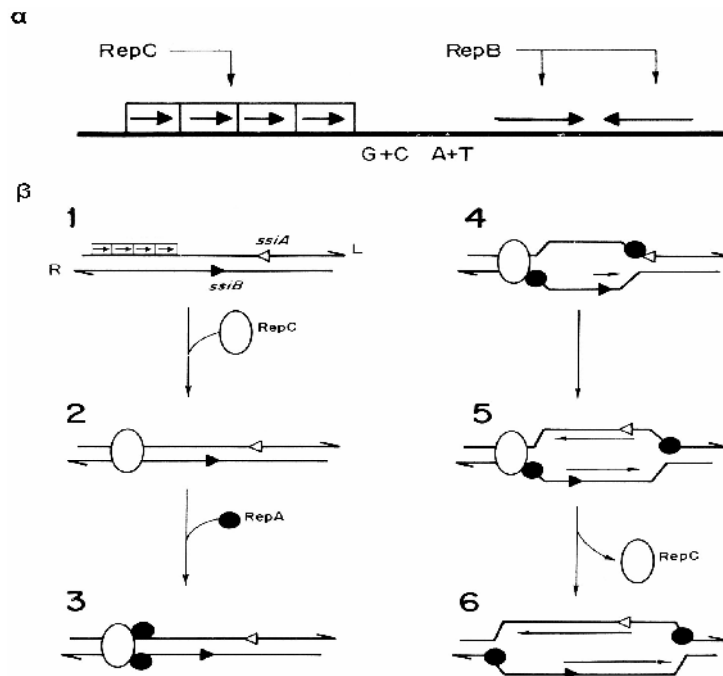
Η κατανόηση των μηχανισμών αντιγραφής των πλασμιδίων είναι πολύ σημαντική για τη χρήση τους στη γενετική μηχανική. Χάρη στις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA, έγιναν δυνατές οι έρευνες γύρω από την αντιγραφή των πλασμιδίων. Για πολλά γνωστά πλασμίδια οι έρευνες οδήγησαν αρκετά νωρίς στην ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό των περιοχών που είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή και τον έλεγχό της.

### **2.1.3 Αντιγραφή με μηχανισμό εκτόπισης αλυσίδας**

Αντιγραφή που ξεκινά από δύο σημεία του πλασμιδίου, με ταυτόχρονη εκτόπιση μιας κλειστής, κυκλικής αλυσίδας ssDNA. Η τελευταία αντιγράφεται από το άλλο σημείο έναρξης αμέσως μετά.

Τα καλύτερα παραδείγματα πλασμιδίων που αντιγράφονται με τον μηχανισμό εκτόπισης αλυσίδας είναι αυτά που ανήκουν στην ομάδα ασυμβατότητας IncQ (με αντιπροσωπευτικότερο μέλος το RSF1010), τα οποία μπορούν να αντιγράφονται σε πολλούς διαφορετικούς ξενιστές. Η αντιγραφή ξεκινά από δύο συμμετρικές και παρακείμενες μονόκλωνες περιοχές (*ssiA* και *ssiB*) που σχηματίζουν δομή φουρκέτας και οι οποίες βρίσκονται από μία σε κάθε αλυσίδα του DNA (η *ssiA* στην πάνω αλυσίδα και η *ssiB* στην κάτω αλυσίδα, **Σχήμα 7**). Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της αντιγραφής είναι οι παραπάνω περιοχές να εκτεθούν σαν μονόκλωνες. Η τήξη αυτή του DNA εξαρτάται από δύο πλασμιδιακές πρωτεΐνες αντιγραφής, την RepC και την RepA και διευκολύνεται από μια περιοχή πλούσια σε A+T που προηγείται των περιοχών *ssiA* και *ssiB*. Η RepC αναγνωρίζει ευθέως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (directly repeated sequences) παρακείμενα στην πλούσια σε A+T περιοχή (initiator activity) και η RepA είναι μια DNA ελικάση (Sakai & Komano, 1996). Η πριμοδότηση της σύνθεσης του DNA στις περιοχές αυτές καταλύεται από την RepB (πλασμιδιακή πριμοδοτάση). Η σύνθεση της κάθε

μιας αλυσίδας συμβαίνει συνεχώς και έχει ως αποτέλεσμα τον εκτοπισμό της συμπληρωματικής αλυσίδας.



**Σχήμα 7.** Αντιγραφή με τον μηχανισμό εκτόπισης αλυσίδας (del Solar *et al.*, 1998).

(α) Περιοχή έναρξης της αντιγραφής όπου απεικονίζονται οι περιοχές αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RepB (  $\rightarrow \leftarrow$  ) και RepC (ευθείως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες) παρακείμενα στην πλούσια σε A+T περιοχή. (β) Μοντέλο έναρξης της αντιγραφής εκτόπισης αλυσίδας. Η αντιγραφή ξεκινά με αντίθετες πολικότητες από δύο περιοχές (*ssxA* και *ssxB*), οι οποίες δρουν ανεξάρτητα. Στο σχήμα φαίνονται και οι αλληλεπιδράσεις των πλασμιδιακών πρωτεϊνών RepC και RepA. Οι λεπτές γραμμές υποδεικνύουν τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, με την κατεύθυνση σύνθεσης όπως αυτή υποδεικνύεται από τα βέλη.

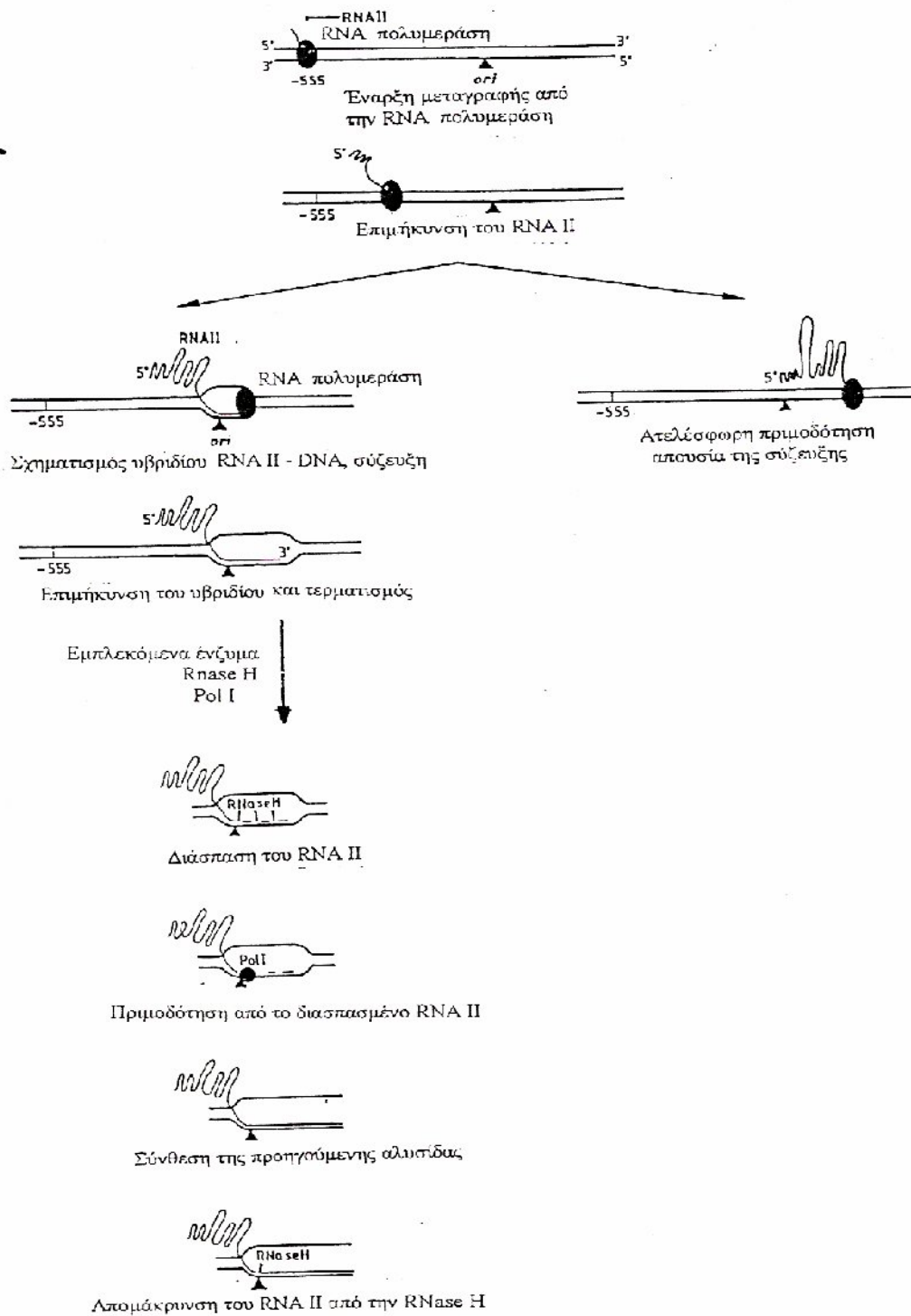
Εξ' αιτίας του τρόπου δράσης των τριών παραπάνω πλασμιδιακών πρωτεϊνών αντιγραφής (RepA, RepB και RepC), η έναρξη της αντιγραφής στα πλασμίδια της ομάδας ασυμβατότητας IncQ δεν εξαρτάται από παράγοντες αντιγραφής του κυττάρου-ξενιστή, που δρουν στα αρχικά στάδια της αντιγραφής (DnaA, DnaB, DnaC και DnaG) (Scherzinger *et al.*, 1984), γεγονός που ίσως εξηγεί και τον χαρακτήρα των πλασμιδίων αυτών να αντιγράφονται σε ευρύ φάσμα ξενιστών.

## 2.2 Παράδειγμα πλασμιδιακής αντιγραφής εξαρτώμενης από πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου-ξενιστή

### ColE1 και πλασμίδια τύπου ColE1

Το ColE1 είναι πλασμίδιο του *E. coli*, με Μ.Β. 6,6 kb και συχνότητα ύπαρξης 20 περίπου αντιγράφων ανά κύτταρο. Η αντιγραφή του ColE1 αρχίζει σε μια περιοχή (*ori*) 0,6 kb και γίνεται προς μια κατεύθυνση ακολουθώντας μηχανισμό  $\theta$  μορφής (Tomizawa *et al.*, 1977).

Για την όλη πορεία, το ColE1 χρησιμοποιεί πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το κύτταρο-ξενιστή και αυτές είναι η DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η ριβονουκλεάση H (Rnase H) και η DNA πολυμεράση I. Στην αντιγραφή του ColE1 συμμετέχουν επίσης η DNA γυράση και η τοποϊσομεράση I (Itoh & Tomizawa, 1978). Μετά τη διάσπαση της μίας αλυσίδας από την DNA γυράση, και τη διαμόρφωση του μορίου έτσι ώστε να χάσει την υπερελικτότητά του με τη δράση της τοποϊσομεράσης I, η RNA πολυμεράση μπορεί να μεταγράψει το πριμοδοτικό μόριο RNA, ξεκινώντας 555 νουκλεοτίδια πριν από την περιοχή *ori* του ColE1 (Bird & Tomizawa, 1987). Το πριμοδοτικό αυτό μόριο RNA που έχει μήκος περίπου 700 νουκλεοτίδια (RNA II), υβριδίζει με το εκμαγείο του DNA στην περιοχή *ori* (Itoh & Tomizawa, 1980). Η διαδικασία αυτή λέγεται σύζευξη (coupling). Σε αυτά τα υβριδοποιημένα μόρια RNA-DNA επιδρά η Rnase H, η οποία κόβει το υβριδοποιημένο πριμοδοτικό RNA προσφέροντας έτσι ένα 3'-OH στην DNA πολυμεράση I που προσθέτει νουκλεοτίδια στο πριμοδοτικό μόριο χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο την αλυσίδα του DNA. Τέλος με δεύτερη δράση της Rnase H απομακρύνεται το πριμοδοτικό RNA από τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA έτσι ώστε να έχουμε ένα θυγατρικό μόριο DNA πανομοιότυπο μ' αυτό από το οποίο προήλθε (Camps, 2010; **Σχήμα 8**). Άλλα πλασμίδια εντεροβακτηρίων, που αντιγράφονται με τον ίδιο μηχανισμό και η περιοχή έναρξης της αντιγραφής τους παρουσιάζει συντηρητικότητα με αυτή το ColE1, είναι το p15A, το pMB1, το RSF1030, το CloDF13 (που κωδικοποιεί για κλοασίνη). Τα πλασμίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια πλασμιδίων τύπου ColE1 (del Solar *et al.*, 1998).



**Σ γ ή μ α 8.** Σχηματική επεξήγηση του μηχανισμού της έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου ColE1 (Kües & Stahl, 1989). Η θέση -555 αντιστοιχεί στην αρχή του μεταγραφήματος του RNA II. Σύμβολα: (▲) σημείο έναρξης αντιγραφής (*ori*), όπου λαμβάνει χώρα η επεξεργασία του RNA II από την πρωτεΐνη RNase H καθώς και η θέση δέσμευσης της Pol I (●), (●) RNA πολυμεράση.

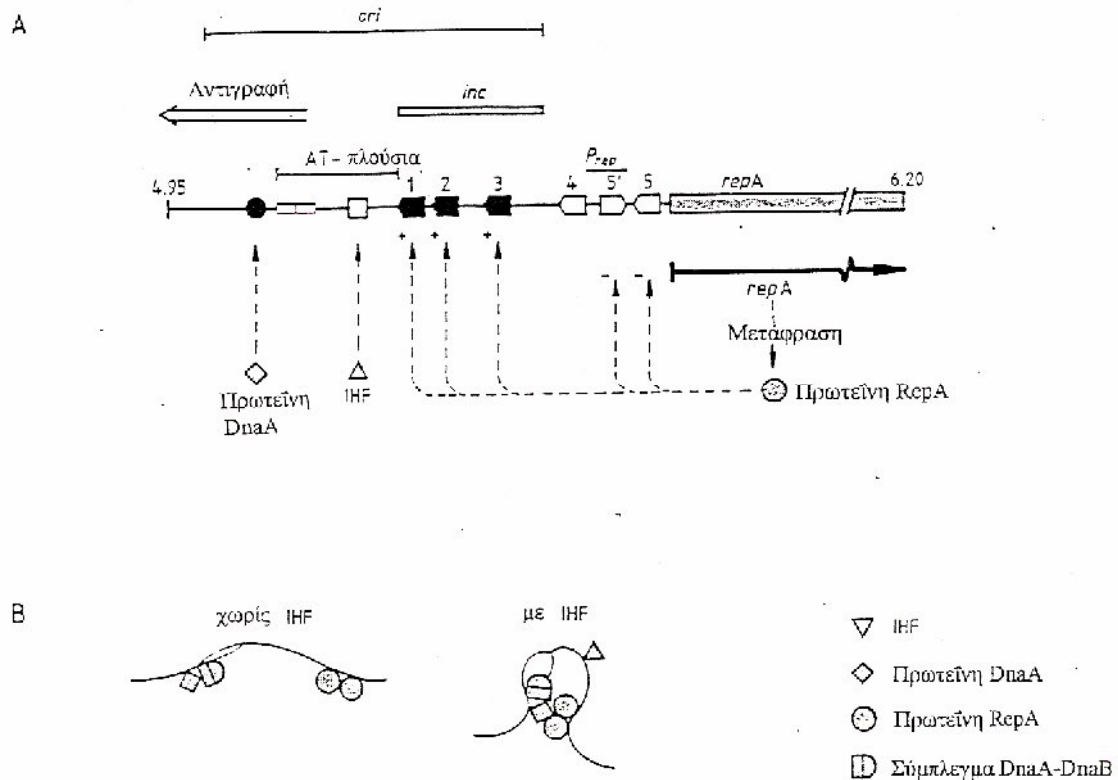
## 2.3 Παραδείγματα πλασμιδιακής αντιγραφής εξαρτώμενης από πρωτεϊνικά μόρια του ίδιου του πλασμιδίου

### pSC101

Το pSC101 είναι πλασμίδιο χαμηλού αριθμού αντιγράφων (5 αντίγραφα ανά χρωμόσωμα), με M.B. 9,26 kb και συναντάται στο εντεροβακτήριο *Salmonella panama*. Η αντιγραφή του γίνεται προς μια κατεύθυνση και η έναρξή της γίνεται στο *replicon*, που αποτελείται από την περιοχή *ori*, μεγέθους 250 bp και από μια περιοχή μεγέθους 1 kb που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής (RepA) μοριακού βάρους 37,5 kDa (Yamaguchi & Yamaguchi, 1984). Η περιοχή *ori* αποτελείται από: (i) μια αλληλουχία 82 νουκλεοτιδίων (84% σε A+T), μέσα στην οποία βρίσκονται δυο 13μερείς νουκλεοτιδιακές επαναλήψεις καθώς και ο παράγοντας ενσωμάτωσης του ξενιστή (Integration Host Factor - IHF), (Rajewska *et al.*, 2012) (ii) τη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης DnaA του κυττάρου ξενιστή και (iii) τρεις 18μερείς νουκλεοτιδιακές επαναλήψεις, ανοδικά της αλληλουχίας πλούσιας σε A+T, που φαίνονται να είναι οι θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης RepA και που μπορεί να αποτελούν τη βάση της ασυμβατότητάς του (**Σχήμα 9**).

Άλλες παρόμοιες αλληλουχίες, αντίθετης όμως κατεύθυνσης, βρέθηκαν αμέσως πριν από το γονίδιο *repA*. Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούν τον υποκινητή (promoter) του γονιδίου *repA* και πιθανά να δουν σαν επιπρόσθετες θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης RepA (Yamaguchi & Masamune, 1985).

Πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής του pSC101 παίζει ο παράγοντας ενσωμάτωσης του ξενιστή (IHF) γιατί είναι αυτός που κάμπει το μόριο του πλασμιδίου στην περιοχή πλούσια σε A+T (Levchenko & Filutowicz, 1996) και φέρνει κοντά τις θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών RepA και DnaA. Έτσι σχηματίζεται ένα μεγαλομοριακό σύμπλοκο από DNA και πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στην αντιγραφή όπως DnaA, RepA και το σύμπλοκο DnaB-DnaC. Το άνοιγμα της διπλής αλυσίδας συμβαίνει στην περιοχή των 13μερών επαναλήψεων, από την DnaB ελικάση. Η πρωτεΐνη RepA είναι αυτή που ρυθμίζει την αντιγραφή του pSC101 με την ενδοκυτταρική της συγκέντρωση, αφού συναγωνίζεται την RNA πολυμεράση για την μεταγραφή του γονιδίου *repA*.



**Σ γ ή μ α 9.** (A) Σχηματική εξήγηση του 1,3 kb βασικού ρεπλικονίου του πλασμίδιου pSC101 (Datta *et al.*, 1999).

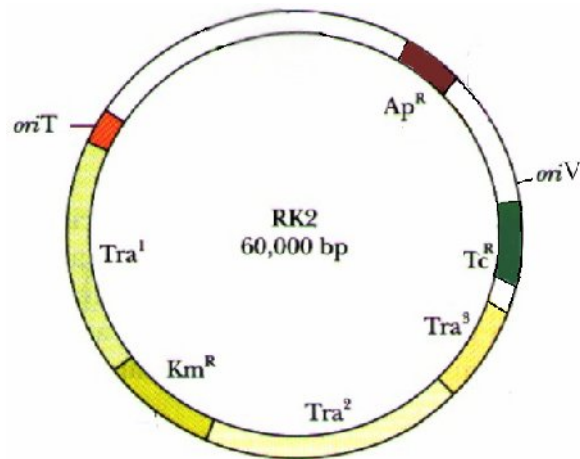
(●) περιοχή δέσμευσης της DnaA, (□) περιοχή δέσμευσης του IHF, (▭) δύο 13-μερείς επαναλήψεις, (▬ :1,2 και 3) τρεις επαναλήψεις ίδιας φοράς, (▭ :4,5' και 5) τρεις επαναλήψεις αντίθετης φοράς, ( $P_{rep}$ ) υποκινητής του γονιδίου *repA* (▭), (←) περιοχή έναρξης της αντιγραφής του πλασμίδιου καθώς και η φορά της, (▭) το κομμάτι DNA, υπεύθυνο για την ασυμβατότητα του pSC101. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις περιοχές αλληλεπίδρασης του DNA με τις πρωτεΐνες DnaA, IHF και RepA. Τα + και - δείχνουν το θετικό αποτέλεσμα της RepA πρωτεΐνης στην αντιγραφή και το αρνητικό αποτέλεσμα στην έκφραση του γονιδίου *repA*, αντίστοιχα.

(B) Σχηματικό μοντέλο που δείχνει το ρόλο του IHF στην κάμψη του DNA και το σχηματισμό του ρεπλισώματος από πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από το ίδιο το πλασμίδιο (RepA) αλλά και από το κύτταρο-ξενιστή (π.χ. DnaA, DnaB και DnaC). Χωρίς IHF η κάμψη του DNA δεν είναι τόσο ισχυρή για να φέρει κοντά τα μόρια των πρωτεϊνών DnaA και RepA, κάμψη που όμως ενισχύεται ύστερα από τη δέσμευση του IHF στο μόριο του DNA. Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες DnaA και RepA μπορούν αρχικά να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, και μετά το σύμπλεγμα DnaB-DnaC (που έχει συνδεθεί στη DnaA), κατευθύνεται κατ' ευθείαν στη περιοχή των 13-μερών για να ανοίξει έτσι τη διπλή αλυσίδα του DNA.

## RK2

Το πλασμίδιο RK2 έχει M.B. 60 kb και βρίσκεται σε 4 έως 7 αντίγραφα στο *E. coli* και σε 3 αντίγραφα στο *Pseudomonas aeruginosa*. Συναντάται επίσης και σε άλλα βακτήρια όπως *R. meliloti*, *P. putida*, *Agrobacterium tumefaciens*, και *Azotobacter vinelandii*.



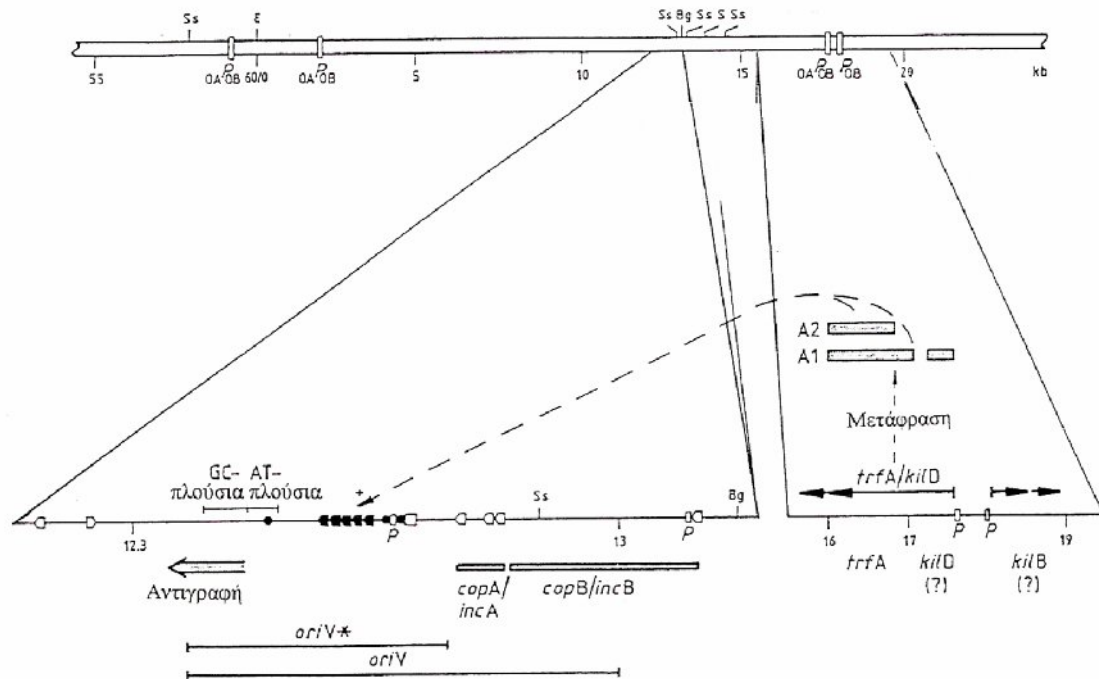


**Σ γ ή μ α 10.** Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου RK2. Το πλασμίδιο κωδικοποιεί για ανθεκτικότητες σε αμπικιλίνη (Ap<sup>R</sup>), σε τετρακυκλίνη (Tc<sup>R</sup>) και καναμυκίνη (Km<sup>R</sup>). Επίσης φαίνεται η περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*), καθώς και περιοχές που κωδικοποιούν για λειτουργίες της μεταφοράς (Tra).

Ο μηχανισμός αντιγραφής που ακολουθεί και αυτό το πλασμίδιο είναι  $\theta$  μορφής και γίνεται προς μια κατεύθυνση, αρχίζοντας από μια περιοχή περίπου 800 ζευγών βάσεων την *oriV*. Η περιοχή αυτή αποτελείται από (i) οκτώ 17μερείς νουκλεοτιδιακές επαναλήψεις, χωρισμένες σε δυο ομάδες, μια των 5 και μια των 3 επαναλήψεων (ii) έναν υποκινητή που βρίσκεται μεταξύ της θέσης πρόσδεσης της DnaA και της θέσης πρόσδεσης του IHF (iii) μια νουκλεοτιδιακή αλληλουχία 49 ζευγών βάσεων πλούσια σε A+T (74% A+T) μέσα στην οποία βρίσκεται και μια άλλη θέση πρόσδεσης της DnaA και (iv) μια νουκλεοτιδιακή αλληλουχία 67 ζευγών βάσεων πλούσια σε G+C (79% G+C), η οποία βρίσκεται δίπλα στην πλούσια σε A+T περιοχή. Ο ρόλος της αλληλουχίας αυτής στην αντιγραφή του πλασμιδίου είναι η δημιουργία μιας τέτοιας στερεοχημικής δομής του μορίου, έτσι ώστε να ευνοείται η πρόσδεση της DnaA στην παρακείμενη αλληλουχία πλούσια σε A+T (Stalker *et al.*, 1981).

Σε ότι αφορά την έναρξη της αντιγραφής του RK2 μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι δεν απαιτείται η δράση της DNA πολυμεράσης I, ενώ είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες DnaA, DnaB ελικάση, DnaG πριμοδοτάση, DNA γυράση και DNA πολυμεράση III του ξενιστή *E. coli*. Στην αντιγραφή και αυτού του πλασμιδίου, φαίνεται να εμπλέκεται ένα ή περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια που κωδικοποιούνται από το *trfA* οπερόνιο του ίδιου του πλασμιδίου. Το οπερόνιο αυτό κωδικοποιεί για τρία πρωτεϊνικά μόρια το KilD, το A1, και το A2. Τα A1 και A2 προέρχονται από το ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αλλά η σύνθεση του A2 ξεκινά

291 βάσεις πριν απ' τη σύνθεση του A1 (Durland & Helinski, 1987). Από αυτά το A2 είναι το πρωτεϊνικό μόριο που σχετίζεται άμεσα με την έναρξη της αντιγραφής του RK2 (Σχήμα 11).



**Σχήμα 11.** Περιοχές του IncP πλασμιδίου RK2, που εμπλέκονται στην έναρξη της αντιγραφής και στη ρύθμιση αυτής (Kües & Stahl, 1989). Μερικές σημαντικές περιοριστικές θέσεις (Bg, BgIII; E, EcoRI; S, Sall; Ss, SstII) και η θέση τους πάνω στο πλασμίδιο (σε kb) δίνονται για σημεία αναφοράς. Κάτω αριστερά φαίνεται μία σχηματική επεξήγηση της περιοχής *oriV*. Τα βέλη (□, ●) δείχνουν τις ευθείες και αντίθετης φοράς νουκλεοτιδικές 17μερείς επαναλήψεις, που θεωρούνται ως πιθανές θέσεις δέσμησης για τις πρωτεΐνες του οπερονίου *trfA*, A1 και A2, (●) θέση δέσμησης της πρωτεΐνης DnaA, (□) θεωρούμενη θέση δέσμησης του IHF, (□) P: πιθανοί υποκινητές. Ακόμη φαίνονται: η έκταση των περιοχών έναρξης της αντιγραφής για τα περισσότερα βακτήρια (*oriV*) και για το *E. coli* (*oriV\** με τις πέντε 17μερείς επαναλήψεις), το μήκος των περιοχών πλούσιων σε G+C και σε A+T, η φορά της αντιγραφής, και τα στοιχεία που εμπλέκονται στον έλεγχο του αριθμού αντιγράφων και της ασυμβατότητας. Κάτω δεξιά, φαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες έναρξης της αντιγραφής A1 και A2. Τα οριζόντια βέλη (←) δείχνουν τα μεταγραφήματα και τη φορά τους και τα κουτάκια (■) δείχνουν τα θεωρητικά πλαίσια ανάγνωσης του γονιδίου *kilD* και των προϊόντων του *trfA*, δηλ. των A1 και A2. Το βέλος (--->) παρουσιάζει τη θετική (+) επίδραση των πρωτεϊνών A1 και A2 στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής.

## RSF1010

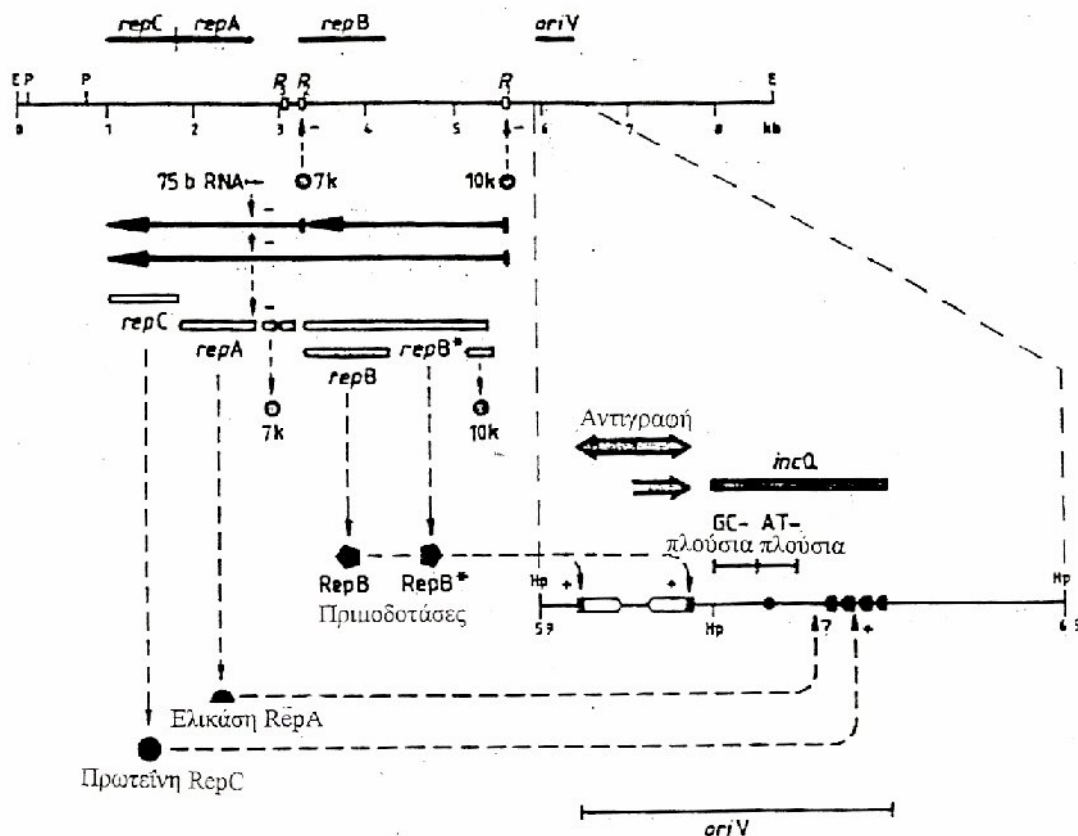
Το πλασμίδιο RSF1010 έχει Μ.Β. 8,7 kb και αριθμό αντιγράφων 10 με 12 για κάθε χρωμόσωμα *E. coli* ή 30 με 60 για κάθε χρωμόσωμα *P. aeruginosa*. Η αντιγραφή του στο *E. coli* γίνεται προς τη μία ή και προς τις δύο κατευθύνσεις, με την ίδια συχνότητα.

Το replicon του RSF1010 αποτελείται από δύο περιοχές που δρουν *in trans* και από μία περιοχή που δρα *in cis*. Η περιοχή που δρα *in cis* [430 bp ανάμεσα στις θέσεις 5,9 και 6,3 kb (**Σχήμα 14**)] περιέχει δύο αλληλουχίες: μία 210 bp και μία 220 bp. Η μεγαλύτερη από τις δύο αυτές αλληλουχίες (220 bp) ρυθμίζει την αντιγραφή και είναι υπεύθυνη για την ασυμβατότητα του πλασμιδίου (Perrson & Nordström, 1986). Αποτελείται από τρεις και μισή επαναλήψεις 21 νουκλεοτιδίων, από μία αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε A+T (68% A+T) μέσα στην οποία βρίσκεται μία μη λειτουργική θέση δέσμευσης πρωτεΐνης DnaA και από μία αλληλουχία 60 νουκλεοτιδίων πλούσια σε G+C (68% G+C) (Lin & Meyer, 1986).

Η δεύτερη αλληλουχία (210 bp) της περιοχής *ori* του RSF1010, έχει δύο επαναλήψεις αντίθετης κατεύθυνσης (Lin *et al.*, 1987), παράγοντας έτσι μία δομή φουρκέτας. Αυτή η δομή παίζει σημαντικότερο ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής (Miao *et al.*, 1993).

Η έναρξη της αντιγραφής εξαρτάται από τρεις πρωτεΐνες: RepA, RepB και RepC, οι οποίες κωδικοποιούνται από τις δυο *in trans* περιοχές του replicon (Kim & Meyer, 1985; Sakai & Komano, 1996). Η RepC (διμερές 31 kDa η κάθε υπομονάδα) ρυθμίζει την έναρξη της αντιγραφής με τη δέσμευσή της στη μεγαλύτερη από τις δύο *cis*-αλληλουχίες, αυτήν των 220 bp (Haring *et al.*, 1985). Η RepA (εξαμερές, 30 kDa η κάθε υπομονάδα) είναι μία 5' → 3' DNA ελικάση και παρουσιάζει ομολογία αμινοξέων με την DnaB του *E. coli* (Scherzinger *et al.*, 1997). Τέλος η RepB πρωτεΐνη (38 kDa) έχει ειδικά στο RSF1010 δράση πριμάσης (Bagdasarian *et al.*, 1986).

Η αντιγραφή του RSF1010 εξαρτάται και από τις DNA πολυμεράση III και γυράση του ξενιστή, ενώ αντίθετα με άλλα πλασμίδια, δεν εξαρτάται από τη DnaA, από το πριμοδοτόσωμα των πρωτεϊνών DnaB, DnaC και DnaG και από την RNA πολυμεράση αυτού (Haring *et al.*, 1985).



**Σ γ ή μ α 12.** Βασική μονάδα αντιγραφής (replicon) του IncQ πλασμιδίου RSF1010 (Kües & Stahl, 1989).

Οι (→) πάνω από το χάρτη του πλασμιδίου δείχνουν τα γονίδια *rep* και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*oriV*).  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  χαρακτηρίζουν τους υποκινητές για τα οπερόνια *rep*. Τα (←) δείχνουν διαφορετικά μεταγραφήματα και τη φορά της μεταγραφής τους. Σύμβολα: (□) πλαίσια ανάγνωσης διαφορετικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες φαίνονται ως εξής: (●) ο 7 kDa καταστολέας, ο 10 kDa καταστολέας και η πρωτεΐνη RepC, (◐) η πρωτεΐνη RepA, (◑) οι πριμοδοτάσες.

Τα (→) δείχνουν την περιοχή όπου δρουν οι παραπάνω πρωτεΐνες (θετικά [+], αρνητικά [-], ή υποτιθέμενα [?]). E, Hr και P αντιστοιχούν στις περιοριστικές θέσεις *EcoR*I, *Hpa*II και *Pst*I που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία αναφοράς του χάρτη του RSF1010. Στο τμήμα της *oriV* σε μεγέθυνση φαίνονται τα δομικά χαρακτηριστικά της αρχής έναρξης της αντιγραφής: (◑) τρεις και μισή επαναλήψεις 21 νουκλεοτιδίων, (●) μια μη λειτουργική θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης DnaA και (□) μια αντιστροφή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 60 νουκλεοτιδίων. Επίσης φαίνονται οι περιοχές που προσδίδουν ασυμβατότητα, καθώς και οι περιοχές πλούσιες σε G+C και A+T.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν για τα πλασμίδια ColE1, pSC101, RK2 και RSF1010, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η δυνατότητα συγκρότησης ρεπλισώματος είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την αντιγραφή των φυσικών πλασμιδίων στα βακτήρια. Στη σωστή αναγνώριση της περιοχής έναρξης της αντιγραφής (*ori*) και στο σχηματισμό του ρεπλισώματος, παίζουν ρόλο τουλάχιστον πέντε στοιχεία:

I. Η ίδια η αλληλουχία της περιοχής έναρξης της αντιγραφής (*ori*).

- II. Οι θέσεις αναγνώρισης και δέσμευσης, μέσα στην περιοχή *ori*, των πρωτεϊνικών μορίων που είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή και αυτά τα ίδια τα πρωτεϊνικά μόρια (π.χ. DnaA, πρωτεΐνες έναρξης της αντιγραφής όπως η RepA για το pSC101, οι A1 και A2 για το RK2, η RepC για το RSF1010).
- III. Οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τη δομή του *ori* του πλασμιδίου (π.χ. IHF).
- IV. Η υπερελίκωση του DNA.
- V. Οι κάμψεις στο DNA.

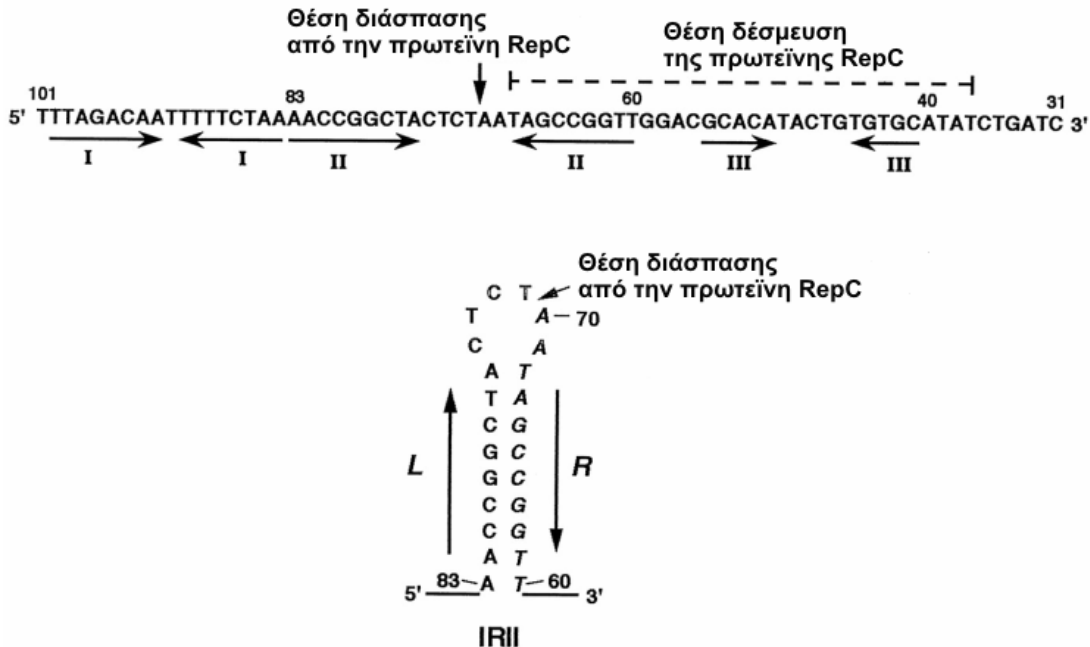
Επιπλέον πρωτεϊνικά μόρια όπως ελικάσες ή πριμοδοτάσες επίσης δεσμεύονται για το σχηματισμό του ρεπλισώματος και μόνο όταν το μακρομοριακό σύμπλοκο πρωτεϊνών-DNA πάρει τη σωστή του μορφή, αρχίζει η αντιγραφή.

### pT181

Το pT181 είναι ένα πλασμίδιο του *Staphylococcus aureus*, με M.B. 4437 bp το οποίο κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη [Tc<sup>R</sup>, (Khan & Novick, 1983)]. Η αντιγραφή του πλασμιδίου γίνεται με το μηχανισμό  $\sigma$ -τύπου και απαιτεί μια πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, την RepC, μοριακού βάρους 37,5 kDa που κωδικοποιείται από το ίδιο το πλασμίδιο. Ο αριθμός αντιγράφων του pT181 είναι 20-25 ανά χρωμόσωμα και ρυθμίζεται από δυο μικρά μόρια RNA, που επίσης κωδικοποιούνται από το ίδιο το πλασμίδιο και δρουν ανασταλτικά στη σύνθεση της πρωτεΐνης RepC (Koepsel & Khan, 1986; Rasooly *et al.*, 1994).

Η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (περιοχή *ori*) του πλασμιδίου, έχει βρεθεί ότι βρίσκεται εντός 70 ζευγών βάσεων, απ' όπου ξεκινά η αντιγραφή του προς μια μόνο κατεύθυνση (Gennaro *et al.*, 1989) και περιλαμβάνει τη θέση δέσμευσης της RepC καθώς και τη θέση διάσπασης του DNA. Η περιοχή αυτή δεν περιέχει άμεσες επαναλήψεις νουκλεοτιδίων, όπως συμβαίνει σε άλλα πλασμίδια (Khan & Novick, 1983). Η RepC αλληλεπιδρά ισχυρά με την περιοχή έναρξης της αντιγραφής έχοντας σαν αποτέλεσμα τη συνεχή έναρξη της αντιγραφής του πλασμιδίου. Χαρακτηριστικό της περιοχής *ori* είναι ότι περιέχει τρεις περιοχές αντίστροφων επαναλήψεων IRI, IRII και IRIII (**Σχήμα 13**). Η περιοχή IRII (νουκλεοτίδια 60 έως 83) σχηματίζει δομή φουρκέτας στο αρνητικά υπερσπειρωμένο DNA, δομή που δρα ως σήμα αναγνώρισης για την RepC. Η δέσμευση της

RepC είναι μη συμμετρική, αφού δεσμεύεται μόνο στο ένα σκέλος του κορμού της φουρκέτας αυτής (Noirot *et al.*, 1990).



**Σχήμα 13.** Νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου rT181 η οποία περιέχει τρεις περιοχές αντίστροφων επαναλήψεων (IR) και που εμπλέκονται στο σχηματισμό δομής φουρκέτας. Η θέση διάσπασης της αλληλουχίας από την πρωτεΐνη RepC βρίσκεται μέσα σ' αυτή την αλληλουχία.

Η πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής RepC, είτε έχει δράση ενδονουκλεάσης και λιγάσης αφού δημιουργεί και κλείνει ανοίγματα στην αλυσίδα του DNA μετά το τέλος κάθε γύρου αντιγραφής είτε δράση DNA-τοποϊσομεράσης. Το υπερσπειρωμένο rT181 γίνεται χαλαρό, πολύ αποτελεσματικά, με τη δράση της RepC, ενώ δεν εμφανίζεται το ίδιο φαινόμενο όταν από το πλασμίδιο έχει αφαιρεθεί η περιοχή δέσμευσης της RepC. Η περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι περικλείει ολόκληρη την αντίστροφη επανάληψη IRIII και το δεξιό κορμό της IRII (**Σχήμα 13**). Η RepC δεσμευόμενη σ' αυτή την περιοχή προκαλεί διάσπαση στην προπορευόμενη αλυσίδα, έτσι ώστε να δημιουργείται ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο και ένα αποκλεισμένο 5'-P άκρο (Koespel *et al.*, 1986). Αυτό οδηγεί στην πιθανότητα η RepC να παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5'-P άκρο της αλυσίδας του DNA. Έτσι ο δεσμός πρωτεΐνης-DNA δίνει την απαιτούμενη ενέργεια για την αντίδραση

επανασύνδεσης, αφού η διάσπαση-επανασύνδεση της αλυσίδας από τη RepC συμβαίνει απουσία εξωτερικής πηγής ενέργειας (Murray *et al.*, 1989).

Το ελεύθερο 3'-OH άκρο χρησιμοποιείται στην αντιγραφή ως πριμοδότης για την προέκταση της σύνθεσης της προπορευόμενης αλυσίδας με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (Koespel *et al.*, 1986). Η περιοχή φαίνεται να χρησιμεύει και ως σήμα τέλους της σύνθεσης της προπορευόμενης αλυσίδας (Khan *et al.*, 1988).

Καμία λειτουργική δράση δεν έχει ακόμη διαπιστωθεί για την περιοχή αντίστροφης επανάληψης IRI (Zhao & Khan, 1996).

Μια περιοχή του pT181 που απέχει περίπου 500 νουκλεοτίδια ανοδικά της περιοχής, όπου προκαλείται η διάσπαση από τη RepC, δείχνει να είναι η περιοχή απ' όπου ξεκινά η σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας (Khan *et al.*, 1988). Η σύνθεση αυτή δεν ξεκινά αν δεν έχει απομακρυνθεί ο ομοιοπολικά κλειστός κύκλος της προπορευόμενης αλυσίδας.

### **3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Τα γονίδια μπορεί να μεταφέρονται μεταξύ στελεχών βακτηριακών κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Η φύση αυτών των μηχανισμών διευκρινίστηκε ύστερα από μελέτες σε χαρακτηρισμένα εργαστηριακά βακτηριακά στελέχη, γεγονός όμως που μπορεί να μην αντιπροσωπεύει τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν και λειτουργούν στο φυσικό περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά, η γνώση που αποκτάται από τέτοιες μελέτες χρησιμοποιείται για να εξετάσει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στους μηχανισμούς μεταφοράς γενετικού υλικού, καθώς και τη μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων στο περιβάλλον.

#### **3.1 Μετασηματισμός**

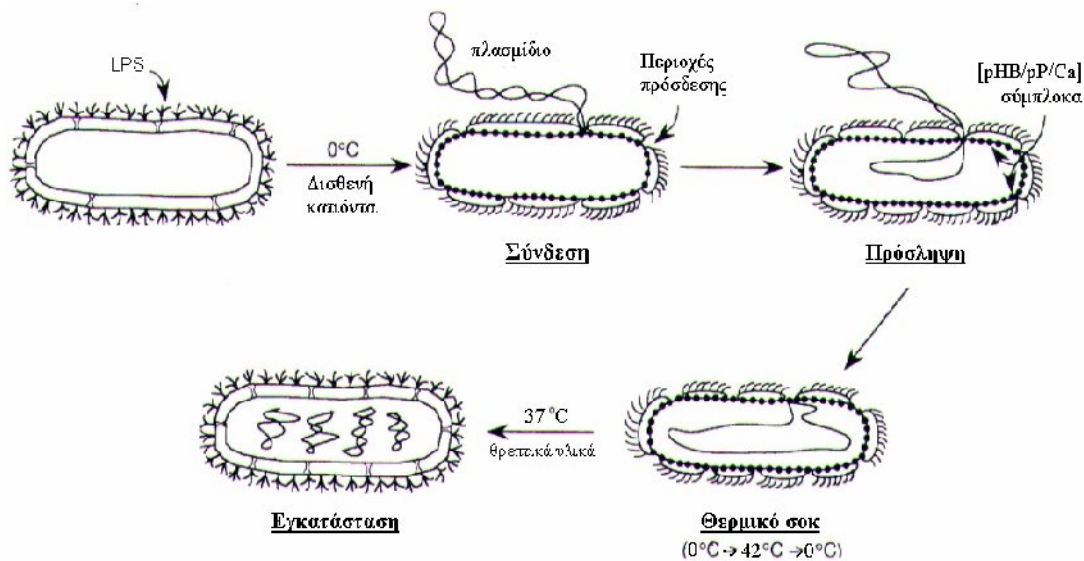
Μετασηματισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα κομμάτι δίκλωνου DNA προσλαμβάνεται από ένα επιδεκτικό βακτηριακό κύτταρο (δηλ. που μπορεί να προσλάβει DNA). Το κομμάτι αυτό του DNA, μπορεί είτε να ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του ξενιστή και να αντιγράφεται μαζί μ' αυτό, είτε να παραμείνει με τη μορφή που έχει

προσληφθεί και να αντιγράφεται αυτόνομα. Ο μετασχηματισμός είναι ένα πολύ σπουδαίο εργαλείο για τη χαρτογράφηση του βακτηριακού γονιδιώματος. Επιπλέον, η δυνατότητα μεταφοράς πλασμιδιακού ή φαγικού DNA σε βακτηριακά κύτταρα, είναι πολύ σημαντικό γεγονός για τη γενετική μηχανική (Yoshida & Sato, 2009).

Φυσικοί ή φυσιολογικοί μετασχηματισμοί συμβαίνουν σε πολλά γένη βακτηρίων όπως *Hemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter* και *Pseudomonas*, στα οποία η φάση επιδεκτικότητάς τους είναι μέρος της “ζωής” τους (Johnsborg *et al.*, 2007). Ο φυσικός μετασχηματισμός διευκολύνεται από την απελευθέρωση DNA στο περιβάλλον, από τα ζωντανά μικροβιακά κύτταρα ή μετά την αποσύνθεσή τους. Βέβαια με την έκθεση του DNA στο περιβάλλον υπάρχει μεγάλος κίνδυνος διάσπασής του από νουκλεάσες. Όμως έχουν βρεθεί περιπτώσεις όπου προστατεύεται μετά από προσρόφησή του σε διάφορα σωματίδια. Σε υδατικά περιβάλλοντα, όπου οι πυκνότητες των βακτηριακών κυττάρων είναι μικρές, η πιθανότητα για *in situ* φυσικό μετασχηματισμό είναι πολύ μικρή.

Σε άλλους μικροοργανισμούς, πολύ χρήσιμους στη γενετική μηχανική, η επιδεκτικότητα μπορεί να προκληθεί τεχνητά, επιδρώντας με διάφορους χημικούς παράγοντες όπως, χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2$ ) ή πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η παρουσία των χημικών αυτών παραγόντων επιφέρει αλλαγές και αναδιοργανώνει τις κυτταρικές μεμβράνες και πιθανά συνδέεται με τη σύνθεση ή ενεργοποίηση κάποιων υποδοχέων πάνω σ’ αυτή. Η διατήρηση μάλιστα χαμηλών θερμοκρασιών (κοντά στους  $0^\circ\text{C}$ ), προκαλεί σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών καθιστώντας αυτές σχετικά άκαμπτες, γεγονός που πιθανά να παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεσή τους με τα μόρια του DNA. Έτσι όταν προστίθεται DNA σε κυτταρικά εναιωρήματα με χημικούς παράγοντες, σχηματίζεται σύμπλοκο ( $\text{Ca}^{2+}$  - DNA ή PEG - DNA), το οποίο προσδένεται στους υποδοχείς αυτούς της κυτταρικής μεμβράνης, και μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε κάποια στελέχη *E. coli* η αναδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών και η δημιουργία περιοχών πρόσδεσης του DNA διευκολύνεται με την προσθήκη DMSO. Τέλος το πέρασμα του DNA υποβοηθείται και από κάποιο θερμικό σοκ (heat shock) που στιγμιαία επιτρέπει στις κυτταρικές μεμβράνες να αποκτήσουν ξανά τη ρευστή μορφή τους “απορροφώντας” παράλληλα το δεσμευμένο σ’ αυτές DNA (Hanahan, 1987).





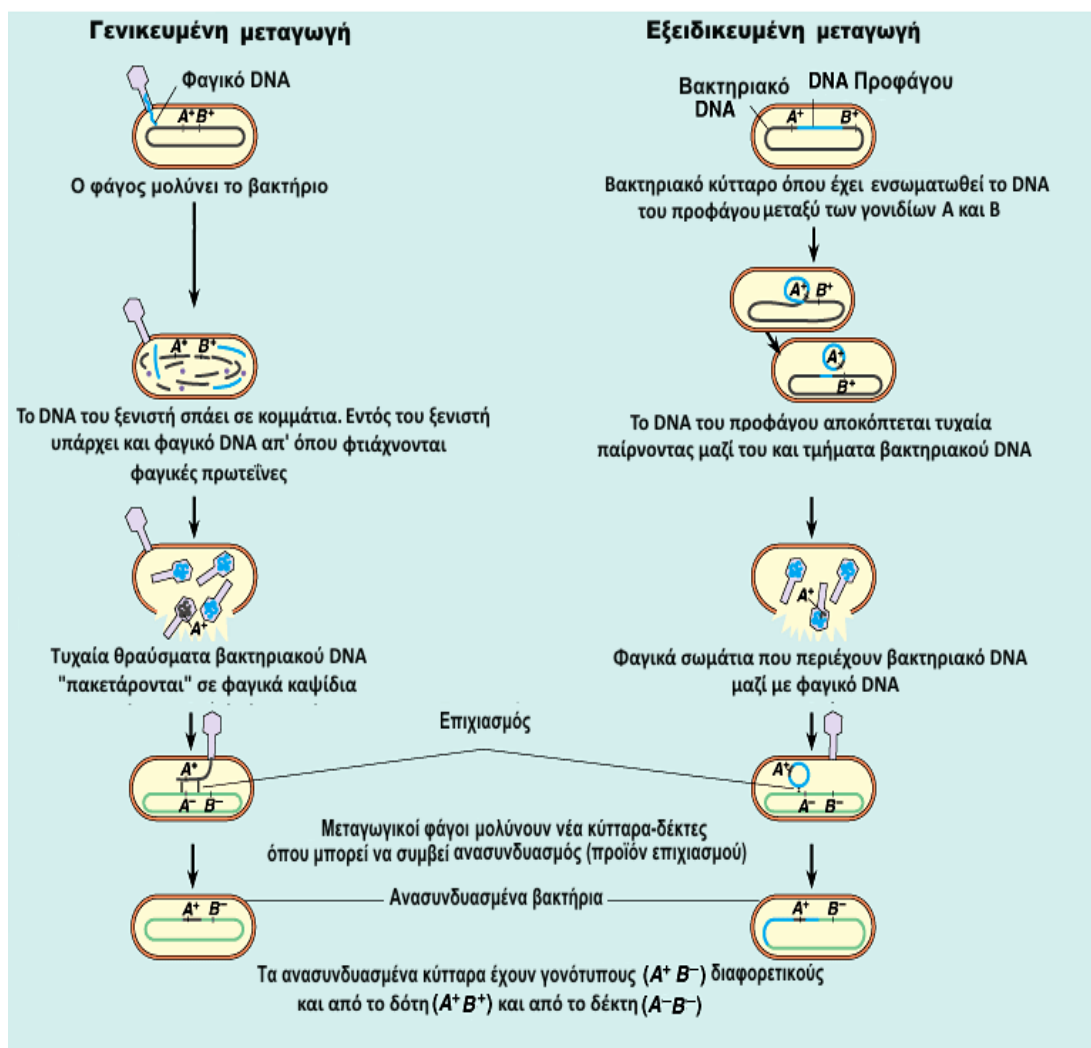
**Σχήμα 14.** Σχηματική περιγραφή των φάσεων του μετασχηματισμού *E. coli* με πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με τον Hanahan (1987). Μεταφορά των κυττάρων σε διάλυμα με δισθενή κατιόντα και στους 0 °C επάγει την αναδιοργάνωση της υπερδομής των λιποπολυσακχαριτών (LPS). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της εσωτερικής και εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης καθιστώντας έτσι τις περιοχές πρόσδεσης αυτής (μακρομοριακά κανάλια μεταφοράς), δεκτικές στην σύνδεση με το πλασμιδιακό DNA. Οι παραπάνω συνθήκες επάγουν επίσης το σχηματισμό συμπλόκων μορίων που θεωρούνται ως μεταφορείς DNA [poly(HB):poly(P):Ca<sup>2+</sup>] και τα οποία εντοπίζονται στην εσωτερική κυτταρική μεμβράνη. Σταδιακά, το DNA “απορροφάται” από το κύτταρο. Το θερμικό σοκ που στιγμιαία τήκει τις μεμβράνες ολοκληρώνει τη διαδικασία πρόσληψης του DNA. Η προσθήκη θρεπτικού υλικού και επώαση στους 37°C, βοηθά στην σταθεροποίηση του πλασμιδίου στο κύτταρο (σταθερή αντιγραφή).

### 3.2 Μεταγωγή

Στη μεταγωγή, το μόριο-δότης DNA "πακετάρεται" σε καψίδιο ενός μεταγωγικού βακτηριοφάγου και ενίεται στο κύτταρο δέκτης. Υπάρχουν δύο ειδών μεταγωγικοί φάγοι - οι γενικευμένοι και οι εξειδικευμένοι (**Σχήμα 15**).

Οι γενικευμένοι μεταγωγικοί φάγοι μπορούν να παράγουν σωματίδια που εμπεριέχουν κομμάτια μόνο DNA από το χρωμόσωμα του κυττάρου-ξενιστή που έχουν μολύνει και όχι φαγικό DNA. Το DNA αυτό μπορεί να προέρχεται από οποιοδήποτε σημείο του βακτηριακού χρωμοσώματος. Έτσι όταν σχηματιστούν νέα φαγικά καψίδια, εισάγεται το DNA αυτό στο νέο κύτταρο-δέκτη, ενσωματώνεται στο χρωμόσωμά του με αποτέλεσμα ο νέος ξενιστής να εκφράζει και γονίδια απ' το χρωμόσωμα του προηγούμενου κυττάρου-ξενιστή που είχε μολυνθεί από τον συγκεκριμένο φάγο. Κλασικό παράδειγμα γενικευμένου φάγου αποτελεί ο P22 (Margolin, 1987).

Ένας διαφορετικός τύπος μεταγωγικών σωματίων μπορούν να παραχθούν από την εκτομή ενός ενσωματωμένου (ολοκληρωμένου) προφάγου: οι εξειδικευμένοι μεταγωγικοί φάγοι. Αυτοί, διαφέρουν από τους γενικευμένους σε τρία σημεία: (1) Περιέχουν φαγικό DNA και DNA του κυττάρου ξενιστή μαζί, κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν ένα ενιαίο μόριο (2) μόνο περιοχές από το DNA του ξενιστή που συνορεύουν με το DNA του ολοκληρωμένου προφάγου βρίσκονται σ' αυτά τα σωματία και (3) ένα μεταγωγικό σωματίο μονής αλυσίδας μπορεί να χρησιμεύει σαν εκμαγείο για την παραγωγή ομοιογενούς πληθυσμού μεταγωγικών σωματίων (Maloy *et al.*, 1994).



**Σχήμα 15.** Σχηματικά παράσταση της μεταφοράς DNA σε βακτηριακά κύτταρα μέσω του μηχανισμού της μεταγωγής (transduction).

Η εξειδικευμένη μεταγωγή είναι πολύ σπάνιο γεγονός σε σύγκριση με τη γενικευμένη επειδή τα γονίδια δεν είναι εύκολο να απελευθερωθούν από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξειδικευμένου φάγου είναι ο φάγος λ (Court *et al.*, 2007).

Η μεταγωγή, ως μηχανισμός μεταφοράς γενετικού υλικού στο περιβάλλον, έχει το πλεονέκτημα ότι τα νουκλεϊνικά οξέα προστατεύονται από το πρωτεϊνικής φύσης καψίδιο. Επιπλέον, το πολύ αυστηρό φάσμα ξενιστών των περισσότερων φάγων (με εξαίρεση ίσως τον P1), οριοθετούν την ικανότητά τους να δρουν σαν φορείς γονιδιακής εξάπλωσης (Reaney *et al.*, 1983).

### 3.3 Βακτηριακή σύζευξη

Η βακτηριακή σύζευξη είναι μία πορεία που περιλαμβάνει μεταφορά DNA από ένα κύτταρο-δότη προς ένα κύτταρο-δέκτη μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί την απ' ευθείας επαφή τους. Η πληροφορία κωδικοποιείται τόσο από πλασμίδια όσο και από συζευκτικά τρανσποζόνια, αποτελώντας έτσι την κυριότερη πορεία οριζόντιας μεταφοράς. Τα συζευκτικά συστήματα είναι πολύ σημαντικά αφού με τον τρόπο αυτό μεταφέρεται γενετικό υλικό μεταξύ μεγάλου εύρους βακτηριακών γενών, και, σε μερικές περιπτώσεις από βακτήρια σε μύκητες και φυτικά κύτταρα. Τα παραπάνω έδωσαν στη βακτηριακή σύζευξη μια πολύ σημαντική δυναμική με κλινικές, περιβαλλοντικές και εξελικτικές εφαρμογές (Mazodier & Davies, 1991).

Οι βιοχημικές και μοριακές μελέτες έχουν εστιαστεί στα εντεροβακτήρια και μάλιστα στην πορεία που κωδικοποιεί το πλασμίδιο F του *Escherichia coli* K-12. Βέβαια, έχουν μελετηθεί και συζευκτικά πλασμίδια άλλων ομάδων ασυμβατότητας όπως το RP4, το RK2(IncPa), καθώς επίσης και πλασμίδια του IncQ (Loftie-Eaton & Rawlings, 2012). Το πλασμίδιο F (ή παράγοντας F) όμως, και τα παράγωγά του, εξακολουθούν (εδώ και 60 χρόνια) να είναι το παράδειγμα της φυσικής σύζευξης.

Περίπου το ένα τρίτο του γονιδιώματός του πλασμιδίου F είναι αφιερωμένο στη βακτηριακή σύζευξη (**Σχήμα 16**). Απαιτεί 23 γονίδια μεταφοράς (*tra*) σε μία περιοχή περίπου 33 kb (Willetts & Wilkins, 1984) (**Πίνακας 2**). Μόνο πέντε από αυτά (*traM*, *Y*, *D*, *I*, *Z*) παίρνουν μέρος στην καθ' εαυτή πορεία μεταφοράς του πλασμιδίου μέσω βακτηριακής σύζευξης. Τα υπόλοιπα γονίδια *tra* μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: (1) σ' αυτά (*traA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *H*, *K*, *L*, *N*, *Q*, *U*, *V*, *W*, *X*) που είναι υπεύθυνα για την

αναγνώριση του κυττάρου-δέκτη και στη συνέχεια την κατασκευή της "συσκευής" μεταφοράς (συζευκτικό τριχίδιο) (Frost *et al*, 1994), (2) σ' αυτά (*traN* και *traG*) που είναι υπεύθυνα για την σταθεροποίηση του "ζευγαρώματος" δότη-δέκτη και (3) σ' αυτά (*traS* και *traT*) που είναι υπεύθυνα για τον επιφανειακό αποκλεισμό, ώστε να αναγνωρίζουν τα κύτταρα που έχουν ήδη το πλασμίδιο ( $F^+$  κύτταρα) και να μη μεταδίδεται εκ νέου σ' αυτά, παρά μόνο στα  $F^-$  (Irpen-Ihler & Minkley, 1986; Frost *et al.*, 1994). Τέλος το γονίδιο *traJ* ρυθμίζει την έκφραση ολόκληρου του οπερονίου *tra*.

**Πίνακας 2.** Τα γονίδια *tra* του πλασμιδίου F (Willetts & Wilkins, 1984).

Γονίδιο	Θέση του προϊόντος του γονιδίου στο κύτταρο	Λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου στο κύτταρο
<i>traA</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Πρωτεΐνη των συζευκτικών τριχιδίων πιλίνη (σηματισμός συζευκτικής γέφυρας)
<i>traB</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traC</i>	κυτταρόπλασμα & εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traD</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Διευκόλυνση του περάσματος DNA
<i>traE</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traF</i>	περιπλασματικός χώρος	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traG</i>	πλασματική μεμβράνη και περιπλασματικός χώρος	Ακετυλίωση της πιλίνης, σταθεροποίηση του "ζευγαρώματος" δότη-δέκτη
<i>traH</i>	περιπλασματικός χώρος	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traI</i>	κυτταρόπλασμα	DNA ελικάση I
<i>traJ</i>	κυτταρόπλασμα	Ρυθμιστής του οπερονίου <i>tra</i>
<i>traK</i>	περιπλασματικός χώρος	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traL</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traM</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Έναρξη της μεταφοράς

<i>traN</i>	εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σταθεροποίηση του “ζευγαρώματος” δότη-δέκτη
<i>traQ</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός της συζευκτικής γέφυρας
<i>traS</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Επιφανειακός αποκλεισμός (αποκαταστολή)
<i>traT</i>	εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Επιφανειακός αποκλεισμός
<i>traU</i>	περιπλασματικός χώρος	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traV</i>	εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traW</i>	περιπλασματικός χώρος	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traX</i>	εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης	Σχηματισμός συζευκτικών τριχιδίων
<i>traY</i>	κυτταρόπλασμα	Διάσπαση στο <i>oriT</i> (ενδονουκλεάση)
<i>traZ (traI*)</i>	κυτταρόπλασμα	Τμήμα της πρωτεΐνης TraI

***traA, B, C, E, F, G, H, K, L, Q, U, V, W, X:* υπεύθυνα για τη συγκρότηση και λειτουργία των φυλετικών τριχιδίων.**

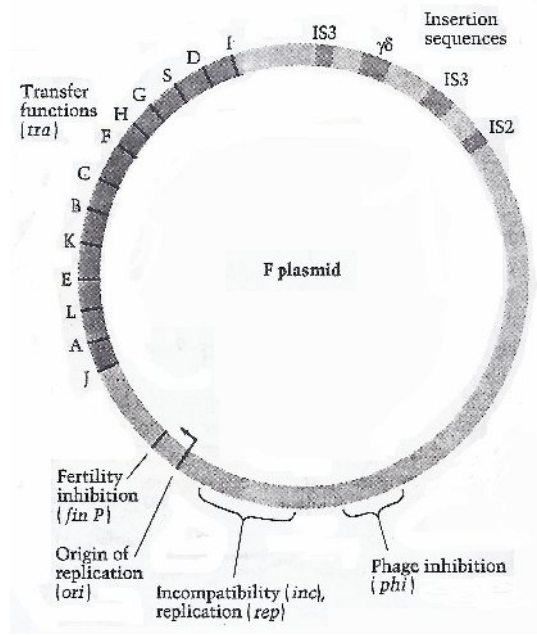
*traY, Z, M, I, D:* υπεύθυνα για απ' ευθείας μεταφορά και μεταβολισμό του DNA και όχι σε σχέση με τα φυλετικά τριχίδια.

### **Σ γ ή μ α 16.**

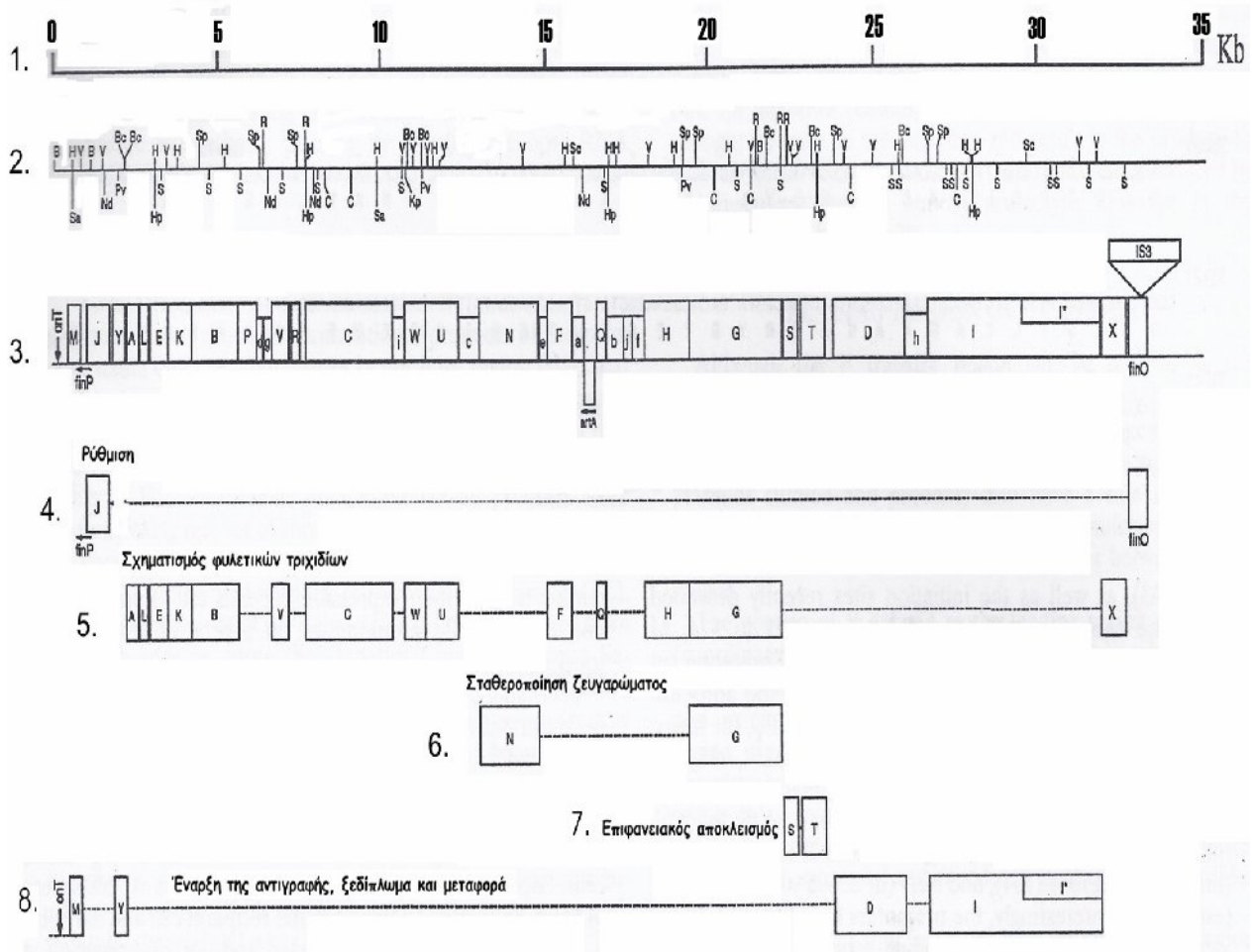
(A). Γενετικός χάρτης του συζευκτικού πλασμιδίου F.

(B). Περιοχή μεταφοράς του πλασμιδίου F (περιοχή *tra*) κατά Frost *et al.*, 1994:

1. Μέγεθος (bp) της περιοχής *tra*.
2. Περιοριστικός χάρτης B: *Bgl*III, Sa: *Sal*I, V: *EcoRV*, Nd: *Nde*I, H: *Hinc*II, Hp: *Hpa*I, S: *Sma*I, Sp: *Sph*I, C: *Cla*I, R: *EcoRI*, Kp: *Kpn*I.
3. Γενετικός χάρτης
- 4-8. Λειτουργίες των *tra* γονιδίων όπως αυτές έχουν ταυτοποιηθεί.



(A)



(B)

Πλασμίδια που συνδυάζουν όλες τις παραπάνω λειτουργίες στο ίδιο μόριο είναι αυτο-μεταταβιβάσιμα και λέγονται **συζευκτικά (conjugative)**. Παρ' όλα αυτά, πολλά μη συζευκτικά πλασμίδια μπορούν να μεταφέρονται σε κύτταρα-δέκτες όταν συνυπάρχουν με ένα συζευκτικό πλασμίδιο στο κύτταρο-δότη. Τα πλασμίδια αυτά λέγονται **κινητοποιήσιμα (mobilizable)** και χωρίζονται σε δύο ομάδες: (α) στα αυτο-κινητοποιήσιμα (self-mobilizable) τα οποία περιέχουν μια περιοχή (*oriT*) που δρα *in cis* και μια περιοχή (*mob*) που κωδικοποιεί για μόρια που δρουν *in trans* (πρωτεΐνες κινητοποίησης), και αλληλεπιδρούν με την *oriT* και (β) στα επιβοηθούμενα-κινητοποιήσιμα τα οποία περιέχουν μόνο την περιοχή *oriT*, και τα οποία είναι συνήθως τεχνητά ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

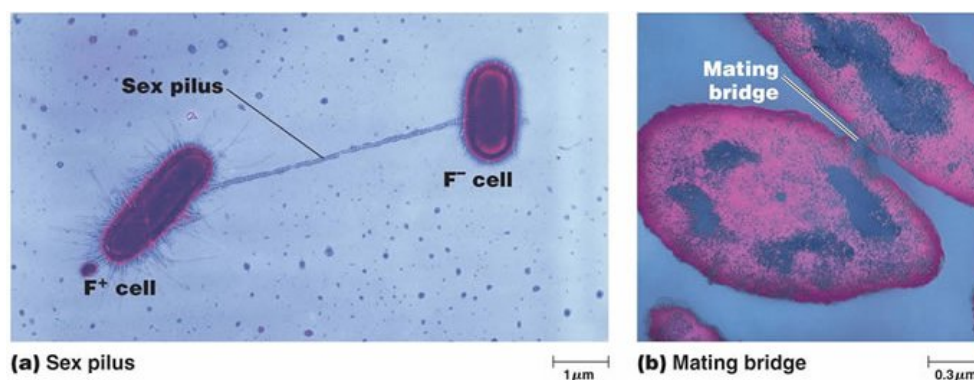
**Πίνακας 3.** Ιδιότητες των μεταβιβάσιμων στοιχείων

Στοιχείο	Ομάδα Inc	Τύπος της περιοχής εντομής	Πρωτεΐνη που επάγει εντομή	Φυσικός ξενιστής
<u>Συζευκτικά πλασμίδια</u>				
F	FI	F	Tra1	<i>Escherichia coli</i>
R100	FII	F	Tra1	<i>Shingella flexneri</i>
R64	II	P	NikA	<i>Salmonella typhimurium</i>
RK2	Pa	P	Tra1	<i>Klebsiella aerogenes</i>
RP4	Pa	P	Tra1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pTiC58		P (LB-RB) <sup>#</sup> Q ( <i>oriT</i> )	VirD2 TraA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pGO1		Q		<i>Staphylococcus aureus</i>
<u>Κινητοποιήσιμα πλασμίδια</u>				
RSF1010	Q	Q	MobA	<i>Escherichia coli</i>
CloDF13				<i>Enterobacter cloacae</i>
ColE1			MbeA	<i>Escherichia coli</i>
pACYC184				<i>Escherichia coli</i>
pSC101		Q		<i>Salmonella panama</i>
pTF1		Q		<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
<u>Συζευκτικά τρανσποζόνια και κινητοποιήσιμα στοιχεία εισδοχής</u>				
Tn4399			MocA	<i>Bacteroides fragilis</i>
NBU1				<i>Bacteroides</i> sp.
NBU2				<i>Bacteroides</i> sp.

<sup>#</sup>LB, RB: αριστερό και δεξί όριο της αλληλουχίας του T-DNA

Ο αριθμός των πλασμιδίων που αποδείχθηκε ότι μπορούν να μεταφερθούν είναι πολύ μεγάλος, γεγονός που οδηγεί στην αναγκαιότητα κατάταξής τους σε ομάδες (**Πίνακας 3**).

Μια άλλη ομάδα κινητοποιήσιμων γενετικών στοιχείων πολύ μικρότερου Μ.Β. (έως και 16 kb) αποτελούν τα συζευκτικά τρανσποζόνια (Salyers *et al.*, 1995b). Αυτά μοιάζουν με τα αυτο-κινητοποιήσιμα πλασμίδια. Είναι δηλ. ομοιοπολικά κλειστά κυκλικά μόρια DNA που περιέχουν *oriT*, *mob* αλληλουχίες και παράγοντες ανθεκτικότητας, αλλά που δεν αντιγράφονται στα κύτταρα-ξενιστές (δότες ή δέκτες). Αντίθετα, μπορούν και ενσωματώνονται ή αποκόπτονται από το DNA των κυττάρων αυτών.



**Εικόνα 1:** Βακτηριακή σύζευξη μεταξύ στελεχών *E.coli* (φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)

(α) Σχηματισμός συζευκτικού τριχιδίου μεταξύ του κυττάρου-δότη και του κυττάρου-δέκτη.

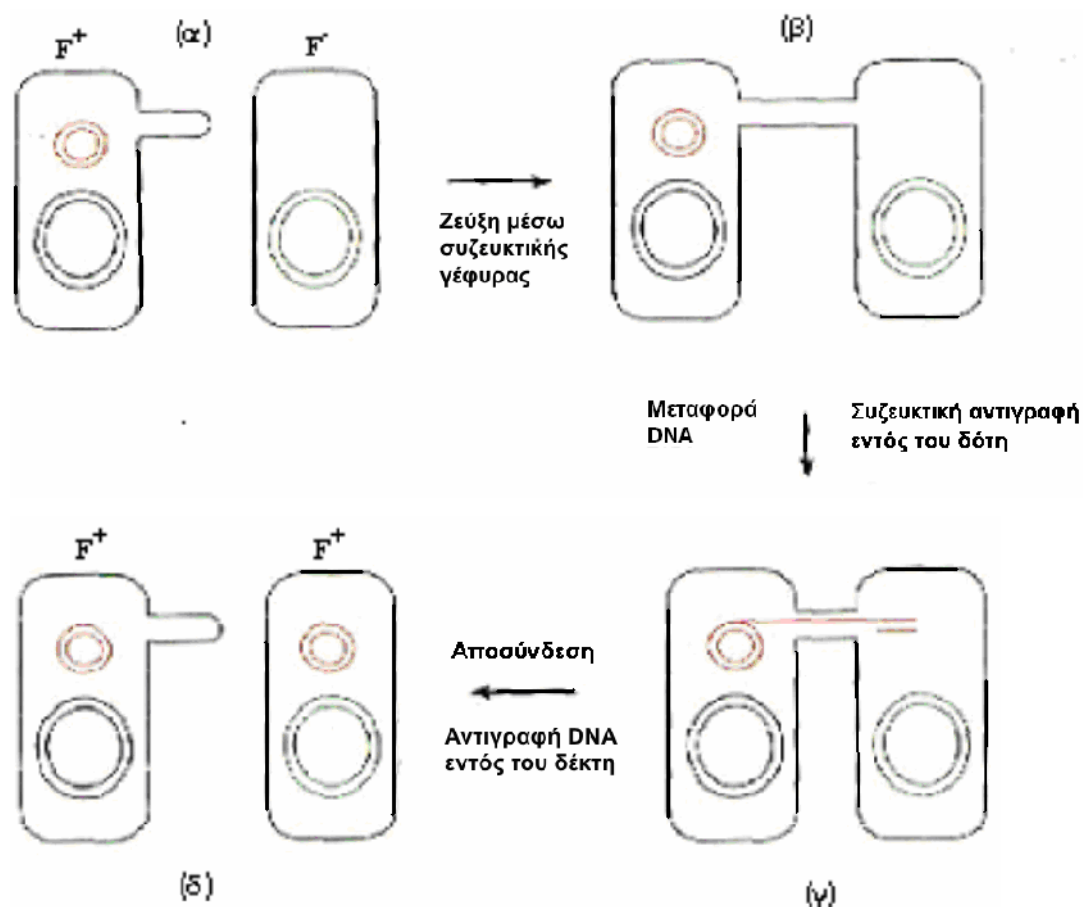
(β) Συστολή της “συζευκτικής γέφυρας” για σταθεροποίηση της επικοινωνίας δέκτη-δότη.

Η πορεία της βακτηριακής σύζευξης φαίνεται στο **Σχήμα 17**. Η σύζευξη αρχίζει με τη δημιουργία της “συζευκτικής γέφυρας” στο κύτταρο δότη F<sup>+</sup> (περιέχει το πλασμίδιο F) διαμέσου της οποίας έρχεται σε επαφή με το κύτταρο δέκτη F<sup>-</sup>. Η εύκαμπτη αυτή, πρωτεϊνικής φύσης, γέφυρα που μοιάζει με τριχίδιο, έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του κυττάρου δέκτη F<sup>-</sup> και έτσι σχηματίζεται ένα “ζευγάρισμα” μεταξύ των δύο διαφορετικών κυττάρων. Η συστολή της “συζευκτικής γέφυρας” σταθεροποιεί το ζευγάρι και εγκαθιστά μία άμεση επικοινωνία μεταξύ των δύο κυττάρων (Harrington & Rogerson, 1990).

Ακολουθεί η μεταφορά του πλασμιδίου η οποία αρχίζει με την εγκοπή (nic) στην μία εκ των δύο αλυσίδων του πλασμιδίου στην περιοχή *oriT*. Στο σημείο της εγκοπής και από το ελεύθερο 3'-OH άκρο αρχίζει η σύνθεση του DNA με εκμαγείο την αλυσίδα που δεν έχει κοπεί. Το άλλο άκρο (5'-P) της κομμένης αλυσίδας εκτοπίζεται και μεταφέρεται



(κατεύθυνση 5'→3') ως μονόκλωνη αλυσίδα DNA (ss-DNA) μέσω της “συζευκτικής γέφυρας” στο κύτταρο δέκτη. Στη συνέχεια, μέσα στο κύτταρο δέκτη, το μεταφερόμενο μονόκλωνο DNA επανασυνδέεται ώστε να δημιουργηθεί αρχικά κυκλικό μόριο που θα χρησιμεύσει σαν εκμαγείο για νέα σύνθεση δίκλωνου DNA, με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης III. Όταν η μεταφορά του DNA ολοκληρωθεί, τα κύτταρα (δότης – δέκτης) αποχωρίζονται (Dürrenberger *et al.*, 1991). Έχουμε έτσι τη δημιουργία δυο F<sup>+</sup> κυττάρων που μπορούν αργότερα να δράσουν σαν δότες. Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων δεν είναι γνωστό αν είναι ενιαία για όλα τα βακτηριακά είδη.



**Σχήμα 17.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της βακτηριακής σύζευξης

(α) Το κύτταρο-δότης παράγει συζευκτικό τριχίδιο

(β) Το συζευκτικό τριχίδιο προσεγγίζει το κύτταρο-δέκτη και ακολουθεί η συστολή της “συζευκτικής γέφυρας”.

γ) Το πλασμίδιο διασπάται στο σημείο εγκόπης και μεταφέρεται μονόκλωνο στο κύτταρο-δέκτη.

(δ) Τα δύο κύτταρα συνθέτουν τη συμπληρωματική αλυσίδα του πλασμιδίου ώστε να δημιουργηθούν δύο δίκλινα μόρια, καθιστώντας τα κύτταρα ικανά να δράσουν σαν δότες.

### 3.3.1 Η “συζευκτική γέφυρα”

Τα κύτταρα F<sup>+</sup> έχουν συνήθως 4-5 συζευκτικά τριχίδια στην επιφάνεια τους, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση κατάλληλων υποδοχέων σε κύτταρα-δέκτες (προκειμένου να μεταφερθεί το πλασμίδιο F μέσω βακτηριακής σύζευξης) ή την αναγνώριση πρωτεϊνών αποκλεισμού (σε κύτταρα που περιέχουν ήδη αντίστοιχα πλασμίδια).

Τα συζευκτικά τριχίδια αποτελούνται από πλίνες (Date *et al.*, 1977), πρωτεϊνικά μόρια για τον σχηματισμό των οποίων εμπλέκονται τα γονίδια *traA*, *traQ* και *traX* (Πίνακας 2). Η πλίνη σχηματίζεται από την προπλίνη (το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *traA*), ένα πολυπεπτίδιο 12,8 kDa το οποίο διασπάται πρωτεολυτικά σε 7,2 kDa και τότε, με την βοήθεια των πρωτεϊνικών προϊόντων των *traQ* και *traX* ακετυλιώνεται, φωσφορυλιώνεται, γλυκοσυλιώνεται και κυκλοποιείται με αφαίρεση H<sub>2</sub>O και παράγεται το ενεργό μόριο της πλίνης (Frost *et al.*, 1984). Εκτός από το γονίδιο *traA*, απαιτούνται ακόμα 12 γονίδια για τη δημιουργία της “συζευκτικής γέφυρας” (Πίνακας 2).

Στη δομή της “συζευκτικής γέφυρας”, η οποία αναλύθηκε με ακτίνες X, βρέθηκαν περίπου 104 μόρια πλίνης διατεταγμένα ελικοειδώς, που έχουν μήκος 2-3μm και εξωτερική διάμετρο 8nm, με ένα πόρο 2nm (Anthony *et al.*, 1994).

Όταν τα δυο κύτταρα έρθουν σε επαφή (Σχήμα 17) η “συζευκτική γέφυρα” συσπάται για να τα φέρει σε άμεση επαφή. Το σήμα της έναρξης της σύσπασης πιθανότατα οφείλεται στην αλληλεπίδραση των προϊόντων των γονιδίων *traT* και *traS*. Η σύσπαση σταθεροποιείται τόσο από την πρωτεΐνη TraN που αλληλεπιδρά απ’ ευθείας με συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου-δέκτη (Maneewannakul *et al.*, 1992), όσο και από την TraG, ο ρόλος της οποίας είναι διπλός, εφ’ όσον ένα κομμάτι του μορίου της (κοντά στο N-άκρο) εμπλέκεται στην κατασκευή της “συζευκτικής γέφυρας” ενώ το άλλο κομμάτι (κοντά στο C-άκρο) είναι απαραίτητο για την σταθεροποίηση της σύσπασής της (Firth & Skurray, 1992). Η πρωτεΐνη TraD, τέλος, αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη TraM του χαλαροσώματος, διευκολύνει το διαμεμβρανικό πέρασμα του μονόκλωνου DNA στο κύτταρο-δέκτη (Lu *et al.*, 2008).

Οι μηχανισμοί μεταφοράς των συζευκτικών πλασμιδίων στα Gram<sup>+</sup> βακτήρια πιθανά να είναι, τόσο βιοχημικά όσο και γενετικά, διαφορετικοί απ’ αυτούς των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων αφού τα πλασμίδια αυτών δεν κωδικοποιούν “συζευκτική γέφυρα” για την αναγνώριση των κυττάρων-δεκτών.

### 3.3.2 Περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*)

Η περιοχή έναρξης της μεταφοράς είναι η μόνη από τις περιοχές, που απαιτούνται για την μεταφορά του DNA, που δρα *in cis*, η ύπαρξη δε της οποίας είναι ικανή να μετατρέψει έναν μη μεταβιβάσιμο πλασμιδιακό φορέα σε κινητοποιήσιμο πλασμίδιο. Είναι μία περιοχή περίπου 300 νουκλεοτιδίων η οποία εμπεριέχει τη θέση που δημιουργείται η διάσπαση (*nic* region) του DNA από την πρωτεΐνη χαλάρωσης (ρηλαξάση, relaxase). Έχουν αναγνωρισθεί τρεις ομάδες περιοχών *oriT* (Σχήμα 18). Σε κάθε μια απ' αυτές, υπάρχουν μικρές διατηρημένες ακολουθίες που εκτείνονται ανοδικά ή γύρω από την θέση *nic*.

RP4/RK2	C T T C A C C	T A T C C T G▼	C C C C G G C
R64	A A T T G C A	C A T C C T G▼	T T C C C G T
pTiC58 LB	C A C A A T A	T A T C C T G▼	C C C A C C A
pTiC58 RB	G C C A A T A	T A T C C T G▼	T T C A A A C
		Y A T C C T G	Y
F	T T T G C G	T G G G G T	G T▼ G G T G C T
R100	T T T G C G	T A G T G T	G G T G C T
R46	G C T G C G	T T A G G T	G T A T A G C A
R388	G G T G C G	T A T T G T	C T▼ A T A G C C
pED208	T T T G C G	A C G G G T	T T G G G A C T
	T G C G	W N D K	G T S T R K D R C
RSF1010	A A C C G G	T A A G T	G C G▼C C C T C C
pSC101	A A A G T C	T A A G T	G C G C C C T G A
pGO1	T T C G C A	T A A G A	G C G C C C T T A
R1162	A A C C G G	T A A A T	G C G▼C C C T C C
pTF1	T T A C T C	T A A G T	G C▼G C C C T T G
pIP501	T G C G T A	T A A G T	G C G C C C T T A
	T A A D	W G C G	C C C T

**Σχήμα 18.** Σύγκριση των αλληλουχιών ορισμένων φυσικών πλασμιδίων στην περιοχή διάσπασής τους από τις πρωτεΐνες χαλάρωσης. Στο κάτω μέρος κάθε ομάδας πλασμιδίων φαίνεται μια συναινετική ακολουθία των περιοχών αυτών, ενώ σε μαύρο πλαίσιο είναι οι κοινές αλληλουχίες. Με (▼) συμβολίζεται η θέση διάσπασης.

Οι περιοχές *oriT* στα εντεροβακτήρια παρουσιάζουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά:

1. Βρίσκονται σε τέτοιο σημείο πάνω στο πλασμίδιο ώστε η πλειονότητα των *tra* γονιδίων να μεταφέρονται τελευταία στο κύτταρο-δέκτη. Π.χ. Στα πλασμίδια τύπου F, η *oriT* βρίσκεται στο τμήμα των 373 bp, στο τέλος του οπερονίου Tra (**Σχήμα 16**).
2. Έχουν περιεκτικότητα σε A+T μεγαλύτερη από ότι οι περιοχές παρακείμενες σ' αυτές, διευκολύνοντας ίσως έτσι το διαχωρισμό των αλυσίδων στο αρνητικά υπερσπειρωμένο DNA.
3. Έχουν εκτεταμένη δευτεροταγή δομή εξ' αιτίας των άμεσων και αντίστροφων επαναλήψεων. Στα F και RP4 αυτά τα δομικά στοιχεία δρουν ως θέσεις αναγνώρισης για τις πρωτεΐνες δέσμησης στο DNA.
4. Περιέχουν δομικά χαρακτηριστικά (π.χ. εσωτερικές στρέψεις και θέσεις δέσμησης για τον παράγοντα IHF) ώστε να μεταβάλλουν τη δομή της *oriT* τοπικά, έχοντας ως αποτέλεσμα την ευκολότερη προσέγγιση των πρωτεϊνών στο σημείο διάσπασης.
5. Περιλαμβάνουν υποκινητές για την έκφραση των *tra* γονιδίων, γεγονός που σε μερικές περιπτώσεις προκαλούν αποκλίνουσα μεταγραφή (divergent transcription) από την *oriT*.

Σε ότι αφορά τα συζευκτικά στοιχεία των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων, σύγκριση των αλληλουχιών των *oriT* περιοχών του πλασμιδίου pG01 των σταφυλοκόκκων και του ευρέως φάσματος ξενιστών πλασμιδίου pIP501 των στρεπτοκόκκων, έδειξε ότι τα πλασμίδια αυτά περιέχουν μία περιοχή διάσπασης όμοια με αυτή του RSF1010 (**Σχήμα 18**). Το σημαντικό αυτό γεγονός αποδεικνύει ότι οι μηχανισμοί μεταφοράς τουλάχιστον μερικών συζευκτικών πλασμιδίων Gram<sup>+</sup> βακτηρίων, είναι ουσιαστικά όμοιοι με αυτούς πλασμιδίων Gram<sup>-</sup> βακτηρίων (Lanka & Wilkins, 1995).

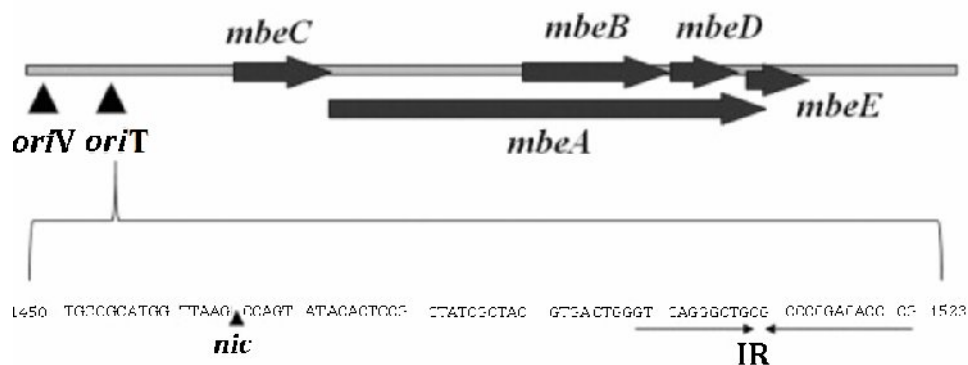
### 3.3.3 Χαλαροσώματα (Relaxosomes)

#### 3.3.3.1 Διάσπαση στην περιοχή *oriT*

Είναι κοινώς παραδεκτό στη βακτηριακή σύζευξη, ότι το DNA μεταφέρεται ως μονή αλυσίδα, τη λεγόμενη T-αλυσίδα. Για να συμβεί αυτό χρειάζεται να γίνει εξειδικευμένη διάσπασή της στη θέση *nic* από ένα σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών που δημιουργείται και που ονομάζεται **χαλαρόσωμα** (Fürste *et al.*, 1989).

Η διάσπαση αυτή του DNA, δημιουργεί ένα 3'-OH άκρο στο κύτταρο-δότη που χρησιμοποιείται από την DNA πολυμεράση I του *E. coli* για την επιμήκυνση της αλυσίδας

(Guiney & Helinski, 1975). Στο πλασμίδιο ColE1, η περιοχή κινητοποίησής του αποτελείται από πέντε γονίδια (*mbeA*, *mbeB*, *mbeC*, *mbeD* και *mbeE*), δύο εκ των οποίων (*mbeB* και *mbeD*) επικαλύπτονται εντελώς από το *mbeA* (Boyd *et al.*, 1989, **Σχήμα 19**). Έχει δειχθεί ότι το DNA συνδέεται με τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες M.B. 60 kDa, 16 kDa, 11 kDa. Η πρωτεΐνη 60 kDa [πιθανά το προϊόν του γονιδίου *mob3* (*mbeA*) 57,9 kDa] συνδέεται ισχυρά με το 5'-P άκρο του DNA που δημιουργείται στην θέση *nic* με την παραπάνω διάσπαση, ενώ οι άλλες δύο (τα προϊόντα των *mbeB* και *mbeC*) μετά την διάσπαση απομακρύνονται (Blair & Helinski, 1975, Lovett & Helinski, 1975). Η διάσπαση γίνεται στην βαρύτερη (H) από τις δύο αλυσίδες, όπως αποδείχθηκε μετά από βαθμίδωση πολυ(U,G)-CsCl, περίπου 170 bp μακριά από την αρχή της βλαστικής αντιγραφής [*oriV*, (Bastia, 1978)].



