

*Διερεύνηση του μηχανισμού της
βακτηριοκτόνου δράσης του
αντιμικροβιακού πεπτιδίου
Μασεδοσίνη που παράγεται από
το *Streptococcus macedonicus*
ACA-DC 198*

Βάγια Παγώνα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Τσακαλίδου Έφη, Καθηγήτρια

Εξεταστική Επιτροπή: Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής

Τσακαλίδου Έφη, Καθηγήτρια

Χαδιώ Στυλιανή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την κ. Έφη Τσακαλίδου, για τη βοήθεια και υποστήριξη και γιατί πίστεψε σε μένα και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω σε συνθήκες εργαστηρίου, να συνεργαστώ με ανθρώπους αξιόλογους και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες. Ιδιαίτερες ευχαριστίες και απεριόριστη ευγνωμοσύνη στον κ. Κώστα Παπαδημητρίου, που αποτελεί λαμπρό παράδειγμα του πώς πρέπει να είναι ένας επιστήμονας. Η συμβολή του στη μελέτη μου ήταν καθοριστική, με την απεριόριστη βοήθεια, ψυχολογική υποστήριξη και το αίσθημα ασφάλειας που μου παρείχε. Ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμος για την οποιαδήποτε απορία ή δυσκολία, με δίδαξε πολλά πράγματα και με έκανε να νιώθω το εργαστήριο σπίτι μου. Ακόμα, είναι αξιοσημείωτη η συμβολή της κ. Ράνιας Αναστασίου στην ολοκλήρωση της μελέτης μου και την ευχαριστώ για τη βοήθεια που μου παρείχε, την ιδιαίτερη ευγένεια που τη διακρίνει ως άνθρωπο και την αμέριστη προσοχή που μου έδειξε. Ευχαριστίες στην κ. Μαρίνα Γεωργαλάκη και στην κ. Γεωργία Ζουμποπούλου, για τη βοήθεια και τη γλυκύτητά τους. Τέλος, ευχαριστώ το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου γαλακτοκομίας για τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria).....	6
1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια και στρες	7
1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτηριοσίνες.....	9
1.3.1 Λαντιβιοτικά και πιθανή χρήση τους στα τρόφιμα	10
1.4 Ο <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 και η βακτηριοσίνη μασεδοσίνη.....	11
1.4.1 Ο <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198.....	11
1.4.2 Μασεδοσίνη – Ομάδα Λακτισίνης 481 (Lacticin 481 group)	12
1.4.2.1 Η μασεδοσίνη και το <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	14
1.4.2.2 Βιοσύνθεση της μασεδοσίνης	15
1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης.....	17
2.2 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος <i>E. coli</i> EC101	17
2.2.1 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1	17
2.2.2 Επιβεβαίωση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA.....	18
2.3 Μετασχηματισμός του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 με το πλασμίδιο pGh9:ISS1	19
2.4 Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών για την επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, ανθεκτικών στη μασεδοσίνη, μέσω της μετάθεσης του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1.....	20
2.5 Επιβεβαίωση του μεταλλαγμένου φαινότυπου ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη των στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 που επιλέχθηκαν	22
2.6 Επιβεβαίωση της μετάλλαξης μέσω της μετάθεσης του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1, με ανάλυση κατά Southern του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	22

2.6.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....	22
2.6.2 Παρασκευή ιχνηθέτη (probe)	23
2.6.3 Πέψη του χρωμοσωμικού DNA και του πλασμιδίου pGh9:ISS1 και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	25
2.6.4 Προϋβριδισμός	26
2.6.5 Προετοιμασία του ιχνηθέτη.....	26
2.6.6 Υβριδισμός	26
2.6.7 Ανοσολογική ανίχνευση του σήματος Southern-DIG.....	26
2.7 Κλωνοποίηση της πλευρικής αλληλουχίας της περιοχής στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, όπου εισήλθε το πλασμίδιο pGh9:ISS1	27
2.7.1 Παρασκευή κυττάρων του στελέχους <i>E. coli</i> EC101 ικανών προς μετασχηματισμό (Competent Cells).....	27
2.7.2 Πέψη του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	28
2.7.3 Κυκλοποίηση των γραμμικών προϊόντων της πέψης του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, μέσω αντίδρασης λιγάσης (Ligation).....	29
2.7.4 Συμπύκνωση των προϊόντων της δράσης της λιγάσης.....	29
2.7.5 Μετασχηματισμός των ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους <i>E. coli</i> EC101	30
2.7.6 Colony PCR των αποικιών των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους <i>E. coli</i> EC101 και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	31
2.7.7 Συλλογή των επιθυμητών αποικιών, απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 και αλληλούχιση των θέσεων του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 που διεκόπηκαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδίου	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
3.1 Απομόνωση και χαρακτηριστικά του μεταθετού φορέα pGh9:ISS1	33

3.2 Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, ανθεκτικών στη μασεδοσίνη.....	36
3.3 Επιβεβαίωση του ανθεκτικού στη δράση της μασεδοσίνης φαινότυπου	37
3.4 Επιβεβαίωση της μετάλλαξης του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 μέσω μετάθεσης του pGh9:ISS1 με ανάλυση κατά Southern	39
3.5 Κλωνοποίηση του πλασμιδιακού DNA που εισήλθε μέσω μετάθεσης στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, σε κύτταρα του στελέχους <i>E. coli</i> EC101	43
3.6 Αλληλούχηση (Sequencing) των θέσεων του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 που διεκόπηκαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1	48
3.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεταλλαξογένεσης του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 και εκτίμηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη μασεδοσίνη	48
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	68
7. SUMMARY	70

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactic Acid Bacteria*)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν μια ετερογενή ομάδα βακτηρίων και συναντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα, από το σώμα των ανθρώπων και των ζώων, μέχρι και τα φυτά. Τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαφόρων τροφίμων ζύμωσης, ζωικής (γάλα, κρέας, ψάρι) ή φυτικής (λαχανικά, κρασί, ελιές) προέλευσης (Stiles 1996). Αποτελούν τμήμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων που περιέχουν χαμηλό % ποσοστό των βάσεων γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C). Ανήκουν στην Κλάση III (Bacilli) του φύλου Firmicutes, το οποίο περιέχει συνολικά τρεις κλάσεις: Clostridia (Κλάση I), Mollicutes (Κλάση II) και Bacilli (Κλάση III). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται στην τάξη II της Κλάσης III, που ονομάζεται *Lactobacillales* και περιλαμβάνουν σήμερα έξι οικογένειες (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*) (Garrity and Holt 2001).

Σύμφωνα με σύγχρονα δεδομένα, ένα τυπικό οξυγαλακτικό βακτήριο θεωρείται ότι είναι θετικό κατά Gram, μη σποριογόνο, αρνητικό στη δοκιμή καταλάσης, στερούμενο κυτοχρωμάτων, αεροάντοχο αλλά όχι αερόβιο, οξυάντοχο, απαιτητικό σε θρεπτικά συστατικά και αυστηρώς ζυμωτικό, με το γαλακτικό οξύ να είναι το κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης σακχάρων (Klein et al. 1998; Axelsson 2004). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι φυλογενετικά πολυσύνθετα και τα γένη που σχετίζονται με τα τρόφιμα είναι τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*.

Παρά το γεγονός ότι σύγχρονες μοριακές βιολογικές τεχνικές και αναλύσεις γονιδιώματος έχουν συνεισφέρει στην καλύτερη και βαθύτερη κατανόηση της κατάταξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, φαίνεται ότι χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να αποδοθεί μια πιο ικανοποιητική εικόνα των φυλογενετικών τους σχέσεων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία μικροβιακή ομάδα μέγιστης σημασίας για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης από το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά και τα δημητριακά, λόγω της οξίνισης που επιφέρουν, η οποία έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των

προϊόντων. Τα βακτήρια αυτά συμβάλλουν στη συντήρηση του προϊόντος, μέσω ανταγωνισμού με τους αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων, κυρίως λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αλκοόλης, CO₂, H₂O₂ και βακτηριοσινών. Επιπλέον, συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας, αφού συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος, της γεύσης και της υφής του προϊόντος. Με τη ζύμωση των προϊόντων, βελτιώνεται η πεπτικότητα τους, καθώς και η θρεπτική τους αξία, αφού εμπλουτίζονται με απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα και βιταμίνες.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως αυτές σε προβιοτικά τρόφιμα (Schiffrin et al. 2001), σε προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες και ως ζωντανά εμβόλια (Wells et al. 1996; Mercenier et al. 2000). Στις εφαρμογές αυτές, τα βακτήρια καταναλώνονται ζωντανά και παραμένουν μεταβολικά ενεργά στο γαστρεντερικό σωλήνα, δημιουργώντας αποικίες στον εντερικό βλεννογόνο, όπου και εκδηλώνουν τις εξειδικευμένες προβιοτικές λειτουργίες τους (van de Guchte et al. 2002; Lorca and Font de Valdez 2009). Στον πεπτικό σωλήνα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν ανταγωνιστικά ως προς την εντερική μικροχλωρίδα, συμβάλλουν στη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και στην καλύτερη λειτουργία του εντέρου. Τέλος, υπάρχει το ενδεχόμενο εκδήλωσης αντικαρκινικής δράσης.

1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια και στρες

Ως στρες μπορεί να οριστεί η μεταβολή στο γονιδίωμα, στις παραγόμενες πρωτεΐνες ή στο περιβάλλον, η οποία έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ή επιβίωσης ενός μικροοργανισμού (Spano and Massa 2006; Sugimoto et al. 2008). Οι αποκρίσεις στις διάφορες μορφές στρες είναι εξαιρετικά σημαντικές για τους μικροοργανισμούς που υπόκεινται σε συνεχείς μεταβολές στη θερμοκρασία, στο pH, στο θρεπτικό υπόστρωμα και στη διαθεσιμότητα νερού ή στην ωσμωτική πίεση του περιβάλλοντος. Οι παράγοντες που προκαλούν το στρες μπορεί να είναι χημικοί, φυσικοί ή βιολογικοί. Κάποιοι σχετίζονται με το περιβάλλον, όπως η θερμοκρασία, η ωσμωτική πίεση, το pH, η συγκέντρωση αιθανόλης, το διαθέσιμο οξυγόνο και η ύπαρξη βακτηριοσινών, ενώ άλλοι μπορεί να προέρχονται από τον ίδιο το μικροοργανισμό, όπως η οξύτητα, η χαμηλή διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά ως συνέπεια του

μεταβολισμού και η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (van de Guchte et al. 2002; Miyoshi et al. 2003; Spano and Massa 2006; Bruno-Bárcena et al. 2010). Συνεπώς, τόσο η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν το μηχανισμό απόκρισης στο στρες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να ανιχνεύουν το στρες και να ενεργοποιούν άμυνες που τους επιτρέπουν να αντέξουν τις αντίξοες συνθήκες ή τις απότομες μεταβολές του περιβάλλοντός τους (van de Guchte et al. 2002; Spano and Massa 2006; Lorca and Font de Valdez 2009).

Παρ' όλ' αυτά, τα βακτήρια δεν εκτίθενται μόνο σε δυνητικά στρεσογόνες περιβαλλοντικές αλλαγές στις βιομηχανικές διεργασίες, αλλά και στη φύση, όπου η ικανότητα γρήγορης απόκρισης στο στρες είναι σημαντική για την επιβίωσή τους (Stortz et al. 2000). Παρά το γεγονός ότι ένας μικροοργανισμός θα μπορούσε, θεωρητικά, να έχει συγκεκριμένα ρυθμιστικά δίκτυα συνυφασμένα με κάθε γονίδιό του και να προσαρμόζει την έκφρασή τους ανάλογα με το περιβάλλον, κάτι τέτοιο θα αποτελούσε ένα τεράστιο γενετικό φορτίο. Αντί για αυτό, τα ρυθμιστικά δίκτυα συνήθως ελέγχουν ταυτόχρονα αρκετά γονίδια και κάποιες φορές ελέγχουν και άλλα ρυθμιστικά δίκτυα (Van Bogelen et al. 1999). Οι βακτηριακές αποκρίσεις στο στρες βασίζονται στη συγχρονισμένη έκφραση των γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων τροποποιούν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες (κυτταρική διαίρεση, μεταβολισμός DNA, σύνθεση μεμβρανών κλπ) και δρουν συντονισμένα, ώστε να βελτιωθεί η βακτηριακή αντοχή στο στρες (Stortz et al. 2000). Η ενεργοποίηση αυτών των αποκρίσεων επιτυγχάνεται μέσω των ρυθμιστικών δικτύων.

Τα συστήματα αντοχής στο στρες μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (Α) τα ειδικά συστήματα, που επάγονται από την ύπαρξη του στρες, αλλά σε υποθανατηφόρο δόση. Αυτή η απόκριση προσαρμογής συνήθως σχετίζεται με την φάση εκθετικής ανάπτυξης του βακτηρίου και περιλαμβάνει την επαγωγή ειδικών ομάδων γονιδίων ή ρυθμιστών, για να αντιμετωπιστούν συγκεκριμένα στρες. (Β) τα γενικά συστήματα, όπου η προσαρμογή στις στρεσογόνες συνθήκες μπορεί να καταστήσει τα κύτταρα ανθεκτικά και σε άλλες στρεσογόνες καταστάσεις. Τα συστήματα αυτά είναι συνηθισμένα στα οξυγαλακτικά βακτήρια, όμως διαφέρουν μεταξύ των ειδών και των στελεχών. (Γ) οι αποκρίσεις που σχετίζονται με τη στατική φάση των βακτηρίων, οι οποίες περιλαμβάνουν την επαγωγή συγκεκριμένων γονιδίων που είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να προσδίδουν στο κύτταρο γενικευμένη ανθεκτικότητα έναντι

πολλαπλών στρες. Η απόκριση αυτού του είδους, σε αντίθεση με την πρώτη, δεν απαιτεί προηγούμενη έκθεση του μικροοργανισμού στο στρες για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας (Lorca and Font de Valdez 2009) και μπορεί να χαρακτηριστεί και αυτή ως απόκριση γενικού τύπου (van de Guchte et al. 2002).

Η αναγνώριση των γονιδίων που συμμετέχουν στις αποκρίσεις του στρες είναι πολύ σημαντική όταν ο στόχος είναι ο έλεγχος και η πρόβλεψη της συμπεριφοράς των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνθήκες στρες. Η τρέχουσα γνώση για τις αποκρίσεις στα περιβαλλοντικά στρες των οξυγαλακτικών βακτηρίων ποικίλλει μεταξύ των ειδών και ανάλογα με τον τύπο του στρες (van de Guchte et al. 2002).

Σήμερα, έχει αρχίσει να αναγνωρίζεται και η σημασία της μελέτης στρες, τα οποία προέρχονται από βιολογικούς παράγοντες. Ένα σημαντικό παράδειγμα τέτοιου στρες αποτελεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και άλλων βακτηρίων (οξυγαλακτικών ή μη), κατά τη φάση της ζύμωσης. Ειδικά στις φυσικές ζυμώσεις, το οικοσύστημα είναι πολύπλοκο και τα βακτηριακά είδη που συμμετέχουν σε αυτό επιδίδονται σε ένα βιολογικό πόλεμο, με παθητικές αλλά και ενεργητικές στρατηγικές. Ως παθητικές μπορούμε να εκλάβουμε τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά, ενώ ως ενεργητικές, την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες.

1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτηριοσίνες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ευρέως γνωστά για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οργανικά οξέα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διοξείδιο του άνθρακα, διακετύλιο και βακτηριοσίνες (Caplice and Fitzgerald 1999; Ross et al. 2002). Οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες που συντίθενται ριβοσωμικά, δηλαδή κωδικοποιούνται από δομικά γονίδια, σε αντίθεση με τα ενζυματικής σύνθεσης αντιβιοτικά πεπτίδια (Dufour et al. 2006) και εκδηλώνουν, ως επί το πλείστον, αντιμικροβιακή δράση έναντι φυλογενετικά συγγενών στελεχών (De Vuyst and Vandamme 1994). Αρκετές βακτηριοσίνες είναι δραστικές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων, όπως είναι το *Clostridium* spp., ο *Staphylococcus aureus* και η *Listeria monocytogenes* (Nettles and Barefoot 1993; Ennahar et al. 2000).

1.3.1 Λαντιβιοτικά και πιθανή χρήση τους στα τρόφιμα

Τα λαντιβιοτικά αποτελούν μία οικογένεια αντιμικροβιακών πεπτιδίων, που παράγονται από θετικά κατά Gram βακτήρια και έχουν δράση σε άλλα βακτήρια, ενώ το στέλεχος που τα παράγει είναι ανθεκτικό στη δράση των δικών του πεπτιδίων (Draper et al. 2008). Τα λαντιβιοτικά συντίθενται στο ριβόσωμα, με μία αλληλουχία-οδηγό στο αμινο-τελικό άκρο και στη συνέχεια τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά (Bierbaum et al. 2009). Η αλληλουχία-οδηγός διατηρεί τα πεπτίδια ανενεργά για όσο βρίσκονται μέσα στο βακτηριακό κύτταρο που τα παράγει. Όταν τα πεπτίδια εξέλθουν από το κύτταρο, η αλληλουχία-οδηγός απομακρύνεται, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των πεπτιδίων. Τα λαντιβιοτικά περιέχουν δακτυλίους λανθειονίνης (lanthionine-lan) και μεθυλο-λανθειονίνη (methyllanthionine-melan) (McAuliffe et al. 2001), οι οποίοι συνεισφέρουν στην αντίσταση στην πρωτεόλυση και στη θερμική αδρανοποίηση (Hurst 1981; Bierbaum et al. 1996).

Πολλά από αυτά τα πεπτίδια είναι πιθανοί ισχυροί αντιμικροβιακοί φορείς, με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην κλίμακα του nM (Chatterjee et al. 2005). Τα λαντιβιοτικά είναι ενεργά απέναντι σε πολλούς κοινούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και εμφανίζουν μια πολλά υποσχόμενη δραστηριότητα έναντι επιμολύνσεων από τον *Staphylococcus aureus* και βακτήρια του γένους *Enterococcus* (Cotter et al. 2005). Πολλά λαντιβιοτικά παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία θεωρούνται «γενικώς αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (GRAS-Generally Recognized As Safe) και συνεπώς δεν αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Άρα τα παραγόμενα από αυτά λαντιβιοτικά φαίνονται να είναι μια καλή επιλογή για την ασφάλεια των τροφίμων.

Σήμερα, η έρευνα εστιάζεται στη χρήση των λαντιβιοτικών για τη συντήρηση και την ασφάλεια των τροφίμων, όπως επίσης και στη χρήση τους στον θεραπευτικό τομέα, τόσο για ανθρώπους όσο και για ζώα (Cotter et al. 2005). Παρά το γεγονός ότι τα λαντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων εδώ και πολύ καιρό, η ανθεκτικότητα που μπορεί να επαχθεί στα λαντιβιοτικά είναι πολύ μικρή και αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τον τρόπο δράσης τους στα βακτήρια. Οι βακτηριοσίνες παρεμβαίνουν στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος ενώ ταυτόχρονα δημιουργούν πόρους στην κυτταρική μεμβράνη, με συνέπεια την

απώλεια κυτταρικών συστατικών και το θάνατο των κυττάρων. Η διπλή αυτή δράση καθιστά πιο δύσκολη την επαγωγή ανθεκτικότητας των βακτηρίων-στόχων (Chatterjee et al. 2005).

Η νισίνη, η οποία προστίθεται εδώ και 40 χρόνια στο επεξεργασμένο τυρί για να εμποδίσει την αλλοίωση από βακτήρια του γένους *Clostridium*, είναι το μόνο λαντιβιοτικό που επιτρέπεται να χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό (E234), σε γαλακτοκομικά και μη τρόφιμα (Delves-Broughton et al. 1996). Η κλωστριδιακή αλλοίωση των ημίσκληρων τυριών, αυτήν τη στιγμή, αντιμετωπίζεται με τη χρήση νιτρικών αλάτων, τα οποία ανάγονται προς νιτρώδη κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Τα νιτρικά, όμως, αναστέλλουν την ανάπτυξη των προπιονικών βακτηρίων στα τυριά Ελβετικού τύπου και, επιπροσθέτως, μπορούν να αντιδράσουν με αρωματικά αμινοξέα προς παραγωγή νιτροζαμινών, πολλές από τις οποίες είναι καρκινογόνες. Έτσι, βακτηριοσίνες, όπως η νισίνη, αποτελούν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική, ως προς τη χρήση των νιτρικών, λύση (Rilla et al. 2003). Δυστυχώς όμως η νισίνη δεν είναι τόσο διαλυτή και σταθερή σε ουδέτερο pH και είναι ευαίσθητη στη δράση των πρωτεασών (Liu and Hansen 1990; Davies et al. 1998), ενώ για τη χρήση της θα πρέπει να προστίθενται στην εναρκτήρια καλλιέργεια επιπλέον στελέχη ανθεκτικά σε αυτήν (Oumer et al. 2001; Benech et al. 2002).

