

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΤΡΑΚΑ ΧΡΥΣΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

«ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA ΚΑΙ ΕΥΡΕΣΗ ΚΛΩΝΩΝ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ
ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΙΔΗΡΟΦΟΡΩΝ»

ΛΑΡΙΣΑ 2010

«Κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*
και εύρεση κλώνων που φέρουν γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση σιδηροφόρων»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας, Βιοτεχνολογία Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιολογική Χημεία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας και στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την εποπτεία του κ. Μόσιαλου Δημήτρη.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Μαρκουλάτο Παναγιώτη και Σταθόπουλο Κωνσταντίνο για τη βοήθειά τους στην παρούσα εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο για την πολύ ωραία συνεργασία που είχαμε και κυρίως για την υπομονή και κατανόηση που έδειξε στα όποια προβλήματα προέκυψαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Το βακτηριακό γένος <i>Pseudomonas</i>	8
1.2 <i>Pseudomonas entomophila</i>	10
1.2.1 Γονιδίωμα.....	10
1.2.2 Μεταβολισμός.....	12
1.2.3 Οικολογία.....	12
1.2.4 Παθογένεια.....	12
1.3 Σιδηροφόρα.....	15
1.3.1 Πυοβερδίνη.....	16
1.3.2 Δευτερεύοντα σιδηροφόρα.....	18
1.4 Βιοφιλμ.....	20
1.5 Γονιδιωματική βιβλιοθήκη.....	22
1.5.1 Γενικά.....	22
1.5.2 Φορείς.....	24
1.5.3 Χρησιμότητα γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών.....	27
2.2 Απομόνωση του κοσμιδίου από το <i>E.coli</i>	30
2.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το βακτήριο <i>P.entomophila</i>	30
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
2.5 Μερική πέψη χρωμοσωμικού DNA.....	34
2.6 Σύνδεση του γραμμικού κοσμιδίου με το χρωμοσωμικό DNA.....	36
2.6.1 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων.....	36
2.7 Τιτλοποίηση της αντίδρασης πακεταρίσματος του κοσμιδίου.....	37
2.7.1 SM buffer.....	38
2.8 Δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	38
2.8.1 Υπολογισμός βαθμού κάλυψης (fold coverage).....	40
2.9 Μεταλλαξιγένεση.....	41

2.10 Ηλεκτροδιάτρηση.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Αξιολόγηση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	45
3.2 Αποτελέσματα μεταλλαξιγένεσης.....	51
3.2.1 Τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολλο της μεταλλαξιγένεσης.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	54
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *P.entomophila*, όπως και πολλά άλλα βακτήρια, προκειμένου να αντιμετωπίσει τη μικρή βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου και να ικανοποιήσει τις διατροφικές της ανάγκες, προχωρά στην παραγωγή σιδηροφόρων, χαμηλού μοριακού βάρους συμπλόκων, που σκοπό έχουν να δεσμεύουν και να μεταφέρουν τον σίδηρο στο εσωτερικό της.

Η πυοβερδίνη είναι το κύριο σιδηροφόρο που παράγεται στην *P.entomophila*, αλλά και σε όλες τις φθορίζουσες ψευδομονάδες, και παρουσιάζει υψηλή σταθερά σύνδεσης με το σίδηρο. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, παράγονται επίσης και δευτερεύοντα σιδηροφόρα, σε μικρότερες ποσότητες και με άγνωστο συνήθως βιολογικό ρόλο.

Σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila* και η εύρεση κλώνων που να φέρουν γονίδια που να ευθύνονται για την παραγωγή σιδηροφόρων. Οι πειραματικές διαδικασίες ξεκίνησαν με την ελπίδα ότι θα επιτύχουμε απομόνωση και μελέτη του δεύτερου, άγνωστου μέχρι τότε, σιδηροφόρου της *P.entomophila*.

Ωστόσο, μία ερευνητική ομάδα από εργαστήριο του Βελγίου, και ενώ είχε ήδη ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, προχώρησε σε απομόνωση και ταυτοποίηση του δεύτερου σιδηροφόρου της *P.entomophila*, το οποίο και ονομάστηκε ψευδομονίνη.

Συνεπώς, η εργασία προσανατολίζεται πλέον σε διαφορετική κατεύθυνση και συγκεκριμένα προχωρούμε σε μεταλλαξιγένεση του γονιδιώματος της *P.entomophila* και εύρεση κλώνων από τους οποίους να απουσιάζει η ικανότητα σχηματισμού βιοφιλμ. Τα αρνητικά, ως προς τη δημιουργία βιοφιλμ, μεταλλάγματα θα ελεγχθούν ως προς την εντομοπαθογένειά τους σε σχέση με τον άγριο τύπο. Δυστυχώς, τα στενά χρονικά περιθώρια στα οποία έπρεπε να παραδοθεί η παρούσα εργασία δεν επέτρεψαν ολοκληρωμένα αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το βακτηριακό γένος *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες είδη βακτηρίων, που ανήκουν στην κατηγορία των Gram-αρνητικών-γ-πρωτεοβακτηρίων. Χαρακτηρίζονται από ένα ή περισσότερα αντιδιαμετρικά μαστίγια και την έλλειψη δυνατότητας σχηματισμού σπορίων. Αναπτύσσονται κυρίως κάτω από αερόβιες συνθήκες, αν και αναερόβια ανάπτυξη είναι επίσης δυνατή (Mossialos and Amoutzias, 2007). Στο γένος περιλαμβάνονται είδη που ενισχύουν τη φυτική ανάπτυξη (*P.fluorescens*), είδη που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (*P.aeruginosa*, εικ.1.α) και τα φυτά (*P.syringae*), αλλά και είδη που συμμετέχουν στην βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών (*P.putida*, εικ.1.β). Ενδεικτικά, το είδος *P.aeruginosa* προσβάλλει ευκαιριακά τον άνθρωπο και τα ζώα, και ευθύνεται για μια σειρά από μολύνσεις, όπως η κυστική ίνωση (CF) των πνευμόνων και άλλες νοσοκομειακές λοιμώξεις (Lyczak et al., 2000).

Το γένος *Pseudomonas* χωρίζεται σε πέντε ομάδες με κριτήριο την ομολογία των 16S rRNA αλληλουχιών. Η πρώτη ομάδα (Group I) διακρίνεται περαιτέρω σε φθορίζουσες και μη φθορίζουσες ψευδομονάδες (Palleroni, 1984).



Εικόνα 1.α. Το βακτήριο *P.aeruginosa* έπειτα από καλλιέργεια σε τριβλίο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.6. Το βακτήριο *Pseudomonas putida* όπως φαίνεται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* διακατέχονται από υψηλή μεταβολική προσαρμοστικότητα και παραγωγή πολυάριθμων δευτερογενών μεταβολιτών (Ryall et al., 2009).

Εγκαθίστανται και επιβιώνουν σε πολυάριθμα οικολογικά ενδιαιτήματα, όπως είναι το έδαφος, το νερό και οι φυτικές επιφάνειες. Η μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων αντανακλά κατά κανόνα το μέγεθος του γονιδιώματος του κάθε μικροοργανισμού, το οποίο περιέχει μεγάλες ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με την εκμετάλλευση της εκάστοτε πηγής άνθρακα και την ικανότητα προσαρμογής του (Vodovar et al., 2006).

1.2 *Pseudomonas Entomophila*

Η *Pseudomonas entomophila* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 2001 από μύγες φρούτων στο δυτικό τμήμα του νησιού της Γουαδελούπης (Liehl et al., 2006). Πρόκειται για ένα εντομοπαθογόνο Gram αρνητικό βακτήριο που ζει στο έδαφος και αποτελεί, όπως επιβεβαίωσε και η αλληλούχιση του 16S rRNA, στενό συγγενή των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas monteilli*. Χαρακτηρίζεται από υψηλή εντομοπαθογένεια, καθώς έχει τη δυνατότητα να θανατώνει τη *Drosophila melanogaster* αλλά και έντομα διαφόρων τάξεων, ενήλικα και προνύμφες, ύστερα από κατάποση (Vodovar et al., 2006).

1.2.1 Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα της *P.entomophila* αποτελείται από ένα μοναδικό κυκλικό χρωμόσωμα (εικ.1.2.1) και είναι σε μέγεθος το μικρότερο από τα μέχρι τώρα μελετημένα είδη που συγκαταλέγονται στο γένος *Pseudomonas*, με μήκος **5.888.780 ζεύγη βάσεων** (Vodovar et al., 2006). Περίπου το 67% αυτού αποτελεί γονίδια με γνωστές λειτουργίες.

Χρήση του BLAST για σύγκριση του γονιδιώματος με τα 5 αντιπροσωπευτικά είδη *Pseudomonas* αποκάλυψε την ύπαρξη 2.065 γονιδίων που αποτελούν τον πυρήνα του γονιδιώματος των ψευδομονάδων. Αποτέλεσμα της ίδιας έρευνας ήταν η ταυτοποίηση 1.002 γονιδίων, μοναδικών στο γονιδίωμα της *P.entomophila* (Vodovar et al., 2006).

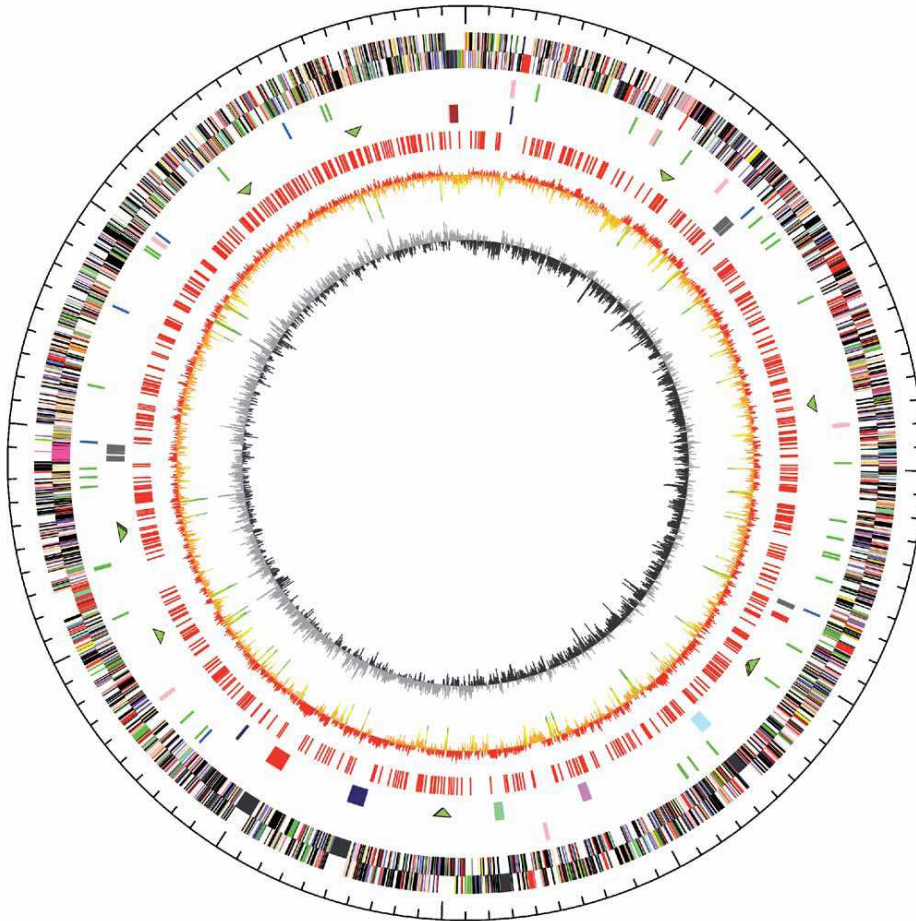
Η αλληλούχιση του γονιδιώματος έδειξε πως περίπου το 70% των γονιδίων της *P.entomophila* έχουν ορθολογία του στην *P.putida*, φανερώνοντας στενή συγγενική σχέση μεταξύ τους (Vodovar et al., 2006).

Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος της *P.entomophila*, συγκριτικά με τις άλλες ψευδομονάδες, δεν αποτελεί προϊόν εξελικτικής πίεσης, ειδικά αν ληφθεί υπ' όψιν ότι το γονιδίωμα της *P.entomophila* έχει δεχθεί παρεμβολές από γενετικά μεταθετά στοιχεία και βακτηριοφάγους στο μικρότερο βαθμό (Vodovar et al., 2006).

Για τη σημαντική παθογένεια που παρουσιάζει φαίνεται να ευθύνονται γονίδια που παράγουν εντομοκτόνες τοξίνες, αιμολυσίνες (εξωτοξίνες που διαρρηγνύουν μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων), λιπάσες, πρωτεάσες καθώς και πρωτεΐνες που

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

επιτρέπουν την προσκόλληση στον ξενιστή και την αποτελεσματική εγκαθίδρυση. (Vodovar et al., 2006).



Εικόνα 1.2.1. Το κυκλικό χρωμόσωμα που αποτελεί το γονιδίωμα του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila* με συνολικό μήκος 5.888.780 ζεύγη βάσεων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2.2 Μεταβολισμός

Το γονιδίωμα της *P.entomophila* κωδικοποιεί τα βασικά μεταβολικά μονοπάτια που συναντώνται στο γένος *Pseudomonas*, όπως το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης, το μονοπάτι Entner-Doudoroff και τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (Vodovar et al., 2006).

Επίσης, περιλαμβάνει και γονίδια που συμμετέχουν σε υδρολυτικές διαδικασίες, όπως πιθανότατα στην αποικοδόμηση πολυμερών του συναντώνται στο εδάφος. Σε αντίθεση με άλλα φυτοπαθογόνα στελέχη, η *P.entomophila* στερείται γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ικανά να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, γεγονός αναμενόμενο, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο είδος δεν είναι παθογόνο για τα φυτά (Vodovar et al., 2006).

1.2.3 Οικολογία

Οι μεταβολικές δυνατότητες του βακτηρίου (όπως προκύπτουν από τη μελέτη του γονιδιώματός του) επιτρέπουν την εύκολη προσαρμογή του σε ποικίλα περιβάλλοντα όπως το έδαφος, τη ριζόσφαιρα ή ακόμη και το νερό (Vodovar et al., 2006).

1.2.4 Παθογένεια

Η *P.entomophila* εμφανίζει υψηλή παθογένεια για τη *Drosophila melanogaster*, στα ενήλικα άτομα αλλά και στις προνύμφες. Παρά την επαγωγή του ανοσοβιολογικού συστήματος της τελευταίας, φαίνεται πως η *P.entomophila* έχει αναπτύξει ειδικές στρατηγικές δράσης για να αποφεύγει την ανοσολογική απόκριση του εντόμου.

Τα τελευταία χρόνια η *Drosophila* έχει εξελιχθεί σε ένα άριστο μοντέλο μελέτης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ξενιστή και του παθογόνου μικροοργανισμού (Schneider, 2000; Vodovar et al., 2004). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του συστήματος της *Drosophila*, είναι η ύπαρξη πολλαπλών αμυντικών μηχανισμών που συναντώνται και σε ανώτερους οργανισμούς (Tzou et al., 2002; Hultmark, 2003; Ha et al., 2005). Σ' αυτούς περιλαμβάνονται φυσικοί φραγμοί, τοπική και συστηματική

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ανοσολογική απόκριση. Στη συντονισμένη άμυνα έναντι των μικροοργανισμών συμμετέχουν και αρκετοί ιστοί (Liehl et al., 2006).

