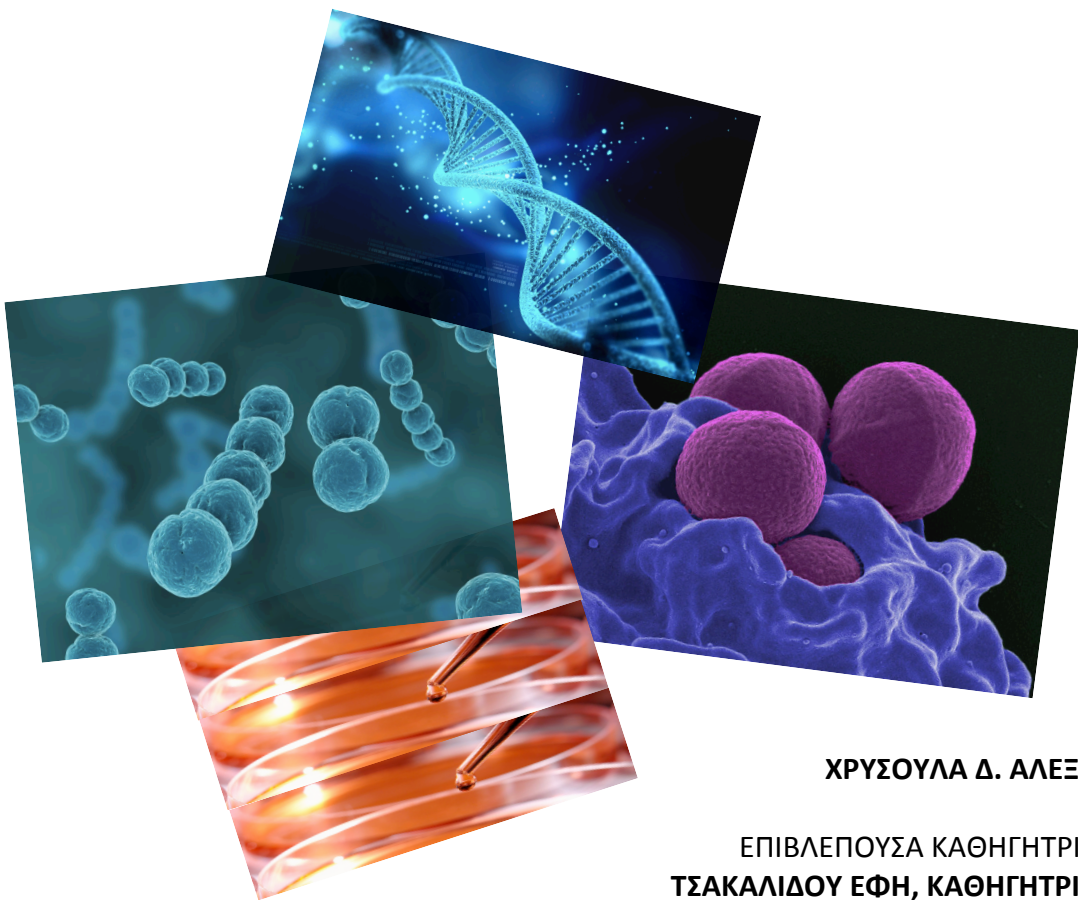


Γ Ε Ω Π Ο Ν Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν
Τ Μ Η Μ Α Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Η Σ Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν Κ Α Ι Δ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Η Σ Τ Ο Υ Α Ν Θ Ρ Ω Π Ο Υ
Ε Ρ Γ Α Σ Τ Η Ρ Ι Ο Γ Α Λ Α Κ Τ Ο Κ Ο Μ Ι Α Σ
Π Ρ Ο Γ Ρ Α Μ Μ Α Μ Ε Τ Α Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Ω Ν Σ Π Ο Υ Δ Ω Ν
« Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Η & Τ Ε Χ Ν Ο Λ Ο Γ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν & Δ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Η Τ Ο Υ Α Ν Θ Ρ Ω Π Ο Υ »
Κ Α Τ Ε Υ Θ Υ Ν Σ Η « Σ Υ Σ Τ Η Μ Α Τ Α Δ Ι Α Χ Ε Ι Ρ Ι Σ Η Σ Π Ο Ι Ο Τ Η Τ Α Σ & Α Σ Φ Α Λ Ε Ι Α Σ Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν »

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Κλωνοποίηση βακτηριοσινών του *Streptococcus macedonicus* ACA - DC 198
σε βακτήρια *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*
και *Streptococcus thermophilus* »



ΧΡΥΣΟΥΛΑ Δ. ΑΛΕΞΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

Γ Ε Ω Π Ο Ν Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν
Τ Μ Η Μ Α Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Η Σ Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν Κ Α Ι Δ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Η Σ Τ Ο Υ Α Ν Θ Ρ Ω Π Ο Υ
Ε Ρ Γ Α Σ Τ Η Ρ Ι Ο Γ Α Λ Α Κ Τ Ο Κ Ο Μ Ι Α Σ
Π Ρ Ο Γ Ρ Α Μ Μ Α Μ Ε Τ Α Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Ω Ν Σ Π Ο Υ Δ Ω Ν
« Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Η & Τ Ε Χ Ν Ο Λ Ο Γ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν & Δ Ι Α Τ Ρ Ο Φ Η Τ Ο Υ Α Ν Θ Ρ Ω Π Ο Υ »
Κ Α Τ Ε Υ Θ Υ Ν Σ Η « Σ Υ Σ Τ Η Μ Α Τ Α Δ Ι Α Χ Ε Ι Ρ Ι Σ Η Σ Π Ο Ι Ο Τ Η Τ Α Σ & Α Σ Φ Α Λ Ε Ι Α Σ Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Ω Ν »

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Κλωνοποίηση βακτηριοσινών του *Streptococcus macedonicus* ACA - DC 198
σε βακτήρια *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*
και *Streptococcus thermophilus* »

ΧΡΥΣΟΥΛΑ Δ. ΑΛΕΞΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

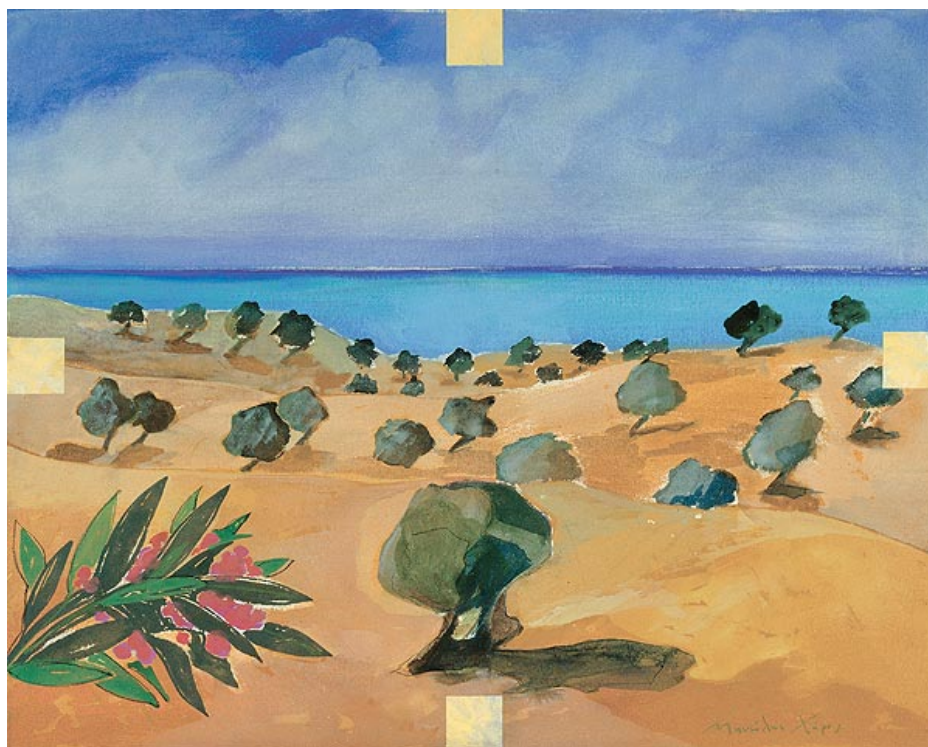
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Κλωνοποίηση βακτηριοσινών του *Streptococcus macedonicus* ACA - DC 198
σε βακτήρια *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*
και *Streptococcus thermophilus* »

Χρυσούλα Δ. Αλέξη

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΜΕΛΗ: ΓΙΑΝΝΙΩΤΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ



«Ελληνικό Φως» 1994, Μανώλης Χάρος (Πηγή: www.michael-culture.gr)

Περίληψη Ελληνικά

Ο *Streptococcus macedonicus* απομονώθηκε για πρώτη φορά από Ελληνικό Κασσέρι. Είναι οξυγαλακτικό βακτήριο, ανήκει στο σύμπλεγμα των μικροοργανισμών *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* και φαίνεται να έχει χάσει κάποια στοιχεία της παθογένειάς του εξελικτικά. Το στέλεχος *S. macedonicus* ACA-DC 198 παρουσιάζει τεχνολογικό ενδιαφέρον καθώς παράγει αντιμικροβιακά πεπτιδία τις βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες ανάλογα με την κλάση στην οποία ανήκουν λειτουργούν με διαφορετικούς τρόπους στην αναστολή της ανάπτυξης βλαστικών μορφών και σπορίων βακτηρίων. Η μασεδοσίνη και η μασεδοβισίνη του *S. macedonicus* εκδηλώνουν αντιμικροβιακή δράση έναντι άλλων Gram θετικών βακτηρίων, όπως οξυγαλακτικά, αλλοιωγόνα και παθογόνα βακτήρια. Η ανάλυση του γονιδιώματός του έδωσε ενδείξεις για την ύπαρξη τριών νέων πιθανών βακτηριοσινών.

Σκοπός της μελέτης ήταν η κλωνοποίηση των νέων βακτηριοσινών σε κύτταρα *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* και *Streptococcus thermophilus*.

Για το λόγο αυτό, από το φορέα κλωνοποίησης pORI198 δημιουργήθηκε ο παλίνδρομος φορέας που έφερε τμήμα DNA για τις νέες τρεις βακτηριοσίνες. Ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης χρησίμευε στην ένθεση του DNA για τις νέες τρεις βακτηριοσίνες σε κύτταρα *E. coli*, *L. lactis* και *S. thermophilus*. Στη μελέτη αναλύονται οι μέθοδοι και οι νέες τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την κλωνοποίηση. Ακόμα περιγράφεται ο έλεγχος για την ετερόλογη έκφραση των νέων βακτηριοσινών μέσω της αναστολής πιθανών ευαίσθητων στελεχών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης περιλαμβάνουν την επιτυχή κλωνοποίηση των τριών νέων βακτηριοσινών σε κύτταρα *E. coli* και *L. lactis* και την ανάπτυξη νέας διαδικασίας για την κλωνοποίηση στον *S. thermophilus*. Ο έλεγχος για την ετερόλογη έκφραση των νέων βακτηριοσινών δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συμπύκνωσης. Απαιτείται περαιτέρω έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης των νέων βακτηριοσινών με την αλυσιδωτή αντίδραση της ανάστροφης τρανσκριπτάσης. Η αντίδραση αυτή θα συμβάλει στον καθορισμό του αντιμικροβιακού φάσματος των νέων βακτηριοσινών.

Λέξεις Κλειδιά: *Streptococcus macedonicus*, βακτηριοσίνες, κλωνοποίηση,
ηλεκτρομετασχηματισμός, μοριακές τεχνικές

**“Cloning bacteriocins of *Streptococcus macedonicus* ACA - DC 198 in bacteria
Escherichia coli, *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*”**

Streptococcus macedonicus had been isolated for the first time from the Greek cheese Kasseri. It is a lactic acid bacterium that belongs to *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. It seems to have lost evolutionary elements of its pathogenicity. Strain *S. macedonicus* ACA-DC 198 presents technological interest because it produces antimicrobial peptides, bacteriocins. Bacteriocins act in different ways -according to the class they belong to- in order to inhibit the growth of stem and spore forms of bacteria. Macedocin and macedovicin, the known bacteriocins produced by *S. macedonicus*, exhibit antimicrobial activity against other Gram positive bacteria, such as lactic acid bacteria, as well as several food spoilage and pathogenic bacteria. The analysis of its genome has shown the existence of three new potential bacteriocins.

The purpose of the study was to clone the new bacteriocins in bacteria cells of *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*.

Therefore, shuttle cloning vector bearing DNA fragment of three new bacteriocins had been created from cloning vector pORI198. Shuttle vector was used to insert DNA fragment into *E. coli*, *L. lactis* and *S. thermophilus* cells. The study analyzes the cloning methods and new techniques that have been applied to. Also, the heterologous expression of the new bacteriocins through inhibition of putative sensitive strains is described.

The study results include the successful cloning of the three new bacteriocins into *E. coli* and *L. lactis* cells and the development of a new process for cloning into *S. thermophilus*. Monitoring for the heterologous expression of the new bacteriocins gave no positive results even when the bacteriocins were condensated. Further control of the heterologous expression of the new bacteriocins by polymerase chain reaction of reverse transcriptase is needed. This control will help determine the antimicrobial spectrum of the three new bacteriocins.

Key words: *Streptococcus macedonicus*, bacteriocins, cloning, electrotransformation, molecular techniques

Ευχαριστίες

Η Διπλωματική Εργασία αυτή, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, με κατεύθυνση: "Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων".

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τη συνδρομή τους στην εκπόνηση της εργασίας αυτής:

Πρώτα την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, κα. Έφη Τσακαλίδου, για τη σημαντική βοήθεια και τις εύστοχες παρατηρήσεις. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός ότι με συμπεριέλαβε στο εν λόγω εργαστήριο, δίνοντάς μου την ευκαιρία να δουλέψω σε ένα περιβάλλον με άριστη οργάνωση και συνέπεια.

Τους κ.κ. Γιαννιώτη Σταύρο, Καθηγητή και Παναγιώτη Σκανδάμη, Επίκουρο Καθηγητή για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής επίβλεψης και αξιολόγησης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, τον Δρ. Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου, για το γεγονός ότι με επέλεξε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα.

Την Δρ. Ράνια Αναστασίου, για την ανεκτίμητη βοήθειά της, καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Την υποψήφια διδάκτωρα κα Μαρία Κάζου, για την πολύτιμη στήριξή της κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για την άψογη συνεργασία μας και τη συμπαράστασή τους.

Ευχαριστώ από καρδιάς,

Χρυσούλα Δ. Αλέξη

Περιεχόμενα

α/α	Κεφάλαιο	Σελ
A	Περίληψη Ελληνικά	4
B	Περίληψη Αγγλικά	6
Γ	Ευχαριστίες	7
Δ	Περιεχόμενα	8
1.	Εισαγωγή	10
1.1	Οξυγαλακτικά βακτήρια	10
1.1.1	Συστηματική ταξινόμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων	10
1.1.2	Φυσιολογία οξυγαλακτικών βακτηρίων	11
1.1.3	Χρησιμότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα	11
1.2	Γένος <i>Streptococcus</i>	12
1.2.1	<i>Streptococcus macedonicus</i>	14
1.3	Πλασμίδια	15
1.3.1	Φορέας κλωνοποίησης pORI198	16
1.4	Βακτηριοσίνες	17
1.4.1	Κλάσης I- Λαντιβιοτικά	18
1.4.1.1	Τρόπος βιοσύνθεσης λαντιβιοτικών	18
1.4.1.2	Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών	19
1.4.2	Κλάσης II - Μη τροποποιημένες βακτηριοσίνες	22
1.4.2.1	Τρόπος δράσης μη τροποποιημένων βακτηριοσινών	22
1.4.3	Κλάσης III- Βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους	23
1.4.4	Μασεδοσίνη του <i>Streptococcus macedonicus</i>	24
1.4.5	Μασεδοβισίνη του <i>Streptococcus macedonicus</i>	25
2.	Σκοπός Μελέτης	26
3.	Υλικά & Μέθοδοι - Πειραματική Διαδικασία	26
3.1	Βακτηριακά κύτταρα και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης	26
3.2	Πειραματική Διαδικασία	28
3.2.1	Απομόνωση γενωμικού υλικού- gDNA	28
3.2.2	Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA	29
3.2.3	Έλεγχος DNA σε πηκτή αγαρόζης	30
3.2.4	Ενίσχυση τμημάτων DNA με τις νέες βακτηριοσίνες	30
3.2.5	Εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης	31
3.2.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με υψηλό αριθμό αντιγράφων από <i>E.coli</i>	32
3.2.7	Πέψεις του πλασμιδίου pORI198	33
3.2.7.1	Μονή πέψη pORI198	33
3.2.7.2	Διπλή πέψη pORI198	34
3.2.8	Ένθεση τμημάτων DNA σε φορέα κλωνοποίησης	35
3.2.9	Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	35
3.2.10	Έλεγχος αποικιών με Colony PCR και πέψη παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης	36
3.2.11	Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων του <i>L. lactis</i> MG1363	37
3.2.12	Ενίσχυση τμημάτων DNA παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός	38

	<i>L.lactis</i>	
3.2.12.1	Ενίσχυση τμήματος DNA μικρού μεγέθους του παλίδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός του <i>L.lactis</i>	39
3.2.12.2	Ενίσχυση τμήματος DNA μεγάλου μεγέθους του παλίδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός του <i>L.lactis</i>	39
3.3	Έλεγχος έκφρασης	40
3.3.1	Δοκιμασία Διάχυσης Υπερκειμένου	40
3.3.2	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>Streptococcus thermophilus</i>	41
4.	Αποτελέσματα- Συζήτηση	42
4.1	Γενικά	42
4.2	Νέες βακτηριοσίνες <i>Streptococcus macedonicus</i>	43
4.3	Απομόνωση γενετικού υλικού νέων βακτηριοσινών	44
4.4	Ενίσχυση DNA για τις νέες βακτηριοσίνες	44
4.5	Απομόνωση πλασμιδιακού φορέα ρORI198 από <i>E. coli</i>	45
4.6	Ενζυμική πέψη φορέα κλωνοποίησης	45
4.7	Ένθεση DNA νέων βακτηριοσινών στο φορέα κλωνοποίησης	46
4.8	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	46
4.9	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>L. lactis</i>	49
4.10	Έλεγχος έκφρασης μέσω ευαίσθητων στελεχών	54
4.11	Έλεγχος έκφρασης με ενσωμάτωση σε ξενιστή	57
5	Συμπεράσματα	57
6	Μελλοντική διερεύνηση	58
7	Βιβλιογραφία	59
E	Κατάλογος Εικόνων	62
ΣΤ	Κατάλογος Πινάκων	65

1. Εισαγωγή

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Η χρήση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι διαχρονική. Η παρατήρηση της αλλαγής των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων και η αύξηση της διατηρησιμότητάς τους με τη χρήση μικροοργανισμών είναι γνωστή από την αρχαιότητα, αν και γινόταν καθαρά εμπειρικά χωρίς να υπάρχει η γνώση περί των μικροοργανισμών. Οι τεχνολογικές και επιστημονικές εξελίξεις που ακολούθησαν, ιδίως κατά τον 18^ο και 19^ο αιώνα, οδήγησαν σε θεμελιώδεις ανακαλύψεις στην επιστήμη της μικροβιολογίας τροφίμων. Ορόσημα αποτέλεσαν η ενασχόληση του Pasteur με την οξυγαλακτική ζύμωση το 1857 και η απομόνωση καθαρής βακτηριακής καλλιέργειας *Bacterium lactis* από τον Lister το 1873. Απόρροια ήταν ο χαρακτηρισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria, LAB) ως ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών και το σημαντικότερο, η χρήση τους ως εναρκτηρίες καλλιέργειας στα τυριά και το ξινόγαλο, η οποία οδήγησε στη βιομηχανοποιημένη παραγωγή τροφίμων (Stiles and Holzapfel, 1977).