1.4 Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 και η βακτηριοσίνη μασεδοσίνη

1.4.1 Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198

Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 είναι ένα στέλεχος οξυγαλακτικού βακτηρίου που απομονώθηκε πρόσφατα από το ελληνικό τυρί Κασσέρι. Είναι θερμοφίλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 42.3° C και άριστη τιμή pH 6.4. Το βακτήριο αυτό παράγει το, κατάλληλο για τρόφιμα, λαντιβιοτικό μασεδοσίνη, όταν αναπτύσσεται σε άπαχο γάλα, ενισχυμένο με αζωτούχες πηγές (Tsakalidou et al. 1998; Georgalaki et al. 2002). Οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH για την άριστη ανάπτυξη του *S. macedonicus* ACA-DC 198 προσομοιάζουν τις συνθήκες που επικρατούν κατά την παρασκευή τυριών. Ο θερμοφίλος χαρακτήρας του ίσως προέρχεται από προσαρμογή του στον οικολογικό του θώκο (ecological niche), καθώς το στέλεχος απομονώθηκε από το Κασσέρι, που ανήκει στην κατηγορία των

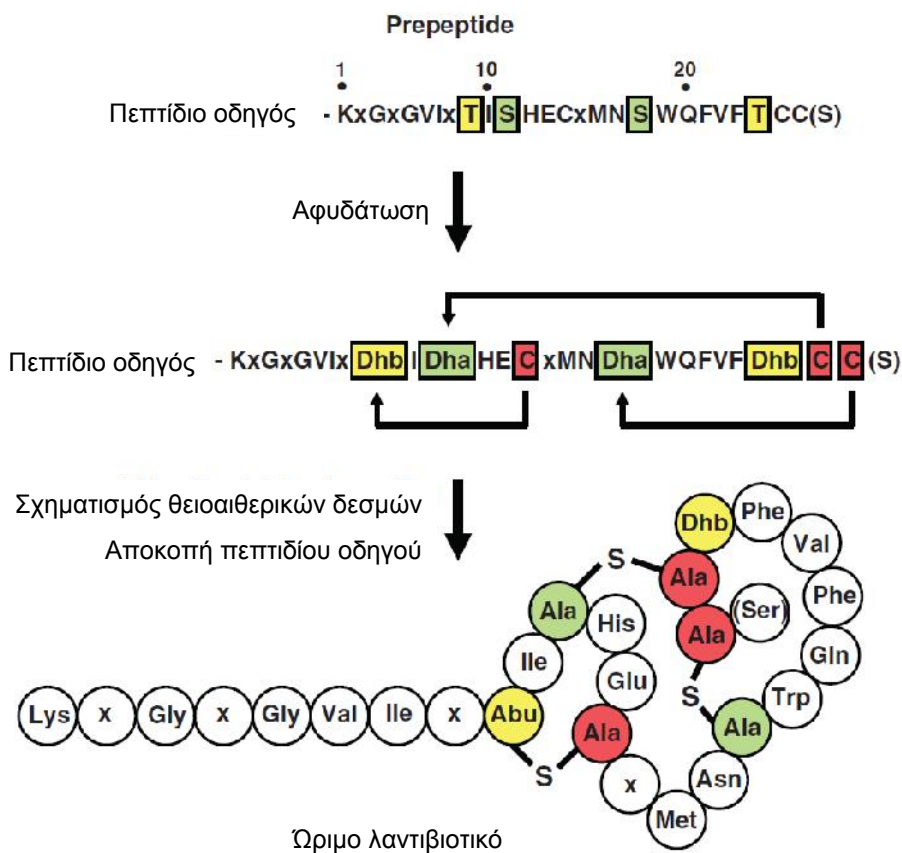
τυριών Pasta Filata, τα οποία αναθερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες (αρχικά στους 40-50° C και εν συνεχεία στους 70-80°C). Η άριστη τιμή pH για την ανάπτυξη του μοιάζει πολύ με τις τιμές που επικρατούν στο νωπό αγελαδινό γάλα που είναι περίπου στο pH 6.6. Τέλος, σύμφωνα με μελέτες (Van den Berghe et al. 2005) η μασεδοσίνη παράγεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 45° C και σε τιμές pH από 6.9 έως 5.1.

1.4.2 Μασεδοσίνη – Ομάδα Λακτισίνης 481 (*Lacticin 481 group*)

Όπως όλα τα λαντιβιοτικά, οι βακτηριοσίνες της ομάδας λακτισίνης 481 συντίθενται από ένα πρόδρομο πεπτίδιο, που κωδικοποιείται από ένα δομικό γονίδιο. Το πρόδρομο πεπτίδιο αποτελείται από το N-τελικό πεπτίδιο-οδηγό και το C-τελικό προπεπτίδιο. Το τελικό ενεργό λαντιβιοτικό προκύπτει μετά την ενζυμική μετα-μεταφραστική τροποποίηση κάποιων αμινοξέων και την απομάκρυνση του N-τελικού πεπτιδίου-οδηγού κατά την έξοδο του μορίου από το παραγωγό κύτταρο.

Στην ομάδα αυτήν ανήκει η μασεδοσίνη, η οποία εκδηλώνει αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και του *Clostridium tyrobutyricum* (Anastasiou et al. 2009), έχει μοριακό βάρος 2.5 kDa, είναι ενεργή σε τιμές pH μεταξύ 4.0 και 9.0, ανθεκτική στην αποστείρωση και εμφανίζει ευαισθησία στην πυτιά, μόνο μετά από 24 ώρες επώασης (Georgalaki et al. 2002). Οι άριστες συνθήκες για την παραγωγή βακτηριοσινών σπάνια ταυτίζονται με αυτές για την ανάπτυξη του βακτηρίου που τις παράγει (Parente and Ricciardi 1994; Parente et al. 1994; Matsusaki et al. 1996; Lejeune et al. 1998; Cheigh et al. 2002; Mataragas et al. 2003). Στην περίπτωση της μασεδοσίνης όμως η άριστη θερμοκρασία για την παραγωγή της, δηλαδή θερμοκρασίες από 20 έως 25° C, είναι αρκετά χαμηλότερη από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *S. macedonicus* ACA-DC 198, που είναι 42.3° C, ενώ η άριστη τιμή pH για την παραγωγή της ταυτίζεται με αυτήν για την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους (pH 6.4 και 6.0 αντίστοιχα). Συνεπώς, ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη εναρκτήρια ή βιοπροστατευτική καλλιέργεια, για την παραγωγή του Κασσεριού, κατά την οποία χρησιμοποιούνται μεσόφιλες και θερμόφιλες καλλιέργειες. Η οξίνιση του γάλακτος από τη θερμόφιλη εναρκτήρια καλλιέργεια γίνεται στους 37° C για 30 λεπτά, ακολουθεί η προσθήκη της πυτιάς και ο σχηματισμός πήγματος και η θέρμανση στους

45° C, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό του πήγματος και του ορού. Στη συνέχεια, το στραγγισμένο πήγμα (Μπασκί) παραμένει στους 20-22° C για 2-3 ημέρες, ώστε να επέλθει πτώση του pH του στην τιμή 5.2 (Arvanitoyannis and Mavrououlos 2000; Kaminarides et al. 1999) και ακολουθεί η αναθέρμανση του πήγματος στους 70-80°C πριν το τυρί οδηγηθεί για την πλήρη ωρίμαση. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, το pH μπορεί να αυξηθεί, λόγω πρωτεολυτικής δραστηριότητας της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας. Το τελικό pH του Κασσεριού, μετά από περίοδο ωρίμασης 21 ημερών στους 16° C και 70 ημερών στους 4° C είναι 5.7 (Anifantakis 1991). Η σταθερότητα της μασεδοσίνης κατά τη διάρκεια όλης της παραπάνω διαδικασίας, είναι ενθαρρυντική για ενδεχόμενη αποτελεσματική εφαρμογή της και μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τη δομή του λαντιβιοτικού και τους δακτυλίους λανθειονίνης που φέρει (Anastasiou et al. 2009) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση της βιοσύνθεσης λαντιβιοτικών της ομάδας της Λακτισίνης 481. Η Λακτισίνη 481 (όπως και η μασεδοσίνη) αποτελείται από τρεις δακτυλίους, δύο που περιέχουν λανθειονίνη (Ala-S-Ala), καθώς και έναν που περιέχει μεθυλο-λανθειονίνη (Abu-S-Ala) και μία αφυδατωμένη θρεονίνη (Dhb).

1.4.2.1 Η μασεδοσίνη και το *Clostridium tyrobutyricum*

Η μασεδοσίνη αναστέλλει ένα ευρύ φάσμα οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και πολλούς αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ανασταλτική της επίδραση φαίνεται ότι εξαρτάται από το είδος ή ακόμα και από το στέλεχος του μικροοργανισμού στόχου (Georgalaki et al. 2002).

Το βακτήριο *Clostridium tyrobutyricum* είναι ένα θετικό κατά Gram, αναερόβιο, σποριογόνο βακτήριο που θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας που προκαλεί το «όψιμο φούσκωμα», βασικό ελάττωμα στα ημίσκληρα και σκληρά τυριά, τα οποία έχουν μεγάλο χρόνο ωρίμασης, όπως είναι το Κασσέρι, το Gruyere, το Emmental, το Gouda, το Parmigiano και το Grana Padano. Όλα έχουν σχετικά υψηλό pH (5.3-5.5), με αποτέλεσμα να ευνοείται η εκβλάστηση των σπορίων του *Clostridium* (Steffen et al. 1993; Walstra et al. 1993). Η βιοχημική βάση του ελαττώματος αυτού είναι η μετατροπή, μέσω της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος προς οξικό και βουτυρικό οξύ, διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου. Το βουτυρικό οξύ προσδίδει ταγή γεύση στο τυρί ενώ η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αερίου υδρογόνου προκαλεί τη διεύρυνση των τρυπών και, σε σπάνιες περιπτώσεις, ακόμα και το σκάσιμο των τυριών. Τα ελαττώματα αυτά έχουν σαν συνέπεια την απώλεια της εμπορικής αξίας του προϊόντος και άρα οικονομική ζημιά για τον παραγωγό.

Οι πιο κοινές προσεγγίσεις για την αποφυγή του όψιμου φουσκώματος περιλαμβάνουν την τεχνική bactofugation (τεχνική απομάκρυνσης μικροοργανισμών από το γάλα, μέσω φυγοκέντρησης), τη μικροδιήθηση του γάλακτος και τέλος την προσθήκη νιτρικών ή λυσοζύμης (Lodi 1990; Stadhouders 1990; Van den Berg et al. 2004). Οι τεχνικές αυτές όμως συχνά έχουν σαν συνέπεια την εμφάνιση δευτερευόντων παρενεργειών. Μία εναλλακτική είναι η χρήση προστατευτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία διαθέτουν πολλές προοπτικές στη βιοσυντήρηση των τροφίμων. Στη σημερινή εποχή, η βιοσυντήρηση ανταποκρίνεται περισσότερο στις απαιτήσεις των καταναλωτών, οι οποίοι προτιμούν τρόφιμα ασφαλή και υγιεινά, τα οποία έχουν υποστεί την ελάχιστη επεξεργασία (Anastasiou et al. 2009).

Το στέλεχος *S. macedonicus* ACA-DC 198 έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την αναστολή της εκβλάστησης και ανάπτυξης των σπορίων του *Clostridium tyrobutyricum* σε γαλακτικές ζυμώσεις, υπό συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές που επικρατούν κατά την

παραγωγή και ωρίμαση του Κασσεριού. Η μείωση που επιτεύχθηκε ήταν μέχρι 1.40 λογαριθμικές μονάδες, σε δείγμα Κασσεριού ζύμωσης 10 ημερών, σε σύγκριση με ζύμωση στην οποία είχαν προστεθεί εναρκτήριες καλλιέργειες *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Η παρεμπόδιση αυτή της εκβλάστησης των σπορίων του *Clostridium tyrobutyricum* δε θα μπορούσε να αποδοθεί μόνο στο χαμηλό pH και στην παρουσία οργανικών οξέων, αφού οι συνθήκες pH και συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ζυμώσεων (Anastasiou et al. 2009).

1.4.2.2 Βιοσύνθεση της μασεδοσίνης

Πρόσφατα, έγινε η αλληλούχηση μίας περιοχής του γονιδιώματος του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, μεγέθους 15,171 bp, η οποία περιέχει το σύμπλοκο γονιδίων (ρεγουλόνιο) που κωδικοποιούν την παραγωγή μασεδοσίνης. Η περιοχή περιλαμβάνει 10 πλαίσια ανάγνωσης, που αντιστοιχούν στα γονίδια *mcdKRAA'AIMTFEG*, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση και τη σύνθεση της μασεδοσίνης, καθώς και στην ανοσία του στελέχους προς αυτήν (Εικόνα 2). Το σύμπλοκο γονιδίων της μασεδοσίνης είναι οργανωμένο σε δύο οπερόνια, ένα ρυθμιστικό και ένα βιοσυνθετικό/ανοσίας. Ακόμα, περιέχει ένα πρόσθετο δομικό γονίδιο, το *mcdA'*, καθώς και ένα πιθανό γονίδιο τρανσποζάσης, το *tnp*, το οποίο εντοπίζεται ανοδικά από το *mcdR* (Papadelli et al. 2007).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του ρεγουλονίου σύνθεσης της μασεδοσίνης. Τα γονίδια *macA*, *macA'* και *macAI* είναι δομικά γονίδια. Το γονίδιο *macM* ρυθμίζει το μετα-μεταφραστικό σχηματισμό θειοαιθερικών δεσμών. Το *macT* αποκόπτει το πεπτιδίο οδηγό και μεταφέρει τη μασεδοσίνη στο εξωτερικό του κυττάρου. Τα γονίδια *macF*, *macE* και *macG* αποτελούν ABC μεταφορείς που εμπλέκονται στην ανοσία του κυττάρου που παράγει τη μασεδοσίνη προς αυτήν. Τα γονίδια *macK* και *macR* ρυθμίζουν την έκφραση του ρεγουλονίου και το *macTnp* αποτελεί ένδειξη ότι το οπερόνιο μπορεί να έχει προέλθει από οριζόντια μεταφορά.

1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να εντοπίσει τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της βακτηριοσίνης μασεδοσίνης που παράγεται από το βακτήριο *S. macedonicus* ACA-DC 198, έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται ή που μπορεί να εμφανιστούν στα τρόφιμα.

Επίσης, η συσσώρευση δεδομένων και πληροφοριών προκειμένου να εκτιμηθούν τα τεχνολογικά πλεονεκτήματα της μασεδοσίνης, ως προς τη χρήση της ως βιο-συντηρητικό κατά την παραγωγή τυριών, λαμβάνοντας υπ' όψιν την παγκόσμια τάση που υπάρχει στη σύγχρονη εποχή για τρόφιμα φυσικά, ελάχιστα επεξεργασμένα, απαλλαγμένα από χημικά συντηρητικά.

Με βάση τα παραπάνω λοιπόν, δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 που ήταν ανθεκτικά στη δράση της μασεδοσίνης. Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 είναι ο αναγνωρισμένος μικροοργανισμός-μοντέλο για τη γενετική των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η γνώση που αποκομίζεται συνεχώς από την έρευνα πάνω σε αυτό το στέλεχος έχει αξιοποιηθεί τόσο σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές όσο και σε θέματα βασικής έρευνας. Είναι σημαντικό ότι για το στέλεχος αυτό, υπάρχουν τεχνικές για την ανάλυση εισαγόμενων τμημάτων DNA μέσω ομόλογου ή ετερόλογου ανασυνδυασμού. Αντίθετα, δεν ήταν δυνατή η χρήση του *Clostridium tyrobutyricum* για τη δημιουργία των μεταλλαγμένων στελεχών, γιατί δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα κατάλληλα εργαλεία για τη γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού αυτού.

Επιπλέον, οι τεχνικές με τις οποίες δημιουργήσαμε τις μεταλλάξεις στο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 οδηγούν σε μεταλλαγμένα στελέχη που, θεωρητικά, είναι συμβατά με τα τρόφιμα. Τα στελέχη αυτά μπορούν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν σαν εναλλακτικές εναρκτήριες καλλιέργειες, που να μην επηρεάζονται από την αντιμικροβιακή δράση της μασεδοσίνης, είτε αυτή προστίθεται απευθείας, είτε παράγεται από τον *S. macedonicus* ACA-DC 198 σαν συμπληρωματική καλλιέργεια.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία, είναι ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 και το στέλεχος *Escherichia coli* EC101.

Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* αναπτυσσόταν σε θρεπτικό μέσο M17, ενισχυμένο με 0.5-1.0% w/v γλυκόζη, παρουσία ή απουσία 1 µg/ml ερυθρομυκίνης. Το βακτήριο *E. coli* EC101 αναπτυσσόταν σε θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani Media), παρουσία ή απουσία 200 µg/ml ερυθρομυκίνης.

2.2 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος *E. coli* EC101

2.2.1 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1

Η απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από στελέχη EC101, πραγματοποιήθηκε με το Quantum Prep, Plasmid Miniprep kit, της εταιρείας BIO-RAD. Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- 1) 2 ml στατικής καλλιέργειας (24 ώρες στους 37° C υπό ανάδευση) του στελέχους EC101, μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο pGh9:ISS1, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο Eppendorf μικροφυγοκέντρωσης. Στα 2 ml περιέχονταν περίπου 2×10^9 κύτταρα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 12-14,000 g για 15-30 s ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα και το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
- 2) Προστέθηκαν 200 µl από το διάλυμα επαναιώρησης (Cell Resuspension Solution) και, με ισχυρή ανάδευση, έγινε επαναιώρηση των κυττάρων.
- 3) Προστέθηκαν 250 µl από το διάλυμα λύσης (Cell Lysis Solution) και το περιεχόμενο του σωλήνα αναμίχθηκε, με ήπια αναστροφή περίπου 10 φορές. Επιτεύχθηκε, έτσι, η λύση των βακτηριακών κυττάρων, οπότε το διάλυμα έγινε ιξώδες και διαυγές.

- 4) Προστέθηκαν 250 μl από το διάλυμα εξουδετέρωσης (Neutralization Solution) και ακολούθησε ήπια ανακίνηση, όπως και παραπάνω. Σχηματίστηκε ορατό ίζημα, που αποτελούνταν από το κυτταρικό τοίχωμα, τις πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA.
- 5) Έγινε φυγοκέντρηση σε 12-14,000 g για 5 λεπτά, σε μικροφυγόκεντρο. Στο στάδιο αυτό κατακρημνίστηκαν οι πρωτεΐνες, το κυτταρικό τοίχωμα και το χρωμοσωμικό DNA, που βρίσκεται χαλαρά συνδεδεμένο με το κυτταρικό τοίχωμα. Στον πυθμένα του σωλήνα εμφανίστηκε συμπαγές, λευκό ίζημα ενώ στο υπερκείμενο βρισκόταν το πλασμιδιακό DNA.
- 6) Το υπερκείμενο από τη φυγοκέντρηση του βήματος 5 που περιείχε το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρθηκε σε στήλη (Spin Column). Προστέθηκαν 200 μl από το Quantum Prep matrix και αναμίχθηκαν καλά με την πιπέτα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 12-14,000 g για 30 s.
- 7) Απομακρύνθηκε το διήθημα, προστέθηκαν 400 μl από το διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 12-14,000 g για 30 s. Το διάλυμα έκπλυσης περιείχε 50% αιθανόλη, η οποία προκαλεί αφυδάτωση του DNA, το οποίο παρέμεινε με το αρνητικό φορτίο του και έτσι δεσμεύθηκε από τους πόρους του πυριτίου της στήλης.
- 8) Απομακρύνθηκε το διήθημα, προστέθηκαν 400 μl από το διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 12-14,000 g για 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της αιθανόλης. Οι εκπλύσεις έγιναν επίσης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα από πρωτεΐνες που δεν έχουν μετουσιωθεί και μόρια RNA, ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του DNA.
- 9) Η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο Eppendorf του 1.5 ml. Προστέθηκαν 100 μl από TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) για την ενυδάτωση του DNA και έγινε έκλουσή του από τη στήλη με φυγοκέντρηση σε 12-14,000 g για 1 λεπτό.
- 10) Απορρίφθηκε η στήλη και το καθαρό πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20° C.

