

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας**

«Ανάπτυξη μεθόδων λύσης βακτηριακών κυττάρων»

Δημητριάδης-Γιαννέλης Ι. Κωνσταντίνος

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Επιβλέπων Ν. Λάμπρου, Αν Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2012

Η ανάθεση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας έγινε με την [13η/29-05-2012] απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

«Ανάπτυξη μεθόδων λύσης βακτηριακών κυττάρων»

Δημητριάδης-Γιαννέλης Ι. Κωνσταντίνος

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Η τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- | | |
|-------------------------------------|-----------|
| • Ν. Λάμπρου, Αν Καθηγητής ΓΠΑ | Επιβλέπων |
| • Ι. Κλώνης, Καθηγητής ΓΠΑ | Μέλος |
| • Εμ. Φλεμετάκης, Επ. Καθηγητής ΓΠΑ | Μέλος |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Ν. Λάμπρου, Αν Καθηγητής ΓΠΑ. Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ν. Λάμπρου, Αν Καθηγητής ΓΠΑ για την άμεση καθοδήγησή του και για τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλη την διενέργεια των πειραμάτων αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Ι. Κλώνη, Καθηγητή ΓΠΑ και τον Εμ. Φλεμετάκη, Επ. Καθηγητή ΓΠΑ για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.

Αφιερώνω την εργασία μου αυτή στην οικογένεια μου που με βοήθησαν και με στήριξαν με το δικό τους, μοναδικό τρόπο και στην ανηψιά μου Βίκη, που είναι μόλις 2,5 χρονών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και ο χαρακτηρισμός δύο νέων βακτηριοφάγων (ALMC, CHOED), οι οποίοι μολύνουν το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι βακτηριοφάγοι (ALMC, CHOED) αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4. Η αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων επηρεάζεται τόσο από την ποσότητα και συγκέντρωση των βακτηριοφάγων που προστίθενται όσο και από το χρονικό σημείο ανάπτυξης στο οποίο προστίθενται στην καλλιέργεια του βακτηρίου. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο βακτήρια, αν και αρνητικά κατά Gram, είναι ευαίσθητα στο ένζυμο λυσοζύμη τύπου C, με την αποτελεσματικότητα της λύσης των κυττάρων να επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων στην αντίδραση λύσης και από την ποσότητα του ενζύμου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι και η συγκέντρωση NaCl αλλά και η τιμή του pH επηρεάζουν την αντίδραση λύσης με τις βέλτιστες τιμές αντίδρασης να είναι 0mM NaCl και pH6,24 και για τα δύο βακτήρια.

Επιπλέον μελετήθηκαν τα νουκλεϊκά οξέα των δύο νέων βακτηριοφάγων. Για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση, πέψη με περιοριστικό ένζυμο, κλωνοποίηση τυχαίων τμημάτων μήκους 2kbp, 3kbp και 4kbp σε πλασμιδιακό φορέα, μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων βρέθηκε ότι το γονιδιωματικό υλικό του βακτηριοφάγου CHOED είναι δίκλωνο, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ μεγέθους τουλάχιστον 22kbp.

ABSTRACT

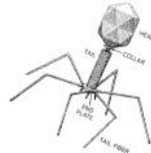
The aim of this work was the study and characterization of two new bacteriophage (ALMC, CHOED), which infect the bacterium *Vibrio anguillarum* strain Pf4. In this study, we observed that bacteriophages ALMC and CHOED can inhibit the bacteria host *Vibrio anguillarum* strain Pf4, with CHOED being more effective. The effectiveness of bacteriophages to inhibit bacteria is influenced by the concentration of the bacteriophage solution being added and the time being added in bacterial culture. We also observed that both bacteria, although Gram negative, are susceptible to the enzyme lysozyme type C. Furthermore, it was observed that the concentration of NaCl and the pH affect the bacterial lysis by enzyme lysozyme, with the optimal conditions being 0mM NaCl and pH6, 24 for both bacteria.

Moreover we studied the nucleic acids of the two new bacteriophages. The whole genome was extracted and digested with restriction enzyme EcoRV. The genome of bacteriophage CHOED is double stranded, deoxyribonucleic acid of at least 22 kbp in length. Random segments of bacteriophage DNA (2kbp, 3kbp and 4kbp length) were cloned in plasmid vectors, transformed in competent cells.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ.....	9
1.1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ	11
1.1.2 ΚΥΚΛΟΙ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ	14
1.1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΟΥΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥΣ.....	17
1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ	18
1.2.1 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ	18
1.2.2 ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	19
1.2.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	20
1.2.4 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ	20
1.2.5 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ.....	21
1.3 ΛΥΣΙΝΕΣ.....	21
1.3.1 ΜΟΥΡΑΜΙΔΑΣΕΣ	22
1.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΙΡΟΛΥΣΙΝΩΝ	26
1.4.1 ΒΙΡΟΛΥΣΙΝΕΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	26
1.4.2 ΚΗΤΙΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	26
1.4.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΥΣΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	26
1.4.4 ΧΡΗΣΗ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ	27
1.4.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	27
1.4.6 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	27
1.5 Ο ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ KVP40.....	28
1.6 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Vibrio anguillarum</i>	32
1.7 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
2.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΑΓΟΙ.....	37
2.1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΓΩΝ.....	37
2. 2 ΜΕΛΕΤΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	38
2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ.....	40
2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟ....	40

2.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟ ΓΛΥΚΟΛΗ (PEG)	41
2.3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ.....	41
2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	42
2.5 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	43
2.6 ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	43
2.7 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ DNA.....	44
2.7.1 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΟΥ DNA.....	44
2.7.2 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ	44
2.8 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ	44
2.8.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΤΟΡΟ CLONING KIT	45
2.9 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ TOP10	46
2.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
3.1 ΓΕΝΙΚΑ	51
3.2 Μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων και των βακτηριοφάγων μετά την μόλυνση σε αυτά.....	51
3.3 Μελέτη της λύσης των κυττάρων από το ένζυμο λυσοζύμη	54
3.4 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου	59
3.5 Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV.....	61
3.6 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	62
3.7 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	64
3.8 Βιοϋπολογιστική Ανάλυση	66
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εξαιτίας της παγκόσμιας έξαρσης παθογόνων βακτηρίων τα οποία είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά, τα λεγόμενα υπερβακτήρια (superbugs), ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) προειδοποίησε ότι αυτά τα βακτήρια απειλούν να φέρουν τον κόσμο στην προ-αντιβιοτικών εποχή. Για την διατήρηση λοιπόν της παγκόσμιας υγείας έγιναν παγκοσμίως προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων υποψήφιων αντιβακτηριακών, συμπεριλαμβανομένου των βακτηριοφάγων και των κωδικοποιούμενων από αυτά λυτικών ενζύμων.

Οι ιοί των βακτηρίων ή βακτηριοφάγοι θεωρούνται ως η κυρίαρχη ζωή στην βιόσφαιρα, προφανώς πολύ περισσότερα από τα βακτήρια ξενιστές και ως εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά για την θεραπεία βακτηριακών ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα και για την μείωση των ζημιών που προκαλούν σε φυτικά και ζωικά προϊόντα. Εξάλλου οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν ποικιλία πλεονεκτημάτων έναντι των αντιβιοτικών. Η απομόνωσή τους είναι γρήγορη και απλή. Η παραγωγή τους οικονομική. Παρουσιάζουν εξειδίκευση με το βακτήριο ξενιστή ή των αριθμών των βακτηρίων που μολύνουν και δεν επηρεάζουν την φυσιολογική μικροχλωρίδα του περιβάλλοντος όπου μπορούν να εφαρμοστούν. Θεωρούνται φιλικά προς το περιβάλλον. Αυτό-αναπαράγονται στο σημείο της μόλυνσης αρκεί το βακτήριο ξενιστής να είναι παρών και μέχρι τώρα δεν έχουν αναφερθεί παρενέργειες (Dorval Courchesne *et al.* 2009).

1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ

Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί, οι οποίοι εξειδικευμένα μολύνουν και λύνουν το βακτήριο ξενιστή. Οι βακτηριοφάγοι και η χρήση αυτών για θεραπεία βακτηριακών ασθενειών, ανακαλύφθηκαν πριν περίπου 100 χρόνια και η ανακάλυψή τους καταλογίζεται στους Frederick Twort, έναν άγγλο βακτηριολόγο, και Felix d'Herelle, έναν γαλλοκαναδό μικροβιολόγο. Εντούτοις, ο Twort δεν συνέχισε την έρευνά του και ήταν ο Felix d'Herelle αυτός που συνέχισε να δουλεύει με αυτούς του ιούς όπου το 1916 τους ονόμασε βακτηριοφάγους από το αρχαίο ελληνικό «φάγειν» και την λέξη βακτήριο, (Twort, 1915, d'Hérelle, 1917) αν και η αντιβακτηριακή τους ιδιότητα είχε αναγνωρισθεί από τους Hankin το 1896 και Gamaleya το 1898.

Ο Felix d'Herelle έκανε πολυάριθμες δοκιμές σε ανθρώπους και ζώα προσπαθώντας να κατανοήσει την φύση και την ικανότητα αυτών των ιών ως θεραπευτικοί παράγοντες (d'Hérelle, 1922, 1917) απομόνωσε βακτηριοφάγους από βακτήρια ξενιστές τα οποία προκαλούν ασθένειες όπως: χολέρα, βουβωνική πανώλη και άνθρακα. Οι δημοσιεύσεις αυτές ήταν που βοήθησαν την ίδρυση του διεθνούς ινστιτούτου των βακτηριοφάγων στο Tbilisi, Georgia το 1923.

Η ανακάλυψη των βακτηριοφάγων συνέβη 20 χρόνια νωρίτερα από την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού, της πενικιλίνης. Μέχρι τότε οι βακτηριοφάγοι χρησιμοποιούταν ως πιθανή θεραπεία για τις βακτηριακές ασθένειες. Οι ανακάλυψη των αντιβιοτικών σε συνδυασμό με ανησυχίες και κλινικές αποτυχίες οδήγησε στην εγκατάλειψη των βακτηριοφάγων ως θεραπεία των ασθενειών στην Αμερική και στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (Matsuzaki *et al.* 2005). Οι περισσότερες κλινικές αποτυχίες οφείλονταν: 1) στην έλλειψη κατανόησης της βιολογίας του βακτηριοφάγου, 2) κακές πειραματικές τεχνικές, 3) κακής ποιότητας παρασκευάσματα βακτηριοφάγων και 4) η έλλειψη κατανόησης των βαθύτερων αιτιών της ασθένειας υπό θεραπεία (O'Flaherty *et al.* 2009). Παρόλα αυτά, η έρευνα και η θεραπεία με βακτηριοφάγους συνεχίστηκε στην πρώην σοβιετική ένωση και στις χώρες της ανατολικής ευρώπης (Alisky *et al.* 1998, Weber-Dabrowska *et al.* 2000).

Πρόσφατα, εξαιτίας της παγκόσμιας έξαρσης παθογόνων βακτηρίων τα οποία είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά, τα λεγόμενα υπερβακτήρια (superbugs), το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει επιστέψει στην μελέτη των βακτηριοφάγων για την κατανόησή τους και την χρήση τους ως θεραπευτικών παραγόντων (Matsuzaki *et al.* 2005). Η θεραπεία με βακτηριοφάγους έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των αντιβιοτικών: 1) είναι αποτελεσματική ενάντια στα υπερβακτήρια (superbugs) λόγω του διαφορετικού μηχανισμού καταπολέμησης των βακτηρίων από τα αντιβιοτικά, 2) παρουσιάζουν εξειδίκευση με το βακτήριο ξενιστή ή των αριθμών των βακτηρίων που μολύνουν και δεν επηρεάζουν την φυσιολογική μικροχλωρίδα του περιβάλλοντος όπου μπορούν να εφαρμοστούν, 3) μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα στην εμφάνιση βακτηρίων ανθεκτικών στους βακτηριοφάγους επειδή η συχνότητα μετάλλαξης των βακτηριοφάγων είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των βακτηρίων, 4) το κόστος

ανάπτυξης ενός συστήματος με βακτηριοφάγους είναι πολύ μικρότερο από αυτό του νέου αντιβιοτικού και 5) οι παρενέργειες είναι πολύ σπάνιες (Courchesne *et al.* 2009).

1.1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Το εκτιμώμενο συνολικό μέγεθος του πληθυσμού των βακτηριοφάγων είναι εξαιρετικά υψηλό. Υποστηρίζεται ότι οπουδήποτε βρίσκονται βακτήρια είναι πιθανόν να βρεθούν και βακτηριοφάγοι για κάθε ξενιστή. Έχει αποδειχθεί ότι οι βακτηριοφάγοι είναι πολύ περισσότεροι αριθμητικά από τα βακτήρια, ουσιαστικά σε όλα τα περιβάλλοντα που έχουν μελετηθεί (Ashelford *et al.* 2003, Furuse *et al.* 1987, Neve *et al.* 1994) και υποστηρίζεται ότι είναι η κυρίαρχη μορφή ζωής στην βιόσφαιρα. Μερικά παραδείγματα όπου έχουν απομονωθεί βακτηριοφάγοι είναι χώμα, νερό, απόβλητα, μέρη του σώματος ανθρώπων και ζώων και οι τροφές (Ashelford *et al.* 2003, Merril, 1974, Neve *et al.* 1994). Εκτιμάται ότι υπάρχουν 10^{31} βακτηριοφάγοι στη γη και περίπου 5100 έχουν χαρακτηριστεί μέχρι το τέλος του 20^{ου} αιώνα (Courchesne *et al.* 2009). Από αυτούς οι περισσότεροι βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον, σε επίγεια οικοσυστήματα υπολογίζονται περίπου 10^7 βακτηριοφάγοι ανά γραμμάριο χώματος και στα απόβλητα ο αριθμός των βακτηριοφάγων κυμαίνεται μεταξύ 10^8 και $10^{10}/\text{ml}$ (Ashelford *et al.* 2003, Hendrix 2002, Sharp 2001).

Οι βακτηριοφάγοι έχουν εξελιχθεί για να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα και θερμοκρασίες, έως 95°C, και σε χαμηλές τιμές pH έως 1,3 (Marks & Sharp 2000). Αυτή η εξέλιξη έχει δημιουργήσει βακτηριοφάγους ποικίλων σχημάτων, μεγεθών, συμμετρίας του καψιδίου και δομής. Το γονιδίωμά τους μπορεί να είναι DNA ή RNA, μονόκλωνο (ss) ή δίκλωνο (ds). Η ταξινόμηση των βακτηριοφάγων έχει ανατεθεί στην Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV) η οποία ομαδοποιεί τους βακτηριοφάγους σε 13 διαφορετικές οικογένειες της τάξης *Caudovirales* (Πίνακας 1). Η ταξινόμηση των βακτηριοφάγων βασίζεται κυρίως στην μορφολογική ανάλυση, στον τύπο του νουκλεϊκού οξέως και στον τύπο του ξενιστή. Ωστόσο, ιδιότητες όπως: φυσικοχημικές, βιολογικές, ποσότητα και μέγεθος πρωτεϊνών, ύπαρξη φακέλου ή λιπιδίου, μεταξύ άλλων προτύπων χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων από την Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV) (Matsuzaki *et al.* 2005).

Order	Family	Morphology	Nucleic acid
Caudovirales	Myoviridae		Double-stranded DNA
	Siphoviridae		
	Podoviridae		
	Tectiviridae ^a		
	Corticoviridae ^a		
	Lipothrixviridae ^b		
	Plasmaviridae ^b		Single-stranded DNA Single-stranded RNA Segmented, double-stranded RNA
	Rudoviridae		
	Fuselloviridae		
	Inoviridae		
	Microviridae		
	Leviviridae		
	Cytoviridae ^b		

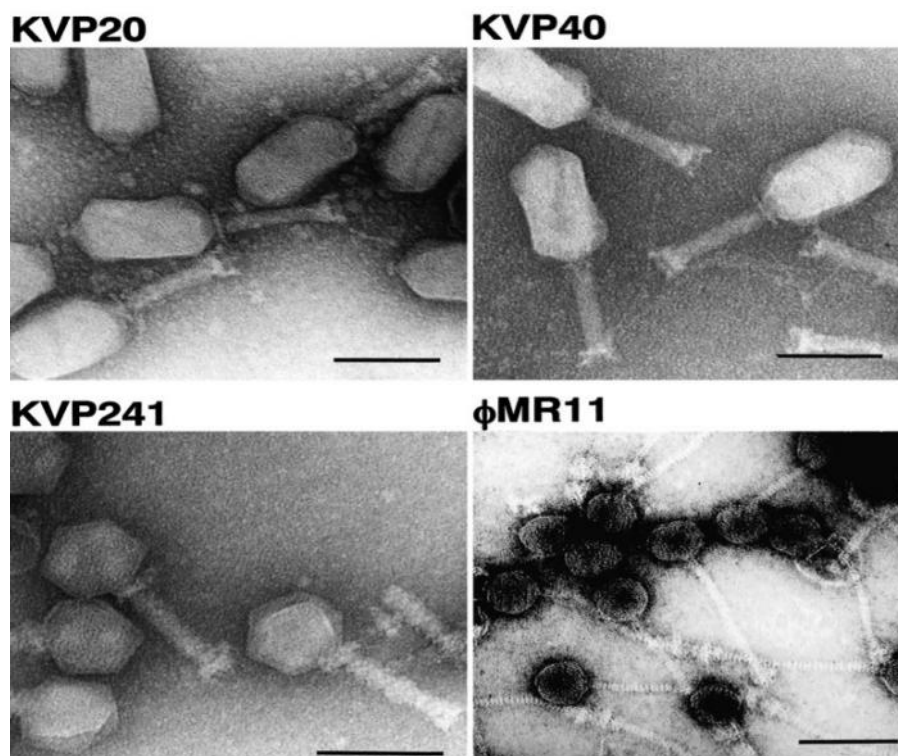
^aLipid containing
^bEnveloped

^aLipid containing
^bEnveloped

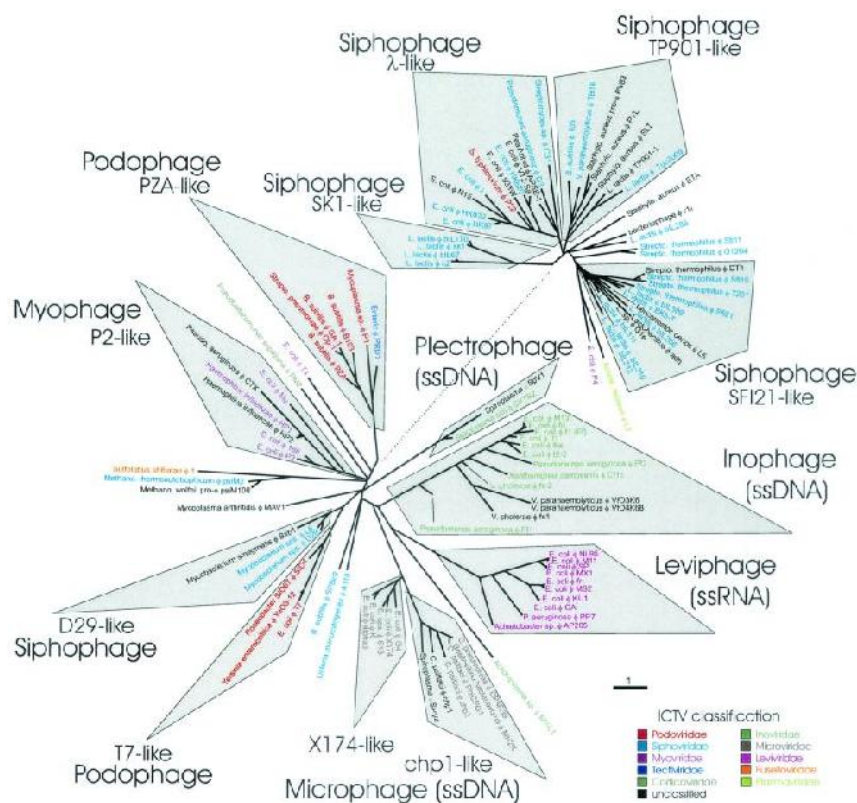
Υπολογίζεται ότι 96% όλων των βακτηριοφάγων στον κόσμο ανήκουν στη μία από τις τρεις ομάδες των βακτηριοφάγων με ουρά. Αυτές οι τρεις ομάδες διαφέρουν ουσιαστικά στον τύπο της ουράς που κατέχουν, συσταλτή ή όχι και μικρού ή μεγάλου μήκους και είναι οι: *Myoviridae* με συσταλτή ουρά (KVP20, KVP40, KVP241 και T-even), *Siphoviridae* με μεγάλη μη συσταλτή ουρά (φMR11 και λ), και *Podoviridae* με πολύ μικρή ουρά (T7) (Εικόνα 1). Μεταξύ των λιγότερο κοινών ομάδων βακτηριοφάγων, μερικές σχηματίζονται από μόνο ένα στοιχείο, βρίσκονται βακτηριοφάγοι με πολυεδρική κεφαλή, νηματοειδής και με πλειομορφική μορφολογία λόγω ότι δεν παρουσιάζουν καθορισμένο σχήμα (Matsuzaki *et al.* 2005).

Μία άλλη τεχνική για την ταξινόμηση των βακτηριοφάγων βασίζεται στην αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τους. Φυλογενετικό δένδρο των βακτηριοφάγων έχει δημιουργηθεί με δεδομένα από πολλά αλληλουχιμένα γονιδιώματα βακτηριοφάγων και το φυλογενετικό δένδρο αυτό ομαδοποιεί τους βακτηριοφάγους σε σχέση με τους κοντινούς συγγενείς αλλά και με όλους τους άλλους βακτηριοφάγους της βάσης δεδομένων (Εικόνα 2). Όλες οι αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για την ομαδοποίηση των βακτηριοφάγων, ανεξάρτητα εάν η πρωτεΐνη προέρχεται από έναν κοινό πρόγονο ή προστέθηκε αργότερα με μεταφορά γενετικού υλικού. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συντηρημένες σε όλες τις ομάδες των βακτηριοφάγων, μπορούν να θεωρηθούν ως γενετικοί δείκτες για τις αντίστοιχες ομάδες τους και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση πολλών άγνωστων βακτηριοφάγων στο περιβάλλον και την ενσωμάτωσή τους στο φυλογενετικό δένδρο.

Ωστόσο, ορισμένες διαφορές μεταξύ των δύο συστημάτων ταξινόμησης, το βασιζόμενο στο γονιδίωμα και η ταξινόμηση του ICTV σύμφωνα με τη μορφολογία, έχουν ανακαλυφθεί. Για παράδειγμα, ο βακτηριοφάγος φP22 του *S.typhimurium* της οικογένειας *Podoviridae* σύμφωνα με το ICTV, έδειξε ομοιότητα σε γονιδιωματικό επίπεδο με τους λ-όμοιους βακτηριοφάγους. Επίσης, ο βακτηριοφάγος φPRD1 της οικογένειας *Tectiviridae* (ICTV) ομαδοποιείται γονιδιωματικά με τους PZA-όμοιους (Rohwer *et al.* 2002).



Εικόνα 1. Βακτηριοφάγοι στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. KVP20, KVP40 και KVP241 είναι βακτηριοφάγοι που μολύνουν είδη του γένους *Vibrio* και ανήκουν στην οικογένεια *Myoviridae*. Ο βακτηριοφάγος φMR11 ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae* (Matsuzaki *et al.* 2005).