**Σχήμα 19.** Χάρτης της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του πλασμιδίου ColE1 (Varsaki *et al.*, 2009).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι της περιοχής *oriT*. Η χαρακτηριστική περιοχή αντίστροφης επανάληψης (IR) απεικονίζεται με οριζόντια βέλη. Η θέση διάσπασης *nic* (η οποία συμβαίνει στην συμπληρωματική αλυσίδα DNA) υποδεικνύεται με το βέλος (▲).

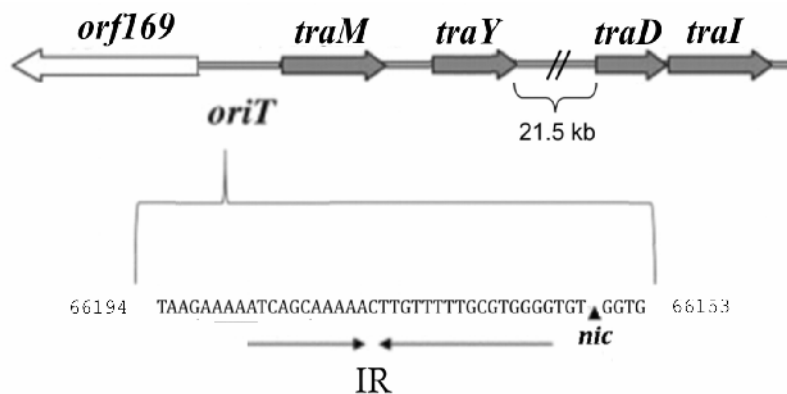
Φαίνεται επίσης η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*oriV*). Η φορά των βελών των γονιδίων δηλώνει την κατεύθυνση της μεταγραφής (από αριστερά προς τα δεξιά).

Παρόμοια πράγματα συμβαίνουν και στα πλασμίδια F, RP4 και RSF1010 όπου οι πρωτεΐνες TraI, TraI και MobA αντίστοιχα, είναι αυτές που συνδέονται ομοιοπολικά στο 5'-P άκρο του DNA (Pansegrau *et al.*, 1990; Matson *et al.*, 1993; Scherzinger *et al.*, 1993). Για τις δύο τελευταίες περιπτώσεις αναφέρεται ότι η πλευρική υδροξυλομάδα της τυροσίνης Y22 της TraI του RP4 (Balzer *et al.*, 1994) και Y24 της MobA του RSF1010 (Scherzinger *et al.*, 1993) είναι αυτή που σχηματίζει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό με το 5'-P άκρο της T-αλυσίδας του DNA.

### 3.3.3.2 Πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στην περιοχή *oriT*

Το χαλαρόσωμα, όπως αναφέρθηκε, είναι το σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών, υπεύθυνο για την έναρξη της μεταφοράς του DNA και βρίσκεται στο κύτταρο-ξενιστή σε μορφή που μπορεί να απομονωθεί. Μετά την ανακάλυψή του στο πλασμίδιο ColE1, έχουν αναφερθεί χαλαροσώματα για διάφορα συζευκτικά και κινητοποιήσιμα πλασμίδια (F, RP4 και RSF1010) των εντεροβακτηρίων (Willetts & Wilkins, 1984).

**Πλασμίδια τύπου F:** Τα πλασμίδια τύπου F αποτελούν μοντέλο για την εξήγηση των βασικών μοριακών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την συζευκτική πλασμιδιακή μεταφορά (de la Cruz *et al.*, 2010). Η περιοχή μεταφοράς (*oriT*) του F και των πλασμιδίων τύπου F (F-like plasmids), βρίσκεται στο ένα άκρο της δέσμης γονιδίων *tra* και εκτείνεται για περίπου 350 νουκλεοτίδια (Frost *et al.*, 1994). Η περιοχή *oriT* συνδέεται με ένα γονίδιο καθοδικά του *nic*, το λεγόμενο γονίδιο *X* (ή *orf169*) το οποίο είναι το πρώτο που μεταφέρεται. Ανοδικά του *nic* βρίσκεται το *traM*, που είναι και το πρώτο της δέσμης γονιδίων *tra*, και που περνάει τελευταίο στο κύτταρο-δέκτη (Koraimann, 2003).

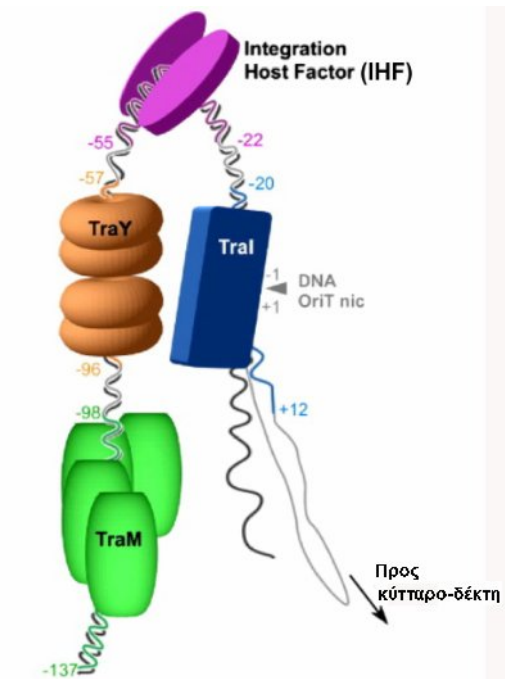


**Σχήμα 20.** Χάρτης της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του πλασμιδίου F.

Η νουκλεοτιδιακή αλληλουχία είναι της περιοχής *oriT*. Η χαρακτηριστική περιοχή αντίστροφης επανάληψης (IR) απεικονίζεται με οριζόντια βέλη. Η θέση διάσπασης *nic* υποδεικνύεται με το βέλος (▲).

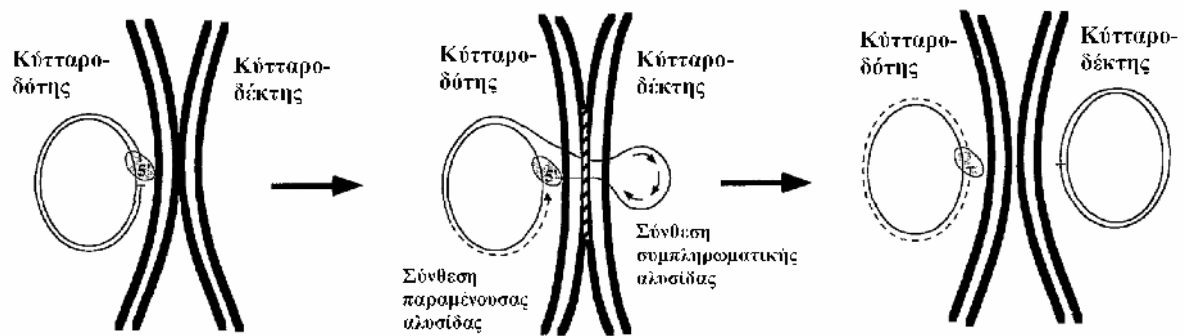
*In vivo* μελέτες για τη διάσπαση των F πλασμιδίων στην περιοχή *oriT* και τη δημιουργία του χαλαροσώματος έδειξαν ότι είναι απαραίτητος ο ρόλος μιας περιοχής πλούσιας σε A+T, των πλασμιδιακών γονιδίων *traI*, *traY* και *traM* καθώς και του κυτταρικού παράγοντα IHF (Everett & Willetts, 1980). Τα γονίδια αυτά βρίσκονται στα δυο άκρα του οπερονίου Tra (**Σχήμα 16**), υποδηλώνοντας ότι η χαλάρωση του DNA δεν απαιτεί γειτονικούς γενετικούς τύπους όπως στην περίπτωση των πλασμιδίων IncP, IncQ

και IncW (Furuya & Komano, 1991). Ο σχηματισμός του χαλαροσώματος φαίνεται στο **Σχήμα 21**.



**Σχήμα 21.** Σχηματικό διάγραμμα του χαλαροσώματος στο πλασμίδιο F. Οι κωδικοποιούμενες από το πλασμίδιο πρωτεΐνες TraM (πράσινο), TraY (πορτοκαλί) και TraI (μπλε) και ο παράγοντας IHF (ιώδες), συνδέονται με το πλασμίδιο F σε συγκεκριμένες περιοχές που εξαρτώνται από την αλληλουχία και τη χωροδιάταξη αυτών. Τα νουκλεοτίδια με τα οποία συνδέεται κάθε πρωτεΐνη φαίνονται με αντίστοιχο χρώμα, η αριθμησή τους δε ξεκινά από τη θέση *nic*. Τέλος υποδεικνύεται και η περιοχή του ssDNA που μεταφέρεται στο κύτταρο-δέκτη μέσω συστήματος έκκρισης τύπου IV (T4SS).

Η πρωτεΐνη TraI, γνωστή και σαν DNA-ελικάση I, έχει διπλή δράση (ρηλαξάσης και ελικάσης) και είναι αυτή που διασπά το DNA στην αλληλουχία *nic* της περιοχής *oriT* και που παραμένει συνδεδεμένη στο 5'-άκρο που δημιουργείται με την παραπάνω διάσπαση (Byrd & Matson, 1997). Στη συνέχεια, η TraI ξεδιπλώνει το DNA στην κατεύθυνση 5'→3' δημιουργώντας μια μονόκλωνη αλυσίδα που μεταναστεύει στο κύτταρο-δέκτη, ενώ η ίδια η TraI μεταφέρεται και αυτή μαζί με τη μεταφερόμενη αλυσίδα (T-strand) (Dostal *et al.*, 2011). Ο παράγοντας IHF διεγείρει τη δράση της TraI (Inamoto *et al.*, 1994) και συμμετέχει στη δημιουργία της τρισδιάστατης δομής του χαλαροσώματος επάγοντας στρέψεις στο DNA κατά γωνία 123° έως 140° (Seong *et al.*, 2002). Η TraM, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 127 αμινοξέων, έχει βρεθεί ότι ενισχύει της αντίδραση εγκοπής του πλασμιδίου F, προετοιμάζοντας έτσι τη μεταφορά του (Kupelwieser *et al.*, 1998; Ragonese *et al.*, 2007). Ρυθμίζει επίσης τη σύζευξη του πλασμιδίου διαβιβάζοντας το σήμα για την έναρξη της μεταφοράς του, μέσω παράλληλης σύνδεσης με τη μεμβράνη (Willetts & Wilkins 1984).



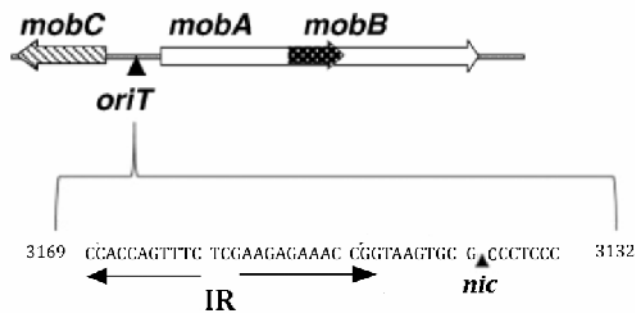
**Σ γ ή μ α 22.** Όταν σταθεροποιηθεί η επαφή των δύο κυττάρων μέσω της συζευκτικής πύλης, διαβιβάζεται ένα σήμα, μέσω της TraM, στο χαλαρόσωμα (που περιέχει την πρωτεΐνη TraI και την περιοχή *oriT*) και ξεκινά η μεταφορά του DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εκτόπιση της μονής αλυσίδας του πλασμιδίου F (T-strand), η οποία και περνά στο κύτταρο-δέκτη. Μετά την εγκόπη, η πρωτεΐνη TraI παραμένει δεσμευμένη στο 5'-άκρο της μεταφερόμενης αλυσίδας και παράλληλα βρίσκεται συνδεδεμένη στη μεμβράνη του κυττάρου-δότη κατά την ενδοκυτταρική σύνδεση. Καθώς η αλυσίδα ξετυλίγεται και κινείται προς το κύτταρο-δέκτη, αρχίζει η αντιγραφή των μονών αλυσίδων, τόσο της παραμένουσας στο κύτταρο-δότη, όσο και της συμπληρωματικής της στο κύτταρο-δέκτη. Η μεταφορά ολοκληρώνεται όταν η μεταφερόμενη αλυσίδα επανακυκλωποιηθεί στην περιοχή *oriT* (Firth *et al.*, 1996).

Τέλος, η TraY, εκτός από ρυθμιστική για ολόκληρη τη δέσμη γονιδίων *tra*, φαίνεται να είναι μια μικρή (75 αμινοξέων) βοηθητική πρωτεΐνη, που διευκολύνει τη δέσμευση της ρηλαξάσης στο DNA και η οποία έχει βρεθεί στον κυτταρικό φάκελο (Nelson *et al.*, 1995).

**IncQ πλασμίδια (RSF1010):** Για την κινητοποίηση του RSF1010 απαιτείται μια περιοχή 1,8 kb του πλασμιδίου (Derbyshire *et al.*, 1987). Η ελάχιστη λειτουργική περιοχή *oriT* είναι 38 bp και συνδέεται ανοδικά με τα γονίδια *mobA* και *mobB* και καθοδικά με το *mobC*.

*In vitro* πειράματα για τη διάσπαση τόσο γραμμικού όσο και υπερσπειρωμένου RSF1010 στην περιοχή *oriT*, παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$  και των πρωτεϊνών MobA, MobB και MobC, έδειξαν ότι για τη διάσπαση του γραμμικού DNA απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα MobC (Scherzinger *et al.*, 1993). Οι πρωτεΐνες MobA (78 kDa πρωτεΐνη επίσης γνωστή και σαν RepB) και MobC, είναι αυτές που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη διάσπαση του υπερσπειρωμένου DNA, ενώ η MobB έχει διεγερτικό αποτέλεσμα. Έχει βρεθεί ότι η MobC λαμβάνει μέρος στο χαλαρόσωμα αλληλεπιδρώντας με τη MobA.

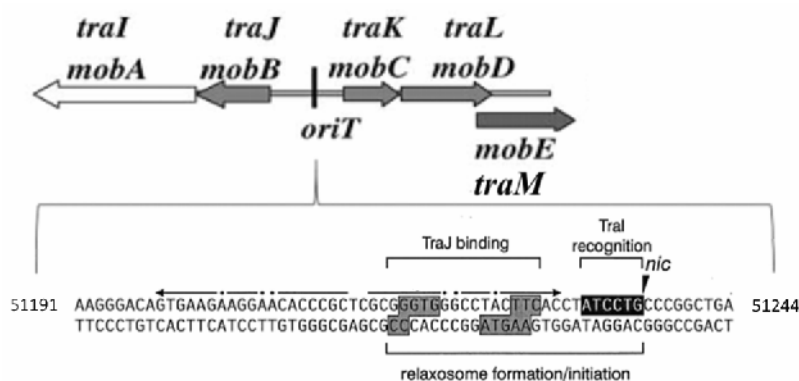




**Σχήμα 23.** Χάρτης της συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του πλασμιδίου RSF1010 (Meyer, 2009). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά του πλασμιδίου σημειώνονται με παχιά βέλη ( $\Rightarrow$ ). Η φορά τους φανερώνει την κατεύθυνση μεταγραφής τους. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι της περιοχής *oriT*. Οι χαρακτηριστικές περιοχές αντίστροφων επαναλήψεων (IR) σημειώνονται με οριζόντια βέλη. Οι βάσεις που αναγνωρίζονται από την MobA είναι σε μαύρο πλαίσιο. Η θέση διάσπασης (*nic*) υποδεικνύεται από το βέλος ( $\blacktriangledown$ ).

Η σύνδεση της MobC στην περιοχή *oriT* ίσως έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση της MobA με τη θέση αναγνώρισής της πάνω στη μονή αλυσίδα του DNA την οποία και διασπά (Lanka & Wilkins, 1995).

**IncP πλασμίδια (RP4):** Η περιοχή κινητοποίησης των πλασμιδίων αυτών αποτελείται από πέντε γονίδια, *traI(mobA)*, *traJ(mobB)*, *traK(mobC)*, *traL(mobD)* και *traM(mobE)*. Ανάμεσά τους βρίσκεται και η περιοχή *oriT* (Σχήμα 24).



**Σχήμα 24.** Χάρτης συζευκτικής περιοχής κινητικότητας του πλασμιδίου RP4 (Francia *et al.*, 2004). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά του πλασμιδίου σημειώνονται με παχιά βέλη ( $\Rightarrow$ ). Η φορά τους φανερώνει την κατεύθυνση μεταγραφής τους. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι της περιοχής *oriT*. Οι χαρακτηριστικές περιοχές αντίστροφων επαναλήψεων (IR) σημειώνονται με οριζόντια βέλη. Οι βάσεις που αναγνωρίζονται από την TraI είναι σε μαύρο πλαίσιο. Η θέση διάσπασης (*nic*) υποδεικνύεται από το βέλος ( $\blacktriangledown$ ).

*In vitro* πειράματα έδειξαν ότι για τη δημιουργία του χαλαροσώματος, απαραίτητες είναι οι πρωτεΐνες TraI, TraJ και TraK. Η πρώτη είναι η ρηλαξάση, ενώ οι άλλες βοηθούν στη δημιουργία και σταθεροποίηση του χαλαροσώματος. Συγκεκριμένα, η TraJ (M.B. 13,5 kDa), δεσμεύεται στο DNA σε μια περιοχή κοντά στη θέση *nic*. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζεται από την TraI, η οποία δεν είναι ικανή να δεσμευτεί με το δίκλωνο μόριο άμεσα (Lanka & Wilkins, 1995).

Η πρωτεΐνη TraK (M.B. 14,7 kDa) είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές στην υπερσπείρωση της αλυσίδας DNA στην θέση *nic*. Πειράματα αποτυπώματος DNA με DNaseI (DNaseI footprinting DNA) έδειξαν ότι μόρια TraK αλληλεπιδρούν με την *oriT*, καλύπτοντας μία περιοχή περίπου 200 ζευγών βάσεων. Με το δεδομένο ότι η διάσπαση της περιοχής *oriT* απαιτεί αρνητικά υπερσπειρωμένο DNA, το σύμπλοκο TraK-*oriT* μπορεί να συμβάλλει στο ξεδίπλωμα της αλυσίδας στη θέση *nic*, δημιουργώντας θετική υπερσπείρωση και ευκολότερη πρόσβαση από την TraI.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες TraL και TraM, ο ρόλος τους μέχρι σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστος (Zechner *et. al.*, 2000).

### 3.3.4 Εκτύλιξη του DNA

Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί για την παραγωγή μονής αλυσίδας από δίκλωνο DNA, μετά την εγκοπή στην θέση *nic*:

1. Νουκλεολυτική αποσύνθεση της δεύτερης αλυσίδας, σε αναλογία με την πρόσληψη DNA στο φυσικό μετασχηματισμό (Stewart & Carlson, 1986).
2. Εκτόπιση της μίας αλυσίδας με τη δράση πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της *de novo* σύνθεσης του DNA.
3. Εκτύλιξη (ξεδίπλωμα) με τη δράση μιας DNA ελικάσης με ή χωρίς *de novo* σύνθεση του DNA (Matson & Kaiser-Rogers, 1990). Το συζευκτικό ένζυμο μπορεί να είναι κωδικοποιήσιμο από το ίδιο το πλασμίδιο ή από το κύτταρο-ξενιστή.

Εκτύλιξη πλασμιδιακού DNA έχει καλύτερα μελετηθεί στο F σύστημα. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ο πρώτος μηχανισμός αποκλείστηκε με την απόδειξη ότι η μη μεταφερόμενη αλυσίδα του F πλασμιδίου παραμένει στο κύτταρο δότη (Varnek & Rupp, 1970). Ο δεύτερος μηχανισμός δεν μπορεί να παρέχει την μόνη πορεία μεταφοράς γιατί

βρέθηκε ότι η μεταφορά του F συνεχίζεται αν εμποδιστεί η σύνθεση του DNA στο κύτταρο-δότη (Kingsman & Willetts, 1978). Αντίθετα, ο τρίτος μηχανισμός φαίνεται να είναι ο πιο επικρατέστερος. Το ρόλο του ενζύμου τον παίζει η πολυλειτουργική πρωτεΐνη TraI που έχει δράση ssDNA-εξαρτώμενης ATPάσης και ελικάσης/ρηλαξάσης. Η TraI πραγματοποιεί την εγκοπή και παραμένει συνδεδεμένη στο 5'-*oriT*-άκρο του πλασμιδίου. Θυμίζουμε ότι αρχικά η TraI είχε χαρακτηριστεί από τον Hoffmann-Berling και τους συνεργάτες του ως DNA ελικάση I (Geider & Hoffmann-Berling, 1981). *In vitro* πειράματα με ετερόλογα μόρια DNA έδειξαν ότι το ένζυμο δρα μόνο προς την κατεύθυνση 5' → 3' (Kuhn *et al.*, 1979).

Η πρωτεΐνη TraI (1756 αμινοξέα, M.B. 182 kDa) περιέχει δυο περιοχές δέσμησης νουκλεοτιδίων (nucleotide binding site - NBS) με δράση ATPάσης. Οι περιοχές αυτές, που ταυτοποιήθηκαν μετά από σύγκριση με γνωστές διατηρημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, βρίσκονται η μία στο N-τελικό άκρο της, από το αμινοξύ 177 έως το 184 (SDKVGTKG) και η δεύτερη στο C-τελικό άκρο του μορίου, από το αμινοξύ 992 έως το 1003 (VQGYAGVGKTTQ [Bradshaw *et al.*, 1990]).



**Σ γ ή μ α 25.** Περιοχές της πρωτεΐνης TraI. Η περιοχή με δράση ρηλαξάσης βρέθηκε μεταξύ του 1ου και του 306ου αμινοξικού κατάλοιπου, η περιοχή με δράση ελικάσης μεταξύ του 990ου και 1476ου αμινοξικού κατάλοιπου ενώ η περιοχή δέσμησης σε ssDNA και TraM από το 1504ο έως το τέλος.

Τέλος έχει βρεθεί μία ακόμη περιοχή στο C-τελικό άκρο (προσδιορίστηκε ύστερα από απάλειψη των τελευταίων 252 αμινοξέων), η οποία δεσμεύεται σε ssDNA (Guogas *et al.*, 2009) αλλά και στην πρωτεΐνη TraM (Ragonese *et al.*, 2007).

Η DNA ελικάση I (TraI), είναι η κύρια ελικάση που εμπλέκεται στην εκτύλιξη του πλασμιδίου F στο κύτταρο δότη (Abdel-Monem *et al.*, 1983). Απαιτεί μια περιοχή περίπου 150 νουκλεοτιδίων (50 αριστερά της θέσης *nic* και 100 δεξιά της) μονόκλωνου DNA (ssDNA) για να ξεκινήσει το ξεδίπλωμα *in vitro*. Μετά τη δέσμευσή της και τη δημιουργία συμπλόκου στην περιοχή *oriT*, το αμινοξύ τυροσίνη-16 (Tyr-16) επιδρά με πυρηνόφιλη προσβολή στο DNA και το διασπά δημιουργώντας την απαραίτητη εγκοπή στη μία αλυσίδα

του. Η τυροσίνη αυτή είναι μέρος του μοτίβου YY-X<sub>5-6</sub>-YY (Tyr16, Tyr17, Tyr23 και Tyr24) το οποίο είναι καλά συντηρημένο στην οικογένεια συζευκτικών ρηλαξασών INQ<sub>F</sub> (Byrd & Matson, 1997). Στη συνέχεια επιστρατεύει την ικανότητά της να δρα σαν ελικάση και ξεδιπλώνει το DNA στην συγκεκριμένη περιοχή καθιστώντας το μονόκλωνο. Το σύμπλοκο αυτό κινείται κατά μήκος της αλυσίδας του DNA, χρησιμοποιώντας την ενέργεια της υδρόλυσης του ATP για να εκτύλιξει το DNA. Η ταχύτητα εκτύλιξης είναι περίπου 1 kb ανά δευτερόλεπτο στους 37°C (Geider & Hoffmann-Berling, 1981), υπερβαίνοντας τη ταχύτητα μεταφοράς του χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα-δότες Hfr (0,75 kb ανά δευτερόλεπτο στους 37°C). Η αντίδραση εκτύλιξης μπορεί να αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την μεταφορά του DNA, μόνο στην περίπτωση που η TraI βρίσκεται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός ότι η φυσική θέση της TraI είναι στο κυτταρόπλασμα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι προφανώς αλληλεπιδρά με άλλη πρωτεΐνη Tra που βρίσκεται στην εσωτερική κυτταρική μεμβράνη και η οποία δρα σαν «άγκυρα» για την TraI. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η TraD (Dash *et al.*, 1992). Έτσι η TraI ακινητοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου δότη προσφέροντας την απαραίτητη ενέργεια (Silverman, 1987).

Μη συζευκτικές ελικάσες έχουν βρεθεί στα συστήματα μεταφοράς των πλασμιδίων IncP, IncQ και Ti. Το RSF1010 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη (RepA) με δραστηριότητα ελικάσης και ss-DNA εξαρτώμενης ATPασης, αλλά εμπλέκεται στη βλαστική αντιγραφή και όχι στην κινητικότητα του RSF1010 (Derbyshire *et al.*, 1987).

### 3.3.5 Τερματισμός της μεταφοράς

Ένας γύρος της βακτηριακής μεταφοράς DNA τελειώνει με την επανασύνδεση των άκρων της T-αλυσίδας, έτσι ώστε να παραχθεί ένας ομοιοπολικά κλειστός κύκλος. Η κυκλοποίηση καταλύεται από την πρωτεΐνη χαλάρωσης (ρηλαξάση) που βρίσκεται προσδεδεμένη στο 5'-P άκρο της μεταφερόμενης αλυσίδας, παίρνοντας ενέργεια για την επανασύνδεση από την ενέργεια του φωσφοδιεστερικού δεσμού που διατηρείται και στο ενδιάμεσο προϊόν DNA-πρωτεΐνης (Lanka & Wilkins, 1995).



**Σ γ ή μ α 26.** Χαρακτηριστικά των αλληλουχιών των πλασμιδίων RSF1010, F και RP4 στην περιοχή τερματισμού της μεταφοράς. Οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις αντίθετης φοράς δείχνονται με οριζόντια βέλη. Οι αστερίσκοι προσδιορίζουν τις θέσεις στο πλασμίδιο F όπου μεταλλάξεις μετάπτωσης αναστέλλουν τη διάσπαση στην περιοχή *oriT* και συνεπώς τον τερματισμό της μεταφοράς του. Οι περιοχές phased A-tracts υπογραμμίζονται.

Στο **σχήμα 26** εικονίζονται τρεις ομάδες περιοχών *oriT* ανάλογα με το αν περιέχουν μια αντίστροφη επανάληψη, ανοδικά της θέσης *nic*.

Αυτή η επανάληψη είναι απαραίτητη για τον τερματισμό της μεταφοράς. Οι βραχίονες ίσως σχηματίζουν μια δευτεροταγή δομή στην T-αλυσίδα, η οποία "παγιδεύει" την πρωτεΐνη χαλάρωσης που είναι συνδεδεμένη στην μονή αλυσίδα.

Ειδικά για το πλασμίδιο F, αποτελεσματικός τερματισμός της μεταφοράς του απαιτεί εκτός από την ύπαρξη της αντίστροφης νουκλεοτιδικής επανάληψης και μία ακέραιη η περιοχή ανάμεσα στην επανάληψη και στη θέση *nic*, αφού παρουσιάστηκε αναστολή του τερματισμού της μεταφοράς από δυο μεταλλάξεις μετάπτωσης στην περιοχή αυτή (Gao *et al.*, 1994).

### 3.3.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πορείας του DNA και του συζευκτικού πόρου

Υπάρχουν διάφορα στάδια όπου το DNA, ύστερα από τις αντιδράσεις που γίνονται στην περιοχή *oriT*, αλληλεπιδρά με τον συζευκτικό πόρο. Αυτή η διαδικασία του συστήματος F εμπλέκει 17 ή και περισσότερες πρωτεΐνες Tra που εντοπίζονται στην εσωτερική κυτταρική μεμβράνη, στην περιπλασμική περιοχή ή στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη στα κύτταρα-δότες *E. coli*. Οι περισσότερες πρωτεΐνες απαιτούνται για την δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας (Frost *et al.*, 1994). Η συζευκτική επαφή σε υγρή καλλιέργεια ξεκινά με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των απολήξεων των συζευκτικών τριχιδίων και των υποδοχέων, πιθανά λιποπολυσακχαριτών, του κυττάρου-δέκτη (Anthony *et al.*, 1994).

Συστολή του συζευκτικού τριχιδίου φέρνει τα κύτταρα σε επιφανειακή επαφή η οποία και σταθεροποιείται με τις πρωτεΐνες TraG και TraN. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει δείξει ότι η περιοχή επαφής, που λέγεται και συζευκτικός σύνδεσμος, ανάμεσα στις δυο επιφάνειες των βακτηρίων, παρουσιάζει μια ασυνήθιστη (unique) ζώνη υψηλής πυκνότητας ηλεκτρονίων, η οποία επικεντρώνεται στις εξωτερικές μεμβράνες των κυττάρων τους (Lanka & Wilkins, 1995).

Στο πλασμιδίο RP4 για τον σχηματισμό του συζευκτικού πόρου χρειάζονται δέκα από τα έντεκα γονίδια *trb* του οπερονίου Tra2 καθώς και το γονίδιο *traF* της περιοχής Tra1 (Lessl *et al.*, 1993). Η περιοχή Tra2 του RP4 σχετίζεται με το οπερόνιο *virB* του πλασμιδίου T1 το οποίο επίσης αποτελείται από 11 γονίδια (Lessl *et al.*, 1992). Μερικές απ' αυτές τις πρωτεΐνες εντοπίζονται στη μεμβράνη και το γεγονός ότι άλλες βρίσκονται συνδεδεμένες με την εσωτερική και άλλες με την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη δηλώνει την ύπαρξη καναλιού στο κυτταρικό τοίχωμα (Thorenston *et al.*, 1993).

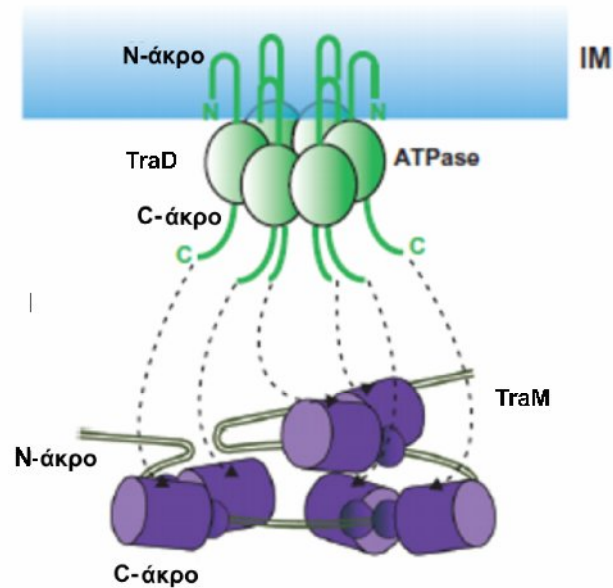
Η μεταφορά του DNA ξεκινά από μερικά μηνύματα που δημιουργούνται ως απόκριση μίας σταθεροποιημένης κυτταρικής επαφής. Στο κύτταρο-δότη το μήνυμα πρέπει να σπάει την ισχυρή μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην πρωτεΐνη χαλάρωσης (relaxase) και το 3'-OH άκρο που δημιουργείται στη θέση *nic* ώστε να δημιουργηθεί μία δομή προσιτή στο μηχανισμό μεταφοράς. Η πορεία του DNA μέσα στα κύτταρα-δέκτες είναι ακόμη άγνωστη. Πιθανά να υπάρχει μία προσχηματισμένη σύνδεση μεταξύ εσωτερικών και εξωτερικών κυτταρικών μεμβρανών και εισχώρηση του DNA (Ippen-Ihler & Minkley, 1986), ή εισαγωγή του DNA σε μία πορεία δυο σταδίων που εμπλέκει ένα περιπλασμικό ενδιάμεσο (Dürrenberger *et al.*, 1991).

### 3.3.7 Σύνδεση του μεταφερόμενου DNA με το συζευκτικό πόρο

Για τη μεταφορά της εκτυλιγμένης T-αλυσίδα στη συζευκτική γέφυρα έχουν αναφερθεί μηχανισμοί που εμπλέκουν για την περίπτωση του πλασμιδίου F την πρωτεΐνη TraD, για την περίπτωση του πλασμιδίου RP4 την πρωτεΐνη TraG, για την περίπτωση του πλασμιδίου T1 την πρωτεΐνη VirD4, (Balzer *et al.*, 1994, Lessl & Lanka, 1994).

Η TraD του πλασμιδίου F είναι μια πρωτεΐνη που η θέση της είναι στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης του *E. coli* (Πίνακας 1). Η πρωτεΐνη αυτή, είναι γνωστό, ότι μεσολαβεί στην εισαγωγή του ssDNA, διαμέσου της συζευκτικής γέφυρας, στο

κύτταρο-δέκτη (Dash *et al.*, 1992), αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένη περιοχή της TraM. Το γεγονός αυτό αποδείχτηκε με κρυσταλλογραφία όταν το τμήμα της F TraM<sup>58-127</sup> συνκρυσταλλώνονταν με τα τελικά 8 αμινοξικά κατάλοιπα του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης TraD (Lu *et al.*, 2008). Επίσης το γεγονός ότι η TraM αλληλεπιδρά και με το C-τελικό άκρο της TraI (Ragonese *et al.*, 2007), αποδεικνύει ότι η TraM είναι αυτή που οδηγεί το χαλαρόσωμα στη συζευκτική γέφυρα, φέρνοντας κοντά την TraI με την TraD προκαλώντας την αλληλεπίδρασή τους (Traxler & Minkley, 1988).



**Σχήμα 27.** Μοντέλο σύνδεσης TraM-TraD στο συζευκτικό πόρο σύμφωνα με τους Wong *et al.*, 2012. Η TraD παρουσιάζεται με πράσινο και η TraM με μωβ. Τα N-τελικά άκρα της TraM εμφανίζονται ως ελλεικοειδή, ενώ τα C-τελικά άκρα της εμφανίζονται ως κύλινδροι. Τα τετραμερή της TraM δεσμεύονται σε τρεις συγκεκριμένες θέσεις της περιοχής *oriT* με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζεται μια πολύ συμπαγής διάταξη μεταξύ τους, γεγονός που διευκολύνει την αλληλεπίδραση της TraM με τα πολλαπλά C-τελικά άκρα της TraD. IM: εσωτερική μεμβράνη.

Η TraD είναι η μοναδική πρωτεΐνη Tra, εκτός απ' αυτές που είναι συστατικά του συζευκτικού πόρου, που είναι γνωστό ότι απαιτείται για την κινητοποίηση του ColE1 (Willets & Wilkins, 1984). Η πρωτεΐνη TraD δεν είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση του CloDF13, ενός σχετικού με το πλασμίδιο ColE1, το οποίο χρησιμοποιεί για το σκοπό αυτό την πρωτεΐνη MobB που παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με τη TraD (Balzer *et al.*, 1994).

Η πρωτεΐνη TraG του RP4 ομοίως είναι η μοναδική πρωτεΐνη Tra, εκτός αυτών του συζευκτικού πόρου, που είναι σημαντική για την κινητικότητα του RSF1010 (Lessl *et al.*, 1993). Το πλασμίδιο αυτό μπορεί να κινητοποιηθεί και μεταξύ βακτηρίων του γένους *Agrobacterium* με τη βοήθεια του Ti. Εδώ είναι απαραίτητη η παρουσία των VirD4 και VirB, οι οποίες και αποτελούν το κανάλι μεταφοράς του DNA (Beijersbergen *et al.*, 1992).

### 3.3.8 Σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA

#### Στο κύτταρο-δότη

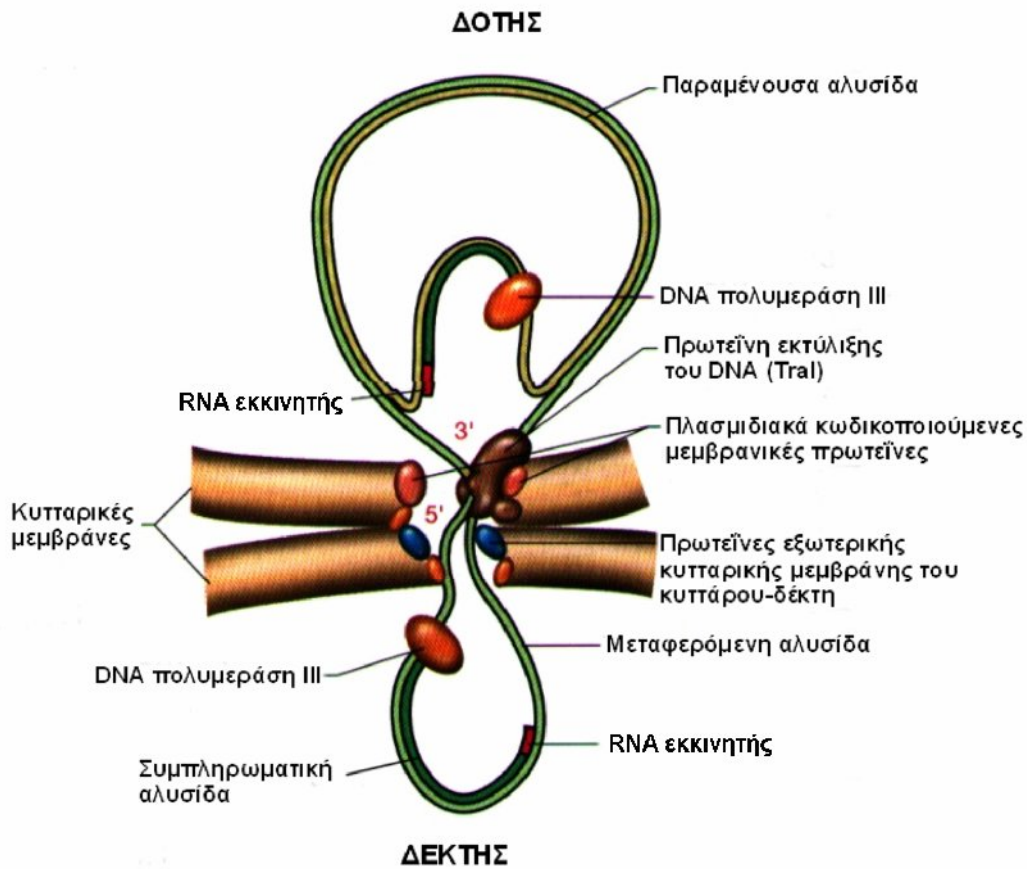
Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας στο κύτταρο-δότη είναι η DNA πολυμεράση III. Η σύνθεση μπορεί να είναι είτε συνεχής και να γίνεται σύμφωνα με το μοντέλο αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου, με την επιμήκυνση δηλ. του 3'-OH άκρου και την εμπλοκή της DNA πολυμεράσης III, είτε ασυνεχής οπότε χρειάζεται η σύνθεση RNA πριμοδοτικών μορίων (με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης του ξενιστή) όπου η μη μεταφερόμενη αλυσίδα λειτουργεί σαν εκμαγείο (**Σχήμα 28**, Kingsman & Willetts, 1978). Γεγονός πάντως είναι πως υπάρχει έλλειψη πληροφόρησης για τα τελικά στάδια της σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA που αφορά κυρίως την αφαίρεση των πριμοδοτικών μορίων, την πλήρωση των κενών και την συνένωση των άκρων της νεοσυντθέμενης αλυσίδας. Πιθανά σ' αυτά τα στάδια να εμπλέκονται η DNA πολυμεράση I και η DNA λιγάση του ξενιστή.

#### Στο κύτταρο-δέκτη

Δεν είναι ακόμα γνωστό αν η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας στο κύτταρο-δέκτη είναι συνεχής ή ασυνεχής διαδικασία αλλά το **Σχήμα 28** παραδέχεται ως δεδομένο τη μη συνεχή σύνθεση, περιλαμβάνοντας σχηματισμό πολλών διαφορετικών μορίων εκκινητών. Παρ' όλο που αυτός είναι ο πιο πολύπλοκος μηχανισμός, έχει την ιδιότητα να ελαχιστοποιεί τη συσσώρευση μονόκλωνων μορίων DNA στο κύτταρο-δέκτη, ελαττώνοντας παράλληλα τη δυνατότητα το μεταφερόμενο DNA να πάθει ανεπανόρθωτες ζημιές, όπως π.χ. σπάσιμο της μονόκλωνης αλυσίδας. Έχει ήδη αναφερθεί ότι η TraI μεταφέρεται μαζί με τη μονόκλωνη αλυσίδα στο κύτταρο-δέκτη, «ψάχνοντας» το σημείο τερματισμού της μεταφερόμενης αλυσίδας. Μόλις συμβεί αυτό, ενώνει τα δύο άκρα ανασυγκροτώντας ένα μονόκλωνο DNA. Το σημείο τερματισμού, πριν εισέλθει στο



κύτταρο-δέκτη, έχει ήδη αναγνωριστεί και αποκοπεί στο κύτταρο-δότη από ένα άλλο μόριο TraI (Garcillan-Barcia *et al.*, 2007).



**Σ γ ή μ α 28.** Μοντέλο συζευκτικής μεταφοράς του πλασμιδίου F κατά Willetts & Wilkins, 1984. Η μία αλυσίδα του πλασμιδίου διασπάται στην περιοχή *oriT* από την ενδονουκλεάση TraYZ και μεταφέρεται με την κατεύθυνση 5' → 3' διαμέσω πόρου, που σχηματίζεται μεταξύ του κυττάρου-δότη και του κυττάρου-δέκτη. Τα άκρα της μεταφερόμενης αλυσίδας συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με ένα σύμπλεγμα που περιέχει την ενδονουκλεάση. Η DNA ελικάση (το προϊόν του γονιδίου *traI*), συνδέεται με την αλυσίδα που υφίσταται μεταφορά, προκαλώντας έτσι εκτύλιξη του δίκλωνου DNA. Η υδρόλυση του ATP ίσως δίνει την ενέργεια προώθησης της μεταφερόμενης αλυσίδας στο κύτταρο-δέκτη. Η μεταφορά του DNA συνδέεται με την σύνθεση της αλυσίδας αντικατάστασης στο κύτταρο-δότη και στο κύτταρο-δέκτη. Και στις δύο περιπτώσεις απαιτείται *de novo* σύνθεση μορίου εκκινήτη και δράση της DNA πολυμεράσης III. Το μοντέλο θεωρεί ότι μια SSB-πρωτεΐνη συνδέεται με το DNA βοηθά στη σύνθεση της αλυσίδας αντικατάστασης, και μπορεί να μεταφέρεται από το δότη στο δέκτη δεσμευμένη πάνω στο DNA.

### 3.4 Μεταφορά χρωμοσωμικού DNA μέσω της βακτηριακής σύζευξης

Στα κύτταρα F<sup>+</sup>, που φέρουν ελεύθερα το συζευκτικό πλασμίδιο F μπορεί να πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός ειδικής θέσης μέσω των αλληλουχιών εισδοχής IS2, IS3a και IS3b τις οποίες φέρει με αποτέλεσμα το πλασμίδιο να ενσωματωθεί σε

αντίστοιχες συγκεκριμένες θέσεις του χρωμοσώματος του κυττάρου-δότη. Η συχνότητα της ενσωμάτωσης είναι περίπου  $10^{-5}$  κύτταρα ανά γενιά. Τα κύτταρα, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί ενσωμάτωση του παράγοντα F, ονομάζονται κύτταρα Hfr (high frequency of recombination) επειδή εμφανίζουν υψηλή συχνότητα μεταφοράς του χρωμοσωμικού γενετικού υλικού και επομένως και ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός ειδικής θέσης πραγματοποιείται στις θέσεις εισδοχής του πλασμιδίου και σε αντίστοιχες συγκεκριμένες θέσεις του χρωμοσώματος του κυττάρου.

Η διαφορά των κυττάρων Hfr από τα  $F^+$  είναι ότι τα Hfr μεταφέρουν πρώτα το βακτηριακό τους χρωμόσωμα και αν προλάβουν και το πλασμίδιο F, ενώ τα  $F^+$  δίνουν μόνο το πλασμίδιο F. Έχει βρεθεί ότι χρειάζονται 100 min, για να μεταφερθεί το συνολικό χρωμόσωμα του *E. coli* από ένα κύτταρο-δότη Hfr σε ένα κύτταρο-δέκτη  $F^-$  (ενώ ο μέσος χρόνος διπλασιασμού είναι περίπου 30 min).

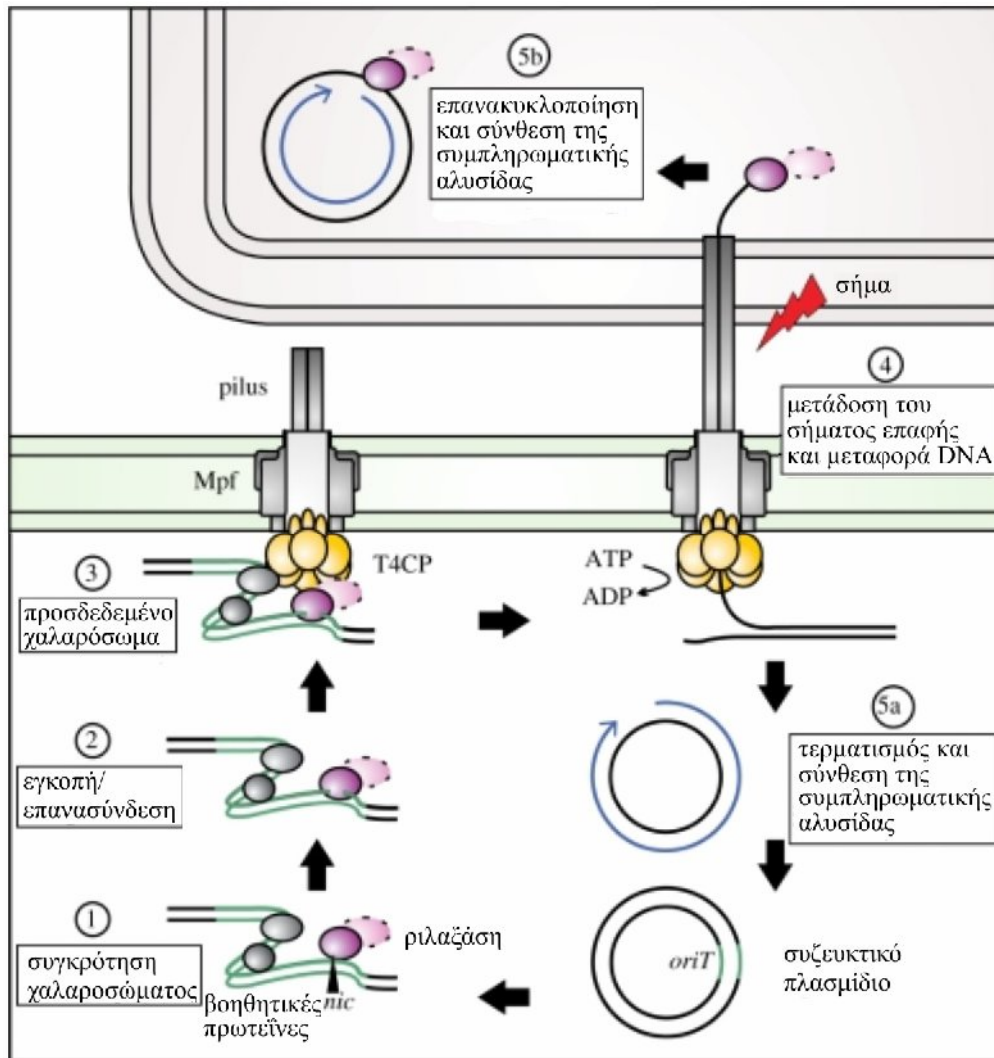
Η σειρά των εισερχομένων γονιδίων στο κύτταρο-δέκτη εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του παράγοντα F στο χρωμόσωμα καθώς και από τον προσανατολισμό του. Επομένως, εφ' όσον η ταχύτητα της μεταφοράς της χρωμοσωμικής αλυσίδας είναι σταθερή κατά τη σύζευξη, τότε διακόπτοντας τη σύζευξη σε διαφορετικούς χρόνους, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ποιοι γενετικοί δείκτες έχουν μεταφερθεί και με αυτόν τον τρόπο να κατασκευαστεί ο γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος του βακτηρίου (μέθοδος διακοπτόμενης σύζευξης).

Ένα κύτταρο Hfr μπορεί να μετατραπεί σε κύτταρο  $F^+$  με την εκτομή του πλασμιδίου F από το χρωμόσωμα, η οποία γίνεται με την ίδια συχνότητα που γίνεται και η ενσωμάτωση. Συνήθως αυτή η εκτομή από το χρωμόσωμα γίνεται σε σημεία διαφορετικά από εκείνα της εισόδου. Έτσι προκύπτουν είτε πλασμίδια τα οποία φέρουν και γονίδια του χρωμοσωμικού DNA και ονομάζονται  $F'$  πλασμίδια, είτε πλασμίδια μικρότερου μεγέθους όταν κατά την εκτομή τους από το χρωμόσωμα αφήνουν τμήμα τους πάνω σ' αυτό.

### **3.5 Σύγχρονες απόψεις για τη μεταφορά DNA μέσω βακτηριακής σύζευξης**

Τα συστήματα έκκρισης τύπου IV (T4SSs) είναι κυτταρικοί μηχανισμοί που απαντώνται σε μεγάλο εύρος προκαρυωτικών κυττάρων όπως  $\text{Gram}^+$  βακτήρια,  $\text{Gram}^-$  βακτήρια και

αρχαία. Βασίζονται στη έκκριση μακρομορίων από τα κύτταρα, μέσω ενός πολυπρωτεϊνικού καναλιού που σχηματίζεται στην κυτταρική μεμβράνη.



**Σ γ ή μ α 29.** Γενικός μηχανισμός πλασμιδιακής μεταφοράς κατά Zechner *et al.*, 2012. Διακρίνεται το συζευκτικό πλασμίδιο που διαθέτει μια περιοχή *oriT* και το οποίο κωδικοποιεί για πρωτεΐνες υπεύθυνες για τον σχηματισμό συζευκτικών τριχιδίων, για πρωτεΐνες υπεύθυνες για το σχηματισμό συζευκτικού πόρου (Mpf –T4 channel), την T4CP (κίτρινο χρώμα), το σύμπλοκο έναρξης της έκκρισης (χαλαρόσωμα), το υπόστρωμα της έκκρισης και τέλος η ρηλαξάση με την δυνατότητα δημιουργίας εγκοπής στο μόριο του DNA (ροζ χρώμα). Το T-DNA οδηγείται όπως περιγράφεται στο κείμενο και μεταφέρεται σαν ssDNA. Η συμπληρωματική αλυσίδα παραμένει κυκλικό μόριο σε όλη τη διάρκεια της μεταφοράς.

Οι τελευταίες επιστημονικές απόψεις υποστηρίζουν ότι τα συστήματα βακτηριακής σύζευξης αποτελούν τη μεγαλύτερη και την πιο διαδεδομένη υποκατηγορία του μηχανισμού αυτού (Zechner *et al.*, 2012; de la Cruz, *et al.*, 2010). Τα πλασμίδια των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων είναι τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα. Πρόκειται για αυτομεταβιβάσιμα

εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία, τα οποία κωδικοποιούν τα ίδια το σύνολο των μηχανισμών που χρειάζονται για τη μεταφορά τους σε άλλο κύτταρο-δέκτη. Οι μηχανισμοί αυτοί προϋποθέτουν τον σχηματισμό συζευκτικού πόρου (mating pore formation – MPF) μέσω του οποίου γίνεται η μεταφορά DNA.

Ο γενικός μηχανισμός της μεταφορά πλασμιδίων φαίνεται στο **Σχήμα 29**. (i) Ένα σύνολο πρωτεϊνών δεσμεύονται στην περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*) για να σχηματίσουν το χαλαρόσωμα. (ii) Το σταθερό σύμπλοκο που σχηματίζεται προετοιμάζει το DNA για τη μεταφορά του. Η ρηλαξάση προκαλεί εγκοπή στο μόριο ώστε να δημιουργηθεί το μονόκλωνο DNA (T-strand). Η έναρξη της μεταφοράς απαιτεί την διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού σε μια συγκεκριμένη θέση, εντός της *oriT*, στη θέση *nic*. Η αντίδραση γίνεται με τη μεσολάβηση ενός υπολείμματος τυροσίνης της ρηλαξάσης, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το ομοιοπολικό σύμπλοκο τυροσίνης:DNA. (iii) Το σύμπλοκο αυτό, πλασμιδιακού DNA και πρωτεϊνών, αναγνωρίζεται από την πλασμιδιακή T4CP. (iv) Το σήμα για την έναρξη της μεταφοράς μεταδίδεται και η ρηλαξάση, που είναι συνδεδεμένη στο μονόκλωνο DNA (T-strand) αντλείται μέσω του συζευκτικού πόρου. (v) Στο κύτταρο-δέκτη, μετά τη λήξη της μεταφοράς, το μόριο επανασυνδέεται με τη βοήθεια της δεσμευμένης ρηλαξάσης, έχοντας σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μονόκλωνου κυκλικού μορίου και ελευθερώνοντας το μόριο της ρηλαξάσης. (vi) Τέλος, η σταθεροποίηση των αρχικών μορίων, τόσο στο δέκτη όσο και στο δότη, γίνεται με τη δημιουργία δίκλωνων μορίων μέσω των μηχανισμών που περιγράφησαν παραπάνω.

### 3.6 Συζευκτικά μεταθετά στοιχεία

Τα συζευκτικά μεταθετά στοιχεία είναι μία σχετικά καινούργια κατηγορία κινητών γενετικών στοιχείων, τα οποία εκτός από αλληλουχίες υπεύθυνες για την μετάθεσή τους στο χρωμοσωμικό ή πλασμιδιακό DNA, μεταφέρουν και περιοχές που δρουν *in cis* και *in trans* με λειτουργίες παρόμοιες αυτών των κινητικών πλασμιδίων. Αυτό το είδος κινητού DNA δείχνει ότι μάλλον δεν υπάρχουν όρια για την εξάπλωση των πλασμιδίων και των γενετικών τους χαρακτηριστικών στον μικροβιακό κόσμο.

Δύο τύποι συζευκτικών μεταθετών στοιχείων έχουν διευκρινισθεί μέχρι σήμερα. Αυτά που βρίσκονται πάνω σε μη-συζευκτικά μη-κινητικά πλασμίδια, καθιστώντας τα έτσι

κινητικά (μεταθετές κασέτες κινητοποίησης = transposable mobilization cassettes), και αυτά που υπάρχουν ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του ξενιστή αλλά που μεταφέρονται ανεξάρτητα σε κύτταρα-δέκτες (συζευκτικά τρανσποζόνια) (Clewell & Flannangan, 1993).

### 3.6.1 Μεταθετές κασέτες κινητοποίησης

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας μεταθετών στοιχείων είναι το τρανσποζόνιο Tn4399 (9,6 kb), που βρέθηκε στο *Bacteroides fragilis* (Hecht & Malamy, 1989). Μη συζευκτικά πλασμίδια, αποκτώντας το Tn4399 γίνονται κινητοποιήσιμα σε κύτταρα *E. coli* και μεταφέρονται σε *E. coli* και *Bacteroides* όταν συνυπάρχουν με τα συζευκτικά πλασμίδια IncPα και IncPβ (Murphy & Malamy, 1993).

Η ελάχιστη περιοχή που είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση των στοιχείων αυτών έχει μέγεθος 2,8 kb, περιέχει μια περιοχή *oriT* και δύο πλαίσια ανάγνωσης, που κωδικοποιούν για τα πρωτεϊνικά μόρια MocA (M.B. 36,4 kDa) και MocB (M.B. 16,4 kDa) (Murphy & Malamy, 1993). Μια περιοχή 14 αμινοξέων της πρωτεΐνης MocA, παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με μια σειρά πρωτεϊνών χαλάρωσης (**Πίνακας 4**) που κωδικοποιούνται από διάφορα συζευκτικά ή κινητοποιήσιμα πλασμίδια (Pansegrau & Lanka, 1991).

**Πίνακας 4.** Ομολογίες αλληλουχιών της πρωτεΐνης MocA με άλλες πρωτεΐνες Mob, σύμφωνα με τους Pansegrau & Lanka, 1991.

MocA (Tn4399)	102	V I V A R H T D R E H P H C H I V F N R V D N D
MobA (pC221)	94	V A V Y T H T D K D H Y H N H I V I N S V D L E
Rlx1 (pS194)	94	V A V Y T H T D K D H Y H N H I I I N S V N L E
NikB (R64)	153	Y V S A V H T D T D N L H V H V A V N R V H P E
VirD2 (pTiA6)	126	V L T A Y H V D R D H P H L H V V V N R R E L L
VirD2 (pRiA4)	126	V L T A F H I D R D H P H L H V V V N R R E L L
TraI (RP4)	104	R V S A V H H D T D N L H I H I A I N K I H P T
TraI (R751)	104	R I S A V H H D T D N L H I H I A I N K I H P T
Rlx (pC223)	94	V A V Y T H N D T D H V H N H I V I N S I D L E

Η πρωτεΐνη MocB είναι επίσης απαραίτητη για την κινητοποίηση και η δράση της είναι *in trans*. Το γονίδιο αυτό δεν έδειξε αξιόλογες ομοιότητες με άλλα γονίδια πρωτεϊνών μεταφοράς (Murphy & Malamy, 1993).

Η περιοχή *oriT* της "κασέτας κινητοποίησης" Tn4399 εντοπίστηκε σε ένα τμήμα αυτού, με μεγέθους 199 kb. Περιλαμβάνει μια αλληλουχία 46 bp, η οποία έδειξε 64% ομολογία με μέρος της περιοχής *oriT* του πλασμιδίου pC221 του *S. aureus* (Projan *et al.*, 1985). Επιπλέον ομοιότητα μεταξύ του τρανσποζονίου Tn4399 και του πλασμιδίου pC221 αποτελεί το γεγονός ότι, το pC221 κωδικοποιεί κι αυτό για δύο πρωτεΐνες κινητοποίησης, τις MobA και MobB, οι οποίες δεσμεύονται στην περιοχή *oriT* προς σχηματισμό χαλαροσώματος (Projan & Archer, 1989). Οι πρωτεΐνες MobA (pC221) και MocA (Tn4399) παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην συναινετική περιοχή των 14 αμινοξέων (Πίνακας 4). Δεν υπάρχει όμως καμία ομοιότητα μεταξύ των MobB και MocB (Murphy & Malamy, 1993).

### 3.6.2 Συζευκτικά τρανσποζόνια

Αυτά είναι μορφές DNA που μοιάζουν με τρανσποζόνια ή και με πλασμίδια, ικανά να μεταφέρονται σε βακτηριακούς δέκτες (Salyers *et al.*, 1995a). Μοιάζουν με τρανσποζόνια γιατί μπορούν να ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα του ξενιστή τους και να αποκόπτονται απ' αυτό με διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι διαφέρουν εκείνων των συμβατικών τρανσποζονίων, όπως των Tn5 και Tn10 (Scott, 1992, Bedzyk *et al.*, 1992). Οι διαφορές έχουν να κάνουν με το γεγονός ότι τα συζευκτικά τρανσποζόνια σχηματίζουν ένα ομοιοπολικό κλειστό κύκλο ως ενδιάμεσο και δεν αναπαράγονται όταν ενσωματώνονται στο DNA. Από αυτή την άποψη, η αποκοπή και ενσωμάτωση των συζευκτικών τρανσποζονίων μοιάζει με την πορεία που ακολουθείται από τους φάγους, οι οποίοι επίσης έχουν ένα κυκλικό ενδιάμεσο.

Η πλασμιδιακή φύση των συζευκτικών τρανσποζονίων προέρχεται από το γεγονός ότι, όταν αποκόπτονται από το σημείο που βρίσκονται ενσωματωμένα, αποκτούν μορφή ομοιοπολικό κλειστού κύκλου (ccc). Σε αντίθεση όμως με τα πλασμίδια, η κυκλική αυτή μορφή των συζευκτικών τρανσποζονίων δεν αντιγράφεται στα κύτταρα-δέκτες (Bedzyk *et al.*, 1992).

Τα συζευκτικά τρανσποζόνια έχουν βρεθεί τόσο σε Gram<sup>+</sup> (όπου και πρωτοανακαλύφθηκαν), όσο και σε Gram<sup>-</sup> βακτήρια. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 16 έως 150 kb. Εκτός από τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (τετρακυκλίνη ή ερυθρομυκίνη), περιέχουν και γονίδια ενσωμάτωσης (*int*) και αποκοπήs (*xis*). Η ενσωμάτωση δεν είναι απόλυτα εξειδικευμένη αλλά δεν είναι τυχαίο γεγονός. Υπάρχουν ορισμένες συγκεκριμένες θέσεις επί του DNA του δέκτη (3-6) όπου γίνεται.

Ένα πολύ ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των συζευκτικών τρανσποζονίων, με μεγάλη κοινωνική και περιβαλλοντική επίδραση, είναι η ικανότητά τους να κινητοποιούν συνυπάρχοντα πλασμίδια. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους: (α) *in trans*, εφοδιάζοντας το κύτταρο με τον συζευκτικό πόρο, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα συνυπάρχοντα πλασμίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κινητοποίησης για να μεταφερθούν στα βακτηριακά κύτταρα-δέκτες (Clewell & Flanagan 1993), και (β) *in cis*, ενσωματώνοντας μη-κινητοποιήσιμα πλασμιδιακά μόρια (Shoemaker & Salyers 1990; Bedzyk *et al.*, 1992).

Οι περιοχές των συζευκτικών τρανσποζονίων που δρουν *in cis* και *in trans*, δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί πλήρως. Περιοχές *oriT* έχουν βρεθεί, πλην όμως, δεν έχουν δείξει καμία νουκλεοτιδική ομοιότητα με τις περιοχές *oriT* πλασμιδίων (Lessl & Lanka, 1994). Ένα γονίδιο *mob* έχει ταυτοποιηθεί κοντά σε περιοχή *oriT*, το προϊόν του οποίου μοιάζει με την πρωτεΐνη κινητοποίησης του πλασμιδίου ColE1 του *E. coli* (Salyers *et al.*, 1995b). Οι περιοχές Tra των συζευκτικών τρανσποζονίων που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα εμφανίζονται να είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες των συζευκτικών πλασμιδίων όπως π.χ. του F και του RP4.

Μία εξίσου εντυπωσιακή ανακάλυψη είναι η ύπαρξη ενσωματωμένων τμημάτων DNA ικανών να αποκόπτονται από βακτηριακά χρωμοσώματα, να κυκλοποιούνται, και να κινητοποιούνται συζευκτικά σε άλλα κύτταρα-δέκτες. Αυτά τα στοιχεία, τα οποία πρωτοανακαλύφθηκαν στο γένος *Bacteroides* και γι' αυτό ονομάζονται NBU (μη-αντιγραφόμενες μονάδες *Bacteroides* = non-replicating *Bacteroides* units), είναι μικρότερα σε μέγεθος, δεν έχουν σχέση με τα συζευκτικά τρανσποζόνια, δεν μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, αλλά κωδικοποιούν για μία πρωτεΐνη κινητοποίησης ικανή να δεσμευτεί στην δική τους περιοχή *oriT*, να διασπάσει το μόριο και να ξεκινήσει τη μεταφορά ενός μονόκλωνου αντιγράφου NBU, διαμέσου του συζευκτικού πόρου που σχηματίζεται από ένα συζευκτικό τρανσποζόνιο (Shoemaker *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995).

Οι μονάδες NBU δεν μπορούν να αντιγράφονται στο δότη ή στο δέκτη, αλλά ενσωματώνονται στο γονιδίωμά τους με μηχανισμό όμοιο μ' αυτόν του φάγου λ. Μπορούν έτσι να ενσωματώνονται είτε στο χρωμόσωμα, είτε σε πλασμίδια, καθιστώντας τα κινητοποιήσιμα.

## 4. ZYMOMONAS MOBILIS

### 4.1 Ιστορική αναδρομή

Το γένος *Zymomonas* συναντάται σε όλα τα γεωγραφικά μήκη και πλάτη της γης και σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή τοπικών αλκοολικών αφεψημάτων. Ο οργανισμός πρωτοπαρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία το 1912 από τους Barker και Hillier, που το απομόνωσαν από μηλίτη οίνο και οι οποίοι δεν έδωσαν σ' αυτόν λατινικό όνομα ταξινόμησης. Τον θεώρησαν μάλιστα και επιμολυντή του επειδή κατά την αποθήκευση του προσδίδει δυσάρεστη γεύση και άρωμα σ' αυτόν εξ' αιτίας της παραγωγής μεγάλης ποσότητας ακεταλδεϋδης. Έτσι η ανακάλυψή του αποδίδεται στον Linder (1928), που το προσδιόρισε στο μεξικάνικο ποτό pulque (είδος τεκίλας). Το ποτό αυτό είναι οينوπνευματώδες (4-6% οινόπνευμα) και παράγεται από τη ζύμωση του σακχαρώδους χυμού του κακτοειδούς φυτού *Agave atrovirens*. Η ονομασία που του πρωτοδίνεται είναι *Thermobacterium mobile*.

Το 1950 ο Shimwell απομόνωσε για πρώτη φορά το βακτήριο *Zymomonas* σε ζύθο, μιας και οι συνθήκες ζύμωσης είναι παρόμοιες με τις συνθήκες ανάπτυξής του. Το *Zymomonas* δε βρέθηκε σε ζύθο τύπου "lager", πιθανά λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας παρασκευής του (8-12 °C).

Το 1972, ο Gonçaves de Lima και οι συνεργάτες του, απομόνωσαν για πρώτη φορά βακτήριο από χυμό ζαχαροκάλαμου που είχε υποστεί ζύμωση. Επίσης, έχει αναφερθεί απομόνωση του *Zymomonas* από μέλι από τους Ruiz-Argueso & Rodriguez-Navarro το 1975.



Έπειτα, το 1977, οι Swing & De Ley εντοπίζουν το βακτήριο σε χυμό φοινικόδεντρου που υφίσταται ζύμωση για την παραγωγή οίνου με περιεκτικότητα αιθανόλης 4-5% και pH 3-4.

Το Gram<sup>-</sup> βακτήριο *Zymomonas mobilis* έχει συγκεντρώσει έντονο ερευνητικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, χάρη στην ικανότητα γρήγορης και αποδοτικής παραγωγής αιθανόλης, που φτάνει μέχρι και το 12% (3-5 φορές περισσότερη παραγωγή απ' ό τι οι ζύμες, Rogers *et al.*, 1982), σε συνδυασμό με την ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (έως και 16%) και σακχάρων (έως και 25% σακχαρόζη), αλλά και στις γενετικές και βιοχημικές ιδιαιτερότητές του. Το κίνητρο για την ερευνητική δραστηριότητα γύρω από το βακτήριο αυτό το έδωσε η πετρελαϊκή κρίση στις αρχές της δεκαετίας του '80 που ακολουθήθηκε από εκτίναξη στις τιμές του πετρελαίου και την ανάγκη παραγωγής εναλλακτικών καυσίμων από βιομάζα. Το 2001, το Υπουργείο Ενέργειας των Ηνωμένων Πολιτειών σχολίαζε ότι «Τα πλεονεκτήματα που έχει το *Zymomonas mobilis* σε σχέση με την παραδοσιακό σακχαρομύκητα μπορεί να οδηγήσουν σε πιο οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους παραγωγής αιθανόλης».

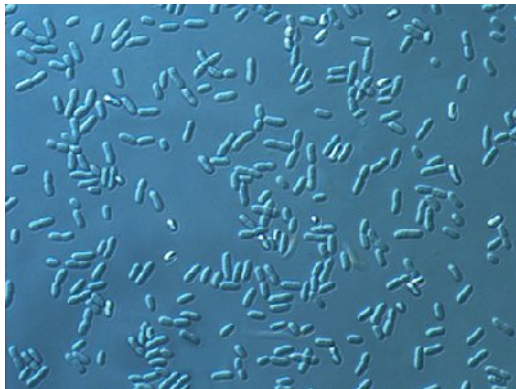
**Πίνακας 5.** Σημαντικά ερευνητικά επιτεύγματα για το *Zymomonas*

Επίτευγμα	Περίοδος	Αναφορά
Ανασκόπηση του δυναμικού παραγωγής αιθανόλης του <i>Z. mobilis</i>	Τέλος δεκαετίας 1970	Swing & De Ley, 1977
Επιβεβαίωση του υψηλού ρυθμού παραγωγής αιθανόλης με κινητική	Αρχές δεκαετίας 1980	Rogers <i>et al.</i> , 1979 Lee <i>et al.</i> , 1979
Αποτίμηση διαφόρων στελεχών κατά τη συμπεριφορά τους σε συνεχείς, ασυνεχείς καλλιέργειες και ανακύκλωση κυττάρων	Αρχές δεκαετίας 1980	Lavers <i>et al.</i> , 1981 Lawford <i>et al.</i> , 1982 Doelle <i>et al.</i> , 1982
Ανάπτυξη τεχνικών γενετικής μηχανικής για το <i>Z. mobilis</i>	Αρχές δεκαετίας 1980	Skotnicki <i>et al.</i> , 1980 Dally <i>et al.</i> , 1982 Drainas <i>et al.</i> , 1983
Υποκλωνοποίηση ετερόλογων γονιδίων, προκειμένου να επεκταθεί το εύρος των υποστρωμάτων σακχάρου πέραν της	Μέσα δεκαετίας 1980	Carey <i>et al.</i> , 1983 Goodman <i>et al.</i> , 1984 Strzelecki <i>et al.</i> , 1987

γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης		Su <i>et al.</i> , 1989
Χαρακτηρισμός των ενζύμων στη μεταβολική πορεία Entner-Doudoroff	Μέσα δεκαετίας 1980	Scopes <i>et al.</i> , 1986 Neale <i>et al.</i> , 1986, 1987
Υποκλωνοποίηση γονιδίων για τον πλήρη μεταβολισμό των υποστρωμάτων ξυλόζης και αραβινόζης	Μέσα δεκαετίας 1990	Zhang <i>et al.</i> , 1995 Deanda <i>et al.</i> , 1996
Αποτίμηση των ανασυνδυασμένων στελεχών σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν ξυλόζη, αραβινόζη ή γλυκόζη, με κινητική	Τέλος δεκαετίας 1990 Αρχές δεκαετίας 2000	Joachimsthal <i>et al.</i> , 1999 Joachimsthal & Rogers, 2000 Lawford <i>et al.</i> , 1999, 2003 Mohagheghi <i>et al.</i> , 2002
Αποτίμηση των στελεχών σε βιομηχανικά υδρολυμένη λιγνοκυτταρίνη	Αρχές 2000	Lawford <i>et al.</i> , 2001 Mohagheghi <i>et al.</i> , 2004
Δημοσίευση της αλληλουχία του γονιδιώματος του <i>Z. mobilis</i> ZM4	2005	Seo <i>et al.</i> , 2005
Εφαρμογή μεταβολικής μηχανικής για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος	2006	Kim <i>et al.</i> , 2006
Ανακοίνωση συνεργασίας των εταιρειών Dupont και Broin για ανάπτυξη διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης από καλαμπόκι, χρησιμοποιώντας το <i>Z. mobilis</i>	Οκτώβριος 2006	Reisch, 2006 (Εταιρική Αναφορά)
Δημοσίευση της αλληλουχία του γονιδιώματος του <i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	2009	Kouvelis <i>et al.</i> , 2009
Δημοσίευση της αλληλουχία του γονιδιώματος του <i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	2011	Pappas <i>et al.</i> , 2011
Δημοσίευση της αλληλουχία του γονιδιώματος των <i>Z. mobilis</i> ATCC 29192 και ATCC 29191	2011 2012	Kouvelis <i>et al.</i> , 2011 Denitsiotis <i>et al.</i> , 2012

## 4.2 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Zygomonas* είναι Gram<sup>-</sup> βάκιλλοι, μήκους 2-6 μm και πλάτους 1-1,5 μm, δυνητικά κινητικοί με τη χρήση 1-4 λοφότριχων μαστιγίων. Ως οργανισμός θεωρείται αναερόβιος με ανοχή στην αεροβίωση. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, για τα περισσότερα στελέχη, είναι μεταξύ 25 και 30 °C ενώ το βέλτιστο pH μεταξύ 3,5 και 7,5 (Kaur *et al.*, 1993).



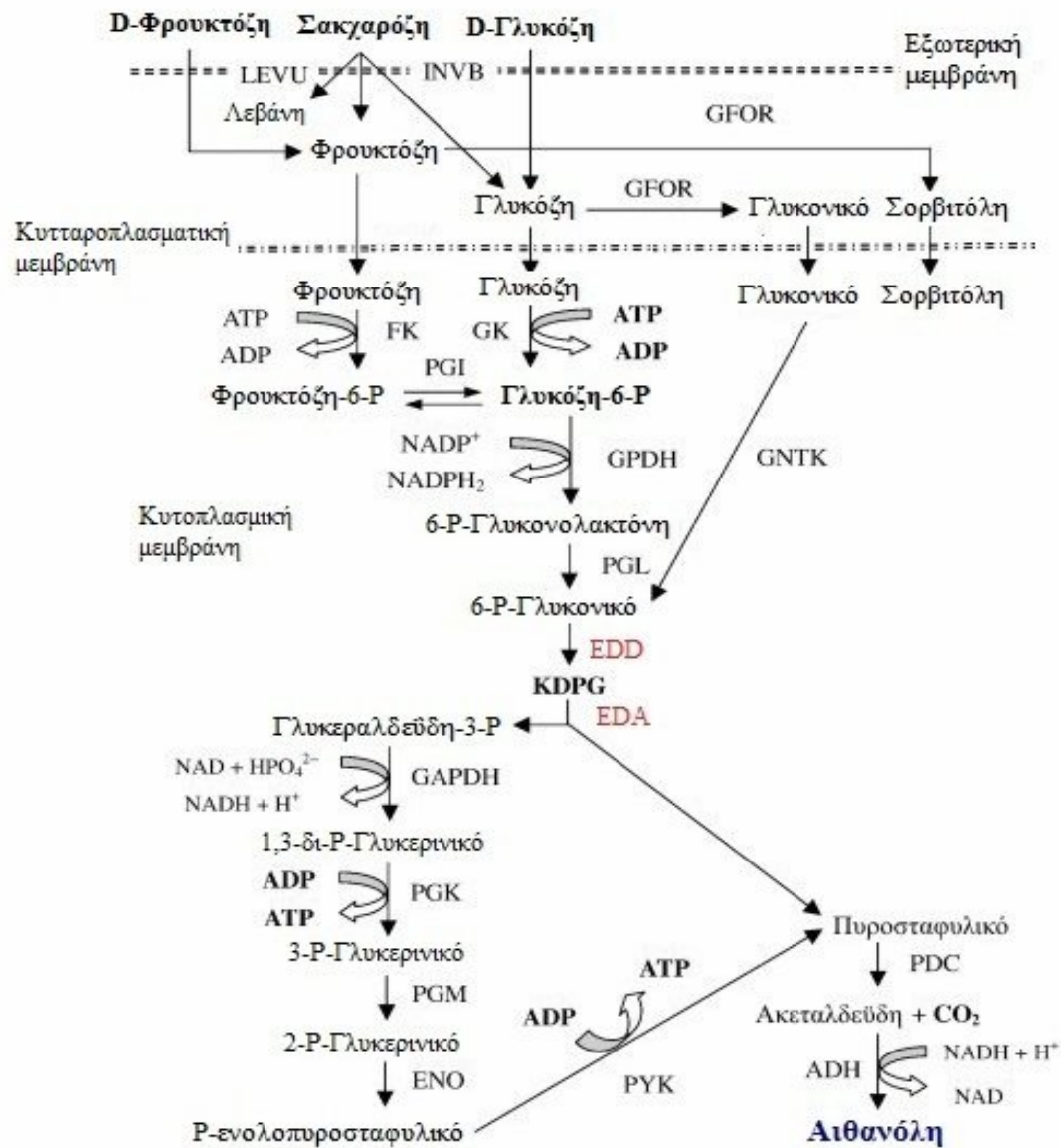
**Εικόνα 2.** Κύτταρα του βακτηρίου *Z. mobilis*

Το κυτταρικό του τοίχωμα είναι το τυπικό κυτταρικό τοίχωμα των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, αποτελούμενο από πεπτιδιογλυκάνες, πρωτεΐνες, λιπίδια και λιποπολυσακχαρίτες (Doelle *et al.*, 1982). Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης, εκτός των φωσφολιπιδίων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων, χαρακτηρίζεται από αυξημένο ποσοστό οπανοειδών. Τα οπανοειδή είναι πεντακυκλικά τριτερπενοειδή που βοηθούν στην πλαστικότητα της μεμβράνης, αλλάζοντας τη διαπερατότητά της (Azoulay *et al.*, 1985). Στα κύτταρα *Zygomonas* δεν συναντώνται μορφές σπορίων, δομές κάψας και εσωτερικά αποθηκευτικά κοκκία λιπιδίων, γλυκογόνου ή πολυ-β-υδροξυβουτυρικού οξέος. Οι αποικίες του *Z. mobilis* είναι υπόλευκες, γυαλιστερές, φακοειδείς και έχουν μέγεθος 1-2 mm μετά από 2 ημέρες στους 30°C.

## 4.3 Ζύμωση Υδατανθράκων

Κύριο χαρακτηριστικό του *Zygomonas* αλλά και μειονέκτημά του είναι η αλκοολική ζύμωση των μοναδικών υποστρωμάτων στα οποία αναπτύσσεται ο άγριος τύπος του, δηλ. των απλών C6 σακχάρων γλυκόζη, φρουκτόζη και του δισακχαρίτη σακχαρόζη, για όσα

στελέχη διαθέτουν το ένζυμο λεβανσακχαράση, μέσω της βιοχημικής πορείας Entner-Doudoroff (Gibbs & Moss, 1954, **Σχήμα 30**).



**Σχήμα 30.** Η παραγωγή αιθανόλης μέσω της καταβολικής πορείας Entner–Doudoroff. Η διακλάδωση από την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη έως το πυροσταφυλικό είναι ίδια ακριβώς με αυτή της μεταβολικής πορείας Embden–Meyerhof–Parnas. **Συντμήσεις:** LEVU: λεβανσακχαράση, INVΒ: ινβεράση, GFOR: οξειδοαναγωγή γλυκόζης-φρουκτόζης, FK: φρουκτοκινάση, GK: γλυκοκινάση, GPDH: αφυδρογόνωση 6-φωσφορικής γλυκόζης, PGI: ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, GAPDH: αφυδρογόνωση της φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης, PGK: φωσφογλυκερινική κινάση, PGM: φωσφογλυκερινική αλδολάση, ENO: ενολάση, PYK: πυροσταφυλική κινάση, PDC: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, ADH: αλκοολική αφυδρογόνωση (δύο ισόενζυμα).

### 4.3.1 Γλυκόζη και Φρουκτόζη

Η πρόσληψη D-γλυκόζης και D-φρουκτόζης από το μικροοργανισμό γίνεται με διευκολυνομένη διάχυση μέσω της οποίας αποκαθίσταται πολύ γρήγορα η ισορροπία μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής συγκέντρωσης σακχάρου (Romano, 1986). Η πρόσληψη της γλυκόζης ελέγχεται από το ενεργειακό ισοζύγιο του κυττάρου, ενώ της φρουκτόζης από την συγκέντρωση της γλυκόζης. Οι ρυθμοί πρόσληψης της γλυκόζης είναι 3-4 φορές ταχύτεροι από αυτούς της φρουκτόζης, ενώ παρουσία και των δύο σακχάρων, η γλυκόζη μπορεί έως και να παρεμποδίζει την πρόσληψη φρουκτόζης. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν οι Strohdeicher *et al.*, το 1988, οι οποίοι χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μίγμα φρουκτόζης – γλυκόζης, είδαν σημαντική μείωση στην απόδοση αιθανόλης, ενώ παράλληλα σχηματιζόνταν και αρκετά ποσά σορβιτόλης. Η σορβιτόλη παράγεται από την αναγωγή της φρουκτόζης. Παρουσία γλυκόζης παρεμποδίζεται η δράση του ενζύμου φρουκτοκινάση, που μετατρέπει τη φρουκτόζη σε 6-φωσφο-φρουκτόζη, με αποτέλεσμα η φρουκτόζη να μην μπαίνει στην κανονική μεταβολική πορεία. Μη διάσπαση της φρουκτόζης σημαίνει αυξημένη ποσότητα σορβιτόλης.

Η αναερόβια διάσπαση εξοζών απ' το *Z. mobilis* μέσω της παραπάνω πορείας αποδίδει μόνο 1 mole ATP ανά mole υποστρώματος για τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Αυτό έχει ως συνέπεια τη σχεδόν θεωρητικά τέλεια μετατροπή της πηγής άνθρακα στο επιθυμητό προϊόν, την αιθανόλη (τουλάχιστον 97% μετατροπή), 2-2,6% σε κυτταρική βιομάζα και ένα υπόλοιπο ελάχιστο σε ακαταλευδή, οξικό οξύ, γαλακτικό, γλυκερόλη (Rogers *et al.*, 1982; Lawford *et al.*, 1982).

Δύο είναι οι βασικές αντιδράσεις αυτής της βιοχημικής πορείας. Η μετατροπή του 6-φωσφο-γλυκονικού οξέος σε 2-κετο-3-δεσοξυ-6-φωσφο-γλυκονικό από μια αφυδρατάση και στη συνέχεια η μετατροπή αυτού σε πυροσταφυλικό και 3-φωσφο-γλυκεριναλδεύδη από μια αλδολάση. Το πυροσταφυλικό οξύ, που παράγεται από το μεταβολισμό, μετατρέπεται σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση). Για τη γρήγορη παραγωγή αιθανόλης απαιτούνται σε μεγάλη ποσότητα το ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, η οποία αποτελεί το 3-4% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης του κυττάρου (Bringer-Mayer *et al.*, 1986) και το ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση, το οποίο απαντά με τη μορφή των δύο ισοενζύμων ADH I και ADH II, που καταλύουν της αναγωγή της ακεταλδεύδης σε αιθανόλη με συνένζυμο το NADH (Kinoshita *et al.*, 1985).

Το γεγονός ότι αποτελεί το μοναδικό γνωστό, μέχρι σήμερα, βακτήριο που χρησιμοποιεί την παραπάνω πορεία για την αναερόβια διάσπαση εξοζών, ανάμεσα στις άλλες ιδιομορφίες του, έχει προκαλέσει προβλήματα ως προς την ταξινόμησή του (μέχρι πρόσφατα κατατάσσονταν στην κατηγορία των ανεξάρτητων ταξινομικά γενών από το Bergey's Manual Συστηματικής Βακτηριολογίας).

#### 4.3.2 Σακχαρόζη

Η αύξηση σε σακχαρόζη, από όσα στελέχη *Z. mobilis* διαθέτουν το ένζυμο λεβανσακχαράση, είναι πιο πολύπλοκη απ' αυτή της γλυκόζης αλλά και αρκετά ενδιαφέρουσα από βιοτεχνολογική σκοπιά, μιας και ο συγκεκριμένος δισακχαρίτης απαντάται σε πολλά φυσικά υποστρώματα όπως μολάσσειες, χυμούς φρούτων και σιρόπι καλαμοσάκχαρου (Koutinas *et al.*, 1986; Kolios *et al.*, 1989; Doelle *et al.*, 1991; Park & Baratti, 1991). Η κατανάλωση σακχαρόζης από το *Z. mobilis* για την παραγωγή αιθανόλης παρουσιάζει το πρόβλημα ότι στη φάση της διάσπασης του μορίου της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, με τη δράση του ενζύμου λεβανσακχαράση, παράγεται ως παραπροϊόν η φρουκτάνη (levan), (Park *et al.*, 1983). Ο σχηματισμός αυτού του πολυμερούς οδηγεί σε μειωμένους ρυθμούς παραγωγής αιθανόλης μέχρι και 10% σε σύγκριση με τα ποσά αιθανόλης που παράγονται όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η γλυκόζη. Ωστόσο, η ρύθμιση της θερμοκρασίας (35°C), του pH (>5,0) και της συγκέντρωσης των σακχάρων (<15%), μπορεί να περιορίσουν το σχηματισμό φρουκτάνης, προς όφελος της παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων (αιθανόλη, σορβιτόλη ή φρουκτόζη) (Doelle & Greenfield 1985; Johns *et al.*, 1991).

#### 4.3.3 Άλλα υποστρώματα

Προσπάθειες έχουν γίνει για να διευρυνθεί το φάσμα των υποστρωμάτων *Z. mobilis* για την παραγωγή αιθανόλης. Ο μεταβολισμός τηςμανιτόλης βρέθηκε να είναι οξυγονοεξαρτώμενος και οδήγησε σε περιορισμένη παραγωγή της αιθανόλης, αλλά αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος (Buchhotz *et al.*, 1988).

Μεγάλη σημασία δόθηκε και στη χρησιμοποίηση διαφόρων ανανεώσιμων πηγών, όπως το καλαμπόκι, οι πατάτες ή το σιτάρι. Στην κατεύθυνση αυτή αναπτύχθηκαν δύο

αξιοσημείωτες εφαρμογές για την παραγωγή αιθανόλης από το *Zygomonas*, η ‘Glucotech’ από Αυστραλιανή ερευνητική ομάδα στο Πανεπιστήμιο του Queensland (Doelle *et al.*, 1988) και η ‘Bio-Hol’ από Καναδική ερευνητική ομάδα στο Πανεπιστήμιο του Toronto (Lawford, *et al.*, 1988). Μελέτες έχουν επίσης γίνει χρησιμοποιώντας σαν πρώτη ύλη υγρό και ξηρό άλεσμα καλαμποκιού και μείγματα σιταριού. Σε ρυθμούς παραγωγής αιθανόλης  $0,25\% \text{ h}^{-1}$ , η ζύμωση ολοκληρώθηκε εντός 36-40 ωρών σε σύγκριση με τις 52-70 ώρες που χρειάζεται μια ζύμη (Doelle *et al.*, 1989).

Η αλκοολική ζύμωση του υδρολύματος κυτταρίνης (κλάσμα εξόζης) έδειξε ότι το θεμοανεκτικό στέλεχος *Z. mobilis* C107 παρουσίασε την καλύτερη ανάπτυξη, ενώ είχε και καλύτερη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης, σε σύγκριση με το άγριου τύπου ZM4 και το μεταλλαγμένο οσμωανεκτικό SBE15 (Park *et al.*, 1993). Ωστόσο, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και η απόδοση βιομάζας ανεστάλησαν σε υψηλές συγκεντρώσεις υδρολυμένου υποστρώματος (Kademi & Baratti, 1996).

**Πίνακας 6.** Πλεονεκτήματα του *Z. mobilis* έναντι των ζυμών κατά την παραγωγή αιθανόλης ( Lawford *et al.*, 1982).

	<i>Z. mobilis</i>	Σακχαρομύκητας
Ζύμωση σακχάρων προς αιθανόλη (%)	96	96
Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (%)	12	12
Παραγωγή ATP (ανά mole γλυκόζης) (Entner-Doudoroff vs Embden-Mayerhoff)	1	2
Ρυθμός παραγωγικότητας αιθανόλης ( $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) <sup>α</sup>	5,67	0,67
Ογκομετρική παραγωγικότητα αιθανόλης ( $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) <sup>β</sup>	200	29
Εύρος pH για παραγωγή αιθανόλης	3,5 – 7,5	2-6,5
Βέλτιστη θερμοκρασία (°C)	25-30	30-38

α: Ασυνεχής ζύμωση κυττάρων σε υπόστρωμα 10% γλυκόζης

β: Συνεχής καλλιέργεια με ανακύκλωση κυττάρων

Λογικό ήταν, οι έρευνες να επικεντρωθούν σε μεγάλο βαθμό στη γενετική τροποποίηση του οργανισμού ώστε να μπορεί να χρησιμοποιεί μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων. Έτσι έχουν αναφερθεί ανασυνδυασμένα στελέχη που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα πεντόζες (**Πίνακας 5**), γεγονός που δίνει μια πολύ σημαντική μελλοντική υπόσχεση για παραγωγή αιθανόλης από υδρολύματα λιγνοκυτταρίνης.

#### 4.4 Το γονιδίωμα του *Z. mobilis*

Μέχρι σήμερα έχουν ελεγχθεί και ομαδοποιηθεί ως προς τη γενετική τους συγγένεια 40 διαφορετικά στελέχη *Zymomonas*. Η ομολογία DNA μεταξύ των γονιδιωμάτων των στελεχών αυτών μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αρχικής ταχύτητας επανουσίωσης σε αυστηρές συνθήκες. Με τη μέθοδο αυτή, η επανουσίωση των μονόκλωνων αλυσίδων και ο σχηματισμός της διπλής έλικας επιτρέπεται μόνο ανάμεσα σε περιοχές πλήρως ομόλογες ή με υψηλό ποσοστό ομολογίας (De Ley *et al.*, 1970). Η G+C σύσταση του γονιδιώματος των περισσότερων *Z. mobilis* στελεχών είναι  $48,5 \pm 1,0\%$ , ενώ το μοριακό βάρος του γονιδιώματος είναι  $1,53 \times 10^9$  Daltons (Swing & De Lay, 1977; Montenecourt, 1985).

Το 1977 οι Swing και De Lay οριστικοποιούν την ένταξη όλων των στελεχών σε ένα και μοναδικό είδος: το *Zymomonas mobilis*, το γονιδίωμα του οποίου αντιστοιχεί στο 65% του γονιδιώματος του *E. coli* και που φέρει τα υποείδη *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*, στο οποίο ανήκουν όλα τα υπάρχοντα στελέχη, εκτός από τρία, με αντιπροσωπευτικό τύπο αναφοράς το ATCC 10988 = NCIB 8938 και *Zymomonas mobilis* subsp. *potomacae*, με αντιπροσωπευτικό τύπο αναφοράς το ATCC 29192 = NCIB 11200.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (**Πίνακας 5**), το 2005 οι Seo *et al.*, ανακοίνωσαν, για πρώτη φορά, την πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος στελέχους του γένους *Zymomonas*, του ZM4. Διαπιστώθηκε ότι το γονιδίωμα αυτό αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 2.056.416 ζευγών βάσεων και έχει G+C περιεκτικότητα σε 46,33%. Το χρωμόσωμα του ZM4 περιέχει 1998 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) και τρεις μεταγραφικές μονάδες ριβοσωμικού RNA. Σύγκριση των δεδομένων ύστερα από ανάλυση μικροσυστοιχιών του γονιδιώματος των *Z. mobilis* ZM1 (ATCC 10988) και ZM4 (ATCC 31821) αποκάλυψε ότι 54 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, που υπήρχαν στο ZM4 ήταν απόντα στο ZM1. Τέσσερα από αυτά, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταφοράς ή περμεάσες, και δύο



κωδικοποιούν για το ένζυμο οξειδοαναγωγή της NAD(P):κινόνης και για τη μικρή αλυσίδα της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Οι ερευνητές πρότειναν ότι πιθανά τα γονίδια αυτά έχουν σχέση με υψηλότερους ειδικούς ρυθμούς πρόσληψης των σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης του ZM4 σε σχέση με το ZM1. Ανέφεραν επίσης ότι δύο γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα βιοσύνθεσης υδατανθράκων της κάψας του βακτηρίου εκφράστηκαν μόνο στο ZM4, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην μεγαλύτερη αντοχή που παρουσιάζει το συγκεκριμένο στελέχος τόσο στην αυξημένη οσμωτική πίεση λόγω υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο (π.χ. 250 – 300 g·L<sup>-1</sup> γλυκόζης στο μέσον) όσο και στην παραγόμενη αιθανόλη.

Το 2009, ανακοινώθηκε από τους Kouvelis *et al.*, η αλληλουχία των νουκλεοτιδιακών βάσεων του γονιδιώματος του στελέχους NCIMB 11163, το οποίο αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 2.124.771 bp (μεγαλύτερο κατά 68.355 bp από αυτό του ZM4) με περιεκτικότητα σε G+C 46,83%. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι υπάρχουν δύο περιοχές του που δεν παρουσιάζουν ομολογία με άλλα στελέχη του *Zymomonas*, αλλά έχουν σημαντική ομοιότητα με τα στελέχη *Paracoccus denitrificans* PD1222, *Xanthobacter autotrophicus* Py2 και *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5.

Τέλος, πολύ πρόσφατα οι Pappas *et al.*, 2011, ολοκληρώνοντας τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους ATCC 10998, βρήκαν ότι περιέχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 2.021.773 bp με περιεκτικότητα σε G+C 46,22% και το οποίο υπολείπεται του ZM4 κατά 34.590 bp, ενώ παρουσιάζει 98% ταυτότητα με αυτό. Το ιδιαίτερο εύρημα του χρωμοσώματος αυτού είναι η ύπαρξη 36 γονιδίων τρανσποζασών, αριθμός πολύ μεγαλύτερος από άλλων στελεχών των οποίων έχει προσδιοριστεί το γονιδίωμα.

#### 4.4.1 Ενδογενή πλασμίδια του *Zymomonas*

Πέρα από το χρωμοσωμικό DNA, για ορισμένα στελέχη του *Z. mobilis* έχει αναφερθεί η ύπαρξη ενός αριθμού πλασμιδίων. Τα πλασμίδια αυτά αποτελούν θέμα εντατικής έρευνας, μέσα στα πλαίσια της γενετικής βελτίωσης και της βιοτεχνολογικής αξιοποίησης του βακτηρίου. Στη δεκαετία του '90 αρκετοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό του αριθμού και του μεγέθους των πλασμιδίων του *Z. mobilis*. Έτσι φυσικά πλασμίδια μεγέθους περίπου 70 και 30 kb έχουν βρεθεί σε αμφότερα τα στελέχη ZM3 και ZM4 (Dally *et al.*,

1982). Τα πλασμίδια αυτά είναι επίσης παρόντα και στα στελέχη ZM1 και Ag11, ενώ το στέλεχος ZM1 περιέχει επιπλέον και τρία πλασμίδια μικρού μοριακού βάρους 1,7, 1,9 και 2,5 kb.