Αρχικά, στην πρώτη γραμμή της άμυνας βρίσκονται η στοματική κοιλότητα και η τραχεία, όπου παράγονται αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs). Στη συνέχεια, εξειδικευμένα αιμοκύτταρα προχωρούν σε εγκόλπωση και φαγοκύττωση των εισβολέων. Τέλος, το λιπαρό σώμα, που είναι λειτουργικά αντίστοιχο του συκωτιού των θηλαστικών, είναι η περιοχή όπου λαμβάνει χώρα η χυμική ανοσία (Liehl et al., 2006).

Η *P. entomophila*, μπορεί να προκαλέσει και συστηματική αλλά και τοπική ανοσοαπόκριση προκαλώντας το θάνατο και σε προνύμφες ύστερα από στοματική μόλυνση (εικ.1.2.4). Η παραμονή της στις προνύμφες προκαλεί μαζική καταστροφή των κυττάρων του εντέρου (Vodovar et al., 2005).

Αν και παθογόνος οργανισμός, στερείται εκκριτικό σύστημα τύπου III, καθώς και όλες τις συσχετιζόμενες τοξίνες, με αποτέλεσμα να βασίζει την εντομοπαθογένειά της σε ένα αριθμό πιθανολογούμενων παθογόνων παραγόντων, όπως εντομοκτόνες τοξίνες, πρωτεάσες, αιμολυσίνες, υδροκυάνιο και άλλους νέους δευτερογενείς μεταβολίτες (Vodovar et al., 2006).

Μελέτες απέδειξαν πως η παθογένεια του βακτηρίου είναι πολυπαραγοντική και μάλιστα φαίνεται πως παράγοντες που ενεργοποιούν την απόκριση διακρίνονται από εκείνους που προάγουν την παθογένεια. Μεταλλαξιγένεση (με χρήση μεταθετών γενετικών στοιχείων, όπως το τρασποζόνιο) οδήγησε στην αναγνώριση αρκετών ρυθμιστικών γονιδίων, απαραίτητων για την προσβολή και το θάνατο της *Drosophila* (Liehl et al., 2006).



Εικόνα 1.2.4. Προνύμφη στο έντερο της οποίας διακρίνεται το βακτήριο *Pseudomonas entomophila*, ύστερα από σήμανση με GFP

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το υδροκυάνιο αποτελεί έναν από τους πιθανούς παθογόνους παράγοντες στους οποίους βασίζει την εντομοπαθογένειά της η *P.entomophila*. Λίγα μόνο βακτηριακά είδη είναι γνωστά που να παράγουν και να εκκρίνουν υδροκυάνιο (HCN).

Το HCN αποτελεί ισχυρό αναστολέα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και αρκετών άλλων μεταλλοενζύμων. Χαρακτηρίζεται γενικά σαν δευτερογενής μεταβολίτης, καθώς δε φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό των βακτηρίων που το εκκρίνουν. Το HCN έχει τοξική δράση και τα βακτηριακά στελέχη που το εκκρίνουν διαθέτουν μηχανισμούς ώστε να προστατεύονται από αυτή. Βασικό μηχανισμό αυτοπροστασίας αποτελεί η μη ευαίσθητη οξειδάση του υδροκυανίου (CIO). Η παραγωγή της οξειδάσης αυτής επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων υδροκυανίου (Zlosnik et al., 2006; Cooper et al., 2003).

Το HCN παράγεται με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της γλυκίνης, με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση του HCN. Η συνθάση του HCN κωδικοποιείται από την ομάδα γονιδίων *hcnABC* (Blumer and Haas, 2000; Zlosnik et al., 2006).

Ο βιολογικός ρόλος της παραγωγής υδροκυανίου στα βακτήρια δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος αλλά το πιθανότερο είναι ότι προσφέρει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων βακτηρίων και παίζει ρόλο στην αποκλειστικότητα των διαθέσιμων θρεπτικών, όπως συμβαίνει στην *P.fluorescens* (Haas and Defago, 2005).

Το γονιδίωμα της *P.entomophila* κωδικοποιεί γονίδια που ευθύνονται για τη παραγωγή της συνθάσης του υδροκυανίου (HCN). Έπειτα από ανάπτυξη τόσο σε υγρή όσο και στερεή καλλιέργεια, φαίνεται να παράγει HCN σε συγκεντρώσεις που αγγίζουν τα 40μmol/l, και η παραγωγή επηρεάζεται από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Ryall et al., 2009).

1.3 Σιδηροφόρα

Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για όλα σχεδόν τα βακτήρια. Έχει βασικό ρόλο τόσο ως συμπαράγοντας πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αναπνοή όσο και στην σύνθεση του RNA (Braun, 1997). Παρόλο που είναι ένα από τα στοιχεία που αφθονούν στον πλανήτη, σε ουδέτερο pH σχηματίζει αδιάλυτα υδροξείδια με αποτέλεσμα η διαθεσιμότητά του στα βακτήρια να είναι περιορισμένη (Neilands, 1995). Ενδεικτικά, η συγκέντρωση σιδήρου που απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη των βακτηρίων είναι 10^{-8} - 10^{-6} M. Ωστόσο, σε ουδέτερο pH, και κάτω από αερόβιες συνθήκες, αυτή μπορεί να φτάνει τα 10^{-17} - 10^{-18} M (Guerinot, 1994).

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει διάφορες μεθόδους προκειμένου να αντιμετωπίσουν τη μικρή βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου και να ικανοποιήσουν τις διατροφικές τους ανάγκες. Η πιο κοινή από αυτές είναι η παραγωγή ενός σιδηροφόρου, ενός δηλαδή χαμηλού μοριακού βάρους συμπλόκου που μπορεί να δεσμεύει τον σίδηρο (Neilands, 1995). Το σιδηροφόρο προσφέρει στον μικροοργανισμό που το παράγει την ποσότητα σιδήρου που χρειάζεται από το περιβάλλον του.

Τα σιδηροφόρα των βακτηρίων ταξινομούνται, ανάλογα με την κύρια χημική ομάδα τους που συμμετέχει στη σύνδεση με το σίδηρο, σε κατεχολικά, υδροξαμικά και καρβοξυλικά. Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί σιδηροφόρα που δεν ανήκουν αποκλειστικά σε κάποια από αυτές τις κατηγορίες. Όλα όμως τα σιδηροφόρα χαρακτηρίζονται από σταθερά σύνδεσης με το σίδηρο, που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αγγίζει το 10^{52} (όπως για παράδειγμα το κατεχολικό σιδηροφόρο εντεροβακτήνη) (Drechsel and Jung, 1998).

Η μεταφορά του σιδήρου από το σιδηροφόρο στα Gram αρνητικά βακτήρια απαιτεί την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου. Αυτοί οι υποδοχείς εκφράζονται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και το μοριακό τους βάρος είναι συνήθως 75-90kDa (Guerinot, 1994). Το σιδηροφόρο ή ο σίδηρος (Fe^{+++}) θα πρέπει να μεταφερθούν από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα διασχίζοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε αυτή τη διαδικασία λαμβάνουν μέρος πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για να συνδεθεί ο σίδηρος ή το σιδηροφόρο στους ειδικούς υποδοχείς, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν σαν κανάλι και φυσικά ATPάσες που θα προμηθεύσουν με την απαραίτητη για τη μεταφορά ενέργεια, υδρολύοντας ATP (Faraldo-Gomez and Sansom, 2003).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.3.1 Πυοβερδίνη

Η πυοβερδίνη είναι ένα κιτρινο-πράσινο φθορίζον σιδηροφόρο που παράγεται από τις φθορίζουσες ψευδομονάδες, όταν αυτές αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου (εικ.1.3.1). Παρουσιάζει υψηλή σταθερά σύνδεσης με το σίδηρο προσφέροντας έτσι ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στις ψευδομονάδες που την παράγουν (Ravel and Cornelis, 2003).

Αποτελείται από τρία δομικά μέρη:

- ένα εξελικτικά διατηρημένο χρωμοφόρο, που ευθύνεται για το φθορισμό,
- ένα πεπτιδικό βραχίονα από L- και D- αμινοξέα, που ποικίλει στις διάφορες πυοβερδίνες και
- ένα μικρό δικαρβοξυλικό οξύ συνδεδεμένο με την αμινομάδα του χρωμοφόρου (Budzikiewicz, 1997)

Η πυοβερδίνη περιλαμβάνει και κατεχόλες και υδροξαμικές ομάδες. Το χρωμοφόρο διαθέτει μια κατεχολική ομάδα, και ο πεπτιδικός βραχίονας διαθέτει δύο υδροξαμικές ομάδες. Στη σύνδεση του Fe^{3+} , συμμετέχουν από κοινού, τόσο το χρωμοφόρο όσο και ο πεπτιδικός βραχίονας (Budzikiewicz, 1997).

Τα γονίδια που συμμετέχουν στην πρόσληψη σιδήρου μέσω των σιδηροφόρων, επάγονται και καταστέλλονται σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα του σιδήρου. Μια διμερής πρωτεΐνη, η Fur (Ferric Uptake Regulator), δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας χάρις την εξαρτώμενη από το Fe^{2+} ικανότητά της να δεσμεύεται στους υποκινητές βιοσυνθετικών γονιδίων. Όταν η συγκέντρωση του σιδήρου στο εσωτερικό του κυττάρου αυξάνεται, η Fur συνδέεται με το Fe^{2+} και στη συνέχεια όλο το σύμπλοκο αναγνωρίζει και προσδένεται σε μια περιοχή του DNA, μήκους 19 βάσεων, που βρίσκεται κοντά στον προαγωγέα, εμποδίζοντας τη μεταγραφή (Escolar et al., 1999).

Αντίστοιχα, όταν το βακτήριο βρεθεί σε κατάσταση έλλειψης σιδήρου, το σίδηρο στο εσωτερικό του κυττάρου μειώνεται, οπότε και δε μπορεί να συμβεί καταστολή μέσω της πρωτεΐνης Fur, λόγω της αδυναμίας πρόσδεσης των ιόντων σιδήρου ως συμπάροντα. Επιπλέον, απαιτείται και θετική ρύθμιση για την παραγωγή πυοβερδίνης. Αυτή πραγματοποιείται με την έκφραση ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή και την πρόσδεσή του σε ειδική περιοχή του DNA (Mossialos and Amoutzias, 2007).

Η πρόσληψη σιδήρου μέσω της πυοβερδίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για την μολυσματικότητα της *P.aeruginosa*. In vivo επαγωγή των βιοσυνθετικών για την πυοβερδίνη γονιδίων προκάλεσε σε πειραματόζωα χρόνια μόλυνση των πνευμόνων και

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

σηψαιμία. (Handfield et al., 2000). Επιπλέον, μεταλλάγματα αρνητικά για την παραγωγή πυοβερδίνης έδειξαν έλλειψη ικανότητας μόλυνσης σε σύγκριση με αυτά του άγριου τύπου (Meyer et al., 1996).



Εικόνα 1.3.1. Αριστερά. Knock out μετάλλαξη ενός γονιδίου υπεύθυνου για τη βιοσύνθεση πυοβερδίνης, με αποτέλεσμα την απουσία φθορισμού σε UV **Δεξιά.** Παραγωγή της φθορίζουσας πυοβερδίνης από άγριου τύπου στελέχη σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.3.2 Δευτερεύοντα σιδηροφόρα

Η πυοβερδίνη είναι το κύριο σιδηροφόρο στις φθορίζουσες ψευδομονάδες. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί αρκετά δευτερεύοντα σιδηροφόρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρότερη συγγένεια με το σίδηρο. Σε αυτά περιλαμβάνονται η θειοκινολοβακτίνη, η πυοχελίνη, η ψευδομονίνη, η κορουγατίνη και η πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσα ορνικορουγατίνη (εικ.1.3.2) (Cox and Graham, 1979; Risse et al., 1998; Mercado-Blanco et al., 2001; Cornelis and Matthijs, 2002; Matthijs et al., 2007, 2008).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα δευτερεύοντα σιδηροφόρα παράγονται σε μικρότερες ποσότητες, συγκριτικά με την πυοβερδίνη, και ο βιολογικός τους ρόλος δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Εικάζεται πως κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, και απουσία πυοβερδίνης, τα δευτερεύοντα σιδηροφόρα μπορούν να προμηθεύουν το βακτήριο με επαρκείς ποσότητες σιδήρου αλλά να επιτελούν και άλλες διαφορετικές λειτουργίες, πέραν αυτής. Η απομόνωση και μελέτη πολλών από αυτά έγινε έπειτα από δημιουργία αρνητικών για την πυοβερδίνη μεταλλάγματων. Τα μεταλλάγματα δεν παρήγαγαν πυοβερδίνη και παρόλα αυτά αναπτύσσονταν σε θρεπτικά μέσα όπου ο σίδηρος βρισκόταν σε περιορισμένη ποσότητα. Στα δευτερεύοντα σιδηροφόρα ανήκουν επίσης η κινολοβακτίνη και η PDIC (πυριδίνη-2, 6-δισ θειοκαρβοξυλικό οξύ) (Mossialos and Amoutzias, 2007).

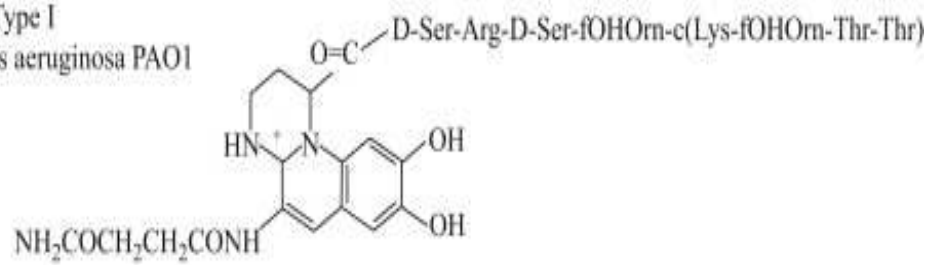
Η αλληλούχιση του γονιδιώματος της *P.entomophila* έδειξε ότι αυτή παράγει δύο σιδηροφόρα, ένα μοναδικό, από άποψη δομής, σιδηροφόρο, την πυοβερδίνη, και ένα άλλο που έχει ήδη περιγραφεί στη *Pseudomonas fluorescens*, την ψευδομονίνη (Matthijs et al., 2009).

Ένα γνώρισμα που κάνει τις φθορίζουσες ψευδομονάδες ιδιαίτερα ανταγωνιστικές για το σίδηρο, είναι η ικανότητά τους να χρησιμοποιούν σύμπλοκα σιδήρου από διάφορα σιδηροφόρα, εκκρινόμενα από άλλους μικροοργανισμούς γενικότερα, ανάμεσά τους βακτήρια και μύκητες (Poole et al., 1990; Jurkevitch et al., 1992; Meyer, 1992; Raaijmakers et al., 1995).