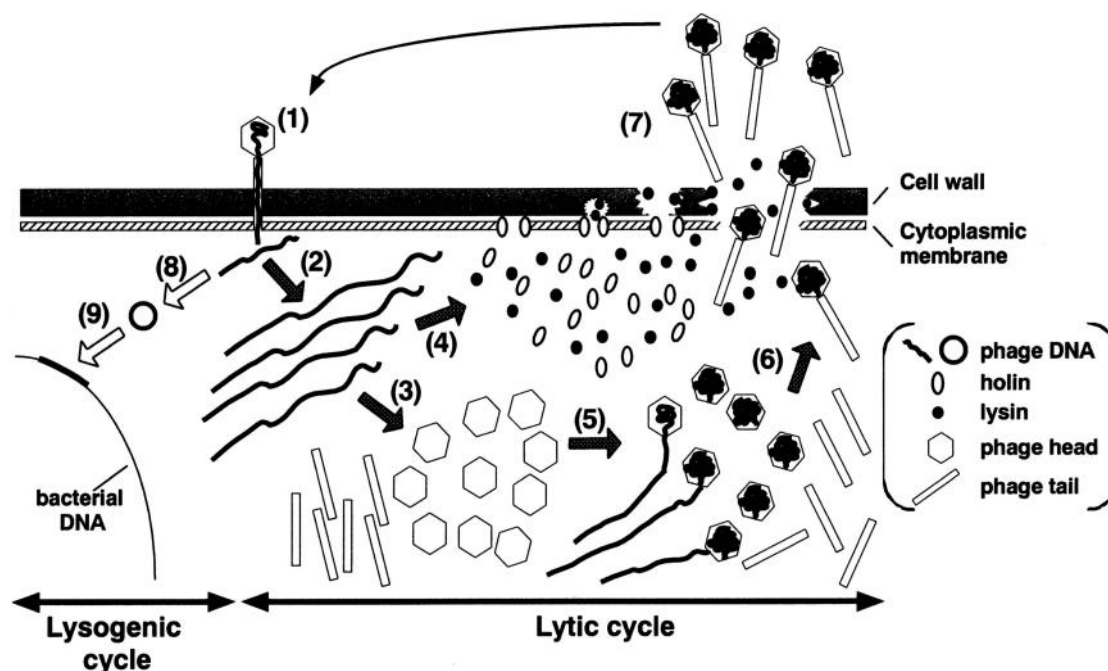
Εικόνα 2 Φυλογενετικό δένδρο των βακτηριοφάγων βασισμένο σε 105 πλήρως αλληλουχισμένα γονιδιώματα (Rohwer *et al.* 2002).

1.1.2 ΚΥΚΛΟΙ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Οι βακτηριοφάγοι όπως και όλοι οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοπαράσιτα και για να πολλαπλασιαστούν απαιτούν έναν εξειδικευμένο ξενιστή. Έξω από τον ξενιστή, οι βακτηριοφάγοι είναι αδρανής και προστατεύουν το γονιδιώμά τους από φυσικές, χημικές και ενζυμικές καταπονήσεις έως ότου το γονιδιώμά τους εισαχθεί στον κατάλληλο ξενιστή μετά από μόλυνση. Το γενετικό υλικό των βακτηριοφάγων είναι είτε DNA είτε RNA. Η πρόσδεση του βακτηριοφάγου στο βακτήριο ξενιστή γίνεται μέσω της ουράς του ή της άκρης της ουράς η οποία αναγνωρίζει τους απαραίτητους υποδοχείς (υδατάνθρακες, μόρια πρωτεΐνης και λιποπολυσακχαριτών και μαστίγια) οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηρίου ξενιστή. Οι περισσότεροι βακτηριοφάγοι είναι υψηλά εξειδικευμένοι για τους κατάλληλους υποδοχείς και γι' αυτό υπάρχει μικρή ή καθόλου αλληλεπίδραση με υποδοχείς με έστω και μικρές διαφορές στην δομή τους.

Λυτικός κύκλος ζωής

Ο λυτικός κύκλος ζωής ξεκινά με την αλληλεπίδραση του βακτηριοφάγου με τους υποδοχείς στην επιφάνεια του βακτηρίου ξενιστή. Μετά την προσρόφηση του βακτηριοφάγου στην επιφάνεια του βακτηρίου ξενιστή, το κυτταρικό τοίχωμα γίνεται διαπερατό, το νουκλεϊκό οξύ μεταφέρεται εντός του κυττάρου ενώ το καψίδιο του βακτηριοφάγου παραμένει εκτός του βακτηριακού κυττάρου. Στο εσωτερικό του ξενιστή συμβαίνουν αρκετά βήματα που περιλαμβάνουν γονιδιακή έκφραση, αντιγραφή του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου και μορφογένεση, δηλαδή τον σχηματισμό των καψιδίων και ουρών και το πακετάρισμα των γονιδιωμάτων εντός των καψιδίων (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ο λυτικός και ο λυσιγενικός κύκλος ζωής των βακτηριοφάγων (Matsuzaki *et al.* 2005).

Οι βακτηριοφάγοι αναπαράγονται πολύ γρήγορα, σχηματίζοντας νέα ιοσωμάτια και ο λυτικός κύκλος τελειώνει με την λύση του βακτηρίου ξενιστή απελευθερώνοντας εκατοντάδες νέους βακτηριοφάγους έτοιμους να προσβάλουν γειτονικά βακτήρια ξενιστές. Η λύση του βακτηρίου ξενιστή πραγματοποιείται με την χρήση δύο πρωτεϊνών, της χολίνης και της ενδολυσίνης ή λυσίνης, οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου. Οι λυσίνες υδρολύουν την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Η πρωτεΐνη χολίνη δημιουργεί μία «τρύπα» στην μεμβράνη του κυττάρου, επιτρέποντας στην λυσίνη να φτάσει στα εξωτερικά στρώματα της πεπτιδογλυκάνης (Matsuzaki *et al.* 2005). Ο αριθμός των

νέων βακτηριοφάγων που παράγονται εξαρτάται από το είδος και τις συνθήκες, ωστόσο κάθε βακτηριοφάγος είναι ικανός να παράγει κατά μέσο όρο 50 – 200 νέους βακτηριοφάγους σε κάθε κύκλο ζωής (Carlton, 1999).

Λυσιγονικός κύκλος ζωής

Βακτηριοφάγοι με λυσιγονικό κύκλο ζωής ενσωματώνουν το γονιδίωμά τους στο χρωμόσωμα του βακτηρίου ξενιστή. Η ενσωματωμένη μορφή του βακτηριοφάγου ονομάζεται *προφάγος*. Με αυτή τη μορφή ο βακτηριοφάγος μπορεί να περνάει από τη μια βακτηριακή γενιά στην άλλη, ώσπου να διεγερθεί από κάποιο παράγοντα, να αποσχιστεί από το βακτηριακό χρωμόσωμα και να αρχίσει ένα λυτικό κύκλο. Οι απόγονοι βακτηριοφάγοι στη συνέχεια ακολουθούν είτε λυτικό είτε λυσιγονικό κύκλο. Όταν ένα βακτηριακό στέλεχος προσβληθεί από βακτηριοφάγο με λυσιγονικό κύκλο ζωής τότε γίνεται ανθεκτικό στην μόλυνση από άλλους βακτηριοφάγους με όμοιο σύστημα μόλυνσης ή ίδια ειδικότητα καταστολής. Μερικοί προφάγοι αναγνωρίζονται ως πλασμίδια τα οποία αντιγράφονται και περνούν στο νέο κύτταρο κατά την αντιγραφή του κυττάρου. Σε ορισμένες περιπτώσεις η συγκέντρωση του καταστολέα μειώνεται και ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων που είναι απαραίτητα για το λυτικό μονοπάτι. Σε αυτή την περίπτωση ακολουθείτε ο λυτικός κύκλος ζωής όπου αρχικά σχηματίζονται νέοι βακτηριοφάγοι στο εσωτερικό του βακτηρίου και ακολουθεί λύση του βακτηρίου και απελευθέρωση των νέων βακτηριοφάγων (Matsuzaki *et al.* 2005).

Πρωτεΐνες αντιβιοτικά

Μερικοί μικροί βακτηριοφάγοι όπως οι φX174 και Qβ, οι οποίοι έχουν μονόκλωνο DNA ή RNA, δεν έχουν τα γονίδια για τις πρωτεΐνες χολίνη και λυσίνη για την έξοδό τους από το βακτήριο ξενιστή. Αντί αυτού όμως, παράγουν μια πρωτεΐνη η οποία καταστέλλει τη βιοσύνθεση της μονομερούς μουρεΐνης . Η πρωτεΐνη gpE του βακτηριοφάγου φX174 καταστέλλει την MraY, η οποία καταλύει τον σχηματισμό της πρόδρομης μουρεΐνης συνδεδεμένης με λιπίδιο, και η πρωτεΐνη gpA2 του βακτηριοφάγου Qβ καταστέλλει την MurA, η οποία καταλύει το πρώτο βήμα του μονοπατιού της σύνθεσης της μουρεΐνης. Η στρατηγική της καταστολής της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος πιστεύεται ότι χρησιμοποιείται από μικρούς

βακτηριοφάγους και οι πρωτεΐνες καταστολής που παράγουν είναι γνωστές ως «πρωτεΐνες αντιβιοτικά» (Matsuzaki *et al.* 2005).

1.1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΟΥΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥΣ

Τα βακτήρια μπορούν να γίνουν ανθεκτικά στους βακτηριοφάγους όταν: μία διαταραχή συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του βακτηριοφάγου, μέσω ειδικών μηχανισμών για την προστασία τους από την εισβολή ξένου DNA, γενετική ανταλλαγή με άλλα βακτήρια, απόκτηση ορισμένων πλασμιδίων και ύπαρξη λυσιγονικού βακτηριοφάγου. Διαταραχή κατά την ανάπτυξη του βακτηριοφάγου μπορεί να συμβεί μέσω απώλειας ή αλλαγής μέσω μετάλλαξης των υποδοχέων του ξενιστή στους οποίους ο βακτηριοφάγος προσροφάτε. Στην περίπτωση αυτή δημιουργείται ανθεκτικότητα των βακτηρίων στους βακτηριοφάγους που μέχρι πρότινος το προσέβαλαν. Διαταραχή μπορεί επίσης να συμβεί μετά την είσοδο του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου στον ξενιστή με την αποδιάταξη του ξένου DNA μέσω των βακτηριακών DNAσών σε διαφορετικά στάδια της ενδοκυτταρικής βιοσύνθεσης (αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση, ωρίμανση των ιοσωμάτων) και τέλος, εξαιτίας του μπλοκαρίσματος της λύσης του κυττάρου ξενιστή και την απελευθέρωση των βακτηριοφάγων (Krylov, 2001).

Η προστασία του βακτηρίου ενάντια στη είσοδο ξένου DNA βασίζεται στην μεθυλίωση του DNA του ξενιστή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται σε συγκεκριμένα σημεία της γονιδιωματικής αλληλουχίας η οποία θα το προστατεύσει από περιοριστικές ενδονουκλεάσες του βακτηριοφάγου. Η τροποποίηση αυτή προσφέρει την αποδιάταξη όλων των ξένων DNA τα οποία δεν φέρουν το αντίστοιχο μοτίβο μεθυλίωσης. Μερικά τροποποιημένα γονιδιώματα βακτηριοφάγων έχουν την ικανότητα να ξεφεύγουν την αποδιάταξη αυτή και κατά την αντιγραφή τους στην συνέχεια μεθυλιώνονται και παραμένουν μολυσματικά για το βακτήριο (Marks, & Sharp, 2000).

Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις όπου η εξέλιξη του βακτηρίου το κατέστησε ανθεκτικό στους βακτηριοφάγους τροποποιώντας του υποδοχείς που προσροφάτε ο βακτηριοφάγος. Οι υποδοχείς αυτοί μπορεί να είναι παράγοντες μολυσματικότητας για το βακτήριο και η τροποποίησή τους να οδηγήσει στην μείωση της μολυσματικότητας του βακτηρίου.

1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Οι αντιβιοτικές ιδιότητες των λυτικών βακτηριοφάγων αξιολογήθηκαν πολύ νωρίς, πριν την εποχή των αντιβιοτικών. Μερικές δυτικές εταιρίες συμπεριλαμβανομένου των γαλλικών Le Laboratoire du Bacteriophage και L'Oreal, των γερμανικών Antipiol και την Γερμανική κοινότητα των Βακτηριοφάγων, και των αμερικάνικων εταιριών Eli-Lilly, Swan-Myers of Abbot Laboratories, Squibb and Sons, και η εταιρία Parke & Davis (Pfizer), κατασκεύασαν για εμπορική χρήση πλήθος διαφορετικών σκευασμάτων με βακτηριοφάγους για την θεραπεία μολύνσεων όπως αποστήματα, πληγές, κολπίτιδα και μολύνσεις του άνω αναπνευστικού. Παρά το ότι η θεραπεία με βακτηριοφάγους εγκαταλείφτηκε από τις δυτικές χώρες για χάρη των αντιβιοτικών, συνεχίστηκε να μελετάτε και να χρησιμοποιείται εκτενώς στις χώρες τις ανατολικής Ευρώπης και της πρώην Σοβιετικής Ένωσης με σχεδόν καθόλου αναφορές σημαντικών επιπλοκών. Στην Αμερική, αν και δεν υπάρχουν κλινικά αποτελέσματα της χρήσης των βακτηριοφάγων, μερικοί βακτηριοφάγοι χρησιμοποιήθηκαν για ιατρικές μελέτες. Για παράδειγμα, ο βακτηριοφάγος φX174 χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της χημικής ανοσολογικής λειτουργίας σε ασθενείς με έλλειψη ADA και την ανάλυση των μορίων της κυτταρικής επιφάνειας που σχετίζονται με την ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης.

1.2.1 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Πολυάριθμες ευρεσιτεχνίες έχουν κατατεθεί με μεθόδους που αφορούν την χρήση βακτηριοφάγων για την θεραπεία και την προφύλαξη βακτηριακών λοιμώξεων. Πολλές από αυτές τις μεθόδους παρέχουν καινοτόμες τεχνολογίες για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της θεραπείας με βακτηριοφάγους. Για παράδειγμα, μια μέθοδος προσφέρει βακτηριοφάγους για την πρόληψη και θεραπεία μολύνσεων από βακτήρια του γένους *Bacillus*, συμπεριλαμβανομένου του *Bacillus anthracis*. Μία πρόσφατη ευρεσιτεχνία περιγράφει την θεραπεία της ακμής, η οποία προκαλείτε από το βακτήριο *Propionibacterium acnes* στο ανθρώπινο δέρμα, χρησιμοποιώντας βακτηριοφάγους που προσβάλλουν το συγκεκριμένο βακτήριο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα βακτηριοφάγο ο οποίος δεν μπορεί να εισέλθει στον λυσιγονικό κύκλο ζωής, προσφέροντας ένα πλεονέκτημα διότι ο βακτηριοφάγος δεν μπορεί να παραμείνει αδρανής στο χρωμόσωμα του βακτηρίου. Μπορεί επίσης να αποφύγει μερικές από τις προαναφερθείσες ανησυχίες όπως η λυσιγονική ανοσία των

παθογόνων βακτηρίων και η εναλλαγή της παθογένειας του βακτηρίου. Μία άλλη καινοτόμος προσέγγιση στη θεραπεία με βακτηριοφάγους είναι η χρήση βακτηριοφάγων με ελλειπή ή ελαττωματική παραγωγή λυσίνης, η οποίοι μπορούν να δημιουργηθούν μέσω στοχευμένης μετάλλαξης ή με επιλογή από βακτηριοφάγους που έχουν μειωμένα επίπεδα λύσης. Χωρίς ένα λειτουργικό λυτικό ένζυμο, οι βακτηριοφάγοι μπορούν να μολύνουν και να σκοτώσουν τα βακτηριακά κύτταρα χωρίς την λύση των κυττάρων, με αποτέλεσμα νεκρά αλλά άθικτα βακτηριακά κύτταρα. Κατά συνέπεια, τα υλικά των νεκρών κυττάρων (π.χ ενδοτοξίνες) δεν απελευθερώνονται και έτσι η θεραπεία με βακτηριοφάγους παρουσιάζει μειωμένη τοξικότητα. Ωστόσο, το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι οι βακτηριοφάγοι δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν αν δεν υπάρχει λύση του βακτηριακού κυττάρου. Επιπλέον, μεγαλύτερη δόση με βακτηριοφάγους θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση όλων των βακτηριακών κυττάρων σε αντίθεση με θεραπείες που χρησιμοποιούν βακτηριοφάγους με την ικανότητα του αυτό-πολλαπλασιασμού.

1.2.2 ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η ακραία ειδικότητα των βακτηριοφάγων τους καθιστά ιδανικούς υποψήφιους για εφαρμογές που στοχεύουν στην αύξηση της ασφάλειας των τροφίμων κατά την διάρκεια της παραγωγικής διεργασίας, καθώς οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βιολογική καταπολέμηση των βακτηρίων χωρίς να αλληλεπιδρούν με την φυσική μικροχλωρίδα ή τις καλλιέργειες στα προϊόντα ζύμωσης. Ένα άλλο πλεονέκτημα της απολύμανσης με βακτηριοφάγους είναι ότι οι βακτηριοφάγοι είναι μη τοξικοί και δεν μεταβάλλουν το χρώμα, την υφή ή την γεύση των τροφίμων που πρόκειται να εφαρμοστούν. Στην πραγματικότητα, η εφαρμογή των βακτηριοφάγων στα τρόφιμα θεωρείται περισσότερο εφικτή από τους οργανισμούς τροφίμων Ευρώπης και Αμερικής διότι έχουν λιγότερο αυστηρούς κανόνες για την απολύμανση τροφίμων σε αντίθεση με τους θεραπευτικούς παράγοντες για τους ανθρώπους. Για παράδειγμα, στην Αμερική έχει εγκριθεί η χρήση βακτηριοφάγων για την απολύμανση έτοιμου προς κατανάλωση κρέατος, το προϊόν αυτό αποτελείται από έξι βακτηριοφάγους για την εξάλειψη του στελέχους *L. Monocytogenes*.

1.2.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι βακτηριοφάγοι μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως ισχυρά εργαλεία για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα και στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, η παρουσία *E. coli* μπορεί να ανιχνευθεί με χρήση ενός παρασκευάσματος βακτηριοφάγων του *E. coli* στα τρόφιμα επιτρέποντας τους βακτηριοφάγους να προσδεθούν στην επιφάνεια του βακτηρίου. Στην συνέχεια, οι προσροφημένοι βακτηριοφάγοι μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα με την χρήση χρωματογραφίας (HPLC). Μία βελτιωμένη τεχνική για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων έχει δημιουργηθεί, η οποία περιλαμβάνει την χρήση επιλεκτικών βακτηριοφάγων οι οποίοι έχουν σημειωθεί με έναν φθορίζον ή μαγνητικό δείκτη. Η ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων γίνεται με την χρήση της τεχνικής ELISA, με την εκπομπή ενός ορατού σήματος. Πολλές άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων έχουν προταθεί (Courchesne *et al.* 2009).

1.2.4 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Εκτός από τα παθογόνα που προσβάλλουν τον άνθρωπο, η χρήση βακτηριοφάγων ως θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων σε ζώα είναι ένας άλλος σημαντικός τομέας έρευνας των βακτηριοφάγων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ομάδα των Smith και Huggins, οι οποίοι επιτυχώς χρησιμοποίησαν βακτηριοφάγους για την πρόληψη μόλυνσης από το βακτήριο *E. coli* σε μόσχους, χοίρους και αρνιά. Πιο πρόσφατα, έχει αναφερθεί η χρήση βακτηριοφάγων για τον έλεγχο του αριθμού του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 στα πρόβατα και στα βοοειδή. Επίσης προσπάθειες έγιναν για την θεραπεία της μαστίτιδας στα βοοειδή που προκαλείται από το βακτήριο *S. aureus* από τους Gill *et al.* (2006). Επίσης, ερευνήθηκε η θεραπεία των αναπνευστικών λοιμώξεων που προκαλείται από το βακτήριο *E. coli* σε κοτόπουλα από τους Huff *et al.* (2002). Η χρήση βακτηριοφάγων για την θεραπεία παθογόνων βακτηρίων των ψαριών έχει επίσης μελετηθεί. Βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά αποτελούν μεγάλο πρόβλημα για τις υδατοκαλλιέργειες (Nakai & Park, 2002). Για παράδειγμα, η χρήση βακτηριοφάγων για την θεραπεία της ασθένειας που προκαλείται από το βακτήριο *Lactobacillus garvieae* στα κίτρινα ψάρια έχει μελετηθεί. Επίσης έχει μελετηθεί η χρήση βακτηριοφάγων για το μολυσματικό θανατηφόρο βακτήριο των ψαριών *Vibrio Parahemolyticus* το οποίο προκαλεί την ασθένεια βιμπρίωση (Pereira *et al.* 2011).

1.2.5 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Απολύμανση των ιατρικών εργαλείων και συσκευών αποτελεί μία άλλη πρακτική χρήση των βακτηριοφάγων. Οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποστείρωση των ιατρικών εργαλείων με την πρόληψη και μείωση της αποίκισης των βακτηρίων σε αυτές τις επιφάνειες καταστρέφοντας βακτηριακά φιλμ, τα οποία είναι υπεύθυνα για μόλυνσης που προέρχονται από μη αποστειρωμένα σωστά ιατρικά εργαλεία.

Μία άλλη πιθανή χρήση των βακτηριοφάγων είναι η χρησιμοποίησή τους ως μηχανισμοί παράδοσης φαρμάκων. Για παράδειγμα, μία τεχνική προσφέρει την χρήση των βακτηριοφάγων συζευγμένα, μέσω ενός συνδέτη ή απευθείας, με ένα φάρμακο έτσι ώστε το φάρμακο να βρίσκεται συνδεδεμένο στην εξωτερική επιφάνεια του βακτηριοφάγου, επιτρέποντας το φάρμακο να παραδοθεί εξειδικευμένα στον στόχο (Courchesne *et al.* 2009).

1.3 ΛΥΣΙΝΕΣ

Οι «βιρολυσίνες» είναι λυτικά ένζυμα, τα οποία κωδικοποιούνται από τους βακτηριοφάγους (λυσίνες ή ενδολυσίνες), και παράγονται από μολυσμένα βακτήρια με βακτηριοφάγο στο τελικό στάδιο του λυτικού κύκλου ζωής. Προκαλούν την λύση του βακτηριακού κυττάρου αποικοδομώντας την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου ξενιστή με σκοπό την απελευθέρωση των νέων βακτηριοφάγων από το προσβεβλημένο βακτήριο. Οι πρώτες βιρολυσίνες αναγνωρίστηκαν το 1950, ωστόσο, είχε αναφερθεί ότι είναι δραστικές έναντι νεκρών αλλά όχι ζωντανών κυττάρων. Στην συνέχεια, μία δεύτερη βιρολυσίνη PAL αναγνωρίστηκε το 1970, η οποία λύνει νεκρά αλλά και ζωντανά κύτταρα *S. Aureus*. Επιπλέον, βιρολυσίνες από βακτηριοφάγους που προσβάλουν το γένος *Staphylococcus* Twort, 87, Phi11 και 80, όπως επίσης και των βακτηριοφάγων του *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* και *Clostridium tyrobutyricum*, αναγνωρίστηκαν την δεκαετία του 90.