Οι περισσότερες γενετικές έρευνες αναφέρονται στα στελέχη ATCC 10988 και CP4 γιατί έχουν μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυσικών πλασμιδίων και αποτελούν καλούς δέκτες μεταφοράς ετερόλογων πλασμιδίων (**Πίνακας 7**). Οι Drainas και συνεργάτες του το 1983, προσδιόρισαν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, έξι πλασμίδια μοριακού βάρους από 1,7 ως 31,8 kb. Την ίδια εποχή, άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι το ATCC 10988 περιέχει πέντε (Stokes *et al.*, 1983) ή τέσσερα (Tonomura *et al.*, 1982) Η ποικιλία στον αριθμό και το μέγεθος των πλασμιδίων αυτών είχαν κατά καιρούς δώσει αντιφατικά αποτελέσματα και στις ίδιες τις ερευνητικές ομάδες (Skotnicki *et al.*, 1984). Πλασμίδια του *Z. mobilis* είχαν βρεθεί να “συμμεταναστεύουν” στο ίδιο σημείο, παρά τις διαφορές στο μέγεθός τους, με αποτέλεσμα μια ζώνη που περιείχε περισσότερα του ενός πλασμιδίου, να εκλαμβάνεται ως ζώνη ενός πλασμιδίου. Ο τελικός αριθμός και το μέγεθος των πλασμιδίων του ATCC 10988 οριστικοποιήθηκε τελικά για τα 1,6, 1,9, 2,7, 7,3, 16,8 και 31,8 kb (Scordaki & Drainas, 1987).

#### **Πίνακας 7.**

Μέγεθος και αριθμός των φυσικών πλασμιδίων των στελεχών ATCC 10988 και CP4 του *Z. mobilis*.

Μέγεθος πλασμιδίων (kb)	Στέλεχος	Αναφορά
1,7 2,5 121	ATCC 10988	Dally <i>et al.</i> , 1982
121	CP4	
1,95 2,85 4,05 25,4 31,9	ATCC 10988	Tonomura <i>et al.</i> , 1982
1,65 2,47 24 69	ATCC 10988	Stokes <i>et al.</i> , 1983
31,5 69	CP4	
1,6 1,9 2,7 7,3 16,7 31,8	ATCC 10988	Drainas <i>et al.</i> , 1983
1,5 2,3 3,4 34 40	ATCC 10988	Skotnicki <i>et al.</i> , 1984
1,6 1,9 2,7 16,7 31,8	ATCC 10998	Scordaki & Drainas, 1987
1,7 2,9 4 69	ATCC 10998	Karunakaran & Gunasekaran, 1991
37 33,9 32,8 32,4 30,9	CP4	Yang <i>et al.</i> , 2009 Lucas <i>et al.</i> , 2010
2,75 4 18,5 31,7 32,3 32,5	ATCC 10998	Pappas <i>et al.</i> , 2011

Η έρευνα της δομής των πλασμιδίων αποτέλεσε το επόμενο βήμα. Έγινε περιοριστική ανάλυση κυρίως στα μικρότερου μεγέθους πλασμίδια και μελετήθηκαν οι δομικές σχέσεις των πλασμιδίων του ATCC 10988 μεταξύ τους, καθώς και με πλασμίδια άλλων στελεχών του *Z. mobilis*.

Σε πήγμα αγαρόζης παρατηρήθηκε συμμετανάστευση των δύο μικρών πλασμιδίων, pZMO1 και pZMO2, που παρουσιάζουν ομοιότητες στην πρωτοταγή δομή τους όπως αποδείχθηκε από πειράματα υβριδισμού. Το pZMO3 δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα από τα άλλα πλασμίδια, σε αντίθεση με το pZMO5, το οποίο είναι ένα τετραμερές (4 x 4,5 kb) και δείχνει μερική ομολογία με τα pZMO1 και pZMO2 (Scordaki & Drainas, 1987).

Τα αποτελέσματα της δομικής ανάλυσης, έδωσαν ώθηση στη χρήση των πλασμιδίων του ATCC 10988 για την κατασκευή υβριδικών πλασμιδίων που μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς ανασυνδυασμού για τη μεταφορά ξένων γονιδίων στο *Z. mobilis*.

Με ανάπτυξη της τεχνολογίας και την εύρεση της αλληλουχίας των γονιδιωμάτων, βρέθηκε για το μεν στέλεχος ZM4 ότι περιέχει πέντε πλασμίδια, τα pZZM401 έως pZZM405 με μεγέθη 37.066, 33.915, 32.801, 32.400 και 30.952 bp αντίστοιχα (Lucas *et al.*, 2010), ενώ για το στέλεχος NCIMB 11163 ότι περιέχει τρία πλασμίδια τα p11163\_1, p11163\_2 και p11163\_3, με μεγέθη 53.380, 40.818 και 4.551 bp (Kouvelis *et al.*, 2009), εκτός του μικρότερου μεγέθους pZMN1-1 με M.B. 1643 bp (Samaras *et al.*, 2009). Νέα δεδομένα, τέλος, έφεραν στο φως η ολοκλήρωση του προσδιορισμού της αλληλουχίας και του γονιδιώματος του στελέχους ATCC 10998 (Pappas *et al.*, 2011), απ' όπου βρέθηκε ότι περιέχονται σ' αυτό, πέντε πλασμίδια (pZMOB01 έως pZMOB05) μοριακού βάρους από 4 έως 32,5 kb περίπου, επιπλέον βέβαια των τριών pZMO1, pZMO2 και pZMO3 τα οποία είχαν βρεθεί από τους Drainas *et al.*, 1983 (Πίνακας 7).

Πέρα από τη σπουδαιότητά τους για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση του *Z. mobilis*, τα πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 παρουσιάζουν ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Η συνύπαρξη τόσο μεγάλου αριθμού φυσικών πλασμιδίων, καθώς και η σταθερή κληρονομιά τους από γενιά σε γενιά, προσφέρονται για τη μελέτη μηχανισμών αντιγραφής, μεταφοράς, καταμερισμού και ασυμβατότητας. Ερωτήματα που αφορούν τον τρόπο αντιγραφής καθενός απ' αυτά τα πλασμίδια, τους μηχανισμούς που διέπουν την σταθερότητά τους και μάλιστα στη μεταξύ τους σχέση, εξακολουθούν να παραμένουν αναπάντητα.

Εξίσου ενδιαφέρον παραμένει το ερώτημα της λειτουργικής σημασίας των πλασμιδίων μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα, προσφέρουν αυτά τα πλασμίδια κάποιες λειτουργίες στον ξενιστή ή λειτουργούν μόνο για την αυτοσυντήρησή τους; Εάν δεν παρέχουν κανένα πλεονέκτημα στο κύτταρο που τα φιλοξενεί πώς τότε δικαιολογείται η σταθερότητά τους;

Σ' αυτά τα ερωτήματα έχουν επιχειρηθεί προσεγγίσεις από διάφορους ερευνητές, από τις οποίες διαφαίνεται κάποια σχέση ανάμεσα στην παρουσία των πλασμιδίων και την υψηλή ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε πολλά αντιβιοτικά, καθώς και στην κολισινογόνο δράση πολλών στελεχών (Skotnicki *et al.*, 1984). Οι προσεγγίσεις όμως αυτές παραμένουν μέχρι σήμερα αθεμελιώτες υποθέσεις. Σε μία περίπτωση διατυπώθηκε με μεγαλύτερη βεβαιότητα η απόδοση αντοχής σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά (χλωραμφαινικόλη, καναμυκίνη και στρεπτομυκίνη) σε ένα πλασμίδιο του στελέχους CP4 (Walia *et al.*, 1984). Ούτε κι αυτό όμως το αποτέλεσμα θεμελιώθηκε και αναλύθηκε μέχρι σήμερα και δεν έγινε δυνατή η αξιοποίησή του με οποιονδήποτε τρόπο. Η εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδιακών βάσεων των πλασμιδίων των στελεχών ZM4, ATCC 10998, ATCC 29192 και NCIBM 11163 δεν ανέδειξε καμιά ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό ή τοξική ουσία, εκτός ίσως απ' αυτή σε αρσενικό που εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pZA1001 του NCIBM 11163.

Παρ' όλη την πρόοδο που έχει γίνει στη γενετική του *Z. mobilis* τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια και της τεχνολογίας, παραμένει ακόμη άγνωστη στα περισσότερα σημεία της. Βασικά θέματα όπως οι ανταλλαγές γονιδίων, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μηχανισμοί γενετικού ανασυνδυασμού και επιδιόρθωσης, η φύση και οι λειτουργίες των ενδογενών πλασμιδίων, χρήζουν ακόμη περαιτέρω μελέτης.

#### **4.5 Φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis***

Ελλείπει γνωστού μεταγωγικού φάγου για το *Z. mobilis*, η μεταφορά γενετικής πληροφορίας εντός του οργανισμού μπορεί να γίνει μόνο μέσω διαδικασιών μετασχηματισμού και σύζευξης. Η σχεδόν καθολικά χρησιμοποιούμενη οδός για την εισαγωγή ξένου γενετικού υλικού στο *Z. mobilis* είναι η επιβοηθούμενη σύζευξη. Η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (Lam, *et al.*, 1993) έχει επίσης δείξει μεγάλες συχνότητες μετασχηματισμού ( $1,0 \times 10^7$   $\text{mg}^{-1}$  DNA), τουλάχιστον για τον πλασμιδιακό φορέα pZMOCP1, με ικανότητα ενσωμάτωσής του

στο χρωμόσωμα, ο οποίος κατασκευάστηκε ενώνοντας τα *EcoRV* θραύσματα του φορέα pBluescript και του πλασμιδίου pZMP1 και ο οποίος μεταφέρθηκε επιτυχώς στο *Z. mobilis* ATCC 29191 (Delgado *et al.*, 1995). Ο μετασχηματισμός του *Z. mobilis* με ετερόλογο γενετικό υλικό έχει συναντήσει ιδιαίτερες δυσκολίες και, παρά τα προτεινόμενα πρωτόκολλα (Browne *et al.*, 1984; Goodman *et al.*, 1984; Yanase *et al.*, 1986; Su *et al.*, 1988), οι αποδόσεις παραμένουν από χαμηλές έως ανύπαρκτες. Ανάλυση του ζητήματος υπέδειξε ότι σε μεγάλο ποσοστό το πλασμιδιακό DNA που προσλαμβάνεται από το *Z. mobilis*, παραμένει στο κυτταρικό περίβλημα, ενώ το κλάσμα αυτού που εισέρχεται τελικά στο κύτταρο αποτυγχάνει να αναδομηθεί στην κλειστή, υπερελικομένη του μορφή και τελικά αποικοδομείται (Αφένδρα 1992, Διδακτορική διατριβή).

Η γενετική βελτίωση του *Z. mobilis* απαιτεί μεθόδους του ανασυνδυασμένου DNA και για το σκοπό αυτό απαραίτητοι είναι κατάλληλοι φορείς ανασυνδυασμού (cloning vectors).

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ως φορείς ανασυνδυασμού στο *Z. mobilis* ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: (α) πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστή (broad host range plasmids), (β) τροποποιημένοι φορείς ευρέως φάσματος που έχουν ενσωματωμένα κάποια δομικά χαρακτηριστικά του *Z. mobilis* (π.χ. λειτουργία υποκινητή) και (γ) υβριδικά πλασμίδια *E. coli* - *Z. mobilis*.

#### **4.5.1 Πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστή**

Αρκετά στελέχη *Z. mobilis* αποτελούν δέκτες για πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστή. Το στέλεχος ATCC 10988 αναφέρεται ως ένας καλός δέκτης για ορισμένα απ' αυτά τα πλασμίδια (Brestic-Goachet *et al.*, 1987), συχνότερα όμως χρησιμοποιείται το στέλεχος CP4.

Η πρώτη βακτηριακή σύζευξη πραγματοποιήθηκε το 1980 από τους Scotnicki *et al.* Με αυτή μετέφεραν συζευκτικά πλασμίδια R των ομάδων ασυμβατότητας IncP1 και IncFII από το *Pseudomonas aeruginosa* και το *E. coli* σε στέλεχη του *Z. mobilis*. Επίσης, και το πλασμίδιο Sa, της ομάδας IncW, μεταφέρθηκε από το *E. coli* στο *Z. mobilis* (Strzelecki *et al.*, 1987).

Φορείς ανασυνδυασμού, ευρέως χρησιμοποιούμενοι στο *E. coli*, όπως το pBR325 και το pBR327, μεταφέρονται με πολύ χαμηλή συχνότητα στο *Z. mobilis* και είναι εξαιρετικά ασταθείς (Byun *et al.*, 1986; Afendra & Drainas, 1987). Περισσότερο σταθερά παρουσιάζονται πλασμίδια που φέρουν την περιοχή αντιγραφής του RSF1010 (Conway *et*

*al.*, 1987c; Lejeune *et al.*, 1988) και παράγωγα του RP1, όπως το RP1::Tn951 στο οποίο το Tn951 φέρει το γονίδιο της λακτόζης, που μεταφέρεται και διατηρείται σταθερά στο στέλεχος CP4 (Goodman *et al.*, 1984). Πλασμίδια ευρέως φάσματος έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά γονιδίων στο *Z. mobilis* προκειμένου να διευρυνθεί η κλίμακα των μεταβολιζόμενων απ' αυτό σακχάρων.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικά, καθώς η ανάπτυξη των κυττάρων δεν είναι αρκετή και η δραστηριότητα των αντιστοιχών ενζύμων που κωδικοποιούν, είναι μικρή. Τα αίτια, τα οποία ερευνώνται, σχετίζονται με το μεταβολισμό, τα συστήματα μεταφοράς, τη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης του *Z. mobilis*, τη θερμοκρασία επώασης του *Z. mobilis* που δεν είναι πάντα ευνοϊκή για τη δράση του ενζύμου κ.λ.π. Σημαντικότερος όμως λόγος για την αποτυχία αυτή είναι η αστάθεια των χρησιμοποιηθέντων πλασμιδίων μέσα στο *Z. mobilis*, που άλλοτε είναι διαχωριστική (Yoon *et al.*, 1988; Brestic-Goachet *et al.*, 1990) και άλλοτε είναι δομική (Byun *et al.*, 1986; Strzelecki *et al.*, 1987; Brestic-Goachet *et al.*, 1990).

#### 4.5.2 Τροποποιημένοι φορείς

Για την αντιμετώπιση των προαναφερθέντων προβλημάτων κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένοι φορείς με σκοπό: α) την ικανότητα έκφρασης στο *Z. mobilis* των γενετικών δεικτών, που φέρει ο πλασμιδιακός φορέας και β) την εισαγωγή αλληλουχίων στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, τέτοιων ώστε να βελτιώνεται το πρόβλημα της αστάθειάς του στο κύτταρο ξενιστή (Scordaki & Drainas, 1990).

Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστή που περιέχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες του *Z. mobilis* και υποκλωνοποιήθηκαν υποκινητές προερχόμενοι από το χρωμοσωμικό DNA του οργανισμού, ώστε να βελτιωθεί η έκφραση των μεταφερόμενων γονιδίων (Byun *et al.*, 1986; Conway *et al.*, 1987a), ή περιοχές έναρξης της αντιγραφής πλασμιδίων του *Z. mobilis* καθώς και δείκτες αντιβιοτικών στους οποίους ο οργανισμός να επιδεικνύει ευαισθησία (Afendra & Drainas, 1987; Scordaki & Drainas, 1990). Στην πρώτη περίπτωση αναφέρεται έκφραση των γενετικών δεικτών του πλασμιδίου μετά από 50 κυτταρικές διαιρέσεις, χωρίς να ελεγχθεί περαιτέρω η σταθερότητά του. Στη δεύτερη περίπτωση αναφέρεται αντίστοιχη έκφραση μετά όμως από 100 κυτταρικές διαιρέσεις.

### 4.5.3 Υβριδιακά πλασμίδια

Τα φυσικά πλασμίδια του *Z. mobilis* είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την κατασκευή φορέων ανασυνδυασμού. Το βασικό τους πλεονέκτημα είναι η μεγάλη σταθερότητά τους στο *Z. mobilis*, καθώς και το γεγονός ότι πολλά απ' αυτά έχουν και το κατάλληλο μέγεθος. Η μελέτη όμως της λειτουργίας τους δεν έχει αποδώσει μέχρι στιγμής αποτελέσματα και τα πλασμίδια χαρακτηρίζονται ως κρυπτικά, εκτός του pRUT41 του στελέχους CP4 το οποίο χαρακτηρίζεται σαν  $\text{tra}^+$ ,  $\text{Cm}^R$ ,  $\text{Km}^R$  και  $\text{Str}^R$  (Walia *et al.*, 1984).

Επομένως, ο ανασυνδυασμός των φυσικών πλασμιδίων με πλασμίδια ευρέως φάσματος του *E. coli*, τα οποία έχουν τους κατάλληλους δείκτες επιλογής για το *Z. mobilis* είναι ένας τρόπος επίλυσης του προβλήματος της αστάθειας. Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται ορισμένοι πλασμιδιακοί δια-ειδικοί φορείς κλωνοποίησης (shuttle vectors), που κατασκευάστηκαν για το *Z. mobilis* (Sprenger *et al.*, 1993).

Οι Tonomura *et al.*, (1986), κατασκεύασαν τρία ανασυνδυασμένα πλασμίδια τα pZA31, pZA32 και pZA33, τα οποία προέρχονται από το πλασμίδιο ευρέως φάσματος pACYC184 (4 kb) και το φυσικό πλασμίδιο pZM3 (3,9 kb) του στελέχους ATCC 10988, κλωνοποιημένο σε διάφορες περιοριστικές θέσεις. Αυτά μεταφέρθηκαν με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο στέλεχος CP4 του *Z. mobilis*.

Οι Misawa *et al.*, (1986), αναφέρουν παρόμοια μεταφορά στο στέλεχος CP4 του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pZA22, που κατασκεύασαν από το pACYC184 και το φυσικό πλασμίδιο pZMO3 (2,7 kb) του στελέχους ATCC 10988. Επίσης, οι Scordaki & Drainas (1987), κατασκεύασαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS212, το οποίο αποτελείται από το pBR325 (5,95 kb) και το φυσικό πλασμίδιο pZMO2 (2,9 kb) του στελέχους ATCC 10988. Αυτό μεταφέρθηκε από τους Afendra & Drainas (1987) με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο στέλεχος CU1Rif2, παράγωγο του ATCC 10988. Η μελέτη της σταθερότητάς του σε κύτταρα ξενιστές απέδειξε ότι οφειλόταν στις αλληλουχίες του φυσικού πλασμιδίου pZMO2, που περιέχονται σ' αυτό.

**Πίνακας 8.** Δια-ειδικοί φορείς κλωνοποίησης για το *Z. mobilis*.

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Δείκτης / ες	Ρεπλικόνιο (replicon)	Αναφορά
pLOI102	13,5	Ap, gene fusions	pBR327	Byun <i>et al.</i> , 1986
pZA31	7,9	Tc	pACYC184 – pZM3	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA32	7,9	Cm	pACYC184 – pZM3	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA33	7,9	Cm	pACYC184 - pZM3	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA22	6,7	Tc, Cm	pACYC184 – pZM2	Misawa <i>et al.</i> , 1986
pZL1	13,8	Cm, gene fusions	pZA32	Yanase <i>et al.</i> , 1986
pLOI193	13,4	Tc, Cm	RSF1010	Conway <i>et al.</i> , 1987c
PLOI204	13,2	Cm	RSF1010	Conway <i>et al.</i> , 1987c
pDS212	7,8	Tc, Ap	pBR325 – pZMO2	Scordaki & Drainas, 1987
pOK2	19,7	Cm, Ap	pBR329 – pNSW2	Cho <i>et al.</i> , 1989
pPTZ1,2,3	6,9	Tc, Ppdc	RSF1010	Reynen <i>et al.</i> , 1990
pZMOCP1	7,2	Ap	pBluescript-pZMP1	Delgado <i>et al.</i> , 1995
pDS3154	7,44	Cm, Ap	pBR325 – pZMO3	Scordaki & Drainas, 1990
pZB206	14,7	Tc	pACYC184 - pZMO3	Deanda <i>et al.</i> , 1996
pHW20a	9,9	Tc	RSF1010, RP4	Dong <i>et al.</i> , 2011

Οι Scordaki & Drainas (1990), παρουσίασαν μία σειρά από ανασυνδυασμένα πλασμίδια, τα οποία αποτελούνται από ολόκληρο ή τμήματα του φυσικού πλασμιδίου pZMO3, του στελέχους ATCC 10988 και από το πλασμίδιο ευρέως φάσματος pBR325 (5,95 kb). Αυτά ονομάστηκαν pDS3270 (περιέχει ολόκληρο το pZMO3), pDS3154, pDS364, pDS329 και pDS317 (περιέχουν τμήματα του pZMO3). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο στέλεχος CUIRif2. Η μελέτη της σταθερότητάς τους οδήγησε σε πολύτιμα συμπεράσματα ως προς τη σχέση της περιοχής έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου pZMO3 και της πλασμιδιακής σταθερότητάς τους στα κύτταρα-ξενιστές. Επίσης, αποδείχθηκε η βλαστική ασυμβατότητα του pDS3154 με το φυσικό πλασμίδιο pZMO3, γιατί παρουσία επιλεκτικών συνθηκών, εκδιώκει το φυσικό



πλασμίδιο pZMO3. Στελέχη που είχαν χάσει το pZMO3 παρουσίασαν μεγαλύτερη σταθερότητα του pDS3154.

Οι Cho *et al.*, το 1989 κατασκεύασαν το πλασμίδιο pOK2 με *in vivo* ανασυνδυασμό μεταξύ του φυσικού πλασμιδίου pNSW2 (15,5 kb) του στελέχους ZM6 του *Z. mobilis* και του pBR329 (4,2 kb) μετά από επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο ZM6100-παράγωγο του ZM6. Αυτό το πλασμίδιο ήταν σταθερό για περισσότερες από 300 κυτταρικές διαιρέσεις στα κύτταρα-ξενιστές. Οι Yanase *et al.*, (1986), κατασκεύασαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pZL1, το οποίο είναι παράγωγο του pZA32 (Tonomura *et al.*, 1986). Περιέχει αλληλουχίες υποκινητών από το *Z. mobilis* και τα γονίδια της β-γαλακτοσιδάσης και της περμεάσης της λακτόζης από το *E. coli*. Η μεταφορά του έγινε στο στέλεχος CP4 του *Z. mobilis*. Η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης ήταν πολύ μεγαλύτερη απ' αυτή του στελέχους MN1061 Lac<sup>+</sup> *E. coli* και, ενώ τα μετασυζευγμένα στελέχη CP4 Lac<sup>+</sup> δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν στη λακτόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα, ήταν σε θέση να παράγουν ένα μικρό ποσό αιθανόλης από μοναδική πηγή άνθρακα τη λακτόζη.

Οι Byun *et al.*, το 1986 αναφέρουν την απομόνωση τεσσάρων υποκινητών από το χρωμοσωμικό DNA του στελέχους CP4 στο πλασμίδιο pCVD305, που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Η μεταφορά τους έγινε με σύζευξη στο στέλεχος CP4 και έδειξε ότι η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν ικανοποιητική. Όμως τα μετασυζευγμένα στελέχη δεν μπορούσαν ν' αναπτυχθούν σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα τη λακτόζη. Ο έλεγχος της πλασμιδιακής σταθερότητας έδειξε ότι ήταν εξαιρετικά ασταθή και υπόκειντο σε δομικές τροποποιήσεις. Παρόμοια πειράματα που έκαναν οι Conway *et al.*, το 1987 με τα παράγωγα pLOI193 και pLOI194, μπόρεσαν να εκφράσουν τους δείκτες του πλασμιδίου ακόμη και μετά από 50 κυτταρικές διαιρέσεις, χωρίς όμως να αναφέρουν κάτι για την τύχη του πλασμιδίου μετά απ' αυτές.

Μεγάλη επιτυχία είχε η κλωνοποίηση στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pZA22 του γονιδίου της κυτταρινάσης του στελέχους CB4 του *Cellulomonas uda* (Misawa *et al.*, 1986). Το πλασμίδιο αυτό μεταφέρθηκε και εκφράστηκε σε κύτταρα του στελέχους *Z. mobilis* NRRL B-14023, παράγοντας ποσά κυτταρινάσης όμοια με αυτά του στελέχους CB4. Τα ποσά αυτά εξαπλασιάστηκαν με τη χρήση ενός νέου πλασμιδίου, το οποίο προέκυψε από τη σύντηξη μεταξύ του πλασμιδίου αυτού και ενός ισχυρού υποκινητού που απομονώθηκε από το χρωμόσωμα του στελέχους NRRL B-14023. Αργότερα, επιτεύχθηκε η μεταφορά και έκφραση του γονιδίου *inaZ* του *Pseudomonas syringae*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη

παγοπυρήνωσης σε κύτταρα *Z. mobilis* CUIRif2 (Drainas *et al.*, 1995). Αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία κυττάρων *Z. mobilis* ice<sup>+</sup> (προκαλούν σχηματισμό παγοπυρήνων σε θερμοκρασία κάτω από -7°C) ανοίγοντας έτσι μια νέα προοπτική βιοτεχνολογικών εφαρμογών του *Z. mobilis*.

Το γεγονός ότι διάφορα ετερόλογα γονίδια έχουν μεταφερθεί και εκφραστεί στο *Z. mobilis* δείχνει ότι το ήπιο, μη παθογόνο και φιλικό προς το περιβάλλον αυτό βακτήριο θα μπορέσει να έχει ευρύτερες και σημαντικότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

#### 4.6 Το *Z. mobilis* στη βιομηχανία

Το *Zymomonas* είναι ένας μικροοργανισμός τα στελέχη του οποίου (άγριου τύπου ή ανασυνδυασμένα ή μεταλλαγμένα) μπορούν να μετατρέψουν τα απλά σάκχαρα σε αιθανόλη με ρυθμούς ταχύτερους και αποδόσεις υψηλότερες συγκριτικά με το ζυμομύκητα. Ωστόσο η βιομηχανία αιθανόλης εξακολουθεί να χρησιμοποιεί τον παραδοσιακό ζυμομύκητα και παρά τα προφανή πλεονεκτήματα του *Z. mobilis*, φαίνεται ότι υπάρχει δισταγμός στη χρησιμοποίησή του. Μερικοί από τους λόγους είναι η ανησυχία ότι το *Z. mobilis* μπορεί να είναι περισσότερο ευαίσθητο στις επιμολύνσεις σε τέτοιες μεγάλης κλίμακας διαδικασίες καθώς και η έλλειψη εμπειρίας στην μεγάλης κλίμακας βακτηριακή ζύμωση. Επιπλέον, η αγορά που χρησιμοποιεί ήδη τα πρωτεϊνικά παραπροϊόντα της ζύμωσης του ζυμομύκητα, δύσκολα θα πειστεί να ενσωματώσει το καινούργιο προϊόν από το *Z. mobilis*. Τα βασικά θέματα που αφορούν τη χρήση του *Z. mobilis* στην παραγωγή αιθανόλης και οι εναλλακτικές δυνατότητες συνοψίζονται στον

##### **Πίνακα 9.**

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων στελεχών *Z. mobilis* ικανών να χρησιμοποιούν τα C5 σάκχαρα ξυλόζη και αραβινόζη, έχουν πλέον ανοίξει νέες ευκαιρίες, όπως προκύπτει από την ανακοίνωση της εταιρείας Dupont/Broin για την ανάπτυξη μιας διαδικασίας μετατροπής φυτικών υπολειμμάτων καλαμποκιού σε αιθανόλη, βασιζόμενη στο *Zymomonas* (Reisch, 2006). Γενικά, η εμπειρία αυτή των ζυμώσεων μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα βακτήρια, θα μπορούσε να βοηθήσει πολύ, ώστε στο μέλλον να παράγονται όλο και περισσότερα προϊόντα υψηλότερης αξίας από μικροοργανισμούς οι οποίοι θα είναι ικανοί να μεταβολίζουν σάκχαρα γρήγορα και αποδοτικά.

**Πίνακας 9.** Πιθανοί λόγοι για τη μη εμπορευματοποίηση της διαδικασίας παραγωγής αιθανόλης από πρώτες ύλες σάκχαρα και αμυλούχα υποστρώματα.

Θέμα	Σχόλια
1. Ο ζυμομύκητας έχει καθιερωθεί για την παραγωγή αιθανόλης από ζύμωση σακχάρων και αμυλούχων υποστρωμάτων.	Μια πρακτική που έχει καθιερωθεί στη βιομηχανία υπερτερεί έναντι μιας καινούργιας διαδικασίας η οποία μπορεί να έχει πλεονέκτημα την υψηλότερη απόδοση παραγωγής, όπως αυτή μέσω του <i>Zygomonas</i> . Η μη παραγωγή παραπροϊόντων (π.χ. γλυκερόλη) της διαδικασίας μέσω <i>Zygomonas</i> επίσης αποτελεί πλεονέκτημα ελαχιστοποιώντας έτσι τα προβλήματα ρύπανσης κατά τη διάρκεια της απόσταξης.
2. Ο ζυμομύκητας είναι περισσότερο ανεκτικός σε αναστολείς, άλατα και συνθήκες χαμηλού pH.	Τόσο ο ζυμομύκητας όσο και το <i>Z. mobilis</i> επηρεάζονται από αναστολείς, με το <i>Z. mobilis</i> να είναι περισσότερο ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (π.χ. μελάσα) και χαμηλό pH (<3,5). Παρ' όλα αυτά, έχουν απομονωθεί στελέχη <i>Z. mobilis</i> ανθεκτικά σε τέτοιους αναστολείς.
3. Ο ζυμομύκητας έχει υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης στα παραπροϊόντα της ζύμωσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συμπληρώματα διατροφής των ζώων.	Το <i>Z. mobilis</i> είναι οργανισμός GRAS (generally regarded as safe) και έχει υψηλότερη περιεκτικότητα ακατέργαστης πρωτεΐνης (65-70%) από ότι ο σακχαρομύκητας (50-55%).
4. Ο έλεγχος των επιμολύνσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (π.χ. με την προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων) είναι ευκολότερος με το ζυμομύκητα, χρησιμοποιώντας χαμηλό pH.	Πειράματα σε συνεχείς καλλιέργειες (pH=5,0) έχουν δείξει ότι το <i>Z. mobilis</i> είναι πολύ ανθεκτικό σε επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (προφανώς λόγω του υψηλότερου ρυθμού πρόσληψης των σακχάρων). Καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας κυττάρων θα ελαχιστοποιούσαν ακόμη περισσότερο τα προβλήματα επιμόλυνσης. Δεν υπάρχει δε καμία αναφορά επιμόλυνσης του <i>Z. mobilis</i> με βακτηριοφάγους.
5. Έλλειψη βιομηχανικής εμπειρίας σε μεγάλης κλίμακας βακτηριακή ζύμωση συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένα βακτήρια.	Η εμπειρία μεγάλης κλίμακας βακτηριακής ζύμωσης τώρα έχει αρχίσει να αποκτιέται (π.χ. παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης χρησιμοποιώντας <i>rec E. coli</i> ).

## Σκοπός της διατριβής

Από τα στοιχεία που ήδη αναφέρθηκαν συνάγεται ότι για να χρησιμοποιηθεί το βακτήριο *Zygomonas mobilis* σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή αιθανόλης, θα πρέπει να κατασκευαστούν γενετικά βελτιωμένα στελέχη με διευρυμένο το φάσμα των ζυμώσιμων υδατανθράκων.

Γενετική βελτίωση του *Z. mobilis* μπορεί να πραγματοποιηθεί εισάγοντας ετεροειδή γενετική πληροφορία σ' αυτό και κυρίως τα απαραίτητα γονίδια για τη ζύμωση σακχάρων εκτός της γλυκόζης φρουκτόζης και σακχαρόζης που ήδη ζυμώνονται ικανοποιητικά σε βιοαντιδραστήρα. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να συμβάλει στην εύρεση της δομής και λειτουργίας των μικρών φυσικών πλασμιδίων (pZMO1, pZMO2 και pZMO3) του στελέχους ATCC 10988 του *Zygomonas mobilis* και στη χρησιμοποίηση αυτών στην κατασκευή κατάλληλων φορέων ανασυνδυασμού για την μεταφορά και έκφραση ξένων γονιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, οι επιμέρους στόχοι της διατριβής είναι:

α. Η εύρεση και ανάλυση της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του φυσικού πλασμιδίου pZMO2, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης της λειτουργίας πιθανών ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης πάνω σ' αυτό και μελέτης του μηχανισμού αντιγραφής του.

β. Η μελέτη συζευκτικών ικανοτήτων των μικρών πλασμιδίων του *Z. mobilis* και ο προσδιορισμός περιοχών πάνω σ' αυτά, υπεύθυνων για κινητικότητα, ώστε να γίνει ικανή η ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς γονιδίων στο στέλεχος ATCC 10988.

γ. Η κατασκευή νέων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία φέρουν ολόκληρα ή μέρος των φυσικών πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 και η μεταφορά τους σε κύτταρα *Z. mobilis* ώστε να μελετηθεί η σταθερότητά τους.

Ο τρόπος αντιγραφής των πλασμιδίων σε κύτταρα *Z. mobilis* θα μπορέσει να βοηθήσει στην κατασκευή κατάλληλων φορέων ανασυνδυασμού, προκειμένου να υπάρχει καλύτερη μεταφορά και έκφραση ετερόλογων γονιδίων που εισάγονται στο βακτήριο.

Επιπλέον, η μελέτη συστημάτων μεταφοράς και έκφρασης στο *Z. mobilis* θα μπορούσε να ανοίξει νέους δρόμους για την κατασκευή αυτόνομων συζευκτικών φορέων, ειδικών για τον οργανισμό, οι οποίοι να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίησή του σε βιομηχανικές χρήσεις.



# ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

## ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



## 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν διάφορα στελέχη των βακτηρίων *Zyotomonas mobilis* και *Escherichia coli*. Οι γονότυποι των στελεχών αυτών και η πηγή προέλευσής τους αναφέρονται στον **Πίνακα 11**, ενώ στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι δείκτες τους.

### 5.2 Θρεπτικά υλικά

α) Πλήρες θρεπτικό μέσο για το *E. coli* (Luria Broth, L.B.)

1%	(w/v)	NaCl
0,5%	(w/v)	εκχύλισμα ζύμης
1%	(w/v)	τρουπτόνη

pH 7,5 με διάλυμα NaOH 1N

Το πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο προέκυπτε με την προσθήκη στο L.B. 1,5% (w/w) άγαρ (L.A.).



**Πίνακας 10.** Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Πλασμιδιακοί δείκτες	Βιβλιογραφία
pBR325	6,0	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pRK2013	48,0	Km <sup>R</sup> traP, ColE1 replicon	Figuski & Helinski, 1979
pDS191	7,5	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Scordaki & Drainas, 1987
pDS212	7,8	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Scordaki & Drainas, 1987
pDS3270	8,7	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Scordaki & Drainas, 1987
pUC18	2,7	Ap <sup>R</sup>	Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	2,7	Ap <sup>R</sup>	Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUZMO1.1	4,1	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO1.2	4,3	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO1.3	3,7	Ap <sup>R</sup>	Παρούσα Εργασία
pUZMO 1.4	4,6	Ap <sup>R</sup>	Παρούσα Εργασία
pUZMO2.1	4,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO2.2	4,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO3.11	5,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO3.12	5,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO3.21	5,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pUZMO3.22	5,4	Ap <sup>R</sup>	Arvanitis <i>et al.</i> , 1995
pDA11	7,4	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Παρούσα Εργασία
pDA12	5,9	Tc <sup>R</sup>	Παρούσα Εργασία
pDA21	6,7	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Παρούσα Εργασία

**Πίνακας 11.** Βακτηριακά στελέχη

<b>Βακτήριο/ Στέλεχος</b>	<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
<i>E. coli</i>		
<b>HB101</b>	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), $\Delta$ ( <i>gtp-proA</i> )62, <i>recA13</i> , <i>araC14</i> , <i>glnV44</i> , <i>thiE1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ), <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>xylA5</i> , $\lambda$ <sup>-</sup>	Bolivar & Backman, 1979
<b>RR1</b>	F <sup>-</sup> , <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), $\Delta$ ( <i>gtp-proA</i> )62, <i>recA13</i> , <i>araC14</i> , <i>glnV44</i> , <i>thiE1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ), <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>xylA5</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>recA</i> <sup>+</sup>	Peacock <i>et al.</i> , 1981
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ58</i> ( <i>M15</i> ), <i>phoA8</i> , <i>glnV44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>deoR481</i> , <i>gyrA96</i> ( <i>Nal<sup>R</sup></i> ), $\Delta$ ( <i>lac-argF</i> ) <i>U169</i> , <i>endA1</i> , <i>thiE1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> )	Hanahan, 1983
<b>XL1-Blue</b>	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> ( <i>Nal<sup>R</sup></i> ), <i>F'</i> [: <i>Tn10proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup></i> , <i>lacI<sup>R</sup></i> , $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> ], <i>recA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<b>CSR603</b>	F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>uvrA6</i> , <i>phr-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>araC14</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>glnV44</i> , <i>rpsL31</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ), <i>thiE1</i> , <i>argE3</i> , <i>mtl-1</i> , <i>xylA5</i> , $\Delta$ ( <i>gtp-proA</i> )62, <i>galK2</i> , <i>gyrA98</i> ( <i>Nal<sup>R</sup></i> ), $\lambda$ <sup>-</sup>	Sancar & Rupert, 1978
<b>JM83</b>	F <sup>-</sup> , <i>ara</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>rpsL</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> )[ $\phi$ 80 <i>dlacA</i> ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> ]	Yanich-Perron <i>et al.</i> , 1985
<b>SM10</b>	F <sup>-</sup> , <i>tonA21</i> , <i>recA</i> , <i>RP4-2-Tc<sup>R</sup>::Mu</i> , <i>aphA<sup>+</sup></i> <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>Tra<sup>+</sup></i> , <i>IncP</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Z. mobilis</i>		
<b>CU1-Rif2</b>	περιέχει τα πλασμίδια pZMO1,2,3,5,6	Afendra & Drainas, 1987
<b>ATCC10988</b>	περιέχει τα πλασμίδια pZMO1,2,3,4,5,6	Swings & Delay, 1977

β) Ελάχιστο θρεπτικό μέσο για το *E. coli* (MM9 minimal medium, Maniatis *et al.*, 1982)

0,4 %	(w/v)	γλυκόζη
0,6%	(w/v)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,3%	(w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,05%	(w/v)	NaCl
0,1%	(w/v)	NH <sub>4</sub> Cl
2 mM		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,1 mM		CaCl <sub>2</sub>

Για την παρασκευή 1 L του θρεπτικού μέσου ακολουθούνταν η παρακάτω διαδικασία: αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο, ξεχωριστά 700 mL dH<sub>2</sub>O, όπου προστίθονταν 20 mL διαλύματος γλυκόζης (20% w/v) Στη συνέχεια προστίθονταν 200 mL από 5 φορές συμπυκνωμένο διάλυμα των αλάτων Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl και NH<sub>4</sub>Cl (5x M9 salts) το οποίο είχε κι αυτό αποστειρωθεί ξεχωριστά. Τέλος, προστίθονταν 2 mL διαλύματος MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1M, 0,1 mL διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 1M και συμπληρώνονταν με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O μέχρι 1 L.

Στην περίπτωση που το παραπάνω θρεπτικό μέσο περιείχε και 1% (w/v) Casamino acids, τότε προστίθονταν 50 mL διαλύματος Casamino acids (20% w/v) τα οποία είχαν αποστειρωθεί με φιλτράρισμα.

γ) Πλήρες θρεπτικό μέσο για το *Z. mobilis* (Z.B.)

2 %	(w/v)	γλυκόζη
0,1 %	(w/v)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,1 %	(w/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,05 %	(w/v)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 %	(w/v)	εκχύλισμα ζύμης

Το πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο για το *Z. mobilis* προέκυπτε με την προσθήκη στο Z.B. 1,5% (w/w) άγαρ (Z.A.).

### 5.3 Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών

α) Για την ανάπτυξη των στελεχών του *E. coli* εμβολιάζονταν υγρό θρεπτικό υλικό L.B., σε κωνικές φιάλες πλήρεις το πολύ κατά το 20% του όγκου τους, με κύτταρα μονής αποικίας από στερεό θρεπτικό υλικό. Η καλλιέργεια επωάζονταν στους 37°C υπό συνεχή ανακίνηση (120 rpm). Ο χρόνος διπλασιασμού ήταν 25-35 min ανάλογα με το στέλεχος. Στην περίπτωση που το θρεπτικό υλικό περιείχε κάποιο αντιβιοτικό ο χρόνος διπλασιασμού αυξανόταν έως τα 45 min. Καλλιέργειες κυττάρων που έφερναν το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013, επωάζονταν χωρίς ανακίνηση. Καλλιέργειες *E. coli* σε στερεά θρεπτικά υλικά λαμβάνονταν μετά από μια ημέρα επώασης στους 37°C.

β) Οι υγρές καλλιέργειες των στελεχών του *Z. mobilis* απαιτούσε αρχικά εμβολιασμό 20 mL Z.B. με κύτταρα μονής αποικίας από στερεό θρεπτικό υλικό και επώαση στους 30°C, χωρίς ανακίνηση. Στη συνέχεια εμβόλιο 1-2 % (v/v) από την παραπάνω ανεπτυγμένη καλλιέργεια σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, οδηγούσε σε καλλιέργεια σταδίου μέσης προς τέλους εκθετικής φάσης μετά από 14 – 16 h. Ο χρόνος διπλασιασμού των στελεχών του *Z. mobilis* ήταν περίπου 150 min, μπορούσε όμως να αυξηθεί έως 220 min στην περίπτωση που το θρεπτικό υλικό περιέχει κάποιο αντιβιοτικό. Σε στερεό θρεπτικό μέσο, μονές αποικίες γίνονται ορατές μετά από 3 - 6 ημέρες (ανάλογα αν το μέσο ανάπτυξής τους περιείχε αντιβιοτικό ή όχι) μετά την ημέρα εμβολιασμού.

### 5.4 Διατήρηση των στελεχών

Οι στερεές καλλιέργειες του *E. coli* διατηρούνταν στους 4°C για 3 μήνες ενώ του *Z. mobilis* για 1-2 μήνες. Για διατήρηση μεγαλύτερης διάρκειας, κύτταρα υγρών καλλιεργειών σταδίου μέσης προς τέλους εκθετικής αύξησης φυλάσσονταν στους -70°C παρουσία 50% (v/v) γλυκερόλης.

Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν λυοφιλιωθεί για μόνιμη διατήρηση. Η λυοφιλίωση έγινε με την εξής διαδικασία: 10 mL από την καλλιέργεια, που βρίσκονταν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, φυγοκεντρούνταν σε 3500 rpm / 10 min. Τα κύτταρα ξεπλένονταν με ddH<sub>2</sub>O και επαναιωρούνταν σε 0,2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και 0,8 mL αποβουτυρωμένου γάλακτος (skim milk 2% w/v).

**Πίνακας 12.** Αντιβιοτικά : Τρόπος δράσης – Μηχανισμός της ανθεκτικότητας

Αντιβιοτικό	Τρόπος Δράσης	Μηχανισμός της ανθεκτικότητας
<b>Ap.</b>	Αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων εμποδίζοντας τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμιου τρανσπεπτιδάση. Έτσι προκαλείται ο τερμινσιγμός της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.	Το γονίδιο ( <i>bla</i> ) κωδικοποιεί για το ένζυμο β-λακταμάση, το οποίο διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού.
<b>Cm.</b>	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση λόγω της πρόσδεσής του στην 50 S υπομονάδα του ριβοσώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της πεπτιδοσυναρπώσεως των 50 S, παρεμποδίζοντας έτσι το αμινο-ακετυλο-t-RNA να πλησιάζει στο ριβόσωμα και να σχηματίσει πεπτιδικό δεσμό.	Το γονίδιο ( <i>cat</i> ) κωδικοποιεί για ένα ειδικό ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της γλαυροφαιφαινκόλης, η οποία αδρανάζει το αντιβιοτικό.
<b>Tc.</b>	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με την πρόσδεσή του στην 30 S υπομονάδα του ριβοσώματος, με συνέπεια την παρεμπόδιση της δέσμευσης του αμινο-ακυλο-t-RNA στο ριβόσωμα.	Το γονίδιο ( <i>tet</i> ) κωδικοποιεί για ένα ειδικό ένζυμο, που τροποποιεί την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και εμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου.
<b>Km.</b>	Προσδένεται στο 70 S ριβόσωμα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην αντίγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA).	Το γονίδιο ( <i>kan</i> ) κωδικοποιεί για ένα ειδικό ένζυμο (τρανσφεράση αμινογλυκοσιδών), που τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με το ριβόσωμα.
<b>Sm.</b>	Προσδένεται στην 30 S υπομονάδα του ριβοσώματος και προκαλεί λάθη στην αντίγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Π.χ. το κωδικό UUU, όταν διαβάζεται από το ριβόσωμα με Sm, δεν κωδικοποιεί μόνο το αμινοξύ φαινυλαλανίνη αλλά και τα σερίνη, ισολευκίνη και λευκίνη. Έτσι, δημιουργούνται μη λειτουργικά πρωτεϊνικά μόρια.	Το γονίδιο ( <i>str</i> ) κωδικοποιεί για ένα ειδικό ένζυμο, το οποίο τροποποιεί το αντιβιοτικό και αναστέλλει τη δέσμευσή του πάνω στο ριβόσωμα.
<b>Rif.</b>	Αναστολέας της σύνθεσης του RNA που δρα στην ίδια την RNA-πολυμεράση. Δεσμεύεται στη β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης που είναι υπεύθυνη για τη μετακίνηση και δέσμευση του πάνω στο DNA.	Τροποποιημένη β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης.

Το αιώρημα παγώνονταν απότομα σε υγρό N<sub>2</sub> και εξαχνώνονταν μέχρι ξηρού υπό κενό σε ειδικά γυάλινα δοχεία κενού σε λυοφιλιωτή. Τα αφυδατωμένα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για πολλά χρόνια υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου.

## 5.5 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο δεικτών και οι τελικές συγκεντρώσεις τους, για τα στερεά και υγρά θρεπτικά υλικά, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 13**.

Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων τους γίνονταν με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης, μεγέθους πόρων 0,2 μm. Τα διαλύματα χαρακτηρίζονταν σαν διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης και φυλάσσονταν είτε στους 4 °C (Ap, Km, Str) είτε στους -20 °C (Tc, Cm, Rif).

Οι συγκεντρώσεις όλων των διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης ήταν 5 mg·mL<sup>-1</sup>, εκτός της χλωραμφαινικόλης που ήταν 20 mg·mL<sup>-1</sup>.

Η προσθήκη των αντιβιοτικών γίνονταν μετά την αποστείρωση των θρεπτικών υλικών, όταν η θερμοκρασία των τελευταίων έχει φτάσει περίπου στους 55°C, προκειμένου να μειωθεί η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού.

Στον **Πίνακα 12** παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης των αντιβιοτικών και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των γονιδίων απέναντι σε αυτά.

**Πίνακας 13.** Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

<i>Αντιβιοτικό / Διαλύτης</i>	<i>Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο (μg · mL<sup>-1</sup>)</i>			
	<i>Z. mobilis</i>		<i>E. coli</i>	
	<i>στερεό</i>	<i>υγρό</i>	<i>στερεό</i>	<i>υγρό</i>
<b>Αμπικιλίνη</b> / dd.H <sub>2</sub> O	-	-	100	100
<b>Καναμυκίνη</b> / dd.H <sub>2</sub> O	100	100	50	50
<b>Ριφαμικίνη</b> / αιθανόλη	40	20	-	-
<b>Τετρακυκλίνη</b> / αιθανόλη	40	40	20	20
<b>Χλωραμφαινικόλη</b> / αιθανόλη	100	50	-	20

Σπεκτινομυκίνη / dd.H <sub>2</sub> O	-	-	-	20
Στρεπτομυκίνη / dd.H <sub>2</sub> O	-	-	100	100
Κυκλοσερίνη / ddH <sub>2</sub> O	-	-	-	1000

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

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τους μετασχηματισμούς ανήκουν στη σειρά K-12 της *E. coli* και είναι τα εξής: JM83, DH5α, XL-1 blue, HB101. Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων προϋποθέτει κατάλληλη επεξεργασία των τοιχωμάτων τους με (κυρίως δισθενή κατιόντα) ώστε να γίνουν “δεκτικά” στην πρόσληψη του πλασμιδιακού DNA. Τα δεκτικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την παρασκευή τους ή να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -80°C. Οι συνήθεις μετασχηματισμοί στελεχών *E. coli* βασίζονται στην μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου/χλωριούχου ρουβιδίου των Kushner *et al.*, 1978. Το πρωτόκολλο εφαρμογής της μεθόδου μαζί με όποιες τροποποιήσεις, έχει ως εξής:

- Εμβολιάζονταν μονή αποικία, από τρυβλίο 1 - 2 ημερών, σε κωνική φιάλη με 20 mL L.B. και επωάζονταν για 18–20 h. Την επόμενη ημέρα θρεπτικό μέσο L.B. εμβολιάζονταν με 1 % (v/v) εμβόλιο από την παραπάνω καλλιέργεια και επωάζονταν υπό ανακίνηση μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm γίνει 0,1 - 0,2 (βέλτιστη OD<sub>600</sub> για το στέλεχος π.χ. DH5α).
- 1,5 mL καλλιέργειας φυγοκεντρούνταν στις 12000 rpm για 1min. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο απορρίπτονταν και ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με 1 mL παγωμένου διαλύματος πλύσεως (Δ1) και φυγοκέντρηση ξανά στις ίδιες συνθήκες (12000 rpm για 1 min).

Από το σημείο αυτό και σε όλη τη διάρκεια του μετασχηματισμού τα δείγματα φυλάσσονταν στους 0°C, ενώ οι χειρισμοί εκτός πάγου ήταν οι συντομότεροι δυνατοί.

- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρούνταν σε 1 mL διαλύματος ασβεστίου (Δ2) και επωάζονταν για 30 min σε υγρό πάγο (0°C).

- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των κυττάρων για 1 min στις 12000 rpm, καλή αφαίρεση του υπερκειμένου και πολύ καλή επαναϊώρηση του ιζήματος, με ήπιο τρόπο, σε 0,2 mL Δ2.
- Προσθέτονταν 3μl DMSO, γινόταν ήπια ανάδευση και ακολουθούσε η προσθήκη του πλασμιδιακού DNA σε ποσότητα περίπου 200 ng και όγκο 3 - 10 μl.
- Το εναιώρημα των κυττάρων επωάζονταν σε υγρό πάγο (0°C ) για άλλα 30 min.
- Στη συνέχεια ακολουθούσε θερμικό σοκ με την τοποθέτηση του μικροφυγοκεντρικού σωλήνα σε υδατόλουτρο 43,5°C για 1min.
- Τα δείγματα τοποθετούνταν για 1 – 2 min ξανά στους 0 °C.
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρονταν σε 5 mL πλούσιου θρεπτικού υλικού Z-broth (ή L.B.) και ακολουθούσε επώασή του για 1 h στους 37°C, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί ο χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA που έχουν προσλάβει.
- Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνονταν επίστρωση σε τρυβλία (περίπου 0,2 mL), που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό σαν μέσο επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η ποσότητα επίστρωσης εξαρτάται από το μέγεθος του πλασμιδίου και από το στέλεχος.
- Ανθεκτικές αποικίες εμφανίζονταν στο τρυβλίο μετά από 18 περίπου ώρες επώασης στους 37 °C.

Η συχνότητα μετασχηματισμού εκφράζεται από τον αριθμό των μετασχηματισμένων κυττάρων ανά μg μετασχηματιζόντος DNA.

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα πλύσεως ( Δ1 ) : 10mM RbCl, 10mM MOPS pH 7,0

Διάλυμα ασβεστίου ( Δ2 ) : 10mM RbCl, 100mM MOPS pH 6,5 , 50mM CaCl<sub>2</sub>.

Τα διαλύματα Δ1, Δ2, αποστειρώνονται με φίλτρο.



**Z-Broth**

1,6% (w/v) Nutrient broth

1% (w/v) πεπτόνη

0,2% (w/v) γλυκόζη

pH 7,5 με διάλυμα NaOH 1N

**5.7 Επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη μεταξύ *E. coli* και *Z. mobilis***

Κατά τη βακτηριακή σύζευξη έρχονται σε επαφή και ανταλλάσσουν γενετικό υλικό δύο βακτηριακά κύτταρα του αυτού ή διαφορετικού είδους. Το κύτταρο που δρα ως δότης περιέχει ένα συζευκτικό πλασμίδιο, που κωδικοποιεί τις απαραίτητες πληροφορίες για τη δημιουργία συζευκτικής γέφυρας μεταξύ των δύο κυττάρων, μέσω της οποίας μεταφέρεται ένα αντίγραφο του στο κύτταρο-δέκτη. Είναι όμως δυνατόν να μεταφερθούν και τμήματα του χρωμοσωμικού DNA του κυττάρου-δότη. Είναι δυνατό επίσης να μεταφερθεί και άλλο πλασμίδιο που υπάρχει στο κύτταρο-δότη, αρκεί να περιέχει *mob* περιοχές. Για το πλασμίδιο αυτό η σύζευξη λέγεται επιβοηθούμενη.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή για τη μεταφορά ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στο *Z. mobilis*. Ως δότες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους DH5α του *E. coli*, στα οποία συνυπήρχαν το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013 και το προς μεταφορά ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ως δέκτες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 του *Z. mobilis*.

Οι μετασυζευγμένες αποικίες επιλέχθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε χλωραμφαινικόλη ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ή τετρακυκλίνη ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος με χρήση φίλτρων (filter mating, Afendra & Drainas, 1987) σύμφωνα με την οποία:

- Αναμιγνύονταν υγρές καλλιέργειες των δύο στελεχών σε αναλογία κυτταρικού πληθυσμού δότη προς δέκτη, 1:2. Οι καλλιέργειες βρίσκονταν στο μέσο της εκθετικής φάσης. Ο συνολικός όγκος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2 mL.
- Το αιώρημα των κυττάρων αναδεύεται ήπια και διηθούνται υπό κενό χρησιμοποιώντας σαν ηθμό αποστειρωμένο φίλτρο νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων (0,45  $\mu\text{m}$ ). Τα κύτταρα κατακρατούνταν στην επιφάνεια του φίλτρου.

- Το φίλτρο τοποθετούνταν στην επιφάνεια τρυβλίου Z.A. και επωάζονταν στους 30 °C επί 5-6 h, ώστε να λάβει χώρα η βακτηριακή σύζευξη.
- Η σύζευξη τερματίζονταν με εμβαπτισμό του φίλτρου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 1 mL υγρό θρεπτικό μέσο (Z.B.) και επαναϊώρηση των κυττάρων με δυνατή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Εμβολιάζονταν 200 μl του αιωρήματος κυττάρων σε τρυβλία Z.A. και σε τρυβλία Z.A. που περιείχαν δείκτες επιλογής, ριφαμπικίνη (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και χλωραμφαινικόλη (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ή τετρακυκλίνη (40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).
- Μετά από 5-7 ημέρες εμφανίζονταν οι μετασυζευγμένες αποικίες. Στη συνέχεια επιλέγονταν ένας αριθμός από τις παραπάνω μετασυζευγμένες αποικίες και ελέγχονταν εάν πράγματι περιείχε το προς μεταφορά πλασμίδιο. Ο έλεγχος περιελάμβανε: εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, υβριδισμό κατά Southern, επαναμετασχηματισμό (back transformation) κυττάρων *E. coli* με το πλασμιδιακό εκχύλισμα. Τέλος απομονώνονταν το πλασμίδιο από τα επαναμετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* και υφίσταντο περιοριστική ανάλυση.

## 5.8 Έλεγχος της σταθερότητας πλασμιδίων σε κύτταρα *Z. mobilis*

Ως σταθερότητα πλασμιδίων εννοείται η σταθερή τους κληρονομηση στα θυγατρικά κύτταρα μετά από πολλές κυτταρικές γενεές κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες.

Κύτταρα του στελέχους, που φέρει το προς έλεγχο πλασμίδιο, εμβολιάζονταν σε 20 ml μη επιλεκτικού πλήρους θρεπτικού μέσου και επωάζονταν μέχρις ότου η καλλιέργεια φθάσει στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους. Από τη συνολική διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων του *Z. mobilis* υπολογίζεται ότι κατά το διάστημα αυτό έχουν πραγματοποιηθεί περίπου 10 κυτταρικές διαιρέσεις.

Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται όσες φορές είναι απαραίτητες για πραγματοποιηθούν πάνω από 300 κυτταρικές διαιρέσεις.

Κάθε 10 περίπου κυτταρικές διαιρέσεις πραγματοποιούνταν δειγματοληψία κυττάρων, τα οποία αραιώνονταν κατάλληλα και εμβολιάζονταν σε τρυβλία με μη

επιλεκτικό πλήρες θρεπτικό μέσο. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 30°C για την ανάπτυξη των αποικιών.

Μετά την εμφάνιση καλά ανεπτυγμένων αποικιών, ακολουθούσε αντιγραφική μεταφορά αυτών σε τρυβλίο που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό για το προς έλεγχο πλασμίδιο. Μετά από επώαση και ανάπτυξη των κυττάρων, ακολουθούσε σύγκριση των τρυβλίων πλήρους θρεπτικού μέσου και πλήρους θρεπτικού μέσου με το αντιβιοτικό επιλογής. Οι αποικίες κυττάρων που περιείχαν το πλασμίδιο αναπτύσσονταν και στα δύο τρυβλία, ενώ αυτών που δεν περιείχαν το πλασμίδιο αναπτύσσονταν μόνο στα τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό.

Ο λόγος % των ανθεκτικών αποικιών προς το σύνολο των αποικιών, αποτελεί το ποσοστό πλασμιδιακής σταθερότητας του πλασμιδίου:

$$\frac{\text{αριθμός αποικιών σε επιλεκτικό μέσο ανά mL}}{\text{αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο ανά mL}} \times 100$$

Η γραφική παράσταση αυτών των δεδομένων δείχνει την πορεία κληρονόμησης του πλασμιδίου στον αναπτυσσόμενο πληθυσμό.

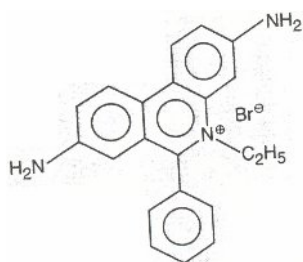
## 5.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

### 5.9.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μεγάλη κλίμακα. Καθαρισμός σε βαθμίδωση πυκνότητας CsCl (Maniatis *et al.*, 1982)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου του DNA διασπώνται, με αποτέλεσμα να διαχωριστούν οι δύο αλυσίδες (μετουσίωση). Αν όμως το διάλυμα ουδετεροποιηθεί τότε, το μεν πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται, το δε χρωμοσωμικό DNA παραμένει μετουσιωμένο. Έτσι ο διαχωρισμός του γίνεται εύκολα.

Ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού DNA από τις πρωτεΐνες, το RNA και τα υπολείμματα του χρωμοσωμικού DNA γίνεται με την επίδραση του βρωμιούχου αιθιδίου. Αυτό εισβάλλει μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνεται η διπλή έλικά του. Με αυτό τον τρόπο συνεχίζεται η εισβολή του βρωμιούχου αιθιδίου, που προκαλεί την επιμήκυνση του μορίου του DNA και κατ' επέκταση την ελάττωση της πυκνότητας επίπλευσής του. Στην περίπτωση όμως του πλασμιδιακού DNA με μορφή κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου, το ξεδιπλωμα της διπλής έλικάς του συνοδεύεται με

αντισταθμιστικές στροφές προς την αντίθετη κατεύθυνση, έτσι ώστε να εμποδίζεται η περαιτέρω διείσδυση του βρωμιούχου αιθιδίου στο μόριό του.



Συντακτικός τύπος του Βρωμιούχου Αιθιδίου

Άρα, σε εξισορροπημένη βαθμίδωση πυκνότητας CsCl, που επιτυγχάνεται με πολύωρη υπερφυγοκέντρωση, διαχωρίζονται τα σύμπλοκα πλασμιδιακού DNA-EtBr (που έχουν χαμηλότερο ποσοστό πρόσδεσης του EtBr λόγω του υπερσπειρωμένου μορίου, άρα μεγαλύτερη πυκνότητα επίπλευσης σε σχέση με τις άλλες διαμορφώσεις του DNA) από τα υπόλοιπα σύμπλοκα μόρια DNA-EtBr. Το σύμπλοκο πλασμιδιακού DNA-EtBr σχηματίζει μια ζώνη που βρίσκεται κοντά στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα (Hardy, 1981).

### **Πειραματική διαδικασία**

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα γίνονταν από καλλιέργειες κυττάρων *E. coli* 500 mL. Μεγάλη σημασία στην ποσοτική απομόνωση κλώνων και φορέων είχε ο αριθμός αντιγράφων ανά κύτταρο να είναι ο βέλτιστος δυνατός. Οι ολιγοαντιγραφικοί φορείς (π.χ. pBR325 και παράγωγα αυτού) απομονώνονταν κατόπιν ενίσχυσης του αριθμού αντιγράφων αυτός (amplification) εντός στελεχών του βακτηρίου *E. coli*, με την προσθήκη αναστολέων πρωτεϊνοσύνθεσης, οι οποίοι ενώ σταματούν την αντιγραφή του χρωμοσωμικού DNA, δεν παρεμποδίζουν το διπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες μπορεί να συνεχίζεται η αντιγραφή του πλασμιδιακού DNA. Ως αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης για την ενίσχυση πλασμιδίων, ανάλογα με την ανθεκτικότητα του στελέχους, χρησιμοποιούνταν η χλωραμφαινικόλη (τελικής συγκέντρωσης 180  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ή η σπεκτινομυκίνη (τελικής συγκέντρωσης 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), η προσθήκη των οποίων γίνονταν όταν η καλλιέργεια έφτανε πάνω από το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Μετά την προσθήκη η επώαση συνεχίζονταν για 10-12 h.

- Στη συνέχεια γίνονταν συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρωση στις 8000 rpm (4 °C, 10 min).

- Ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με 25 mL διαλύματος 25 mM Tris-HCl pH 8,0.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν ξανά (8000 rpm, 4 °C, 10 min), όπως προηγουμένως, και στη συνέχεια επαναιωρούνταν σε 25 mL διαλύματος λύσεως, το οποίο περιείχε 125 mg λυσοζύμης. Το αιώρημα αυτό επωάζονταν σε υγρό πάγο (0°C) για 30 min.
- Ακολουθούσε προσθήκη 40 mL φρέσκου διαλύματος II και ήπια ανάδευση μέχρις ότου το αιώρημα των κυττάρων γίνει διαυγές. Η επώαση σε υγρό πάγο (0°C) συνεχίζονταν για άλλα 15 min.
- Στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 8000 rpm (0°C, 5 min) και το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 500 mL, διαμέσου αποστειρωμένης γάζας, ώστε να διαχωριστεί το διάλυμα από τυχόν αιωρούμενα στερεά κυτταρικά υπολείμματα.
- Το DNA κατακρημνίζονταν με την προσθήκη ψυχρής (-20°C) ισοπροπανόλης σε αναλογία 3 / 5 του όγκου του δείγματος και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 8000 rpm (0°C, 15 min).
- Το ίζημα αφήνονταν να στεγνώσει και στη συνέχεια διαλύονταν σε 6,7 mL TE 8,0.
- Ακολουθούσε μεταφορά του παραπάνω διαλύματος σε κωνική φιάλη των 50 mL, όπου είχαν ζυγιστεί 7,2 g CsCl. Μετά την πλήρη διάλυση του CsCl προστίθεται ποσότητα 0,7 mL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), συγκέντρωσης 3 mg·mL<sup>-1</sup>.
- Το διάλυμα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 4000 rpm (10 min), για να απομακρυνθούν πολλές από τις πρωτεΐνες που είχαν μετουσιωθεί ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατό καθαρότερο κατά την υπερφυγοκέντρωση.
- Το υπερκείμενο τοποθετούνταν σε σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης. Προσθέτονταν παραφινέλαιο στην επιφάνεια του διαλύματος και ο σωλήνας σφραγίζονταν με ειδικό μηχανήμα, αφού πρώτα είχαν απομακρυνθεί οι οποιεσδήποτε φυσαλίδες αέρα.
- Ακολουθούσε υπερφυγοκέντρωση του δείγματος στις 40000 rpm (18°C, 22 h) σε υπερφυγόκεντρο Beckman L7-65 με κεφαλή NVT-65).
- Μετά το τέλος αυτός υπερφυγοκέντρωσης, με τη βοήθεια λυχνίας UV (όχι πάντα, αφού η ζώνη μπορεί να είναι ορατή και χωρίς τη βοήθεια της λυχνίας UV), σημειώνονταν η ζώνη του πλασμιδιακού DNA, η οποία φθόριζε λόγω του δεσμευμένου EtBr.

- Η ζώνη μεταφέρονταν με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL.
- Το EtBr απομακρύνονταν με διαδοχικές εκχυλίσεις 2-βουτανόλης. Οι εκχυλίσεις σταματούσαν όταν χανόταν το ρόδινο χρώμα από την υδατική φάση (χρειάζονταν 3-4 εκχυλίσεις). Ο διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση διευκολύνονταν με σύντομη φυγοκέντρηση αυτός 3500 rpm (5 min).
- Η απομάκρυνση του CsCl από το διάλυμα του DNA γίνονταν με διαπίδυση εντός κατάλληλα κατεργασμένων μεμβρανικών σωλήνων όπως περιγράφεται στη σελ. 100 της παρούσας διατριβής.
- Μετά τη συλλογή του δείγματος γίνονταν ποσοτικός προσδιορισμός των νουκλεϊκών οξέων φασματοφωτομετρικά.

Αφού γίνονταν οι κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνονταν μέτρηση στα 260 nm και 280 nm, που επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας DNA και RNA του δείγματος, ως εξής:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} = 1: \text{αντιστοιχεί σε } 50 \text{ } \mu\text{g} \text{ δίκλωνου DNA ανά mL}$$

Ο λόγος  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του DNA ή του RNA. Καθαρό θεωρείται το παρασκεύασμα του DNA όταν ο λόγος αυτός είναι:  $1,8 < \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} < 2,0$ .

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα I (διάλυμα λύσεως) :	50 mM γλυκόζης
	25 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	5 mg / mL λυσοζύμης

Διάλυμα II :	0,2 N NaOH
	1 % SDS

(Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του)

---

Διάλυμα III :	3M CH <sub>3</sub> COOK pH 4,8
Διάλυμα TE :	10 mM Tris-HCl pH8,0 1mM EDTA pH 8,0

### 5.9.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Z. mobilis* (Scordaki & Drainas, 1987)

Η λύση του *Z. mobilis* απαιτεί προσοχή καθώς ο μικροοργανισμός δε λύεται και δεν αποπρωτεϊνοποιείται εύκολα, ενώ εμφανίζει ισχυρή νουκλεολυτική δράση, που μπορεί να οδηγήσει στην άμεση αποικοδόμηση του υπό παρασκευή δείγματος. Η αποτελεσματικότερη μέθοδος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, βασίστηκε στη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των κυττάρων.

- Κύτταρα απαραιτήτως πρόσφατης καλλιέργειας 50 mL, η οποία βρίσκονταν στο μέσο προς στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, συλλέγονταν με φυγοκέντρηση στις 8000 rpm (4 °C , 10 min).
- Το κυτταρικό ίζημα εκπλένονταν με 5 mL διαλύματος 50 mM Tris-HCl pH 8,0.
- Στη συνέχεια γίνονταν επαναιώρηση των κυττάρων με 0,2 mL διαλύματος TE<sub>50</sub> και ακολουθούσε προσθήκη 100 μl λυσοζύμης και επώαση στους 37°C, για 40 min.
- Στο εναιώρημα προστίθονταν 2,5 mL διαλύματος λύσεως και αναδεύονταν ήπια για 1 min (περίπου 100 αναστροφές με το χέρι). Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 40 min. Σ' αυτό το βήμα πραγματοποιούνταν η λύση των κυττάρων.
- Στη συνέχεια προσθέτονταν 0,4 mL διαλύματος 2M Tris-HCl pH 7,0 και το διάλυμα αναδεύονταν με το χέρι. Έτσι επιτυγχάνονταν η ουδετεροποίηση του δείγματος.
- Η κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA γίνονταν με προσθήκη 0,27 mL 5 M NaCl, ανάδευση όπως προηγούμενα και τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό πάγο (0°C) για 2 h.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 15000 rpm (4°C, 30 min) για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και το χρωμοσωμικό DNA.
- Το υπερκείμενο τοποθετούνταν σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα, που περιείχε 32 ml διαλύματος ενεργοποιημένης RNασης, και το δείγμα επωάζονταν στους 37°C για 30 min. Η επεξεργασία αυτή γίνονταν για την απομάκρυνση του RNA.

- Ακολουθούσαν δύο εκχυλίσεις με 2,5 mL φαινόλης. Το διάλυμα αναδεύονταν γρήγορα με το χέρι για 10 sec και στη συνέχεια ήπια για 1 min. Οι φάσεις διαχωρίζονταν με φυγοκέντρηση στις 3800 rpm (5 min). Η φαινόλη χρησιμοποιούνταν για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών.
- Νέα εκχύλιση με 2,5 mL μίγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24 : 1 v / v). Η ανάμιξη και ο διαχωρισμός των φάσεων γίνονταν όπως και προηγουμένως. Το χλωροφόρμιο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και διευκολύνει το διαχωρισμό της υδατικής φάσης από την οργανική, ενώ η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει την παρουσία φυσαλίδων. Παράλληλα, το μίγμα αυτό βοηθά στην απομάκρυνση της φαινόλης.
- Στην υδατική φάση προστίθονταν ποσότητα 3 M CH<sub>3</sub>COONa ίση με το 1/6 της υδατικής φάσης και ψυχρή αιθανόλη 96% (-20°C), σε όγκο διπλάσιο έως τριπλάσιο από τον όγκο της υδατικής φάσης. Το δείγμα τοποθετούνταν στους -20°C όλη τη νύχτα ή στους -70°C για 30 min, ώστε να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA.
- Το κατακρημνισμένο πλασμιδιακό DNA λαμβάνονταν με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm (0°C, 20 min).
- Τι ίζημα εκκλίνονταν με 2 mL 70% παγωμένης αιθανόλης, στεγνώνονταν και επαναδιαλύονταν σε 100-200 μl TE<sub>10</sub>. Το διάλυμα του πλασμιδιακού DNA φυλάσσονταν στους 4°C (όταν επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί άμεσα) ή στους -20°C (όταν επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί μακροπρόθεσμα).
- Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* καθώς και από καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου αυξάνοντας τον όγκο των διαλυμάτων αναλογικά σε κάθε βήμα.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

TE <sub>50</sub>	Tris 50 mM, EDTA 5mM pH 8,0
Διάλυμα λυσοζύμης	40 mg · mL <sup>-1</sup> σε TE <sub>50</sub>
Διάλυμα λύσης	1% ( w / v ) SDS σε TE <sub>50</sub> . Πριν τη χρήση του, το pH ρυθμίζονταν στην τιμή 12,45 με 12N NaOH



Δ/μα RNασης	2 mg·mL <sup>-1</sup> RNαση σε νερό. Το διάλυμα βράζονταν στους 95°C /10 min και διατηρούνταν στους -20°C
Φαινόλη	Η φαινόλη αποστάζονταν στους 160°C για την απομάκρυνση των διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων (π.χ. κινόνες), οι οποίοι καταστρέφουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των νουκλεϊνικών οξέων. Για προστασία από την οξείδωση προσθέτονταν στη φαινόλη 8-υδροξυκινολίνη (8-hydroxyquinoline), σε τελική περιεκτικότητα 0,1%, (δείκτης οξείδωσης της φαινόλης). Η φαινόλη εξισορροπείτο με διάλυμα Tris-HCl. Αυτό επιτυγχάνονταν με μια εκχύλιση με ίσο όγκο 1M Tris-HCl pH 8,0 και διαδοχικές εκχυλίσεις (τουλάχιστον 3) με ίσο όγκο 0,1M Tris-HCl pH 8,0 ώστε το pH της υδατικής φάσης να γίνει $\geq 7,8$ . Τέλος, φυλάσσονταν σε σκοτεινόχρωμα μπουκάλια.

### 5.9.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini preparation). Πρωτόκολλο I (Maniatis *et al.*, 1982)

Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στην απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρές καλλιέργειες, τα κύτταρα των οποίων λύνονται με βρασμό (boiling method).

- 5 mL θρεπτικού μέσου, που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονταν με μονή αποικία βακτηριακών κυττάρων η οποία περιείχε το πλασμίδιο.
- Η καλλιέργεια επωάζονταν υπό συνεχή ανακίνηση όλη τη νύχτα στους 37°C.
- Από την καλλιέργεια μεταφέρονταν 1,5 mL σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα (τύπου erppendorf) ο οποίος φυγοκεντρούνταν για 1 min στις 12000 rpm.
- Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και στο ίζημα προσθέτονταν ποσότητα 350 μl διαλύματος STET.
- Ακολουθούσε επαναιώρηση του ιζήματος, προσθήκη 25 μl διαλύματος λυσοζύμης και ισχυρή ανάδευση για 5 sec σε μηχανικό αναδευτήρα (η λυσοζύμη δε δρα αποτελεσματικά αν το pH του διαλύματος είναι μικρότερο από 8).



#### 5.9.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini preparation). Πρωτόκολλο II (Maniatis *et al.*, 1982)

Η μέθοδος αναφέρεται στην απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρές καλλιέργειες, τα κύτταρα των οποίων εκχυλίζονται με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

- 5 mL θρεπτικού μέσου, που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονταν με μονή αποικία βακτηριακών κυττάρων τα οποία περιείχαν το πλασμίδιο.
- Η καλλιέργεια επωάζονταν υπό συνεχή ανακίνηση όλη τη νύχτα στους 37°C.
- 1,5 mL της καλλιέργειας φυγοκεντρούταν για 2 min στις 7000 rpm σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf).
- Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρούνταν ήπια (χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα) σε 100 µl Διαλύματος I. Το αιώρημα παρέμενε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούσε προσθήκη 200 µl Διαλύματος II και ήπια ανάδευση, μέχρι το εναίωρημα των κυττάρων να γίνει διαυγές διάλυμα. Η ανάδευση γίνονταν αναστρέφοντας πολλές φορές το μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολουθούσε επώαση στον πάγο για 5 min.
- Στη συνέχεια προσθέτονταν 150 µl Διαλύματος III, ακολουθούσε ήπια ανάδευση, όπως παραπάνω και παραμονή στον πάγο για 10 min. Το βήμα αυτό απαιτούσε ιδιαίτερη προσοχή, γι' αυτό και κατά τη διάρκεια της ψυχρής επώασης ήταν απαραίτητη η ανάδευση του μίγματος για 1-2 φορές.
- Το μίγμα φυγοκεντρούταν στις 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά 400 µl υπερκειμένου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου και προσθήκη 320 µl ισοπροπυλικής αλκοόλης. Ανάδευση, όπως παραπάνω, και παραμονή του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 10 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (το βήμα αυτό μπορούσε να γίνει και στους 4°C).
- Το υπερκείμενο αποχύνονταν προσεκτικά και το ίζημα στέγνωσε με παραμονή του στους 37°C για 10 min.
- Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρούνταν σε 300 µl TE για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η επαναιώρηση γινόταν είτε με το χέρι, είτε σε μηχανικό αναδευτήρα (ανάλογα με το μέγεθος του μορίου DNA).

- Ακολουθούσε προσθήκη 1,5 μl ενεργοποιημένης RNase ( $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) και επώαση του διαλύματος για 15 min στους  $37^\circ\text{C}$ .
- Προσθήκη 30 μl  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 5,5 καθώς και 800 μl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Ανάδευση με ήπια αναστροφή και επώαση για 20 min σε βαθιά κατάψυξη ( $-70^\circ\text{C}$ ), ή κατά τη διάρκεια της νύχτας στους  $-20^\circ\text{C}$ .
- Το μίγμα φυγοκεντρούνταν για 15 min ( $4^\circ\text{C}$ , 12000 rpm).
- Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου ακολουθούσε πλύση με 300 μl 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρωση για 5 min ( $4^\circ\text{C}$ , 12000 rpm).
- Απόρριψη ξανά του υπερκειμένου και ξήρανση του ιζήματος είτε στους  $37^\circ\text{C}$ , είτε σε Speed Vac.
- Το ίζημα διαλύονταν σε 50 μl διαλύματος TE και το διάλυμα φυλάσσονταν στο ψυγείο ή στους  $-20^\circ\text{C}$  ανάλογα με τη χρήση που θα ακολουθούσε.

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα I (διάλυμα λύσεως) : 50 mM γλυκόζης  
 25 mM Tris-HCl pH 8,0  
 10 mM EDTA  
 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  λυσοζύμης

Διάλυμα II : 0,2 N NaOH  
 1 % SDS

(Το διάλυμα παρασκευάζονταν πάντα αμέσως πριν τη χρήση του)

Διάλυμα III : 3M  $\text{CH}_3\text{COOK}$  pH 4,8

Διάλυμα TE : 10 mM Tris-HCl pH 8,0  
 1mM EDTA pH 8,0

## 5.10 Καθαρισμός DNA με τη μέθοδο της διαπίδωσης (Maniatis *et al.*, 1982)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό χρωμοσωμικού ή πλασμιδιακού DNA από CsCl καθώς και άλλων μορίων μικρού M.B. όταν αυτό πρόκειται να υποστεί περιοριστική ανάλυση, κλωνοποίηση ή σήμανση.

Σε τεμάχιο ενεργοποιημένου μεμβρανικού σωλήνα διαπίδωσης, ο οποίος ήταν κλεισμένος στο ένα άκρο του με πλαστικό σφικτήρα, προσθέτονταν το υπό καθαρισμό DNA με αποστειρωμένο σιφώνιο Pasteur ή με Gilson, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα ακρορρύγχια (tips). Αφού απομακρύνονταν οι φυσαλίδες του αέρα, ο μεμβρανικός σωλήνας σφραγιζόταν και στο ανοιχτό άκρο με σφικτήρα.

Ακολουθούσε βύθιση της μεμβράνης σε δοχείο ζέσεως που περιείχε 1 L διαλύματος TE. Το δοχείο τοποθετούνταν σε μαγνητικό αναδευτήρα στους 4°C και αναδεύονταν για 5 h. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνονταν 3-4 φορές με αλλαγή του διαλύματος TE.

Το καθαρό διάλυμα του DNA συλλέγονταν με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα και διατηρούνταν στο ψυγείο.

### 5.10.1 Κατεργασία των μεμβρανών διαπίδωσης (dialysis tubing)

- Τμήματα μεμβρανών μήκους 10-15 cm από ρολό μεμβρανικού σωλήνα διαπίδωσης (Visking dialysis tubing, SERVA 20/32 No44110) κόβονταν και βράζονταν για 10 min σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 2L διαλύματος 10 mM EDTA pH 8,0 προσέχοντας οι μεμβράνες να βρίσκονται συνεχώς βυθισμένες μέσα στο διάλυμα. Γι' αυτό κατά τη διάρκεια του βρασμού, τοποθετούνταν χιαστί μερικά γυάλινα σιφώνια ή τοποθετούνταν ποτήρι ζέσεως 500 mL, που περιείχε 250 mL νερού.
- Ακολουθούσαν τρεις πεντάλεπτοι διαδοχικοί βρασμοί των μεμβρανών με 500 mL απεσταγμένου νερού, με ενδιάμεσες αλλαγές του νερού.
- Μετά τον τελευταίο βρασμό, οι ενεργοποιημένες μεμβράνες αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο για 20 min, σε κωνική φιάλη, που περιείχε 200 mL ddH<sub>2</sub>O, και στη συνέχεια προσθέτονταν 1 mM EDTA pH 8,0 και φυλάσσονταν στο ψυγείο (4°C). Προαιρετική ήταν η προσθήκη λίγων σταγόνων χλωροφορμίου (που δρα ως αντιμικροβιακό) ενώ χρησιμοποιούνταν μόνο με γάντια. Πριν από τη χρήση τους ξεπλένονταν καλά, εσωτερικά και εξωτερικά με απεσταγμένο νερό.

## 5.11 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι βακτηριακά ένζυμα, που διασπούν δίκλιωνα μόρια DNA σε θέσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών βάσεων (συνήθως 4-6), διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις συμμετρικά στις δύο αλυσίδες και εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των θραυσμάτων του DNA, που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών (τύπου II), υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ως προς τις αποστάσεις προτύπων ζωνών DNA γνωστών M.B. Στην εργασία αυτή ως πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε DNA φάγου λ που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*. Η πέψη αυτή δίνει τα εξής περιοριστικά θραύσματα : 23.26, 9.46, 6.55, 4.26, 2.30, 2.02 και 0.59 kb. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, μετά την πέψη του DNA, αφήναν απότομα (blund) ή συμβατά (sticky) άκρα. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες δράσης, οι οποίες εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, το pH και την τελική σύσταση του διαλύματος όπου γίνεται η αντίδραση.

Για τις πέψεις των δειγμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε μια σειρά περιοριστικών ενδονουκλεασών των εταιριών Boehringer Mannheim, Stratagene, Promega, New England Biolabs και Minotech.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

Οι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τις πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι:

1. Η ποσότητα του ενζύμου. Ο όρος «μονάδα ενεργότητας» (unit) για τα περιοριστικά ένζυμα σημαίνει την ποσότητα του ενζύμου που διασπά 1μg DNA του φάγου λ σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης στους 37°C για μια ώρα. Όμως, ενώ στην πειραματική διαδικασία μια μονάδα ενζύμου μπορεί να είναι αρκετή για την πλήρη πέψη του 1 μg DNA του φάγου λ, ίσως να μην είναι αρκετή για την ίδια ποσότητα DNA του δείγματος που αναλύεται. Αυτό πιθανά να οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό θέσεων περιορισμού του προς ανάλυση DNA. Είναι προτιμότερο λοιπόν να χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου (2-3 μονάδες) ανά 1 μg δείγματος DNA.

2. Η καθαρότητα του DNA. Όσο πιο καθαρό είναι το DNA, τόσο καλύτερα αναγνωρίζονται οι θέσεις περιορισμού. Επίσης, η αντίδραση πέψης γίνεται με δυσκολία, ή μερικώς, όταν το διάλυμα είναι πυκνό ή το DNA έχει μεγάλο M.B. ή είναι μεθυλιωμένο.
3. Το ρυθμιστικό διάλυμα πέψης. Τα διαλύματα αυτά περιέχουν ιόντα μαγνησίου (10mM  $Mg^{2+}$ ) και κατάλληλη ποσότητα άλατος. Για να βοηθηθεί η δράση του ενζύμου, σε πολλές περιπτώσεις προστίθενται στο δείγμα σταθεροποιητικοί παράγοντες π.χ. αλβουμίνη (BSA).
4. Η μεταφορά του ενζύμου. Η μεταφορά του ενζύμου πρέπει να γίνεται σε πάγο και να ελαχιστοποιείται ο χρόνος παραμονής του εκτός των  $-20^{\circ}C$ , διαφορετικά μειώνεται η δραστηριότητα.
5. Η συγκέντρωση γλυκερόλης. Το ρυθμιστικό διάλυμα συντήρησης όλων των περιοριστικών ενζύμων περιέχει 50% (v/v) γλυκερόλη, λόγω του ότι τα ένζυμα αυτά φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}C$ . Αν η αναλογία της γλυκερόλης είναι μεγαλύτερη από το 5 % του συνολικού όγκου της αντίδρασης, τότε είναι δυνατό να αναστέλλεται ή να μειώνεται η δράση του ενζύμου και να προκαλείται μερική πέψη του DNA. Γι' αυτό πρέπει ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του ενζύμου που προστίθεται σ' αυτή.

## 5.12 Πέψεις πλασμιδιακού DNA

Οι πέψεις του πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα γίνονται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων της κάθε εταιρίας. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 10-20  $\mu$ l. Το μίγμα αποτελούνταν, από τα εξής συστατικά κατά σειρά προσθήκης τους στο σωλήνα μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf) :

- Κατάλληλη ποσότητα d.H<sub>2</sub>O, για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.
- Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με το 1:10 του τελικού όγκου αντίδρασης.
- Ορισμένη ποσότητα DNA (0,5 - 1  $\mu$ g).
- Περιοριστική ενδονουκλεάση 2-10 U /  $\mu$ l.

Οι πέψεις τερματίζονται με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM. Υπήρχαν ένζυμα τα οποία απενεργοποιούνται με θέρμανση στους 65°C για 10 min.

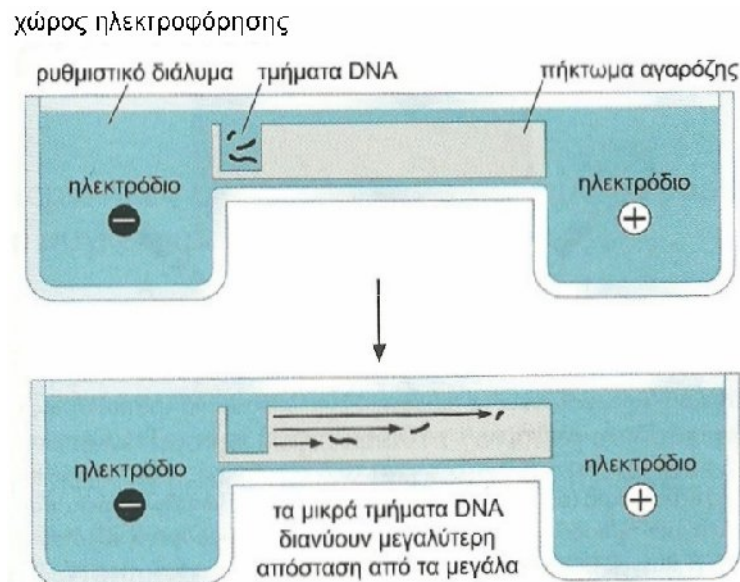
## 5.13 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

### 5.13.1 Γενικά

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο γεγονός ότι το μόριο του DNA παρουσιάζει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, να μετακινείται προς το θετικό πόλο.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μετανάστευση του DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης είναι :

1. Το μέγεθος του τμήματος του DNA : Τα γραμμικά μόρια μετακινούνται στο πήκτωμα της αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογαρίθμου των μοριακών βαρών τους.



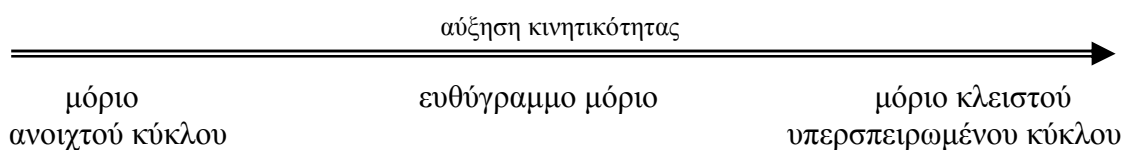
**Σχήμα 31.** Διαχωρισμός μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος.

Το σχήμα απεικονίζει μια πλευρική όψη του πηκτώματος σε κατά μήκος τομή. Τα μόρια DNA, που είναι φορτισμένα με αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, κινούνται μέσω του πηκτώματος προς την άνοδο (θετικός πόλος). Η απόσταση που διανύουν είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος του τμήματος DNA, όπως υποδεικνύεται σχηματικά.



2. Η συγκέντρωση της αγαρόζης : Η μετακίνηση ενός μορίου DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μικρότερη είναι η διάμετρος των πόρων.
3. Η διαμόρφωση του DNA : Τα μόρια του DNA, που πρόκειται να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, είναι συνήθως τριών μορφών: κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιικό DNA), κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια που έχουν εγκοπές στη μια αλυσίδα) και γραμμικά μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια του DNA που έχουν υποστεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Μόρια DNA του ίδιου M.B. αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης έχουν διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Η κινητικότητα αυτή επηρεάζεται επίσης από α) την ένταση του ρεύματος, β) την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης και γ) το βαθμό υπερελίκωσης (form-I). Η σειρά αύξησης της κινητικότητας κατά τους Grinsted & Bennett, 1988, είναι :



4. Το ηλεκτρικό πεδίο : Η κινητικότητα του μορίου του DNA είναι ανάλογη της τάσης του πεδίου. Γενικά ισχύει ότι, όσο χαμηλότερη τάση εφαρμόζεται, τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται. Η συνήθης ηλεκτροφορητική τάση έχει βρεθεί ότι είναι περίπου ίση με  $5 \text{ Volt}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 5.13.2 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Στην παρούσα εργασία η ανάλυση των δειγμάτων DNA γίνονταν σε οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Έτσι:

- Επιλέγονταν η συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούνταν οι αντίστοιχοι υποδοχείς και το κατάλληλο χτένι για τη δημιουργία των φρεατίων εντός των οποίων θα τοποθετούνταν τα δείγματα.
- Σε μια κωνική φιάλη που περιείχε την ανάλογη ποσότητα αγαρόζης (% πήκτωμα αγαρόζης), προσθέτονταν ίση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x

TBE ή 1x TAE (το διάλυμα παρασκευής του πήκτωματος πρέπει να είναι το ίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση).

- Το περιεχόμενο διαλύονταν πλήρως με βρασμό ή σε φούρνο μικροκυμάτων. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος κατέβαινε περίπου στους 50°C προσθέτονταν βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο πήκτωμα να ήταν 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Εναλλακτικά, η χρώση του πήκτωματος μπορούσε να πραγματοποιηθεί και μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, εμβαπτίζοντάς το σε διάλυμα EtBr.
- Στη συνέχεια γίνονταν απόχυση του λιωμένου πήκτωματος στην αντίστοιχη θέση της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Μετά την πήξη του πήκτωματος, αφαιρούνταν το κτένι ώστε να δημιουργηθούν τα φρεάτια. Προστίθονταν το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE ή 1x TAE μέχρι ύψους 0,5 cm πάνω από την επιφάνεια του πήκτωματος.
- Στα δείγματα του DNA προσθέτονταν ο κατάλληλος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Gel Loading Buffer - G.L.B.) σε αναλογία 1:5 αντίστοιχα. Το G.L.B. έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το νερό με αποτέλεσμα το δείγμα του DNA να κατακρατούνταν στον πυθμένα του φρεατίου και να εισχωρούσε στο πήκτωμα της αгарόζης μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Αυτό επιτυγχάνονταν με την υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης που περιέχει το G.L.B. Επίσης, ένας άλλος ρόλος του G.L.B. είναι η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης λόγω των αρνητικά φορτισμένων χρωστικών που έχει.
- Παράλληλα προετοιμάζονταν και το δείγμα του μάρτυρα DNA (DNA marker: τμήματα DNA γνωστών M.B., π.χ. λDNA / HindIII).
- Γίνονταν η τοποθέτηση (φόρτωση) των δειγμάτων σε κάθε ένα από τα φρεάτια με μηχανική μικροπιπέτα. Στη συνέχεια εφαρμόζονταν σταθερή τάση 2-5  $\text{Volt}\cdot\text{cm}^{-1}$  (όπου cm η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων των δύο πόλων) και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην περίπτωση των ολονύχτιων ηλεκτροφορήσεων η εφαρμοζόμενη τάση ήταν 0,5 – 1  $\text{Volt}\cdot\text{cm}^{-1}$ .
- Το τέλος της ηλεκτροφόρησης καθορίζονταν από τη θέση των χρωστικών πάνω στο πήκτωμα. Εάν το πήκτωμα δεν περιείχε EtBr, τότε εμβαπτίζονταν σε υδατικό διάλυμα EtBr, συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  για 20 min. Ακολουθούσε έκπλυση με νερό για 10 min.
- Το πήκτωμα εκτίθονταν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA, οι οποίες φθορίζουν. Η φωτογράφιση του πήκτωματος

γίνονταν χρησιμοποιώντας μηχανή Polaroid MP4 με φιλμ Polaroid 667 (3000 ASA) [έκθεση 3-5 sec σε UV-τράπεζα], έχοντας προσαρμοσμένα στο φακό δύο φίλτρα U.V. ακτινοβολίας (πορτοκαλόχρωμο και κίτρινο) και η εμφάνιση γίνονταν μετά από 45 sec (25°C).

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα 1X TBE (Tris-Borate): 0,089 M Tris-HCl  
0,089 M Βορικό οξύ  
0,002 M EDTA pH 8,0

Το διάλυμα παρασκευάζονταν σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη (10x) και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζονταν λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος (10x).

Για 1 L 10X TBE, ζυγίζονταν 108 g Tris και 55 g βορικού οξέος, ενώ προσθέτονταν 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζονταν με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα 1X TAE (Tris-Acetate): 0,04 M Tris-Acetate  
0,001 M EDTA pH 8,0

Το διάλυμα παρασκευάζονταν σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζονταν λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος (50x).

Για 1L 50X TAE, ζυγίζονταν 242 g Tris και προσθέτονταν 57,1 mL οξικού οξέος (glacial Acetic Acid) και 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζονταν με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr): 3 mg·mL<sup>-1</sup>.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (G.L.B.):

0,25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης  
0,25% (w/v) κυανό της ξυλόλης  
30% (v/v) γλυκερόλη σε H<sub>2</sub>O (διατηρείται στους 4 °C)

## 5.14 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δύο: α) Με ηλεκτροέκλυση χρησιμοποιώντας μεμβράνες διαπίδυσης κατά τους Maniatis *et al.*, 1982 και η οποία φαίνεται να είναι αποδοτικότερη για μεγαλομοριακά κομμάτια DNA και β) με τη χρήση του kit GENECLEAN II της εταιρίας BIO 101 Inc.