1.1.1 Συστηματική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η συστηματική κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων μεταβάλλεται διαρκώς λόγω των επιστημονικών εξελίξεων. Παλαιότερα η ταξινόμηση γινόταν με βάση τη μορφολογική και φαινοτυπική ανάλυση των βακτηρίων. Σήμερα πραγματοποιείται σε μοριακό επίπεδο, χάρη στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, τη συνεχή ανακάλυψη νέων γονιδίων, τη χρήση της βιοπληροφορικής και τον εμπλουτισμό των βάσεων αυτής. Κατόπιν τούτου, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη Lactobacillales της κλάσης Bacilli του φύλλου Firmicutes. Χωρίζονται σε έξι οικογένειες με σαράντα γένη συνολικά. Το μεγάλο εύρος των έξι αυτών οικογενειών υποδηλώνει και την ποικιλομορφία που υπάρχει εντός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Tsakalidou & Papadimitriou 2011): Aerococcaceae (με επτά γένη), Carnobacteriaceae (με δεκαέξι γένη), Enterococcaceae (με επτά γένη), Lactobacillaceae (με τρία γένη), Leuconostocaceae (με τέσσερα γένη), Streptococcaceae (με τρία γένη). Ιδιαίτερα σημαντικά για τα τρόφιμα είναι τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Οι διαρκείς επιστημονικές εξελίξεις δεν αποκλείουν την αλλαγή της ταξινόμησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο μέλλον.

1.1.2 Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν κοινά μορφολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά. Είναι θετικά κατά Gram κόκκοι ή ραβδία, προαιρετικά αναερόβιοι ή αεροανθεκτικοί και μη σπορογόνοι μικροοργανισμοί. Δε διαθέτουν κυτόχρωμα, συνεπώς δεν χρησιμοποιούν οξυγόνο για την οξείδωση των χημικών ενώσεων και ως εκ τούτου είναι αρνητικοί στη δοκιμή της καταλάσης. Παρουσιάζουν ιδανική ανάπτυξη στους 30-40°C και ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH, ενώ έχουν τα ίδια την ικανότητα παραγωγής οξέων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τα σάκχαρα, τα οποία καταβολίζουν ομοζυμωτικά με τον σχηματισμό γαλακτικού οξέος ή ετεροζυμωτικά με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος ή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Αξιοποιούν πέρα από τον άνθρακα των σακχάρων και το άζωτο των πρωτεϊνών ως πηγή ενέργειας. Σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από μικρά γονιδιώματα και χαμηλή αναλογία βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης στο μόριο του DNA (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

1.1.3. Χρησιμότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντούν στον άνθρωπο, τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, λόγω του φαινομένου της συμβίωσης, καθώς και σε ζυμούμενα τρόφιμα ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης. Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε προϊόντα ζύμωσης συμβάλλει στη διατήρηση, την ασφάλεια, τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων (Anastasiou *et al* 2007, Manios *et al* 2009). Ειδικότερα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν οργανικά οξέα, κυρίως γαλακτικό και οξικό, προκαλώντας πτώση του pH στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Επιπλέον παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου, διακετύλιο, αλλά και βακτηριοσίνες. Τα παραπάνω συντελούν στην μικροβιακή ασφάλεια και τη διατηρησιμότητα του προϊόντος. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, αρωματικών ενώσεων και διαφόρων ενζύμων βελτιώνουν το

άρωμα, τη γεύση και την υφή των τροφίμων. Επιπλέον τα βακτήρια αυτά αυξάνουν την θρεπτική αξία και την πεπτικότητα των προϊόντων, με την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων, την παραγωγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, τη μείωση της παραγωγής βιοενεργών αμινών και τη φυσική διάσπαση ενώσεων όπως η λακτόζη. Από τεχνολογικής άποψης, τα οξυγαλακτικά χρησιμοποιούνται ως τυποποιημένες βελτιωμένες εναρκτήριες καλλιέργειες (Yanniotis *et al* 2013 ed). Συντελούν, με αυτό τον τρόπο, στην παραγωγή σταθερού τελικού προϊόντος, με συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την αποφυγή τεχνολογικών εκτροπών (αποτροπή της υπεροξύνισης της γιαούρτης, της διόγκωσης των σκληρών τυριών κ.τ.λ.) (Leroy & De Vuyst 2004). Οι ιδιότητές τους τα καθιστούν άκρως απαραίτητα στην παραγωγή τροφίμων ζύμωσης καθώς με την αυτοματοποιημένη βιομηχανική παραγωγή αναδύονται διαρκώς νέοι μικροβιολογικοί και τεχνολογικοί κίνδυνοι (Skandamis & Nychas, 2011).

1.2 Γένος *Streptococcus*

Στα οξυγαλακτικά ανήκουν και τα βακτήρια του γένους *Streptococcus*. Η πρώτη περιγραφή βακτηρίων του γένους έγινε από τον Rosenbach και η πρώτη διάκρισή τους βάσει της αιμολυτικής τους ικανότητας από τον Shottmuller, στις αρχές του 20ου αιώνα. Έκτοτε ο διαχωρισμός έγινε με τη μελέτη ιδιοτήτων, όπως η ανθεκτικότητα, η αντιγονικότητα και η ζύμωση. Ο Lancefield ανέπτυξε τεχνική που ανίχνευε συγκεκριμένες αντιγονικές ομάδες των β-αιμολυτικών στελεχών του γένους. Ο Sherman αξιοποιώντας όλες τις προηγούμενες ιδιότητες και τεχνικές πρότεινε το διαχωρισμό των στρεπτοκόκκων σε τέσσερις κατηγορίες με βάση κοινές αντιγονικές ομάδες. Η διάκριση αυτή προσεγγίζει τον σύγχρονο τρόπο αναγνώρισης των στρεπτοκόκκων βάσει ομαδοποίησης ορότυπων (serogrouping-ομαδοποίηση βακτηρίων που περιέχουν ένα κοινό αντιγόνο).

Νεότερες μέθοδοι χρησιμοποιούνται πλέον για το διαχωρισμό στρεπτοκόκκων, όπως η κατάταξη με βάση τα γονίδια 16s rRNA, ο υβριδισμός DNA-rRNA, οι ορολογικές δοκιμές κ.α. Κατόπιν αυτών οι στρεπτόκοκκοι διακρίνονται σε: (α) *Streptococcus sensu stricto* που περιλαμβάνει την πλειονότητα των γνωστών ειδών, (β) *Enterococcus* για την ομάδα των εντεροκόκκων και (γ) *Lactococcus* για τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους (Tsakalidou *et al.* 1998).

Το γένος *Streptococcus* χωρίζεται στις ομάδες των β-αιμολυτικών και μη β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων. Η ομάδα των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων περιλαμβάνει τα είδη: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus anginosus* Group, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus phocae* και *Streptococcus didelphis*. Η ομάδα των μη β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων περιλαμβάνει τα είδη: 1) *Streptococcus pneumoniae*, 2) τα μέλη του συμπλέγματος *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (*S. bovis*, *S. equinus*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus pasteurianus* και *Streptococcus lutetiensis*), 3) *Streptococcus suis* και 4) πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι (*Viridans Streptococci*). Τα είδη των μη β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων σχηματίζουν κατά την ανάπτυξή τους σε αιματούχο άγαρ πρασινωπή ή καστανή άλω που οφείλεται στον αποχρωματισμό των ερυθροκυττάρων και την έξοδο καλίου από αυτά (Facklam 2002).

Με βάση τα δεδομένα της αλληλουχίας 16s rRNA περιγράφονται σήμερα διαφορετικές ομάδες εντός του γένους *Streptococcus*: *Streptococcus anginosus*, *S. bovis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* και *Streptococcus salivarius*. Επιπλέον, τα δεδομένα της αλληλουχίας 16s rRNA αποδεικνύουν στενή συγγένεια μεταξύ των *S. thermophilus* με τους *S. salivarius* και *S. vestibularis*, καθώς και τα δεδομένα του υβριδισμού DNA:DNA δείχνουν μια στενή σχέση μεταξύ των ειδών *S. bovis* και *S. equinus* (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Streptococcus* συμβιούν στους ζωϊκούς βλεννογόνους ενώ ορισμένοι είναι παθογόνοι ή ευκαιριακά παθογόνοι. Εντούτοις ο *S. thermophilus* θεωρείται ασφαλής ('Generally Recognized as Safe' – GRAS κατά FDA) και χρησιμοποιείται σε εναρκτήριες καλλιέργειες σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Φαίνεται να έχει απωλέσει ή να διατηρεί ως μη ενεργά χαρακτηριστικά γονίδια σχετιζόμενα με την τοξικότητα και την παθογένεια καθώς και να περιέχει μη λειτουργικά γονίδια για την αξιοποίηση πηγών άνθρακα πέραν της λακτόζης. Η παραπάνω μειωτική εξελικτική διαδικασία στηρίζει την προσαρμογή του γενετικού

υλικού του *S. thermophilus* στον οικολογικό θώκο των προϊόντων γάλακτος (Bolotin *et al* 2004).

1.2.1 *Streptococcus macedonicus*

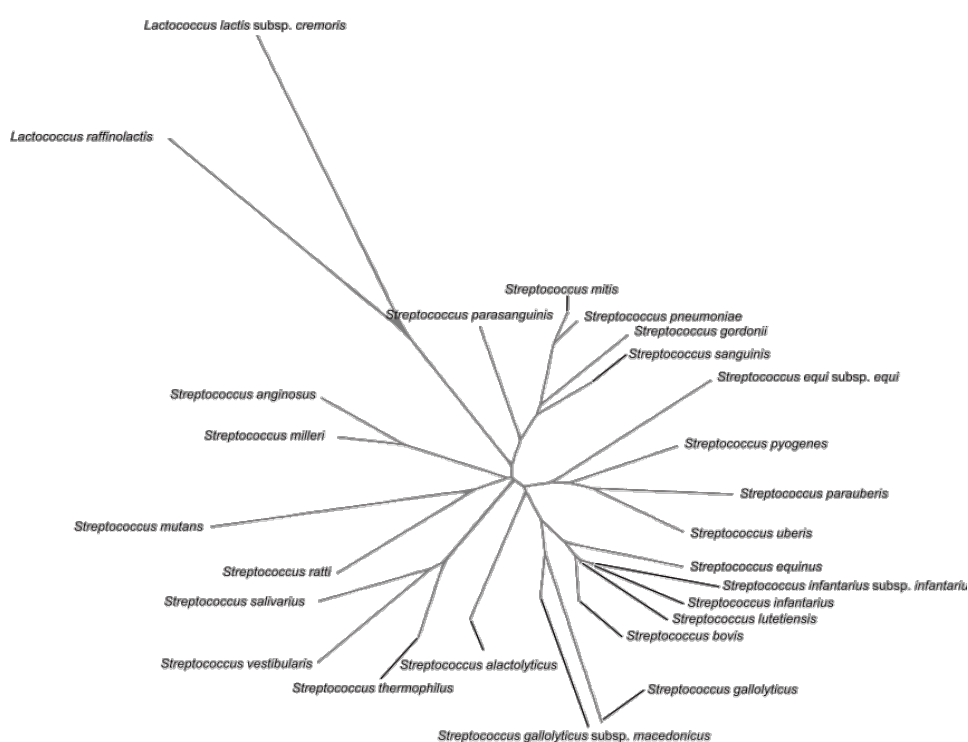
Ο *Streptococcus macedonicus* απομονώθηκε για πρώτη φορά από Ελληνικό παραδοσιακό Κασσέρι που παράγονταν με αυθόρμητη ζύμωση, σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας, κυρίως στη Μακεδονία, γι' αυτό ο μικροοργανισμός ονομάστηκε *macedonicus* (Tsakalidou *et al* 1998).

Ο *S. macedonicus* ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ειδικότερα, ανήκει στο σύμπλεγμα *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (*S.bovis*/*S.equinus* complex, SBSEC). Φαίνεται να είναι συγγενικό είδος των *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus pasteurianus* καθώς και του *Streptococcus infantarius*, όπως αποδεικνύει η φυλογενετική ανάλυση του 16s rRNA και η ανάλυση του γονιδιώματός του. Ο *S.macedonicus* ανήκει στην ετερογενή ομάδα του *S. bovis*, κι όχι στην ομάδα του *S. thermophilus*. Ο *S.macedonicus* απαντάται επίσης σε ζυμούμενα τρόφιμα και παρουσιάζει γενετική εκφυλιστική πορεία, απώλεια κάποιων χαρακτηριστικών παθογένειας και προσαρμογή στην αξιοποίηση της λακτόζης στο περιβάλλον του γάλακτος (Papadimitriou *et al* 2012).

Ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 έχει κυκλικό χρωμόσωμα με 2.130.034 ζεύγη βάσεων (bp) και χαμηλή περιεκτικότητα σε G+C σε σχέση με τα μελετημένα γονιδιώματα στρεπτοκόκκων. Το χρωμόσωμά του περιέχει 2.192 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα οποία αποτελούν το 87,3% του γονιδιώματός του. Από τις αλληλουχίες γονιδίων 192 έχουν αναγνωριστεί ως ψευδογονίδια. Η συγκριτική και φυλογενετική ανάλυση γονιδιωμάτων εντός του SBSEC αποδεικνύουν τη συγγένεια μεταξύ του *S. macedonicus* και των ειδών *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus pasteurianus* και *Streptococcus infantarius* (Εικόνα 1-1). Τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι ο *S. macedonicus* βρίσκεται σε εξελικτική μειωτική διαδικασία φυσικής επιλογής και προσαρμογής στο γάλα σε αντίθεση με άλλα είδη του SBSEC ή άλλους παθογόνους στρεπτόκοκκους (Papadimitriou *et al* 2014).

Ο *S. macedonicus* κι άλλοι στρεπτόκοκκοι του SBSEC βρίσκονται στο γάλα και στα προϊόντα του, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί πλήρως η προέλευσή τους.

Πιθανότατα μπορούν να μεταφερθούν παθητικά στο γάλα, καθώς προκαλούν μαστίτιδα στα γαλακτοπαραγωγά ζώα ή μέσω της πεπτικής οδού των χορτοφάγων ζώων, όπου απαντώνται ως φυσιολογική χλωρίδα. Ορισμένοι στρεπτόκοκκοι του συμπλέγματος SBSEC έχουν ενοχοποιηθεί για συμμετοχή τους σε περιστατικά ενδοκαρδίτιδας, μηνιγγίτιδας και καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο *S. macedonicus*, εντούτοις, φαίνεται ότι έχει χάσει στοιχεία της παθογένειάς του, βρισκόμενος σε εκφυλιστική γενετική πορεία κι έχει προσαρμοστεί γενετικά και κατ' επέκταση μεταβολικά στο περιβάλλον του γάλακτος, που αποτελεί τον πιο συχνό οικολογικό του θώκο (Papadimitriou *et al.* 2014).



Εικ.1-1: Φυλογενετικό δέντρο που φαίνεται η σχέση του *Streptococcus macedonicus* με τα υπόλοιπα είδη των στρεπτόκοκκων (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

1.3 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι τα μικρά τμήματα DNA που μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα, με τη βοήθεια πρωτεϊνών αντιγραφής κι άλλων παραγόντων του κυττάρου, στο οποίο βρίσκονται. Είναι κατά κανόνα μικρά, κυκλικά, δίκλινα μόρια DNA που βρίσκονται συνήθως σε βακτηριακά κύτταρα. Το μέγεθός τους ποικίλει από 1000 έως δεκάδες χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Μπορεί να βρίσκονται σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα εντός των κυττάρων. Ο αριθμός των

αντιγράφων τους είναι συγκεκριμένος για κάθε είδος βακτηριακού κυττάρου. Επίσης, κάθε κύτταρο μπορεί να περιέχει διαφορετικά είδη πλασμιδίων.

Τα πλασμίδια περιέχουν γενετικές πληροφορίες για την επιβίωση του κυττάρου. Ειδικότερα, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προσδίδουν στους μικροοργανισμούς αντοχή έναντι φυσικών αντιβιοτικών, τοξικών βαρέων μετάλλων και ακτινοβολίας, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Επιπλέον, διαθέτουν γενετικές πληροφορίες για την αξιοποίηση ξενοβιοτικών υποστρωμάτων καθώς και την ανάπτυξη συμβιωτικών ή και παθογόνων ιδιοτήτων. Οι παραπάνω βιολογικές λειτουργίες εξασφαλίζουν τη γρήγορη προσαρμογή του κυττάρου σε αντίξοες συνθήκες.

Τα πλασμίδια περιέχουν ακόμα μια βασική περιοχή που απαρτίζεται από γονίδια και αλληλουχίες που εμπλέκονται στην αντιγραφή των ίδιων των πλασμιδίων, καθώς και στον έλεγχό της. Η περιοχή αυτή συνίσταται από τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, *ori*) των πλασμιδίων, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έναρξη της αντιγραφής (όπως η πρωτεΐνη Rep) καθώς και τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο των αντιγράφων των πλασμιδίων (Solar *et al.* 1998). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την ανεξάρτητη αντιγραφή των πλασμιδίων.

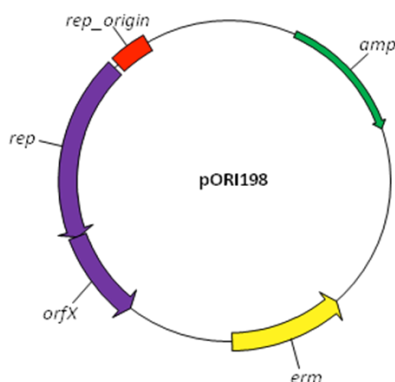
Στη μοριακή γενετική, τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς γονιδίων (vectors), χάρη στην ικανότητά τους να μεταφέρονται από ξενιστή σε ξενιστή. Τα τεχνητά πλασμίδια - παλίνδρομοι φορείς κλωνοποίησης (shuttle vectors) κατασκευάζονται από τα φυσικά πλασμίδια που διαθέτουν την ικανότητα να μεταφέρονται από ξενιστή σε ξενιστή και να εκφράζουν τις πληροφορίες τους. Παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες από το *E.coli*, με τη χρήση τεχνητών πλασμιδίων, για ερευνητικούς και βιομηχανικούς σκοπούς (Mølbak *et al.* 2003).

1.3.1 Φορέας κλωνοποίησης pORI198

Ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 φέρει ένα πλασμίδιο 12.728 bp (ζευγών βάσεων) με την ονομασία pSMA198 (Paradimitriou *et al.* 2012). Η *in silico* ανάλυση έδειξε ότι το πλασμίδιο pSMA198 του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 αποκτήθηκε μέσω οριζόντιας μεταφοράς από τον *Lactococcus lactis*. Από το

πλασμίδιο pSMA198 κατασκευάστηκε ο φορέας κλωνοποίησης pORI198, μεταξύ των *Escherichia coli* και *S. macedonicus* και *Lactococcus lactis*.

Η κατασκευή του pORI198 πραγματοποιήθηκε με βάση το σκελετό της αντιγραφής του πλασμιδίου pSMA198 και την ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (*erm*) από το πλασμίδιο pGh9:ISS1 του στελέχους *E. coli* EC101. Ο σκελετός αντιγραφής του πλασμιδίου pSMA198 αποτελείται από το τμήμα *ori-rep-orfX*. Το *ori* αντιστοιχεί στα σημεία έναρξης αντιγραφής του πλασμιδίου (παράγραφος 1.3). Ακολουθεί το *rep* γονίδιο που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου (Rep). Κατόπιν, το *orfX* γονίδιο, που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μίας πρωτεΐνης, η οποία έχει προταθεί ότι συμμετέχει στον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων του πλασμιδίου στο κύτταρο-ξενιστή. Η ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη έγινε με σκοπό να εξυπηρετήσει την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών που έφεραν το pORI198 (Paradimitriou *et al* 2015). Το πλασμίδιο pORI που κατασκευάστηκε έχει μέγεθος 6598 bp και αξιοποιήθηκε ως παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 1-2).



Εικ.1-2: Ο χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pORI198. Με κόκκινο απεικονίζεται η αρχή έναρξης της αντιγραφής, με μωβ βέλη τα γονίδια *rep-orfX*, με κίτρινο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (*erm*), ενώ με πράσινο βέλος τονίζεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη (*amp*).

1.4. Βακτηριοσίνες

Βακτηριοσίνες ονομάζονται τα αντιβακτηριακά πεπτίδια ή πρωτεΐνες που συντίθενται ριβοσωμικά από βακτήρια. Η αντιβακτηριακή τους δράση ασκείται τις περισσότερες φορές έναντι συγγενικών βακτηρίων. Παράγονται ως επί το πλείστον

από θετικά κατά Gram βακτήρια, κυρίως οξυγαλακτικά. Η έκκριση τους γίνεται μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων (ABC-μεταφορείς) ή μονοπατιών. Το κύτταρο που τις παράγει προστατεύεται από τις δικές του βακτηριοσίνες μέσω πρωτεΐνης ανοσίας, η οποία κωδικοποιείται από γονίδιο, το οποίο συνδέεται με το γονίδιο της βακτηριοσίνης. Οι βακτηριοσίνες κατηγοριοποιούνται σε τρεις κλάσεις με βάση την αρχική δομή τους. Η πρώτη κλάση περιλαμβάνει τροποποιημένα πεπτίδια που ονομάζονται λαντιβιοτικά, η δεύτερη κλάση περιλαμβάνει μη τροποποιημένα πεπτίδια και η τρίτη κλάση βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους (Hechard & Sahl 2002).