Οι βιρολυσίνες αποτελούνται από δύο δομικές περιοχές, μία περιοχή του C τελικού άκρου η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της ουσίας στο κυτταρικό τοίχωμα στην οποία θα προσδεθεί και μία ή δύο περιοχές του N τελικού άκρου η οποία προσδίδει την ικανότητα κατάλυσης της ουσίας στο κυτταρικό τοίχωμα. Η καταλυτική περιοχή εκφράζει μία από τους πέντε κύριους τύπους λυτικής δράσης: N-

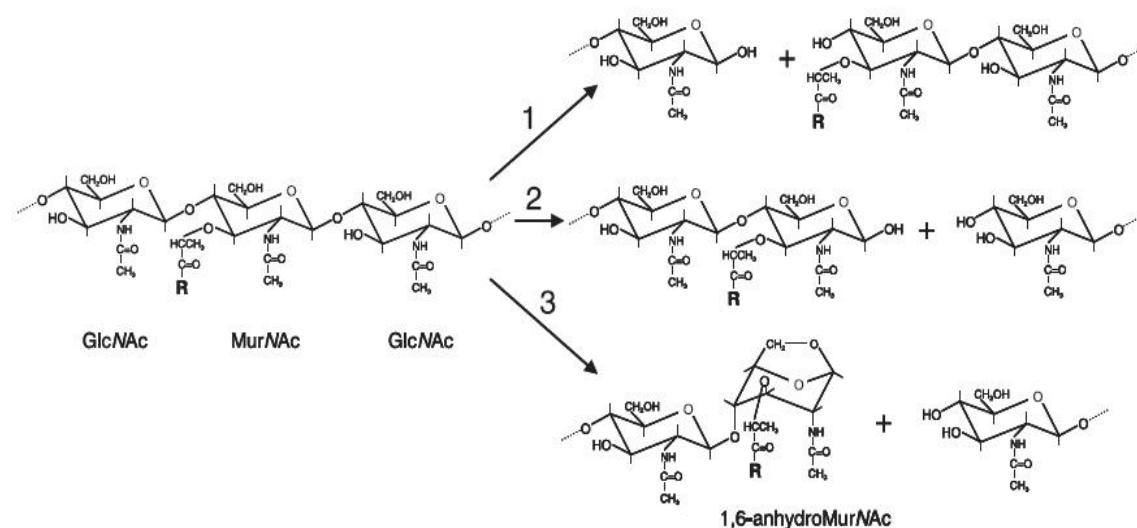
ακετυλο μουραμιδάση, λυτική τρανσγλυκοσυλάση, ένδο-βήτα-N-ακετυλογλυκοσαμινιδάση, ενδοπεπτιδάση ή αμιδάση. Οι τρεις πρώτες τάξεις περιλαμβάνουν βιρολυσίνες οι οποίες διασπούν τον β-1,4-γλυκοσιδικό δεσμό ενώ οι ενδοπεπτιδάσες στοχεύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς και οι αμιδάσες τους αμιδικούς δεσμούς. Κάθε C τελικό άκρο είναι εξειδικευμένο για μία ουσία του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η περιοχή είναι συχνά, αλλά όχι πάντοτε αναγκαία για την δράση της βιρολυσίνης.

Γενικότερα, οι βιρολυσίνες ανήκουν σε μία ομάδα των υδρολασών του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (BCWH), οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις υπό ομάδες σύμφωνα με την προέλευση του ενζύμου: 1) λυσοζύμες, οι οποίες παράγονται από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς ως κύριο στοιχείο του αμυντικού συστήματος 2) μικρολυσίνες, οι οποίες παράγονται από μικρόβια εκτός από αυτές οι οποίες κωδικοποιούνται από βακτηριοφάγους οι 3) βιρολυσίνες. Οι λυσοζύμες είναι οι πιο καλά μελετημένες βακτηριακές λυσίνες. Ωστόσο, οι βιρολυσίνες θεωρούνται οι πλέον υποσχόμενες ανάμεσα στις τρεις ομάδες διότι: 1) έχουν την ικανότητα της γρήγορα θανάτου των βακτηρίων, ακόμη και αν αυτά είναι ανθεκτικά στην λυσοζύμη, 2) έχουν εξειδίκευση με το βακτήριο που προσβάλλουν χωρίς να αλληλεπιδρούν με την φυσική μικροχλωρίδα, 3) υπάρχει μία τεράστια ποικιλία λυτικών βακτηριοφάγων στην βιόσφαιρα, το οποίο εξασφαλίζει την διαθεσιμότητα λυσίνων με στόχο σχεδόν κάθε βακτήριο και 4) η βακτηριολυτική δραστηριότητα των βακτηριοφάγων στους ξενιστές του είναι εύκολα ανιχνεύσιμη, παρέχοντας μία σταθερή βάση για την ορθολογική επιλογή των βακτηριοφάγων για την απομόνωση των επιθυμητών λυσίνων με στόχο συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια.

1.3.1 ΜΟΥΡΑΜΙΔΑΣΕΣ

Υπάρχουν τρεις τύποι ενζύμων οι οποίοι μπορούν να διασπάσουν την πεπτιδογλυκάνη, οι N-ακετυλογλυκοσαμινιδάσες, οι λυσοζύμες και οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες. Οι λυσοζύμες και οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες διασπούν τον ίδιο γλυκοσιδικό δεσμό. Οι λυσοζύμες και οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες είναι περισσότερο γνωστές ως N-ακετυλ-β-D-μουραμιδάσες (μουραμιδάσες). Οι N-ακετυλ-β-D-μουραμιδάσες είναι ένζυμα με ευρεία ύπαρξη και διασπούν τον βήτα-1,4-γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ των MurNAc και GlcNAc καταλοίπων της

πεπτιδογλυκάνης. Ο δεσμός αυτός μπορεί να διασπαστεί με δύο διαφορετικούς τρόπους Εικόνα 4, οι λυσοζύμες υδρολύουν τον γλυκοσιδικό δεσμό με αποτέλεσμα ένα προϊόν με μειωμένο MurNAc κατάλοιπο. Αντιθέτως, οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες διασπούν τον γλυκοσιδικό δεσμό με ταυτόχρονη ενδομοριακή αντίδραση τρανσγλυκοσυλίωσης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του 1,6-ανυδρο δακτυλίου στο MurNAc κατάλοιπο του προϊόντος.



Εικόνα 4. Διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού της πεπτιδογλυκάνης από 1) N-ακετυλγλουκοσαμινιδάσες 2) λυσοζύμες και 3) λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες.

ΛΥΣΟΖΥΜΕΣ

Οι λυσοζύμες παράγονται σε βακτηριοφάγους, βακτήρια, μύκητες, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα, και είναι μεταξύ των πλέον καλύτερα μελετημένων ενζύμων στη βιολογία και στην βιοχημεία. Υπάρχουν εννιά κατηγορίες πρωτεϊνών με αποδεδειγμένη ή πιθανή λειτουργία όπως της λυσοζύμης. Αν και όλες οι πρωτεΐνες αυτές διασπούν τον βήτα 1,4-γλυκοσιδικό δεσμό, μερικά από αυτά τα ένζυμα υδρολύουν την χιτίνη ή χιτοσάνη, ή είναι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες. Τέσσερις κατηγορίες περιέχουν πρωτεΐνες με αποδεδειγμένη υδρολυτική ικανότητα της πεπτιδογλυκάνης. Τα πρωτότυπα ένζυμα αυτών τεσσάρων κατηγοριών είναι η λυσοζύμη από το λευκό του αυγού όρνιθας (HEWL ή τύπου C), η λυσοζύμη από το λευκό του αυγού χήνας (GEWL ή τύπου G), η λυσοζύμη από τον βακτηριοφάγο T4 (T4L) και η λυσοζύμη Ch. Πιθανόν, η λυσοζύμη από το λευκό του αυγού όρνιθας (HEWL ή τύπου C), η λυσοζύμη από το λευκό του αυγού χήνας (GEWL ή τύπου G),

η λυσοζύμη από τον βακτηριοφάγο T4 (T4L) είναι το αποτέλεσμα της εξέλιξης από έναν κοινό πρόγονο. Παρότι, στατιστικά δεν έχουν καμία ομολογία ακολουθία, η τρισδιάστατη δομή τους δείχνει κάποιες ενδιαφέρουσες, αν και μακρινές ιδιότητες. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται μεταξύ δύο τομέων, οι οποίοι ενώνονται με μία μεγάλη α-έλικα. Ένα μόριο γλουταμικού οξέως, πιθανολογείται ότι είναι απαραίτητο για την κατάλυση, τα οποία βρίσκεται στο C τελικό άκρο της α-έλικας της κάθε πρωτεΐνης.

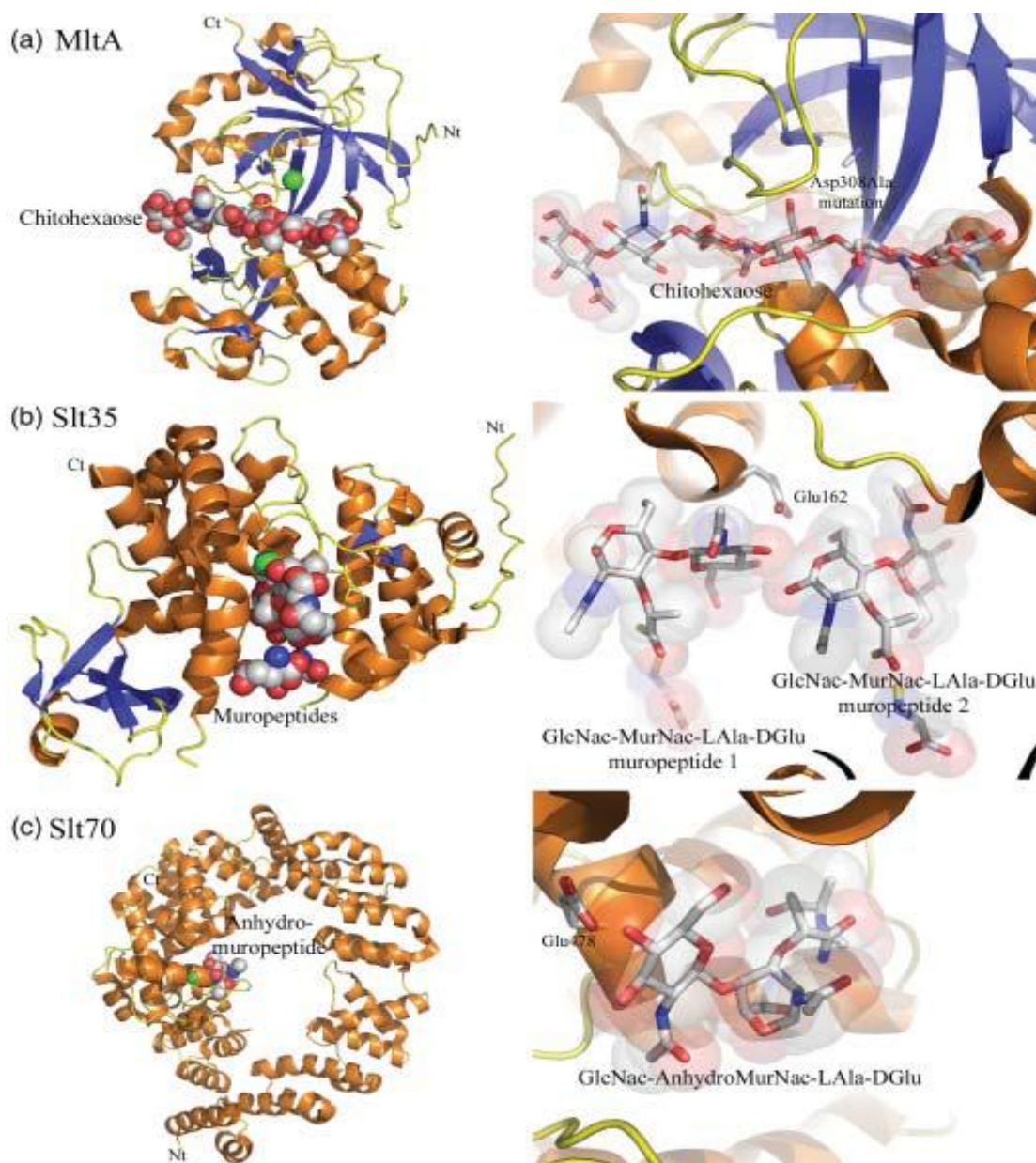
ΛΥΤΙΚΕΣ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΣΥΛΑΣΕΣ

Οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσεις διασπούν τον γλυκοσιδικό δεσμό με ταυτόχρονη ενδομοριακή αντίδραση τρανσγλυκοσυλίωσης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του 1,6-άνυδρο δακτυλίου στο MurNAc κατάλοιπο του προϊόντος. Η ενδομοριακή αντίδραση τρανσγλυκοσυλίωσης περιλαμβάνει συχνά γλουταμινικό οξύ, το οποίο δίνει πρωτόνια στο γλυκοσιδικό οξυγόνο μεταξύ MurNAc και GlcNAc. Το προϊόν πιθανόν σταθεροποιείται με την N-ακετυλ-ομάδα στη θέση 2 του MurNAc σχηματίζοντας έναν ενδιάμεσο δακτύλιο οξαζολίνης. Αποπρωτονίωση της ομάδας υδροξυλίου στο C-6 του MurNAc επιτρέπει πυρινόφιλη προσβολή στο C-1 για τον σχηματισμό του 1,6-άνυδρο δακτυλίου. Ο μηχανισμός αυτό συμφωνεί με την παρατηρούμενη αναστολή της λυτικής τρανσγλυκοσυλάσης MltB του *P. Aeruginosa* από την θιαζολίνη της N-ακετυλγλουκοσαμίνης, η οποία είναι δομικά ανάλογη με τον ενδιάμεσο δακτύλιο οξαζολίνης.

Πολλές καταλυτικές περιοχές των λυτικών τρανσγλυκοσυλάσεων, για παράδειγμα της Slt70 του *E. coli*, έχουν παρόμοιο δίπλωμα με εκείνο των GEWL (τύπου G), το οποίο επίσης περιέχει ένα κατάλοιπο γλουταμινικού οξέως στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ωστόσο, υπάρχουν εμφανής δομικές διαφορές μεταξύ GEWL και λυτικών τρανσγλυκοσυλάσεων. Το περιβάλλον της καταλυτικής περιοχής είναι πολύ πιο υδροφοβικό στις λυτικές τρανσγλυκοσυλάσεις, το οποίο στερείτε επίσης το δεύτερο καταλυτικό αμινοξύ (ασπαρτικό) το οποίο υπάρχει στις λυσοζύμες, δίνοντας απάντηση στους διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης (υδρόλυση έναντι σχηματισμού ενδομοριακού δακτυλίου) των δύο τύπων των ενζύμων. Επίσης διαφέρουν στην ειδικότητα του υποστρώματος οι λυσοζύμες από τις λυτικές τρανσγλυκοσυλάσεις. Οι λυσοζύμες είναι ένδο-N-ακετυλμουραμιδάσες ενώ οι περισσότερες από τις χαρακτηρισμένες λυτικές τρανσγλυκοσυλάσεις επιδεικνύουν έξω-λυτική δράση απελευθερώνοντας 1,6-άνυδρο-MurNAc. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κρυσταλλικές δομές οι οποίες εμφανίζουν διαφορές στο σημείο δέσμευσης

του υποστρώματος, όπου οι λυσοζύμες παρουσιάζουν έναν εξασακχαρίτη στο σημείο δέσμευσης του υποστρώματος ενώ οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες έχουν θέσεις δέσμευσης για τρία έως έξι κατάλοιπα N-ακετυλαμινο σακχάρου.

Οι λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες έχουν ομαδοποιηθεί σε τέσσερις οικογένειες σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία και την παρουσία ή μη συντηρημένων αλληλουχιών. Η Οικογένεια 1 χωρίζεται περαιτέρω σε πέντε υπό οικογένειες ενώ η Οικογένεια 4 περιέχει κυρίως λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες προερχόμενες από βακτηριοφάγους (Vollmer *et al.* 2007).



Εικόνα 5. Δομές λυτικών τρανσγλυκοσυλάσων. α) λυτική τρανσγλυκοσυλάση MltA η οποία δεσμεύεται στην μεμβράνη (*E. coli*) β) λυτική τρανσγλυκοσυλάση Slt35 (*E. coli*) γ) λυτική τρανσγλυκοσυλάση Slt70 (*E. coli*) με το 1,6-ανδρομυροπεπτίδιο και το καταλυτικό Glu478 (Vollmer *et al.* 2007).

1.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΙΡΟΛΥΣΙΝΩΝ

Πιθανή εφαρμογή των βιρολυσινών για την προφύλαξη και την θεραπεία μολύνσεων προέρχεται από την ικανότητα αυτών να «σκοτώνουν» πολύ γρήγορα το παθογόνο βακτήριο μέσω της λύσης του με πολύ υψηλή ειδοειδικότητα. Πολλά πειράματα έχουν γίνει για την εφαρμογή των βιρολυσινών σε διαφορετικά πεδία δράσης με σκοπό την μείωση των παθογόνων και την απαλλαγή από ανθρώπινα και ζωικά παθογόνα, καθώς και την απολύμανση των τροφίμων καθαυτών ή κατά την διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας.

1.4.1 ΒΙΡΟΛΥΣΙΝΕΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Έχουν γίνει πολλές μελέτες και έχουν κατατεθεί πολλές τεχνικές για την χρήση βιρολυσινών ενάντια σε παθογόνα βακτήρια. Όπως για παράδειγμα, λυσίνες PAL ενάντια σε είδη του παθογόνου βακτηρίου *Streptococcus* χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπεία των ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, η βιρολυσίνη LysK του βακτηριοφάγου K ενάντια σε είδη του γένους *Staphylococcus*, βιρολυσίνες ενάντια στο *B. anthracis* προερχόμενες από βακτηριοφάγους του *B. cereus*, βιρολυσίνες ενάντια σε παθογόνα είδη του γένους *Enterococcus*, βιρολυσίνες του βακτηριοφάγου phi3626 ενάντι σε παθογόνα είδη του γένους *Clostridium* και βιρολυσίνες ενάντια στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια του γένους *Salmonella* (Courchesne *et al.* 2009).

1.4.2 ΚΗΤΙΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι λυσίνες χρησιμοποιούνται επίσης και στον τομέα της κτηνιατρικής. Για παράδειγμα η λυσίνη LysH5 χρησιμοποιείτε για την θεραπεία της μαστίτιδας στα βοοειδή η οποία προκαλείτε από παθογόνα βακτήρια του γένους *Staphylococcus*. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε την χρήση της ανασυνδιασμένης λυσίνης LySMP ενάντια στο ανθεκτικό στα αντιβιοτικά παθογόνο *Streptococcus suis* στους χοίρους και η ανασυνδιασμένη λυσίνη PlyC ενάντια στο παθογόνο *Streptococcus equi* στα ιπποειδή.

1.4.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΥΣΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι λυσίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία των τροφίμων, όπως για παράδειγμα η λυσίνη Ply3626 η οποία χρησιμοποιείτε ενάντια στο παθογόνο *C. perfringens* το οποίο προκαλεί δηλητηριάσεις και οικονομικά προβλήματα στην βιομηχανία των πουλερικών.

1.4.4 ΧΡΗΣΗ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ

Οι λυσίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο και την προστασία από φυτοπαθογόνα βακτήρια. Σε μία μελέτη, ένα διαγονιδιακό φυτό πατάτας κατασκευάστηκε, με την ικανότητα έκφρασης λυσίνης του βακτηριοφάγου T4, για την προστασία από το αρνητικά κατά Gram βακτήριο *Erwinia carotovora* το οποίο προκαλεί την μαλακή σήψη. Η λυσίνη εκκρινόταν στους ενδοκυττάριους χώρους του διαγονιδιακού φυτού με αποτέλεσμα να «σκοτώνει» τα παθογόνα βακτήρια. Σε μία άλλη έρευνα, λυσίνη του βακτηριοφάγου jEa1h κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης και εκφράστηκε σε *E. coli*. Όταν ακατέργαστο προϊόν με την επιθυμητή πρωτεΐνη εφαρμόστηκε στην επιφάνεια αχλαδιών εμβολιασμένων με το φυτοπαθογόνο αρνητικό κατά Gram *Erwinia amylovora*, παρατηρήθηκε αναστολή της μόλυνσης (Fenton *et al.* 2010).

1.4.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

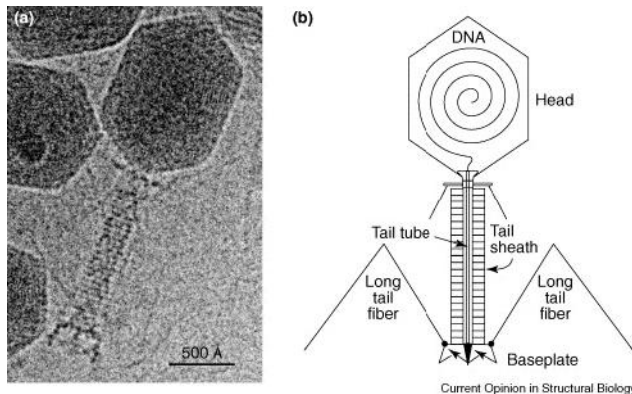
Εκτός από την θεραπεία και προφύλαξη από βακτηριακές μόλυνσης, έχει προταθεί η χρήση λυσινών σε διάφορους άλλους τομείς. Η αρχή της ανίχνευσης και διάγνωσης παθογόνων βακτηρίων βασίζεται στην πολύ γρήγορη λύση των βακτηριακών κυττάρων από τα λυτικά ένζυμα. Για παράδειγμα ένα πρωτόκολλο έχει δημιουργηθεί για την ανίχνευση αρκετών βακτηρίων. Εάν ένα συγκεκριμένο λυτικό ένζυμο προστεθεί σε μίγμα βακτηρίων, το βακτήριο στόχος θα λυθεί και ενδογενή αντιγόνα θα ελευθεροθούν. Στην συνέχεια, με την χρήση ενός αντισώματος για ένα γνωστό αντιγόνο του επιθυμητού βακτηρίου, μία μόλυνση μπορεί να ανιχνευτεί γρήγορα. Για παράδειγμα, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό στρεπτόκοκκου ομάδας A ή C με έλεγχο δειγμάτων με λυσίνη και χολίνη του βακτηριοφάγου C1.

1.4.6 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι λυσίνες από βακτηριοφάγους έχουν πολυάριθμες άλλες εφαρμογές. Εκχύλιση του DNA, η οποία απαιτεί την λύση των βακτηριακών κυττάρων, μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας λυσίνης αντί για την χρησιμοποίηση υπερήχων ή άλλων χημικών μεθόδων. Επίσης, λυσίνες βακτηριοφάγων μπορούν χρησιμοποιηθούν για την απελευθέρωση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια με αύξηση της αποτελεσματικότητας της παραγωγής (Courchesne *et al.* 2009).