### 5.14.1 Ηλεκτροέκλυση σε μεμβράνες διαπίδυσης

Οι ζώνες αφού εντοπίζονταν στο πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας, αφαιρούνταν με τη βοήθεια νυστεριού.

- Ακολουθούσε η τοποθέτηση του τμήματος της αγαρόζης σε μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis tubing) πλάτους 2 cm, οι οποίες ήταν ενεργοποιημένες όπως περιγράφεται στη σελίδα 100 και το ένα άκρο τους είναι υδατοστεγώς κλειστό με πλαστικό σφικτήρα (spectrapores closures).
- Εντός των μεμβρανών διαπίδυσης τοποθετούνταν ποσότητα διαλύματος 1xTAE, συνήθως 2-3 φορές το βάρος του τμήματος της αγαρόζης, αφαιρούνταν με προσοχή οι τυχόν φυσαλίδες αέρος και η μεμβράνη έκλεινε υδατοστεγώς με σφικτήρα και στο άλλο άκρο του.
- Οι μεμβράνες τοποθετούνταν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE. Εφαρμόζονταν τάση 5–10 Volt·cm<sup>-1</sup> (ανάλογα με το μέγεθος του DNA) και η πορεία του DNA παρακολουθούνταν με τη βοήθεια λάμπας U.V. έως ότου αυτό να βγει από το πήκτωμα στο διάλυμα.
- Επειδή το DNA κολλούσε στο τοίχωμα της μεμβράνης, η φορά του ρεύματος αναστρέφονταν για 20 sec, έτσι ώστε όλο το DNA να αποκολληθεί και να περάσει στο διάλυμα.
- Το διάλυμα DNA μεταφέρονταν προσεκτικά σε γυάλινο σωλήνα, ενώ το εσωτερικό της μεμβράνης ξεπλένονταν 2 φορές με 300 μl φρέσκο 1x TAE. Στο τελικό έκλυσμα προσθέτονταν ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου και το μίγμα αναδεύονταν σε μηχανικό αναδευτήρα για 10 sec. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3500 rpm (5 min), για να διαχωριστούν οι δυο φάσεις. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνονταν και

υπολείμματα αγαρόζης που υπήρχαν στο διάλυμα, τα οποία παρέμεναν στην οργανική φάση. Η παραπάνω εκχύλιση επαναλαμβανόταν όσες φορές χρειαζόνταν ώστε να μην υπάρχει μεσόφαση.

- Η πάνω φάση (υδατική) στην οποία υπήρχε το DNA, μεταφέρονταν σε φυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προσθέτονταν ποσότητα 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,2 ίση με το 1/6 του όγκου της και ψυχρή απόλυτη αιθανόλη (-20°C), σε όγκο διπλάσιο από τον όγκο της υδατικής φάσης. Το δείγμα τοποθετούνταν στους -20°C όλη τη νύχτα ή στους -70°C για 30 min, ώστε να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση του πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 12000 rpm (0°C, 20 min).
- Το δείγμα ξεπλένονταν με 2 mL 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκεντρούνταν ξανά όπως στο προηγούμενο βήμα.
- Το ίζημα ξηραίνονταν υπό κενό και στη συνέχεια διαλύονταν σε 50-100 µl TE.

#### **5.14.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο GENECLAN II BIO 101**

Η ζώνη του πηκτώματος αγαρόζης που περιέχει το προς ανάλυση DNA ζυγίζονταν (ισχύει 1g = 1mL) και μεταφέρονταν σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα με χωρητικότητα τριπλάσια ή τετραπλάσια από τον όγκο της.

- Προσθέτονταν 3 όγκοι διαλύματος 0,6 M NaI, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι περίπου 0,4 M.
- Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο 45-55 °C και αναδεύονταν κάθε 2-3 min μέχρις ότου διαλύονταν πλήρως το πήκτωμα. Αν το πήκτωμα της αγαρόζης έχει παρασκευαστεί με ρυθμιστικό διάλυμα TBE και όχι με TAE, τότε προσθέτονταν και ρυθμιστικό TBE modifier σε όγκο 1/2 του όγκου του πηκτώματος.
- Ακολουθούσε η προσθήκη ανάλογης ποσότητας από «GLASSMILK», τηρουμένης της αναλογίας 5 µl «GLASSMILK» ανά 5 µg DNA. Συνήθως χρησιμοποιούνταν περίσσεια από «GLASSMILK».
- Μετά από ισχυρή ανάδευση, το αιώρημα τοποθετούνταν σε πάγο (0°C) για 10-15 min. Αναδεύονταν κάθε 2-3 min ώστε να μην καθιζάνει το «GLASSMILK». Το τελευταίο είναι πυριτικής φύσης και έχει την ικανότητα να δεσμεύει το DNA στην επιφάνειά του.

- Η καταβύθιση του «GLASSMILK» γίνονταν σε θερμοκρασία δωματίου με γρήγορη φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο πάγκου ή αν χρησιμοποιούνταν μεγαλύτεροι δοκιμαστικοί σωλήνες στις 4000 rpm (5 min).
- Το υπερκείμενο συλλέγονταν σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, ώστε μετά το τέλος της διαδικασίας (από την οποία δεσμεύονταν το 80% του συνολικού αρχικού DNA) να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εκ νέου σε μια νέα διαδικασία δέσμευσης – έκλουσης και του υπόλοιπου 20 % του συνολικού αρχικού DNA.
- Το ιζήμα ξεπλένονταν τρεις φορές με 200-700 μl ψυχρού (-20°C) διαλύματος «NEW WASH», pH 7,0 – 8,5. Μετά την αφαίρεση όλου του υπερκείμενου, που γίνονταν κατά την τελευταία πλύση, ακολουθούσε η έκλυση του DNA από το «GLASSMILK».
- Η επαναιώρηση του ιζήματος επιτυγχάνονταν με TE ή H<sub>2</sub>O σε ποσότητα ίση με την αρχική του «GLASSMILK». Ο δοκιμαστικός σωλήνας επωάζονταν σε υδατόλουτρο 45-50°C για 2-3 min. Ακολουθούσε γρήγορη φυγοκέντρηση (spin) και το υπερκείμενο συλλέγονταν με προσοχή.
- Στο υπερκείμενο που είχε συλλεγεί παραπάνω (και που περιείχε το υπόλοιπο 20% του DNA που δεν είχε δεσμευτεί) ακολουθούσαν ξανά η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας απλώς τη μισή ποσότητα «GLASSMILK».

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

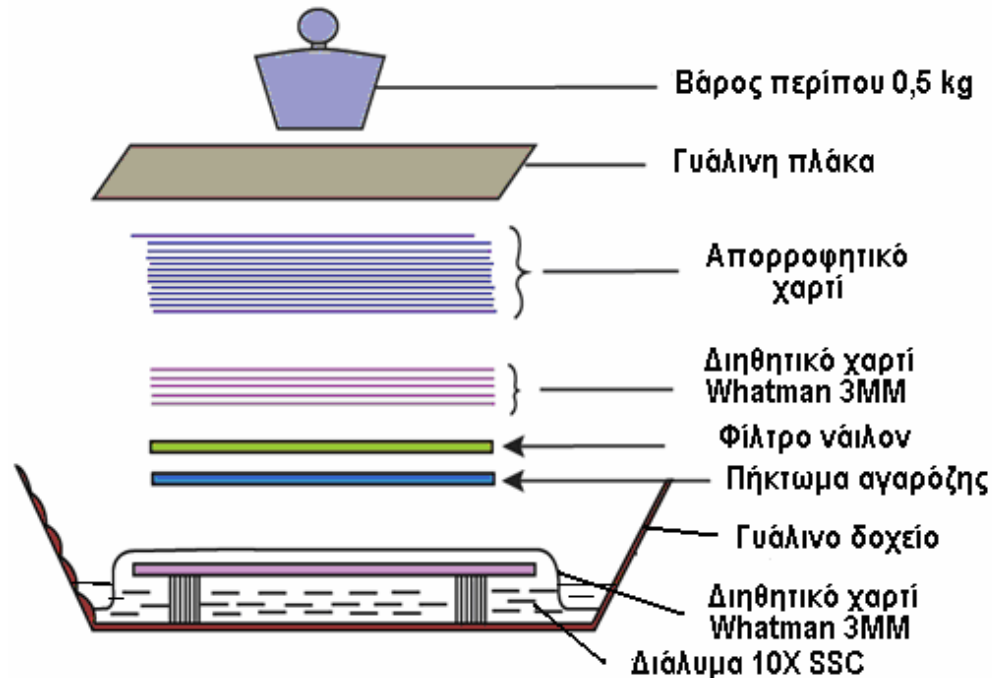
1. Εάν το πήκτωμα της αгарόζης δεν διαλύονταν, προσθέτονταν επιπλέον NaI σε όγκο ίσο με το 25% του βάρους του πηκτώματος.
2. Το δείγμα δεν αφήνονταν σε θερμοκρασία 55°C ποτέ περισσότερο από 10 min.
3. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και για τα εξής : αφαλάτωση διαλυμάτων DNA, αφαίρεση EtBr και υπολειμμάτων φαινολών, καθαρισμό από περιοριστικά ένζυμα μετά από πέψη και αποφωσφορλίωση με αλκαλική φωσφατάση από *E. coli* (BAP) ή έντερο μόσχου (CIP).

### 5.15 Μεταφορά DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε νάιλον φίλτρο (Southern blotting) (Maniatis *et al.*, 1982)

Μονόκλωνο DNA είναι δυνατόν να προσδένεται μόνιμα σε φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης ή νάιλον με σταυροδεσμούς, οι οποίοι δημιουργούνται μετά την έκθεση φίλτρου εμποτισμένου με ένα διάλυμα DNA σε υπεριώδη ακτινοβολία 302 nm για 3-4 min. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε νάιλον φίλτρο (Amersham Hybond-N).

- Μετά τη φωτογράφιση του πηγματος της αγαρόζης, το πήγμα μεταφέρονταν σε γυάλινο δοχείο μεγάλης χωρητικότητας, που περιείχε 250-500 mL διαλύματος μετουσίωσης ανάλογα με το μήκος του πηκτώματος και αναδεύονταν ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min.
- Ακολουθούσε εξουδετέρωση του πηγματος, που επιτυγχάνονταν με την αντικατάσταση του διαλύματος μετουσίωσης από ίση ποσότητα διαλύματος εξουδετέρωσης και ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 45 min.
- Παράλληλα κόβονταν ένα φύλλο νάιλον φίλτρου σε διαστάσεις μεγαλύτερο κατά 3 mm από το πήκτωμα, διαβρέχονταν με απεσταγμένο νερό και τοποθετούνταν για 15 min σε διάλυμα 6X SSC.
- Η διάταξη της μεταφοράς του DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης στο νάιλον φίλτρο παρουσιάζεται στο **Σχήμα 32**.
- Σε δοχείο με κατάλληλες διαστάσεις τοποθετούνταν γυάλινη πλάκα, η οποία έφερνε τοποθετημένα στην επιφάνεια της 3 φύλλα Whatman σε σχήμα γέφυρας ανάλογα με τις διαστάσεις του πηκτώματος, έτσι ώστε οι δύο άκρες να εφάπτονταν της βάσης του δοχείου.
- Στο δοχείο προσθέτονταν αρκετή ποσότητα διαλύματος 10X SSC. Τα φύλλα του διηθητικού χαρτιού διαβρέχονταν με το ίδιο διάλυμα και οι φυσαλίδες αέρος απομακρύνονταν με γυάλινη ράβδο.
- Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετούνταν ανεστραμμένο πάνω στο τελευταίο φύλλο χαρτιού και οι φυσαλίδες απομακρύνονταν όπως προηγουμένως.
- Τοποθετούνταν το νάιλον φίλτρο στην επιφάνεια του πηκτώματος και οι φυσαλίδες απομακρύνονταν προσεκτικά όπως παραπάνω.

- Στην επιφάνεια του φίλτρου, τοποθετούνταν 3 φύλλα Whatman 3MM, ίδιων διαστάσεων με αυτό, τα οποία ήταν εμβαπτισμένα σε διάλυμα 6X SSC και εκ νέου απομακρύνονταν οι φυσαλίδες.



**Σ χ ή μ α 32.** Διάταξη μεταφοράς DNA κατά Southern.

- Πάνω από τα φύλλα Whatman 3MM τοποθετούνταν ικανός αριθμός φύλλων απορροφητικού χαρτιού. Στην κορυφή τοποθετούνταν ένα επίπεδο σκέπασμα (π.χ. γυαλί) και αντικείμενο βάρους περίπου 0,5 kg. Τα διαποτισμένα φύλλα Whatman 3MM κάτω από το πήκτωμα, καθώς και το στρώμα των στεγνών φύλλων απορροφητικού χαρτιού πάνω από το φύλλο του νάιλον φίλτρου, δημιουργούν μια τριχοειδή ροή διαλύματος μέσω του πηκτώματος προς τα άνω, η οποία παρασύρει το DNA από το πήκτωμα προς το νάιλον φίλτρο στο οποίο προσδένεται.
- Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνονταν μετά από 16 ώρες. Κατά την αφαίρεση του πηκτώματος σημειώνονταν οι θέσεις των φρεατίων πάνω στο νάιλον φίλτρο με μολύβι, ώστε να ήταν δυνατή η αναγνώριση της θέσης των δειγμάτων του DNA κατά τον υβριδισμό.



- Το φίλτρο αναδεύονταν ήπια σε διάλυμα 6X SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε διηθητικό χαρτί μέχρι που στέγνωσε πλήρως και ακολουθούσε έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 3-4 min, ώστε να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του DNA επί του φίλτρου με τη δημιουργία σταυροδεσμών (cross links).

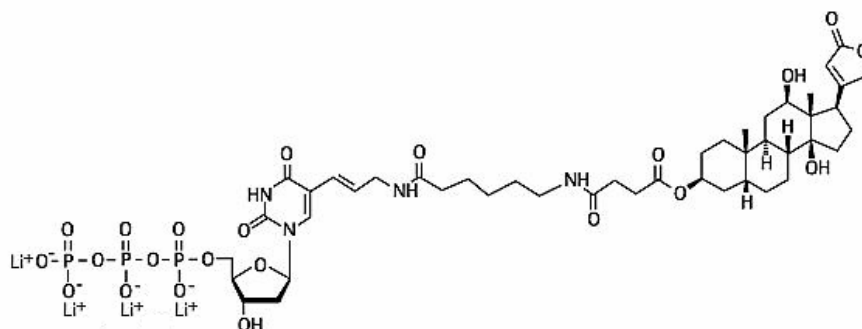
### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα SSC 20X:	0,3 M κιτρικό νάτριο 3 M NaCl pH 7,0
Διάλυμα μετουσίωσης:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Διάλυμα εξουδετέρωσης:	1 M Tris pH 8,0 1,5 M NaCl

### **5.16 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA – “DIG-Boehringer Mannheim” (Μέθοδος DIG)**

Η μέθοδος της μη ραδιενεργού σήμανσης βασίζεται στη δράση του τμήματος Klenow της DNA πολυμεράσης I, το οποίο έχει δράση μόνο 5'→3' πολυμεράσης. Δίκλιωνα μόρια DNA αποδιατάσσονται και γίνονται μονόκλιωνα. Ακολουθεί εκκίνηση από μικρές τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random priming), οι οποίες συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων του DNA. Η Klenow πολυμεράση αναγνωρίζει αυτές τις δίκλωνες περιοχές ως σημεία έναρξης του πολυμερισμού και αρχίζει να συνθέτει τη νέα αλυσίδα ενσωματώνοντας και το σημασμένο DIG-11-dUTP (**Σχήμα 33**), που περιέχεται στο μίγμα των νουκλεοτιδίων.

Η ανίχνευση του DIG-11-dUTP βασίζεται στην αναγνώριση της διγοξigenίνης, που περιέχεται στο μόριο (δεσμευμένη στη θέση C4 της θυμίνης), από ένα σύμπλοκο αντισώματος αντιδιγοξigenίνης και αλκαλικής φωσφατάσης. Αυτό το σύμπλοκο γίνεται ορατό με κατάλληλη ενζυμική αντίδραση από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης που δίνει έγχρωμο προϊόν.



**Σχήμα 33.** Συντακτικός τύπος του DIG-11-Dutp

Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προσθέτονταν:

- 1-3 ng ευθύγραμμου και αποδιαταγμένου DNA
- 2 μl μίγμα εξανουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνταν ως εκκινητές για την αντιγραφή του DNA (primers).
- 2 μl dNTP μίγμα σήμανσης που αποτελούνταν από:

dATP	1,00 mmol/L	
dCTP	1,00 mmol/L	
dGTP	1,00 mmol/L	pH 6,5
dTTP	0,65 mmol/L	
Dig-11-dUTP	0,35 mmol/L	

- Κατάλληλη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 19 μl.
- 1 μl ένζυμο Klenow 2U·μl<sup>-1</sup>.
- Το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρούνταν γρήγορα, αναδεύονταν ελαφρά και τοποθετούνταν στους 37°C για 20 h.
- Η αντίδραση τερματίζονταν με την προσθήκη 2 μl 0,2M EDTA pH 8,0. Η καταβύθιση γίνονταν με 2,5 μl 4M LiCl και 75 μl ψυχρής απόλυτης αιθανόλης, στους -20°C όλη τη νύχτα.
- Το διάλυμα φυγοκεντρούνταν στις 12000 rpm (4°C, 10 min). Ακολουθούσε έκπλυση του ιζήματος με 50 μl 70% παγωμένης αιθανόλης και γίνονταν φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως.

- Το ίζημα ξηραίνονταν και επαναδιαλύονταν σε 50 μl TE στους 37°C για 30 min.

## 5.17 Υβριδισμός DNA-DNA

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα μονόκλωνων μορίων DNA να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των αλυσίδων τους, που περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων ως προς αυτές σχηματίζοντας ένα δίκλωνο μόριο. Κατά συνέπεια, είναι δυνατόν να ελεγχθεί εάν τμήματα DNA διαφορετικής προέλευσης περιέχουν ή όχι ομόλογες περιοχές. Η έκταση της ομολογίας μεταξύ των διαφορετικών μορίων DNA μπορεί να ελεγχθεί τροποποιώντας τις συνθήκες θερμοκρασίας και ιονικής ισχύος κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται ο υβριδισμός. Χαμηλή θερμοκρασία (42°C) και υψηλή συγκέντρωση αλάτων (ήπιες συνθήκες) επιτρέπει υβριδισμό μεταξύ μορίων DNA μικρής ομολογίας. Αύξηση της θερμοκρασίας (68°C) και μείωση της συγκέντρωσης αλάτων (αυστηρές συνθήκες) επιτρέπει υβριδισμό μόνο μεταξύ μορίων υψηλής ομολογίας. Ως μόρια ανιχνευτές (probes) χρησιμοποιούνται μικρά μόρια DNA που φέρουν γνωστή αλληλουχία βάσεων κατάλληλα σημασμένα ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί με ευχέρεια εφόσον συνδεθεί στην αλληλουχία-στόχο.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Το προς διερεύνηση δείγμα του DNA, αφού αποδιαταχθεί, προσδένεται πάνω σε φίλτρο όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το φίλτρο που φέρει το μονόκλωνο DNA εμβαπτίζεται σε διάλυμα υβριδισμού, στο οποίο προστίθεται το ανιχνευτικό μόριο DNA αποδιαταγμένο. Στην περίπτωση που το προς διερεύνηση DNA περιέχει περιοχή συμπληρωματική του ανιχνευτικού μορίου, τότε αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ τους και δημιουργείται ένα δίκλωνο τμήμα DNA το οποίο ανιχνεύεται με μεθόδους ανάλογες της σήμανσης του ανιχνευτικού μορίου. Στην παρούσα εργασία η σήμανση του ανιχνευτικού μορίου έγινε με διγοξigenίνη (σελ. 112).

### 5.17.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός (Boehringer Mannheim Cat. No. 1093657)

#### 5.17.1.1 Προϋβριδισμός

Προϋβριδισμός του φίλτρου με κατάλληλο διάλυμα, είναι η διαδικασία κατά την οποία επιτυγχάνεται κορεσμός όλης της επιφάνειας του φίλτρου από το αντιδραστήριο

“Blocking” ώστε να αποφευχθεί στο επόμενο στάδιο η ανεπιθύμητη εξειδικευμένη πρόσδεση του μονόκλωνου ανιχνευτικού μορίου.

- Κόβονταν η σακούλα υβριδοποίησης στο επιθυμητό μέγεθος και τοποθετούνταν το φίλτρο, στο οποίο έχει μεταφερθεί το DNA, στο εσωτερικό της. Κλείνονταν αυτή από όλες τις πλευρές της εκτός από ένα σημείο από όπου θα έμπαινε το διάλυμα προϋβριδισμού.
- Η σακούλα συμπληρώνονταν με το διάλυμα προϋβριδισμού (20mL/100cm<sup>2</sup>), απομακρύνονταν οι φυσαλίδες αέρα και σφραγίζονταν.
- Ακολουθούσε παραμονή στους 68°C για 1-2 ώρες σε υδατόλουτρο, υπό συνεχή ήπια ανακίνηση.

#### 5.17.1.2 Υβριδισμός

Γίνεται στις ίδιες συνθήκες αντικαθιστώντας το διάλυμα με ίσο όγκο ίδιου διαλύματος, το οποίο περιέχει το ανιχνευτικό μόριο του DNA αποδιαταγμένο.

- Το ανιχνευτικό μόριο DNA, το οποίο είχε επισημανθεί με dig-11-dUTP, αποδιατάσσονταν με βρασμό του για 5 min και σύντομη ψύξη σε πάγο για 3 min.
- Απομακρύνονταν η σακούλα από το υδατόλουτρο, κόβονταν σε μια άκρη, απομακρύνονταν το διάλυμα προϋβριδισμού και προσθέτονταν, από το σημείο τομής, το διάλυμα υβριδισμού (2,5 mL/100 cm<sup>2</sup>) και το αποδιαταγμένο ανιχνευτικό μόριο DNA (50 ng·mL<sup>-1</sup>). Αφού απομακρύνονταν εκ νέου οι φυσαλίδες αέρα η σακούλα σφραγίζονταν και πάλι.
- Ακολουθούσε επώαση του φίλτρου όπως και στον προϋβριδισμό για 20 ώρες. Το υγρό υβριδισμού μετά το τέλος του υβριδισμού φυλάσσονταν σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εφόσον ήταν δυνατόν να επαναχρησιμοποιηθεί για 5-8 φορές.

#### 5.17.1.3 Πλύσεις

- Μετά το τέλος του υβριδισμού το φίλτρο ξεπλένονταν με 50 mL διαλύματος 2X SSC 0,1% (w/v) SDS με ήπια ανακίνηση δύο φορές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθούσαν δύο πλύσεις 50 mL / 100 cm<sup>2</sup> διαλύματος 0,1X SSC, 0,1% (w/v) SDS με ήπια ανακίνηση στους 68°C για 20 min.
- Το φίλτρο μπορούσε να εμφανιστεί αμέσως ή να στεγνώσει και η εμφάνισή του να γίνει αργότερα.

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα προϋβριδισμού / υβριδισμού 5X SSC

0,1% (w/v) N-lauroylsarcosine Na-salt

0,02% (w/v) SDS

1% αντιδραστήριο “Blocking”

Το διάλυμα παρασκευάζεται με θέρμανση στους 50° - 70 °C μέχρι να διαλυθεί εντελώς το αντιδραστήριο “Blocking” (περίπου 1h). Το διάλυμα γίνεται ομογενές-γαλακτώδες.

#### **5.17.1.4 Εμφάνιση**

Όλες οι αντιδράσεις για την εμφάνιση του φίλτρου γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου και με ήπια ανακίνηση, εκτός της αντίδρασης χρώσης, που γίνεται στο σκοτάδι, χωρίς ανακίνηση.

- Γίνονταν μια γρήγορη έκπλυση με 100 mL διαλύματος I.
- Ακολουθούσε επώαση του φίλτρου για 30 min σε 100 mL διαλύματος II.
- Το φίλτρο ξεπλένονταν για 5 min με 100 mL διαλύματος I.
- Στη συνέχεια επωάζονταν για 30 min σε 20-30 mL διαλύματος I που περιείχε 150 mU·mL<sup>-1</sup> μίγματος αντισώματος-αλκαλικής φωσφατάσης.
- Ακολουθούσε έκπλυση δύο φορές για 15 min με 100 mL διαλύματος I, για να απομακρυνθεί το μη ενσωματωμένο μίγμα αντισώματος-αλκαλικής φωσφατάσης.
- Γίνονταν εξισορρόπηση του φίλτρου με 50 mL διαλύματος III για 3 min.
- Το φίλτρο επωάζονταν στο σκοτάδι με 10 mL διαλύματος χρώσης, σε πλαστική σακούλα και η εμφάνιση του χρώματος παρακολουθούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν η χρώση προχωρούσε σε επιθυμητά επίπεδα, η αντίδραση

σταματούσε απομακρύνοντας το διάλυμα χρώσης και ξεπλένοντας το φίλτρο με 50 mL διαλύματος IV.

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα I:	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5
Διάλυμα II:	0,5% αντιδραστήριο “Blocking” σε διάλυμα I
Διάλυμα III:	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9,5
Διάλυμα IV:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Διάλυμα χρώσης:	45 μl NBT (4-Nitro-blue tetrazolium chloride) 35 μl X-Phos (5-Bromo-4-chloro-3-indonyl-phosphate) σε 10 mL διαλύματος III. Το X-Phos φυλάσσεται σε σκοτεινό σημείο στους -20°C. Μπορούσε να παγώνει και να ξεπαγώνει περισσότερες φορές.

### **5.18 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια**

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

α) Φέρουν περισσότερα από ένα γονίδιο, τα οποία κωδικοποιούν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ως δείκτες επιλογής. Π.χ. το pBR325 φέρει τρία γονίδια ανθεκτικότητας για τρία διαφορετικά αντιβιοτικά: τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη.

β) Μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα-ξενιστές τους (μετασηματισμός ή σύζευξη).

γ) Είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα-δέκτες.

δ) Περιέχουν ένα μεγάλο εύρος μονών περιοριστικών θέσεων, που αναγνωρίζονται από διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτές οι θέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση διαφορετικών μορίων DNA. Μερικές φορές οι θέσεις αυτές βρίσκονται εντός των αλληλουχιών των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, ώστε όταν γίνεται η κλωνοποίηση σε αυτή τη θέση, το γονίδιο να απενεργοποιείται και έτσι τα νέα βακτηριακά κύτταρα να μπορούν να επιλέγονται ως ευαίσθητα στο αντίστοιχο αντιβιοτικό, ενώ παραμένουν ανθεκτικά ως προς το/τα άλλα αντιβιοτικά.

Συνήθως όμως ως δείκτες επιλογής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιούνται γονίδια που κωδικοποιούν ενζυμικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (γονίδια αναφοράς). Ένα κοινό τέτοιο σύστημα αποτελεί το τμήμα του οπερονίου της λακτόζης. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον υποκινητή του οπερονίου και τμήμα του γονιδίου *lacZ*, οποίο κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο του αμινο-τελικού άκρου του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Ως κύτταρα δέκτες αυτών των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιούνται στελέχη *E. coli* που περιέχουν το υπόλοιπο τμήμα του ενζύμου από το καρβοξυ-τελικό του άκρο. Τα δύο 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 λειτουργική πρωτεΐνη. Εντός της αλληλουχίας του τμήματος *lacZ* του πλασμιδίου, και στο ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης (polylinker). Εισαγωγή ενός ξένου τμήματος DNA σε αυτή την περιοχή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του μηνύματος για την παραγωγή του συμπληρωματικού πεπτιδίου του αμινο-τελικού άκρου της β-γαλακτοζιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης.

Η ανίχνευση λειτουργικής και μη β-γαλακτοζιδάσης και επομένως η διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδιακών μορίων γίνεται με τη χρησιμοποίηση δύο ουσιών, του X-Gal και του IPTG. Η πρώτη αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης, που η διάσπασή του δίνει μπλε χρώμα στις αποικίες. Η δεύτερη δρα ως επαγωγέας της μεταγραφής του γονιδίου *lacZ*. Σε βακτηριακές αποικίες που περιέχουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια του βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-Gal, που δίνει ως προϊόν τη μπλε χρωστική. Εάν, όμως, το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο, το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *lacZ* διακόπτεται και δεν

σχηματίζεται η χρωστική. Άρα, παρουσία X-Gal και IPTG στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων, οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έχουν άσπρο χρώμα, ενώ αυτές που περιέχουν τον άθικτο πλασμιδιακό φορέα είναι μπλε.

ε) Θα πρέπει να διατηρούνται σταθερά μέσα στα κύτταρα ξενιστές. Γι' αυτό τα πλασμίδια πρέπει να φέρουν κατάλληλη περιοχή έναρξης της αντιγραφής (replicon), την οποία να αναγνωρίζει το σύστημα αντιγραφής των κυττάρων ξενιστών που χρησιμοποιούνται.

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια :

1. Τη δημιουργία συμβατών άκρων μεταξύ του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος DNA. Αυτά προκύπτουν μετά από πέψη με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Υπάρχουν βέβαια και διαφορετικές ενδονουκλεάσες που παράγουν τα ίδια συμβατά άκρα. Αν προκύπτουν απότομα, τότε η σύνδεση γίνεται με λιγότερη αποτελεσματικότητα.
2. Η σύνδεση των συμβατών άκρων του φορέα και του ενθέματος DNA επιτυγχάνεται με τη δράση της T4 λιγάσης του DNA.

### **Στάδιο πρώτο**

Γίνεται η πέψη του πλασμιδίου και του DNA, το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί, με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες όπως περιγράφηκε στην ενότητα περί περιοριστικών αναλύσεων (σελ. 101).

Όταν ο φορέας και το DNA, που πρόκειται να κλωνοποιηθεί, υπόκεινται σε πέψη με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, τότε ενδείκνυται, μετά το τέλος της πέψης, να γίνεται επίδραση του φορέα με αλκαλική φωσφατάση ιδιαίτερα αν το DNA είναι μεγάλου Μ.Β. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του ίδιου του πλασμιδίου διότι αποφωσφορυλιώνει τα 5'-P άκρα του γραμμικού μορίου. Όταν η πέψη του πλασμιδίου γίνεται ταυτόχρονα με δύο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες τότε δεν είναι υποχρεωτική η επίδραση με αλκαλική φωσφατάση γιατί τα άκρα δεν είναι συμβατά και επομένως επανένωση του ίδιου πλασμιδίου είναι αδύνατη.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική φωσφατάση από έντερο μόσχου (Calf Intestinal alkaline Phosphatase, CIP) και όχι η βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (Bacterial Alkaline Phosphatase, BAP), διότι η τελευταία δεν αδρανοποιείται με βρασμό



στους 68°C (στην πραγματικότητα, οι αντιδράσεις με BAP συνήθως γίνονται στους 68°C για να αναστείλουν τη δραστηριότητα μιας εξωνουκλεάσης, που συχνά επιμολύνει τα παρασκευάσματα του ενζύμου).

Η επίδραση με αλκαλική φωσφατάση γίνονταν ως εξής:

- Μετά την καταβύθιση και επαναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε 100 µl 25mM Tris pH 7,0 , προσθέτονταν 11µl 10x ρυθμιστικού διαλύματος και 1µl ενζύμου CIP (2,5–5 Units).
- Το διάλυμα επωάζονταν στους 37°C για 1h.
- Στη συνέχεια προσθέτονταν 1µl ενζύμου CIP και αφήνονταν στους 37°C / 50 min.
- Προσθέτονταν δυο όγκοι μίγματος φαινόλης:χλωροφορμίου, 1:1, για την απομάκρυνση της αλκαλικής φωσφατάσης. Το μίγμα ανακινούνταν και φυγοκεντρώνταν στις 12000 rpm / 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εναλλακτικά, η αλκαλική φωσφατάση μπορεί να αδρανοποιηθεί με θέρμανση στους 68°C για 15 min, αφού προηγουμένως έχουν προστεθεί 40 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl 10x STE και 5 µl 10% SDS.
- Η υδατική φάση μεταφέρονταν σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προσθέτονταν 2 όγκοι παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνονταν όλη τη νύχτα στους -20°C ή 30 min στους -70°C.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm (0°C , 10 min ).
- Στη συνέχεια γίνονταν πλύση του ιζήματος με 200 µl 70% παγωμένης αιθανόλης και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως.
- Γίνονταν ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρηση σε 10 µl ddH<sub>2</sub>O.

### ***Στάδιο δεύτερο – Αντιδράσεις σύνδεσης άκρων (ligation reactions)***

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνδεση (ligation) των δυο γραμμικών μορίων με την επίδραση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης το οποίο, παρουσία ATP, καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στα 5'-P άκρα του τμήματος στόχου και των 3'-OH άκρων του φορέα. Η σύνδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μεταξύ τμημάτων DNA με μονόκλωνα συμπληρωματικά (cohesive) άκρα όσο και μεταξύ δίκλωνων, απότομων άκρων (blunt-end).

Προσθέτονταν σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, με την σειρά που δίνονται, τα ακόλουθα:

- 6-8 μl (0,2 μg) ευθυγραμμισμένο φορέα κλωνοποίησης (που έχει προκύψει μετά από περιοριστική πέψη).
- 6-8 μl (0,8 μg) τμημάτων DNA (που έχουν προκύψει από επίδραση με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο).
- 2 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης.
- 1-2 μl T4 DNA λιγάση (0,5 – 1 Unit).
- Ρυθμίζονταν με τον απαιτούμενο όγκο dd H<sub>2</sub>O στα 20 μl τελικό όγκο αντίδρασης.
- Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετούνταν στους 11-16°C (ανάλογα με την εταιρία) για 4-8 ώρες (μπορεί να παραμείνει και όλη τη νύχτα) όταν επρόκειτο για σύνδεση συμπληρωματικών άκρων. Στην περίπτωση που γινόταν σύνδεση απότομων άκρων το μίγμα της αντίδρασης τοποθετούνταν στους 18°C όλη τη νύχτα ενώ η τελική συγκέντρωση του ATP ήταν 0,5 mM.
- Ακολουθούσε επώαση για 10 min στους 65°C, για αποδιάταξη των μορίων του φορέα που δεν είχαν υποστεί τεχνητή σύνδεση. Οι αντιδράσεις φυλάσσονταν στους -20°C.

### ***Στάδιο τρίτο (επιλογή του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου)***

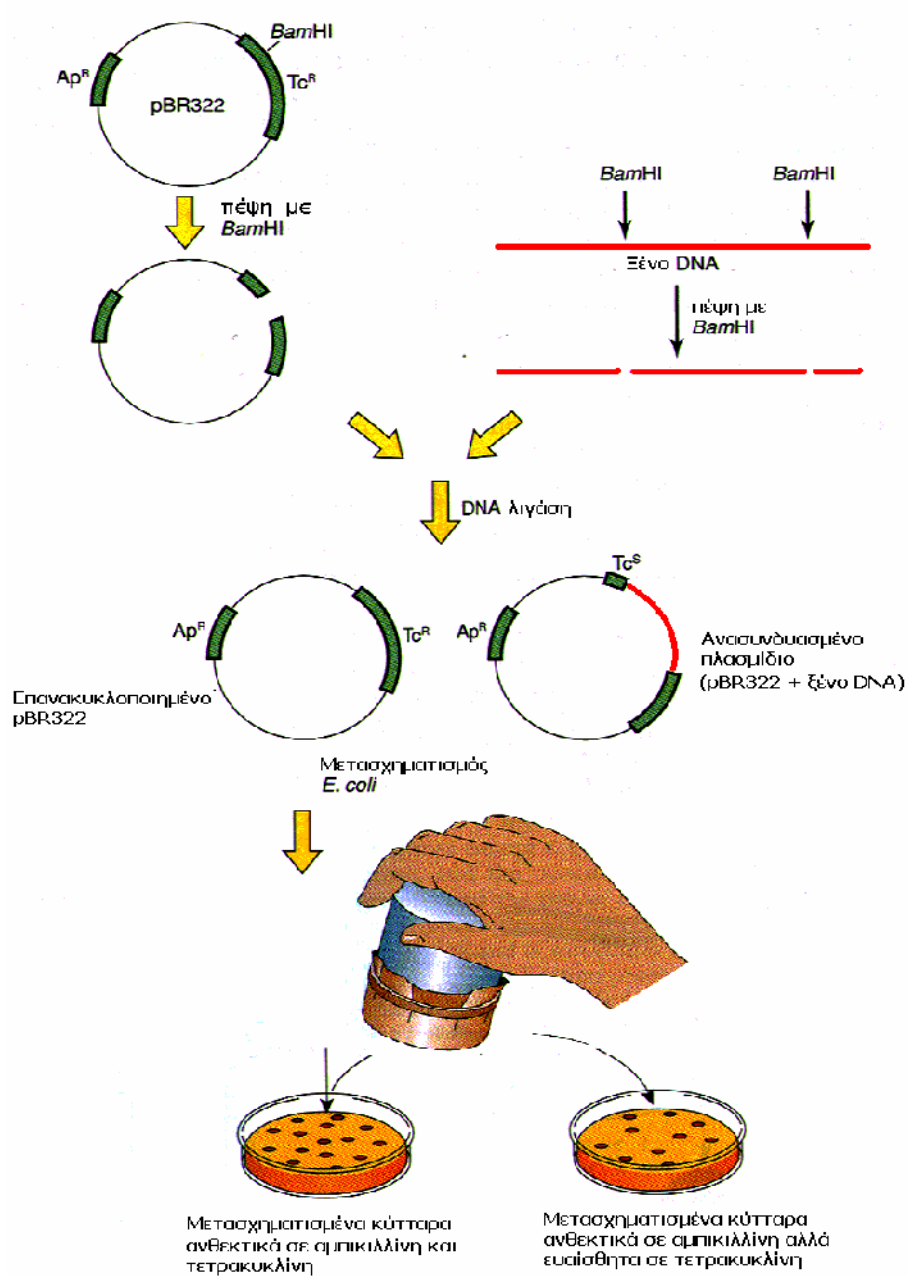
Η επιλογή βακτηριακών κυττάρων που φέρουν το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο μπορεί να γίνει με τη χρήση των αντιβιοτικών, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 34** (τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να επιβιώσουν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό Tc), ή με την ανίχνευση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση, που βασίζεται στο διαχωρισμό των άχρωμων (ανασυνδυσμένων) από μπλε αποικίες. Έτσι λοιπόν:

- Ετοιμάζονταν τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Επιστρώνονταν όλη η επιφάνεια των τρυβλίων με 20 μl διαλύματος X-Gal και 8 μl διαλύματος IPTG. Τα τρυβλία στεγνώνονταν στους 37°C για 1h, ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.
- Ακολουθούσε εμβολιασμός από την κατάλληλη αραιώση ώστε να προκύψουν περίπου 150-200 μετασηματισμένες αποικίες ανά τρυβλίο και επωάζονταν στους 37°C, όλη τη νύχτα.

- Την επομένη, τα τρυβλία μεταφέρονταν στο ψυγείο για 3-4 ώρες, για να γίνει πιο έντονο το μπλε των μη ανασυνδυασμένων αποικιών.
- Στη συνέχεια επιλέγονταν οι άχρωμες αποικίες, οι οποίες περιείχαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Οι αποικίες αυτές ελέγχονταν στη συνέχεια με απομόνωση και ανάλυση του πλασμιδιακού τους DNA.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Ο έλεγχος για υποκλωνοποιημένα μόρια DNA, στην περιοχή των μονών περιοριστικών θέσεων (MCS, multiple cloning site), χρησιμοποιώντας X - gal (μπλε - άσπρες αποικίες), μερικές φορές εξαπατά. Έτσι έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο αποικίες, στις οποίες, ένα μικρού M.B. κομμάτι DNA έχει εισαχθεί στο MCS, να βάφονται μπλε, διατηρώντας το πλαίσιο ανάγνωσης του *lacZ* πεπτιδίου.
2. Ο μετασηματισμός μερικών στελεχών αναστέλλεται από στοιχεία του μίγματος της αντίδρασης σύνδεσης δυο ευθυγράμμων μορίων (ligation). Στην περίπτωση αυτή προτείνεται αραιώση του μίγματος 1:5 με ρυθμιστικό διάλυμα TE.



**Σχήμα 34.** Γενικό σχήμα κλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

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

100 mg·mL<sup>-1</sup> σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Φυλάσσονταν σε σκοτεινά φιαλίδια, στους -20°C.

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

Διαλύονταν 2 g IPTG σε 8 mL dd.H<sub>2</sub>O, ρυθμίζονταν ο όγκος σε 10 mL και το διάλυμα διηθούνταν σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,45 μm. Το διάλυμα κατανέμονταν σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες, που φυλάσσονταν στους -20°C (aliquots).

## 5.19 Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

### 5.19.1 Γενικά

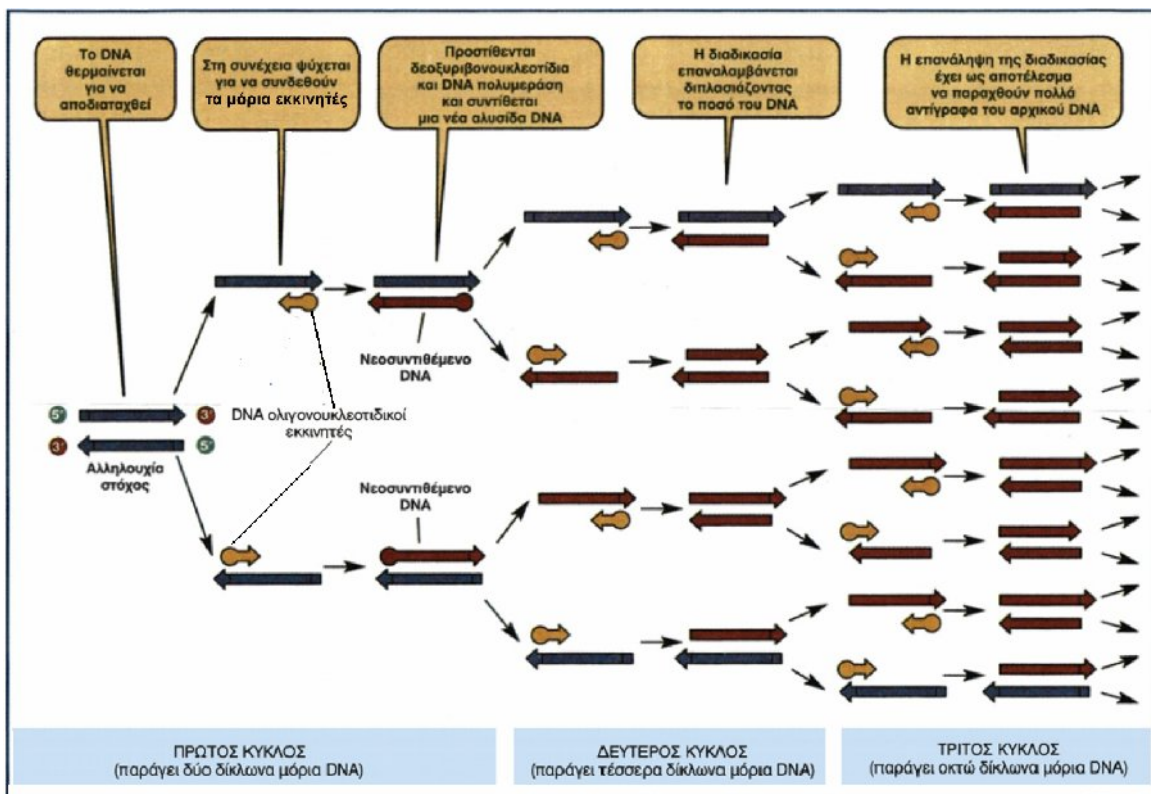
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια γρήγορη και εύκολη τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα *in vitro* παραγωγής πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA μέσα από ένα σύνολο διαφορετικών αλληλουχιών. Η βάση αυτής της αντίδρασης πολυμερισμού είναι η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq polymerase), η οποία απομονώθηκε από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988; Lawyer, *et al.*, 1989). Με τη βοήθεια ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (primers) μήκους 15-30 bp, τα οποία καθορίζουν και τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί, η πολυμεράση αυτή συνθέτει νέες αλυσίδες DNA χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο προϋπάρχουσες αλυσίδες. Η αντίδραση πολυμερισμού απαιτεί την παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg<sup>2+</sup>.

Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται κατά κύκλους. Ο κάθε ένας απ' αυτούς περιλαμβάνει τρία βήματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Πρώτο βήμα (94°C–96°C) είναι η μετουσίωση (αποδιάταξη) του DNA-μήτρα (template), κατά το οποίο όλα τα μόρια του DNA χωρίζουν στις μονές τους αλυσίδες. Δεύτερο βήμα είναι η επανουσίωση (αναδιάταξη) των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, τα οποία αναγνωρίζουν τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στα μονόκλιωνα μόρια DNA και υβριδίζουν, παρέχοντας έτσι τα 3'-OH τελικά άκρα για τη δράση της πολυμεράσης. Η θερμοκρασία που πραγματοποιείται το βήμα αυτό εξαρτάται από το T<sub>m</sub> των εκκινητών. Τρίτο είναι το βήμα της επιμήκυνσης (72°C), κατά το οποίο επιτελείται η αντίδραση πολυμερισμού. Ο πρώτος κύκλος οδηγεί στο σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιόριστου μήκους που, μαζί με τις πατρικές αλυσίδες, συμμετέχουν στους επόμενους κύκλους πολυμερισμού. Αντίθετα, από το δεύτερο κύκλο και μετά συντίθενται και αλυσίδες με καθορισμένο μήκος (ίσο με την απόσταση ανάμεσα στα 5' άκρα των δύο εκκινητών) οι οποίες επίσης συμμετέχουν ως μήτρα στους επόμενους κύκλους. Τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται

εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οδηγώντας έτσι σε πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος DNA.

Ο βαθμός εξειδίκευσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: τη συγκέντρωση των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών και της μήτρας-DNA, την αναλογία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων, τη θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή, τη διάρκεια των βημάτων κάθε κύκλου, τον αριθμό τους και τη συγκέντρωση του  $MgCl_2$ .

Όταν γίνεται η επιλογή των μορίων εκκινητών, είναι πολύ σημαντικό η περιεκτικότητα των βάσεων να είναι 40%-60% G+C και να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους ιδιαίτερα στα 3' και 5' άκρα τους. Συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του εκκινητή ίσως να συμβάλει στο σχηματισμό των λεγόμενων "primer dimmer".



**Σχήμα 35.** Σχηματική παράσταση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

### 5.19.2 Πειραματική διαδικασία

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή DNA Thermal Cycler PERKIN ELMER. Λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας της αντίδρασης, η διεξαγωγή του πειράματος

γίνονταν με γάντια και σε χώρους αποστειρωμένους. Επίσης, όλα τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνταν για την εκτέλεση του πειράματος ήταν αποστειρωμένα. Το τελικό μίγμα μιας συνηθισμένης αντίδρασης PCR αποτελείται από τα εξής:

Υπόστρωμα DNA	10 – 50 ng
Εκκινητής 1	50 pmol
Εκκινητής 2	50 pmol
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (χωρίς MgCl <sub>2</sub> )	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Μίγμα dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP)	0,2 mM
DNA-πολυμεράση (Taq polymerase)	2 Units
Παραφινέλαιο (mineral oil)	30 μl

Το παραφινέλαιο προστίθεται για να εμποδίζει την εξάτμιση των δειγμάτων και την συμπύκνωσή τους, γεγονός που μπορεί να επιφέρει μειωμένη απόδοση της αντίδρασης.

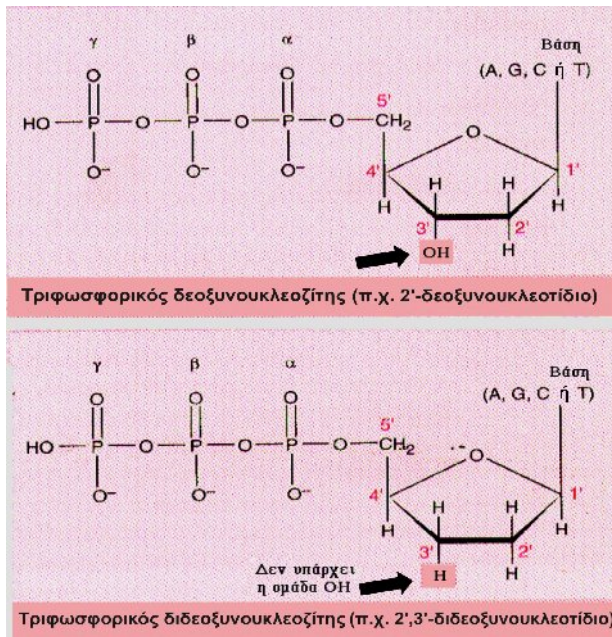
Όλες οι διαδικασίες προσθήκης των αντιδραστηρίων και η διατήρηση των μιγμάτων γίνονταν στον πάγο. Τα δείγματα προθερμαίνονταν στους 80°C για 10 min. Προς το τέλος του χρόνου αυτού προσθέτονταν το ένζυμο ανά δείγμα (Hot start PCR, σύμφωνα με τους D'Aquila *et al.*, 1991) και γίνονταν εκκίνηση των κύκλων (συνολικός αριθμός 30). Τα προϊόντα ενίσχυσης μετά τη λήξη των αντιδράσεων παρέμεναν για 5 min στους 72°C (ολοκλήρωση νεοσυντιθέμενων αλυσίδων) και φυλάσσονταν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4°C.

## **5.20 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας (Sanger *et al.*, 1977)**

### **5.20.1 Γενικά**

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA έγινε με εφαρμογή της μεθόδου των Sanger *et al.*, (1977). Στη μέθοδο αυτή, μια από τις δύο αλυσίδες του DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο (template) για τη σύνθεση της συμπληρωματικής της αλυσίδας με τη βοήθεια ενός πρωταρχικού ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή (primer) και του ενζύμου DNA πολυμεράσης. Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης βασίζεται στον

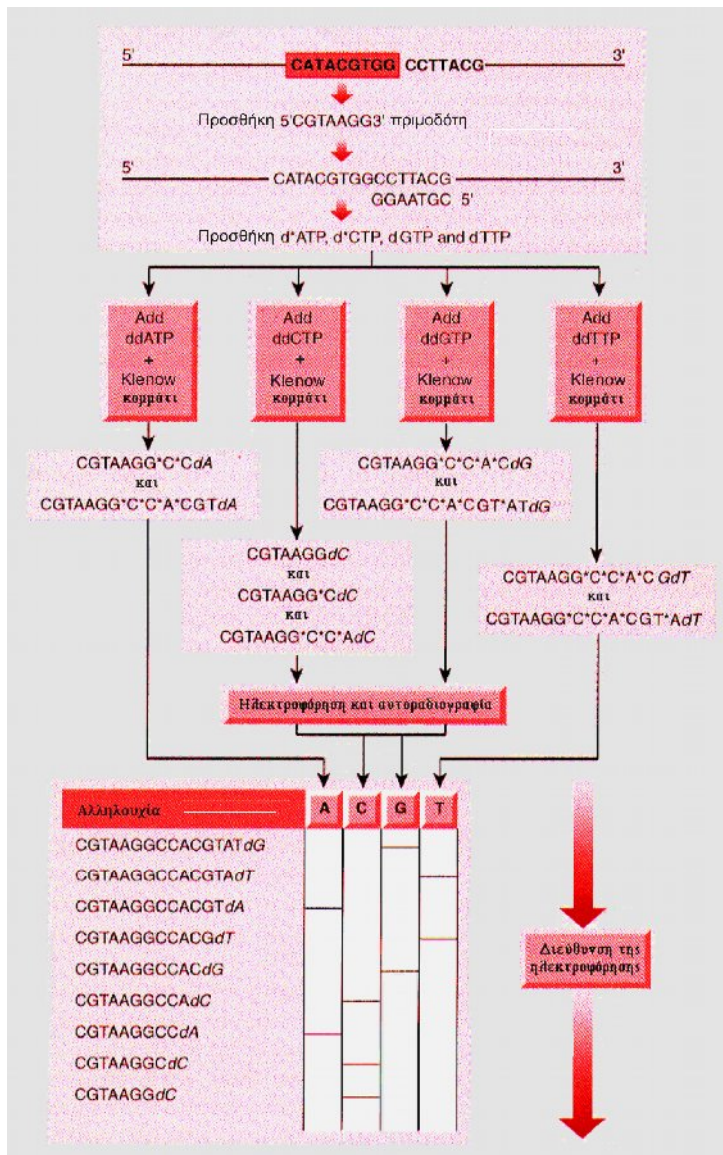
τερματισμό της σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας με την ενσωμάτωση ανάλογων νουκλεοτιδίων, των 5'-τριφωσφορικών-2,3-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs).



Αυτά τα νουκλεοτίδια έχουν χάσει τις 3'-OH τελικές ομάδες, οι οποίες φυσικά και είναι απαραίτητες για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Έτσι ενσωμάτωση των παραπάνω αναλόγων (ddNTPs) σε τυχαίες θέσεις σημαίνει αυτόματα και τον τερματισμό της σύνθεσης δίκλωνου μορίου DNA.

Πρακτικά το Klenow κομμάτι της DNA πολυμεράσης I (που έχει χάσει τη δραστηριότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης) συνθέτει δίκλωνο μόριο DNA, χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο τη μονόκλωνη αλυσίδα του. Για την έναρξη της σύνθεσης απαιτείται η ύπαρξη μορίου εκκινητή. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), ένα από τα οποία είναι ραδιενεργά σημασμένο (στην παρούσα εργασία η σήμανση έγινε με το ραδιενεργό δεοξυνουκλεοτίδιο α-<sup>35</sup>S-dATP), σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, σε κάθε μια από τις οποίες περιέχεται και ένα ddNTP ανάλογο. Έτσι σε κάθε αντίδραση έχουμε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ραδιενεργών αλυσίδων ποικίλου μήκους, που έχουν όμως κοινό το 5'-P άκρο τους.





**Σχήμα 36α.** Σχηματική παράσταση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας.

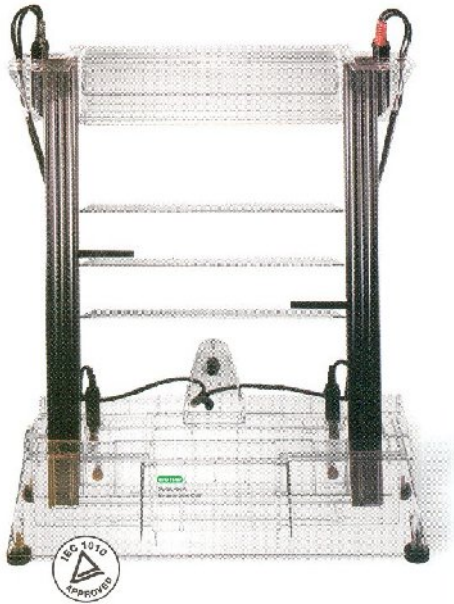
Οι αλυσίδες αυτές γίνονται εμφανείς, μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου και αυτοραδιογραφία. Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός μορίου DNA σε μήκος 300-350 bp.

### 5.20.2 Πειραματική διαδικασία

Για όλες τις αντιδράσεις προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase, το οποίο είναι μια τροποποιημένη T7 DNA πολυμεράση και το

αντίστοιχο σύστημα αντιδραστηρίων (kit) της USB/Amersham (Sequenase Version 2.9 DNA Sequencing Kit).

Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής του φυσικού πλασμιδίου pZMO2 (M.B. ~1,7-kb) του βακτηρίου *Z. mobilis*, καθώς και ο προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής περιοχών του φυσικού πλασμιδίου pZMO3 (M.B. ~2,7-kb) έγιναν στην συσκευή Sequi-Gen, Sequencing Cell της εταιρείας BIO-RAD (**Εικόνα 3**).



**Εικόνα 3.**

Συσκευή Sequi-Gen, Sequencing Cell της εταιρείας BIO-RAD

### **Στάδιο πρώτο – Προετοιμασία του DNA**

Αυτό περιλάμβανε την επεξεργασία του δείγματος ως εξής:

#### **A) Αποδιάταξη - Μετουσίωση**

3 – 5 μg δείγματος δίκλωνου DNA

1/10 όγκους διαλύματος 2N NaOH - 2mM EDTA pH 8,0

ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 50 μL

- Γίνονταν επώαση του μίγματος για 20 min στους 68°C και 1 min στους 0°C.
- Ακολουθούσε η καταβύθιση του DNA με την προσθήκη ποσότητας 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 5,2 και 3 όγκων παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (-20°C) και η

τοποθέτηση του δείγματος για 30 min στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρούταν στις 12000 rpm ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min).

- Το ίζημα εκπλένονταν 2 φορές με 100  $\mu\text{l}$  70% παγωμένης αιθανόλης, φυγοκεντρούνταν όπως πιο πάνω και ξηραίνονταν υπό κενό για 15-20 min. Τέλος επαναιωρούνταν σε 7  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.

### **B) Επανουσίωση – Σύνδεση του ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή**

Στα 7  $\mu\text{l}$  του παραπάνω αποδιαταγμένου DNA προσθέτονταν 2  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος (sequencing buffer) και 1  $\mu\text{l}$  του ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή (25 pmol). Το μίγμα αυτό επωάζονταν για 2 min στους  $68^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια τοποθετούνταν για 20 min στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **Γ) Παρασκευή 4 μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων-τερματισμού**

Για κάθε ένα μόριο εκκινητή αριθμούνταν μια σειρά 4 μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων (G, T, A, C) στους οποίους προσθέτονταν 2,5  $\mu\text{l}$  από το αντίστοιχο μίγμα τερματισμού (termination mix). Καθένα από τα 4 μίγματα τερματισμού περιείχε 80  $\mu\text{M}$  από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο και 8  $\mu\text{M}$  από το αντίστοιχο διδεοξυνουκλεοτίδιο.

### **Δ) Αντίδραση σήμανσης (labeling reaction)**

Στο μίγμα του βήματος επανουσίωσης (B) προσθέτονταν:

1  $\mu\text{l}$  DDT 0,1 M

2  $\mu\text{l}$  μίγματος σήμανσης (labeling mix), αραιωμένο 1 : 5 με ddH<sub>2</sub>O

(7,5  $\mu\text{M}$  dGTP, 7,5  $\mu\text{M}$  dCTP, 7,5  $\mu\text{M}$  dTTP)

0,5  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP

2  $\mu\text{l}$  ένζυμο Sequenase [αραιωμένο 1: 8 σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (Sequanase dilution buffer), αμέσως πριν την έναρξη της αντίδρασης σήμανσης].

Ακολουθούσε γρήγορη ανάμιξη και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως έναρξη των αντιδράσεων τερματισμού.

### **Ε) Αντίδραση τερματισμού (termination reaction)**

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σήμανσης γίνονταν προθέρμανση των μιγμάτων τερματισμού στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 1-2 λεπτά και, λίγο πριν την ολοκλήρωσή της, 3,5  $\mu\text{l}$

μίγματος από την αντίδραση σήμανσης μεταφέρονταν σε κάθε ένα μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τερματισμού (που συμβολίζονται G, T, A, C). Ακολουθούσε ανάμιξη και στους τέσσερις σωλήνες με στιγμιαία φυγοκέντρηση και επώαση για 5 min στους 37°C. Η αντίδραση σταματούσε με την προσθήκη 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C (για χρονικό διάστημα έως ένα μήνα) μέχρι να ηλεκτροφορηθούν.

***Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης:***

95% Φορμαμίδιο

20 mM EDTA

0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

0,05% (w/v) κυανού της ξυλόλης

***Στάδιο δεύτερο - Προπαρασκευή των γυάλινων πλακών***

Οι πλάκες ηλεκτροφόρησης πλένονταν πολύ καλά με απορρυπαντικό, εκπλένονταν τρεις φορές με ddH<sub>2</sub>O και τρεις με απόλυτη αιθανόλη και στεγνωναν καλά (Το παλαιό πήκτωμα αφαιρούνταν από την πλάκα με εμποτισμό της σε 2N NaOH για 1h).

Η πλάκα, στην οποία δεν επιθυμούσαμε να παραμείνει κολλημένο το πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση, κατεργάζονταν με 3-4 mL Gel-Slick (AT Biochem cat. No. 219-B). Η ποσότητα αυτή απλώνονταν με τη βοήθεια απορροφητικού χαρτιού και με κυκλικές κινήσεις σε όλη την επιφάνεια της γυάλινης πλάκας, μέχρι να στεγνώσει πλήρως. Το gel-Slick είναι μη τοξικό και η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει στον πάγκο.

Η πλάκα στην οποία επιθυμούσαμε να παραμείνει κολλημένο το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου (Bind-Silane), διαβρέχονταν με 25 mL του παρακάτω διαλύματος:

25 mL απόλυτης αιθανόλης

125 μl γ-(Methacryoxyl)-Propyltrimethoxysilane (SIGMA M-6514)

**(ΠΡΟΣΟΧΗ:** Τοξικό. Η διαδικασία επιβάλλεται να γίνεται σε απαγωγό)

Η διαδικασία αυτή γίνονταν στον απαγωγό επίσης με κυκλικές κινήσεις, σε όλη την επιφάνεια της πλάκας με τη βοήθεια απορροφητικού χαρτιού. Αφήνονταν να στεγνώσει για 10-15 min επίσης στον απαγωγό και στη συνέχεια γίνονταν πλύση τρεις φορές με αιθανόλη, όπως πιο πάνω.

**Στάδιο τρίτο - Παρασκευή πηκτώματος προσδιορισμού αλληλουχιών DNA**

Για το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ουσίες:

- 21 g ουρίας (BRL)
- 3 mL 10x TBE (βλ. σελ. 106)
- 5 mL Long Rager 50% (AT Biochem)
- dH<sub>2</sub>O μέχρι όγκου 50 mL

Το παραπάνω διάλυμα διηθούνταν σε κωνική φιάλη, υπό κενό, μέσω φίλτρου Whatman 3MM. Στη συνέχεια η φιάλη έκλεινε με λαστιχένιο πώμα, προκειμένου να γίνει απαέρωση του διαλύματος, για περίπου 15 min.

Στο απαερωμένο διάλυμα προσθέτονταν:

- 250 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10% (w / v)
- 25 μl TEMED

και αναδεύονταν με ήπιες κινήσεις ώστε να αποφευχθεί, όσο δυνατόν, η διάλυση οξυγόνου σ' αυτό, γεγονός που ίσως δημιουργούσε πρόβλημα στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Το διάλυμα αποχύνονταν αμέσως και αργά μεταξύ των δυο πλακών, οι οποίες κρατούνταν υπό γωνία 45°. Τα πηκτώματα στα πειράματα της εργασίας αυτής είχαν καθορισμένο πάχος 0,4 mm.

Οι πλάκες, πριν την απόχυση του πηκτώματος, είχαν προσαρμοστεί κατάλληλα και είχαν υποστεί γρήγορη στεγανοποίηση στην κάτω πλευρά τους από το εξής διάλυμα :

- 12 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου / bis 40% σε ddH<sub>2</sub>O
- 168 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% (w / v)
- 60 μl TEMED

Τυχόν φυσαλίδες που μπορεί να δημιουργούνταν κατά την απόχυση του πηκτώματος μεταξύ των πλακών, απομακρύνονταν με απαλά χτυπήματα στις αντίστοιχες περιοχές των εξωτερικών επιφανειών των πλακών.

Η τοποθέτηση του κτενιού γίνονταν μετά την απόχυση του πηκτώματος στο επάνω μέρος των πλακών κατά τέτοιο τρόπο ώστε, η ευθεία πλευρά του κτενιού να ήταν βυθισμένη ανάμεσα στις πλάκες και η οδοντωτή πλευρά αυτού να εξείχε.

Εάν το πήκτωμα δεν «φορτώνονταν» για ηλεκτροφόρηση την ίδια μέρα, φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C), αφού, στην περιοχή που βρίσκονταν το χτένι, περιτυλίγονταν με χαρτί διαποτισμένο με TBE 0,6x.

**Στάδιο τέταρτο****A) Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος προσδιορισμού αλληλουχιών DNA σε συσκευή Bio Rad.**

Με προσοχή αφαιρούνταν το κτένι και τα υπολείμματα του πηκτώματος, τα οποία εμπόδιζαν την ηλεκτροφόρηση. Αντιστρέψαμε, με πολύ προσοχή, το κτένι ώστε η οδοντωτή πλευρά του να βρίσκεται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Πιέσαμε το κτένι τόσο ώστε να καρφωθεί σταθερά στο πήκτωμα. Οι δυο γυάλινες πλάκες, που περιείχαν το πήκτωμα, προσαρμόζονταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης Bio Rad πληρούταν με 2 L διαλύματος 0,6x TBE (βλ. σελ. 106) τόσο ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες, όσο και στην βάση της, και προσαρμόζονταν τα ηλεκτρόδια. Η συσκευή, πριν «φορτωθεί» με τα δείγματα εξισορροπούνταν εφαρμόζοντας τάση 2000 Volt για 15 min (~21 mA).

**B) «Φόρτωμα» δειγμάτων**

Τα δείγματα, πριν το «φόρτωμά» τους, αποδιατάσσονταν στους 78°C για 3 min και αμέσως μετά τοποθετούνταν σε πάγο. Από κάθε δείγμα «φορτώνονταν» 2,5-3 μL. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν στα 2000 Volt (21 - 24 mA), ενώ η θερμοκρασία της συσκευής ελέγχονταν να μην ξεπεράσει τους 45°C. Η ηλεκτροφόρηση τελείωνε όταν η χρωστική έφτανε στο τέλος της συσκευής.

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Κατά το «φόρτωμα» του πηκτώματος είναι προτιμότερο να τοποθετούνται τα δείγματα κατά οκτάδες και να διατηρείται σταθερός ο χρόνος μεταξύ δυο «φορτωμάτων».
2. Ο χρόνος πολυμερισμού του πηκτώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην καλή εικόνα του αποτελέσματος μιας ηλεκτροφόρησης. Γι' αυτό και κατά την απόχυση του πηκτώματος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, πρέπει να είναι 20-25°C. Αλλά και κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, η θερμοκρασία αυτή δεν πρέπει να πέφτει σε χαμηλά επίπεδα.
3. Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων καθαρίζονταν πάντοτε τα φρεάτια από τα υπολείμματα της ουρίας, με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur.

4. Για να αυξήσουμε το διαχωρισμό των βάσεων, φορτώναμε και μια δεύτερη σειρά των ίδιων δειγμάτων (δηλ. μια δεύτερη οκτάδα) και η ηλεκτροφόρηση τελείωνε όταν η χρωστική της δεύτερης σειράς δειγμάτων έφτανε στο τέλος της συσκευής.

### **Στάδιο πέμπτο**

#### **Στερέωση-Εμφάνιση του πηκτώματος**

Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες με το πήκτωμα αφήνονταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min και στη συνέχεια με προσοχή γίνονταν αποχωρισμός των δυο γυάλινων πλακών. Η πλάκα που έφερε το πήκτωμα εμβαπτιζονταν για 30 min σε δοχείο που περιείχε 10% οξικό οξύ για την απομάκρυνση της ουρίας. Ακολουθούσε έκπλυση με άφθονο νερό βρύσης για αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετούνταν για περίπου 2 h στον απαγωγό, πίσω από προστατευτική ασπίδα, για να στεγνώσει.

Ύστερα από την ξήρανση του πηκτώματος, τοποθετούνταν φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-Omat KODAK), το οποίο κάλυπτε όλη την επιφάνεια του πηκτώματος. Η διαδικασία αυτή γίνονταν σε σκοτεινό θάλαμο. Μετά τον απαιτούμενο χρόνο έκθεσης (1 έως 2 ημέρες ανάλογα με τις κρούσεις) σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούνταν η παρακάτω διαδικασία εμφάνισης του φιλμ :

- Το φιλμ εμβαπτιζονταν σε 500 mL διαλύματος ανάπτυξης (Kodak X - Ray developer) για 5 min.
- Η αντίδραση ανάπτυξης σταματούσε ξεπλένοντας το φιλμ σε 300 mL νερό για 2 min.
- Η στερέωση επιτυγχάνονταν βυθίζοντας το φιλμ σε 500 mL διαλύματος στερέωσης (Kodak X - Ray rapid fixer) για 5 min.
- Ακολουθούσε πολύ καλή πλύση υπό συνεχή ροή νερού για 20 min. Το φιλμ στεγνωνε σε θερμοκρασία δωματίου, κατάλληλα τοποθετημένο ώστε να μην εφάπτεται σε κάποια επιφάνεια.

Όλες οι διαδικασίες αυτοραδιογραφίας γίνονται σε σκοτεινό θάλαμο απουσία φωτός ή με τη βοήθεια ειδικής κόκκινης λυχνίας. Η αλληλουχία διαπιστώνονταν καταγράφοντας με τη σειρά τα διδεοξινουκλεοτίδια κάθε διαφορετικής αντίδρασης, σύμφωνα με τις ζώνες που εμφανίζονται στην αυτοραδιογραφία, από το μικρότερο προς το μεγαλύτερο μέγεθος.

### **ΔΙΑΔΥΜΑΤΑ**

Διάλυμα ανάπτυξης : Kodak X - Ray developer αραιώνεται 1 : 5 με νερό

Διάλυμα στερέωσης : Kodak X - Ray rapid fixer αραιώνεται 1 : 5 με νερό

### 5.21 Εύρεση της πρωτοδιάταξης DNA με μη ραδιενεργό μέθοδο χρησιμοποιώντας Taq DNA πολυμεράση

Η αρχή της εύρεσης αλληλουχίας DNA με τη μη ραδιενεργό DIG μέθοδο, είναι η χρησιμοποίηση μορίων εκκινητών που είναι ιχνηθετημένα με διοξυγενίνη στο 5'-άκρο τους. Έτσι παραλείπεται από την όλη διαδικασία το βήμα ιχνηθέτησης του μορίου εκκινητή (one-step sequencing protocol). Η μέθοδος μπορεί να εφαρμόζεται και σε γραμμικά μόρια DNA διπλής αλυσίδας (double-stranded DNA), όπως προϊόντα της PCR, που δεν είναι εύκολη η εύρεση αλληλουχίας τους με τη μέθοδο Sanger, εξ' αιτίας της γρήγορης υβριδοποίησης των αλυσίδων τους. Δίνει επίσης πολύ καλά αποτελέσματα ακόμη και αν η αρχική ποσότητα DNA είναι πολύ μικρή (της τάξης των fmoles).

#### *Πειραματική διαδικασία*

##### *Στάδιο πρώτο*

Οι αντιδράσεις PCR γίνονται όπως ακριβώς προτείνονται από το DIG Taq DNA Sequencing Kit της Boehringer Mannheim (Cat. No. 1449 443). Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι για την περίπτωση που το δείγμα είναι πλασμιδιακό DNA (όπως στην παρούσα εργασία) προτείνονται να γίνεται πρώτα μετουσίωση του δίκλωνου μορίου DNA όπως ακριβώς περιγράφεται στην σελ. 129 της παρούσας διατριβής. Στη συνέχεια:

- Τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά σε αποστειρωμένα σωληνάρια PCR :
  - 4 – 5 μg μετουσιωμένου DNA
  - 1 pmole DIG ιχνηθετημένο μόριο εκκινητή
  - 2 μl Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)
  - Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 19 μl
  - Προσθήκη 1 μl (3 Units) Taq DNA πολυμεράση
- Σε τέσσερα νέα σωληνάρια PCR τοποθετούνται από 2 μL από τα αντίστοιχα μίγματα τερματισμού (π.χ. στο 1° σωλήνα προσθέτονται από το ddGTP/dGTP ή ddGTP/7-deaza-dGTP στο 2° σωλήνα από το ddTTP/dGTP ή ddTTP/7-deaza-dGTP κ.ο.κ) και



σημειώνονταν ανάλογα τα σωληνάρια (G,T,A,C). Στη συνέχεια προσθέτονταν σε καθένα από τα σωληνάρια αυτά 4  $\mu\text{L}$  από το μίγμα του προηγούμενου βήματος.

- Το μίγμα της κάθε αντίδρασης σκεπάζονταν με 30  $\mu\text{l}$  παραφινέλαιο και τα σωληνάρια τοποθετούνταν στο θερμοκυκλοποιητή και γίνονταν εκκίνηση των κύκλων (συνολικός αριθμός 30).
- Οι κύκλοι ενίσχυσης πραγματοποιούνταν λαμβάνοντας υπόψη τις υποδείξεις του πρωτοκόλλου της Boehringer Mannheim και τη θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_m$ ) των εκκινητών.
- Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνονταν με την προσθήκη 2  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (βλ. σελ. 131).
- Τα δείγματα φυλάσσονταν στους  $-20^\circ\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Αν το υπό ανάλυση μόριο DNA είχε μεγάλη περιεκτικότητα σε G και C, χρησιμοποιούνταν τα μίγματα τερματισμού 7-deaza-dGTP.
2. Όλα τα διαλύματα του kit αμέσως πριν τη χρήση τους αναδεύονταν ήπια και φυγοκεντρούνταν (spin).

### **Στάδιο δεύτερο**

#### **Ηλεκτροφόρηση**

- Τα δείγματα μετουσιώνονταν αμέσως πριν την ηλεκτροφόρηση με θέρμανση στους  $95^\circ\text{C}$  για 3 min. Αμέσως μετά, τοποθετούνταν στον πάγο για 2-3 min.
- Γρήγορη φυγοκέντρηση των δειγμάτων και φόρτωση τουλάχιστον 3  $\mu\text{l}$  κάθε δείγματος στο πήκτωμα.
- Εκτελούνταν ηλεκτροφόρηση κάτω από τις συνήθεις συνθήκες, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer) με σύσταση: 9mM Tris, 9mM Βορικό οξύ, 2,5mM EDTA, pH 8,2.

### **Στάδιο τρίτο**

### **Πορεία αποτύπωσης**

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρούνταν με πολύ προσοχή το ένα τζάμι.
- Κόβονταν μία μεμβράνη στις διαστάσεις του πήκτωματος. [Για μεγαλύτερη ευαισθησία προτείνεται η χρήση της μεμβράνης της Boehringer Mannheim (Cat. No. 1417 240)].
- Η μεμβράνη τοποθετούνταν προσεκτικά πάνω στο πήκτωμα (το οποίο, προφανώς, ήταν δεσμευμένο πάνω στην άλλη γυάλινη πλάκα), έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν φυσαλίδες αέρα ανάμεσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη.
- Πάνω στη μεμβράνη τοποθετούνταν ένα φύλλο χαρτιού Whatman 3MM, ίδιων διαστάσεων με τη μεμβράνη.
- Το όλο σύστημα πήκτωματος / μεμβράνης / χαρτιού Whatman 3MM καλύπτονταν με γυάλινη πλάκα, στο κέντρο της οποίας τοποθετούνταν βάρος ~2 kg.
- Η μεταφορά των μορίων DNA ολοκληρώνονταν σε 30-60 min.
- Η μεμβράνη τοποθετούνταν για 3 min σε επίπεδη λάμπα U.V. για να σταυροδεθεί το μεταφερόμενο DNA.

Μετά την σταυροσύνδεση ακολουθούσε η εμφάνιση των ιχνηθετημένων νουκλεοτιδίων της μεμβράνης η οποία μπορεί να γίνει είτε με τη χρωματομετρική μέθοδο ανίχνευσης (DIG Nucleic Acid Detection Kit / Boehringer Mannheim (Cat. No. 1175 041), είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Luminescent Detection Set for DIG Sequencing / Boehringer Mannheim (Cat. No. 1733 915).

### **Στάδιο τέταρτο**

#### **Εμφάνιση**

Ακολουθήθηκε η μέθοδος της χημειοφωταύγειας, δεδομένου ότι ο χρόνος εμφάνισης του φιλμ είναι πολύ μικρότερος. Όλες οι αντιδράσεις γίνονταν σε θερμοκρασία δωματίου

και με ήπια ανακίνηση, εκτός από την επώαση στο διάλυμα CDP-Star™ που γίνονταν χωρίς ανακίνηση. Οι όγκοι που χρησιμοποιούνταν, αναφέρονται για 1000 cm<sup>2</sup> μεμβράνης.

- Μετά την μεταφορά και το σταυροδέσιμο του DNA, η μεμβράνη τοποθετούνταν σε κατάλληλη λεκάνη και ξεπλένονταν για 1-5 min με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
- Η μεμβράνη επωάζονταν για 30 min με 200 mL ρυθμιστικό διάλυμα II (διάλυμα δέσμησης).
- 5 µl anti-DIG-AP-conjugate αραιώνονταν σε 100 mL διαλύματος II, έτσι ώστε η συγκέντρωσή του να είναι 37,5 mU / mL (αραίωση 1: 20.000).
- Επώαση της μεμβράνης για 30 min στο διάλυμα αντισώματος.
- Έκπλυση για 2 x 15 min, με 200 µl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
- Εξισορρόπηση της μεμβράνης εμβαπτίζοντάς την για 2-5 min σε 100 mL ρυθμιστικό διάλυμα III (διάλυμα ανίχνευσης).
- 50 µl CDP-Star™ (25mM) αραιώνονταν σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος III (αραίωση 1: 2000).
- Επώαση της μεμβράνης για 5 min στο διάλυμα CDP-Star™.
- Η μεμβράνη μεταφέρονταν σε χαρτί Whatman 3MM (ή σε οποιοδήποτε απορροφητικό χαρτί), με το μέρος που έχει το DNA προς τα πάνω, για 2 min. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η μεμβράνη δεν έπρεπε να στεγνώσει πλήρως!
- Η μεμβράνη στερεώνονταν σε ειδικές κασέτες που ενίσχυαν το σήμα, τοποθετούνταν πάνω σ' αυτή διαφανής πλαστική μεμβράνη, και σε σκοτεινό θάλαμο τοποθετούνταν το φιλμ ακτίνων X. Η κασέτα αφού έκλεινε αφήνονταν σε σκοτεινό σημείο για τουλάχιστον 1 h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Ακολουθούσε η κλασική διαδικασία εμφάνισης του φιλμ, αυτή που περιγράφεται στη σελ. 134.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Το διάλυμα CDP-Star™ δεν επαναχρησιμοποιούνταν.
2. Αν το σήμα που εμφανίζονταν στο φιλμ δεν είναι το επιθυμητό, αυξάνονταν ή μειώνονταν ο χρόνος έκθεσης του στη χημειοφωταύγεια. Τα σημασμένα νουκλεοτίδια

εκπέμπουν για περίπου 24 h και το σήμα τους είναι έντονο και σταθερό τις πρώτες ώρες.

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Ρυθμιστικό διάλυμα I: (Ρυθμιστικό διάλυμα μαλεϊκού οξέος)	0,1 M μαλεϊκό οξύ 0,15 M NaCl pH 7,5 με στερεό NaOH
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης:	Ρυθμιστικό διάλυμα I με Tween® 20 τελικής περιεκτικότητας 0,3 % (v/v).
Πυκνό διάλυμα δέσμευσης: (διάλυμα αποθήκευσης – stock solution)	10 % (w/v) αντιδραστήριο «Blocking» σε ρυθμιστικό διάλυμα μαλεϊκού οξέος. Το διάλυμα παρασκευάζονταν με θέρμανση στους 60 - 70 °C για 1 h μέχρι να διαλυθεί εντελώς το αντιδραστήριο «Blocking». Το διάλυμα γίνονταν ομογενές-γαλακτώδες.
Ρυθμιστικό διάλυμα II:	Παρασκευάζονταν με αραίωση 1:10 του πυκνού (διάλυμα αποθήκευσης) διαλύματος δέσμευσης σε ρυθμιστικό διάλυμα I.
Ρυθμιστικό διάλυμα III:	0,1 M Tris-HCl      pH 9,5 0,1 M NaCl

### **5.22 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**

Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται από πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) σε μακριές αλυσίδες με σύνδεση μεταξύ των αλυσίδων με ομάδες N, N'-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), που συνήθως αναφέρεται απλά ως δισακρυλαμίδιο (Bis). Ο πολυμερισμός αρχίζει με την

προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED). Στο σύστημα υπερθειικού αμμωνίου-TEMED, το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το υπερθειικό και αυτές με τη σειρά τους αρχίζουν τον πολυμερισμό. Αύξηση της συγκέντρωσης του TEMED ή του υπερθειικού αυξάνει την ταχύτητα του πολυμερισμού. Επειδή η ελεύθερη βάση του TEMED απαιτείται για τον πολυμερισμό, η αντίδραση παρεμποδίζεται σε χαμηλό pH. Το οξυγόνο αναστέλλει τον πολυμερισμό και γι' αυτό τα μίγματα του πυκτώματος πρέπει να απαερώνονται πριν τη χρήση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει κάτω από συνθήκες αποδιάταξης ή μη, της φυσικής δομής των πρωτεϊνών (denaturing και non denaturing gel electrophoresis). Στην εργασία αυτή έγινε ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της δομής των πρωτεϊνών.

### 5.22.1 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες αποδιάταξης (Laemmli, 1970)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής αυτών, χρησιμοποιεί ρυθμιστικό διάλυμα ικανό να διαχωρίσει το σύνολο των πρωτεϊνών στις ξεχωριστές υπομονάδες από τις οποίες αποτελούνται. Ο κύριος αποδιατακτικός παράγοντας είναι το θεϊκό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl-sulfate, SDS), ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο αφενός διασπά σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών (εκτός από αυτές που δημιουργούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς), αφετέρου τους προσδίδει αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μάζα τους. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνικών μορίων να αποτελεί συνάρτηση μόνο της μοριακής τους μάζας. Το μίγμα των πρωτεϊνών αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 100°C, παρουσία περίσσειας SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης για το άνοιγμα των δισουλφιδικών δεσμών. Επειδή το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με μία σταθερή σχέση βάρους (1 μόριο SDS : 2 μόρια αμινοξέων), το συνολικό φορτίο του συμπλόκου πρωτεΐνης-SDS είναι σχεδόν όμοιο.

Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών μαζών, προκειμένου να εκτιμηθεί η μοριακή μάζα των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Πρωτεΐνες κάθε προέλευσης, διαλυτοποιούνται εύκολα με SDS και για το λόγο αυτό η μέθοδος έχει γενική εφαρμογή.



Συνολικός όγκος διαλύματος φόρτωσης	10 mL
-------------------------------------	-------

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Το διάλυμα φόρτωσης χωρίζονταν σε μικρούς όγκους και φυλάσσονταν στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS 5x, pH 8,3	
Tris	200 mM
Γλυκίνη	1,6 M
SDS	0,4 % (w/v)

Προσθέτονταν απεσταγμένο νερό μέχρι όγκου 3L. Το διάλυμα διηθούνταν και φυλάσσονταν στους 4°C. Εάν είχε λάβει χώρα καθίζηση, το διάλυμα θερμαίνονταν πριν τη χρήση του και επαναδιηθούνταν. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνταν διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x που προέκυπτε προσθέτοντας 400 mL διαλύματος 5x σε 1600 mL απεσταγμένου νερού.

Κάθε πήκτωμα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατασκευάζεται ανάμεσα σε δύο επίπεδα τζάμια με τη βοήθεια των ειδικών διαχωριστικών που τοποθετούνται ανάμεσά τους (spacers). Το πήκτωμα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και αποτελεί τον κύριο όγκο του συνολικού πηκτώματος ονομάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), ενώ πάνω από αυτό τοποθετείται ένα λεπτό στρώμα αραιότερου πηκτώματος που ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel). Η παρασκευή των πηκτωμάτων γίνονταν ως εξής:

#### A) Παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού σε διάλυμα Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8

	Τελική συγκέντρωση ακρυλαμίδιου <u>12 %</u>
Διάλυμα Tris-HCl 1.5 M, pH 8,8	375 mM
Διάλυμα SDS 10% (w / v)	0,1 % (w/v)
Διάλυμα Ακρυλαμίδιου/Bis (30%/0,8% w/v)	12 % (w/v)
Απεσταγμένο νερό	

Απαέρωση για $\geq 15$ min, σε θερμοκρασία δωματίου	
Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w / v)	0,05 % (w/v)
TEMED	0,04 % (v/v)
<hr/>	
Συνολικός όγκος διαλύματος μονομερούς	100 mL

Μετά την τοποθέτηση του διαλύματος του πηκτώματος διαχωρισμού εντός των δύο γυάλινων πλακών της συσκευής, η συσκευή τοποθετούνταν κάθετα και προσθέτονταν με προσοχή μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού στην επιφάνεια, με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματιστεί μια στοιβάδα ύψους 0,5-1 cm χρησιμοποιώντας είτε σύριγγα, είτε πιπέτα Pasteur. Έτσι προστατεύονταν το πήκτωμα από το οξυγόνο του αέρα το οποίο εμποδίζει τον πολυμερισμό του. Η ποσότητα αυτή του νερού απομακρύνονταν μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος και πριν την τοποθέτηση του πηκτώματος επιστοιβάξης. Το πήκτωμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα για να πολυμεριστεί.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Το διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) παρασκευάζονταν μόλις πριν τη χρήση με διάλυση 100 mg υπερθειϊκού αμμωνίου σε 1mL απεσταγμένου νερού.
2. Οι παραπάνω όγκοι ήταν αρκετοί για την παρασκευή δύο πηγμάτων, διαστάσεων 1,5 mm x 16 cm x 20 cm.
3. Το πήκτωμα 7,5 % χρησιμοποιούνταν για διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 40 - 250 kDaltons, ενώ το πήκτωμα 12 % για διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 10 - 100 kDaltons.

### **B) Παρασκευή πηκτώματος επιστοιβάξης (πήκτωμα 4.0 % σε διάλυμα Tris-HCl 0.125 M, pH 6,8)**

Διάλυμα Tris-HCl 0.5 M, pH 6,8	0,125 mM
Διάλυμα SDS 10% (w / v)	0,1 % (w/v)
Διάλυμα ακρυλαμίδιου/Bis (30% w/v)	4 % (w/v)
Απεσταγμένο νερό	
Απαέρωση για $\geq 15$ min, σε θερμοκρασία δωματίου	



---

Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w / v)	0,25 % (w/v)
TEMED	0,5 % (w/v)

---

Συνολικός όγκος διαλύματος μονομερούς	20 mL
---------------------------------------	-------

Τοποθέτηση του μίγματος πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Αμέσως τοποθετούνταν και η χτένα που δημιουργούσε τα πηγαδάκια και το πήκτωμα παρέμενε για πολυμερισμό σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30-45 min.

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Ο όγκος αυτός ήταν αρκετός για δύο πηκτώματα επιστοιβαξης πάχους 1.5 mm.

### Γ) Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα των πρωτεϊνών αναμιγνύονταν 1:1 με διάλυμα φόρτωσης και σε τελικό όγκο μέχρι 30  $\mu$ l, θερμαίνονταν για 5 min στους 100°C, φυγοκεντρώνονταν σε μικροφυγόκεντρο πάγκου και “φορτώνονταν” στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση εκτελούνταν σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος, αρχικά στα 10 mA / πήκτωμα (έως ότου τα δείγματα εισέρχονταν στο πήκτωμα διαχωρισμού) και στη συνέχεια στα 40 mA / πήκτωμα ή στα 20 mA / πήκτωμα αν επρόκειτο η ηλεκτροφόρηση να διαρκέσει όλη νύχτα, μέχρι να φτάσει η χρωστική στο τέλος του πηκτώματος. Καθ’ όλη πάντως τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η συσκευή ψύχονταν με εσωτερική ροή νερού.

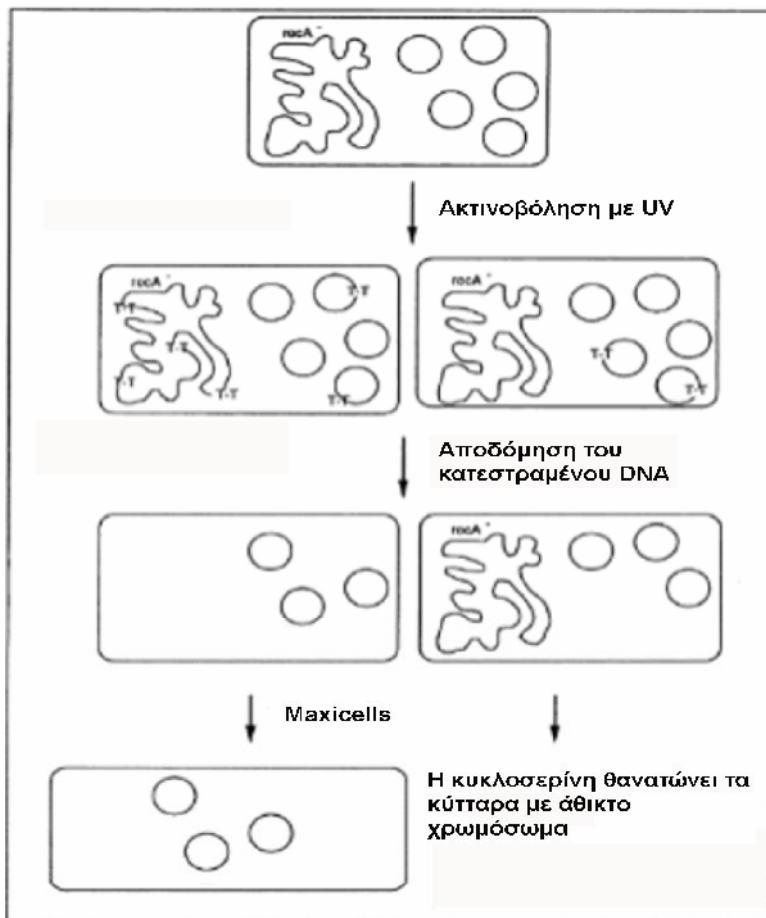
### 5.23 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών μορίων κωδικοποιούμενα από πλασμίδια

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τρεις κατάλληλες μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικών μορίων που κωδικοποιούνται από πλασμίδια. Η μέθοδος «maxicells» (Sancar *et al.*, 1979; Silhary *et al.*, 1984), η μέθοδος «minicells» (Adler *et al.*, 1966) και η μέθοδος που βασίζεται στην *in vitro* ιχνηθέτηση των πρωτεϊνικών μορίων (Pratt *et al.*, 1981). Οι δύο τελευταίες, παρ’ όλο που χρησιμοποιούνται συχνά, παρουσιάζουν αρκετές τεχνικές δυσκολίες και απαιτούν αρκετό χρόνο.

### 5.23.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών μορίων που κωδικοποιούνται από πλασμίδια με τη μέθοδο «maxicells»

#### 5.23.1.1 Γενικά

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε δύο παρατηρήσεις : α) κύτταρα *E. coli* *recA*<sup>-</sup>, *uvrA* ακτινοβολούμενα με U.V. ακτινοβολία (254 nm), χάνουν την ικανότητα να συνθέτουν DNA με αποτέλεσμα το υπάρχον χρωμοσωμικό DNA να αποδομείται σταδιακά, έτσι ώστε, αρκετές ώρες μετά την ακτινοβόληση, ελάχιστες μόνο ποσότητες να παραμένουν άθικτες, β) στην περίπτωση που τα κύτταρα αυτά περιέχουν ένα πλασμίδιο ColE1-τύπου (υψηλού αριθμού αντιγράφων), αυτό εξακολουθεί να αντιγράφεται με αποτέλεσμα ο αριθμός αντιγράφων του να φθάνει σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα (10πλάσια αντίγραφα 6h μετά την ακτινοβόληση). Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, το περισσότερο χρωμοσωμικό DNA (περίπου 80%) έχει αποδομηθεί.



**Σχήμα 37.** Σχηματική παράσταση της μεθόδου «maxicells» σύμφωνα με τον Maloy, 1990.

Όταν στο θρεπτικό μέσο των μη διαιρούμενων κυττάρων (maxicells) προστεθεί ραδιενεργός [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη, τα μόνα πρωτεϊνικά μόρια που θα συντίθενται θα προέρχονται από πλασμιδιακά γονίδια.

Επιλέχθηκε το στέλεχος *E. coli* CSR 603 (Sancar & Rupert, 1978) γιατί ο φαινότυπός του (*recA1*, *uvrA6*, *phr-1*) επέτρεπε να διεξάγονται τα πειράματα κάτω από συνήθεις συνθήκες φωτισμού.

Τα κύτταρα που περιείχαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pDS3270 και pDS212 (παράγωγα του pBR325) ακτινοβολούνταν με U.V. ακτινοβολία, επωάζονταν για την πλήρη αποδόμηση του χρωμοσωμικού DNA και ακολουθούσε ιχνηθέτηση με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, να εμφανίζονταν ζώνες που αντιστοιχούσαν σε πρωτεϊνικά μόρια κωδικοποιούμενα μόνο από πλασμίδια.

### 5.23.1.2 Πειραματική διαδικασία

#### A) Κατεργασία των κυττάρων

Σε 3 κωνικές φιάλες των 100 mL τοποθετούνταν 20 mL ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM9 που περιείχε 1% Casamino acids και το απαιτούμενο αντιβιοτικό. Κάθε μία από τις παραπάνω κωνικές εμβολιάζονταν με κύτταρα των στελεχών CSR603, CSR603/pBR325 και CSR603/pDS3270. Οι καλλιέργειες επωάζονταν υπό ανακίνηση στους 37°C.

Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας (στα 600 nm) γίνονταν 0,3 έως 0,4 (περίπου  $2 \times 10^8$  κύτταρα/mL), 10 mL ακτινοβολούνταν με U.V. ταχύτητας ροής  $0,5 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , υπό μαγνητική ανάδευση. Το βήμα αυτό γίνονταν σε όσο το δυνατό περισσότερο σκοτάδι.

- Τα κύτταρα, στη συνέχεια, μεταφέρονταν σε νέες αποστειρωμένες κωνικές των 100 mL, που ήταν καλυμμένες με αλουμινόχαρτο, και επωάζονταν στους 37°C για 1h υπό ανακίνηση.
- Ακολουθούσε προσθήκη 100 μl διαλύματος κυκλοσερίνης από stock  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .
- Επώαση στους 37 °C υπό ανακίνηση, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 min.

