

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ *Azotobacter vinelandii***

**Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού διπλώματος Εξειδίκευσης
του Κωνσταντίνου Γιαννόπουλου**

ΑΘΗΝΑ 2014

Η ανάθεση της παρούσας εργασίας έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (Γ.Σ. 13^η / 29-4-2009), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της Μεταπτυχιακής διατριβής.

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων:

Καθηγητής: Κατινάκης Π.

Μέλη:

Επίκουρος Καθηγήτρια: Ταμπακάκη Α.

Επίκουρος Καθηγητής: Χατζηπαυλίδης Ι.

Στον πατέρα μου Ιωάννη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κατινάκη Παναγιώτη στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Κατινάκη που με έκανε δεκτό στο εργαστήριο Βιοχημείας και για τις πολύτιμες συμβουλές του που με καθοδήγησαν καθόλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου. Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της Συμβουλευτικής και Εξεταστικής Επιτροπής κ.κ. Ταμπακάκη Αναστασία και Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή Επιτροπή και την αναγνώριση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε και πραγματοποιήθηκε με την πολύτιμη βοήθεια και αμέριστη συμπαράσταση του Διδάκτορα Περικλή Διαμαντόπουλου, η καθοδήγηση του οποίου είχε σαν αποτέλεσμα την επιτυχή εκτέλεση των πειραμάτων τις διορθώσεις και την παρουσίαση του τελικού κειμένου. Στην ολοκλήρωση της εργασίας συνέβαλλαν και αρκετά μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Οι συμβουλές και οι γνώσεις όλων ήταν χρήσιμα εργαλεία κατά την καθημερινή επαφή μου με τον εργαστηριακό πάγκο και τις υποχρεώσεις μου στον εργαστηριακό χώρο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Διδάκτορες κ. Μαρία Δήμου και κ. Νατάσσα Βενιεράκη για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους, καθώς και σε όλους τους υποψήφιους Διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος και ιδιαίτερα στον Ιωάννη Χουλιάρα για την αρωγή τους.

Τέλος, τις θερμότερες των ευχαριστιών στην οικογένειά μου καθώς και στο φιλικό μου περιβάλλον για την στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	08
ABSTRACT.....	09
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
A.1. Ο ΣΙΔΗΡΟΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	11
A.1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	11
A.2. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ.....	13
A.2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	13
A.2.2 DNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (ΜΙΚΡΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ).....	15
A.2.3 ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ.....	18
A.2.4 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ.....	19
A.2.5 ΟΜΑΔΑ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ.....	24
A.2.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ.....	25
A.3. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ, ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΝΔΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ.....	28
A.3.1 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ.....	28
A.3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>E. coli</i> ΚΑΙ ΤΟΥ <i>A. vinelandii</i> ...29	
A.3.3 ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΝΔΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ.....	33
A.3.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΣΙΔΗΡΟΥ.....	35
A.4. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>E. coli</i>	41
A.4.1 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΦΕΡΡΟΞΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΙΜΗ.....	41
A.4.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΤΟΥ C-ΤΕΛΙΚΟΥ ΚΟΛΛΗΜΕΝΟΥ ΑΚΡΟΥ HIS6-ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ.....	42
A. 5 <i>Azotobacter vinelandii</i>	44
A.5.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Azotobacter</i>	44
A.5.2 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Azotobacter vinelandii</i>	45
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46

B.1. ΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Azotobacter vinelandii</i>	47
B.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP ..	47
B.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)	49
B.4. PCR PURIFICATION	51
B.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	51
B.6. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	53
B.7 ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ	53
B.7.1 Ο ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pET28a (+)	53
B.7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ	54
B.7.3 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ DNA ΛΙΓΑΣΗΣ	54
B.8 ΠΕΨΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	55
B.9 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (Competent cells) ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	57
B.9.1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (Competent cells)	57
B.9.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	57
B.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	58
B.10.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA με QIAprep Miniprep	58
B.10.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ (Boiling Prep)	59
B.11 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	60
B11.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ	62
B.11.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ	63

B.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE).....	64
B.12.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	65
B.12.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	66
B.12.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΖΩΝΩΝ ΜΕΣΩ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕ Coomassie Brilliant Blue R-250.....	67
B.13 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α ΣΥΝΘΕΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ.....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ Ο ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ Pet28a(+)......	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
Γ.1. ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP.....	74
Γ.1.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP.....	74
Γ.1.2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP, ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΕΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	74
Γ.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΩΔΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ AvOP-2916 ΚΑΙ AvOP-5614.....	76
Γ.3. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ AvOP2619, AvOP5614 ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP ΣΤΟ <i>E.coli</i>.....	81
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φερριτίνες είναι μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών αποθήκευσης σιδήρου, εξαπλωμένη σε όλους τους αναερόβιους και αερόβιους ζωντανούς οργανισμούς. Φερριτίνες που απομονώθηκαν από βακτήρια, μπορεί να περιέχουν αίμη ή όχι. Στην πρώτη περίπτωση, λέγονται βακτηριοφερριτίνες. Πρωταρχικός ρόλος των φερριτινών στα κύτταρα είναι να αποθηκεύουν το σίδηρο σε μορφή Fe^{3+} . Ένας δευτερεύοντας ρόλος τους είναι η αποτοξίνωση από το σίδηρο ή να προστατεύουν το κύτταρο από το O_2 και τις ελεύθερες ενεργές ρίζες του. Φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες έχουν παρόμοια δομή. Ένα 24-μερές σύμπλοκο σχηματίζει ένα σφαιρικό περίπου κέλυφος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης κλωνοποιημένου γονιδίου της βακτηριοφερριτίνης του *Azotobacter vinelandii*, στελέχη AvOP-2916 και AvOP-5614. Τα γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pET28a(+) και αφού ολοκληρώθηκε η αλληλούχισή τους χαρακτηρίστηκαν ως cDNA κλώνοι της φερριτίνης. Εν συνεχεία εκφράστηκαν ετερόλογα σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21 (DE3) και εξετάστηκε το επίπεδο έκφρασης στο διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα της ανασυνδυασμένης βακτηριοφερριτίνης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης.

ABSTRACT

Ferritins constitute a broad superfamily of iron storage proteins, widespread in all domains of life, in aerobic or anaerobic organisms. Ferritins isolated from bacteria may contain a haem or be haem-free. In the first case they are called bacterioferritins. The primary function of ferritins inside cells is to store iron in the ferric form. A secondary function may be detoxification of iron or protection against O₂ and its radical products. Ferritins and bacterioferritins have essentially the same architecture, assembling in a 24mer cluster to form a hollow, roughly spherical construction. The aim of this study was to overexpress and characterize a gene encoding for bacterioferritin in nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii* strains: AvOP-2916 and AvOP-5614. These genes were subcloned into the expression vector pET28a (+) and after completion of their sequencing, they characterized as cDNA clones of ferritin. Subsequently, they expressed heterologous in *Escherichia coli* cells BL21 (DE3) and the expression level was examined in the soluble and insoluble fraction of the recombinant bacterioferritin in SDS-polyacrylamide gel.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Ο ΣΙΔΗΡΟΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

A.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

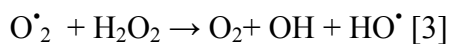
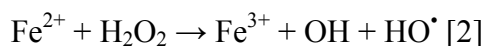
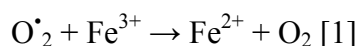
Ο σίδηρος είναι ζωτικό στοιχείο για τη ζωή στη γη με κάποιες σπάνιες εξαιρέσεις (*Borrelia burgdorferi* και γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούν Μαγνήσιο και Κοβάλτιο αντί για Σίδηρο (Archibald, 1983; Pandey *et al.*, 1994; Weinberg, 1997; Imbert and Blondeau, 1998; Posey and Gherardini, 2000)). Στο φλοιό της γης, ο σίδηρος είναι το δεύτερο πιο άφθονο μέταλλο και το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο. Αν και ο σίδηρος επιδεικνύει οξειδωτικές καταστάσεις από -5 έως +6, οι πιο κοινές βιολογικές οξειδοαναγωγικές μορφές είναι: η ανηγμένη Fe^{2+} μορφή και η οξειδωμένη Fe^{3+} μορφή (Crichton and Pierre, 2001). Οι δύο σταθερές καταστάσεις οξείδωσης Fe^{2+} και Fe^{3+} είναι εύκολα ανταλλάξιμες, επιτρέποντας κατά συνέπεια στο σίδηρο να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων (Andrews, 1998). Επιπλέον, οι διάφορες καταστάσεις περιστροφής των ιόντων σιδήρου, του επιτρέπουν να ενεργεί ως βιοκαταλύτης ή μεταφορέας ηλεκτρονίων στις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν μοριακό οξυγόνο. (Smith, 2004).

Ο σίδηρος ενσωματώνεται σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών οι οποίες παίρνουν μέρος σε απαραίτητες βιολογικές διαδικασίες όπως στη φωτοσύνθεση, στη κυτταρική αναπνοή, στη μεταφορά οξυγόνου, στη σύνθεση του DNA και στην πρόσληψη του αζώτου (Crichton and Ward, 1992). Η διαθεσιμότητα και η χρησιμότητα του σιδήρου στις βιολογικές διεργασίες απορρέει από την αφομοίωση του στις διαδικασίες της ζωής σε ένα αρχικό σημείο της εξέλιξης (Beinert *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, εμφανίστηκαν προκλήσεις εκμετάλλευσης του σιδήρου μετά από την εισαγωγή του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα με την διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Η παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου δημιούργησε δύο κύρια προβλήματα στη χρήση του σιδήρου. Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό περιβάλλον που δημιουργείται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, οδήγησε στη μετατόπιση από την υπεροχή του Fe^{2+} στην επικράτηση του Fe^{3+} . Αυτή η αλλαγή ήταν σημαντική επειδή σε διάλυμα ύδατος ουδέτερου pH, ο Fe^{2+} είναι διαλυτός (0.1 M) ενώ ο Fe^{3+} είναι αδιάλυτος (1.4×10^{-9} M) (Chipperfield and Ratledge 2000; Andrews *et al.*, 2003). Αυτή η μείωση στη διαλυτότητα του σιδήρου μείωσε τη βιοδιαθεσιμότητα του επειδή η αποθήκευση του μη διαλυτού Fe^{3+} απαιτεί τη μετατροπή του σε διαλυτό Fe^{2+} πριν χρησιμοποιηθεί από

τους ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι, ο σίδηρος έγινε μια περιοριστική θρεπτική ουσία (Wong, 2009).

Το δεύτερο πολύ σημαντικό πρόβλημα που προέκυψε, αφορά το κυτταρικό στρες από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου. Το κυτταρικό οξειδωτικό στρες είναι ένα καθολικό φαινόμενο που συμβαίνει σε αερόβιους και αναερόβιους οργανισμούς. Προκαλείται από τις ενδοκυτταρικές ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) που μπορούν να παράγουν ένα μείγμα υπεροξειδίου (O_2^{\bullet}) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ως προϊόντα (Smith, 2004). Από αυτό το μείγμα, το υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με τον Fe^{3+} σχηματίζοντας διαλυτό σίδηρο Fe^{2+} και O_2 (Εξ. 1). Κατόπιν, το υπεροξειδίου του υδρογόνου, ένα ισχυρό οξειδωτικό, είναι ικανό να αντιδράσει με τον ελεύθερο Fe^{2+} και να σχηματιστούν καταστροφικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (HO^{\bullet}) μέσω της αντίδρασης Fenton (Εξ. 2). Ο συνδυασμός των δύο αντιδράσεων καλείται αντίδραση haber-Weiss (Εξ. 3) (Wiedenheft *et al.*, 2005; Andrews *et al.*, 2003).



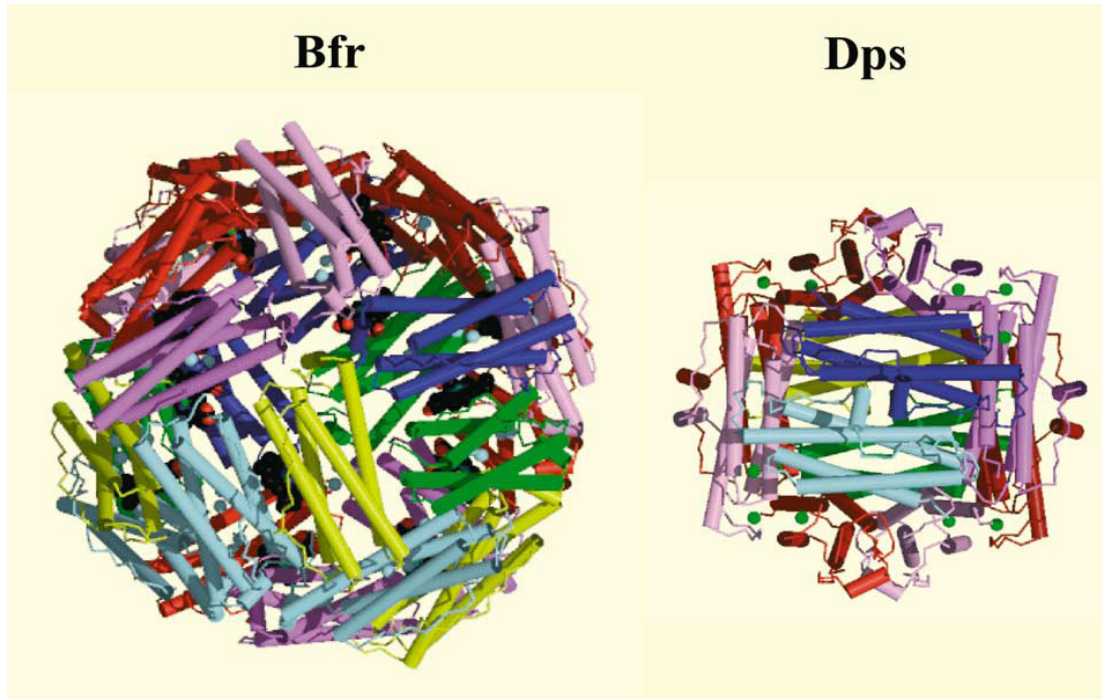
Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (HO^{\bullet}) είναι πολύ ενεργές και μπορούν να προκαλέσουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τα σπασίματα αλυσίδων του DNA, και την υποβάθμιση των διάφορων βιομορίων (Andrews, 1998; Harrison and Arosio, 1996). Έτσι, απαιτείται από τους ζωντανούς οργανισμούς να προσαρμόσουν καλύτερους μηχανισμούς αποθήκευσης, μεταφοράς και χρήσης του σιδήρου. Όλοι οι οργανισμοί επομένως έχουν αναπτύξει στρατηγικές που τους επιτρέπουν να αποκτήσουν το σίδηρο, να τον διαλυτοποιήσουν και να τον αποθηκεύσουν σε μια μη τοξική, εύκολα διαθέσιμη μορφή (Wong, 2009).

A.2. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ

A.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου κατανέμονται ευρέως μεταξύ των *archaea*, των προκαρυωτικών, των υψηλών και χαμηλών G+C Gram-θετικών βακτηρίων, στα κυανοβακτήρια, στα βακτηριοειδή, στα *Thermotogales*, και στις τέσσερις υποδιαίρεσεις των πρωτεοβακτηρίων, που δείχνει ότι η δυνατότητα αποθήκευσης σιδήρου είναι μια σημαντική γενική απαίτηση των προκαρυωτικών (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Ο σίδηρος είναι παρόν μέσα στα κύτταρα των διαφόρων οργανισμών είτε σε πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο και ενζυματικά σύμπλοκα είτε σε πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου. Ο σίδηρος μπορεί να ενσωματωθεί στα πρωτεϊνικά μόρια σαν σύμπλοκο σιδήρου-θείου [Fe-S], σε μονοπύρηνες περιοχές σιδήρου, σε διπύρηνες περιοχές σιδήρου, σε περιοχές μείγματος διπύρηνου μετάλλου (π.χ. περιέχοντας νικέλιο) και αίμης (Wong, 2009).

Τρεις τύποι πρωτεϊνών αποθήκευσης σιδήρου αναγνωρίζονται στα βακτήρια: οι αρχετυπικές φερριτίνες που απαντώνται στους ευκαρυώτες, οι βακτηριοφερριτίνες που περιέχουν αίμη και βρίσκονται μόνο στα ευβακτήρια και η μικρότερη DNA-δεσμευτική πρωτεΐνη Dps (λέγεται και μικροφερριτίνη), που απαντάται μόνο στους προκαρυώτες (Smith, 2004). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλοι οι τύποι φερριτινών μπορεί να υπάρχουν στο ίδιο βακτήριο και πολλαπλά γονίδια φερριτίνης ή βακτηριοφερριτίνης να είναι κοινά. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι η μοριακή αρχιτεκτονική τους, η οποία τους παρέχει την ικανότητα αποθήκευσης σιδήρου. Κάθε μία αποτελείται από 24 (στις φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες) ή 12 (στις Dps πρωτεΐνες) πανομοιότυπες ή παρόμοιες υπομονάδες, που συγκεντρώνονται για να διαμορφώσουν ένα περίπου σφαιρικό πρωτεϊνικό κέλυφος, το οποίο περιβάλλει μία κεντρική κοιλότητα που ενεργεί ως δεξαμενή αποθήκευσης σιδήρου (Εικόνα 1). Κάθε υπομονάδα είναι διπλωμένη έτσι ώστε να διαμορφώσει μια δέσμη τεσσάρων α-ελίκων. Οι σχετικά μεγάλες φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες (~500kDa) φιλοξενούν τουλάχιστον 2000-3000 άτομα σιδήρου ανά 24-μερές, ενώ οι μικρότερες (~250kDa) Dps πρωτεΐνες έχουν χαμηλότερη χωρητικότητα ~500 ατόμων σιδήρου ανά 12-μερές (Hari *et al.*, 2000).



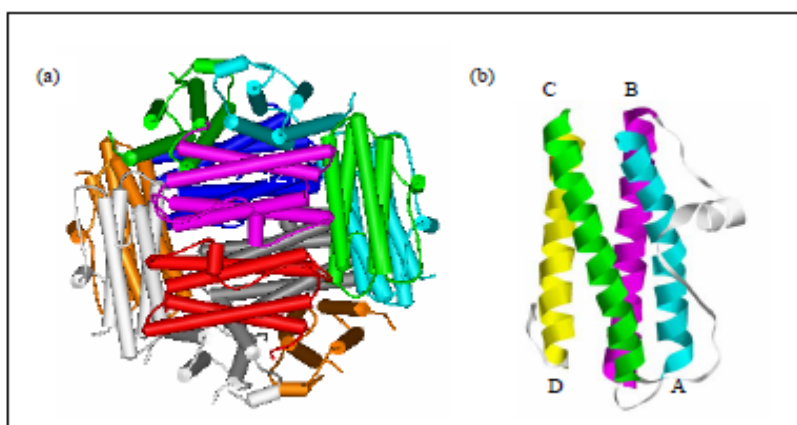
Εικόνα 1: Δομές της 24-μερούς και 12-μερούς πρωτεΐνης αποθήκευσης σιδήρου. Η πρώτη είναι της βακτηριοφερριτίνης (Dautant *et al.*, 1998) και η δεύτερη της Dps (Grant *et al.*, 1998) από το *E.coli* και είναι περίπου σε κλίμακα. Οι ομάδες της αίμης και τα άτομα Mn που είναι ενωμένα με τη βΦΤ, δείχνονται ως μαύρες/κόκκινες και μπλέ σφαίρες. Άτομα S στη Dps δείχνονται πράσινα. Οι εικόνες πάρθηκαν από την πρωτεϊνική τράπεζα στοιχείων (Berman *et al.*, 2000).

Αν και οι τρεις τύποι πρωτεϊνών αποθήκευσης σιδήρου ανήκουν σε ευδιάκριτες εξελικτικές καταγωγές, συσχετίζονται η μια με την άλλη σε επίπεδο δομικών και λειτουργικών ομοιοτήτων (Andrews *et al.*, 1991b). Οι πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου λαμβάνουν το σίδηρο στη διαλυτή Fe^{2+} μορφή, αλλά ο σίδηρος αποθηκεύεται στην κεντρική κοιλότητα στην οξειδωμένη και λιγότερο διαλυτή Fe^{3+} μορφή. Η διαδικασία αποθήκευσης σιδήρου απαιτεί έτσι ένα βήμα φερροξειδοποίησης που καταλύεται σε ειδικές περιοχές μέσα στις πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου. Στις φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες, αυτή η περιοχή είναι το αποκαλούμενο κέντρο φερροξιδάσης που βρίσκεται στη κεντρική περιοχή των διαφόρων υπομονάδων. Τα κατάλοιπα σ' αυτό τον τόπο συντηρούνται ιδιαίτερα και δρουν ως δεσμευτές για τη σύνδεση δύο ιόντων Fe^{2+} , το πρώτο βήμα στη διαδικασία λήψης σιδήρου. Το συνδεδεμένο Fe^{2+} ιονικό ζευγάρι οξειδώνεται στη συνέχεια από το O_2 που οδηγεί στο σχηματισμό ενός οξο-γεφυρωμένου δι-σιδηρικού ενδιάμεσου. Σχηματίζεται έτσι ο Fe^{3+} σίδηρος, ο οποίος έπειτα μετακινείται στην κεντρική κοιλότητα όπου είτε διαμορφώνεται ένας πυρήνας φερριωδρίτη ($5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$), ή ένας άμορφος σιδηρικός πυρήνας φωσφορικού άλατος, εάν το φωσφορικό άλας είναι παρόν, όπως συμβαίνει

in vivo. Τα κατάλοιπα στην περιοχή φερροξιδάσης δεν συντηρούνται στις Dps πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύουν και οξειδώνουν το Fe^{3+} σίδηρο σε μία εντελώς διαφορετική περιοχή που βρίσκεται στη δύο πτυχών διεπαφή μεταξύ των υπομονάδων. Τα κατάλοιπα που περιλαμβάνονται στη δέσμευση σιδήρου σ' αυτό τον τόπο συντηρούνται καλά στις Dps πρωτεΐνες, αλλά όχι στις φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες. Κατά συνέπεια, οι 12-μερείς και 24-μερείς πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου οξειδώνουν το σίδηρο πολύ διαφορετικά. (Pari *et al.*, 2000).