1.5 Ο ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ KVP40

Ο βακτηριοφάγος, των βακτηρίων του γένους *Vibrio*, KVP40, όπως και ο



βακτηριοφάγος T4, ανήκουν στην οικογένεια των ιών *Myoviridae*. Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από γενωματικό υλικό διπλής έλικας DNA, επίμηκες εικοσαεδρικό καψίδιο και μία συσταλτή ουρά με βάση και εκτεταμένα ινίδια. Ωστόσο, υπάρχουν μορφολογικές διαφορές

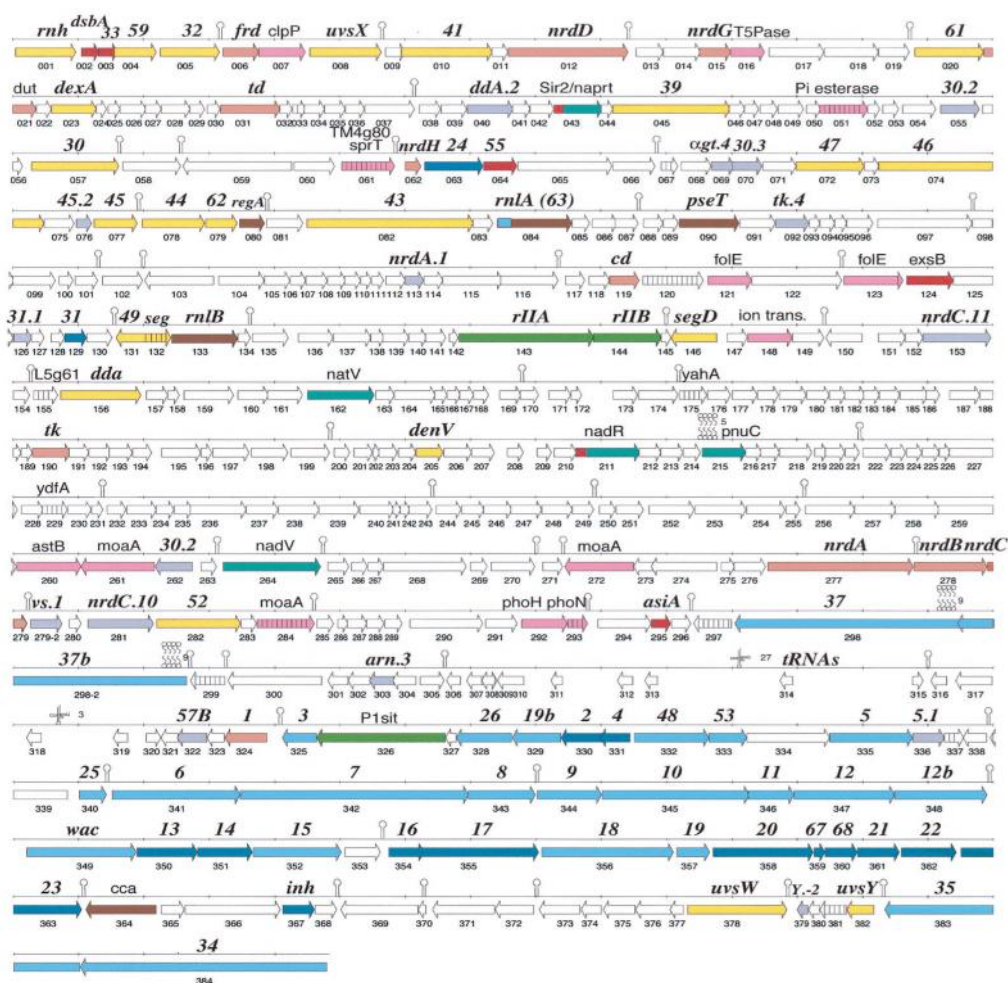
μεταξύ του βακτηριοφάγου T4 και του KVP40. Για παράδειγμα, η κεφαλή του KVP40 είναι μακρύτερη (140 nm μήκος και 70 nm πλάτος) από εκείνη του T4. Λόγω των περιορισμών του μεγέθους της κεφαλής στο πακετάρισμα του DNA, προτείνεται ότι το γονιδίωμα του KVP40 είναι μεγαλύτερο από το 168,903bp γονιδίωμα του T4. Πέρα από μορφολογικές ομοιότητες, τα γονίδια του καψιδίου του KVP40 έχουν αλληλουχηθεί και είναι συντηρημένα με εκείνα του βακτηριοφάγου T4.

Ο βακτηριοφάγος KVP40 διαφέρει από άλλους βακτηριοφάγους στο ότι έχει ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων ξενιστών που μπορεί να προσβάλει. Ο KVP40 μολύνει 8 είδη του γένους *Vibrio*, συμπεριλαμβανομένου των *Vibrio cholera* και *Vibrio parahemolyticus*, του μη παθογόνου είδους *Vibrio natriegens* και του *photobacterium leiognathi*. Σύμφωνα με μελέτες, υποδοχέας του βακτηριοφάγου είναι η πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης OmpK.

Το γονιδίωμα του KVP40

Το γονιδίωμα του KVP40 αποτελείται από ένα χρωμόσωμα 244,853 bp, με ποσοστό G+C 42,6%. Υπάρχουν συνολικά 386 αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (CDSs), 33 υποκινητές παρόμοιους με αυτούς του T4 και 57 rho ανεξάρτητους παράγοντες λήξης της μεταγραφής. Από τις 386 αλληλουχίες που

κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, 107 είναι παρόμοιες με αλληλουχίες από άλλους φάγους, 23 παρόμοιες με αλληλουχίες βακτηρίων, 2 με ευκαρυωτικούς οργανισμούς και 1 με άρχαia. Οι υπόλοιπες 253 αλληλουχίες που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (CDSs) είναι μοναδικές για τον βακτηριοφάγο KVP40. Στην αλληλούχηση του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου KVP40, περίπου το 25% του γονιδιώματος δεν εμφανίζεται με την τεχνική της τυχαίας κλωνοποίησης τμημάτων DNA. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν 145 CDSs, 11 συντηρημένες υποθετικές πρωτεΐνες και 17 πρωτεΐνες με υποτιθέμενη λειτουργία. Αυτές οι περιοχές του γονιδιώματος παρουσιάζουν αυτό το πρόβλημα πιθανόν επειδή περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για προϊόντα τοξικά στο βακτήριο *E. coli*. Υπάρχει πιθανότητα και άλλοι λυτικοί φάγοι να παρουσιάζουν το ίδιο πρόβλημα. Επίσης, 16 πρωτεΐνες πιθανόν να έχουν διπλασιαστεί στον KVP40 σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες οργανισμών στην βάση δεδομένων (Πίνακας 2, Εικόνα 6)



Εικόνα 6. Χάρτης των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (CDSs) του βακτηριοφάγου KVP40 (Miller et al. 2003).

Πίνακας 2. Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου KVP40 (Miller *et al.* 2003).

Feature	Value
Size (bp).....	244,835
Total number of sequences.....	4,008
G+C content (%).....	42.6%
A, 30.0; C, 20.5; G, 22.1; T, 27.4	
Total CDSs.....	386
Average CDS size (bp).....	587
% of genome coding for proteins.....	92.1
No. of CDS products similar to known proteins, total.....	100
No. of CDS products similar to known T4 proteins.....	83
No. of conserved hypothetical proteins, total.....	33
No. of CDS products similar to conserved hypothetical T4 proteins.....	16
No. of hypothetical proteins.....	253
No. of rho-independent terminators.....	57
No. of tRNAs.....	30
No. of start sites and frequency (%) ^a	
AUG.....	321, 83.1% (115, 89.8%)
GUG.....	30, 7.8% (6, 4.7%)
UUG.....	35, 9.1% (7, 5.5%)

^a Start codons and frequency among all CDSs and, in parentheses, among known CDSs.

Πρωτεΐνες, υποκινητές και αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής

Ο έλεγχος του χρόνου της μεταγραφής παρουσιάζει εξειδίκευση από τις τροποποιήσεις της RNA πολυμεράσης, τους παράγοντες μεταγραφής που κωδικοποιούνται από τον βακτηριοφάγο και τις μοναδικές αλληλουχίες υποκινητών. Στην αλληλούχιση του γονιδιώματος αποδείχθηκε ότι ο βακτηριοφάγος KVP40 δεν έχει ομόλογα των Alt, ModA, και ModB ενζύμων. Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν στην ρύθμιση του κύκλου της αντιγραφής του βακτηριοφάγου T4. Επίσης, ο βακτηριοφάγος KVP40 δεν έχει ομόλογο της πρωτεΐνης MotA, ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή, όπως και ενός άλλου παράγοντα της μεταγραφής, της πρωτεΐνης RpbA. Παρόλα αυτά όμως οι κύριες πρωτεΐνες για την μεταγραφή gp33, DsbA και gp45 βρέθηκαν στο γονιδίωμα του KVP50.

Οι rho-ανεξάρτητες αλληλουχίες τερματισμού της μεταγραφής ταυτοποιήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την αλληλουχία τους. Αυτές οι 57 ομαδοποιήθηκαν σε 14 μονές και 11 σετ, περιέχουν περισσότερη από μία αλληλουχία. Οι κυριότερες αλληλουχίες, μοτίβου τεσσάρων βάσεων, υπάρχουν στο γονιδίωμα του KVP40.

Μετάφραση

Σε αντίθεση με τον T4 όπου σχεδόν αποκλειστικά χρησιμοποιεί AUG ως τριπλέτα έναρξης για τα 274 γονίδια, ο βακτηριοφάγος KVP40 χρησιμοποιεί 89,8% AUG, 4,7% GUG και 5,5% UUG ως τριπλέτες έναρξης.

Μεταβολισμός του DNA

Παρότι ο KVP40 κωδικοποιεί για αρκετές νουκλεάσες και ένζυμα για την σύνθεση πρόδρομων νουκλεοτιδίων, δεν υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη ενζύμων με λειτουργία αποδιοργάνωσης του γενωματικού υλικού του ξενιστή. Ομόλογα ένζυμα με τον T4, Alc (*alc*), Ndd (*ndd*), ενδονουκλεάση II (*denA*), και ενδονουκλεάση IV (*denB*) δεν υπάρχουν στο γονιδίωμα του KVP40. Αυτή η έλλειψη ενδονουκλεασών και ικανότητας αποδιοργάνωσης του DNA του ξενιστή, κάνει πρακτικά τον βακτηριοφάγο KVP40 αποτελεσματικό για μεταγωγή.

Γονίδια του καψιδίου και της ουράς

Το ιοσωμάτιο του KVP40 κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο ενιαίο σύμπλεγμα γονιδίων, έχοντας ένα περιεχόμενο σε γονίδια και μια σειρά γονιδίων παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε στον T4. Αν και η σειρά των γονιδίων είναι σχεδόν ίδια μεταξύ T4 και KVP40, υπάρχουν διακρίσεις. Πρώτον, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εξωτερικό του καψιδίου, που κωδικοποιούνται από τα *hoc* και *soc* γονίδια, και οι εσωτερικές πρωτεΐνες iPI, ipII, και ipIII φαίνεται να απουσιάζουν από KVP40.

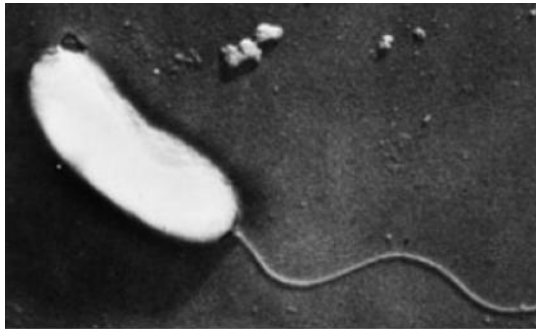
Αν και το γονίδιο 38, που κωδικοποιεί για τα ινίδια της ουράς του T4 απουσιάζει, το γονίδιο *gr37*, που κωδικοποιεί για τα μεγάλα ινίδια ουράς, υπάρχει σε δύο αντίγραφα (CDS298 και CDS298-2). Φαίνεται ότι οι ιδιότητες που προσφέρει το γονίδιο *gr37* χρησιμοποιούνται επίσης από τον βακτηριοφάγο KVP40 για την αναγνώριση του υποδοχέα και την προσαρμογή στο εύρος των ξενιστών.

CDSs με άγνωστη λειτουργία

Περισσότερα από το 60% των CDSs του KVP40 έχουν μη αναγνωρισμένη λειτουργία. Πολλά από αυτά, όπως και στον T4, είναι πιθανόν πρωτεΐνες με βοηθητικό ρόλο οι οποίες χρειάζονται για την μόλυνση σε συγκεκριμένους ξενιστές ή για την ανάπτυξη κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

1.6 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Vibrio anguillarum*

Το βακτήριο *Vibrio anguillarum* είναι ένα παθογόνο του θαλάσσιου περιβάλλοντος το οποίο προκαλεί την ασθένεια «βιμπρίωση» σε σχεδόν 50 είδη ψαριών καλλιεργούμενων ή ελευθέρων διαβιούντων. Το βακτήριο *Vibrio anguillarum* είναι ένα αρνητικά κατά Gram, ραβδωτό βακτήριο με ένα πολικό



μαστίγιο. Παρά το ότι έχουν αναφερθεί 23 ορότυποι, οι O1 και O2 είναι αυτοί κυρίως που προκαλούν την ασθένεια. Πολλά στελέχη του O1 έχουν το 65kb pJM1 πλασμίδιο, το οποίο περιέχει την βιοσύνθεση και μεταφορά της σιδηροφόρου ανγκουιμπακτίνης, ενός

βασικού παράγοντα μόλυνσης του βακτηρίου *Vibrio anguillarum*. Ένα στέλεχος του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* του ορότυπου O1 και όλα τα στελέχη του O2 δεν περιέχουν το πλασμίδιο pJM1. Από το γεγονός ότι, το πλασμίδιο pJM1 είναι σημαντικό για την ικανότητα μόλυνσης των στελεχών που το περιέχουν αλλά κάποια άλλα στελέχη τα οποία δεν περιέχουν το πλασμίδιο αλλά είναι μολυσματικά, συμπεράνουμε ότι τα στελέχη αυτά έχουν διαφορετικό μηχανισμό για την πρόκληση της ασθένειας.

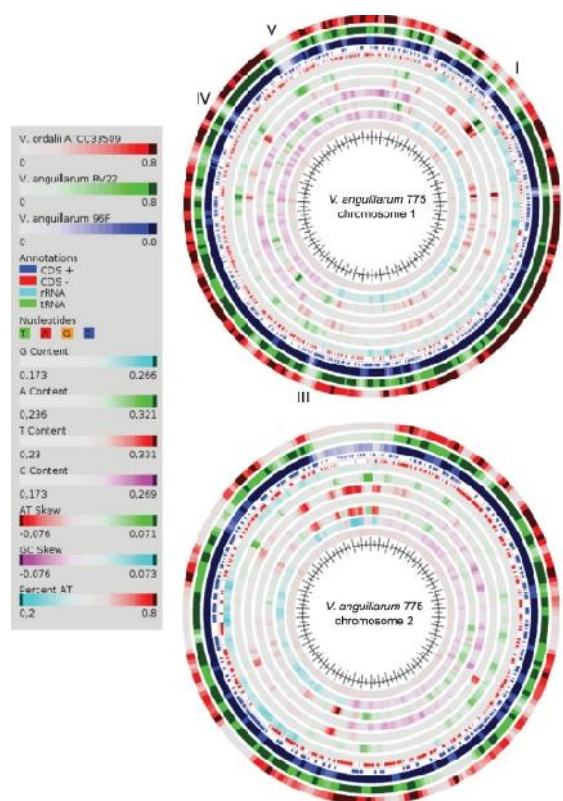
Το γονιδίωμα του βακτηρίου

Το γονιδίωμα του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος 775 αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα, χρωμόσωμα 1 (Chr1) 3Mbp και το χρωμόσωμα 2 (Chr2) 988kbp, και το πλασμίδιο pJM1 65kbp, το οποίο φέρει τα γονίδια βιοσύνθεσης και μεταφοράς της σιδηροφόρου ανγκουιμπακτίνης. Το γονιδίωμα του βακτηρίου περιλαμβάνει 2,093 (54%) πρωτεΐνες αναγνωρισμένες σε υποσυστήματα και 1,783 (46%) οι οποίες δεν περιλαμβάνονται σε υποσυστήματα, που υποδηλώνει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών με μη γνωστή λειτουργία. Το ποσοστό G+C των χρωμοσωμάτων είναι 45% στο Chr1 και 44% στο Chr2 και 43% στο πλασμίδιο pJM1. Ο συνολικός αριθμός υποσυστημάτων στο γένωμα του βακτηρίου είναι 396 και έχει 3,876 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) στα δύο χρωμοσώματα και 65 ORFs στο πλασμίδιο pJM1. Ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε την ύπαρξη 8 γονιδιωματικών νησίδων (GIs) στο χρωμόσωμα 1 και 2 GIs στο χρωμόσωμα 2 με

μέγεθος από 4kbp έως 140kbp. Οι γονιδιωματικές νησίδες περιέχουν γονίδια για την κωδικοποίηση ιντεγκράσης και τρανσποζάσης, ενός πιθανού μηχανισμού μόλυνσης. Το χρωμόσωμα 2 περιλαμβάνει επίσης ένα «superintegron», ενός γονιδίου δύο συστατικών. Επίσης το γονιδίωμα του βακτηρίου δείχνει μία γονιδιωματική μεταβλητότητα που οφείλεται στη εισαγωγή βακτηριοφάγων.

Πίνακας 3. Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος 775 (Naka *et al.* 2011).

Feature	Result for:		
	Chromosome 1	Chromosome 2	pJM1
Size (bp)	3,063,912	988,135	65,009
No. of CDS ^b	2,864	951	65
GC content (%)	44.65	44.09	42.57
No. of tRNAs	82	4	0
No. of rRNAs	22	0	0
<i>oriC</i> localization (nt) ^c	219251 ... 219628	535047 ... 535332	Ori1
<i>oriC</i> GC content (%)	39.95	30.42	
Length of <i>oriC</i> (bp)	377	285	
No. of <i>dnaA</i> boxes	5	4	
Genbank accession no. for:			
ParA	VAA_00834	VAA_00096	AY312585.1 ^d
ParB	VAA_00833	VAA_00097	AY312585.1 ^d
Soj-like protein	VAA_03384		
MukBEF	VAA_02164- VAA_02166		
StbDE toxin-antitoxin		VAA_00010- VAA_00011	



Εικόνα 7. Απεικόνιση των δύο χρωμοσωμάτων του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος 775 (Naka *et al.* 2011).

Γονίδια με ενδιαφέρον του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος 775

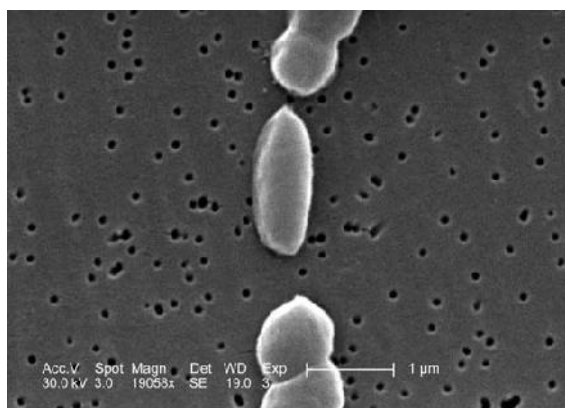
Η πλειοψηφία των γονιδίων της βιοσύνθεσης της σιδηροφόρου ανγκουιμπακτίνης και της μεταφορά της βρίσκονται στο πλασμίδιο pJM1, με την εξαίρεση του γονιδίου *vadA*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την βιοσύνθεση αλλά βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1. Το σύνολο των γονιδίων υπεύθυνων για την μεταφορά σιδήρου βρίσκεται επίσης στο χρωμόσωμα 1. Επίσης, υπάρχουν δύο εκκριτικά συστήματα τύπου IV από ένα σε κάθε χρωμόσωμα. Επιπλέον, στο γονιδίωμα του βακτηρίου υπάρχουν τα γονίδια *rtx*, τα οποία συμμετέχουν στην ικανότητα μόλυνσης του βακτηρίου, τα οποία βρίσκονται και στα δύο χρωμοσώματα (Naka *et al.* 2011).

1.7 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Vibrio parahaemolyticus*

Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδοειδές βακτήριο του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Είναι η κύρια αιτία τροφικής δηλητηρίασης των ανθρώπων και προκαλείτε από την κατανάλωση μολυσμένων θαλασσινών, όπως στρείδια (Han *et al.* 2008).

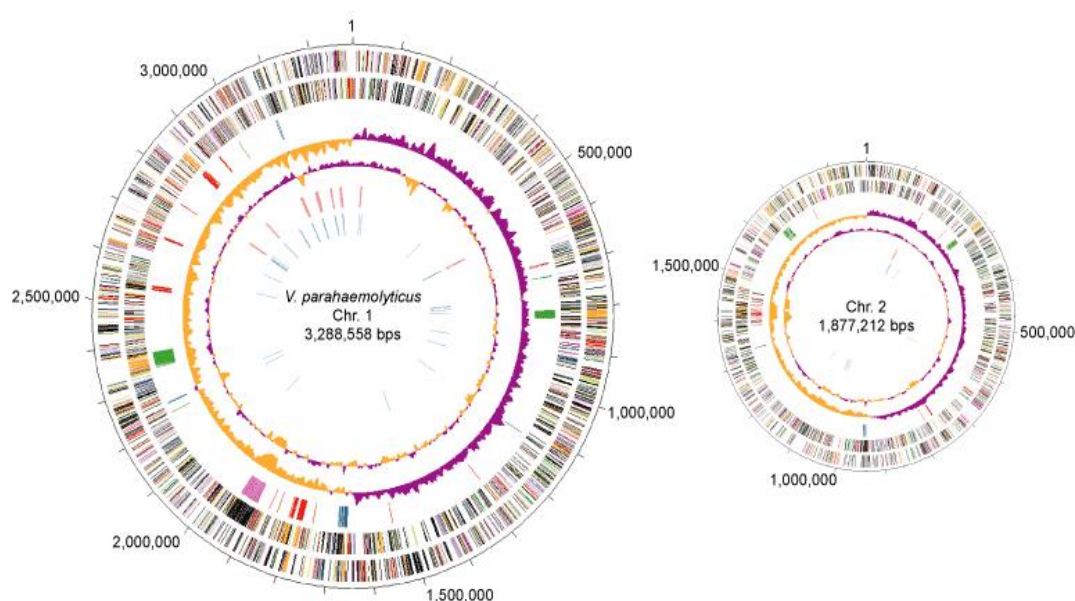
Πριν το 1996 δεν υπήρχε συγκεκριμένος ορότυπος που να σχετιζόταν με την εμφάνιση της ασθένειας και το βακτήριο δεν είχε αναφερθεί ποτέ ότι προκαλεί πανδημία. Κατά την διάρκεια όμως τους έτους εμφανίστηκε πανδημία, η οποία ξεκίνησε από την Ινδία και διαδόθηκε σε όλο τον κόσμο, οφειλόμενη στον ορότυπο O3:K6. Κατά την διάρκεια της πανδημίας περισσότεροι από 20 ορότυποι εξελίχθηκαν από τον αρχικό O3:K6.

Μία αιμολυσίνη (TDH-Thermostable Direct Hemolysin) αναγνωρίζεται ως ο κυριότερος παράγοντας μόλυνσης του *Vibrio parahemolyticus*. Επίσης μία αιμολυσίνη (TRH) πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την μόλυνση στα στελέχη τα οποία δεν παράγουν την TDH (Chen *et al.* 2011).



Το γονιδίωμα του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος RIMD2210633

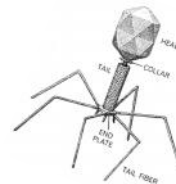
Το γονιδίωμα του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα 3,28Mbp και 1,87Mbp και περιέχει 4832 γονίδια. Επίσης περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν για δύο εκκριτικά συστήματα τύπου III (TTSS). Το TTSS είναι ο κεντρικός παράγοντας πρόκλησης μόλυνσης. Το TTSSI είναι απαραίτητο για κυτολυτική δραστηριότητα του βακτηρίου, ενώ το TTSSII απαιτείται για την τοξικότητα και βρίσκεται νησίδα παθογένειας που περιέχει το γονίδιο *tdh*, το οποίο κωδικοποιεί για την αιμολυσίνη (Han *et al.* 2008, Makino *et al.* 2003).



Εικόνα 8. Απεικόνιση των δύο χρωμοσωμάτων του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος RIMD2210633 (Makino *et al.* 2003).

Super integron

Το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* περιέχει ένα ιντεγκρόνιο (SI) στο χρωμόσωμα 1. Το SI είναι περίπου 48kbp και περιέχει 77 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs). Τα περισσότερα από τα ORFs κωδικοποιούν για υποθετικές πρωτεΐνες (Chen *et al.* 2011).



ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΑΓΟΙ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 καθώς και το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος PF4. Το δύο αυτά βακτήρια είναι Gram⁽⁻⁾ γ-πρωτεοβακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Vibrionaceae της τάξης Vibrionales. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι βακτηριοφάγοι KPV40 (5×10^9 /ml), ALMC (3×10^9 /ml) και CHOED(1×10^5 /ml). Τα βακτηριακά στελέχη και οι βακτηριοφάγοι ήταν προσφορά του Δρ. Π Καθάρου (ΕΛΚΕΘΕ, Ηράκλειο).

2.1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΓΩΝ

Τα βακτήρια καλλιεργούνται είτε σε υγρό θρεπτικό υλικό (LB 3% στους 37 °C, AMS-LB στους 25 °C) υπό συνεχή ανάδευση είτε σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό AMS-LB + 1,5% Agarose στους 18 °C.