- Έκπλυση δύο φορές με 5 mL ελάχιστο θρεπτικό μέσο MM9. Οι φυγοκεντρήσεις γίνονταν όπως και παραπάνω.
- Επαναιώρηση σε 5 mL ελάχιστου θρεπτικού μέσου, χωρίς φωσφορικά ιόντα, και επώαση στους 37°C για 1h υπό ανακίνηση.
- Προσθήκη [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Η επώαση συνεχιζόταν για ακόμη 1h.
- Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 15 min.
- Έκπλυση δύο φορές με 0,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα M9. Η δεύτερη έκπλυση γίνονταν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου erpendorf).
- Τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος φόρτωσης 2x (βλ. σελ. 142) και θερμαίνονταν για 5 min στους 100°C.
- Κατασκευάζονταν τα δείγματα προς φόρτωση με λήψη 50  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$  και 10  $\mu\text{l}$  από το παραπάνω εναιώρημα και συμπλήρωση, όπου χρειάζεται, μέχρι τα 50  $\mu\text{l}$  με διάλυμα φόρτωσης 1x.
- Τα δείγματα φορτώνονταν σε πήκτωμα 12 % πολυακρυλαμιδίου.
- Η ηλεκτροφόρηση και η διαδικασία κατασκευής του πηκτώματος λάμβανε χώρα όπως περιγράφονται στις σελίδες 140 έως 144.

## **B) Κατεργασία του πηκτώματος**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθούσε η διαδικασία κατεργασίας του πηκτώματος:

- Εμβάπτιση του πηκτώματος (αφού αποκολλούνταν με μεγάλη προσοχή από τα τζάμια) σε 200-300 mL DMSO (διάλυμα DMSO-1) και ήπια ανακίνηση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το πήκτωμα μεταφέρονταν σε νέο DMSO (διάλυμα DMSO-2) ίσου όγκου και ανακινούνταν ήπια για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούσε μεταφορά του πηκτώματος σε 200 mL διαλύματος PPO 20% (v/v) σε DMSO. Η επώαση στο διάλυμα αυτό μπορούσε να γίνει καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (ελάχιστη διάρκεια επώασης 3h).

- Μετά το τέλος της παραπάνω επώασης οι διαστάσεις του πήκτωματος είχαν ελαττωθεί. Γίνονταν τρεις πλύσεις με απεσταγμένο νερό (ανά 20 sec) και στο τέλος αφήνονταν σε 200 mL νερό για 20 min. Το πήκτωμα μέχρι να εμβαπτιστεί στο νερό ήταν διαφανές. Όταν εμβαπτιζόνταν σ' αυτό έπαιρνε χρώμα λευκό, γίνονταν μη διαφανές πολύ εύθραυστο ενώ μετά το τέλος και της τελευταίας επώασης έπαιρνε ξανά (κατά ένα μεγάλο ποσοστό) τις αρχικές του διαστάσεις.
- Ακολουθούσε τοποθέτησή του σε 2 φύλλα χαρτιού τύπου Whatman 3MM και ξηραίνονταν σε Gel Dryer για 1,5 έως 2 h στους 60 - 70°C υπό κενό και σύμφωνα με τις προδιαγραφές και οδηγίες του Gel Dryer.

### **Γ) Αυτοραδιογραφία**

- Το πήκτωμα (μαζί με το ένα φύλλο χαρτιού τύπου Whatman 3MM) τοποθετούνταν σε κασέτα αυτοραδιογραφίας, με ειδικές πλάκες για την ενίσχυση του ραδιενεργού σήματος. Τα πήκτωμα καλύπτονταν με φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-Omat KODAK), κλείνονταν η κασέτα και αφήνονταν για έκθεση περίπου 5 ημέρες, σε σκοτεινό περιβάλλον, σε θερμοκρασία δωματίου ή για ενίσχυση του σήματος στους -70 °C.
- Τέλος γίνονταν η εμφάνιση του φιλμ σύμφωνα με όσα περιγράφονται στις σελ. 134.

Όλες οι διαδικασίες αυτοραδιογραφίας γίνονταν σε σκοτεινό θάλαμο απουσία φωτός ή με τη βοήθεια ειδικής κόκκινης λυχνίας.

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Τα διαλύματα DMSO-1, DMSO-2 και PPO μπορούσαν να επαναχρησιμοποιηθούν για περισσότερες από μία φορές.
2. Η κυκλοσερίνη βοηθάει στην αποδόμηση του χρωμοσωμικού DNA και κάνει δυνατό το σχηματισμό maxicells σε πολύ μικρότερες δόσεις UV. Η βέλτιστη συγκέντρωση είναι 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  καλλιέργειας. Επειδή σε υδατικό διάλυμα δεν είναι σταθερή, κάθε φορά φτιάχνονταν καινούργιο διάλυμα το οποίο χρησιμοποιούνταν εντός της ημέρας και το υπόλοιπο απορρίπτονταν.

## 5.25 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία

BECKMAN L7-65 Ultracentrifuge

SAVANT Speed Vac SC100 Refrigerated Condensation Trap RT-100

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments)

FORMA Scientific -80 °C FREEZER

DNA Thermal Cyclor (PERKIN ELMER)

Μικροφυγόκεντροι : MIKRO 12-24 (Hettich Zentrifugen)

Hettich UNIVERSAL

SIGMA 2K-15

SPECTRONIC 20 (BAUSCH and LAMB)

Sequi-Gen, Sequencing Cell (BIO-RAD)

Mini protean II και III της BIO-RAD

# ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



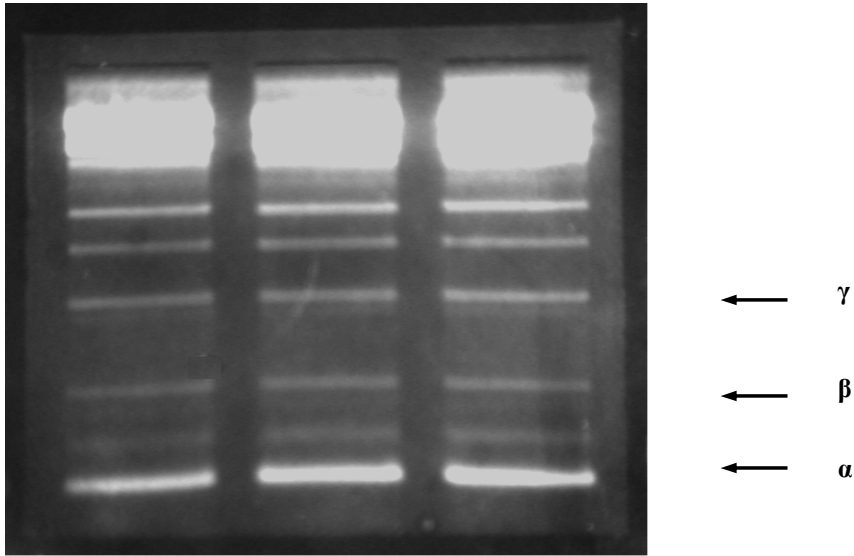


## **6. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ PZMO1, PZMO2 ΚΑΙ PZMO3**

Για την μελέτη των μικρού μοριακού βάρους φυσικών πλασμιδίων του *Z. mobilis* στελέχους ATCC 10988 και τον προσδιορισμό της λειτουργίας τους, είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους, απαλλαγμένα από προσμίξεις. Οι κυτταρικές λύσεις και οι απομονώσεις DNA από το *Z. mobilis* παρουσίαζαν ανέκαθεν δυσκολίες τόσο σε μεγάλη όσο και σε μικρή κλίμακα και αυτό, γιατί ο οργανισμός δε λύεται εύκολα και αποδοτικά, δεν απομακρύνονται οι πρωτεΐνες του αποτελεσματικά και φέρει ισχυρή νουκλεολυτική δράση που αν δεν αδρανοποιηθεί επαρκώς, οδηγεί σε κατακερματισμό των μορίων DNA.

### **6.1 Απομόνωση πλασμιδίων του στελέχους *Z. mobilis* ATCC 10988**

Τα πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Στην **εικόνα 4** φαίνεται το αποτέλεσμα μίας τέτοιας απομόνωσης.



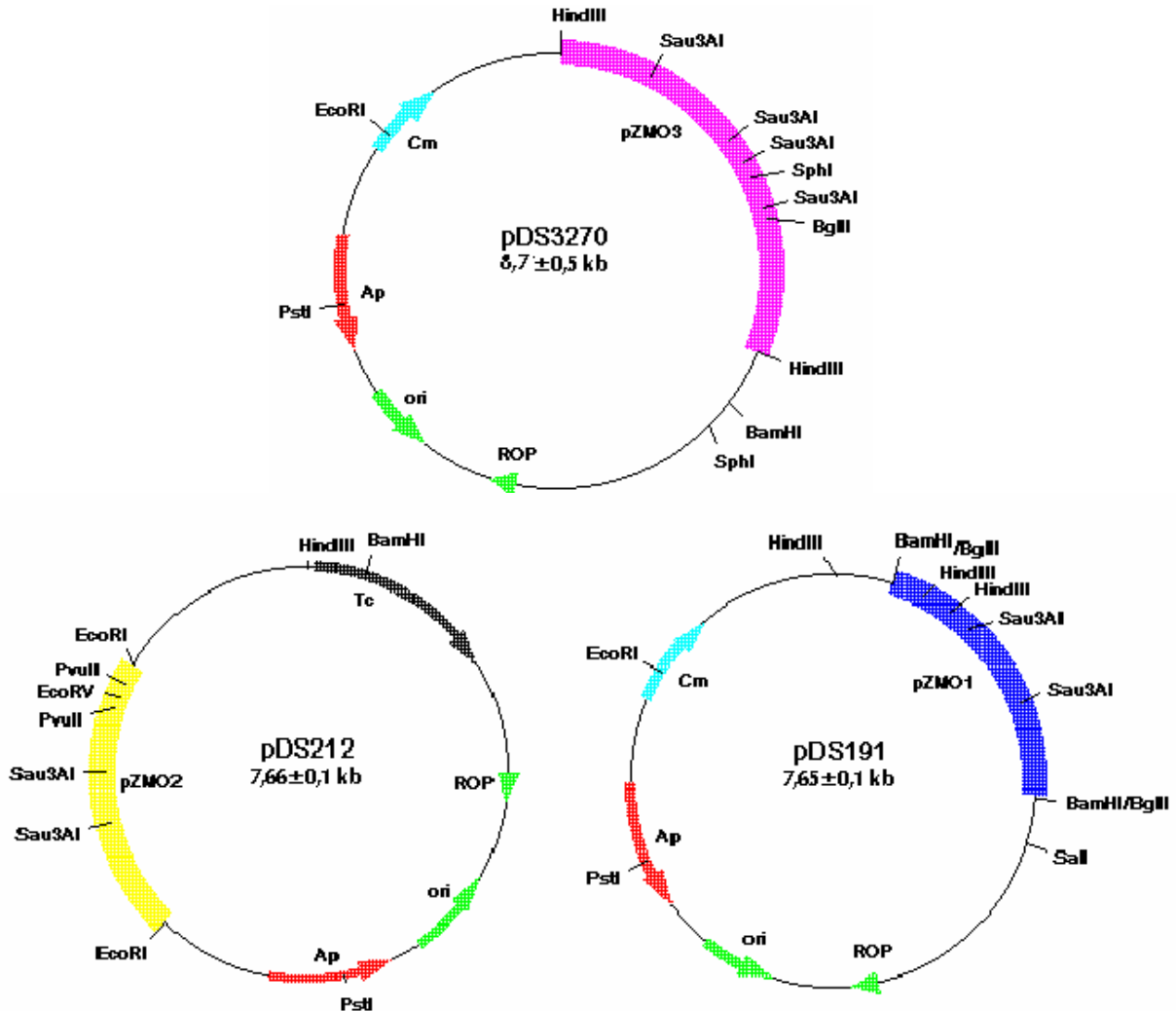
**Εικόνα 4.** Πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 διαχωρισμένα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (TAE 1X, 5V/cm) **α:** pZMO1 + pZMO2, **β:** pZMO3, **γ:** pZMO3 + pZMO5,

Μία παρατήρηση που αφορά στις λύσεις του *Z. mobilis*, είναι ότι μπορούσε περιστασιακά να εμφανίζει μικρές διακυμάνσεις στις εντάσεις ή και θέσεις συγκεκριμένων ζωνών. Αυτό, ίσως να οφείλονταν στη διαφορετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων πριν τη λύση τους ή ακόμα σε διαφορετικό χειρισμό του εκχυλίσματος κατά την διαδικασία λύσης των κυττάρων.

Η μελέτη των πλασμιδίων απ' ευθείας από το πλασμιδιακό εκχύλισμα του ATCC 10988 είναι αδύνατη, καθώς κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, το ίδιο φυσικό πλασμίδιο εμφανίζει πλήθος ζωνών εξαιτίας των διαφόρων διαμορφώσεων, που παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Επιπλέον, είναι γνωστό από τους Scordaki & Drainas (1987), ότι τα περισσότερα συμμεταναστεύουν με άλλα πλασμίδια και εμφανίζονται ως μια κοινή ζώνη (π.χ. τα μικρού μοριακού βάρους πλασμίδια pZMO1 και pZMO2 ή τα πλασμίδια pZMO3 και pZMO5, **Εικόνα 4** ζώνη **α** και **γ** αντίστοιχα). Θεωρήθηκε επομένως αναγκαία η υποκλωνοποίησή τους σε γνωστούς πλασμιδιακούς φορείς ευρέως φάσματος.

Απομονώθηκαν, λοιπόν, τα φυσικά πλασμίδια pZMO1, pZMO2 και pZMO3, είτε απ' ευθείας από το πλασμιδιακό παρασκεύασμα του ATCC 10988, ύστερα από ηλεκτροφόρηση και πέψη, είτε από τα ήδη υπάρχοντα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pDS212 (το οποίο έχει κατασκευαστεί με υποκλωνοποίηση του pZMO2 στον πλασμιδιακό

φορέα pBR325), pDS191 (υποκλωνοποίηση του pZMO1 στο pBR325) και pDS3270 (υποκλωνοποίηση του pZMO3 στο pBR325) (Scordaki & Drainas, 1987, **Σχήμα 38**), ύστερα από πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.



**Σχήμα 38.** Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pDS212, pDS191 και pDS3270 (Scordaki & Drainas, 1987).

Στη συνέχεια τα απομονωθέντα και καθαρά πλέον πλασμίδια, υποκλωνοποιήθηκαν σε γνωστούς πλασμιδιακούς φορείς ευρέως φάσματος (pUC19, pBluescript), σύμφωνα με την πορεία που περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι, στις σελ. 117-122, προκειμένου να προσδιοριστούν τόσο η αλληλουχία των νουκλεοτιδιακών τους βάσεων όσο και η λειτουργία των πρωτεϊνικών μορίων που πιθανά κωδικοποιούνται από αυτά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κατασκευάστηκαν δύο ειδών υποκλώνοι, όπου το ίδιο πλασμίδιο είναι υποκλωνοποιημένο σε διαφορετικές περιοριστικές θέσεις, οι οποίες όμως απέχουν όσο το δυνατόν περισσότερο μεταξύ τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η

καταστροφή πιθανών ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης. Μάλιστα τα πλασμίδια του *Z. mobilis* εισήχθησαν στον φορέα και προς τις δύο κατευθύνσεις.

## 6.2 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO1

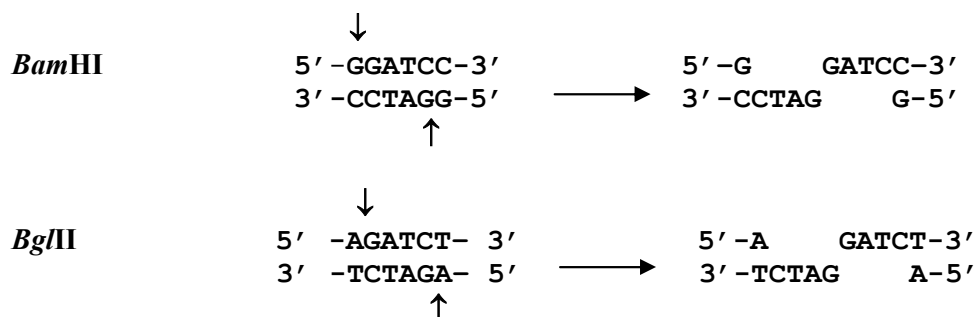
Είναι γνωστό από τους Scordaki & Drainas (1987) ότι το pZMO1, το οποίο συμμεταναστεύει κατά την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αραρόζης με το pZMO2 (Εικόνα 4, ζώνη α), περιέχει μια μονή περιοριστική θέση *Bgl*II. Αφού απομονώθηκε η ζώνη α με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης, όπως αυτή περιγράφεται στη σελ. 107, έγινε πέψη της με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bgl*II. Από την πέψη προέκυψε ευθύγραμμο το μόριο του pZMO1 υποκλωνοποιήθηκε στη θέση *Bam*HI του MCS (multiple cloning site) του πλασμιδιακού φορέα pUC19 και ως προς τους δύο προσανατολισμούς του (Σχήμα 41). Αναλυτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων μορίων pZMO1 ήταν η εξής:

α) Πλήρης πέψη της ζώνης α (pZMO1 + pZMO2) με την ενδονουκλεάση *Bgl*II.

β) Πλήρης πέψη DNA του φορέα pUC19 με την ενδονουκλεάση *Bam*HI.

γ) Ανάμειξη των προϊόντων των δύο πέψεων και επώαση 20 h στους 16 °C παρουσία του ενζύμου T4 DNA λιγάσης. Η σύνδεση είναι δυνατή εφ' όσον οι δύο ενδονουκλεάσες, αν και αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες βάσεων, αφήνουν τα ίδια συμβατά άκρα (Σχήμα 39). Μετά την σύνδεση (ligation), η θέση περιορισμού που δημιουργείται, φυσικά δεν αναγνωρίζεται ούτε από την *Bgl*II ούτε από την *Bam*HI.

### Ένζυμο

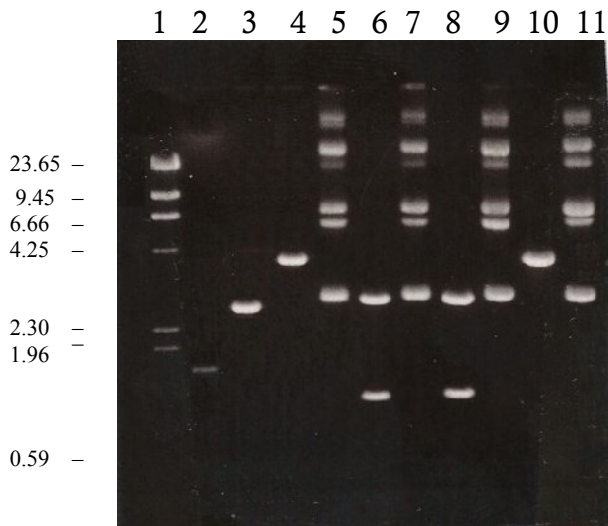


**Σ χ ή μ α 39.** Θέσεις περιορισμού των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Bam*HI και *Bgl*II. Τα βέλη σημειώνουν τα σημεία υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

δ) Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5α με το παραπάνω μίγμα της αντίδρασης.

ε) Απομόνωση 4 ανασυνδυασμένων αποικιών  $Ap^R$  παρουσία IPTG και X-Gal (λευκές αποικίες).

Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών έγινε σε τρυβλία L.A. τα οποία περιείχαν  $Ap$   $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Περιοριστική ανάλυση των παραπάνω απομονωθέντων πλασμιδίων που προέκυψαν από την σύνδεση, έγινε με την ενδονουκλεάση *Hind*III. Επιλέχτηκε η *Hind*III διότι οι θέσεις της βρίσκονται σε τέτοια σημεία πάνω στο πλασμίδιο, που μπορεί εύκολα, από το ηλεκτροφορητικό προφίλ, να βγάλει κανείς συμπεράσματα για τον προσανατολισμό της ένθεσης του pZMO1. Αποδείχτηκε έτσι ότι περιέχουν ολόκληρο το pZMO1 και ως προς τους δύο προσανατολισμούς του. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα αυτό με έναν επιπλέον ασφαλή τρόπο, μετά τις ηλεκτροφορήσεις των πέψων των δειγμάτων, το πήκτωμα της αγαρόζης μεταφέρθηκε κατά Southern σε φίλτρο και στη συνέχεια έγινε υβριδισμός DNA-DNA κατά τον οποίο το ανιχνευτικό μόριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το pZMO1 σημασμένο με DIG-11-dUTP (Υλικά και Μέθοδοι, σελ. 114-117). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν από την παραπάνω σύνδεση ονομάστηκαν pUZMO1.1 και pUZMO1.2, ανάλογα με τον προσανατολισμό υποκλωνοποίησης του pZMO1, έχουν μέγεθος  $4,35 \pm 0,05 \text{ kb}$  και φέρουν το γενετικό δείκτη αντοχής στην αμπικιλίνη (**Σχήμα 41**). Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζεται το πήκτωμα αγαρόζης με το αντίστοιχα φίλτρο υβριδισμού των περιοριστικών αναλύσεων των παραπάνω πλασμιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα πλασμίδια στις διαδρομές 4, 5 και 10, 11 δείχνουν ότι περιέχουν το pZMO1 σαν ένθεμα με τον έναν προσανατολισμό, αφού τα αποτελέσματα της πέψης με *Hind*III έδωσαν μία ζώνη M.B.  $\sim 4,0 \text{ kb}$  (αντιστοιχεί στο pUC19 και στο μεγαλύτερο τμήμα του pZMO1). Άρα αντιστοιχούν στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που ονομάστηκε pUZMO1.2.



**Εικόνα 5.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO1.1 και pUZMO1.2

Διαδρομές:

1. λ DNA / *Hind*III
  2. pZMO1 / *Bgl*II
  3. pUC19 / *Bam*HI
  4. pUZMO1 / *Hind*III
  5. pUZMO1
  6. pUZMO1 / *Hind*III
  7. pUZMO1
  8. pUZMO1 / *Hind*III
  9. pUZMO1
  10. pUZMO1 / *Hind*III
  11. pUZMO1
- Απουκία No 1  
Απουκία No 2  
Απουκία No 3  
Απουκία No 4

α



β

(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

(β) Εμφάνιση φίλτρου ύστερα από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO1 / *Bgl*II σημασμένο με διγοξιγενίνη-11 dUTP.

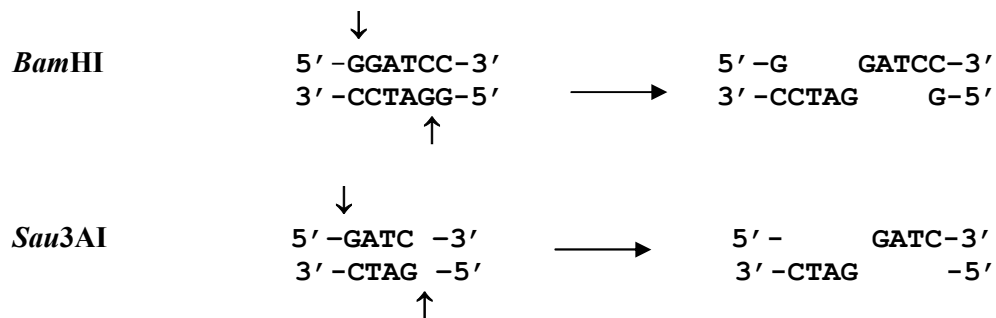
Αντίθετα τα πλασμίδια στις διαδρομές 6, 7 και 8, 9 δείχνουν να περιέχουν το pZMO1 σαν ένθεμα με τον αντίθετο προσανατολισμό, αφού τα αποτελέσματα της πέψης με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind*III έδωσαν δύο ζώνες M.B. ~2,9 kb (αντιστοιχεί στο pUC19 και σε μικρό τμήμα του pZMO1) και ~1,3 kb (αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο τμήμα του pZMO1) και είναι αυτά που αντιστοιχούν στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που ονομάστηκε pUZMO1.1.

Να σημειώσουμε εδώ ότι M.B. των πλασμιδίων, όπως αυτό προκύπτει από τις ηλεκτροφορήσεις, διαφέρει σε σχέση με το θεωρητικό  $4,35 \pm 0,05$  kb. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η πέψη με *Hind*III δίνει για τα μεν πλασμίδια των διαδρομών 6, 7 και 8, 9, δηλ. για το pUZMO1.1, ένα ακόμη τμήμα DNA πολύ μικρού M.B. 170 bp, ενώ για τα πλασμίδια των διαδρομών 4, 5 και 10, 11, δηλ. για το pUZMO1.2, δίνει δύο

τμήματα M.B. 170 bp τα οποία βέβαια, λόγω μεγέθους, έχουν εξέλθει του πηκτώματος και δεν ανιχνεύονται.

Η ιδέα της υποκλωνοποίησης του pZMO1 και σε μία δεύτερη περιοριστική του θέση φαινόταν ως αναγκαία, αφού, η *Bgl*II στα παραπάνω ανασυνδυασμένα μόρια (pUZMO1.1 και pUZMO1.2), πιθανά να διέκοπτε την έκφραση κάποιου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης πάνω σ' αυτά. Έτσι η ζώνη **α** του πλασμιδιακού περιεχομένου του ATCC 10988 (**Εικόνα 4**), υπέστη μία δεύτερη πέψη, μερική αυτή τη φορά, ελλείπει άλλης μονής περιοριστικής θέσεις πάνω στο πλασμίδιο pZMO1, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sau*3AI, μία θέση της οποία να βρίσκεται εκ διαμέτρου αντίθετα από την περιοριστική θέση *Bgl*II. Μετά την πέψη και την ηλεκτροφόρηση, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με ηλεκτροέκλυση, οι ζώνες που αντιστοιχούσαν σε μόρια DNA μεγάλου μοριακού βάρους και ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης στη θέση *Bam*HI του MCS του πλασμιδιακού φορέα pUC19. Η σύνδεση και εδώ είναι εφικτή εφ' όσον και οι δύο ενδονουκλεάσες, αν και αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες βάσεων, αφήνουν τα ίδια συμβατά άκρα (όπως φαίνεται παρακάτω στο **Σχήμα 40**).

#### Ένζυμο



**Σ χ ή μ α 40.** Θέσεις περιορισμού των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Bam*HI και *Sau*3AI. Τα βέλη σημειώνουν τα σημεία υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Όσο μεγαλύτερου μοριακού βάρους ήταν τα τμήματα που θα προέκυπταν μετά τη μερική πέψη του pZMO1 τόσο μεγαλύτερο κομμάτι του pZMO1 θα υποκλωνοποιούνταν και τόσο μικρότερη πιθανότητα, φυσικά, υπήρχε να διακόπτονταν κάποιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Προκειμένου να υπολογιστεί το μήκος των ενθεμάτων έγινε περιοριστική ανάλυση αρκετών μετασχηματισμένων αποικιών *E. coli* DH5α Ap<sup>R</sup> παρουσία IPTG και X-Gal (λευκές αποικίες), ώσπου απομονώθηκε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που

ονομάστηκε pUZMO1.3 (**Σχήμα 41**). Έχει μέγεθος  $3,8 \pm 0,05$  kb και φέρει και αυτό το γενετικό δείκτη αντοχής στην αμικικιλίνη.

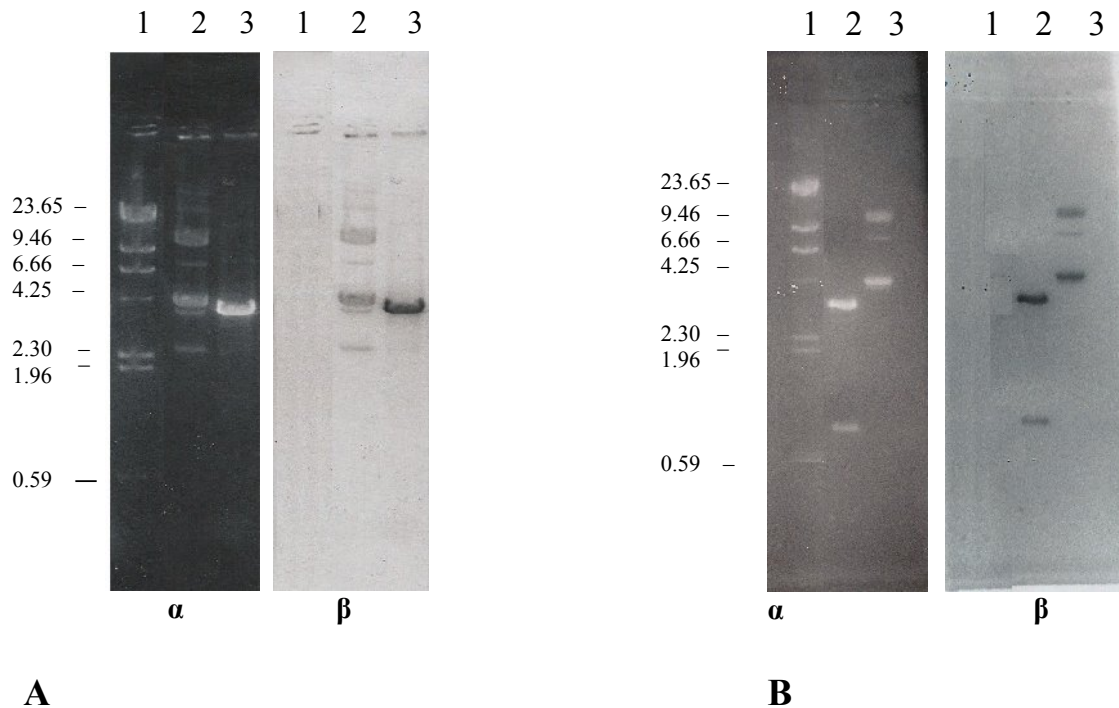
Η χαρτογράφηση του pUZMO1.3 έγινε με απλές και διπλές πέψεις του με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bgl*II, *Hind*III, *Eco*RI, και *Sal*I. Τα αποτελέσματα της περιοριστικής ανάλυσης του pUZMO1.3 περιγράφονται στον **Πίνακα 14**.

**Πίνακας 14.** Μεγέθη του πλασμιδίου pUZMO1.3 που προέκυψαν από τις διαφορετικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Πέψη	Περιοριστικά τμήματα (kb $\pm$ 0,05)	Άθροισμα (kb $\pm$ 0,05)
<i>Bgl</i> II	Πλήρης	3,8 (μία ζώνη)	3,8
<i>Eco</i> RI + <i>Bgl</i> II	Διπλή	3,1 + 0,7 (δύο ζώνες)	3,8
<i>Hind</i> III	Πλήρης	3,4 + 0,21 + 0,17 (τρεις ζώνες)	3,78
<i>Eco</i> RI + <i>Sal</i> I	Διπλή	2,7 + 1,1 (δύο ζώνες)	3,8

Μετά τις ηλεκτροφορήσεις των πέψεων των δειγμάτων, τα μόρια του DNA μεταφέρθηκαν κατά Southern και στη συνέχεια έγινε μη ραδιενεργός υβριδισμός με ανιχνευτικό μόριο το pZMO1.





**Ε ι κ ό ν α 6.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUZMO1.3 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bgl*II και *Eco*RI.

**(Α)** Πέψη με *Bgl*II

Διαδρομές:

1. λ DNA / *Hind*III
2. pUZMO1.3
3. pUZMO1.3 / *Bgl*II

**(Β)** Διπλή πέψη με *Eco*RI + *Bgl*II

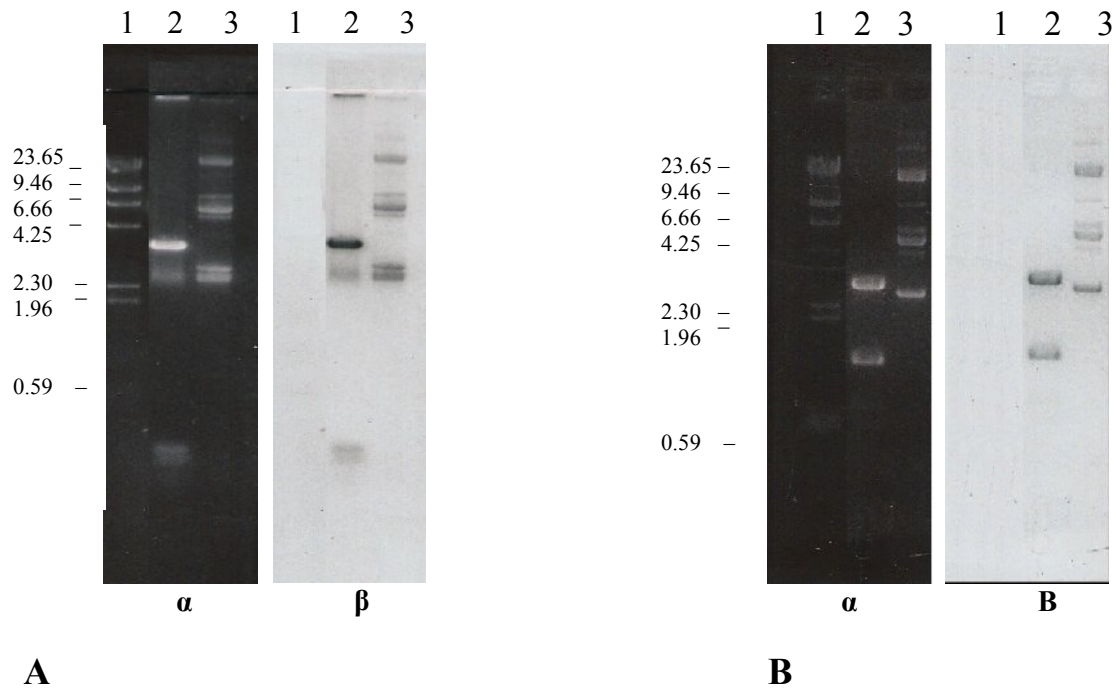
Διαδρομές:

1. λ DNA / *Hind*III
2. pUZMO1.3 / *Eco*RI + *Bgl*II
3. pUZMO1.3

(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

(β) Εμφάνιση φίλτρου ύστερα από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO1 / *Bgl*II σημασμένο με διγοξιγενίνη-11 dUTP.

Στις **Εικόνες 6** και **7** παρουσιάζονται τα πηκτώματα αγαρόζης με τα αντίστοιχα φίλτρα υβριδισμού των περιοριστικών αναλύσεων του εν λόγω πλασμιδίου. Αποδείχτηκε έτσι ότι το pUZMO1.3 περιέχει σαν ένθεμα μέρος της περιοχής του pZMO1 μεγέθους 1,1 kb και συγκεκριμένα την περιοχή *Sau*3AI (1 kb) – *Sau*3AI (0,53 kb) όπως αυτή φαίνεται στον περιοριστικό χάρτη του **Σχήματος 41** και διατηρεί άθικτη την περιοριστική θέση *Bgl*II, θέση που καταστρέφεται στα ανασυνδυασμένα μόρια pUZMO1.1 και pUZMO1.2. Ήταν το μεγαλύτερο κομμάτι του pZMO1 που καταφέραμε να υποκλωνοποιήσουμε που περιέχει άθικτη τη θέση *Bgl*II και μεγάλα κομμάτια δεξιά και αριστερά αυτής γεγονός που σημαίνει ότι αν υπήρχε ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης θα διατηρούνταν άθικτο.



**Ε ι κ ό ν α 7.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUZMO1.3 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Hind*III, *Eco*RI και *Sal*I.

**(Α)** Πέψη με *Hind*III

Διαδρομές:

1. λ DNA / *Hind*III
2. pUZMO1.3 / *Hind*III
3. pUZMO1.3

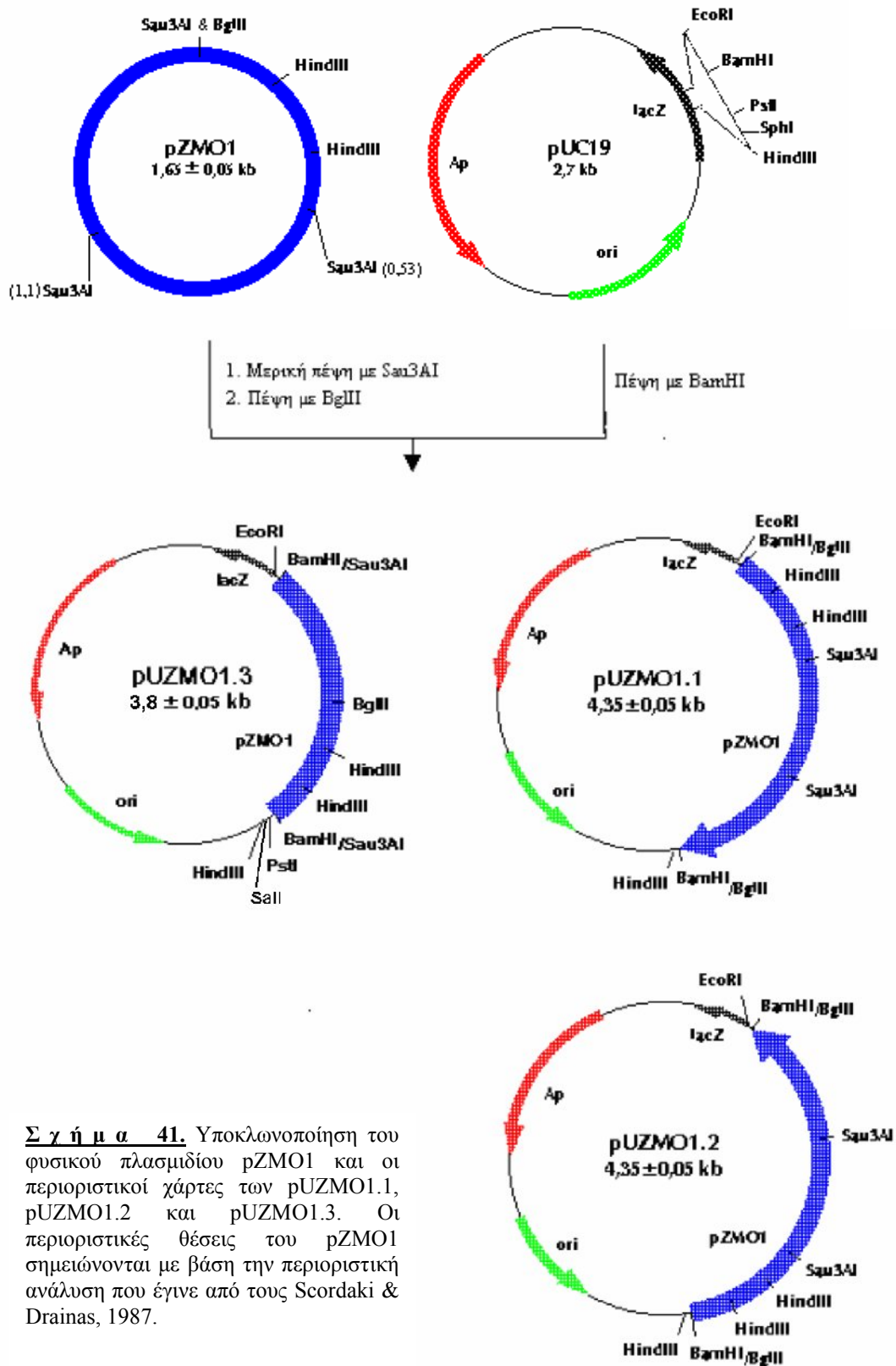
**(Β)** Διπλή πέψη με *Eco*RI + *Sal*I

Διαδρομές:

1. λ DNA / *Hind*III
2. pUZMO1.3 / *Eco*RI + *Sal*I
3. pUZMO1.3

(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

(β) Εμφάνιση φίλτρου ύστερα από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO1/*Bgl*II σημασμένο με διγοξυγενίνη-11 dUTP.



**Σ γ ή μ α 41.** Υποκλωνοποίηση του φυσικού πλασμιδίου pZMO1 και οι περιοριστικοί χάρτες των pUZMO1.1, pUZMO1.2 και pUZMO1.3. Οι περιοριστικές θέσεις του pZMO1 σημειώνονται με βάση την περιοριστική ανάλυση που έγινε από τους Scordaki & Drinas, 1987.

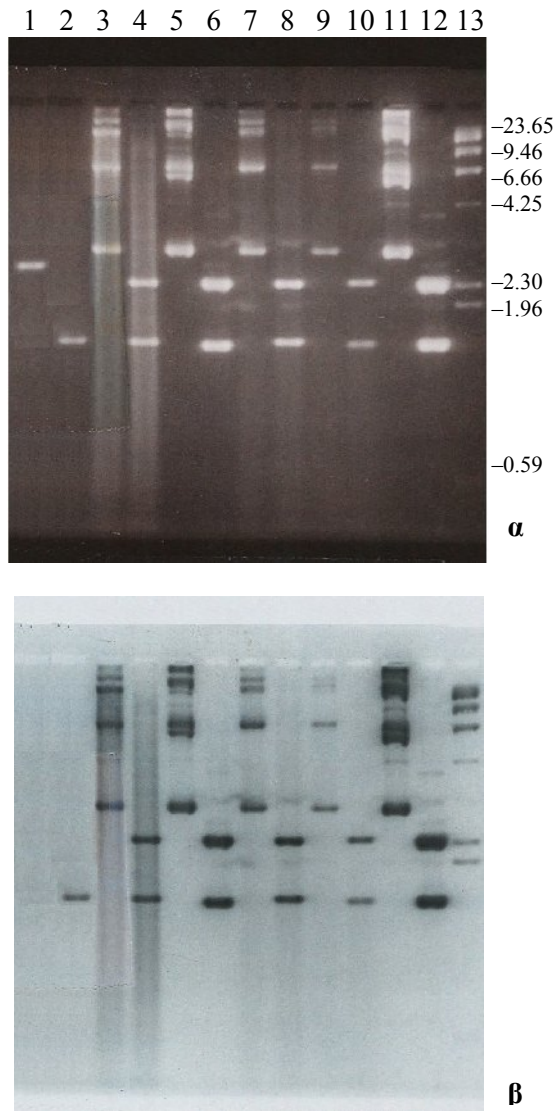
### 6.3 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO2

Ως πηγή του πλασμιδίου pZMO2 χρησιμοποιήθηκε επίσης το DNA της ζώνης **α** (pZMO1 + pZMO2) του πλασμιδιακού εκχυλίσματος του στελέχους ATCC 10988 το οποίο υπέστη νέα πέψη, αυτή τη φορά με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* που ευθυγραμμίζει μόνο το pZMO2 και δεν υπάρχει στο πλασμίδιο pZMO1 (Scordaki & Drainas 1987). Το γραμμικό μόριο που προέκυψε (pZMO2) υποκλωνοποιήθηκε στη θέση *EcoRI* του MCS του pUC19 (**Σχήμα 42**). Αναλυτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων μορίων pZMO2 ήταν η εξής:

- α) Πλήρης πέψη της ζώνης **α** (pZMO1 + pZMO2) με την ενδονουκλεάση *EcoRI*.
- β) Πλήρης πέψη DNA του φορέα pUC19 επίσης με την ενδονουκλεάση *EcoRI*.
- γ) Ανάμειξη των προϊόντων των δύο πέψεων και επώαση 20 h στους 16°C παρουσία του ενζύμου T4 DNA λιγάσης.
- δ) Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5α με το παραπάνω μίγμα της αντίδρασης.
- ε) Απομόνωση 5 ανασυνδυασμένων αποικιών Ap<sup>R</sup> παρουσία IPTG και X-Gal (λευκές αποικίες).

Η επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών για τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pUZMO2.1 και pUZMO2.2 έγινε σε τρυβλία L.A. τα οποία περιείχαν Ap 100 mg·mL<sup>-1</sup>. Περιοριστική ανάλυση με την ενδονουκλεάση *PvuII*, των παραπάνω απομονωθέντων πλασμιδίων, που προέκυψαν από την σύνδεση, απέδειξαν ότι περιέχουν ολόκληρο το pZMO2 και ως προς τους δύο προσανατολισμούς του. Τα ανασυνδυασμένα αυτά πλασμίδια ονομάστηκαν pUZMO2.1 και pUZMO2.2 (ανάλογα με τον προσανατολισμό υποκλωνοποίησης του pZMO2), έχουν μέγεθος 4,40 ± 0,05 kb και φέρουν τον γενετικό δείκτη αντοχής στην αμπικιλίνη (**Σχήμα 42**). Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8**, τα πλασμίδια στις διαδρομές 5, 6 και 11, 12 δείχνουν ότι περιέχουν το pZMO2 σαν ένθεμα με τον έναν προσανατολισμό, αφού πέψη αυτών με *PvuII* έδωσε δύο ζώνες M.B. 2,40 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pUC19) και 1,45 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO2 και μικρό τμήμα 90 bp του pUC19). Το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμίδιο ονομάστηκε pUZMO2.2. Αντίθετα τα πλασμίδια στις διαδρομές 3, 4, 7, 8 και 9, 10 δείχνουν να περιέχουν το pZMO2 σαν ένθεμα με τον αντίθετο προσανατολισμό, αφού πέψη επίσης με *PvuII* έδωσε δύο ζώνες M.B. 2,40 kb (αντιστοιχεί στο ίδιο τμήμα του pUC19) και 1,60 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO2 και μικρό τμήμα 232 bp του pUC19). Αυτό το πλασμίδιο ονομάστηκε pUZMO2.1. Προς επιβεβαίωση των παραπάνω

έγιναν πειράματα μη ραδιενεργού υβριδισμού DNA–DNA με ανιχνευτικό μόριο το pZMO2 όπως αυτό απομονώθηκε από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS212 ύστερα από πέψη με *EcoRI* (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO2.1 και pUZMO2.2

Διαδρομές:

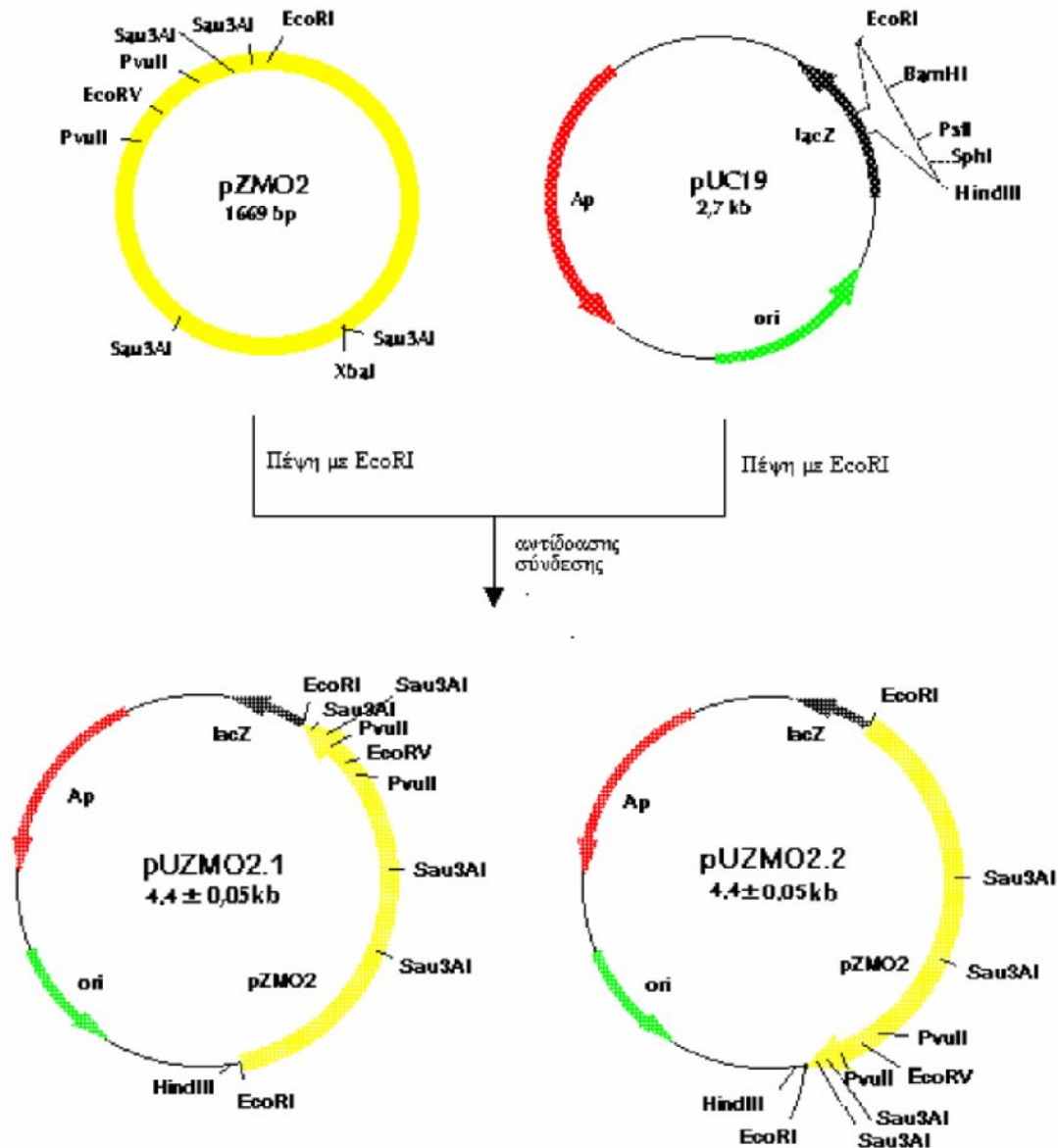
- |                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| 1: pUC19 πέψη <i>EcoRI</i>        |              |
| 2: pZMO2 πέψη με <i>EcoRI</i>     |              |
| 3: pUZMO2.1                       | Αποικία No 1 |
| 4: pUZMO2.1 πέψη με <i>PvuII</i>  |              |
| 5: pUZMO2.2                       | Αποικία No 2 |
| 6: pUZMO2.2 πέψη με <i>PvuII</i>  |              |
| 7: pUZMO2.1                       | Αποικία No 3 |
| 8: pUZMO2.1 πέψη με <i>PvuII</i>  |              |
| 9: pUZMO2.1                       | Αποικία No 4 |
| 10: pUZMO2.1 πέψη με <i>PvuII</i> |              |
| 11: pUZMO2.2                      | Αποικία No 5 |
| 12: pUZMO2.2 πέψη με <i>PvuII</i> |              |
| 13: λ DNA / <i>HindIII</i>        |              |

(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης.

(β) Εμφάνιση φίλτρου μετά από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO2 / *EcoRI* σημασμένο με διγοξιγενίνη-11 dUTP.

Να σημειωθεί ότι και εδώ παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο M.B., όπως αυτό προκύπτει από την πέψη με *PvuII*, σε σχέση με το θεωρητικό  $4,40 \pm 0,05$  kb. Αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η πέψη με *PvuII* δίνει για το κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, άλλα δύο τμήματα DNA, πολύ μικρότερου M.B. (230 bp και 151 bp για το pUZMO2.1 δηλ. τα πλασμίδια των διαδρομών 3, 4, 7, 8 και 9, 10 ενώ για τα πλασμίδια των διαδρομών 5, 6 και 11, 12 δηλ. για το pUZMO2.2 δίνει τμήματα 372 bp και 151 bp) τα οποία βέβαια, λόγω μεγέθους, έχουν εξέλθει του ηλεκτώματος. Να υπενθυμίσουμε τέλος

ότι το pZMO2 μπορεί να εξαχθεί από το pUZMO2.1 και pUZMO2.2 μετά από πέψη με *EcoRI*. Το πλήθος των ζωνών που εμφανίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης και αντιστοιχούν σε πλασμιδιακό DNA που δεν έχει υποστεί πέψη, οφείλεται στις διαφορετικές διαμορφώσεις που παρουσιάζουν τα πλασμίδια.



**Σ γ ή μ α 42.** Υποκλωνοποίηση του pZMO2 και περιοριστικοί χάρτες των pUZMO2.1 και pUZMO2.2. Οι περιοριστικές θέσεις του pZMO2 σημειώνονται με βάση την εύρεση της αλληλουχίας του pZMO2 στην διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Προσπάθειες υποκλωνοποίησης του pZMO2 σε μια δεύτερη περιοριστική θέση, απομακρυσμένης της *EcoRI* δεν είχαν αποτέλεσμα.

## 6.4 Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZMO3

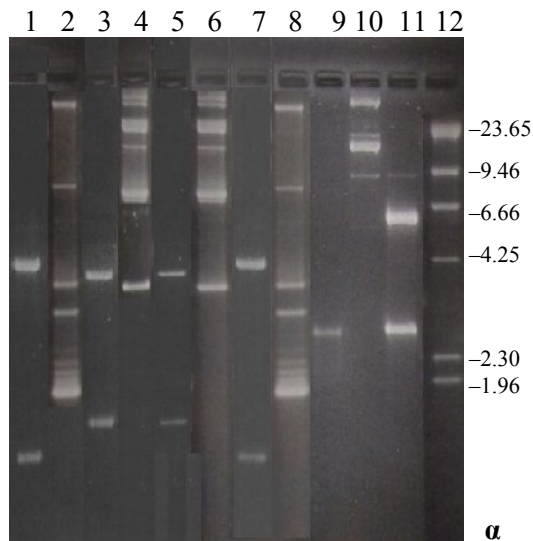
Το pZMO3 ήταν το καλύτερα μελετημένο μικρού μοριακού βάρους πλασμίδιο του *Z. mobilis* 10988 δεδομένου ότι τόσο οι Scordaki & Drainas, 1987 όσο και οι Misawa & Nakamura, 1989 είχαν φτάσει σε πολύ χρήσιμα και εμπειριστατωμένα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα είχε γίνει περιοριστική ανάλυση και είχε προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική του αλληλουχία, καθώς και δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF1 και ORF2) πάνω σ' αυτό, το ένα εκ των οποίων (το ORF2) είναι, σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, πιθανότατα υπεύθυνο για την σταθερή αντιγραφή του πλασμιδίου.

Να σημειωθεί εδώ η ιδιαιτερότητα ότι το pZMO3 είναι το μοναδικό από τα πλασμίδια του *Z. mobilis* που δεν υβριδίζει με κανένα από τα υπόλοιπα πλασμίδια οποιουδήποτε στελέχους του συγκεκριμένου βακτηρίου. Για την παρούσα εργασία ως πηγές του πλασμιδίου pZMO3 χρησιμοποιήθηκαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS3270 (**Σχήμα 38**) καθώς και η ζώνη **β** της **Εικόνας 4**.

Η πέψη του pDS3270 (Scordaki & Drainas, 1987) με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind*III, επέφερε το γραμμικό κλάσμα 2,7 kb, το οποίο και υποκλωνοποιήθηκε στη θέση *Hind*III του MCS του πλασμιδιακού φορέα pUC19 ακολουθώντας και εδώ τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τις υποκλωνοποιήσεις των pZMO1 και pZMO2. Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών έγινε σε τρυβλία L.A. τα οποία περιείχαν  $Ap$  100 mg·mL<sup>-1</sup>. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν ονομάστηκαν pUZMO3.11 και pUZMO3.12, ανάλογα με τον προσανατολισμό υποκλωνοποίησης του pZMO3, έχουν μέγεθος  $5,4 \pm 0,1$  kb και φέρουν άθικτο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 καθώς και τον γενετικό δείκτη αντοχής στην αμπικιλίνη (**Σχήμα 43**).

Απόδειξη των παραπάνω αποτελεί η **Εικόνα 9** όπου παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση περιοριστικής ανάλυσης τεσσάρων απομονωθέντων πλασμιδίων από ανασυνδυασμένες αποικίες κυττάρων *E. coli* DH5α,  $Ap^R$  παρουσία IPTG και X-Gal, αλλά και το φίλτρο μη ραδιενεργού υβριδισμού DNA-DNA με ανιχνευτικό μόριο το pZMO3 όπως αυτό απομονώθηκε από το pDS3270.





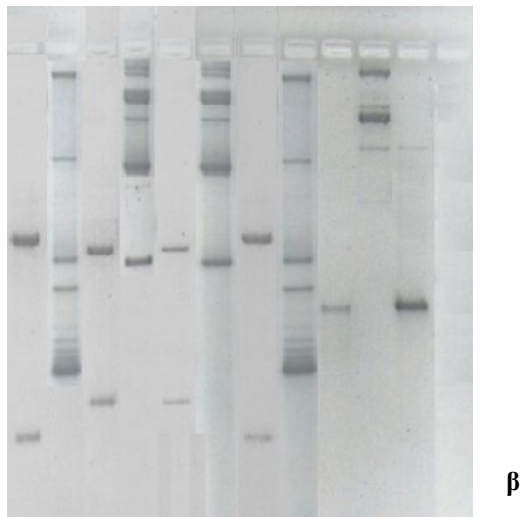
**Εικόνα 9.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO3.11 και pUZMO3.12

Διαδρομές:

1. pUZMO3.11 πέψη με *SphI* Αποικία 1
2. pUZMO3.11
3. pUZMO3.12 πέψη με *SphI* Αποικία 2
4. pUZMO3.12
5. pUZMO3.12 πέψη με *SphI* Αποικία 3
6. pUZMO3.12
7. pUZMO3.11 πέψη με *SphI* Αποικία 4
8. pUZMO3.11
9. Ζώνη β Εικόνας 4 πέψη με *SphI*
10. pDS3270
11. pDS3270 πέψη με *HindIII*
12. λDNA / *HindIII*

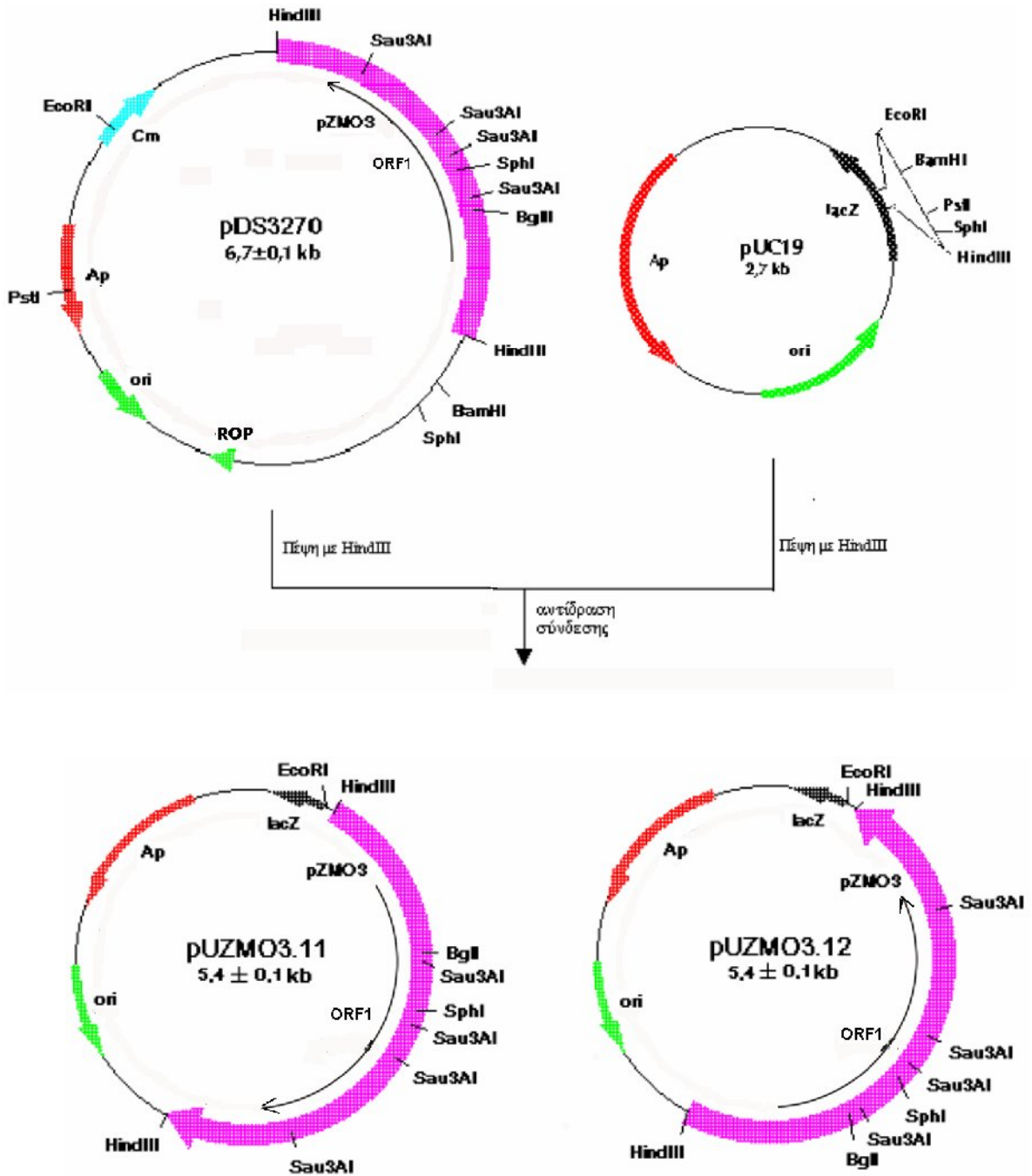
(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης.

(β) Εμφάνιση φίλτρου μετά από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO3 το οποίο εξήχθη από το pDS3270 ύστερα από πέψη με *HindIII* και σημάνθηκε με διγοξιγενίνη-11 dUTP.



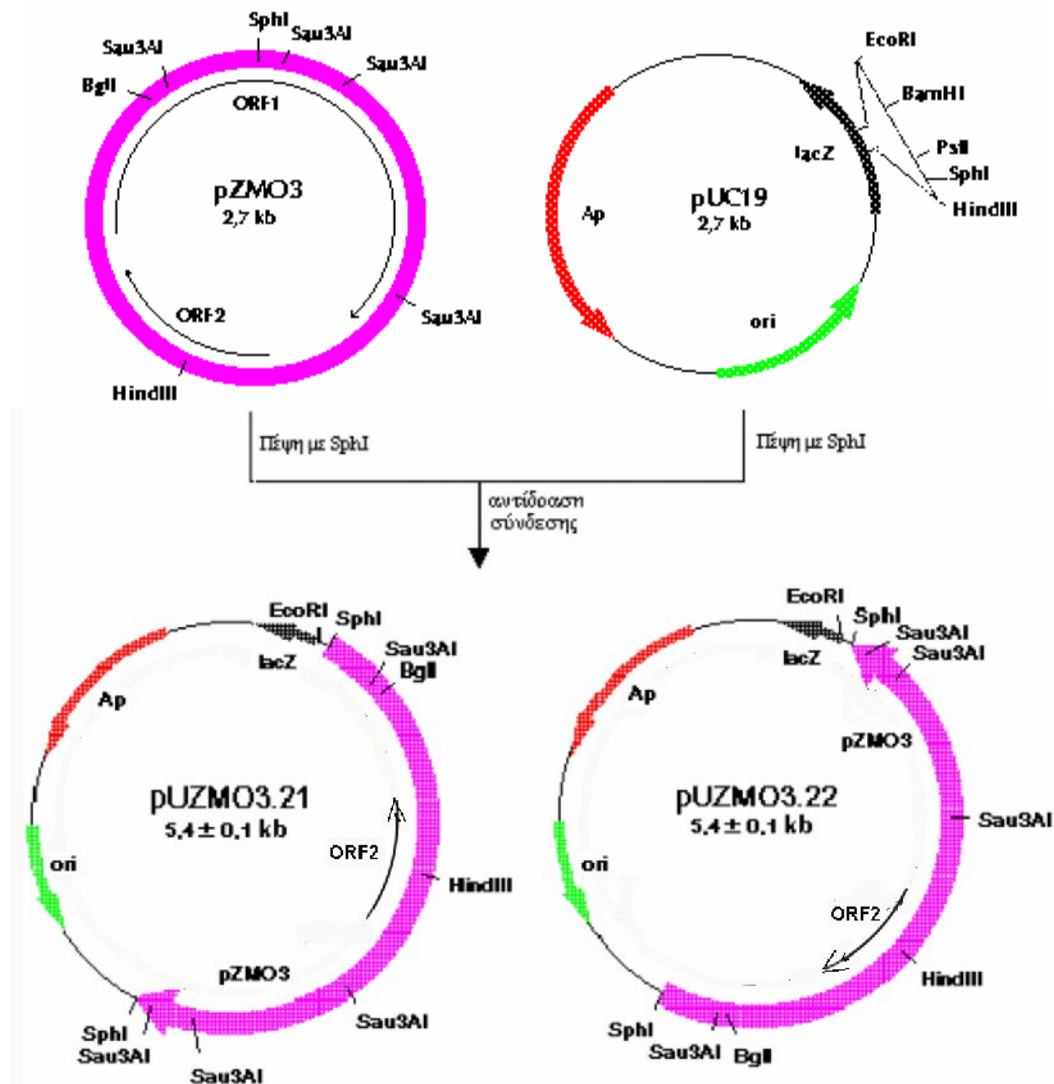
Πιο συγκεκριμένα, τα πλασμίδια στις διαδρομές 3, 4 και 5, 6 (pUZMO3.12) δείχνουν ότι περιέχουν το pZMO3 σαν ένθεμα με τον έναν προσανατολισμό, αφού πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SphI* έδωσε δύο ζώνες M.B. 3,85 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pUC19 και τμήμα του pZMO3) και 1,55 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO3 και μικρό τμήμα 6 bp του pUC19). Αντίθετα τα πλασμίδια στις διαδρομές 1, 2 και 7, 8 (pUZMO3.11) δείχνουν να περιέχουν το pZMO3 σαν ένθεμα με τον αντίθετο προσανατολισμό, αφού τα αποτελέσματα της ίδιας πέψης έδωσαν δύο ζώνες M.B. 4,25 kb (αντιστοιχεί στο ίδιο τμήμα του pUC19 και τμήμα του pZMO3) και 1,15 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO3 και μικρό τμήμα 6 bp του pUC19). Το pZMO3 μπορεί να εξαχθεί από τα pUZMO3.11 και pUZMO3.12 μετά από πέψη με *HindIII*.





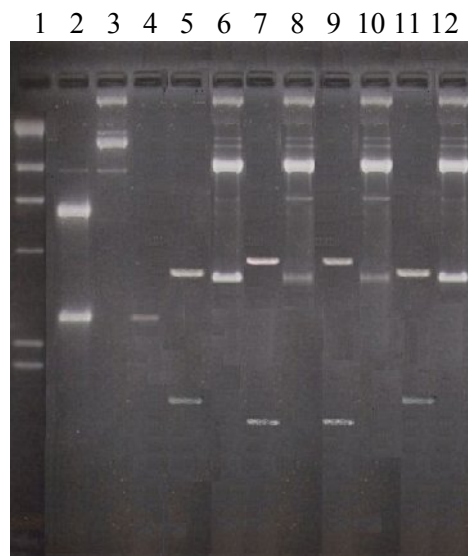
**Σ γ ή μ α 43.** Περιοριστικός χάρτης των pUZMO3.11 και pUZMO3.12. Οι περιοριστικές θέσεις του pZMO3 σημειώνονται με βάση την περιοριστική ανάλυση που έγινε από τους Scordaki & Drainas, 1987.

Όμως τα παραπάνω μόρια διέκοπταν τη λειτουργία του ORF2 που οι Misawa και Nakamura το 1989 είχαν βρει ότι ήταν υπεύθυνο για τη σταθερή αντιγραφή του πλασμιδίου. Έτσι ήταν πλέον επιτακτική η ανάγκη για προσπάθεια υποκλωνοποίησης του pZMO3 σε μία δεύτερη περιοριστική θέση ευρισκόμενη εκτός του ORF2. Για το σκοπό αυτό το DNA της ζώνης β του πλασμιδιακού εκχυλίσματος του στελέχους ATCC 10988 (Εικόνα 4), υπέστη πέψη με *Sph*I. Το γραμμικό μόριο που προέκυψε υποκλωνοποιήθηκε στην *Sph*I θέση του MCS του πλασμιδιακού φορέα pUC19 (Σχήμα 44).



**Σχήμα 44.** Περιοριστικός χάρτης των pUZMO3.21 και pUZMO3.22. Οι περιοριστικές θέσεις του pZMO3 σημειώνονται με βάση την περιοριστική ανάλυση που έγινε από τους Scordaki & Drinas, 1987.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν ονομάστηκαν pUZMO3.21 και pUZMO3.22, ανάλογα με τον προσανατολισμό υποκλωνοποίησης του pZMO3, έχουν μέγεθος  $5,4 \pm 0,1$  kb και φέρουν άθικτο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF2 καθώς και τον γενετικό δείκτη αντοχής στην αμπικιλίνη. Το pZMO3 μπορεί να εξαχθεί από τα pUZMO3.21 και pUZMO3.22 ύστερα από πέψη με *Sph*I.



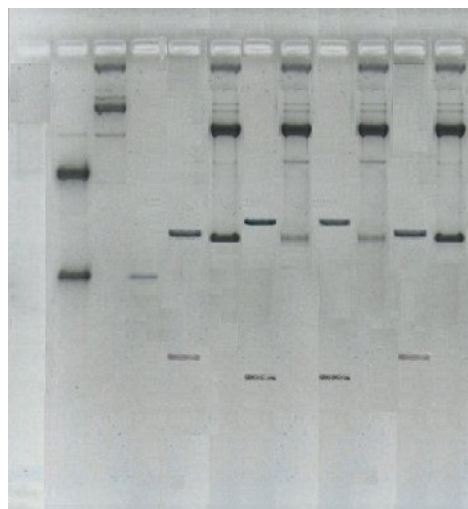
**Εικόνα 10.** Περιοριστική ανάλυση και υβριδιστική ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO3.21 και pUZMO3.22

Διαδρομές:

1. λDNA / *Hind*III
2. pDS3270 πέψη με *Hind*III
3. pDS3270
4. Ζώνη β Εικόνας 4 πέψη με *Sph*I
5. pUZMO3.21 πέψη με *Hind*III
6. pUZMO3.21 Αποικία 1
7. pUZMO3.22 πέψη με *Hind*III
8. pUZMO3.22 Αποικία 2
9. pUZMO3.22 πέψη με *Hind*III
10. pUZMO3.22 Αποικία 3
11. pUZMO3.21 πέψη με *Hind*III
12. pUZMO3.21 Αποικία 4

α

(α) Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης.



β

(β) Εμφάνιση φίλτρου μετά από μη ραδιενεργό υβριδισμό με ανιχνευτικό μόριο το pZMO3 το οποίο εξήχθη από το pDS3270 ύστερα από πέψη με *Hind*III και σημάνθηκε με διγοξιγενίνη-11 dUTP.

Στην **Εικόνα 10** παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση περιοριστικής ανάλυσης τεσσάρων απομονωθέντων πλασμιδίων από αντίστοιχες ανασυνδυασμένες αποικίες κυττάρων *E. coli* DH5α,  $Ap^R$  παρουσία IPTG και X-Gal, αλλά και το φίλτρο μη ραδιενεργού υβριδισμού DNA-DNA με ανιχνευτικό μόριο το pZMO3 όπως αυτό απομονώθηκε από το pDS3270.

Πιο συγκεκριμένα, τα πλασμίδια στις διαδρομές 5, 6 και 11, 12 (pUZMO3.21) δείχνουν ότι περιέχουν το pZMO3 σαν ένθεμα με τον έναν προσανατολισμό, αφού πέψη με *Hind*III έδωσε δύο ζώνες M.B. 3,9 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pUC19 και τμήμα του pZMO3) και 1,5 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO3 και μικρό τμήμα 6 bp του pUC19). Αντίθετα τα πλασμίδια στις διαδρομές 7, 8 και 9, 10 (pUZMO3.22) δείχνουν να περιέχουν το pZMO3 σαν ένθεμα με τον αντίθετο προσανατολισμό, αφού τα αποτελέσματα της ίδιας πέψης έδωσαν δύο ζώνες M.B. 4,2 kb (αντιστοιχεί στο ίδιο τμήμα του pUC19 και τμήμα του pZMO3) και 1,2 kb (αντιστοιχεί σε τμήμα του pZMO3 και μικρό τμήμα 6 bp του pUC19).

Όλα τα παραπάνω ανασυνδυασμένα πλασμίδια, κατόπιν της αντίδρασης σύνδεσης φορέα – ενθέματος (ligation), απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή με υπερφυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας CsCl, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα PCR και εύρεσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).

## **7. ΣΥΖΕΥΚΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ pZMO1, pZMO2 ΚΑΙ pZMO3**

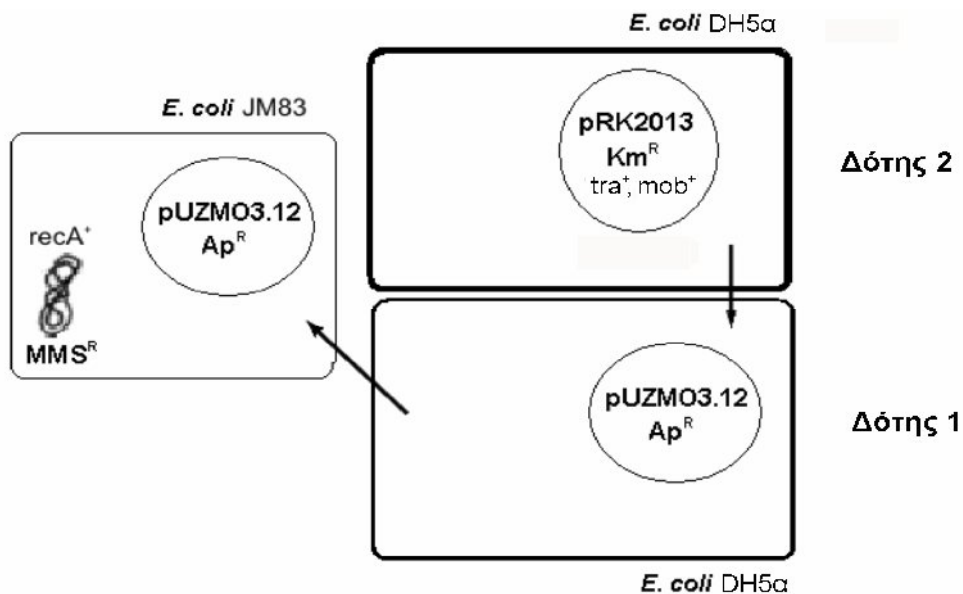
### **7.1 Μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με βακτηριακή σύζευξη μεταξύ στελεχών *E. coli***

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια του *Z. mobilis* ATCC 10988, που κατασκευάστηκαν και παρουσιάζονται σ' αυτή τη διατριβή, εξετάστηκαν για ενδοειδική ικανότητα κινητοποίησής τους, σε στελέχη *E. coli*. Η μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μέσω βακτηριακής σύζευξης, ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τρυβλία επιλογής που περιείχαν αμπικιλίνη (γενετικός δείκτης του pUC19) και MMS (για τον αποκλεισμό των δοτών).

Δύο ειδών βακτηριακές συζεύξεις έλαβαν χώρα:

Α) Με τη βοήθεια του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 (*tra*<sup>+</sup>, *mob*<sup>+</sup>), χρησιμοποιώντας σαν κύτταρα δέκτες τα *E. coli* JM83 (triparental conjugation).

Σαν κύτταρα δότες χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος DH5α του *E. coli* (*recA*<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>) που είχε μετασηματιστεί κάθε φορά με ένα από τα ανασυνδυασμένα pUZMO (pUC19::pZMO1,2,3) πλασμίδια (Δότης 1) αλλά και με το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013 (Δότης 2). Η πειραματική πορεία περιγράφεται στη σελ. 88-89. Τα αποτελέσματα των συζεύξεων αυτών που συγκεντρώνονται στον **Πίνακα 15**, δείχνουν ότι μόνο τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιείχαν το pZMO3 υποκλωνοποιημένο σε θέση *Hind*III (pUZMO3.11 και pUZMO3.12), παρουσίασαν ικανότητα κινητοποίησής τους από το pRK2013, με υψηλή συχνότητα μεταφοράς τους. Μάλιστα, και στις δύο περιπτώσεις, η συχνότητα μεταφοράς των πλασμιδίων ήταν περίπου ίδια μεταξύ τους και πάντως μεγαλύτερη απ' αυτή του pBR325.



**Σχήμα 45.** Σχηματική παράσταση επιβοηθούμενης συζευκτικής κινητοποίησης πλασμιδίου με τη βοήθεια του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 (triparental conjugation). Με πολύ έντονη γραμμή σημειώνεται το κύτταρο-δότης DH5α που περιέχει το συζευκτικό πλασμίδιο, με λιγότερο έντονη γραμμή το κύτταρο-δότης DH5α που περιέχει το κινητοποιήσιμο πλασμίδιο ενώ με λεπτή γραμμή σημειώνεται το κύτταρο-δέκτης JM83.

Το πλασμίδιο pRK2013 είναι παράγωγο του φυσικού πλασμιδίου RP4 του *E. coli* και διαθέτει τις λειτουργίες *tra* και *mob* (*mob*<sup>+</sup>, *tra*<sup>+</sup>), που του επιτρέπουν να δημιουργεί συνθήκες σύζευξης και να κινητοποιεί πλασμίδια *mob*<sup>+</sup> τα οποία έχουν τουλάχιστον περιοχή έναρξης της μεταφοράς *oriT* και συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο.

**Πίνακας 15.** Επιβοηθούμενη συζευκτική κινητοποίηση των pUZMO ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν αλληλουχίες των πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3 σε *E.coli* JM83.

Πλασμίδιο	Θέση σύνδεσης	Ένθεμα (DNA)	Μέγεθος (kb)	Συχνότητα (f)
pUC19	-	-	-	<10 <sup>-8</sup>
pBR325	-	-	-	4,2 x 10 <sup>-3</sup>
pUZMO1.1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sau</i> 3A1	pZMO1	1,4	<10 <sup>-8</sup>
pUZMO1.2	<i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI	pZMO1	1,6	<10 <sup>-8</sup>
pUZMO2.1	<i>Eco</i> RI	pZMO2	1,6	<10 <sup>-8</sup>
pUZMO2.2	<i>Eco</i> RI	pZMO2	1,6	<10 <sup>-8</sup>
pUZMO3.11	<i>Hind</i> III	pZMO3	2,7	1 x 10 <sup>-2</sup>
pUZMO3.12	<i>Hind</i> III	pZMO3	2,7	3,5 x 10 <sup>-2</sup>
pUZMO3.21	<i>Sph</i> I	pZMO3	2,7	<10 <sup>-8</sup>
pUZMO3.22	<i>Sph</i> I	pZMO3	2,7	<10 <sup>-8</sup>

f. Συχνότητα = μετασυζευγμένες αποικίες / κύτταρα δεκτών. Δότης 1: DH5α / pRK2013, Δότης 2: DH5α μετασηματισμένο με το αντίστοιχο pUZMO πλασμίδιο. Ο συνολικός αριθμός μετασυζευγμένων κυττάρων δέκτες που ελέγχθηκαν ήταν 4 x 10<sup>8</sup>.

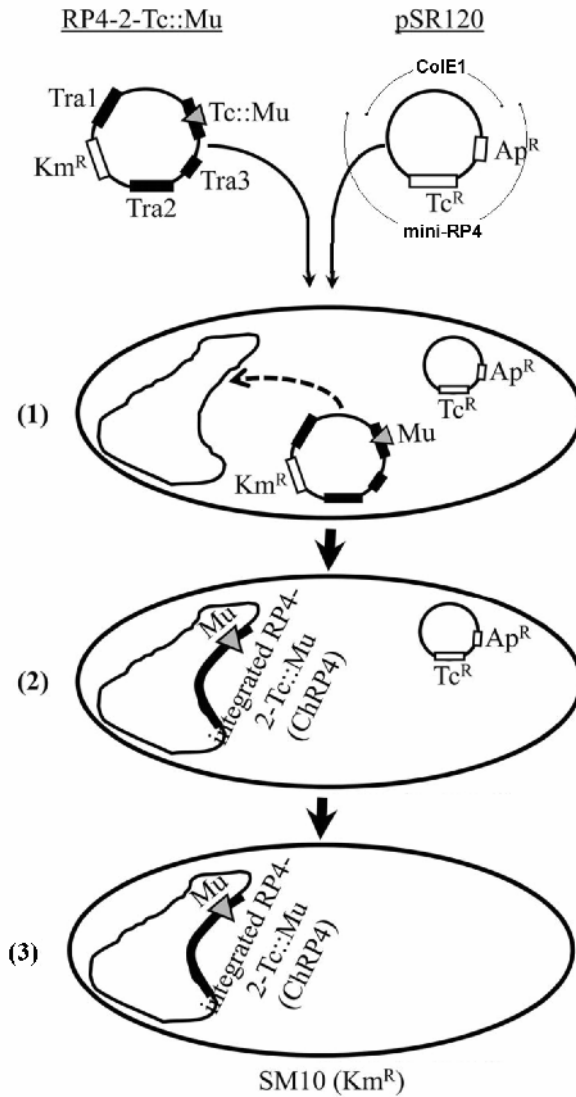
Αντίθετα, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια όπου το pZMO3 είχε υποκλωνοποιηθεί στη θέση *Sph*I (pUZMO3.21 και pUZMO3.22), δεν έδειξαν να είναι κινητοποιήσιμα. Όμοια, όλα τα υπόλοιπα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, οι υποκλώνοι δηλ. των pZMO1 και pZMO2, σε οποιαδήποτε θέση και κατεύθυνση υποκλωνοποίησης, καθώς και το πλασμίδιο pUC19 (που χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας), έδειξαν να μην είναι κινητοποιήσιμα, μιας και δεν εμφανίστηκαν μετασυζευγμένες αποικίες σε τρυβλία με αμπικιλίνη και MMS. Το πλασμίδιο pBR325 (Covarrubias *et al.*, 1981), που περιέχει περιοχή έναρξης της μεταφοράς *oriT* του πλασμιδίου RP4, ενώ δεν περιέχει πρωτεΐνη κινητοποίησης *Mob* (*mob*<sup>-</sup>), χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας στα πειράματα αυτά

και έδειξε ότι μπορούσε να γίνεται κινητοποιήσιμο από το pRK2013, κάτι που άλλωστε ήταν αναμενόμενο (Πίνακας 15).

Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι για να κινητοποιηθεί το pZMO3 δεν χρειάζεται την περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*) του pBR325, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του pDS3270 (Scordaki & Drainas, 1987), όπου το pZMO3 υπάρχει υποκλωνοποιημένο στο πλασμίδιο pBR325, και για τη μεταφορά του χρησιμοποιεί την *oriT* του pBR325. Το ίδιο το pZMO3, περιέχει τουλάχιστον μια περιοχή έναρξης της μεταφοράς του (*oriT*), που αλληλεπιδρά με κάποια πρωτεΐνη κινητοποίησης (του pRK2013 ή του ίδιου του pZMO3) και η οποία δρα *in trans*. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του pBR325, η *oriT* του οποίου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη κινητοποίησης του pRK2013 και το πλασμίδιο καθίσταται κινητοποιήσιμο.

Τα ίδια αποτελέσματα δηλώνουν επίσης ότι για τη μεταφορά του pZMO3, εκτός από την ύπαρξη της περιοχής *oriT*, απαιτείται πιθανά και το πρωτεϊνικό μόριο του ORF1. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pUZMO3.21 και pUZMO3.22, ενώ περιέχουν την περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*), εν τούτοις δεν καταφέρνουν να μεταφερθούν γιατί η θέση υποκλωνοποίησής τους στον φορέα pUC19 «κόβει» το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 με συνέπεια να μη δημιουργείται η πρωτεΐνη, η οποία είναι αυτή που αλληλεπιδρά με την *oriT* και κινητοποιεί το πλασμίδιο pZMO3.

B) Με τη βοήθεια του *Hfr* στελέχους *E. coli* SM10 (*tra*<sup>+</sup>, *mob*<sup>-</sup>) χρησιμοποιώντας σαν κύτταρα δέκτες τα *E. coli* RR1 (biparental conjugation).



**Σ γ ή μ α 46.** Κατασκευή του στελέχους κινητοποίησης *E. coli* SM10 (Simon *et al.*, 1983). Το πλασμίδιο RP4-2-Tc::Mu είναι ένα αυτό-κινητοποιήσιμο πλασμίδιο ( $Tra^+$ ) αφού μεταφέρει την συζευκτική περιοχή του RP4 (Tra1, Tra2, και Tra3), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη ( $Km^R$ ) και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη το οποίο όμως είναι απενεργοποιημένο, αφού διακόπτεται από την παρεμβολή του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου Mu ( $Tc::Mu$ ). Το πλασμίδιο pRS120 είναι προϊόν σύντηξης των ρεπλικόνιων δύο πλασμιδίων, του ColE1 και του RP4 το οποίο φέρει επίσης γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη ( $Ap^R$ ) και στην τετρακυκλίνη ( $Tc^R$ ). Τα δύο αυτά μη συμβατά πλασμίδια-παράγωγα του RP4 εισάγονται με μετασχηματισμό σε ένα *recA*<sup>-</sup> στέλεχος *E. coli* και η επιλογή των μετασχηματισμένων γίνεται για καναμυκίνη και τετρακυκλίνη μαζί (Βήμα 1). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του RP4-2-Tc::Mu σε τυχαία θέση στο χρωμόσωμα του *E. coli* με παράλληλη ύπαρξη του pSR120 (Βήμα 2). Το πλασμίδιο pSR120 εκδιώκεται ύστερα από επίδραση με πορτοκαλί της ακριδίνης (Βήμα 3). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα που προκύπτουν δημιουργούν το *Hfr* στέλεχος SM10 ( $Tra^+$ ,  $Mob^-$ ).

Μια άλλη προσέγγιση του προηγούμενου αποτελέσματος ήταν το κατά πόσο ήταν εφικτή η μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO με τη βοήθεια ενός στελέχους, το οποίο όμως δεν “προμηθεύει” τις *mob* λειτουργίες *in trans* (όπως γίνεται με



την περίπτωση του pRK2013), δεν κωδικοποιεί δηλ. για πρωτεΐνη Mob. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένα *Hfr mob<sup>-</sup>* στέλεχος, το *E. coli* SM10, στο γονιδίωμα του οποίου έχουν ενσωματωθεί οι *tra* λειτουργίες του πλασμιδίου RP4 (Σχήμα 46).

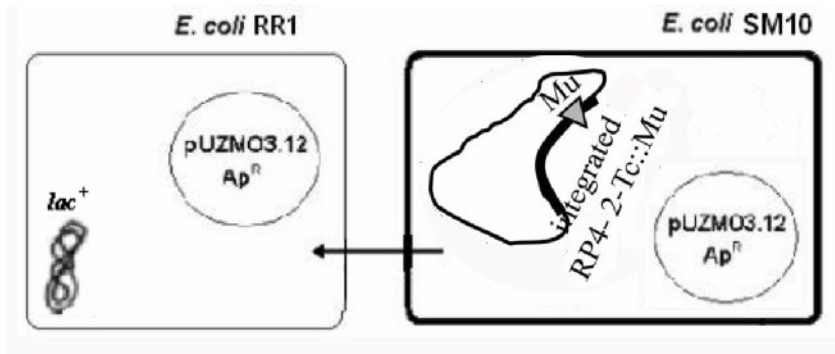
Το στέλεχος αυτό μετασηματίστηκε με όλα τα παραπάνω pUZMO ανασυνδυασμένα πλασμίδια σύμφωνα με το πρωτόκολλο των σελ. 86-87. Τα μετασηματισμένα πλέον αυτά κύτταρα SM10 χρησιμοποιήθηκαν σαν δότες σε πειράματα σύζευξης (Σχήμα 47), τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν για μία ακόμη φορά, υψηλή συχνότητα μεταφοράς των πλασμιδίων pUZMO3.11 και pUZMO3.12 και μόνο αυτών (Πίνακας 16).

**Πίνακας 16.** Συζευκτική αυτό-κινητοποίηση των pUZMO ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν αλληλουχίες πλασμιδίων pZMO1, pZMO2 και pZMO3 σε *E. coli* RR1.

Πλασμίδιο	Περιοριστική θέση ένθεσης	Συχνότητα ( <i>f</i> )
pUC19	-	$<10^{-8}$
pBR325	-	$<10^{-8}$
pUZMO1.1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sau</i> 3A1	$<10^{-8}$
pUZMO1.2	<i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI	$<10^{-8}$
pUZMO2.1	<i>Eco</i> RI	$<10^{-8}$
pUZMO2.2	<i>Eco</i> RI	$<10^{-8}$
PUZMO3.11	<i>Hind</i> III	$8,5 \times 10^{-3}$
PUZMO3.12	<i>Hind</i> III	$3,5 \times 10^{-2}$
pUZMO3.21	<i>Sph</i> I	$<10^{-8}$
pUZMO3.22	<i>Sph</i> I	$<10^{-8}$

*f*, Συχνότητα = μετασυζευγμένα κύτταρα / κύτταρα δέκτες. Δότης 1: SM10 μετασηματισμένα με το αντίστοιχο πλασμίδιο. Τα κύτταρα δέκτες επιβεβαιώθηκαν σαν αποικίες μπλε χρώματος σε τρυβλία Luria agar που περιέχουν IPTG και X-gal. Ο συνολικός αριθμός μετασυζευγμένων κυττάρων δέκτες που ελέγχθηκαν ήταν  $4 \times 10^8$ .

Αντίθετα το πλασμίδιο pBR325 (που όπως αναφέρθηκε περιέχει *oriT* αλλά δεν κωδικοποιεί για Mob πρωτεΐνη) καθώς και το pUC19 (το οποίο δεν περιέχει *oriT* ούτε βέβαια γονίδια *mob*) δεν εμφάνισαν καμία κινητικότητα.



**Σχήμα 47.** Σχηματική παράσταση συζευκτικής κινητοποίησης πλασμιδίου με τη βοήθεια του *Hfr* στελέχους SM10 (biparental conjugation). Με πολύ έντονη γραμμή σημειώνεται το κύτταρο-δότης SM10 (*tra*<sup>+</sup>, *mob*<sup>-</sup>) ενώ με λεπτή γραμμή το κύτταρο-δέκτης RR1.

Ο έλεγχος της δομής του πλασμιδιακού DNA των μετασυζευγμένων αποικιών έγινε με απομόνωση αυτού και εκ νέου «μεταφορά» του σε *E. coli* DH5α με μετασχηματισμό (back transformation). Ακολούθησε νέα απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των μετασχηματισμένων *E. coli* DH5α και πέψη αυτού με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα .

## 7.2 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO3

Τα αποτελέσματα των πέψεων του φυσικού πλασμιδίου pZMO3 που απομονώθηκε τόσο απ' ευθείας από το *Z. mobilis* όσο και από τα ανασυνδυασμένα pUZMO3.11 και pUZMO3.12, έδειξαν ότι το pZMO3 είναι ταυτόσημο με το πλασμίδιο pZM2, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του οποίου έχει δημοσιευθεί (41% G+C, Misawa & Nakamura, 1989). Περισσότερη υποστήριξη της παραπάνω απόδειξης ήρθε όταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUZMO3.11 (**Σχήμα 43**) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της αλληλουχίας βάσεων μιας περιοχής του pZMO3, με τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας, όπως περιγράφεται στη σελ. 126 της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Τα μόρια υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν τα συνηθισμένα M13/pUC Forward και M13/pUC Reverse.

**M13/pUC (-20) Forward Sequencing primer**

5' -GTAAAACGACGGCCAGT- 3'

**M13/pUC (-48) Reverse Sequencing Primer**

5' -AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA- 3'

PZM03f	5' - AAGCTTTCAGCGTTCTGGTTTGGATACTTCAAGACAAAGGCATCAGCAA	50
pZM2	3' -AAGCTTTCAGCGTTCTGGTTTGGATACTTCAAGACAAAGGCATCAGCAA *****	
PZM03f	GACCTCGTCCCTTTAGACAAATTCGTTTTAGAGGACTTTCTTAACGCACA	100
pZM2	GACCTCGTCCCTTTAGACAAATTCGTTTTAGAGGACTTTCTTAACGCACA *****	
PZM03f	AGAAAAAAAACTGGCACTATCTCAAGCTACCTTTGCAAGAGGTCTAGCCG	150
pZM2	AGAAAAAAAACTGGCACTATCTCAAGCTACCTTTGCAAGAGGTCTAGCCG *****	
PZM03f	AATTAGAAAAAGCTAAAATCATTGCAAAGCATGTTGCGCCAAGGATGGTAT	200
pZM2	AATTAGAAAAAGCTAAAATCATTGCAAAGCATGTTGCGCCAAGGATGGTAT *****	
PZM03f	TTTATTAATCCTAATTTTCGTTTTCAATGGCGACCGCGTAG-3'	240
pZM2	TTTATTAATCCTAATTTTCGTTTTCAATGGCGACCGCGTAG-5' *****	
PZM03r	5' - ACGAGAATCCTTTCATCGAAGGTATGGTTGTGCCAGTTAAAAGTCAGAGG	50
pZM2	3' - ACGAGAATCCTTTCATCGAAGGTATGGTTGTGCCAGTTAAAAGTCAGAGG *****	
PZM03r	G TTCAGTTATCTCGATTAGGACGAGATGATAACATTCTGGTCAATCAAGC	100
pZM2	G TTCAGTTATCTCGATTAGGACGAGATGATAACATTCTGGTCAATCAAGC *****	
PZM03r	CACTGGTGAGATGCAAGGCACTCATGTGACGACTTACAGACGTGTTGATA	150
pZM2	CACTGGTGAGATGCAAGGCACTCATGTGACGACTTACAGACGTGTTGATA *****	
PZM03r	GTGAAGAATTTGTAAAATTATTTAGCACCAATATCGCGCTAACTTTTGAA	200
pZM2	GTGAAGAATTTGTAAAATTATTTAGCACCAATATCGCGCTAACTTTTGAA *****	
PZM03r	CTAGGAGCCGCTGGAATAA-3'	219
pZM2	CTAGGAGCCGCTGGAATAA-5' *****	

Μετά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας 460 νουκλεοτιδικών βάσεων του pZMO3, ξεκινώντας από την περιοριστική θέση *Hind*III και συγκρίνοντάς την με τη δημοσιευμένη αλληλουχία του πλασμιδίου pZM2 των Misawa και Nakamura (1989), φαίνεται ότι το pZMO3 ταυτίζεται 100% με το πλασμίδιο pZM2. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδήγησε στη συνέχεια στην υπόθεση ότι στο πλασμίδιο pZMO3, όπως συμβαίνει και στο pZM2, υπάρχουν δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs), τα ORF1 και ORF2.