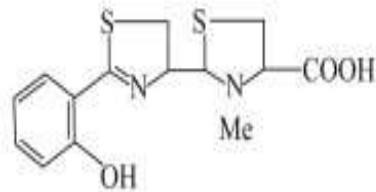
Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν τη δυνατότητα της *P.entomophila* να εκμεταλλεύεται μια ποικιλία από διαφορετικές πυοβερδίνες, εκκρινόμενες από άλλα είδη *Pseudomonas* (Matthijs et al., 2009).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Pyoverdine Type I
Pseudomonas aeruginosa PAO1



Pyochelin



Εικόνα 1.3.2. Χημική δομή της πυοβερδίνης και της πυοχελίνης
(Mossialos and Amoutzias, 2009)

1.4 Βιοφιλμ

Ένα χαρακτηριστικό που δίνει επιπλέον κίνητρο για τη μελέτη της *P.entomophila* είναι η ικανότητα σχηματισμού βιοφιλμ. Πρόκειται για έναν ή περισσότερους πληθυσμούς, που προσκολλώνται σε επιφάνειες σχηματίζοντας μια δομή, αντί να βρίσκονται στο περιβάλλον ως πλαγκτονικά κύτταρα. Στην πραγματικότητα οι πληθυσμοί που σχηματίζουν τα βιοφιλμ διαφέρουν από τους αντίστοιχους πλαγκτονικούς του ίδιου είδους σε γονιδιακή έκφραση, κυτταρική φυσιολογία και αυξημένη αντίσταση σε αντιβιοτικά (Hoyle and Costerton, 1991; Costerton et al., 1995).

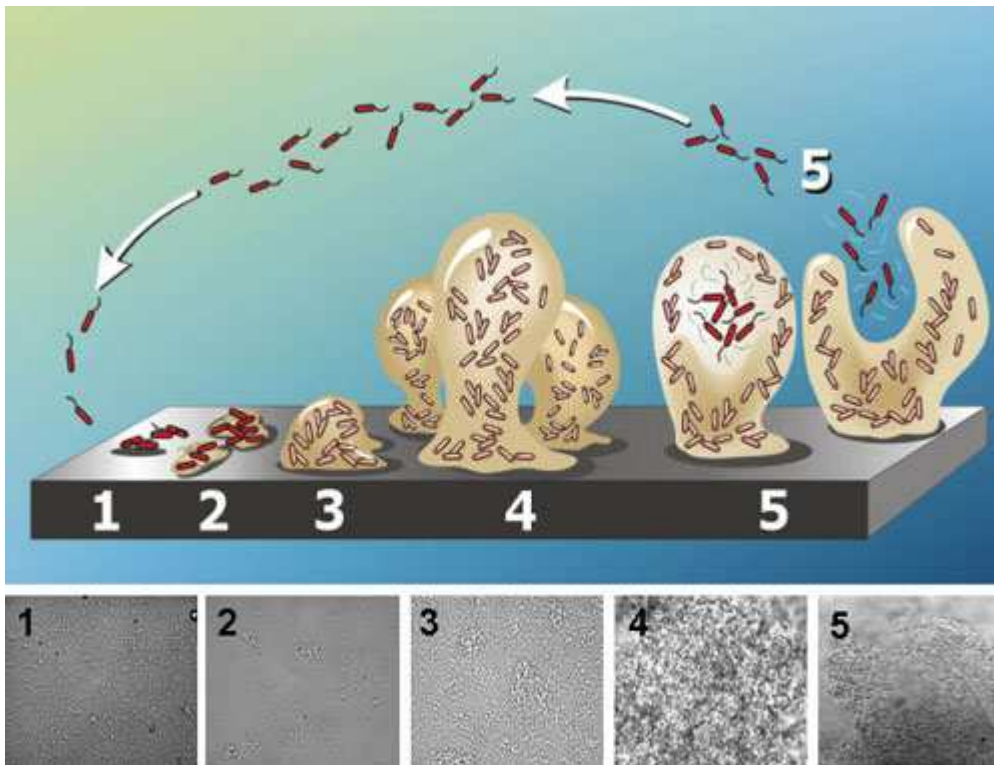
Η ανάπτυξη των βιοφιλμ ξεκινά όταν βακτήρια αλλάζουν τρόπο ζωής αποφασίζοντας να εγκαταλείψουν την πλαγκτονική ύπαρξη και να προσκολληθούν σταθερά σε αβιοτικές ή βιοτικές επιφάνειες (εικ.1.4.α). Αυτή η αλλαγή του τρόπου ζωής φαίνεται να ρυθμίζεται κατά ένα μέρος και από το επίπεδο των θρεπτικών στο περιβάλλον (Wimpenny and Colasanti, 1997). Μετά την αρχική προσκόλληση στο υπόστρωμα, τα κύτταρα πιστεύεται πως υπόκεινται σε ένα πρόγραμμα αλλαγών της φυσιολογίας τους, που οδηγεί σταδιακά σε υψηλά δομημένες, λείες μικροβιακές κοινότητες (O'Toole et al., 1998).

Το μοτίβο σχηματισμού των βιοφιλμ επιτρέπει στα κύτταρα να τοποθετούνται σε ευνοϊκή θέση μπροστά σε μια μεταβολή των θρεπτικών συστατικών και οδηγεί στην κατασκευή και διατήρηση διακριτών υποπληθυσμών (εικ.1.4.β), που μπορούν και επιβιώνουν εν όψει μιας περιβαλλοντικής αναταραχής (Parsek and Tolker-Nielsen, 2008).

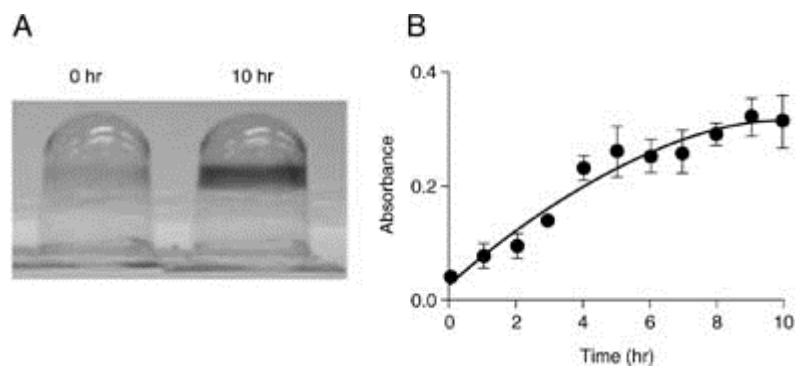
Από τα πιο αξιοπρόσεχτα χαρακτηριστικά των βιοφιλμ, εκτός από την αυξημένη αντίσταση σε αντιβιοτικά, είναι και η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων εξωκυττάρων πολυσακχαριτών. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται το πρώτο, δεν είναι ακόμη κατανοητός (Costerton et al., 1995).

Η ικανότητα των παθογόνων βακτηρίων να σχηματίζουν βιοφιλμ στη κυστική ίνωση (CF) των πνευμόνων συμβάλλει περαιτέρω στην αντίσταση κατά των αντιβιοτικών (Caraher et al., 2007; Hill et al., 2005).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.4.α. Απεικόνιση της εναλλαγής των βακτηριακών κυττάρων από την πλαγκτονική τους κατάσταση σε βιοφιλμ, και το αντίστροφο.



Εικόνα 1.5.6. Α. Βακτήρια που έχουν προσκολληθεί στη γυάλινη επιφάνεια και έχουν δημιουργήσει βιοφιλμ γίνονται ορατά ύστερα από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες.

Β. Ποσοτικοποίηση των κυττάρων αυτών με επαναδιάλυση της χρωστικής σε αιθανόλη και μέτρηση της οπτικής απορρόφηση στα 600nm. (Meritt et al., 2005)

1.5 Γονιδιωματική βιβλιοθήκη

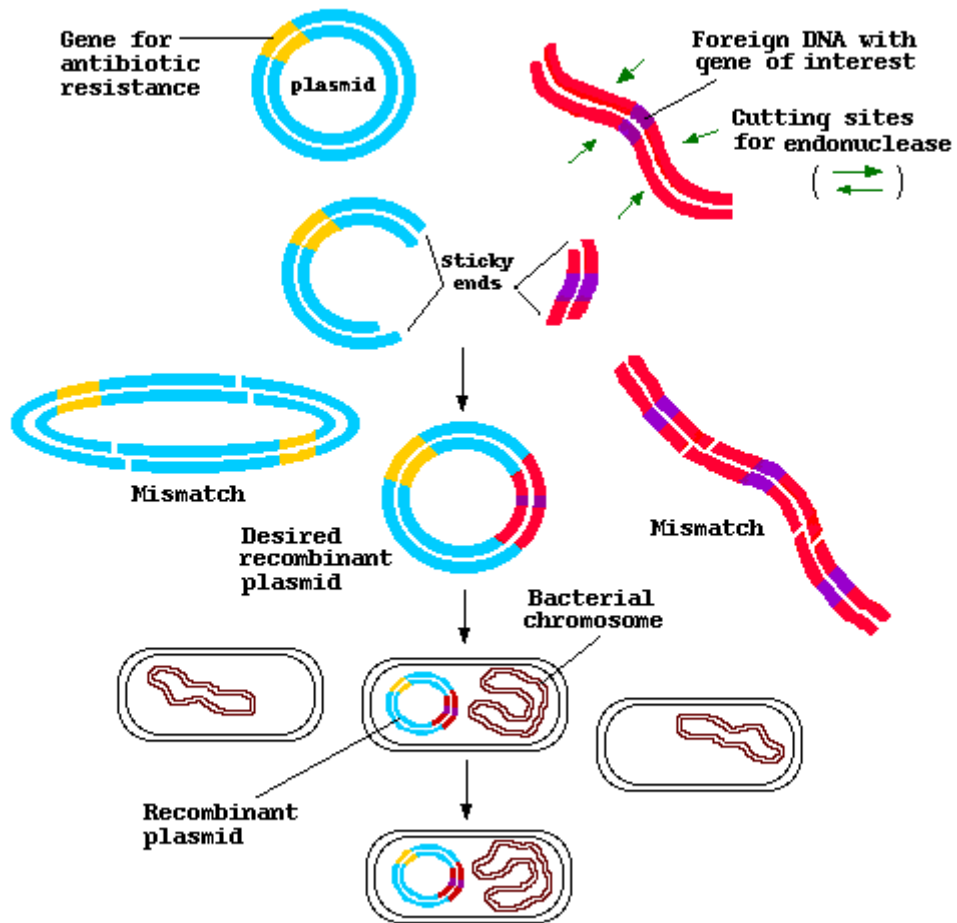
1.5.1 Γενικά

Με τον όρο γονιδιωματική βιβλιοθήκη αναφερόμαστε στο σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού, τμηματοποιημένο και κλωνοποιημένο σε κατάλληλους φορείς, που στη συνέχεια εισάγονται σε βακτήρια (εικ.1.6.1)

Συγκεκριμένα, τμήματα ευκαρυωτικού DNA πέπτονται με ένζυμο περιορισμού και συνδέονται *in vitro* σε φορείς που μπορούν να πακεταριστούν μέσα σε μόρια βακτηριοφάγου λ. Οι βακτηριοφάγοι που προκύπτουν, λειτουργούν σαν Δούρειοι Ίπποι που εισάγουν αποτελεσματικά το ανασυνδυσμένο DNA μέσα στα βακτήρια. Το ανασυνδυσμένο DNA μπορεί να πολλαπλασιάζεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA σαν μεγάλο μοριακού βάρους πλασμίδιο (Molecular Cloning 3rd Edition, Sambrook and Russel, 2001). Η επιλογή του μετασχηματισμένου βακτηριακού κλώνου γίνεται συνήθως εξαιτίας της ανθεκτικότητάς του σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, ιδιότητα που οφείλεται σε γονίδιο του φορέα κλωνοποίησης.

Τέλος, απαραίτητη διαδικασία αποτελεί η δημιουργία και η σήμανση κατάλληλων ανιχνευτών για την διαλογή των βιβλιοθηκών, την επιλογή δηλαδή του συγκεκριμένου γονιδίου ή απλώς ενός τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.6.1. Απεικόνιση της δημιουργίας μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με τη χρήση πλασμιδίου ως φορέα κλωνοποίησης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.5.2 Φορείς

Για την κατασκευή μιας DNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιούνται διάφοροι φορείς, ανάμεσά τους πλασμίδια, κοσμίδια και βακτηριοφάγοι λ.

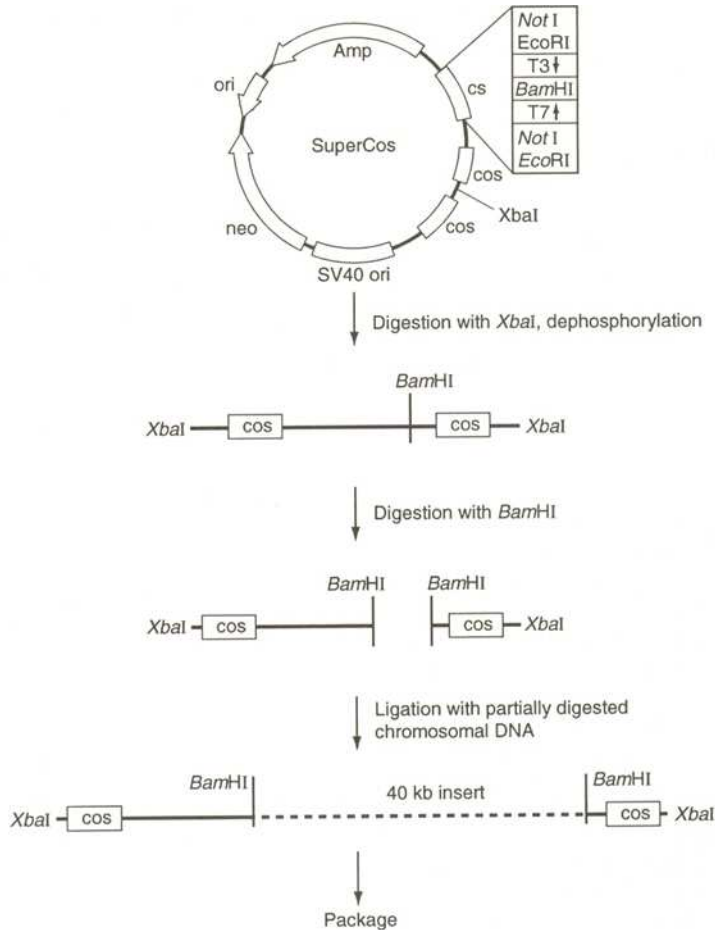
Το πλασμίδιο μπορεί να δεχθεί ένθεμα μέχρι 10kb. Όμως, ο αριθμός των διακριτών κλώνων που αποφέρει η κλωνοποίηση σε πλασμίδια είναι μικρός, λόγω της σχετικά μειωμένης ικανότητας μετασχηματισμού του *E.coli*, αλλά και του μικρού αριθμού των διακριτών αποικιών που προκύπτουν και μπορούν να απομονωθούν από το τριβλίο, με αποτέλεσμα να το καθιστούν μάλλον δεύτερη επιλογή ως φορέα κλωνοποίησης (Gene Cloning, Principles and Applications, p.93-99, Lodge et al., 2007).