Προκαλλιέργεια

- 20ml θρεπτικού υλικού LB 3% εμβολιάζονται είτε με κύτταρα *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 είτε με κύτταρα *Vibrio anguillarum* στέλεχος PF4. Η προκαλλιέργεια επωάζεται για 16 ώρες στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση.

Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό LB

- 20ml θρεπτικού υλικού LB 3% εμβολιάζονται με 1/100 προκαλλιέργειας. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 37 °C.
- Όταν $OD_{600}=0.3$ προστίθενται επιθυμητή ποσότητα φάγου. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 37 °C για 12 ώρες.
- Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 5000rpm για τον διαχωρισμό των βακτηριοφάγων από τα βακτήρια. Φιλτράρουμε το υπερκείμενο με χρήση 0,2 μM φίλτρου.

Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό AMS-LB

- 20ml θρεπτικού υλικού AMS-LB εμβολιάζονται με 1/100 προκαλλιέργειας. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 25 °C.
- Όταν $OD_{600}=0.05-0.1$ προστίθενται επιθυμητή ποσότητα φάγου. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 25 °C για 72 ώρες.
- Φυγοκέντριση για 30 λεπτά στις 8000rpm για τον διαχωρισμό των βακτηριοφάγων από τα βακτήρια. Επαναλαμβάνουμε μία φορά. Φιλτράρουμε το υπερκείμενο με χρήση 0,2 μM φίλτρου.

Καλλιέργεια και χρήση της μεθόδου Double layer agar

- 20ml θρεπτικού υλικού AMS-LB εμβολιάζονται με 1/100 προκαλλιέργειας από το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 25 °C μέχρι $OD_{600}=0.05-0.1$
- 1ml από την καλλιέργεια προστίθεται σε 4ml ρευστοποιημένου AMS-LB 0.6% Agarose. Ανάμιξη με vortex.
- Τοποθέτηση των 5ml σε τρυβλίο που περιέχει AMS-LB 1.5% Agarose και τοποθέτηση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη επιθυμητών ποσοτήτων από τους φάγους KVP40, ALMC και CHOED (2μl, 5μl και 20μl σε τρία αντίτυπα). Τα τρυβλία επωάζονται στους 18 °C για τουλάχιστον 24 ώρες.

2. 2 ΜΕΛΕΤΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο προσδιορισμός της ικανότητας λύσης των κυττάρων έγινε με την χρησιμοποίηση του ενζύμου λυσοζύμη και βασίστηκε στο πρωτόκολλο ‘**Enzymatic Assay of LYSOZYME**’ της εταιρείας **SIGMA**. Η ανάλυση των βακτηρίων βασίστηκε στην αρχή :

Vibrio parahaemolyticus Cells (Intact) $\xrightarrow{\text{Lysozyme}}$ *Vibrio parahaemolyticus* Cells (Lysed)

Vibrio anguillarum Cells (Intact) $\xrightarrow{\text{Lysozyme}}$ *Vibrio anguillarum* Cells (Lysed)

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο το μίγμα της αντίδρασης περιέχει 835μl 0.015% (w/v) κύτταρα *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 είτε *Vibrio anguillarum* στέλεχος pF4 τα οποία εξισορροπούνται στους 25°C. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 35μl ενζύμου λυσοζύμη (200-400 units/ml) η οποία ακολουθείτε απο μείωση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος A_{600nm} και για χρονικό διάστημα 10 λεπτών.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- A. 66 mM Φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 , pH 6.24
- B. 0.015% (w/v) κύτταρα *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 είτε *Vibrio anguillarum* στέλεχος pF4 λυοφιλιωμένα.
- Γ. Διάλυμα Λυσοζύμης, το οποίο περιέχει 1mg/ml λυσοζύμης σε κρύο διάλυμα A.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Σε κυψελίδα του 1ml προσθέτω:		
Διάλυμα B	835μl	835μl
Εξισορρόπηση στους 25°C		
Διάλυμα Γ	35μl	-
Διάλυμα A	-	35μl

Ακολουθεί μίξη των διαλυμάτων και μέτρηση της διαφοράς της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος A_{600nm} . Οι μετρήσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους, του οίκου **Hitachi** (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 10mm) που φέρει θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.

Επίσης μέτρηση της ταχύτητας μείωσης της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές τιμές pH (pH 5 – 7,5), σε αποστειρωμένο H_2O και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος *NaCl* (0mM – 200mM).

2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ

Μετά την συλλογή και το φιλτράρισμα των φάγων από την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων ακολουθεί απομόνωση του DNA βακτηριοφάγου.

2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟ

Οι Palakolanu Sudhakar Reddy *et al.* 2008 ανέπτυξαν ένα χαμηλού κόστους και υψηλής απόδοσης πρωτόκολλο για την απομόνωση DNA φάγων ικανό να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις μετέπειτα διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης και της αλληλούχισης. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην κατακρήμνιση των σωματιδίων των φάγων με ρύθμιση του pH της καλλιέργειας στο 5.2 με οξικό νάτριο, ακολουθούμενο από προσθήκη αιθανόλης έως 25% v/v. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA των φάγων με αιθανόλη και θειοκύανο γουανιδίνιο υπό αλκαλικό pH. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

Απομόνωση των σωματιδίων του φάγου

Σε 500μl δείγμα (σωματίδια φάγου σε υγρή καλλιέργεια μετά την απομάκρυνση των βακτηρίων) προσθέτω 500μl 2x alcohol buffer (Παράρτημα) και αφήνω για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρώ για 10 λεπτά στις 5.000rpm και πετώ το υπερκείμενο.

Απομόνωση του DNA του φάγου

Στο ίζημα που δημιουργήθηκε προσθέτω:

- 340μl Disruption buffer
- 84μl 1M NaOH και αφήνω για 10 λεπτά σε R.T
- 848μl 100% αιθανόλης (4°C) για 5 λεπτά σε R.T, φυγοκεντρώ στις 10.000rpm για 15 λεπτά και πετώ το υπερκείμενο προσεκτικά.
- Πλύση ιζήματος με 200μl 70% αιθανόλης και φυγοκεντρώ στις 10.000rpm για 10 λεπτά
- Αφήνω να στεγνώσουν τα eppendorf για 10 λεπτά σε R.T
- Τέλος επαναδιαλύω σε 20μl TE.

2.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟ ΓΛΥΚΟΛΗ (PEG)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της πολυαιθύλενο γλυκόλης να περιβάλλει τα μόρια των πρωτεϊνών και να τα κατακρημνίζει.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

- Φυγοκέντριση της καλλιέργειας στις 13.000rpm για 15 λεπτά για την απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων
- Στο υπερκείμενο προσθέτω 1 όγκο διαλύματος PEG (20% PEG 6000, 2,5M NaCl) για κάθε 4 όγκους υπερκείμενου που περιέχει τους φάγους
- Αφήνω στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες
- Φυγοκέντριση στις 1.500-3.200 x g για 30 λεπτά. Η επιλογή των στροφών τις φυγοκέντρου εξαρτάται από το μέγεθος των φάγων
- Απομακρύνω το υπερκείμενο και επαναδιαλύω το ίζημα των φάγων που σχηματίστηκε σε 1/10 έως 1/100 του αρχικού όγκου. Για την επαναδιάλυση χρησιμοποιώ διάλυμα PBS-Tween 20.

Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη διαλύματος για την λύση των φάγων και την απομόνωση του DNA.

2.3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ

Για την απομόνωση του DNA των βακτηριοφάγων χρησιμοποιήθηκε το **Pure Link Viral RNA/DNA Mini Kit** της εταιρείας **Invitrogen**. Το kit στηρίζεται στην αποτελεσματική λύση των βακτηριοφάγων σε υψηλές θερμοκρασίες με την χρήση πρωτεΐνης K και την επιλεκτική δέσμευση των νουκλεϊκού οξέων στην μεμβράνη silica με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Στην συνέχεια η μεμβράνη με το προσροφημένο νουκλεϊκό οξύ ξεπλένεται και τέλος το νουκλεϊκό οξύ εκλύεται σε νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα TE.

Προετοιμασία για την λύση των βακτηριοφάγων

Σε αποστειρωμένο eppendorf προσθέτω:

- 200μl δείγμα απαλλαγμένο από βακτηριακά κύτταρα
- 25μl πρωτεΐνωση K (20mg/ml)
- 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) και αναμιγνύω με vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Εξισορρόπηση στους 56°C για 15 λεπτά
- 250μl 100% αιθανόλη και αναμιγνύω με vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Εξισορρόπηση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Διαδικασία καθαρισμού

- Προσθήκη των 675μl από το προηγούμενο βήμα σε καινούργια Viral spin κολώνα
- Φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 6800rpm
- Απομακρύνω το Collection tube και βάζω την κολώνα σε νέο Wash tube
- Ξεπλένω με 500μl Wash buffer φυγοκεντρώντας για 1 λεπτό στις 6800rpm
- Απομακρύνω το Wash tube και επαναλαμβάνω το βήμα
- Φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 13000rpm
- Τοποθετώ την κολώνα σε νέο Recovery tube και εκλούω με κατάλληλη ποσότητα νερού απαλλαγμένου από Rnase.
- Το Recovery tube περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μόρια DNA μεγέθους 0.1 – 20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0.8-2% οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1 X TAE, στα οποία προστίθεται 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνται μετά από την προσθήκη ειδικού διαλύματος δείγματος (loading buffer 6x), σε σταθερής έντασης ρεύμα 110mA. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA σχηματίζουν ζώνες διακριτές λόγω

φθορισμού κατά την διάρκεια έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, όπου και μπορούν να φωτογραφηθούν. Ως μοριακός δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο λDNA/HindIII ladder της εταιρείας **Fermentas**.

2.5 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ

Για την πέψη μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers) που συνοδεύουν κάθε ένζυμο για βέλτιστη δραστηριότητα. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1μg DNA με 3-5 units ενζύμου στα 20μl συνολικού όγκου αντίδρασης.

Το ένζυμο περιορισμού χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του ολικού νουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου με σκοπό την απομόνωση τμημάτων αυτού και την εισαγωγή τους σε πλασμίδιο. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV. Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* J62 pLG74 με αλληλουχία αναγνώρισης την 5'-GAT|ATC-3'. Το περιοριστικό ένζυμο EcoRV δημιουργεί τυφλά άκρα.

2.6 ΑΝΑΚΤΗΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μετά την πέψη του ολικού DNA του βακτηριοφάγου και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την ανάκτηση των επιλεγμένων κομματιών (bands) από το πήκτωμα αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο κιτ του εμπορίου, το Nucleospin Gel Extraction της εταιρείας Macherey-Nagel και το QIA quick Gel Extraction της εταιρείας QIAGEN. Επιλέχθηκαν κομμάτια DNA με μοριακό βάρος 2kbp, 3kbp και 4kbp. Και τα δύο κιτ βασίζονται στην ίδια αρχή, όπου αρχικά τα κομμάτια του πηκτώματος της αγαρόζης αναμιγνύονται με ειδικό διάλυμα και θερμαίνονται για να ρευστοποιηθεί η αγαρόζη. Στην συνέχεια το δείγμα φορτώνεται σε ειδική κολώνα, όπου με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικών αλάτων, το DNA προσδένεται στην μεμβράνη silica. Ακολουθούν βήματα καθαρισμού των υπολειμμάτων της αγαρόζης με διάλυμα αιθανόλης. Τέλος, το καθαρό DNA εκλύεται κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων με ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα.

2.7 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ DNA

2.7.1 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων, για την απομάκρυνση των αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων όπως η χαμηλή θερμοκρασία, η παρουσία κατιόντων που αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος και η παρουσία αιθανόλης η οποία απομακρύνει μόρια νερού και αφυδατώνει το δείγμα. Η κατακρήμνιση δειγμάτων DNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου (CH_3COONa) pH 5.2 και διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης υψηλής καθαρότητας. Τα δείγματα τοποθετούνται για 2 h στους -20°C και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 15 min σε 13000 rpm. Τα ιζήματα πλένονται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο (10-30 μl) ddH_2O .

2.7.2 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

Μια εναλλακτική μέθοδος συμπύκνωσης νουκλεϊκών οξέων είναι η λυοφιλίωση ή Deep Freeze όπου είναι μια μέθοδος ξήρανσης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εξάχνωση των υγρών σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-60°C). Συνεπώς, προκειμένου να λυοφιλωθεί μια ουσία, αρχικά ψύχουμε την ουσία (-20°C), οπότε το περιεχόμενο σ' αυτή νερό ή διάλυμα παγώνει. Στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα το οποίο δημιουργεί κενό και εφαρμόζεται πολύ χαμηλή θερμοκρασία (-60°C) και αρνητική πίεση. Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό ή ο επιλεγμένος διαλύτης απομακρύνεται με εξάχνωση μέσω κατάλληλου συμπυκνωτή – παγίδα υδρατμών. Τέλος, μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα, στο erppendorf έχει απομείνει το DNA σε μορφή σκόνης.

2.8 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

Μετά την πέψη του ολικού νουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου και την εξαγωγή των κομματιών DNA από το πήκτωμα αγαρόζης ακολουθεί η κλωνοποίηση αυτών σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα TOPO® Cloning (Invitrogen, Η.Π.Α.).

2.8.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΤΟΡΟ CLONING KIT

Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν δύο κιτ, το TOPO Cloning TA με πλασμιδιακό φορέα τον pEXP5-CT/TOPO και το TOPO Cloning XL με πλασμιδιακό φορέα τον pCR-XL-TOPO, ο οποίος χρησιμοποιείται ειδικότερα για την ενσωμάτωση μεγάλων κομματιών DNA (3-10 Kb). Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται την ύπαρξη μιας βάσης αδενίνης σε κάθε άκρο των κομματιών DNA, η οποία έχει προστεθεί με την χρήση της Taq πολυμεράσης. Γενικά η διαδικασία περιλαμβάνει προσθήκη Taq πολυμεράσης, το buffer του ενζύμου και δεοξυριβονουκλεοτιδίων αδενίνης (dATP) στα erppendorf, τα οποία περιέχουν τα κομμάτια DNA με τα τυφλά άκρα, και επώαση για 15 min στους 72°C. Ο πλασμιδιακός φορέας, που παρέχεται σε γραμμική μορφή με μια βάση T σε κάθε άκρο, υβριδοποιείται με μεγάλη εξειδίκευση με κομμάτια DNA που έχουν βάση αδενίνη στα άκρα τους. Η διαδικασία της κλωνοποίησης γενικά περιλαμβάνει:

1. Ένθεση των κομματιών DNA σε πλασμιδιακό φορέα και επώαση του μίγματος για 30 min στους 25°C.
2. Εισαγωγή του πλασμιδίου στα επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* TOP10 του βακτηρίου.
3. Ανάπτυξη των δεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα και την ένθεση σε τρυβλία.

TOPO Cloning TA

Στο πρώτο στάδιο τοποθετήθηκαν σε erppendorf 1μl πλασμιδιακού φορέα pEXP5-CT/TOPO, 4μl DNA και 1μl διαλύματος αλάτων (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂). Η αντίδραση επωάζεται για 30 min στους 25°C και διατηρείται στον πάγο. Ακολουθεί μετασχηματισμός TOP10 δεκτικών κυττάρων.

TOPO Cloning XL

Αρχικά τοποθετήθηκαν σε erppendorf 1μl πλασμιδιακού φορέα pCR-XL-TOPO, 4μl DNA και η αντίδραση επωάζεται για 30 λεπτά στους 25°C. Στην συνέχεια προσθέτουμε 1μl 6x TOPO Cloning stop Solution, το οποίο αυξάνει την απόδοση της ενσωμάτωσης, και διατηρείται στον πάγο. Ακολουθεί μετασχηματισμός TOP10 δεκτικών κυττάρων.

2.9 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ TOP10

- Σε σωλήνα erppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα *E. coli*.
- Αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν, προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται.
- Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 420C για 1-2 λεπτά.
- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB ή SOC και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για περίπου 18 ώρες.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων γίνεται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών διότι οι ανασυνδυσμένοι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τρυβλίων συλλέγονται η κάθεμία και αναπτύσσονται εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/αντιβιοτικού έτσι ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA.

2.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τρία στάδια: την ανάπτυξη της μετασχηματισμένης βακτηριακής καλλιέργειας, τη συλλογή και λύση των κυττάρων και το καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA. Η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας γίνεται με επώαση των βακτηρίων στους 37°C για 16 ώρες σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού καναμυκίνης (50μg/ml). Η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων γίνεται με φυγοκέντριση στις 4000 x g για 10 λεπτά και ακολουθεί η αλκαλική λύση τους σύμφωνα με τα εξής. Το ίζημα των κυττάρων αιωρείται σε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και στο αιώρημα προστίθεται ο διπλάσιος όγκος (400μl) διαλύματος 0,2 M NaOH, 1% SDS. Το μίγμα ομογενοποιείται με απλή ανακίνηση

του σωλήνα και αφήνεται για 5 λεπτά στο πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 300μl ψυχρού διαλύματος 3 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /RNase A και το οποίο αναδεύεται προσεκτικά και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 13000 x g για 15 min. Στο υπερκείμενο που παραλαμβάνεται γίνεται κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 0,7 ml όγκου ισοπροπανόλης και μετά από ανάδευση το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Στην υδατική στοιβάδα που απομονώνεται μετά από φυγοκέντρωση 13000 x g για 10 λεπτά, γίνεται κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 1 ml 70% παγωμένης αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται τελικά σε 20μl αποστειρωμένου ddH_2O και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι την χρησιμοποίησή του.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

LB

Για την Παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος LB 3%: σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10g Peptone, 30g NaCl, 5g Yeast extract. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε κωνικές φιάλες σε θερμοκρασία δωματίου.

AMS-LB

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος AMS-LB: σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10g Tryptone, 5g Yeast extract, 23g NaCl, 24g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5g KCl, 1.4g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% Agarose. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε κωνικές φιάλες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

2x alcohol buffer

Για την παρασκευή 50ml buffer αναμιγνύω 25ml 0,006M Οξικού νατρίου και 25ml αιθανόλης 100%.

Disruption buffer

Το buffer περιλαμβάνει:

- 4M θειοκυανικό γουανιδίνιο
- 25mM κιτρικό οξύ
- 0,1M 2-μερκαπτοαιθανόλη
- 0,5% Triton X-100

Το buffer ρυθμίζεται σε pH 7 με 1M NaOH και ογκομετρήτε στον τελικό του όγκο.

TE

Για την παρασκευή 50ml διαλύματος προσθέτω 6,05mg Tris (1mM Tris-HCl) και 1,462mg EDTA (0,1mM EDTA). Στη συνέχεια διαλύω τις ποσότητες σε 30ml και ρυθμίζω το pH με HCl έως pH 8. Τέλος ογκομετρώ έως 50ml.

PBS Tween 20

Για την παρασκευή 1 λίτρου PBS Tween 20 αναμιγνύονται σε 800 ml αποστειρωμένο ddH₂O 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄ και 2ml Tween 20. Γίνεται εξισορρόπηση του pH στο 7,2, ογκομέτρηση έως 1 λίτρο και αποστείρωση.

3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

Για την παρασκευή 3 ml διαλύματος αναμιγνύονται 150μl 0,5 M Tris-HCl, pH 8, 60μl 0,5 M EDTA, pH 8 και 75μl 2 M γλυκόζης.

Διάλυμα NaOH/SDS

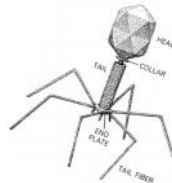
Για την Παρασκευή 5 ml διαλύματος αναμιγνύονται 114μl 10M NaOH και 568 μl 10% (w/v) SDS.

Διάλυμα CH₃COONH₄/RNase A

Για την Παρασκευή 4,5 ml διαλύματος αναμιγνύονται 4,5 ml CH₃COONH₄ (7,5 M) pH 7,8 και 45μl διαλύματος RNase A.

RNase A

Διάλυμα RNase A 10 mg/ml σε 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 15 mM NaCl. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο 100°C για 15 λεπτά και αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου φυλάσσεται στους -20°C.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

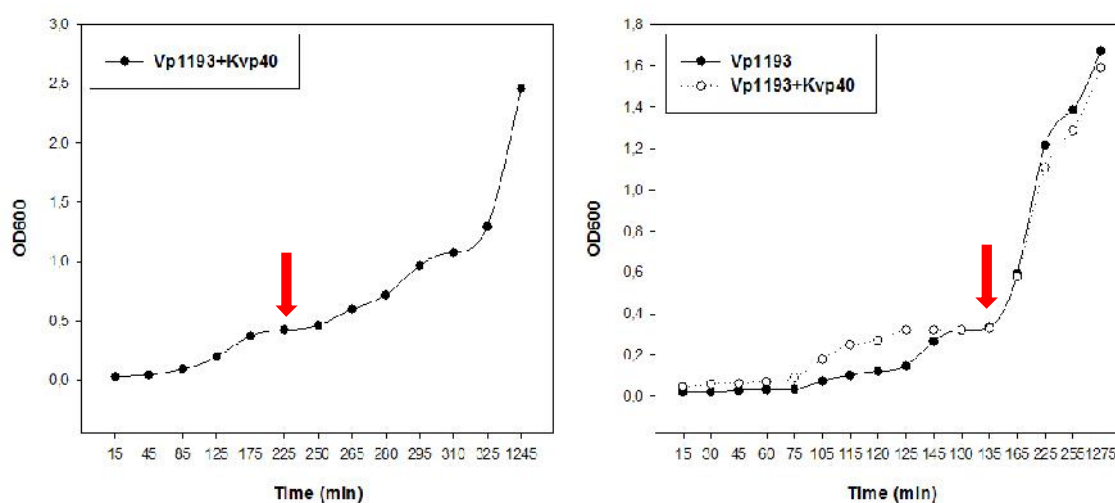
Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν είχαν ως σκοπό την μελέτη και τον χαρακτηρισμό δύο νέων βακτηριοφάγων (ALMC, CHOED), οι οποίοι μολύνουν το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 με μόλυνση από τους δύο νέους βακτηριοφάγους και σύγκριση με καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 με μόλυνση με τον βακτηριοφάγο Knp40. Στην συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα λύσης των βακτηρίων *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 και *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 από το ένζυμο λυσοζύμη τύπου C και η επίδραση των pH, χλωριούχου νατρίου και δις απιονισμένου νερού στην αντίδραση λύσης.

Επιπλέον μελετήθηκαν τα νουκλεϊκά οξέα των δύο νέων βακτηριοφάγων. Για το σκοπό αυτό έγινε απομόνωση νουκλεϊκών οξέων των βακτηριοφάγων, πέψη με περιοριστικό ένζυμο, εισαγωγή τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως σε φορέα κλωνοποίησης, μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων και απομόνωση των ανασυνδιασμένων πλασμιδιακών φορέων με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης για την αλληλούχιση των τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως των δύο νέων βακτηριοφάγων.

3.2 Μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων και των βακτηριοφάγων μετά την μόλυνση σε αυτά.