2.2.2 Επιβεβαίωση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA

Για την επιβεβαίωση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA, έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, η οποία έχει μία θέση πέψης στο πλασμίδιο pGh9:ISS1. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του μητρικού και του κομμένου πλασμιδίου σε πηκτή αγαρόζης 0.7% w/v, ως εξής:

- Σε 40 ml του διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (0.004 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) προστέθηκαν 280 mg αγαρόζη
- Το διάλυμα θερμάνθηκε, μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
- Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 60° C και προστέθηκαν 2 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε η χτένα και έπηξε, σε θερμοκρασία δωματίου, σχηματίζοντας την πηκτή
- Απομακρύνθηκε η χτένα και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 x TAE. Στα σχηματιζόμενα από τη χτένα κενά τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer-0.25% w/v Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 40% w/v glycerol)

2.3 Μετασηματισμός του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με το πλασμίδιο pGh9:ISS1

Για τη δημιουργία κυττάρων ικανών προς μετασηματισμό, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο M17, ενισχυμένο με 0.5% w/v γλυκόζη (GM17), στους 30° C, μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα 0.5-0.8, στα 600 nm. Στη συνέχεια, έγινε εμβολιασμός 1% σε SGM17 (GM17 που περιέχει 0.5M σακχαρόζη, ενισχυμένο με 1% w/v γλυκίνη). Μετά από ανάπτυξη στους 30°C (οπτική πυκνότητα 0.2-0.7 στα 600 nm), τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση σε 5,000 g στους 4°C. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0.5M που περιείχε 10% w/v γλυκερόλη και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν στο 1% του όγκου της καλλιέργειας, στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις και αποθηκεύτηκαν στους -85°C μέχρι τη χρήση τους.

Τα εναιωρήματα των κυττάρων έλιωσαν σε πάγο. Ποσότητες των 40 μl αναμίχθηκαν με 1 μl πλασμιδιακού DNA, μεταφέρθηκαν σε παγωμένη κυψελίδα ηλεκτρομετασηματισμού (electroporation cuvette), με απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της 2 mm και, στη συνέχεια, εκτέθηκαν σε έναν ηλεκτρικό παλμό. Ο ηλεκτρομετασηματισμός έλαβε χώρα υπό τάση 12.5 kV/cm κυψελίδας και είχε διάρκεια 4.5-5 ms. Αμέσως μετά, τα εναιωρήματα αναμίχθηκαν με 0.96 ml παγωμένου SGM17, που περιείχε 20 mM MgCl₂ και 2 mM CaCl₂ (SGM17MC) και

παρέμειναν σε πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα, έγιναν κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις σε SGM17MC και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 30°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε αραιώση εξαπλώθηκαν επιφανειακά σε τρυβλία που περιείχαν M17, ενισχυμένο με 1% w/v γλυκόζη και 1.5% άγαρ. Τα τρυβλία περιείχαν 1μg/ml ερυθρομυκίνης για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη. Παράλληλα, έγινε επιφανειακή εξάπλωση ίσων ποσοτήτων καλλιέργειας του στελέχους *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 αγρίου τύπου (wild type) (ως μάρτυρας) σε τρυβλία που δεν περιείχαν ερυθρομυκίνη. Οι αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων μετρήθηκαν μετά από επώαση 2 ημερών στους 30°C και εμβολιάστηκαν σε M17 που περιείχε 0.5% w/v γλυκόζη και 180mM MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid], καθώς και 1 μg/ml ερυθρομυκίνης. Οι αποικίες των κυττάρων του στελέχους αγρίου τύπου εμβολιάστηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο, αλλά χωρίς την παρουσία ερυθρομυκίνης. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες (Holo and Nes 1989).

2.4 Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών για την επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, ανθεκτικών στη μασεδοσίνη, μέσω της μετάθεσης του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1

Καλλιέργεια του στελέχους *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 αγρίου τύπου επώαστηκε σε GM17 (M17 και 0.5% w/v γλυκόζη), στους 30°C για 24 ώρες και έγινε ανανέωση της καλλιέργειας (1%v/v) σε GM17. Η νέα καλλιέργεια επώαστηκε στους 30°C για 2.5 ώρες και στους 37.5°C για άλλες 2.5 ώρες. Η καλλιέργεια περιείχε 10^8 - 10^9 κύτταρα/ml. Ακολούθως, έγιναν δύο αραιώσεις, (α) αραιώση 1/10, οπότε ο αριθμός κυττάρων/ml ήταν 10^7 - 10^8 και (β) αραιώση 1/100, όπου ο αριθμός κυττάρων/ml ήταν 10^6 - 10^7 . Έγινε επιφανειακή εξάπλωση σε τρυβλία με M17, ενισχυμένο με 0.5% w/v γλυκόζη και 160 mM MOPS, 1.5% άγαρ και μασεδοσίνη, σε συγκεντρώσεις 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 και 5.0% v/v. Η επιφανειακή εξάπλωση στα τρυβλία πραγματοποιήθηκε με 100 μl από την αρχική καλλιέργεια (που αντιστοιχούν σε 10^7 - 10^8 κύτταρα/ml), με 100 μl από την αραιώση 1/10 (που αντιστοιχούν σε 10^6 - 10^7 κύτταρα/ml) και με 100 μl από την αραιώση 1/100 (που αντιστοιχούν σε 10^5 - 10^6 κύτταρα/ml), στις διαφορετικές συγκεντρώσεις μασεδοσίνης. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37.5°C για 48 ώρες.

Πραγματοποιήθηκε επανάληψη του παραπάνω πειράματος με αποικία του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 μετασηματισμένου με τον πλασμιδιακό φορέα pGh9:ISS1. Η καλλιέργεια της μετασηματισμένης αποικίας, που επώαστηκε σε M17 – MOPS, με 1μg/ml ερυθρομυκίνης, στους 30°C για 24 ώρες, εμβολιάστηκε 1% σε M17 – MOPS χωρίς ερυθρομυκίνη και επώαστηκε στους 30°C για 2.5 ώρες και στους 37.5°C για 2.5 ώρες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το στέλεχος αγρίου τύπου (αρνητικός μάρτυρας). Στη συνέχεια, έγινε επιφανειακή εξάπλωση σε τρυβλία με M17 ενισχυμένο με 0.5% w/v γλυκόζη, 160 mM MOPS και 1.5% άγαρ, 1 μg/ml ερυθρομυκίνης και μασεδοσίνη στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: (α) για την αραιώση 1/10 χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 3.5, 4.0 και 4.5%, σε 5 τρυβλία για την κάθε μία συγκέντρωση και (β) για την αραιώση 1/100 1.5, 2.0 και 2.5%, σε 5 τρυβλία για την κάθε μία συγκέντρωση. Η επιφανειακή εξάπλωση του στελέχους αγρίου τύπου έγινε στο ίδιο θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία ερυθρομυκίνης, και επιστρώθηκαν 100 μl από την αρχική καλλιέργεια (10^7 - 10^8 κύτταρα/ml) σε 1 τρυβλίο, 100 μl από την αραιώση 1/10 (10^6 - 10^7 κύτταρα/ml) σε 1 τρυβλίο και 100 μl από την αραιώση 1/100 (10^5 - 10^6 κύτταρα/ml) σε 1 τρυβλίο, στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις μασεδοσίνης. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37.5°C για 48 ώρες.

Τα πιθανά μεταλλαγμένα στελέχη που προέκυψαν από τη μεταλλαξογένεση του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, μέσω της μετάθεσης του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1, μετά από την επιλογή τους, αναπτύχθηκαν σε υγρό GM17 (1.0% w/v γλυκόζη), το οποίο περιείχε 1 μg/ml ερυθρομυκίνης, στους 37.5°C για 24 ώρες και απομονώθηκαν νέες μεμονωμένες αποικίες για κάθε στέλεχος, μετά από επιφανειακή εξάπλωση (streaking) σε GM17 (1% w/v γλυκόζη) και 1.5% άγαρ, παρουσία ερυθρομυκίνης και επώασή τους στους 37.5°C για 48 ώρες. Η ανάπτυξη επαναλήφθηκε, εμβολιάζοντας τις μεμονωμένες αποικίες σε GM17 (1% w/v γλυκόζη) με 1 μg/ml ερυθρομυκίνης και επωάζοντας στους 37.5°C για 24 ώρες. 200 μl από κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση των στελεχών σε υγρό GM17 με 20% w/v γλυκερόλη, στους -80°C.

2.5 Επιβεβαίωση του μεταλλαγμένου φαινότυπου ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη των στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 που επιλέχθηκαν

Τα μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν στους 37.5°C για 24 ώρες, σε GM17 (0.5% w/v γλυκόζη), παρουσία 1 µg/ml ερυθρομυκίνης. Έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (10^0 - 10^{-3}) και 2 µl από το εναιώρημα τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια ενός τρυβλίου με M17 – MOPS, με 0.5% w/v γλυκόζη και 160 mM MOPS, καθώς και μασεδοσίνη σε συγκεντρώσεις 0, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 v/v (χωρίς ερυθρομυκίνη). Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το άγριο στέλεχος του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, υπό τις ίδιες συνθήκες.

2.6 Επιβεβαίωση της μετάλλαξης μέσω της μετάθεσης του πλασμιδιακού φορέα *pGh9:ISS1*, με ανάλυση κατά Southern του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363

2.6.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363

Η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με το GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma) με τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμάστηκε διάλυμα λυσοζύμης 10 mg/ml. Για κάθε δείγμα χρειάστηκαν 200 µl λυσοζύμης.
- 2) 1.5 ml από στατική καλλιέργεια (24 ώρες στους 37.5°C σε GM17) φυγοκεντρήθηκε σε 12,000-16,000 g για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
- 3) Το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρήθηκε σε 200 µl λυσοζύμης και επώαστηκε για 30 λεπτά στους 37°C. Σε αυτό το στάδιο η λυσοζύμη έδρασε στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, υδρολύοντάς το. Προστέθηκαν 20 µl από διάλυμα RNάσης (RNase A Solution) και έγινε επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για να υδρολυθούν τυχόν υπολείμματα RNA.
- 4) Προστέθηκαν 20 µl από το διάλυμα πρωτεϊνάσης K (Proteinase K solution) για την πέψη των κυτταρικών πρωτεϊνών και 200 µl από το διάλυμα λύσης (Lysis Solution C). Έγινε ισχυρή

ανάδευση για περίπου 15 δευτερόλεπτα και τα δείγματα επώαστηκαν στους 55°C για 10 λεπτά. Στο στάδιο αυτό επήλθε η λύση των κυττάρων και σχηματίστηκε ένα ομογενές μίγμα.

5) Σε κάθε στήλη GenElute Miniprep Binding Column που τοποθετήθηκε μέσα σε σωλήνες συλλογής των 2ml, προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα ενεργοποίησης στήλης (Column Preparation Solution), έγινε φυγοκέντρηση σε 12,000 g για 1 λεπτό και απορρίφθηκε το διήθημα. Το διάλυμα ενεργοποίησης μεγιστοποιεί τη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης και δίνει μεγαλύτερες αποδόσεις.

6) Προστέθηκαν 200 μl αιθανόλης (95-100%) στο λύμα των κυττάρων και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 5-10 δευτερόλεπτα. Προέκυψε ομογενές μίγμα. Η αιθανόλη αφυδάτωσε το DNA, το οποίο έτσι δεσμεύθηκε στη μεμβράνη της στήλης.

7) Μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενο των σωλήνων, δηλαδή τα λυμένα κύτταρα, μέσα στη στήλη. Έγινε φυγοκέντρηση σε $\geq 6,500$ g για 1 λεπτό. Απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής που περιείχε το διάλυμα της έκλουσης και η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής.

8) Προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα έκπλυσης 1 (Wash Solution 1) στη στήλη και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε $\geq 6,500$ g. Απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής και αντικαταστάθηκε από έναν νέο. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η πρώτη έκπλυση, για να απομακρυνθούν όλα τα άλλα συστατικά των κυττάρων, εκτός από το DNA.

9) Προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα έκπλυσης (Wash Solution) στη στήλη, για να γίνει η δεύτερη έκπλυση, και έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα (12,000-16,000 g), για να στεγνώσει η στήλη από την αιθανόλη που περιείχε το διάλυμα έκπλυσης. Η στήλη έπρεπε να είναι απαλλαγμένη από κάθε ίχνος αιθανόλης, πριν την έκλυση του DNA. Έγινε πρόσθετη φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης. Τελικά, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο σωλήνα συλλογής.

10) Προστέθηκαν 200 μl από το διάλυμα έκλουσης (Elution Solution) ακριβώς στο κέντρο της στήλης, έγινε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε $\geq 6,500$ g για 1 λεπτό, για να γίνει η έκλυση του DNA.

Το προϊόν της έκλουσης περιείχε καθαρό χρωμοσωμικό DNA, το οποίο αποθηκεύτηκε στους 4°C.

2.6.2 Παρασκευή ιχνηθέτη (probe)

Ο ιχνηθέτης παρασκευάστηκε με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάρια Eppendorf για PCR, όγκου 0.5 ml, ένα για έλεγχο και ένα για να ληφθεί ο ιχνηθέτης.

Στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκαν:

- 5 μl από το 10 x διάλυμα πολυμεράσης
- 2 μl διαλύματος dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP,) 5 mM, τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM
- 1 μl εκκινητή Forward (PrimerF)
- 1 μl εκκινητή Reverse (Primer R)
- 3 μl πλασμιδιακού DNA pGh9:ISS1
- 1 μl πολυμεράσης
και νερό, μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Στο δεύτερο σωληνάριο προστέθηκαν τα ίδια αντιδραστήρια, με τη διαφορά ότι, αντί για διάλυμα dNTPs, χρησιμοποιήθηκε μίγμα DIG DNA Labeling Mix της εταιρείας Roche (Manheim, Germany) που περιέχει 1mM dATP, 1mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP και 0.35 mM DIG-dUTP, τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM dATP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 0.065 mM dTT και 0.035 mM DIG-dUTP.

Το πλασμιδιακό DNA αρχικά αποδιατάχθηκε, στους 94°C για 2 λεπτά. Ακολούθησε παραμονή στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, η θερμοκρασία μειώθηκε στους 61°C για 1 λεπτό και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 72°C για 2.5 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν 35 τέτοιοι κύκλοι. Τέλος, με επιπλέον παραμονή στους 72°C για 20 λεπτά συντίθενται πλήρως οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια. Το σωληνάριο με τον ιχνηθέτη που περιέχει νουκλεοτίδια συνδεδεμένα με μόρια διγοξυγενίνης (DIG) αποθηκεύτηκε στους 4°C, μέχρι τη χρήση του. Για επιβεβαίωση, ο ιχνηθέτης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1.0%.

2.6.3 Πέψη του χρωμοσωμικού DNA και του πλασμιδίου *pGh9:ISS1* και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Έγινε πέψη του χρωμοσωμικού DNA (1μg) των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, καθώς και του πλασμιδιακού DNA, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (στους 37°C για 3 ώρες και στους 65° C για 20 λεπτά, για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο). Τα προϊόντα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 2.2.2), με τάση 60 V, για 1 ώρα και 40 λεπτά. Η πηκτή με το DNA καλύφθηκε με διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer-0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl) και παρέμεινε, υπό ανακίνηση, για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο στάδιο αυτό τα δίκλιωνα μόρια DNA μετατράπηκαν σε μονόκλιωνα. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, η πηκτή τοποθετήθηκε στο διάλυμα εξουδετέρωσης (Neutralization Buffer-0.5 M Tris, 1 M NaCl), όπου παρέμεινε, υπό ανακίνηση, για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξουδετερωθούν οι αλκαλικές συνθήκες που επικράτησαν με την προσθήκη του NaOH του διαλύματος αποδιάταξης και, επομένως, να μπορέσει ο ιχνηθέτης να υβριδιστεί με το DNA. Το DNA της πηκτής μεταφέρθηκε σε νάυλον Gene Screen PlusTM μεμβράνη (NEF-994; DuPont, 8.5 x 12.4 cm, 20 sheets), σε 20x SSC (3M NaCl, 0.3M Sodium citrate), σε ένα δοχείο με την εξής διάταξη:

- 20 x SSC στο δοχείο
- 2 φύλλα από χαρτί Whatman 3M, κομμένα λίγο μεγαλύτερα από την πηκτή, με τις άκρες τους να είναι βυθισμένες στο 20 x SSC
- η πηκτή
- περιτύλιγμα πλαστικής ελαστικής μεμβράνης
- η μεμβράνη
- 4 φύλλα χαρτιού Whatman 3M
- πολλές χαρτοπετσέτες
- ένα βάρος

Μετά από περίπου 24 ώρες, η μεταφορά επιτεύχθηκε και η μεμβράνη θερμάνθηκε στους 80°C για 2 ώρες ώστε να προσδεθεί και να ακινητοποιηθεί το DNA σε αυτήν (fixation).

2.6.4 Προϋβριδισμός

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κλειστό πλαστικό δοχείο, που περιείχε διάλυμα υβριδισμού (Hybridization Buffer-20 x SSC, 10% w/v Sarcocyl, 2.5 g Blocking reagent, 20% w/v SDS) και παρέμεινε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 65°C, υπό ήπια ανακίνηση, για τουλάχιστον 1 ώρα.

2.6.5 Προετοιμασία του ιχνηθέτη

Το διάλυμα του ιχνηθέτη επώαστηκε στους 100°C σε νερό και παρέμεινε εκεί για 10 λεπτά, για την αποδιάταξή του. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε πάγο, ώστε να διατηρηθεί η μονόκλωνη δομή του.

2.6.6 Υβριδισμός

Το διάλυμα υβριδισμού αντικαταστάθηκε με νέο και προστέθηκε ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης. Ο υβριδισμός έγινε στους 65°C για 18 ώρες τουλάχιστον, υπό ήπια ανακίνηση.

2.6.7 Ανοσολογική ανίχνευση του σήματος *Southern-DIG*

Μετά το τέλος του υβριδισμού, έγιναν 2 εκπλύσεις με κατάλληλο διάλυμα (Wash Buffer - 2 x SSC, 0.1% w/v SDS), για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση με το διάλυμα 1 (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl), για 1 λεπτό.

Η μεμβράνη επώαστηκε μέσα στο διάλυμα 2 (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% blocking reagent) υπό μέτρια ανάδευση. Ακολούθησε διάλυση 1/5,000 του αντι-DIG αντισώματος στο διάλυμα 2 και επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα του αντισώματος, για 30 λεπτά, υπό αργή ανάδευση. Έγιναν 2 εκπλύσεις με το διάλυμα 1, για 15 λεπτά, υπό μέτρια

ανάδευση, για να απομακρυνθεί η ποσότητα του αδέσμευτου ιχνηθέτη και η μεμβράνη εξισορροπήθηκε για 2 λεπτά στο διάλυμα 3 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Ακολούθησε επώαση στο διάλυμα χρωματικής αντίδρασης (31 μl NBT solution, 35 μl X-phosphate solution) μέσα σε κλειστή πλαστική σακούλα, σε σκοτεινό μέρος, χωρίς ανάδευση, για μερικά λεπτά. Όταν ανιχνεύθηκαν οι επιθυμητές ζώνες στη μεμβράνη, η χρωματική αντίδραση διακόπηκε με έκπλυση με νερό για 5 λεπτά. Η μεμβράνη στέγνωσε, τοποθετημένη σε χαρτί Whatman 3M. και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

2.7 Κλωνοποίηση της πλευρικής αλληλουχίας της περιοχής στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp.cremoris* MG1363, όπου εισήλθε το πλασμίδιο pGh9:ISS1

2.7.1 Παρασκευή κυττάρων του στελέχους *E. coli* EC101 ικανών προς μετασχηματισμό (Competent Cells)

1) Παρασκευάστηκε το διάλυμα TB, το οποίο περιείχε:

- 10 mM HEPES, pH 6.7
- 15 mM CaCl₂
- 55 mM MnCl₂
- 250 mM KCl

και τοποθετήθηκε σε πάγο.

2) Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1% v/v του στελέχους *E. coli* EC101 που δεν περιείχε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη, σε 5 ml LB και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες, υπό ανακίνηση.

3) Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 1% της καλλιέργειας σε 200 ml LB, μέσα σε κωνική φιάλη του 1 λίτρου και επώαση στους 37°C υπό δυνατή ανακίνηση (220 rpm) μέχρις αποκτήσεως οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (O.D₆₀₀) περίπου 0.6.

4) Η κωνική φιάλη απομακρύνθηκε από τον κλίβανο επώασης και τοποθετήθηκε σε πάγο, όπου παρέμεινε για 30 λεπτά.

- 5) Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 4 σωλήνες Falcon των 50 ml και φυγοκεντρήθηκε σε φυγόκεντρο που είχε προψυχθεί στους 4° C, σε 3,000 rpm για 10 λεπτά.
- 6) Τα ιζήματα που προέκυψαν επαναιωρήθηκαν σε 20 ml παγωμένου διαλύματος TB, ακολούθησε επώαση σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση όπως παραπάνω (βήμα 5).
- 7) Τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν απαλά σε 4 ml παγωμένου διαλύματος TB και προστέθηκαν 300 μl DMSO σε κάθε σωλήνα Falcon, με πολύ ήπιες κινήσεις.
- 8) Τα επαναιωρημένα ιζήματα επώαστηκαν σε πάγο για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, μοιράστηκαν σε επιμέρους ποσότητες των 200 μl εντός προψυγμένων σωληναρίων Eppendorf του 1.5 ml και τοποθετήθηκαν απευθείας στους -80° C.
- 9) Τα ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -80° C.

2.7.2 Πέψη του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363

Πραγματοποιήθηκε πέψη του χρωμοσωμικού DNA (1μg) των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, χρησιμοποιώντας την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Το μίγμα της πέψης περιείχε:

- 1 μg χρωμοσωμικό DNA του κάθε μεταλλαγμένου στελέχους
- 1 μl EcoRI
- 5 μl 10 x EcoRI buffer
- νερό, μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Η πέψη έγινε στους 37°C για 3 ώρες και ακολούθησε επώαση στους 65°C για 20 λεπτά, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

2.7.3 Κυκλοποίηση των γραμμικών προϊόντων της πέψης του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, μέσω αντίδρασης λιγάσης (Ligation)

Στα σωληνάρια των πέψεων προστέθηκαν 400 μl νερό και στη συνέχεια προστέθηκαν 1.5 μl του ενζύμου λιγάση (ligase) και 50 μl 10 x διάλυμα της λιγάσης και τοποθετήθηκαν στους 4°C για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες, επώστηκαν στους 65°C για 10 λεπτά, για να απενεργοποιηθεί η λιγάση.

2.7.4 Συμπύκνωση των προϊόντων της δράσης της λιγάσης

Η συμπύκνωση των προϊόντων της δράσης της λιγάσης πραγματοποιήθηκε με το Plasmid DNA Purification Kit, της Macherey-Nagel, ως εξής:

- 1) Προστέθηκαν 500 μl από το Διάλυμα A3 στο κάθε σωληνάριο Eppendorf που περιείχε το μίγμα της λιγάσης και ακολούθησε καλή ανάμιξη.
- 2) Τοποθετήθηκε μία στήλη (NucleoSpin[®] Plasmid) σε κάθε σωλήνα συλλογής (Collection Tube) των 2 ml, στην οποία φορτώθηκε το μίγμα της λιγάσης. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 11,000 x g για 1 λεπτό, το διήθημα απορρίφθηκε και η στήλη τοποθετήθηκε ξανά στο σωλήνα συλλογής.
- 3) Για την πλύση της μεμβράνης πυριτίου που βρίσκεται στη στήλη, προστέθηκαν 600 μl Διαλύματος A4. Έγινε φυγοκέντρηση στα 11,000 x g για 1 λεπτό, το διήθημα απορρίφθηκε και η στήλη τοποθετήθηκε ξανά στον άδειο σωλήνα συλλογής.
- 4) Για το στέγνωμα της μεμβράνης, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 11,000 x g για 2 λεπτά και απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής, μαζί με το περιεχόμενό του.
- 5) Τέλος, ακολούθησε η έκλουση του πλασμδιακού DNA που βρισκόταν στη μεμβράνη της στήλης. Η στήλη τοποθετήθηκε σε σωλήνες Eppendorf του 1.5 ml, προστέθηκαν 50 μl Διαλύματος AE, επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρήθηκαν στα 11,000 x g για 1 λεπτό.

2.7.5 Μετασχηματισμός των ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους *E. coli* EC101

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων του στελέχους *E. coli* EC101 έγινε με βάση το Transformation Protocol του TA Cloning Kit, της Invitrogen, ως εξής:

- 1) Τα σωληνάρια Eppendorf που περιείχαν το προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης φυγοκεντρήθηκαν στα 11,000 x g για 2 λεπτά και τοποθετήθηκαν στον πάγο.
- 2) Ένα σωληνάριο Eppendorf που περιείχε 200 μl από κύτταρα του στελέχους EC101 ικανά προς μετασχηματισμό ξεπάγωσαν τοποθετημένα μέσα στον πάγο.
- 3) Όλη η ποσότητα του πλασμιδίου προστέθηκε μέσα στο σωλήνα των ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων και έγινε καλή ανάμιξη με ήπιες κινήσεις.
- 4) Τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ, με παραμονή τους στους 42° C για 30 δευτερόλεπτα, χωρίς ανακίνηση και μεταφέρθηκαν απευθείας στον πάγο.
- 5) Προστέθηκαν 250 μl από θρεπτικό μέσο S.O.C., το οποίο περιείχε:
 - 4 g tryptone
 - 1 g yeast extract
 - 0.1 g NaCl
 - 0.02 g KCl
 - ρύθμιση του pH = 7
 - 0.36 g γλυκόζη
 - 0.2 g MgCl₂
- 6) Τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37°C για 1 ώρα, υπό ανακίνηση (225 rpm).
- 7) Έγινε επιφανειακή εξάπλωση 50 μl σε τρυβλία με LB, 1.5% άγαρ και 200 μg/ml ερυθρομυκίνη.
- 8) Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 7,000 x g για 2 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και όλη η ποσότητα του ιζήματος εξαπλώθηκε επιφανειακά σε τρυβλία με LB, 1.5% άγαρ και 200 μg/ml ερυθρομυκίνη.
- 9) Όλα τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 48 ώρες.

2.7.6 Colony PCR των αποικιών των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους *E. coli* EC101 και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για τη συνέχεια του πειράματος επιλέχθηκαν τα τρυβλία, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί επιφανειακή εξάπλωση των 50 μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων κυττάρων EC101, διότι σε αυτά οι αποικίες είχαν το κατάλληλο μέγεθος σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, στα οποία ο αριθμός των αποικιών ήταν πολύ μεγάλος, με αποτέλεσμα αυτές να συνωστίζονται και να είναι μικρές σε μέγεθος.

Συλλέχθηκαν 3 αποικίες από κάθε τρυβλίο και τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο Eppendorf με 20 μl νερό, το οποίο, στη συνέχεια, παρέμεινε στους 94°C για 4 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά και 5 μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για το Colony PCR που ακολούθησε.

Στο σωληνάριο του PCR προστέθηκαν:

- 2.5 μl από το 10 x διάλυμα πολυμεράσης
- 1 μl διαλύματος dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP,) 5 mM, τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM
- 0.5 μl εκκινητή Forward pGHF (PrimerF)
- 0.5 μl εκκινητή Reverse pGER (Primer R)
- 5 μl πλασμιδιακό DNA
- 0.5 μl πολυμεράσης
- νερό, μέχρι τελικό όγκο 25 μl

Το πλασμιδιακό DNA αρχικά αποδιατάχθηκε, στους 94° C για 2 λεπτά. Ακολούθησε παραμονή στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, η θερμοκρασία μειώθηκε στους 50° C για 1 λεπτό και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 72° C για 3 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν 30 τέτοιοι κύκλοι. Με επιπλέον παραμονή στους 72° C για 10 λεπτά ολοκληρώθηκε η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του Colony PCR, σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v, ως εξής:

- Σε 120 ml του διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (0.004 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) προστέθηκαν 0.96 g αγαρόζης
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
- Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 60°C και προστέθηκαν 6 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε η χτένα και έπηξε σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζοντας την πηκτή
- Απομακρύνθηκε η χτένα και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 x TAE. Στα σχηματιζόμενα από τη χτένα κενά τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer-0.25% w/v Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 40% w/v glycerol). Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών (marker) μεγέθους 1 kb.
- Η πηκτή έτρεξε στα 120 V/159 mA, για περίπου μισή ώρα.

2.7.7 Συλλογή των επιθυμητών αποικιών, απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 και αλληλούχιση των θέσεων του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 που διεκόπηκαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδίου

Μετά από εκτίμηση των αποτελεσμάτων της πηκτής αγαρόζης, επιλέχθηκε μία αποικία από τις τρεις του κάθε τρυβλίου που είχαν επιλεγεί νωρίτερα, των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους *E.coli* EC101. Η αποικία τοποθετήθηκε σε θρεπτικό μέσο LB, σε σωλήνες των 5 ml, με προσθήκη 200 μg/ml ερυθρομυκίνης και επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες, υπό ανακίνηση.

Ακολούθησε απομόνωση εκ νέου του πλασμιδίου pGh9:ISS1, με χρήση του Plasmid DNA Purification Kit, της Macherey-Nagel, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 2.6.4), με τη διαφορά ότι η έκλυση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 30 μl.

Τα τελικά προϊόντα έκλυσης της παραπάνω διαδικασίας, στάλθηκαν στην εταιρία VBC Genomics, για να γίνει αλληλούχιση (sequencing) του πλασμιδιακού DNA, με τον εκκινητή αλληλούχισης pGhM1 (5'- gttcattgatatactctcgctgctc – 3').

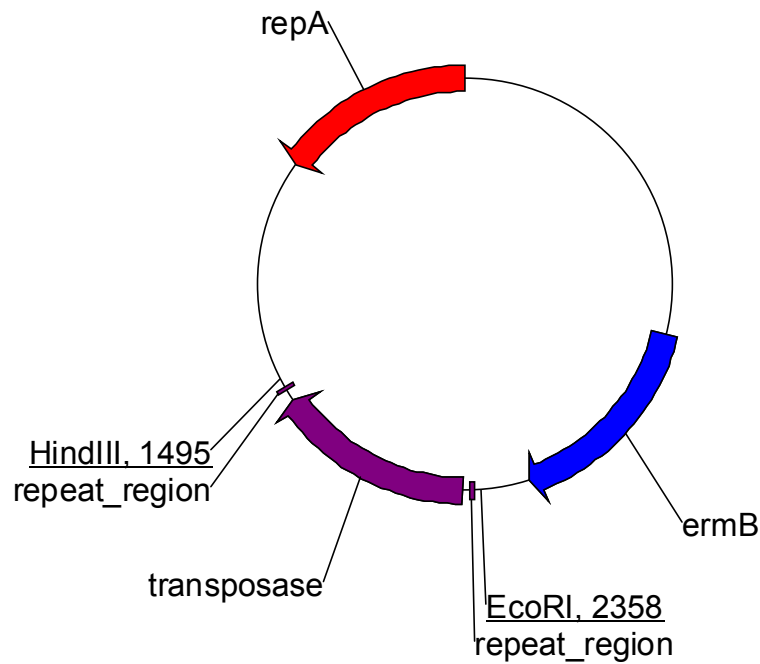
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Απομόνωση και χαρακτηριστικά του μεταθετού φορέα *pGh9:ISS1*

Το πλασμίδιο pG^+ host είναι ένα θερμοευαίσθητο παράγωγο αντιγραφής του pWV01 (Otto et al. 1982) που απομονώθηκε μετά από μεταλλαξογένεση του pGK12 (Kok et al. 1984; Maguin et al. 1992). Στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, το pG^+ host αντιγράφεται στους 28-30° C, αλλά όχι σε θερμοκρασίες πάνω από 37°C.

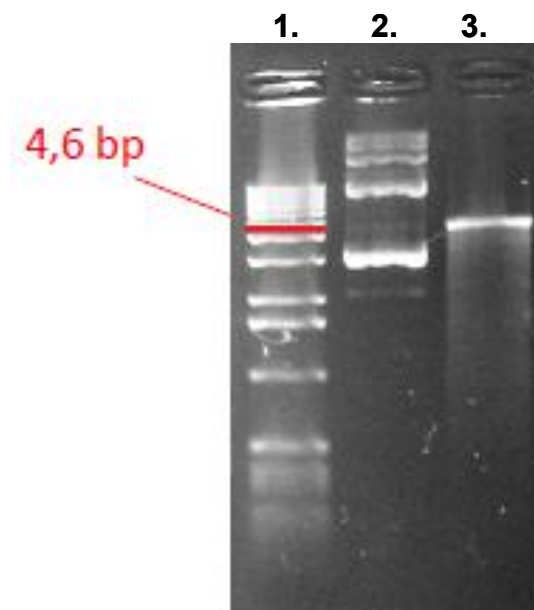
Τα IS στοιχεία (Insertion Sequences- Αλληλουχίες Μετάθεσης) είναι μικρά (800-2,500 bp), βρίσκονται ανάμεσα σε αντεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και κωδικοποιούν, γενικά, τις δικές τους μεταθετικές λειτουργίες. Υπάρχουν τρεις οικογένειες IS στοιχείων, που έχουν βρεθεί στους λακτόκοκκους (Romero et al. 1993) και η ποικιλία των αλληλουχιών που τα περιέχουν, οι θέσεις και οι συχνότητές τους στο χρωμόσωμα, φαίνεται ότι διαφέρουν κατά πολύ ανάμεσα στα στελέχη (Polzin et al. 1993; Schafer et al. 1991). Τα στοιχεία *ISS1* υποβάλλονται σε αντιγραφική μετάθεση, που οδηγεί στην τυχαία ενσωμάτωση του πλασμιδίου pG^+ host μεταξύ διπλασιασμένων αλληλουχιών IS, στο χρωμόσωμα του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Με χρήση του πλασμιδίου pG^+ host ως μέσου μεταφοράς του *ISS1*, επιτυγχάνεται μετάθεση υψηλής συχνότητας (τουλάχιστον 0.5%) που επιτρέπει επαρκή απενεργοποίηση γονιδίων και άμεση κλωνοποίηση του DNA της πλευρικής αλληλουχίας.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο του pG^+ host, *pGh9:ISS1* (Σχήμα 2). Το πλασμίδιο έχει μέγεθος περίπου 4.6 kb και η πρωτεΐνη Ts που είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του πλασμιδίου είναι γενετικά τροποποιημένη, ώστε να είναι θερμοευαίσθητη, όπως προαναφέρθηκε. Περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη και, επομένως, η μετάθεση γίνεται αντιληπτή όταν γίνει δοκιμή για συλλογή στελεχών ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη, τα οποία είναι ικανά να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία που απαγορεύει την αντιγραφή του πλασμιδίου. Ακόμα, περιέχει μία θέση περιορισμού για την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και μία για την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII* (Maguin et al. 1996)



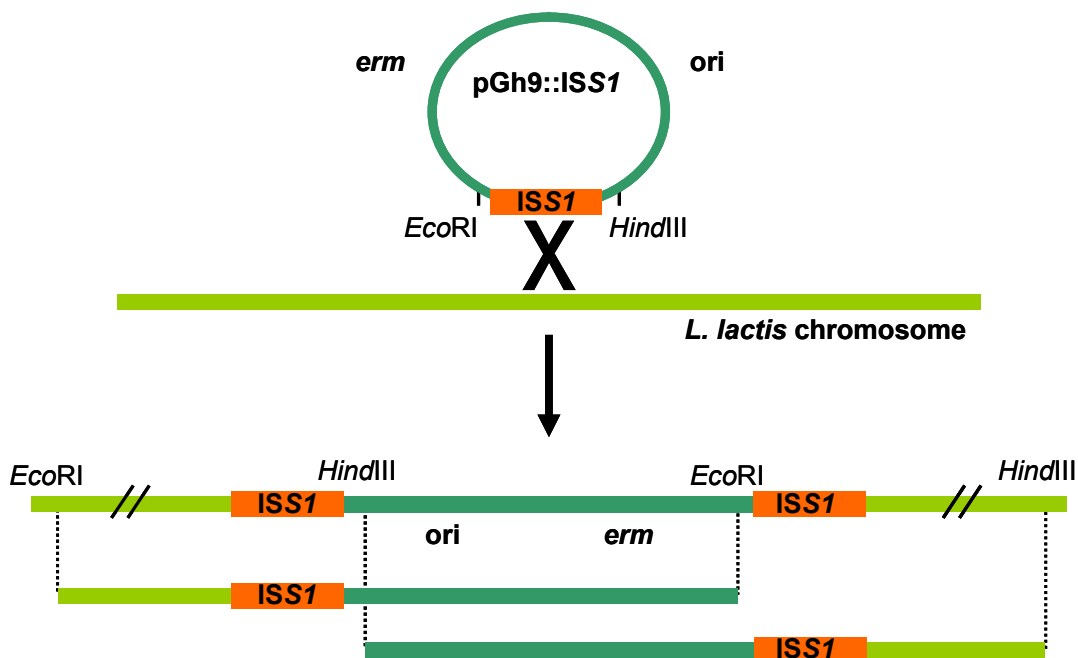
Σχήμα 2: Το πλασμίδιο pGh9:ISS1

Το συγκεκριμένο πλασμίδιο απομονώθηκε από το βακτήριο *E. coli* EC101. Γι' αυτό το λόγο, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA του βακτηρίου και επιβεβαιώθηκε η δομή του απομονωμένου φορέα, αλλά και το μέγεθός του (Εικόνα 1) μέσω πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI.



Εικόνα 1: Πηκτική αγαρόζης για το πλασμίδιο pGh9:ISS1. Διαδρομές: (1) mάρτυρας, (2) pGh9:ISS1 και (3) pGh9:ISS1 μετά από πέψη με EcoRI

Η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο χρωμόσωμα του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 γίνεται σε τυχαία θέση και επιτυγχάνεται με μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 37.5°C. Στους 30°C, το πλασμίδιο θεωρείται ότι βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 και η θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη T_s λειτουργεί, οπότε το πλασμίδιο αντιγράφεται φυσιολογικά. Με μεταβολή της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στους 37.5°C, η πρωτεΐνη T_s δε λειτουργεί πια, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή των πλασμιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού τους και την ενσωμάτωση κάποιων στο χρωμόσωμα. Με τον εμβολιασμό των καλλιεργειών σε τρυβλία με άγαρ και παρατεταμένη παραμονή σε θερμοκρασία 37.5°C, όσα πλασμίδια έχουν μείνει εκτός χρωμοσώματος, θα ενσωματωθούν και αυτά. (Σχήμα 3)



Σχήμα 3: Αναπαράσταση της μετάθεσης του πλασμιδίου pGh9:ISS1. Ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο χρωμόσωμα, μεταξύ διπλασιασμένων ISS1 στοιχείων, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 37.5°C.