1.4.1 Κλάση I - Λαντιβιοτικά

Τα λαντιβιοτικά είναι οι βακτηριοσίνες της πρώτης κλάσης. Πρόκειται για πεπτίδια που υφίστανται εκτενείς μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πριν την έξοδό τους από το κύτταρο. Τα πεπτίδια υπόκεινται σε αφυδάτωση των υπολειμμάτων σερίνης και θρεονίνης σε δι-δεϋδρο-αλανίνη και δι-δεϋδρο-βουτυρίνη αντίστοιχα, ακολουθούμενη από την πυρηνόφιλη προσθήκη κατάλληλα τοποθετημένων υπολειμμάτων κυστεΐνης, μέσω των σουλφιδρυλικών ομάδων τους, στους διπλούς δεσμούς άνθρακα της δι-δεϋδρο-αλανίνης και δι-δεϋδρο-βουτυρίνης (Papadelli *et al* 2007). Προκύπτουν κατά αυτό τον τρόπο αμινοξέα με θειοαιθερικούς δεσμούς, τα οποία είναι σταθερά στις πρωτεάσες και αναγνωρίζονται μετά από υδρόλυση ως λανθειονίνη (προερχόμενη από δι-δεϋδρο-αλανίνη και κυστεΐνη) και ως 3-μεθυλο-λανθειονίνη (προερχόμενη από δι-δεϋδρο-βουτυρίνη και κυστεΐνη). Οι αντιμικροβιακές ενώσεις που περιέχουν πεπτίδια με λανθειονίνη ονομάζονται εν συντομία λαντιβιοτικά (Hechard & Sahl 2002). Διακρίνονται σε τύπου A και τύπου B. Τα τύπου A είναι γραμμικά μόρια ενώ τα τύπου B σφαιρικά. Τα τύπου A χωρίζονται σε A I και A II. Τα τύπου A I είναι γραμμικά πεπτίδια ενώ τα τύπου A II χαρακτηρίζονται από γραμμικό αμινοτελικό άκρο και σφαιρικό καρβοξυτελικό άκρο (Chatterjee *et al* 2005).

1.4.1.1 Τρόπος βιοσύνθεσης λαντιβιοτικών

Η βιοσύνθεση των λαντιβιοτικών γίνεται στα ριβοσώματα και κωδικοποιείται από οπερόνια που μπορούν να βρίσκονται στο γενωμικό DNA, σε

πλασμιδιακό DNA ή σε τρανσποζόνια. Τα οπερόνια περιλαμβάνουν γονίδια για τη δομή του λαντιβιοτικού, τις τροποποιήσεις αυτού, την πρωτεολυτική δράση για την απελευθέρωσή του από πρωτεΐνες-οδηγούς, τη μεταφορά του έξω από το κύτταρο και την ανοσία του βακτηρίου που το παράγει καθώς και ρυθμιστικά γονίδια. Στα ριβοσώματα γίνεται η σύνθεση του λαντιβιοτικού ως πρόδρομου πεπτιδίου ενωμένου με ειδική πρωτεΐνη-οδηγό. Το προ-πρε-πεπτίδιο υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως περιγράφηκαν στην παράγραφο 1.4.1 και κατόπιν απελευθερώνεται από την πρωτεΐνη-οδηγό με τη δράση μιας πρωτεάσης τύπου σερίνης. Το ώριμο πλέον λαντιβιοτικό μεταφέρεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης με ειδικό μεταφορέα (ABC μεταφορέας) ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται η ανοσία του κυττάρου έναντι του λαντιβιοτικού. Τα ώριμα λαντιβιοτικά εξωκυτταρικά ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση (Patton G.C. *et al* 2005).

1.4.1.2 Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών

Τα λαντιβιοτικά παράγονται και δρουν κυρίως κατά Gram θετικών βακτηρίων. Η περιορισμένη δράση κατά Gram αρνητικών βακτηρίων αιτιολογείται από την ύπαρξη της εξωτερικής λιποπολυσακχαριτικής τους μεμβράνης. Επιπλέον, τα λαντιβιοτικά παρουσιάζουν υψηλή ειδική ενεργότητα, αλλά περιορισμένο αντιμικροβιακό φάσμα. Κάθε τύπος λαντιβιοτικού λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο.

Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών τύπου A I

Τα τύπου A I λαντιβιοτικά παρουσιάζουν διαφορές ως προς τον τρόπο της αντιμικροβιακής τους δράσης. Παρεμβαίνουν στην ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, την εκβλάστηση των σπόρων των μικροβίων ενώ προάγουν και την αυτόλυση των κυττάρων.

Η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης καταλύεται με το σχηματισμό πόρων. Σε λιπόφιλο περιβάλλον τα πεπτίδια, λόγω του αμφίφιλου τους χαρακτήρα τους, συνδέονται ηλεκτροστατικά με την κυτταρική μεμβράνη και δημιουργούν μια κεντρική περιοχή σύνδεσης, οπότε εισέρχονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με το καρβοξυτελικό τους άκρο, διαρρηγνύοντας την, με συνέπεια την έξοδο

μεταβολιτών και τη διαταραχή της ιοντικής διαβάθμισης. Οι πόροι που σχηματίζονται είναι μικρής διάρκειας και απαιτούν μικρομοριακές συγκεντρώσεις λαντιβιοτικού. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα σχηματισμού πόρων μεγαλύτερης διάρκειας. Στην περίπτωση αυτή τα λαντιβιοτικά τύπου A I χρησιμοποιούν ως μόρια πρόσδεσης στα βακτηριακά κύτταρα τα λιπίδια II της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για το σχηματισμό πόρων. Η νισίνη που αποτελεί χαρακτηριστικό εκπρόσωπο του τύπου A I σχηματίζει με τους βρόχους του αμινοτελικού της άκρου μια θήκη πρόσδεσης (πυροφωσφορικό κλωβό), η οποία ενσωματώνει τα πυροφωσφορικά τμήματα των λιπιδίων II και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου. Κατόπιν το καρβοξυτελικό της άκρο εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, ολιγομερίζεται και σχηματίζει πόρο που αποτελείται από οχτώ μέρη νισίνης προς τέσσερα μέρη λιπιδίων II. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι για τη διαδικασία αυτή τόσο οι δακτύλιοι όσο κι ο σκελετός των λαντιβιοτικών. Οι πόροι που σχηματίζονται με μόρια στόχους, όπως τα λιπίδια II, είναι ιδιαίτερα σταθεροί και απαιτούν νανοσυγκεντρώσεις λαντιβιοτικού για το σχηματισμό τους.

Αναφορικά με την αναστολή βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, αυτή επιτυγχάνεται με τη μετατόπιση των λιπιδίων II. Τα λιπίδια II απαντώνται στα διαφραγμάτια ανάπτυξης και στα ελικοειδή νημάτια κατά μήκος των αξόνων των ραβδόμορφων βακτηρίων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα και παρεμποδίζουν τη χρησιμοποίησή του λιπιδίου II κατά τη βιοσύνθεση των συμπλεγμάτων του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτέλεσμα είναι η δυσμορφία και ο μη σχηματισμός κυτταρικού τοιχώματος.

Μια επιπρόσθετη δράση είναι η αναστολή της εκβλάστησης σπορίων. Παλαιότερα αποδίδονταν στην αντίδραση των υπολειμμάτων δε-υδρο-αλανίνης (Dha) με τις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών του εξωτερικού τοιχώματος των σπορίων. Αντικατάσταση, εντούτοις, της ομάδας Dha στη νισίνη επέφερε τα ίδια αποτελέσματα. Συμπεραίνεται ότι η αποτελεσματικότητα οφείλεται μάλλον στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των σπορίων που εκβλασταίνουν κι όχι στην Dha.

Τα τύπου A I προάγουν ακόμα την αυτόλυση των κυττάρων. Συνδέονται με τα τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα, ενεργοποιούν τα ένζυμα αυτόλυσης και

προκαλούν ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος στα διαφραγμάτια μεταξύ των διαιρούμενων κυττάρων (septum).

Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών τύπου A II

Τα λαντιβιοτικά τύπου AII λειτουργούν συμπλεκόμενα με το λιπίδιο II. Τα δημιουργούμενα σύμπλοκα είτε οδηγούν, είτε όχι, στο σχηματισμό πόρων. Εφόσον η δράση βασίζεται στο σχηματισμό πόρων που μπορεί να είναι ασταθείς, προκαλούνται διαταραχές στο δυναμικό της μεμβράνης και απώλεια μεταβολιτών. Επιπλέον δύναται να διαμορφωθούν σταθεροί πόροι με τη χρήση λιπιδίου II, που συνεπάγεται τη λύση των κυττάρων. Τέλος τα τύπου AII αναστέλλουν τις αντιδράσεις βιοσύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος με τη χρήση του λιπιδίου I και II. Οι μηχανισμοί είναι όμοιοι με αυτούς που περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα τρόπου δράσης λαντιβιοτικών τύπου AI.

Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών τύπου B

Τα λαντιβιοτικά του τύπου αυτού λειτουργούν με δυο διαδικασίες. Η πρώτη περιλαμβάνει την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος μέσω του λιπιδίου II, στην οποία όμως δεν σχηματίζονται πόροι, σε αντίθεση με τα λαντιβιοτικά τύπου AI και AII. Ειδικότερα σχηματίζονται σύμπλοκα με το λιπίδιο II, είτε με την ομάδα της N-ακετυλογλυκοζαμίνης του λιπιδίου και ανιόντα ή πλευρικές ομάδες γλυκίνης του πεπτιδίου, είτε με τη μορφή κλωβών με χλωριωμένες ομάδες, όπως οι πυροφωσφορικοί κλωβοί στα τύπου AI. Η συμμετοχή του λιπιδίου II είναι απαραίτητη για τη συγκεκριμένη διαδικασία.

Η δεύτερη διαδικασία περιλαμβάνει την αναστολή της φωσφολιπάσης A2. Τα λαντιβιοτικά συνδέονται στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης κι αναστέλλουν τη φωσφιλιπάση A2 με την απομόνωση του φωσφατιδυλο-αιθυλαμινικού της υποστρώματος. Παρεμβαίνουν με αυτό τον τρόπο και στη βιοσύνθεση προσταγλαδινών και λευκοτριενιών. Τα τύπου B λαντιβιοτικά ασκούν τη δράση τους με την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και της φωσφολιπάσης A2 (Chatterjee *et al* 2005, Asaduzamman & Sonomoto 2009, Bierbaum & Sahl 2009, Ross *et al* 2011).

1.4.2 Κλάση II - Μη Τροποποιημένες Βακτηριοσίνες

Τα μη τροποποιημένα πεπτίδια μήκους 20-60 αμινοξέων με κατιονικό και υδροφόβο χαρακτήρα απαρτίζουν την κλάση II των βακτηριοσινών. Διαιρούνται ανάλογα με τη δομή τους σε τρεις υποκατηγορίες (IIa, IIb, IIc).

Η υποκλάση IIa περιλαμβάνει πεπτίδια με αμινοτελικό άκρο που αποτελείται από συγκεκριμένη σειρά αμινοξέων, δισουλφυδική γέφυρα και καλά διατηρημένες πλευρικές ομάδες. Τα πεπτίδια αυτά εκδηλώνουν όλα ανασταλτική δράση έναντι του γένους *Listeria*.

Η υποκλάση IIb αποτελείται από βακτηριοσίνες με δυο διακριτά πεπτίδια, χωρίς τυποποιημένη δομή που εμφανίζουν μόνο από κοινού συμπληρωματική δράση κι όχι μεμονωμένα. Υπάρχει δε ένα μοναδικό γονίδιο ανοσίας που συνδέεται με τα δυο δομικά γονίδια των πεπτιδίων και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ανοσίας.

Η υποκλάση IIc περιλαμβάνει τα αταξινόμητα πεπτίδια στις δύο προηγούμενες κατηγορίες, χωρίς να υπάρχει κάποιο δεδομένο μοτίβο για τη δομή τους (Hechard & Sahl 2002).

1.4.2.1 Τρόπος δράσης βακτηριοσινών κλάσης II

Οι βακτηριοσίνες της κλάσης II προκαλούν γενικώς διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και έξοδο μορίων από τα ευαίσθητα κύτταρα. Ευαίσθητα είναι κυρίως Gram θετικά βακτήρια με χαμηλό ποσοστό γουανίνης+κυτοσίνης, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτήρια του γένους *Clostridium*. Η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων περιορίζεται σε είδη ή στελέχη συγγενή με τα βακτήρια που τα παράγουν (Hechard & Sahl 2002, Stoyanova *et al* 2012).

Τρόπος δράσης βακτηριοσινών II a

Οι βακτηριοσίνες IIa εκδηλώνουν την αντιβακτηριακή τους δράση με το σχηματισμό πόρων, την έξοδο ιόντων και την εξάντληση του ενδοκυτταρικού ATP. Οι πόροι είναι ανιόντων ή κατιόντων και δημιουργούνται με δύο τρόπους. Συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες με τη διαμεσολάβηση επιφανειακής πρωτεΐνης-στόχου, πιθανότατα μιας περμεάσης μαννόζης, διευκολύνονται στην δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Μάλιστα, η δραστηριότητα της βακτηριοσίνης επηρεάζεται από τη δομή και την έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου. Η σύνδεση

μεταξύ τους μπορεί να προκαλέσει το άνοιγμα της περμεάσης και να αυξήσει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης στο στοχευόμενο κύτταρο. Ο δεύτερος τρόπος δράσης δεν απαιτεί τη μεσολάβηση πρωτεΐνης-στόχου αλλά εξαρτάται από ηλεκτροστατικές ή/και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της βακτηριοσίνης με την κυτταρική μεμβράνη που καταλήγουν στο σχηματισμό πόρων ή σε τοπικές ρήξεις στην κυτταρική μεμβράνη.

Τρόπος δράσης βακτηριοσινών II b

Οι βακτηριοσίνες της υποκλάσης II b φαίνεται να λειτουργούν με διαφορετικούς μηχανισμούς ανάλογα με τη δομή τους. Οι μηχανισμοί συντελούν στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη που προκύπτουν από ιοντικές αλληλεπιδράσεις αυξάνοντας τη διαπερατότητά της.

Τρόπος δράσης βακτηριοσινών II c

Οι βακτηριοσίνες που συγκαταλέγονται στην υποκλάση IIc δεν παρουσιάζουν ενιαίο μηχανισμό δράσης αλλά εμπλέκονται σε διαδικασίες, όπως η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η αναστολή του σχηματισμού διαφραγματίων κατά τη διαίρεση του κυττάρου (septum) και στην αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω του πρόδρομου λιπιδίου II (Hechard & Sahl 2002, Shpakov 2009).

Αξιοσημείωτη είναι η ποικιλία τρόπων δράσης των βακτηριοσινών κλάσης I και II, καθώς και το γεγονός ότι καθένας από αυτούς ασκείται από συγκεκριμένα πεπτίδια της κάθε κλάσης και της κάθε κατηγορίας. Η εξειδίκευση καθιστά απαραίτητες τις διάφορες βακτηριοσίνες, καθώς κάθε τρόπος δράσης είναι αποτελεσματικός έναντι διαφορετικών μηχανισμών άμυνας των μικροβίων.

1.4.3 Κλάση III – Βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους

Οι βακτηριοσίνες της κλάσης III χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους. Οι πληροφορίες για τη δομή και τη δραστηριότητά τους είναι περιορισμένες. Υπάρχουν μόνο ενδείξεις ότι ελέγχουν την ίδια τους τη βιοσύνθεση και ότι ρυθμίζουν κυτταρικά συστήματα επικοινωνίας. Είναι γενικά οι λιγότερο μελετημένες βακτηριοσίνες.

1.4.4 Μασεδοσίνη του *Streptococcus macedonicus*

Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 παράγει τη βακτηριοσίνη μασεδοσίνη. Πρόκειται για λαντιβιοτικό του τύπου της λακτισίνης 481, μεγέθους 2,8 kDa, που παρουσιάζει αμινοξική αλληλουχία παρόμοια με τα λαντιβιοτικά SA-FF22 και SA-M49 του *S. pyogenes*. Το αμινοτελικό τους άκρο μάλιστα είναι πανομοιότυπο. Η παραγωγή της μασεδοσίνης γίνεται στο περιβάλλον του γάλακτος (Georgalaki *et al* 2002) και επάγεται από κλάσματα της καζεΐνης (Georgalaki *et al* 2010).

Η παραγωγή της μασεδοσίνης γίνεται από περιοχή μεγέθους 15171 bp του χρωμοσώματος του *Streptococcus macedonicus*. Η περιοχή αποτελείται από 10 ORFs (Open Reading Frames - περιοχή γενετικών πληροφοριών για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης, μεταξύ σημάτων έναρξης και λήξης). Τα ORFs αντιστοιχούν σε γονίδια για τη βιοσύνθεση, τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης και την ανοσία του κυττάρου που την παράγει έναντι της μασεδοσίνης. Τα γονίδια των ORFs είναι οργανωμένα σε δύο οπερόνια. Ο ρόλος των οπερονίων έχει μελετηθεί σε σχέση με το λειτουργικό ρόλο οπερονίων ομόλογων της μασεδοσίνης λαντιβιοτικών, όπως της στρεπτοκοκκίνης A-FF22. Η συγκριτική μελέτη ανέδειξε την παρουσία ενός επιπλέον δομικού γονιδίου και μιας επιπλέον αλληλουχίας μεταξύ του ρυθμιστικού και βιοσυνθετικού οπερονίου στο τμήμα του γονιδιώματος της μασεδοσίνης (Paradelli *et al* 2007). Τα παραπάνω αποτέλεσαν ισχυρή ένδειξη για την παραγωγή ενός δεύτερου λαντιβιοτικού από το ίδιο στέλεχος (1.4.5).

Η μασεδοσίνη παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Ειδικότερα, η αντιμικροβιακή της δράση εκδηλώνεται έναντι μεγάλου εύρους οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, όπως ο *Bacillus subtilis* και το *Clostridium tyrobutyricum*. Η αναστολή του *C. tyrobutyricum* είναι σημαντική από πλευράς τεχνολογίας καθώς ο μικροοργανισμός εμπλέκεται στο όψιμο φούσκωμα τυριών σκληρού ή ημίσκληρου τύπου (Georgalaki *et al* 2002).

1.4.5 Μασεδοβισίνη του *Streptococcus macedonicus*

Ο *S. macedonicus* 198 παράγει επιπρόσθετα το λαντιβιοτικό μασεδοβισίνη. Η μασεδοβισίνη είναι πεπτίδιο μεγέθους 3,4 KDa, λαντιβιοτικό AII, ανήκει στην ομάδα της λακτισίνης 481 και είναι ομόλογο με τη μποβισίνη HJ50 και τη θερμοφιλίνη 1277, που παράγονται από τον *S. bovis* και τον *Streptococcus thermophilus* αντίστοιχα. Μετά τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις διαθέτει γραμμικό αμινοτελικό και σφαιρικό καρβοξυτελικό άκρο. Η παραγωγή της μασεδοβισίνης ευνοείται σε θρεπτικό υπόστρωμα M17, σε αντίθεση με την παραγωγή μασεδοσίνης. Η παρατήρηση αυτή, δηλαδή η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους σε θρεπτικό υπόστρωμα που δεν ευνοεί την παραγωγή της μασεδοσίνης, αποτέλεσε το έναυσμα για τη μελέτη παραγωγής και δεύτερης βακτηριοσίνης από τον *S. macedonicus*.