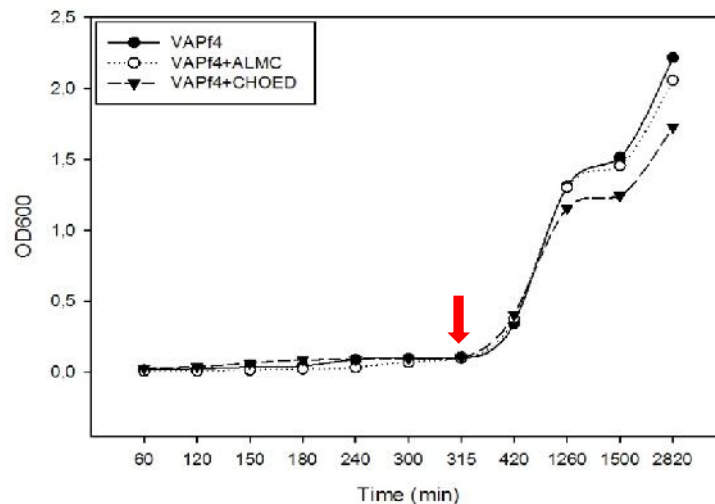
Οι καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων κατασκευάστηκαν με σκοπό την μελέτη της ανάπτυξής τους, της ανάπτυξης των βακτηριοφάγων μετά την μόλυνση και πώς επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων η μόλυνση από βακτηριοφάγους. Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και μολύνθηκαν σε διάφορες τιμές οπτικής πυκνότητας και με διαφορετικές ποσότητες βακτηριοφάγων. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν στα 450 nm και 600 nm έως τρεις μέρες.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε στην Εικόνα 9 φαίνεται ότι μειώνεται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 μετά την μόλυνση με τον βακτηριοφάγο Kvp40 σε σχέση με την καλλιέργεια χωρίς βακτηριοφάγο. Επίσης παρατηρείται μείωση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας βακτηριοφάγου και μείωση στον ρυθμό αύξησης στην περίπτωση όπου η μόλυνση έγινε σε τιμή οπτικής πυκνότητας 0,4.



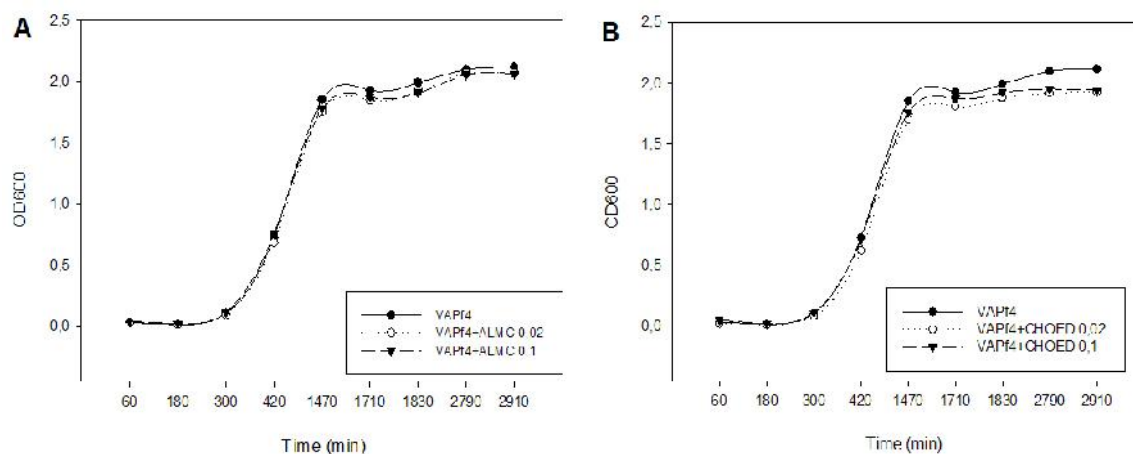
Εικόνα 9. Καμπύλη ανάπτυξης του *Vibrio parahaemolyticus* στελέχους 1193 παρουσία του βακτηριοφάγου Kvp40. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει το σημείο προσθήκης του βακτηριοφάγου στη καλλιέργεια του βακτηρίου. Α. Προσθήκη 40μl βακτηριοφάγου Kvp40 σε οπτική πυκνότητα 0,4. Β. Προσθήκη 300μl βακτηριοφάγου Kvp40 σε οπτική πυκνότητα 0,3.

Στην Εικόνα 10 παρατηρείται ότι ο βακτηριοφάγος CHOED ακολουθεί διαφορετική πορεία αύξησης από τον βακτηριοφάγο ALMC όταν αυτά μολύνουν το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4, δηλαδή ο βακτηριοφάγος CHOED επηρεάζει περισσότερο την ανάπτυξη της καλλιέργειας.



Εικόνα 10. Καμπύλες ανάπτυξης του *Vibrio anguillarum* στέλεχος *Pf4* παρουσία των βακτηριοφάγων ALMC και CHOED. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει το σημείο προσθήκης του βακτηριοφάγου στη καλλιέργεια του βακτηρίου. Η ποσότητα του βακτηριοφάγου που προστέθηκε είναι 50μl σε οπτική πυκνότητα 0,1 στα 600nm.

Στην Εικόνα 11 (Α,Β) επίσης παρατηρείται ότι ο βακτηριοφάγος CHOED ακολουθεί διαφορετική πορεία αύξησης από τον βακτηριοφάγο ALMC. Επιπλέον παρατηρείται ότι η μόλυνση σε τιμή οπτικής πυκνότητας 0,02 και η μόλυνση σε τιμή οπτικής πυκνότητας 0,1 και των δύο βακτηρίων ακολουθούν την ίδια πορεία αύξησης. Δηλαδή η μόλυνση σε χαμηλή τιμή οπτικής πυκνότητας 0,02 δεν παρουσιάζει διαφορά στην ανάπτυξη του βακτηριοφάγου σε σχέση με την τιμή οπτικής πυκνότητας 0,1.



Εικόνα 11. Καμπύλες ανάπτυξης του *Vibrio anguillarum* στέλεχος *Pf4* παρουσία των βακτηριοφάγων ALMC και CHOED σε διαφορετικές τιμές οπτικής πυκνότητας. Α. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου με προσθήκη 50μl βακτηριοφάγου ALMC σε τιμές οπτικής πυκνότητας 0,02 και 0,1. Β. Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου με προσθήκη 50μl βακτηριοφάγου CHOED σε τιμές οπτικής πυκνότητας 0,02 και 0,1.

3.3 Μελέτη της λύσης των κυττάρων από το ένζυμο λυσοζύμη

Για την μελέτη της λύσης των βακτηρίων *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 και *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λυσοζύμη και το πρωτόκολλο ‘**Enzymatic Assay of LYSOZYME**’. Η ανάλυση των βακτηρίων βασίζεται στην αρχή:

Vibrio parahaemolyticus Cells (Intact) $\xrightarrow{\text{Lysozyme}}$ *Vibrio parahaemolyticus* Cells (Lysed)

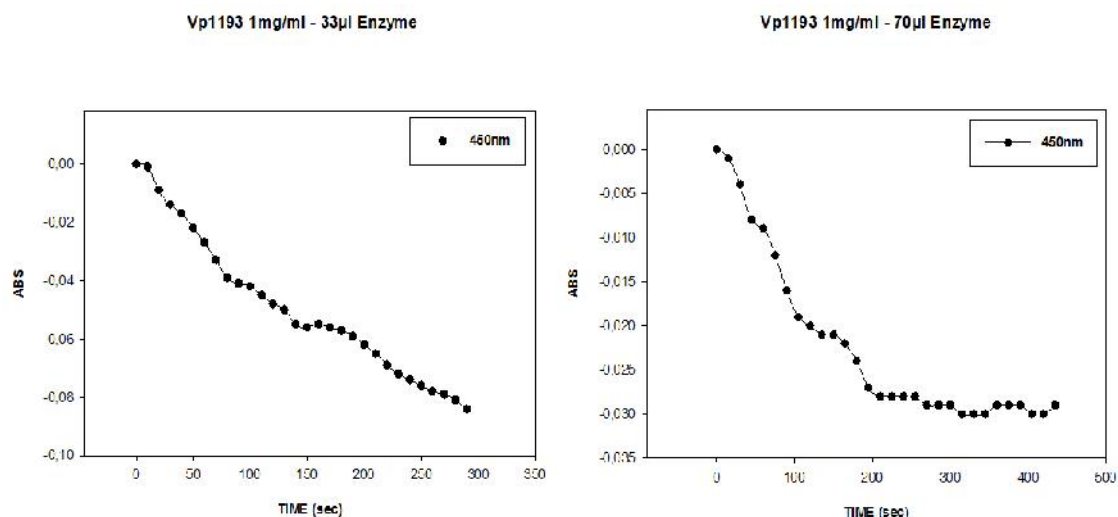
Vibrio anguillarum Cells (Intact) $\xrightarrow{\text{Lysozyme}}$ *Vibrio anguillarum* Cells (Lysed)

Το ένζυμο λυσοζύμη που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό είναι της εταιρίας ALDRICH και είναι τύπου C. Το ένζυμο αυτό λειτουργεί υδrolύωντας 1,4-β-δεσμούς στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος Gram θετικών βακτηρίων, τα οποία, σε αντίθεση με τα Gram αρνητικά βακτήρια δεν έχουν εξωτερική μεμβράνη φωσφολιπιδίων και λιποπολυσακχαριτών, η οποία εμποδίζει τη δράση του ενζύμου. Αρκετές μελέτες όμως έχουν δείξει ότι το ένζυμο λυσοζύμη είναι επίσης ικανό να λύσει Gram αρνητικά βακτήρια (Hui Li *et al.* 2008).

Η μελέτη της λύσης των βακτηρίων από το ένζυμο λυσοζύμη πραγματοποιήθηκε με τον φωτομετρικό προσδιορισμό της αντίδρασης λύσης. Μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηριακών κυττάρων και ποσότητες ενζύμου που προστέθηκαν στην αντίδραση. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου και του pH στην ικανότητα λύσης των βακτηριακών κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν καμπύλες σε τιμές οπτικής πυκνότητας 450nm και 600nm σε χρόνο έως και 10 λεπτά, με την κάθε παράμετρο να επαναλαμβάνεται τρεις φορές για μείωση των λαθών.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

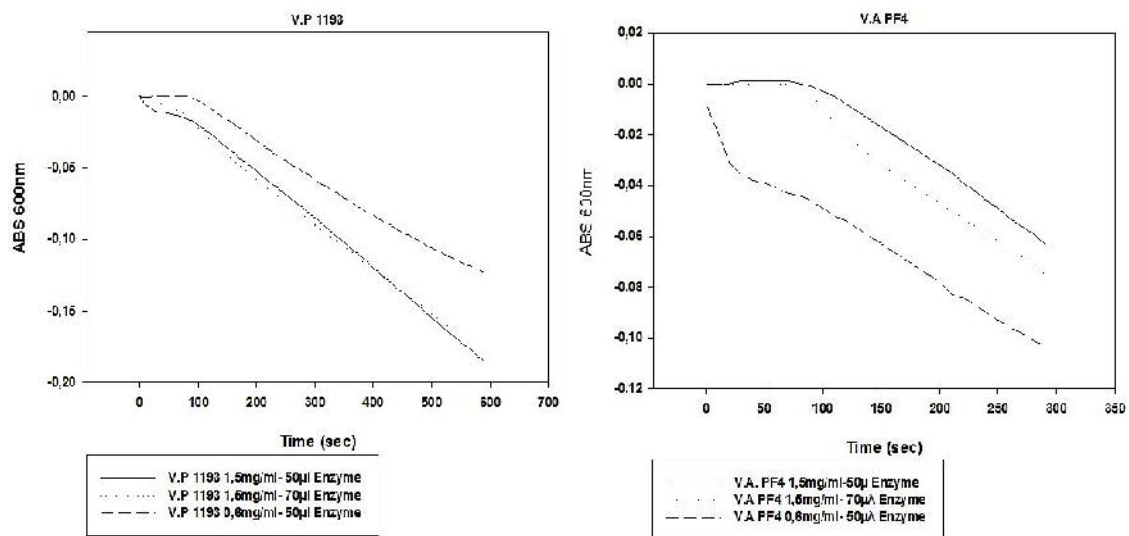
Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα λύσης των κυττάρων του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193, από το ένζυμο λυσοζύμη, προερχόμενα από διαφορετική κατεργασία. Στο πρώτο διάγραμμα τα κύτταρα προέρχονται από λυοφιλίωση ενώ στο δεύτερο διάγραμμα τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται απευθείας από την πάστα κυττάρων μετά την φυγοκέντριση της καλλιέργειας. Παρατηρείτε ότι, τα κύτταρα του Gram αρνητικού βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 μπορούν να λυθούν από το ένζυμο λυσοζύμη τύπου C.



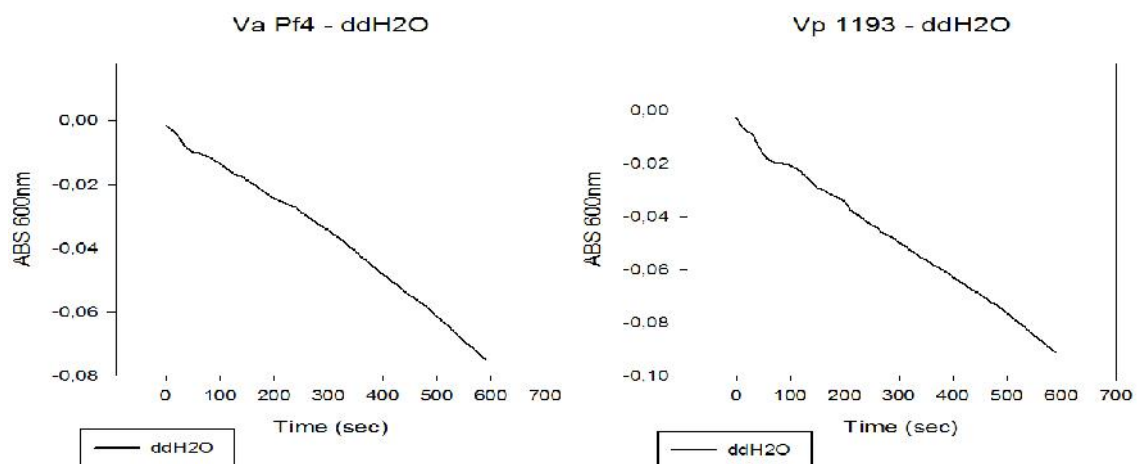
Εικόνα 12. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λύσης του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 από το ένζυμο λυσοζύμη. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 450nm σε συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων 1mg/ml προερχόμενα 1) από λυοφιλίωση και προσθήκη 33μl ενζύμου και 2) από πάστα κυττάρων και προσθήκη 70μl ενζύμου. Οι τιμές των καμπυλών είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Στις καμπύλες της Εικόνας 13 παρατηρείτε ότι η λύση των κυττάρων του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 είναι αποτελεσματικότερη στις συγκεντρώσεις βακτηρίου 1,5mg/ml ενώ στο βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 η λύση των κυττάρων από το ένζυμο λυσοζύμη είναι αποτελεσματικότερη στις συγκεντρώσεις 0,6mg/ml. Στην Εικόνα 14 παρατηρείτε ότι τα δύο βακτήρια παρουσιάζουν παρόμοια οπτική απορρόφηση όταν για buffer της αντίδρασης χρησιμοποιείτε μόνο δις απιονισμένο νερό.

Συνοψίζοντας, και τα δύο βακτήρια είναι ευαίσθητα στο ένζυμο λυσοζύμη. Η αποτελεσματικότητα της λύσης όμως επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων στη αντίδραση και από την ποσότητα του ενζύμου λυσοζύμη.



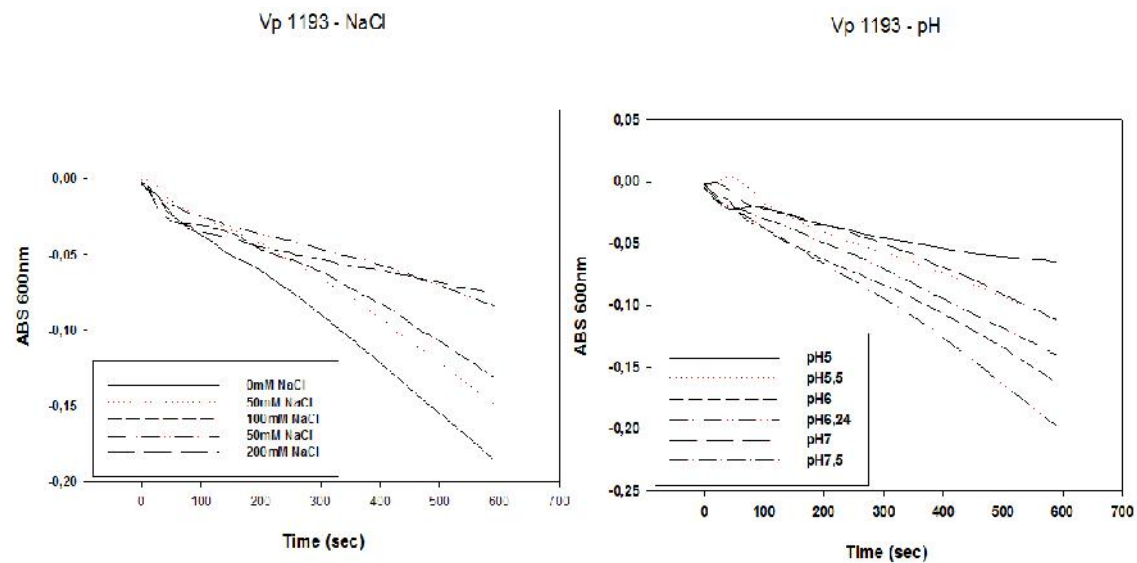
Εικόνα 13. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λύσης των βακτηρίων *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 και *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηριακών κυττάρων και με διαφορετικές ποσότητες ενζύμου στην αντίδραση. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 600nm και οι τιμές των καμπυλών είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.



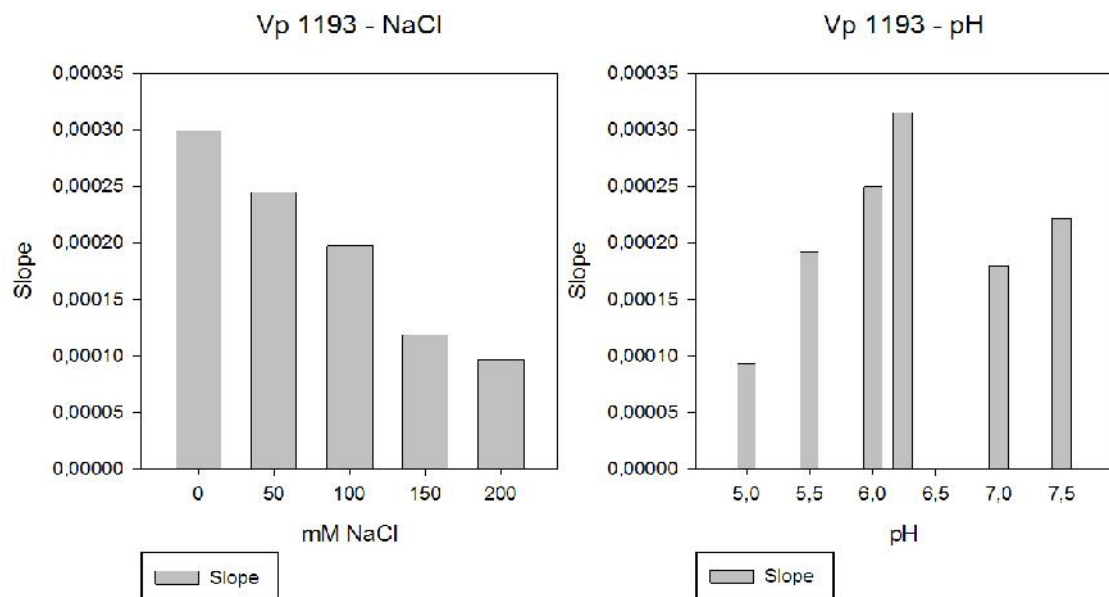
Εικόνα 14. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λύσης των βακτηρίων *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 και *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 σε δις απιονισμένο νερό. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε είναι 30μl. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 600nm και οι τιμές των καμπυλών είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες οπτικής απορρόφησης της αντίδρασης λύσης των βακτηρίων *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 και *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 από το ένζυμο λυσοζύμη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και σε διαφορετικές τιμές pH. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι και η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου αλλά και η

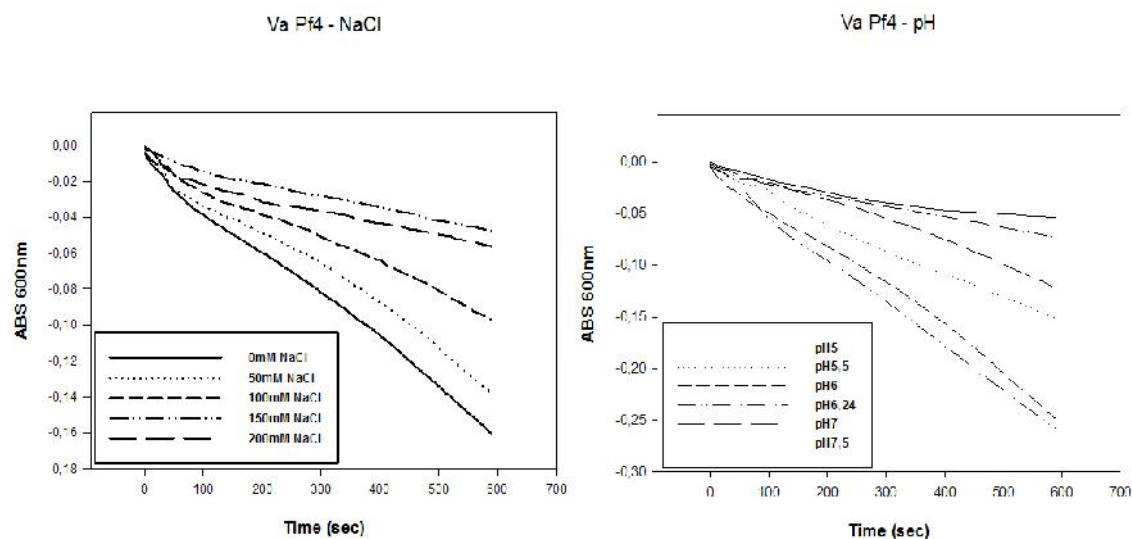
τιμή του pH επηρεάζουν την αντίδραση λύσης με τις βέλτιστες τιμές της αντίδρασης λύσης να είναι 0mM NaCl και pH 6,24 και για τα δύο βακτήρια.



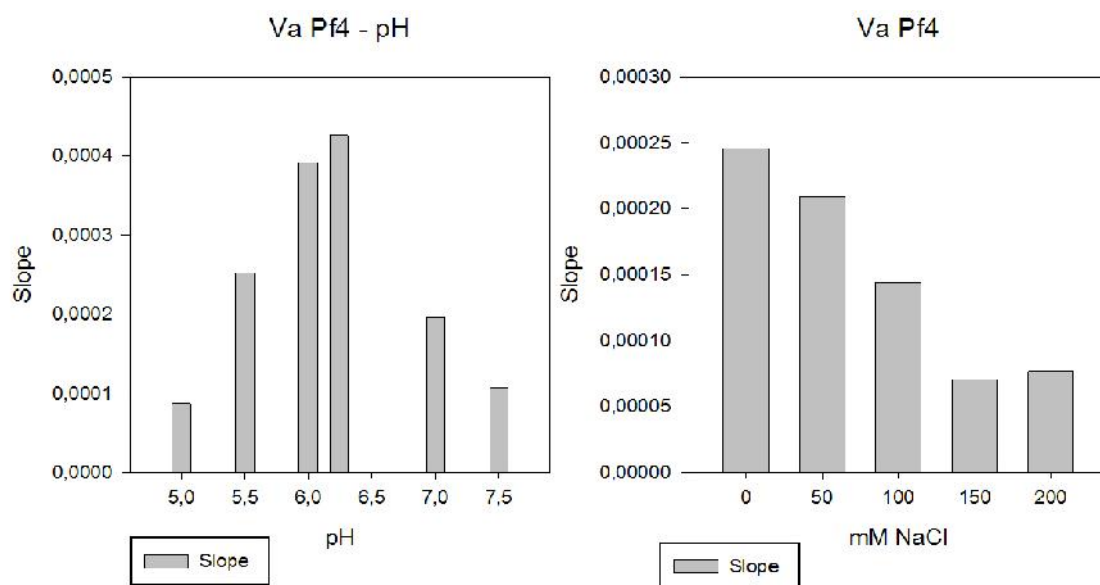
Εικόνα 15. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λύσης του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και σε διαφορετικές τιμές pH. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε είναι 30μl. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 600nm και οι τιμές των καμπυλών είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της κλίσης των γραμμών της Εικόνας 15. Στο διάγραμμα φαίνεται η αποτελεσματικότερη τιμή pH και συγκέντρωσης NaCl για το Vp 1193.