Όσον αφορά το βακτηριοφάγο λ, το βασικό πλεονέκτημα της χρήσης του είναι ότι αυτός προσβάλλει τα βακτήρια ξενιστές ενεργά και έτσι το DNA του εισάγεται μέσα στα κύτταρα με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα απ' ό,τι με κάποια χημική μέθοδο. Ωστόσο, πριν τη χρήση του ως φορέας κλωνοποίησης θα πρέπει να τροποποιηθεί για να μπορεί να δεχθεί ένθεμα και αυτό δε μπορεί να ξεπερνά το 5% του φυσιολογικού γονιδιώματος του φάγου. Με διάφορες τεχνικές κατά τις οποίες αποκόπτονται μη απαραίτητες περιοχές, ο βακτηριοφάγος λ μπορεί τελικά να δεχθεί τμήμα DNA που να φτάνει τις 25kb. Χάρη τις *cos* αλληλουχίες το γονιδίωμα του φάγου μπορεί να εισέλθει στο άδειο καψίδιο, μια διαδικασία που ονομάζεται πακετάρισμα. (Gene Cloning, Principles and Applications, p.93-99, Lodge et al., 2007).

Το κοσμίδιο είναι ένας τύπος φορέα που συνδυάζει χαρακτηριστικά και από τους δύο φορείς που περιγράφηκαν προηγουμένως. Προσφέρει μεγάλη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού, όπως και ο φάγος λ, αλλά και την δυνατότητα να μεταφέρει μεγάλο ένθεμα, όπως το πλασμίδιο. Το βασικό βήμα για τη δημιουργία των κοσμιδίων ήταν η εκμετάλλευση των *cos* αλληλουχιών. Όπως προαναφέρθηκε, οποιαδήποτε αλληλουχία DNA μπορεί να πακεταριστεί *in vitro* αρκεί να υπάρχουν οι *cos* αλληλουχίες και να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον 50kb. Το κοσμίδιο δεν είναι κάτι περισσότερο από ένα πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί τμήμα βακτηριοφάγου λ που περιλαμβάνει και τις *cos* περιοχές. Οι *cos* περιοχές έχουν μέγεθος συνήθως 5-7kb. Ένα ανασυνδυασμένο κοσμίδιο δε μπορεί να ενσωματώσει ξένο DNA μικρότερο από 28kb ή μεγαλύτερο από 45kb. Τμήματα DNA αυτών των μεγεθών προκύπτουν μετά από μερική πέψη υψηλού μοριακού βάρους χρωμοσωμικό DNA με ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει αλληλουχίες που βρίσκονται περίπου κάθε 4kb

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

και αφήνει κολλώδη τελικά άκρα. Η δυνατότητά του κοσμιδίου να δέχεται μεγάλο ένθεμα και να μετασχηματίζει αποτελεσματικά τα βακτήρια ξενιστές, δικαιολογεί το γεγονός ότι χρησιμοποιείται εκτεταμένα ως φορέας κλωνοποίησης στην κατασκευή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών (εικ.1.6.2) (Gene Cloning, Principles and Applications, p.93-99, Lodge et al., 2007).



Εικόνα 1.5.2. Το κοσμίδιο σαν φορέας κλωνοποίησης. Το κοσμίδιο κόβεται με κάποιο ένζυμο περιορισμού στο σημείο πολλαπλής κοπής και γίνεται γραμμικό. Στη συνέχεια, και με τη βοήθεια μίας λιγάσης, ενώνεται, λόγω συμπληρωματικότητας, με τμήμα χρωμοσωμικού DNA που έχει υποστεί μερική πέψη από το ίδιο ένζυμο. Το κοσμίδιο, με το ενσωματωμένο πλέον τμήμα χρωμοσωμικού DNA, πακετάρεται σε καψίδιο βακτηριοφάγου, χάρις την ύπαρξη των *cos* αλληλουχιών.

1.5.3 Χρησιμότητα γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Με τον όρο γονιδιωματική βιβλιοθήκη αναφερόμαστε στο σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν όλο το DNA ενός οργανισμού. Περιέχει ολόκληρη την ποσότητα του γενετικού υλικού (π.χ. υποκινητές, τμήματα γονιδίων, αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, junk DNA κ.ά.). Έτσι, μας δίνεται το πλεονέκτημα απομόνωσης και μελέτης των παραπάνω αλληλουχιών ή τμημάτων που μας ενδιαφέρουν (με τη χρήση ανιχνευτών).

Ο βασικός λοιπόν λόγος για να κατασκευαστεί μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη είναι γιατί αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, δεδομένου ότι ανά πάσα στιγμή μπορεί να επιλεγεί ο κλώνος που περιέχει το γονίδιο ή τα γονίδια που χρειάζεται να μελετηθούν.

Ασφαλώς και παρουσιάζει μεγαλύτερη χρησιμότητα σαν εργαλείο για έναν προκαρυωτικό οργανισμό, καθώς ο τελευταίος έχει μικρό σχετικά μέγεθος γονιδιώματος και στερείται εσωνίων (Gene Cloning, Principles and Applications, p.92-93, Lodge et al., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, ήταν το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli*, που περιέχει το κοσμίδιο **pRG930-Cm^R**, και το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas entomophila* L48. Επίσης, για τη δημιουργία μεταλλαγμάτων της *P.entomophila*, με τη χρήση τρανσποζονίου (βλέπε 2.9 μεταλλαξιγένεση), χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *E.coli S17lambdaPir*, με το πλασμίδιο **pUT-miniTn5-Tc**, και το *E.coli S17lambdaPir*, που στερούνταν πλασμιδίου.

Το κοσμίδιο **pRG930-Cm^R** προσδίδει ανθεκτικότητα, για τα βακτήρια που το διαθέτουν, στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (**Sm**) και χλωραμφενικόλη (**Cm**) σε συγκεντρώσεις 25μg/ml και 50μg/ml, αντίστοιχα. Ομοίως, το πλασμίδιο **pUT-miniTn5-Tc** προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (**Tc**) σε συγκέντρωση, για το *E.coli S17lambdaPir*, 15μg/ml (πίνακας 1).

Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα LB agar (Luria Bertani). Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* αναπτύχθηκε σε τριβλία που περιείχαν μόνο άγαρ και στους 30°C, ενώ το βακτήριο *Escherichia coli* με το κοσμίδιο pRG930-Cm^R, σε τριβλία με αντιβιοτικά Sm και Cm, στους 37°C. Η παρουσία των αντιβιοτικών στο τελευταίο ήταν απαραίτητη για την επιλογή του κοσμιδίου. Αντίστοιχα, το βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir* με το πλασμίδιο pUT-miniTn5-Tc, αναπτύχθηκε στους 37°C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε και το αντιβιοτικό Tc για επιλογή του πλασμιδίου.

Τέλος, για υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό LB Broth, με τις ανάλογες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, όταν αυτό ήταν απαραίτητο, και στις ανάλογες θερμοκρασίες. Να σημειωθεί επίσης ότι τα αντιβιοτικά Sm και Cm διατηρούνται στους -20°C σε stock γλυκερόλης, σε συγκεντρώσεις 25mg/ml και 50mg/ml αντίστοιχα, ενώ η Tc σε συγκέντρωση 20mg/ml.

Στο σημείο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθεί ότι τα θρεπτικά μέσα αλλά και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία της καλλιέργειας των μικροοργανισμών ήταν **αποστειρωμένα**. Η αποστείρωση έγινε με υγρή θέρμανση (σε αυτόκαυστο) σε θερμοκρασίες που άγγιζαν τους 121°C. Το θρεπτικό υλικό

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για περίπου 20 λεπτά και αφού κρυώσει αρκετά, μετά προστίθενται τα αντιβιοτικά.

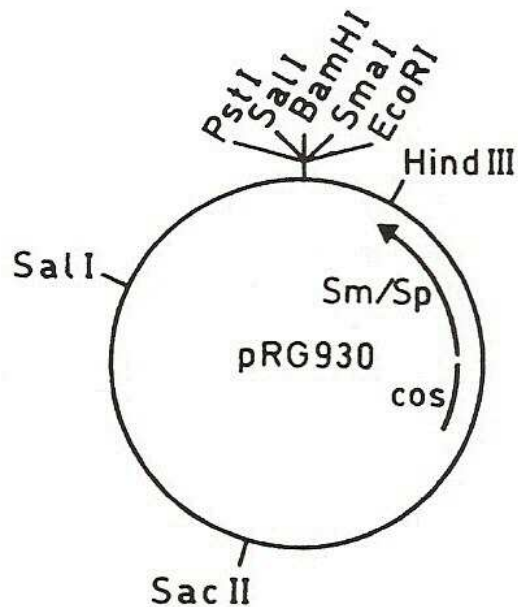
Η αποστείρωση είναι πολύ σημαντική διαδικασία και γίνεται για να μην υπάρχουν επιμολύνσεις από άλλους μικροοργανισμούς. Σε αυτό συμβάλλει και η εργασία σε ασηπτικό περιβάλλον. Όταν δεν είναι εφικτό να δουλεύουμε σε θάλαμο νηματικής ροής, ο πάγκος καθαρίζεται σχολαστικά με οινόπνευμα, το ίδιο και τα χέρια μας αλλά και όλες οι εργασίες γίνονται με αναμμένο καμινέτο και σε κοντινή απόσταση από αυτό.

Πίνακας 1

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ANTIBIOTIKA
<i>E.coli</i> (με το κοσμίδιο pRG930-Cm^R)	37°C	25µg/ml Sm και 50µg/ml Cm
<i>E.coli S17lambdaPir</i> (με το pUT-miniTn5-Tc)	37°C	15µg/ml Tc
<i>E.coli S17lambdaPir</i>	37°C	-
<i>Pseudomonas entomophila L48</i>	30°C	-

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την δημιουργία της DNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το τεχνητά κατασκευασμένο κοσμίδιο **pRG930-Cm^R** (εικ.2.1). Έχει μέγεθος 16.1 kb και περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού EcoRI, BamHI, PstI, SmaI, HindIII και SacII. Η παρουσία του στο βακτήριο προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (**Sm**) και χλωραμφενικόλη (**Cm**) όταν αυτά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 25μg/ml και 50μg/ml, αντίστοιχα. Το κοσμίδιο (εικ.2.1) περιέχονταν στο βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* (*E.coli*).



Εικόνα 2.1. Το τεχνητά κατασκευασμένο κοσμίδιο pRG930-Cm^R (Van den Eede, 1992)

2.2 Απομόνωση του κοσμιδίου pRG930-Cm^R από το *E.coli*

Για την απομόνωση του κοσμιδίου από το βακτήριο *E.coli* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Nucleospin (εταιρεία MACHEREY-NAGEL), που αφορά την απομόνωση μικρών αντιγράφων πλασμιδίων και κοσμιδίων.

Η διαδικασία περιλαμβάνει φυγοκέντρηση υγρής καλλιέργειας βακτηρίων και μια σειρά από προσθήκες διαφορετικών buffer με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις, που σαν αποτέλεσμα έχουν να σπάσουν τις μεμβράνες του βακτηριακού κυττάρου και να προσφέρουν σε καθαρή μορφή το πλασμιδιακό (κοσμιδιακό στην περίπτωση μας) DNA.

2.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το βακτήριο *P.entomophila*

Για την κατασκευή της βιβλιοθήκης ήταν απαραίτητη και η απομόνωση όλου του χρωμοσωμικού DNA της *P.entomophila*. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Puregene Yeast/Bact. Kit A της QIAGEN που αφορά την απομόνωση DNA από Gram αρνητικά βακτήρια. Η διαδικασία περιλαμβάνει λύση των κυττάρων, δράση με RNάση, τοποθέτηση του διαλύματος στον πάγο για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και υδρόλυση του DNA.

Ωστόσο, η ποσότητα του DNA που πήραμε δεν ήταν ικανοποιητική και για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε ένα διαφορετικό πρωτόκολλο (Ausubel et al., 1996) με προετοιμασία μιας μεγάλης καλλιέργειας και απομόνωση εκ νέου.

Η διαδικασία περιλάμβανε overnight 100ml υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, φυγοκέντρηση και προσθήκη TE (Tris EDTA), SDS και πρωτεϊνάσης K. Επώαση στους 55°C-60°C για μία ώρα και προσθήκη NaCl και CTAB. Στη συνέχεια επώαση για 20 λεπτά πριν προστεθεί χλωροφόρμιο και ισοπροπανόλη. Το χρωμοσωμικό DNA ξεπλένεται με αλκοόλη και διαλύεται σε αποστειρωμένο νερό.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την απομόνωση τόσο του κοσμιδίου pRG930-Cm^R όσο και του χρωμοσωμικού DNA, απαραίτητο βήμα είναι η **ηλεκτροφόρηση** των δειγμάτων, αφενός μεν για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη και καθαρή απομόνωση του DNA και αφετέρου να γίνει μια ποσοτική εκτίμηση του DNA που έχουμε στην κατοχή μας.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα του αρνητικά φορτισμένου (λόγω των φωσφορικών ομάδων) DNA να κινείται προς τον θετικό πόλο, όταν βρεθεί μέσα σε ένα μέσο που ασκείται ηλεκτρικό πεδίο. Στους πόλους της ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης (tank) τοποθετούνται ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται τάση ηλεκτρικού ρεύματος, με αποτέλεσμα διαφορετικά τμήματα DNA να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα, συναρτήσει του μήκους τους, του φορτίου τους και του σχήματός τους. Τα μικρά τμήματα γενικά κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα (εικ.2.4) (Recombinant DNA, 3rd ed., Watson et al., 2007).

Το μέσο στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται ανθεκτικά υλικά, συνήθως χάρτινα φίλτρα και πηκτώματα που αποτελούνται από πολυμερή, όπως η αγαρόζη ή η πολυακρυλαμίδη. Τα τμήματα DNA με μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν αποτελεσματικά σε ένα πήκτωμα με συγκέντρωση αγαρόζης 1%, εφόσον το μέγεθος των τμημάτων αυτών διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Όταν είναι απαραίτητο να διαχωριστούν μεταξύ τους μικρά τμήματα (δεκάδων έως εκατοντάδων ζευγών βάσεων) που διαφέρουν ακόμη και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο, είναι απαραίτητη η χρήση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που προσδένεται στο DNA και έτσι επιτυγχάνεται χρώση των τμημάτων ενόσω αυτά βρίσκονται στο πήκτωμα. Εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους.

Ένα από τα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα της ηλεκτροφόρησης είναι ότι τα μόρια του DNA που μετακινούνται μέσα στα πηκτώματα αυτά διατηρούνται άθικτα και είναι δυνατό να ανακτηθούν και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.