Τα τμήματα του γονιδιώματος που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μασεδοβισίνης παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα με αυτά των ομόλογων λαντιβιοτικών μποβισίνης HJ50 και θερμοφιλίνης 1277. Το ρεγουλόνιο της βιοσύνθεσης της μασεδοβισίνης είναι τμήμα γενετικού υλικού μεγέθους 14 χιλιάδων βάσεων (Kb). Οι συστάδες γονιδίων βρέθηκαν ταυτόσημες μεταξύ των λαντιβιοτικών που αναφέρθηκαν ωστόσο παρουσιάζουν διαφορές σε επίπεδο μεμονομένων γονιδίων και πρωτεϊνών. Η σημαντικότερη διαφορά είναι η διάσπαση του γονιδίου *mdvT* της μασεδοβισίνης σε *bonT* και *bonE* στην μποβισίνη HJ50. Η πρωτεΐνη MdvT που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mdvT* συμμετέχει παράλληλα στην ωρίμανση και στη μεταφορά της βακτηριοσίνης. Στο αμινοτελικό της άκρο έχει δράση πεπτιδάσης για την απομάκρυνση του πεπτιδίου-οδηγού από το πρόδρομο μόριο. Στο καρβοξυτελικό της άκρο έχει δράση ειδικού μεταφορέα για την έξοδο του ώριμου πεπτιδίου από το κύτταρο. Ακόμα περιέχει διαμεμβρανικό τμήμα που συμμετέχει στη συνένωση των πρωτεϊνικών αυτών τμημάτων σε ένα μόριο.

Η μασεδοβισίνη εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε αποτελεσματική έναντι οξυγαλακτικών βακτηρίων, των *C. tyrobutyricum* και *Clostridium sporogenes*, καθώς και έναντι δυο συγκεκριμένων στελεχών *Listeria* και *Bacillus* (*Listeria welschimeri* 15008 και *Bacillus licheniformis* FMCC B-91). Επιπλέον, δρα έναντι στρεπτοκόκκων που

μετέχουν σε μολύνσεις της στοματικής κοιλότητας, όπως ο *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, ο *Streptococcus oralis* και ο *Streptococcus salivarius*. (Georgalaki *et al* 2013).

2. Σκοπός Μελέτης

Ο *S. macedonicus* απαντάται σε τρόφιμα ζύμωσης, κυρίως γαλακτοκομικά προϊόντα και η προσαρμογή του στο περιβάλλον του γάλακτος οδήγησε εξελικτικά στη μερική απώλεια της παθογένειάς του, όπως συμβαίνει και με τον *S. thermophilus*. Ο *S. macedonicus* παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της παραγωγής αντιβακτηριακών πρωτεϊνικών ενώσεων - των βακτηριοσινών. Οι βακτηριοσίνες του *S. macedonicus* μασεδοσίνη και μασεδοβισίνη, δρουν ανασταλτικά έναντι οξυγαλακτικών βακτηρίων και άλλων αλλοιωγόνων και παθογόνων Gram θετικών μικροοργανισμών, γεγονός που πιθανότατα ευνόησε μακροπρόθεσμα στην φυσική επικράτησή του στο οικοσύστημα του γάλακτος. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* ACA-DC 198 και η *in silico* ανάλυσή του αποκάλυψαν τρεις νέες πιθανές βακτηριοσίνες, πέραν των μελετημένων μασεδοσίνης και μασεδοβισίνης. Το γεγονός αυτό ενισχύει το ερευνητικό ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Σκοπός και αντικείμενο της μελέτης είναι αρχικά η ενσωμάτωση των νέων βακτηριοσινών του *S. macedonicus* στο πλασμίδιο pORI198. Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης γίνεται προσπάθεια κλωνοποίησης των βακτηριοσινών αυτών σε στελέχη των μικροοργανισμών *E. coli*, *L. lactis* και *S. thermophilus*, με σκοπό την παραγωγή τους σε αυτούς τους ετερόλογους ξενιστές.

3. Υλικά – Μέθοδοι & Πειραματική Διαδικασία

3.1 Βακτηριακά κύτταρα και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη:

- *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198
- *Escherichia coli* Stellar™
- *Escherichia coli* NEB 10-beta Electrocompetent *E.coli* cells™

-
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363
 - *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4

Τα στελέχη *S. macedonicus* ACA-DC 198, *L. lactis* MG1363 και *S. thermophilus* ACA-DC 4 προήλθαν από τη συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα *E. coli* Stellar™ και *E. coli* NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* cells™ ήταν εμπορικά στελέχη.

Αναλυτικότερα, το στέλεχος του *S. macedonicus* ACA-DC 198 αναπτυσσόταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS (MRS Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) με MOPS (400 mM MOPS Oxoid) pH 7.2, σε θερμοκρασία 37°C.

Τα στελέχη *E. coli* Stellar™ και NEB10-beta Electrocompetent *E. coli* cells™ αναπτύσσονταν αερόβια σε υγρό θρεπτικό μέσο LB [Luria-Bertani : 1% w/v τρυπτόνη (DUCHEFA, Haarlem, The Netherlands), 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract, Biokar Diagnostics, Zac de ther- Allonne, Beauvais) και 1% w/v χλωριούχο νάτριο (Merck, Darmstadt, Germany), pH 7.5] ή σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB με 1.5% w/v άγαρ (Biokar Diagnostics) στους 37 °C, παρουσία ή απουσία 200 µg/mL αντιβιοτικού ερυθρομυκίνης (Sigma, Taufkirchen, Germany).

Ο *L. lactis* MG1363 αναπτυσσόταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα GM17 [M17 (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) ενισχυμένο με 0.5% w/v γλυκόζη (Applichem, Darmstadt, Germany)] ή σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα GM17 με 1.5% w/v άγαρ (Biokar Diagnostics), σε θερμοκρασία 30 °C, παρουσία ή απουσία και 2 µg/mL ερυθρομυκίνης (Sigma).

Το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC 4 αναπτυσσόταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με 10% w/v εργαστηριακό γάλα (Skimmed Milk, Oxoid) και 0,3% w/v εκχύλισμα ζύμης (Biokar Diagnostics), στους 37°C για 24 ώρες. Κατόπιν, μέρος της καλλιέργειας μεταφερόταν σε υγρό μέσο M17 (Oxoid) στους 37°C για 24 ώρες. Ο μικροοργανισμός αναπτυσσόταν ακόμα σε στερεό θρεπτικό μέσο 5LM17 [M17 Oxoid ενισχυμένο με 0,5% v/v λακτόζη (Lactose, Serva Feinbiochemica GmbH & Co)], στους 37 °C, παρουσία ή απουσία 1 µg/mL ερυθρομυκίνης (Sigma).

Για την αποθήκευση των στελεχών, 200 µL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρονταν σε κρυοφιαλίδια (vials) που περιείχαν 60% v/v από το αντίστοιχο

μέσο ανάπτυξης και 20% v/v γλυκερόλη (HiMedia, Mumbai, India). Η αποθήκευση γινόταν στους -80°C .

Για τις ανανεώσεις των καλλιέργειών, χρησιμοποιούνταν 1% v/v εμβόλιο στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

3.2 Πειραματική διαδικασία

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού υλικού- gDNA

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Pitcher and Saunders (1989) μερικώς τροποποιημένο. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης έχουν ως εξής:

- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος από vial (50 μL). Επώαση καλλιέργειας για 24 h.
- Συλλογή κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια ενώ βρίσκονται στη στατική φάση σε erpendorf του 1,5 mL. Φυγοκέντρηση 8.000 rpm / 1 min.
- Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1mL PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4. Θέρμανση στους 65°C για 10 min, με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Φυγοκέντρηση (8.000 rpm / 1min) και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
- Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 100 μL (50 mg/mL) λυσοζύμης (L6876, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) διαλυμένη σε TE buffer (10mmol Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH:8), 10 μL μουτανολυσίνης (5 U/ μL) και 20 μL RNAάσης (GenElute). Τα ένζυμα συμβάλλουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και στην πέψη του υπολειμματικού RNA. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min με περιοδική ανάδευση των erpendorfs ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποδόμησης του DNA, η μεταχείριση των δειγμάτων γίνεται με ήπιες κινήσεις.
- Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου GES (60g Guanidium thiocynate, 0.5 mol/L EDTA, 5% v/v Sarcosyl) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.
- Στη συνέχεια προστίθεται 0,25 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 mol/L), ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10 min.
- Προστίθεται 0,5 mL χλωροφόρμιο και αναδεύονται τα δείγματα ήπια για έκπλυση των λιπών.

-
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό ψύξη (13.000 rpm / 5 min / 4 °C).
 - Μεταφορά υπερκλειμένου σε καθαρό erpendorf. Αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης.
 - Προσθήκη 0,54 του όγκου ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA.
 - Φυγοκέντρηση στις 7.000 rpm / 1 min και απόχυση του υπερκλειμένου.
 - Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70%) και ανάδευση για απομάκρυνση των αλάτων από το DNA. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 5 φορές.
 - Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρηση, απόχυση και χρήση πιπέτας. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 8-10 min για να εξατμιστεί η αιθανόλη προσέχοντας, όμως να μην στεγνώσει το ίζημα.
 - Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 40-60 μL, ανάλογα το μέγεθος του ιζήματος, διαλύματος TE.
 - Τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στους 37 °C για 24 h και έπειτα στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

3.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων που προέκυψαν έγινε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο μικροποσοτήτων Quawell Q5000 Read First (Quawell Technology, Inc, San Jose, CA 95161 U.S.A.) το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Η φωτομέτρηση για το DNA γινόταν σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (optical density-O.D.) υπολογίσθηκε αυτόματα η συγκέντρωση. Παράλληλα, γινόταν μέτρηση του ίδιου δείγματος και στα 280 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες. Ο λόγος της $O.D._{260nm}/O.D._{280nm}$ εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης. Όταν ο λόγος ισούται με 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Όταν όμως είναι μικρότερος του 1.8 τότε είναι πιθανό να υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης στο δείγμα.

3.2.3 Έλεγχος ποιότητας DNA σε πηκτή αγαρόζης

Το DNA που απομονώθηκε αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 × TAE (0.004 Tris-acetate, 1 mM EDTA) προστέθηκε 0,8-1% w/v αγαρόζη, ανάλογα το μέγεθος του DNA σε bp.
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη.
- Έπειτα προστέθηκαν 2μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/mL (Sigma, Taufkirchen, Germany).
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, για το σχηματισμό της πηκτής.
- Η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 × TAE. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγηθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer- 0.25% w/v Bromophenol blue, 0.25% w/v Xylene cyanol, 40% w/v glycerol).
- Η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε στα 60-120 V για 30-60 min, ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος του DNA σε bp.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε φωτογράφιση σε ειδικό UV θάλαμο.

3.2.4 Ενίσχυση τμημάτων DNA με τις νέες βακτηριοσίνες

Για την ενίσχυση των τμημάτων DNA με τις νέες βακτηριοσίνες από το γενωμικό υλικό του *S. macedonicus*, πραγματοποιήθηκε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Χρησιμοποιήθηκε κιτ πολυμεράσης της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS , Wilmington, MA 01887 United States και οι εκκινητές (primers Forward-Reverse) F7904 3bacts/R7904 3bacts. Η κάθε αντίδραση PCR περιείχε τα συστατικά που φαίνονται στον Πίνακα 3-1:

Πίνακας 3-1: Στοιχεία αντίδρασης PCR για ενίσχυση τμήματος gDNA των νέων βακτηριοσινών από το *S. macedonicus* ACA-DC 198.

		Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα 50 μL
5x KapaTaqExtra Buffer		1x	10 μL
MgCl ₂	25mM	1,75 mM	3,5 μL
dNTPs	10mM	0,3 mM	1,5 μL
Primer Forward	10μM	0,5 μM	2,5 μL

Primer Reverse	10μM	0,5 μM	2,5 μL
DNA <i>S.macedonicus</i>			600-1000ng
KapaTaqExtra HotStart DNA Polymerase	2,5U/μL	1,25U/50μL	0,5 μL
Απιονισμένο νερό			μέχρι τελικού όγκου
Τελικός όγκος			50 μL

Το γενωμικό DNA αρχικά αποδιατάχθηκε στους 94 °C για 3 min (initial denaturation). Ακολούθησε παραμονή στους 94 °C για 25sec για την πλήρη αποδιάταξη (denaturation) και η θερμοκρασία έπεσε στους 63 °C για 15sec, οπότε και έγινε η προσαρμογή των εκκινήτων στη μήτρα του DNA (annealing). Στους 68°C για 8min ξεκίνησε η δράση της πολυμεράσης και άρχισαν να συντίθενται οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA, από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια (extention). Στο τέλος του πρώτου κύκλου, είχαν δημιουργηθεί δύο αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας του τμήματος γενωμικού DNA με τις νέες βακτηριοσίνες. Πραγματοποιήθηκαν 35 τέτοιοι κύκλοι και ακολούθησε επώαση στους 68 °C για 20 min για να ολοκληρωθεί η σύνθεση των ημιτελών αλυσίδων (final extention) (Πίνακας 3-2). Τα σωληνάρια με τα επιθυμητά τμήματα DNA αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

Πίνακας 3-2: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR ενίσχυσης του τμήματος *gDNA* του *S. macedonicus*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Initial denaturation	93 °C	3 min	} 35 κύκλοι
Denaturation	94 °C	25 sec	
Annealing	63 °C	15 sec	
Extention	68 °C	8 min	
Final extention	68 °C	20 min	

3.2.5 Εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης

Η εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με το κιτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (Duren, Germany) βάσει του ακόλουθου πρωτοκόλλου:

- Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, αποκόπηκε το επιθυμητό τμήμα DNA από την πηκτή αγαρόζης και απομακρύνθηκε η περιττή ποσότητά της.
- Αφού καθορίστηκε το βάρος της πηκτής που αποκόπηκε, τοποθετήθηκε σε σωληνάριο eppendorf μικροφυγοκέντρησης.

-
- Για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης (συγκέντρωσης < 2 %) προστέθηκαν 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer NT1) και ακολούθησε επώαση του δείγματος για 5 – 10 min στους 50 °C με ανάδευση ανά 2 – 3 min μέχρι να διαλυθεί τελείως το αποκομμένο τμήμα πηκτής.
 - Για την πρόσδεση του DNA σε νέο σωληνάριο των 2 mL, τοποθετήθηκε στήλη NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, φορτώθηκαν περίπου 700 μL δείγματος και ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 12.000 rpm. Απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη μεμβράνη και το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.
 - Για την έκπλυση της μεμβράνης προστέθηκαν στη στήλη 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer NT3), ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 12.000 rpm και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη μεμβράνη.
 - Προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 12.000 rpm.
 - Για να γίνει η έκλουση του DNA, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο του 1,5 mL, προστέθηκαν 15 – 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer NE) επώαστηκε για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 12.000 x rpm. Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα.

3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με υψηλό αριθμό αντιγράφων από *E.coli*

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το κιτ NucleoSpin® Plasmid/Plasmid(NoLid) της Macherey-Nagel (Duren, Germany) βάσει του ακόλουθου πρωτοκόλλου:

- Σε σωληνάριο erpendorf μικροφυγοκέντρωσης των 2 mL εισήχθησαν περίπου 5 mL στατικής καλλιέργειας. Φυγοκεντρήθηκαν, ανά 1,6 mL, για 1 min στις 11.000 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το ίζημα της καλλιέργειας (pellet).
- Το ίζημα επαναιωρήθηκε με προσοχή ώστε να μην παραμείνουν συσσωματώματα κυττάρων, σε 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension Buffer A1).
- Προστέθηκαν 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer A2), ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου 6 – 8 φορές, για να αποφευχθεί η θραύση του

-
- γενωμικού DNA και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min ή μέχρι το εναιώρημα να γίνει διαυγές.
- Προστέθηκαν 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης (Neutralization Buffer A3) και ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου 6 – 8 φορές, για να αποφευχθεί η θραύση του γενωμικού DNA.
 - Για τον καθαρισμό του κυτταρολύματος έγινε φυγοκέντριση για 5 min σε 11.000 rpm και επανάληψή της σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν ήταν διαυγές.
 - Για τη δέσμευση του DNA, τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο των 2 mL, στήλη NucleoSpin® Plasmid, έγινε μεταφορά του υπερκείμενου του προηγούμενου βήματος, ανά 750 μL και ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 11.000 rpm έως ότου μεταφερθεί όλο το κυτταρόλυμα.
 - Έπειτα, προστέθηκαν 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης συμπληρωμένου με αιθανόλη (Wash Buffer A4) έγινε φυγοκέντριση για 1min σε 11.000 rpm και απορρίφθηκε το ρευστό που διαπέρασε τη μεμβράνη.
 - Για την ξήρανση της μεμβράνης της στήλης έγινε φυγοκέντριση για 2 min στις 11.000 rpm.
 - Για την έκλυση του DNA από τη μεμβράνη της στήλης, τοποθετήθηκε η στήλη σε νέο σωληνάριο του 1,5 mL και προστέθηκαν 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer AE). Η στήλη επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min και φυγοκεντρήθηκε σε 11.000 rpm για 1 min. Προστέθηκαν επιπλέον 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης και ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε 11.000 rpm όπου απορρίφθηκε η στήλη με τη μεμβράνη και συλλέχθη το σωληνάριο του 1,5 mL με το πλασμιδιακό DNA. Ακολούθησε φωτομέτρηση της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA (Παράγραφος 3.2.3).

3.2.7 Πέψεις του φορέα κλωνοποίησης pORI198

Η πέψη του πλασμιδίου pORI198 πραγματοποιήθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *SacI*-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA USA) σε δυο αντιδράσεις, όπως περιγράφονται ακολούθως.

3.2.7.1 Μονή πέψη pORI198

Ο φορέας κλωνοποίησης έγινε γραμμικός με μονή πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI* (New England Biolabs). Το *SmaI* κόβει τη δίκλωνη αλυσίδα DNA του

φορέα κλωνοποίησης κάθετα σε ένα σημείο, συγκεκριμένα στη θέση 177 (CCC[▼]GGG), αφήνοντας "τυφλά" τα άκρα της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (blunt end cut). Στον ακόλουθο Πίνακα 3-3 φαίνεται το πρωτόκολλο της πέψης.

Πίνακας 3-3: Απλή ενζυμική πέψη φορέα κλωνοποίησης pORI198 με το ένζυμο *SmaI*

Περιοριστικό ένζυμο <i>SmaI</i>	1μL
DNA pORI198	1μg
10 x NEBuffer	5μL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50μL
Θερμοκρασία επώασης	25°C
Χρόνος επώασης	15min
Θερμοκρασία αδρανοποίησης	65°C
Χρόνος αδρανοποίησης	20min

Μετά την επώαση, ακολούθησε αδρανοποίηση του ενζύμου. Το προϊόν της πέψης αναμενόταν σε μέγεθος 6598 bp- όσο το μέγεθος του γραμμικού pORI198. Κατόπιν, τα προϊόν ηλεκτροφορήθηκε και εκχυλίστηκε από πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.6 και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

3.2.7.2 Διπλή πέψη pORI198

Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *SmaI* και το *SacI*-HF (New England Biolabs) για τη διπλή πέψη του φορέα κλωνοποίησης. Το *SacI*-HF κόβει τη δίκλωνη αλυσίδα DNA του pORI198 στη θέση 169/165 (G[▼]AGCT[▼]C) αφήνοντας ελεύθερα τα αντιπαράλληλα άκρα της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (3' ext, sticky end cut). Η πέψη αρχικά έγινε όπως το πρωτόκολλο της μονής πέψης (Παρ. 3.2.7.1), χωρίς το στάδιο της αδρανοποίησης, μέχρι τελικού όγκου 30 μL. Ακολούθησε η παρακάτω αντίδραση του Πίνακα 3-4 :

Πίνακας 3-4: Διπλή ενζυμική πέψη φορέα κλωνοποίησης pORI198 με *SmaI* και *SacI*-HF

Περιοριστικό ένζυμο <i>SacI</i> -HF	1μL
Μίγμα απλής πέψης	30μL
10 x NEBuffer	5μL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50μL
Θερμοκρασία επώασης	37°C
Χρόνος επώασης	20min
Θερμοκρασία αδρανοποίησης	65°C

Το αποτέλεσμα της διπλής πέψης ήταν δυο γραμμικά προϊόντα μεγέθους 6590 bp και 8 bp. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν και το τμήμα των 6590 bp εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.6. Κατόπιν τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.8 Ένθεση τμημάτων DNA σε φορέα κλωνοποίησης

Ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης κατασκευάστηκε με την ένθεση του καθαρού τμήματος των νέων βακτηριοσινών που εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης στο φορέα pORI198.