Εικόνα 17. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λύσης του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και σε διαφορετικές τιμές pH. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε είναι 30μl. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 600nm και οι τιμές των καμπυλών είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της κλίσης των γραμμών της Εικόνας 17. Στο διάγραμμα φαίνεται η αποτελεσματικότερη τιμή pH και συγκέντρωσης NaCl για το Va Pf4.

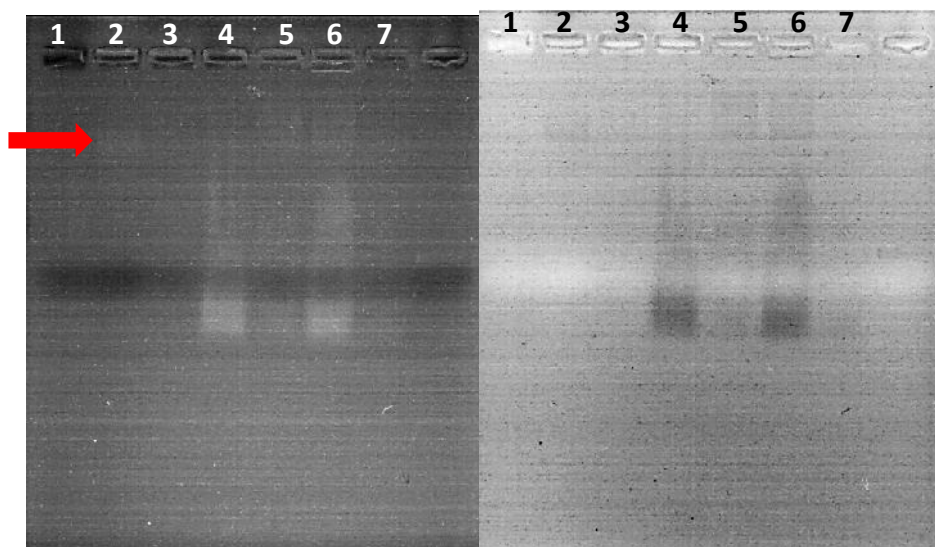
3.4 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου

Για την απομόνωση DNA του βακτηριοφάγου χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι. Η πρώτη είναι μία χαμηλού κόστους και υψηλής απόδοσης μέθοδος τα προϊόντα της οποίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλες τις μετέπειτα διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης και της αλληλούχισης. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην κατακρήμνιση των σωματιδίων των φάγων με ρύθμιση του pH της καλλιέργειας στο 5.2 με οξικό νάτριο, ακολουθούμενο από προσθήκη αιθανόλης στο 25%. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA των φάγων με αιθανόλη και θειοκύανο γουανιδίνιο υπό αλκαλικό pH (Reddy *et al.* 2008).

Η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της πολυαιθύλενο γλυκόλης PEG να περιβάλλει τα μόρια των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν δομικά στοιχεία της κεφαλής του βακτηριοφάγου, και να τα κατακρημνίζει. Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη διαλύματος για την λύση των φάγων και την απομόνωση του DNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν οι βακτηριοφάγοι ALMC και CHOED οι οποίοι μολύνουν το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε, (Εικόνα 19), στην μέθοδο που κάνει χρήση την πολυαιθύλενο γλυκόλη PEG, φαίνεται ότι έχει απομονωθεί DNA όπως δείχνει η αχνή μπάντα στην γραμμή 1 και 2, χωρίς ωστόσο να λαμβάνεται ικανή συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων για περεταίρω επεξεργασία. Στην μέθοδο (Palakolanu Sudhakar Reddy *et al.* 2008), γραμμές 4,5,6,7, φαίνεται γενωματικό υλικό, χωρίς ωστόσο όμως το DNA να σχηματίζει μία ξεχωριστή μπάντα όπως αναμενόταν. Συμπερασματικά καμία από τις δύο μεθόδους δεν έδωσε ικανοποιητική συγκέντρωση απομονωμένου νουκλεϊκού οξέως. Αυτό ίσως οφείλετε σε μη αποδοτική λύση των μορίων βακτηριοφάγου ώστε να εξέλθει το DNA του βακτηριοφάγου στο διάλυμα και την μετέπειτα απομόνωσή του. Όσον αφορά την μέθοδο (Reddy *et al.* 2008), φαίνεται στην εικόνα 10 ότι υπάρχει RNA το οποίο έχει απομονωθεί, σε αντίθεση με την μέθοδο που χρησιμοποιεί την πολυαιθύλενο γλυκόλη PEG, όπου φαίνεται ότι η μέθοδος είναι ικανή για απομόνωση μόνο του DNA και όχι και του RNA.

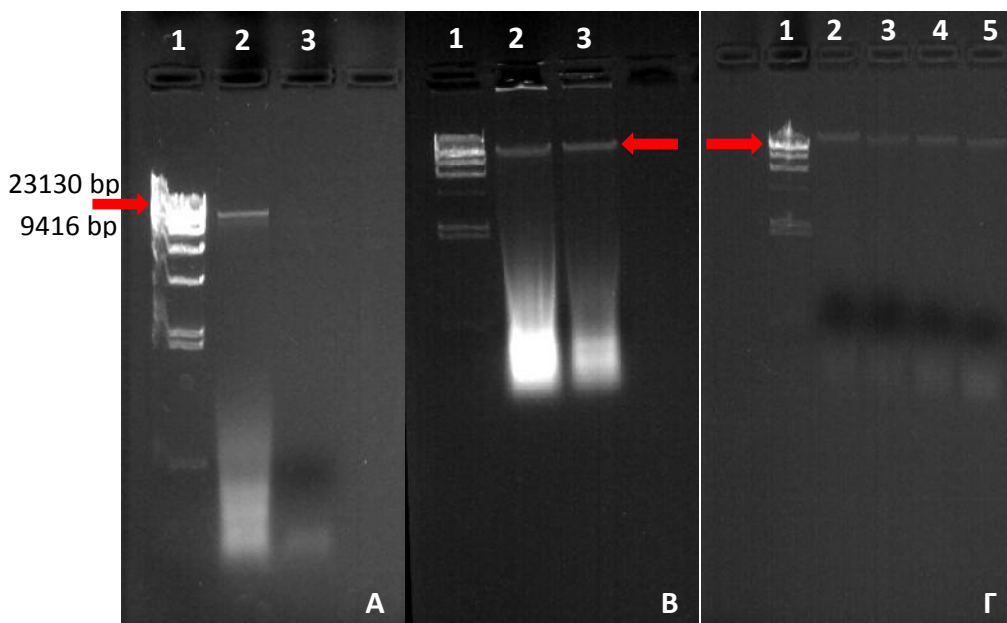
Συγκριτικά, καμία από τις δύο μεθόδους δεν έδωσε ικανά αποτελέσματα για περεταίρω επεξεργασία.



Εικόνα 19. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των προϊόντων των δύο μεθόδων απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων βακτηριοφάγου. 1,2,3) Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου με την μέθοδο που χρησιμοποιεί την πολυαιθύλενο γλυκόλη PEG. 4,5,6,7) Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου με την μέθοδο των Palakolanu Sudhakar Reddy *et al.* 2008.

Γι αυτό τον λόγο δοκιμάστηκε η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων βακτηριοφάγων με την χρήση κιτ του εμπορίου. Το κιτ το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το **Pure Link Viral RNA/DNA Mini Kit** της εταιρείας **Invitrogen**. Το κιτ στηρίζεται στην αποτελεσματική λύση των βακτηριοφάγων σε υψηλές θερμοκρασίες με την χρήση πρωτεΐνάσης K και την επιλεκτική δέσμευση των νουκλεϊκών οξέων στην μεμβράνη silica με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Στην συνέχεια η μεμβράνη με το προσκολλημένο νουκλεϊκό οξύ ξεπλένεται και τέλος το νουκλεϊκό οξύ εκλύεται σε νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα TE.

Από τα αποτελέσματα που πήραμε στην Εικόνα 20 φαίνεται για τον βακτηριοφάγο CHOED ξεκάθαρη μπάντα δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος στο πήγμα αγαρόζης, σε αντίθεση με τον βακτηριοφάγο ALMC.

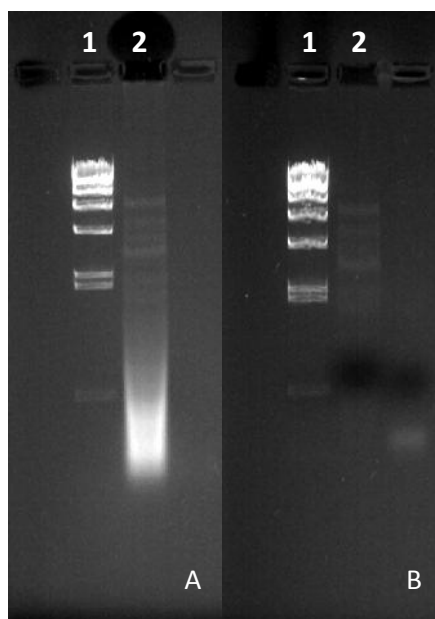


Εικόνα 20. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των προϊόντων του εμπορικού κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων των βακτηριοφάγων CHOED και ALMC. Α. 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2) Βακτηριοφάγος CHOED 3) Βακτηριοφάγος ALMC. Β. 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2,3) Βακτηριοφάγος CHOED. Γ. 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2,3,4,5) Βακτηριοφάγος CHOED.

3.5 Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV

Το ένζυμο περιορισμού χρησιμοποιήθηκε για την τμηματοποίηση του ολικού νουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου με σκοπό την απομόνωση τμημάτων αυτού και την εισαγωγή τους σε πλασμίδιο. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV. Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* J62 pLG74 με αλληλουχία αναγνώρισης την 5'-GAT|ATC-3'. Το περιοριστικό ένζυμο EcoRV δημιουργεί τυφλά άκρα.

Για την πέψη μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers) που συνοδεύουν κάθε ένζυμο για βέλτιστη δραστηριότητα. Κατα κανόνα γίνεται πέψη 1μg DNA με 3-5 units ενζύμου στα 20μl συνολικού όγκου αντίδρασης. Πριν το τέλος της αντίδρασης και για χρονικό διάστημα 30' έως 60' λεπτών, προστέθηκε στον όγκο της αντίδρασης 1μl RNase.



Εικόνα 21. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) των προϊόντων της πέψης του DNA του βακτηριοφάγου CHOED A. με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2) DNA Βακτηριοφάγου CHOED και B. με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV και την προσθήκη 1μl RNase 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2) DNA Βακτηριοφάγου CHOED.

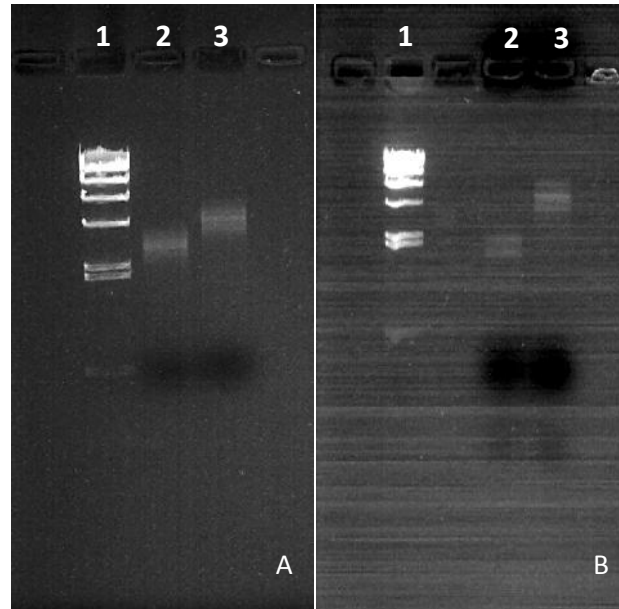
Στην εικόνα 21 A μετά από την πέψη του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου CHOED από το περιοριστικό ένζυμο EcoRV φαίνεται ότι δημιουργούνται 6 ευδιάκριτες μπάντες. Προσθέτοντας το πιθανό μήκος αυτών των ζωνών συμπεραίνεται ότι το μήκος του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου CHOED είναι τουλάχιστον 22000 ζεύγη βάσεων και είναι δίκλωνο.

Για την περαιτέρω χρησιμοποίηση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απαλλαγή του από κομμάτια RNA. Ο σκοπός αυτός επιτυγχάνεται με την προσθήκη στην αντίδραση της πέψης 1 μl RNase. Το αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας φαίνεται στην Εικόνα 21 B όπου έχει απομείνει μόνο το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ του βακτηριοφάγου απαλλαγμένου από ριβονουκλεϊκό οξύ.

3.6 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την πέψη του ολικού DNA του βακτηριοφάγου με περιοριστικό ένζυμο και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, έγινε ανάκτηση επιλεγμένων κομματιών (bands) από το πήκτωμα αγαρόζης με σκοπό την υποκλωνοποίησή τους σε κατάλληλο φορέα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο κιτ του εμπορίου, το

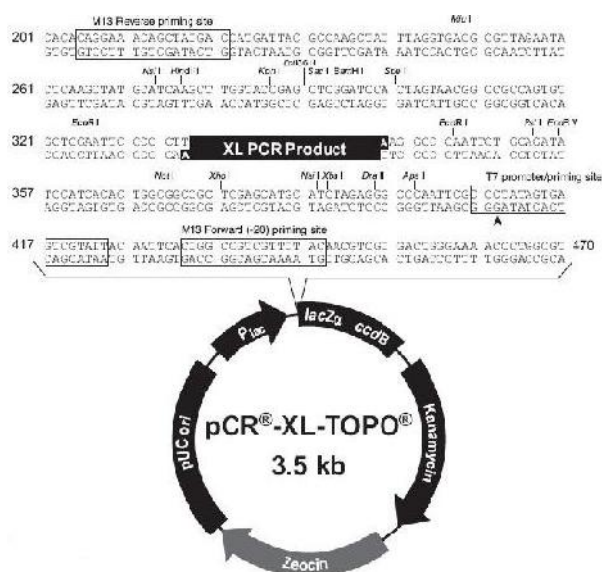
Nucleospin Gel Extraction της εταιρείας Macherey-Nagel και το QIA quick Gel Extraction της εταιρείας QIAGEN. Επιλέχθηκαν κομμάτια DNA με μοριακό βάρος 2Kbp, 3Kbp και 4Kbp όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των προϊόντων των δύο εμπορικών κιτ για την ανάκτηση κομματιών DNA από πήκτωμα αгарόζης. **A.** 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2) DNA Βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους περίπου 3Kbp 3) DNA Βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους περίπου 4Kbp **B.** 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2) DNA Βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους περίπου 2Kbp 3) DNA Βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους περίπου 4Kbp.

3.7 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά την πέψη του ολικού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου και την ανάκτηση των τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως από το πήκτωμα αγαρόζης ακολουθεί η κλωνοποίηση αυτών σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν δύο κιτ, το TOPO Cloning TA με πλασμιδιακό φορέα τον pEXP5-CT/TOPO και το TOPO Cloning XL

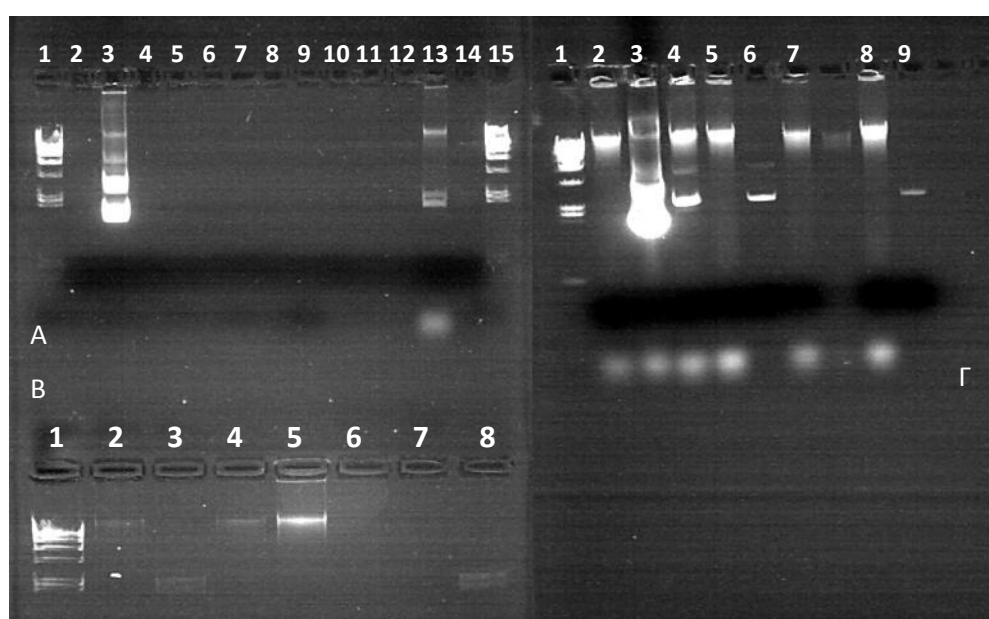


με πλασμιδιακό φορέα τον pCR-XL-TOPO, ο οποίος χρησιμοποιείται ειδικότερα για την κλώνοποίηση μεγάλων κομματιών δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως (3-10 Kb). Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται την ύπαρξη μιας βάσης αδενίνης σε κάθε άκρο των τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως, η οποία έχει προστεθεί με την χρήση της Taq πολυμεράσης. Η προσθήκη αυτή είναι απαραίτητα επειδή τα τμήματα του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως προέρχονται από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV έχουν τυφλά άκρα. Μετά την εισαγωγή των τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους 3Kbp και 4Kbp στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα γίνεται μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων TOP10 με θερμικό σοκ και τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για περίπου 18 ώρες παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων γίνεται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών διότι οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τρυβλίων συλλέγονται η κάθε μία και αναπτύσσονται εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/αντιβιοτικού έτσι ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Τα προϊόντα της απομόνωσης DNA πλασμιδιακού φορέα με αλκαλική λύση αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) όπως φαίνονται στην Εικόνα 23A και 23B. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν, φαινομενικά από το πήκτωμα αγαρόζης, για δεύτερη απομόνωση αποικίες με τη μεγαλύτερη πιθανότητα ύπαρξης της ένθεσης στο

πλασμίδιο. Στην Εικόνα 23Γ φαίνεται ότι τα πλασμίδια που επιλέχθηκαν για δεύτερη απομόνωση πιθανόν να περιέχουν την επιθυμητή ένθεση των τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως του βακτηριοφάγου CHOED μεγέθους 3Kbp και 4Kbp.

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε pCR-XL-TOPO έχει μέγεθος 3,5 Kbp και τα τμήματα DNA του βακτηριοφάγου CHOED έχουν μέγεθος 3Kbp και 4Kbp. Άρα στην περίπτωση της ένθεσης των τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα, το μέγεθος γίνεται 6,5Kbp και 7,5Kbp αντίστοιχα.



Εικόνα 23. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% (w/v) των προϊόντων της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση. Α. 1, 15) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2-13) 5μl DNA ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα με ένθεση τμήματος βακτηριοφαγικού DNA μεγέθους 3Kbp 14) 5μl DNA ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα με ένθεση τμήματος βακτηριοφαγικού DNA μεγέθους 4Kbp Β. 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2-8) 5μl DNA ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα με ένθεση τμήματος βακτηριοφαγικού DNA μεγέθους 4Kbp Γ. Δεύτερη απομόνωση DNA του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα από επιλεγμένες αποικίες Α-(2,3,13) για το τμήμα DNA μεγέθους 3Kbp και Α-(14), Β-(2,3,4,5,8) για το τμήμα DNA μεγέθους 4Kbp. 1) Μοριακός δείκτης λ-HindIII 2-4) 10μl DNA ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα με ένθεση τμήματος βακτηριοφαγικού DNA μεγέθους 3Kbp 5-9) 10μl DNA ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού φορέα με ένθεση τμήματος βακτηριοφαγικού DNA μεγέθους 4Kbp.

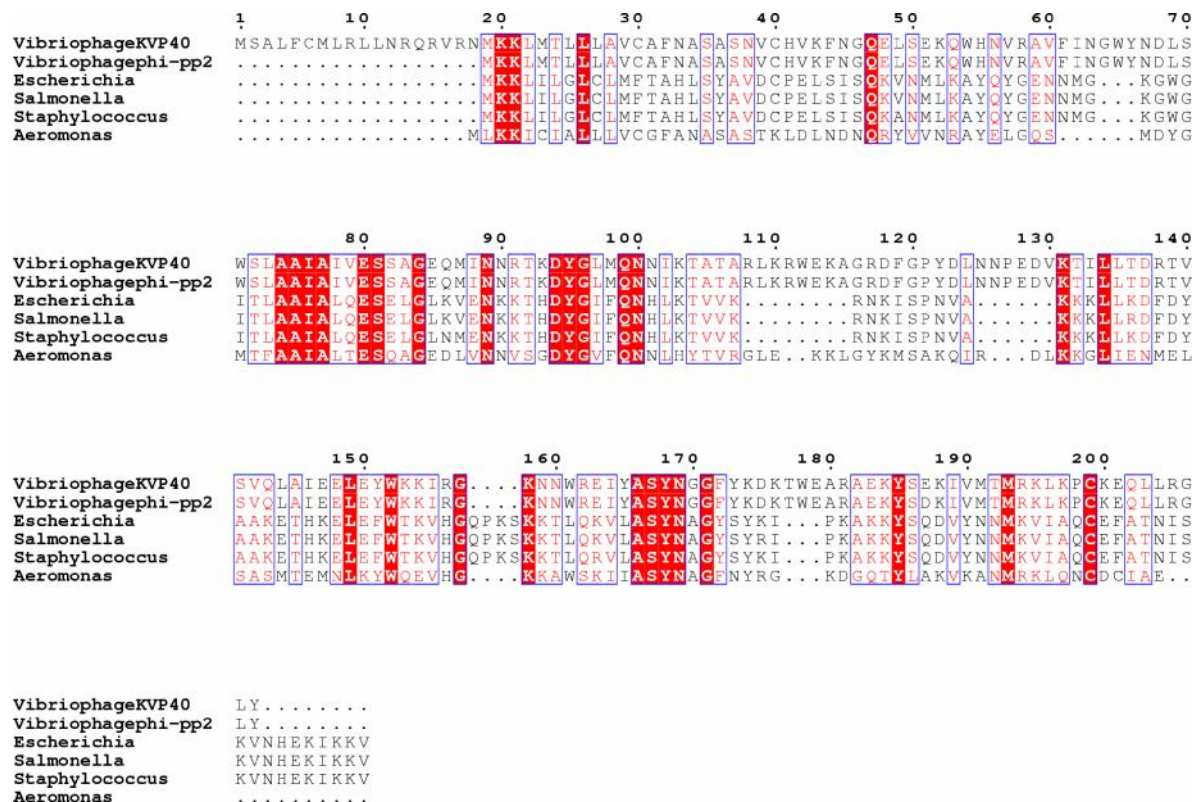
3.8 Βιοϋπολογιστική Ανάλυση

Έλεγχος στη βάση δεδομένων του NCBI και ειδικότερα στην αλληλούχηση του γονιδιώματος του *Vibrio* phage KVP40 (Miller et al., 2003) έδειξε την παρουσία ενός λυτικού ενζύμου της τρανσγλυκοσιλάσης (Εικόνα 24). Το ένζυμο (κωδικός NCBI NP_899526) αποτελείται από 208 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακή μάζα 24.156 Da. Μέλη της οικογένειας της τρανσγλυκοσιλάσης περιλαμβάνουν τις βακτηριακές τρανσγλυκοσιλάσες και τις ευκαρυωτικές λυσοζύμες ["goose-type" lysozymes (GEWL)]. Το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση του β-1,4-γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ N-ακετυλομουραμικού και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης όπως η λυσοζύμη. BLAST ανάλυση της αλληλουχίας NP_899526 έδειξε την ύπαρξη ομολόγων αλληλουχιών σε άλλους φάγους. Επιλέχτηκαν ομόλογες πρωτεΐνες από τους παρακάτω φάγους: *Vibrio* phage KVP40 *Aeromonas* phage PX29, *Staphylococcus* phage SA1, *Escherichia* phage EC6, *Salmonella* phage Felix01. Στον Πίνακα 4 φαίνεται η % ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι αλληλουχίες τρανσγλυκοσιλάσης από φάγους *Vibrio* εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα ομολογίας (μεταξύ 23-31 %) με τις αντίστοιχες από άλλους φάγους. Αυτό πιθανότατα να υποδεικνύει ότι αποτελούν ξεχωριστή ομάδα της οικογένειας. Ακολούθως οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε αμινοξική στοίχιση με το πρόγραμμα CLUSTALW και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 25. Από την αμινοξική στοίχιση είναι φανερό ότι τα ένζυμα παρά το γεγονός ότι διαθέτουν χαμηλά επίπεδα ομολογίας υπάρχουν απόλυτα συντηρημένες περιοχές.