3.2 Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, ανθεκτικών στη μασεδοσίνη

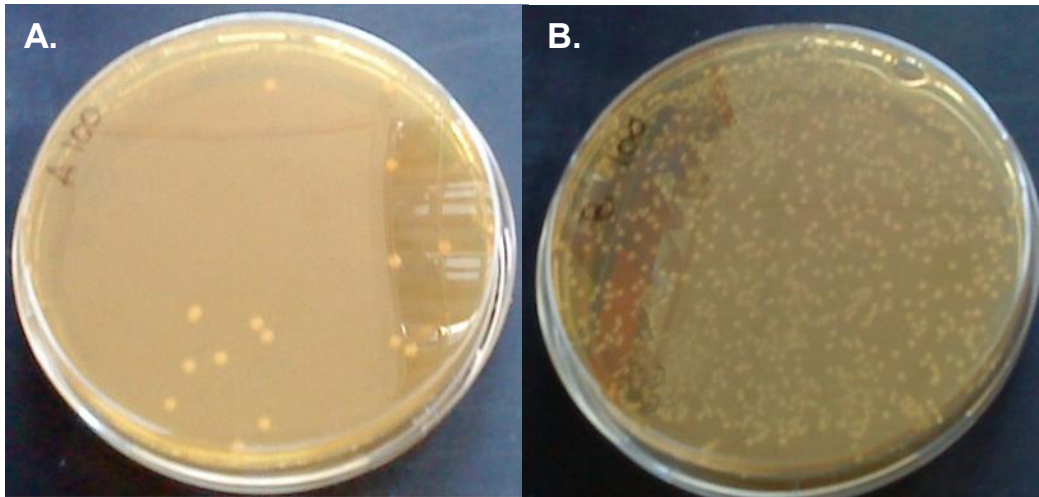
Προσδιορίστηκαν οι θανατηφόρες συνθήκες για το στέλεχος του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 αγρίου τύπου παρουσία μασεδοσίνης. Για το σκοπό αυτό, 50 μl στατικής καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε GM17 και επώαστηκαν στους 30°C για 2.5 ώρες και στους 37.5°C για 2.5 ώρες, ώστε να επικρατήσουν οι ίδιες συνθήκες με εκείνες που επικράτησαν στα μετασηματισμένα κύτταρα του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, προκειμένου να ενσωματωθεί το πλασμίδιο στο χρωμόσωμά τους.

Μετά το τέλος της επώασης των τρυβλίων, παρατηρήθηκε ότι σε αυτά που προέρχονταν από την αραιώση 1/10 ο θάνατος του μικροοργανισμού επερχόταν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 4.0% ενώ στα τρυβλία που προέρχονταν από την αραιώση 1/100 ο μικροοργανισμός θανατώθηκε ήδη από 2.0% μασεδοσίνη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Προσδιορισμός θανατηφόρων συγκεντρώσεων μασεδοσίνης

Αραίωση	Συγκέντρωση μασεδοσίνης % (v/v)									
	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
1:10 (α)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1:10 (β)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1:100 (α)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1:100 (β)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο μετασηματισμός του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363, με την τεχνική του ηλεκτρομετασηματισμού (electroporation) και ακολούθησε επιφανειακή εξάπλωση 100 μl, καθώς και επιφανειακή εξάπλωση σε λωρίδες (streaking) από την αρχική καλλιέργεια και 100 μl από την αραιώση 1/100 της αρχικής (10^5 - 10^6 κύτταρα) και επώαση στους 30°C για 48 ώρες.



Εικόνα 2: Μεμονωμένες αποικίες μετασηματισμένων στελεχών *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 από την αρχική αραιώση και από την αραιώση 1/100.

Συλλέχθηκαν μεμονωμένες μετασηματισμένες αποικίες, μία από το τρυβλίο της αρχικής καλλιέργειας και δύο από το τρυβλίο της αραιώσης 1/100 (Εικόνα 2), εμβολιάστηκε η κάθε μία σε υγρό θρεπτικό μέσο με ερυθρομυκίνη και επώαστηκαν στους 30°C μέχρι να φτάσουν στη στατική φάση, στους 30°C. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν σε νέο υγρό μέσο χωρίς ερυθρομυκίνη και επώαστηκαν για 2.5 ώρες και στους 37.5°C για 2.5 ώρες. Ακολούθησε επιφανειακή εξάπλωση σε στερεό θρεπτικό μέσο με ερυθρομυκίνη που περιείχε, για την αραιώση 1/10 3.5, 4.0 και 4.5% μασεδοσίνη και για την αραιώση 1/100 1.5, 2.0 και 2.5%, σε 5 τρυβλία για την κάθε μία και επώαση στους 37.5°C για 48 ώρες. Από τα τρυβλία αυτά συλλέχθηκαν 44 πιθανά μεταλλαγμένα στελέχη του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363.

3.3 Επιβεβαίωση του ανθεκτικού στη δράση της μασεδοσίνης φαινότυπου

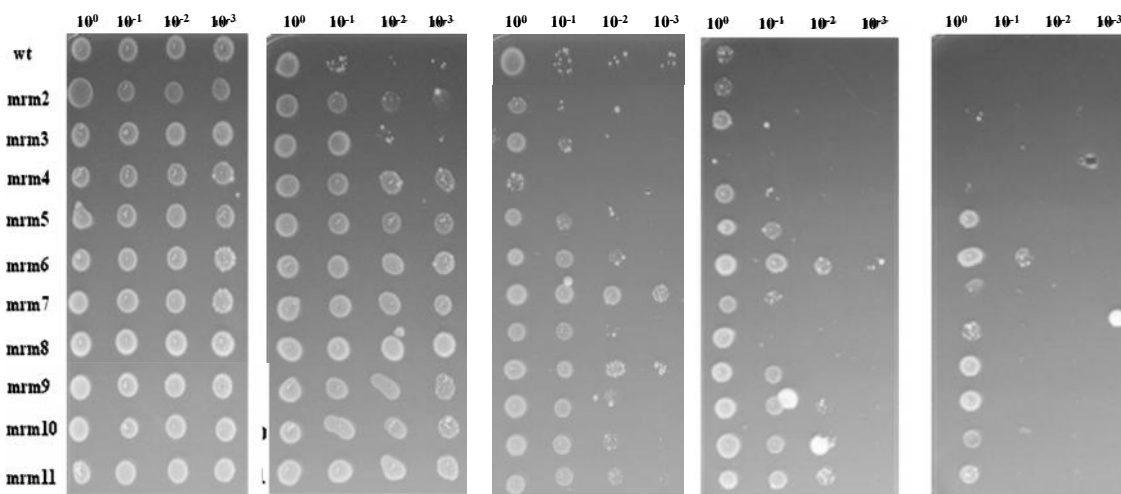
Η επιβεβαίωση του ανθεκτικού φαινότυπου έγινε με την τεχνική της τοποθέτησης σταγόνας από στατικές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων στελεχών *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με τρεις δεκαδικές αραιώσεις (10^0 - 10^{-3}). Τοποθετήθηκαν ποσότητες 2 μl στην επιφάνεια τρυβλίου που περιείχε M17-MOPS με 0.5% γλυκόζη, 160 mM MOPS και άγαρ. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις μασεδοσίνης 0, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 % (v/v, χωρίς ερυθρομυκίνη). Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το άγριο στέλεχος του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, υπό τις ίδιες συνθήκες (wild type-wt).

Εξετάστηκαν σαράντα τέσσερα μετασχηματισμένα στελέχη και ονομάστηκαν mfm1 έως mfm44 αντίστοιχα.

Ο φαινότυπος ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη επιβεβαιώθηκε για όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη αφού εμφάνισαν ανάπτυξη σε όλες τις συγκεντρώσεις μασεδοσίνης, εκτός από τη συγκέντρωση 2.5% v/v, σε αντίθεση με το στέλεχος αγρίου τύπου, το οποίο αναπτύχθηκε μόνο απουσία μασεδοσίνης (Εικόνα 3).

Όπως φαίνεται, όταν στο θρεπτικό μέσο δεν υπήρχε μασεδοσίνη, τόσο το στέλεχος αγρίου τύπου, όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν φυσιολογικά, σε όλες τις αραιώσεις τους. Η ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου αναστάλθηκε με προσθήκη μασεδοσίνης ενώ παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην ανθεκτικότητα μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών. Αντιπροσωπευτικά, στην Εικόνα 3 φαίνεται ότι τα στελέχη mfm2, mfm3 και mfm4 παρουσιάζουν σχετικά μειωμένη ανθεκτικότητα, σε σχέση με τα υπόλοιπα της εικόνας.

0-2.5 % v/v Macedocin



Εικόνα 3: Επιβεβαίωση του φαινότυπου ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών

3.4 Επιβεβαίωση της μετάλλαξης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 μέσω μετάθεσης του *pGh9:ISS1* με ανάλυση κατά Southern

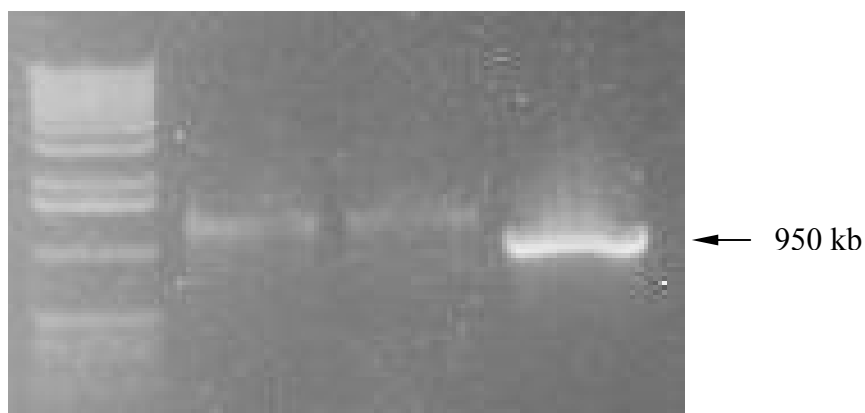
Η επιβεβαίωση ότι η μετάλλαξη προέκυψε από μετάθεση του πλασμιδιακού φορέα *pGh9:ISS1* έγινε με ανάλυση κατά Southern, όπου φάνηκε κατά πόσο το πλασμιδιακό DNA ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα και πόσες φορές.

Η ανάλυση κατά Southern έγινε ως εξής: αρχικά, απομονώθηκε το χρωμοσωμικό DNA των μεταλλαγμένων στελεχών, το οποίο, στη συνέχεια, υπέστη πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και διαχωρίστηκε σε πηκτική αγαρόζη, υπό τις ίδιες συνθήκες.

Μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα αποδιάταξης και σε διάλυμα εξουδετέρωσης, επιτεύχθηκε η αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA και εξουδετέρωση των αλκαλικών συνθηκών που επικράτησαν από το διάλυμα αποδιάταξης, το οποίο περιείχε καυστικό νάτριο (NaOH), με στόχο να μπορέσει ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης να σχηματίσει δεσμούς με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA που θα συναντήσει. Ακολούθως, το DNA της πηκτής μεταφέρθηκε σε

νάυλον μεμβράνη, μέσω τριχοειδούς φαινομένου και προσδέθηκε εκεί (cross link), με θέρμανση της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες.

Ο ιχνηθέτης παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). Κατά την αντίδραση, αναμίχθηκαν ποσότητες του πλασμιδίου pGh9:ISS1, εκκινητές Forward και Reverse, οι οποίοι είναι ειδικοί για την ενίσχυση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη που φέρει το pGh9:ISS1, καθώς και μίγμα ελεύθερων νουκλεοτιδίων επισημασμένων με το μόριο της διγοξυγενίνης (DIG mix). Τα νουκλεοτίδια είναι επισημασμένα με το μόριο της διγοξυγενίνης, ώστε να είναι δυνατή η ανοσολογική ανίχνευση τους, μέσω χρωματικής αντίδρασης. Για επιβεβαίωση, ο ιχνηθέτης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 4). Για να χρησιμοποιηθεί ο ιχνηθέτης, πρώτα αποδιατάχτηκε, με θέρμανση, ώστε να καταστεί μονόκλωνος.



Εικόνα 4: Η πηκτή αγαρόζης του ιχνηθέτη. Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στο μάρτυρα 1 kb που χρησιμοποιήθηκε, η δεύτερη και η τρίτη αντιστοιχούν στον ιχνηθέτη που παρασκευάστηκε και η τρίτη είναι ένας ιχνηθέτης ελέγχου, ο οποίος προϋπήρχε στο εργαστήριο

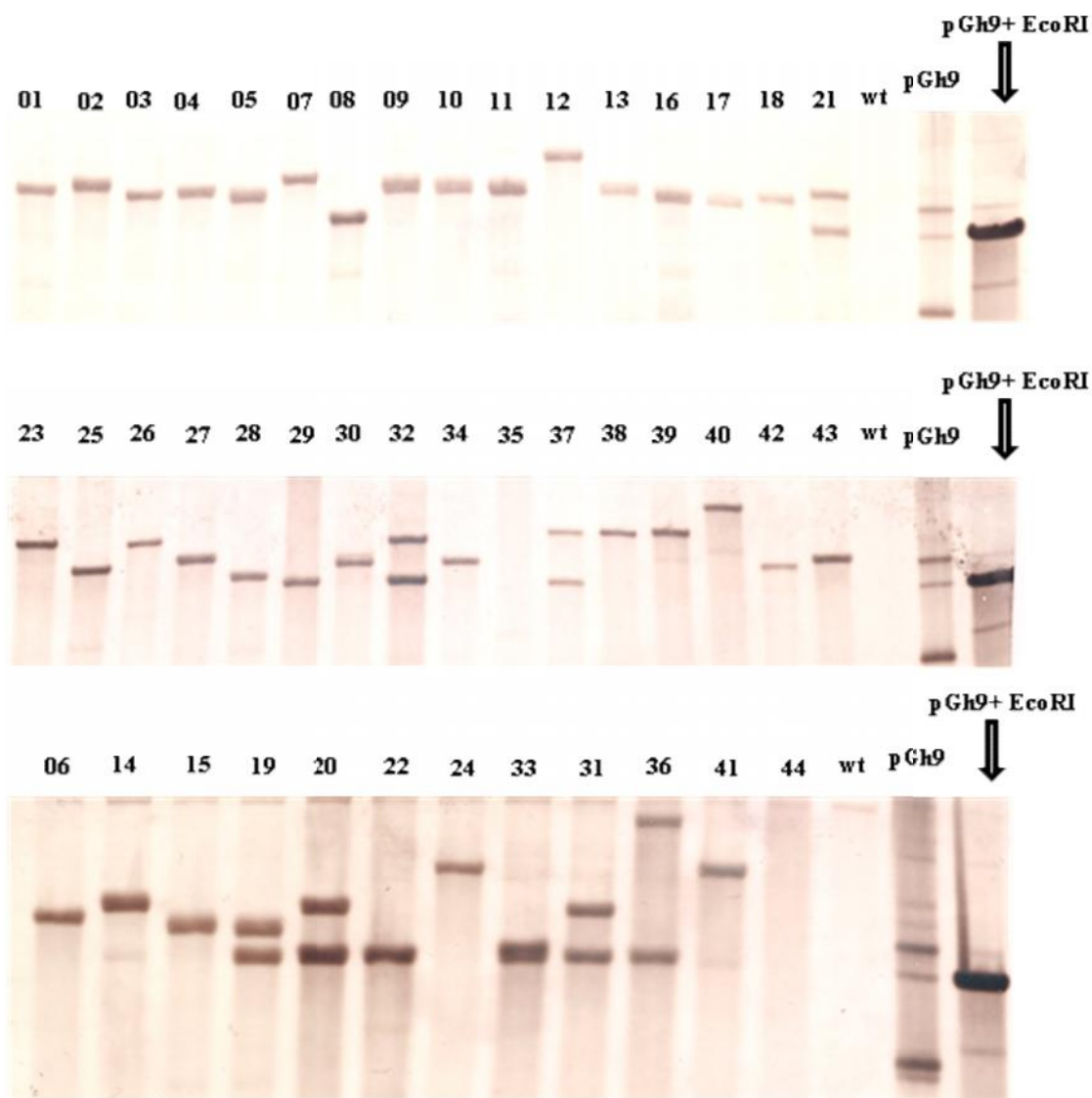
Η σημασία του προϋβριδισμού έγκειται στην παρεμπόδιση των τυχαίων αλληλουχιών, οι οποίες είναι σε κάποιο ποσοστό συμπληρωματικές προς τον ιχνηθέτη, όπου θα μπορούσε αυτός να προσδεθεί (non-specific sites). Με αυτόν τον τρόπο οι συνθήκες έγιναν πιο αυστηρές και ο ιχνηθέτης σχημάτισε δεσμούς μόνο με τις επιθυμητές αλληλουχίες, με τις οποίες είχε πολύ μεγάλο ποσοστό ομολογίας, άρα με τις αλληλουχίες που αποτελούσαν τμήματα του πλασμιδιακού DNA, το οποίο είχε ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363.

Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση της μεμβράνης στο διάλυμα υβριδισμού και προσθήκη του αποδιαταγμένου ιχνηθέτη, στους 65°C, για τουλάχιστον 18 ώρες, υπό ανακίνηση. Με αυτόν τον τρόπο, ο ιχνηθέτης εντοπίζει και σχηματίζει δεσμούς με τις συμπληρωματικές προς αυτόν αλληλουχίες του DNA.

Η ανίχνευση του σήματος έγινε με ανοσολογική ανίχνευση του μορίου της διγοξυγενίνης με χρήση αντι-DIG συμπλόκου αλκαλικής φωσφατάσης. Έγινε διάλυση 1/5000 του αντι-DIG αντισώματος στο διάλυμα 2 που βρισκόταν η μεμβράνη και επώαση στο διάλυμα του αντισώματος, για 30 λεπτά, υπό αργή ανάδευση. Μετά από κάποιες εκπλύσεις για να απομακρυνθεί η ποσότητα του αδέσμευτου ιχνηθέτη, η μεμβράνη εξισορροπήθηκε και ακολούθησε επώαση στο διάλυμα χρωματικής αντίδρασης, που αποτελεί το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης, μέσα σε κλειστή πλαστική σακούλα, σε σκοτεινό μέρος, χωρίς ανάδευση, για μερικά λεπτά. Τα υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης, κατά τη διάσπασή τους στη χρωματική αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, άφησαν ορατό ίζημα πάνω στη μεμβράνη, το οποίο αποτέλεσε τις ζώνες (Εικόνα 5). Όταν οι ζώνες έγιναν επαρκώς ορατές, η χρωματική αντίδραση διακόπηκε με έκπλυση με νερό.

Από τα αποτελέσματα των μεμβρανών φαίνεται ότι ο πλασμιδιακός φορέας pGh9:ISS1 έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα όλων των μεταλλαγμένων στελεχών. Σε ό,τι αφορά τα μεταλλαγμένα στελέχη mrgm19, mrgm20, mrgm21, mrgm31, mrgm32, mrgm36 και mrgm37 εμφανίζονται δύο θετικά σήματα υβριδισμού που υποδεικνύουν ότι το πλασμίδιο έχει ενσωματωθεί δύο ή περισσότερες φορές στο χρωμόσωμά τους. Όμως, φαίνεται ότι η κατώτερη ζώνη βρίσκεται στο ίδιο ύψος με τη γραμμική μορφή του πλασμιδίου pGh9:ISS1 (η πρώτη στήλη από δεξιά). Το φαινόμενο αυτό είναι ενδεικτικό αυτού που ονομάζεται διαδοχική μετάθεση (tandem transposition). Δηλαδή, ενσωματώθηκαν δύο ή περισσότερα πλασμίδια

pGh9:ISS1 σε διαδοχικές θέσεις, οπότε τελικά έγινε παρεμβολή σε μία μόνο θέση του χρωμοσώματος των μεταλλαγμένων στελεχών (Σχήμα 4).



Εικόνα 5: Οι μεμβράνες του Southern μετά τη λήξη της χρωματικής αντίδρασης. Παρουσιάζονται τα μεταλλαγμένα στελέχη, το στέλεχος αγρίου τύπου (wt), το πλασμίδιο pGh9:ISS1 κομμένο με το ένζυμο EcoRI και το πλασμίδιο άκοπο.



Σχήμα 4: Παράσταση της διαδοχικής μετάθεσης του pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμα του *L. lactis* ssp. cremoris MG1363

3.5 Κλωνοποίηση του πλασμιδιακού DNA που εισήλθε μέσω μετάθεσης στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis* ssp. cremoris MG1363, σε κύτταρα του στελέχους *E. coli* EC101

Κλωνοποίηση καλείται η διαδικασία μεταφοράς ενός γονιδίου από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού και επανατοποθέτησής του, είτε στο γονιδίωμα του ίδιου μικροοργανισμού, είτε ενός άλλου. Κατά την κλωνοποίηση, το DNA απομονώνεται από τα κύτταρα, υποβάλλεται σε διάφορους χειρισμούς και, στη συνέχεια, εισάγεται ξανά στα κύτταρα του ίδιου ή ενός άλλου μικροοργανισμού. Το γεγονός ότι το στέλεχος *E. coli* EC101 είναι καλά χαρακτηρισμένο, το καθιστά συνηθισμένη επιλογή για την κλωνοποίηση γονιδίων.