Η ένθεση του DNA των νέων βακτηριοσινών στο φορέα κλωνοποίησης pORI198 πραγματοποιήθηκε με το In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc., ATakaraBio Company 1290, Terra Bella Avenue, Mountain View, CA 94043, USA), σύμφωνα με την αντίδραση του Πίνακα 3-5 που ακολουθεί. Τα δείγματα μετά την επώαση, τοποθετήθηκαν σε πάγο 4°C μέχρι τη χρήση τους.

Πίνακας 3-5: Αντίδραση ένθεσης τριών βακτηριοσινών στο pORI198.

5x In-Fusion HD Enzyme Premix		2μL
DNA pORI198	10ng/μL (20 ng)	2μL
DNA 3bacts	50ng/μL (200 ng)	4μL
Τελικός όγκος με απιονισμένο H ₂ O		10μL
Χρόνος επώασης		15min
Θερμοκρασία επώασης		50°C

3.2.9 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E.coli* με τον παλίνδρομο φορέα κλωνοποίησης

Τα επιδεικτικά κύτταρα NEB10-beta Electrocompetent *E.coli* cells™ μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της ένθεσης της παραγράφου 3.2.8. με ηλεκτρικό παλμό. Συγκεκριμένα, 10 μL της αντίδρασης ένθεσης αναμίχθηκαν με 25 μL επιδεικτικών κυττάρων *E.coli* και παρέμειναν στον πάγο για 2 min. Για το μετασχηματισμό, εισήχθησαν σε κυψελίδα ηλεκτρομετασχηματισμού (electroporation cuvette) με απόσταση ηλεκτροδίων 2 mm και εκτέθηκαν σε ηλεκτρικό παλμό 2 KV, 200 Ω, 25 μF, διάρκειας 4.8-5.1 ms σε MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). Έπειτα σε κάθε δείγμα

προστέθηκαν 975 μL υγρού θρεπτικού μέσου SOC (2% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,5 mM NaCl, 250 mM KCl, 3,6% v/v γλυκόζη και 2 M MgCl₂, pH 7.0) προθερμασμένου στους 37 °C και επωάστηκαν για 1 h ακριβώς στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Προκειμένου να εντοπισθούν τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*, ακολούθησε επιφανειακή εξάπλωση (100 και 50 μL /ανά τρυβλίο) από τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB παρουσία αντιβιοτικού ερυθρομυκίνης 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 37 °C για 24 h.

3.2.10 Έλεγχος αποικιών με colony PCR και πέψη παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης

Για να εντοπιστούν οι μετασχηματισμένες αποικίες *E.coli* ελέχθηκαν με colony PCR και πραγματοποιήθηκε πέψη του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης με τις νέες βακτηριοσίνες (pORI198-3bacts).

Ειδικότερα, τμήμα των αποικιών που αναπτύχθηκαν παρουσία ερυθρομυκίνης (Παράγραφος 3.2.9) τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο erpendorf με 20 μL αποστειρωμένου νερού κι παρέμειναν στους 94 °C επί 4 min, για να λυθούν τα κύτταρα. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 10min και λήφθηκαν 4 μL από το υπερκείμενο, που περιείχε το DNA. Το DNA ενισχύθηκε με colony PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκε το κιτ KK3604 της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS και οι εκκινητές F/R 805check3bacts. Η αντίδραση παρουσιάζεται στον Πίνακα 3-6 :

Πίνακας 3-6: Στοιχεία αντίδρασης colony PCR για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli*

	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα 25 μL
2×KAPATaq EXtra HotStart ReayMix with dye	1 x	12,5 μL
F 805check3bacts (10 μM)	0,5 μM	1,25 μL
R 805check3bacts (10 μM)	0,5 μM	1,25 μL
DNA pORI198-3bacts		4 μL
απιονισμένο H ₂ O		6 μL
Τελικός όγκος		25μL

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε αρχικά την αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 2 min (initial denaturation). Ακολούθησε παραμονή στους 94 °C για 30 sec (denaturation) και η θερμοκρασία έπεσε στους 63 °C για 90 sec (annealing). Στους 72°C για 3 min ξεκίνησε η δράση της πολυμεράσης και άρχισαν

να συντίθενται οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (extention). Πραγματοποιήθηκαν 30 τέτοιοι κύκλοι και ακολούθησε επώαση στους 72 °C για 10 min για να ολοκληρωθεί η σύνθεση των ημιτελών αλυσίδων (final extention) (Πίνακας 3-7). Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (Παράγραφος 3.2.4).

Πίνακας 3-7: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR ενίσχυσης του τμήματος πλασμιδιακού DNA μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Initial denaturation	94 °C	2 min	} 30 κύκλοι
Denaturation	94 °C	30 sec	
Annealing	63 °C	1,5 min	
Extention	72 °C	3 min	
Final extention	72 °C	10 min	

Στη συνέχεια ανανεώθηκαν οι αποικίες που έδωσαν προϊόν PCR στο αναμενόμενο μέγεθος (805bp) (Παράγραφος 3.1), απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (Παράγραφος 3.2.6) και υδρολύθηκε ενζυμικά με διπλή πέψη (Παράγραφος 3.2.7.2). Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη (Παράγραφος 3.2.4).

3.2.11 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων του *L. lactis* με τον παλίνδρομο φορέα κλωνοποίησης

Ο παλίνδρομος φορέας χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό κυττάρων *L.lactis* MG1363 τα οποία είχαν καταστεί επιδεικτικά σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο, που αποτελεί τροποποίηση στα πρωτόκολλα των Paragianni M. (2007) και Kassem M. (2011):

Για τη δημιουργία επιδεικτικών κυττάρων, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17 στους 30 °C για 24 h. Εμβολιάστηκε 1 % καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο GM17 ενισχυμένο με 1% w/w γλυκίνη και 40 μM θρεονίνη και επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες για 24 h. Κατόπιν, εμβολιάστηκε 10 % καλλιέργεια στο ίδιο προθερμασμένο υγρό θρεπτικό μέσο και αναπτύχθηκε μέχρι οπτική πυκνότητα 0,3-0,4 στα 600 nm. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 8.000 rpm για 2 min στους 4 °C. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα οξικού λιθίου (100 mM Lithium Acetate- LiAc, 10 mM DDT, 0,6 M

σουκρόζη, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Κατόπιν, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 rpm για 5 min και επαναιωρήθηκαν σε παγωμένο διάλυμα 0,5 M σακχαρόζης που περιείχε 10 % γλυκερόλη. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0.5 M με 10 % γλυκερόλη, δύο εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0.5 M με 10% γλυκερόλη που περιείχε επιπλέον 50 mM EDTA (pH 7.0). Τα κύτταρα παρέμειναν στον πάγο για 15 min και ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα σακχαρόζης 0.5M με 10 % γλυκερόλη χωρίς EDTA. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν στο 1 % του αρχικού όγκου της καλλιέργειας, στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι τη χρήση τους (Paragianni M *et al* 2007, Kassem PhD thesis 2011).

Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 2 μg πλασμιδιακού DNA και 50μL καλλιέργειας επιδεικτικών κυττάρων *L.lactis*, τα οποία εισήχθησαν σε κυψελίδα ηλεκτρομετασχηματισμού (electroporation cuvette) με απόσταση ηλεκτροδίων 2 mm και εκτέθηκαν σε ηλεκτρικό παλμό τάσεως 12,5 kV/cm, διάρκειας 4.5-5 ms σε MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). Αμέσως μετά, προστέθηκαν 940 μL παγωμένου διαλύματος SGM17 (GM17 εμπλουτισμένο με 0.5M σακχαρόζη και 1% w/w γλυκίνη) που περιείχε επιπλέον 20 mM MgCl₂ και 2 mM CaCl₂ (SGM17MC) και παρέμειναν σε πάγο για 5 min. Έπειτα, έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στα δείγματα SGM17MC και επωάστηκαν στους 37°C για 2h. Κατόπιν, επιστρώθηκαν (100μL καλλιέργειας ανά τρυβλίο) σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα GM17, παρουσία 1 μg/mL ερυθρομυκίνης. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 48h.

3.2.12 Ενίσχυση τμημάτων DNA παλίδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός *L.lactis*

Απομονώθηκε γενωμικό DNA (gDNA) του *L. lactis* κατά τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.1 κι έγιναν οι ενισχύσεις του τμήματος DNA με αντιδράσεις PCR ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων της αντίδρασης.

3.2.12.1 Ενίσχυση τμήματος DNA μικρού μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός του *L.lactis*

Η ενίσχυση των τμημάτων DNA του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης μικρού μεγέθους σε bp εντός *L.lactis* έγινε με την αντίδραση PCR του Πίνακα 3-8. Το kit και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ίδια με αυτά της παραγράφου 3.2.10. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά το ζεύγος εκκινητών F/R check3bacts κι έπειτα συνδυασμοί των εκκινητών F_{M13}, F check3bacts με R check3bacts.

Πίνακας 3-8: Στοιχεία αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος DNA μικρού μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από *L. lactis*.

	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα 50μL
2xKAPATaq EXtra HotStart ReayMix with dye	1 x	25 μL
F primer (10 μM)	0,5 μM	2,5 μL
R primer (10 μM)	0,5 μM	2,5 μL
DNA pORI198-3bacts		1,5μg
απιονισμένο H ₂ O		μέχρι τελικού όγκου
Τελικός όγκος		50μL

3.2.12.2 Ενίσχυση τμήματος DNA μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης εντός του *L.lactis*

Η ενίσχυση των τμημάτων DNA του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης μεγάλου μεγέθους σε bp από *L.lactis* έγινε με το kit TaKaRaLaTaq™ HotStartVersion, της εταιρείας TAKARA BIO Inc.(Otsu, Shiga, 520-2193, Japan). Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F/R_{M13}. Η αντίδραση PCR έγινε σύμφωνα με τον Πίνακα 3-9.

Πίνακας 3-9: Στοιχεία αντίδρασης PCR για την ενίσχυση DNA μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από *L. lactis*

		Ποσότητα 50 μL
10x LA PCR BufferII	(Mg ²⁺ plus)	5 μL
dNTPs	2,5mM	8 μL
Primer Forward M13		0,2-1 μM
Primer Reverse M13		0,2-1 μM
DNA		2,5μg
TaKaRaLA Taq HS DNA Polymerase	5U/μL	0,5 μL
Απιονισμένο νερό		μέχρι τελικού όγκου
Τελικός όγκος		50 μL

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε αρχικά την αποδιάταξη του DNA στους 93 °C για 3 min (initial denaturation). Ακολούθησε παραμονή στους 93 °C για 25 sec (denaturation) και η θερμοκρασία έπεσε στους 59°C για 14 sec

(annealing). Στους 68°C για 3min ξεκίνησε η δράση της πολυμεράσης (extention). Πραγματοποιήθηκαν 35 τέτοιοι κύκλοι και ακολούθησε επώαση στους 68 °C για 20 min για να ολοκληρωθεί η σύνθεση των ημιτελών αλυσίδων (final extention) (Πίνακας 3-10). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Πίνακας 3-10: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος DNA μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από *L. lactis*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Initial denaturation	93 °C	3 min	} 35 κύκλοι
Denaturation	93 °C	25 sec	
Annealing	59 °C	14 sec	
Extention	68 °C	3 min	
Final extention	68 °C	20 min	

3.3 Έλεγχος έκφρασης

3.3.1 Δοκιμασία Διάχυσης Υπερκειμένου

Για να ελεγχθεί η έκφραση των βακτηριοσινών, ακολουθήθηκε η δοκιμασία διάχυσης του υπερκειμένου καλλιέργειας των μετασηματισμένων στελεχών του *L.lactis* σε πιθανά ευαίσθητα στελέχη.

Για τη λήψη του υπερκειμένου:

- Αναπτύχθηκε ο μικροοργανισμός σε υγρό θρεπτικό μέσο σύμφωνα με την παράγραφο 3.1
- Φυγοκεντρήθηκε η καλλιέργεια στις 8000 rpm για 2min και λήφθηκε το υπερκείμενο 1. Ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 6,5 και διηθήθηκε το υπερκείμενο μέσα από φίλτρο 0,22 μm.

Για τη συμπύκνωση του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκε οξικό αμμώνιο (ammonium acetate precipitate):

- Το υπερκείμενο 1 που συλλέχθηκε συμπυκνώθηκε μέχρι 60% με την σταδιακή προσθήκη οξικού αμμωνίου, το οποίο έφθασε τελικώς στα 390 g/L.
- Το υγρό με το οξικό αμμώνιο παρέμεινε υπό ανάδευση στους 4°C για 24 h.
- Φυγοκεντρήθηκε 12500 rpm για 30 min και λήφθηκε το υπερκείμενο 2.
- Το ίζημα επαναωρήθηκε στο ένα δέκατο του αρχικού όγκου του υπερκειμένου (ίζημα).

Επιλέχθηκαν τα στελέχη που θα ελέγχονταν ως προς την ευαισθησία τους στις τρεις βακτηριοσίνες. Τα στελέχη προέρχονταν από τις συλλογή ACA-DC και LMG του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ήταν τα εξής:

- *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* LMG 6890^T
- *Lactobacillus zymae* ACA-DC 3411
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 87
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 187

Το πρώτο στέλεχος ενσωματώθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα M17 (Oxoid) με 1,3% w/w άγαρ. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη ενσωματώθηκαν σε στερεό μέσο MRS (Oxoid) με 1,3% w/w άγαρ. Μετά τη στερεοποίηση του μέσου ανοίχθηκαν οπές με πιπέτα Pasteur και προστέθηκαν 50 μL από το κάθε υγρό (υπερκείμενο 1 δίχως συμπύκνωση, υπερκείμενο 2 και ίζημα, κατόπιν συμπύκνωσης). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 h. Στην περίπτωση που οι βακτηριοσίνες θα ήταν ενεργές θα εμπόδιζαν την ανάπτυξη των ευαίσθητων στελεχών. Η ανάσχεση της ανάπτυξης εμφανίζεται ως διαυγής άλως γύρω από την οπή που είχε τοποθετηθεί το υγρό. Για τον έλεγχο του θετικού αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε και η πρωτεΐνάση K που αναστέλλει τη δράση των βακτηριοσινών, σε συγκέντρωση 1mg/mL.

3.3.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *Streptococcus thermophilus*

Ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης με το ένθετο τμήμα των νέων βακτηριοσινών χρησιμοποιήθηκε και για το μετασηματισμό επιδεκτικών κυττάρων του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 4. Για τη δημιουργία των επιδεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία, που αποτέλεσε τροποποίηση του πρωτοκόλλου Sasaki (2004):

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο M17 (Oxoid) ενισχυμένο με 0.5% w/v λακτόζη (5LM17) στους 37°C για 24 h. Στη συνέχεια, έγινε εμβολιασμός 1% σε M17 που περιείχε 1% w/v λακτόζη (pH 5.5), 0,175 M σακχαρόζη, 0,6% γλυκίνη (SGLM17) κι επώαστηκε στους 42°C για 24 h. Ακολούθησε δεύτερος εμβολιασμός 1% σε SGLM17 κι επώαση στους 42°C μέχρι οπτική

πυκνότητα 0,08-0,1 στα 600 nm. Κατόπιν τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 5.000 rpm για 10 min και θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0.5 M που περιείχε 10% v/v γλυκερόλη και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν στο 1% του αρχικού όγκου της καλλιέργειας, στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι τη χρήση τους (Sasaki *et al* 2004).

Για το μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 2 μg πλασμιδιακού DNA και 40 μL καλλιέργειας επιδεικτικών κυττάρων *S. thermophilus*, τα οποία εισήχθησαν σε κυψελίδα ηλεκτρομετασχηματισμού (electroporation cuvette) με απόσταση ηλεκτροδίων 2 mm και εκτέθηκαν σε ηλεκτρικό παλμό τάσεως 2 kV/cm, διάρκειας 4.5-5 ms σε MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). Στη συνέχεια προστέθηκε 1mL SGM17, που περιείχε 20 mM MgCl₂ και 2 mM CaCl₂ (SGM17MC). Έγιναν 4 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στα δείγματα με 100 μL καλλιέργειας και 900 μL SGM17MC και παρέμειναν στους 37°C για 2h. Κατόπιν, τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LM17 που περιείχε 1 μg/mL ερυθρομυκίνης. Στη συνέχεια, τα τρυβλία αυτά επώαστηκαν για 48h στους 37 °C.

4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

4.1 Γενικά

Ο *S. macedonicus* απαντάται σε ζυμούμενα τρόφιμα κι απομονώθηκε για πρώτη φορά από Ελληνικά γαλακτοκομικά προϊόντα (Tsakalidou *et al*,1998). Ανήκει στο σύμπλεγμα SBSEC. Είναι συγγενικό είδος των *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus*, καθώς και του *Streptococcus infantarius*, που είναι ευκαιριακά παθογόνοι. Εντούτοις, ο *S. macedonicus* φαίνεται να έχει απωλέσει στοιχεία της παθογένειάς του βρισκόμενος σε μειωτική γενετική εξέλιξη (Paradimitriou *et al*. 2014).

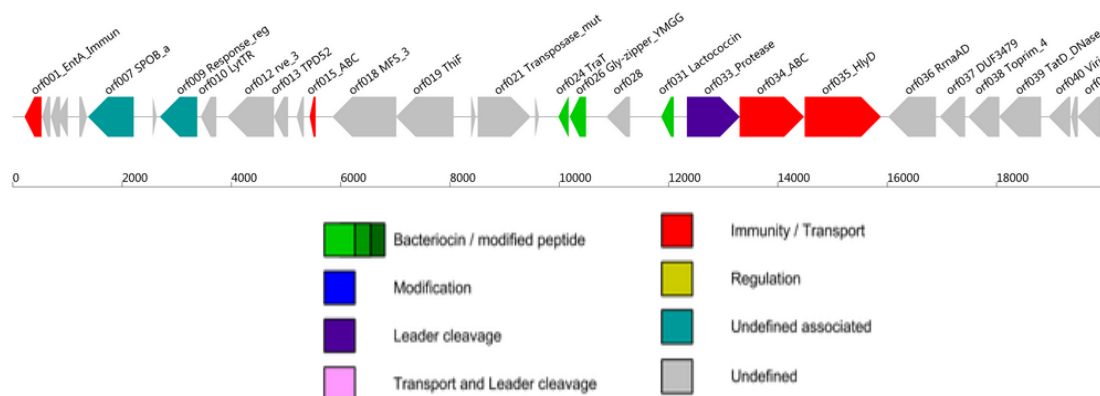
Ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως οξυγαλακτικό βακτήριο για τις προβιοτικές και τεχνολογικές του ιδιότητες. Σημαντική ιδιότητά του είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, των βακτηριοσινών. Συγκεκριμένα, παράγει τα λαντιβιοτικά μασεδοσίνη (Georgalaki *et al* 2002) και μασεδοβισίνη (Georgalaki *et al* 2013), που δρουν έναντι άλλων

οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και έναντι παθογόνων ή αλλοιωγόνων κατά Gram θετικών μικροοργανισμών. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές *in silico* ενδείξεις ότι στο γονιδιώμα του περιέχεται σύμπλεγμα που παράγει και καθιστά λειτουργικές τρεις νέες βακτηριοσίνες, για τις οποίες δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές.

4.2 Νέες βακτηριοσίνες του *Streptococcus macedonicus*

Η ανάλυση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* με τη χρήση του προγράμματος Bagel3 προέβλεψε την ύπαρξη τριών νέων πιθανών βακτηριοσινών. Ειδικότερα, έδωσε στοιχεία για το σύμπλεγμα των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τρεις νέες βακτηριοσίνες, ABC-μεταφορείς, μια πρωτεάση, καθώς και στοιχεία ρύθμισης γονιδίων και ανοσίας. Το σύμπλεγμα εμφανίζεται στην περιοχή μεταξύ 234^{ου} έως και 19926^{ου} νουκλεοτιδίου στο γενωμικό DNA (Εικόνα 4-1).

Το πρόγραμμα RAST είχε παλαιότερα αντιστοιχήσει την πρώτη και την τρίτη νέα βακτηριοσίνη ως υποθετικές πρωτεΐνες και τη δεύτερη ως πεπτίδιο τύπου βακτηριοσίνης, γεγονός που ενισχύει τη θέση για την ύπαρξη του συμπλέγματος βακτηριοσινών. Με τη χρήση του προγράμματος Bagel3, βρέθηκε ότι πρόκειται για βακτηριοσίνες κλάσης II. Η πρώτη βακτηριοσίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *orf24* και αποτελείται από 62 αμινοξέα. Η δεύτερη βακτηριοσίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *orf26* που μεταφράζεται σε 99 αμινοξέα. Η τρίτη βακτηριοσίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *orf31*, αποτελείται από 76 αμινοξέα και εμφανίζει ομολογία με λακτοκοκκίνες. Τα στοιχεία που προέκυψαν για το σύμπλεγμα των νέων βακτηριοσινών οδήγησαν στην παρούσα μελέτη.