A.2.2 DNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (ΜΙΚΡΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ)

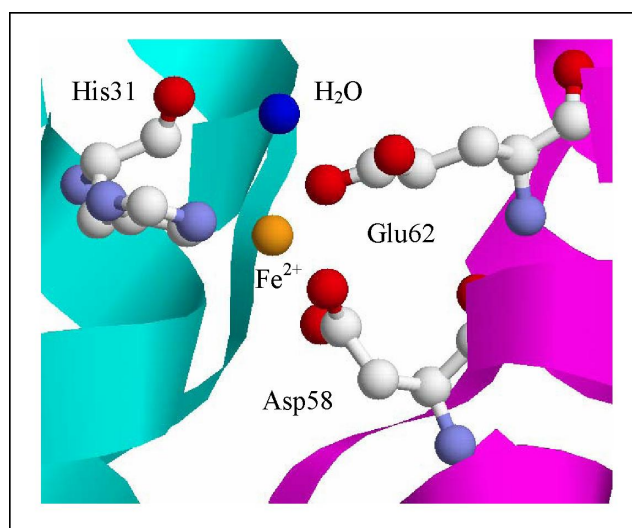
Η DNA-δεσμευτική πρωτεΐνη από κύτταρα με έλλειψη σιδήρου (Dps) είναι μια περίπου σφαιρική πρωτεΐνη με 12 πανομοιότυπες υπομονάδες και συνολικό μοριακό βάρος (MW) ~240kDa. Η πρωτεΐνη μπορεί να αποθηκεύσει μέχρι 500 άτομα σιδήρου μέσα στην κεντρική κοιλότητα (Zhao *et al.*, 2002) (Εικ. 2α). Η εξωτερική διάμετρος της κοιλότητας είναι ~10nm και η εσωτερική διάμετρος είναι ~5nm (Wiedenhaupt *et al.*, 2005). Η δευτεροταγής δομή της Dps δείχνει ότι κάθε υπομονάδα είναι διπλωμένη σε μια δέσμη τεσσάρων ελίκων (A-D) (Εικ. 2β). Το κέντρο της φερροξιδάσης βρίσκεται στη διεπαφή μεταξύ των δύο συμμετρικών συγγενικών υπομονάδων δύο πτυχών, έτσι ώστε οι δεσμευτές του σιδήρου να συνδέονται και από τα δύο συμμετρικά μονομερή (12- υπομονάδες) (Suttisansanee, 2006).



Εικόνα 2: (α) Η δομή της Dps της *Listeria* και (β) η δομή μιάς υπομονάδας η οποία αποτελείται από τις έλικες A (μπλέ), B (μώβ), C (πράσινο), και D (κίτρινο) (Pari *et al.*, 2000). Κάθε χρώμα στο (α) αναπαριστά μία υπομονάδα και κάθε χρώμα στο (β) αναπαριστά έλικες και βρόγχους.

Η πρώτη πρωτεΐνη Dps που ανακαλύφθηκε ήταν από το *E.coli*. Αυτή η πρωτεΐνη βρέθηκε να δεσμεύεται στο DNA για να το προστατεύσει από το οξειδωτικό στρες (Almiron *et al.*, 1992). Έπειτα, ομόλογες Dps βρέθηκαν και σε άλλα βακτήρια όπως στη *Listeria monocytogenes* (Bozzi *et al.*, 1997) και αλλού. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η Dps του *E.coli* μπορεί επίσης να αποθηκεύσει το σίδηρο, αλλά προτιμά το H₂O₂ ως οξειδωτικό, με το O₂ σαν εναλλακτική λύση. Αυτό δείχνει ότι ο αρχικός ρόλος της Dps του *E. coli* είναι η προστασία του DNA από τη συνδυασμένη δράση Fe²⁺ και H₂O₂ που οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου (Zhao *et al.*, 2002). Κατά συνέπεια, η πρωταρχική λειτουργία της Dps πιθανώς δεν είναι στην αποθήκευση σιδήρου. Εάν οι Dps-ομοειδείς πρωτεΐνες άλλων βακτηρίων λειτουργούν κυρίως ως προστασία του DNA από οξειδωτικούς παράγοντες, παραμένει να διερευνηθεί. (Simon *et al.*, 2003).

Η κρυσταλλική δομή με ακτίνες X της Dps της *Listeria* (προηγουμένως γνωστή ως φερριτίνη της *Listeria*) έδειξε ότι το κέντρο της φερροξιδάσης περιέχει έναν συνδεδεμένο σίδηρο που συντονίζεται από τα Glu62 και Asp58 από μια υπομονάδα, μία His31 από τη συμμετρική υπομονάδα, και ένα μόριο νερού που βρίσκεται 3 Å από το άτομο σιδήρου, σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου με την His43 από το ίδιο μονομερές (Pari *et al.*, 2000) (Εικ. 3). Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στη δέσμευση σιδήρου σ' αυτό τον τόπο συντηρούνται καλά στις Dps πρωτεΐνες.



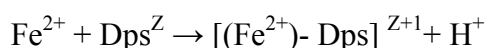
Εικόνα 3: Τα κατάλοιπα σύνδεσης σιδήρου της Dps της *Listeria* είναι His31, Asp58, Glu62 και ένα μόριο νερού (μπλέ) με το άτομο σιδήρου (κίτρινο) (Pari *et al.*, 2000).

Η Dps της *Listeria* δεσμεύει το σίδηρο σε τρεις διαφορετικές φάσεις αντίδρασης: ο σίδηρος δεσμεύεται στα κέντρα της φερροξιδάσης, οξειδώνεται από το

διαλυμένο οξυγόνο, και μεταλλοποιείται με το σχηματισμό μικροκρυσταλλικής δομής (Su *et al.*, 2005). Η όλη διαδικασία της απόθεσης σιδήρου και η αποτοξίνωση από τη Dps της *Listeria* περιγράφεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

Για τη Φερροξιδάση,

1) Ο Fe^{2+} δεσμεύεται σε κάθε μια από τις 12 περιοχές της Dps της *Listeria*:



2) Fe^{2+} οξειδωση/υδρόλυση: $[(Fe^{2+})-Dps]^{Z+1} + Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow [(Fe^{3+})_2(O)_2-Dps]^{Z+1} + 2H^+$.

Για τη μεταλλοποίηση,

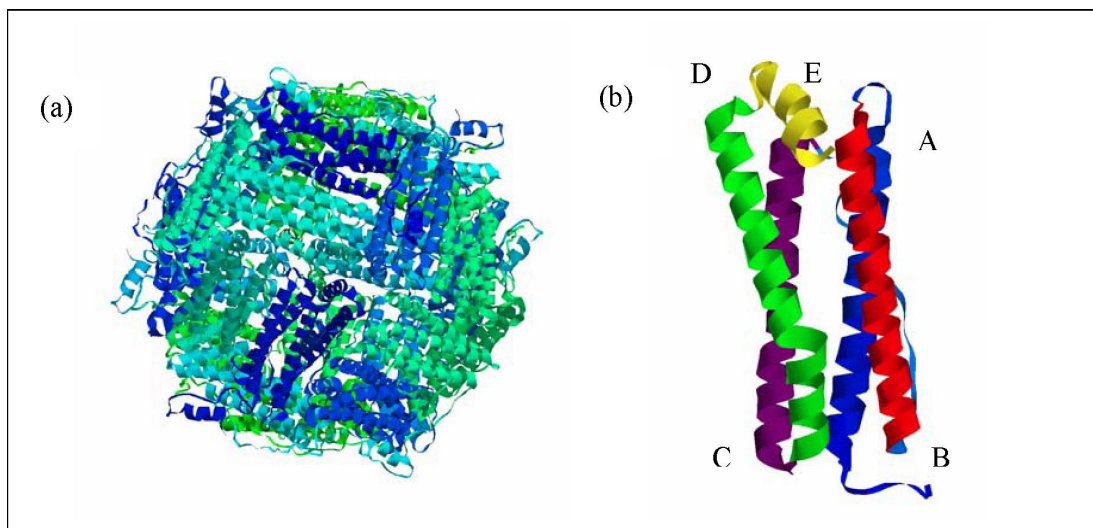
1) Fe^{2+} οξειδωση/υδρόλυση: $2Fe^{2+} + H_2O_2 + 2H_2O \rightarrow 2Fe(O)OH$ (πυρήνας) $+ 4H^+$.

Από τη μεταλλοποίηση, έχει αποδειχθεί ότι το H_2O_2 , ένα ισχυρό οξειδωτικό, χρησιμοποιείται γρήγορα στο κέντρο φερροξιδάσης της Dps, το οποίο αποβάλλει ταυτόχρονα τα δύο συστατικά μέσω της αντίδρασης Fenton (Fe^{2+} και H_2O_2) που συμβάλλουν στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου. Μετάλλαξη της επάνω περιοχής σύνδεσης του σιδήρου στην Dps του *L. innocua*, βρέθηκε ότι αυτή η πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου απαιτείται κυρίως για την αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και όχι για τη λήψη σιδήρου (Iari *et al.*, 2005).

A.2.3 ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ

Οι φερριτίνες (ΦΤ) βρίσκονται σε οργανισμούς τόσο διαφορετικούς όσο τα βακτήρια, οι μύκητες, τα φυτά και τα σπονδυλωτά. Η ευρεία διανομή τους μεταξύ των διαφόρων ειδών υπονοεί έναν θεμελιώδη και αρχαίο ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου. Η δομή των φερριτινών, που έχει μελετηθεί ευρέως, είναι μια πρωτεΐνη 24 πανομοιότυπων υπομονάδων με μοριακό βάρος ~480kDa οι οποίες σχηματίζουν ένα δωδεκαεδρικό ρομβικό πρωτεϊνικό κέλυφος που εσωκλείει μέχρι 4500 άτομα σιδήρου σε έναν πυρήνα οξειδίου/υδροξειδίου/φωσφορικού άλατος (Harrison and Arosio, 1996; Theil, 1987; Stillman *et al.*, 2001; Liu and Theil, 2005). Η εξωτερική διάμετρος της πρωτεΐνης είναι 12-13 nm και η εσωτερική διάμετρος της κοιλότητας είναι 7-8

nm. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια δέσμη τεσσάρων ελίκων (A-D) και έναν πέμπτο κοντύτερο έλικα (E) (Εικόνα 4) σχηματίζοντας έναν κύλινδρο που χωρά στην κοιλότητα του κελύφους με κυβική συμμετρία 432 (Suttisansanee, 2006).



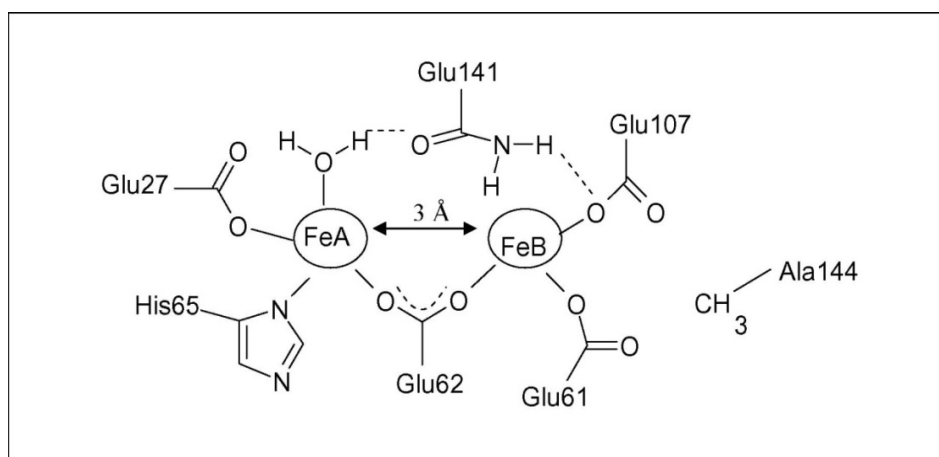
Εικ. 4: Οι εικόνες αναπαριστούν (α) τις δομές ΦΤ του *Trichoplusia ni* (PDB entry 1Z60) (Hamburger *et al.*, 2005) και (β) μία δομή υπομονάδας ΦΤ από ανθρώπινο μιτοχόνδριο, η οποία δείχνει την έλικα Α (μπλέ), την έλικα Β (κόκκινο), την έλικα C (μώβ), την έλικα D (πράσινο) και την έλικα E (κίτρινο) (PDB entry 1R03) (Langlois d'Estaintot *et al.*, 2004).

Η αδρανοποίηση του γονιδίου της φερριτίνης Α (FtnA) του *E.coli*, οδήγησε σε δύο φαινότυπους: έναν με μείωση ~50% της περιεκτικότητας σε κυτταρικό σίδηρο στη στάσιμη φάση, ακολουθούμενη από φάση αύξησης κάτω από συνθήκες επάρκειας σιδήρου και έναν δεύτερο με μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Ο φαινότυπος της αύξησης παρατηρήθηκε μόνο όταν προκαλλιεργήθηκαν κλώνοι με επαρκή σίδηρο για να επιτρέψουν στο σίδηρο να συσσωρευθεί από το FtnA. Αυτό δείχνει ότι η λειτουργία του FtnA είναι να συσσωρευθεί ο σίδηρος κατά τη διάρκεια της μετέπειτα φάσης αύξησης παρουσία επάρκειας σιδήρου ως πηγή ενδοκυτταρικού σιδήρου σε αντιδιαστολή με τη φάση υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Κατά συνέπεια, το FtnA εκπληρώνει τον κλασσικό ρόλο αποθήκευσης σιδήρου που προτάθηκε αρχικά για τις φερριτίνες στους ευκαρυωτικούς (Theil *et al.*, 1987).

Φερριτίνες από άλλα βακτήρια (*Campylobacter jejuni*, *H.pylori*) έχουν βρεθεί επίσης να έχουν ρόλο στην ενίσχυση της αύξησης από έλλειψη σιδήρου (Wai *et al.*, 1998) και έτσι θα εμφανίζονταν να ενεργούν επίσης πρώτιστα ως πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου. Εντούτοις, μεταλλάξεις φερριτίνης των *C. Jejuni* και *H.pylori*

ήταν πίο ευαίσθητες στο οξειδωτικό στρες ή στα μέταλλα, γεγονός που δείχνει ότι οι φερριτίνες αποτοξινώνουν, καθώς επίσης και αποθηκεύουν το σίδηρο (Andrews *et al.*, 2003).

Η φερριτίνη των θηλαστικών αποτελείται από *H* και *L* αλυσίδες (βαριές και ελαφρές αλυσίδες αντίστοιχα), οι οποίες κωδικοποιούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Αυτές οι *H* και *L* αλυσίδες αποτελούνται από 182 και 174 αμινοξέα αντίστοιχα και μοιράζονται ομολογία αμινοξέων περίπου 54%. Αυτό το πρωτεϊνικό κέλυφος έχει οκτώ υδρόφιλα κανάλια κατά μήκος των τρίπτυχων αξόνων του, έξι υδρόφοβα κανάλια κατά μήκος των τετράπτυχων αξόνων του, 12 αυλακωμένες δομές στο εσωτερικό του κατά μήκος των διπλών αξόνων του, και μια εσωτερική υποπεριοχή φερροξιδάσης μεταξύ των τεσσάρων ελίκων των υπομονάδων της *H*. Κάθε υπομονάδα *H*-αλυσίδας έχει ένα κέντρο φερροξιδάσης που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα επτά αμινοξέων, ενώ η *L*-αλυσίδα παρέχει τις περιοχές σχηματισμού φύτρων για τη σύνδεση σιδήρου (Chasteen, 1998; Harrison *et al.*, 1998). Το κέντρο της φερροξιδάσης περιέχει περιοχές συνδέσεων με δι-σίδηρο και λέγεται περιοχή Α, η οποία χρησιμοποιεί το άζωτο από ένα κατάλοιπο ιστιδίνης και την καρβοξυλική ομάδα από τα όξινα κατάλοιπα καθώς ο σίδηρος συντονίζεται από τους δεσμευτές, και την περιοχή Β όπου το μέταλλο συντονίζεται μόνο με τη βοήθεια της καρβοξυλικής ομάδας (Treffry *et al.*, 1997) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Η περιοχή σύνδεσης διπύρηνου κέντρου σιδήρου της ανθρώπινης Φερριτίνης (*H* αλυσίδας) περιέχει τα κατάλοιπα Glu27, Tyr34, Glu61, Glu62, His65, Glu107, και Glu141 (adapted from Treffry *et al.*, 1997).

Τα άτομα σιδήρου απέχουν 3 Å το ένα από το άλλο, αλλά συνδέονται από μία οξογέφυρα μιας καρβοξυλικής ομάδας. Τα κατάλοιπα αυτής της περιοχής

συντηρούνται και δρουν ως δεσμευτές των δύο ιόντων Fe^{2+} , το πρώτο στάδιο κατά τη λήψη σιδήρου. Ακολουθεί οξείδωση των δύο ιόντων Fe^{2+} από το O_2 και ο σχηματισμός μιας ενδιάμεσης οξο-γέφυρας δι-σιδήρου. Το Fe^{3+} ιόν έτσι σχηματίζεται και μετακινείται στην κεντρική κοιλότητα όπου, είτε σχηματίζεται ένας πυρήνας σιδήρου-υδρίτη ή ένας άμορφος σιδηρικός-φωσφορικός πυρήνας, αν το φωσφορικό άλας είναι παρόν (όπως *in vivo*) (Mann *et al.*, 1987). Επίσης διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός οξείδωσης του Fe^{2+} ήταν μέγιστος με προσθήκη δύο ατόμων Fe^{2+} /υπομονάδα, και τροποποίηση των δεσμευτών της περιοχής A έχει αποτέλεσμα την αργή σύνδεση σιδήρου και την αργή οξείδωση, ενώ η τροποποίηση του τόπου B δεν αποτρέπει το Fe^{2+} να συνδεθεί στον τόπο A αλλά μειώνει πολύ το ρυθμό οξείδωσης (Treffry *et al.*, 1997). Η λήψη σιδήρου είναι αποδοτικότερη παρουσία *H/L* ετεροπολυμερών στις φερριτίνες των θηλαστικών απ' ό,τι με καθένα ομοπολυμερές. Η *H*-αλυσίδα διευκολύνει το σιδηρικό ιονικό σχηματισμό, και η *L*-αλυσίδα διευκολύνει τη μεταλλοποίηση του σιδηρικού ιόντος στην κοιλότητα. Γενικά, φερριτίνες πλούσιες σε *H* είναι χαρακτηριστικά των ιστών εγκεφάλου και καρδιάς που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο σε σύγκριση με αυτήν των πλούσιων σε *L* φερριτίνες, οι οποίες βρίσκονται σε χαρακτηριστικά όργανα αποθήκευσης σιδήρου όπως το συκώτι και η σπλήνα (Carrondo, 2003).

Η φερριτίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως μια πηγή σιδήρου σε περιπτώσεις έλλειψής του, συμπεριλαμβανομένης της δράσης της ως πηγή σιδήρου για ενζυματικά ενεργές περιοχές, άλλες πρωτεϊνικές προσθετικές ομάδες (δηλ. [Fe-S] σύμπλοκα), και ως μηχανισμός αποτοξίνωσης από τον υπερβολικό ενδοκυτταρικό σίδηρο για να αποτρέψουν την οξειδωτική ζημιά (Suttisansanee, 2006).

A.2.4 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ

Αν και οι βακτηριοφερριτίνες (βΦΤ) είναι πίο κοινές στα βακτήρια και ανακαλύφθηκαν 10 έτη πριν από τις φερριτίνες, ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι λιγότερο σαφής (Andrews *et al.*, 2003). Η βΦΤ έχει απομονωθεί από πολλούς οργανισμούς όπως τους *Desulfovibrio desulfuricans* (Romão *et al.*, 2000b), *Escherichia coli* (Yariv *et al.*, 1981), και *Helicobacter pylori* (Evans *et al.*, 1995). Διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή ριζών υδροξυλίου από *in vitro* οξείδωση του Fe^{3+} ιόντος από H_2O_2 μειώθηκε πολύ όταν η βΦΤ ήταν παρούσα, και αυτή η διαδικασία

δεν οδήγησε στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου όπως εμφανίζεται στην αντίδραση Fenton (Bou-Abdallah *et al.*, 2002).