Ο όρος «κύτταρα ικανά προς μετασχηματισμό» αναφέρεται στην ικανότητα των κυττάρων να ενσωματώνουν εξωκυτταρικό DNA από το περιβάλλον τους. Για να αποκτήσουν την ικανότητα αυτή, πρέπει να υποστούν συγκεκριμένη μεταχείριση, ώστε ο κυτταρικός τους φάκελος να καταστεί διαπερατός στο DNA. Η μεταβολή της περατότητας της μεμβράνης των κυττάρων επιτρέπει στο DNA να εισχωρήσει μέσα από την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα και την εσωτερική κυτταρική μεμβράνη του EC101. Η εξωτερική κυτταρική μεμβράνη του EC101 ανταποκρίνεται στο μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού και αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες. Υπάρχουν πολλά κανάλια που σχηματίζονται μέσω της συγχώνευσης της εξωτερικής και της εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, επιτρέπουν τη μεταφορά των μορίων DNA (Bayer 1968).

Το εισερχόμενο DNA, όμως, λόγω του αρνητικού του φορτίου, απωθείται από το αρνητικό φορτίο μακρομορίων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Η προσθήκη CaCl_2 εξυπηρετεί την εξουδετέρωση των ανεπιθύμητων αυτών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA και των πολυανιόντων της εξωτερικής στοιβάδας του κυττάρου. Επιπλέον, η επώαση στον πάγο για 30 λεπτά που πραγματοποιείται σταθεροποιεί τη λιπιδιακή μεμβράνη και επιτρέπει αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ των κατιόντων του ασβεστίου και των αρνητικά φορτισμένων συστατικών του κυττάρου.

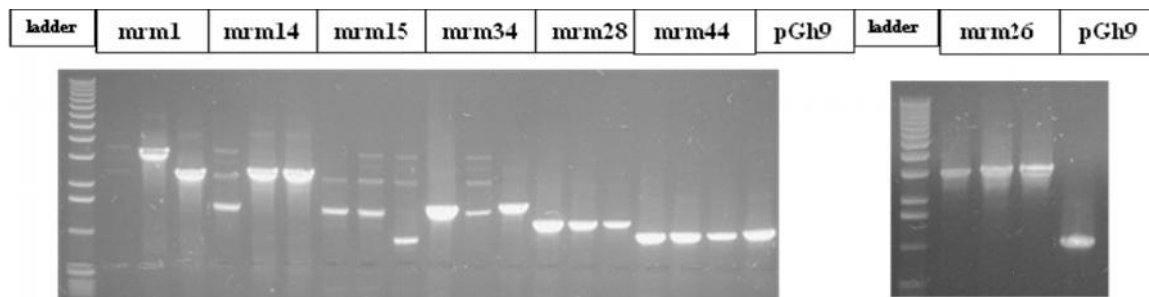
Το χρωμοσωμικό DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 υπέστη πέψη από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Όπως προαναφέρθηκε (Παράγραφος 3.1 και Σχήμα 2), ο πλασμιδιακός φορέας pGh9:ISS1 διαθέτει μία θέση πέψης από την EcoRI. Κατά συνέπεια, στα προϊόντα της αντίδρασης πέψης με αυτήν περιέχονται τμήματα του γραμμικού πλασμιδίου, που φέρουν μία πλευρική αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών. Δηλαδή, το συγκεκριμένο γραμμικό τμήμα, από τη μία πλευρά θα διαθέτει την αλληλουχία του πλασμιδίου, στην οποία έδρασε το ένζυμο, και στην αντίθετη πλευρά την αλληλουχία του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών. Η αλυσίδα αυτή είναι που διαφοροποιεί τα προϊόντα πέψης του κάθε μεταλλαγμένου στελέχους. Η εισαγωγή του πλασμιδίου στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών είναι τυχαία, οπότε η αλληλουχία που διακόπτει κάθε φορά μπορεί να είναι διαφορετική, με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται και η πλευρική αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA.

Στη συνέχεια της διαδικασίας, μετά την πέψη, ακολούθησε κυκλοποίηση μέσω αντίδραση λιγάσης (ligation) των προϊόντων πέψης αφού προηγήθηκε αραίωση του δείγματος, με προσθήκη νερού. Τέλος, ακολούθησε συμπύκνωση ώστε να απομονωθεί εκ νέου το κυκλοποιημένο πλασμίδιο με την πλευρική αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA από το μίγμα προϊόντων της πέψης και να ακολουθήσει ο μετασχηματισμός του στελέχους *E. coli* EC101 με αυτά. Όλη η παραπάνω διαδικασία καθώς και τα επόμενα βήματα, πραγματοποιήθηκαν και για 18 συμπληρωματικά μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία υπήρχαν στο εργαστήριο γαλακτοκομίας από παλαιότερα πειράματα και ονομάστηκαν mgmK.

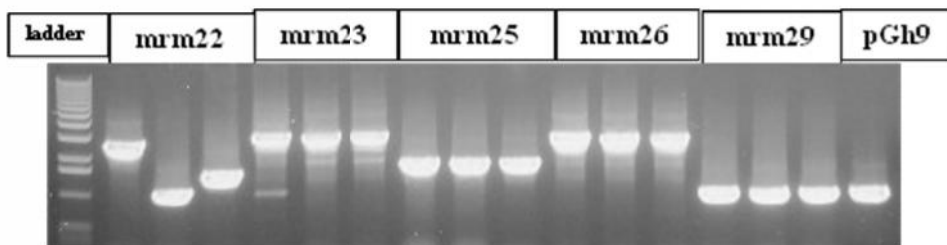
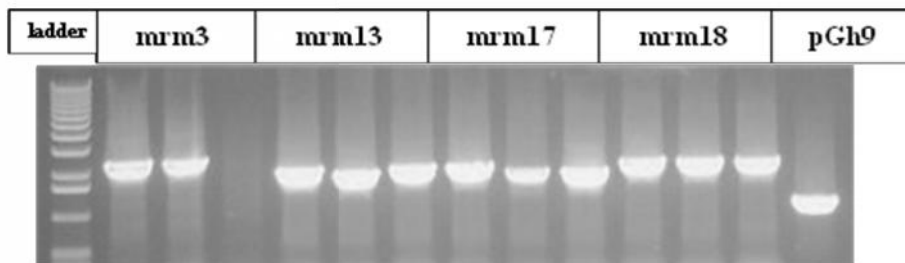
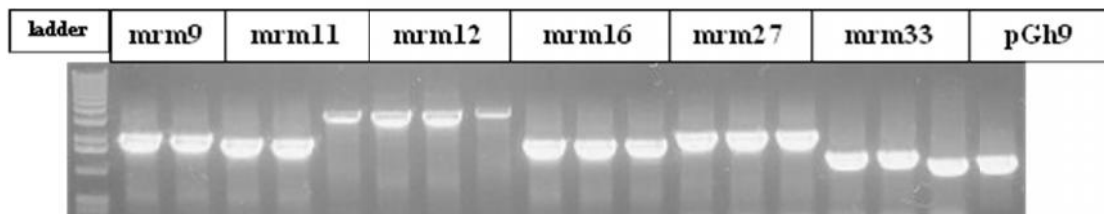
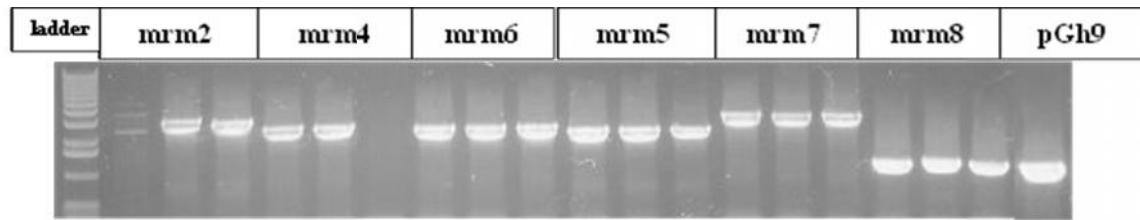
Μετά το μετασχηματισμό του EC101 με το πλασμίδιο pGh9:ISS1, ακολούθησε επιφανειακή εξάπλωση σε τρυβλία με ερυθρομυκίνη για την απομόνωση μεμονωμένων αποικιών. Επιλέχθηκαν τρεις αποικίες από το κάθε τρυβλίο και πραγματοποιήθηκε Colony PCR,

χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα το πλασμίδιο pGh9:ISS1 σαν μάρτυρα. Το πλασμίδιο διαθέτει, εκτός από τη μία θέση πέψης από την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, μία θέση πέψης από την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII (Σχήμα 2). Για το Colony PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές pGER και pGHF, των οποίων το παραγόμενο προϊόν περιλαμβάνει το τμήμα του πλασμιδίου pGh9:ISS1 μεταξύ των θέσεων περιορισμού για τα ένζυμα EcoRI και HindIII. Κατά συνέπεια, το παραγόμενο προϊόν του Colony PCR του πλασμιδίου είναι ένα τμήμα του, που περιέχει τις δύο αυτές αλληλουχίες, μεγέθους περίπου 0.9 kb (900 b). Όλα τα παραγόμενα προϊόντα του Colony PCR, για τα μεταλλαγμένα στελέχη θα έχουν κατά συνέπεια μεγαλύτερο μέγεθος λόγω της ύπαρξης της πλευρικής αλυσίδας του χρωμοσωμικού DNA που φέρουν.

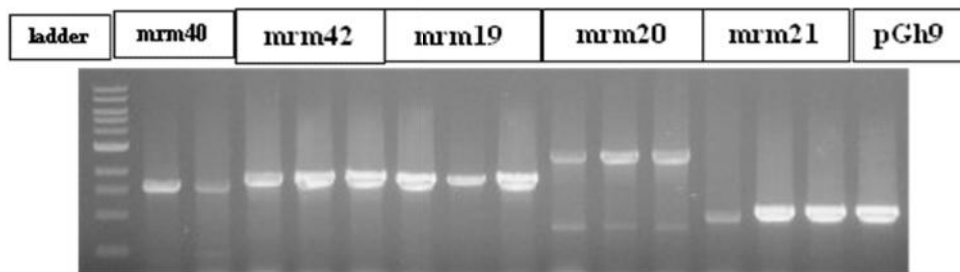
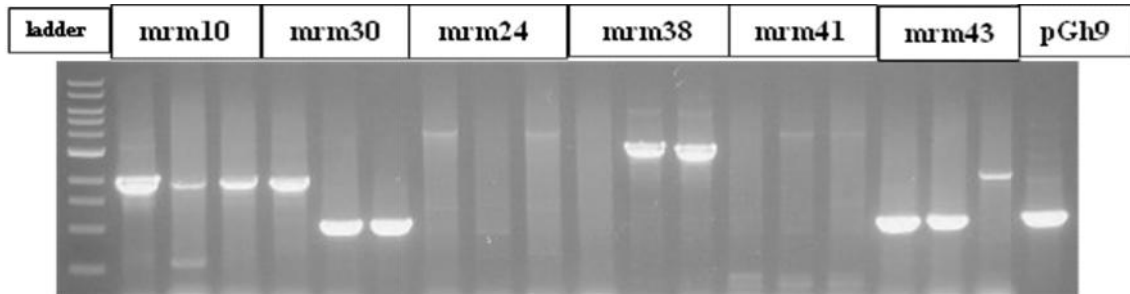
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του Colony PCR σε πηκτή αγαρόζης, τόσο για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του πλασμιδιακού φορέα, όσο και για να επαληθευτεί ότι αυτός έχει διακόψει την ίδια αλληλουχία του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών και στις τρεις αποικίες που απομονώθηκαν από το ίδιο τρυβλίο. (Εικόνες 6, 7 και 8).



Εικόνα 6: Colony PCR σε πηκτή αγαρόζης. Παρουσιάζονται, ανά τριάδες, οι αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών, σε σύγκριση με το πλασμίδιο pGh9:ISS1.



Εικόνα 7: Colony PCR σε πηκτή αгарόζης. Παρουσιάζονται, ανά τριάδες, οι αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών, σε σύγκριση με το πλασμίδιο pGh9:ISS1.



Εικόνα 8: Colony PCR σε πηκτή αγαρόζη. Παρουσιάζονται, ανά τριάδες, οι αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών, σε σύγκριση με το πλασμίδιο pGh9:ISS1.

3.6 Αλληλούχηση (Sequencing) των θέσεων του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 που διεκόπηκαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1

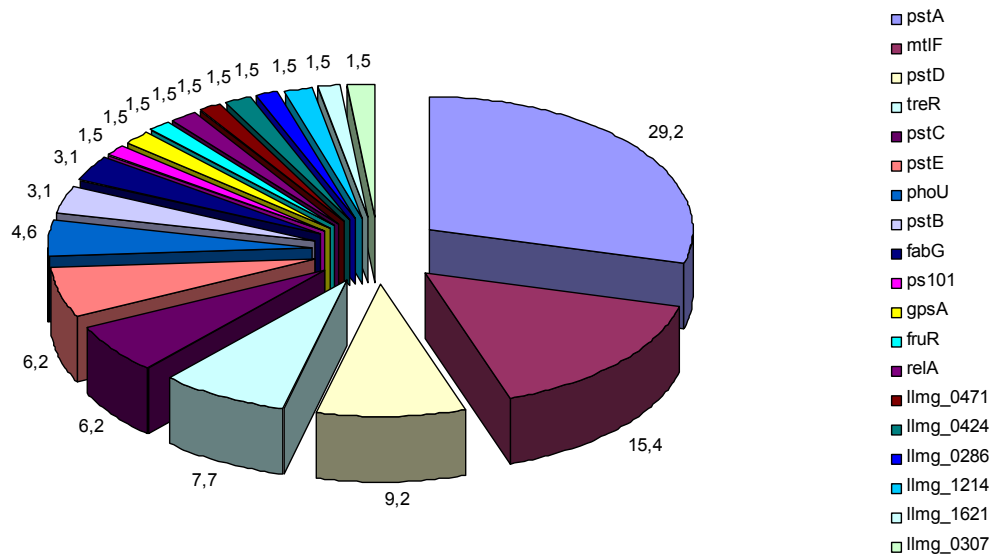
Για να διαπιστωθεί η αλληλουχία που διεκόπη από την εισαγωγή και ενσωμάτωση του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1 σε κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος, συλλέχθηκαν ξανά οι ίδιες αποικίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Colony PCR, οι οποίες στο μεταξύ είχαν αναπτυχθεί περαιτέρω, εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό διάλυμα LB παρουσία 200 µg/ml ερυθρομυκίνης, από αυτές απομονώθηκε εκ νέου το πλασμίδιο pGh9:ISS1 που φέρει την πλευρική αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών και εστάλη για αλληλούχηση. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), με εισαγωγή των αλληλουχιών που διεκόπηκαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1 (insertion sites) διαπιστώθηκε η ύπαρξη γονιδίων, των οποίων η διακοπή οδηγεί στην επαγωγή ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 2).

3.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεταλλαξογένεσης του *L. lactis ssp. cremoris* MG1363 και εκτίμηση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη μασεδοσίνη

Στην παρούσα εργασία έγιναν δύο ανεξάρτητες μεταλλαξογενέσεις (α και β), από τις οποίες προέκυψαν, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, 44 μεταλλαγμένα στελέχη. Επιπλέον, αναλύθηκαν και 20 μεταλλαγμένα στελέχη, ανθεκτικά στη μασεδοσίνη από μία προηγούμενη μεταλλαξογένεση που είχε πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει τα γεγονόσ ότι σε αρκετές περιπτώσεις υπήρξε επικάλυψη των γονιδίων που βρέθηκαν να διακόπτονται κατά τη μετάθεση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 μεταξύ των τριών διαφορετικών μεταλλαξογενέσεων (Σχήμα 5). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ένα σημαντικό βαθμό κορεσμού κατά τη μεταλλαξογένεση και την επιλογή των μεταλλαγμένων στελεχών ενώ παράλληλα ενισχύεται η πιθανότητα η διακοπή των γονιδίων που εντοπίστηκαν πολλαπλές φορές να οδηγεί όντως σε φαινότυπο ανθεκτικότητας έναντι της μασεδοσίνης.

Πίνακας 2: Γονίδια τα οποία διακόπηκαν λόγω μετάθεσης του πλασμιδίου pGh9:ISS1

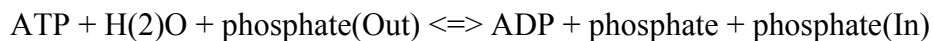
mrm	Gene	Protein Function	EC no.	E value
1	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
2	<i>pstB</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
3	<i>gpsA</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	(1.1.1.94)	0
4	<i>pstB</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
5	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	6,00E-179
6	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
7	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
8	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
9	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	4,00E-83
10	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
11	<i>phoU</i>	phosphate transport system regulator	(3.6.3.27)	0
12	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
13	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
14	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
15	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
16	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	2,00E-177
17	<i>phoU</i>	phosphate transport system regulator	(3.6.3.27)	0
18	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
19	<i>pstC</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
20	<i>pstC</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
21	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	0
22	<i>pstE</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
23	<i>pstE</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
24	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	0
25	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	(1.1.1.100)	7,00E-151
26	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	0
27	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
28	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	1,00E-136
29	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	0
30	<i>phoU</i>	phosphate transport system regulator	(3.6.3.27)	0
31	<i>pstC</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
32	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	(1.1.1.100)	0
33	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	2,00E-115
34	<i>pstD</i>	phosphate transport system permease protein	(3.6.3.27)	0
35	<i>pstE</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
36	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
37	<i>pstC</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
38	<i>relA</i>	GTP pyrophosphokinase	(2.7.6.5)	2,00E-131
39	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
40	<i>ps101</i>	DNA breaking-rejoining enzyme	-	7,00E-145
41	<i>llmg_0471</i>	hypothetical protein	-	0
42	<i>fruR</i>	fructose-1-phosphate kinase	-	0
43	<i>llmg_0286</i>	putative secreted protein	-	0
44	<i>pstA</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	(3.6.3.27)	0
	<i>mitF</i>	fructose/mannitol PTS system	-	2,00E-168
	<i>treR</i>	trehalose uptake operon repressor	-	2,00E-89
mrmK	<i>llmg_1214</i>	glycosyl-transferase	-	7,00E+160
	<i>llmg_1621</i>	glycosyl-transferase	-	2,00E-177
	<i>llmg_0307</i>	N-acetyltransferase	-	6,00E-130
	<i>llmg_0424</i>	transcriptional regulator-antibiotic resistance	0	6,00E-122



Σχήμα 5: Συχνότητα εμφάνισης (%) συγκεκριμένων διακεκομμένων γονιδίων στο σύνολο των μεταλλαγμένων στελεχών, που παρουσίασαν φαινότυπο ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη

3.7.1 Γονίδια *pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstD*, *pstE*, *phoU* και *relA*

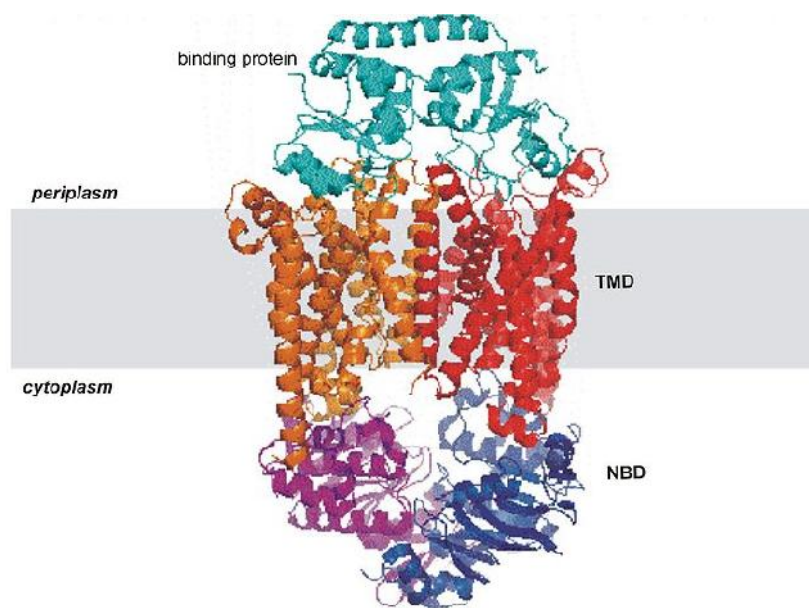
Από τα 44 μεταλλαγμένα, ανθεκτικά στη μασεδοσίνη στελέχη, 19 ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο στην αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο *pstA*, 2 στο γονίδιο *pstB*, 4 στο γονίδιο *pstC*, 6 στο γονίδιο *pstD* και 3 στο γονίδιο *pstE*, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PstA, PstB, PstC, PstD και PstE, αντίστοιχα. Οι παραπάνω πρωτεΐνες αποτελούν υπομονάδες των ABC-μεταφορέων του φωσφόρου, δεσμεύοντας το ATP, υδρολύοντάς το και παρέχοντας, έτσι, την ενέργεια στο κύτταρο να μεταφέρει το φώσφορο του περιβάλλοντός του στο εσωτερικό του, βάσει της αντίδρασης:



Οι ABC μεταφορείς (ABC transporters) ανήκουν στην υπερικογένεια ATP-Binding Cassette (ABC), μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών, η οποία περιέχει περισσότερες από 50 υποοικογένειες, και χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP προς ADP για να εφοδιάσουν

το κύτταρο με ενέργεια. Οι ABC μεταφορείς αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές, μία υψηλά συντηρημένη ATP-Binding Cassette (ABC) και ένα λιγότερο συντηρημένο διαμεμβρανικό πεδίο (Transmembrane Domain-TMD). Οι δύο αυτές περιοχές μπορεί να βρεθούν είτε στην ίδια πρωτεΐνη είτε σε δύο διαφορετικές. Οι περισσότεροι ABC μεταφορείς δρουν ως διμερή και συνεπώς αποτελούνται από τέσσερα τμήματα, δύο ABC στοιχεία και δύο διαμεμβρανικά πεδία (TMDs) (Σχήμα 6).