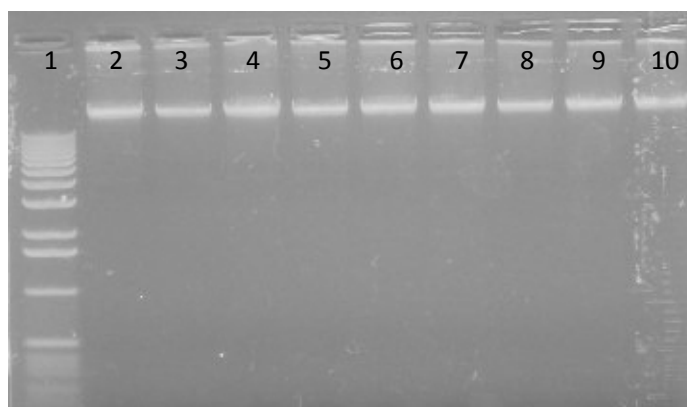


Εικ. 4-1: Σύμπλεγμα γονιδίων νέων βακτηριοσινών (*Bagel.molgenrug.nl*)

Ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 φέρει το πλασμίδιο pSMA198. Το πλασμίδιο pSMA198 χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευαστεί ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης pORI198 μεταξύ των στελεχών *E. coli* και *L. lactis* (Paradimitriou *et al* 2015). Ο φορέας pORI198 αποτέλεσε το όχημα μεταφοράς (shuttle vector), προκειμένου να κλωνοποιηθούν οι νέες βακτηριοσίνες από τον *S. macedonicus* στα κύτταρα *E.coli*, του *L.lactis* και του *S. thermophilus*.

4.3 Απομόνωση γενετικού υλικού τριών νέων βακτηριοσινών από το *S. macedonicus*

Για την κλωνοποίηση των νέων βακτηριοσινών, ήταν απαραίτητο να απομονωθεί το τμήμα γενετικού υλικού του *S. macedonicus* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των τριών βακτηριοσινών. Αρχικά, απομονώθηκε το ολικό γενωμικό DNA (gDNA) του στρεπτόκοκκου, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1 και ελέγχθηκε η ποιότητά του σε πηκτή αγαρόζης §3.2.3 (Εικόνα 4-2).

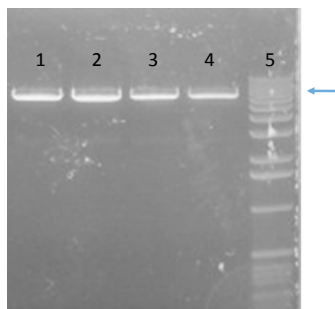


Εικ. 4-2: Πηκτή αγαρόζης με το γενωμικό DNA *S. macedonicus*. Στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε ο marker (1KB ladder Invitrogen™) και στις θέσεις 2 - 9 δείγματα gDNA του *S. macedonicus*.

4.4 Ενίσχυση του DNA για τις νέες βακτηριοσίνες

Ακολούθησε η ενίσχυση του τμήματος DNA των νέων βακτηριοσινών (DNA3bacts) από το gDNA του *S. macedonicus*. Η ενίσχυση του τμήματος DNA3bacts έγινε με PCR, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.4. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν σχεδιασμένη ώστε να παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα, αφενός με τα άκρα του τμήματος που θέλαμε να ενισχύσουμε και αφετέρου με την περιοχή του φορέα

κλωνοποίησης, στον οποίο επρόκειτο να κλωνοποιηθεί το προϊόν της PCR. Το προϊόν της PCR αναμενόταν σε μέγεθος 7904 bp, το οποίο καθορίζεται από τους συγκεκριμένους εκκινητές. Το μέγεθος του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και τα ενισχυμένα τμήματα λήφθηκαν με εκχύλιση από την πηκτή (Εικόνα 4-3).



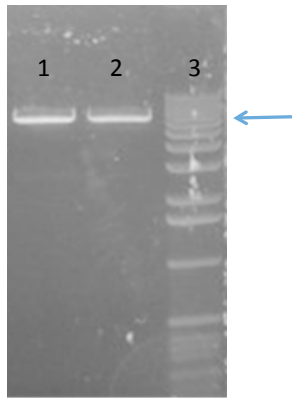
Εικ. 4-3: Πηκτή αγαρόζης με ενισχυμένο το τμήμα DNA των τριών νέων βακτηριοσινών. Στις τέσσερις πρώτες θέσεις απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR και στην πέμπτη θέση ο marker (1KB ladder Invitrogen™). Το βέλος δείχνει το μέγεθος 8000 bp, θέση στην οποία αναμένονταν τα προϊόντα (7904 bp).

4.5 Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pORI198 από *E.coli*

Το τμήμα γενετικού υλικού (DNA3bacts) έπρεπε να μεταφερθεί στο φορέα κλωνοποίησης pORI198. Σε πρώτο στάδιο, αναπτύχθηκαν τα κύτταρα *E.coli* Stellar™ που έφεραν το φορέα κλωνοποίησης pORI198 και απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA.

4.6 Ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης

Σε δεύτερο στάδιο, ο κυκλικός φορέας κλωνοποίησης (pORI198) που απομονώθηκε υδrolύθηκε με ενζυμική πέψη (*Sma*I), ώστε να μπορέσει να γίνει γραμμικός και να ενσωματώσει το επιθυμητό τμήμα DNA (DNA3bacts) (Εικόνα 4-4).



Εικ.4-4 Εικόνα πηκτής αγαρόζης με προϊόντα μόνης ενζυμικής πέψης με το ένζυμο *SmaI* του φορέα κλωνοποίησης pORI198. Στις θέσεις 1 και 2 τοποθετήθηκαν τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης και στη θέση 3 τοποθετήθηκε ο *marker*. Το γαλάζιο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 6500 bp. Το προϊόν της πέψης έχει αναμενόμενο μέγεθος 6598 bp.

4.7 Ένθεση DNA τριών βακτηριοσινών στο φορέα κλωνοποίησης

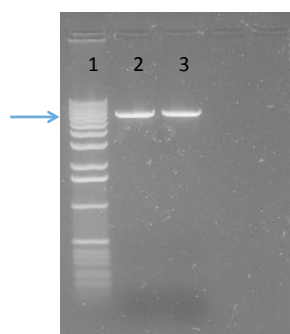
Πραγματοποιήθηκε η ένθεση του τμήματος DNA για τις νέες βακτηριοσίνες στο προϊόν πέψης του φορέα κλωνοποίησης pORI198, με τη διαδικασία της αντίδρασης της παραγράφου 3.2.8.

4.8 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli*

Ακολούθησε ο μετασηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* NEB™, όπως αναλύεται στην παράγραφο 3.2.9. Ελέχθηκαν οι αποικίες που αναπτύχθηκαν με colony PCR και πέψεις (παράγραφος 3.2.10), προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα έχουν το κατάλληλο μέγεθος (σε bp), που υποδηλώνει την ενσωμάτωση του DNA με τις νέες βακτηριοσίνες στον παλίνδρομο φορέα κλωνοποίησης.

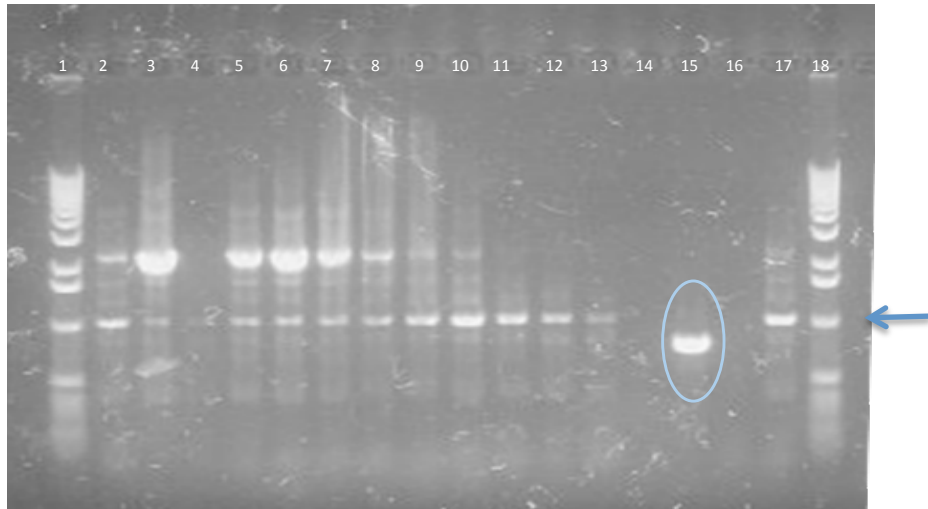
Η ανάπτυξη των αποικιών *E. coli* παρουσία ερυθρομυκίνης υποδηλώνει ότι έφεραν το φορέα κλωνοποίησης pORI198, ο οποίος προσδίδει την ανθεκτικότητα έναντι στο αντιβιοτικό στα κύτταρα, συνεπακόλουθα ότι ο μετασηματισμός των κυττάρων ήταν επιτυχής. Με τον έλεγχο των αποικιών με διπλή πέψη (παράγραφος 3.2.10), παρατηρήθηκε ένα μόνο προϊόν στο μέγεθος του DNA pORI198. Διαπιστώθηκε ότι είχαν μετασηματιστεί τα *E. coli* με τον φορέα κλωνοποίησης, αλλά δεν είχε γίνει η ένθεση του τμήματος DNA 3bacts στο φορέα. Θεωρήθηκε ότι δεν γινόταν η ένθεση- η κατασκευή του παλίνδρομου φορέα, επειδή το

DNApORI198 μετά τις πέψεις στη διαδικασία της ενσωμάτωσης έπαιρνε ξανά την κυκλική του μορφή. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα, χρησιμοποιήθηκαν δύο περιοριστικά ένζυμα που παράγουν ασύμβατα άκρα κατά την υδρόλυση του DNA. Ακολούθησε η ένθεση των τριών βακτηριοσινών, ο ηλεκτρομετασχηματισμός και ο έλεγχος τους. Το αποτέλεσμα ήταν πάλι αρνητικό. Επιλέχθηκε η ταυτόχρονη χρήση και των δύο ενζύμων (διπλή πέψη παράγραφος 3.2.7.2). Με τη διπλή πέψη, το DNApORI198 υδρολύθηκε σε δύο μικρότερα τμήματα, με αναμενόμενο μέγεθος 6590 bp και 8 bp, βάσει των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 4-5).



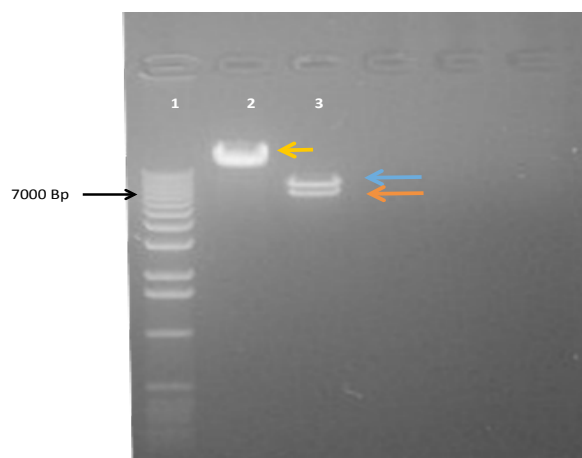
Εικ.4-5: Εικόνα πηκτής αγαρόζης με τα προϊόντα διπλής ενζυμικής πέψης του φορέα κλωνοποίησης pORI198 με τα ένζυμα *SmaI*TM και *SacI-HF*TM. Στη θέση 1 απεικονίζεται ο marker και στις θέσεις 2-3 τα προϊόντα της πέψης. Τα προϊόντα έχουν αναμενόμενο μέγεθος 6590 bp και 8 bp (δεν απεικονίζεται). Το γαλάζιο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 6500 bp.

Ακολούθησαν η ένθεση των τριών βακτηριοσινών στον φορέα κλωνοποίησης (παράγραφος 4.5), ο ηλεκτρομετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* (παράγραφος 4.5) και ο έλεγχός τους (παράγραφος 3.2.10). Ο έλεγχος έγινε με colony PCR (Εικόνα 4-6) και με πέψη. Τα προϊόντα της PCR αναμένονταν σε μέγεθος 805 bp, βάσει των εκκινητών.



Εικ.4-6: Προϊόντα *colony PCR* από μετασχηματισμένες αποικίες *E. coli* σε πηκτή αγαρόζης. Στις θέσεις 1 και 18 είναι οι *markers*, στις θέσεις 2- 17 τα προϊόντα της αντίδρασης. Στη θέση 15 έχει κυκλωθεί το προϊόν *PCR* μετασχηματισμένης αποικίας με το αναμενόμενο μέγεθος 805 bp. Το βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 bp.

Για επιβεβαίωση, ανανεώθηκαν οι αποικίες που έδωσαν προϊόν *PCR* στο αναμενόμενο μέγεθος (805bp) (Παράγραφος 3.1), απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (Παράγραφος 3.2.6) και υδρολύθηκε ενζυμικά με διπλή πέψη (Παράγραφος 3.2.7.2). Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (Παράγραφος 3.2.4). Με την πέψη αναμένονταν να διαμορφωθούν δυο προϊόντα, ένα στο μέγεθος του DNA_{ORI} (6598 bp) κι ένα στο μέγεθος DNA_{3bacts} (7904 bp). Πράγματι, η εικόνα σε πηκτή αγαρόζης επιβεβαίωσε τον επιτυχή μετασχηματισμό των κυττάρων *E. coli* με τον παλίνδρομο πλέον φορέα κλωνοποίησης (Εικόνα 4-7).



Εικ.4-7: Προϊόντα διπλής πέψης πλασμιδιακού DNA μετασχηματισμένων αποικιών *E. coli* σε πηκτή αγαρόζης. Στη θέση 1 είναι ο *marker*, στη θέση 2 το άπεπτο προϊόν (αναμενόμενο μέγεθος περί 14,5

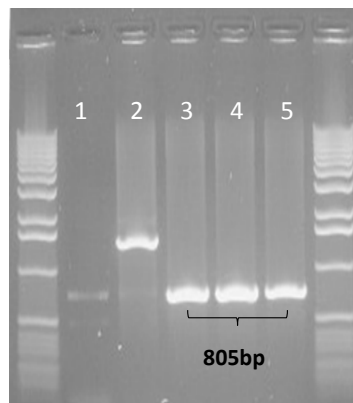
Kb) και στη θέση 3 τα προϊόντα της διπλής πέψης με τα αναμενόμενα μεγέθη (κόκκινο βέλος 6598 bp και μπλέ βέλος 7904 bp). Το αριστερό μαύρο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 7000 bp.

Τα κύτταρα των επιτυχώς μετασχηματισμένων αποικιών με τον παλίνδρομο φορέα (DNA_pORI+3bacts) ανανεώθηκαν δύο φορές στο κατάλληλο υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία ερυθρομικίνης, με σκοπό τον έλεγχο της επιβίωσής τους κι αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους στους -80° C (παράγραφος 3.1).

4.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *L. lactis*

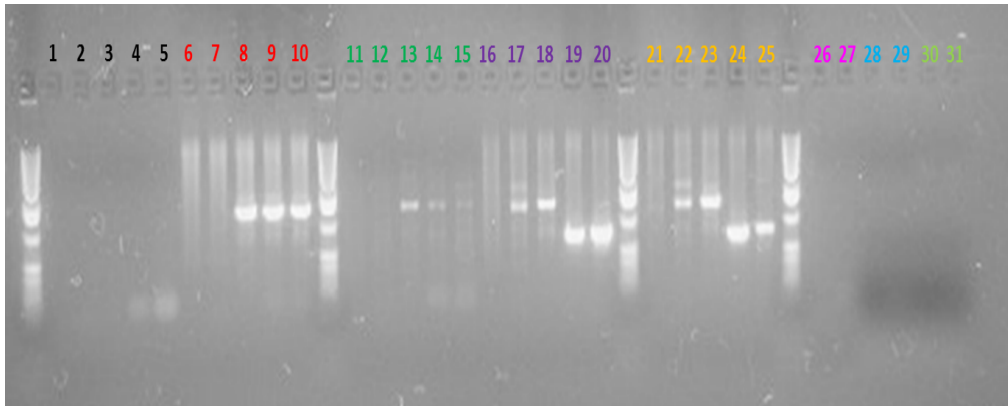
Μετά την κλωνοποίηση των νέων βακτηριοσινών του *S. macedonicus* στο *E. coli*, σειρά είχε η κλωνοποίηση σε κύτταρα *L. lactis*. Αρχικά, ανανεώθηκαν τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*, από τα οποία απομονώθηκε το DNA του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης (DNA_pORI+3bacts) με τη μέθοδο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (παράγραφος 3.2.6). Παράλληλα, προετοιμάστηκαν τα κύτταρα *L. lactis* MG1363, προκειμένου να καταστούν επιδεκτικά και έπειτα μετασχηματίστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 3.2.12. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν παρουσία ερυθρομικίνης ανανεώθηκαν στο κατάλληλο υπόστρωμα (παράγραφος 3.1) και απομονώθηκε το gDNA σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.1. Η απομόνωση του gDNA επιλέχθηκε έναντι της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA, γιατί ο *L. lactis* είναι ετερόλογος μικροοργανισμός του *S. macedonicus* και αναμένεται να φέρει μικρό αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου του δεύτερου (low copy number).

Το DNA που απομονώθηκε ενισχύθηκε με αντίδραση PCR (παράγραφος 3.2.12.1) και τη χρήση του ζεύγους εκκινητών F/R 805chech3bacts (Εικόνα 4-8).



Εικ.4-8: Προϊόντα αντίδρασης PCR από *L. lactis* σε πηκτή αγαρόζη. Στις θέσεις 1-5 τοποθετήθηκαν τα δείγματα PCR. Στη θέση 1 τοποθετήθηκε το δείγμα με μίγμα της αντίδρασης χωρίς DNA. Στη θέση 2 τοποθετήθηκε το δείγμα PCR που περιείχε DNA μη μετασχηματισμένου *L. lactis*. Σημειώνονται τα δείγματα στις θέσεις 3-5 με DNA των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων με το αναμενόμενο μέγεθος (805 bp). Εκατέρωθεν, αριστερά και δεξιά, τοποθετήθηκε ο marker.

Στην εικόνα παρατηρούνται τα δείγματα από τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα (θέσεις 3-5), αλλά και η δημιουργία προϊόντος στους αρνητικούς μάρτυρες. Η δημιουργία προϊόντος στο δείγμα που περιείχε DNA μόνο του *L. lactis* (θέση2), υποδηλώνει ότι οι εκκινητές υβριδίζουν και ενισχύουν τμήμα του gDNA του *L. lactis*. Η παρουσία προϊόντος στο δείγμα χωρίς DNA (θέση 1), υποδηλώνει την επιμόλυνση των εκκινητών ή του μίγματος αντιδραστηρίων της PCR. Για να διαγνωστούν τα προβλήματα, αποφασίστηκε να γίνουν επιπλέον αντιδράσεις PCR με διαφορετικούς εκκινητές και διαφορετικά μίγματα αντιδραστηρίων (Παράγραφος 3.2.12.1). Οι εκκινητές που είχαν χρησιμοποιηθεί ήταν σχεδιασμένοι, ώστε να υβριδίζουν πάνω στο DNA_{pORI198} ο F805check3bacts και στο DNA3bacts ο R805check3bacts. Ελλείψει άλλου ειδικού για τις τρεις βακτηριοσίνες reverse εκκινητή, αντικαταστάθηκε ο F805check3bacts με τον F_{M13}, που υβριδίζει επίσης στο DNA_{pORI198}, αναμένοντας να παράγει προϊόν 754 bp. Το σύνολο των αντιδράσεων παρουσιάζεται στην Εικόνα 4-9. Στον Πίνακα 4-1 αναλύονται, ανά θέση, τα συστατικά των αντιδράσεων PCR που παρουσιάζονται στην εικόνα 4-9.