Αντίθετα από τη φερριτίνη των θηλαστικών ή τη βακτηριακή φερριτίνη (ΦΤ), η βΦΤ περιέχει ένα τμήμα κυτοχρώματος b (ομάδα αίμης) (Yariv *et al.*, 1981). Σε αρχικές μελέτες, υπήρξαν κάποια στοιχεία που έδειχναν ότι η βΦΤ σχηματίζει μια πρωτεϊνική οικογένεια που ήταν ευδιάκριτη από τις φερριτίνες. Σε μια μελέτη της βΦΤ του *Azotobacter chroococcum*, διαπιστώθηκε ότι τα αντισώματα που κατευθύνθηκαν ενάντια στη βΦΤ δεν αντέδρασαν με τις φερριτίνες ανθρώπων και αλόγων, αλλά μερικώς αντέδρασαν με τις φερριτίνες φυτών από σπόρους φακής (φυτοφερριτίνη) (Chen and Crichton, 1982). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν βασισμένα στην έρευνα των ανοσολογικών ιδιοτήτων της βΦΤ των *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Azotobacter vinelandii* όταν συγκρίθηκαν με τις φερριτίνες φυτών και ζώων (Andrews *et al.*, 1991a). Εκτός αυτού, η πρόβλεψη της προκαταρκτικής δομής βασισμένη στην ανάλυση του N-τελικού αμινοξέος που συνδυάστηκε με τη χημική τροποποίηση της βΦΤ του *Escherichia coli* δεν παρουσίασε καμία ομολογία μεταξύ ΦΤ και βΦΤ (Tsugita and Yariv, 1985). Παρά τη χαμηλή ομοιότητα αλληλουχίας τους (~23% ομοιότητα μεταξύ της βΦΤ του *Escherichia coli* και κατάλοιπων αμινοξέων ΦΤ σπλήνας αλόγου) (Εικόνα 6), η πλήρης ακολουθία της βΦΤ του *Escherichia coli*, η συντήρηση των κατάλοιπων του κέντρου φερροξιδάσης και κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα με ακτίνες X δείχνουν την εξελικτική συγγένεια μεταξύ βΦΤ και ΦΤ.

```

H-chain FT      ATGACGACCGCGTTCCOCTCGCAGGTGCGGCCAGAACTACCACCAGGAC-TCGGAGGCCGC
L-chain FT      ATGA-----GCTCCC-----AGATTCTGTCAGAATTAT-TCTACTGAAGTGGAGGCCGC
bFT            ATGA--AAGGTGACT----AAAGTTATA---AATTATCTCAACAAA-CTGTTGG--GA
                ****          * * *          * * *          * * *          * * *
H-chain FT      CATCAACC-GTCAGA-TCAACCTGGAGCTCCACGCCCTCC-TATGTGTACCTGTCC---AT
L-chain FT      CGTCAACC-GCCTGG-TCAACCTGTACCTGCGGGCCCTCC-TACACCTACCTCTCT---CT
bFT            AATGAGCTTGTGCAATCAATCAGTACTTTTC-----TCCATGCCCGAATGTTTAAAAACT
                * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      GTCTTTCTATTTTGTATGCGATGATGTGGCTTTGAAGAACTT-TGCCAAATATTTTCTTC
L-chain FT      GGGCTTCTATTTGACCGCGACGATGTGGCTCTGAGGGCGTATGCCAC-----TTCTTC
bFT            GGGGT-----CTCAAACTCTCAATGA---TGTGGAG----TAT-----C
                * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      ACCAATCTCATG-AGGAGAGG---GAAATGTGTGAGAACT-GATGAAG--CTGCAGAAC
L-chain FT      CGCGAGTTGGCGGAGGAGAAGCGCGAGGGTGGCCGAGCGTCT-CTTGAAG--ATGCCAAAAC
bFT            ATGAATCCATTG-ATGAGATG---AARACGCGCGATCGTTATATTGAGCGCATTCTTTTT
                * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      CAACGAGGTGGCCG-GATCTTCC----TT-CAGGACATCAAGAAACCAGACCAGGATGAC
L-chain FT      CAGCGCGGCGGCCCGCTCT-CT----TC-CAGGACTTGCAGAAGCCGTCGCCAGGATGAA
bFT            CTGGAAGG-----TCTTCCAACTTACAGGAOCTGGCCAACTG-AACA-----
                * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      TGGGAGAATGGGCTGAAGGCAATGGAGTGTGCATT-ACACTTGGAAAAAATGTGAATGA
L-chain FT      TGGGCTACAAACCCAGACGCCATGAAAGCCGCCAT-TGTCTCGAGAGAGCCCTGAACCA
bFT            TTGGTGAAGATGTGA-GGAAATG----CTGGCTTCTGATCTGGCACTTGAGCTGGAT--
                * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      GTCACATTTGGAACCTGCACA---AACTGGCCACTGACAAAAATGACCCCACTTGTGTGA
L-chain FT      GGCCCTTTTGGATCTGCATG---CCCTGGGTTCTGCCAGGCGAGACCCCACTCTGTGTGA
bFT            GCGCGGAA-GAATTTGGGTGAGGCAATGGTTATGCCGATAGCGT-----TCA-TGA
                * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      CTTCCTCGAGACTCATTACCTGAATGAGCAGGTGAAAGC---CATCAAGAATTTGGGTGA
L-chain FT      CTTCTTGGAGAGCCACTTCTAGACGAGGAGGTGAAACT---CATCAAGAAGATGGGCGA
bFT            TTACGTC---AGCCGCG-----ATATGATGATA-GAAATTTTGGCTGATGAAGAAGG----
                * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
H-chain FT      CCACGT-AACCAACCTGGCGAGGATGGG---GGCCCCGAATCTGG-CATGGCAGAGTA
L-chain FT      CCATCT-GACCAACATCCAGAGGCTCGT----TGGCTCCCAAGCTGG-GCTGGGCGAGTA
bFT            CCATATCGACTGGCTGGAAACGGAACTTGTATCTGATTGAGAAAGATGGGCTGCAAAATTA
                ***          * * *          * * *          * * *          * * *
H-chain FT      TCTCTTTGACAAGCACACCCTGGGAGAGTGTGACGAGAGCTAA
L-chain FT      TCTCTTTGAAAGGCTCACTCTC-AA--GC---ACGA---CTAA
bFT            TCTG-----CAAGCACAGA-TCC-----GCGAAGAAGGTTGA
                ***          * * * * *          * * *          * * *

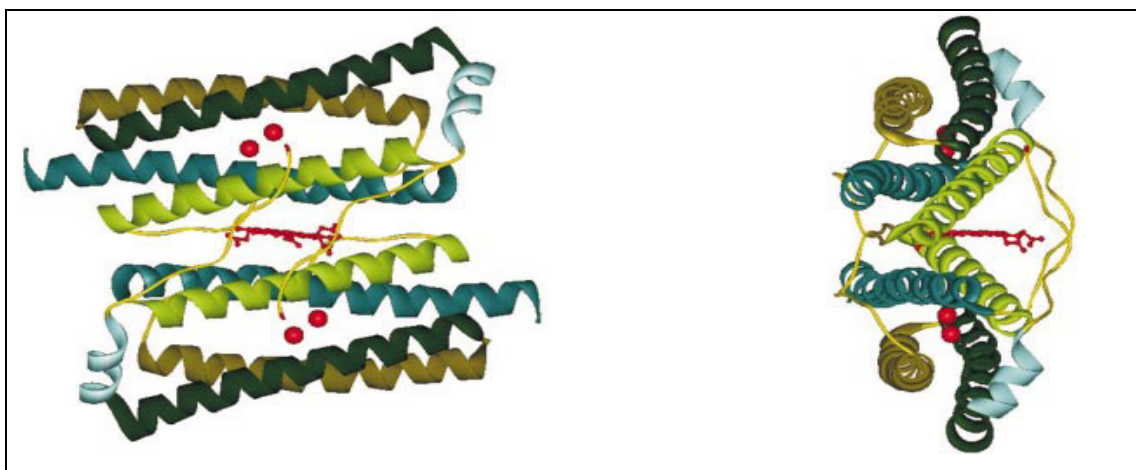
```

Εικόνα 6: Το πολλαπλό alignment της φερριτίνης από σπλήνα αλόγου (H-αλυσίδα) (Orino *et al.*, 2005), φερριτίνη σπλήνας αλόγου (L- αλυσίδα) (Takeda *et al.*, 1993) και *E. coli* βΦΤ (Andrews *et al.*, 1989b) χρήση CLUSTAL FORMAT για T-COFFEE δικτυακό πρόγραμμα (<http://www.tcoffee.org>) (Notredame *et al.*, 2000).

Και οι δύο πρωτεΐνες είναι παρόμοιες σε μοριακό βάρος, σε βάρος υπομονάδων, στη σύνθεση αμινοξέων, στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), στο μέγεθος, και στη μορφή (Andrews *et al.*, 1989b; Andrews *et al.*, 1991b; Lawson *et al.*, 1991; Frolow *et al.*, 1994; Dautant *et al.*, 1998). Η αλληλουχία τους και μελέτες κατασκευής μοντέλων έχουν δείξει ότι ΦΤ και βΦΤ έχουν παρόμοια διαμόρφωση υπομονάδων και τεταρτοταγή δομή (Grossman *et al.*, 1992; Cheesman *et al.*, 1993). Η κρυσταλλογραφία ακτίνας X της βΦΤ έχει μελετηθεί επίσης πρόσφατα για το *Azotobacter vinelandii* (Liu *et al.*, 2004), το *Desulfovibrio desulfuricans* (Macedo *et al.*, 2003), το *Escherichia coli* (Frolow *et al.*, 1994; Dautant *et al.*, 1998), και το

Capsulatus rhodobacter (Cobessi *et al.*, 2002) για να αποκτηθεί περισσότερη γνώση των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της βΦΤ.

Οι 24 υπομονάδες βΦΤ του *Desulfovibrio desulfuricans* συνδέονται από άξονες συμμετρίας 4, 3 και 2 πτυχών (συμμετρία 432-σημείου). Οι υπομονάδες συμπεριφέρονται σαν διμερή, και στις βακτηριοφερριτίνες η αίμη βρίσκεται μεταξύ των δύο υπομονάδων (Carrondo, 2003) (Εικόνα 7).



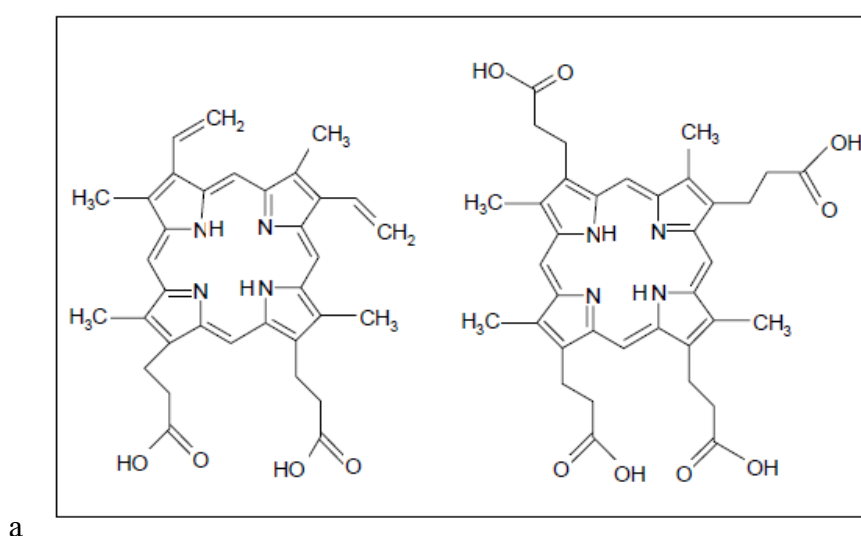
Εικόνα 7: Δύο υπομονάδες από τη βΦΤ του *Desulfovibrio desulfuricans* σχηματίζουν ένα ομοδιμερές. Διακρίνεται η σύνδεση του Fe με την αίμη (κοπροπορφυρίνη III) στη διεπαφή, μεταξύ των δύο πτυχών. Οι κόκκινες σφαίρες αναπαριστούν τα διπύρρηνα κέντρα σιδήρου της φερροξιδάσης σε κάθε ένα από τα μονομερή.

Ενώ η βΦΤ του *E. coli* είναι η πιο συχνά μελετημένη βακτηριοφερριτίνη, η βΦΤ του *A. vinelandii* είχε μελετηθεί προηγουμένως στις δομικές και μαγνητικές ιδιότητες του πυρήνα σιδήρου (Stiefel and Watt, 1979; Mann *et al.*, 1987). Διαπιστώθηκε ότι η βΦΤ του *A. vinelandii* αποτελείται από δύο μη ταυτόσημες υπομονάδες (Harker and Wullstein, 1985) παρόμοιες με τις βΦΤ από το *P. aeruginosa* και το *P. putida* (Moore *et al.*, 1986; al-Massad *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 2000), ενώ οι περισσότερες βΦΤ από άλλα βακτηρια όπως το *E. coli* αποτελούνται από έναν μόνο τύπο υπομονάδας.

A.2.5 ΟΜΑΔΑ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ

Ο μέγιστος αριθμός ομάδων αίμης (αίμη ομάδας IX) που μπορεί να δεσμευτεί σε κάθε οργανισμό ποικίλει. Υπάρχουν κανονικά 12 ομάδες αίμης ανά 24 υπομονάδες στη βΦΤ του *A. vinelandii* (Stiefel and Watt, 1979) και του *E. coli* (Smith *et al.*, 1988; Yariv *et al.*, 1981). Αυτές οι πρωτεΐνες δεν δεσμεύουν πρόσθετη αίμη (Smith *et al.*, 1989). Εντούτοις, έχει επίσης διαπιστωθεί ότι υπάρχουν 5-9 ομάδες αίμης ανά 24

υπομονάδες στο *P. aeruginosa* (Moore *et al.*, 1986) με τη μέγιστη σύνδεση 24 ομάδων αίμης ανά 24 υπομονάδες (Kadir and Moore, 1990). Η διαφορά στη μέγιστη σύνδεση ομάδων αίμης έχει ως αποτέλεσμα τις διαφορετικές πρωτεϊνικές διαμορφώσεις κελύφων. Αυτό μπορεί να προκύψει από την ικανότητα αμέσου αντιδράσεως στο ήμισυ των περιοχών της βΦΤ του *A. vinelandii* που αποτρέπει τη δέσμευση της αίμης στη βΦΤ σε 12 τόπους (Moore *et al.*, 1992a). Βρέθηκε επίσης ότι δεν περιέχουν όλες οι βΦΤ αίμη ομάδας IX (Εικόνα 8). Η βΦΤ στο *D. desulfuricans* περιέχει αίμη ομάδας III (Εικόνα 8) (Romão *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2001).



Εικόνα 8: Οι χημικές δομές της πρωτοπορφυρίνης IX (αριστερά) και κοπροπορφυρίνης III (δεξιά) (Romão *et al.*, 2000a).

Ο σίδηρος της αίμης έχει μειωμένη περιστροφική ικανότητα (*spin*) και χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (3225 MV για το *Azotobacter vinelandii*) (Watt *et al.*, 1986). Ο σκοπός της αίμης είναι αβέβαιος, αλλά είναι πιθανόν ότι η παρουσία της είναι σημαντική στη διάκριση της λειτουργίας των ΦΤ που δεν έχουν αίμη από τις βΦΤ. Παραλλαγές βΦΤ του *E.coli* χωρίς αίμη, λαμβάνουν το σίδηρο *in vitro* σε ποσοστά όμοια με εκείνες του άγριου-τύπου που δείχνει ότι η αίμη δεν απαιτείται για τη λήψη σιδήρου. Εντούτοις, οι χωρίς αίμη παραλλαγές συσσωρεύουν τετραπλάσια ποσότητα σιδήρου *in vivo* από αυτή του άγριου-τύπου που δείχνει ότι η ομάδα της αίμης εμπλέκεται στην απελευθέρωση του σιδήρου από τη ΒΦ με τη διευκόλυνση της μείωσης από τον πυρήνα σιδήρου (Andrews *et al.*, 1995).

Α.2.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ

Σε πολλά είδη, η χρησιμοποίηση μεταλλαγμάτων που δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν πρωτεΐνες όπως οι ΦΤ μας έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για τον ρόλο που παίζουν αυτά τα βιομόρια στα βακτήρια. Τα στοιχεία που αποκτήθηκαν από τη χρήση μεταλλαγμάτων, δείχνουν ότι η επίδραση στο κύτταρο των βακτηριακών φερριτινών δεν είναι σταθερή και διαφέρει στα διάφορα είδη. (Πίνακας 1). Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν πολλαπλές λειτουργίες. Η Dps για παράδειγμα, δεν δεσμεύεται πάντα στο DNA ως προστατευτικό κρυσταλλικό σύμπλοκο. Επιπρόσθετα, η βακτηριακή Φερριτίνη ή βΦΤ δεν προστατεύει πάντα το βακτήριο από το οξειδωτικό στρες, ούτε χρησιμεύει ως πηγή σιδήρου όταν υπάρχει έλλειψή του. Σε μερικές περιπτώσεις, οι ΦΤ προστατεύουν το κύτταρο από υπερφόρτωση σιδήρου (Smith, 2004).

Βακτηριακό Είδος	Βακτηριοφερριτίνη (βΦΤ)	Βακτηριακή Φερριτίνη	Δωδεκαμερής Φερριτίνη (Dps)
<i>Agrobacterium tumifaciens</i>			1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει από H ₂ O ₂
<i>Bacillus anthracis</i>			1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει από περίσσεια Fe
<i>Brucella melitensis</i>	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν προστατεύει από παρακουάτ και H ₂ O ₂ σε ανθρώπινους ξενιστές 3. Προκαλεί μία Th-1 ανοσία σε ανθρώπινους ξενιστές		
<i>Campylobacter jejuni</i>		1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Είναι πηγή Σιδήρου	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν δεσμεύεται στο DNA

		3. Προστατεύει από παρακουάτ και H_2O_2	3. Προστατεύει από H_2O_2
<i>Escherichia coli</i>	1. Δεσμεύει το Σίδηρο	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Είναι πηγή Σιδήρου 3. Δεν προστατεύει από οξειδωτικό στρές	1. Δεσμεύει Σίδηρο 2. Δεσμεύεται στο DNA 3. Προστασία από H_2O_2 4. Προστατεύει το DNA από σπασίματα προκαλούμενα από H_2O_2 : Fe^{2+}
<i>Helicobacter pylori</i>		1. Δεσμεύει το Fe 2. Προστατεύει από περίσσεια Fe^{2+} , Cu^{2+} και Mn^{2+} 3. Δεν είναι πηγή Σιδήρου 4. Δεν προστατεύει από το παρακουάτ 5. Απαραίτητο για την αποίκιση γαστρικής mucosa	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεσμεύεται στο DNA 3. Ενεργοποιεί neutrophils and monocytes 4. Προστατεύει από τοξικότητα Οξυγόνου 5. Προστατεύει από H_2O_2 ή παρακουάτ (υπό αμφισβήτηση)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>			1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει το DNA από H_2O_2 : Fe^{2+} Και την DNάσηI από σπασίματα
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Είναι πηγή Σιδήρου 3. Προστατεύει από το H_2O_2 και το παρακουάτ	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Είναι πηγή Σιδήρου 3. Δεν προστατεύει από H_2O_2 ή cumene hydroperoxide	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει από H_2O_2 4. Δεν φαίνεται να προστατεύει το DNA

			από αναστολείς του 5. Δεν είναι πηγή Σιδήρου 6. Απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων σε ιστούς tissue culture cells
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Προστατεύει από H ₂ O ₂ 3. Απαραίτητη για την μέγιστη ενεργότητα της καταλάσης-A		
<i>Pseudomonas putida</i>	1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν είναι πηγή Σιδήρου 3. Όχι απαραίτητη για την ενεργότητα της καταλάσης-A 4. Όχι απαραίτητη για την αποικιοποίηση φυτικών ριζών		
<i>Streptococcus mutans</i>			1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει από O ₂ και H ₂ O ₂
<i>Streptococcus suis</i>			1. Δεσμεύει το Σίδηρο 2. Δεν δεσμεύεται στο DNA 3. Προστατεύει από H ₂ O ₂

Πίνακας 1: Αποτελέσματα φερριτινών σε βακτήρια (Smith, 2004).

A.3. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ, ΠΕΡΟΧΗ ΣΥΝΔΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ

A.3.1 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ

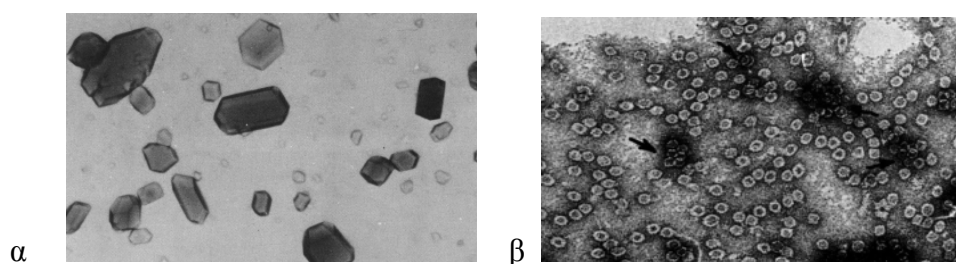
Η βακτηριοφερριτίνη απομονώθηκε αρχικά από ολόκληρα κύτταρα *E. coli* βάση του οπτικού φάσματος τους και ονομάστηκε κυτόχρωμα b₁ (Keilin, 1934; Keilin and Harpley, 1941). Αργότερα αυτό το κυτόχρωμα b₁ απομονώθηκε ως καθαρή πρωτεΐνη και βρέθηκε να έχει παρόμοιες οπτικές ιδιότητες με το κυτόχρωμα b₅₅₇ βασισμένο στις τρεις οπτικές ζώνες του για την ομάδα της αίμης (Deeb and Hager, 1964). Επίσης διαπιστώθηκε ότι το pI αυτής της πρωτεΐνης είναι 4.6 (Bartsch *et al.*, 1971). Το 1973, η πρωτεΐνη που απομονώθηκε από το *A. vinelandii* είχε βρεθεί ότι ήταν μια πρωτεΐνη σαν τη φερριτίνη, αλλά περιείχε αίμη, και έτσι ταξινομήθηκε ως αιμοπρωτεΐνη (Bulen *et al.*, 1973). Αργότερα, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι αυτή η αιμοπρωτεΐνη και το κυτόχρωμα b₅₅₇ έμοιαζαν με τη ΦΤ στην τεταρτοταγή δομή. (Stiefel και Watt, 1979). Διαπιστώθηκε ότι η ΦΤ του *E.coli* όπως η αιμοπρωτεΐνη είχε τα μέγιστα απορρόφησης στα 417, 530, και 560 nm (Soret, β-, και α- μπάντες αντίστοιχα), συντελούμενα από την πρωτοαίμη IX που δεν ήταν παρόν στις ΦΤ (Yariv *et al.*, 1981). Από αυτήν την ανακάλυψη, οι ΦΤ των βακτηρίων όπως και οι αιμοπρωτεΐνες τους, κλήθηκαν βακτηριοφερριτίνες για να διακριθούν από τις ΦΤ (Yariv *et al.*, 1981; Chen and Crichton, 1982). Η πλήρης ακολουθία του *E.coli* - K12 βΦΤ (Εικόνα 9) προήλθε από την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κλωνοποιημένου γονιδίου, το οποίο αποτελείται από 158 κατάλοιπα αμινοξέων με μια υπομονάδα (MW) 18.495 Da (Andrews *et al.*, 1989b).

1	mkgdtkviny lnkllgnelv ainqyflhar mfkngwglktrl ndveyhesid emkhadryie
61	rifleglprn lqdlgknig edveemlrsl laleldgagn lreaigyads vhdvysrdmm
121	ieilrdeegh idwleteldl iqkmglqnyl qaqireeg

Εικόνα 9: Αλληλουχία αμινοξέων της βΦΤ του *E. coli* (Andrews *et al.*, 1989b).

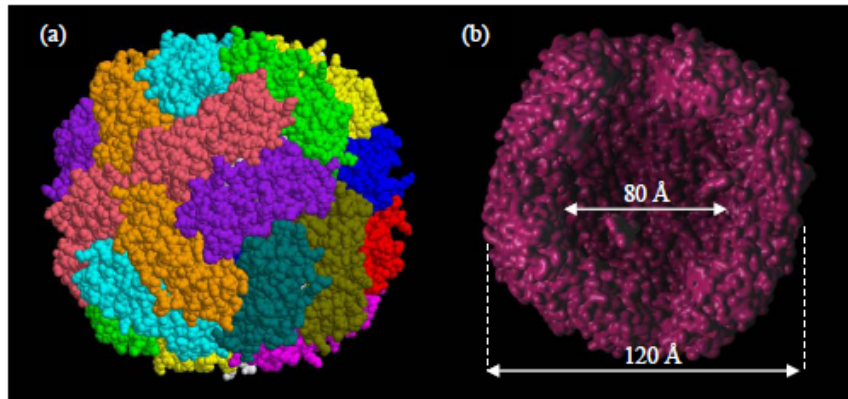
A.3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ *E. coli* ΚΑΙ ΤΟΥ *A. vinelandii*

Προτού καθοριστεί η δομή με ακτίνες X της βΦΤ, υπήρξαν διάφορες μελέτες πρόβλεψης της δομής της. Αρχικά το 1981, ένας κρύσταλλος της βΦΤ του *E. coli* (Εικ. 10α) και οι φωτογραφίες μετάπτωσης με ακτίνες X πρότειναν μια συμμετρία 432 σημείου-ομάδας και το σχηματισμό 24 ίδιων υπομονάδων (Yariv *et al.*, 1981). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσίασε έναν εσωτερικό πυρήνα διαμέτρου 6 nm και ένα εξωτερικό κέλυφος διαμέτρου 9.5 nm (Εικ. 10β) (Yariv *et al.*, 1981).



Εικόνα 10: Απλοί κρύσταλλοι (α) και η ηλεκτρονική μικρογραφία της βΦΤ του *E. coli* (β) (από Yariv *et al.*, 1981). Το βέλος δείχνει το πακετάρισμα των τμημάτων.