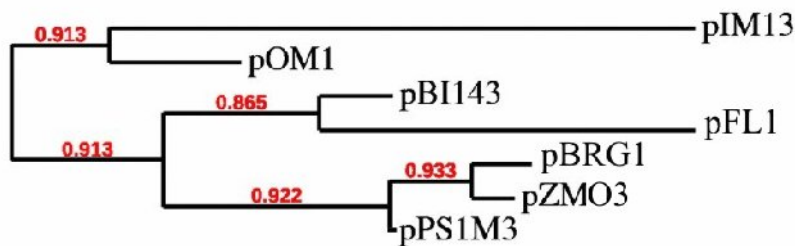
### 7.2.1 Η περιοχή υπεύθυνη για την αντιγραφή (Rep region)

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF2 του pZMO3 (39% σε G+C) αποτελεί αλληλουχία που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 184 αμινοξέων, M.B. 20.962 Da, με pI=9,74 και είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του πλασμιδίου (πρόκειται δηλ. για μία Rep πρωτεΐνη; Misawa & Nakamura, 1989). Μία επιπλέον απόδειξη ότι το ORF2 πρέπει να παίζει ρόλο στην αντιγραφή του πλασμιδίου, αποτελούν και προηγούμενα πειράματα από τους Scordaki & Drainas, 1990, σύμφωνα με τα οποία, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS3270 (**Σχήμα 38**), στο οποίο και εκεί έχει υποκλωνοποιηθεί ολόκληρο το μόριο του pZMO3 στη θέση *Hind*III, έχανε την ικανότητα σταθερής αντιγραφής του στα θυγατρικά κύτταρα *Z. mobilis* 10988 σχετικά γρήγορα (ύστερα από 72 κυτταρικές διαιρέσεις) κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες.

**Πίνακας 17.** Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF2 του πλασμιδίου pZMO3 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul *et al.*, 1990).

Σχετική πρωτεΐνη [Μικροοργανισμός]	Ταυτότητα (Identity)	Ομοιότητα (Similarity)	Accession No.
Πρωτεΐνη αντιγραφής Rep του pBRG1 [ <i>Bartonella grahamii</i> ]	63%	87%	NC006374
Πρωτεΐνη αντιγραφής Rep του pPS1M3 [ <i>Pseudoalteromonas</i> sp.]	58%	67%	AB022096
Πρωτεΐνη Rep του pBI141 [ <i>Bacteroides fragilis</i> ]	32%	60%	U30316
Πρωτεΐνη Rep του pFL1 [ <i>Flavobacterium</i> sp.]	29%	61%	NC002132

Τέλος στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF2 με βάσεις δεδομένων έδειξε να παρουσιάζει αξιόλογη ομοιότητα με άλλες χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες αντιγραφής όπως αυτές που φαίνονται στον **Πίνακα 17**. Όλα τα παραπάνω πλασμίδια είναι κρυπτικά πλασμίδια Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, εμφανίζουν δε ομοιότητα με πλασμίδια που αντιγράφονται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου και που ανήκουν στην ομάδα pSN2 (Khan *et al.*, 1997).



**Σχήμα 48.** Φυλογενετική σύγκριση, με βάση την πρωτεΐνη Rep, πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου. Είναι ξεκάθαρο ότι τα πλασμίδια pOM1 και pIM13 ανήκουν σε άλλη οικογένεια (οικογένεια pT181-τύπου) απ' αυτή που ανήκουν τα πλασμίδια pBI143, pFL1, pBRG1, pZMO3 και pPS1M3 (οικογένεια pSN2-τύπου). Φαίνεται επίσης ότι το pZMO3 δημιουργεί μια διακριτή υποομάδα με το pBRG1. Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA έκδοση 4 (Tamura *et al.*, 2007),

Το ORF2, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, δεν φαίνεται να έχει καμία επίδραση στην κινητικότητα του πλασμιδίου, μιας και στα ανασυνδυασμένα κινητικά πλασμίδια pUZMO3.11 και pUZMO3.12 (**Σχήμα 43**), η θέση *HindIII*, στην οποία έχει υποκλωνοποιηθεί το pZMO3, διακόπτει το ORF2, απενεργοποιώντας έτσι την οποιαδήποτε λειτουργία του.

## 7.2.2 Η περιοχή υπεύθυνη για την κινητικότητα (Mob region)

Όσον αφορά το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 (43% σε G+C), το κύριο χαρακτηριστικό του είναι στην ύπαρξη της αντίστροφης επανάληψης (IR-A και IR-B) που εντοπίζεται στα δύο άκρα του γονιδίου (**Σχήμα 52**). Το ORF1 αποτελεί αλληλουχία που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 584 αμινοξέων M.B. 65.793 Da, με pI=9,66. Αυτό μένει άθικτο στα κινητικά πλασμίδια pUZMO3.11 και pUZMO3.12, ενώ διακόπτεται στα μη κινητικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια pUZMO3.21 και pUZMO3.22 (**Σχήμα 44**). Πιθανά, λοιπόν, το προϊόν της αλληλουχίας του ORF1 να είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο υπεύθυνο για την κινητικότητα του πλασμιδίου (Mob πρωτεΐνη).

Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF1, με άλλες αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων, έδειξε να υπάρχει ομοιότητα με χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες κινητοποίησης από πλασμίδια Gram<sup>-</sup> βακτηρίων που ανήκουν στον κλάδο B της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου, σε ποσοστό που ξεπερνά το 50% (**Πίνακας 18**). Πιο αναλυτικά έδειξε ομοιότητα με Mob πρωτεΐνες των πλασμιδίων pWKS1 του *Paracoccus pantotrophous* (Bartosik *et al.*, 2002), pTS1 του *Treponema denticola* (Chauhan & Kuramitsu, 2004), pBBR1 του *Bordetella bronchiseptica* (Antoine & Loch, 1992) και pBRG1 του *Bartonella grahamii* (Seubert *et al.*, 2003).

**Πίνακας 18.** Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του ORF1 του πλασμιδίου pZMO3 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul *et al.*, 1990).

Σχετική πρωτεΐνη (Μικροοργανισμός)	Ταυτότητα (Identity)	Ομοιότητα (Similarity)	Accession No. (Nucleotide)
<u>Κλάδος B</u> οικογένειας pMV158-τύπου			
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pBRG1 ( <i>Bartonella grahamii</i> )	36%	56%	NC006374
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pTS1 ( <i>Treponema denticola</i> )	35%	49%	AF112856
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pWKS1 ( <i>Paracoccus pantotrophous</i> )	34%	52%	AF482428
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pBBR1 ( <i>Bordetella bronchiseptica</i> )	32%	51%	X66730
<u>Κλάδος A</u> οικογένειας pMV158-τύπου			
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pT181 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	27%	47%	NC_001393
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pMV158 ( <i>Streptococcus agalactiae</i> )	26%	46%	X15669
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pUB110 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	28%	46%	NC_001384
Πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob του pTB19 ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> )	28%	46%	M63891

Έδειξε όμως να υπάρχει και αντίστοιχη ομοιότητα σε ποσοστό που ξεπερνά το 45% με χαρακτηρισμένες πλασμιδιακές πρωτεΐνες κινητοποίησης Gram<sup>+</sup> βακτηρίων, που ανήκουν δηλαδή στον κλάδο A της οικογένειας πλασμιδίων pMV158-τύπου. Τέτοιες είναι

οι Mob πρωτεΐνες του πλασμιδίου pMV158 του γένους *Streptococcus* (Oskam *et al.*, 1991) που αποτελεί και το αντιπροσωπευτικό μέλος του κλάδου αυτού, του πλασμιδίου pTB19 του γένους *Bacillus* (Priebe & Lacks, 1989) καθώς και των πλασμιδίων pUB110 και pT181 του γένους *Staphylococcus* (Khan & Novick, 1983; McKenzie *et al.*, 1986).

PMV158MOB .EQTRTFPE TAKNYFAENYGESNIAYA SV [HLD E S T P H M H] MGVVPEF  
 PTB19MOB GEQKR . FFEESYKLFSE RY G K Q N I A Y A T V H N D E Q T P H M H L G V V P M  
 PZMO3MOB .EKLEHWKTI TQ Q W A E Q T E G E N N L V S L Q L [H A D E T T P H L T] G F M V P R

**3H motif**

PMV158MOB E . . N G K L S S K A M F D . R E E L K H T Q E D L F R Y M S D H G F F E L E R G K L N S E  
 PTB19MOB R . . D G K L Q G K N V F N . R Q E L L W L Q D K F P E H M K K Q G F E L K R G E R G S D  
 PZMO3MOB D P D T G R L N A S R W F D G R K A L S A L Q T D Y A A S M E P L G . . L A R G V K G S K

PMV158MOB A K H K T V A E F K R  
 PTB19MOB R K H I E T A K F . .  
 PZMO3MOB A T H Q R V Q R H Y G

**A**

PTS1MOB C D S W A K K T F G A K N I F L I T H [ H Y D E L T P H S S ] I L L V P T D P . K G  
 PZMO3MOB T Q Q W A E Q T F G E N N I V S L Q L [ H A D E T T P H L T ] G F M V P R D P D T G  
 PWKS1MOB A L N W L K T R H G A E N I L S A V I [ H R D E T T P H M T ] V M T I P L D Q . Q G  
 PBBR1MOB A H K W L A D K Y G A D R I V T A S I [ H R D E T S P H M T ] A F V V P L T Q . D G

**3H motif**

D135  
E126

PTS1MOB K E N C R Y F L G G G A K L R A L Q D S F F E Q V G K K F G L E R G V K G S K A  
 PZMO3MOB R L N A S R W F D G R K A L S A L Q T D Y A A S M . E P L G L A R G V K G S K A  
 PWKS1MOB K L N A R A L V G S R Q Q L S A M Q T D F A K V V G Q A H G L Q R G L E G S R A  
 PBBR1MOB R L S A K E F I G N K A Q M T R D Q T T F A A A V A D . L G L Q R G I E G S K A

PTS1MOB R H Q T V K  
 PZMO3MOB T H Q R V Q  
 PWKS1MOB T H E R V K  
 PBBR1MOB R H T R I Q

**B**

**Σχήμα 49.** Α) Στοίχιση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας (97-192 αμινοξύ) του πολυπεπτιδίου των 66 kD του ORF1 του pZMO3 (PZMO3MOB), με αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων κινητοποίησης από τα πλασμίδια pMV158 (PMV158MOB) και pTB19 (PTB19MOB) του κλάδου Α της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου.

**Β)** Στοίχιση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας (104-188 αμινοξύ) του πολυπεπτιδίου των 66 kD που κωδικοποιείται από το ORF1 του pZMO3 (PZMO3MOB), με αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων κινητοποίησης από τα πλασμίδια pWKS1 (PWKS1MOB), pTS1 (PTS1MOB) και pBBR1 (PBBR1MOB) του κλάδου Β της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου.

Σε κόκκινο πλαίσιο είναι οι περιοχές πλήρους συντηρητικότητας ενώ σε κίτρινο πλαίσιο βρίσκονται οι περιοχές υψηλής συντηρητικότητας αμινοξέων.

Τα ποσοστά ομοιότητας έδειξαν να είναι υψηλότερα στο N-τελικό άκρο των πρωτεϊνών. Έτσι εστιάζοντας στον παραλληλισμό της περιοχής αμινοξέων μεταξύ 104 και 188 του ORF1 με τις αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών κινητοποίησης των πλασμιδίων pBBR1, pWKS1 και pTS1, είδαμε να παρουσιάζει ομοιότητα πάνω από 60% με αμινοξέα ισχυρά συντηρημένων περιοχών ενώ παραλληλισμός της περιοχής αμινοξέων 97 έως 192 με τις αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών κινητοποίησης των πλασμιδίων pMV158 και pTB19, έδειξε ποσοστό ομοιότητας πάνω από 50 % (**Σχήμα 49**).

Από το παραπάνω σχήμα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ORF1 του pZMO3 περιέχει τη συντηρημένη περιοχή HxDExxPHxh (3H motif) και η οποία υπάρχει και στους δύο κλάδους (A και B) της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου (Francia *et al.*, 2004) και όπου στον κλάδο B η τρίτη ιστιδίνη (His, H) αντικαθίσταται από σερίνη (Ser, S) ή θρεονίνη (Thr, T), όπως στην περίπτωση του pTS1 ή του pZMO3 αντίστοιχα. Βέβαια μέσα σ' αυτή τη συντηρημένη περιοχή και στις θέσεις 125 και 126 υπάρχουν τα σημαντικά αμινοξέα ασπαραγινικό (Asp, D125) και γλουταμινικό (Glu, E126) οξύ για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι στο pBBR1 παίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στην δραστηριότητα (activity) της Mob πρωτεΐνης του, εφόσον αντικατάσταση των συγκεκριμένων αμινοξέων με σημειακή μεταλλαγή είχε σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της εν λόγω πρωτεΐνης (Szpirer *et al.*, 2001).

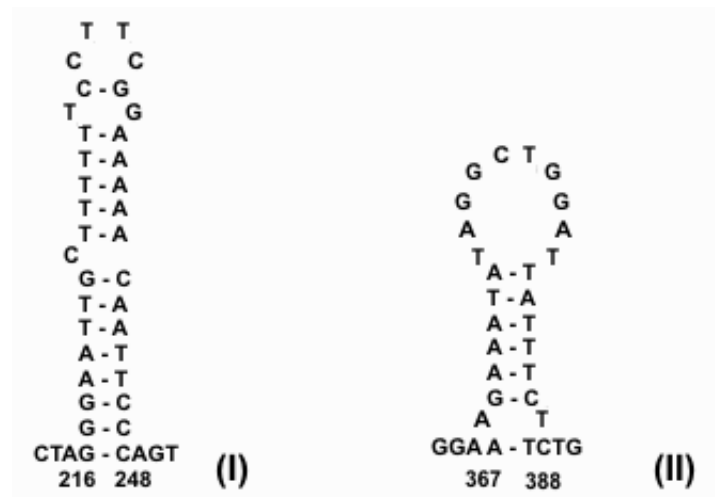
Σε ότι αφορά στην ελάχιστη περιοχή που είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει η κινητοποίηση του πλασμιδίου, την περιοχή δηλ. όπου προσδέεται η πρωτεΐνη χαλάρωσης και προκαλεί την εγκοπή (*nic*) της αλυσίδας (περιοχή *oriT*), βρέθηκε ότι στα πλασμίδια της οικογένειας pMV158-τύπου βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου *mob* και παρουσιάζει μια οργάνωση που αποτελείται από αντίστροφες επαναλήψεις σχηματίζοντας δομή μίσχου-θηλιάς. Το σημείο εγκοπής είναι γνωστό ότι βρίσκεται μεταξύ των βάσεων που αποτελούν τη θηλιά. Η περιοχή αυτή στο pZMO3 βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 111 και 519 (Afendra *et al.*, 1999, βλ. Συζήτηση) και όπως μπορεί να διαπιστώσει κανείς από την πρωτοδιάταξη του pZMO3, περιέχει δύο περιοχές αντίστροφων επαναλήψεων (μεταξύ **315 και 348** ή μεταξύ **367 και 388**, **Σχήμα 50**).



**A**

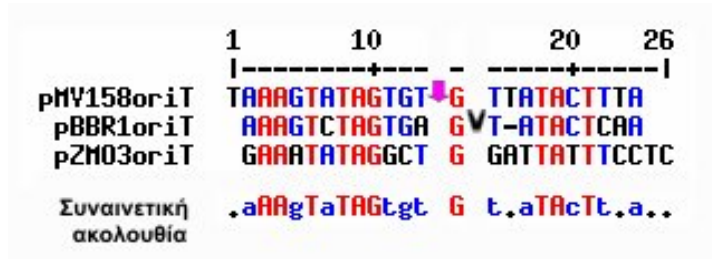
(ORF2 τέλος) \*\*\*  
 GACGAATCAGAATAAATTCAGTACTCACTAC**GGAAATTGCTTTTTTCCTTCGGAAAAACAA**-344  
 ----- I -----  
 ----- II -----  
**TTCCAGTTCGCTACTAGGGAAAGAAATATAGGCTGGATTATTTCCCTCTGGTCTTTTCTCA**-404  
 -----  
 (ORF1 αρχή)  
 AATTAAAGCAGTTAAAACATGCCGAACATGCAATCTTTAGGTTTGAAAAACATAAAACA-464

**B**



**Σχήμα 50.** (A) Μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO3 (μεταξύ του C-τελικού άκρου του ORF2 και του N-τελικού άκρου του ORF1) σύμφωνα με τους Misawa & Nakamura, 1989. Οι δύο πιθανές περιοχές *oriT* φαίνονται με έντονα γράμματα. (B) Οι δομές μίσχου – θηλιάς των δύο πιθανών περιοχών *oriT* (I και II) στο πλασμίδιο pZMO3.

Τέλος από τις δύο πιθανές *oriT* του pZMO3 μόνο η (II) έδειξε νουκλεοτιδική ομοιότητα με τις αντίστοιχες περιοχές των pMV158 και pBBR1 (Σχήμα 51). Θυμίζουμε ότι τα δύο αυτά πλασμίδια είναι τα μοναδικά πλασμίδια της οικογένειας που έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά. Η στοίχιση των *oriT* φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σ γ ή μ α 51.** Στοιχισή της πιθανής περιοχής *oriT* (II) του pZMO3 με τις αντίστοιχες περιοχές των πλασμιδίων pMV158 και pBBR1. Με κόκκινο σημειώνονται οι βάσεις πλήρους συντηρητικότητας. Με **↓** και **∇** σημειώνονται τα σημεία εγκόπης των πλασμιδίων pMV158 και pBBR1 αντίστοιχα από τις πρωτεΐνες χαλάρωσης.

### 7.3 Άλλες χαρακτηριστικές περιοχές στο μόριο του pZMO3

Παρακάτω παρατίθεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του φυσικού πλασμιδίου pZMO3 (ή pZM2) όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους Misawa & Nakamura, 1989 και έχει κατατεθεί στην τράπεζα δεδομένων NCBI (αριθμός πρόσβασης X14438) καθώς και η αμινοξική αλληλουχία των δύο ORFs. Επίσης σημειώνονται και οι αλληλουχίες των αντίστροφων επαναλήψεων (IR) οι οποίες μεταξύ των νουκλεοτιδίων 300 και 420 αποτελούν πιθανές περιοχές *oriT*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η δεύτερη πιθανή θέση *oriT* επικαλύπτει τη θέση -10 του υποκινητή του ORF1 (γονιδίου *mob*), γεγονός συνηθισμένο στα πλασμίδια της οικογένειας pMV158-τύπου.

```

AAGCTTTCAGCGTTCTGGTTTGGATACTTCAAGACAAAGGCATCAGCAAAGACCTCGTCC      60
K A F S V L V W I L Q D K G I S K D L V

CTTTAGACAAATTCGTTTTAGAGGACTTTCTTAACGCACAAGAAAAAAACTGGCACTAT      120
P L D K F V L E D F L N A Q E K K L A L

CTCAAGCTACCTTTGCAAGAGGTCTAGCCGAATTAGAAAAAGCTAAAATCATTGCAAAGC      180
S Q A T F A R G L A E L E K A K I I A K

ATGTTTCGCCAAGGATGGTATTTTATTAATCCTAATTTTCGTTTTCAATGGCGACCGCGTAG      240
H V R Q G W Y F I N P N F V F N G D R V

CTTTCACAACAGTTATAGAACGCAAAAAGACGCTCCAAAAGCAAGACGAATCAGAATAAA      300
A F T T V I E R K K T L Q K Q D E S E *

TTCAGTACTCACTACGGAATTGCTTTTTTTCCTTCGGAAAAACAATTCCAGTTCGCTACTA      360
                                     -35
                                     <----->
                                     IR1
    
```

-10  
 GGGAAAGAAATATAGGCTGGATTATTTCTCTGGTCTTTTCTCAAATTAAGCAGTTAAA 420  
 ← IR-B IR2 → S.D.

ACATGCCGAACATGCAATCTTTAGGTTTGAAAAACATAAAACAGTTGGCACGATTAAAG 480  
 M P N Y A I F R F E K H K T V G T I K

CCGCGAGCCTGCATATGACGCGAGGCCGCGAAACACAAAACGCTGACCCAGATAGAAAAG 540  
 A A S L H M T R G R E T Q N A D P D R K

AACTAAACGAAATACTCAAAGGCTCTACTGACCCATCAGCAGATGTTAAATCTATGCTGA 600  
 E L N E I L K G S T D P S A D V K S M L

ATAAAATTCAGAAAGAAACGGGAAAGCCTCTTAGAAAAACGGTGTGCAGGCCATAGAAC 660  
 N K I Q K E T G K P L R K N G V Q A I E

TGTTCTTTGGTATGTCTCCAGAATGGTCAAAACAGGCCACTCCTGAAAACTCGAACACT 720  
 L F F G M S P E W S K Q A T P E K L E H

GGAAAACAATCACCCAGCAATGGGCGGAACAAACCTTTGGAGAAAACAACCTTGTATCTC 780  
 W K T I T Q Q W A E Q T F G E N N L V S

TTCAGCTACATGCTGATGAAACAACACCCCACTTAACCGGCTTTATGGTGCCTAGAGACC 840  
 L Q L H A D E T T P H L T G F M V P R D

CCGATACAGGCCGTTTAAACGCATCGAGATGGTTTGATGGTCGAAAAGCCCTTTCTGCCC 900  
 P D T G R L N A S R W F D G R K A L S A

TCCAGACGGATTATGCGGCTTCTATGGAGCCTCTAGGGCTGGCCAGAGGCGTAAAAGGTT 960  
 L Q T D Y A A S M E P L G L A R G V K G

CAAAAGCAACGCATCAAAGAGTCAAAGACATTACGGAAATATCAACAAAACCTTTACAGC 1020  
 S K A T H Q R V Q R H Y G N I N K T L Q

TAGATCCCAAGATTCAGGCACCCATCCCACCCTCAATTTTTACAAATAAGGAAGAATGGG 1080  
 L D P K I Q A P I P P S I F T N K E E W

CAGAAAAGAACGCCTAAAAGCCCAAAAATCGGCACTTTCGGTAATACAGCCGCTGGCTG 1140  
 A E K E R L K A Q K S A L S V I Q P L A

ACAAAGCGGCGAGATATGTGGAAGAAAAAAAACGAGCAGATAGAGCAGAGGAAGCCCTGT 1200  
 D K A A R Y V E E K K R A D R A E E A L

CATTAGCTAGAAGAAAAGCTGATAGCATGCGTGCAATACCTCTTTCTGATGTCTTAAAAA 1260  
 S L A R R K A D S M R A I P L S D V L K

CCTTAGGCATGGAACCTTGACCCAGCAGACAAAAGCAATGGCGAGACCCTGAACATAGAT 1320  
 T L G M E L D P A D K K Q W R D P E H R

TCCGAATTACGATAGATAATTATAAATTTTATGACCATTCAGCTCAAAAAGGAGGGGGTG 1380  
 F R I T I D N Y K F Y D H S A Q K G G G

GTGCCATTGATTTGCTCATGCACACAACAGGCCAAGACTACAAAGGCGCGCTATCATGGC 1440  
G A I D L L M H T T G Q D Y K G A L S W

TGGCTGACAGGTTTGGTGATGAAACTGCCCGTCATGATATGCTTCTAAATGATTTGTATC 1500  
L A D R F G D E T A R H D M L L N D L Y

GAAGTAAATCAGAATAAATGAAGCAAACAAAGACCTGCTTTTAAACAACCAGAGCATA 1560  
R S K I R I N E A K Q R P A F K Q P E H

AAAATGAGCCGAAAATTAGGGAGTTTTTAAATTCCTCGAGGAATATCATTTAACAATATTC 1620  
K N E P K I R E F L N S R G I S F N N I

CTGACTCTATCCGAACAGATGATCGCGGTAATGTAGCCTTCTTGATGTATGACGATAAAG 1680  
P D S I R T D D R G N V A F L M Y D D K

ATACACTTCAGGGCGCAGAATTACGCGGAACAAGCAGTGGTTTTAAAGGGTTAGCCTTGG 1740  
D T L Q G A E L R G T S S G F K G L A L

GAAGCAGTCGCGAAGCCCATTTTACTGGCAGCATCAATGTAAAAAATGACGAAAAGTATG 1800  
G S S R E A H F T G S I N V K N D E K Y

ATCTTTATATCGCTGAAAGTGCATAGACGCGATTTAGTAGTCGGCTTTTTAAGCCCAG 1860  
D L Y I A E S A I D A I S V V G F L S P

AAAAAATTAAGCTGGCGTAAAATTATTAAGCACCAGCGGCGTAAGAACGTCTCTTACTA 1920  
E K I K A G V K L L S T S G V R T S L T

AAACTCTCCGAAAAATCGTTGAAAAGGCATCTTCTGTCCATATTGCCTATGATTGGGATG 1980  
K T L R K I V E K A S S V H I A Y D W D

CTGTAGGACAAAGAGCAGCATCGCTATTAGTCGGAGCGATTAAAGCCGCGTTTTCCAACAA 2040  
A V G Q R A A S L L V G A I K A A F P T

AAAAAGTTGAAAAGCTGGCTCCACCTAAAGAACAGATGATACACGGAAAAGATTGGAACG 2100  
K K V E N W L P P K E Q M I H G K D W N

ATCTTTTGATGGTTAAACGCGGTCTTAAAAAGACAGTTGCGCCTAAACAAACCGTAAAGC 2160  
D L L M V K R G L K K T V A P K Q T V K

GAAAAATCCGGTTTT**TAA**TTTTTACAAATACCCTGCCTTATCTCTTTCCCAGTAGCTAAAA 2220  
R K I R F \* ----->  
IR-A

ATAGGGTGGCTTTGCCCGTGTATATAACCAACAGCTTTCTCATGGTTTTTCCGAGGCAGG 2280

ATTCAACGAATTTCCCCTAGGAAGAATAAGAAAGGGAATCGTGAAAATATCCCTAAA 2340  
<----->  
IR3

ATAGGGAAGTCGATTTTTCAGAATCTGTGAAGGGTCTATCAATATTGATTAAACCGTCTA 2400  
<----->  
IR4

TCAAAAAAAGGGGTAAAATTGATAGACCT**TGCTT**CATTCGATGAATAGGT**TATAAT**CAAAA 2460  
-35 -10

```

AATGTGGTTTTTTTTGATTAAGGGTTTATCAAATATGGCGACAAAATTGAGAAAGCAGCCA 2520
→ IR5 ← S.D. M A T K L R K Q P

ATCAGATATGACGAGAATCCTTTCATCGAAGGTATGGTTGTGCCAGTAAAAGTCAGAGG 2580
I R Y D E N P F I E G M V V P V K S Q R

GTTCAGTTATCTCGATTAGGACGAGATGATAACATTCTGGTCAATCAAGCCACTGGTGAG 2640
V Q L S R L G R D D N I L V N Q A T G E

ATGCAAGGCACTCATGTGACGACTTACAGACGTGTTGATAGTGAAGAATTTGTAAAATTA 2700
M Q G T H V T T Y R R V D S E E F V K L

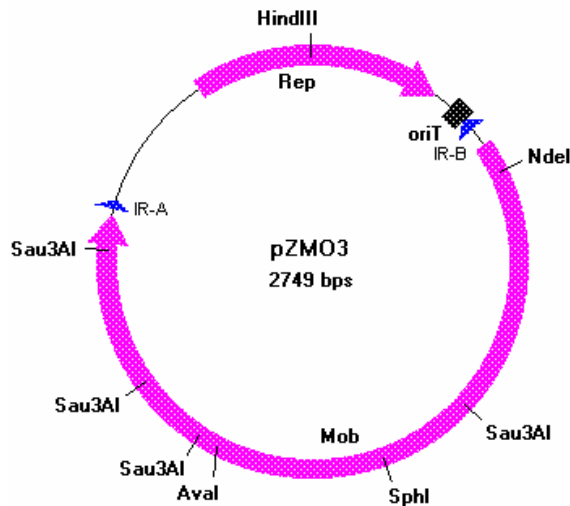
TTTAGCACCAATATCGCGCTAACTTTTGAAGTAGGAGCCGCTGGAATAA 2749
F S T N I A L T F E L G A A G I

```

**Σχήμα 52.** Πλήρης νουκλεοτιδιακή αλληλουχία του φυσικού πλασμιδίου pZMO3(pZM2) του *Z. mobilis* ATCC 10988, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους Misawa & Nakamura, 1989 (αριθμός πρόσβασης NCBI GeneBank X14438). Η αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζεται κάτω από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Οι πιθανές αλληλουχίες των υποκινητών-προαγωγών (-35: TTGCCCT, -10: TATAAT για το ORF2 και -35: TTCCAG, -10: AAGAAATAT για το ORF1), όπως αυτές προβλέφθηκαν με το πρόγραμμα BPRON (Solovyeu & Salamov, 2011), σημειώνονται με **γκρι επισήμανση**. Οι περιοχές Shine-Dalgarno πρόσδεσης στο ριβόσωμα (AGC, AGG) είναι μέσα σε **πλαίσιο**, ενώ με →← και - → ← - κάτω από την αλληλουχία υποδεικνύονται οι αντίστροφες επαναλήψεις οι οποίες προβλέφθηκαν με το πρόγραμμα “mfold”.

## 7.4 Συμπεράσματα

- Το pZMO3 είναι το φυσικό πλασμίδιο του *Z. mobilis* ATCC 10988, που αντιστοιχεί στο πλασμίδιο pZM2 των Misawa & Nakamura, 1989. Περιέχει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF1 και ORF2) που κωδικοποιούν για μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αντιγραφή του (Rep), M.B. 20.962 Da, και μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην μεταφορά του (Mob), M.B. 65.793 Da. Εκατέρωθεν του ORF1 υπάρχουν δύο περιοχές 35 bp αντίστροφων επαναλήψεων (IR-A και IR-B, **Σχήμα 52** και **53**). Οι επαναλήψεις αυτές χωρίζουν το πλασμίδιο σε δύο περιοχές οι οποίες διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε G+C. Η περιοχή που περιέχει το γονίδιο *rep* έχει περιεκτικότητα 39% ενώ η περιοχή με το γονίδιο *mob* έχει περιεκτικότητα 43%.



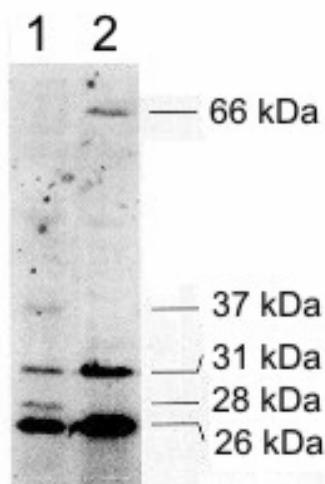
**Σ γ ή μ α 53.** Φυσικός χάρτης του πλασμιδίου pZMO3

- Σύγκριση του ORF2, που εμπλέκεται με τη σταθερή αντιγραφή του πλασμιδίου (πιθανή πρωτεΐνη Rep) με βάσεις δεδομένων, έδειξε να παρουσιάζει ομοιότητα με πρωτεΐνες αντιγραφής πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου και που ανήκουν στην οικογένεια pSN2-τύπου. Μάλιστα δημιουργεί μια διακριτή υποομάδα με το πλασμίδιο pBRG1 του *Bartonella grahamii*. Το γεγονός αυτό είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι το pZMO3 χρησιμοποιεί τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου για την αντιγραφή του.
- Η περιοχή κινητοποίησης (mobilization region) ακολουθεί την τυπική οργάνωση που ακολουθούν όλα τα πλασμίδια που ανήκουν στην παραπάνω οικογένεια δηλ. αποτελείται από ένα μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη χαλάρωσης (relaxase) και ανοδικά αυτής βρίσκεται η περιοχή *oriT*.
- Η περιοχή *oriT* παρουσιάζει ομοιότητα στη διαμόρφωσή της (similar configuration) με τις αντίστοιχες περιοχές των πλασμιδίων pMV158 και pBBR1, των μοναδικών πλασμιδίων της οικογένειας που έχουν χαρακτηριστεί.
- Η Mob πρωτεΐνη (ORF1) διατηρεί το 3H motif (HxDExxPHxh) στο N-τελικό άκρο της, το οποίο είναι συντηρημένο τόσο στον κλάδο A όσο και στον κλάδο B της οικογένειας pMV158-τύπου όπως επίσης και τα σημαντικά για τη δράση της αμινοξέα Asp (D125) και Glu (E126).

## 7.5 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης του ORF1 του pZMO3 με τη μέθοδο «maxicells»

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί το πρωτεϊνικό μόριο που κωδικοποιείται από το ORF1 του pZMO3 προχωρήσαμε στην έκφρασή του και τον προσδιορισμό του με τη μέθοδο “maxicells” (Sancar *et al.*, 1979). Η μέθοδος είναι εξειδικευμένη για πρωτεϊνικά μόρια που εκφράζονται από πλασμίδια και στηρίζεται στην αποδόμηση (degradation) του χρωμοσωμικού DNA που προκαλείται από U.V. ακτινοβολία (254 nm) σε κύτταρα *E. coli* *uvrA<sup>-</sup> recA<sup>-</sup>*. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του διπλασιασμού των κυττάρων, όχι όμως και του πλασμιδιακού DNA, οι λειτουργίες του οποίου δεν επηρεάζονται, με συνέπεια την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του αλλά και των συντιθέμενων απ’ αυτό πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες οι οποίες είναι οι μοναδικές που συντίθενται πλέον στο κύτταρο και που ανιχνεύονται με την προσθήκη [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης, παρουσία κυκλοσερίνης, SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος CSR603 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, σελ. 81) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS3270 (στο οποίο το pZMO3 έχει υποκλωνοποιηθεί στη θέση *Hind*III του φορέα pBR325, Scordaki & Drainas, 1990, **Σχήμα 38**, σελ. 153). Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pBR325. Η αυτοραδιογραφία των πρωτεϊνών που έχουν κωδικοποιηθεί από τα παραπάνω πλασμίδια και που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά παρουσιάζεται στην **Εικόνα 11**.



### Εικόνα 11.

Αυτοραδιογραφία για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης του ORF1 με τη μέθοδο “maxicells” σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου.  
 Διαδρομή 1: pBR325  
 Διαδρομή 2: pDS3270

Οι ζώνες που προκύπτουν από το pBR325 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (37 kDa), στην αμικιλίνη (b-lactamase - 31 και 28 kDa), και στην χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol acetyltransferase - 26 kDa).

Το pBR325 εμφανίζει να κωδικοποιεί για 4 πρωτεϊνικά μόρια: Δύο που κωδικοποιούνται από το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη (β-λακταμάση) με M.B. 28 και 31 kDa, ένα που κωδικοποιείται από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη με M.B. 37 kDa και ένα που κωδικοποιείται από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol acetyltransferase) με M.B. 26 kDa.

Το pDS3270 κωδικοποιεί την β-λακταμάση (Ap<sup>R</sup>) και την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη (Cm<sup>R</sup>) του pBR325 αλλά δεν εμφανίζει να κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Tc<sup>R</sup>). Αντίθετα κωδικοποιεί για μια νέα πρωτεΐνη με M.B. 66 kDa η οποία προφανώς είναι αυτή που κωδικοποιείται από το ORF1 του pZMO3 αφού συμφωνεί με το M.B. που έχει θεωρητικά υπολογιστεί με βάση την πρωτοταγή της δομή.

## **8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pZMO2**

Για την εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων του πλασμιδίου pZMO2 επιλέχθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUZMO2.1 και η οποία έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sanger *et al.*, 1977 και με χρήση του ενζύμου Sequenase v 2.0. Σαν εναρκτήριοι περιοχές χρησιμοποιήθηκαν περιοχές του pUC19, αυτή δηλ. του παγκοσμίως ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή (Universal primer) και αυτή του ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή αντίστροφης φοράς (Reverse primer), που βρίσκονται στις συμπληρωματικές αλυσίδες του πλασμιδίου, εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης *EcoRI*. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν βήμα προς βήμα, τέσσερις επιπλέον εκκινητές, η αλληλουχία των οποίων βρίσκονταν κάθε φορά από την εύρεση της αλληλουχίας του πλασμιδίου pZMO2.



### 8.1 Μόρια-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του φυσικού πλασμιδίου του *Z. mobilis* pZMO2

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της αλληλουχίας του pZMO2 ήταν:

Όνομα	Αλληλουχία 5' → 3'	Αριθμός nt
M13/pUC (-20) Forward Sequencing primer	5' - GTAAAACGACGGCCAGT -3'	17
UZM21f primer	5' - TTCTGAACATCATCTGCCTG -3'	20
UZM20f primer	5' - AGATCGAATAACCAGCTAAA -3'	20
PUZ19f primer	5' - CTAACCTGCCCTTCATTTT -3'	19
PZM20r primer	5' - CGGTTAAGCCAAGTGATATG -3'	20
M13/pUC (-48) Reverse Sequencing Primer	5' - AGCGGATAACAATTTTCACACAAGG -3'	24

Με τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια PUZ19f και PZMO20r που βρίσκονται σε συμπληρωματικές αλυσίδες και έχουν αντίθετη κατεύθυνση, ουσιαστικά έγινε επαλήθευση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην περιοχή 960 έως 1355 bp.

Το μέγεθος του pZMO2 υπολογίστηκε στις 1669 bp και η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία, ξεκινώντας από την περιοριστική θέση *EcoRI*, φαίνεται παρακάτω:

**pZMO2 EcoRI (1669bp)**

```

      10          20          30          40          50          60          70          80
5'-GAATTCATTA TTCTCAACGT ATCTGACAAA TCTTCTATAT GGCAGTTCTT AACAGTCAAA GTTAGGAACA GAAAACGAGC
3'-CTTAAGTAAT AAGAGTTGCA TAGACTGTTT AGAAGATATA CCGTCAAGAA TTGTCAGTTT CAATCCTTGT CTTTTCGCTCG

      90          100         110         120         130         140         150         160
TTTGGGATAT TCTTTAATGA TAGCAGGAAG TGCAGAATAA AATCTGGCTT GCCACATTAG GGAACGCCTC CACTGACAGA
AAACCCTATA AGAAATTACT ATCGTCCTTC TCGTCTTATT TTAGACCGAA CGGTGTAATC CCTTGCGGAG GTGACTGTCT

      170         180         190         200         210         220         230         240
CTGGACAATG ACGCACTCGA CAAAAATGGG CTTCTTGTA TCGTAACTTT AATTTTTTTT TACCGGTCTC ATCATCATCT
GACCTGTTAC TCGGTGAGCT GTTTTTACCC GAAGAACATT AGCATTGAAA TTAAAAAAAA ATGCCAGAG TAGTAGTAGA

      250         260         270         280         290         300         310         320
ATCTGACTAA AACGCAAAAT ACCGGAACAG TTTCCAATAC GTTGAGCCAG ACGTTGAAAC TCTAATTCC TATTATAAAT
TAGACTGATT TTGCGTTTTA TGGCCTTGTC AAAGTTATG CAACTCGGTC TGCAACTTTG AGATTAAGGA CTAATATTTA

      330         340         350         360         370         380         390         400
      UZM21f
      330         340
CTTCTGAACA TCATCTGCCT GACTACGATG AACATCCCAG AATCTGCCTT GCTCACTATA ATTCGCAAGC CCATCTCTCT
GAAGACTTGT AGTAGACGGA CTGATGCTAC TTGTAGGGTC TTAGACGGAA CGAGTGATAT TAAGCGTTCG GGTAGAGAGA

      410         420         430         440         450         460         470         480
TGCATGAATC AGAAAATTTG ATATAGCTCC CAATAGTGAC CTTCTTGGTC ATAAAAACCC TTTTATTTTT GTTGTGTGCG
ACGTACTTAG TCTTTTAAAC TATATCGAGG GTTATCACTG GAAGAACCAG TATTTTTTGGG AAAATAAAAA CAACACAGCG

      490         500         510         520         530         540         550         560
AGCTTCAAAA ATGAGGGTTT TTTTCTACA TGTCAAATTG AAAATATCCC TTGTGTAGCA AGGGGAAAGT GCCAAAATCA
TCGAAGTTTT TACTCCCAA AAAAAGATGT ACAGTTTAA CTTTATAGGG AACACATCGT TCCCTTTTCA CGGTTTTAGT

      570         580         590         600         610         620         630         640
ATCCCAGAGT TATCCCTTAA GTATCAAGTA AAGTATTTTT GACCGTATTT TTGACCGTAT TTTTGACCGT ATTTTTGACC
TAGGGTCTCA ATAGGGAATT CATAGTTCAT TTCATAAAAA CTGGCATAAA AACTGGCATA AAAACTGGCA TAAAAACTGG

      650         660         670         680         690         700         710         720
      UZM20f
      690         700         710
GTATTTTTGA CCGTATTTTT CTAAATTTTT TATAACCAGT TATCATTTCTA GATCGAATAA CCAGCTAAAA ACTCATAACC
CATAAAAAC TGGCATAAAAA GATTTAAAAA ATATTGGTCA ATAGTAAGAT CTAGCTTATT GGTCGATTTT TGAGTATTGG

      730         740         750         760         770         780         790         800
ACCCATCCCC CCGCCCTTCC CGCCGAGAGC AGCACATGGC AGGAGTGCAG GAGAATAAGC TGCCTACGC TTGCTTCTCT
TGGGTAGGGG GCGGGAAGG GCGGCTCTCG TCGTGTACCG TCCTCACGTC CTCTTATTCG ACGCGATGCG AACGAAGAGA

      810         820         830         840         850         860         870         880
TCCCCGCACT CTATGCGATA ACATATGCTA CGCTCACAGC GTCCAAGGCC AAGCCGCTTA CCGCTCGCTA CAGCCTTGAC
AGGGGCGTGA GATACGCTAT TGTATACGAT GCGAGTGTCT CAGGTTCCGG TTCGGCGAAT GCGCAGCGAT GTCGGAAC TG

      890         900         910         920         930         940         950         960
TCTGCTCTGT CGTTCCTTTT CTTTGATTTT TACCGTTGAG CATGAAGTCG AATAAGTTTT TTCGTCCAGG ACTAGTCATT
AGACGAGACA GCAAGGAAAA GAAACTAAAA ATGGCAACTC GTACTTCAGC TTATTCAAAA AAGCAGGTCC TGATCAGTAA

      970         980         990         1000        1010        1020        1030        1040
      PUZ19f
      970         980
CTAACCTGCC CTTTCATTTT ACTGTTTTTT TTCAAGATTT TTTAAAGCCG ATCTTTCAAT CTTTTTAAAT TTAAAAAGAT
GATTGGACGG GAAGTAAAAA TGACAAAAAA AAGTTCATAA AAATTTCCGC TAGAAAAGTTA GAAAAATTTA AATTTTTTCTA

      1050        1060        1070        1080        1090        1100        1110        1120
AGTTTTAAAT CTTTAAAAAT CTTGAGACAT AATAAAAAAA AGCCCCAAAT ATGGGGCTTT TTTCTCTTAA ATAATATCAC
TCAAATTTA GAAATTTTTA GAACTCTGTA TTATTTTTTT TCGGGGTTTA TACCCGAAA AAAGAGAATT TATTATAGTG

      1130        1140        1150        1160        1170        1180        1190        1200
CTTGTTCAA ACGACGATAA CACTTTTCTG ATTGTGCGCA ATTAAAAGCA ATACGACGTT CTATCACTAA TCTCATTTAA
GAACAAGTTT TGCTGCTATT GTGAAAAGAC TAACAGCGGT TAAATTTTCGT TATGCTGCAA GATAGTGATT AGAGTAAATT

```

```

1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
ATTATCTGCG AAAATCAAAT CTTCAATTCGT CTCCTGACGT TCGCGCAAGA TATTTTTTAA AACCCACCT GAAGCAATAA
TAATAGACGC TTTTAGTTTA GAAGTAAGCA GAGGACTGCA AGCGCTTCT ATAAAAAATT TTGGGTGGA CTTCGTTATT

1290      1300      1310      1320      1930      1940      1950      1960
ACSTTTTACG ATGAACCTGT TTTGTCATTT GAAGAAACCA GTTGTACCT TCAATCATAT CACTTGGCTT AACCGAATAT
TGGAAAATGC TACTTGAACA AAACAGTAAA CTTCTTTGGT CAACAATGGA AGTTAGTATA GTGAACCGAA TTGGCTTATA
                                     ←
                                     PZM20r

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
TTCAAAGTTT CTGCAACAGC TGCCCCAAA CCCTCTGTAA GGCCTGAGGA TGCCTCAGGA ACGCAATTCT TTACAGTTCT
AAGTTTCAA GACGTTGTCG ACGGGGGTTT GGGAGACATT CCGGACTCCT ACGGAGTCTT TGCGTTAAGA AATGTCAAGA

1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
GATATCAACT ACCGGAGAAT AATCTAAACG AGCGCAATAA GCCCATAATT CAGCCCACCG AGATTTTTTA ACGTAAGAAT
CTATAGTTGA TGGCCTCTTA TTAGATTTGC TCGCGTTATT CGGGTATTAA GTCGGGTGGC TCTAAAAAAT TGCATTCTTA

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
GAGCAAACCA GCTGGGAGGA ACCATAAGCA AAATATGAAA ATGAGGATGT GCAGATCCGT CTTTTCTTTT TGTACTTCT
CTCGTTTGGT CGACCTCTT TGGTATTCTG TTTATACTTT TACTCTACA CGTCTAGGCA GAAAAGGAAA ACAATGAAGA

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1669
GTTGAACGTA TCCAACCCAA AAGCCATTTA AATTCTTTAC GATCTTTTAA ACGCAAACGC TGCCAACCA. -3'
CAACTTGCAAT AGGTTGGGTT TTCGGTAAAT TTAAGAAATG CTAGAAAATT TCGGTTTGCG ACGGTTGGT. -5'

```

## 8.2 Ανάλυση της αλληλουχίας του pZMO2

Μετά την ολοκλήρωση του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO2 ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας για να εντοπιστούν σημαντικές αλληλουχίες ή περιοχές τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PC/GENE 6.85 IntelliGenetics (Oxford Molecular, Oxford, UK). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν :

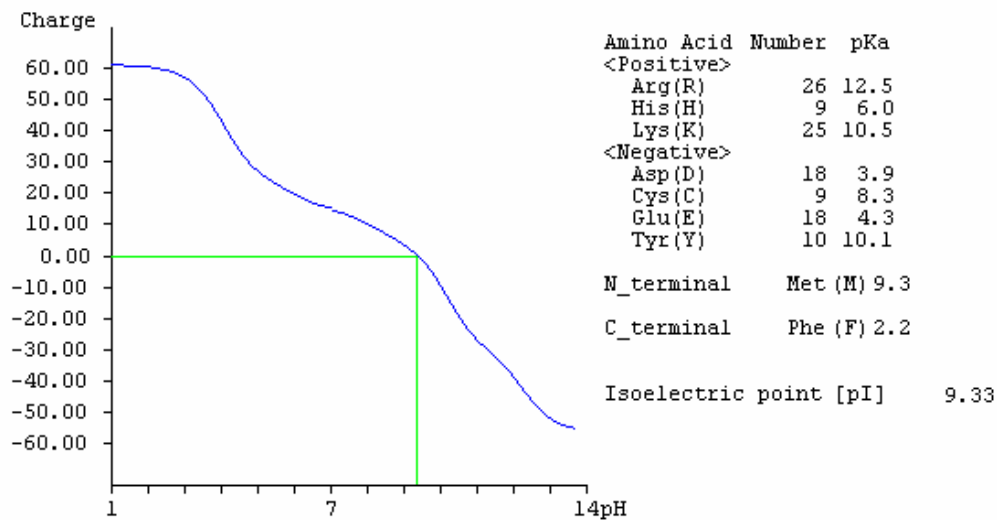
### 8.2.1 Σε επίπεδο πρωτεΐνης

- Την ύπαρξη ενός συνεχόμενου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORFZMO2), που κωδικοποιεί για ένα πρωτεϊνικό μόριο 319 αμινοξέων. Το κωδικόνιο έναρξης, βρίσκεται στην συμπληρωματική αλυσίδα και στη θέση 452 (ATG) και σημειώνεται με κόκκινο στην παραπάνω αλληλουχία, ενώ το κωδικόνιο τερματισμού βρίσκεται στη θέση 1161 (TAA) και σημειώνεται με μπλε. Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του προσδιορισμένου ORFZMO2 είναι:

```

M T K K V T I G S Y I K F S D S C K R D G L A N Y S E Q G R   30
F W D V H R S Q A D D V Q K I Y N Q E L E F Q R L A Q R I G   60
N C S G I L R F S Q I D D D E T G K K K L K L R L Q E A H F   90
C R V R H C P V C Q W R R S L M W Q A R F Y S A L P A I I K  120
E Y P K A R F L F L T L T V K N C H I E D L S D T L R I M N  150
S G W Q R L R L K D R K E F K W L L G W I R S T E V T K G K  180
D G S A H P H F H I L L M V P P S W F A H S Y V K K S R W A  210
E L W A Y C A R L D Y S P V V D I R T V K N C V P E A S S G  240
L T E G L G A A V A E T L K Y S V K P S D M I E G N N W F L  270
Q M T K Q V H R K R F I A S G G V L K N I L R E R Q E T N E  300
D L I F A D N L N E I S D R T S Y C F *                       319
    
```

και αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μοριακού βάρους 37.251Da ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI) υπολογίστηκε 9,33.



Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2, με άλλες αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST (Altschul *et. al.*, 1990), έδειξε να υπάρχει σημαντική ομοιότητα (similarity) σε ποσοστό που ξεπερνά και το 60% με χαρακτηρισμένες πλασμιδιακές πρωτεΐνες αντιγραφής (**Πίνακας 19**). Να σημειωθεί ότι τόσο το pKYM όσο και τα pCA2.4 και pNostoc (για το pJ δεν υπάρχουν πληροφορίες), ανήκουν στην οικογένεια πλασμιδίων pC194/pUB110-τύπου, τα μέλη της οποίας αντιγράφονται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (Seery *et al.*, 1993). Είναι δε

χαρακτηριστικό ότι και τα τέσσερα παραπάνω πλασμίδια έχουν φυσικούς ξενιστές Gram<sup>-</sup> βακτήρια.

**Πίνακας 19.** Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-P (Altschul *et. al.*, 1990).

Σχετική πρωτεΐνη [Μικροοργανισμός]	Ταυτότητα (Identity)	Ομοιότητα (Similarity)	Accession No.
Πρωτεΐνη αντιγραφής Rep του pKYM [ <i>Shigella sonnei</i> ]	52%	68%	M38574
Πρωτεΐνη αντιγραφής Rep του pJ [ <i>Salmonella enteritidis</i> ]	51%	67%	AF268389
Πρωτεΐνη RepA του pCA2.4 [ <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> ]	46%	61%	L13739
Πρωτεΐνη RepA του pNostoc [ <i>Nostoc sp.</i> ]	40%	61%	M81381
Πρωτεΐνη RepB του pUB110 [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]	35%	57%	X03408
Πρωτεΐνη αντιγραφής Rep του pC194 [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]	28%	47%	V01277

Αντίθετα, στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 με τις πρωτεΐνες αντιγραφής των πλασμιδίων pC194 και pUB110 που ανήκουν στην ίδια μεν ομάδα, με ξενιστές όμως Gram<sup>+</sup> βακτήρια, έδειξε ότι το ποσοστό ομοιότητας πέφτει περίπου στο 30%. Η συνολική στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 του πλασμιδίου pZMO2 με τις πρωτεΐνες αντιγραφής όλων των παραπάνω πλασμιδίων, αλλά και με αυτή του pZMO1 φαίνεται στο **Σχήμα 54**.

	1U	2U	3U	4U	5U	6U
pCA2.4	MSRTLVEDCLQQ	SDKVVKSN		LIDKVLRLQLSPND	AKWDDRRSETDQ	
pNostoc	MSEASEGISLPS	IVSFPQQE		ENSTPALSELSQRDE	VMDKHRANSDA	
pZMO1	WRQPKKRGF	MHFSATI	GHNTKANFF	FKCKSNNGF	ESDKNGI	ADYSPKDRF
pZMO2	HTKKVTIGSY	IKFSDS		CK		RDGLANYSEQGRF
pKYM	MSED					KFLSDYSPRDAVWD
pJ	MKNPD	L				QNLTDYSPSDAPWD
pUB110						AHRSVSDD
	70	80	90	100	110	120
pCA2.4	VRELYRGI	KYDSL	LAGRIS	ACSGRLE	FGFEIQ	ETGESKLR
pNostoc	VEGYAGS	EFSKY	SERISD	CAOLLDF	RLVFNSET	GGEYKFL
pZMO1	VEQIYQTA	KEFER	YAEERIS	NCGGVLR	FAVSE	EGAEK
pZMO2	VQKIYNQ	ELEFQRL	AQRIGNC	SGILRFS	QIDDD	ETGKK
pKYM	VGGIYQT	AGQFF	RYAIRM	ASCGLI	RFGWST	IMETG
pJ	VGGIYLL	AAEYERY	GARMAL	CGLLRF	GWSTL	KETG
pUB110						REAHFCRVRI
	130	140	150	160	170	180
pCA2.4	RRSLMWR	AKAFKIL	POIVE	AYPKHR	FIFL	TLTVRN
pNostoc	RRSLMWR	AKAKYKIL	PQLLID	YDKAR	WLFV	TLTVKN
pZMO1	RRSLMWR	QARFY	YALPE	VLKAM	MNIN	WLF
pZMO2	RRSLMWR	QARFY	YALPE	VLKAM	MNIN	WLF
pKYM	RRSLMWR	QARFY	YALPE	VLKAM	MNIN	WLF
pJ	RRSLMWR	QARFY	YALPE	VLKAM	MNIN	WLF
pUB110						
	190	200	210	220	230	240
pCA2.4	RAKW	PADGW	IRSL	EVTRGK	DGSA	HPHF
pNostoc	LKAF	PAEGY	IKTV	EVTRGK	TPDGS	AHPH
pZMO1	RAKAF	PVNG	GWIR	TTEVTRGK	DGSA	HPHF
pZMO2	RKEFK	WLLC	WIR	STEVTRGK	DGSA	HPHF
pKYM	RKELS	PVQGW	IR	ATEVTRGK	DGSA	HPHF
pJ	RKEFR	PVQGW	IR	TTEVTRGS	DGSA	HPHF
pUB110	YK	KINK	NLV	GFMR	ATEV	TINNK
	250	260	270	280	290	300
pCA2.4	SLRIN	YRPI	VHVQ	AVRP	KNKE	TLDTL
pNostoc	SLRVD	YKPI	ILDV	QSLNP	QD	SLIGL
pZMO1	CMKVP	YSPN	IDV	VRVKG	KKGED	EN
pZMO2	CARLD	YS	PVVD	IRTVKN	CVPE	ASSG
pKYM	CLRVN	YEPN	ID	IRAVKT	KTGE	VVAN
pJ	CLRVN	YDPN	VV	RAVVKPR	KCCES	LACAT
pUB110	AMKLD	YDPN	VV	QMI	IRP	KNYKS
	310	320	330	340	350	360
pCA2.4	ENKQW	LV	VELT	TQLH	HKTR	AVAT
pNostoc	WFL	EL	TRQL	HR	TKAIA	GGIL
pZMO1	WFL	EL	TKQV	HQLRF	IAS	GGIL
pZMO2	WFL	QMT	RQV	HR	KRF	IAS
pKYM	WFL	DV	TRQL	HK	RRF	IST
pJ	WFL	EL	TRQT	HK	RRFV	AT
pUB110	FN	LKRL	SD	LE	EGL	HRKRL
	370	380				
pCA2.4	DWEQRI	KKYAM	NDR			
pNostoc	GWKQK	QKKY	KLVE			
pZMO1	NW	OSDES	RYRR	FSE	G	DI
pZMO2	V	WDSG	KRRY	KRA	PE	KDK
pKYM	F	MKTE	VRRY	RS	PT	KD
pJ	M	WNER	KNY	F	I	K
pUB110						

**Σ χ ή μ α 54.** Στοιχισμός της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας του ORFZMO2 με πρωτεΐνες αντιγραφής πλασμιδίων της ομάδας pC194/ pUB110 και με αυτή του pZMO1 (EMBL Accession No. AJ009975). Με κόκκινο σημειώνονται οι περιοχές πλήρους συντηρητικότητας ενώ με μπλε οι περιοχές υψηλής συντηρητικότητας αμινοξέων.

Από την παραπάνω στοίχιση μπορούμε να διακρίνουμε μια πολύ καλά συντηρημένη περιοχή γύρω από τη θέση **Tyr-255 (Y255)**. Το αμινοξύ αυτό πιστεύεται ότι βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών αντιγραφής (Rep) των πλασμιδίων της οικογένειας pC194/pUB110-τύπου, και ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση του ενζύμου, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της προπορευόμενης αλυσίδας (double stranded origin – **DSO**, Seery *et al.*, 1996; Bouia *et al.*, 1989).

pBAA1	<b>E I S K Y P V K D T D</b>	( <i>B. subtilis</i> )
pBS2	<b>E I S K Y P V K D T D</b>	( <i>B. subtilis</i> )
pBC1	<b>E I S K Y P V K D T D</b>	( <i>B. coagulans</i> )
pLP1	<b>E T A K Y E V K S A D</b>	( <i>L. plantarum</i> )
pLpe	<b>E T A K Y E V K S A D</b>	( <i>L. pentosus</i> )
pLAB1000	<b>E T A K Y Q V K S K D</b>	( <i>L. hilgardii</i> )
pUB110	<b>E T A K Y P V K D T D</b>	( <i>S. aureus</i> )
pOX6	<b>E T S K Y S V K S S D</b>	( <i>S. aureus</i> )
pC194	<b>E M A K Y S G K D S D</b>	( <i>S. aureus</i> )
pSK89	<b>E M A K Y S G K D S D</b>	( <i>S. aureus</i> )
pKYM	<b>E T L K Y S V K P E D</b>	( <i>S. sonnei</i> )
pNostoc	<b>E V I K Y S V K E S D</b>	( <i>Nostoc sp.</i> )
pMA1	<b>E T I K Y S V K P A D</b>	( <i>M. aureginosa</i> )
pVA380	<b>E T A K Y P V K P F D</b>	( <i>S. ferus</i> )
pST1	<b>E T A K Y P T K P I D</b>	( <i>S. thermophilus</i> )
Consensus	<b>E X X K Y X V K X X D</b>	
pZMO2	<b>E T L K Y S V K P S D</b>	( <i>Z. mobilis</i> )

**Πίνακας 20.** Στοίχιση αμινοξικής αλληλουχίας στο ενεργό κέντρο χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών Rep που κωδικοποιούνται από πλασμίδια της οικογένειας pC194/pUB110-τύπου. Με έντονη γραφή αναγράφονται τα αμινοξέα που επαναλαμβάνονται σε μεγάλο ποσοστό στη θέση αυτή. Στη συναινετική αλληλουχία, με X συμβολίζονται τα αμινοξέα που δεν επαναλαμβάνονται συχνά στη συγκεκριμένη θέση. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το pZMO2 δείχνει πλήρη ταύτιση με τη συναινετική ακολουθία.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το pZMO2 διατηρεί πολύ καλά συντηρημένη την περιοχή αυτή, όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 20**, όπου συγκρίνονται τα θεωρούμενα ως ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών αντιγραφής από πλασμίδια που ανήκουν τόσο σε Gram<sup>+</sup> βακτήρια όσο και σε Gram<sup>-</sup> βακτήρια, όλα της οικογένειας

pC194/pUB110-τύπου, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το πλασμίδιο pZMO2 ανήκει και αυτό στη συγκεκριμένη οικογένεια και ότι αντιγράφεται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου.

### 8.2.2 Σε επίπεδο DNA

- Ότι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που αποτελούν το πλασμίδιο pZMO2 καθώς και το ποσοστό αυτών μέσα στο μόριο είναι:

**A: 521 (31,22 %), C: 262 (15,70 %), G: 383 (22,95 %), T: 503 (30,14 %)**

Είναι χαρακτηριστικό ότι η αναλογία σε G+C στο pZMO2 είναι 39% δηλ. 7% χαμηλότερη απ' ότι στο σύνολο του γονιδιώματος του *Z. mobilis* ATCC 10988 (Pappas *et al.*, 2011) ή και άλλων στελεχών *Zymomonas* (Seo *et al.*, 2005; Kouvelis *et al.*, 2009).

- Την ύπαρξη πληθώρας περιοριστικών θέσεων, μερικές από τις οποίες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 21.** Περιοριστικές θέσεις του φυσικού πλασμιδίου pZMO2 του στελέχους *Z. mobilis* ATCC 10988 όπως προέκυψαν μετά την εύρεση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας και την ανάλυση αυτής με το πρόγραμμα PC/GENE. Το βέλος (↓) υποδηλώνει τα σημεία υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Περιοριστικό ένζυμο	Αλληλουχία	Αρ. θέσεων	Θέσεις
<i>Afl</i> II	C↓TTAAG	1	577
<i>Dra</i> I	TTT↓AAA	9	1002 1025 1031 1045 1053 1197 1257 1627 1646
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	1	1
<i>Eco</i> RV	GAT↓ATC	1	1441
<i>Hae</i> III	GG↓CC	2	848 1402
<i>Mlu</i> I	A↓CGCGT	1	861
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	1	823
<i>Pvu</i> II	CAG↓CTG	2	1378 1529
<i>Sau</i> 3AI	↓GATC	4	692 1011 1574 1641
<i>Spe</i> I	A↓CTAGT	1	952



<i>TaqI</i>	T↓CGA	2	177 694 929
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	1	688
<i>XmnI</i>	GAANN↓NNTTC	1	265

- Την ύπαρξη πιθανής περιοχής δέσμευσης στο ριβόσωμα (AAGG, Shine-Dalgarno sequence) έξι βάσεις πριν από το κωδικόνιο έναρξης ATG του ORFZMO2.
- Την ύπαρξη δύο αλληλουχιών με αντίστροφες επαναλήψεις που σχηματίζουν δομή μίσχου-θηλιάς με ιδιαίτερα υψηλό ποσό Ελεύθερης Ενέργειας, οι οποίες βρίσκονται μετά το τέλος του ORFZMO2 και πιθανά να αποτελούν την περιοχή λήξης της μεταγραφής (transcription terminator-like sequence).

Κορμός (nt)	Θηλιά (nt)	Ελεύθερη Ενέργεια (ΔG)	Θέση
11	0	-15.00	1029 5' ATCTTTTTTAAA : : : : : : : : : : : : ) 3' TAGAAAAATTT 1030
10	4	-19.00	1087 5' AAAAGCCCCA : : : : : : : : : : : AATA 3' TTTTCGGGGT 1092

- Την ύπαρξη πιθανής -35 (GAAGCTGCG) και -10 (CAAAAAT) περιοχής υποκινητή, ανοδικά του ORFZMO2, περιοχής δηλ. υπεύθυνης για την αναγνώρισή της από εξειδικευμένα μόρια RNA πολυμεράσης του *Z. mobilis* (Sprenger *et al.*, 1993).
- Την σημαντική ομοιότητα (63,6%) που παρουσιάζει με το φυσικό πλασμίδιο pZMO1 του στελέχους ATCC 10988, καθώς και την ύπαρξη μιας περιοχής 139 bp (από 960 bp έως 1099 bp της αντίστροφης και συμπληρωματικής αλυσίδας, σελ. 192-193) που παρουσιάζει ταυτότητα 100% με αυτό (Arvanitis *et al.*, 2000). Η ομοιότητα αυτή

σίγουρα είναι υπεύθυνη για τον ισχυρό υβριδισμό μεταξύ τους ή ακόμη και για τη συμμετανάστευση κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.



**Σ χ ή μ α 55.** Η αλληλουχία της περιοχής των 139 bp του pZMO2 (από 962 bp έως 1105 bp της αντίστροφης και συμπληρωματικής αλυσίδας) που παρουσιάζει ταυτότητα 100% με το pZMO1 (Arvanitis *et al.*, 2000). Τα βέλη →→ πάνω από την αλληλουχία δείχνουν τις άμεσες επαναλήψεις.

Όσον αφορά την ομοιότητά του με τα άλλα πλασμίδια του ίδιου του *Z. mobilis* ATCC 10988, η νουκλεοτιδιακή αλληλουχία των οποίων προσδιορίστηκε πρόσφατα από τους Pappas *et al.*, 2011, στοίχιση μεταξύ τους έδειξε ότι μόνο με το pZMOB05 (Acc. No. NCBI: NC\_017182.1) παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα. Ενδιαφέρον δε είναι ότι, η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2860-2970 του πλασμιδίου αυτού, δείχνει ομοιότητα 56% με την περιοχή 962-1081 της αντίστροφης και συμπληρωματικής αλυσίδας του pZMO2. Και περισσότερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η περιοχή αυτή του pZMO2 είναι η ίδια με αυτή που παρουσιάζει ταυτότητα 100% με το pZMO1 όπως αναφέρθηκε πιο πάνω.

Τέλος η περιοχή αυτή παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό σε A+T (78% A+T) και η οποία είναι πλούσια σε άμεσες επαναλήψεις. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν 5 άμεσες επαναλήψεις (TTTAAA, **Σ χ ή μ α 55**). Από τα δεδομένα αυτά οδηγούμαστε στην υπόθεση ότι η παραπάνω περιοχή πιθανά να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της αντιγραφής του pZMO2 και πιθανά και του pZMO1 του *Z. mobilis* ATCC 10988.

- Στοίχιση ολόκληρης της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του pZMO2 ή μέρος αυτής, με αλληλουχίες καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων, δεν έδειξαν καμιά αξιοσημείωτη ομοιότητα.

### 8.3 Οργάνωση των περιοχών έναρξης αντιγραφής (*DSO* και *SSO*)

Μια πιο λεπτομερής ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του pZMO2, ανέδειξε την ύπαρξη μιας περιοχής με πολλές άμεσες και αντίστροφες επαναλήψεις, ανοδικά του ORFZMO2 και μεταξύ των θέσεων 570 και 1060 (192), η οποία εικάζεται ότι παίζει ουσιαστικό ρόλο στην έναρξη ή στη ρύθμιση της αντιγραφής. Στην περιοχή αυτή διακρίνει κανείς:

1. Δύο καλά συντηρημένες περιοχές που θα μπορούσαν δυνητικά να δράσουν σαν **DSO** (Double-strand origin ή όπως πιο παλαιότερα αναφέρονταν σαν “plus origin”), ανοδικά του ORFZMO2. Ως γνωστό, στα πλασμίδια που για την αντιγραφή τους χρησιμοποιούν το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου, η παραπάνω περιοχή αποτελεί το σημείο διάσπασης της αλυσίδας από την πρωτεΐνη Rep και βέβαια είναι το σημείο απ’ όπου ξεκινά αλλά και τελειώνει η αντιγραφή της προπορευόμενης αλυσίδας, αυτής δηλ. που στην περίπτωση του pZMO2 κωδικοποιείται και το υποθετικό πρωτεϊνικό μόριο. Στο pZMO2 ανιχνεύτηκε μια αλληλουχία μεταξύ των θέσεων 598 και 582 του προπορευόμενου κλώνου (leading strand) του, αυτού δηλ. που κωδικοποιεί για το υποθετικό πρωτεϊνικό μόριο ORFZMO2, η οποία παρουσιάζει ομοιότητα 11/14 νουκλεοτίδια με την συναινετική αλληλουχία της περιοχής **DSO** της οικογένειας πλασμιδίων pC194/pUB110-τύπου ενώ η ομοιότητα αυτή είναι 100% για την αλληλουχία του επταμερούς 5' -**CTTG↓ATA** (το βέλος ↓ υποδηλώνει το ακριβές σημείο διάσπασης της αλυσίδας).

```

pC194/pUB110  1009- T C T T T C T T A T C T T G A T A -992
                * * * * * * * * * *
pZMO2 (i)     598 - A A A T A C T T T A C T T G A T A -582

```

Μία δεύτερη πιθανή περιοχή διάσπασης και έναρξης της αντιγραφής εντοπίστηκε λίγο πιο πάνω, επίσης στην προπορευόμενη αλυσίδα, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 587 και 571. Η αλληλουχία αυτή βρέθηκε να είναι πανομοιότυπη με μία από τις αλληλουχίες **DSO** του πλασμιδίου pKYM όπως αυτή προσδιορίστηκε από τους Yasukawa *et al.* το 1991 και η οποία περιέχει τέσσερα από τα επτά νουκλεοτίδια

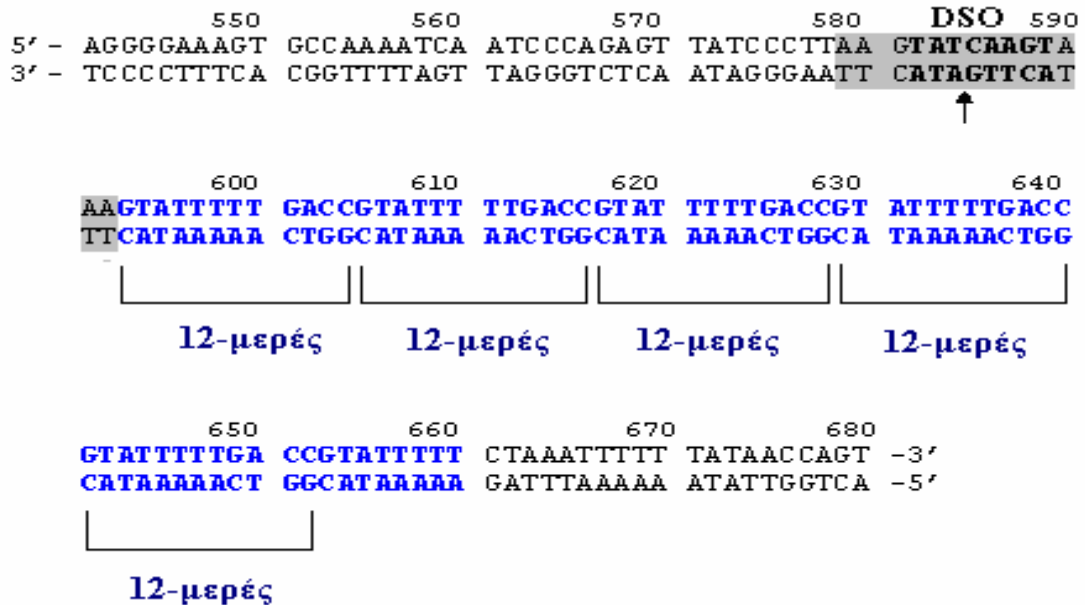
της συναινετικής αλληλουχίας της οικογένειας πλασμιδίων pC194/pUB110-τύπου. Υπενθυμίζεται επίσης το υψηλό ποσοστό ομοιότητας (68%) μεταξύ του ORFZMO2 και της χαρακτηρισμένης πρωτεΐνης αντιγραφής του pKYM.

```
pKYM(ii)      433 -T T T A T A C T T A A G G G A T A -449
                * *   * * * * * * * * * * * *
pZMO2(ii)     587 -T T G A T A C T T A A G G G A T A -571
```

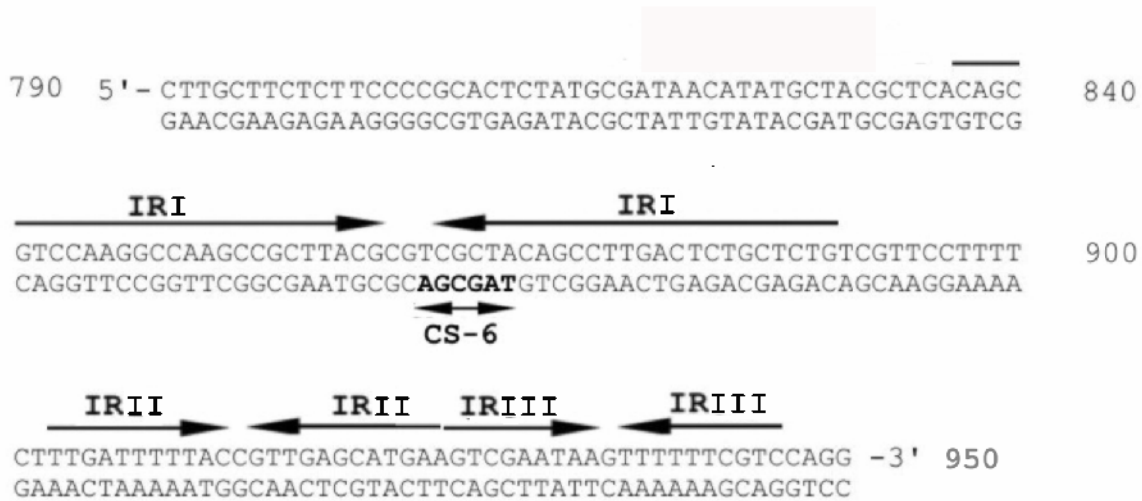
Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι τα πλασμίδια pKYM, pMA1 και pNostoc, οι φυσικοί ξενιστές των οποίων είναι Gram<sup>-</sup> βακτήρια, δεν περιέχουν μία αλλά δύο περιοχές που θα μπορούσαν να δράσουν σαν περιοχές έναρξης της αντιγραφής (**DSOs**). Οι περιοχές αυτές βρίσκονται είτε στην ίδια (pMA1) είτε στις συμπληρωματικές αλυσίδες (pNostoc, pKYM) (Seery *et al.*, 1993).

```
pZMO2 (ii)    587 -T T G A T A C T T A A G G G A T A -571
                *       *       * * * * * * * * * *
pMA1 (ii)     2252 -T A A A A C C T T A T G G G A T A -2260
```

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των δύο παραπάνω περιοχών **DSO** στο pZMO2 είναι ότι παρουσιάζονται αμέσως μετά από μια εκτεταμένη περιοχή 5,5 διαδοχικών άμεσων επαναλήψεων 12 bp (μεταξύ των νουκλεοτιδίων 593 και 660). Την εμφάνιση αντίστοιχου φαινομένου έχουμε και στα πλασμίδια pLS1 (Puyet *et al.*, 1988), pFX2 (Xu *et al.*, 1991), pLP1 (Bouia *et al.*, 1989) και pWC1 (Pillidge *et al.*, 1996), που ανήκουν επίσης στην ομάδα πλασμιδίων pC194/pUB110, για τα οποία εικάζεται ότι οι διαδοχικές επαναλήψεις παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη δέσμευση της πρωτεΐνης Rep πριν τη διάσπαση της αλυσίδας.



2. Την ύπαρξη **SSO** περιοχής δηλ. περιοχή που ξεκινά και τελειώνει η μετατροπή της καθυστερούσας μονόκλωνης αλυσίδας σε δίκλωνη (ss DNA → ds DNA) (Gruss & Ehrlich, 1989; Novick, 1989). Το χαρακτηριστικό των περιοχών αυτών είναι ότι βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα με την περιοχή **DSO**, έχουν μήκος 130 έως 220 νουκλεοτίδια και περιέχουν ατελή παλίνδρομα (imperfect palindromes) με δυναμική να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές θηλειών (Kramer *et al.*, 1999; Khan, 2000). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι **SSOs** (ανάλογα με τις δομικές τους ιδιότητες) οι **SSOA**, **SSOT**, **SSOU** και **SSOW** (Gruss & Ehrlich, 1989; Khan, 2000). Παρ' όλα αυτά και στους τέσσερις τύπους **SSOs** υπάρχει μια συναινετική αλληλουχία 6 νουκλεοτιδίων CS-6 (5'-TAGCGT/A-3'). Στο pZMO2 αναγνωρίστηκε μια τέτοια περιοχή καθοδικά του ORFZMO2 (μεταξύ των νουκλεοτιδίων 950 και 790, στη συμπληρωματική αλυσίδα), όπου υπάρχουν τρία ατελή παλίνδρομα (IRI, IRII και IRIII) και μια πιθανή αλληλουχία CS-6, η οποία μάλιστα βρίσκεται στη θηλιά που σχηματίζει το ατελές παλίνδρομο IRI, όπως συμβαίνει στα RCR πλασμίδια που περιέχουν την περιοχή τύπου **SSOA** (Kramer *et al.*, 1998).



Στοιχισή της παραπάνω περιοχής του pZMO2 με αντίστοιχες περιοχές από πλασμίδια που έχουν διαφορετικούς τύπους *SSOs*, έδειξε ότι η *SSO* περιοχή του pZMO2 παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα (63%) με την *SSOA* περιοχή του pLS1, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 22.

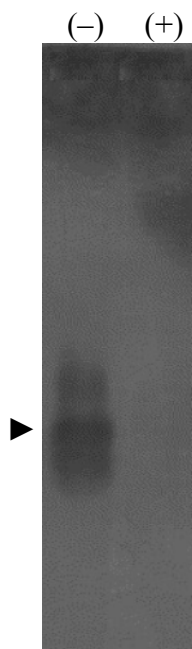
**Πίνακας 22.** Στοιχισή της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας της πιθανής *SSO* περιοχής του pZMO2 με αντίστοιχες χαρακτηρισμένες περιοχές από βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST-N (Altschul *et. al.*, 1990).

Περιοχή	Θέση	Μέγεθος (nt)	<i>SSO</i> αντιπροσωπευτικών πλασμιδίων [Μικροοργανισμός]	Θέση	Ταυτότητα (Identity)	Ομοιότητα (Similarity)
<i>SSO</i> pZMO2	950-790	160	<i>SSOA</i> pLS1 [Streptococcus pneumoniae]	4083-4933	55%	63%
			<i>SSOT</i> pBAA1 [Bacillus subtilis]	184-338	40%	60%
			<i>SSOU</i> pUB110 [Staphylococcus aureus]	1492-1317	39%	59%
			<i>SSOW</i> pWV01 [Lactococcus lactis]	47-215	41%	58%

#### 8.4 Ανίχνευση μονόκλωνου DNA (ss-DNA)

Ξεχωριστό χαρακτηριστικό της πλασμιδιακής αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου είναι και η παρουσία ενδιάμεσου μονόκλωνου μορίου DNA. Έτσι η ανίχνευση τέτοιων μορίων με υβριδισμό κατά Southern χρησιμοποιείται σαν απόδειξη ότι το πλασμίδιο αντιγράφεται με τον συγκεκριμένο μηχανισμό (Khan, 1997; del Solar *et al.*, 1998).

Εκχύλισμα ολικού DNA από την εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων *Z. mobilis* ATCC 10988 ηλεκτροφορήθηκε με ή χωρίς επώαση με S1 νουκλεάση και μεταφέρθηκε σε νάλον φίλτρο υβριδισμού κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, παρ' όλο που θα μεταφερθούν όλες οι μορφές DNA (μονόκλωνη και δίκλωνη) στο φίλτρο, μόνο το μονόκλωνο DNA θα μπορέσει να υβριδίσει με το ανιχνευτικό μόριο (probe). Θετικό σήμα εμφανίστηκε στο πλασμιδιακό εκχύλισμα που δεν είχε επωαστεί με S1 νουκλεάση (**Εικόνα 12**), ενώ εξαφανίστηκε όταν το εκχύλισμα επώαστηκε με S1 νουκλεάση, υποδηλώνοντας την παρουσία του ενδιάμεσου μονόκλωνου μορίου DNA.



**Εικόνα 12.** Ανίχνευση ssDNA με υβριδισμό κατά Southern κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες σε ολικό DNA *Z. mobilis* 10988 εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Ως ανιχνευτικό μόριο (probe) χρησιμοποιήθηκε το pZMO2 σημασμένο με διγοξιγενίνη-11-dUTP. (+) ύστερα από επώαση με S1 νουκλεάση (-) χωρίς επώαση με S1 νουκλεάση

Το μονόκλωνο DNA υποδεικνύεται με το βέλος.

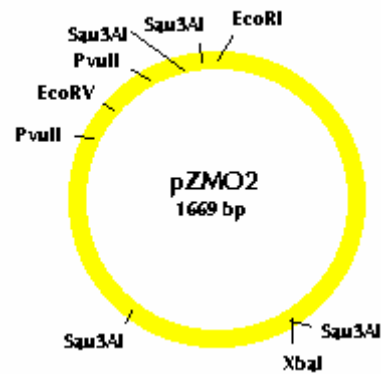
Αντίστοιχα πειράματα που έγιναν στο στέλεχος UVS51 (παράγωγο του ATCC 10998 που όμως έχει χάσει το πλασμίδιο pZMO2, Vartholomatos *et al.*, 1993) έδειξαν ότι στο στέλεχος αυτό δεν εμφανίζονταν αντίστοιχος υβριδισμός κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες (Α. Αφένδρα, προσωπική επικοινωνία). Το παραπάνω αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι το μονόκλωνο DNA που ανιχνεύτηκε στο ATCC 10988 ήταν αποκλειστικά του

πλασμιδίου pZMO2, γεγονός που ενθαρρύνει την υπόθεση ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του pZMO2 είναι αυτός του κυλιόμενου κύκλου.

## 8.5 Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν ύστερα από την ανάλυση της προσδιορισθείσας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO2, επιγραμματικά είναι τα παρακάτω:

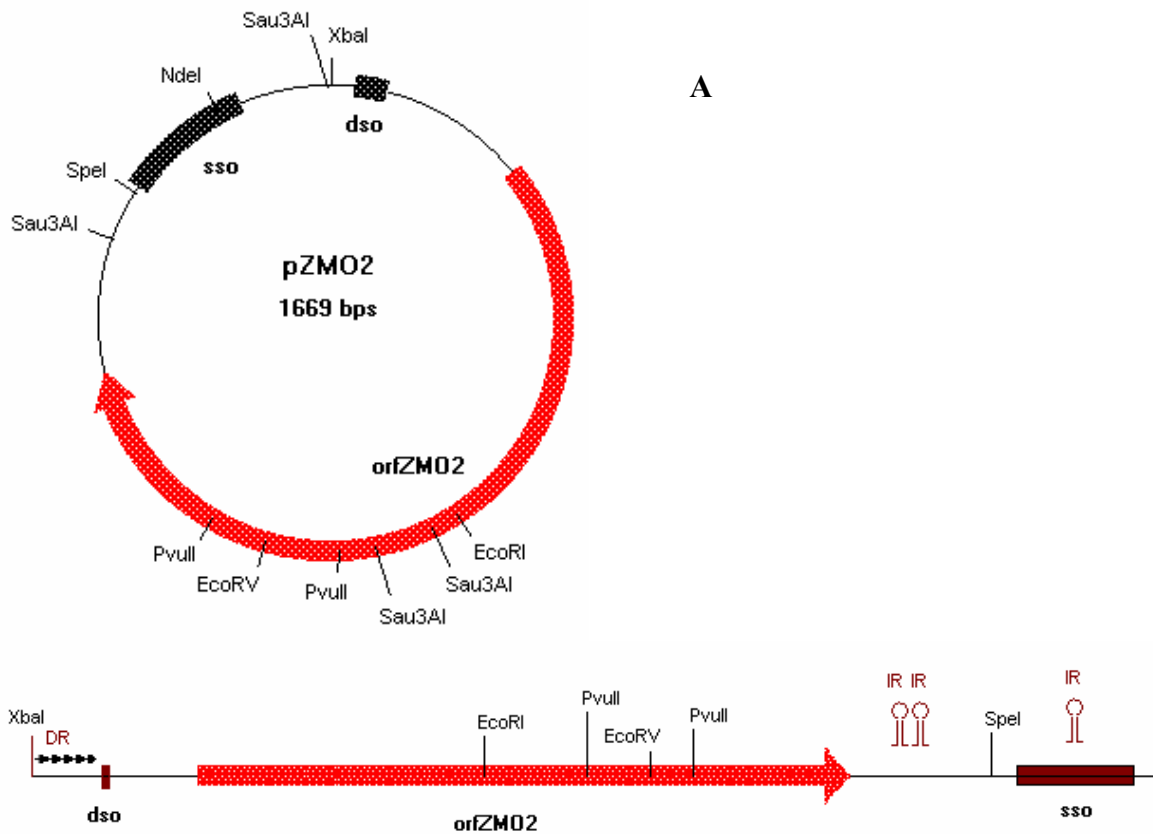
- Το μέγεθος του πλασμιδίου pZMO2 είναι 1669 bp. Η διαφορά σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα των Scordaki & Drainas, 1989, οι οποίοι είχαν προσδιορίσει το μέγεθος του πλασμιδίου στα 1,9 kb, προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάλυση είχε γίνει μόνο με τη βοήθεια πηγματος αγαρόζης.
- Διαθέτει πλήθος περιοριστικών θέσεων, μερικές από τις οποίες είναι μονές (π.χ. *EcoRI*, *EcoRV*, *XmnI*, *HaeI*, *NdeI*, *XbaI*), ενώ διαθέτει τέσσερις περιοριστικές θέσεις *Sau3AI*.
- Διαθέτει ένα ORF που κωδικοποιεί για πρωτεϊνικό μόριο M.B. 37.253 Da το οποίο δείχνει αμινοξική ομοιότητα με Rep πρωτεΐνες πλασμιδίων που αντιγράφονται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (RCR). Τα πλασμίδια αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 ομάδες ανάλογα με την ομοιότητα που παρουσιάζουν τα γονίδια *rep* που περιέχουν (Khan, 1997). Παραλληλισμός, λοιπόν, του ORF του pZMO2 έδειξε ότι αυτό ανήκει στην οικογένεια των πλασμιδίων pC194/pUB110-τύπου ή στην ομάδα III της βάσης δεδομένων των πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου [RCR Replicon Database ([http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR\\_RCRIIalign.htm](http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR/DPR_RCRIIalign.htm))].
- Περιέχει αλληλουχίες που σχηματίζουν επαναλήψεις (άμεσες και αντίστροφες) που παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της αντιγραφής (*SSO* και *DSO*) και της μεταγραφής. Οι αλληλουχίες αυτές βρέθηκαν στην μη-κωδικοποιούμενη περιοχή του pZMO2. Η αλληλουχία *SSO* βρίσκεται ανοδικά της *DSO* έτσι ώστε αυτή να μην εκτίθεται σαν



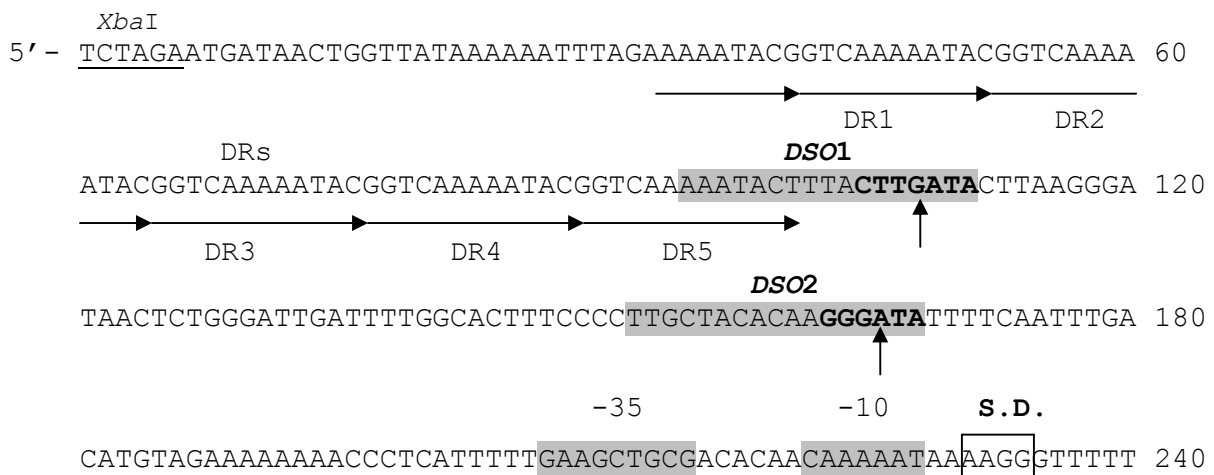


μονόκλωνη αλυσίδα πριν την ολοκλήρωση της αντιγραφής της προπορευόμενης αλυσίδας. Η σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας συνήθως ξεκινά αφού έχει ολοκληρωθεί πλήρως η σύνθεση της προπορευόμενης αλυσίδας (Khan, 2000).

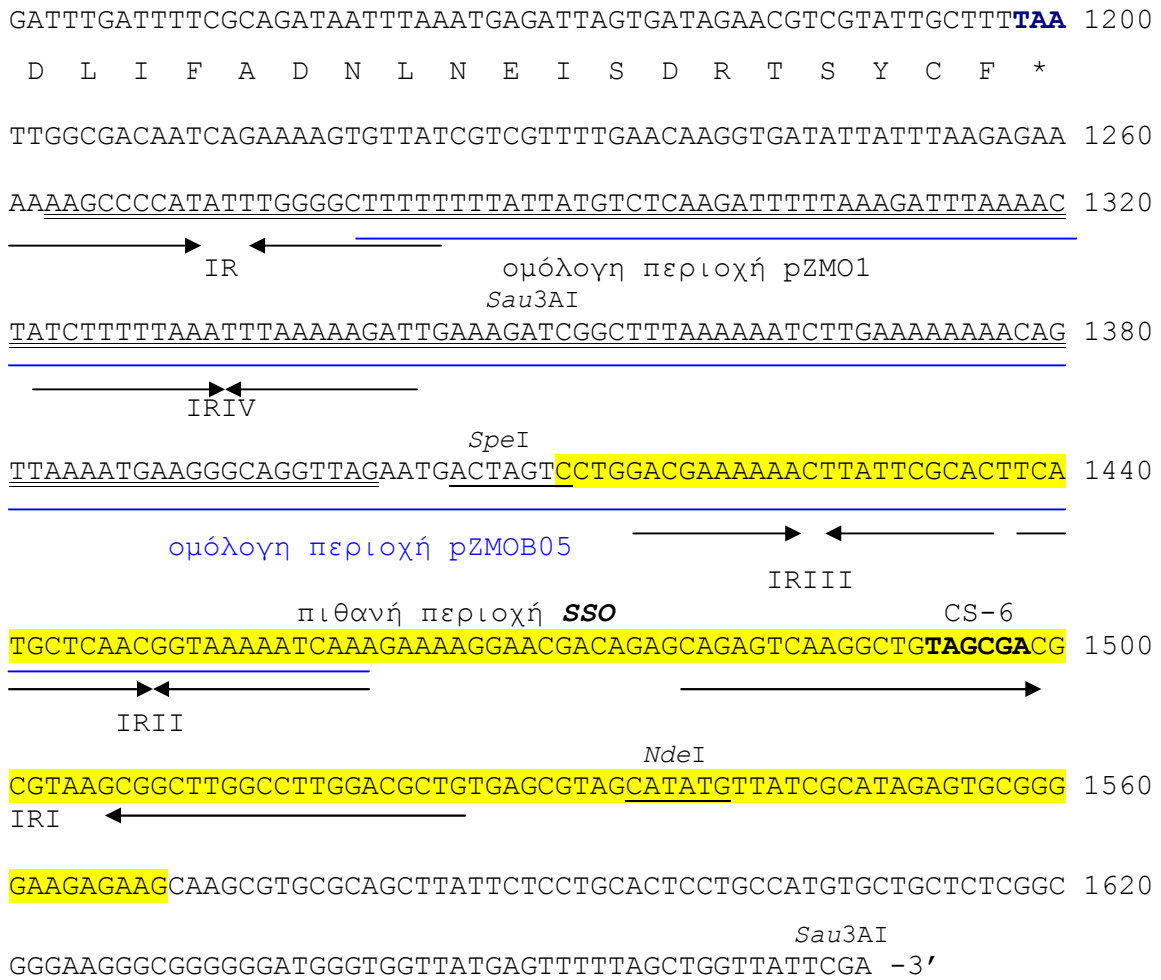
- Περιέχει μια περιοχή 139 bp που παρουσιάζει ταυτότητα 100% με το pZMO1.



**B**



**ATG**ACCAAGAAGGTCACTATTGGGAGCTATATCAAATTTTCTGATTCATGCAAGAGAGAT 300  
M T K K V T I G S Y I K F S D S C K R D  
GGGCTTGC GAATTATAGTGAGCAAGGCAGATTCTGGGATGTTTCATCGTAGTCAGGCAGAT 360  
G L A N Y S E Q G R F W D V H R S Q A D  
GATGTTCAGAAGATTTATAATCAGGAATTAGAGTTTCAACGTCTGGCTCAACGTATTGGA 420  
D V Q K I Y N Q E L E F Q R L A Q R I G  
AACTGTTCCGGTATTTTGC GTTTTAGTCAGATAGATGATGATGAGACCGGTAAAAAAAAA 480  
N C S G I L R F S Q I D D D E T G K K K  
TTAAAGTTACGATTACAAGAAGCCATTTTTGTGCGAGTGCATTCATTGTCCAGTCTGTCAG 540  
L K L R L Q E A H F C R V R H C P V C Q  
TGGAGGCGTTCCCTAATGTGGCAAGCCAGATTTTATTCTGCTCTTCCTGCTATCATTAAA 600  
W R R S L M W Q A R F Y S A L P A I I K  
GAATATCCCAAAGCTCGTTTTCTGTTTCTAACTTTGACTGTTAAGAAGTCCCATATAGAA 660  
E Y P K A R F L F L T L T V K N C H I E  
GATTTGTCAGATACGTTGAGAATAATGAATTCGTTGGCAGCGTTTGC GTTTAAAAGAT 720  
D L S D T L R I M N S G W Q R L R L K D  
CGTAAAGAATTTAAATGGCTTTTGGGTTGGATACGTTCAACAGAAGTAACAAAAGGAAAA 780  
R K E F K W L L G W I R S T E V T K G K  
GACGGATCTGCACATCCTCATTTTTCATATTTTGCTTATGGTTCCTCCCAGCTGGTTTGCT 840  
D G S A H P H F H I L L M V P P S W F A  
CATTCTTACGTTAAAAAATCTCGGTGGGCTGAATTATGGGCTTATTGCGCTCGTTTAGAT 900  
H S Y V K K S R W A E L W A Y C A R L D  
TATTCTCCGGTAGTTGATATCAGAACTGTAAAGAATTGCGTTCCTGAGGCATCCTCAGGC 960  
Y S P V V D I R T V K N C V P E A S S G  
CTTACAGAGGGTTTGGGGCAGCTGTTGCAGAACTTTGAAATATTCGGTTAAGCCAAGT 1020  
L T E G L G A A V A E T L K Y S V K P S  
GATATGATTGAAGGTAACAACCTGGTTTCTTCAAATGACAAAACAAGTTCATCGTAAAAGG 1080  
D M I E G N N W F L Q M T K Q V H R K R  
TTTATTGCTTCAGGTGGGGTTTTAAAAAATATCTTGCGCGAACGTCAGGAGACGAATGAA 1140  
F I A S G G V L K N I L R E R Q E T N E



**Σ γ ή μ α 56.** (A) Χάρτης του φυσικού πλασμιδίου pZMO2 του *Z. mobilis* ATCC 10988 όπου παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες, όπως αυτές προέκυψαν από την εύρεση της νουκλεοτιδιακής του αλληλουχίας.