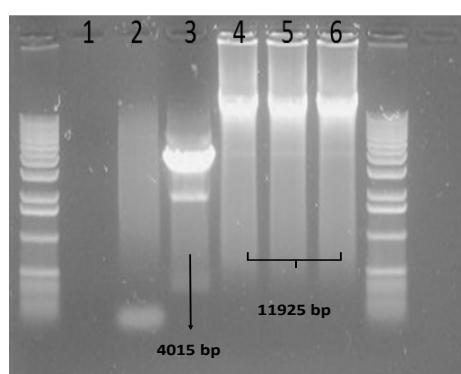
Εικ.4-9: Προϊόντα πολλαπλών αντιδράσεων PCR για έλεγχο των μετασηματισμένων αποικιών *L. lactis* σε πηκτή αγαρόζης. Με μαύρο χρώμα (θέσεις 1-5) συμβολίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας). Με κόκκινο χρώμα στις θέσεις 6-10 συμβολίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA μη μετασηματισμένου *L. lactis* (αρνητικός μάρτυρας). Με πράσινο χρώμα στις θέσεις 11-15 απεικονίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA μετασηματισμένου μόνο με DNA_{ORI198} *L. lactis* (αρνητικός μάρτυρας). Με μωβ και κίτρινο χρώμα, στις θέσεις 16-20 και 21-25 αντίστοιχα, φαίνονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA επιτυχώς μετασηματισμένων κυττάρων *L. lactis* με DNA_{ORI198}+3*bacts*. Τέλος με ροζ, γαλάζιο και πράσινο χρώμα (στις θέσεις 26-27, 28-29 και 30-31 αντίστοιχα) απεικονίζεται η χρήση διαφορετικών μιγμάτων αντιδραστηρίων για την PCR χωρίς DNA, για τον έλεγχο των μιγμάτων (αρνητικοί μάρτυρες).

Πίνακας 4-1: Τα συστατικά των αντιδράσεων PCR της Εικόνας 4-9. Αξιοσημείωτο είναι ότι προϊόν αναμενόταν μόνο στις αντιδράσεις 19, 20 και 24, 25 (μέγεθος με πορτοκαλί χρώμα).

	Master Mix (25μl)	DNA (1μg)	Primer F (1μl)	Primer R (1μl)	H ₂ O (μl)	Product (bp)
1	Biolabs	-	FM13	-	24	
2	Biolabs	-	Fcheck3bact	-	24	
3	Biolabs	-	-	Rcheck3bact	24	
4	Biolabs	-	FM13	Rcheck3bact	23	
5	Biolabs	-	Fcheck3bact	Rcheck3bact	23	
6	Biolabs	MG1363	FM13	-	22.7	
7	Biolabs	MG1363	Fcheck3bact	-	22.7	
8	Biolabs	MG1363	-	Rcheck3bact	22.7	
9	Biolabs	MG1363	FM13	Rcheck3bact	21.7	
10	Biolabs	MG1363	Fcheck3bact	Rcheck3bact	21.7	
11	Biolabs	MG1363 + pORI	FM13	-	23	
12	Biolabs	MG1363 + pORI	Fcheck3bact	-	23	
13	Biolabs	MG1363 + pORI	-	Rcheck3bact	23	
14	Biolabs	MG1363 + pORI	FM13	Rcheck3bact	22	
15	Biolabs	MG1363 + pORI	Fcheck3bact	Rcheck3bact	22	
16	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (1)	FM13	-	22	
17	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (1)	Fcheck3bact	-	22	
18	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (1)	-	Rcheck3bact	22	
19	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (1)	FM13	Rcheck3bact	21	754
20	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (1)	Fcheck3bact	Rcheck3bact	21	805
21	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (2)	FM13	-	22.5	
22	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (2)	Fcheck3bact	-	22.5	
23	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (2)	-	Rcheck3bact	22.5	
24	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (2)	FM13	Rcheck3bact	21.5	754
25	Biolabs	MG1363 + pORI +3bact (2)	Fcheck3bact	Rcheck3bact	21.5	805

	Buffer	dNTPs (μl)	Primer F	Primer R	Polymerase (μl)	H ₂ O (μl)
26	MM Biolabs (25μl)	-	-	-	-	25
27	MM Biolabs (25μl)	-	FM13 (1μl)	RM13(1μl)	-	23
28	Qiagen (5μl)	2.5	-	-	0.4	42.1
29	Qiagen (5μl)	2.5	FM13 (2.5μl)	RM13(2.5μl)	0.4	37.1
30	Takara (5μl)	8	-	-	0.5	36.5
31	Takara (5μl)	8	FM13 (1μl)	RM13(1μl)	0.5	34.5

Με την εκτέλεση των αντιδράσεων, διαπιστώθηκε ότι στις θέσεις που υπήρχε το gDNA του *L. lactis* και ο εκκινητής R805check3bacts παραγόταν μη αναμενόμενο προϊόν, γεγονός που επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές υβριδίζουν στο gDNA. Συνεπώς, αποφασίστηκε να αντικατασταθεί ο R805check3bacts με εκκινητή που υβριδίζει πάνω στο DNA του pORI198, εσωκλείοντας τις τρεις βακτηριοσίνες. Το αναμενόμενο προϊόν θα ήταν αρκετά μεγαλύτερο (11925 bp), για αυτό χρησιμοποιήθηκε αντίδραση Long Range PCR με διαφορετικό κιτ και διαφορετικές συνθήκες, όπως αναλύεται στην παράγραφο 3.2.12.2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 4-10.



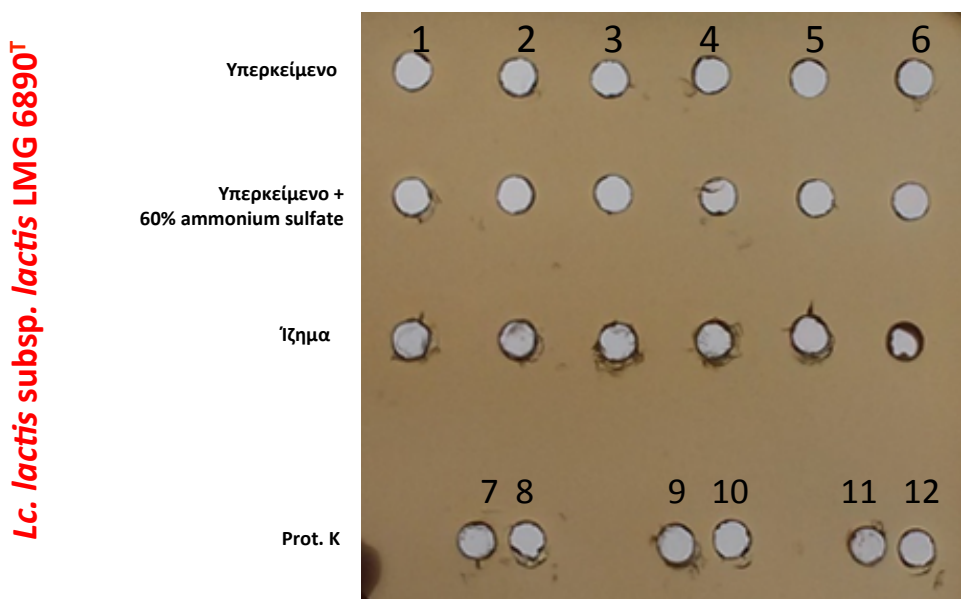
Εικ.4-10: Προϊόντα αντίδρασης Long Range PCR από *L. lactis* σε πηκτή αγαρόζης. Στη θέση 1 τοποθετήθηκε δείγμα χωρίς DNA. Στη θέση 2 δείγμα με DNA *L. lactis*. Στη θέση 3 δείγμα με DNA *L. lactis* μετασχηματισμένου μόνο με pORI198. Στις θέσεις 4-6 δείγματα DNA *L. lactis* μετασχηματισμένου με τις νέες βακτηριοσίνες. Εκατέρωθεν των δειγμάτων τοποθετήθηκε ο marker. Σημειώνονται τα δείγματα με το αναμενόμενο μέγεθος στις 11925 bp (θέσεις 4-6). Το δείγμα στη θέση 3 έχει το μέγεθος (4015 bp) του τμήματος DNA που δεν εσωκλείει τις τρεις βακτηριοσίνες.

Παρατηρήθηκαν στην εικόνα τα εξής: α) προϊόντα της αντίδρασης στο αναμενόμενο μέγεθος (θέσεις 4-6), που εσωκλείαν το τμήμα των τριών βακτηριοσινών εντός του φορέα κλωνοποίησης, β) προϊόν σε μικρότερο μέγεθος, που περιελάμβανε μόνο το φορέα κλωνοποίησης, στον αρνητικό μάρτυρα (θέση 3) και γ) παραπροϊόν στη θέση του αρνητικού μάρτυρα (θέση 3), που οφείλεται στη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών στη μήτρα του DNA (annealing), λόγω χαμηλής θερμοκρασίας, η οποία ωστόσο εξυπηρετούσε την ενίσχυση των μεγάλων τμημάτων του DNA.

Η διερεύνηση των αρνητικών μαρτύρων επιβεβαίωσε το αρχικό θετικό αποτέλεσμα, την επιτυχή κλωνοποίηση του παλίνδρομου φορέα με τις τρεις νέες βακτηριοσίνες εντός του *L. lactis*.

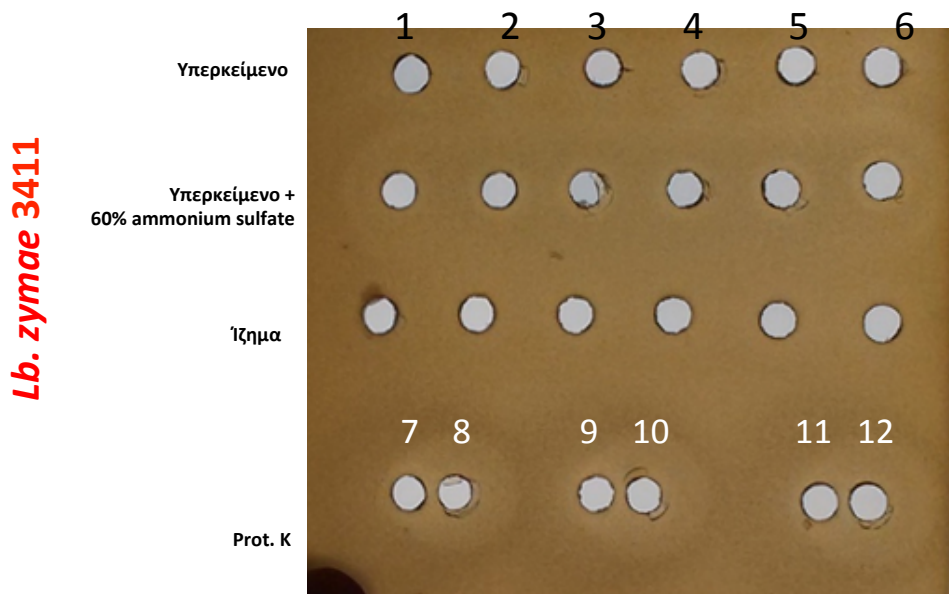
4.10 Έλεγχος έκφρασης μέσω ευαίσθητων στελεχών

Μετά την κλωνοποίηση των νέων βακτηριοσινών στον *L. lactis* κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί η έκφρασή τους. Για το σκοπό αυτό, θα δοκιμάζοταν η έκφραση και παραγωγή τους μέσω της αντιμικροβιακής δράση τους. Ο τρόπος αυτός επιλέχθηκε ως άμεσος και απλός. Δεδομένα για τις νέες βακτηριοσίνες σχετικά με ευαίσθητα στελέχη ή άλλες πληροφορίες δεν υπήρχαν, ως εκ τούτου αναζητήθηκαν ομόλογες βακτηριοσίνες, με βάση την αμινοξική αλληλουχία τους και τη χρήση του προγράμματος Blast (ref). Βρέθηκε ότι οι βακτηριοσίνες παρουσιάζουν ομολογία με μια λακτοκοκκίνη, η οποία εκδηλώνει αντιμικροβιακή δράση έναντι μεγάλου εύρους μικροοργανισμών (στρεπτοκόκκων, λακτοβακίλλων, λακτοκόκκων κ.α.). Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε να δοκιμαστούν οι νέες βακτηριοσίνες σε τυχαία στελέχη λακτοκόκκων και λακτοβακίλλων του εργαστηρίου. Επειδή, όμως η έκφραση θα γινόταν από ετερόλογο μικροοργανισμό με χαμηλό αριθμό αντιγράφων πλασμιδίων και πιθανότατα να μην παράγονται οι βακτηριοσίνες σε επαρκή ποσότητα, αποφασίστηκε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά τους και με συμπύκνωση. Ακολούθησε η μέθοδος διάχυσης υπερκειμένου σε τρυβλία με κατάλληλα στερεά υποστρώματα. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά για όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν, όπως φαίνονται στις Εικόνες 4-11 έως 4-14, που ακολουθούν.



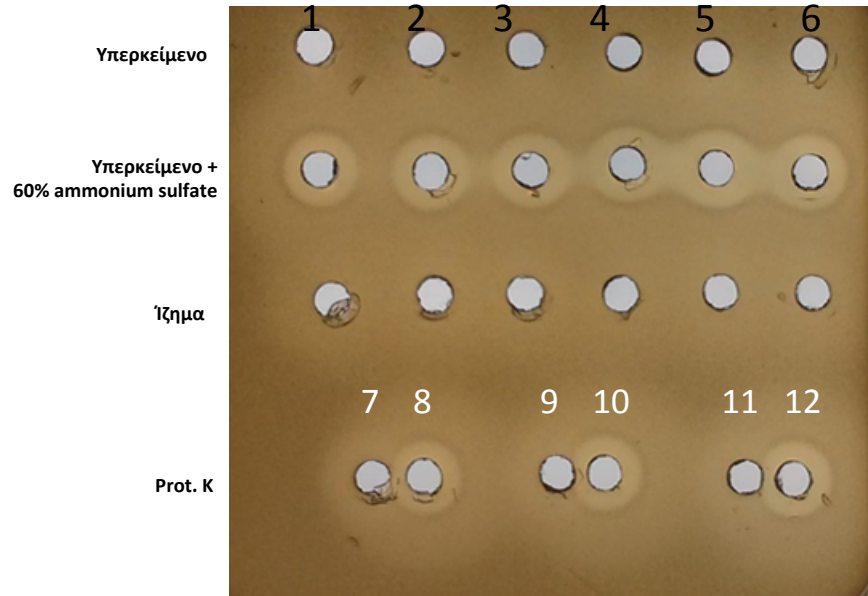
Εικόνα 4-11: Διάχυση υπερκειμένου στο *L. lactis subsp. lactis* 6890^T. Στην πρώτη σειρά τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1, στη δεύτερη σειρά το συμπυκνωμένο υπερκείμενο 2, στην τρίτη το εναιώρημα ιζήματος κατόπιν συμπύκνωσης και στην τέταρτη το υπερκείμενο των τριών

μετασηματισμένων λακτοκόκκων δίπλα σε πρωτεΐνάση K, για έλεγχο της πιθανής αναστολής των βακτηριοσινών. Στη στήλη 1 τοποθετήθηκε το υγρό μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη στήλη 2 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το *L. lactis* MG1363. Στη στήλη 3 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το *L. lactis* MG1363 μετασηματισμένου με pOR1198. Στις στήλες 4-6 το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των καλλιιεργειών με τα μετασηματισμένα κύτταρα με τις νέες βακτηριοσίνες του *L. lactis* MG1363 από τις τρεις αποικίες. Στις θέσεις 7, 9 και 11 τοποθετήθηκε η πρωτεΐνάση K. Στις θέσεις 8, 10 και 12 τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1 των καλλιιεργειών από κάθε μια επιτυχώς μετασηματισμένη αποικία *L. lactis* MG1363.



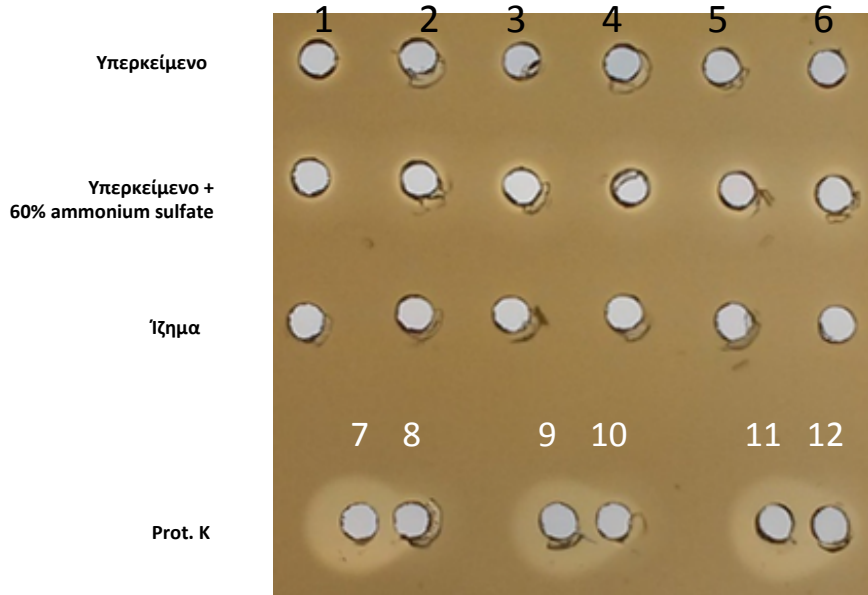
Εικόνα 4-12: Διάχυση υπερκειμένου στο *L. zymae* 3411. Στην πρώτη σειρά τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1, στη δεύτερη σειρά το συμπυκνωμένο υπερκείμενο 2, στην τρίτη το εναιώρημα ιζήματος κατόπιν συμπύκνωσης και στην τέταρτη το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των τριών μετασηματισμένων λακτοκόκκων δίπλα σε πρωτεΐνάση K, για έλεγχο της πιθανής αναστολής των βακτηριοσινών. Στη στήλη 1 τοποθετήθηκε το υγρό μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη στήλη 2 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το *L. lactis* MG1363. Στη στήλη 3 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το *L. lactis* MG1363 μετασηματισμένου με pOR1198. Στις στήλες 4-6 το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με τα μετασηματισμένα κύτταρα με τις νέες βακτηριοσίνες του *L. lactis* MG1363 από τις τρεις αποικίες. Στις θέσεις 7, 9 και 11 τοποθετήθηκε η πρωτεΐνάση K. Στις θέσεις 8, 10 και 12 τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1 των καλλιιεργειών από κάθε μια επιτυχώς μετασηματισμένη αποικία *L. lactis* MG1363. Παρατηρούνται ζώνες αναστολής ανάπτυξης-διάγασης γύρω και από αρνητικούς μάρτυρες στη δεύτερη σειρά που τοποθετήθηκε το υπερκείμενο της συμπύκνωσης. Ομοίως και στην τέταρτη σειρά που τοποθετήθηκε το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των καλλιιεργειών με τις πιθανές βακτηριοσίνες δίπλα στην πρωτεΐνάση K. Πρόκειται για ψευδώς θετικά αποτελέσματα που οφείλονται πιθανόν στο ammonium sulfate.

Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus 87



Εικόνα 4-13: Διάχυση υπερκειμένου στο *L. bulgaricus 87*. Η τοποθέτηση ήταν η ίδια με της προηγούμενης εικόνας (Εικ.4-12). Οι ζώνες διαύγασης που παρατηρούνται επίσης στα ίδια σημεία οφείλονται στο μέσο συμπύκνωσης.

Lb. delbrueckii subsp. lactis 178



Εικόνα 4-14: Διάχυση υπερκειμένου στο *L. lactis 178*. Η τοποθέτηση στις θέσεις του τρυβλίου ήταν η ίδια με της Εικ.4-12. Η αναστολή που παρατηρείται στις θέσεις 7, 9 και 11 οφείλεται στην πρωτεΐνάση K.

Η επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τυχαία, λόγω του μεγάλου εύρους αντιμικροβιακής δράσης της ομόλογης βακτηριοσίνης. Πιθανόν τα

αποτελέσματα να ήταν διαφορετικά αν οι βακτηριοσίνες ελέγχονταν για τη δράση τους σε διαφορετικά στελέχη ή αν αναπτυσσόταν ο *L. lactis* σε διαφορετικό θρεπτικό μέσο, όπως συμβαίνει με την παραγωγή της μασεδοσίνης.

4.11 Έλεγχος έκφρασης με ενσωμάτωση σε ξενιστή

Τα αποτελέσματα της ετερόλογης έκφρασης ήταν αρνητικά στο *L. lactis*. Για το λόγο αυτό προσπαθήσαμε να κλωνοποιήσουμε τις βακτηριοσίνες και στον *S. thermophilus* που είναι φυλογενετικά συγγενικός με τον *S. macedonicus*.