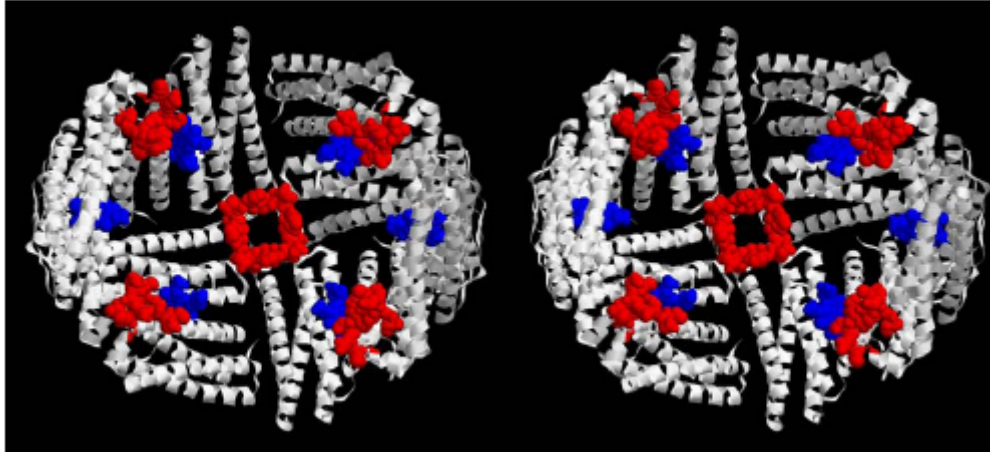
Η αρχική δομή που καθορίστηκε από την ανάλυση αμινοξέων συνδυαζόμενη με τη χημική τροποποίηση και μερική ανάλυση αλληλουχίας, πρότειναν ότι ο σχηματισμός 24 υπομονάδων ήταν από ένα είδος πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Tsugita and Yariv, 1985). Μετά από τον προσδιορισμό της πλήρους αλληλουχίας των αμινοξέων, η δευτεροταγής δομή της προβλέφθηκε να κατέχει ένα υψηλό α-ελικοειδές περιεχόμενο σύμφωνα με μια διαμόρφωση 4 ελίκων-δεσμών (Εικ. 11α), και ένα τετρακοσαμερές βΦΤ που περιείχε 12 ομάδες αίμης (Andrews *et al.*, 1989a). Όταν επιτεύχθηκε υψηλότερη κρυσταλλογραφική ανάλυση (Frolow *et al.*, 1994; Dautant *et al.*, 1998), διαπιστώθηκε ότι η βΦΤ ήταν ένα ελαφρώς παραμορφωμένο σφαιρικό κέλυφος με μία εσωτερική κοιλότητα διαμέτρου $\sim 80 \text{ \AA}$ (8 nm) και μια εξωτερική 120 \AA (12 nm) (Εικόνα 11β).



Εικόνα 11: Η δομή της βΦΤ του *E. coli* (α) όπου κάθε χρώμα αναπαριστά μία υπομονάδα και (β) η μισή δομή που δείχνει το μέγεθος της εσωτερικής και εξωτερικής κοιλότητας (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

Η βΦΤ του *A. vinelandii* (AvBF) είναι ένα επίσης 24-μερές σφαιρικό κοχύλι με συμμετρία 432. Η εξωτερική του διάμετρος είναι 125 Å και η εσωτερική 72 Å (Liu *et al.*, 2004).

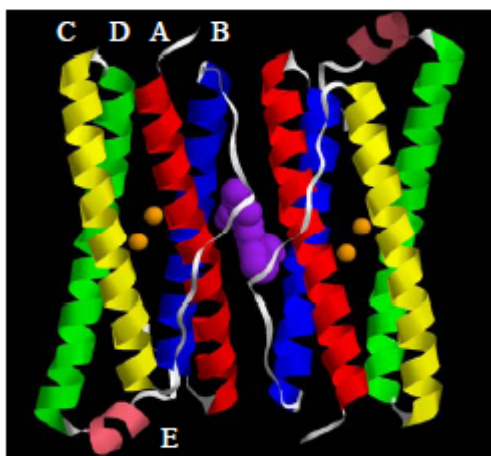
Όταν η βΦΤ διαμορφώνει μια δομή κλωβού, το C-τελικό κάθε υπομονάδας δείχνει προς τον πυρήνα, ενώ το N-τελικό δείχνει εξωτερικά (Εικ. 12).



Εικόνα 12: Στερεοοπτική άποψη της 12μερούς υπομονάδας της βΦΤ του *E. coli* αναπαριστά τα μέρη σύνδεσης της αίμης (μπλέ) και το C-τελικό άκρο (κόκκινο) που κοιτάζουν εσωτερικά προς την κοιλότητα. Η άθικτη βΦΤ είναι μια 24μερής υπομονάδα η οποία σχηματίζει μία ολοκληρωμένη σφαιρική δομή (PDB είσοδος 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

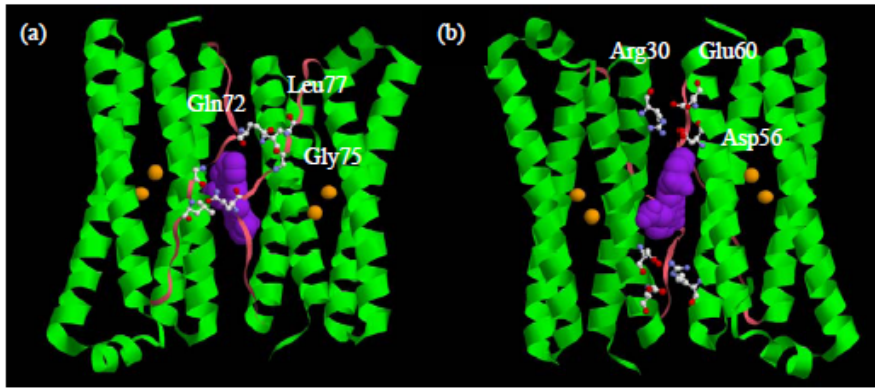
Το μονομερές της βΦΤ του *E.coli* περιέχει A (Thr5-Trp35), B (Lys38-Phe64), C (Val83-Val111), D (Tyr114-Met144) έλικες, οι οποίες διαμορφώνουν τη συνηθισμένη

αριστερόχειρη τετράγωνη δέσμη, και μια έλικα E (Leu146-Gln151) στο C-τελικό που βρίσκεται σχεδόν κάθετα (78°) στον άξονα δεσμών (Εικ. 13).



Εικόνα 13: Δύο γειτονικές υπομονάδες βΦΤ του *E. coli* δείχνοντας το σημείο σύνδεσης της αίμης και το κέντρο φερροξιδάσης, όπου η αίμη είναι βαμμένη μώβ και δύο άτομα σιδήρου είναι πορτοκαλί. Οι έλικες σε κάθε υπομονάδα είναι χρωματισμένες A (κόκκινες), B (μπλέ), C (κίτρινες), D (πράσινες), και E (ρόζ) (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

Κάθε αίμη είναι συνδεδεμένη σε μια θέση που σχηματίζεται στη διεπαφή μεταξύ ενός ζευγαριού συμμετρικών υπομονάδων, ενώ οι περιοχές συνδέσεων του δι-μετάλλου βρίσκονται μέσα στο μονομερές. Οι έλικες AB είναι αντιπαράλληλες στις έλικες CD με βρόχους L (Leu65-Asp82) που συνδέουν τις έλικες B και C. Η σύνδεση μεταξύ του βρόχου L και της έλικας C υιοθετεί μια τυχαία διαμόρφωση σπειρών. Η έλικα E παρέχει σταθερές αλληλεπιδράσεις στους τετραπλούς άξονες συμμετρίας. Δύο υπομονάδες σταθεροποιούνται από τέσσερις δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ατόμων O και N του αμιδίου Gln72 στο ένα μονομερές και N (Leu77) και O (Gly75) του άλλου παράλληλου μονομερούς, αντίστοιχα (Εικόνα 14α). Η εσωτερική επιφάνεια έχει μια αλατούχο γέφυρα μεταξύ των Arg30 και Asp56, και Glu60, αν και το Glu60 δεν συντηρείται σε όλες τις βΦΤ (Εικόνα 14β).



Εικόνα 14: Δύο γειτονικές υπομονάδες βΦΤ του *E. coli* (πράσινες) αναπαριστώντας τα κατάλοιπα (CPK ball and stick display) που εμπλέκονται στην εσωτερική σταθερότητα δύο υπομονάδων της βΦΤ του *E. coli* στην (α) εξωτερική επιφάνεια και (β) στην εσωτερική επιφάνεια (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994). Ο L βρόγχος είναι χρωματισμένος ρόζ, η αίμη μώβ και τα δύο άτομα σιδήρου πορτοκαλί.

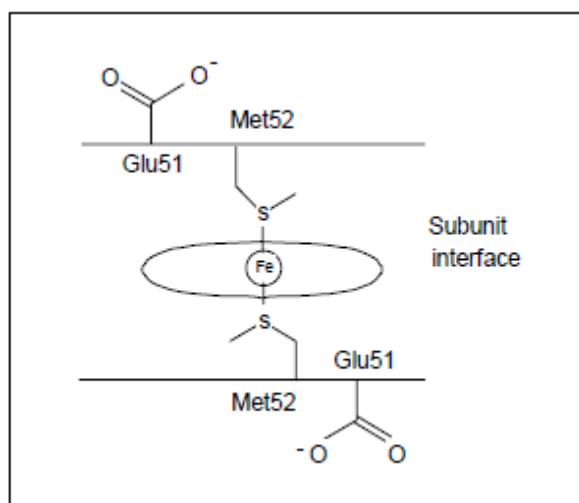
Πρόσθετη σταθερότητα στη διεπαφή των υπομονάδων επιτυγχάνεται με δύο αλατογέφυρες που σχηματίζονται από τα Glu128 και Glu135 με Arg61 και την N-τελική αμίνη της κάθετης υπομονάδας, αντίστοιχα (Εικόνα 15). Το αμινοξύ Glu128 σχηματίζει επίσης μία γέφυρα άλατος με το Arg102 της ίδιας υπομονάδας συνδέοντας τις έλικες C και D (Εικόνα 15). Ενώ, η αλληλεπίδραση μεταξύ των διεπαφών των υπομονάδων είναι υδρόφοβη, η εσωτερική επιφάνεια της σφαίρας είναι υδρόφιλη από τα κατάλοιπα των ελίκων B και D (Frolow *et al.*, 1994).



Εικ. 15: Τέσσερις υπομονάδες βΦΤ του *E. coli* δείχνοντας τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην σταθερότητα της διεπαφής (CPK ball and stick display), τα οποία είναι Arg61, Arg102, Glu128, και Glu135 (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

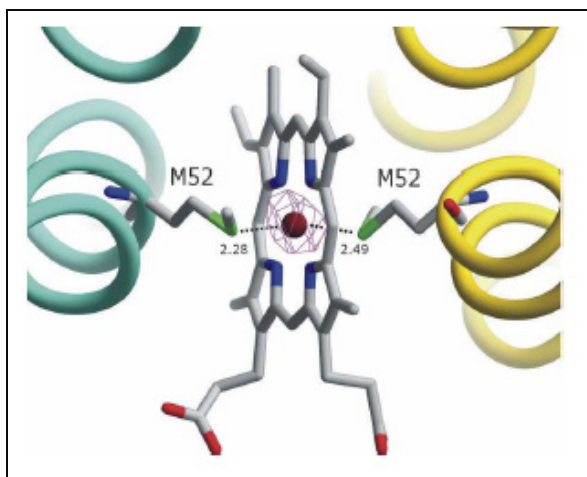
A.3.3 ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΝΔΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ

Η απορρόφηση της ομάδας της αίμης παρατηρήθηκε αρχικά όταν μελετήθηκε η απομονωμένη αιμοπρωτεΐνη από το *A. vinelandii* (Bulen *et al.*, 1973). Η αίμη βρέθηκε να δεσμεύεται ουσιαστικά (Stiefel and Watt, 1979). Η περιοχή που δεσμεύεται η αίμη είναι στη διεπαφή μεταξύ των δύο υπομονάδων κοντά στην επιφάνειά τους με τους δεσμευτές *Met52* και *Met52'* από τους δύο σχετικούς γείτονες (1 αίμη ανά 2 υπομονάδες). Μόλις επιτεύχθηκε η δομή με ακτίνες X της βΦΤ του *E. coli* (Frolow *et al.*, 1994; Dautant *et al.*, 1998), έδειξε ότι η περιοχή αυτή ήταν όντως η σωστή περιοχή σύνδεσης της αίμης (Εικόνα 16). Αυτή η περιοχή έχει κατά προσέγγιση συμμετρία με δύο πτυχές με τα σχετικά δι-μεταλλικά κέντρα. Ο σίδηρος της πρωτοπορφυρίνης IX έχει δύο άξονες δεσμεύσεως με το S σε απόσταση 2.35 Å και 4 δεσμευτές άζωτου σε απόσταση 1.97 Å. Οι αποστάσεις μεταξύ του ατόμου Fe της αίμης και των 2 ατόμων μετάλλου που δεν ανήκουν στην αίμη είναι 14.5 και 12.8 Å.



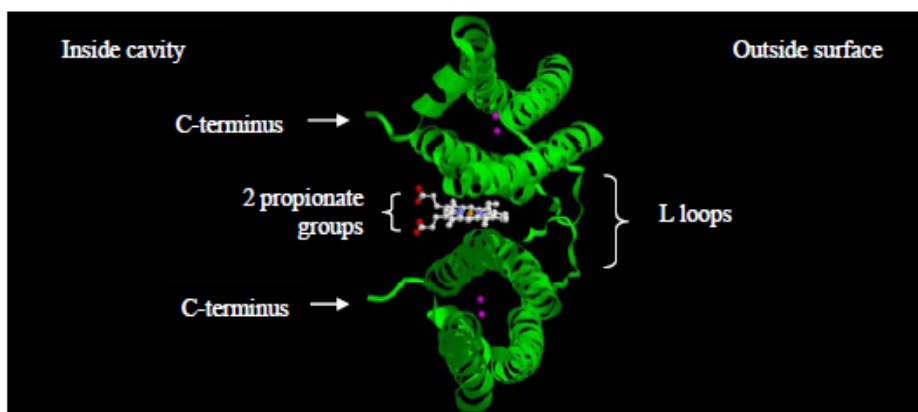
Εικόνα 16: Αναπαράσταση της σύνδεσης της αίμης στη βΦΤ, η οποία βρίσκεται μεταξύ δύο γειτονικών υπομονάδων δείχνοντας την διεπαφή των *Met52* και *Met52'* με το άτομο σιδήρου της αίμης. Τα δύο *Met* κατάλοιπα είναι κοντά στο *Glu51* κατάλοιπο του κέντρου φερροξιδάσης (adapted from Keech *et al.*, 1997).

Στο *Mycobacterium smegmatis*, ο σίδηρος της αίμης είναι αξονικά συντεταγμένος και από τις δύο πλευρές από το άτομο του S της *Met52* από δύο γειτονικά μονομερή, με απόσταση Fe-S από 2.30 έως 2.50 Å (Εικόνα 17) (Janowski *et al.*, 2008).



Εικόνα 17: Η αίμη βρίσκεται μεταξύ των αλυσίδων (κυανής και κίτρινης). Οι πρωτεΐνες των αλυσίδων εμφανίζονται σαν σωλήνες και τα κατάλοιπα Met52 σαν μαστούνια. Η διαφορετική πυκνότητα ηλεκτρονίων τοποθετεί το άτομο σιδήρου στο κέντρο της αίμης. Η εικόνα προετοιμάστηκε CueMol (<http://cuemol.sourceforge.jp/en/index.php>).

Η υδρόφοβη περιοχή, που εσωκλείει την αίμη, σχηματίζει ένα οδοντωτό άνοιγμα από την επιφάνεια της εσωτερικής κοιλότητας και σύρεται κατά μήκος της υδρόφοβης διεπαφής μεταξύ των δύο υπομονάδων. Το μόριο της αίμης είναι προσιτό μόνο από το εσωτερικό του πρωτεϊνικού κελύφους, όπου δύο προπιονικές ομάδες της προεξέχουν στην υδρόφιλη εσωτερική κοιλότητα, και προστατεύεται από το εξωτερικό υδάτινο μέσο από τους δύο συμμετρικούς βρόχους *L* (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Δύο γειτονικές υπομονάδες βΦΤ του *E. coli* (πράσινες) δείχνοντας τις δύο προπιονικές ομάδες της αίμης (CPK ball and stick display) στη διεπαφή, δύο άτομα Fe (μωβ) στο κέντρο φερροξιδάσης, *L* βρόγχοι που προστατεύουν την αίμη από το υδάτινο μέσο και το C-τελικό προς το εσωτερικό της πρωτεϊνικής κοιλότητας. (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

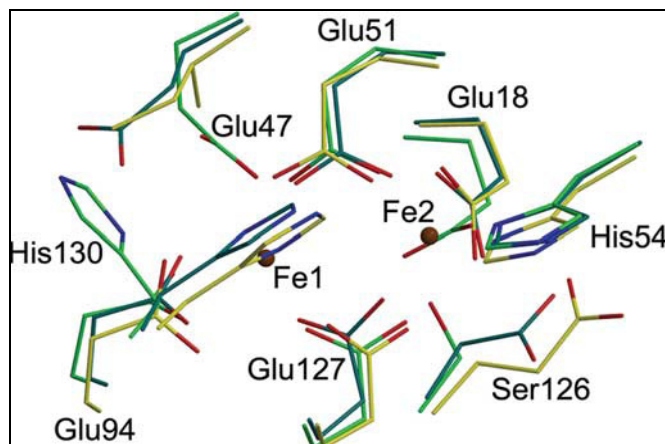
Η δέσμευση της αίμης επιτρέπει επίσης κάποια συντήρηση της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής, η οποία εξηγεί την περιοριστική στοιχειομετρία μιάς αίμης ανά 2 υπομονάδες (Grossman *et al.*, 1992).

Η παρουσία του πυρήνα σιδήρου έχει αποδειχθεί να μην έχει καμία ανιχνεύσιμη επίδραση στα ηλεκτρικά πεδία κατά την τοποθέτηση της ομάδας της αίμης (Cheesman *et al.*, 1992). Παραλλαγές βΦΤ χωρίς αίμη από το *E. coli* λαμβάνουν το σίδηρο *in vitro* σε ποσοστά όμοια με εκείνα της άγριου-τύπου πρωτεΐνης δείχνοντας ότι η αίμη δεν απαιτείται για τη λήψη σιδήρου (Andrews *et al.*, 1995; Dautant *et al.*, 1998). Αυτό είναι λογικό επειδή ο σίδηρος της αίμης δεν υποβάλλεται στην οξειδοαναγωγική ανακύκλωση όταν Fe^{2+} και O_2 είναι τα υποστρώματα για τη φόρτωση σιδήρου της βΦΤ. Εντούτοις, μελέτες βασισμένες στη μεταλλαξιγένεση στη δεσμευτική περιοχή της αίμης (Andrews *et al.*, 1995) και στη μελέτη της που δεσμεύεται στη ΦΤ σπλήνας αλόγου (Kadir *et al.*, 1992), έχουν δείξει ότι το ποσό σιδήρου που ενσωματώνεται στη βΦΤ χωρίς αίμη *in vivo* είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερο από αυτή του άγριου-τύπου βΦΤ, ο οποίος δείχνει ότι η ομάδα της αίμης συμμετέχει στη μεσολάβηση της απελευθέρωσης του σιδήρου από τη βΦΤ με τη διευκόλυνση της μείωσης του πυρήνα σιδήρου. Επιπλέον, διαπιστώνεται επίσης ότι η σύνδεση της αίμης δεν οδηγεί στο διαχωρισμό των 24 υπομονάδων στη βΦΤ (Kadir *et al.*, 1992).

A.3.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΣΙΔΗΡΟΥ

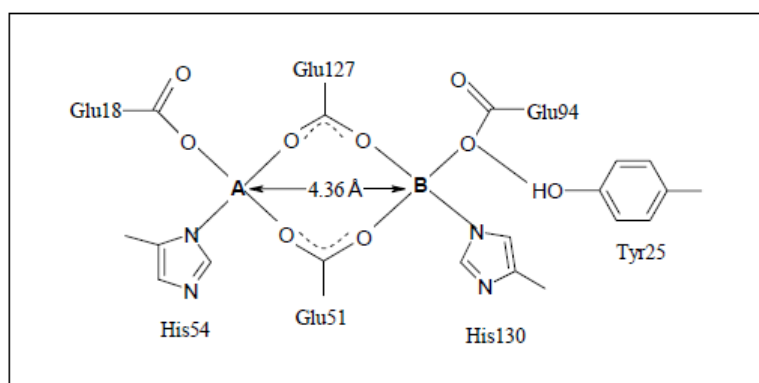
Μελέτες του πυρήνα σιδήρου στη βΦΤ έχουν αναλυθεί με τη σπεκτροσκοπία *Mössbauer* (Matzanke *et al.*, 1989) σε συνδυασμό με σπεκτροσκοπίες *e.p.r.* και *m.c.d.* (Cheesman *et al.*, 1992) οι οποίες έχουν δείξει μερικές εικόνες από το σχηματισμό του πυρήνα. Αυτός ο σχηματισμός διαφέρει από τον σχηματισμό του πυρήνα σιδήρου της ΦΤ. Η ανάλυση αλληλουχίας (Grossman *et al.*, 1992), το μοριακό μοντέλο (Cheesman *et al.*, 1993), η μετάλλαξη θέσης (Le Brun *et al.*, 1995), και προβλέψεις του διπύρηνου καρβοξυλίου της πρωτεΐνης βασισμένα σε δομές και ακολουθίες συναφών πρωτεϊνών (Nordlund and Eklund, 1995), έχουν δείξει δύο κύριες περιοχές σύνδεσης και έχουν αναγνωριστεί πολλά κατάλοιπα σύνδεσης σιδήρου. Τα κατάλοιπα των συντηρημένων αμινοξέων κλειδιών στα κέντρα φερροξιδάσης της ΦΤ συγκρινόμενα με αυτά της βΦΤ δείχνουν ότι η βΦΤ έχει ένα κέντρο φερροξιδάσης παρόμοιο με αυτό της Η αλυσίδας των ΦΤ (Andrews *et al.*, 1991b; Grossman *et al.*, 1992). Κάθε υπομονάδα βΦΤ περιέχει μια διπύρηνη περιοχή σιδήρου που θεωρείται επίσης ως το καταλυτικό κέντρο, αρμόδιο για την κατάλυση της οξείδωσης του Fe^{2+}

από το O₂. Αυτή η καταλυτική δραστηριότητα αναφέρεται γενικά ως δραστηριότητα φερροξειδάσης (Εικόνα 19) (Liu *et al.*, 2004).



Εικόνα19: Κατάλοιπα γύρω από το διπύρρηνο κέντρο σιδήρου (καφέ τελείες) από τις βFT των Av (πράσινα), Ec (μπλε), Dd (κίτρινα).