Ο ρόλος των ABC μεταφορέων είναι η εξαγωγή ή η εισαγωγή μίας μεγάλης ποικιλίας ενώσεων, από μικρού μεγέθους ιόντα, έως και μακρομόρια. Το σύστημα εισαγωγής ABC εξυπηρετεί κυρίως την παροχή βασικών θρεπτικών συστατικών στο βακτήριο. Βρίσκεται μόνο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και τα τέσσερα συνιστώντα τμήματά του συνήθως αποτελούνται από δύο ABC πρωτεΐνες και δύο TMD πρωτεΐνες. Τα προκαρυωτικά εισαγωγικά συστήματα απαιτούν πρόσθετες εξωκυττοπλασματικές δεσμευτικές πρωτεΐνες για να λειτουργήσουν. Αντιθέτως, τα εξαγωγικά συστήματα εμπλέκονται στην εξώθηση επιβλαβών ουσιών, την εξαγωγή εξωκυττοπλασματικών τοξινών και σε ουσίες που στοχοποιούν τα συστατικά της μεμβράνης (Saurin et al. 1999).

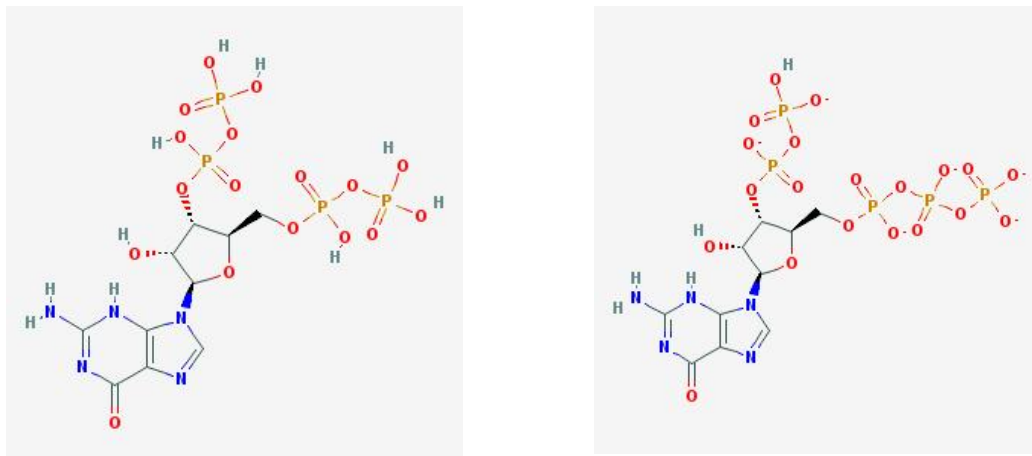


Σχήμα 6: Ένας ABC μεταφορέας. Φαίνεται ότι τα πεδία TMD βρίσκονται στο διαμεμβρανικό χώρο, τα πεδία ABC ή NBD (Nucleotide-Binding Domains) στο κυτταρόπλασμα και η δεσμευτική πρωτεΐνη, που απαιτείται για να λειτουργήσει ο μεταφορέας, (binding protein) βρίσκεται στο εξωτερικό του

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *pstA* έχει βρεθεί ότι επάγει ανθεκτικότητα σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι το οξειδωτικό στρες (Cesselin et al. 2009), στα οξυγαλακτικά βακτήρια και, συγκεκριμένα στο βακτήριο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, μεταβάλλοντας την ομοιόσταση του κυττάρου. Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν δείξει ότι ανθεκτικότητα στο όξινο στρες μπορεί να επαχθεί με απενεργοποίηση του γονιδίου *pstE*, λόγω της μειωμένης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης φωσφορικών (Rallu et al. 2000). Όλα τα γονίδια *pst* ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο και, συνεπώς, φαίνεται ότι σε όλα αυτά τα μεταλλαγμένα στελέχη η επαγωγή ανθεκτικότητας έχει συμβεί με τον ίδιο τρόπο. Είναι πιθανό η επαγωγή ανθεκτικότητας να επιτεύχθηκε μέσω της ρύθμισης των επιπέδων της δισφωφορικής και της τριφωφορικής γουανωσίνης (ppGpp και pppGpp, αντίστοιχα) (Εικόνα 9) (Rallu et al. 2000) και, ειδικότερα, μέσω της ρύθμισης του λόγου των δύο, οδηγώντας το κύτταρο σε μία κατάσταση προ-προσαρμοσμένη (pre-adapted). Η ορμόνη ppGpp είναι μία αλαρμόνη (alarmone), δηλαδή μία ορμόνη συναγερμού, η οποία εκκρίνεται από το κύτταρο, όταν αυτό βρεθεί σε μία στρεσογόνο κατάσταση. Τα ppGpp και pppGpp είναι μικρά νουκλεοτίδια που περιέχουν 4 και 5 φωσφορικές ομάδες, αντίστοιχα, και δρουν σαν αποστολείς σημάτων στο κύτταρο για την αναστολή της σύνθεσης ριβοσωμικού RNA όταν δεν είναι διαθέσιμα αμινοξέα για πρωτεϊνοσύνθεση. Έχει αποδειχθεί ότι τα δύο αυτά νουκλεοτίδια αποτελούν καθολικούς ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων στο κύτταρο, δηλαδή επηρεάζουν πολλά διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με την επιβίωση των κυττάρων σε στρεσογόνες συνθήκες, προκαλώντας, μεταξύ άλλων, αναστολή της μετάφρασης, ευνοώντας την επιβίωση του κυττάρου, εις βάρος της ανάπτυξής του (Magnusson et al. 2005). Παρεμβαίνοντας σε κάποιο από τα γονίδια του ABC οπερονίου, επηρεάζεται ο ανωτέρω λόγος και το κύτταρο αναπτύσσει γενικευμένη αντοχή, άρα και έμμεση ανθεκτικότητα στη μασεδοσίνη.

Ακόμα, 3 μεταλλαγμένα στελέχη (*mgm10*, *mgm17* και *mgm30*) βρέθηκαν ότι έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο στην αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο *phoU*, το οποίο όμως αποτελεί ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου *pstA* και έχει φανεί ότι είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής, που απενεργοποιεί αρκετές εκατοντάδες γονιδίων που συμμετέχουν στο βακτηριακό μεταβολισμό (Li and Zhang, 2007), οπότε ο πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη του συγκεκριμένου μεταλλαγμένου στελέχους μπορεί να προκύπτει από τη

γενικευμένη επαγωγή των γονιδίων που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλονται από αυτόν το μεταγραφικό παράγοντα.



Εικόνα 9: Τα νουκλεοτίδια α) *ppGpp* και β) *pppGpp*

Σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος (*mrm38*), η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στο γενετικό τόπο που κωδικοποιεί τη σύνθεση συνθετασών της πολυφωσφορικής γουανοσίνης (*ppGpp* και *pppGpp*). Η παραγόμενη RelA πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη τόσο για τη σύνθεση όσο και για την υδρόλυση του (p)ppGpp κατά τη γενική απόκριση στρες (Cashel et al. 2006; Mechold et al. 1996; Mechold and Malke 1997; Martinez-Costa et al. 1998; Wehmeier et al. 1998). Συνεπώς, ο μηχανισμός επαγωγής ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη σε αυτό το μεταλλαγμένο στέλεχος, θεωρούμε ότι προσομοιάζει αυτόν των μεταλλαγμένων στα *pst* γονίδια.

3.7.2 Γονίδιο *mtlF*

Δέκα από τα πρόσθετα μεταλλαγμένα στελέχη που εξετάστηκαν (*mrmK*) φάνηκε ότι ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο στον τόπο όπου υπάρχει το γονίδιο *mtlF*, που κωδικοποιεί την ΠΑ υπομονάδα του συστήματος μεταφοράς φωσφοροτρανσφεράσης (PTS system) σακχάρων φρουκτόζης/μαννιτόλης. Η λειτουργία του συστήματος αυτού είναι αναγκαία για την εισαγωγή υδατανθράκων από την κυτταρική μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου και τη

φωσφορυλίωσή τους. Στον *L.lactis* ssp. *cremoris* MG1363 έχει βρεθεί η ύπαρξη του οπερονίου *mtlARFD*: Το γονίδιο *mtlA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη EIICB, η οποία εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση και την εισαγωγή της μαννιτόλης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Το γονίδιο *mtlF* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη EIIA, η οποία είναι υπεύθυνη για τη φωσφορο-μεταφορά μεταξύ της πρωτεΐνης ιστιδίνης (HPt) και της EIICB. Σε παλαιότερες μελέτες, έχει βρεθεί ότι όταν το οπερόνιο είναι ενεργό τότε τα κύτταρα είναι ευαίσθητα στη βακτηριοσίνη ενώ η απενεργοποίηση του γονιδίου *mtlF* του οπερονίου επάγει ανθεκτικότητα σε αυτήν (Postma et al. 1993).

Υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί για την επαγωγή ανθεκτικότητας των Δ *mtlF* μεταλλαγμένων στελεχών στη μασεδοσίνη. Ο πρώτος αφορά μία γενική απόκριση στρες (General Stress Response), που προκαλείται λόγω της αδυναμίας εκ μέρους του κυττάρου να προσλάβει σάκχαρα, με παραγωγή του (p)ppGpp και τροποποίηση της μετάφρασης, ώστε να ευνοηθεί η επιβίωση του κυττάρου. Ο μηχανισμός αυτός όμως είναι λιγότερο πιθανός καθώς τα γονίδια που κωδικοποιούν το οπερόνιο *man-PTS*, τον κύριο μεταφορέα της γλυκόζης, που είναι ο βασικός υδατάνθρακας για τη θρέψη και την επιβίωση των κυττάρων, έχουν παραμείνει άθικτα. Ο πιο πιθανός μηχανισμός που προτείνουμε αφορά στη δυσκολία πρόσδεσης της μασεδοσίνης στον κυτταρικό φάκελο.

3.7.3 Γονίδια *treR* και “*lmg_0424*”

Τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη *mimK* ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο στην περιοχή του γονιδίου *treR* που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GntR και είναι υπεύθυνος για την καταστολή του οπερονίου δέσμευσης της τρεχαλόζης (*tre* operon). Δηλαδή, όταν το γονίδιο είναι ενεργό το οπερόνιο δέσμευσης της τρεχαλόζης είναι ανενεργό ενώ στην περίπτωση αυτών των μεταλλαγμένων στελεχών όταν το γονίδιο είναι ανενεργό το οπερόνιο λειτουργεί, δεσμεύοντας και συσσωρεύοντας στο εσωτερικό του κυττάρου τρεχαλόζη.

Η μασεδοσίνη, όπως όλες οι βακτηριοσίνες, δρουν δημιουργώντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλώντας, έτσι, εκροή κυτταρικών συστατικών. Η δράση της αυτή προκαλεί στο κύτταρο ένα είδος ωσμωτικού στρες, καθώς, με την ύπαρξη των πόρων, διαταράσσεται η ωσμωτική ισορροπία μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του

κυττάρου. Σε συνθήκες ωσμωτικού στρες και, ειδικότερα, σε υπερτονικές συνθήκες, το κύτταρο αναπτύσσει μία απόκριση, συσσωρεύοντας ωσμωλύτες, είτε από το περιβάλλον, είτε με απευθείας σύνθεσή τους. Οι ωσμωλύτες επιδρούν στην εξισορρόπηση της διαφοράς ωσμωμοριακότητας, καθώς επίσης σταθεροποιούν κάποια ένζυμα και παρέχουν προστασία από το ωσμωτικό στρες (Kets et al. 1996; Poolman et al. 1998; Panoff et al. 2000).

Ο προτεινόμενος από εμάς μηχανισμός ανθεκτικότητας στα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα στελέχη, είναι η σύνθεση της τρεχαλόζης, ώστε να δράσει ως ωσμωλύτης στο επερχόμενο ωσμωτικό στρες, που προκαλείται από τη μασεδοσίνη. Βέβαια, ο μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται από το γονίδιο *treR* είναι πιθανό να ρυθμίζει και άλλα γονίδια, άγνωστα προς το παρόν.

Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *mrmK* βρέθηκε να έχει ενσωματώσει το πλασμίδιο στην περιοχή που κωδικοποιεί μία πιθανή μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη, τη *marR*, η οποία αποτελεί ρυθμιστή της εκδήλωσης ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά (Alekshun et al. 2000). Προτείνεται δηλαδή ότι με την απενεργοποίηση του γονιδίου *marR*, ενεργοποιούνται τα γονίδια που συμμετέχουν στη γενική απόκριση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και, έτσι, αυξάνεται και η ανθεκτικότητα στη μασεδοσίνη.

3.7.4 Γονίδια “*llmg_0286*”, *fabG*, “*llmg_1214*”, “*llmg_1621*”, “*llmg_0307*” και *gpsA*

Σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος (*mrm43*), η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στην τοποθεσία που κωδικοποιεί μία πιθανή πρωτεΐνη που δεσμεύει τη γαλακτόζη (“*llmg_0286*”) (Phillips et al. 1991). Η γαλακτόζη αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι, πιθανόν, το συγκεκριμένο γονίδιο να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη σύνθεσή του.

Σε δύο μεταλλαγμένα στελέχη (*mrm25* και *mrm32*), η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στην τοποθεσία του γονιδίου *fabG* που κωδικοποιεί την έκφραση μίας οξειδοαναγωγάσης, πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των αφυδρογονασών, η οποία είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, τα περισσότερα από τα οποία φαίνεται ότι είναι οξειδοοδουκτάσες εξαρτώμενες από το Νικοτιναμίδιο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD) (Jornvall et al. 1995). Καθώς το πρώτο μέλος της οικογένειας αυτής που χαρακτηρίστηκε ήταν μία αλκοολική αφυδρογονάση

της μύγας *Drosophila*, αυτή συνηθίζεται να καλείται (Villaroya et al. 1989; Persson et al. 1991; Neidle et al. 1992) «τύπου εντόμου (insect-type)» ή «μικράς αλύσου» αλκοολικές αφυδρογονάσες. Τα περισσότερα ένζυμα αυτής της κατηγορίας είναι πρωτεΐνες αποτελούμενες από περίπου 250 έως 300 υπολλείμματα αμινοξέων. Οι περισσότερες αφυδρογονάσες διαθέτουν τουλάχιστον δύο συντηρημένες περιοχές. Η πρώτη είναι αυτή που δεσμεύει το συνένζυμο, συνήθως το NAD, και η δεύτερη είναι αυτή που δεσμεύει το υπόστρωμα. Η τελευταία είναι αυτή που καθορίζει την εκλεκτικότητα του υποστρώματος και περιέχει αμινοξέα που εμπλέκονται στην κατάλυση. Το γονίδιο *fabG* συμμετέχει στη σύνθεση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι, το Δ *fabG* στέλεχος μπορεί να παρουσιάζει αλλαγές στον τρόπο σύνδεσης της μασεδοσίνης με την κυτταρική μεμβράνη του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 και έτσι να προκύπτει ο φαινότυπος ανθεκτικότητας. Με παρόμοιο μηχανισμό μπορεί να επάγεται η ανθεκτικότητα και στο μεταλλαγμένο στέλεχος (*mim3*), στο οποίο η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στο γονίδιο *gpsA*, που κωδικοποιεί τη σύνθεση της γλυκερυλο-3-φωσφορικής δεϋδρογενάσης (GPD). Η GpsA καταλύει την αντιστρεπτή αναγωγή της φωσφορικής δι-υδροξυ-ακετόνης προς 3-φωσφορική γλυκερόλη, είναι μία κυττοπλασματική πρωτεΐνη (von Kalm et al. 1989) και συμμετέχει στη σύνθεση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης.

Δύο μεταλλαγμένα στελέχη *mimK* ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο στη θέση που κωδικοποιεί δύο διαφορετικές γλυκοζυλ-τρανσφεράσες (*llmg_1214* και *llmg_1621*), οι οποίες πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ένα άλλο στη θέση που κωδικοποιεί μία N-ακετυλ-τρανσφεράση (*llmg_0307*), η οποία επίσης συμμετέχει στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Γενικότερα, η δομή καθώς και το φορτίο του κυτταρικού τοιχώματος είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη δράση των βακτηριοσινών έναντι των κυττάρων, καθώς αυτές προσδένονται στο κυτταρικό τοίχωμα, ώστε να δημιουργήσουν πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και να θανατώσουν το κύτταρο. Συνεπώς προτείνουμε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν την ομάδα έγιναν ανθεκτικά στη μασεδοσίνη με έναν τέτοιο μηχανισμό, μεταβολής της σύνθεσης του κυτταρικού φακέλου και, άρα, του τρόπου πρόσδεσης της μασεδοσίνης σε αυτόν.

3.7.5 Γονίδιο *fruR*

Σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος (*mrm40*), η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στην τοποθεσία που βρίσκεται ένας μεταγραφικός ρυθμιστής για τον καταβολισμό σακχάρων και κωδικοποιείται μια πρωτεΐνη της οικογένειας DeoR.

Το πεδίο της πρωτεΐνης DeoR, το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύει DNA, απαρτίζεται από 50-60 αμινοξέα και βρίσκεται στους μεταφραστικούς ρυθμιστές της οικογένειας *deoR*, που εμπλέκονται στον καταβολισμό των σακχάρων. Η οικογένεια αυτή έχει ονομαστεί από την πρωτεΐνη του βακτηρίου *E. coli* DeoR, έναν καταστολέα του *deo* οπερονίου, που κωδικοποιεί καταβολικά ένζυμα νουκλεοτιδίων και νουκλεϊκών οξέων.

Μεταγραφικοί καταστολείς που προσομοιάζουν τον DeoR βρίσκονται σε διάφορα είδη βακτηρίων ως ρυθμιστές των μεταβολικών συστημάτων σακχάρων και νουκλεοζιτών (von Bodman et al. 1992; Ray and Larson 2004). Φαίνεται ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να εκδηλώνει μια πλειοτροπική επίδραση στα κύτταρα, συνεπώς, δεν μπορούμε να προβλέψουμε τον πιθανό μηχανισμό επαγωγής ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη.