Ανανεώθηκαν, για το σκοπό αυτό, τα κλωνοποιημένα κύτταρα *E. coli* και απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (DNA_pORI198+3bacts) με τη μέθοδο της παραγράφου 3.2.6. Ομοίως, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA (DNA_pORI) από *E. coli* Stellar™. Επιλέχθηκε για μετασχηματισμό το στέλεχος *S. thermophilus* 4. Χρησιμοποιήθηκε ο *S. thermophilus*, ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης, καθώς και ο φορέας κλωνοποίησης, που απομονώθηκαν, για γίνει ο ηλεκτρομετασχηματισμός με τη διαδικασία της παραγράφου 3.3.2.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν παρουσία ερυθρομυκίνης προέρχονταν από κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το φορέα κλωνοποίησης (DNA_pORI) κι όχι από κύτταρα μη μετασχηματισμένα ή που μετασχηματίστηκαν με τον παλίνδρομο φορέα (DNA_pORI198+3bacts). Το αποτέλεσμα δηλώνει ότι: α) το συγκεκριμένο στέλεχος *S. thermophilus* δεν εκδηλώνει ανθεκτικότητα στη δεδομένη συγκέντρωση ερυθρομυκίνης και β) το πρωτόκολλο μετασχηματισμού που τροποποιήσαμε ήταν αποτελεσματικό, αλλά χρήζει βελτίωσης για την κλωνοποίηση του μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης.

5. Συμπεράσματα

Ο *S. macedonicus* περιέχει στο γονιδίωμά του πληροφορίες για την παραγωγή, πέραν της μασεδοσίνης και της μασεδοβισίνης, άλλων τριών βακτηριοσινών. Τα ευρήματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι τμήμα του συμπλέγματος για τις επιπρόσθετες βακτηριοσίνες μπορεί να ενσωματωθεί σε άλλους μικροοργανισμούς. Αυτό επιτεύχθηκε με την εξαρχής κατασκευή

παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης που περιείχε το γενετικό υλικό του πλασμιδίου pORI και τμήμα του συμπλέγματος.

Οι τρεις νέες βακτηριοσίνες κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς στα κύτταρα *E.coli*. Πραγματοποιήθηκε επιτυχώς και η κλωνοποίησή τους σε κύτταρα του ετερόλογου ξενιστή *L. lactis*. Η κλωνοποίηση των νέων βακτηριοσινών στον *L. lactis* αναφέρεται επίσης πρώτη φορά (σύμφωνα με τις μέχρι τώρα γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές). Η επιτυχής κλωνοποίηση προήλθε από τροποποίηση διαδικασιών και δημιουργήθηκε νέο αποτελεσματικό πρωτόκολλο ηλεκτρομετασχηματισμού για *L. lactis*.

Ο έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης μελλοντικά των νέων βακτηριοσινών του *S. macedonicus* θα συμβάλλει στη διερεύνηση της έκφρασης των βακτηριοσινών στους ετερόλογους ξενιστές.

Συνολικά, οι νέες βακτηριοσίνες του *S. macedonicus* κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς σε δύο ετερόλογους ξενιστές παρέχοντας ποικίλλες δυνατότητες περαιτέρω μελέτης και αξιοποίησης τους.

6. Μελλοντική Διερεύνηση

Η παρούσα μελέτη απέδωσε σημαντικά συμπεράσματα, με έναν περιορισμό. Οι νέες βακτηριοσίνες που κλωνοποιήθηκαν ελέγχθηκαν για την έκφρασή τους σε ετερόλογους ξενιστές. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της έκφρασης ήταν άμεσες, για να δώσουν ένα αδρό αποτέλεσμα, ώστε να καθοδηγηθεί η συνέχεια της έρευνας. Μια άλλη μέθοδος διερεύνησης της ετερόλογης έκφρασης είναι η RT-PCR με την οποία ελέγχεται η μεταγραφή των γονιδίων. Επί θετικού αποτελέσματος, μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των νέων βακτηριοσινών σε περισσότερα πιθανά ευαίσθητα στελέχη.

7. Βιβλιογραφία

- Anastasiou, R., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Kandarakis, I., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2007). The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasser cheese production. *International dairy journal*, 17(3), 208-217.
- Asaduzzaman, S. M., & Sonomoto, K. (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(5), 475-487.
- Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 2-18.
- Bolotin, A. et al., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1554–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543133> [Accessed April 28, 2015].
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., & van der Donk, W. A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 633-684.
- De Vuyst, L. & Tsakalidou, E., 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, 18(5), pp.476–485. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095869460700194X> [Accessed March 14, 2015].
- Facklam, R., 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), pp.613–630. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 15, 2015].
- Georgalaki, M. D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2002). Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5891-5903.
- Georgalaki, M., Papadelli, M., Chassioti, E., Anastasiou, R., Aktypis, A., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2010). Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and environmental microbiology*, 76(4), 1143-1151.
- Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B., & Tsakalidou, E. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food microbiology*, 33 (1), 124-130.
- Héchar, Y., & Sahl, H. G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84(5), 545-557.
- Kassem, M. (2011). *Investigation of storage polysaccharide metabolism in lactic acid bacteria* (Doctoral dissertation, Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen).

-
- Kaufmann, S. F., & Palzer, S. (2013). Food structure engineering for nutrition, health and wellness. In *Advances in Food Process Engineering Research and Applications* (pp. 429-443). S. Yanniotis (ed.) Springer US. (Available at: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-7906-2>) [Accessed May 04, 2015]
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, pp.67–78.
- Manios, S. G., Skiadaresis, A. G., Karavasilis, K., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2009). Field validation of predictive models for the growth of lactic acid bacteria in acidic cheese-based Greek appetizers. *Journal of Food Protection*[®], 72(1), 101-110.
- Mølbak, L. et al., 2003. The plasmid genome database. *Microbiology (Reading, England)*, 149 (Pt11), pp.3043–3045. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600215>.
- Papadelli, M., Karsioti, A., Anastasiou, R., Georgalaki, M., & Tsakalidou, E. (2007). Characterization of the gene cluster involved in the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus*. *FEMS microbiology letters*, 272(1), 75-82.
- Papadimitriou, K., Ferreira, S., Papandreou, N. C., Mavrogonatou, E., Supply, P., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2012). Complete genome sequence of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Journal of bacteriology*, 194(7), 1838-1839. [Accessed March 04, 2015].
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Mavrogonatou, E., Blom, J., Papandreou, N. C., Hamodrakas, S. J., Ferreira, S., Renault, P., Supply, P., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2014). Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *BMC genomics*, 15(1), 272.
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Maistrou, E., Plakas, T., Papandreou, N. C., Hamodrakas, S. J. & Tsakalidou, E. (2015). Acquisition through Horizontal Gene Transfer of Plasmid pSMA198 by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 Points towards the Dairy Origin of the Species. *PloS one*, 10(1).
- Papagianni, M., Avramidis, N., & Filioussis, G. (2007). High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC biotechnology*, 7(1), 15.
- Patton, G. C., & van der Donk, W. A. (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current opinion in microbiology*, 8(5), 543-551.
- Ross, A. C., & Vederas, J. C. (2011). Fundamental functionality: recent developments in understanding the structure–activity relationships of lantibiotic peptides. *The Journal of antibiotics*, 64(1), 27-34.
- Sasaki, Y., Ito, Y., & Sasaki, T. (2004). ThyA as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1858-1864.

-
- Shpakov, A. O. (2009). Peptide autoinducers in bacteria. *Microbiology*, 78(3), 255-266.
- Skandamis, P., & Nychas, G.J. (2011). Ecological attributes of foodborne infections. *Virulence*, 2(6), 570-572.
- Solar, G. et al., 1998. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), pp.434–464.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), pp.1–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168311>
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied biochemistry and microbiology*, 48(3), 229-243.
- Tsakalidou, E. & Papadimitriou, K., 2011. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* E. Tsakalidou & K. Papadimitriou, eds., Boston, MA: Springer US. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020631532202> [Accessed April 08, 2015].
- Tsakalidou, E. et al., 1998. Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 2 (1 998), pp.519–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731293>.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα	Τίτλος	Σελ.
Εικ. 1-1	Φυλογενετικό δέντρο που φαίνεται η σχέση του <i>Streptococcus macedonicus</i> με τα υπόλοιπα είδη των στρεπτόκοκκων (De Vuyst & Tsakalidou 2008).	15
Εικ.1-2	Ο χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pORI198. Με κόκκινο απεικονίζεται η αρχή έναρξης της αντιγραφής, με μωβ βέλη τα γονίδια <i>rep-orfX</i> , με κίτρινο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (<i>erm</i>), ενώ με πράσινο βέλος τονίζεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (<i>amp</i>).	17
Εικ.4-1	Σύμπλεγμα γονιδίων νέων βακτηριοσινών (<i>Bagel.molgenrug.nl</i>)	43
Εικ.4-2	Πηκτή αγαρόζης με το γενωμικό DNA <i>S. macedonicus</i> . Στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε ο marker (1KB ladder Invitrogen™) και στις θέσεις 2 - 9 δείγματα gDNA του <i>S. macedonicus</i> .	44
Εικ.4-3	Πηκτή αγαρόζης με ενισχυμένο το τμήμα DNA των τριών νέων βακτηριοσινών. Στις τέσσερις πρώτες θέσεις απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR και στην πέμπτη θέση ο marker (1KB ladder Invitrogen™). Το βέλος δείχνει το μέγεθος 8000 bp, θέση στην οποία αναμενόταν τα προϊόντα (7904 bp).	45
Εικ.4-4	Εικόνα πηκτής αγαρόζης με προϊόντα μονής ενζυμικής πέψης με το ένζυμο <i>SmaI</i> του φορέα κλωνοποίησης pORI198. Στις θέσεις 1 και 2 τοποθετήθηκαν τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης και στη θέση 3 τοποθετήθηκε ο marker. Το γαλάζιο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 6500 bp. Το προϊόν της πέψης έχει αναμενόμενο μέγεθος 6598 bp.	46
Εικ.4-5	Εικόνα πηκτής αγαρόζης με τα προϊόντα διπλής ενζυμικής πέψης του φορέα κλωνοποίησης pORI198 με τα ένζυμα <i>SmaI</i> ™ και <i>SacI-HF</i> ™. Στη θέση 1 απεικονίζεται ο marker και στις θέσεις 2-3 τα προϊόντα της πέψης. Τα προϊόντα έχουν αναμενόμενο μέγεθος 6590 bp και 8 bp (δεν απεικονίζεται). Το γαλάζιο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 6500 bp.	47
Εικ.4-6	Προϊόντα colony PCR από μετασχηματισμένες αποικίες <i>E. coli</i> σε πηκτή αγαρόζης. Στις θέσεις 1 και 18 είναι οι markers, στις θέσεις 2- 17 τα προϊόντα της αντίδρασης. Στη θέση 15 έχει κυκλωθεί το προϊόν PCR μετασχηματισμένης αποικίας με το αναμενόμενο μέγεθος 805 bp. Το βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 bp.	48
Εικ.4-7	Προϊόντα διπλής πέψης πλασμιδιακού DNA μετασχηματισμένων αποικιών <i>E. coli</i> σε πηκτή αγαρόζης. Στη θέση 1 είναι ο marker, στη θέση 2 το άπεπτο προϊόν (αναμενόμενο μέγεθος περί 14,5 Kb) και στη θέση 3 τα προϊόντα της διπλής πέψης με τα αναμενόμενα μεγέθη (κόκκινο βέλος 6598 bp και μπλέ βέλος 7904 bp). Το αριστερό μαύρο βέλος αντιστοιχεί σε μέγεθος 7000 bp.	48
Εικ.4-8	Προϊόντα αντίδρασης PCR από <i>L. lactis</i> σε πηκτή αγαρόζης. Στις θέσεις 1-5 τοποθετήθηκαν τα δείγματα PCR. Στη θέση 1 τοποθετήθηκε το δείγμα με μίγμα της αντίδρασης χωρίς DNA. Στη θέση 2 τοποθετήθηκε το δείγμα PCR που περιείχε DNA μη μετασχηματισμένου <i>L. lactis</i> . Σημειώνονται τα δείγματα στις θέσεις 3-5 με DNA των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων με το αναμενόμενο μέγεθος (805 bp). Εκατέρωθεν, αριστερά και δεξιά, τοποθετήθηκε ο marker.	49

Εικ.4-9	<p>Προϊόντα πολλαπλών αντιδράσεων PCR για έλεγχο των μετασχηματισμένων αποικιών <i>L. lactis</i> σε πηκτή αγαρόζης. Με μαύρο χρώμα (θέσεις 1-5) συμβολίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας). Με κόκκινο χρώμα στις θέσεις 6-10 συμβολίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA μη μετασχηματισμένου <i>L. lactis</i> (αρνητικός μάρτυρας). Με πράσινο χρώμα στις θέσεις 11-15 απεικονίζονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA μετασχηματισμένου μόνο με DNA_{pORI198} <i>L. lactis</i> (αρνητικός μάρτυρας). Με μωβ και κίτρινο χρώμα, στις θέσεις 16-20 και 21-25 αντίστοιχα, φαίνονται τα δείγματα αντίδρασης PCR με DNA επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων <i>L. lactis</i> με DNA_{pORI198+3bacts}. Τέλος με ροζ, γαλάζιο και πράσινο χρώμα (στις θέσεις 26-27, 28-29 και 30-31 αντίστοιχα) απεικονίζεται η χρήση διαφορετικών μιγμάτων αντιδραστηρίων για την PCR χωρίς DNA, για τον έλεγχο των μιγμάτων (αρνητικοί μάρτυρες).</p>	51
Εικ.4-10	<p>Προϊόντα αντίδρασης Long Range PCR από <i>L. lactis</i> σε πηκτή αγαρόζης. Στη θέση 1 τοποθετήθηκε δείγμα χωρίς DNA. Στη θέση 2 δείγμα με DNA <i>L. lactis</i>. Στη θέση 3 δείγμα με DNA <i>L. lactis</i> μετασχηματισμένου μόνο με pORI198. Στις θέσεις 4-6 δείγματα DNA <i>L. lactis</i> μετασχηματισμένου με τις νέες βακτηριοσίνες. Εκατέρωθεν των δειγμάτων τοποθετήθηκε ο marker. Σημειώνονται τα δείγματα με το αναμενόμενο μέγεθος στις 11925 bp (θέσεις 4-6). Το δείγμα στη θέση 3 έχει το μέγεθος (4015 bp) του τμήματος DNA που δεν εσωκλείει τις τρεις βακτηριοσίνες.</p>	53
Εικ.4-11	<p>Διάχυση υπερκείμενου στο <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 6890^T. Στην πρώτη σειρά τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1, στη δεύτερη σειρά το συμπυκνωμένο υπερκείμενο 2, στην τρίτη το εναιώρημα ιζήματος κατόπιν συμπύκνωσης και στην τέταρτη το υπερκείμενο των τριών μετασχηματισμένων λακτοκόκκων δίπλα σε πρωτεϊνάση K, για έλεγχο της πιθανής αναστολής των βακτηριοσινών. Στη στήλη 1 τοποθετήθηκε το υγρό μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη στήλη 2 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το <i>L. lactis</i> MG1363. Στη στήλη 3 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το <i>L. lactis</i> MG1363 μετασχηματισμένου με pORI198. Στις στήλες 4-6 το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των καλλιιεργειών με τα μετασχηματισμένα κύτταρα με τις νέες βακτηριοσίνες του <i>L. lactis</i> MG1363 από τις τρεις αποικίες. Στις θέσεις 7, 9 και 11 τοποθετήθηκε η πρωτεϊνάση K. Στις θέσεις 8, 10 και 12 τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1 των καλλιιεργειών από κάθε μια επιτυχώς μετασχηματισμένη αποικία <i>L. lactis</i> MG1363.</p>	54
Εικ.4-12	<p>Διάχυση υπερκείμενου στο <i>L. zymae</i> 3411. Στην πρώτη σειρά τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1, στη δεύτερη σειρά το συμπυκνωμένο υπερκείμενο 2, στην τρίτη το εναιώρημα ιζήματος κατόπιν συμπύκνωσης και στην τέταρτη το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των τριών μετασχηματισμένων λακτοκόκκων δίπλα σε πρωτεϊνάση K, για έλεγχο της πιθανής αναστολής των βακτηριοσινών. Στη στήλη 1 τοποθετήθηκε το υγρό μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη στήλη 2 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το <i>L. lactis</i> MG1363. Στη στήλη 3 το υπερκείμενο του υγρού μέσου ανάπτυξης με το <i>L. lactis</i> MG1363 μετασχηματισμένου με pORI198. Στις στήλες 4-6 το υπερκείμενο των καλλιιεργειών με τα μετασχηματισμένα κύτταρα με τις</p>	55

	<p>νέες βακτηριοσίνες του <i>L. lactis</i> MG1363 από τις τρεις αποικίες. Στις θέσεις 7, 9 και 11 τοποθετήθηκε η πρωτεΐνάση K. Στις θέσεις 8, 10 και 12 τοποθετήθηκε το υπερκείμενο 1 των καλλιεργειών από κάθε μια επιτυχώς μετασχηματισμένη αποικία <i>L. lactis</i> MG1363. Παρατηρούνται ζώνες αναστολής ανάπτυξης- διαύγασης γύρω και από αρνητικούς μάρτυρες στη δεύτερη σειρά που τοποθετήθηκε το υπερκείμενο της συμπύκνωσης. Ομοίως και στην τέταρτη σειρά που τοποθετήθηκε το συμπυκνωμένο υπερκείμενο των καλλιεργειών με τις πιθανές βακτηριοσίνες δίπλα στην πρωτεΐνάση K. Πρόκειται για ψευδώς θετικά αποτελέσματα που οφείλονται πιθανόν στο <i>ammonium sulfate</i>.</p>	
Εικ.4-13	<p>Διάχυση υπερκειμένου στο <i>L. bulgaricus</i> 87. Η τοποθέτηση ήταν η ίδια με της προηγούμενης εικόνας (Εικ.4-12). Οι ζώνες διαύγασης που παρατηρούνται επίσης στα ίδια σημεία οφείλονται στο μέσο συμπύκνωσης.</p>	56
Εικ.4-14	<p>Διάχυση υπερκειμένου στο <i>L. lactis</i> 187. Η τοποθέτηση στις θέσεις του τρυβλίου ήταν η ίδια με της Εικ.4-12. Η αναστολή που παρατηρείται στις θέσεις 7, 9 και 11 οφείλεται στην πρωτεΐνάση K.</p>	56

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας	Τίτλος	Σελ.
Πίνακας 3-1	Στοιχεία αντίδρασης PCR για ενίσχυση τμήματος gDNA των νέων βακτηριοσινών από το <i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198.	30
Πίνακας 3-2	Πρόγραμμα αντίδρασης PCR ενίσχυσης του τμήματος gDNA του <i>S. macedonicus</i> .	31
Πίνακας 3-3	Απλή ενζυμική πέψη φορέα κλωνοποίησης pORI198 με το ένζυμο <i>SmaI</i>	34
Πίνακας 3-4	Διπλή ενζυμική πέψη φορέα κλωνοποίησης pORI198 με <i>SmaI</i> και <i>SacI</i> -HF	34
Πίνακας 3-5	Αντίδραση ένθεσης τριών βακτηριοσινών στο pORI198	35
Πίνακας 3-6	Στοιχεία αντίδρασης colony PCR για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>E. coli</i>	36
Πίνακας 3-7	Πρόγραμμα αντίδρασης PCR ενίσχυσης του τμήματος πλασμιδιακού DNA μετασχηματισμένων κυττάρων <i>E. coli</i> .	37
Πίνακας 3-8	Στοιχεία αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος DNA μικρού μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από <i>L. lactis</i>	39
Πίνακας 3-9	Στοιχεία αντίδρασης PCR για την ενίσχυση DNA μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από <i>L. lactis</i>	39
Πίνακας 3-10	Πρόγραμμα αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος DNA μεγάλου μεγέθους του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης από <i>L. lactis</i> . Εμφανίζονται οι κατάλληλες θερμοκρασίες και χρόνοι σε κάθε βήμα της αντίδρασης.	40
Πίνακας 4-1	Τα συστατικά των αντιδράσεων PCR της Εικόνας 4-9.	52