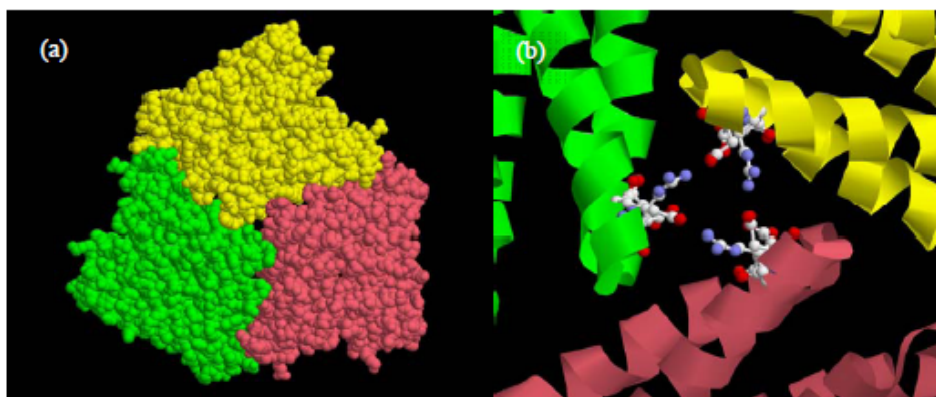
Μελέτες μετάλλαξης θέσεων (Keech *et al.*, 1997) και κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Frolova *et al.*, 1994; Dautant *et al.*, 1998) έχουν δείξει ότι τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη διαμόρφωση του διπύρρηνου κέντρου σιδήρου είναι κατάλοιπα των Glu18, Glu51, His54, Glu94, Glu127 και His130, τα οποία αντιδρούν με δύο άτομα Fe (όχι της αίμης) που απέχουν 4.36 Å (Εικ.20).



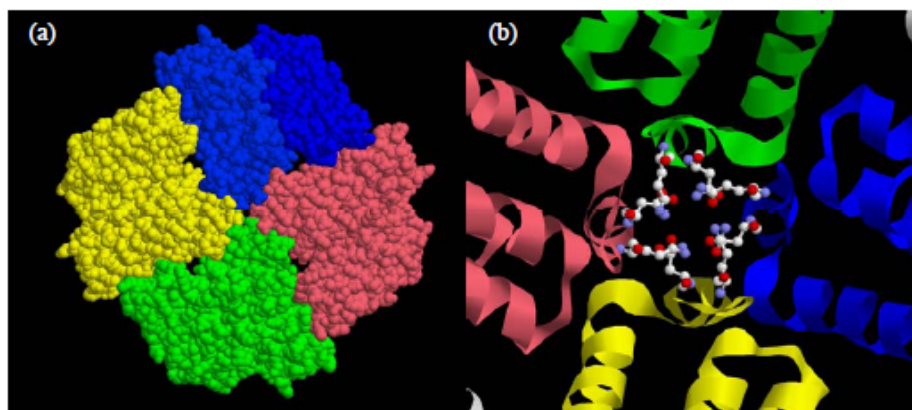
Εικόνα 20: Οι δεσμευτές στο κέντρο φερροξειδάσης της βΦΤ του *E. coli* βρίσκονται στις έλικες A-D: έλικα A, Glu18; έλικα B, Glu51 και His54; έλικα C, Glu94; και έλικα D, Glu127 και His130 (adapted from Stillman *et al.*, 2003). Τα A και B είναι δύο άτομα σιδήρου.

Κάθε μεταλικό ιόν συγκρατείται από τα καρβοξύλια των Glu και His συνδέσεων. Αυτά τα δύο άτομα σιδήρου συνδέονται από γέφυρα δύο καρβοξυλικών ομάδων. Η Tyr25 συντηρείται στις βΦΤ και τις ΦΤ των ευκαρυωτικών, όπου το άτομο O του υδροξυλίου κοιτά προς το μεταλικό κέντρο (απόσταση 3.6 Å) και το άτομο του H

εμφανίζεται να σταθεροποιεί το καρβοξυλικό οξυγόνο του Glu94. Εφόσον η τυροσίνη επιτρέπει την υπεροξείδωση του συμπλόκου, αυτό το κατάλοιπο τυροσίνης προστατεύει την ενεργή περιοχή από μόνιμη οξειδωτική ζημιά. Τα κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο και έξοδο του Fe^{2+} στην βΦΤ περιλαμβάνουν 3 πτυχές (Εικόνα 21), 4 πτυχές (Εικόνα 22), και κύρια κανάλια.



Εικόνα 21: (α) Έξι υπομονάδες της βΦΤ του *E. coli* σχηματίζουν ένα κανάλι 3 πτυχών και (β) ζούμ στα κατάλοιπα που σχηματίζουν το κανάλι (CPK ball and stick display) (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).



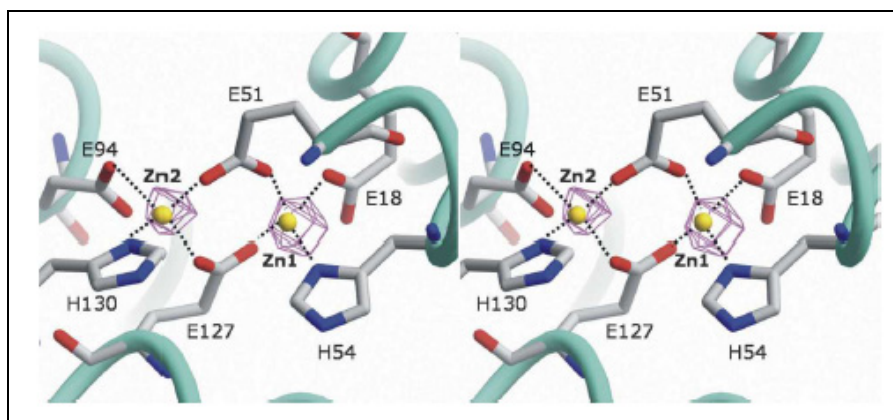
Εικόνα 22: (α) Οκτώ υπομονάδες της βΦΤ του *E. coli* σχηματίζουν ένα κανάλι 4 πτυχών CPK ball and stick display) και (β) ζούμ στα κατάλοιπα που το σχηματίζουν (PDB entry 1BCF) (Frolow *et al.*, 1994).

Οκτώ υπομονάδες της βΦΤ σχηματίζουν κανάλια 4 πτυχών, ενώ 6 υπομονάδες σχηματίζουν κανάλια 3 πτυχών. Όλες αυτές οι υπομονάδες είναι υδρόφιλες και συνδέουν το εσωτερικό του πυρήνα με το περιβάλλον της πρωτεΐνης. Τα κανάλια 3 πτυχών είναι σε γραμμή με τα κατάλοιπα Asp109, Arg117 και Asp118, ενώ τα κανάλια 4 πτυχών που είναι ακόμα πιο υδρόφιλα, συνδέονται με 4 κατάλοιπα Asn148

στην εξωτερική επιφάνεια του πρωτεϊνικού κελύφους και 4 κατάλοιπα Gln151 συνδέονται σε ένα βαρύ άτομο στην εσωτερική επιφάνεια. Η περιοχή σύνδεσης του μετάλλου βρίσκεται στον άξονα 4 πτυχών, ενώ οι κύριες περιοχές μεταφοράς σιδήρου μέσα στην κοιλότητα είναι τα κανάλια 3 πτυχών. Εφόσον η βΦΤ και η Η αλυσίδα της ΦΤ είναι παρόμοιες, προτάθηκε ότι τα κανάλια 3 πτυχών είναι οι κύριες περιοχές που χρησιμοποιούνται από τον Fe^{+2} για να εισέλθει και να κινηθεί στις διπύρηνες περιοχές (Levi *et al.*, 1996). Η οξειδωση του σιδήρου στις διπύρηνες περιοχές παράγει Fe^{+3} , ο οποίος επιστρέφει μέσω των καναλιών 3 πτυχών μέσα στην κοιλότητα για το σχηματισμό του πυρήνα μετάλλου (Treffry *et al.*, 1993). Το διπύρηνο κέντρο είναι στη βάση του σιδηρικού πόρου (πόρος φερροξιδάσης), ο οποίος είναι περίπου κυκλικός με ελλειπτική βάση. Η είσοδος και οι διαστάσεις του πόρου επιτρέπουν σε άτομα Fe και νερού να εισέλθουν και εξέλθουν ελεύθερα. Άτομα σιδήρου εισέρχονται και σχηματίζουν το διπύρηνο κέντρο. Με ηλεκτροστατικούς υπολογισμούς, έχει υπολογιστεί ότι η εξωτερική είσοδος είναι περικυκλωμένη από θετικό φορτίο που οδηγεί σε ηλεκτρικό πεδίο που οδηγεί τα κατιόντα στην είσοδο του καναλιού (Carrondo, 2003). Είναι πιθανό άτομα Fe να αφήσουν το διπύρηνο κέντρο για το διάλυμα μέσω του πόρου, αλλά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι επίσης πιθανό αυτά τα άτομα να μετακινηθούν προς τον εσωτερικό πυρήνα με συντονισμένη κίνηση των υδρόφιλων κατάλοιπων που βρίσκονται κάτω από τη θέση του σιδήρου (Carrondo 2003). Το κύριο κανάλι, το οποίο διαφέρει από τα κανάλια 3 και 4 πτυχών, επεκτείνεται στο εσωτερικό του πρωτεϊνικού κοχυλιού και είναι αρκετά μεγάλο για την είσοδο του Fe στον πρωτεϊνικό πυρήνα. Αν και οι δεσμευτές εμφανίζονται να είναι ισοδύναμοι για τα δύο άτομα Fe^{2+} , οι περιοχές συνδέσεων έχουν μη συμμετρικά περιβάλλοντα και εκθέτουν συνεπώς τις άνισες δεσμευτικές συγγένειες για τα μεταλλικά ιόντα.

Η περιοχή φερροξιδάσης είναι ικανή να δεσμεύει μέταλλα εκτός από το σίδηρο συμπεριλαμβανομένου του ψευδάργυρου, του κοβαλτίου, του μαγγάνιου και του ουράνιου. Ο ψευδάργυρος είναι ένας γνωστός ανασταλτικός παράγοντας οξειδωσης του σιδήρου και θεωρείται ότι το κάνει με τη δέσμευση του στη διπύρηνη περιοχή σιδήρου (LE Brun *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000; Baaghil *et al.*, 2003). Πολλές κρυσταλικές δομές των βΦΤ από διαφορετικά βακτηριακά είδη έχουν ληφθεί με ιόντα μετάλλων άλλα από το σίδηρο που δεσμεύονται στη διπύρηνη περιοχή σιδήρου. Το κατάλοιπο His130, ένας δεσμευτής της διπύρηνης περιοχής, έχει παρατηρηθεί να

εκθέτει εναλλακτικές διαμορφώσεις που μπορεί να είναι σχετικές με το μηχανισμό οξειδωσης του σιδήρου (Liu *et al.*, 2004; Swartz *et al.*, 2006). Στο *Mycobacterium smegmatis* τα δύο άτομα μετάλλου που είναι συνδεδεμένα στη βΦΤ είναι Zn και όχι Fe. (Εικόνα 23) (Janowski *et al.*, 2008).



Εικόνα23:Το διμεταλλικό κέντρο βΦΤ του *M. Stegmatitis*. Η αλυσίδα πρωτεΐνης είναι κυανή. Τα άτομα Zn είναι κίτρινα και τα κατάλοιπα μαστούνια χρωματισμένα ανάλογα με τα κατάλοιπα. The figure was prepared in CueMol (<http://cuemol.sourceforge.jp/en/index.php>).

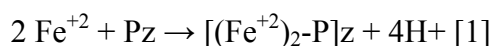
Στις διάφορες δομές της βΦΤ διαφέρει η απόσταση των δύο μετάλλων. Στο *A. vinelandii*, τα άτομα Fe απέχουν 3.5 Å στην οξειδωμένη πρωτεΐνη, ενώ απέχουν 4.0 Å στην μη οξειδωμένη. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η περιοχή του δεύτερου Zn είναι πιο αδύνατη από την πρώτη. Αυτό δείχνει ότι η δεύτερη περιοχή δεν καταλαμβάνεται πλήρως από τον Zn. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε άλλες βΦΤ που περιέχουν Fe (Liu *et al.*, 2004; Van Eerde *et al.*, 2006; Swartz *et al.*, 2006).

Ο σχηματισμός του πυρήνα σιδήρου εξαρτάται από την συγκέντρωση Fe^{+2} , το pH και το ποσό του Fe που είναι ήδη παρόν στον πυρήνα (Baaghil *et al.*, 2003). Υπάρχουν 3 κινητικές φάσεις πρόσληψης Fe στην βΦΤ. Πρώτα, 2 άτομα Fe^{+2} συνδέονται σε κάθε ένα διπύρηνο κέντρο ($t_{1/2} \sim 50$ ms), μετά, γίνεται γρήγορη οξείδωση των Fe^{+2} ιόντων σε Fe^{+3} παρουσία οξυγόνου ($t_{1/2} \sim 5$ s), και τρίτον ο σχηματισμός του πυρήνα ($t_{1/2} \sim 300$ s), ο οποίος φαίνεται μόνο όταν μούν περισσότερα από 50 άτομα σιδήρου στην πρωτεΐνη (Le Brun *et al.*, 1993). Η χωρητικότητα σιδήρου είναι ~ 2700 άτομα ανά σύμπλοκο (24 υπομονάδες) ενώ το θεωρητικό όριο είναι ~ 4500 .

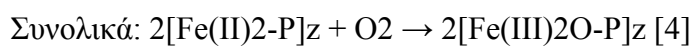
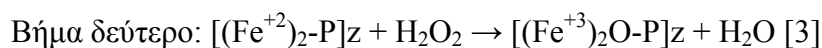
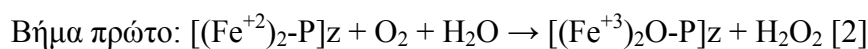
Η παρουσία βΦΤ στο *E. coli* μειώνει την παραγωγή ριζών υδροξυλίου κατά τη διάρκεια της οξειδωσης του Fe^{+2} από το H_2O_2 , αποφεύγοντας έτσι το σχηματισμό ριζών με συνέπεια το οξειδωτικό στρές (Bou-Abdallah *et al.*, 2002). Αφού μπουν τα άτομα Fe στη διπύρηνη περιοχή, 3 κύριες αντιδράσεις γίνονται: δέσμευση δύο Fe^{+2} , φερροξιδιοποίηση και μεταλλοποίηση για να αποθηκευτούν στον πρωτεϊνικό πυρήνα και να μειωθεί ο σχηματισμός ριζών υδροξυλίου (Bou-Abdallah *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000). Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση 2 ατόμων Fe στη περιοχή φερροξιδάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή 4 πρωτονίων και $[(\text{Fe}^{+2})_2\text{-P}]_z$, το οποίο αναπαριστά ένα σύμπλοκο δι-σιδηρικής φερροξιδάσης της πρωτεΐνης P με φορτίο Z (Εξ. 1).

Αυτό το σύμπλοκο δι- Fe^{+2} -πρωτεΐνης οξειδώνεται παρουσία O_2 και ένα μόριο νερού για να παράγει Fe^{+3} και H_2O_2 (Εξ. 2). Αυτό το H_2O_2 χρησιμοποιείται ταχύτατα στο βήμα 2 της φερροξιδάσης για να παράξει $[(\text{Fe}^{+3})_2\text{O-P}]_z$, το οποίο αναπαριστά ένα σύμπλοκο μ-οξο-γεφυρωμένη δι-σιδηρική φερροξιδάση, χωρίς την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω της χημείας Fenton. Αυτή είναι μια ένδειξη ότι η πρωτεΐνη είναι ικανή να αποτρέψει τον τοξικό συνδυασμό των Fe^{+2} και H_2O_2 . Το H_2O_2 είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν του βήματος μεταλλοποίησης και γρήγορα καταναλώνεται για να παραχθεί Fe^{+3} (Εξ. 5-7). Τέλος, η εσωτερική επιφάνεια θα δώσει μια περιοχή για τη δέσμευση του Fe^{+3} και θα διευκολύνει τον πυρήνα σιδήρου.

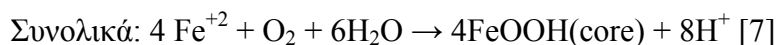
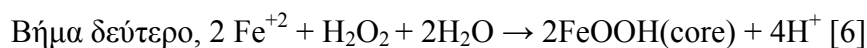
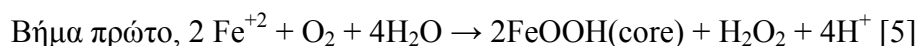
Δέσμευση Fe^{+2} ,



Φερροξιδιοποίηση,



Μεταλλοποίηση,



A.4. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ *E.coli*

A.4.1 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΦΕΡΡΟΞΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΙΜΗ

Τα υπολείμματα αμινοξέων που εμπλέκονται άμεσα στο κέντρο φερροξιδάσης του *E. coli* είναι τα: Glu18, Glu51, His54, Glu94, Glu127 και His130, ενώ το κατάλοιπο που αλληλεπιδρά με την αίμη είναι το Met52. Διαπιστώθηκε ότι οι μεταλλάξεις Glu18 στην Ala (Glu18→Ala ή E18A), Glu51→Ala (E51A), Glu94→Ala (E94A), Glu127→Gln (E127Q), και His130→Glu (H130E) έχουν μειώσει πολύ τις δυνατότητες να αποθηκευτεί ο σίδηρος και να διατηρηθούν δραστηριότητες οξειδωσης του Fe²⁺ χωρίς όμως σημαντική επιρροή στην αίμη (Brun *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000; Stillman *et al.*, 2003; Baaghil *et al.*, 2003). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη E18A διαμορφώνει τον πυρήνα σιδήρου πιο αργά από τη μετάλλαξη E94A (Keech *et al.*, 1997). Η βΦΤ χωρίς αίμη μπορεί να παραχθεί από την αντικατάσταση του Met52 στη LEU (M52L). Από μελέτες μεταλλαξιγένεσης, διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στο γενικό ποσοστό συσσώρευσης σιδήρου για το M52L συγκρινόμενο με τον άγριο τύπο βΦΤ (Andrews *et al.*, 1995). Αν και η συγκέντρωση βΦΤ σε φυσιολογικό pH δεν επηρεάζεται από την έλλειψη αίμης, η περιεκτικότητα σε σίδηρο στο βΦΤ-M52L είναι τουλάχιστον τέσσερις φορές μεγαλύτερη από τη βΦΤ άγριου τύπου (βΦΤ-βάρος) (Andrews *et al.*, 1995). Η αντικατάσταση του Met52 ίσως επηρεάσει τη συντονιστική ικανότητα του Glu51, το παρακείμενο κατάλοιπο που παρέχει μια καρβοξυλική πλευρική αλυσίδα γεφυρώνοντας τα δύο μεταλλικά ιόντα που δεσμεύονται στο κέντρο της φερροξιδάσης (Εικόνα 14). Εκτός αυτού, μελέτες κινητικής έχουν δείξει ότι η αίμη δεν διαδραματίζει κανέναν ρόλο στη λήψη οξυγόνου και την οξειδωση του σιδήρου (Yang *et al.*, 2000), αλλά η σύνδεσή της στη ΦΤ αυξάνει το ποσοστό απελευθέρωσης σιδήρου (Kadir *et al.*, 1992).

Προκειμένου να εκτελεστούν τα πειράματα ενθυλάκωσης με τη βΦΤ, ο πυρήνας σιδήρου πρέπει να είναι κενός πριν προστεθούν τα φιλοξενούμενα μόρια στην κοιλότητα. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι κένωσης του πυρήνα σιδήρου συμπεριλαμβανομένης της χρησιμοποίησης χαμηλών συγκεντρώσεων αποδιατακτικών μέσων όπως 1M ουρία (Liu *et al.*, 2003), μείωση με διάφορα θιολικά

όπως το θιογλυκολικό οξύ ακολουθούμενο από διάλυση (Price, 1983; Funk *et al.*, 1985; Read *et al.*, 1995), και μεταλλαξιγένεση των κατάλοιπων που εμπλέκονται στο σχηματισμό του πόρου (Jin *et al.*, 2001). Υπό ήπιες συνθήκες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποσυμπλοκοποίηση της υπομονάδας, όπως χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών μέσων ή χαμηλού pH, μπορούν επίσης να ισχύσουν και για την απελευθέρωση του σιδήρου. Συχνά, στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν παράγοντες μείωσης όπως το ασκορβικό για να μειώσει το Fe^{3+} που αποθηκεύεται στον πυρήνα σιδήρου σε Fe^{2+} ακολουθούμενο από τη χρήση ενός χηλικού σιδήρου όπως η φερροζίνη για να συλλάβει τα ελεύθερα ιόντα Fe^{2+} που μεταναστεύουν μέσω των πρωτεϊνικών καναλιών (Moore *et al.*, 1992b; Laulhère and Briat, 1993; Stookey, 1970). Εντούτοις, αυτές οι μέθοδοι επιλέχθηκαν για τη δυνατότητά τους να αποκαθιστούν την πρωτεϊνική τετραεδρική δομή μετά από την απελευθέρωση του σιδήρου.

Α.4.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗΣ ΤΟΥ C-ΤΕΛΙΚΟΥ ΚΟΛΛΗΜΕΝΟΥ ΑΚΡΟΥ HIS6-ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ

Η εργασία του Andrews προηγουμένως είχε δείξει ότι οι υπομονάδες της βΦΤ με 14 πρόσθετα κατάλοιπα αμινοξέος στο C-τελικό άκρο θα μπορούσαν να σχηματίσουν ένα κανονικό πρωτεϊνικό κοχύλι, το οποίο ονόμασαν αυτήν την C-τελική επέκταση της βΦΤ, ΒΦ-λ υβριδική πρωτεΐνη (Andrews *et al.*, 1990). Αυτό το υβρίδιο αντικατέστησε τέσσερα C-τελικά κατάλοιπα (REEG) στη βΦΤ-βάρους από 18 κατάλοιπα (RLPFTSCAVCLQDSMRSR). Με βάση την PAGE, τη θερμική διάσπαση, τη χρωματογραφία ανιονικής ανταλλαγής Q-σεφαρόζης και τη χρωματογραφία διείσδυσης πηκτής Superose 6, διαπιστώθηκε ότι και ο άγριος τύπος και οι υβριδικές πρωτεΐνες είχαν παρόμοιες λειτουργίες και ιδιότητες. Αυτά τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τα πρόσθετα κατάλοιπα στο C-τελικό άκρο μέσα στην κεντρική μοριακή κοιλότητα δεν επηρεάζουν το πρωτεϊνικό κοχύλι ούτε επηρεάζουν τις ιδιότητες της εξωτερικής επιφάνειας. Επιπλέον πληροφορίες βασισμένες σε πειράματα κρυστάλλωσης είχαν δείξει ότι αυτά τα 14 πρόσθετα κατάλοιπα αμινοξέος γέμισαν κατά προσέγγιση 60% την κοίλη κοιλότητα και εμπόδισαν ενδεχομένως την πρόσβαση των ιόντων σιδήρου έτσι ώστε η υβριδική πρωτεΐνη ΒΦ-λ απέτυχε να

λάβει το σίδηρο *in vitro*. Επίσης έδειξαν ότι πολλές περιοχές της αίμης επηρεάστηκαν.