3.7.6 Γονίδιο “*lmg_0471*” και *ps101*

Στα μεταλλαγμένα στελέχη *mrm40* και *mrm41* η ενσωμάτωση του γονιδίου έγινε στους γενετικούς τόπους *lmg_0471* και *ps101* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργία και, για το λόγο αυτό, δεν έχουμε να προτείνουμε κάποιο πιθανό μηχανισμό επαγωγής ανθεκτικότητας στη μασεδοσίνη.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή παρουσιάστηκε η στρατηγική μεταλλαξογένεσης που χρησιμοποιήθηκε, με στόχο τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της βακτηριοσίνης μασεδοσίνης έναντι των κυττάρων-στόχων της. Με βάση τα αποτελέσματα της διαδικασίας, υποθέτουμε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στη μασεδοσίνη με τους εξής μηχανισμούς:

1. με διακοπή του οπερονίου που ρυθμίζει έναν ABC μεταφορέα φωσφόρου, τη δημιουργία, δηλαδή συνθηκών ασιτίας για το κύτταρο, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση του λόγου των ορμονών ppGpp και pppGpp και τον προσανατολισμό του κυττάρου στην επιβίωσή του, επάγοντας έτσι μία γενικευμένη ανθεκτικότητα.
2. με διακοπή του γονιδίου που καταστέλλει το οπερόνιο δέσμευσης της τρεχαλόζης και την ακόλουθη συσσώρευση τρεχαλόζης ως ωσμωλύτη, στο ωσμωτικό στρες που υπόκειται το κύτταρο με την εκροή κυτταρικών συστατικών από τους πόρους που δημιουργεί η μασεδοσίνη στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου.
3. με διακοπή γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζοντας έτσι τον τρόπο πρόσδεσης της μασεδοσίνης στο κύτταρο.

Σε ένα επόμενο στάδιο της ερευνητικής αυτής δουλειάς, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί διακοπή των συγκεκριμένων γονιδίων με διαφορετική μεθοδολογία, για την επιβεβαίωση του ανθεκτικού φαινότυπου και μοριακή διερεύνηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας με ευρείας κλίμακας τεχνικές, όπως είναι η πρωτεομική και η μεταγραφομική. Επίσης, είναι πιθανό να χρειαστούν και στοχευμένα πειράματα αλληλεπίδρασης της μασεδοσίνης με κάποιες από τις πρωτεΐνες, ειδικά τις διαμεμβρανικές, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια που διεκόπηκαν στα διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη και μπορεί να βρεθούν πιθανοί στόχοι πρόσδεσης της μασεδοσίνης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Alekshun, M.N., Kim, Y.S. and Levy S.B. (2000) Mol. Microbiol. 35: 1394–404
- 2) Alekshun M., Levy S., Mealy T., Seaton B. and Head J. (2001) The crystal structure of marR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution, Nature Structural Biology 8: 710-714
- 3) Anastasiou R., Aktypis A., Georgalaki M., Papadelli M., De Vuyst L. and Tsakalidou E. (2009) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening, International Dairy Journal 19: 330-335
- 4) Andersson U., Levander F. and Radstrom P. (2001) Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*, The journal of biological chemistry 276: 42707-42713
- 5) Anifantakis E. M. (1991) Semi-hard cheeses. In: Anifantakis E. M. (Ed. Greek Cheeses: A tradition of centuries, National Dairy Committee of Greece, Athens, pp. 63-67
- 6) Arvanitoyannis I. S. and Mavrouopoulos A. A. (2000) Implementation of the hazard analysis of critical control point (HACCP) system to Kasseri/Kefalotiri and Anevato cheese production lines, Food Control 11: 31-40
- 7) Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria, Classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, Lactic acid bacteria, Marcel Dekker
- 8) Bayer M. E. (1968) Adsorption of bacteriophages to adhesions between the wall and membrane of *Escherichia coli*, Journal of Virology 2: 346-356
- 9) Benech R. O., Kheadr E. E., Ladridi R., Lacroix C. and Fliss I. (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed cultures, Applied and Environmental Microbiology 68: 3683-3690
- 10) Benyajati C., Place A.R., Powers D.A. and Sofer W. (1981) Alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: relationship of intervening sequences to functional domains in the protein, Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 78: 2717-2721

- 11) Bierbaum G., Szekat C., Josten M., Heidrich C., Kempter C., Jung G. and Dahl H. G. (1996) Engineering of a novel thioether bridge and role of modified residues in the lantibiotic Pep5, *Applied and Environmental Microbiology* 62: 385-392
- 12) Bierbaum G. and Sahl H. G. (2009) Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 2-18
- 13) Bruno-Barcena J. M., Azcarate-Peril M. A. and Hansen H. M (2010) Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids, *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2747-2753
- 14) Caplice E. and Fitzgerald G. F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology* 50: 131-149
- 15) Cashel M., Gentry D. R., Hernandez V. J. and Vinella D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhart, F. C. Washington DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458-1496
- 16) Cesselin B., Ali D., Gratadoux J.J., Gaudu P., Duwat P., Gruss A. and El Karoui M. (2009) Inactivation of the *Lactococcus lactis* high-affinity phosphate transporter confers oxygen and thiol resistance and alters metal homeostasis, *Microbiology* 155: 2274-2281
- 17) Chatterjee C., Paul M., Xie L. and van der Donk W. A. (2005) *Chemical Reviews* 105: 633-683
- 18) Cheigh C. I., Choi H. J., Park H., Kim S. B., Kook M. C., Kim T. S., Hwang J. K. and Pyun Y. R. (2002) Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi, *Journal of Biotechnology* 95: 225-235
- 19) Cotter P. D., Hill C. and Ross R. P. (2005) Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential, *Current Protein and Peptide Science* 6: 61-75
- 20) Davies E. A., Bevis H. E., Potter R., Harris J., Williams G. C. and Delves-Broughton J. (1998) The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving, *Letters in Applied Microbiology* 27: 186-187
- 21) Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R. J. and Hugenholtz J. (1996) Applications of the bacteriocin, nisin, *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193-202

- 22) De Vuyst L. and Vandamme E. J. (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, In: De Vuyst L. and Vandamme E. J. (Eds), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, Blackie Academic and Professional, London, pp. 91-142
- 23) Diep D., Skaugen M., Salehian Z., Holo H. and Nes I. (2007), Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins, *PNAS* 194: 2384-2389
- 24) Draper L. A., Ross R. P., Hill C. and Cotter P. D. (2008) Lantibiotic immunity, *Current Protein and Peptide Science* 9: 34-49
- 25) Dufour A., Hindre T., Haras D. and Le Pennec J. P. (2007) The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age, *FEMS Microbiology Reviews* 31: 134-167
- 26) Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. and Ishizaki A (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews* 24: 85-106
- 27) Garrity G. M. and Holt J. G. (2001) The road map to the manual. In: Boone D. R., Castenholz R. W., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York
- 28) Gaspar P., Neves A., Ramos A., Gasson M., Shearman C. and Santos H. (2004) Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: High yields from food-grade strains deficient in lactate transport system, *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1466-1474
- 29) Georgalaki M. D., Van den Berghe E., Kritikos D., Devriese B., Van Beeumen J., Kalantzopoulos G., De Vuyst L. and Tsakalidou E. (2002) Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5891-5903
- 30) Georgalaki M., Papadelli M., Chassioti E., Anastasiou R., Aktypis A., De Vuyst L., Van Driessche G., Devriese B. and 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: 1143-1151
- 31) Higgins C. F. (2001) ABC transporters: from microorganisms to man, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 8:67-113

- 32) Higgins C. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview, *Research in Microbiology* 152: 205-210
- 33) Hurst A. (1981) Nisin, *Advances in Applied Microbiology* 27: 85-123
- 34) Ito N., Phillips S. E., Stevens C., Ogel Z. B., McPherson M. J., Keen J. N., Yadav K. D. and Knowles P. F. (1991) Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase, *Nature* 350: 87-90
- 35) Jornvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J. and Ghosh D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductase (SDR), *Biochemistry* 34: 6003-6013
- 36) Kaminarides S., Parasschopoulos N. and Beri L. (1999) Combined effects of concentrated thermophilic and mesophilic cultures and conditions of curd acidification on the manufacture and quality of Kasserli cheese, *International Journal of Dairy Technology* 52: 11-19
- 37) Kets E. P. W., Teunissen P. J. M. and De Bont J. A. M. (1996) Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying, *Applied and Environmental Microbiology* 62: 259-261
- 38) Klein G., Pack A., Bonaparte C. et al. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 41: 103-125
- 39) Lejeune R., Callewaert R., Crabbe K. and De Vuyst L. (1998) Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation, *Journal of Applied Microbiology* 84: 159-168
- 40) Levander F., Andersson U. and Radstrom P. (2001) Physiological role of β -phosphoglucomutase in *Lactococcus lactis*, *Applied and environmental microbiology* 67: 4546-4553
- 41) Li Y. and Zhang Y. (2007) PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 2092–2099
- 42) Liu W. and Hansen J. B. (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2551-2558

- 43) Lodi R. (1990) The use of lysozyme to control butyric acid fermentation, *Bulletin of the International Dairy Federation* 251: 51-54
- 44) Lorca G. L. and Font de Valdez G. (2009) *Lactobacillus* stress responses, In: Ljungh A., Waldstrom T., *Lactobacillus* molecular biology, Caister Academic Press, Norfolk
- 45) Martinez-Costa O. H., Fernandez-Moreno M. A. and Malpartida F. (1998) The *relA/spot* homologous gene in *Streptococcus coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp. Synthesizing and degrading activities, *Journal of Bacteriology* 180: 4123-4132
- 46) Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. and Drosinos E. H. (2003) Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, *Meat Science* 64: 265-271
- 47) Matsusaki H., Endo N., Sonomoto K. and Ishizaki A. (1996) Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth, *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 36-40
- 48) McAuliffe O., Ross R. P. and Hill C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, *FEMS Microbiology Reviews* 25: 285-308
- 49) Mechold U., Cashel M., Steiner K., Gentry D. and Malke H. (1996) Functional analysis of *relA/spot* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*, *Journal of Bacteriology* 178: 1401-1411
- 50) Mechold U. and Malke H. (1997) Characterization of the stringent and relaxed response of *Streptococcus equisimilis*, *Journal of Bacteriology* 179: 2658-2667
- 51) Mercenier A., Muller-Alouf H. and Grangette C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines, *Current Issues in Molecular Biology* 2: 17-25
- 52) Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J-J et al. (2003) Oxidative stress in *Lactococcus lactis*, *Genetics and Molecular Research* 2: 348-359
- 53) Mulradt P. F. J., Menzel J. Golecki J. R. and Speth V. (1973) Outer membrane of *Salmonella*. Sites of export of newly synthesized lipopolysaccharide on the bacterial surface, *European Journal of Biochemistry* 35:471-481
- 54) Neidle E., Hartnett C., Ornston L. N., Bairoch A., Rekik M. and Harayama S. (1992) cis-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid *xylL* gene and the

- Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benD* gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily. European Journal of Biochemistry 204: 113-120
- 55) Nettles C. G. and Barefoot S. F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria, Journal of Food Protection 56: 338-356
- 56) Oumer A., Garde S., Gaya P., Medina M. and Nunez M. (2001) The effects of cultivating lactic acid starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria, Journal of Food Protection 64: 81-86
- 57) Panoff J. M., Thammavongs B. and Guegeuen M. (2000) Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP101027T, Cryobiology 40: 264-269
- 58) Papadelli M., Karsioti A., Anastasiou R., Georgalaki M. and Tsakalidou E. (2007) Characterization of the gene cluster involved in the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* FEMS Microbiology Letters 272: 75-82
- 59) Parente E., Ricciardi A. and Addario G. (1994) Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology 41: 388-394
- 60) Parente E. and Ricciardi A. (1994) Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation, Letters in Applied Microbiology 19: 12-15
- 61) Persson B., Krook M. and Jornvall H. (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. European Journal of Biochemistry 200: 537-543
- 62) Poolman B. and Glaasker E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria, Molecular Microbiology 29: 397-407
- 63) Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria, Microbiology Reviews 57: 543-594

- 64) Rallu F., Gruss A., Ehrlich D. and Maguin E. (2000) Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals, *Molecular Microbiology* 35 (3): 517-528
- 65) Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. (2000). Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology* 35: 517–528
- 66) Ray W. K. and Larson T. J. (2004) Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12, *Molecular Microbiology* 51: 813-826
- 67) Rilla N., Martinez B., Delgado T. and Rodriguez A. (2003) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ILA 729, a nisin Z producer, *International Journal of Food Microbiology* 85: 23-33
- 68) Ross R. P., Morgan S. and Hill C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology* 79: 3-16
- 69) Ross A. and Vederas J. (2011) Fundamental functionality: recent developments in understanding the structure-activity relationships of lantibiotic peptides, *The Journal of Antibiotics* 64: 27-34
- 70) Saurin W., Hofnung M., and Dassa E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of Molecular Evolution* 48: 22-41
- 71) Schenider E. and Hunke S. (1998) ATP-binding cassette (ABC transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains, *FEMS Microbiology Reviews* 22: 1-20
- 72) Schiffrin E. J. and Blum S. (2001) Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods, *Current Opinion in Biotechnology* 12: 499-502
- 73) Spano G. and Massa S. (2006) Environmental stress response in wine lactic acid bacteria. Beyond *Bacillus subtilis*, *Critical Reviews in Microbiology* 32: 77-86
- 74) Stadhouders J. (1990) Prevention of butyric acid fermentation by the use of nitrate, *Bulletin of the International Dairy Federation* 251: 40-46

- 75) Steffen C., Eberhard P., Bosset J. O. and Ruegg M. (1993) Swiss-type varieties. In: Fox P. F., Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Major Cheese Groups, second ed., vol. 2. Chapman and Hall, London, UK, p. 91
- 76) Stiles M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331-345
- 77) Stortz G. and Hengge-Aronis R. (2000) *Bacterial Stress Responses* p. 485, ASM Press, Washington DC
- 78) Sugimoto S., Al-Mahim A. and Sonomoto K. (2008) Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106: 324-336
- 79) Tsakalidou E., Zoidou E., Pot B., Wassill L., Ludwig W., Devriese L. A., Kalantzopoulos G., Schleifer K. H. and Kersters K. (1998) Identification of streptococci from Greek Kasserli cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 519-527
- 80) Van Bogelen R. A., Greis K. D., Blumenthal M., Tani T. H. and Matthews R. (1999) Mapping regulatory networks in microbial cells, *Trends in Microbiology* 7: 320-328
- 81) van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D and Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 187-216
- 82) Van den Berg G., Meijer W. C., Dusterhoft E. M. and Smit G. (2004) Gouda and related cheeses. In: Fox R. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Major Cheese Groups, third ed., vol. 2, Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 103-140
- 83) Van den Berghe E., Skourtas G., Tsakalidou E. and De Vuyst L. (2005) *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture, *International Journal of Food Microbiology* 107: 138-147
- 84) Villarroya A., Juan E., Egestad B. and Jornvall H. (1989) The primary structure of alcohol dehydrogenase from *Drosophila lebanonensis*. Extensive variation within insect 'short-chain' alcohol dehydrogenase lacking zinc. *European Journal of Biochemistry* 180: 191-197

- 85) von Bodman B. S., Hayman G. T., Farrad S. K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 89: 643-637
- 86) von Kalm L., Weaver J., DeMarco J., MacIntyre R. J. and Sullivan D. T. (1989) Structural characterization of the alpha-glycerol-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene of *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 86: 5020-5024
- 87) Walstra P., Noomen A. and Geurts T. J. (1993) Dutch-type varieties. In: Fox P. F., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Major Cheese Groups*, second ed., vol. 2. Chapman and Hall, London, UK, p. 39-82
- 88) Wehmeier L., Sxhafer A., Burkovski A., Kramer R., Mechold U., Malke H. et al. (1998) The role of the *Corynebacterium glutamicum* rel gene in (p)ppGpp metabolism, *Microbiology* 144: 1853-1862
- 89) Wells J. M., Robinsin K., Chamberlain L. M., Schofield K. M. and LePage R. W. (1996) Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 317-330

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λέξεις κλειδιά: μασεδοσίνη, *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, ανθεκτικότητα, πλασμιδιακός φορέας, μετασχηματισμός, χαρακτηρισμός, μεταλλαγμένα στελέχη

Οι καινοτόμοι ή εναλλακτικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν εξαιρετικά μεγάλη σημασία στις μέρες μας, λόγω της εκτεταμένης εμφάνισης ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι γνωστό εδώ και καιρό ότι παράγουν τέτοιες ενώσεις, με πιθανές εφαρμογές στους τομείς των τροφίμων και της βιοϊατρικής. Η μασεδοσίνη είναι μία βακτηριοσίνη-πεπτίδιο με ευρύ βακτηριοκτόνο φάσμα, που παράγεται από τον *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, ένα βακτήριο συμβατό με τα τρόφιμα, το οποίο απομονώθηκε από το φυσικά ζυμωμένο Ελληνικό τυρί Κασσέρι. Η παρούσα μελέτη έχει στόχο να αποσαφηνίσει τον τρόπο δράσης της μασεδοσίνης, διερευνώντας τους μηχανισμούς αναγνώρισης και θανάτωσης των κυττάρων-στόχων. Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, ο μικροοργανισμός-μοντέλο για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εκδηλώνει μία έμφυτη ευαισθησία στη μασεδοσίνη. Χρησιμοποιήσαμε τον πλασμιδιακό φορέα pGh9:ISS1 για να κατασκευάσουμε μία τυχαιοποιημένη βιβλιοθήκη από μεταλλαγμένα στελέχη του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Η βιβλιοθήκη δοκιμάστηκε σε διάφορες ανασταλτικές συγκεντρώσεις βακτηριοσίνης, με αποτέλεσμα να απομονωθούν 64 σταθερά μεταλλαγμένα στελέχη, ανθεκτικά στη μασεδοσίνη. Ο προκαταρκτικός χαρακτηρισμός αυτών των μεταλλαγμένων στελεχών με πειράματα κλωνοποίησης και διάσωσης του πλασμιδίου που έφερε την πλευρική αλυσίδα από το χρωμοσωμικό DNA των μεταλλαγμένων στελεχών έδειξαν ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων διακόπηκε στο γονίδιο των ABC-μεταφορέων που εμπλέκονται στη δέσμευση του φωσφόρου, σε κάποια στελέχη διακόπηκε το οπερόνιο του συστήματος μεταφοράς φρουκτόζης/μαννιτόλης PTS (*mtl*) και στο μεταβολισμό των σακχάρων (*fruR*), εμπλέκοντας έτσι τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στην εμφάνιση του ανθεκτικού φαινότυπου. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 πραγματοποιήθηκε σε γενετικούς τόπους που έχουν σχέση με τη βιοσύνθεση του

κυτταρικού φακέλου ενώ βρέθηκαν και γενετικοί τόποι που ρυθμίζουν το οπερόνιο της τρεχαλόζης (*tre*) και την ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Τέλος, βρέθηκαν και δύο γενετικοί τόποι, οι οποίοι αντιστοιχούν σε γονίδια, των οποίων η λειτουργία δεν είναι ακόμα γνωστή. Η μελέτη αυτή ελπίζουμε να αποσαφηνίσει τον τρόπο δράσης της μασεδοσίνης, σε μοριακό επίπεδο.

7. SUMMARY

Key-words: macedocin, *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, resistance, plasmid, transformation, characterization, mutants

Novel or alternative antimicrobial agents are nowadays of outmost importance due to the extended emerging of bacteria's antibiotic resistance. Lactic acid bacteria have been known for long to produce such substances with potential applications for the food and the biomedical sectors. Macedocin is a peptide-bacteriocin with a broad bacteriocidal spectrum produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, a food-grade isolate from naturally fermented Greek Kasserri cheese. The current study aims to unravel the mode of action of macedocin by investigating the mechanisms of target cells' recognition and subsequent killing. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, the 'model' organism for lactic acid bacteria, exhibits an inherent sensitivity to macedocin. We employed the pGh9:ISS1 vector to construct a randomized library of *L. lactis* insertional mutants. The library was screened against several inhibitory concentrations of the bacteriocin, resulting in the isolation of 64 stable mutants resistant to macedocin. Preliminary characterization of these mutants with 'plasmid rescue' experiments showed that the majority of them were disrupted in the fructose/mannitol PTS operon (*mtl*), and the sugar metabolism (*fruR*), thus implicating these proteins in the resistance phenotype. Furthermore, in many cases, insertion of the vector was traced back in loci of *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 chromosome that are dedicated to cell wall biosynthesis, while loci that regulate the trehalose operon (*tre*) and the antibiotic resistance were also found to have been disrupted. Finally, two loci were traced back, that correspond to genes whose function is not known yet. Our ongoing investigation will shed light into the molecular aspects of macedocin's action.