(B) Πλήρης νουκλεοτιδιακή αλληλουχία του πλασμιδίου pZMO2 και προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό. Τα αμινοξέα της πρωτεΐνης συμβολίζονται με **κεφαλαία γράμματα**. Το κωδικόνιο τερματισμού συμβολίζεται με **έντονα γράμματα και αστερίσκο**. Η περιοχή του υποκινητή-προαγωγού (-35, GAAGCTGCG; -10, CAAAAAT) σημειώνεται με **γκρι επισήμανση** ενώ η περιοχή Shine-Dalgarno (AAGG) με **πλαίσιο**. Η πιθανή περιοχή **SSO** παρουσιάζεται με **κίτρινη επισήμανση** ενώ η αλληλουχία CS-6 με **έντονα γράμματα** εντός της περιοχής **SSO**. Με **γκρι επισήμανση** επίσης παρουσιάζονται οι περιοχές **DSO** (**DSO1** που παρουσιάζει ομολογία με την συναινετική επταμερή αλληλουχία CTTGATA τόσο της οικογένεια pC194/pUB110-τύπου όσο και του πλασμιδίου pKYM και **DSO2** που παρουσιάζει ομολογία με την συναινετική επταμερή αλληλουχία της οικογένεια pC194/pUB110-τύπου), →→ κάτω από την αλληλουχία δείχνουν τις άμεσες επαναλήψεις, →← κάτω από την αλληλουχία δείχνουν τις αντίστροφες επαναλήψεις, με **μπλε γραμμή** κάτω από την αλληλουχία παρουσιάζεται η ομόλογη περιοχή με το πλασμίδιο pZMOB05, με **διπλή γραμμή** κάτω από την αλληλουχία παρουσιάζεται η ομόλογη περιοχή με το πλασμίδιο pZMO1. Τέλος, πάνω από την αλληλουχία, σημειώνονται και οι θέσεις των κυριότερων περιοριστικών ενζύμων.

## **9. ΜΕΤΑΦΟΡΑ, ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ pZMO1 ΚΑΙ pZMO2**

Μεταξύ των πλασμιδίων που υπάρχουν στο στέλεχος ATCC 10988 του *Z. mobilis*, τα pZMO1 και pZMO2 παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι με βάση τα μέχρι τώρα αποτελέσματα (Σκορδάκη 1990, Διδακτορική διατριβή Αφένδρα 1992, Διδακτορική διατριβή) υβριδίζουν ισχυρά μεταξύ τους, παρουσιάζουν δηλαδή μεγάλη ομολογία.

Τα πλασμίδια pDS191 και pDS212 που αποτελούν συντήξεις του πλασμιδιακού φορέα pBR325 με τα παραπάνω φυσικά πλασμίδια pZMO1 και pZMO2 αντίστοιχα, περιέχουν την πλήρη αλληλουχία των πλασμιδίων αυτών (**Σχήμα 38**). Όμως μπορούν τα πλασμίδια αυτά να αποτελέσουν κατάλληλους φορείς υποκλωνοποίησης για το βακτήριο *Z. mobilis*; Με άλλα λόγια, είναι σταθερά εντός των κυττάρων *Z. mobilis* κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες και αν ναι, ποιες αλληλουχίες είναι υπεύθυνες γι' αυτό;

Όσον αφορά το pDS212 διαπιστώθηκε (Αφένδρα 1992, Διδακτορική διατριβή), ότι μετά από 100 κυτταρικές διαιρέσεις το πλασμίδιο διατηρείται σε κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 σε ποσοστό 89%, δηλαδή ότι η δομή του πλασμιδίου παραμένει η αρχική, τουλάχιστον για τον αριθμό των κυτταρικών γενεών που ελέγχθηκαν. Επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει ιδανικό φορέα υποκλωνοποίησης για το *Z. mobilis*. Αντίθετα, πειράματα σταθερότητας του pDS191 εντός του στελέχους CU1Rif2 έδειξαν, ότι το πλασμίδιο αυτό, όχι μόνο δεν παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα, καθώς το ποσοστό των κυττάρων που περιείχαν το πλασμίδιο μετά από 100 κυτταρικές διαιρέσεις ήταν μόλις 4%, αλλά και ότι δεν διατηρούσε πάντα την αρχική του δομή (Αφένδρα 1992, Διδακτορική διατριβή). Η αστάθεια αυτή πιθανά να οφείλεται στη θέση υποκλωνοποίησης του pZMO1.

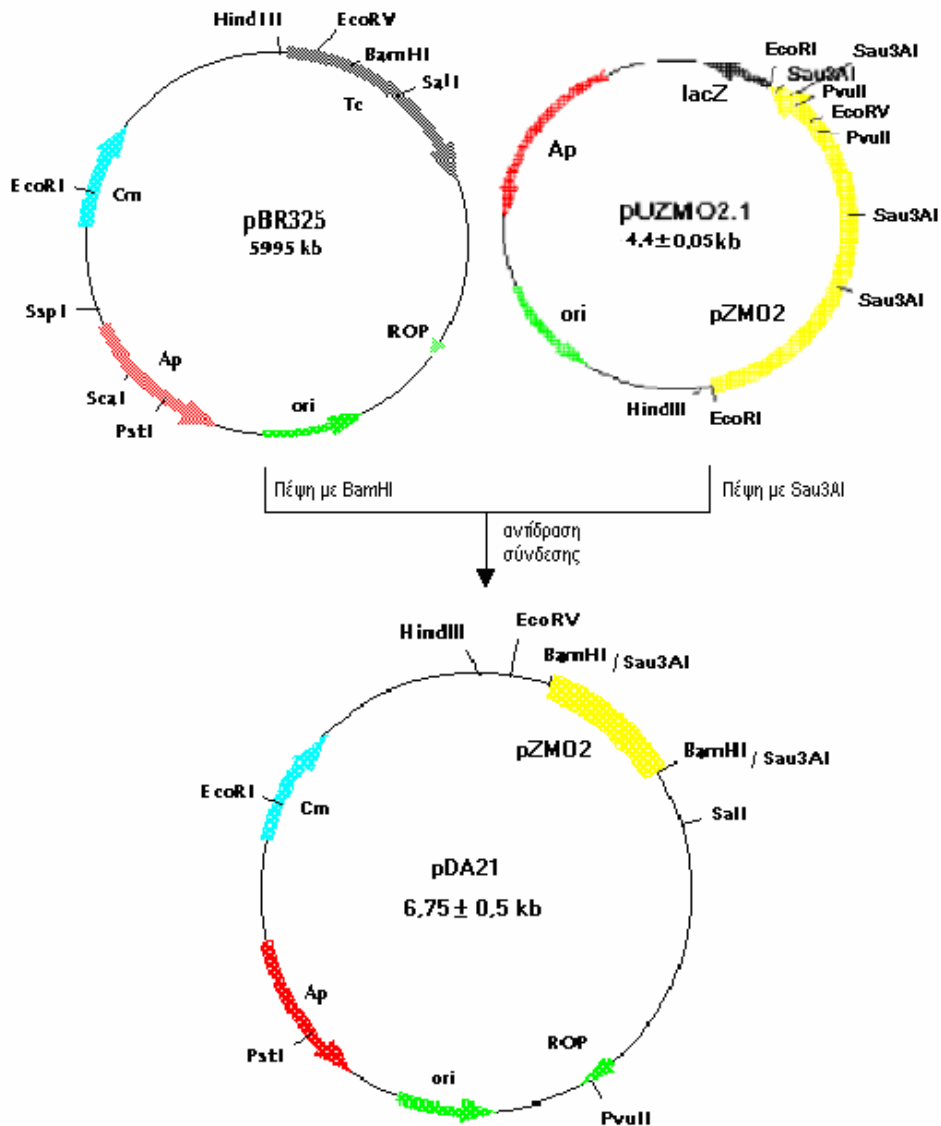
Στο κεφάλαιο αυτό της παρούσας διατριβής περιγράφεται η σταθερότητα των φυσικών πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 στο στέλεχος CU1Rif2 του *Z. mobilis*

χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα πλασμίδια, που περιέχουν τμήματα των pZMO1 και pZMO2. Έτσι κατασκευάστηκαν τα pDA21 (περιέχει μέρος του pZMO2), pDA11 (περιέχει ολόκληρο το pZMO1) και pDA12 (περιέχει μέρος του pZMO1). Τα νέα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο στέλεχος CUIRif2. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι το στέλεχος αυτό παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα σύζευξης σε σχέση με τα στελέχη CP4, NCIB 11163 και ATCC 10988 (Αφένδρα 1992; Διδακτορική διατριβή). Το σημαντικότερο πλεονέκτημά του όμως αποτελεί το γεγονός ότι είναι ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη σε συγκέντρωση  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Afendra & Drainas, 1987). Το αντιβιοτικό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης αποκλεισμού των αποικιών του στελέχους-δότη του *E. coli*, το οποίο είναι ευαίσθητο στη ριφαμπικίνη κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Το pBR325, που είναι ο φορέας υποκλωνοποίησης των παραπάνω ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, δεν είναι συζευκτικό πλασμίδιο, είναι όμως κινητοποιήσιμο, αφού περιέχει περιοχή έναρξης της μεταφοράς, *oriT*, η οποία του επιτρέπει να «κινητοποιείται» από συζευκτικό πλασμίδιο (Covarrubias *et al.*, 1981). Είναι γνωστό ότι στα pZMO1 και pZMO2 υπάρχουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), όπως αυτά προσδιορίστηκαν από την εύρεση της αλληλουχίας τους (Arvanitis *et al.*, 2000). Όπως δε αποδείχθηκε στην παρούσα διατριβή τα ORFs αυτά δεν κωδικοποιούν για λειτουργίες απαραίτητες για την μεταφορά του μέσω βακτηριακής σύζευξης.

## 9.1 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21

Στο πλασμίδιο pUZMO2.1 (Σχήμα 42) υπάρχουν συνολικά 19 περιοριστικές θέσεις *Sau3AI*, 4 πάνω στο pZMO2 και 15 πάνω pUC19. Το πλασμίδιο αυτό υπέστη πέψη με *Sau3AI* και απομονώθηκε το μεγαλύτερο από τα προϊόντα της πέψης, το οποίο και περιείχε το κομμάτι *Sau3AI* – *EcoRI* του pZMO2 (θέση 1-692 της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας, Σχήμα 56, σελ. 207-209) και βέβαια ένα πολύ μικρό κομμάτι του πλασμιδιακού φορέα pUC19.

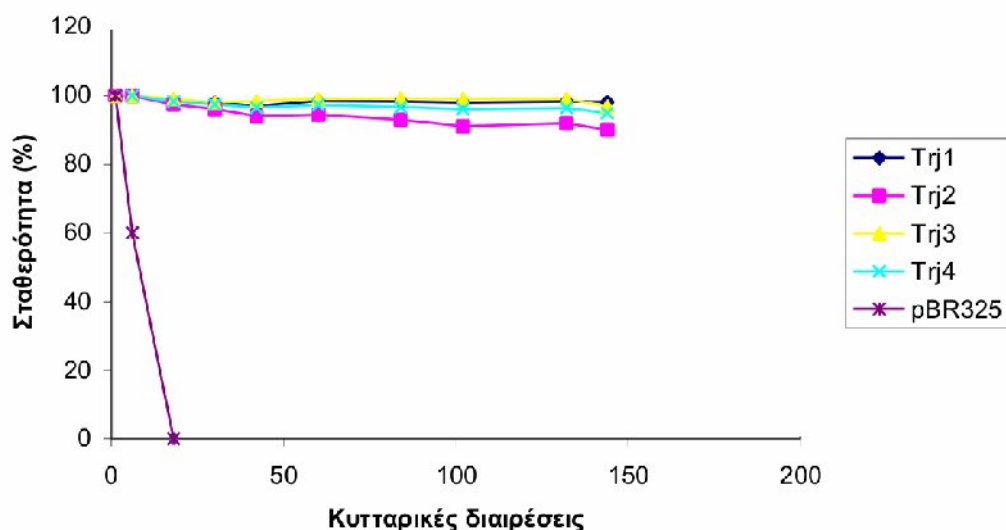


**Σχήμα 57.** Υποκλωνοποίηση της περιοχής 1-692 kb (Σχήμα 56) του pZMO2 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21.

Το προϊόν αυτό εισήχθη με επανασύνδεση στη θέση *Bam*HI του pBR325. Έτσι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21 με μέγεθος  $6,75 \pm 0,5$  kb (Σχήμα 57), που φέρει γενετικούς δείκτες αντοχής στη χλωραμφαινικόλη ( $Cm^R$ ) και στην αμπικιλίνη ( $Ap^R$ ). Σημειώτεον ότι η περιοχή του pZMO2 που υπάρχει στο pDA21, περιέχει το N-τελικό άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, που βρέθηκε ύστερα από την ανάλυση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του pZMO2 (Σχήμα 56), περιέχει όμως άθικτες την προβλεπόμενη περιοχή *DSO*, τις περιοχές του μορίου υποκινητή καθώς και τις περιοχές πρόσδεσης στο ριβόσωμα (RBS).

### 9.1.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21 σε κύτταρα *Z. mobilis*

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21 μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 σύμφωνα με τη μέθοδο επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης (σελ. 88-89). Ως στέλεχος-δότης χρησιμοποιήθηκε το *E. coli* DH5α που περιείχε το pDA21 και το *E. coli* DH5α που περιείχε το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013. Η επιλογή των μετασυζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία πλήρους θρεπτικού μέσου *Zyotomonas* (Z.B.), που περιείχαν 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ριφαμπικίνης (για αποκλεισμό των κυττάρων *E. coli*) και 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  χλωραμφαινικόλης (που είναι ο δείκτης ανθεκτικότητας του πλασμιδίου pDA21). Οι αποικίες εμφανίστηκαν μετά από 5-6 ημέρες επώασης στους 30°C. Η συχνότητα σύζευξης υπολογίστηκε  $\sim 5 \times 10^{-6}$  (Πίνακας 23, σελ. 222).



**Σ χ ή μ α 58.** Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2 υπό μη επιλεκτικές συνθήκες. (% των αποικιών *Z. mobilis*, ανθεκτικών στο αντιβιοτικό επιλογής του πλασμιδίου).

Η σταθερή κληρονόμηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA21 στα κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2, μελετήθηκε κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες. Για τον έλεγχο αυτό τέσσερις (4) μετασυζευγμένες αποικίες CU1Rif2/pDA21 αναπτύχθηκαν σε υγρό πλήρες θρεπτικό μέσο *Zyotomonas* απουσία του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη για περισσότερες από 150 κυτταρικές διαιρέσεις. Δείγματα λαμβάνονταν μετά από περιοδικά χρονικά

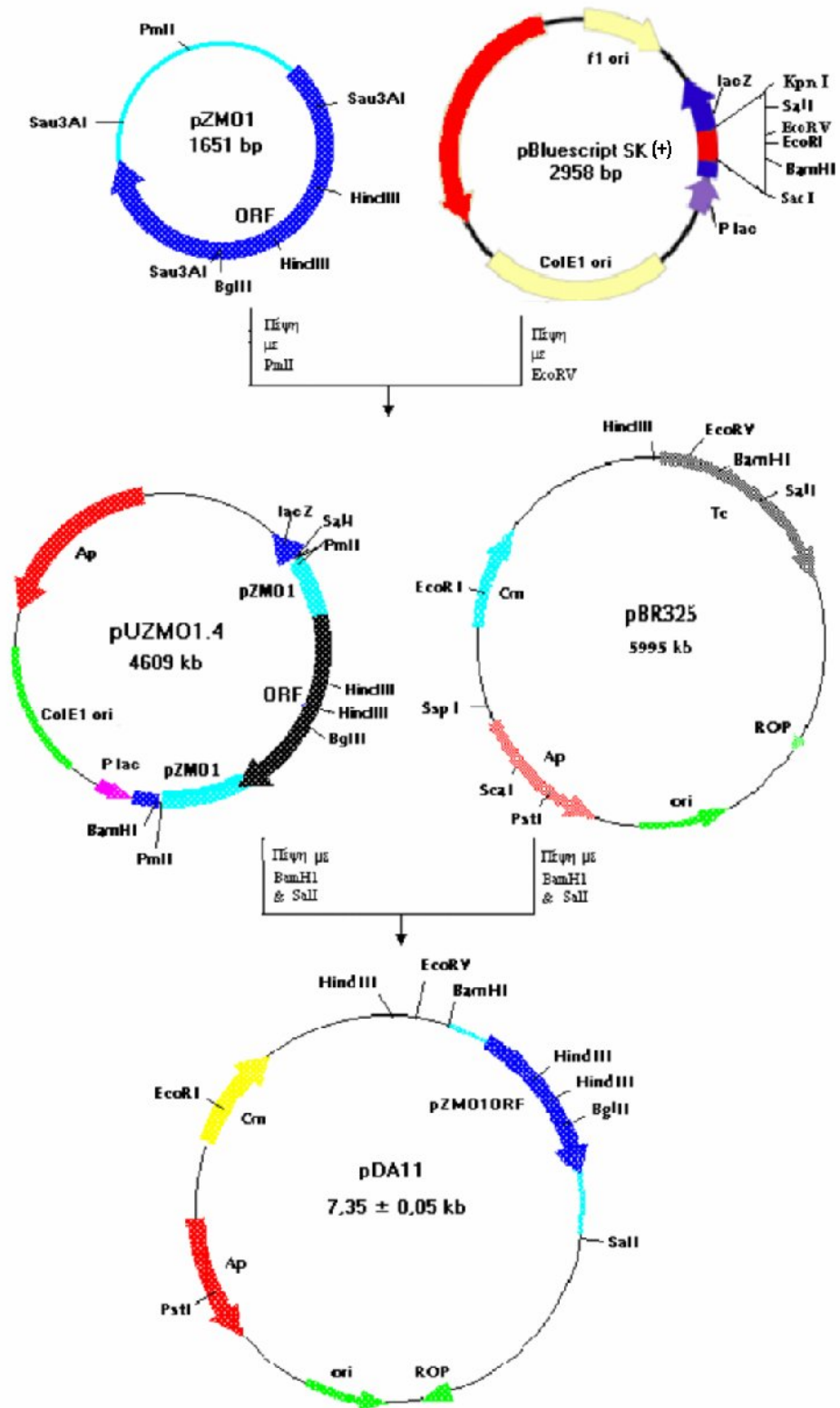
διαστήματα, και τα κύτταρα από την κατάλληλη αραίωση εμβολιάζονταν σε τρυβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό επιλογής του πλασμιδίου. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 30°C και οι αποικίες που προέκυπταν μεταφέρονταν αντιγραφικά μέσω βελούδων σε νέα τρυβλία επιλογής που περιείχαν Cm 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ο λόγος % των ανθεκτικών αποικιών προς το σύνολο των αποικιών αποτελεί το ποσοστό κληρονόμησης του πλασμιδίου. Η καμπύλη σταθερότητας που προέκυψε για τέσσερα (4) μετασυζευγμένα στελέχη CU1Rif2/pDA21 παρουσιάζεται στο **σχήμα 58**.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης, παρατηρήθηκε ότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21 παρουσίαζε εξαιρετικά μεγάλη σταθερότητα (άγγιζε το 90% ύστερα από 170 κυτταρικές διαιρέσεις), σε σύγκριση με το pBR325, γεγονός που αποδεικνύει ότι το κομμάτι του pZMO2 που υπάρχει υποκλωνοποιημένο στο pDA21, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην σταθερή κληρονόμηση και διατήρησή του στο *Z. mobilis* CU1Rif2.

## 9.2 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA11

Η ζώνη **a** της **εικόνας 4** στη σελίδα 152, αφού απομονώθηκε και καθαρίστηκε όπως περιγράφεται στη σελ. 107-109 του κεφαλαίου “Υλικά και Μέθοδοι”, ευθυγραμμίστηκε με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PmlI*. Αυτή τέμνει μόνο το pZMO1, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μη διακόπτεται κανένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, ούτε τις πιθανές περιοχές μορίων-υποκινητών ή *SSO* και *DSO*, όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τους Arvanitis *et al.*, 2000. Το κομμάτι pZMO1/*PmlI* εισήχθη με επανασύνδεση απότομων άκρων στη θέση *EcoRV* του πλασμιδιακού φορέα pBluescript. Έτσι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUZMO1.4. Απ’ αυτό, με διπλή πέψη εξήχθη το κομμάτι *BamHI/SalI*, το οποίο και πάλι περιείχε βέβαια άθικτο το pZMO1 και επανασυνδέθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του pBR325. Έτσι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA11 με μέγεθος  $7,35 \pm 0,5$  kb (**Σχήμα 59**), που φέρει γενετικούς δείκτες αντοχής στη χλωραμφαινικόλη (Cm<sup>R</sup>) και στην αμικικιλίνη (Ap<sup>R</sup>).

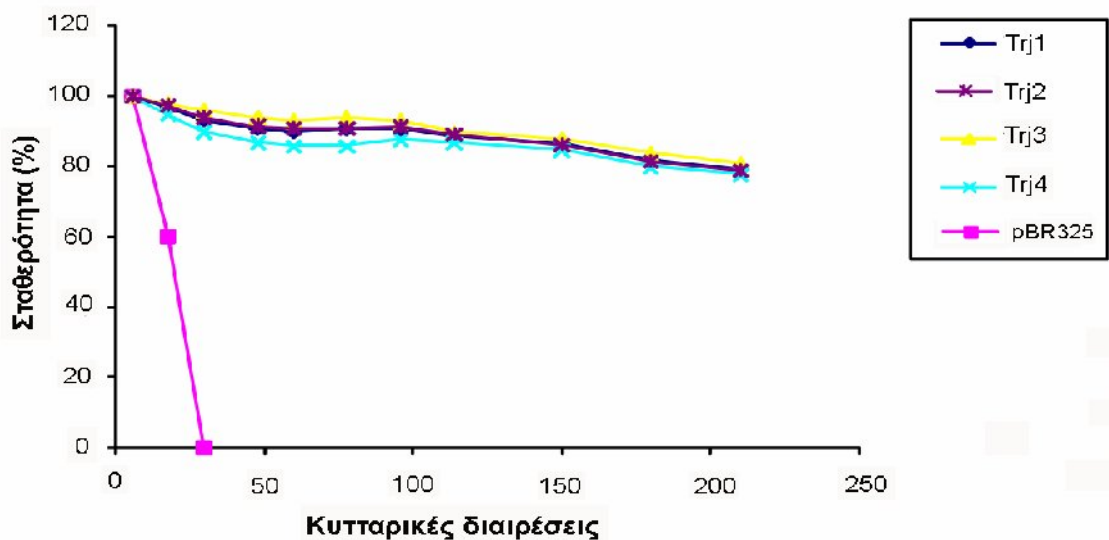




**Σχήμα 59.** Υποκλωνοποίηση του πλασμιδίου pZM01 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11.

### 9.2.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11 σε κύτταρα *Z. mobilis*

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA11 μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 σύμφωνα με τη με την μέθοδο επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης (σελ. 88-89). Ως στέλεχος-δότης χρησιμοποιήθηκε το *E. coli* DH5α που περιείχε το pDA11 και το *E. coli* DH5α που περιείχε το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013. Η επιλογή των μετασυζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία πλήρους θρεπτικού μέσου *Zyotomonas* (Z.B.), που περιείχαν Rif 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (για αποκλεισμό των δοτών) και Cm 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (που είναι ο δείκτης ανθεκτικότητας του πλασμιδίου pDA11). Οι αποικίες εμφανίστηκαν μετά από 5-6 ημέρες επώασης στους 30°C. Η συχνότητα σύζευξης υπολογίστηκε  $\sim 4 \times 10^{-6}$  (Πίνακας 23, σελ. 222).

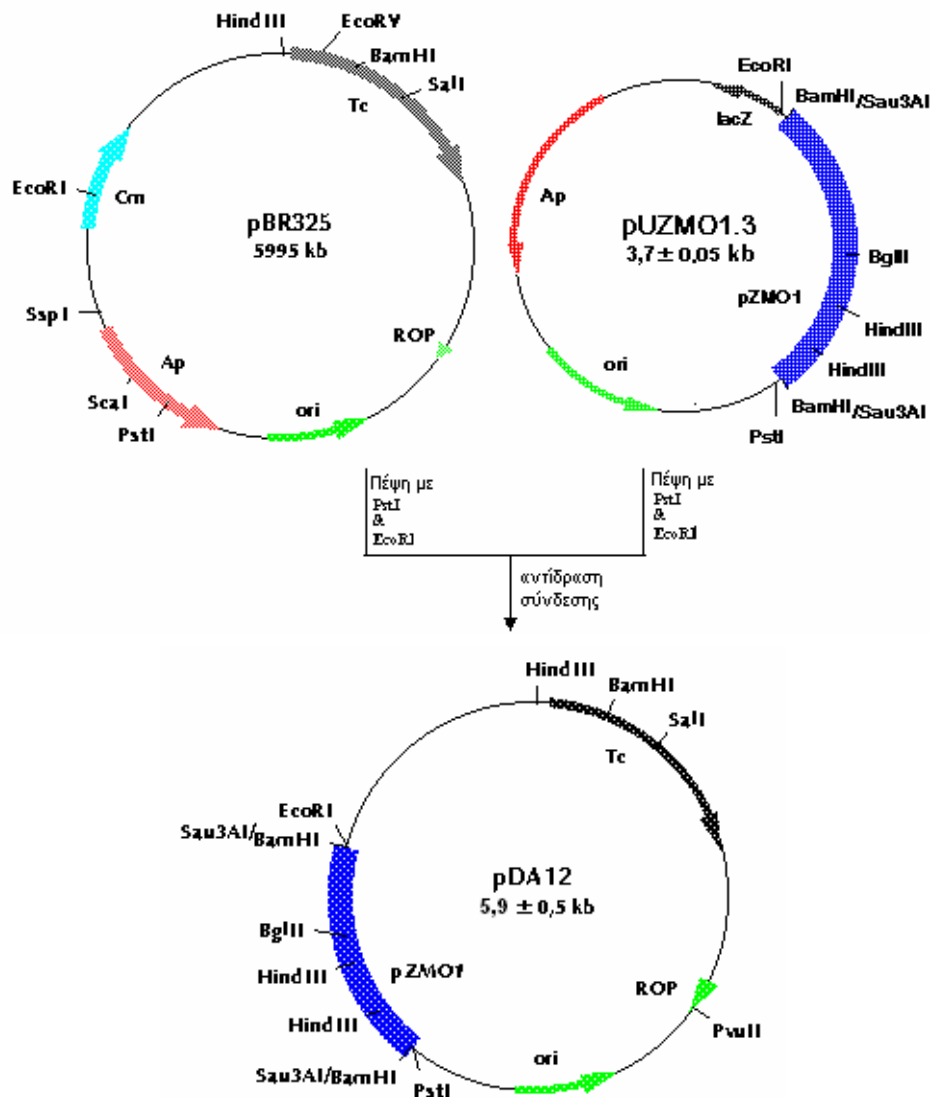


**Σχήμα 60.** Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2 υπο μη επιλεκτικές συνθήκες. (% των αποικιών *Z. mobilis*, ανθεκτικών στο αντιβιοτικό επιλογής του πλασμιδίου).

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA11 έγιναν συνεχείς ανακαλλιέργειες τεσσάρων μετασυζευγμένων (4) αποικιών CU1Rif2, κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες, με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για το pDA21. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις καμπύλες του Σχήματος 60. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το pDA11 παρουσίασε επίσης μεγάλη σταθερότητα (πάνω από 80% ύστερα από 200 κυτταρικές διαιρέσεις).

### 9.3 Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA12

Το ανασυνδυασμένο μόριο pUZMO1.3 (Σχήμα 41) υπέστη διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Pst*I και *Eco*RI και το γραμμικό μόριο που προέκυψε και που περιέχει το pZMO1, υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδιακού φορέα pBR325. Έτσι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA12, με μέγεθος  $5,9 \pm 0,5$  kb (Σχήμα 61), που φέρει το γενετικό δείκτη ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη ( $Tc^R$ ).

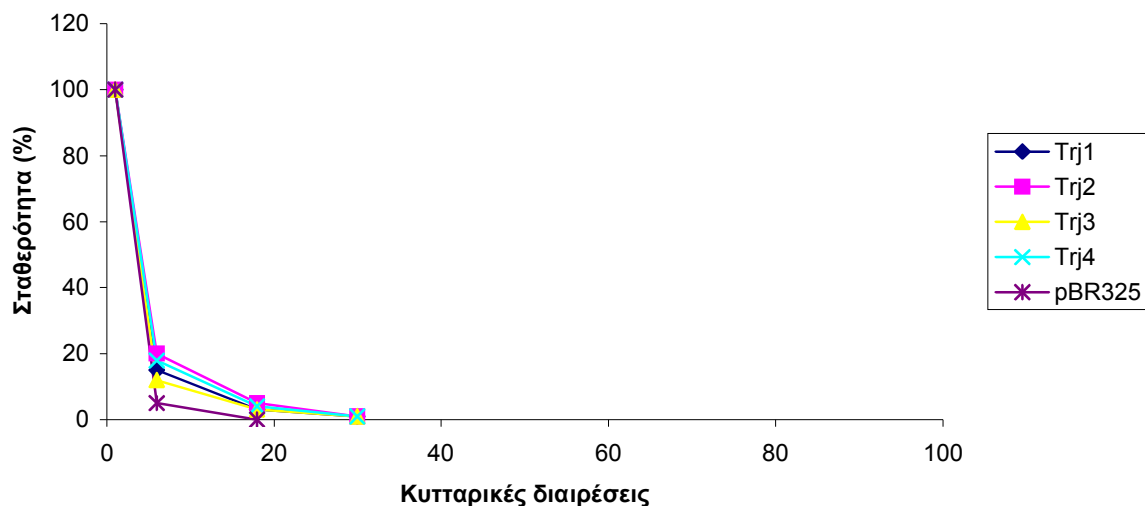


**Σχήμα 61.** Υποκλωνοποίηση μέρους του πλασμιδίου pZMO1 στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 και κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12.

Το κομμάτι του pZMO1 που είναι υποκλωνοποιημένο στο pDA12 περιέχει το μεγαλύτερο μέρος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (δεν περιέχει το N-τελικό άκρο), πλαίσιο που διακόπτεται στο ανασυνδυασμένο πλασμιδίο pDS191, ενώ δεν περιλαμβάνει τις πιθανές περιοχές μορίων-υποκινητών, ούτε το τμήμα με τις πιθανές SSO και DSO, όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τους Arvanitis *et al.*, 2000.

### 9.3.1 Μεταφορά και σταθερότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12 σε κύτταρα *Z. mobilis*

Το ανασυνδυασμένο πλασμιδίο pDA12 μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 σύμφωνα με τη με την μέθοδο επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης (σελ. 88-89). Ως στέλεχος-δότης χρησιμοποιήθηκε το *E. coli* DH5α που περιείχε το pDA12 και το *E. coli* DH5α που περιείχε το συζευκτικό πλασμιδίο pRK2013. Η επιλογή των μετασυζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία πλήρους θρεπτικού μέσου *Zyotomonas* (Z.B.), που περιείχαν Rif 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (για αποκλεισμό των δοτών) και Tc 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (που είναι ο δείκτης ανθεκτικότητας του πλασμιδίου pDA12).



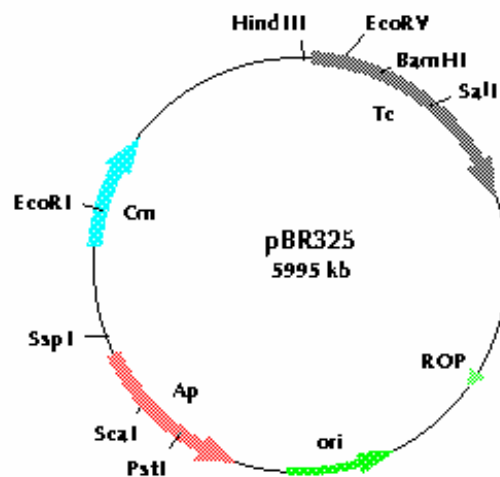
**Σ γ ή μ α 62.** Καμπύλες σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12 και του pBR325 σε μετασυζευγμένα κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2 υπο μη επιλεκτικές συνθήκες. (%των αποικιών *Z. mobilis*, ανθεκτικών στο αντιβιοτικό επιλογής του πλασμιδίου).

Οι αποικίες εμφανίστηκαν μετά από 6-7 ημέρες επώασης στους 30°C. Η συχνότητα σύζευξης υπολογίστηκε  $\sim 2 \times 10^{-6}$  (Πίνακας 23, σελ. 222).

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12 έγιναν συνεχείς ανακαλλιέργειες τεσσάρων μετασυζευγμένων (4) αποικιών CU1Rif2, κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες, με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για pDA21. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις καμπύλες του Σχήματος 62. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το pDA11 παρουσίασε μικρή σταθερότητα (<20% ύστερα από 10 κυτταρικές διαιρέσεις), ενώ χανόταν ύστερα από τις 30 κυτταρικές διαιρέσεις.

#### 9.4 Μεταφορά του πλασμιδίου pBR325

Το πλασμίδιο pBR325 μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 με συχνότητα  $1 \times 10^{-6}$  μετασυζευγμένων κυττάρων ανά ολικό αριθμό δεκτών. Η επιλογή των μετασυζευγμένων αποικιών έγινε σε πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο *Zymomonas* (Z.B.) το οποίο περιείχε  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  χλωραμφαικόλης (για την επιλογή του pBR325) και  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ριφαμπικίνης (για τον αποκλεισμό των δοτών). Μετά από επώαση 5-6 ημερών στους 30°C εμφανίστηκαν μετασυζευγμένες αποικίες.



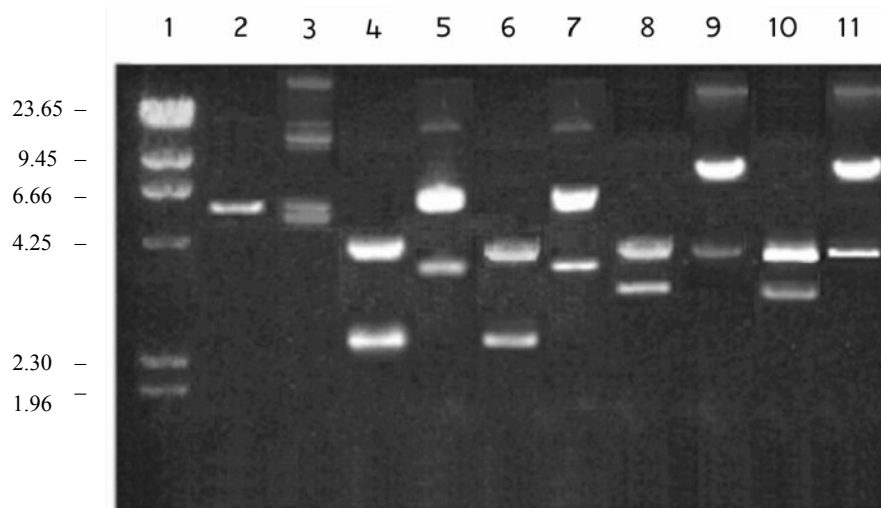
Όσον αφορά την μεταφορά και τη σταθερότητά του σε κύτταρα *Z. mobilis*, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε και στις περιπτώσεις των pDA21 και pDA11, pDA12. Εντούτοις, απομόνωση των πλασμιδιακών εκχυλισμάτων αποικιών μετά από 10 κυτταρικές διαιρέσεις και προσπάθεια επαναμετασχηματισμού του στελέχους

*E. coli* DH5α, δεν απέδωσε. Η επιλογή των αποικιών έγινε σε  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Tc και σε  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Cm.

### **9.5 Δομική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12 σε μετασυζευγμένα κύτταρα CU1Rif2**

Η δομική ανάλυση των πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12 προαπαιτούσε το διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα φυσικά πλασμίδια που περιέχονται στο CU1Rif2. Αυτό ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθεί με ηλεκτροφόρηση του ολικού πλασμιδιακού εκχυλίσματος σε πήκτωμα αγαρόζης και κατόπιν παραλαβή των ζωνών που αντιστοιχούσαν στα πλασμίδια αυτά, μιας και δεν ήταν ξεκάθαρο ποιες ακριβώς ήταν οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στα εν λόγω πλασμίδια.

Το πρόβλημα αυτό παρακάμφθηκε απομονώνοντας πλασμιδιακά εκχυλίσματα από έξι μετασυζευγμένες αποικίες (δύο για κάθε πλασμίδιο), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για επαναμετασχηματισμό (back transformation) κυττάρων του στελέχους DH5α του *E. coli*. Τα μετασχηματισμένα στελέχη επελέγησαν με βάση την ανθεκτικότητα σε χλωραμφαινικόλη, που είναι δείκτης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21 και pDA11 και σε τετρακυκλίνη που είναι δείκτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pDA12. Με το δεδομένο ότι το στέλεχος DH5α είναι ευαίσθητο τόσο στη τετρακυκλίνη όσο και στη χλωραμφαινικόλη, οποιαδήποτε αντοχή των αποικιών που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό, στο αντίστοιχο αντιβιοτικό, ήταν αναμενόμενο να οφείλονταν στην ύπαρξη των πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12. Στη συνέχεια απομονώθηκε εκ νέου το πλασμιδιακό περιεχόμενο (Υλικά & Μέθοδοι, σελ. 96-99) από δεκαπέντε (15) ανθεκτικές στα αντίστοιχα αντιβιοτικά, επαναμετασχηματισμένες αποικίες DH5α (5 για το κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο). Περιοριστική ανάλυση των δειγμάτων έδειξε ότι τα κύτταρα αυτά περιείχαν πλασμίδια ίδια μορφής με τις πρότυπες κατασκευές pDA21, pDA11 και pDA12 που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά τους στο CU1Rif2. Περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων αυτών, των αντίστοιχων προτύπων τους καθώς και του πλασμιδιακού φορέα pBR325 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13**.

**Εικόνα 13.**

Περιοριστική ανάλυση του πλασμιδιακού φορέα pBR325 και των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21 και pDA11 από στελέχη επαναμετασηματισμένα με το πλασμιδιακό εκχύλισμα μετασυζευγμένων στελεχών CU1Rif2/pDA21, CU1Rif2/pDA11 και CU1Rif2/pDA12.

Απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA μετασυζευγμένων στελεχών μετά από 170 κυτταρικές διαιρέσεις και χρησιμοποιήθηκε για επαναμετασηματισμό του στελέχους DH5α. Επελέγησαν τα μετασηματισμένα στελέχη με βάση την ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη. Απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και υπέστησαν διπλή πέψη με τις ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *PstI*. Τα προϊόντα της πέψης συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα προϊόντα των πρότυπων pDA21 και pDA11.

Διαδρομές:

12. λ DNA / *HindIII*
13. pBR325 / *EcoRI*
14. pBR325
15. pDA21α / *EcoRI* & *SalI*
16. pDA21α
17. pDA21β / *EcoRI* & *SalI*
18. pDA21β
19. pDA11α / *EcoRI* & *SalI*
20. pDA11α
21. pDA11β / *EcoRI* & *SalI*
22. pDA11β

α: πρότυπα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

β: ανασυνδυασμένα πλασμίδια προερχόμενα από μετασυζευγμένα στελέχη *Z. mobilis* και απομονωθέντα από επαναμετασηματισμένα στελέχη *E.coli*.

**Πίνακας 23.** Συνοπτική περιγραφή των συζεύξεων *E. coli* x *Z. mobilis* και της σταθερότητας των μεταφερομένων πλασμιδίων

Στέλεχος δότης	Στέλεχος δέκτης	Μέσο επιλογής	Χρόνος επώασης	Συχνότητα σύζευξης	Δομή πλασμιδίου	Σταθερότητα πλασμιδίου
<i>E. coli</i> DH5α (pDA21) X	<i>Z. mobilis</i> CU1Rif2	Cm + Rif	5-6 ημέρες	$5 \times 10^{-6}$	σταθερή	Σταθερή κληρονόμηση (>90 % μετά από 170 κυτ. διαιρέσεις)
<i>E. coli</i> DH5α (pDA12) X	<i>Z. mobilis</i> CU1Rif2	Tc + Rif	7 ημέρες	$2 \times 10^{-6}$	σταθερή	Χάνεται σχεδόν αμέσως (<20 % μετά από 10 κυτ. διαιρέσεις)
<i>E. coli</i> DH5α (pDA11) X	<i>Z. mobilis</i> CU1Rif2	Cm + Rif	5-6 ημέρες	$4 \times 10^{-6}$	σταθερή	Σταθερή κληρονόμηση (>80 % μετά από 200 κυτ. διαιρέσεις)
<i>E. coli</i> DH5α (pBR325) X	<i>Z. mobilis</i> CU1Rif2	Cm + Rif	5-6 ημέρες	$< 10^{-8}$	–	Χάνεται αμέσως



# ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Διαρκής επιδίωξη της σύγχρονης Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας είναι η αναζήτηση νέων φυσικών στελεχών. Στη Βιομηχανία συνήθως η αναζήτηση αυτή στηρίζεται σε κάποια ιδιότητα που προσελκύει το βιομηχανικό ενδιαφέρον και η οποία μπορεί να αφορά είτε κάποιο προϊόν, είτε την ανάπτυξη και μεταβολισμό διαφόρων υποστρωμάτων κάτω από διάφορες φυσικές ή τεχνητές ακραίες ή μη συνθήκες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας νέος μικροοργανισμός που ανακαλύπτεται γίνεται αντικείμενο έντονης βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας, τελικός σκοπός της οποίας είναι η δημιουργία ενός νέου βελτιωμένου στελέχους, που να ανταποκρίνεται καλύτερα από το φυσικό στέλεχος στις απαιτήσεις της συγκεκριμένης βιομηχανικής εφαρμογής. Προγράμματα βελτίωσης στελεχών έχουν εφαρμοστεί σχεδόν για όλους τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται σήμερα στη Βιομηχανία. Τα προγράμματα αυτά βασίζονται κυρίως στη σύγχρονη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Είναι επομένως αναγκαίο να μελετάται η δομή και ο μεταβολισμός του DNA κάθε νέου οργανισμού καθώς επίσης και ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να επιτευχθούν παρεμβάσεις προς την έκφραση νέων ή ενισχυμένων ιδιοτήτων.

Εκτός από τη βελτίωση με στόχο την καλύτερη παραγωγικότητα ή προσαρμοστικότητα του μικροοργανισμού στις βιομηχανικές απαιτήσεις, υπάρχει μία ακόμη αναγκαιότητα: η γνώση της συμπεριφοράς του στο περιβάλλον, αν για οποιοδήποτε λόγο μεγάλοι πληθυσμοί κυττάρων βρεθούν από ατύχημα ή από πρόθεση σ' αυτό. Μεταξύ των ερωτημάτων που τίθενται σε τέτοιες περιπτώσεις είναι τα εξής: Θα επικρατήσει ο πληθυσμός αυτός σε βάρος των φυσικών πληθυσμών; Το γενετικό υλικό του

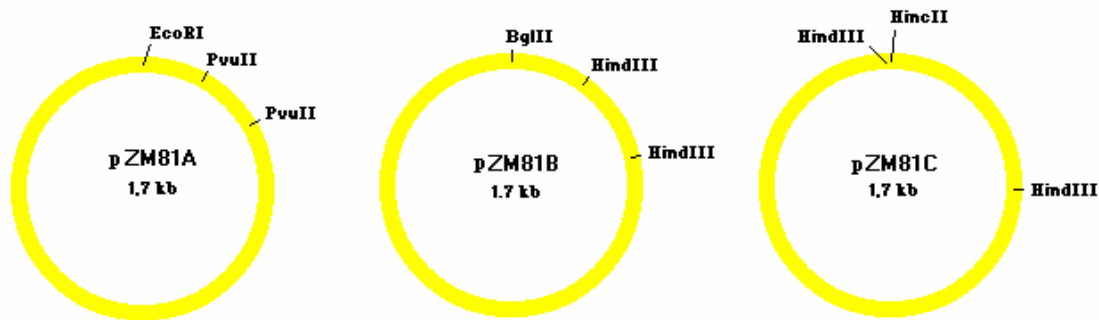
μικροοργανισμού είναι σταθερό ή όχι; Έχει κινητικότητα; Θα επηρεάσει ή όχι το φυσικό γονιδιακό φορτίο; Τα ερωτήματα αυτά είναι σημαντικά. Αφορούν ζητήματα εκτεταμένων κινδύνων και θα πρέπει να απαντώνται σε κάθε περίπτωση που επιδιώκεται η χρήση ενός νέου γενετικά βελτιωμένου οργανισμού σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (Drainas, 1992). Με βάση τα παραπάνω είναι πλέον αυτονόητο ότι είναι απαραίτητη η μελέτη της γενετικής οποιουδήποτε οργανισμού προορίζεται για βιομηχανικές εφαρμογές.

### **10.1 Ανάλυση και λειτουργία των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 του στελεχούς ATCC 10988 του *Z. mobilis***

Όταν ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του '80 από διάφορους ερευνητές η μελέτη των πλασμιδίων του *Z. mobilis* στόχευε στην ταξινόμηση των ποικίλων στελεχών του *Z. mobilis* ανάλογα με το πλασμιδιακό τους περιεχόμενο και στη χρήση των πλασμιδίων ως εργαλείων για την γενετική του βελτίωση. Όσον αφορά στο στέλεχος ATCC 10988, το οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο, το σύνολο των ερευνητικών ομάδων είχε εντοπίσει ένα ή περισσότερα πλασμίδια μεγέθους 1,5 έως 2 kb. (Πίνακας 7, σελ. 67).

Πιο συγκεκριμένα, στις αρχικές εργασίες αναφερόταν μόνο ένα πλασμίδιο (Dally *et al.*, 1982; Tonomura *et al.*, 1982; Skotnicki *et al.*, 1984), η περιοριστική ανάλυση του οποίου προσδιόριζε μία θέση περιορισμού για τις ενδονουκλεάσες *EcoRV*, *HindIII* και *Sau3AI* αλλά καμία για την *EcoRI*. Οι εργασίες αυτές βασίστηκαν μόνο σε ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης, κατά την οποία δεν είναι δυνατό να διακριθούν πλασμίδια του ίδιου μοριακού βάρους, καθώς αυτά συμμεταναστεύουν στην ίδια ζώνη. Γενικά τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών προήλθαν από μάλλον σύντομες έρευνες που δεν κατόρθωσαν να εντοπίσουν μέσα στη ζώνη με το μικρότερο μοριακό βάρος την ύπαρξη περισσότερων του ενός πλασμιδιακών μορίων.

Αντίθετα η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε την ύπαρξη δύο πλασμιδίων με μικρή διαφορά μεγέθους 1,6 και 1,9 kb (Drainas *et al.*, 1984). Την ίδια εποχή άλλοι ερευνητές, με διαφορετική προσέγγιση, έκαναν λεπτομερή περιοριστική ανάλυση της δέσμης του πλασμιδιακού εκχυλίσματος με το μικρότερο μοριακό βάρος. Εντοπίστηκαν έτσι τρία διαφορετικά πλασμίδια με το ίδιο μοριακό βάρος (1,7 kb), τα οποία ονομάστηκαν pZM81A, pZM81B και pZM81C (Σχήμα 63) και κατασκευάστηκαν οι περιοριστικοί τους χάρτες (Misawa *et al.*, 1985).



**Σχήμα 63.** Περιοριστικοί χάρτες των τριών πλασμιδίων 1.7 kb που εντοπίστηκαν από τους Misawa *et al.*, 1985 στο στέλεχος ATCC 10988.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το pZM81A έχει μία περιοριστική θέση *EcoRI* και δύο περιοριστικές θέσεις *PvuII*. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτά με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής και ύστερα από την εύρεση της αλληλουχίας του pZMO2 (Σχήμα 56, σελ. 207-209), φαίνεται ότι το pZM81A αντιστοιχεί στο pZMO2. Στο ίδιο συμπέρασμα είχε καταλήξει και το εργαστήριό μας από παλαιότερα αποτελέσματα, με τη διαφορά ότι υπήρχε μία διαφοροποίηση στο M.B. του συγκεκριμένου πλασμιδίου κατά 0,15 kb (Σκορδάκη 1990, Διδακτορική διατριβή).

Ανάλογα, σύμφωνα πάντα με τους Misawa *et al.*, 1985, το pZM81B έχει μία περιοριστική θέση *BglII* και δύο περιοριστικές θέσεις *HindIII*, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το pZM81B αντιστοιχεί στο pZMO1. Αυτό επιβεβαιώθηκε επίσης με την εύρεση την αλληλουχίας του pZMO1 (Arvanitis *et al.*, 2000) αλλά και προθύστερα με την περιοριστική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUZMO1.1 και pUZMO1.2 όπως παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή. Να σημειωθεί εδώ ότι η δεύτερη θέση *HindIII* δεν κατέστη δυνατόν να εντοπιστεί προηγούμενα ούτε από το εργαστήριό μας, αλλά ούτε από άλλους ερευνητές, προφανώς λόγω του πολύ μικρού M.B. της ζώνης που προκύπτει. Το πλασμίδιο pZM81C το οποίο έχει δύο θέσεις περιορισμού για την *HindIII* και μια για την *HincII*, δεν αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας της παρούσας διατριβής, μιας και δεν επιτεύχθηκε ο εντοπισμός του.

Το πλασμίδιο μεγέθους 1,5 kb που απομονώθηκε από τους Skotnicki *et al.*, (1984) βρέθηκε ότι υβριδίζει ισχυρά με πλασμίδια παρόμοιου μεγέθους άλλων στελεχών του *Z. mobilis*. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε και με πειράματα στο Εργ. Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τα οποία τα πλασμίδια pZMO1 και pZMO2 υβριδίζουν

ισχυρά μεταξύ τους αλλά και με πλασμίδιο μικρού M.B. του στελέχους NCIB 11163, (Σκορδάκη 1990, Διδακτορική διατριβή). Από τα παραπάνω, αυτό που θα συμπεραίνει κανείς εκ πρώτης όψεως, είναι ότι τα πλασμίδια pZMO1 και pZMO2 παρουσιάζουν ομολογία νουκλεοτιδιακών βάσεων. Πράγματι, με την εύρεση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας των παραπάνω πλασμιδίων και την μεταξύ τους σύγκριση, βρέθηκε ότι το ποσοστό ομολογίας ανέρχεται στο 67 % (Arvanitis *et al.*, 2000). Το ποσοστό αυτό κρίνεται ως υψηλό ώστε να δικαιολογεί τον πολύ ισχυρό υβριδισμό μεταξύ τους, καθώς επίσης και το ότι συμεταναστεύουν κατά την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού εκχυλίσματος από *Z. mobilis* σε πήγμα αγαρόζης 0,8 % κ.β. (Scordaki & Drainas, 1987). Πολύ σημαντικό είναι δε και το χαρακτηριστικό ότι υπάρχει 100% ομολογία σε μία περιοχή 139 νουκλεοτιδίων, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι τα πλασμίδια αυτά έχουν προέλθει από ένα κοινό προγονικό πλασμίδιο, το οποίο να έχει υποστεί τροποποιήσεις και να έχει έτσι δημιουργήσει ακόμη και το τρίτο μικρό πλασμίδιο αυτό που οι Misawa *et al.*, το 1985 ονόμασαν pZM81C. Όσον αφορά δε τον ισχυρό υβριδισμό που αναφέρθηκε παραπάνω, με πλασμίδιο μικρού M.B. του στελέχους NCIB 11163, αυτός αποδείχτηκε ότι οφείλεται στο υψηλό ποσοστό ομοιότητας που παρουσιάζει το pZMO1 με το πλασμίδιο pZMN1-1 (GeneBank FN554922.1, Samaras *et al.*, 2009, Direct Submission) ή το pZMO1A (Genebank GQ293074, Watt & So, 1990, Direct Submission) του NCIB 11163, ποσοστό που αγγίζει το 96% και το 97% αντίστοιχα. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι το pZMO2 συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα πλασμίδια του ATCC 10988 παρουσιάζει ομοιότητα μόνο με μια συγκεκριμένη περιοχή του pZMOB05 (Acc. No. NCBI: NC\_017182.1, Pappas *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2860-2970 του πλασμιδίου αυτού, δείχνει ομοιότητα 82% με περιοχή 168 νουκλεοτιδίων της αντίστροφης και συμπληρωματικής αλυσίδας του pZMO2 και 84% με περιοχή επίσης 168 νουκλεοτιδίων του pZMO1. Και περισσότερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι περιοχές αυτές των pZMO1 και pZMO2, εμπεριέχουν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής των 139 νουκλεοτιδίων, στην οποία τα δύο αυτά πλασμίδια παρουσιάζουν ομοιότητα 100% όπως αναφέρθηκε πιο πάνω (Σχήμα 56, 207-209). Επίσης, το γεγονός ότι η περιοχή αυτή είναι τόσο καλά συντηρημένη στα τρία αυτά πλασμίδια, μπορεί να σημαίνει (i) ότι έχουν προέλθει και τα τρία από ένα κοινό προγονικό πλασμίδιο και, για να έχει συντηρηθεί τόσο καλά, ότι αποτελεί μια πολύ σημαντική περιοχή ή (ii) ότι επειδή το μονόκλωνο DNA που σχηματίζεται ως ενδιάμεσο της αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου, έχει

μεγάλη δυναμική ανασυνδυασμού, τμήματα DNA μπορούν να μετακινηθούν σε άλλα πλασμίδια (Seery et al., 1993).

Η λεπτομερής ανάλυση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας των pZMO1 και pZMO2, ανέδειξε επίσης την ύπαρξη ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) πάνω σ' αυτά, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά μόρια 384 αμινοξικών καταλοίπων και M.B. 41 kDa για το pZMO1 και 319 αμινοξικών καταλοίπων και M.B. 37 kDa για το pZMO2. Το επόμενο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της λειτουργίας τους. Πρώτη προσέγγιση του θέματος έγινε με τον έλεγχο της δυνατότητας κινητοποίησης των πλασμιδίων με τη βοήθεια συζευκτικών πλασμιδίων. Δημιουργήθηκαν έτσι κάποια προϊόντα σύντηξης των pZMO1 και pZMO2, όπου αυτά είχαν εισαχθεί σε διαφορετικές θέσεις και με διαφορετικούς προσανατολισμούς (pUZMO2.1, pUZMO2.2, pUZMO1.1, pUZMO1.2, pUZMO1.3). Όμως καμία κινητικότητα δεν ανιχνεύτηκε. Επομένως αποκλείστηκε το ενδεχόμενο τα ORFZMO2 και ORFZMO1 να είναι περιοχές υπεύθυνες για κινητικότητα των πλασμιδίων. Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανότητα τα ORFs να κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αντιγραφής. Στοιχισή των πρωτεϊνών αυτών με πρωτεΐνες Rep, έδειξε να παρουσιάζουν αξιόλογο ποσοστό ομοιότητας με πρωτεΐνες Rep, πλασμιδίων που είναι γνωστό ότι αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (**Σχήμα 54**, σελ. 196).

### 10.1.1 Μηχανισμός αντιγραφής του pZMO2 και περιοχές υπεύθυνες για την αντιγραφή του

Στηριζόμενοι στο παραπάνω έχουμε μια ένδειξη ότι τα πλασμίδια ότι τα πλασμίδια pZMO1 και pZMO2 να ακολουθούν τον μηχανισμό κυλιόμενου κύκλου για την αντιγραφή τους. Το γεγονός όμως ότι ανιχνεύτηκε, με πειράματα υβριδισμού, μονόκλωνο DNA μόνο του pZMO2 (Arvanitis *et al.*, 2000), υποστηρίζει την υπόθεση ότι μόνο το pZMO2 αντιγράφεται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου ή ότι το ssDNA του pZMO2 που συσσωρεύεται μέσα στα κύτταρα είναι σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες απ' ότι αυτό του pZMO1. Τέλος, η εύρεση χαρακτηριστικών περιοχών **DSO** και **SSO** όπως αυτές προβλέφθηκαν από την ανάλυση των αλληλουχιών των πλασμιδίων (Arvanitis *et al.*, 2000), ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο την άποψη ότι τα πλασμίδια αυτά (ή τουλάχιστον το pZMO2) χρησιμοποιούν τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου για την αντιγραφή τους.

Πλασμίδια που αντιγράφονται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου κατ' αρχήν ανακαλύφθηκαν στο *Staphylococcus aureus* (Khan & Novick, 1983). Σήμερα έχουν περιγραφεί τέτοια πλασμίδια σε μεγάλο αριθμό Gram<sup>+</sup> βακτηρίων όπως *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* και *Streptomyces* (Khan, 1997). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δεν είναι τα πρώτα που αναφέρουν για μηχανισμό κυλιόμενου κύκλου σε πλασμίδια προερχόμενα από Gram<sup>-</sup> βακτήρια. Κατά το παρελθόν είχαν απομονωθεί πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό αυτό και από άλλα Gram<sup>-</sup> βακτήρια ή κυανοβακτήρια όπως *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides*, *Helicobacter pylori*, *Selenomonas ruminantium*, *Shingella sonnei* (Kleanthous *et al.*, 1991; Yasukawa *et al.*, 1991; Yang & McFadden, 1993; Smith *et al.*, 1995; Khan 1997). Η ποικιλότητα των RC πλασμιδίων είναι επίσης φανερή και από το γεγονός ότι μερικά πλασμίδια έχουν αναφερθεί και στα Αρχαία (Erauso *et al.*, 1996).

Τα διάφορα πλασμίδια αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου διακρίνονται τουλάχιστον σε 5 ομάδες, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 24**, ανάλογα με την ομολογία που παρουσιάζουν στις πρωτεΐνες Rep και στις περιοχές έναρξης της αντιγραφής **DSO** (double strand origins). Τα πλασμίδια που δεν ανήκουν σε καμία από τις 5 ομάδες σχηματίζουν την ομάδα “Άλλα RC πλασμίδια”.

**Πίνακας 24.** Βακτηριακά πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (Khan, 1997).

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Γονίδιο ανθεκτικότητας	Κύτταρο-ξενιστής
<b>pT181</b>			
pT181	4.4	Tc	<i>Staphylococcus aureus</i>
pC221	4.6	Cm	<i>Staphylococcus aureus</i>
pC223	4.6	Cm	<i>Staphylococcus aureus</i>
pCW7	4.2	Cm	<i>Staphylococcus aureus</i>
pHD2	2.1	Cryptic	<i>Bacillus thuringiensis</i>
pLUG10	3.1	Cd	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
pOg32	2.5	Cryptic	<i>Leuconostoc oenos</i>
pS194	4.4	Sm	<i>Staphylococcus aureus</i>
pT127	4.4	Tc	<i>Staphylococcus aureus</i>
pTZ12	2.5	Cm	<i>Corynebacterium xenosis</i>
pUB112	4.1	Cm	<i>Staphylococcus aureus</i>



Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Γονίδιο ανθεκτικότητας	Κύτταρο-ξενιστής
<b>pE194/pLS1</b>			
pE191	3.7	Em	<i>Staphylococcus aureus</i>
pA1	2.8	Cryptic	<i>Lactobacillus plantarum</i>
pC1305	8.7	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
pCI411	2.9	Cryptic	<i>Leuconostoc lactis</i>
pFX2	2.5	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
pKMK1	1.9	Cryptic	<i>Mycoplasma mycoides</i>
pLS1 (pMV158)	5.5	Tc	<i>Streptococcus agalactiae</i>
pSH71	2.1	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
pWV01	3.3	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>pC194/pUB110</b>			
pC194	2.9	Cm	<i>Staphylococcus aureus</i>
pAMa1	9.6	Tc	<i>Streptococcus faecalis</i>
pBAA1	6.8	Cryptic	<i>Bacillus subtilis</i>
pBC1	1.6	Cryptic	<i>Bacillus coagulans</i>
pBC16	4.6	Tc	<i>Bacillus cereus</i>
pBS2	2.3	Cryptic	<i>Bacillus subtilis</i>
pCA2.4	2.4	Cryptic	<i>Synechocystis</i> strain PCC
pCB101	6.0	Cryptic	<i>Clostridium butyricum</i>
pCB2.4	2.3	Cryptic	<i>Synechocystis</i> strain PCC
pCC5.2	5.2	Cryptic	<i>Synechocystis</i> strain PCC
pFTB14	8.2	Cryptic	<i>Bacillus liquefaciens</i>
pGT5	3.4	Cryptic	<i>Pyrococcus abyssi</i>
pJDB14	2.5	Cryptic	<i>Selenomonas ruminantium</i>
pKYM	2.1	Cryptic	<i>Shingella sonnei</i>
pLAB1000	3.3	Cryptic	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
pLP1	2.1	Cryptic	<i>Lactobacillus plantarum</i>
pOX6	3.2	Cd	<i>Staphylococcus aureus</i>
pRBH1 (pTB19)	1.75	Km	Bacilli
pSH1451	6.1	Salt	<i>Bacillus pumilus</i>
pSN1981	4.9	Tc	<i>Bacillus subtilis</i>
pUB110	4.5	Km	<i>Staphylococcus aureus</i>
pWC1	2.8	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
pWGB32	2.4	Smr	<i>Staphylococcus aureus</i>
p353-2	2.4	Cryptic	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<b>pSN2</b>			
pSN2	1.3	Cryptic	<i>Staphylococcus aureus</i>
pBI143	2.7	Cryptic	<i>Bacteroides fragilis</i>
pE5	2.1	Em	<i>Staphylococcus aureus</i>
pE12	2.2	Em	<i>Staphylococcus aureus</i>
pIM13	2.1	Em	<i>Bacillus subtilis</i>
pNE131	2.1	Em	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
pT48	2.1	Em	<i>Staphylococcus aureus</i>

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Γονίδιο ανθεκτικότητας	Κύτταρο-ξενιστής
pTCS1	1.3	Cryptic	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>pIJ101/pJV1</b>			
pIJ101	8.6	Cryptic	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
pBL1	4.5	Cryptic	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
pJV1	10.5	Cryptic	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
pSG5	3.3	Cryptic	<i>Streptomyces ghanaensis</i>
pSN22	11.0	Cryptic	<i>Streptomyces nigrifaciens</i>
<b>Άλλα</b>			
pC1305	8.7	Cryptic	<i>Lactococcus lactis</i>
pG12	9.7	Cryptic	<i>Bacillus thuringiensis</i>
pGRB1	1.7	Cryptic	<i>Halobacterium strain GRB</i>
pHPK255	1.5	Cryptic	<i>Helicobacter pylori</i>
pTX14-1	5.4	Cryptic	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Cm: χλωραμφαινικόλη, Cd: κάδμιο, Em: ερυθρομυκίνη, Km: καναμυκίνη, Sm: στρεπτομυκίνη, Smr: πολυανθεκτικότητα Σταφυλοκόκκων (staphylococcal multidrug resistance), Tc: τετρακυκλίνη.

Αν επιχειρούσε κανείς να περιγράψει πολύ περιληπτικά τη δράση της πρωτεΐνης Rep σε τέτοια συστήματα, θα μπορούσε να πει ότι αυτή προσδένεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής της διπλής αλυσίδας (**DSO**) και τέμνει τη μία αλυσίδα του DNA σε ειδική ακολουθία-στόχος (bind and nick region) ώστε να παραχθεί ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο, το οποίο και χρησιμοποιείται σαν εκκινήτης για τη σύνθεση της προπορευόμενης αλυσίδας. Στη συνέχεια “επιστρατεύονται” πρωτεΐνες αντιγραφής του ξενιστή όπως DNA ελικάση, μονοκλωνο-προσδετική πρωτεΐνη (SSB protein) και DNA πολυμεράση III, αρχίζουν να προεκτείνουν το DNA από το 3'-OH άκρο και να εκτοπίζουν την πατρική αλυσίδα, δημιουργώντας ένα εκτοπισμένο μονόκλωνο DNA (ssDNA). Στο τέλος της αντιγραφής της πατρικής-προπορευόμενης αλυσίδας, η ίδια πρωτεΐνη Rep αναγνωρίζει πάνω σ' αυτή μία αλληλουχία τερματισμού, η οποία επικαλύπτει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής, ξανατέμνει τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA και συνδέει τα άκρα του ελεύθερου μονόκλωνου DNA για να δημιουργηθεί έτσι ένα μονόκλωνο κυκλικό πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό με τη σειρά του, μετατρέπεται από παράγοντες του κυττάρου-ξενιστή (DNA πολυμεράση I, DNA πολυμεράση III) σε δίκλωνο πλασμδιακό μόριο χρησιμοποιώντας μία άλλη περιοχή αντιγραφής του πλασμιδίου, τη λεγόμενη “περιοχή αντιγραφής της μονόκλωνης αλυσίδας (**SSO**)” (Gruss & Ehrlich, 1989). Το δίκλωνο πλέον

νέο μόριο επανασυνδέεται και υπερσπειρώνεται με τη DNA λιγάση και DNA γυράση επίσης του ξενιστή. Αντίστοιχη είναι και η τύχη της καθυστερούσας αλυσίδας (**Σχήμα 6**, σελ. 11).

Στο μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου, οι πρωτεΐνες Rep παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη και τον τερματισμό της αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα, στην υποτιθέμενη ενεργή περιοχή τους υπάρχουν συντηρημένα τα αμινοξέα τυροσίνη και λυσίνη. Αυτό παρατηρείται τόσο στις πρωτεΐνες Rep πλασμιδίων των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων όσο και σ' αυτές των πλασμιδίων pCA2.4 και pKYM Gram<sup>-</sup> βακτηρίων καθώς και σε αντίστοιχες πρωτεΐνες των φάγων φX174 και G4 για τους οποίους έχει βρεθεί ότι αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου (Yang & McFadden, 1993). Η τυροσίνη είναι αυτή που κόβει την αλυσίδα του DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό μ' αυτό (del Solar *et al.*, 1998). Οι Yasukawa *et al.*, το 1991 απέδειξαν ότι ειδικά για το πλασμίδιο pKYM η τυροσίνη είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης Rep με το DNA μιας και η αντικατάστασή της από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη καθιστούσε την πρωτεΐνη Rep ανίκανη να δημιουργήσει 3'-OH με αποτέλεσμα την αδυναμία αντιγραφής του πλασμιδίου. Στο πρωτεϊνικό μόριο του ORFZMO2, ύστερα από στοίχιση με πρωτεΐνες αντιγραφής της ομάδας pC194/pUB100, βρέθηκαν τρεις πολύ καλά συντηρημένες περιοχές (**Σχήμα 54**, σελ. 196). Η μία από αυτές (motif 3) είναι αυτή που περιέχει το αμινοξύ τυροσίνη-254.

Από τη στοίχιση της αλληλουχίας με βάσεις δεδομένων έχει βρεθεί ότι τα πλασμίδια προερχόμενα από Gram<sup>-</sup> βακτήρια (π.χ. pCA2.4, pKYM) ανήκουν στην ίδια ομάδα pC194/pUB110 (Khan, 1997). Οι πρωτεΐνες Rep των πλασμιδίων αυτών δεν παρουσιάζουν ομολογία με πρωτεΐνες Rep άλλων ομάδων πλασμιδίων κυλιόμενου κύκλου ούτε και με αντίστοιχες πρωτεΐνες πλασμιδίων που αντιγράφονται με τη θ-μορφή όπως τα pSC101, R6K και R1. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ORF του pZMO2, έδειξε σημαντική ομολογία με τις πρωτεΐνες Rep των πλασμιδίων pKYM (*Shingella sonnei*), pCA2.4 (*Synechocystis* sp.) και pGL2 (*Nostoc* sp.) ενώ με πρωτεΐνες Rep άλλων πλασμιδίων της ίδιας ομάδας προερχόμενα όμως από Gram<sup>+</sup> βακτήρια η ομολογία ήταν αρκετά χαμηλή.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πλασμίδια που έχουν ομόλογες πρωτεΐνες Rep συνήθως έχουν ομοιότητες στην αλληλουχία της **DSO** περιοχής (Gruss & Ehrlich, 1989). Για παράδειγμα, η συναινετική ακολουθία 5'-TTTCTTATCTTGATACTA υπάρχει στην

**DSO** περιοχή των πλασμιδίων της ομάδας pUB110 που προέρχονται από Gram<sup>+</sup> βακτήρια (del Solar *et al.*, 1998). Αυτή η συναινετική ακολουθία πιθανά να είναι η ακολουθία-στόχος της πρωτεΐνης Rep η οποία τέμνει στο 5'-CTTG↓ATA-3'. Στο pZMO2 υπάρχει μέρος της συναινετικής αυτής ακολουθίας, σε δύο διαφορετικές περιοχές του ανοδικά του ORFZMO2. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται η μία στη θέση 97-114 (5'-TACTTTACTTGATACTT-3') και η δεύτερη στη θέση 144-160 (5'-CTTTCCCCTTGCTACAC-3') του pZMO2 (**Σχήμα 56**, σελ. 207-209). Ο εντοπισμός αυτών των περιοχών υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή πιθανά να είναι η **DSO** περιοχή του pZMO2. Το γεγονός δε ότι συμφωνεί και με την παρατήρηση ότι στα πλασμίδια μονόκλωνου DNA (ssDNA plasmids) η περιοχή αυτή βρίσκεται στις περισσότερες των περιπτώσεων ανοδικά των γονιδίων *rep* και στην ίδια αλυσίδα (del Solar *et al.*, 1998), ενισχύει την παραπάνω υπόθεση.

Σε ότι αφορά στην **SSO** περιοχή, γνωστή και ως “minus origin”, δηλ. περιοχή που ξεκινά και τελειώνει η μετατροπή της καθυστερούσας μονόκλωνης αλυσίδας σε δίκλωνη (ss DNA → ds DNA), στο pZMO2 αναγνωρίστηκε μια τέτοια, καθοδικά του ORFZMO2 (μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1412 και 1569, **Σχήμα 56**, σελ. 207-209). Το χαρακτηριστικό των περιοχών αυτών είναι ότι βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα με την περιοχή **DSO**, έχουν μήκος 130 έως 220 νουκλεοτίδια και περιέχουν ατελή παλίνδρομα (imperfect palindroms) με δυναμική να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές θηλειών (Khan, 2000; Kramer *et al.*, 1999). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι SSOs (ανάλογα με τις δομικές τους ιδιότητες) οι *SSOA*, *SSOT*, *SSOU* και *SSOW*. (Gruss & Ehrlich, 1989; Khan, 2000). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αποκλειστικά υπεύθυνα για την σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας είναι τα πρωτεϊνικά μόρια του ξενιστή (RNA πολυμεράση, DNA πολυμεράση I, DNA πολυμεράση III), συνεπώς οι περιοχές αυτές δεν αναμένεται να είναι όμοιες ανάμεσα ακόμη και σε πλασμίδια που ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Schuster *et al.*, 1998; Birtch & Khan, 1992). Παρ' όλα αυτά και στους τέσσερις τύπους SSOs υπάρχει μια συναινετική αλληλουχία 6 νουκλεοτιδίων CS-6 (5'-TAGCGT/A-3'). Η αλληλουχία αυτή, που προκύπτει από τη στοίχιση μεγάλου αριθμού πλασμιδίων, πρωτοαναφέρθηκε για τον τύπο *SSOA* και προτείνεται ως το σημείο τερματισμού της σύνθεσης του 20μερούς μορίου RNA εκκινήτη από την RNA πολυμεράση και τη μετάβαση στη σύνθεση του DNA δηλ. την έναρξη της αντιγραφής της καθυστερούσας αλυσίδας από την DNA πολυμεράση I του ξενιστή και στη συνέχεια τον πολυμερισμό της από την DNA πολυμεράση III (del

Solar *et al.*, 1987; Kramer *et al.*, 1997). Η περιοχή που αναγνωρίστηκε σαν *SSO* στο pZMO2 περιέχει τρία ατελή παλίνδρομα (IR1, IR2 και IR3) και μια πιθανή αλληλουχία CS-6, η οποία μάλιστα βρίσκεται στη θηλιά που σχηματίζει το ατελές παλίνδρομο IR1, όπως συμβαίνει στα RCR πλασμίδια που περιέχουν την περιοχή τύπου *SSOA* (Kramer *et al.*, 1998). Στοίχιση της παραπάνω περιοχής του pZMO2 με αντίστοιχες περιοχές από πλασμίδια που έχουν διαφορετικούς τύπους *SSOs*, έδειξε ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα (63%) με τον τύπο *SSOA* όπως φαίνεται στον **Πίνακα 22**, σελ. 204).

### 10.1.2 Σταθερότητα αντιγραφής των pZMO1 και pZMO2 σε κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2

Η βακτηριακή σύζευξη αποτέλεσε τον πρώτο τρόπο εισαγωγής ξένης γενετικής πληροφορίας στο *Z. mobilis*, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε μεταφορά γνωστών συζευκτικών πλασμιδίων (Skotnicki *et al.*, 1980; Carey *et al.*, 1983). Αργότερα καθιερώθηκε η επιβοηθούμενη σύζευξη για την μεταφορά πλασμιδίων στο *Z. mobilis*, η οποία μέχρι σήμερα αποτελεί τον κατεξοχήν τρόπο μεταφοράς πλασμιδιακού DNA στο βακτήριο αυτό. Έτσι, μεταφέρθηκαν πλασμίδια ευρέος φάσματος ξενιστών ή πλασμίδια ευρέος φάσματος ξενιστών στα οποία είχαν υποκλωνοποιηθεί καταβολικά γονίδια σακχάρων από άλλα βακτήρια (Buchholz & Eveleigh, 1986; Brestic-Goachet *et al.*, 1989). Παρ' όλο που η μεταφορά των παραπάνω γονιδίων πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, η έκφρασή τους στους νέους ξενιστές παρουσίαζε διάφορα προβλήματα, με αποτέλεσμα τα στελέχη του *Z. mobilis* να μην αναπτύσσονταν σε θρεπτικά υποστρώματα ανάλογων των ιδιοτήτων που «μετέφεραν» τα πλασμίδια.

Είναι γνωστό ότι η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και, επομένως και η έκφραση των γονιδίων που μεταφέρουν, επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

- α) Τον αριθμό των πλασμιδιακών αντιγράφων ανά κύτταρο (copy number). Πλασμίδια που εξασφαλίζουν αποτελεσματικότερη ποσοτικά, φαινοτυπική έκφραση των γονιδίων που φέρουν, σημαίνει ότι απαντώνται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων.
- β) Τη δομική σταθερότητα (structural stability). Ισχυρές πειραματικές ενδείξεις άλλων ερευνητών (Αφένδρα 1992, Διδακτορική διατριβή: Βαρθολομάτος 1995, Διδακτορική διατριβή) έδειξαν ότι στο βακτήριο *Z. mobilis* συμβαίνουν διάφορα φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ μορίων DNA. Αποτέλεσμα αυτών μπορεί να είναι η

διαφοροποίηση της δομής των μεταφερόμενων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μετά από έναν αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων.

γ) Τη σταθερότητα κληρονόμησης των πλασμιδίων στα θυγατρικά κύτταρα. Είναι προφανές ότι η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων εξαρτάται από τις αλληλουχίες ελέγχου της αντιγραφής του φυσικού πλασμιδίου που φέρουν. Καθοριστικός άρα είναι ο ρόλος της θέσης ανασυνδυασμού. Αν δηλ. ο ανασυνδυασμός γίνει σε θέση που διακόπτει αλληλουχία σημαντική για την αντιγραφή και διατήρηση του φυσικού πλασμιδίου, τότε επηρεάζεται αρνητικά η σταθερή του κληρονόμηση στα θυγατρικά κύτταρα μετά την κυτταρική διαίρεση.

δ) Την ασυμβατότητα (incompatibility) με φυσικά πλασμίδια του δέκτη. Ασυμβατότητα συμβαίνει στην περίπτωση κατά την οποία το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για την μεταφορά περιέχει αλληλουχίες ελέγχου της αντιγραφής ενός εκ των φυσικών πλασμιδίων που φέρει το στέλεχος-δέκτης.

Ένας από τους σκοπούς της παρούσας διατριβής ήταν και η διερεύνηση της λειτουργίας των πρωτεϊνικών μορίων που βρέθηκαν να κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια pZMO1 και pZMO2. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων που ανακαλύπτεται μια πρωτεΐνη κωδικοποιούμενη από ένα πλασμίδιο, η πρωτεΐνη αυτή είναι η πρωτεΐνη αντιγραφής του. Προκειμένου, λοιπόν, να ερευνηθούν και πειραματικά αν τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης των pZMO1 και pZMO2 που προέκυψαν, είναι πράγματι περιοχές υπεύθυνες για την αντιγραφή τους, αλλά και προκειμένου να κατασκευαστούν κατάλληλοι ανασυνδυασμένοι φορείς, οι οποίοι θα μπορούν να αντιγράφονται και να κληρονομούνται σταθερά στα κύτταρα-ξενιστές τους, κατασκευάστηκαν διάφορα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε *Z. mobilis*. Τα πλασμίδια αυτά κατασκευάστηκαν εισάγοντας στον πλασμιδιακό φορέα pBR325 είτε ολόκληρα τα φυσικά πλασμίδια pZMO1 και pZMO2, είτε κλάσματα αυτών, διακόπτοντας έτσι τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Να σημειώσουμε ότι ο φορέας pBR325 είναι ασταθής σε κύτταρα *Z. mobilis* (Afendra & Drinas, 1987).

Καθώς, όπως προαναφέρθηκε, δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα αποτελεσματική μέθοδος μετασχηματισμού του *Z. mobilis* με πλασμιδιακό DNA, η βασική μέθοδος μεταφοράς DNA είναι η επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη, εφ' όσον τα

ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν δεν είναι συζευκτικά, όπως εν προκειμένω τα pZMO1 και pZMO2.

Η συχνότητα μεταφοράς πλασμιδίου από *E. coli* σε *Z. mobilis* μέσω βακτηριακής σύζευξης εξαρτάται γενικά από το στέλεχος – δότη, το στέλεχος – δέκτη και από το υπό μεταφορά πλασμίδιο. Μεταξύ των στελεχών του *Z. mobilis*, το ATCC 10988 αναφέρεται ως ένας από τους καλύτερους δέκτες για μια σειρά πλασμιδιακών φορέων ευρέως φάσματος (Afendra & Drainas, 1987; Brestic – Goachet *et al.*, 1989). Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος CU1Rif2, ένα παράγωγο του ATCC 10988, διότι προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίαζε μεγαλύτερη συχνότητα σύζευξης σε σχέση με το ATCC 10988 (Αφένδρα 1990, Διδακτορική διατριβή). Το στέλεχος αυτό έχει απομονωθεί ύστερα από επίδραση με πορτοκαλί της ακριδίνης (τελικής συγκέντρωσης  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) σε κύτταρα CU1 (παράγωγο του ATCC 10988 που κι αυτό έχει προέλθει με επίδραση με πορτοκαλί της ακριδίνης τελικής συγκέντρωσης  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και διαθέτει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (Afendra & Drainas, 1987). Το αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε, σε περιεκτικότητα  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  καλλιέργειας, ως δείκτης αποκλεισμού των αποικιών του στελέχους-δότη του *E. coli*, το οποίο είναι ευαίσθητο στη ριφαμπικίνη κάτω απ' αυτές τις συνθήκες.

Έτσι, κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA11 (**Σχήμα 59**) το οποίο περιέχει άθικτο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης των 384 αμινοξέων του pZMO1 καθώς και τις ρυθμιστικές περιοχές και τις πιθανές χαρακτηριστικές αλληλουχίες *DSO*, *SSO* και βρέθηκε να είναι πολύ σταθερό σε κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2 κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες (80% σταθερότητα ύστερα από 200 κυτταρικές διαιρέσεις). Αντίθετα, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA12 (**Σχήμα 61**) το οποίο περιέχει μικρότερο υπολογιζόμενο ORF που κωδικοποιεί για πεπτίδιο 228 αμινοξέων και το οποίο περιλαμβάνει το N-τελικό άκρο της ολικής πρωτεΐνης, δεν κατάφερε να παραμείνει σταθερό στο ίδιο στέλεχος (εξαφανίζονταν ύστερα από 40 κυτταρικές διαιρέσεις). Μη ικανοποιητική σταθερότητα παρουσίαζε και σε προηγούμενα πειράματα ένα άλλο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο του pZMO1, το pDS191 (Scordaki & Drainas, 1987; Afendra & Drainas, 1992). Αυτό χανόταν εντελώς, ύστερα από 100 κυτταρικές διαιρέσεις σε κύτταρα ξενιστές *Z. mobilis* CU1Rif2, απουσία επιλογής. Θυμίζουμε ότι στην περίπτωση του pDS191, το pZMO1 είχε ευθυγραμμιστεί με *Bgl*II (άρα το ORF είχε κοπεί στη μέση) και υποκωνοποιηθεί στη θέση *Bam*HI του pBR325 (**Σχήμα 38**, σελ. 153).

Όσον αφορά το pZMO2, κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21 (**Σχήμα 57**) το οποίο περιέχει “κουτσουρεμένο” το πιθανό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, που βρέθηκε ύστερα από την ανάλυση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του pZMO2. Πιο συγκεκριμένα, κωδικοποιείται μόνο για το N-τελικό άκρο της υποτιθέμενης πρωτεΐνης αντιγραφής του pZMO2, περιέχει όμως άθικτη την υποτιθέμενη **DSO** ανοδικά του κωδικόνιου έναρξης της μεταγραφής του, τις περιοχές του μορίου εκκινητή καθώς και τις περιοχές πρόσδεσης στο ριβόσωμα (RBS). Παρ’ όλα αυτά, το pDA21 έδειξε πολύ μεγάλη σταθερότητα σε κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2 (90% ύστερα από 165 κυτταρικές διαιρέσεις). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενα αποτελέσματα των Afendra & Drainas, 1987, όταν χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS212 όπου το pZMO2 είχε υποκλωνοποιηθεί στη θέση *EcoRI* του pBR325. Το pDS212 (**Σχήμα 38**, σελ. 153) είχε παρουσιάσει πολύ μεγάλη σταθερότητα (89% για 100 κυτταρικές διαιρέσεις) σε κύτταρα-ξενιστές *Z. mobilis* CU1Rif2).

Ανακεφαλαιώνοντας, θα μπορούσαμε να πούμε ότι με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έχουμε μια λεπτομερή εικόνα των δύο μικρότερων σε μέγεθος κρυπτικών πλασμιδίων του *Z. mobilis* ATCC 10988, δηλ. των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2, σε ότι αφορά το μέγεθος, τις δομικές ομοιογένειες, τη λειτουργία τους και την σταθερότητά τους. Οι διαφορές που αναφέρθηκαν στα μεγέθη, συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες αυτών, προφανώς οφείλονται στην διαφορά των μεθόδων απομόνωσης και ανάλυσης των πλασμιδίων του στελέχους ATCC 10988 καθώς επίσης και στο γεγονός ότι ο προσδιορισμός του M.B. ενός μορίου DNA με περιοριστική ανάλυση και ηλεκτροφόρηση, εμπεριέχει μεγαλύτερο ποσοστό σφάλματος απ’ ότι με την εύρεση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του.

Και τα δύο πλασμίδια περιέχουν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αντιγραφής (Rep). Ειδικά για το pZMO2, που αποτελούσε και βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, η πρωτεΐνη αυτή έδειξε να παρουσιάζει ομοιότητες με αντίστοιχες πρωτεΐνες πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου και μάλιστα της οικογένειας pC194/pUB110-τύπου. Πιο σημαντική για την αντιγραφή του πλασμιδίου βρέθηκε να είναι η περιοχή **DSO** η οποία επίσης έδειξε ομοιότητα με αντίστοιχες περιοχές από Gram<sup>-</sup> βακτήρια που ανήκουν όμως πάλι στην οικογένεια pC194/pUB110-τύπου.



Το γεγονός ότι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA21, που κωδικοποιεί για μια ελλιπή ως προς το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνη αντιγραφής, είναι ικανό να αντιγράφεται σταθερά σε κύτταρα *Z. mobilis* CU1Rif2, υποδηλώνει ότι το pDA21 μπορεί να χρησιμοποιεί για την αντιγραφή του την πρωτεΐνη αντιγραφής του pZMO2 που συνυπάρχει στο στέλεχος CU1Rif2. Υποδηλώνει όμως επίσης ότι το pZMO2 μπορεί να χρησιμοποιεί για την αντιγραφή του και αντίστοιχες πρωτεΐνες άλλων πλασμιδίων ή ακόμη και του ίδιου του χρωμοσώματος, δρώντας *in trans* πάνω στην περιοχή του **DSO**. Να θυμίσουμε άλλωστε πως το μεταλλαγμένο στέλεχος UVS51 (Vartholomatos *et al.*, 1993) προκαλεί αστάθεια του πλασμιδίου pZMO2, δεδομένου ότι ακόμα και μετά από εκατοντάδες ανακαλλιέργειες του από τότε που απομονώθηκε, έχει διατηρήσει όλα τα υπόλοιπα φυσικά του πλασμίδια εκτός του pZMO2 (Βαρθολομάτος 1995, Διδακτορική διατριβή). Αυτό σημαίνει ότι ενδεχομένως η βιοσύνθεση του πλασμιδίου pZMO2, επηρεάζεται από διαφορετικούς μηχανισμούς από ότι τα υπόλοιπα φυσικά πλασμίδια του *Z. mobilis*. Οι μηχανισμοί αυτοί επιβάλουν την εμπλοκή πρωτεϊνικών μορίων προερχόμενα από το κύτταρο-ξενιστή και τα οποία ίσως να έχουν τροποποιηθεί όταν κύτταρο-ξενιστής είναι το μεταλλαγμένο στέλεχος UVS51. Είναι επομένως πιθανό αυτός ο μεγάλος αριθμός πλασμιδίων του *Z. mobilis* να ανήκει σε διαφορετικές ομάδες ασυμβατότητας και ίσως να αντιγράφεται με διαφορετικό μηχανισμό.

Αντίθετα, για τη σταθερή αντιγραφή του pZMO1 είναι απαραίτητο να υπάρχει άθικτο το μόριο της πρωτεΐνης των 348 αμινοξέων που βρίσκεται πάνω στο ίδιο το pZMO1. Στην περίπτωση που το μόριο της πρωτεΐνης δεν υπάρχει ολόκληρο (pDA12) ή διακόπτεται περίπου στη μέση του (pDS191), το pZMO1 παρουσιάζει αστάθεια σε κύτταρα-ξενιστές CU1Rif2. Θα μπορούσε να πει κανείς ότι ένας λόγος συνύπαρξης των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 σε κύτταρα *Z. mobilis* είναι ακριβώς το γεγονός ότι η αντιγραφή τους γίνεται με διαφορετικό τρόπο.

Τέλος, αναφορικά με τη μεταφορά και τη σταθερή αντιγραφή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pDA21, pDA11 και pDA12, το πλασμίδιο pDA21 παρουσίασε την υψηλότερη συχνότητα σύζευξης και το μεγαλύτερο ποσοστό σταθερότητας στο *Z. mobilis* CU1Rif2. Θα ήταν άρα λογικό να υπερτερεί έναντι των πλασμιδίων pDA11 και pDA12 ως πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης στο *Z. mobilis* γιατί διαθέτει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. Έχει μικρό MB (7,9 kb)

2. Διαθέτει δύο δείκτες αντοχής σε αντιβιοτικά ( $Cm^R$  και  $Ap^R$ ), οι οποίοι περιέχουν μονές περιοριστικές θέσεις για την κλωνοποίηση άλλων τμημάτων DNA.
3. Είναι σε θέση να μεταφέρεται, μέσω βακτηριακής σύζευξης, με ικανοποιητική συχνότητα και να εκφράζεται στο *Z. mobilis*. Κληρονομείται δε σταθερά για πολλές κυτταρικές διαιρέσεις απουσία επιλεκτικής πίεσης.

Παρ' όλα αυτά, εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η “κουτσουρεμένη” πρωτεΐνη αντιγραφής του pZMO2 είναι εξαρτώμενη απ' το κύτταρο-ξενιστή, καθιστά το πλασμίδιο αυτό ακατάλληλο για φορέα κλωνοποίησης. Έτσι μόνο το pZMO1 και πιο συγκεκριμένα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDA12, μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλο για βιοτεχνολογικές εφαρμογές του *Z. mobilis*.

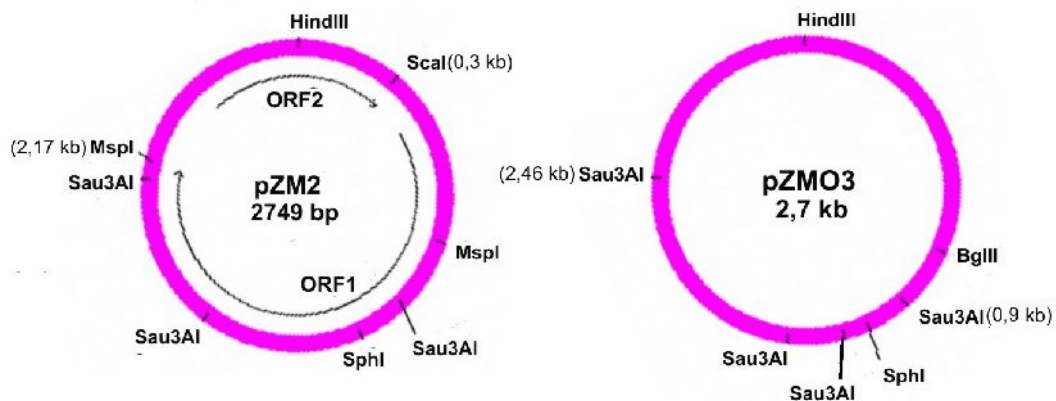
## 10.2 Μελέτη λειτουργικών ιδιοτήτων του πλασμιδίου pZMO3 του στελέχους ATCC 10988 του *Z. mobilis*

Αναφέρθηκε ήδη η σπουδαιότητα των φυσικών πλασμιδίων του *Z. mobilis* για την κατασκευή φορέων ανασυνδυασμού (βλ. Εισαγωγή, σελ. 69). Τα μικρού μεγέθους πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 είναι ιδιαίτερα κατάλληλα λόγω του μεγέθους τους και της μεγάλης σταθερότητάς τους. Η δομική τους ανάλυση έχει προχωρήσει σε τέτοιο βαθμό, ώστε να επιτρέπεται η χρήση τους σε *in vitro* ανασυνδυασμούς. Ωστόσο έχουν το μειονέκτημα ότι υβριδίζουν ισχυρά μεταξύ τους. Ως εκ τούτου είναι δύσκολο να διακριθούν κατά την περιοριστική ανάλυση και τον υβριδισμό.

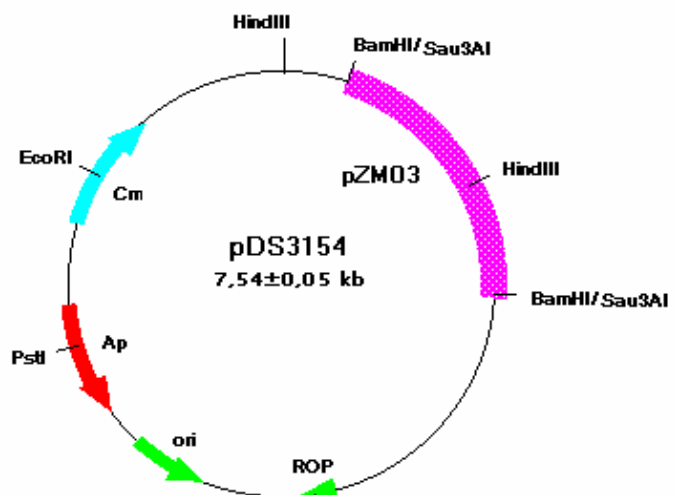
Αντίθετα από την ανάλυση του πλασμιδιακού περιεχομένου του ATCC 10988 προέκυψε ότι το πλασμίδιο pZMO3 είναι μοναδικό, σταθερό και μπορεί να ανιχνεύεται με βεβαιότητα, ενώ απαντά και σε υψηλό αριθμό αντιγράφων, όπως προκύπτει από μετρήσεις των Misawa *et al.*, (1985). Πάντως η μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων του δεν είχε αποδώσει ουσιαστικούς καρπούς και το πλασμίδιο παρέμενε κρυπτικό. Για τους λόγους αυτούς αποτέλεσε αντικείμενο λεπτομερέστερης έρευνας και στην παρούσα διατριβή και από άλλους ερευνητές, προγενέστερους και επόμενους.

### 10.2.1 Δομή και ρόλος του πρωτεϊνικού μορίου του ORF2

Το 1989, οι Misawa και Nakamura ήταν οι πρώτοι που έκαναν την πλήρη αλληλούχιση πλασμιδίου του *Z. mobilis* ATCC 10988, του pZM2 όπως το ονόμασαν, μοριακού βάρους 2.749 bp (41% GC), που περιείχε δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF1 και ORF2). Το ORF1 κωδικοποιούσε για ένα πολυπεπτίδιο 584 αμινοξέων με υπολογιζόμενο M.B. 65.792 Da ενώ το ORF2 για ένα πολυπεπτίδιο 184 αμινοξέων με υπολογιζόμενο M.B. 20.962 Da. Οι ίδιοι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για την αντιγραφή του pZM2 απαιτείται η περιοχή μεταξύ των θέσεων 2,17 έως 2,75 kb και 1 bp έως 0,3 kb, η οποία περιείχε το ORF2 και τη μη κωδικοποιούμενη περιοχή που βρίσκεται στο 5' άκρο ανοδικά του ORF2. Η περιοχή αυτή μπορούσε να εξαχθεί από το pZM2 με πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *ScaI* και *MspI* (Σχήμα 64).



**Σχήμα 64.** Περιοριστικοί χάρτες των πλασμιδίων pZM2 (Misawa & Nakamura, 1989), pZMO3 (Scordaki & Drainas, 1989) και pDS3154 (Scordaki & Drainas, 1990).