Μετάπειτα, αναπτύχθηκαν τα πρωτόκολλα για να καθαρίσουν την άγριου τύπου βΦΤ και τις υβριδικές πρωτεΐνες ΒΦ-λ (Andrews *et al.*, 1993). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η υπερπαραγωγή πρωτεΐνης άγριου τύπου βΦΤ ήταν 120 πτυχές, ενώ για την υβριδική πρωτεΐνη ήταν μόνο 50 πτυχές. Τα πειράματα διάθλασης ακτίνας Χ έδειξαν ότι τα πρόσθετα C-τελικά κατάλοιπα ήταν παρόντα μέσα στην κοιλότητα της πρωτεΐνης 24 υπομονάδων, και το ορατό φάσμα έδειξε ότι το περιεχόμενο της αίμης του υβριδίου λ ήταν περίπου 1-2 ομάδες αίμης/τετρακοσαμερές, ενώ της βΦΤ αγρίου τύπου είχε 3.5-10.5 ομάδες αίμης/τετρακοσαμερές. Τα πειράματα μη-μετουσίωσης με PAGE έδειξαν ότι το υβρίδιο ΒΦ-λ σταθεροποιήθηκε από την παρουσία των πρόσθετων C-τελικών κατάλοιπων.

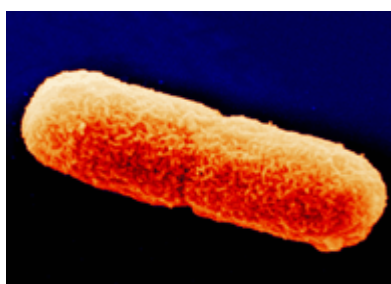
Ενώ οι περισσότερες δημοσιευμένες εφαρμογές των πρωτεϊνικών κελύφων για τις μελέτες ξενιστή-παθογόνου βασίζονται σε ΦΤ με διάφορους τύπους φιλοξενούμενων μορίων δηλ. μέταλλα, πεπτίδια, μικρή πρωτεΐνη, ή φάρμακα, προηγούμενες μελέτες ενθυλάκωσης που χρησιμοποίησαν βΦΤ έχουν εστιάσει στην αντικατάσταση του πυρήνα Fe^{3+} με άλλα μέταλλα. Η περαιτέρω κινητική μελέτη των μετάλλων που δεσμεύονται στη βΦΤ (σε επίπεδο της σταθεράς διαχωρισμού) είχε δείξει ότι η σειρά της ιονικής σύνδεσης μετάλλων ήταν $Cu(II) < Co(II) < Zn(II)$ (Baaghil *et al.*, 2002; Le Brun *et al.*, 1996).

A. 5 *Azotobacter Vinelandii*

A.5.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Azotobacter*

Το γένος *Azotobacter* ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Περιλαμβάνει αρνητικούς κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιους και ελεύθερα διαβιούντες (μη συμβιωτικούς) οργανισμούς, ικανούς να δεσμεύουν το N₂. Στο συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνονται 9 είδη τα οποία φυλογενετικά ανήκουν στα γ-πρωτεοβακτήρια. Τα κύτταρά τους έχουν σχεδόν το μέγεθος ζυμομύκητα, με διαμέτρους από 2-4μm ή και περισσότερο. Ο πλειομορφισμός είναι συνήθης και έχουν περιγραφεί πολλά σχήματα και μεγέθη κυττάρων. Μερικά στελέχη είναι αυτοκινούμενα, διαθέτοντας περίτριχα μαστίγια. (Madigan M. *et al.*, 2005).

Παρά το γεγονός ότι το *Azotobacter* είναι υποχρεωτικά αερόβιο, το ενζυμικό σύστημα που διαθέτει για τη βιολογική δέσμευση του N₂ είναι ευαίσθητο στο O₂. Πιστεύεται ότι ο χαρακτηριστικός για το *Azotobacter* υψηλός ρυθμός αναπνοής και η πλούσια γλοιώδης στοιβάδα της κάψας βοηθούν στην προστασία του ενζυμικού αυτού συστήματος από το O₂. Το *Azotobacter* μπορεί να αναπτύσσεται σε μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων, αλκοολών και οργανικών οξέων. Ο μεταβολισμός ενώσεων του άνθρακα είναι αυστηρά οξειδωτικός και σπάνια παράγονται οξέα ή άλλα προϊόντα ζύμωσης. Όλα τα στελέχη του γένους *Azotobacter* είναι ικανά να δεσμεύουν το N₂ ενώ αναπτύσσονται και με απλές μορφές δεσμευμένου αζώτου όπως η αμμωνία, η ουρία και τα νιτρικά άλατα (Madigan M. *et al.*, 2005).



Εικόνα 2.1. Βλαστικό κύτταρο του στελέχους *Azotobacter vinelandii*.

Το *Azotobacter* μπορεί να σχηματίσει ληθαργικές μορφές οι οποίες ονομάζονται κύστες. Όπως και τα ενδοσπόρια των βακτηρίων, οι κύστες του *Azotobacter* έχουν αμελητέα ενδογενή αναπνοή και είναι ανθεκτικές στην αποξήρανση, τη μηχανική

αποδόμηση και την υπεριώδη και ιονίζουσα ακτινοβολία. Αντίθετα με τα ενδοσπόρια όμως, δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στη θερμότητα και δεν βρίσκονται σε απόλυτο λήθαργο, διότι οξειδώνουν ταχύτατα εξωγενείς πηγές ενέργειας. (Madigan *et al.*, 2005).

Όλα τα στελέχη του *Azotobacter* είναι θετικά στη δοκιμή ουρίας, μια ιδιότητα που τα διαχωρίζει από τα στελέχη του *Azotomonas* (Kennedy *et al.*, 2003). Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την ικανότητα των *Azotobacter vinelandii* και *Azotobacter chroococcum* να χρησιμοποιούν ουρία ως πηγή αζώτου (Thompson and Skerman, 1979; Kennedy *et al.*, 2003).

A.5.2 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Azotobacter vinelandii*

Τις τελευταίες δεκαετίες οι έρευνες έχουν εστιάσει στο στέλεχος *Azotobacter vinelandii* AvOP και τα παράγωγά του, λόγω της δεκτικότητας του συγκεκριμένου οργανισμού σε γενετικούς χειρισμούς, δεδομένου ότι είναι εξαιρετικός δέκτης DNA που προέρχεται από άλλους οργανισμούς είτε μέσω μετασχηματισμού (*Transformation*) είτε μέσω σύζευξης (*Conjunction*) (Kennedy and Bishop, 2004). Το στέλεχος αυτό μπορεί να δεχθεί πλασμίδια σε μεγάλο αριθμό από το *E. coli* ή από άλλα στελέχη του γένους *Azotobacter* και μπορεί να μετασχηματιστεί είτε με γραμμικό είτε με πλασμιδιακό DNA.

Το γένωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP αποτελείται από 5.3 Mb DNA, με περιεκτικότητα σε G,C περίπου 65%. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του κυμαίνονται από ένα στα αρχικά στάδια ανάπτυξης (φάση υστέρησης, αρχή λογαριθμικής), μέχρι περισσότερα και από 80 στη φάση λογαριθμικής και στη φάση στασιμότητας (Maldonado *et al.*, 1994). Το *Azotobacter vinelandii* AvOP δεν περιέχει ενδογενή πλασμίδια, σε σχέση με άλλα είδη όπως το *Azotobacter chroococcum* το οποίο περιέχει οκτώ (Robson *et al.*, 1984; Kennedy *et al.*, 2003).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Azotobacter vinelandii*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii*, στελέχη AvOP-2916 και AvOP-5614. Το *Azotobacter vinelandii* είναι ένας μη συμβιωτικός, αρνητικός κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιος οργανισμός, ικανός να δεσμεύει N₂. Φυλογενετικά ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια της οικογένειας *Pseudomonadaceae* της τάξεως *Pseudomonadales*.

B.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *Azotobacter vinelandii* AvOP

- 30ml θρεπτικού διαλύματος εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία βακτηρίου. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 30°C για 48 ώρες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10ml 150mM NaCl και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10ml TES.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 6ml TE'.
- Προστίθενται 21μl διαλύματος λυσοζύμης (2mg/ml TE) και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 20 λεπτά.
- Προστίθενται 500μl Sarkosyl/πρωτεϊνάση K (10% LauroSarkosyl + 5mg/ml pronase in TE) και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα.
- Προστίθενται 3ml φαινόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C.
- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 2ml φαινόλη και 2ml χλωροφόρμιο.

- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1/10 του όγκου διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH:4,8 για την τελική κατακρήμιση του DNA και ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Το μείγμα παραμένει για 16 ώρες στους -20°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 400μl TE.
- Το μείγμα επωάζεται στους -20°C για 1 ώρα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300μl αιθανόλη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl TE.
- Προστίθενται 3μl RNaseA και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά.
- Προστίθενται 500μl φαινόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 500μl χλωροφόρμιο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1/10 του όγκου διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH:4,8 για την τελική κατακρήμιση του DNA και ίσος όγκος ισοπροπανόλης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300μl αιθανόλη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μl TE.

- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C .

B.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)

Οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης θεωρούνται εργαλεία *in vivo* πολλαπλασιασμού του DNA. Ωστόσο, με την ανάπτυξη του συνθετικού DNA δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro*, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986; Mullis and Faloona, 1987) είναι η πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA *in vitro* και *in situ*.

Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Στη συνέχεια, δύο ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία μείγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg^{+2} . Στη συνέχεια, οι αλυσίδες καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές.

Κατά την πραγματοποίηση του παραπάνω κύκλου αντίδρασης n φορές, το αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2^n δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα των αλληλουχιών ανάμεσα από τους εκκινητές και παρέχουν τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Σε κάθε κύκλο δηλαδή ουσιαστικά διπλασιάζεται το περιεχόμενο του αρχικού DNA-στόχου. Στην πράξη, συνήθως πραγματοποιούνται 20-30 κύκλοι, κάτι που οδηγεί σε αύξηση της αλληλουχίας-στόχου κατά 10^6 έως 10^9 φορές. Η εκθετική βέβαια συσσώρευση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιείται κατά την απουσία περιοριστικών παραγόντων, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του

προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών αυτών στη μήτρα του DNA.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας του DNA που προστίθεται κάθε φορά εξαρτάται από την πηγή προέλευσης του DNA αυτού. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γενωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με 1μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 10-100ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m). Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων είχαν ως εξής:

- Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται:
- DNA εκμαγείο *A. vinelandii* AvOP 50ng 1μl
 - Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (300 ng/μl) 1μl
 - Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (300 ng/μl) 1μl
 - Μίγμα dNTP's (1,25mM το καθένα) 1μl
 - **10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR** 5μl
 - *Taq* DNA πολυμεράση [ExPol] (1u/μl) 1μl
 - DMSO (5%) 2.5μl
 - ddH₂O έως τελικό όγκο 50 μl (37.5 μl)

Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και ακολουθεί η πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης για την ενίσχυση του τμήματος DNA ήταν:

- | | | |
|----------------------------|-------------------|-----------|
| • Αρχική αποδιάταξη | 94°C για 3 λεπτά | |
| • Αποδιάταξη | 94°C για 1 λεπτό | |
| • Υβριδισμός των εκκινητών | 4°C για 1 λεπτό | 35 κύκλοι |
| • Επιμήκυνση | 72°C για 1 λεπτό | |
| • Τελική επιμήκυνση | 72°C για 10 λεπτά | |

B.4. PCR PURIFICATION

Έπειτα από την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης, σύμφωνα με το QIAquick PCR Purification kit της QIAGEN.

- Σε κάθε δείγμα προστίθεται διάλυμα **PB**, πενταπλάσιου όγκου από αυτόν της αντίδρασης PCR.
- Το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά στη στήλη «QIAquick spin column». Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για ένα λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που συλλέχθηκε στο κάτω μέρος της στήλης πετάγεται.
- Προστίθενται στη στήλη 750μl PE.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που συλλέχθηκε στο κάτω μέρος της στήλης πετάγεται.
- Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf. Για την έκλουση του DNA προστίθεται ddH₂O είτε διάλυμα EB (30μl).
- Έπειτα από 1 λεπτό ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

B.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Σε περίπτωση γραμμικών κλασμάτων DNA ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα 1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αгарόζης σε σχέση με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA(Kb)
0.3	1.0-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1.0	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2.0	0.1-5

Πίνακας 1. Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη **βρωμιούχου αιθιδίου**, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης αναμιγνύεται σε κωνική φιάλη με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος **1XTAE** και θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί εντελώς.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,001% v/v), αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης (πηγαδάκια).
- Η «χτένα» απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης **1XTAE**, έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνειά του.
- Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Loading Dye Solution), τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης (πηγαδάκια) της πηκτής.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.

B.6. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

- Έπειτα από το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από την πηκτική αгарόζη με τη χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf, ζυγίζεται και προστίθενται τρεις όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος **QG**.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για περίπου 10 λεπτά, έως ότου διαλυθεί η αгарόζη. Συνίσταται ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) για κάθε 2 λεπτά της επώασης (κίτρινο χρώμα).
- Στο διάλυμα προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης, ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε κολώνα QIA quick column και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ.
- Το υγρό αδειάζεται, η στήλη ξεπλένεται με 750μl ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ.
- Αδειάζεται ξανά η στήλη και πραγματοποιείται μια επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ.
- Η κολώνα QIA quick column τοποθετείται σε ένα καθαρό σωλήνα erppendorf 1,5ml και προστίθενται 50μl dH₂O (στο κέντρο της κολώνας).
- Μετά από αναμονή 1 λεπτού ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13.000 σ.α.λ.
- Το υγρό που συγκεντρώνεται περιέχει το ένθετο τμήμα DNA.

B.7 ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

B.7.1 Ο ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ pET28a (+)

Ο πλασμιαδικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο **pET28a (+)** (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ). Οι πλασμιαδικοί φορείς **pET28a (+)** φέρουν τον T7 προαγωγό της RNA πολυμεράσης καθώς επίσης άμινο- και καρβόξυ- τελικά άκρα με κατάλοιπα ιστιδίνης (His-Tag). Φέρουν επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ).

Ο σκοπός της χρησιμοποίησης του συγκεκριμένου φορέα ήταν η υποκλωνοποίηση τμήματος DNA προκειμένου να γίνει ευκολότερος ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του και ο χαρακτηρισμός του. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αυτής έγινε με αυτοματοποιημένες μεθόδους.

B.7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ

- Ο πλασμιδιακός φορέας υφίσταται πέψη με το επιθυμητό ένζυμο περιορισμού για 3 ώρες.
- Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται κατά τακτά χρονικά διαστήματα με ανάλυση δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.
- Μόλις διαπιστωθεί η πλήρης πέψη του πλασμιδίου, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 75°C για 20 λεπτά.
- Ο πλασμιδιακός φορέας κατακρημνίζεται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH:5,2 και δύο όγκων αιθανόλης και συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Τέλος το πλασμιδιακό DNA ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH₂O.

B.7.3 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ DNA ΛΙΓΑΣΗΣ

Η μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία συμπληρωματικών άκρων μεταξύ του τμήματος του DNA και του πλασμιδιακού φορέα στον οποίο θέλουμε να το εισαγάγουμε. Για τον σκοπό αυτό τόσο το τμήμα του DNA όσο και ο φορέας, υφίστανται πέψεις με ένζυμα περιορισμού τα οποία εξασφαλίζουν συμπληρωματικότητα στα άκρα τους. Στην περίπτωση που για την κατεργασία του πλασμιδιακού φορέα χρησιμοποιείται μόνο ένα ένζυμο περιορισμού, πραγματοποιείται ένας ακόμα χειρισμός, ο οποίος αποσκοπεί στην αποφυγή επανασύνδεσης των άκρων του.

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (**ligation**), η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3 για τη

μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου τμήματος DNA γίνεται ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Σε σωλήνα erpendorf αναμίχθηκαν τα παρακάτω:

- DNA πλασμιδιακός φορέας 1μl
- DNA ένθεσης (insert) 1μl
- **10X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης** 1μl
- Ένζυμο Λιγάση T4 (1 unit/μl) 2μl
- ddH₂O 6μl

B.8 ΠΕΨΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA γίνονται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Ο όγκος αυτός καθορίζεται τόσο από την ποσότητα και καθαρότητα του DNA όσο και από τη ποσότητα του ενζύμου περιορισμού το οποίο χρησιμοποιείται κάθε φορά. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20-100μl. Στο πείραμα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν δύο πέψεις με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, μία για τον φορέα κλωνοποίησης (pET28a) και μία για το τμήμα ένθεσης DNA (insert) που μελετήθηκε, αμφότερες σε τελικό όγκο 50μl.

Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, RNaseA εάν το δείγμα περιέχει RNA και την ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Τέλος προστίθεται ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο.

pET28a

- Διάλυμα DNA pET28a 15 μl
- Ένζυμο περιορισμού XhoI 1 μl
- Ένζυμο περιορισμού NcoI 1 μl
- 10 x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer red) 5 μl
- ddH₂O 28 μl

Insert

- Διάλυμα DNA insert 15 μl
- Ένζυμο περιορισμού BspHI (PagI) 1 μl
- Ένζυμο περιορισμού NcoI 1 μl
- 10 x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (TANGO) 5 μl
- ddH₂O 17 μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση των μειγμάτων στην ιδανική θερμοκρασία για τη δράση των ενζύμων περιορισμού (συνήθως 37°C). Η επώαση διαρκεί ανάλογα με την ποσότητα των ενζύμων περιορισμού (3 ώρες). Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

Ενδονουκλεάση περιορισμού	Αλληλουχία αναγνωρίσεως	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης
XhoI	C/TCCAG	37°C
NcoI	C/CATGG	37°C
BspHI (PagI)	T/CATGA	37°C
XbaI	T/CTAGA	37°C
/: ορισμός σημείου πέψης στην αλληλουχία		

Πίνακας 2. Ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

B.9 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (Competent cells) ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

B.9.1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (Competent cells)

- 10ml **LB** θρεπτικού υλικού (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β) εμβολιάζονται με μια αποικία *E.coli* (στέλεχος XL-blue) και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- 2ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C, για περίπου 2 ώρες μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας μετρούμενης στα 600nm να είναι περίπου 0.3-0.4 (O.D. ₆₀₀= 0.3-0.4).
- Οι χειρισμοί οι οποίοι ακολουθούν παρακάτω γίνονται ή στον πάγο ή στους 4°C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά.
- Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλυθεί με ήπια ανάδευση σε 50ml 0,1 M MgCl₂, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 σ.α.λ.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25ml 0,1 M CaCl₂ και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 6.000 σ.α.λ.
- Το ίζημα των επαναδιαλύεται σε 10ml 0,1M CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού μοιραστούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

B.9.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

- Τα ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα από το κατάλληλο στέλεχος *E.coli* μεταφέρονται σε πάγο για να ξεπαγώσουν.
- Σε σωλήνα erpendorf μέσα σε πάγο, μεταφέρονται 100μl δεκτικά κύτταρα XL-blue και προστίθενται 10-100ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δεν

πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυτάρων (10μl από το ligate DNA).

- Το μείγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου 30 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (Heat-Shock) στους 42°C για 1 λεπτό και την απ'ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο.
- Προστίθενται 150-200μl LB θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 40-60 λεπτά.
- Έπειτα από ανάδευση τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ) για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Για τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (pET28a+) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και καναμυκίνη.
- Στην περίπτωση που επιθυμείται η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, γίνεται στα κύτταρα προσθήκη 15μl IPTG 100 mM και 50μl X-Gal (2% διμέθυλο-φορμαμίδιο). Οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές.

B.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

B.10.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA με QIAprep Miniprep

- 5ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- 1,5ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250μl διαλύματος P1 (περιέχει RNaseA).

- Προστίθενται 250μl διαλύματος **P2** (περιέχει NaOH), το δείγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά.
- Προστίθενται 350μl διαλύματος εξουδετέρωσης **N3** (περιέχει οξικό οξύ και γουανιδίνη-HCl), ακολουθεί ανάμιξη και φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη QIAprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στη στήλη.
- Προστίθενται 350μl διαλύματος **PE** (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα που διαπερνά την στήλη πετάγεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα **PE** καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf. Για την έκλυση του DNA προστίθεται ddH₂O ή διάλυμα 30μl **EB** (10mM Tris-Cl, pH:8,5).
- Ακολουθεί φυγοκέντριση της στήλης στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

B.10.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ (Boiling Prep)

(Holmes and Quigley, 1981)

- 5ml θρεπτικού υλικού LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό σε ποσότητα 5μl εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* τα οποία φέρουν τα πλασμίδια που φέρουν την ένθεση που επιθυμείται στη μελέτη. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.

- Από την παραπάνω καλλιέργεια 2x1,5ml μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν στεγνό.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 150μl **διαλύματος STET** παρουσία λυσοζύμης (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml.
- Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρωσή του στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται στο υπερκείμενο 180μl ισοπροπανόλης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA.
- Αφού το ίζημα ξεπλυθεί με 70% αιθανόλη και στεγνώσει στον αέρα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο **ρυθμιστικού διαλύματος TE**.
- Το ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

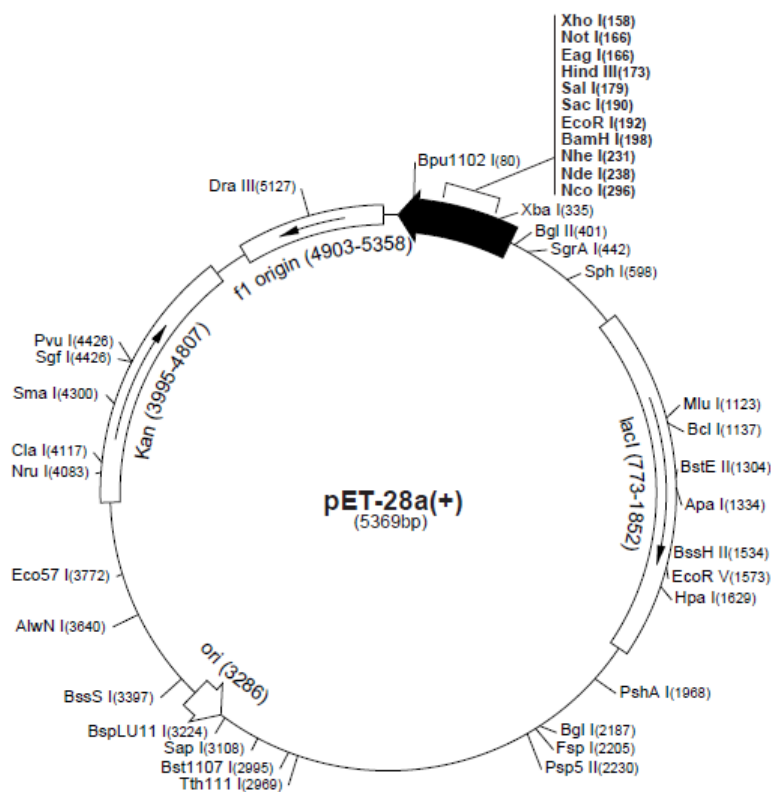
B.11 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Το DNA των κλώνων AvOP2619, AvOP5614, ενισχύεται μέσω της αντίδρασης PCR και τη χρήση των εκκινητών του πίνακα 1.