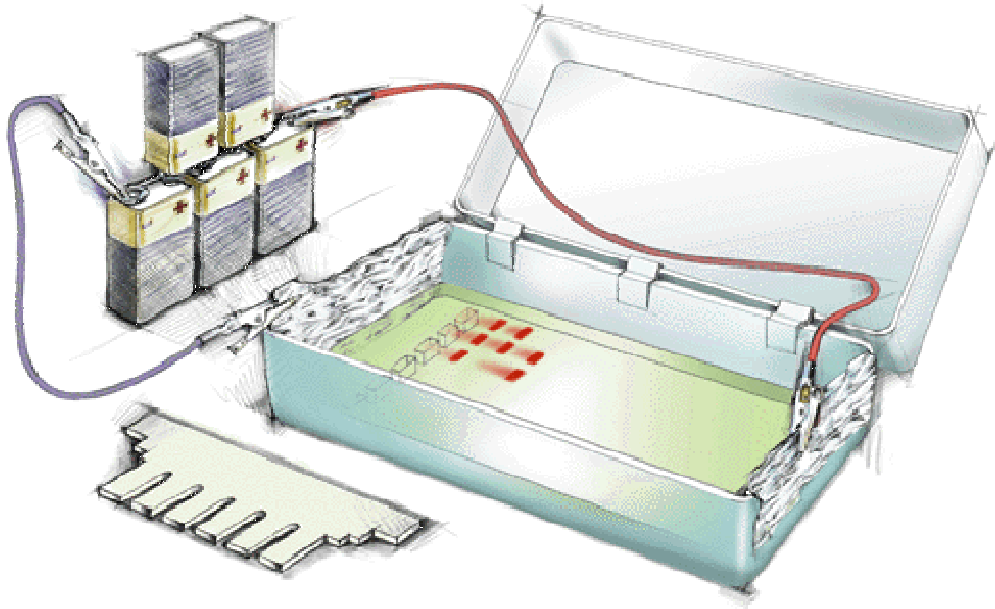
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις ανάγκες του πειράματος η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε gel με συγκέντρωση 0,8% αγαρόζη. Για το gel με 0,8% αγαρόζη διαλυμένη στα 100ml, προστίθενται 0,8gr αγαρόζη, 90ml απιονισμένο νερό και 10ml TBE (σύνολο 100ml).

Το βρωμιούχο αιθίδιο βρίσκεται σε συγκέντρωση stock 10mg/ml. Η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να είναι 1μg/ml. Άρα προστίθονται 10μl βρωμιούχο αιθίδιο. Έτσι προκύπτει ο συντελεστής αραίωσης για το βρωμιούχο αιθίδιο 1:10000.

Στο tank της ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται 700 ml running buffer (70ml TBE και 630ml απιονισμένο νερό). Το TBE (Tris-Boric acid-EDTA) που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας BioRad Ltd.

Στα πηγαδάκια, φορτώνεται στο πρώτο το ladder και μετά 4μl από το DNA και 1μl από το loading buffer. Το ladder που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο είναι το 2-Log DNA ladder της εταιρείας New England Biolabs. Μετά από ηλεκτροφόρηση δίνει ζωνώσεις με μεγέθη 0,1-10,0kb. Το ladder θα επιβεβαιώσει ότι οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν σωστές αλλά και θα βοηθήσει στον υπολογισμό από τα μοριακά βάρη των κομματιών μας, ενώ το loading buffer (5x της BioRad) χρησιμοποιείται για να οπτικοποιήσει το διάλυμα (DNA) που θα φορτώσουμε αλλά και για να το κάνει πιο βαρύ και άρα πιο εύκολο να παραμείνει στα πηγαδάκια. Το loading buffer περιέχει δύο χρωστικές, κυανό του ξυλενίου και μπλε της βρωμοφαινόλης.



Εικόνα 2.4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το ειδικό «χτενάκι» τοποθετείται πριν πήξει η αгарόζη για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια. Το αρνητικά φορτισμένου DNA κινείται προς τον θετικό πόλο, όταν βρεθεί μέσα σε ένα μέσο που ασκείται ηλεκτρικό πεδίο

2.5 Μερική πέψη χρωμοσωμικού DNA

Η μερική πέψη του χρωμοσωμικού DNA της *P.entomophila* γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις του ενζύμου. Χρησιμοποιείται ένζυμο που να αναγνωρίζει και να κόβει το κοσμίδιο μία και μόνο φορά, στο σημείο πολλαπλής κοπής από ένζυμα.

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το **PstI**, FastDigest της εταιρείας Fermentas και ήταν σε συγκέντρωση 10u/μl.

Το ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει, όπου συναντά, την παρακάτω αλληλουχία στο σημείο που υποδεικνύουν τα βέλη:

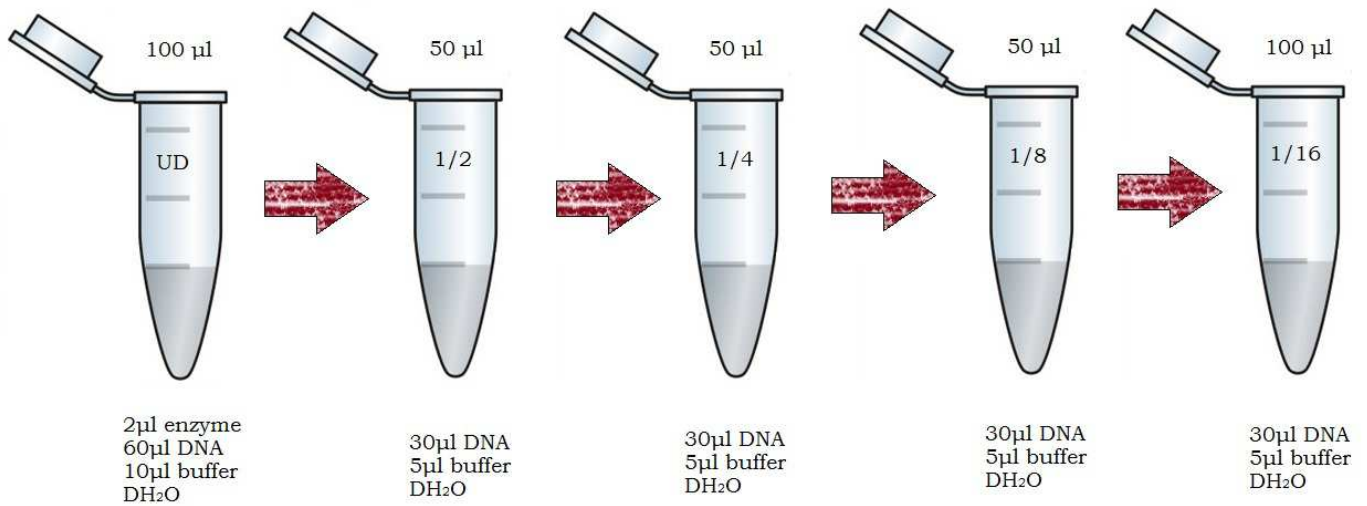


Η αραιώση έγινε με 5 δείγματα. Ξεκινώντας από το πρώτο, σε αυτό περιέχονταν, 20 units του ενζύμου, 60μl DNA, 10μl buffer και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100μl. Τα υπόλοιπα τέσσερα δείγματα περιείχαν 30μl DNA, 5μl buffer και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 50μl. Μόνο το πρώτο δείγμα περιείχε το ένζυμο και από αυτό, μετά από μια σύντομη ανάδευση με την πιπέτα, πήραμε 50μl και τα μεταφέραμε στο δεύτερο δείγμα. Μετά από σύντομο πιπετάρισμα, 50μl από το δεύτερο δείγμα μεταφέρθηκαν στο τρίτο. Από το τρίτο 50μl μεταφέρθηκαν στο τέταρτο, και το ίδιο από το τέταρτο στο πέμπτο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η αραιώση του ενζύμου να έχει ως εξής: στο πρώτο δείγμα ήταν μηδενική, στο δεύτερο ήταν 1/2, στο τρίτο 1/4, στο τέταρτο 1/8 και στο πέμπτο 1/16 (εικ.2.5).

Αφήνεται το ένζυμο να δράσει για 30 λεπτά στους 37°C (fast digest) και έπειτα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65°C για περίπου 20-25 λεπτά. Το ένζυμο με αυτό τον τρόπο αδρανοποιείται και σταματάει να κόβει. Το χρωμοσωμικό DNA βρίσκεται τώρα σε κομμάτια διαφόρων μεγεθών.

Με το ίδιο ένζυμο κόβουμε και το κοσμίδιο. Αναμειγνύονται 20μl από το κοσμίδιο, 3μl buffer και 5μl dH₂O. Το ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει σε ένα μόνο σημείο του κοσμιδίου, οπότε και το κάνει γραμμικό. Αποθηκεύεται στους -20°C.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Εικόνα 2.5. Μερική πέψη χρωμοσωμικού DNA με διαδοχικές αραιώσεις του ενζύμου

2.6 Σύνδεση του γραμμικού κοσμιδίου με το χρωμοσωμικό DNA

Για την επανακυκλοποίηση του κοσμιδίου, αφού πρώτα έχουν ενσωματωθεί τμήματα χρωμοσωμικού DNA, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από το βιβλίο *Molecular Cloning 3rd Edition*, Sambrook and Russel, 2001.

Για ένα διάλυμα τελικού όγκου 20μl προστέθηκαν:

- 6μl γραμμικό κοσμιδιακό DNA,
- 4μl χρωμοσωμικό DNA,
- 2μl 10x buffer για τη σύνδεση,
- 1μl DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4
- 1μl dATP

Επώαση στους 16 °C για 12-16 ώρες.

2.6.1 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων

Για την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου που αφορά το ligation, απαραίτητη ήταν η ποσοτικοποίηση του DNA στα δείγματα που θα χρησιμοποιούνταν. Αυτό μπορούσε να γίνει με φασματοφωτομετρία, μέτρηση δηλαδή της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως, με την απορρόφηση να εμφανίζει μέγιστο σε μήκος κύματος 260nm. Η συγκέντρωση ενός δείγματος με ένα τυχαίο συντελεστή αραίωσης και μια οπτική πυκνότητα OD_{260nm} υπολογίζεται ως εξής:

$$C(\mu\text{g/ml}) = OD_{260nm} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \times 50$$

Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις: μία μέτρηση στα 260 nm και μία μέτρηση στα 280 nm. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς 280nm χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η επιμόλυνση από πρωτεΐνες, γιατί οι πρωτεΐνες τείνουν να απορροφούν σε μήκος κύματος 280nm. Γενικά χαμηλές τιμές του λόγου αυτού (<1,5) αντιστοιχούν σε μεγάλη επιμόλυνση του δείγματος σε πρωτεΐνη, ενώ οι τιμές 1,8-2,0 αντιστοιχούν σε δείγματα με υψηλή καθαρότητα νουκλεϊκών οξέων (*Molecular Cloning 3rd Edition*, Sambrook and Russel, 2001). Στη μέτρηση της OD χρησιμοποιήθηκε σαν τυφλό dH₂O, γιατί μέσα σε αυτό είναι διαλυμένο το DNA.

2.7 Τιτλοποίηση της αντίδρασης πακεταρίσματος του κοσμιδίου

Το πακετάρισμα, η είσοδος δηλαδή των ανασυνδυασμένων κοσμιδίων μέσα σε άδεια καψίδια φάγων, έγινε σύμφωνα με το Gigapack III Gold Packaging Extract.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το δεκτικό στέλεχος *E. Coli*, **VCS257** το οποίο και βρισκόταν σε stock γλυκερόλης. Το πρώτο βήμα ήταν να δημιουργηθεί μια στερεή καλλιέργεια από το δείγμα και να παραμείνει για ανάπτυξη στους 37°C. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων, τα τριβλία μπορούν να φυλάσσονται στους 4°C έως και μια βδομάδα.

Τα βακτήρια στα οποία θα γίνει η είσοδος του ανασυνδυασμένου κοσμιδίου, υπόκεινται σε μια προετοιμασία, που περιλαμβάνει ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό που περιέχει MgSO₄ και 0.2% w/v μαλτόζη. Τα βακτήρια φυγοκεντρούνται και επαναδιαλύονται σε MgSO₄ μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου 0,5.

Η διαδικασία του πακεταρίσματος περιλαμβάνει την ανάμειξη του DNA με τα άδεια καψίδια, προσθήκη SM buffer, χλωροφόρμιο και φυγοκέντρηση. Συγκεκριμένα, τα καψίδια μεταφέρονται από τους -80°C, όπου φυλάσσονταν, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αμέσως εισάγεται το DNA (περίπου 4μl). Ανακινούμε και επωάζουμε για 2 ώρες στους 22°C. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό στο σημείο αυτό να φροντίσουμε ότι όλα τα συστατικά βρίσκονται στον πάτο του eppendorf. Έπειτα προστίθενται το SM buffer και το χλωροφόρμιο. Μετά τη διαδικασία αυτή, το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ανασυνδυασμένοι φάγοι, φάγοι δηλαδή που περιέχουν ως γενετικό υλικό το κοσμιδιακό DNA με ένθεμα χρωμοσωμικό DNA της *P.entomophila*.

Ετοιμάζονται αραιώσεις του πακεταρισμένου κοσμιδίου σε SM buffer, 1:10 και 1:50. Αναμειγνύονται με τα δεκτικά κύτταρα και επωάζονται με προσθήκη LB Broth. Η επώαση θα επιτρέψει την έκφραση του γονιδίου που προσδίδει την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά Sm και Cm.

Προχωρούμε σε επίστρωση των βακτηρίων σε τριβλία LB agar με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών (25μg/ml για την Sm και 50μg/ml για την Cm).

2.7.1 SM buffer

Για την παρασκευή 10ml του SM buffer χρειάστηκαν:

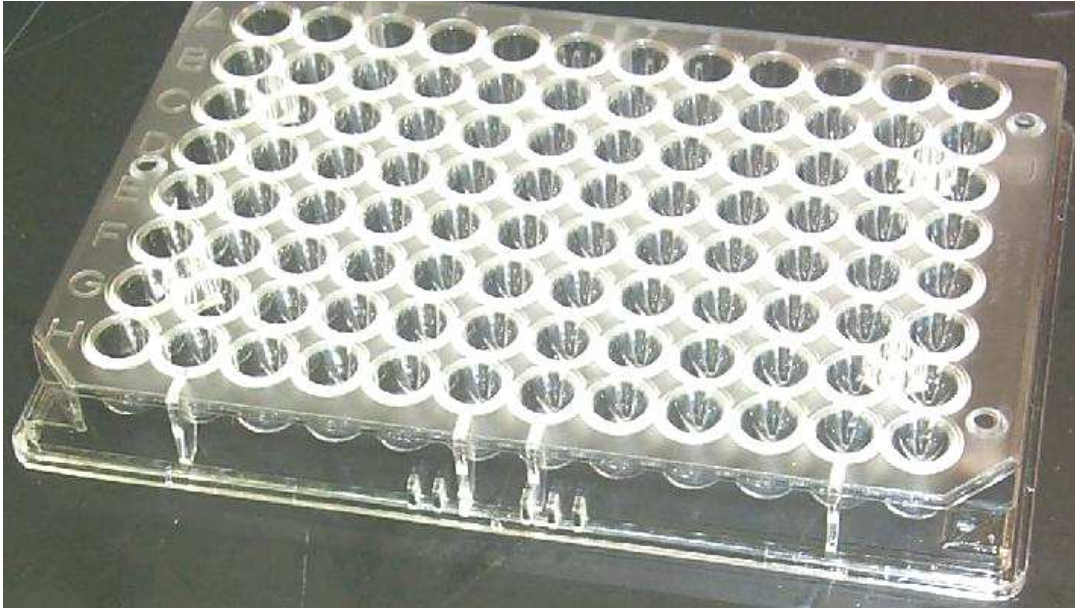
- 0.058gr NaCl,
- 0.02gr MgSO₄·7H₂O,
- 0.5ml of 1M Tris-HCl (pH 7.5),
- 0.05ml of 2% (w/v) ζελατίνη,
- dH₂O μέχρι τελικό όγκο 10ml

2.8 Δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Ετοιμάζονται τριβλία με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών (Sm και Cm). Πραγματοποιείται η αντίδραση κατά την οποία το δεκτικό στέλεχος *E.coli* θα μολυνθεί από τον φάγο και θα δεχθεί το ανασυνδυασμένο κοσμίδιο. Γίνεται επίστρωση των βακτηρίων στα τριβλία και επωάζονται στους 37°C όλο το βράδυ. Παρατηρούνται περίπου 25-30 αποικίες ανά τριβλίο.