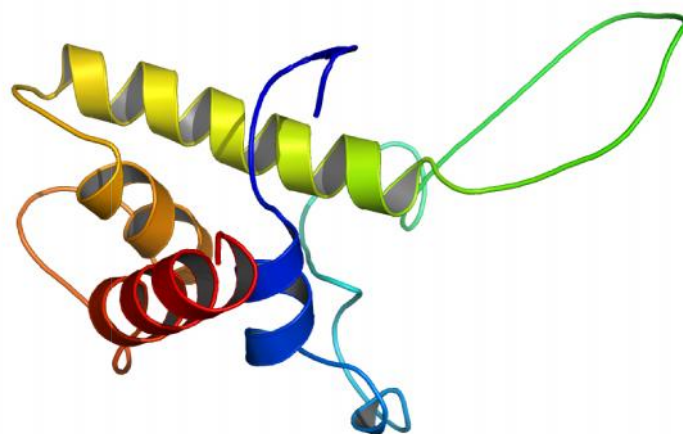
***Vibrio* phage KVP40**

```
1 MSALFCMLRL LNRQVRNMK KLMTLLLAVC AFNASASNVC HVKFNGQELS EKQWHNVRAV
61 FINGWYNDLS WSLAAIAIVE SSAGEQMINN RTKDYGLMQN NIKTATARLK RWEKAGRDFG
121 PYDLNPNEDV KTILLTDRTV SVQLAIEELE YWKKIRGKNN WREIYASYNG GFYKDKTWEA
181 RAEKYSEKIV MTMRKLKPKCK EQLLRGLY
```

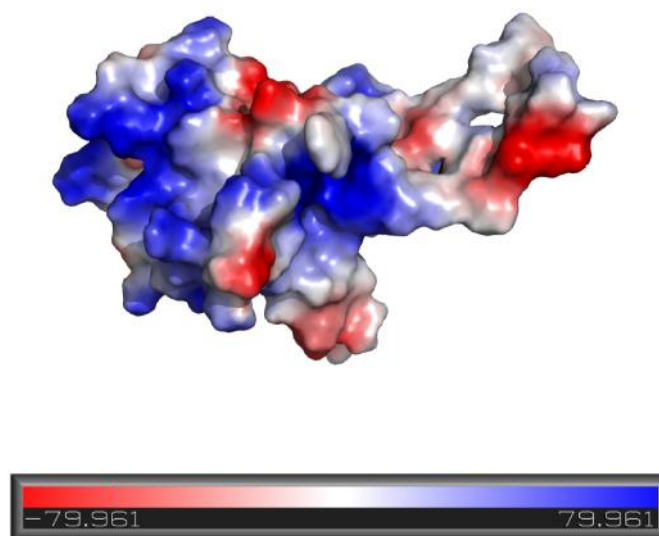
Εικόνα 24. Αμινοξική αλληλουχία της καταχώρησης NP_899526 που αντιστοιχεί στο ένζυμο τρανσγλυκοσιλάση από τον *Vibrio* phage KVP40.



Εικόνα 25. Αμινοξική στοίχιση με το πρόγραμμα CLUSTALW επιλεγμένων ενζύμων από τους φάγους Vibrio phage KVP40 Aeromonas phage PX29, Staphylococcus phage SA1, Escherichia phage EC6, Salmonella phage Felix01.



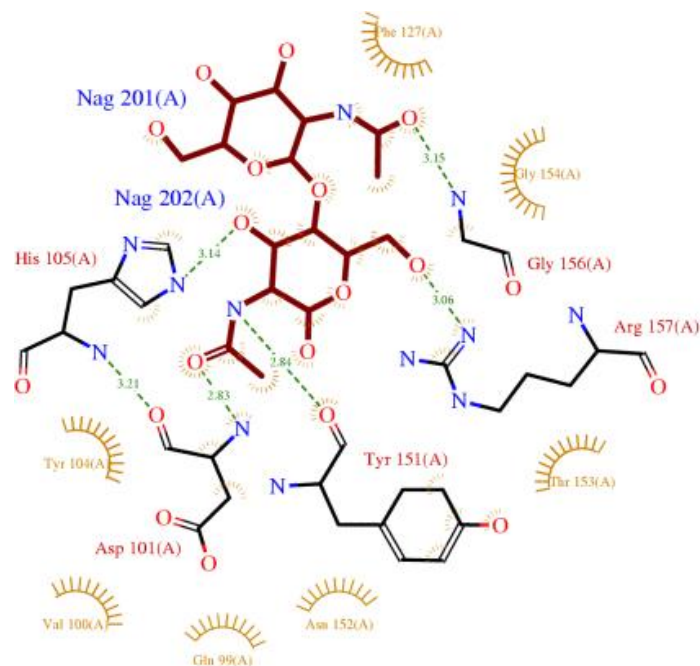
Εικόνα 26. Η προβλεπόμενη δομή του ενζύμου όπως προέκυψε μετά από ομόλογη μοντελοποίηση.



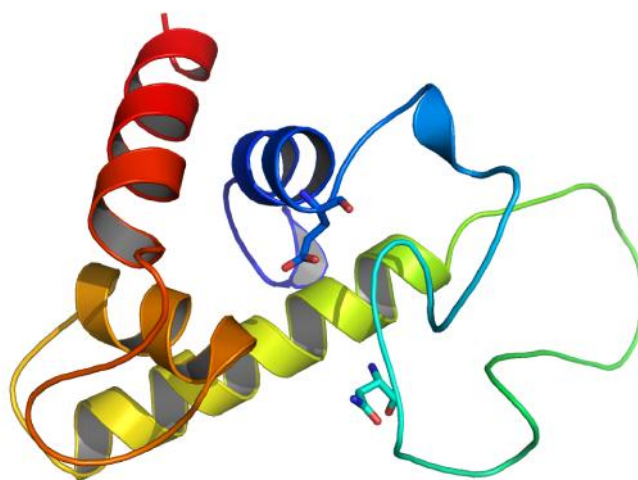
Εικόνα 27. Υπολογισμός του ηλεκτροστατικού δυναμικού της δομής του ενζύμου όπως προέκυψε μετά από ομόλογη μοντελοποίηση.

Η περιοχή μεταξύ 73-181 (αρίθμηση με βάση την αλληλουχία του του *Vibrio* phage KVP40 ενζύμου) διαθέτει την υψηλότερη ομολογία και πιθανότατα αντιστοιχεί σε μια συντηρημένη περιοχή με καταλυτικά σημαντικό ρόλο.

Για να μελετηθεί ο καταλυτικός ή δομικός ρόλος της περιοχής έγινε προσπάθεια να πραγματοποιηθεί προσομοίωση της δομής του ενζύμου με ομόλογη μοντελοποίηση. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο διακομιστής Swiss-Model (Arnold et al., 2006, Schwede et al., 2003). Για την ομόλογη μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκε η δομή του 3gxrD (1.70 Å) που αντιστοιχεί στο ένζυμο λυσοζύμη (g-type) από μπακαλιάρο (Helland et al., 2009). Επαρκής ομολογία και ικανοποιητική μοντελοποίηση πραγματοποιήθηκε για την περιοχή της πρωτοταγούς δομής 64-198. Στην Εικόνα 26 και Εικόνα 27 φαίνεται η προβλεπόμενη δομή του ενζύμου. Στην Εικόνα 28 φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ υποστρώματος και του ενζύμου λυσοζύμη (g-type) από μπακαλιάρο (3gxrD) (Helland et al., 2009). Το ένζυμο από *Vibrio* phage KVP40 διαθέτει το καταλυτικό αμινοξύ Glu73 (αμινοξικό κατάλοιπο 80 με βάση την αρίθμηση του ενζύμου από *Vibrio* phage KVP40, Εικόνα 24). Επίσης τα δύο αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν αναγνωριστεί σαν καταλυτικά σημαντικά στη λυσοζύμη (g-type) από μπακαλιάρο (Asp90 και Asp101) δεν είναι συντηρημένα.



Εικόνα 28. Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του υποστρώματος N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη και του ενζύμου λυσοζύμη (g-type) από μπακαλιάρο (3gxrD) (Helland et al., 2009).

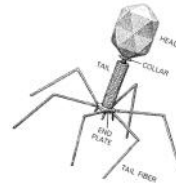


Εικόνα 29. Η δομή του Vibrio phage KVP40 ενζύμου με τα καταλυτικά σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα Asp80 και Asn101.

Ειδικότερα στη θέση της Asp101 υπάρχει Asn ενώ στη θέση 90 υπάρχει αμινοξικό κενό. Στην Εικόνα 29 φαίνεται η δομή του Vibrio phage KVP40 ενζύμου με τα καταλυτικά σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα Asp80 και Asn101.

Πίνακας 4. Ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο του ενζύμου τρανσγλυκοσίλωση από φάγους: Vibrio phage KVP40 Aeromonas phage PX29, Staphylococcus phage SA1, Escherichia phage EC6, Salmonella phage Felix01.

Όνομα	Μέγεθος	Όνομα	Μέγεθος	Score
VibriophageKVP40	208	Vibriophagephi-pp2	190	99.0
VibriophageKVP40	208	Aeromonas	173	31.0
VibriophageKVP40	208	Staphylococcus	182	28.0
VibriophageKVP40	208	Escherichia	182	23.0
VibriophageKVP40	208	Salmonella	182	23.0
Vibriophagephi-pp2	190	Aeromonas	173	31.0
Vibriophagephi-pp2	190	Staphylococcus	182	28.0
Vibriophagephi-pp2	190	Escherichia	182	23.0
Vibriophagephi-pp2	190	Salmonella	182	23.0
Aeromonas	173	Staphylococcus	182	30.0
Aeromonas	173	Escherichia	182	31.0
Aeromonas	173	Salmonella	182	31.0
Staphylococcus	182	Escherichia	182	97.0
Staphylococcus	182	Salmonella	182	96.0
Escherichia	182	Salmonella	182	98.0



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη δύο νέων βακτηριοφάγων (ALMC, CHOED), οι οποίοι μολύνουν το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 που είναι γνωστό για την ασθένεια που προκαλεί, την βιμπρίωση (Vibriosis). Επίσης χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 και ο βακτηριοφάγος του KVP40 για συγκριτικές μελέτες. Το δύο αυτά βακτήρια είναι Gram⁽⁻⁾ γ-πρωτεοβακτήρια και ανήκουν στην οικογένεια Vibrionaceae της τάξης Vibrionales. Ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία των δύο βακτηρίων και του βακτηριοφάγου KVP40 έχει πλήρως καθοριστεί (Makino *et al.* 2003, Naka *et al.* 2011, Miller *et al.* 2003). Το γένωμα του βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* στέλεχος 1193 αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα 3288558 bp και 1877212 bp και περιέχει 4832 γονίδια. Το γένωμα του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4 αποτελείται από δύο χρωμοσώματα και περιέχει το πλασμίδιο pJM1 το οποίο είναι υπεύθυνο για την ικανότητα πρόκλησης της ασθένειας. Ο βακτηριοφάγος KVP40 ομοιάζει τον φάγο T4 και το γένωμά του αποτελείται από 244835 bp με ποσοστό G+C 42.6%.

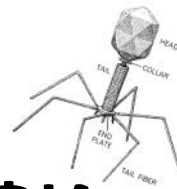
Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι βακτηριοφάγοι (ALMC, CHOED) «σκοτώνουν» το βακτήριο *Vibrio anguillarum* στέλεχος Pf4, με αποδοτικότερο τον βακτηριοφάγο CHOED. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων επηρεάζεται τόσο από την ποσότητα και συγκέντρωση των βακτηριοφάγων που προστίθενται όσο και από το χρονικό σημείο στο οποίο προστίθενται στην καλλιέργεια του βακτηρίου.

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο βακτήρια, αν και αρνητικά κατά Gram, είναι ευαίσθητα στο ένζυμο λυσοζύμη τύπου C, με την αποτελεσματικότητα της λύσης των κυττάρων να επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων στην αντίδραση λύσης και από την ποσότητα του ενζύμου. Οι λυσοζύμη τύπου C, τύπου G και η λυσοζύμη προερχόμενη από τον βακτηριοφάγο T4 έχουν προέλθει με εξέλιξη από κοινό πρόγονο, έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και ανήκουν στην ίδια ομάδα λυσινών τις μουραμιδάσες (Vollmer *et al.* 2008). Η παρατήρηση της λύσης των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων από λυσοζύμη επιβεβαιώνεται επίσης από τους Hui Li *et al.* 2008 οι οποίοι έδειξαν ότι το ένζυμο λυσοζύμη είναι ικανό να λύσει αρνητικά κατά Gram βακτήρια, και από τους Vega *et*

al. 2006, οι οποίοι χρησιμοποίησαν λυσοζύμη τύπου C στα βακτήρια *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio cholera*.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι και η συγκέντρωση NaCl αλλά και η τιμή του pH επηρεάζουν την αντίδραση λύσης με τις βέλτιστες τιμές αντίδρασης να είναι η απουσία NaCl και pH6,24 και για τα δύο βακτήρια. Οι Poznanski *et al.* (2003) στην μελέτη του για την εξάρτηση της δράσης, του ενζύμου λυσοζύμη, από το NaCl απέδειξαν ότι η επίδραση του NaCl στην δράση του ενζύμου είναι στατιστικά σημαντική, χρησιμοποιώντας συγκέντρωση NaCl έως 0,1M και συγκέντρωση ενζύμου λυσοζύμης τύπου C στο εύρος 0.5–9 mM. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του NaCl τόσο λιγότερα είναι τα σημεία δέσμευσης του ενζύμου στην μεμβράνη του βακτηρίου, άρα και η δραστηριότητα του ενζύμου στην λύση του κυττάρου.

Η απομόνωση του γενωμικού υλικού των δύο βακτηριοφάγων, με το πρωτόκολλο των Palakolanu Sudhakar Reddy *et al.* 2008 και την κατακρήμνιση των ιοσωματίων του βακτηριοφάγου με PEG 6000, δεν έδωσε αποτελέσματα ικανά για περεταίρω επεξεργασία, σε σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ. Ακόμη, βρέθηκε ότι το γονιδιωματικό υλικό του βακτηριοφάγου CHOED είναι δίκλωνο, δεοξυριβονουκλεικό οξύ μήκους τουλάχιστον 22 kbp, μετά την πέψη του με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV, ενώ για τον βακτηριοφάγο ALMC δεν ήταν δυνατή η απομόνωση του γονιδιώματός του.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- d'Hérelle F: *The bacteriophage: Its role in immunity*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1922.
- Twort FW: An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* ii:1241; 1915.
- d'Hérelle F: Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Critical Reviews Academic Science Paris* 1917, 165: 373.
- Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N: Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect* 1998, 36: 5-15.
- Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A: Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000, 48: 547-551.
- Ashelford KE, Day MJ, Fry JC: Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69: 285-289.
- Furuse K: Distribution of coliphages in the general environment: general considerations. In *Phage ecology*. Edited by Goyal SM, Gerba C, Bitton G. New York, N.Y.: John Wiley & Sons; 1987:87-124.
- Merrill CR: Bacteriophage interactions with higher organisms. *Trans N Acad Sci* 1974, 36: 265-272.
- Neve HU, Kemper U, Geis A, Heller J: Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber* 1994, 46: 167-178.
- Marks T, Sharp R: Bacteriophages and biotechnology: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 2000, 75: 6-17.
- Hendrix RW: Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol* 2002, 61: 471-480.
- Sharp R: Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2001, 76: 667-672.
- Hayes W: *The genetics of bacteria and their viruses*, 2nd edn. London, United Kingdom.: Blackwell Scientific Publications Ltd.; 1968. Carlton RM: *Phage*

Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1999, 47: 267-274.

- Krylov VN: Phagotherapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, perspectives, safety, limitations. *Genetika* 2001, 37: 869-887.
- Miller,E.S., Heidelberg,J.F., Eisen,J.A., Nelson,W.C., Durkin,A.S., Ciecko,A., Feldblyum,T.V., White,O., Paulsen,I.T., Nierman,W.C., Lee,J., Szczypinski,B. and Fraser,C.M. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage *J. Bacteriol.* 185 (17), 5220-5233 (2003).
- Miller,E.S., Heidelberg,J.F., Eisen,J.A., Nelson,W.C., Durkin,A.S., Ciecko,A., Feldblyum,T.V., White,O., Paulsen,I.T., Nierman,W.C., Lee,J., Szczypinski,B. and Fraser,C.M. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage *J. Bacteriol.* 185 (17), 5220-5233 (2003).
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.
- R.Helland,R.L.Larsen,S.Finstad,P.Kyomuhendo,A.N.Larse (2009). Crystal structures of g-type lysozyme from Atlantic cod shed new light on substrate binding and the catalytic mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2585-2598.
- L.Vanderkelen, J.M.Van Herreweghe, K.G.Vanoirbeek, G.Baggerman, B.Myrnes, P.J.Declerck, I.W.Nilsen, C.W.Michiels, and L.Callewaert (2011). Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1053-1064.
- A.Wohlkönig, J.Huet, Y.Looze, and R.Wintjens (2010). Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. *PLoS One*, 5, e15388. L.Callewaert, and C.W.Michiels (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*, 35, 127-160.

- Shigenobu Matsuzaki, Mohammad Rashel Jumpei Uchiyama, Shingo Sakurai, Takako Ujihara, Masayuki Kuroda, Masahiko Ikeuchi, Toshikazu Tani, Mikiya Fukieda, Hiroshi Wakiguchi, Shosuke Imai (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 11:211-219 DOI 10.1007/s10156-005-0408-9.
- Haihong Han, Hin-chung Wong, Biao Kan, Zhaobiao Guo, Xiaotao Zeng, Shengjun Yin, Xiumei Liu, Ruifu Yang and Dongsheng Zhou (2008). Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics* 2008, 9:570 doi:10.1186/1471-2164-9-570.
- Yuansha Chen, O Colin Stine, Jonathan H Badger, Ana I Gil, G Balakrish Nair, Mitsuaki Nishibuchi and Derrick E Fouts. (2011). Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC Genomics* 2011, 12:294
- Kozo Makino, Kenshiro Oshima, Ken Kurokawa, Katsushi Yokoyam, Takayuki Uda BPharm, Kenichi Tagomori MPharm, Yoshio Iijima, Masatomo Najima MSc, Masayuki Nakano MSc, Atsushi Yamashita, Yoshino Kubota BSc, Shigenobu Kimura PhD, Teruo Yasunaga PhD, Takeshi Honda, Hideo Shinagawa, Masahira Hattori, Dr Tetsuya Iida (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholera*. *Lancet* 1;361(9359):743-9.
- Waldemar Vollmer, Bernard Joris, Paulette Charlier & Simon Foster. (2008) *FEMS* DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x.
- Noémie M. Dorval Courchesne, Albert Parisien and Christopher Q. Lan. (2009) *Recent Patents on Biotechnology* 2009, 3, 37-45.
- Mark Fenton, Paul Ross, Olivia McAuliffe, Jim O'Mahony and Aidan Coffey. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs* 1:1, 9-16.
- Sarah O'Flaherty, R. Paul Ross & Aidan Coffey. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. DOI:10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x
- Vincent A. Fischetti. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300 (2010) 357–362

- Eun-Young Kim, Yu-Ri Kim, Dong-Gyun Kim, In-Soo Kong. A susceptible protein by proteomic analysis from *Vibrio anguillarum* under various environmental conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* (2012) 35:273–282 DOI 10.1007/s00449-011-0636-6.
- E. Jończyk, M. Kłak, R. Międzybrodzki, A. Górski. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol* (2011) 56:191–200 DOI 10.1007/s12223-011-0039-8
- Carla Pereira, Yolanda J. Silva, Ana L. Santos, Ângela Cunha, Newton C. M. Gomes and Adelaide Almeida. Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2236-2255; doi:10.3390/md9112236
- Lavigne R, Briers Y, Hertveldt K, Robben J, Volckaert G. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Nov;61(21):2753-9
- I Frans, C W Michiels, P Bossier, K A Willems, B Lievens, and H Rediers. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* 2011, 34, 643–661
- Hiroaki Naka, Graciela M. Dias, Cristiane C. Thompson, Christopher Dubay, Fabiano L. Thompson, and Jorge H. Crosa. Complete Genome Sequence of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Harboring the pJM1 Virulence Plasmid and Genomic Comparison with Other Virulent Strains of *V. anguillarum* and *V. Ordalii*. *INFECTION AND IMMUNITY*, July 2011, p. 2889–2900. doi:10.1128/IAI.05138-11
- Manuela Di Lorenzo, Michiel Stork, Marcelo E. Tolmasky, Luis A. Actis, David Farrell, Timothy J. Welch, Lidia M. Crosa, Anne M. Wertheimer, Qian Chen, Patricia Salinas, Lillian Waldbeser, and Jorge H. Crosa. Complete Sequence of Virulence Plasmid pJM1 from the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Strain 775. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Oct. 2003, p. 5822–5830. DOI: 10.1128/JB.185.19.5822–5830.2003
- Catherine Loc-Carrillo and Stephen T. Abedon. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1:2, 111-114; March/April 2011; © 2011 Landes Bioscience.

- Vincent A Fischetti. Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria. *BMC Oral Health* 2006, 6(Suppl 1):S16 doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S16
- Forest Rohwer¹ and Rob Edwards. The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Aug. 2002, p. 4529–4535. DOI: 10.1128/JB.184.16.4529–4535.2002
- J. G. VOSS. Lysozyme Lysis of Gram-Negative Bacteria without Production of Spheroplasts. *J . gen. Microbial.* (1964), 35, 313-317
- Hui Lia, Maria-Giovanna Parisia, b, Mylène Toubiana^a, Matteo Cammarata^b and Philippe Roch. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. July 2008, Volume 25, Issues 1-2, Pages 143-152
- de-la-Re-Vega E, Garcia-Galaz A, Diaz-Cinco ME, Sotelo-Mundo RR. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol.* 2006 Mar;20(3):405-8.
- Sonomi Hikima, Jun-ichi Hikima, Jiraporn Rojtinnakorn, Ikuo Hirono, Takashi Aoki. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene.* 2003 Oct 16;316:187-95.
- Jarosław Poznanski, Małgorzata Wszelaka-Rylik, Wojciech Zielenkiewicz. Concentration dependencies of NaCl salting of lysozyme by calorimetric methods. *Thermochimica Acta* 409 (2004) 25–32.