Πίνακας 1: Εξειδικευμένοι εκκινητές για την ενίσχυση του προς έκφραση πολυπεπτιδίου

Γονίδιο	Locus	Ακολουθία αριστερού (F) και δεξιού (R) εκκινητή
AvOP-2916	Avin 10050	F: 5'-AAACCATGGAGGGGCAGGCGCAAGTCC R: 5'-GGGAAGCTTCATCTGCGACTGCAGGTAG
AvOP-5614	Avin14460	F: 5'-GGGCCATGGAAGGCGATAAGATAGTCATC R: 5'-GGGGAATTCTCATCCATTTGCGATTGCAG

Ακολουθεί ενσωμάτωση αυτών, στον φορέα pET28a(+) μεταξύ των θέσεων περιορισμού Nco I και Hind III (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, το προϊόν της PCR υφίσταται πέψη με τα ένζυμα περιορισμού Nco I και Hind III και υποκλωνοποιείται στον φορέα ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 1: Χάρτης του φορέα έκφρασης pET28a(+). Διακρίνονται οι θέσεις κλωνοποίησης.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό ικανών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3). Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων γίνεται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει καναμυκίνη.

Η επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια γίνεται με την απομόνωση πλασμιδιακού DNA και την πέψη του με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού.

B11.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

- Μεμονωμένη αποικία μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης, χρησιμοποιείται για τη μόλυνση 5ml θρεπτικού διαλύματος LB στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη.
- Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 37°C με συνεχή ανακίνηση.
- 1,5ml από την παραπάνω καλλιέργεια, χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό 30ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει καναμυκίνη.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30°C με συνεχή ανακίνηση, έως ότου η οπτική πυκνότητα $O.D._{600}=0,6$.
- 1ml της καλλιέργειας αυτής μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf, φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα που απομένουν επαναδιαλύονται σε 20μl ddH₂O.
- Προστίθενται 20μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης
- Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C
- Στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και ZnSO₄ σε τελική συγκέντρωση 0,5mM.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 25°C με συνεχή ανακίνηση για 6 ώρες.
- 1ml της καλλιέργειας αυτής μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf, φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.000 σ.α.λ. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα που απομένουν επαναδιαλύονται σε 40μl ddH₂O.
- Προστίθενται 20μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης
- Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C

- Η υπόλοιπη καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300μl διαλύματος 50mM Tris-HCl pH:7,0.
- Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους και φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων συλλέγεται και φυλάσσεται στους 4°C.
- Τα κυτταρικά θραύσματα που βρίσκονται στο ίζημα επαναδιαλύονται σε 300μl διαλύματος 50mM Tris-HCl pH:7,0.
- Σε 100μl διαλυτών πρωτεϊνών προστίθενται 100μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C
- Τα 3 τελευταία βήματα επαναλαμβάνονται για τα κυτταρικά θραύσματα.

Η ύπαρξη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ελέγχεται με την ανάλυση των παραπάνω πρωτεϊνικών κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

B.11.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

- Μεμονωμένη αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης, χρησιμοποιείται για τη μόλυνση 5ml θρεπτικού διαλύματος LB στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη.
- Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 37°C με συνεχή ανακίνηση.
- 25ml από την παραπάνω καλλιέργεια, χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό 500ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει καναμυκίνη.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30°C με συνεχή ανακίνηση, έως ότου η οπτική πυκνότητα $O.D._{600}=0,6$.
- Προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και $ZnSO_4$ σε τελική συγκέντρωση 0,5mM.

- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 25°C με συνεχή ανακίνηση για 6 ώρες.
- Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες απομονώνονται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας με φυγοκέντριση σε Sorval RC 5B Plus φυγόκεντρο με κεφαλή GSA στις 4.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων με 3ml διαλύματος λύσης pH:8,0
- Προσθήκη λυσοζύμης σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml.
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο και λύσιμο των κυττάρων με υπερήχους (10 φορές για 30sec στα 200-300Watt με ενδιάμεση παύση 10sec).
- Οι ολικές διαλυτές πρωτεΐνες συλλέγονται στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντριση στις 10.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά στους 4°C.

B.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες τις οποίες επιβάλλει η παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) (Laemmli, 1970). Οι πρωτεΐνες κατά την έκθεσή του στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS αποκτούν αρνητικό φορτίο, καθώς σε κάθε αμινοξύ δεσμεύεται ένα περίπου μόριο SDS. Συνεπώς, κατά την ηλεκτροφόρηση μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους.

Κατά τη μέθοδο της κάθετης ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πηκτή επιστοιβάξης, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα και μεγάλο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πηκτή αυτή και συσσωρεύονται σε μια λεπτή στοιβάδα. Ακολούθως, περνούν σε πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα, με μικρότερο μέγεθος πόρων, την πηκτή διαχωρισμού, όπου και γίνεται ο διαχωρισμός τους βάσει του μοριακού τους βάρους.

B.12.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Η ανάλυση πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Το απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν ισχυρό αναγωγικό παράγοντα όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη και με θέρμανση οδηγούν στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες που όλες πλέον αποκτούν αρνητικό φορτίο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους μέγεθος.

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβαξης (Stacking Gel).

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού είναι η ακόλουθη:

- Αναμειγνύονται τα διαλύματα 1,2,3,5 και 6 και στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα 7 και 8.
- Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για 1 ώρα (20-25°C).
- Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτή επιστοιβαξης, η οποία παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι περιέχει το διάλυμα 4 αντί για το 5. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι.
- Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30 λεπτά (25°C).
- Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοιβαξης η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Στην συσκευή προστίθεται **1X ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης**.
- Τέλος με μια σύριγγα απομακρύνονται οι φυσαλίδες που σχηματίζονται στο κάτω μέρος της πηκτής μεταξύ των τζαμιών.

		Πηκτή διαχωρισμού							Πηκτή επιστοιβαξή (Stacking Gel)
		7,5 %	10%	12,5 %	15%	17,5 %	20%	25%	
1	Ακρυλαμίδη 30%	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	1,3
2	1% Bis- ακρυλαμίδη	5,2	3,9	3,1	2,6	2,2	2,9	1,5	1
3	3M Tris pH: 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	-
4	1M Tris pH: 6,8	-	-	-	-	-	-	-	1.25
5	10% SDS	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
6	dH ₂ O	13,0 4	11,8 5	10,14	8,14	6,04	3,84	-	6,24
7	TEMED	0,01 5	0,01 5	0,015	0,01 5	0,015	0,01 5	0,01 5	0,015
8	10% APS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Πίνακας 3. Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης ανάλογα με την τελική συγκέντρωση σε ακρυλαμίδη.

B.12.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμιγνύονται με **ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης** που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη, όπου θερμαίνονται στους 75-100°C για 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, αφού ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των ασθενών δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων), ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Το **ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης** περιέχει και τη χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος αφαιρείται προσεκτικά η χτένα και τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια της πηκτής.

B.12.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΖΩΝΩΝ ΜΕΣΩ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕ

Coomassie Brilliant Blue R-250.

- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 90Volts για όσο διατρέχουν την πηκτική επιστοιβαξής και αμέσως μετά στα 140Volts, σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.
- Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση της πηκτής σε διάλυμα χρώσης για 30 λεπτά στους 60°C, με ελαφρά ανακίνηση ή ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτισή της σε διάλυμα αποχρωματισμού σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφρά ανακίνηση.
- Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται με νέο ανά 1 ώρα, ωστόσο απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής και φανούν καθαρά οι πρωτεϊνικές ζώνες.

B.13 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ευθυγράμμιση της φερριτίνης του *Azotobacter vinelandii* στέλεχος AvOP με αντίστοιχα ένζυμα άλλων οργανισμών, καθώς και η εύρεση της ομολογίας μεταξύ τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος Lasergene. Η κατασκευή του φυλλογενετικού δένδρου βάσει των αμινοξικών ακολουθιών έγινε με χρήση του προγράμματος ClustalW.

Οι κωδικοί πρόσβασης (Accession numbers) στις βάσεις δεδομένων των ακολουθιών της φερριτίνης που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

C1DQY9	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP 2916
C1DNM1	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP 5619
A4VQJ3-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> BFRA
Q9HWF9-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BFR
A4XZ61-1	<i>Pseudomonas mendocina</i> BFR
NM_080134.2	<i>Drosophilla melanogaster</i> Heavy chain Fer1
EST587819	Tomato ferritin

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΣΥΝΘΕΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Ακρυλαμίδη (30%): 60 gr ακρυλαμίδης διαλύονται σε 200 ml dH₂O. Το διάλυμα αναδεύεται παρουσία ιοντοανταλλακτικής ρητίνης για 30 λεπτά, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4°C.

Αντιδραστήριο Bradford: 100mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 διαλύεται σε 100ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε θερμοκρασία 25°C.

APS (10%): 1 gr APS (Amonium Persulfate) διαλύονται σε 10 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 µg/ml.

BIS-ακρυλαμίδη (1%): 0,5 gr BIS-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 50 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα αποχρωματισμού: 30% Μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

Διάλυμα έκλουσης: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM ιμιδαζόλιο-NaOH pH: 8,0.

Διάλυμα λύσης: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM ιμιδαζόλιο-NaOH pH: 8,0.

Διάλυμα πλύσης: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM ιμιδαζόλιο-NaOH pH: 8,0.

Διάλυμα φόρτωσης: 0,25% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη.

Διάλυμα χρώσης: 450 gr/Lt Μεθανόλη, 100 ml/Lt οξικό οξύ, 0,25 gr/Lt Coomassie Brilliant Blue R-250.

IPTG (100 mM): 23,8 gr IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside) διαλύονται σε 1 ml ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

Λυσοζύμη: 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

NaCl (150 mM): Σε τελικό όγκο 1 Lt H₂O διαλύονται 8,77 gr χλωριούχο νάτριο.

NaP 90.1 M pH: 7,4): Σε τελικό όγκο 1 Lt H₂O διαλύονται 2,48 gr NaH₂PO₄, και 11,64 gr Na₂HPO₄.

Οξικό νάτριο (3 M pH: 4,8): Σε τελικό όγκο 1 Lt H₂O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 4,8 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride) (0,1 M): Σε 1 ml ισοπροπανόλης διαλύονται 17,41 mg PMSF.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x): 144 gr/Lt γλυκίνη, 30,25 gr/Lt Tris και 10 gr/Lt SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x): 0,66M Tris-HCl pH:7,6 , 50mM MgCl₂ , 50mM DTT , 10mM ATP . Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης: 4% SDS , 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 0,1M Tris pH: 6,8 και 0,0005% χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης.

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10x): 100mM Tris-HCl pH:8,3 , 500mM KCl, 15mM MgCl₂ , 0,1% (w/v) gelatin.

RNase A: 10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10mM Tris-HCl pH:7,5 / 15mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C.

Sarkosyl/πρωτεϊνάση K: 0,1gr Sarkosyl και 5mg πρωτεϊνάσης K διαλύονται σε TE με επώαση στους 37°C για μία ώρα.

STET: 8% σακχαρόζη, 5% Triton x 100, 50mM Tris-HCl pH:8,0 , 50mM EDTA.

TAE (1x): Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50 x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές, 50 x TAE: 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH: 8,0 σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 lt.

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

TE': 10mM Tris-HCl pH:8,0 , 25mM EDTA.

TES: 10mM Tris-HCl pH:8,0 , 25mM EDTA, 150mM NaCl.

Tris.SO₄ (1M pH:8): Σε τελικό όγκο 1 lt H₂O διαλύονται 121,14 gr Tris-Base. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8,0 με την προσθήκη πυκνού H₂SO₄ . Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Tris-HCl (1M pH:7,0): Σε τελικό όγκο 1lt H₂O διαλύονται 121,14 gr Tris-Base (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,0 με την προσθήκη πυκνού HCl. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Φαινόλη: Σε 500 ml φαινόλης προστίθενται 200 ml διαλύματος 1M Tris-HCl pH:8,0. Ακολουθεί καλή ανάδευση και οι δύο φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η άνω υδατική φάση απομακρύνεται και προστίθενται 200 ml διαλύματος 100mM Tris-HCl pH:8,0. Μετά από καλή ανάδευση το μείγμα φυλάσσεται ανά 40 ml σε σωλήνες Falcon στους -20°C.

X-Gal (2%): 0,02 gr X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

LB: ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *E. coli*:

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος LB εκτελούνται τα εξής:

- Σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr NaCl, 10gr Bacto-Trypton (Casein) και 5gr Yeast Extract.
- Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% agar. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Καναμυκίνη:

Μητρικό διάλυμα: 25mg/ml σε dH₂O.

Τελική συγκέντρωση: 25mg/ml θρεπτικού διαλύματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

Ο ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ Pet28a(+)

pET-28a-c(+) Vectors

TB074 12/98

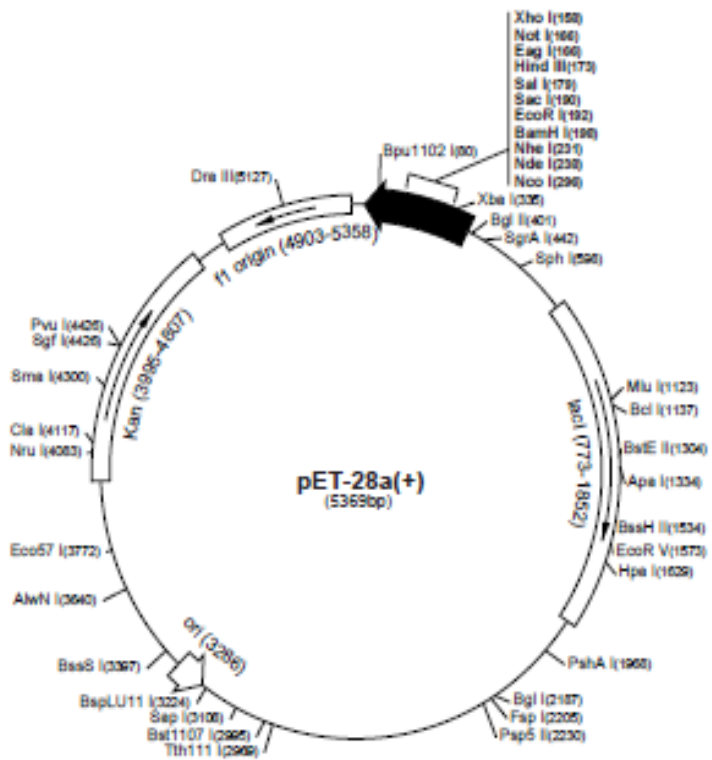
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His*Tag*/thrombin/T7*Tag* configuration plus an optional C-terminal His*Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The ϕ 1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His*Tag coding sequence	270-287
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (BamH I - Xho I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
ϕ 1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond BamH I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond BamH I at 198.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Azotobacter vinelandii* AvOP

Γ.1.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Azotobacter vinelandii* AvOP

Το γένωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP διερευνήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), για τον εντοπισμό γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανές βακτηριοφερριτίνες. Η έρευνα είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό τριών γονιδίων που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με γονίδια διαθέσιμα στο διαδίκτυο, εκ των οποίων διερευνήθηκαν τα δύο τα οποία κωδικοποιούν για βακτηριοφερριτίνες που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από άλλους οργανισμούς.

Πρόκειται για τα γονίδια AvOP-2916 και AvOP-5614, τα ανοικτά αναγνωριστικά πλαίσια των οποίων αποτελούνται από 470 και 475 νουκλεοτίδια, που κωδικοποιούν για ένα πολυπεπτίδιο 154 και 156 αμινοξέων, με μοριακό βάρος περίπου 17,9 και 18,1 kDalton αντίστοιχα και ίδιο θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 4,5 (κωδικοί πρόσβασης: C1DQY9 και C1DNM1. Οι προηγούμενοι υπολογισμοί έγιναν μέσω του προγράμματος Compute pI/Mw της βάσης δεδομένων ExPASy (www.expasy.org) .

Γ.1.2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΤΟΥ *Azotobacter vinelandii* AvOP, ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΕΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η αμινοξική αλληλουχία της βακτηριοφερριτίνης του *Azotobacter vinelandii* AvOP-2916 και AvOP-5614 ευθυγραμμίστηκε με βακτηριοφερριτίνες από άλλους μικροοργανισμούς: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, του φυτικού είδους: *Tomato ferritin* και της *Drosophilla melanogaster* μέσω του προγράμματος Lasergene (Εικ. 1).

```

1 -----M Q G Q A Q V D Y L K E L L R Avop 2916
1 -----M K G D K I V I Q H L N K I L G AVop 5614
1 -----M L A R C S R -----R I S H G E Y A M Q G Q A P V I D Y L K E L L R Ps.stutzeri
1 -----M Q G H P E V I D Y L N T L L T Ps.aeruginosa
1 -----M K G H I E V I D Y L K Q L L K Ps.mendocina
5 I A S L L L L A V V A Q A Y G D F K C S L A -----V P E I T K D W V D M K D A C I K G M R N Q I Q Drosophila fer1
51 S N S K P L T G V V F E P F E E V K K E L M L V P T V P Q A S L A R Q K F T D Q S E A A L N E Q I N tomato ferritin

17 G E L A A R D Q Y M L H S R M Y A D W G L S K -----L H E R M D H E M S E E T Q H A D A L L K ----- Avop 2916
17 N E L I A I N Q Y F L H A R M Y E D W G L E K -----L G K H E Y H E S I D E M K H A D K L I K ----- AVop 5614
32 G E L A A R D Q Y F L H S R M Y A D W G F I K -----L Y E R I N H E M E E E T Q H A D A L L Q ----- Ps.stutzeri
17 G E L A A R D Q Y F I H S R M Y E D W G F S K -----L Y E R L N H E M E E E T Q H A D A L L R ----- Ps.aeruginosa
17 G E L A A R D Q Y F I H S R L Y E D W G F S K -----L Y E R I N H E M E E E T Q H A D A L L K ----- Ps.mendocina
51 E E I N A S Y Q Y L A M G A Y F S R D T V N R P G F A E H F F K A A K E E R E H G S K L V E Y L S M Drosophila fer1
101 V E Y N V S Y V Y H A M Y A Y F D R D N V A L K G L A K F F K E S S E E E R E H A E K F M E Y Q N K tomato ferritin

61 R I L F L Q G T P D M S P E -----P I N P G Q T V P -----E M L R N D L A L E Y H V R D A L A K G I E L C Avop 2916
61 R I L F L E G L P N L Q E L G K L L I G E H T K -----E M L E C D L K L E Q A G L P D L K A A I A Y C AVop 5614
76 R I L F L E G T P D M T P E -----P I H P G H T V P -----D M L R S D L A L E Y K V R A A L A Q G I A L A Ps.stutzeri
61 R I L L L E G T P R M R P D -----D I H P G T T V P -----E M L E A D L K L E R H V R A A L A K G I A L C Ps.aeruginosa
61 R I I F L E G V P D M V P N -----A F T F G Q T V P -----E A L K L D L A L E Y E V R A A L S K G I E L C Ps.mendocina
101 R G Q L T E G V S D L I N V P T V A K Q E W T D G A A A L S D A L D L E I K V T K S I R K L I Q T C Drosophila fer1
151 R G G K V K L Q S I L M P L S E F D H A E K G D A L Y A M E L A L S L E K L T N E K L L N L H A V A tomato ferritin

108 E Q -----L G D Y V T R N I L Q A Q L D D T E E D H A Y W L E Q Q L G L I D R I G -----L Q Avop 2916
109 E S -----V G D Y A S R E L L E D I L E -----S E E D H I D W L E T Q L D L I D K I G -----L E AVop 5614
123 E Q -----H G D Y E T R D I L A L Q L Q D T E E D H A Y W L E Q Q L G L I D R I G -----L Q Ps.stutzeri
108 E Q -----H K D E V S R D I L K A Q L A D T E E D H A Y W L E Q Q L G L I A R M G -----L E Ps.aeruginosa
108 E K -----H Q D Y Q T R D I L L T Q L K D T E E D H A Y W L E I Q L Q L I D K L G -----L E Ps.mendocina
151 E N K P Y N H Y H L V D Y L T G V Y L E E Q L H -----G Q R E L A G K L T L K K M M D T N G E -----L G Drosophila fer1
201 T R N -----N D V Q L A D F V E N E Y L Q E Q V E -----A I K K I S E Y V A Q L R R V D K G H G V W H F D tomato ferritin

148 N Y L Q S Q M Avop 2916
148 N Y L Q S Q M D E AVop 5614
163 N Y L Q S Q A G Ps.stutzeri
148 N Y L Q S Q I Ps.aeruginosa
148 K Y L Q S Q M Ps.mendocina
198 E F L F D K I L Drosophila fer1
248 Q M L L H E A E A L A tomato ferritin

```

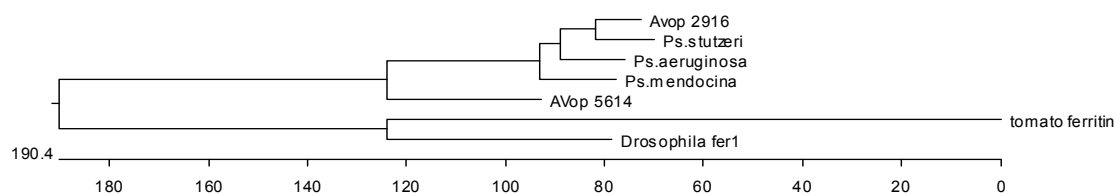
Εικόνα 1: Ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της βακτηριοφερριτίνης του *Azotobacter vinelandii* AvOP-2916 και AvOP-5614 με βακτηριοφερριτίνες από άλλα είδη.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει το ποσοστό ομοιότητας των βακτηριοφερριτίνων και φερριτίνων από άλλους οργανισμούς (Εικόνα 2)

Percent Identity								
	1	2	3	4	5	6	7	
1	████	49.7	81.8	73.4	70.8	22.2	16.3	1 Avop 2916
2	80.7	████	48.7	50.3	49.0	21.9	17.9	2 AVop 5614
3	20.9	83.4	████	76.6	72.7	20.1	14.8	3 Ps.stutzeri
4	32.9	79.0	28.1	████	72.7	20.9	17.0	4 Ps.aeruginosa
5	37.0	82.5	33.9	33.9	████	24.2	15.7	5 Ps.mendocina
6	220.0	223.0	244.0	234.0	202.0	████	28.6	6 Drosophila fer1
7	301.0	274.0	335.0	291.0	315.0	169.5	████	7 tomato ferritin
	1	2	3	4	5	6	7	

Εικόνα 2: Ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν και στο Alignment.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μεταξύ των ακολουθιών που χρησιμοποιήθηκαν και της εξεταζόμενης, υπάρχουν περιοχές έντονα συντηρημένες, αλλά και περιοχές με μικρότερη ή μηδενική ομολογία. Το δενδρόγραμμα που ακολουθεί, κατασκευάστηκε από την ευθυγράμμιση των παραπάνω αλληλουχιών. Οι κωδικοί πρόσβασης των αλληλουχιών της βακτηριοφερριτίνης που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ευθυγράμμισή τους (Alignment) όπως επίσης και κατά την κατασκευή του δενδρογράματος, αναφέρονται στην παράγραφο Β.13 (Εικόνα 3).