Το μάζεμα των αποικιών γίνεται στο θάλαμο νηματικής ροής. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή να μη γίνει επιμόλυνση των αποικιών. Η επιλογή τους γίνεται με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες και μεταφέρονται σε πολυκυψελιδικό πιάτο (Tissue Culture Testplate της εταιρείας SPL Life Sciences) (εικ.2.8). Κάθε πολυκυψελιδικό πιάτο περιέχει 96 πηγαδάκια αριθμημένα οριζόντια από 1-12 και κάθετα από A-H. Κάθε πηγαδάκι του πιάτου περιέχει αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό, LB Broth με 20% Glycerol και τα αντιβιοτικά Sm και Cm. Το πολυκυψελιδικό πιάτο τοποθετείται στους 37°C overnight για ανάπτυξη των βακτηρίων κι έπειτα στους -80°C.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Εικόνα 2.8. Πολυκυψελιδικό πιάτο

Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε κάθε αποικία που συλλέγεται να αποτελεί ένα και μόνο κλώνο. Για το λόγο αυτό κατά τη διάρκεια της συλλογής, επιλέγονται διακριτές μόνο αποικίες. Κάθε αποικία αποτελείται από ένα κλώνο, βακτήρια δηλαδή στα οποία έχει εισέλθει το κοσμίδιο με το ίδιο ένθεμα, ένα συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος της *P.entomophila*.

Ο βασικός στόχος όταν κατασκευάζεται μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη είναι η δημιουργία αρκετού αριθμού ανσυνδυασμένων κλώνων ώστε να καλύπτεται 7 με 10 φορές το γονιδίωμα του οργανισμού, από τον οποίο προέρχεται το DNA. Δεδομένου λοιπόν του μήκους της *P.entomophila* και προκειμένου να γίνει ολική κάλυψή του (να έχουμε όλο το γονιδίωμα σε κομμάτια) συλλέχθηκαν περίπου **4.000 αποικίες** (43 microplates με 96 πηγαδάκια το καθένα).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.8.1 Υπολογισμός βαθμού κάλυψης (*fold coverage*)

$$N = \ln(1-p) / \ln(1-x/y)$$

N = αριθμός κλώνων

x = το μέσο μέγεθος των κλωνοποιημένων τμημάτων

y = το μέγεθος του απλοειδούς γονιδιώματος

p = η πιθανότητα που έχει μια τυχαία αλληλουχία να βρεθεί στη βιβλιοθήκη

Θεωρητικά, η ύπαρξη κενών κατά την κάλυψη του γονιδιώματος είναι αναπόφευκτη, μιας και η βιβλιοθήκη μπορεί να αντιπροσωπεύσει ένα δείγμα μόνο του πληθυσμού των τμηματοποιημένων κομματιών. Το μέγεθος και ο αριθμός αυτών των στατιστικών κενών εξαρτάται από τον αριθμό των ισοδύναμων τμημάτων που θα έχει η βιβλιοθήκη.

Για παράδειγμα σε μια βιβλιοθήκη 750.000 κοσμιδίων που καλύπτει το γονιδίωμα ενός ανθρώπου 10 φορές, υπάρχει πιθανότητα 99,995% πιθανότητα η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει να υπάρχει τουλάχιστον μια φορά στη βιβλιοθήκη (Gene Cloning, Principles and Applications, p.89-90, Lodge et al., 2007).

Δυστυχώς, κάποιοι γονιδιακοί κλώνοι αντιγράφονται περισσότερο από άλλους και έτσι η αντιπροσώπευσή τους στη βιβλιοθήκη αυξάνεται. Ωστόσο, δεδομένου του μεγέθους του γονιδιώματος, των κλωνοποιημένων τμημάτων και του βαθμού κάλυψης, η πιθανότητα μιας βιβλιοθήκης να μην αντιπροσωπεύει πλήρως το γονιδίωμα ενός οργανισμού είναι αμελητέα.

2.9 Μεταλλαξιγένεση

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το Wide genome mutagenesis in *P.entomophila* (L48) (Vodovar et al., 2006). Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά του πλασμιδίου **pUT-miniTn5-Tc** από το βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir*, όπου και βρίσκεται, στην *P.entomophila*, μέσω βακτηριακής σύζευξης. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει ένα τρασποζόνιο το οποίο, μετά την είσοδό του στην *P.entomophila*, θα προκαλέσει τυχαίες απενεργοποιήσεις γονιδίων, καθώς θα αρχίσει να ενσωματώνεται τυχαία σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος. Το τρασποζόνιο περιέχει επίσης και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (**Tc**), με αποτέλεσμα το *E.coli* που φέρει το πλασμίδιο να μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία Tc σε συγκέντρωση 15μg/ml.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιελάμβανε καλλιέργεια των βακτηρίων, *E.coli S17lambdaPir* και *P.entomophila*, στους 37°C και 30°C αντίστοιχα, μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει 0,8-1. Στο θρεπτικό υπόστρωμα για το *E.coli S17lambdaPir* με το πλασμίδιο, θα πρέπει να προστεθεί και το αντιβιοτικό Tc για επιλογή του πλασμιδίου που φέρει το τρασποζόνιο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται οι δύο καλλιέργειες, φυγοκεντρούνται και ξεπλένονται δύο φορές με φρέσκο LB Broth, προκειμένου να μη μείνει καθόλου ποσότητα του αντιβιοτικού. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν σαν σταγόνα και εναποτίθενται σε τριβλίο με LB άγαρ για όλο το βράδυ και σε θερμοκρασία 30°C, ώστε να γίνει η σύζευξη. Την επόμενη μέρα ετοιμάζονταν αραιώσεις (1:50, 1:100 και 1:200) και τα βακτήρια επιστρώνονταν σε τριβλία με συγκέντρωση τετρακυκλίνης 150μg/ml. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα τριβλία στα οποία περιέχονταν το αντιβιοτικό Tc έπρεπε να παραμένουν σκεπασμένα με αλουμινόχαρτο καθώς η τετρακυκλίνη είναι φωτοευαίσθητη.

Παράλληλα, ετοιμάστηκε μία ακόμη καλλιέργεια του *E.coli S17lambdaPir*, η οποία και χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση του πλασμιδίου **pUT-miniTn5-Tc**. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της Nucleospin (εταιρεία MACHEREY-NAGEL), που αφορά την απομόνωση πλασμιδίων. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξή του. Το πλασμίδιο σε καθαρή μορφή φυλάσσεται στους -20°C.

Σαν αρνητικό control της όλης διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir*, το οποίο **δεν** περιέχει το πλασμίδιο **pUT-miniTn5-Tc**,

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

και άρα **δεν** είναι ανθεκτικό για την τετρακυκλίνη. Το *E.coli S17lambdaPir* αναμειγνύεται με την *P.entomophila* και ακολουθείται κανονικά η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης. Μετά την επίστρωση στο αρνητικό control περιμένουμε να μην αναπτυχθούν καθόλου αποικίες.

Με πειράματα αποδείχθηκε ότι ούτε το βακτηριακό στέλεχος με το πλασμίδιο (*E.coli S17lambdaPir*) αλλά ούτε και η *P.entomophila* χωρίς το πλασμίδιο μπορούσαν να αναπτυχθούν σε συγκέντρωση αντιβιοτικού Tc 150μg/ml. Επομένως, στο επόμενο 24ωρο αναμένεται να αναπτυχθούν μόνο βακτήρια του είδους *P.entomophila* που να έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το ενσωματωμένο τρασποζόνιο (πίνακας 2). Θα ακολουθούσε αναγνώριση του είδους *P.entomophila* με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το 16S rRNA της *P.entomophila*.

Πίνακας 2

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
<i>E.coli S17lambdaPir</i> (με το pUT-miniTn5-Tc)	37°C	15μg/ml Tc
<i>E.coli S17lambdaPir</i>	37°C	-
<i>P.entomophila</i>	30°C	-
<i>P.entomophila</i> (με το pUT-miniTn5-Tc)	30°C	150μg/ml Tc

2.10 Ηλεκτροδιάτρηση

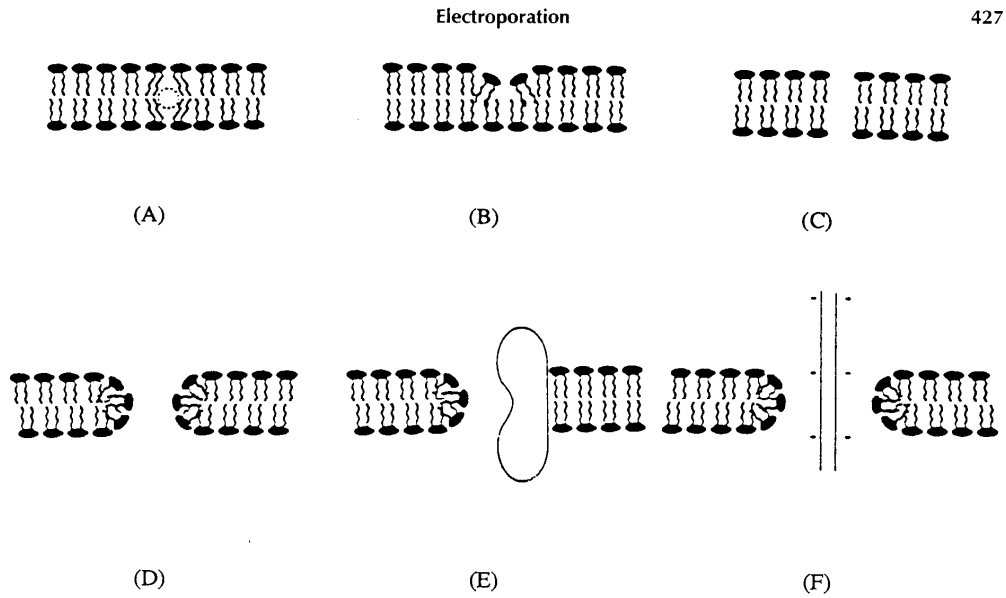
Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται προκειμένου διάφορα μόρια, όπως για παράδειγμα DNA, να διαπεράσουν τη μεμβράνη του κυττάρου και να εισέλθουν στο εσωτερικό του.

Μια συσκευή που παράγει οξύ ηλεκτρικό παλμό προκαλεί κύρτωση της μεμβράνης και επακόλουθο σχηματισμό προσωρινών υδροφοβικών πόρων, η διάμετρος των οποίων ποικίλει από 2nm το ελάχιστο έως μερικά nm το μέγιστο. Μερικοί από τους μεγαλύτερους υδροφοβικούς πόρους μετατρέπονται σε υδροφιλικούς, επειδή η ενέργεια που χρειάζεται για να δημιουργηθεί και να διατηρηθεί ένας υδροφιλικός πόρος μειώνεται καθώς η τάση μεταξύ των μεμβρανών αυξάνεται (Weaver, 1993). Η επαναφορά των πόρων (κλείσιμο) είναι μια μάλλον σχετική διαδικασία καθώς μπορεί να καθυστερήσει αν τα κύτταρα παραμείνουν σε χαμηλή θερμοκρασία (Molecular Cloning 3rd Edition, Sambrook and Russel, 2001) (εικ. 2.10).

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την εισαγωγή του πλασμιδίου **pUT-miniTn5-Tc** στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir*, από το οποίο απουσίαζε το πλασμίδιο.

Σε καλλιέργεια δεκτικών κυττάρων *E.coli S17lambdaPir* προστίθεται το πλασμίδιο που διατηρείται σε καθαρή μορφή στους -80°C. Η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται στην ειδική συσκευή και αφού τα κύτταρα τοποθετηθούν μέσα σε ειδικές κυψελίδες (της εταιρείας BioRad). Αμέσως μετά, στα κύτταρα προστίθεται φρέσκο LB Broth και αφήνονται για επώαση στους 37°C για μία ώρα, προκειμένου να γίνει η φαινοτυπική έκφραση.

Τα βακτηριακά κύτταρα στα οποία έχει εισέλθει το πλασμίδιο επιλέγονται έπειτα από καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσία του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη, σε συγκέντρωση 15μg/ml.



Εικ. 2.10. Υποθετικό πλάνο σχετικά με τις αλλαγές που συμβαίνουν στη μεμβράνης κατά την πορεία της ηλεκτροδιάτρησης.
 (A). μικρή διακύμανση του μεμβρανικού όγκου (B). δημιουργία προεξοχής (C,D). υδροφοβικοί πόροι ή αλλιώς 'πρωταρχικοί πόροι' διαμέσου των οποίων περνούν ιόντα και μόρια (E). φορτισμένο μακρομόριο περνά τον υδροφιλικό πόρο.
 Εικάζεται πως η διαδρομή $A \rightarrow B \rightarrow C$ ή D πραγματοποιείται με συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα καθώς η τάση αυξάνεται. Η πορεία (F) περιγράφει την είσοδο ενός προσδεμένου μακρομορίου, ενώ η τάση μεταξύ των μεμβρανών είναι υψηλή, και πως αυτό συνεχίζει καθώς η τάση εξασθενεί (Weaver, 1993)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η κατασκευή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς αντιπροσωπεύει το συνολικό γονιδίωμα ενός οργανισμού. Αποτελεί ένα σημαντικότατο εργαλείο για κάθε ερευνητή που θέλει να μελετήσει την *P.entomophila*, να προσδιορίσει γονίδια, έκφραση γονιδίων, ομάδες γονιδίων αλλά και γονιδιακές μεταλλάξεις.

3.1 Αξιολόγηση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

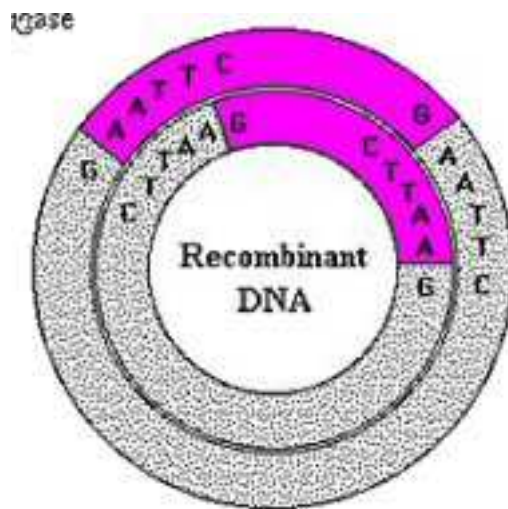
Μετά τη διαδικασία μετασχηματισμού των βακτηρίων, ο έλεγχος και η επιλογή των κλώνων που δέχθηκαν το κοσμίδιο γίνεται με κριτήριο της ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα που να περιέχει αντιβιοτικά. Το γονίδιο που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά βρίσκεται στο κοσμίδιο. Ωστόσο, η διαδικασία της σύνδεσης επέφερε δυο πιθανές καταστάσεις:

- ⇒ α. το κοσμίδιο μετά την επέμβαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση, επανακυκλοποιήθηκε χωρίς να ενσωματωθεί άλλο τμήμα DNA (εικ.3.1.α)
- ⇒ β. το κοσμίδιο επανακυκλοποιήθηκε αφού προηγουμένως ενσωματώθηκε, λόγω συμπληρωματικότητας των άκρων, χρωμοσωμικό DNA της *P.entomophila* (εικ.3.1.β).