Την ίδια εποχή το εργαστήριό μας (Scordaki & Drainas, 1990) ανακοίνωνε την ύπαρξη του πλασμιδίου pZMO3 στο ίδιο στέλεχος, η περιοριστική ανάλυση του οποίου έδειχνε ότι ήταν ταυτόσημο με το pZM2 των Misawa και Nakamura. Αυτό αποδείχθηκε

αργότερα, για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, όταν έγινε προσδιορισμός μέρους (περίπου 450 νουκλεοτιδίων) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pZMO3 στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUZMO3.11.

Τα αποτελέσματα των Scordaki και Drainas, 1990 ανέφεραν την ύπαρξη μιας περιοχής 1,54 kb του pZMO3 (από τη θέση 2,46 έως 2,75 kb και 1 bp έως 0,9 kb του περιοριστικού χάρτη, **Σχήμα 64**) που σχετίζονταν με τις λειτουργίες αντιγραφής, εφ' όσον εξασφάλιζε στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS3154, που περιείχε την περιοχή αυτή, υψηλό αριθμό αντιγράφων κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες, σταθερότητα δομής και ισχυρή ασυμβατότητα με το pZMO3. Είναι προφανές ότι η εν λόγω περιοχή περιείχε την περιοχή 2,17 έως 0,3 kb των Misawa και Nakamura.

Αντίθετα, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pDS3270 που περιείχε ολόκληρο το μόριο του pZMO3 υποκλωνοποιημένο σε *HindIII* και στο οποίο διακόπτονταν το ORF2 (**Σχήμα 38**, σελ. 153), παρουσίαζε μικρή σταθερότητα σε κύτταρα *Z. mobilis*. Από όλα τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι το ORF2 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη Rep υπεύθυνη για την αντιγραφή του ίδιου του πλασμιδίου.

Δεν υπήρχε όμως καμία αναφορά για το ρόλο που έπαιζε το πρωτεϊνικό μόριο που κωδικοποιούνται από το ORF1.

### 10.2.2 Δομή και ρόλος του πρωτεϊνικού μορίου του ORF1

Για το σκοπό αυτό, κρίθηκε αναγκαίος ο ανασυνδυασμός του με πλασμίδια του *E. coli* που χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς ανασυνδυασμού (cloning vectors) και φέρουν κατάλληλους δείκτες επιλογής. Κατασκευάστηκαν λοιπόν μια σειρά από ανασυνδυασμένα πλασμίδια του pZMO3 για να ελεγχθεί η δυνατότητα κινητοποίησης τους από το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013 μεταξύ διαφορετικών στελεχών *E. coli*. Σαν φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το μη συζευκτικό, μη κινητοποιήσιμο πλασμίδιο pUC19, το οποίο περιέχει και σαν δείκτη το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έδειξαν πολύ υψηλή συχνότητα συζευκτικής εισόδου ήταν αυτά που το pZMO3 είχε υποκλωνοποιηθεί στη θέση *HindIII* (pUZMO3.11 και pUZMO3.12 βλ. **Σχήμα 43**, σελ. 167), αφήνοντας δηλ. άθικτο το ORF1 και την περιοχή ανοδικά του 5' άκρου του. Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο αυτά πλασμίδια

έδειξαν παρόμοια συχνότητα συζευκτικής εισόδου, γεγονός που αποδεικνύει ότι μεταξύ στελεχών *E. coli*, αυτή είναι ανεξάρτητη του προσανατολισμού του ORF1.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το pZMO3 περιέχει μια δραστική περιοχή έναρξης της μεταφοράς του *oriT*. Το ερώτημα που γεννιέται είναι αν αυτή η *oriT* αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες κινητοποίησης του κυττάρου ξενιστή ή του ίδιου του πλασμιδίου. Σε όλα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια του pZMO3 που κατασκευάστηκαν στην παρούσα έρευνα, ανεξάρτητα από την περιοριστική θέση υποκλωνοποίησής του, περιέχεται η περιοχή *oriT*. Όμως αυτή δίνει τη δυνατότητα κινητοποίησης του πλασμιδίου μόνον όταν το ORF1 είναι άθικτο. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι για να κινητοποιηθεί το pZMO3 απαιτεί, εκτός της *oriT*, την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ORF1 του ίδιου του πλασμιδίου που σημαίνει ότι το ORF1 πιθανά κωδικοποιεί για μία *trans*-δραστική πρωτεΐνη κινητοποίησης (mobilization product).

Για επιπλέον απόδειξη του παραπάνω ισχυρισμού έγινε στοίχιση του πολυπεπτιδίου των 66 kD του ORF1, με αλληλουχίες χαρακτηρισμένων πρωτεϊνικών μορίων κινητοποίησης. Η στοίχιση αυτή έδειξε ότι υπάρχει ομοιότητα με πρωτεΐνες κινητοποίησης (Mob) της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου. Αναλυτικότερα, έδειξε ομολογία που ξεπερνά το 30% και ομοιότητα μεγαλύτερη του 59% με Mob πρωτεΐνες πλασμιδίων προερχόμενα από Gram<sup>-</sup> βακτήρια, όπως το pWKS1 (*Paracoccus pantotrophous*), το pTS1 (*Treponema denticola*), το pGBR1 (*Bartonella grahamii*) και το pBBR1 (*Bordetella bronchiseptica*), ενώ έδειξε επίσης μεγάλη ομοιότητα (>53%) και αρκετά μεγάλο ποσοστό ομολογίας (~26%) με Mob πρωτεΐνες πλασμιδίων προερχόμενα από Gram<sup>+</sup> βακτήρια, όπως του pMV158 (*Streptococcus agalactiae*), του pTB19 (*Geobacillus stearothermophilus*) καθώς και των πλασμιδίων pUB110 και pT181 (*Staphylococcus aureus*).

**Πίνακας 25.** Βακτηριακά πλασμίδια της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου (Francia *et al.*, 2004).

Πλασμίδιο			Βακτηριακός ξενιστής	Πρωτεΐνη χαλάρωσης (Ρηλαξάση)		
Όνομα	Accession No.	Μέγεθος (bp)		Όνομα	% ομολογία με την MobM του pMV158	Accession No.
pMV158	X15669	5536	<i>Streptococcus agalactiae</i>	MobM	100	AAA25387
pVA380	L23803	>2343	<i>Streptococcus ferus</i>	Mob	97	AAA19677.1
pSSU1	NC_002140	4975	<i>Streptococcus suis</i>	Mob, ORF5	70	BAA83679
pSMQ172	AF295100	4230	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Mob, ORF3	70	AAK83121
pER13	NC_002776	4139	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Mob	70	NP_115336.1
pF8801	AF196967	>600	<i>Pediococcus damnosus</i>	Mob	57	AAL15563.1
pI4	AF300457	14,000	<i>Bacillus coagulans</i>	Mob/Pre	52	AF300457-5
pIP823	U40997	>3712	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mob/Pre	47	AAA93296
pLB4	M33531	>3547	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RepC	42	AAA25252
pLAB1000	A14660	3300	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Mob	42	A35390
pS86	AJ223161	5149	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mob, ORF4	39	CAA11139
pBM02	AY026767	>3854	<i>Lactococcus lactis</i>	Mob, Orf1	39	AAK13009.1
pK214	X92946	29,871	<i>Lactococcus lactis</i>	Mob	39	CAA63521.1
pBC16	NC_001705	4630	<i>Bacillus cereus</i>	Mob, ORF-β	37	AAA84921
pIP1714	AF015628	4978	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Mob/Pre	37	AAC61672
pUB110	NC_001384	4548	<i>Staphylococcus aureus</i>	Mob, ORF-β	37	AAF85649
pLC88	U31333	>3501	<i>Lactobacillus casei</i>	Mob	37	AAA74581.1
pLA106	D88438	2800	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Pre	34	BAA21093
pBM5	AJ429478	>491	<i>Bacillus mojavensis</i>	Mob	33	CAD22322.1
pGI2	X13481	9672	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob/Pre	32	P10025
pTX14-2	NC_004334	6829	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob14-2	32	NP_795748.1
pTB19	M63891	11,887	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Mob	31	AAA98305.1
pTB53	D14852	>2083	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Pre	31	BAA03580.1
pTB913	M63891	11,887	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Mob	31	AAA98307
pGI1	NC_004335	8254	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob1	31	NP_705753.1
pTA1015	NC_001765	5807	<i>Bacillus subtilis</i>	Mob15	30	NP_053784
pTA1060	NC_001766	8737	<i>Bacillus subtilis</i>	Mob60	30	NP_053788
pUH1	M76715	>2044	<i>Bacillus subtilis</i>	Pre	29	A48371
p1414	NC_002075	7950	<i>Bacillus subtilis</i>	Mob	29	AAD22622
p22R	NC_004528	9935	<i>Leuconostoc citreum</i>	Mob	28	NP_775704
pSBK203	U35036	3780	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pre	27	AAA79055.1
pE194	J01755	3728	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pre, C-403	27	QQSA4E
pOM1	L31579	4442	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Pre	26	AAB57761.1
pT181	NC_001393	4439	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pre	26	NP_040472
pKH6	NC_001767	4439	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pre	26	NP_053796.1
pBBR1	X66730	2600	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Mob	25	S25246
pRS2	NC_003201	2544	<i>Oenococcus oeni</i>	Pre	25	NP_443752.1
pRS3	NC_003099	3948	<i>Oenococcus oeni</i>	Pre, ORF2	25	NP_254269
pBMY1	AJ243967	3377	<i>Bacillus mycoides</i>	Mob	25	CAB88024
pCC7120α	NC_003276	408,101	<i>Nostoc sp.</i>	Pre	25	NP_490305.1
pLo13	M95954	>3948	<i>Oenococcus oeni</i>	Mob13	25	AAA19673.1
pBGR1	NC_004308	2723	<i>Bartonella grahamii</i>	Mob	24	NP_696963.1
pRAO1	AB022866	2140	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Mob, ORF3	23	BAA74512
pTX14-1	NC_002091	5415	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob	23	NP_054010
pCC7120Δ	NC_003273	55,414	<i>Nostoc sp.</i>	Pre	23	NP_489420.1
pUIBI-1	NC_004059	4671	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob	23	NP_660266
pBMYdx	AJ272266	3376	<i>Bacillus mycoides</i>	Mob	22	CAB88025
pRRI2	AJ278872	3240	<i>Prevotella ruminicola</i>	Pre	22	CAC38004
pFL1	NC_002132	2311	<i>Flavobacterium sp.</i>	Pre, ORFII	21	NP_052877
pTS1	NC_002650	4200	<i>Treponema denticola</i>	Mob	21	NP_073756
pWKS1	NC_004160	2697	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	Mob	21	NP_690578.1
pTX14-3	NC_001446	7649	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mob14-3	18	S16658
pPL1	NC_002094	3874	<i>Marinococcus halophilus</i>	Mob	17	NP_054019
pZM03	X14438	2749	<i>Zymomonas mobilis</i>	ORF1	26	CAA32611.1
pYHBi1	AF454701	5059	<i>Prevotella intermedia</i>	Mob	17	AAL73040.1

Η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των Mob πρωτεϊνών χαλάρωσης που κωδικοποιούνται από πλασμίδια της οικογένειας pMV158-τύπου (**Πίνακας 25**), ανέδειξε την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών (Motifs), οι οποίες δεν έχουν καμία σχέση με περιοχές αντίστοιχων πρωτεϊνών που ανήκουν σε άλλες οικογένειες πλασμιδίων. Στο **Σχήμα 65c**, φαίνεται να υπάρχει μια περιοχή στο N-τελικό άκρο (Motif I – HxxR) και μια δεύτερη, πιθανά παραλλαγή της ήδη γνωστής 3H περιοχής (Motif III – HxDE...Rhxxh). Η ύπαρξη των δύο αυτών συντηρημένων περιοχών αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη, ότι η οικογένεια αυτή των πλασμιδίων έχει μια συγκεκριμένη κοινή φυλογενετική προέλευση. Η οικογένεια pMV158-τύπου χωρίζεται σε δύο κλάδους, όπως διακρίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο του **Σχήματος 66**. Οι πρωτεΐνες κινητοποίησης του κλάδου A, του οποίου αντιπροσωπευτικό μέλος είναι το πλασμίδιο pMV158, παρουσιάζουν εκτεταμένη συντηρητικότητα. Εκτός των δύο παραπάνω συντηρημένων περιοχών (HxxR και HxDE), διαθέτουν μια επιπλέον περιοχή, την NY(D/E)L (Motif II, **Σχήμα 65a**). Η υπόθεση ότι πιθανά η περιοχή αυτή περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, εφόσον υπάρχει σ' αυτή το αμινοξύ τυροσίνη, είναι μάλλον αβάσιμη καθώς δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι η περιοχή αυτή είναι το ενεργό κέντρο, ενώ είναι εμφανές ότι απουσιάζει από τους άλλους κλάδους της οικογένειας. Ο κλάδος B (**Σχήμα 65**) έχει σαν αντιπροσωπευτικό μέλος το πλασμίδιο pBBR1, το οποίο αποτελεί το μοναδικό χαρακτηρισμένο βιοχημικά πλασμίδιο του κλάδου. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο κλάδος αυτός δείχνει μια σαφή αλλά πιθανά παραλλαγμένη μορφή της 3H συντηρημένης περιοχής (HxDExxPHxxh), στην οποία το τρίτο κατάλοιπο ιστιδίνης μερικές φορές αντικαθίσταται από σερίνη (S) ή θρεονίνη (T). Εκτός αυτού, δε διαθέτει την περιοχή Motif II, που περιέχει την τυροσίνη (**Σχήμα 65b**). Η πρωτεΐνη του pZMO3, που κωδικοποιείται από το ORF1, ακολουθεί πιστά την συντηρητικότητα του κλάδου αυτού σε όλες τις περιοχές. Άρα με βεβαιότητα θα μπορούσε να την καταλήξει κανείς στο συμπέρασμα ότι το ORF1 του πλασμιδίου pZMO3 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη Mob, η οποία αποτελεί μέλος του κλάδου B των πρωτεϊνών κινητοποίησης της οικογένειας κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου.

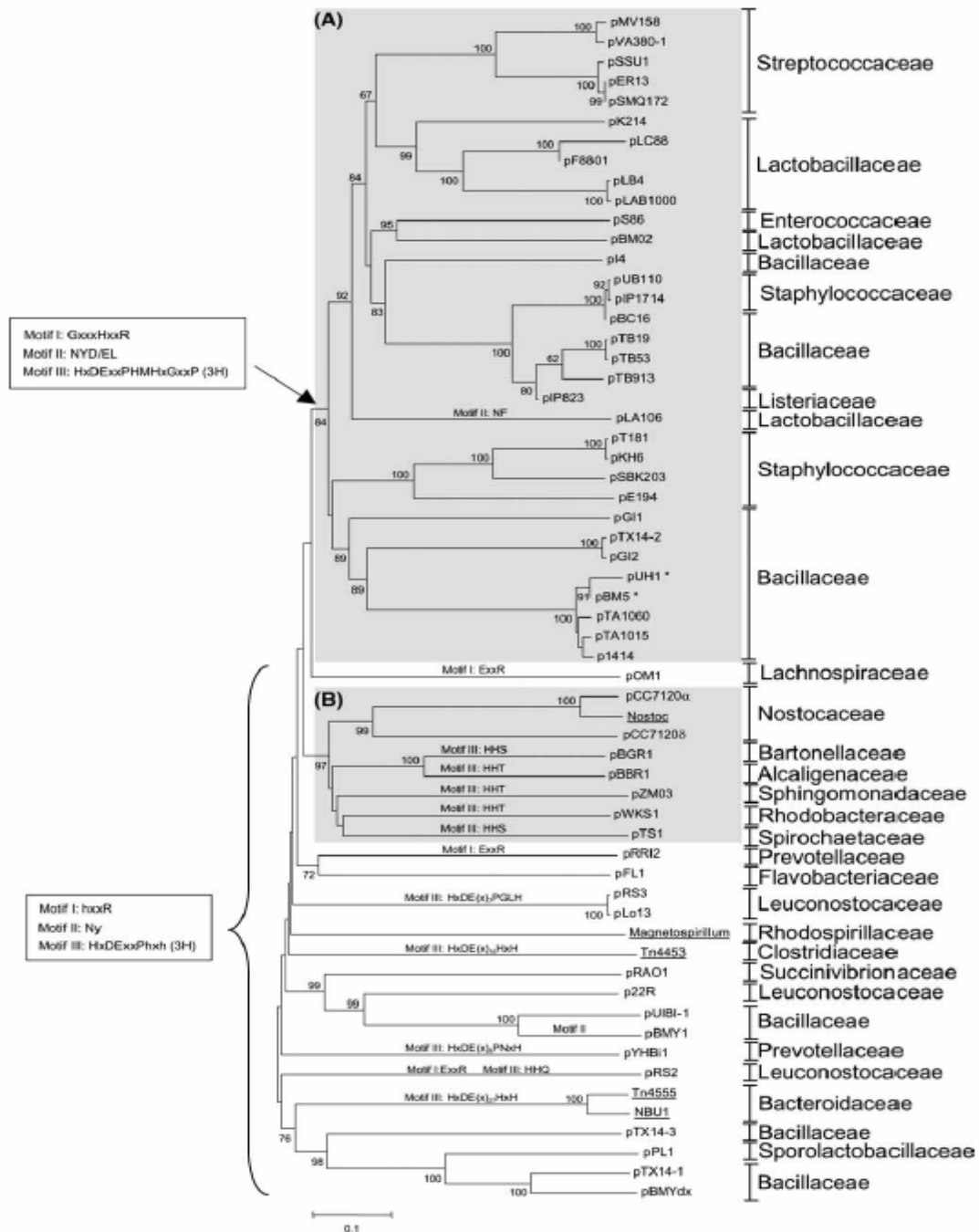


(a)	Motif I	Motif II	Motif III
	(19) 19                      30                      40                      50		(121) 121                      130                      148
pUB110	(17) KGMQFHNQRERKSRITNDIDHERTRENYDLKN		(118) NIAYATVHNDEQTPHMHLGVVPMRDG-K
pTB19	(17) KGMQFHNQRERKSRITNDIDHERTRENYDLKN		(118) NIAYATVHNDEQTPHMHLGVVPMRDG-K
pI4	(17) AGIERHNKRIYKNHSNEDIDGELSNSNYDLMD		(117) NIAYAQVHLDEERTPHMHLGVVPMREG-K
pS86	(17) SGIQRHNQRRTNNHNSNPDIDIEKSHLNYDLVN		(116) NVAYATVHLEDETPHMHLGIVPMYEG-R
pMV158	(17) GGAFKHNERNVFETHSNKIDINPSRSHLNYELTD		(119) NIAYASVHLEDESTPHMHMGVVPFENG-K
pK214	(17) VGVGNHNQRNTDNHNSNKIDIDVERSHLNYDLVN		(117) NIRYAQVHLEDETPHMHLGIVVPFNDDEHK
pLAB1000	(17) VGIGNHDQRKTTNHSNEDIDVSHSHLNYDLVA		(118) NIRYAVVHDEKTPHMHMGIVVPFDDDKK
pGI1	(18) KGLQIHNRREKESHNSDI IQERTEQNYDLIH		(120) NFVYASVHVEDEKTPHMHVGMVVPVNEKQK
pTA1015	(18) NGTQKHNRREKESHNSDI IQERTEQNYDLIN		(117) NMLYATVHMEDETPHMHVGMVVPITEDGR
pE194	(18) NGIQRHNQRRENKYNKIDINHEETVKNYDLIN		(119) NMLYATVHLEDERVPHMHVGMVVPITEDGR
pT181	(18) TGIQKHVQRENNYYENEDIDHSKTYLNYDLVN		(119) NLLYATVHMEDEKTPHMHVGMVVPITDDGR
Consensus	(19) GIQKHNRRE NHSNEDID ERTLHNYDLVN		(121) NI YATVHLEDE TPHMHLGVVPM D K
(b)	Motif I	Motif III	
	(42) 42                      50                      64	(151) 151                      160                      170                      181	
pWKS1	(42) GASLQHTFRERETPNADPARRTD	(132) GAENILSAVIRHREDETPHMTVMITPLDQQ-G	
<b>pZMO3</b>	(19) KAASLHMTFRRETQADPDRKEL	(113) GENNLVSLQLHADETPHMTGMVPRDPDTG	
pTS1	(18) GASVSHALRTRETPNADKAKTSD	(118) GAKNIFLIITHYDELTPHSSILLVPTDPK-G	
pBBR1	(19) AASLKHAYRERETPNADASRTPE	(108) GADRIVTASIRHREDETPHMTAFVVPILTQD-G	
pBGR1	(19) ASALQHCYRERETPNADSERTPN	(108) GQDRITAAVVHNDIISPHLSAFVVPILTQD-G	
pCC7120a	(17) SGSASHARERETPNADPTQKNI	(119) G-DRIVRAELHLEDETPHITHAYVVPIDDQ-G	
pCC7120d	(19) GGSEKHTARLQDTPNADTTKKNI	(119) G-DKCVRAELHLEDETPHITHAYVVPINDK-T	
pTX14-1	(19) GGSEKHTARLQDTPNADTTKKNI	(119) G-DKCVRAELHLEDETPHITHAYVVPINDK-T	
Consensus	(42) GASL HT RERETPNAD TRK I	(151) G DRIV A LH DE TPHITAFIVPID G	
(c)	Motif I	Motif II	Motif III
	43                      50                      60                      70                      80                      91		168                      180                      190                      203
pUB110	(1) MSYAVCRMQRKVSAG-LKGMQFHNQRERKSRITNDIDHERTRENYDLKN		YG-RQNLAYATVHNDEQT-----PHMHLGVVPMRD
pTB19	(1) MSYAVCRMQRKVSAG-LKGMQFHNQRERKSRITNDIDHERTRENYDLKN		YG-RQNLAYATVHNDEQT-----PHMHLGVVPMRD
pI4	(1) MSMLVARMQRMKANN-LAGIERHNKRIYKNHSNEDIDGELSNSNYDLMD		YG-QQNLAYAQVHLDEERT-----PHMHLGVVPMRE
pS86	(1) MSKIVARMEKMKDGN-LSGIQRHNQRRTNNHNSNPDIDIEKSHLNYDLVN		CG-RQNLAYATVHLEDETT-----PHMHLGIVPMYEG
pSMQ172	(1) MSYVARMQRMKAGN-LGGAFKHNERNVFETHSNKIDINPSRSHLNYELTD		YG-EDNLAYASVHLEDEST-----PHMHMGVVPFQD
pMV158	(1) MSYVARMQRMKAGN-LGGAFKHNERNVFETHSNKIDINPSRSHLNYELTD		YG-RSNIAYASVHLEDETT-----PHMHMGVVPFEN
pLAB1000	(1) MSFAVARMKRLKADN-LVGIGNHDQRKTTNHSNEDIDVSHSHLNYDLVA		YG-DENIRYAVVHMEDEKTPHMHMGVVPFDD
pGI2	(2) NKFAIITHMQRFOISD-VQGIQKHNRQKSKSNLIDIDVSKSEQNYDLIN		YG-RQNTLYAVVHMEDEAT-----PHMHVGMVVPITE
pTA1015	(2) ANYAVIRMEKYYKDR-LNGTQKHNRREKESHNSDI IQERTEQNYDLIN		YS-AENMLYATVHMEDEAT-----PHMHVGMVVPITE
pE194	(1) MSHSILFVARVKGSSNTNGIQRHNQRRENKYNKIDINHEETVKNYDLIN		YG-KENMLYATVHLEDERV-----PHMHVGMVVPITE
pT181	(1) MSYSIVKVSQVSGTNTTGIQKHVQRENNYYENEDIDHSKTYLNYDLVN		YG-KDNLLYATVHMEDEKTPHMHVGMVVPITE
pTS1	(1) NAFICIMRTAKLKEDGNVGASVSHALRTRETP--NADKAKTSDMWCYN		YG-AKNIFLIITHYDELT-----PHSSILLVPTDP
pTX14-1	(2) VALAILHVBKLEKSPGVGGSEKHTARLQDTP--NAD--TTKKNIRLIG		YG--DKCVRAELHLEDETPHITHAYVVPINDK
pRS3	(6) NYKLVLHVKHFKKGN-LSKLENHNSRYLHDMNKNIRPILSKNNIQIFD		YG-KENVLRSYLHLEDEVDNGIQHPLHVDVEMTK
pBMY1	(43) GGVLMANVQRKTKAN-VQGLSIRHWRKTEIHTNKDIDVERSHLNYDLCE		YGGKKNVICAQVHNDEDETT-----PHMHVGMVVPVAY
Consensus	(43) MS V RM K K L G HNQR N DID E S NYDL N		YG NI YATVHLEDE T PHMHLGVVPM D

**Σ γ ή μ α 65.** Στοιχισμός των πρωτεϊνών κινητοποίησης της οικογένειας πλασμιδίων pMV158-τύπου. (a) Κλάδος A (b) Κλάδος B (c) Συναινετικές αλληλουχίες των περιοχών Motif I – III για όλες τις πρωτεΐνες κινητοποίησης της οικογένειας. Κόκκινα γράμματα σε κίτρινο φόντο: αμετάβλητα αμινοξέα, Μπλε γράμματα σε μπλε φόντο: ισχυρά συντηρημένα, Μαύρα γράμματα σε πράσινο φόντο: όμοια, Πράσινα γράμματα σε άσπρο φόντο: ελαφρώς όμοια, Μαύρα γράμματα σε άσπρο φόντο: μη συντηρημένα. (Francia *et al.*, 2004)



Στο δενδρόγραμμα του Σχήματος 66 απεικονίζεται περιληπτικά η συγγένεια μεταξύ των πρωτεϊνών κινητοποίησης των πλασμιδίων της οικογένειας pMV158-τύπου. Είναι εμφανές ότι



**Σχήμα 66.** Δενδρόγραμμα με βάση τις πρωτεΐνες κινητοποίησης πλασμιδίων που ανήκουν στην οικογένεια pMV158-τύπου. Οι κλάδοι A και B σημειώνονται σε γκρι πλαίσιο (Francica *et al.*, 2004).

εκτός από τους δύο κυρίως κλάδους A και B, σχηματίζονται και άλλοι μικρότεροι που υπογραμμίζουν έτσι τη μεγάλη ποικιλομορφία αυτής της οικογένειας, με τις Mob πρωτεΐνες να κατανέμονται μεταξύ των Gram<sup>-</sup> και Gram<sup>+</sup> θετικών βακτηρίων.

Σύμφωνα με τους Guzman και Espinoza, 1997, η πρωτεΐνη χαλάρωσης MobM του pMV158 (κλάδος A) διασπά το DNA του πλασμιδίου (σε οποιαδήποτε κατάσταση και αν είναι αυτό, υπερσπειρωμένο ή μονόκλωνο) στη θέση εγκοπής (*nic*) και παραμένει συνδεδεμένη πάνω στο DNA-στόχο. Η αντίδραση διάσπασης, σε αντιστοιχία με ότι συμβαίνει στα RCR πλασμίδια και την πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής τους, θεωρείται ότι πραγματοποιείται από το αμινοξικό κατάλοιπο της τυροσίνης-49 (Tyr49), χωρίς αυτό να έχει αποδειχθεί πειραματικά.

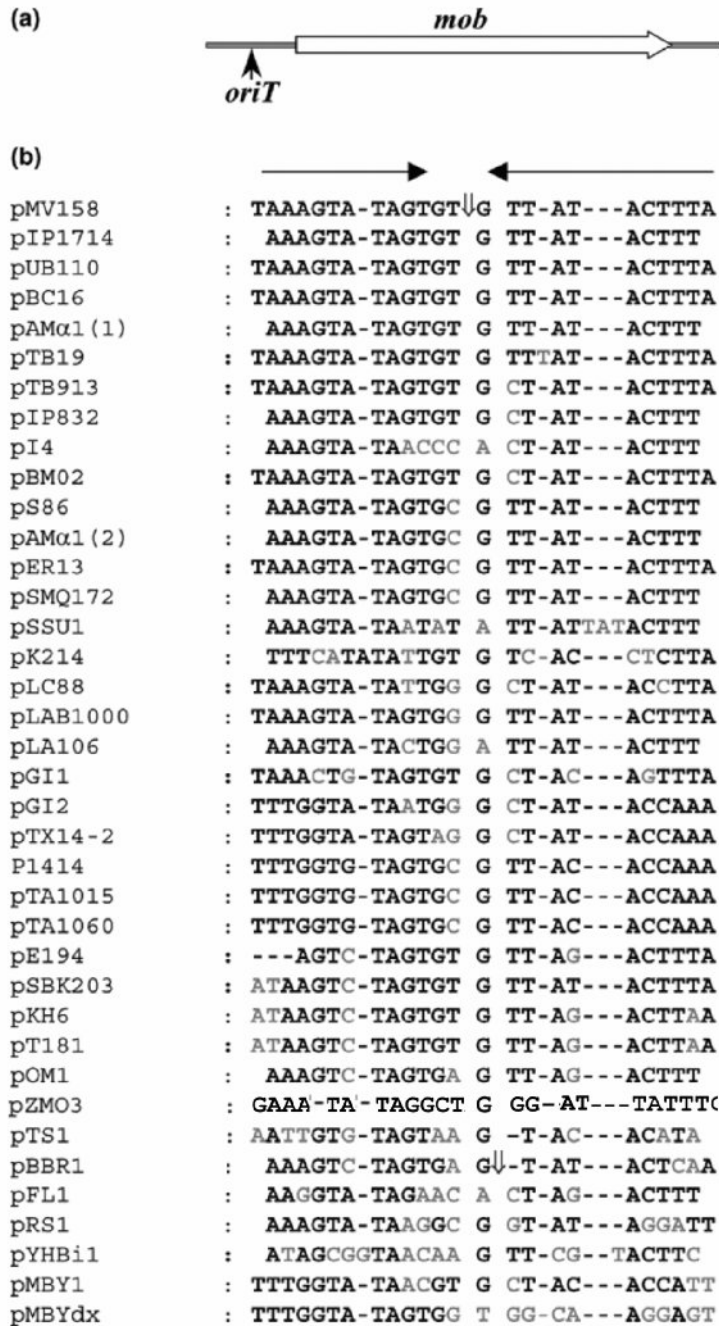
Εκτός από το σύστημα κινητοποίησης του pMV158 που έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί, μια ακόμα αντίστοιχη περιοχή έχει χαρακτηριστεί, αυτή του πλασμιδίου pBBR1 (κλάδος B). Το ενδιαφέρον με το πλασμίδιο αυτό, είναι ότι απομονώθηκε από το Gram<sup>-</sup> βακτήριο *Bordetella bronchiseptica* και ότι δεν αντιγράφεται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου αλλά με θ-μορφής (Antoine & Loch, 1992). Η πρωτεΐνη χαλάρωση που κωδικοποιεί (*Orf1*) φαίνεται να αναγνωρίζει μια αλληλουχία 52 βάσεων χωρίς να απαιτείται η παρουσία οποιασδήποτε άλλης πρωτεΐνης (Szpirer *et al.*, 2001). Η αλληλουχία αυτή περιέχει την περιοχή *oriT* καθώς και του υποκινητή του αυτορρυθμιζόμενου γονιδίου *orf1*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σύνδεση της πρωτεΐνης χαλάρωσης στην αλληλουχία αυτή μπορεί να ικανοποιεί δύο λειτουργίες, το σχηματισμό του χαλαροσώματος και τη ρύθμιση του γονιδίου *mob*. Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιό είναι το αμινοξύ που πραγματοποιεί την εγκοπή στην αλυσίδα του DNA, έγιναν πειράματα θεσηκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σε καθένα από τα αμινοξικά κατάλοιπα επτά τυροσινών, δύο φαινυλαλανινών (F94 και F95), ενός ασπαρτικού (D120) και ενός γλουταμινικού (E121) του *orf1*. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι οι τυροσίνες δεν παίζουν κανέναν ουσιαστικό ρόλο στον καταλυτικό μηχανισμό. Αντίθετα, μεταλλάξεις του ασπαρτικού (D120) και του γλουταμινικού (E121) ανέστειλλαν τελείως την κινητοποίηση του πλασμιδίου. Δεδομένου ότι τα δύο αυτά αμινοξικά κατάλοιπα είναι συντηρημένα στην οικογένεια pMV158-τύπου, οι ερευνητές προτείνουν ότι και τα δύο κατάλοιπα μπορεί να είναι μέρος τους ενεργού κέντρου της ρηλαξάσης, παίρνοντας άμεσα μέρος στο σπάσιμο του φωσφοδιεστερικού δεσμού στη θέση διάσπασης *nic*.

Το pZMO3, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί μέλος του κλάδου Β της οικογένειας pMV158-τύπου και διαθέτει και αυτό τα αμινοξικά κατάλοιπα D126 και E127 στην περιοχή Motif III (**Σχήμα 65b**). Ένας από τους μελλοντικούς στόχους θα μπορούσε να είναι η θεσηκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των δύο αυτών αμινοξέων και ο έλεγχος απώλειας της δυνατότητας κινητοποίησης του pZMO3.

### 10.3 Περιοχή έναρξης της μεταφοράς (*oriT*)

Η οργάνωση της περιοχής κινητοποίησης είναι παρόμοια για όλα τα μέλη της οικογένειας πλασμιδίων pMV158-τύπου. Αποτελείται από ένα μόνο γονίδιο και ανοδικά αυτού βρίσκεται η περιοχή *oriT*, όπως φαίνεται και στο **σχήμα 67a**.

Οι περιοχές *oriT* πολλών πλασμιδίων της οικογένειας αυτής, εμφανίζουν μεγάλη συντηρητικότητα της αλληλουχίας τους, σε τέτοιο βαθμό μάλιστα που είναι δυνατό να προβλέπονται οι θέσεις *nic* για πολλά από αυτά (**Σχήμα 67**). Όλες αυτές οι δυνητικές περιοχές *oriT* βρίσκονται ανοδικά του γονιδίου *mob* και εμφανίζουν μια παρόμοια διαμόρφωση αντίστροφης επανάληψης σχηματίζοντας δομή μίσχου-θηλιάς. Η θέση *nic* για τα πλασμίδια pMV158 και pBBR1 βρίσκεται στη θηλιά αυτής της αντίστροφης επανάληψης (Guzman & Espinoza, 1997; Szpirer *et al.*, 2001). Αναγνώριση περιοχών *oriTs* διαφόρων πλασμιδίων από μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη κινητοποίησης έχει αποδειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις, υποδηλώνοντας ότι η συν-κινητοποίηση θα μπορούσε να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό.



**Σ γ ή μ α 67.** Στοίχιση των θέσεων *nic* πλασμιδίων της οικογένειας pMV158-τύπου.

(a) Γενετική οργάνωση της οικογένειας των κινητοποιήσιμων πλασμιδίων pMV158-τύπου

(b) Σύγκριση των θέσεων *nic* πλασμιδίων που ανήκουν στην οικογένεια pMV158-τύπου.

Σαν επαλήθευση των παραπάνω συμπερασμάτων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ο προσδιορισμός της ελάχιστης περιοχής που είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση του pZMO3, δηλ. της περιοχής *oriT*. Η περιοχή αυτή εντοπίστηκε ανοδικά του ORF1, ακολουθώντας τον κανόνα που ισχύει για την οικογένεια pMV158-τύπου, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 111 και 519 της αλληλουχίας pZM2 των Misawa και Nakamura, 1989 (Afendra *et al.*, 1999).

→  
 AAAAACTGGCACTATCTCAAGCTACCTTTGCAAGAGGTCTAGCCGAATTAGAAAAAGCT-164  
 → I ←  
 AAAATCATTGCAAAGCATGTTTCG**CCAAGGATGGTATTTTATTAA**TCCTAATTTTCGTTTTTC-224  
 AATGGCGACCGCGTAGCTTTCCACAACAGTTATAGAACGC AAAAGACGCTCCAAAAGCAA-284  
 (ORF2 end)\*\*\* ScaI  
 GACGAATCAGAATAAATTCagtactCACTACGGAAATTGCTTT**TTTCC**TTCCGGAAAAACAA-344  
 → II ←  
 TTCCAGTTCGCTACTAGGGAAAGAAATATAGGCTGGATT**TTTCC**CTGGTCTTTTCTCA-404  
**ATCCGACCTAA**  
 └→ (ORF1 start)  
 AATTAAAGCAGTTAAAACATGCCGAACCTATGCAATCTTTAGGTTTGAAAAACATAAAAACA-464  
 NdeI ←  
 GTTGGCAGATTAAAGCCGCGAGCCTGcatatgACGCGAGGCCGCGAAACACAAAACGCT-524

**Σ χ ή μ α 68.** Νουκλεοτιδική αλληλουχία κομματιού του pZMO3 (θέση 105-524 σύμφωνα με τους Misawa & Nakamura, 1989) στο οποίο εντοπίστηκε η περιοχή *oriT*. Οι περιοχές (I-II) που παρουσιάζουν ομολογία με γνωστές *oriT* είναι σημειωμένες με έντονα γράμματα (η περιοχή II βρίσκεται στην συμπληρωματική αλυσίδα). Η θέση πρόσδεσης στο ριβόσωμα (AGC) υπογραμμίζονται. (→), αντίστροφες επαναλήψεις. (→), ολογονουκλεοτίδια-εκκινητές PCR.

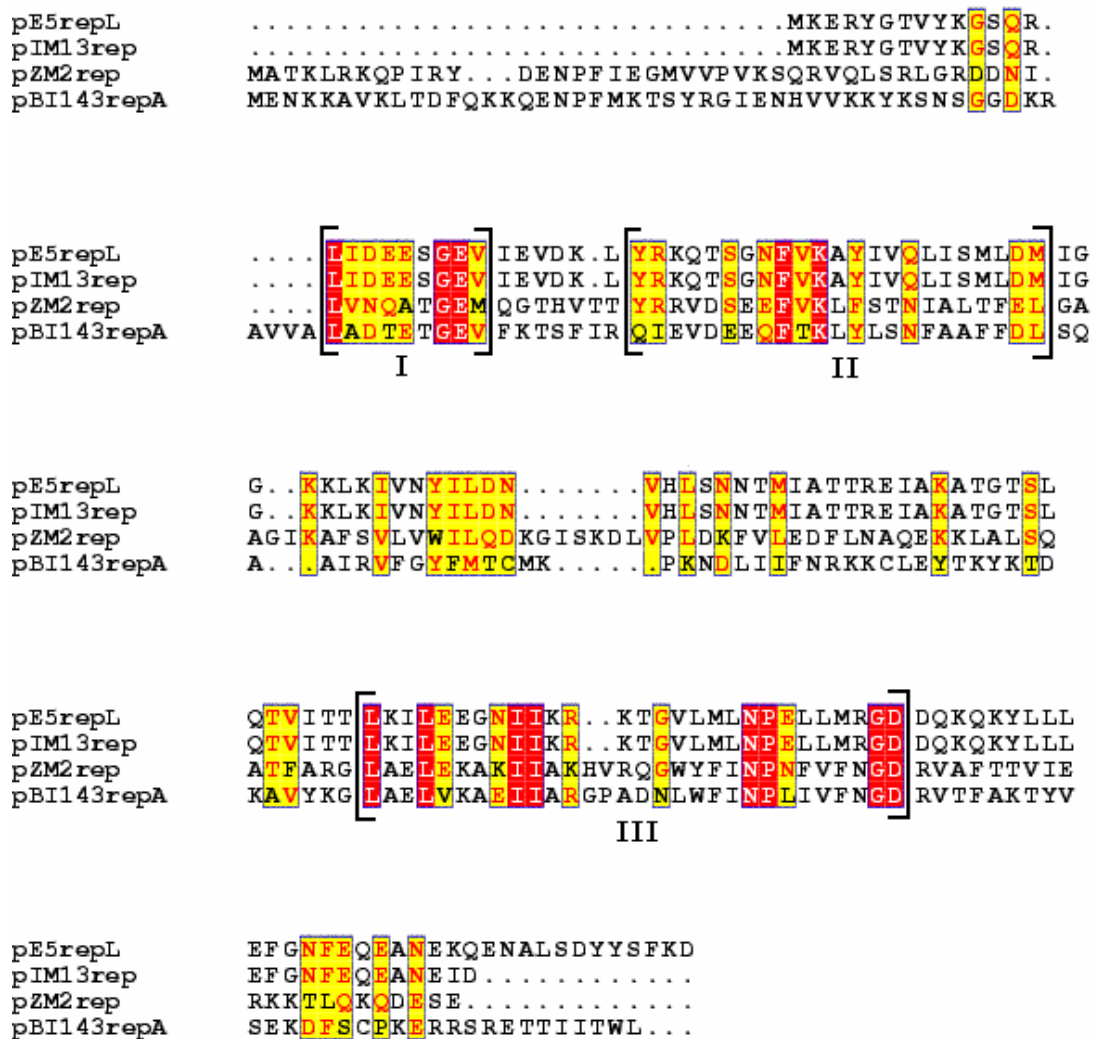
Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιείχαν το ORF1 χωρίς όμως την περιοχή ανοδικά αυτού, δεν ήταν κινητοποιήσιμα. Όμοια ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιείχαν την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 111 και 519 (*oriT*) χωρίς να περιέχουν άθικτο το ORF1 επίσης δεν ήταν κινητοποιήσιμα από τα ίδια τα πλασμίδια. Ήταν όμως κινητοποιήσιμα όταν συνυπήρχαν με ανασυνδυασμένα πλασμίδια του pZMO3 όπου το ORF1 ήταν άθικτο.

Δύο διαφορετικά τμήματα μέσα στο κομμάτι 111 έως 519 έδειξαν σχετική ομολογία με *oriT* περιοχές άλλων κινητοποιήσιμων ή συζευκτικών πλασμιδίων. Το πρώτο βρίσκεται στο C-τελικό του ORF2 (θέση 190-212) και το δεύτερο τμήμα βρίσκεται ανοδικά του ORF1, στη συμπληρωματική αλυσίδα ανάμεσα στα νουκλεοτίδια 368-392 (**Σχήμα 68**). Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιείχαν το ένα από τα δύο παραπάνω τμήματα κάθε φορά, απέτυχαν να κινητοποιηθούν, πράγμα που σημαίνει ότι για την κινητοποίηση του pZMO3 απαιτείται ολόκληρο το κομμάτι 111 έως 519.

Ένα άλλο στοιχείο της αλληλουχίας του pZMO3 που πρέπει να επισημανθεί είναι ο σχετικά μικρός αριθμός περιοριστικών θέσεων για *Sau3AI*. Συγκεκριμένα εμφανίζονται 4

θέσεις *Sau3AI* τη στιγμή που ο προβλεπόμενος αριθμός για μία αλληλουχία 2,7 kb (με 41% G+C), βασιζόμενος σε τυχαία κατανομή των θέσεων GATC είναι 10 (Smith *et al.*, 1995). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται τόσο στο πλασμίδιο pBI143 (2,7 kb, καμία θέση *Sau3AI*) του γένους *Bacteroides*, όσο και στο τρανσποζόνιο Tn4555 (12,2 kb, 2 θέσεις *Sau3AI*). Όλα τα παραπάνω γενετικά στοιχεία είναι κινητοποιήσιμα, γεγονός που μας οδηγεί στην άποψη ότι κατά την εξέλιξή τους υπήρχε επιτακτική ανάγκη “άμυνας” απέναντι στην περιοριστική ενδονουκλεάση *Sau3AI*.

Είναι σημαντικό τέλος να αναφέρουμε τη χαρακτηριστική ομοιότητα που παρουσιάζει το pZMO3 με το κρυπτικό πλασμίδιο pBI143 (Accession No. U30316), το οποίο αποτελεί το πιο διαδεδομένο πλασμίδιο του γένους *Bacteroides* (Smith *et al.*, 1995). Πρόκειται για ένα πλασμίδιο Μ.Β. 2,7 kb η αλληλούχισή του οποίου έδειξε επίσης την ύπαρξη δύο ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης: ένα που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη αντιγραφής (RepA) και ένα που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη κινητοποίησης (MobA). Σύγκριση μάλιστα του ORF2 του pZMO3 με τη RepA πρωτεΐνη του pBI143 έδειξε 32% ομολογία ενώ σύγκριση των δύο αυτών πρωτεϊνικών μορίων με τράπεζες δεδομένων έδειξε κάποια ομολογία με πλασμδιακές πρωτεΐνες αντιγραφής προερχόμενες από Gram<sup>+</sup> βακτήρια και που αντιγράφονται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, έδειξαν ομοιότητα με τις πρωτεΐνες αντιγραφής των πλασμιδίων pE5 του *S. aureus* και pIM13 του *B. subtilis* της οικογένειας pSN2-τύπου (**Πίνακας 24**). Στο σχήμα που ακολουθεί βλέπουμε ότι τρεις περιοχές I, II και III των πρωτεϊνών αυτών παρουσιάζουν ικανοποιητική συντηρητικότητα.



**Σχήμα 69.** Στοιχίση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας μέρους του πολυπεπτιδίου του ORF2 του pZMO3 (PZMO3REP), με αντίστοιχες αλληλουχίες πρωτεϊνικών μορίων από τα πλασμίδια pE5, pIM13 και pBI143 της οικογένειας πλασμιδίων pSN2-τύπου. Σε κόκκινο πλαίσιο είναι οι περιοχές πλήρους συντηρητικότητας ενώ σε κίτρινο πλαίσιο βρίσκονται οι περιοχές υψηλής συντηρητικότητας αμινοξέων.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι παρ' όλο που μεταφορά DNA από *Z. mobilis* σε *E. coli* έχει ανιχνευτεί παλαιότερα (Παππά 1997, Διδακτορική διατριβή), υπάρχει έλλειψη πληροφόρησης σχετικά με το σύστημα κινητοποίησης που χρησιμοποιεί το *Z. mobilis*. Εξετάστηκε λοιπόν και αποκαλύφθηκε η ικανότητα κινητοποίησης ενός από τα τρία, μικρού M.B., πλασμίδια του βακτηρίου *Z. mobilis* ATCC 10988, του pZMO3. Η κινητικότητα αυτή οφείλεται (i) σε ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF1) ευρισκόμενο πάνω στο ίδιο το πλασμίδιο, που κωδικοποιεί για ένα πρωτεϊνικό μόριο, το M.B. του οποίου προσδιορίστηκε, τόσο με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία όσο και

πειραματικά, στα 66 kDa. Πρόκειται για μία πιθανή πρωτεΐνη κινητοποίησης υπεύθυνη για την κινητοποίηση του ίδιου του πλασμιδίου και (ii) σε μία υποτιθέμενη δραστική περιοχή αρχής έναρξης της αντιγραφής *oriT* που βρίσκεται ανοδικά του ORF1 στο pZMO3.

Η μελέτη πάντως αυτή αποτέλεσε την πρώτη ολοκληρωμένη αναφορά σχετικά με κινητοποίηση ενός εκ των μικρού μοριακού βάρους πλασμιδίων του *Z. mobilis*. Η ύπαρξη της αλληλουχίας που προσδίδει κινητικότητα στο pZMO3 σε συνδυασμό με την μη δυνατότητα μεταβίβασης των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 μπορεί να εκμεταλλευτεί η γενετική μηχανική σε διάφορες εφαρμογές. Η κατασκευή καινούργιων πλασμιδιακών φορέων γι' αυτόν τον μικροοργανισμό, που θα βοηθήσουν στην περαιτέρω μελέτη των γενετικών ιδιοτήτων του, είναι μία από τις εφαρμογές αυτές. Επιπλέον, το σύστημα βακτηριακής σύζευξης που αναπτύχθηκε, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο για τον εντοπισμό ικανοτήτων κινητοποίησης νέων πλασμιδιακών φορέων ευρέως φάσματος.



# ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



**A**

- Abdel-Monem, M., Taucher-Scholz, G. and Klinkert, M.-O. (1983).** Identification of *Escherichia coli* DNA helicase I as the *traI* gene product of the F sex factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4659-4663.
- Adler, H.I., Fisher, W.D., Hardigree, A.A. and Stapleton, G.E. (1966).** Repair of radiation-induced damage to the cell division mechanism of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **91**, 737-742.
- Αφένδρα Α.-Σ. (1992).** Μεταφορά και έκφραση πλασμιδιακού DNA στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*: Μελέτη του συστήματος του μετασηματισμού, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Afendra, A.S. and Drainas, C. (1987).** Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 127-134.
- Afendra, A.S., Vartholomatos, G., Arvanitis, N. and Drainas, C. (1999).** Characterization of the mobilization region of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10998 plasmid pZM03. *Plasmid* **41**, 73-77.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

- Anthony, K.G., Sherburne, C., Sherburne, R. and Frost, L.S. (1994).** The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol. Microbiol.* **13**, 939-953.
- Antoine, R. and Locht, C. (1992).** Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* **6**, 1785-1799.
- Aruffo, A. (1991).** Expression cloning vectors. *Curr. Opin. Biotech.* **2**, 735-741.
- Arvanitis, N., Afendra, A.S. and Drainas, C. (1995).** *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3 expresses mobilization functions in *Escherichia coli* JM83 and RR1. *Biotechnol. Lett.* **17**, 681-686.
- Arvanitis, N., Pappas, K.M., Kolios, G., Afendra, A.S., Typas, M.A. and Drainas, C. (2000).** Characterization and replication properties of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmids pZMO1 and pZMO2. *Plasmid.* **44**, 127-137.
- Ashiuchi, M., Zakaria, M.M., Sakaguchi, Y. and Yagi, T. (1999).** Sequence analysis of a cryptic plasmid from *Flavobacterium* sp. KP1, a psychrophilic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 243-249.
- Azoulay, T., Michel, G.P.F. and Starka, J. (1985).** Separation of Membrane Fractions in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters* **30**, 251-255.

## **B**

- Bagdasarian, M., Bailone, A., Bagdasarian, M.M., Manning, P.A., Lurz, R., Timmis, K.N., Devoret, R. (1986).** An inhibitor of SOS induction, specified by a plasmid locus in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5723-5726.
- Balzer, D., Pansegrau, W. and Lanka, E. (1994).** Essential motifs of Relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **176**, 4285-4295.
- Barker, B.T.P. and Hillier, V.F. (1912).** Cider sickness. *J. Agric. Sci.* **5**, 67-85.

- Βαρθολομάτος, Γ.Α. (1995).** Επίδραση γονιδίων γενετικού ανασυνδυασμού στην πλασμιδιακή σταθερότητα του βακτηρίου *Zymomonas mobilis*. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Bartosik, D., Baj, J., Sochacka, M., Piechucka, E. and Wlodarczyk, M. (2002).** Molecular characterization of functional modules of plasmid pWKS1 of *Paracoccus pantotrophus* DSM 11072. *Microbiology* **148**, 2847-2856.
- Bedzyk, L.A., Shoemaker, N.B., Young, K.E. and Salyers, A.A. (1992).** Insertion and excision of *Bacteroides* conjugative chromosomal elements. *J. Bacteriol.* **174**, 166-172.
- Beijersbergen, A., Dulk-Ras, A.D., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J. (1992).** Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*. **256**, 1324-1347.
- Beijersbergen, A., den Dulk-Ras, A., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J.J. (1992).** Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **256**, 1324-1327.
- Bird, R.E. and Tomizawa, J. (1987).** Ribonucleotide-deoxyribonucleotide linkages at the origin of DNA replication of colicinE1 plasmid. *J. Mol. Biol.* **120**, 137-143.
- Blair, D.G. and Helinski, D.R. (1975).** Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. I. Strand-specific association of protein and DNA in the relaxed complexes of plasmids ColE1 and ColE2. *J. Biol. Chem.* **250**, 8785-8789.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Cross, J.H. and Falkow, S. (1977).** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979).** Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors, *Methods Enzymol.* **68**, 245-267.
- Bouia, A., Bringel, F., Frey, L., Kammerer, B., Belarbi, A., Guyonvarch, A. and Hubert, J.C. (1989).** Structural organization of pLP1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904. *Plasmid* **22**, 185-192.

- Boyd, A.C., Archer, J.A.K. and Sherratt, D.J. (1989).** Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 488-498.
- Bradshaw, H.D. Jr, Traxler, B.A., Minkley, E.G. Jr, Nester, E.W. and Gordon, M.P. (1990).** Nucleotide sequence of the *tral* (helicase I) gene from the sex factor F. *J. Bacteriol.* **172**, 4127-4131.
- Brestic-Goachet, N., Gunasekaran, P., Cami, B. and Baratti, J.C. (1987).** Transfer and expression of broad-host-range plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **9**, 13-18.
- Brestic-Goachet, N., Gunasekaran, P., Cami, B. and Baratti, J.C. (1989).** Transfer and expression of *Erwinia chrysantemi* cellulose gene in *Z. mobilis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 893-903.
- Brestic-Goachet, N., Gunasekaran, P., Cami, B. and Baratti, J.C. (1990).** Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **153**, 219-225.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L. and Sahm, H. (1986).** Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146**, 105-110.
- Browne, G.M., Scotnicki, M.L. Goodman, A.E. and Rogers, P.L. (1984).** Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid* **12**, 211-214.
- Buchholz, S.E. and Eveleigh, D.E. (1986).** Transfer of plasmids to an antibiotic-sensitive mutant of *Z. mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **52**, 366-370.
- Buchholz, S.E., O'Mullan, P. and Eveleigh, D.E. 1988).** Growth of *Zymomonas mobilis* on mannitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 275-281.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987).** XL-1 Blue : a high efficiency plasmid transformation *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio/technology* **5**, 376-379.

- Byun, M. O-K., Kaper, J.B. and Ingram, L.O. (1986).** Construction of a new vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. *J. Indust. Microbiol.* **1**, 9-15.
- Byrd, D.R. and Matson, S.W. (1997).** Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol. Microbiol.* **25**, 1011-22.

## **C**

- Camps, M. (2010).** Modulation of ColE1-like Plasmid Replication for Recombinant Gene Expression. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **4**, 58-73.
- Carey, V.C., Walia, S.K. and Ingram, L.O. (1983).** Expression of a Lactose Transposon (Tn951) in *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol.* **46**, 1163-1168.
- Cesareni, G. and Banner, D.W. (1985).** Regulation of plasmid copy number by complementary RNAs. *TIBS August 1985*, 303-306.
- Chauhan, S. and Kuramitsu, H.K. (2004).** Sequence analysis of plasmid pTS1 isolated from oral spirochetes. *Plasmid* **51**, 61-65.
- Cho, D-W., Rogers, P.L. and Delaney, S.F. (1989).** Construction of a shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 50-53.
- Churchward, G., Linder, P. and Caro, L. (1983).** The nucleotide sequence of replication and maintenance functions encoded by plasmid pSC101. *Nucleic Acid Research* **11**, 5645-5659.
- Clewell, D.B. and Flannagan, S.E. (1993).** The conjugative transposons of Gram-positive bacteria, in: *Bacterial conjugation* (D.B. Clewell, ed.), Plenum Press, New York, 369-393.
- Conway, T., Osman, Y.A. and Ingram, L.O. (1987a).** Gene expression in *Zymomonas mobilis*: Promoter structure and identification of membrane anchor sequences forming functional LacZ' fusion proteins. *J. Bacteriol.* **169**, 2327-2335.
- Conway, T., Byun, M. O.-K. and Ingram, L.O. (1987c).** Expression vector for *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 235-241.

- Court, D.L., Oppenheim, A.B. and Adhya S.L. (2007).** A new look at bacteriophage lambda networks. *J. Bacteriol.* **189(2)**, 298-304.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. and Maas, W.K. (1988).** Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**, 375-395.
- Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberon, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portony Y.M. and Bolivar, F., (1981).** Construction and characterization of new cloning vehicles V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* **13**, 25-35.

## **D**

- Dally, E.L., Stokes, H.W. and Eveleigh, D.E. (1982).** Genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.* **4**, 91-96.
- D'Aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Gorczyca, P. and Kaplan, J.C. (1991).** Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3749.
- Dash, P.K., Traxler, B.A., Panicker, M.M., Hackney, D.D. and Minkley, E.G. Jr. (1992).** Biochemical characterization of *Escherichia coli* DNA helicase I. *Mol Microbiol.* **6**, 1163-1172.
- Date, T., Inuzuka, M. and Tomoeda, M. (1977).** Purification and characterization of F Pili from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **16**, 5579-5585.
- Datta, H.J., Kharti, G.S. and Bastia, D. (1999).** Mechanism of recruitment of DnaB helicase to the replication origin of the plasmid pSC101. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 73-78.
- Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C. and Picataggio, S. (1996).** Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4465-4470.
- de la Cruz, F., Frost L.S., Meyer, R.J. and Zechner. E.L. (2010).** Conjugative DNA metabolism in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 18-40.



- De Ley, J., Cattoir, H. and Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**, 133-142.
- Delgado, O.D., Abate, C.M. and Siñeriz, F. (1995).** Construction of an integrative shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol Lett.* **132**, 23-26.
- del Solar, G.H., Puyet, A. and Espinosa, M. (1987).** Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5561-5580.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, D. (1998).** Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 434-464.
- Derbyshire, K.M., Hatfull, G. and Wilets, N. (1987).** Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and sequence analysis of the mobilization region. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 161-168.
- Desiniotis, A., Kouvelis, V.N., Davenport, K., Bruce, D., Detter, C., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L.A., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Typas, M.A. and Pappas, K.M. (2012).** Complete Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Centrotype ATCC 29191. *J Bacteriol.* **194**, 5966-5967.
- Doelle, H.W., Preusser, H.J. and Rostek, H. (1982).** Electron microscopic investigations of *Zymomonas mobilis* cells grown in low and high glucose concentrations. *Eur. J. App. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 136-141.
- Doelle, H.W. and Greenfield, P.F. (1985).** Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 411-415.
- Doelle, H.W., Millichip, R.J., Doelle, M.B. and Wells, W. (1988).** Glucotech process: new ethanol production technology using *Zymomonas mobilis*, In 8<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium, Paris.
- Doelle, H.W., Kennedy, L.D. and Doelle, M.B. (1991).** Scale-up of ethanol production from sugar cane using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **13**, 131-136.

- Doelle, M. B. and Doelle, H. W. (1989).** Ethanol production from sugar cane syrup using *Zymomonas mobilis*, *J. Biotechnol.* **11**, 25-36.
- Dong, H.W., Bao, J., Ryu, D.D. and Zhong, J.J. (2011).** Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1616-1627.
- Dostal, L., Shao, S. and Schildbach, J.F. (2011).** Tracking F plasmid TraI relaxase processing reactions provides insight into F plasmid transfer. *Nucleic Acid Res.* **39**, 2658-2670.
- Drainas, C., Slater, A.A., Coggins, L., Montague, P., Costa, R.G., Ledingham, W.M. and Kinghorn, J.R. (1983).** Electron microscopic analysis of *Zymomonas mobilis* strain ATCC 10988 plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.* **5**, 405-408.
- Drainas, C., Typas, M.A. and Kinghorn, J.R. (1984).** A derivative of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 with impaired ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **6**, 37-42.
- Drainas, C. (1992).** Genetic instability of vectors used for the modification of microorganisms: Molecular implications following deliberate release. *XII, Dir. European Communities.*
- Durland, R.H. and Helinski, D.R. (1987).** The sequence encoding the 43-kilodalton trfA protein is required for efficient replication or maintenance of minimal RK2 replicons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid* **18**, 164-169.
- Dürrenberger, M.B., Villinger, W. and Bächli, T. (1991).** Conjugational junctions: morphology of specific contacts in conjugating *Escherichia coli* bacteria. *J. Struct. Biol.* **107**, 146-156.

## **E**

- Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M-F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D. and Forterre, P. (1996).** Sequence of plasmid pGT5 from the Archeon *Pyrococcus abyssi*: Evidence for Rolling-Circle Replication in a Hyperthermophile. *J. Bacteriol.* **178**, 3232-3237.

Everett, R. and Willetts, N. (1980). Characterisation of an in vivo system for nicking at the origin of conjugal DNA transfer of the sex factor F. *J. Mol. Biol.* **136**, 129-150.

## **F**

Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 1648-1652.

Firth, N., and Skurray, R. (1992). Characterization of the F plasmid bifunctional conjugation gene, traG. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 145-153.

Firth, N., Ippen-Ihler, K. and Skurray, R. (1996). Structure and Function of the F Factor and Mechanism of Conjugation. In: F. Neidhardt *et al.*, (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, second edition p. 2377-2401. ASM Press, Washington, D.C.

Foster, T.J. (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**, 361-409.

Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C. and de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* **28**, 79-100.

Frost, L.S., Paranchych, W. and Willetts, N.S. (1984). DNA sequence of the F traALE region that includes the gene for F pilin. *J. Bacteriol.* **160**, 395-401.

Frost, L.S., Ippen-Ihler, K. and Skurray, R.A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**, 162-210.

Fürste, J.P., Pansegrau, W., Ziegelin, G., Kroger, M. and Lanka, E. (1989). Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: Interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1771-1775.

**Furuya, N. and Komano, T. (1991).** Determination of the nick site at *oriT* of IncI1 plasmid R64: Global similarity of *oriT* structures of IncI1 and IncP plasmids. *J. Bacteriol.* **173**, 6612-6617.

## **G**

**Gao, Q., Luo, Y. and Deonier, R.C. (1994).** Initiation and termination of DNA transfer at F plasmid *oriT*. *Mol. Microbiol.* **11**, 449-458.

**Garcillán-Barcia, M.P., Jurado, P., Gonzalez-Perez, B., Moncalian, G., Fernadez, L.A. and de la Cruz F. (2007).** Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells and antibodies. *Mol. Microbiol.* **63**, 404-416.

**Geider, K. and Hoffmann-Berling, H. (1981).** Proteins controlling the helical structure of DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 233-260.

**Gennaro, M.L., Iordanescu, S., Novick, R.P., Murray, R.W., Steck, T.R., Khan, S.A.. (1989).** Functional organization of the plasmid pT181 replication origin. *J. Mol. Biol.* **205**, 355-362.

**Gibbs, R. and de Moss, R.D. (1954).** Anaerobic dissimilation of <sup>14</sup>C-labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lidnerii*. *J. Biol. Chem.* **207**, 689-694.

**Gonçalves de Lima, O., Schumacher, I.E. and Araujo, J.M. (1972).** New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. Ecological aspects of some problems in microbiology. *Rev. Inst. Antibiot.*, **12**, 57-69.

**Goodman, A.E., Strzelecki, A.T. and Rogers, P.L. (1984).** Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **1**, 219-228.

**Grinsted, J. and Bennett, P.M. (1988).** Preparation and Electrophoresis of Plasmid DNA. *Methods in Microbiology* **21**, 129-142.

**Gruss, A. and Ehrlich, D. (1989).** The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**, 231-241.

- Guiney, D.G. and Helinski, D.R. (1975).** Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. III. Association of protein with the 5' terminus of the broken DNA strand in the relaxed complex of plasmid ColE1. *J. Biol. Chem.* **250**, 8796-8803.
- Guogas, L.M., Kennedy, S.A., Lee, J.H. and Redinbo, M.R. (2009).** A novel fold in the TraI relaxase-helicase C-terminal domain is essential for conjugative DNA transfer. *J. Mol. Biol.* **386**, 554-568.
- Guzman, L.M. and Espinoza, M. (1997).** The mobilization protein MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.* **266**, 688-702.

## **H**

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1987).** Mechanisms of DNA transformation. In J. Ingraham, F. Neidhardt, K. Low, B. Magasanik and H. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hardy, K. (1981).** Bacterial plasmids (T. Neelson L T Ed.), *Hong Kong*.
- Haring, V., Scholtz, P., Scherzinger, E., Frey, J., Derbyshire, K., Hatfull, G., Willetts, N.S. and Bagdasarian, M. (1985).** Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6090-6094.
- Harrington, L.C. and Rogerson, A.C. (1990).** The F pilus of *Escherichia coli* appears to support stable DNA transfer in the absence of wall-to-wall contact between cells. *J. Bacteriol.* **172**, 7263-7264.
- Hashimoto-Gotoh, T. and Sekiguchi, M. (1977).** Mutations to temperature sensitivity in R plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* **131**, 608-619.

**I**

**Inamoto, S., Fukuda, H., Abo, T. and Ohtsubo, E. (1994).** Site- and strand-specific nicking at *oriT* of plasmid R100 in a purified system: Enhancement of the nicking activity of TraI (helicase I) with TraY and IHF. *J. Biochem.* **116**, 838-844.

**Ippen-Ihler, K.A. and Minkley, E.G. Jr. (1986).** The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 593-624.

**Itoh, T. and Tomizawa, J.-I. (1978).** Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA Polymerase, Ribonuclease H and DNA Polymerase I. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, p. 409-418.

**Itoh, T. and Tomizawa, J.-I. (1980).** Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2450-2454.

**I**

**Joachimsthal, E., Haggett, K.D. and Rogers, P.L. (1999).** Evaluation of recombinant strains of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77**, 147-157.

**Joachimsthal, E. and Rogers, P.L. (2000).** Characterization of a high-productivity recombinant strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Appl Biochem Biotechnol.* **84-86**, 343-356.

**Johns, M.R., Greenfield, P.F. and Doelle, H.W. (1991).** Byproducts from *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.* **17**, 44-49.

**Johnsborg, O., Eldholm, V. and Håvarstein, L.S. (2007).** Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* **58**:767-778.

**K**

- Kademi, A. and Baratti, J. (1996).** Effect of substrate concentration on ethanol production by *Zymomonas mobilis* on cellulose hydrolysate", *Biotechnology Letters*, **18**, 1019-1024.
- Karunakaran, T. and Gunasekaran, P. (1991).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of mercuric ion resistance coding genes from *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **19**, 287-300.
- Kaur, R., Gupta, R.P., Sedha, R.K., Neelam, K. and Pandher, M.S. (1993).** Optimization of fermentation conditions for ethanol production using immobilized and free cells of *Zymomonas mobilis*. *Indian J. Microbiol.* **33**, 169–173.
- Khan, S.A. and Novick, R.P. (1983).** Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**, 251-259.
- Khan, S.A., Murray, R.W. and Koepsel, R.R. (1988).** Mechanism of plasmid pT181 DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **951**, 375-81.
- Khan, S.A. (1997).** Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 442-455.
- Khan, S.A. (2000).** Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol. Microbiol.* **37**, 477-484.
- Khan, S.A. (2005).** Plasmid rolling-circle replication: highlights of two-decades of research. *Plasmid* **53**, 126-136.
- Kim, J.Y., Kim, J.-H. and Chong, H. (2006).** Development of succinic acid producing *Zymomonas mobilis* strain. Abstract 28th Symp Biotechnol for Fuels and Chemicals, Nashville, TN, April 30–May 3
- Kim, K. and Meyer, R.J. (1985).** Copy number of the broad-host-range plasmid R1162 is determined by the amount of essential plasmid-encoded proteins. *J. Mol. Biol.* **185**, 755-767.

- Kingsman, A. and Willetts, N. (1978).** The requirements for conjugal DNA synthesis in the donor strain during flac transfer. *Mol Biol.* **122**, 287-300.
- Kinoshita, S., Kakizono, T., Kadota, K., Das, K. and Taguchi, H. (1985).** Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 249-259.
- Kleanthous, H., Clayton, C.L. and Tabaqchali, S. (1991).** Characterization of plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 2377-2389.
- Koespel, R.R., Murray, R.W. and Khan, S.A. (1986).** Sequence-specific interaction between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5484-5488.
- Koespel, R.R. and Khan, S.A. (1986).** Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* **233**, 1316-1318.
- Kolios, G., Lekka, M., Typas, M.A. and Drainas, C. (1989).** Bioconversion of fruit and sugar beet extracts by *Zymomonas mobilis* to ethanol and other fine chemicals. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 363-365.
- Koraimann, G. (2003).** Lytic transglycosylases in macromolecular transport system of Gram-negative bacteria. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 2371-2388.
- Koutinas, A.A., Kanellaki, M., Typas, M.A. and Drainas, C. (1986).** Raisin: suitable raw material for ethanol production using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 517-520.
- Kouvelis, V.N., Saunders, E., Brettin, T.S., Bruce, D., Detter, C., Han, C., Typas, M.A. and Pappas, K.M. (2009).** Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *J. Bacteriol.* **191**, 7140-7141.
- Kouvelis, V.N., Davenport, K.W., Brettin, T.S., Bruce, D., Detter, C., Han, C.S., Nolan, M., Tapia, R., Damoulaki, A., Kyrpides, N.C., Typas, M.A. and Pappas, K.M. (2011).** Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* lectotype strain ATCC 29192. *J. Bacteriol.* **193**, 5049-5050.



- Kramer, M.G., Khan, S.A. and Espinosa, M. (1997).** Plasmid rolling circle replication: identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement for DNA polymerase I for lagging strand synthesis. *EMBO J.* **16**, 5784-5795.
- Kramer, M.G., Espinosa, M., Misra, T.K. and Khan, S.A. (1998).** Lagging strand replication of rolling-circle plasmids: specific recognition of the *ssoA*-type origins in different gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10505-10510.
- Kramer, M. G., Espinosa, M., Misra, T. K. and Khan, S. A. (1999).** Characterization of a single-strand origin, *ssoU*, required for broad host range replication of rolling-circle plasmids. *Mol. Microbiol.* **33**, 466-475.
- Kües, U. and Stahl, U. (1989).** Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 491-516.
- Kuhn, B., Abdel-Monem, M., Krell, H. and Hoffmann-Berling, H. (1979).** Evidence for two mechanisms for DNA unwinding catalyzed by DNA helicases. *J. Biol. Chem.* **254**, 11343-11350.
- Kupelwieser, G., Schwab, M., Hogenauer, G., Koraimann, G. and Zechner, E.L. (1998).** Transfer protein TraM stimulates TraI-catalyzed cleavage of the transfer origin of plasmid R1 in vivo. *J. Mol. Biol.* **275**, 81-94.
- Kushner, S.R., Sheperd, J., Edwards, G. and Maples, V.F. (1978).** *UvrD*, *uvrE* and *recL* represent a single gene, in: *DNA repair mechanisms* (P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox, eds.), Academic Press Inc., NY, pp. 251-254.

## **L**

- Lacks, S.A., Lopez, P., Greenberg, B. and Espinoza, M. (1989).** Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **192**, 753-765.
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lam, C.K., O'Mullan, P. and Eveleigh D.E. (1993).** Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 305–308.
- Lanka, E. and Wilkins, B.M. (1995).** DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 141-169.
- Lavers, B.H., Pang, P., MacKenzie, C.R., Lawford, G.R., Pik, J. and Lawford, H.G. (1981).** Industrial alcohol production by high performance bacterial fermentation. in *Advances in Biotechnology*, Moo-Young, M. and Robinson, C. W., eds., vol. II, Pergamon, Toronto, pp. 195–204.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R. Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D.H. (1989).** Isolation, characterization and expression in *E. coli* of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* **264**, 6427-6437.
- Lawford, G.R., Lavers, B.H., Good, D., Charley, R., Fein, J. and Lawford, H.G. (1982).** *Zymomonas* ethanol fermentations: Biochemistry and Bioengineering, in: *International symposium on Ethanol from biomass* (H.E. Duckworth and E.A. Thomson, eds.), Ottawa: Royal Society of Canada, pp. 482-507.
- Lawford, G.R., Charley, R.C., Edamura, R., Fein, J., Hopkins, K., Potts, D., Zawadski, B. and Lawford, H.G. (1988).** Scale-up of the Bio-Hol process for the conversion of biomass to ethanol, in: *Biotechnology and Renewable Energy* (M. Moo-Young, S. Hasuain and J. Lamptey, eds.), Elsevier, New York.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D., Mohagheghi, A. and McMillan, J.D. (1999).** Fermentation performance characteristics of a prehydrolyzate-adapted xylose-fermenting recombinant *Zymomonas* in batch and continuous fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77**, 191-204.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D. and Tolan, J.S. (2001).** Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91–93**, 133-146.
- Lawford, H.G. and Rousseau, J.D. (2003).** Cellulosic fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **106**, 457-469.

- Lee, K.J., Tribe, D.F. and Rogers, P.L. (1979).** Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. *Biotechnol. Lett.* **1**, 421-426.
- Lejeune, A., Eveleigh, D.E. and Colson, C. (1988).** Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters* **49**, 363-366.
- Lessl, M., Balzer, D., Pansegrau, W. and Lanka, E. (1992).** Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* **267**, 20471-20480.
- Lessl, M., Balzer, D., Weyrauch, K. and Lanka, E. (1993).** The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J. Bacteriol.* **175**, 6415-6425.
- Lessl, M. and Lanka, E. (1994).** Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* **77**, 321-324.
- Levchenko, T. and Filutowicz, M. (1996).** Initiator protein pi can bind independently to two domains of the gamma origin core of plasmid R6K: the direct repeats and the A+T-rich segment. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1936-1942.
- Li, L.-Y., Shoemaker, N.B., Wang, G.-R., Cole, S.P., Hashimoto, M.K., Wang, J. and Salyers, A.A. (1995).** The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette. *J. Bacteriol.* **177**, 3940-3945.
- Lin, L.-S. and Meyer, R.J. (1986).** Directly repeated 20 bp sequence of plasmid R1162 is required for replication, expression of incompatibility, and copy-number control. *Plasmid* **15**, 35-47.
- Lin, L.-S., Kim, Y.-J. and Meyer, R.J. (1987).** The 20-bp, directly repeated DNA sequence of broad-host-range plasmid R1162 exerts incompatibility *in vivo* and inhibits R1162 DNA replication *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 390-397.
- Linder, P. (1928).** Garungsstudien uber Pulque in Mexiko. *Ber. Westpreuss, Bot. Zool. Ver.* **50**, 253-255.

- Loftie-Eaton, W. and Rawlings, D.E. (2012).** Diversity, biology and evolution of IncQ-family plasmids. *Plasmid* **67**, 15-34.
- Lovett, M.A. and Helinski, D.R. (1975).** Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. II. Characterization of the proteins associated with the unrelaxed and relaxed complexes of plasmid ColE1. *J. Biol. Chem.* **250**, 8790-8795.
- Lu, J., Wong, J.J.W., Edwards, R.A., Manchak, J., Frost, L.S. & Glover J.N.M. (2008).** Structural basis of specific TraD–TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **70**, 89–99.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Glavina del Rio, T., Tice, H., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Balakireva, M., Brettin, T., Detter, J.C., Han, C., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Mikhailova, N. and Pappas, K. (2010).** Complete sequence of plasmids of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4. Direct Submission. CONSRTM US DOE Joint Genome Institute. BioProject: PRJNA45825.
- Luria, S.E. and Darnell Jr., J.E. (1967).** General Virology, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.

## **M**

- Mackenzie, K.F., Conway, T., Aldrich, H.C. and Ingram, L.O. (1989).** Expression of *Zymomonas mobilis* adhB (encoding alcohol dehydrogenase II) and adhB-lacZ operon fusions in recombinant *Z. mobilis*. *J. Bacteriol.* **171**, 4577-4582.
- Maloy, S.R. (1990).** Expression of Cloned Gene Products in: *Experimental Techniques in Bacterial Genetics* pp. 95-99, Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston, MA.
- Maloy, S.R., Cronan, Jr., J.E. and Freifelder, D. (1994).** Molecular Genetics. Jones and Bartlett Publishers.
- Maneewannakul, S., Kathir, P. and Ippen-Ihler, K. (1992).** Characterization of the F plasmid mating aggregation gene *traN* and of a new F transfer region locus *trbE*. *J. Mol. Biol.* **225**, 299-311.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Margolin, P. (1987).** Generalized transduction. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. (F. Neidhardt, J. Ingraham, K. Low, B. Magasanik and H.E. Umbarger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 1154-1168.
- Matson, S.W. and Kaiser-Rogers, K.A. (1990).** DNA helicases. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 289-329.
- Matson, S.W., Nelson, W.C. and Morton, B.S. (1993).** Characterization of the reaction product of the *oriT* nicking reaction catalysed by *Escherichia coli* Dna helicase I. *J. Bacteriol.* **175**, 2599-2606.
- Mazodier, P. and Davies, J. (1991).** Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Gen.* **25**, 147.
- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T. and Sucoka, N. (1986).** The nucleotide sequence of pUB110: some silent features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **25**, 113-120.
- Meyer, R. (2009).** Replication and conjugative mobilization of Broad-Host-range IncQ plasmids. *Plasmid* **62**, 57-70.
- Miao, D.-M., Honda, Y. Tanaka, K., Higashi, A., Nakamura, T., Taguchi, Y., Sakai, H., Komano, T. and Bagdasarian, M. (1993).** A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Nucleic Acid Res.* **21**, 4900-4903.
- Misawa, N., Okamoto, T., Nakamura, K., Kitamura, K., Yanase, H. and Tonomura, K. (1986).** Construction of a new shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3201-3203.
- Misawa, N. and Nakamura, K. (1989).** Nucleotide sequence of the 2.7-kb plasmid of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Biotech.* **12**, 53-70.

- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.C. and Zhang, M. (2002).** Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol Lett* **26**, 321-325.
- Mohagheghi, A., Dowe, N., Schell, D., Chou, Y.C., Eddy, C. and Zhang, M. (2004).** Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**, 885-898.
- Montenecourt, B.S. (1985).** *Zymomonas*, a unique genus of bacteria, in : *Biology of Industrial Microorganisms* (A.L. Demain and N.A. Solomon, eds.), Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, pp. 161-181.
- Murphy, C.G. and Malamy, M.H. (1993).** Characterization of a «mobilization cassette» in transposon Tn4399 from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **175**, 5814-5823.
- Murray, R.W., Koespel, R.R. and Khan, S.A. (1989).** Synthesis of single-stranded plasmid pT181 DNA in vitro: initiation and termination of DNA replication. *J. Biol. Chem.* **264**, 1051-1057.

## **N**

- Neale, A.D., Scopes, R.K., Kelly, J.M. and Wettenhall, R.E.H. (1986).** The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological roles. *Eur J Biochem.* **154**, 119-124.
- Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E.H. and Hoogenraad, N.J. (1987).** Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 1024-1028.
- Nelson, W.C., Howard, M.T., Sherman, J.A. and Matson, S.W. (1995).** The *traY* gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*. *J. Biol. Chem.* **270**, 28374-80.

**Noirot, P., Bargonetti, J. and Novick, R.P. (1990).** Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8560-8564.

**Novick, R.P. (1989).** Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol.* **43**, 537-565.

## Q

**Oskam, L., Hillenga, D.J., Venema, G. and Bron, S. (1991).** The large *Bacillus* plasmid pTB19 contains two integrated rolling-circle plasmids carrying mobilization functions. *Plasmid* **26**, 30-39.

## P

**Pansegrau, W. and Lanka, E. (1991).** Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucleic Acids Research* **19**, 3455.

**Pansegrau, W., Ziegelin, G. and Lanka, E. (1990).** Covalent association of the *traI* gene product of plasmid RP4 with the 5' -terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* **18**, 10637-10644.

**Παππά Α.-Μ. (1997).** Μελέτη της μεταφοράς γονιδίων μέσω σύζευξης στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Pappas, K.M., Kouvelis, V.N., Saunders, E., Brettin, T.S., Bruce, D., Detter, C., Balakireva, M., Han, C.S., Savvakis, G., Kyrpides, N.C. and Typas, M.A. (2011).** Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* lectotype strain ATCC 10988. *J. Bacteriol.* **193**, 5051-5052.

**Paranchych, W. (1975).** Attachment, ejection and penetration stages of the RNA phage infection process in. *RNA Phages* (Zinder, N. D., ed.) pp. 85–131, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Paranchych, W. and Frost, L.S. (1988).** The physiology and biochemistry of pili. *Adv. Microbiol. Physiol.* **29**, 53-114.
- Park, S.C. and Baratti, J. (1991).** Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 304-313.
- Park, S.C., Kademi, A. and Baratti, J. (1993).** Alcoholic fermentation of cellulose hydrolysate by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1179-1184.
- Park, Y.K., Mortatti, M.P.L. and Sato, H.H. (1983).** Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Biotechnol. Lett.* **5**, 515-518.
- Peacock, S.L., McIver, C.M. and Monahan, J.J. (1981).** Transformation of *Escherichia coli* using homopolymer-linked plasmid chimeras. *Biochem. Biophys. Acta* **655**, 242-250.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Perrson, C. and Nordström, K. (1986).** Control of replication of the broad host range plasmid RSF1010: the incompatibility determinant consists of directly repeated DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 189-192.
- Pillidge, C.J., Cambourn, W.M. and Pearce, L.E. (1996).** Nucleotide sequence and analysis of pWC1, a pC194-type rolling circle replicon in *Lactococcus lactis*. *Plasmid* **35**, 131-140.
- Pratt, J.M., Boulnois, G.J., Darby, V., Orr, E., Wahle, E. and Holland, I.B. (1981).** Identification of gene products programmed by restriction endonuclease DNA fragments using an *E. coli* in vitro system. *Nucleic Acid Res.* **9**, 4459-4474.
- Priebe, S.D. and Lacks, S.A. (1989).** Region of the streptococcal plasmid pMV158 for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* **171**, 4778-4784.
- Projan, S.J., Kornblum, J., Moghazeh, S.L., Edelman, I., Gennaro, M.L. and Novick, R.P. (1985).** Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, cognate plasmid replicons from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 452-464.



**Projan, S.J. and Archer, G.L. (1989).** Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pG01 involves three pC221 loci. *J. Bacteriol.* **171**, 1841-1845.

**Puyet, A., del Solar, G.H. and Espinosa, M. (1998).** Identification of the origin and direction of replication of the broad-host-range plasmid pLS1. *Nucleic Acids Res.* **16**, 115-133.

## **R**

**Ragonese, H., Haisch, D., Villareal, E., Choi, J.H. and Matson, S.W. (2007).** The F plasmid-encoded TraM protein stimulates relaxosome-mediated cleavage at *oriT* through an interaction with TraI. *Mol. Microbiol.* **63**, 1173 - 1184.

**Rajewska, M., Wegrzyn, K. and Konieczny, I. (2012).** AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 408-434.

**Rasooly, A., Projan, S. L. and Novick, R.P. (1994).** Plasmids of the pT181 family show replication-specific initiator protein modification. *J. Bacteriol.* **176**, 2450-2453.

**Reaney, D.C., Gowland, P.C. and Slater, J.H. (1983).** Genetic interactions among microbial communities. *In* Microbes in their Natural Environments. Slater, J.H., Whittenbury, R. and Wimpenny, J.M.T. (eds.) pp. 379-422. Cambridge University Press, Cambridge.

**Reisch, M.S. (2006).** Fuels of the future: Chemistry and agriculture join to make a new generation of renewable fuels. *Chem. Eng. News*, **84**, 30–32.

**Reynen, M., Reipen, L., Sahm, H. and Sprenger, G.A. (1990).** Construction of expression vectors for the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 335-341.

**Rogers, P.L., Lee, K.J. and Tribe, D.E. (1979).** Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnol. Lett.* **1**, 165-170.

**Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L. and Tribe, D.E. (1982).** Ethanol production by *Zymomonas mobilis*, In Adv. Biochem. Eng., (ed. Fiechter, A.) vol. **23**, 27-84.

**Romano, A. H. (1986).** Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **4**, 207-213.

**Ruiz-Argueso, T. & Rodriguez-Navarro, A. (1975).** Microbiology of ripening honey. *Appl. Microbiol.* **30**, 893-896.

**Rush, MG and Misra, R. (1985).** Extrachromosomal DNA in eucaryotes. *Plasmid* **14**, 177-191.

## **S**

**Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

**Sakai, H. and Komano, T. (1996).** DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 377-382.

**Salyers, A.A., Shoemaker, N.B. and Li, L.-Y. (1995a).** In the driver's seat: The *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobile. *J. Bacteriol.* **177**, 5727-5731.

**Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. and Li, L.-Y. (1995b).** Conjugative transposons: An unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* **59**, 579-590.

**Samaras, T., Drainas, C. and Afendra, A.S. (2009).** Complete sequence of *Zymomonas mobilis* NCIB 11163 cryptic plasmid pZMN1-1. *Direct submission*. GeneBank FN554922.1 Submitted (SEP-2009) to the GenBank databases.

**Sancar, A. and Rupert, C.S. (1978).** Correction of the map location for the *phr* gene in *Escherichia coli* K12. *Mutat. Res.* **51**, 139-143.

**Sancar, A., Hack, A.M. and Rupp, W.D. (1979).** Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.* **137**, 692-693.

- Sancar, A. and Rupp, W.D. (1983).** A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*. **33**, 249-260.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467.
- Scherzinger E., Bagdasarian, M.M., Scholtz, P., Lurz, R., Rückert, B. and Bagdasarian, M. (1984).** Replication of the broad-host-range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid encoded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 654-658.
- Scherzinger E., Kruft, V. and Otto, S. (1993).** Purification of the large mobilization protein of plasmid RSF1010 and characterization of its-specific DNA-cleaving/DNA-joining activity. *Eur. J. Biochem.* **217**, 929-938.
- Scherzinger, E., Ziegelin, G., Bárcena, M., Carazo, J.M., Lurz, R. and Lanka, E. (1997).** The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **272**, 30228-30236.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Leibold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. and Scherzinger, E. (1989).** Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **75**, 271-288.
- Schuster, C., van der Linden, M. and Hakenbeck, R. (1998).** Small cryptic plasmids of *Streptococcus pneumoniae* belong to the pC194/pUB110 family of rolling circle plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 427-431.
- Σκορδάκη Α. (1990).** Μελέτη των φυσικών πλασμιδίων του στελέχους ATCC 10998 του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου *Zymomonas mobilis*. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Scopes, R.K. and Griffiths-Smith, K., (1986).** Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. *Biotechnol. Lett.* **8**, 653-656.
- Scordaki, A. and Drainas, C. (1987).** Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2547-2556.

- Scordaki, A. and Drainas, C. (1990).** Analysis and stability of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3. *Plasmid* **23**, 59-66.
- Scott, J.R. (1992).** Sex and the single circle: Conjugative transposition. *J. Bacteriol.* **174**, 6005-6010.
- Seery, L.T., Nolan, N.C., Sharp, P.M. and Devine, K.M. (1993).** Comparative analysis of the pC194 group of rolling circle plasmids. *Plasmid* **30**, 185-196.
- Seo, J.S., Chong, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Jung, C., Kim, J.J., Hong, J.H., Kim, H., Kim, J.H., Kil, J.I., Park, C.J., Oh, H.M., Lee, J.S., Jin, S.J., Um, H.W., Lee, H.J., Oh, S.J., Kim, J.Y., Kang, H.L., Lee, S.Y., Lee, K.J. and Kang, H.S. (2005).** The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol.* **23**, 63-68.
- Seong, G.H., Kobatake, E., Miura, K., Nakazawa, A., and Aizawa, M. (2002).** Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 361-366.
- Seubert, A., Falch, C., Birtles, R.J., Schulein, R. and Dehio, C. (2003).** Characterization of the cryptic plasmid pBGR1 from *Bartonella grahamii* and construction of a versatile *Escherichia coli*-*Bartonella* spp. shuttle cloning vector. *Plasmid* **49**, 44-52.
- Shimwell, J.L. (1950).** *Saccharomonas*: a proposed new genus for bacteria producing a quantitative alcoholic fermentation of glucose. *J. Inst. Brew.* London **56**, 179-182.
- Shoemaker, N.B. and Salyers, A.A. (1990).** A cryptic 65-kilobase-pair transposonlike element isolated from *Bacteroides uniformis* has homology with *Bacteroides* conjugal tetracycline resistance elements. *J. Bacteriol.* **172**, 1694-1702.
- Shoemaker, N.B., Wang, G.-R., Stevens, A.M. and Salyers, A.A. (1993).** Excision, transfer and integration of NBU1, a mobilizable site-selective insertion element. *J. Bacteriol.* **175**, 6578-6587.

- Silhary, T., Berman, M. and Enquist, L. (1984).** Experiments with Gene Fusions, p. 213-214, Gold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Silverman, P. M. (1987).** The structural basis of prokaryotic DNA transfer, p. 277–310. *In*: M. Inouye (ed.), Bacterial Outer Membranes as Model Systems. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Simon, R., Pfieser, U. and Puhler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology* **1**, 784-791.
- Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. and Rogers, P.L. (1980).** R-Plasmid transfer in *Z. mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **40**, 7-12.
- Skotnicki, M.L., Goodman, A.E., Warr, R.G. and Rogers, P.L. (1984).** Isolation and characterisation of *Zymomonas mobilis* plasmids. *Microbios* **40**, 53-61.
- Smith, C.J., Rollins, L.A. and Parker, A.C. (1995).** Nucleotide sequence determination and genetic analysis of the *Bacteroides* plasmid, pB1143. *Plasmid* **24**, 211-222.
- Solovyev, V. and Salamov, A. (2011).** Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *In* Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies, (eds. Li, R.W.), Nova Science Publishers, p. 61-78
- Som, T., Armstrong, K.A., Volkert, F.C. and Broach, J.R. (1988).** Autoregulation of 2 micron circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell* **15;52(1)**, 27-37.
- Sprenger, G.A., Typas, M.A. and Drainas, C. (1993).** Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 17-24.
- Stalker, D.M., Thomas, C.M. and Helinski, D.R. (1981).** Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad-host-range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 8-12.
- Stewart, G. and Carlson, C. (1986).** The biology of natural transformation. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 211.

- Stokes, H.W., Dally, E.L., Yablonsky, M.D. and Eveleigh, D.E. (1983).** Comparison of plasmids in strains of *Z. mobilis*. *Plasmid* **91**, 138-146.
- Strohdeicher, M., Schmitz, B., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. (1988).** Formation and degradation of glucose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 378-382.
- Strzelecki, A.T., Goodman, A.E. and Rogers, P.L. (1987).** Behavior of the IncW plasmid Sa in *Zymomonas mobilis*. *Plasmid* **18**, 197-205.
- Su, P., Delaney, S.F. and Rogers, P.L. (1988).** Kinetics of plasmid transformation in *Z. mobilis*. *J. Biotechnol.* **8**, 317-320.
- Su, P., Delaney, S.F. and Rogers, P.L. (1989).** Cloning and expression of a  $\beta$ -glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **9**, 139-152.
- Swing, J. and De Ley, J. (1977).** The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* **41**, 1-46.
- Szpirer, C.Y., Faelen, M. and Couturier, M. (2001).** Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J. Bacteriol.* **183**, 2101-2110.

## **T**

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
- Thorstenson, Y.R., Kuldau, G.A. and Zambryski, P.C. (1993).** Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: Implications for the formation of a T-DNA transport structure. *J. Bacteriol.* **175**, 5233-5241.
- Tomizawa, J.-I., Ohmori, M. and Bird, R.E. (1977).** Origin of replication of colicinE1 plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1865-1869.
- Tonomura, K., Kurose, N., Konishi, S. and Kawasaki, H. (1982).** Occurrence of plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2851-2853.

**Tonomura, K., Okamoto, T., Yasui, M. and Yanase, H. (1986).** Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 805–808.

**Traxler, B.A. and Minkley, E.G. Jr. (1987).** Revised genetic map of the distal end of the F transfer operon: implications for DNA helicase I, nicking at *oriT*, and conjugal DNA transport. *J. Bacteriol.* **169**, 3251-3259.

**Traxler, B.A. and Minkley, E.G. Jr (1988).** Evidence that DNA helicase I and *oriT* site-specific nicking are both functions of the F TraI protein. *J. Mol. Biol.* **204**, 205-209.

## V

**Vapnek, D. and Rupp, W.D. (1970).** Asymmetric segregation of the complementary sex-factor DNA strands during conjugation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **53**, 287-303.

**Varsaki, A., Moncalián, G., Garcillán-Barcia, M.P., Drainas, C. and de la Cruz, F. (2009).** Analysis of ColE1 MbeC unveils an extended ribbon-helix-helix family of nicking accessory proteins. *J. Bacteriol.* **191**, 1446-1455.

**Viret, J-F., Bravo, A. And Alonso, J. (1991).** Recombination-Dependent concatameric plasmid replication. *Microbiol. Rev.* **55**, 675-683.

**von Freiesleben, U. and Rasmussen, K.V. (1992).** The level of supercoiling affects the regulation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **143**, 655-663.

## W

**Walia, S.K., Carey, V.C., All III, B.P. and Ingram L.O. (1984).** Self-transmissible plasmid in *Z. mobilis* carrying antibiotic resistances. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 198-200.

**Wang, J.J., Lu, J. and Glover, J.M. (2012).** Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids – a structural biology perspective. *Mol. Microbiol.* **85**, 608-617.

**Willetts, N. and Wilkins, B. (1984).** Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* **48**, 24-41.

**Willetts, N. and Skurray, R. (1987).** Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation, p. **1110-1133** In: F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.

**Wong, J.J., Lu, J. and Glover, J.N. (2012).** Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids – a structural biology perspective. *Mol. Microbiol.* **85**, 602-617.

## **Y**

**Yamaguchi, K. and Yamaguchi, M. (1984).** The replication origin of pSC101: the nucleotide sequence and replication functions of the *ori* region. *Gene* **29**, 211-219.

**Yamaguchi, K. and Masamune, Y. (1985).** Autogenous regulation of synthesis of the replication protein in plasmid pSC101. *Mol Gen Genet.* **200**, 362-367.

**Yanase, H., Kotani, T. and Tonomura, K. (1986).** Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3139-3144.

**Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.

**Yang, X., and McFadden, B.A. (1993).** The complete DNA sequence and replication analysis of the plasmid pCB2.4 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plasmid* **31**, 131-137.

**Yen, Y.M. and Serdar, C.M. (1988).** Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonads*. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 247-268.



- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A. and Masamune, Y. (1991).** Rolling-circle replication of the plasmid pKYM isolated from a Gram-negative bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10282-10286.
- Yoon, K.H., Pack, S.H. and Pack, M.Y. (1988).** Transfer of *Bacillus subtilis* endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene into *Z. anaerobia*. *Biotechnol. Lett.* **10**, 213-216.
- Yoshida, N. and Sato, M. (2009).** Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 791-798.

## **Z**

- Zechner, E.L., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A.M., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C.M., Wilkins B.M. and Zatyka M. (2000).** Conjugative-DNA transfer processes p. **87-174.** In C. M. Thomas (ed.), The horizontal gene pool: Bacterial plasmids and gene spread. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Zechner, E.L., Lang, S. and Schildbach, J.F. (2012).** Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367**, 1073-1087.
- Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M. and Picataggio, S. (1995).** Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* **267**, 240-243.
- Zhao, A.C. and Khan, S.A. (1996).** An 18-basepair sequence is sufficient for termination of rolling-circle replication of plasmid pT181. *J. Bacteriol.* **178**, 5222-5228.