Εικόνα 3.1.α Επανακυκλοποίηση του φορέα χωρίς ένθεμα

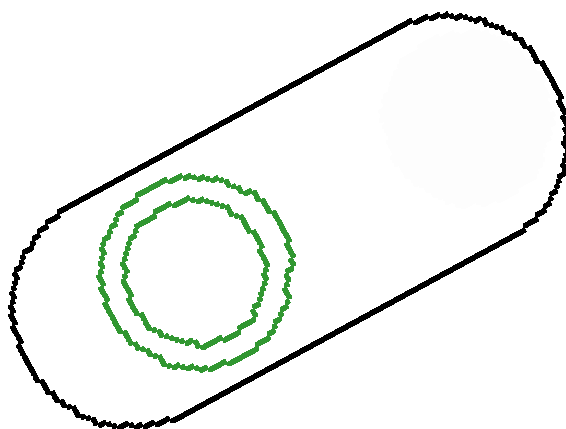
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.1.β. Επανακυκλοποίηση μετά την ενσωμάτωση τμήματος DNA, λόγω συμπληρωματικότητας

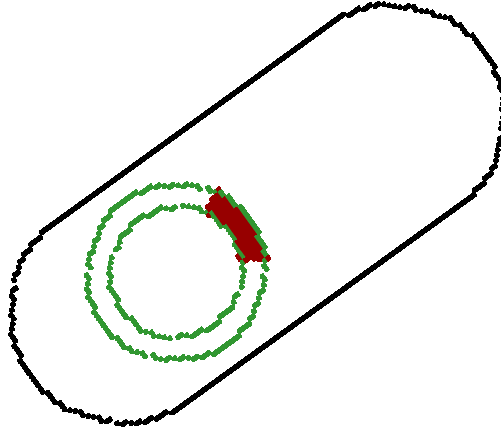
Ομοίως, μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, προέκυψαν τρεις πιθανές περιπτώσεις βακτηρίων:

⇒ α. βακτήρια στα οποία εισήλθε κοσμίδιο χωρίς ένθεμα

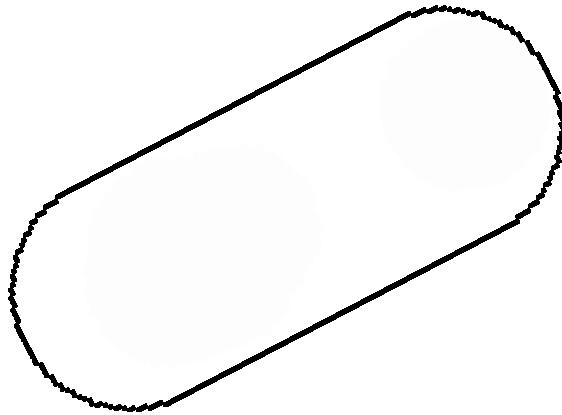


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

⇒ β. βακτήρια στα οποία εισήλθε κοσμίδιο με ένθεμα



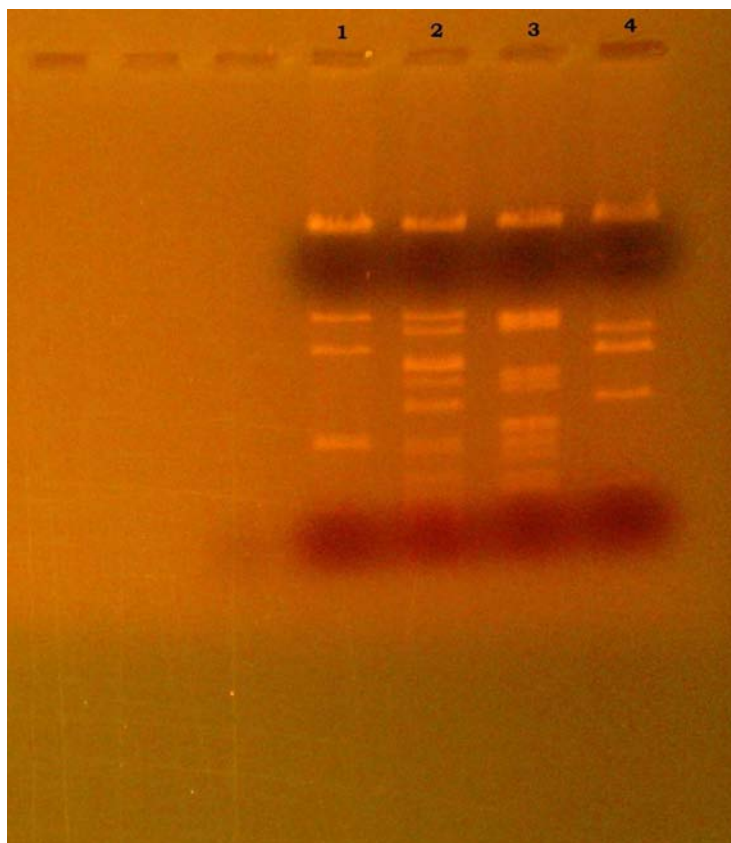
⇒ γ. βακτήρια στα οποία δεν έγινε μετασχηματισμός



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα με αντιβιοτικά, μας «απαλλάσσει» από τα βακτήρια της κατηγορίας γ. Ωστόσο, δε μπορούμε να γνωρίζουμε με βεβαιότητα αν τα βακτήρια που αναπτύσσονται περιέχουν ένθεμα, παρά μόνο αν χρησιμοποιήσουμε μοριακές μεθόδους, όπως πέψη με ένζυμο περιορισμού και ηλεκτροφόρηση.

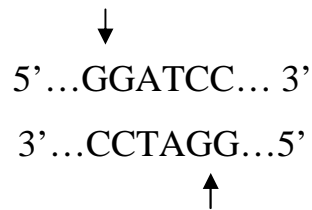
Γίνεται τυχαία επιλογή αποικιών από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Αφήνονται για ανάπτυξη και στη συνέχεια απομονώνεται το κοσμίδιο. Με μια αρχική ηλεκτροφόρηση φαίνεται το κοσμίδιο να είναι μεγάλου μοριακού βάρους. Για να επιβεβαιώσουμε ότι υπάρχει ένθεμα, καθώς και ότι το ένθεμα αυτό είναι διαφορετικό σε κάθε βακτηριακό κλώνο που επιλέξαμε, κόβουμε με το ένζυμο περιορισμού PstI και πραγματοποιούμε και δεύτερη ηλεκτροφόρηση (εικ.3.1.γ)



Εικόνα 3.1.γ. Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κοσμιδιακού DNA έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμό PstI. Οι διαφορετικές ζώνες που προκύπτουν επιβεβαιώνουν την ύπαρξη διαφορετικού ενθέματος σε κάθε βακτηριακό κλώνο (1-4).

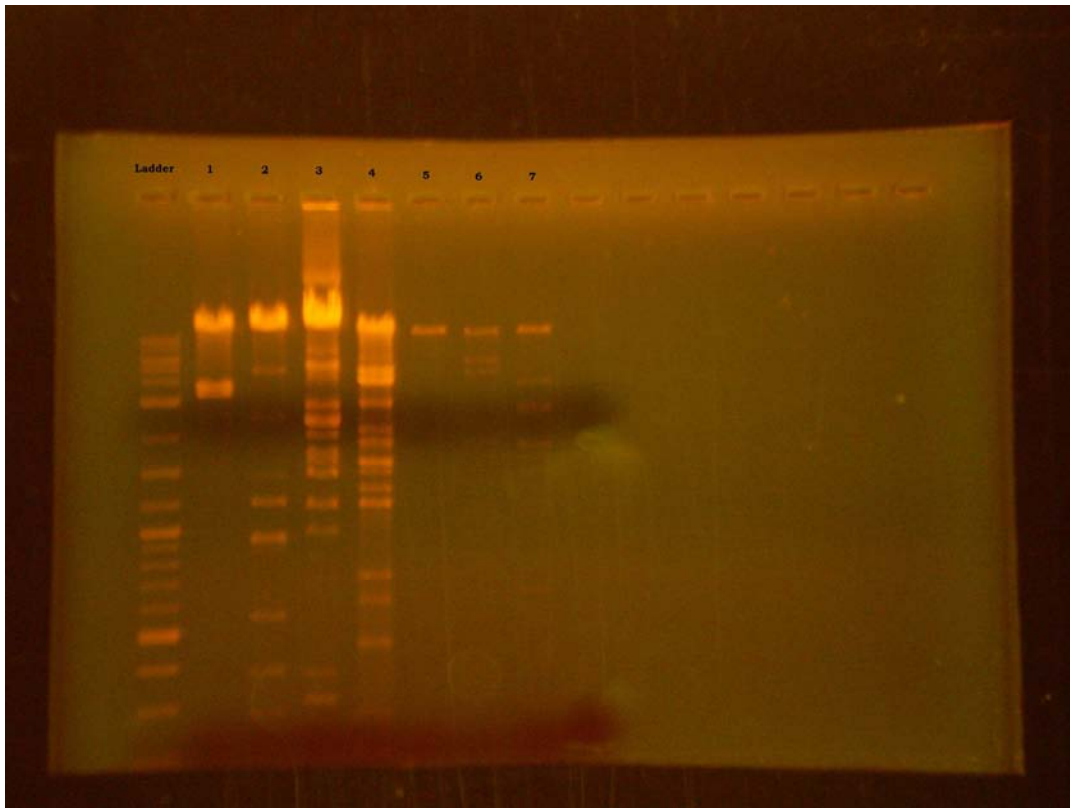
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται ξανά. Αυτή τη φορά επιλέγουμε τυχαία 7 βακτηριακούς κλώνους από το σύνολο της γονιδιοματικής βιβλιοθήκης. Προχωρούμε σε απομόνωση του κοσμιδίου και στη συνέχεια πέπτουμε με ένζυμο περιορισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι το BamHI της εταιρείας New England Biolabs. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει και κόβει την παρακάτω αλληλουχία στα σημεία που επισημαίνουν τα βέλη:



Το ένζυμο παραμένει για 3 ώρες μαζί με το κοσμίδιο στους 37°C, προκειμένου να γίνει η πέψη και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του διαλύματος (εικ.3.1.δ)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικ. 3.1.δ. Απομόνωση 7 τυχαίων βακτηριακών κλώνων από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Απομόνωση του κοσμιδίου και πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI. Οι διαφορετικές ζώνες στα δείγματα (1-7), επιβεβαιώνουν την ύπαρξη διαφορετικού ενθέματος στο κοσμίδιο. Στο δείγμα (5) η ύπαρξη μίας μόνο μπάντας δείχνει πως το κοσμίδιο δεν έχει δεχθεί ένθεμα.

3.2 Αποτελέσματα μεταλλαξιγένεσης

Η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης ως σκοπό είχε την δημιουργία μεταλλαγμάτων του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*. Το πλασμίδιο pUT-miniTn5-Tc περιέχονταν στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir* από το οποίο και θα μεταφερόταν στην *P.entomophila*. Μετά την είσοδό του στην *P.entomophila*, το τρασποζόνιο που περιέχονταν στο πλασμίδιο θα ενσωματώνονταν τυχαία στο γονιδιώμα της. Η ενσωμάτωση του τρασποζονίου θα προκαλούσε την τυχαία απενεργοποίηση κάποιων γονιδίων.

Ωστόσο, τα πρώτα πειράματα δεν φάνηκε να δίνουν κάποιο αποτέλεσμα. Μετά την επιστροφή των βακτηρίων στα τριβλία με Tc 150μg/ml δεν αναπτύχθηκε καμία αποικία. Στο αρχικό πρωτόκολλο ακολούθησε μια σειρά από τροποποιήσεις προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

3.2.1 Τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολλο της μεταλλαξιγένεσης

⇒ Αλλαγή συγκέντρωσης αντιβιοτικού

Αρχικά, θεωρήθηκε πως η συγκέντρωση Tc στα 150μg/ml ήταν πολύ υψηλή ακόμη και για την *P.entomophila*, που έχει προσλάβει το πλασμίδιο, να επιβιώσει. Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν τριβλία με LB άγαρ και διάφορες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού Tc: 70μg/ml, 80μg/ml, 90μg/ml, 100μg/ml και 120μg/ml. Στα τριβλία αυτά παρέμειναν για ανάπτυξη στις κατάλληλες θερμοκρασίες τα στελέχη *E.coli S17lambdaPir* με το πλασμίδιο και *P.entomophila*. Το συμπέρασμα της διαδικασίας ήταν ότι το βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir* που περιέχει το πλασμίδιο, ενώ αναπτύσσεται άριστα σε συγκέντρωση Tc 15μg/ml, μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό με το αντιβιοτικό Tc μέχρι και σε συγκέντρωση 80μg/ml. Η *P.entomophila* δεν αναπτύσσεται καθόλου παρουσία Tc. Έτσι, η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι μετά τη σύζευξη τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τριβλία με Tc 90μg/ml. Παρόλα αυτά, καμία αποικία δεν αναπτύχθηκε.

⇒ Πλύση του αντιβιοτικού Tc πριν την σύζευξη

Τα βακτηριακά κύτταρα *E.coli S17lambdaPir* που είχαν το πλασμίδιο αναπτύσσονταν σε υγρή καλλιέργεια που περιείχε και το αντιβιοτικό Tc σε

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συγκέντρωση 15μg/ml. Οπότε, προκειμένου να δουλέψει το πρωτόκολλο, επιχειρήθηκε ξέπλυμα των κυττάρων *E.coli S17lambdaPir* πριν την ανάμιξή τους με την *P.entomophila*, μήπως η παρουσία αντιβιοτικού, στον ελάχιστο χρόνο μέχρι να γίνει η φυγοκέντρωση, ήταν ανασταλτικός παράγοντας της σύζευξης. Το ξέπλυμα των κυττάρων έγινε με φρέσκο LB Broth. Επανάληψη της διαδικασίας της μεταλλαξιγένεσης δεν επέφερε κάποιο αποτέλεσμα.

⇒ *Απενεργοποίηση περιοριστικού συστήματος της P.entomophila*

Μια περίπτωση που επίσης εξετάστηκε ήταν το περιοριστικό σύστημα της *P.entomophila* να επιτίθεται στο πλασμιδιακό DNA του *E.coli* όταν γίνεται η ανάμιξη των δύο στελεχών. Έτσι, πριν την ανάμιξη των δύο καλλιεργειών, και εφόσον αυτές είχαν φτάσει την επιθυμητή οπτική πυκνότητα, η *P.entomophila* παρέμεινε στους 45°C για 20 λεπτά, προκειμένου να απενεργοποιηθεί το περιοριστικό της σύστημα (Matthijs et al., 2009). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης κανονικά. Ωστόσο, μετά την τελική επίστρωση των βακτηρίων δεν αναπτύχθηκε καμία αποικία.

⇒ *Ηλεκτροδιάτρηση*

Ένας επιπλέον παράγοντας που διαφοροποιήθηκε ήταν τα ίδια τα κύτταρα που έφεραν το πλασμίδιο και χρησιμοποιήθηκαν στη βακτηριακή σύζευξη (donor strain). Προκειμένου να πετύχει η μεταλλαξιγένεση εξετάστηκε το ενδεχόμενο τα βακτηριακό στέλεχος *E.coli S17lambdaPir* με το πλασμίδιο για κάποιο λόγο να μην επιτυγχάνει τη σύζευξη. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το ίδιος στέλεχος (*E.coli S17lambdaPir*) από το οποίο όμως απουσίαζε το πλασμίδιο. Με τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης επιχειρήθηκε μεταφορά του πλασμιδίου από το στέλεχος στο οποίο βρισκόταν στο στέλεχος από το οποίο απουσίαζε. Η διαδικασία δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

⇒ *Άλλες παράμετροι*

Άλλες διαφοροποιήσεις που έγιναν πάνω στο αρχικό πρωτόκολλο ήταν η οπτική πυκνότητα. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές όπου η οπτική πυκνότητα των δύο στελεχών έφτανε στο 1-1,2. Επίσης η θερμοκρασία σύζευξης επιχειρήθηκε να είναι στους 25 °C αλλά και στους 37°C, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Επίσης, κατά την επίστρωση των βακτηρίων στο τελικό στάδιο, δοκιμάστηκαν επιστρώσεις με διάφορες αραιώσεις των

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

βακτηρίων καθώς και επίστρωση χωρίς να έχει γίνει καθόλου αραίωση, μήπως η αραίωση που γινόταν ήταν πολύ μεγάλη και για αυτό οι αποικίες δεν αναπτύσσονταν. Τέλος, μετά την επίστρωση στα τριβλία τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονταν για περισσότερο από ένα 24ωρα. Ωστόσο, χωρίς αποτέλεσμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* ανακαλύφθηκε πρόσφατα και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κυρίως για την ικανότητά του να μολύνει την *Drosophila melanogaster*, τα ενήλικα άτομα αλλά και τις προνύμφες, ύστερα από κατάποση.

Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, η *P.entomophila*, έχει τη δυνατότητα να συνθέτει και να εκκρίνει σιδηροφόρα, σύμπλοκα χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν και συνδέονται με το σίδηρο. Το σιδηροφόρο προσφέρει στον μικροοργανισμό που το εκκρίνει την ποσότητα σιδήρου που χρειάζεται. Η παραγωγή σιδηροφόρων αποτελεί ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για την *P.entomophila* αλλά και για όλα τα βακτήρια που τα εκκρίνουν, έναντι άλλων μικροοργανισμών, καθώς η παραγωγή και έκκρισή τους όχι μόνο διασφαλίζει την επιβίωσή τους, ελλείψεως σιδήρου, αλλά φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην παθογένεια κάποιων στελεχών.

Το κύριο σιδηροφόρο για τις φθορίζουσες ψευδομονάδες είναι η πτοβερδίνη, η οποία και εκκρίνεται αμέσως μόλις το βακτήριο βρεθεί σε συνθήκες μειωμένου σιδήρου. Στη δομή της πτοβερδίνης βρίσκεται, μεταξύ άλλων, ένα φθορίζον χρωμοφόρο. Η παρουσία αυτού του χρωμοφόρου προσδίδει στις ψευδομονάδες που εκκρίνουν πτοβερδίνη την ιδιότητα να φθορίζουν σε UV, όταν το περιβάλλον τους στερείται σιδήρου. Ωστόσο, πέραν της πτοβερδίνης υπάρχουν κι άλλα δευτερεύοντα σιδηροφόρα με χαμηλότερη σταθερά σύνδεσης με το σίδηρο.

Η *P.entomophila* διαθέτει δύο σιδηροφόρα. Το ένα είναι η πτοβερδίνη και το άλλο ήταν μέχρι πρόσφατα άγνωστο από άποψη δομής και λειτουργίας.

Σκοπός της εργασίας ήταν η δημιουργία μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και η χρήση αυτής προκειμένου να ανιχνευτούν και να μελετηθούν γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση σιδηροφόρων. Συγκεκριμένα, το πρώτο κομμάτι της εργασίας ήταν η δημιουργία της βιβλιοθήκης και η αξιολόγησή της. Στο δεύτερο κομμάτι η βιβλιοθήκη θα χρησιμοποιούνταν σαν εργαλείο προκειμένου να μελετηθούν τα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή του δεύτερου σιδηροφόρου της *P.entomophila*.

Η κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ολοκληρώθηκε με επιτυχία και πραγματοποιήθηκε και έλεγχος αυτής με μοριακές μεθόδους. Ωστόσο, λίγο πριν την

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ολοκλήρωση του πρώτου μέρους δημοσιεύτηκε μία εργασία που χαρακτήριζε το δεύτερο, άγνωστο μέχρι τότε, σιδηροφόρο της *P.entomophila*, το οποίο και ονομάστηκε ψευδομονίνη (Matthijs et al., 2009).

Λαμβάνοντας υπόψη τη συγκεκριμένη δημοσίευση το δεύτερο κομμάτι της παρούσας εργασίας αποφασίστηκε να τροποποιηθεί, έτσι ώστε αφενός μεν να εξακολουθεί να αποτελεί μια ερευνητική εργασία και αφετέρου να εκμεταλλεύεται το ήδη υπάρχον εργαλείο, τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

Αποφασίστηκε να μελετήσουμε την ικανότητα του βακτηρίου *P.entomophila* να σχηματίζει βιοφιλμ. Ως βιοφίλμ χαρακτηρίζεται μια μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από ένα ή περισσότερα βακτηριακά είδη τα οποία παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες που δημιουργούν μια προστατευτική κάψα γύρω από τα βακτήρια και επιπλέον τα βοηθά να προσκολληθούν σε στερεές επιφάνειες. Τα βακτήρια σχηματίζουν μικροαποικίες μέσα στο στρώμα των πολυσακχαριτών.

Η βασική ιδέα περιελάμβανε τη δημιουργία μεταλλαγμάτων της *P.entomophila* με τυχαία απενεργοποίηση γονιδίων. Η διαδικασία θα πραγματοποιούνταν με μεταλλαξιγένεση με τη χρήση γενετικών μεταθετών στοιχείων (τρασποζόνια). Το τρανσποζόνιο θα ενσωματώνονταν ανάμεσα στην αλληλουχία του γονιδιώματος της *P.entomophila* και θα προκαλούσε τυχαίες απενεργοποιήσεις γονιδίων. Από τα μεταλλάγματα θα επιλέγονταν εκείνα στα οποία είχαν απενεργοποιηθεί γονίδια που ευθύνονταν για τη δημιουργία βιοφιλμ και άρα θα απουσίαζε η ικανότητα σχηματισμού του.

Η επιλογή αυτών των κλώνων θα γινόταν με τη βοήθεια μιας χρωστικής, το κρυσταλλικό ιώδες. Το κρυσταλλικό ιώδες χρωματίζει τα κύτταρα που έχουν προσκολληθεί σε στερεή επιφάνεια (σχηματισμός βιοφιλμ) και τα οπτικοποιεί. Εάν και εφόσον η μεταλλαξιγένεση ήταν πετυχημένη, θα δημιουργούσαμε μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμάτων (αντίστοιχη με τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη) σε πολυκυψελιδικά πιάτα με 96 πηγαδάκια το καθένα. Για το κάθε πολυκυψελιδικό πιάτο θα σχηματίζονταν ένα αντίγραφο του. Θα προστίθονταν το κρυσταλλικό ιώδες και στη συνέχεια, αφού απομακρύνονταν τα βακτηριακά κύτταρα από τα πηγαδάκια, θα επιλέγονταν οι κλώνοι που δε σχημάτισαν βιοφιλ (απουσία χρώσης με κρυσταλλικό ιώδες). Αυτά τα μεταλλάγματα θα χαρακτηρίζονταν μοριακά (εύρεση απενεργοποιημένου γονιδίου) καθώς και για την αποτελεσματικότητα της εντομοπαθογένειάς τους, συγκριτικά με τον άγριο τύπο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρόλα αυτά, και προκειμένου η παρούσα εργασία να ολοκληρωθεί στα χρονικά περιθώρια του μεταπτυχιακού προγράμματος, η επιλογή των μεταλλαγμάτων δεν ολοκληρώθηκε. Ο βασικός λόγος ήταν η αδυναμία της επιτυχημένης ολοκλήρωσης της διαδικασίας της μεταλλαξιγένεσης. Παρόλο που η διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές, και παρά τις όποιες τροποποιήσεις που επιχειρήθηκαν, άγνωστοι παράγοντες λειτούργησαν ανασταλτικά εμποδίζοντας την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Ωστόσο, σημαντικό επίτευγμα εξακολουθεί να αποτελεί η κατασκευή ενός ιδιαίτερα χρήσιμου εργαλείου, της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, η οποία, και έπειτα από αξιολόγηση, είναι διαθέσιμη σε οποιοδήποτε ερευνητή θελήσει να τη χρησιμοποιήσει σαν υποδομή για την ανίχνευση, τη μελέτη και το χαρακτηρισμό γονιδίων της *Pseudomonas entomophila*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.D, Smith J.A. (1996) Preparation of Genomic DNA in bacteria: Current Protocol in Molecular Biology 24.4-24.5
- Blumer C, Haas D. (2000) Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol* 173, 170-177
- Braun V. (1997) Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biol. Chem.* 378, 779-786
- Budzikiewicz H. (1997) Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z. Naturforsch.* 52c, 713-720
- Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. (2007) Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 213-216
- Cooper M, Tavankar GR, Williams HD. (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*, 149:1257-1284
- Cornelis P, Matthijs S. (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* 4: 787-798
- Costerton J.W, Lewandowski Z, Caldwel D.E, Korber D.R, Lappin-Scott H.M. (1995) Microbial biofilms. In *Annual Review of Microbiology*. Ornston, L.N., et al. (eds). Palo Alto, CA: Annual Reviews, pp. 711-745
- Cox CD, Graham R. (1979) Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 137: 357-364
- Drechsel H, Jung J. (1998) Peptide siderophores. *J Peptide Sci.* 4, 147-181
- Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. (1997) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223-6229
- Faraldo-Gomez J.D, Sansom M.S. (2003) Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 105-116
- Guerinot M.L. (1994) Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 743-772
- Ha E.M, Oh C.T, Ryu J.H, Bae Y.S, Kang S.W. (2005) An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* 8: 125-132
- Haas D. and Defago G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3, 307-319

- Handfield M, Lehoux D.E, Sanschagrín F, Mahan MJ, Woods DE, Levesque R.C. (2000) In vivo induced genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 68, 2359-2362
- Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, Macleod C, Aaron SD, Harbour C. (2005) Antibiotics susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic and biofilm conditions. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5085-5090
- Hoyle B.D. and Costerton W.J. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 37: 91-105
- Hultmark D. (2003) *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15: 12-19
- Jukervitch E, Hadar Y, Chen Y. (1992) Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:119-124
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., Lemaitre, B. Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model. *PLOS Pathogens* (2006) vol.2 Is.6 e56 0552-0561
- Lodge J, Lund P, Minchin S. (2007) Gene cloning Principles and Applications (p.89-99).
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2, 1051-1060
- Matthijs, S., Abbaspour Tehrani, K., Laus, G., Jackson, RW., Cooper, RM., Cornelis, P. (2007) Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ Microbiol* 9: 425-434
- Matthijs, S., Budzikiewicz, H., Schafer, M., Whatelet, B., Cornelis, P (2008) Ornicorrugatin, a new siderophore from *Pseudomonas fluorescens* AF76. *Z Naturforsch* 63: 8-12
- Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J., Abbaspour-Tehrani, K., Schafer, M., Budzikiewicz, H., Cornelis, P. Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *BioMetals* vol.22 (2009) 951-964
- Mercado-Blanco, J., van der Drift, KMG.M., Olsson, PE., Thomas-Oates, JE., van Loon, LC., Bakker, PAHM (2001) Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in

the biosynthesis of the salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriol* 183: 1909-1920

- Merritt J.H, Kadouri, D.E, O'Toole, G.A Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr Protocol Microbiol.* (2005) Chapter 1: Unit 1B.1
- Meyer J-M (1992) Exogenous siderophore-mediated uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *J Gen Microbiol* 138:951-958
- Meyer JM, Neely A, Stinzi A, Georges C, Holder IA (1996) Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 64, 518-523
- Mossialos D, Amoutzias, G.D. Siderophores in fluorescent pseudomonads: new tricks from an old dog. *Future Microbiol.* (2007) 2(4), 387-395
- Mossialos D, Amoutzias G.D (2009) Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *International Journal of Medical Microbiology* 299 (2009) 87-98
- Neilands, JB: Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723-26727 (1995)
- O'Toole, G.A., Kolter. R. Initiation of biofilm in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* (1998) 28(3), 449-461
- Palleroni, N.J. (1984) *Pseudomonadaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Krieg, N.R. and Holt, J.G. pp. 141-199 Baltimore, MD: Williams and Wilkins
- Parsek, M.R., and Tolker-Nielsen, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* (2008) 11(6):560-6
- Poole K, Young L, Neshat S (1990) Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 172:6991-6996
- Raaijmakers JM, Van Der Sluis I, Koster M, Bakker PAHM, Weisbeek PJ, Schippers B (1995) Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas spp.* *Can J Microbiol* 41:126-135
- Ravel, J., Cornelis, P (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* 11:195-200
- Risse, D., Beiderbeck, H., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Gustine, D (1998) Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Z Naturforsch* 53c: 295-304

- Ryall, B., Mitchell, H., Mossialos, D., Williams, H.D. Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*. Journal compilation The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology **49** (2009) 131-135
- Sambrook J, Russel D.W (2001) Molecular Cloning 3rd Edition
- Schneider D (2000) Using *Drosophila* as a model insect. Nat Rev Genet 1: 218-225
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Op Microbiol 5: 102-110
- Van de Eede, G., Deblaere, R., Goethals, K., Van Montagu, M., Holsters, M. (1992) Broad Host Range and Promoter Selection Vectors for Bacteria that Interact with Plants. Molecular Plant-Microbe Interactions vol.5 no.3 228-234
- Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., Bocard, F. (2004) *Drosophila*: A polyvalent model to decipher hst-pathogen interactions. Trends Microbiol 12: 235-242
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Bocard, F., Lemaitre, B. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. PNAS (2005) vol.102 no.32 11414-11419
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Medigue, C., & Bocard, F. (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nature Biotechnology (2006) vol.24 no.6 673-679
- Watson J.D, Myers R.M, Caudy A.A, Witkowski J.A. (2007) Recombinant DNA (Genes and Genomes – A short course) 3rd edition p.103-104
- Weaver J.C (1993) Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J.Cell. Biochem.* **51**:426-435
- Wimpenny, J.W.T., and Colasanti, R. (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 1-16
- Zlosnik, J.E., Travankar, C.R., Bundy, J.G., Mossialos, D., O'Toole, R. and Williams, H.D. (2006) Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 152, 1407-1415