Εικ. 3: Φυλογενετικό δενδρόγραμμα μέσω της εφαρμογής Clustal W, που προέκυψε από την ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της βακτηριοφερριτίνης του *Azotobacter vinelandii* AvOP-2916 και AvOP-5614 με βακτηριοφερριτίνες άλλων οργανισμών.

Γ.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΩΔΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ AvOP-2916 ΚΑΙ AvOP-5614

Η ενίσχυση της αλληλουχίας των γονιδίων AvOP-2916 και AvOP-5614 έγινε μέσω της χρήσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) κατόπιν επιλογής κατάλληλων εκκινητών (Primers). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε βάσει του μήκους τους (αριθμού νουκλεοτιδίων) και της αλληλουχίας τους (περιεκτικότητα σε G-C). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού Nco I και Hind III ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση της ένθεσης στο φορέα έκφρασης pET28a(+).

Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

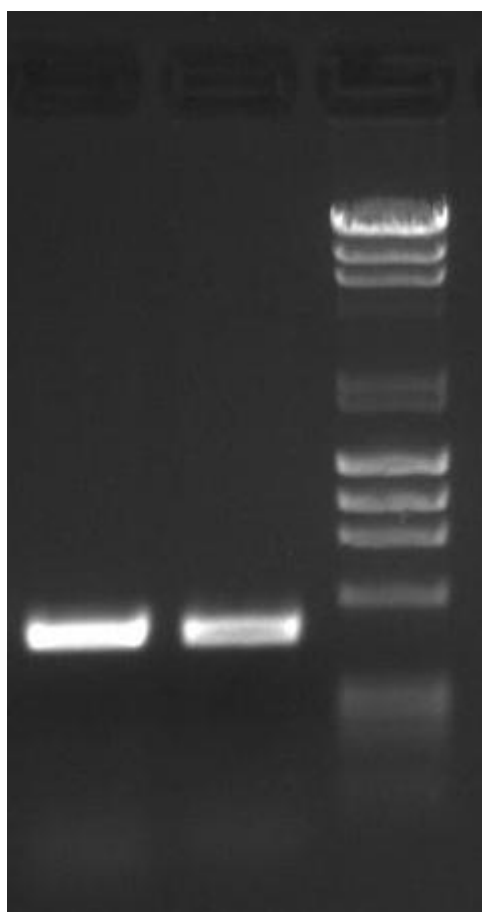
Γονίδιο	Locus tag	Ακολουθία αριστερού (F) και δεξιού (R) εκκινητή
AvOP 2916	Avin 10050	F: 5'-AAACCATGGAGGGGCAGGCGCAAGTCG-3' R: 5'-GGGAAGCTTCATCTGCGACTGCAGGTAG-3'
AvOP 5614	Avin 14460	F: 5'-GGCCATGGAAGGCGATAAGATAGTCATC-3'

R: 5'-GGGGAATTCTCATCCATTTGCGATTGCAG-3'

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης περιγράφηκαν στην παράγραφο Β.3. Το προϊόν της αντίδρασης που προέκυψε κατόπιν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,5%w/v (Εικ.3)

AVop2916 AVop5614 marker

1 2 3

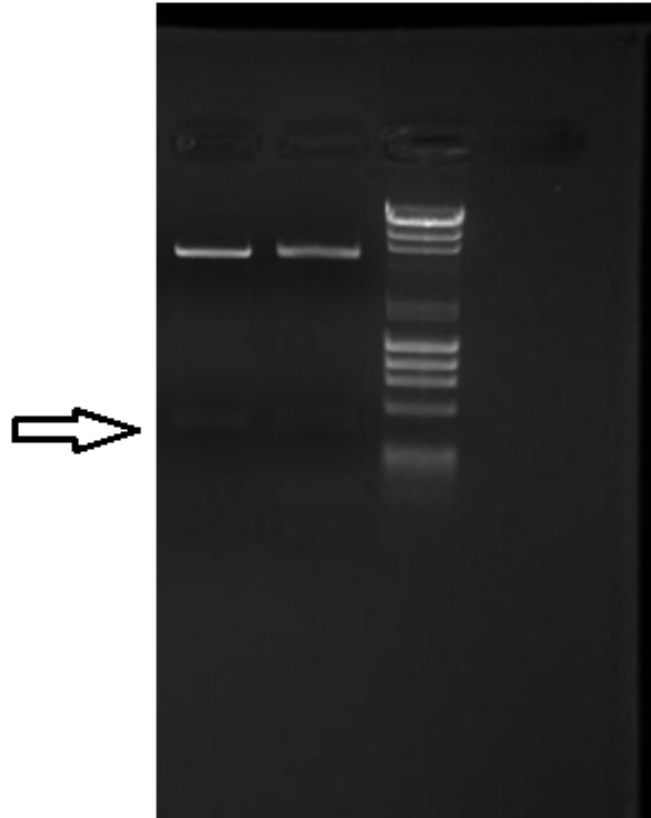


Εικ. 3: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1,5%w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων AvOP2916 και AvOP5614 *Azotobacter vinelandii* . 1-2. Προϊόν της αντίδρασης PCR. 3. Δείκτης μοριακών μεγεθών (DNA marker) See blue (invitrogen).

Η επιθυμητή ζώνη ανακτήθηκε από την πηκτή (Gel extraction). Στη συνέχεια, τα απομονωμένα τμήματα κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET28a(+) με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση. Έπειτα από τα προηγούμενα, πραγματοποιήθηκε

μετασχηματισμός ικανών κυττάρων του κατάλληλου στελέχους *E. coli* (XL-1 Blue) με το προϊόν της αντίδρασης της DNA λιγάσης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Για τον έλεγχο της ύπαρξης του ένθετου τμήματος DNA επιλέχθηκαν ενδεικτικά οκτώ αποικίες οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα για 16 ώρες στους 37⁰C. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του βρασμού. Ακολούθησε πέψη του προϊόντος PCR και του φορέα έκφρασης pET28a(+) με τα ένζυμα περιορισμού NCo I και Hind III για τη διαπίστωση της ύπαρξης του ένθετου τμήματος. Οι βακτηριακές αποικίες που περιείχαν τη σωστή ένθεση ανακαλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα για 16 ώρες στους 37⁰C, ώστε με τη χρήση της μεθόδου Miniprep (Qiagen) να απομονωθεί το πλασμίδιο σε υψηλότερη καθαρότητα από αυτό της μεθόδου βρασμού. Οι πέψεις των καθαρών πλασμιδίων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5%w/v. (Εικόνα 4).

AVop	AVop	marker
2916	5614	
1	2	3



Εικ.4 Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1,5%w/v των πέψεων των πλασμιδίων που απομονώθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Miniprep (Qiagen) 1-2. Ανάλυση των πέψεων, εκ των οποίων φαίνεται η ένθεση του τμήματος DNA και τα πλασμίδια 3. Δείκτης μοριακών μεγεθών (DNA marker). Με το βέλος δείχνονται τα μεγέθη του προϊόντος της PCR με 470 και 475 bp για τα γονίδια AvOP-2916 και AvOP-5614 αντίστοιχα.

Ακολούθησε αλληλούχιση (Sequencing) του πλασμιδίου (Εικόνες 5-6).

AvOP2916

GCTAGACGAACATTCCCTCTAGAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAGGGGC
AGGCGCAAGTCGTCTGACTATCTGAAGGAATTGCTGCGCGGCGAACTGGCGGCGCGCATCAGTACA
TGCTGCGCTCGCGGATGTACGCCGATTGGGGCCTGAGCAAGCTCCACGAGCGCATGGACCACGAGA
TGAGCGAGGAGACCCAGCATGCCGACGCTCTGCTGAAGCGCATCCTGTTCTGCAGGGAACGCCGG
ACATGAGTCCCGAGCCGATCAATCCGGGGCAGACCGTGCCGGAAATGCTGCGCAACGACCTGGCGC
TCGAGTACCACGTGTGCGACGCGCTGGCCAAGGGCATCGAACTCTGCGAACAGCTCGGGCGACTATG
TCACCCGCAACATCCTCCAGGCGCAGCTCGACGACACCGAGGAAGACCATGCCTACTGGCTGGAGC
AGCAGCTCGGCCTGATCGATCGCATCGGCCTGCAGAACTACCTGCAGTCGCAGATGAAGCTTGCGGC
CGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGA
GTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGG
GGTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCAT
TAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCG
CTCCTTCGCTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGG
GCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG
GTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT
AATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATCTTTGATTTATAAGG
ATTTTGCCGATTGCTATGGTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTACGCGATTACAAATATACGCT
ACATTTAGTGGCATTTCCGAATGTGGGCGGACCCTTTTTTGTATTTTTTCTAGT

Εικόνα 5: Το DNA του AvOP2916. Με κόκκινο, δείχνονται οι θέσεις των primers που αναφέρθηκαν στην παράγραφο Γ.2

AvOP5614

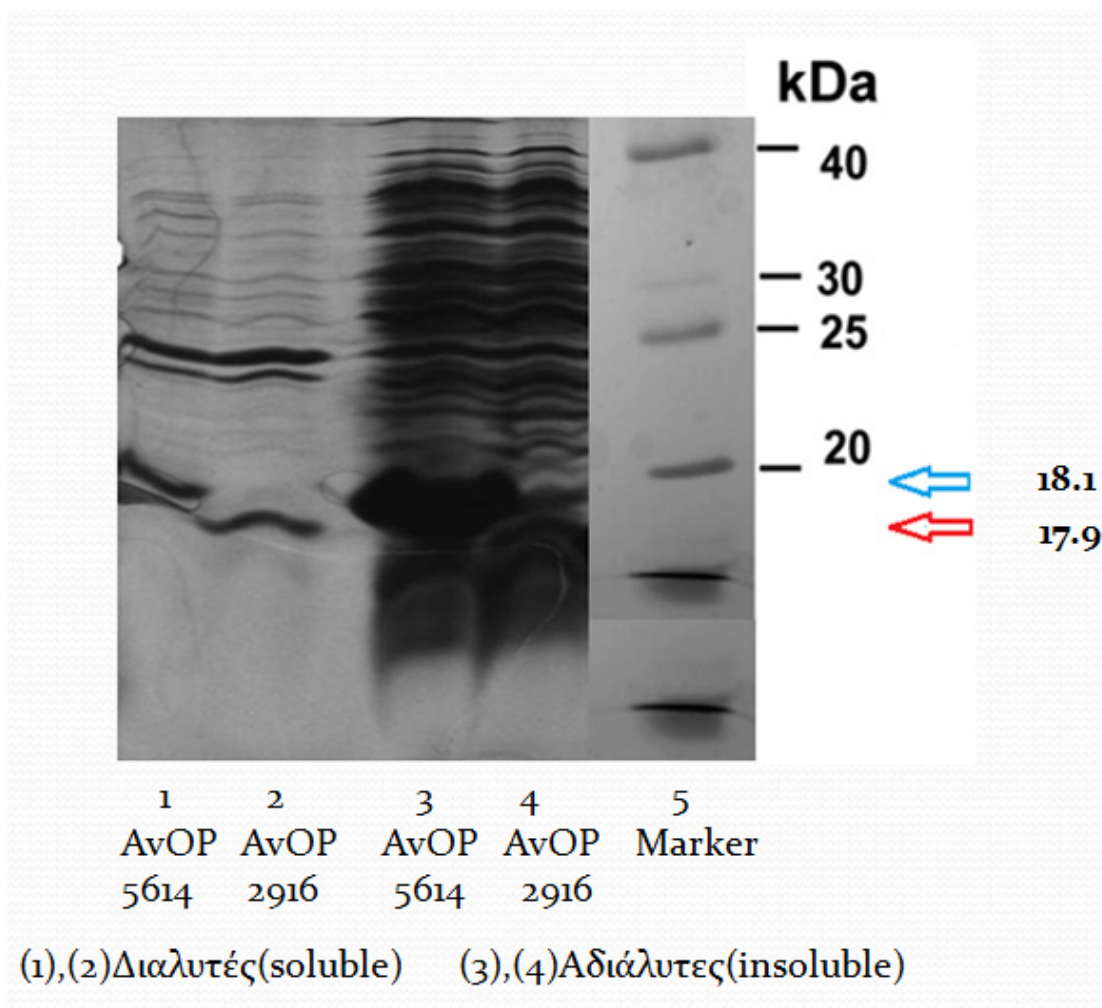
CTTTTGACGGTACTTTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAAGG
CGATAAGATAGTCATCCAGCACCTCAACAAGATCCTCGGTAATGAGTTGATCGCGATCAACCAGTAC
TTTCTACATGCACGCATGTATGAAGACTGGGGGCTGGAGAACTCGGCAAGCATGAGTATCACGAA
TCCATCGATGAGATGAAGCATGCCGACAAATTGATCAAGCGTATTCTGTTTCTCGAGGGCCTGCCCA
ACCTCCAAGAGCTCGGCAAGCTTCTCATCGGTGAACACACCAAGGAAATGCTCGAGTGTGATCTGAA
ACTTGAGCAAGCAGGGTTGCCCGACCTGAAGGCCGCCATTGCCTACTGCGAAAGCGTTGGGGACTA
TGCCAGCCGCGAATTGCTAGAAGACATCCTTGAATCCGAAGAAGACCATATCGATTGGCTGGAAACC
CAACTGGACTTGATCGACAAGATCGGTCTGGAAAATTATCTGCAATCGCAAATGGATGAGAATTCGA
GCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA
CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGG
GGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGG
GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACA
CTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCC
AAAAAATTGATTAGGGTGTGTTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTT
GACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
CGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGATTTGCGATTTGCGCTATGGTAAAAATGAGCTGATTTAACAA
AATTAACGCGAATTTAACAAAATATTACGGCTTACAATTAAGTGGCACTTTTCCGGGAAAGT

Εικόνα 6: Το DNA του AvOP5619. Με κόκκινο, δείχνονται οι θέσεις των primers που αναφέρθηκαν στην παράγραφο Γ.2

Γ.3. ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ AvOP2619, AvOP5614 ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΕΡΡΙΤΙΝΗ ΣΤΟ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Azotobacter vinelandii* AvOP ΣΤΟ *E.coli*

Ικανά κύτταρα (Competent cells) *E. coli* BL21 μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET28a(+). Οι αποικίες από το μετασχηματισμό, ελέγχθηκαν για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η επαγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε σε υγρές καλλιέργειες σε θερμοκρασία 30⁰C με την προσθήκη β-D-ισοπροπυλικής-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG), η οποία αποτελεί τον επαγωγέα του προαγωγέα του πλασμίδιου έκφρασης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια βακτηρίων τα οποία έφεραν τον φορέα έκφρασης με το τμήμα ένθεσης. Ακολούθησε θραύση των κυττάρων με υπέρηχους και έγινε διαχωρισμός των

πρωτεϊνών σε διαλυτές και αδιάλυτες. Οι πρωτεΐνες για τις οποίες γίνεται λόγος αναλύθηκαν αρχικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE (Εικ. 7). Οι αριθμοί παραστάνουν διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 20%, ολικών πρωτεϊνών, των μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pET28(+), κυττάρων *E. coli* BL21. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 6 ώρες μετά την προσθήκη IPTG (1mM) και επώαση στους 37°C. Με το κόκκινο βέλος αναπαρίσταται η ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη του AvOP-2916 και με το μπλέ του AvOP-5614.

- Στήλη 1: Διαλυτές πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που έχουν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET28(+) ο οποίος φέρει το γονίδιο ένθεσης AvOP-5614, έπειτα από την προσθήκη IPTG και τη θραύση των κυττάρων με υπέρηχους.
- Στήλη 2: Διαλυτές πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που έχουν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET28(+) ο οποίος φέρει το

γονίδιο ένθεσης AnOP-2916, έπειτα από την προσθήκη IPTG και τη θραύση των κυττάρων με υπέρηχους

- Στήλη 3: Αδιάλυτες πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που έχουν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET28(+) ο οποίος φέρει το γονίδιο ένθεσης AnOP-5614, έπειτα από την προσθήκη IPTG και τη θραύση των κυττάρων με υπέρηχους.
- Στήλη 4: Αδιάλυτες πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που έχουν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET28(+) ο οποίος φέρει το γονίδιο ένθεσης AnOP-2916, έπειτα από την προσθήκη IPTG και τη θραύση των κυττάρων με υπέρηχους
- Στήλη 5: Marker

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 7, η ανάλυση των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων *E. coli* τα οποία μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pET28(+) ο οποίος έφερε τα γονίδια ένθεσης AnOP-2916 και AnOP-5614, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της πρωτεΐνης που μελετήθηκε, ήτοι του προϊόντος των γονιδίων AnOP-2916 και AnOP-5614. Στο σχήμα παρατηρείται η αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης (στήλες 1-4). Στις στήλες 3-4 παρατηρείται υψηλή συσσώρευση αδιάλυτης πρωτεΐνης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σίδηρος ανήκει στην ομάδα των απαραίτητων μακροστοιχείων για την ανάπτυξη τόσο των ευκαρυωτικών, όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών και υπάρχει με τις μορφές Fe^{2+} και Fe^{3+} οι οποίες είναι εύκολα ανταλλάξιμες (Andrews 1998; Crichton and Pierre, 2001).

Ο σίδηρος ενσωματώνεται σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών. Αυτές με τη σειρά τους λαμβάνουν μέρος σε πολλές σημαντικές βιολογικές αντιδράσεις, όπως στη φωτοσύνθεση, στη κυτταρική αναπνοή, στη μεταφορά οξυγόνου, στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, στη ρύθμιση γονιδίων και τη βιοσύνθεση του DNA, στην πρόσληψη του αζώτου κ.λπ. Όλοι σχεδόν οι οργανισμοί, πρέπει να βρουν τρόπους για να αποθηκεύσουν το σίδηρο σε μία μη τοξική, εύκολα χρησιμοποιούμενη μορφή (Crichton and Ward, 1992; Wong, 2009).

Οι φερριτίνες και οι βακτηριοφερριτίνες είναι πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου, οι οποίες προστατεύουν τους διάφορους οργανισμούς από το οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και χρησιμεύουν ως πηγή σιδήρου όταν παρατηρείται έλλειψη του τελευταίου. Η κύρια διαφορά μεταξύ φερριτινών και βακτηριοφερριτινών, είναι ότι οι τελευταίες περιέχουν μία ομάδα αίμης (κυρίως πρωτοπορφυρίνη IX) (Yariv *et al.*, 1981; Romão *et al.*, 2000a; Coelho *et al.*, 2001).

Το *Azotobacter vinelandii* είναι ένας μη συμβιωτικός, αρνητικός κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιος οργανισμός, ικανός να δεσμεύει N_2 . Στο γονιδίωμα του *A. vinelandii* ΑνΟΡ, βρέθηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν για φερριτίνες, από τα οποία εξετάστηκαν τα δύο: ΑνΟΡ-2916 και ΑνΟΡ-5619. Τα γονίδια αποτελούνται από 470 και 475 νουκλεοτίδια με 154 και 156 αμινοξέα και με μοριακό βάρος περίπου 17,9 και 18,1 kDalton αντίστοιχα και ίδιο θεωρητικό ηλεκτρικό σημείο (pI) 4,5 (Madigan *et al.*, 2005).

Τα γονίδια ΑνΟΡ-2916 και ΑνΟΡ-5619 κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pET28a(+). Εκφράστηκαν ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) και εξετάστηκε το επίπεδο έκφρασης στο διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα. Ακολούθησε θραύση των κυττάρων με υπερήχους και έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε διαλυτές και αδιάλυτες.

Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι η εξεταζόμενη πρωτεΐνη παρήχθη και η ποσότητά της ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό με την προσθήκη IPTG. Επίσης, η έκφραση των αδιάλυτων πρωτεϊνών στο ΑνΟΡ-5614 είναι σαφώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του ΑνΟΡ-2916.

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που παρατηρήθηκε κατά την ευθυγράμμιση των ακολουθιών (alignment) είναι ότι τα δύο γονίδια του *Azotobacter vinelandii*, παρουσιάζουν ομολογία περίπου 49%, ενώ μεταξύ του AvOP-2916 και του *P. Stutzeri* υπάρχει ομολογία πάνω από 80%. Τέλος, μικρότερη ομολογία παρουσιάζουν με τις ευκαρυωτικές φερριτίνες, πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι φερριτίνες και βακτηριοφερριτίνες, παρά την κοινή καταγωγή τους, διαφέρουν επίσης αρκετά μεταξύ τους.

Σε πειράματα που έχουν γίνει εξάλλου στο ριζοβακτήριο *P. putida* KT2440, έδειξαν ότι υπάρχουν δύο γονίδια βΦΤ, Bfralpha και Bfrbeta. Η έκφραση των bfralpha και bfrbeta ενισχύθηκε από την έκθεση σιδήρου, και ήταν μέγιστη σε γρήγορα αυξανόμενα κύτταρα σε υψηλό περιβάλλον σιδήρου. Η απώλεια του Bfralpha ή του Bfrbeta οδήγησε χωριστά σε μια σημαντική μείωση (περίπου 17%) των επιπέδων σιδήρου στο κύτταρο και η διαγραφή και των δύο μείωσε τα κυτταρικά επίπεδα σιδήρου κατά 38% σε σχέση με τον άγριο τύπο. Οι μεταλλάξεις ποίκιλαν στη δυνατότητά τους να αυξηθούν σε μέσο με χαμηλό επίπεδο σιδήρου ενώ η αύξηση (ποσοστό και τελική πυκνότητα κυττάρων) των ενιαίων μεταλλάξεων και του άγριου τύπου ήταν παρόμοια, ενώ αυτή της διπλής μετάλλαξης μειώθηκε σημαντικά. Οι μεταλλάξεις που στερούνται Bfralpha ή/και Bfrbeta δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή σε σχέση με τον άγριο τύπο πάνω στην ευαισθησία από τοξικότητα λόγω των (ROS). Συλλογικά, τα στοιχεία δείχνουν ότι ενώ τα Bfralpha και Bfrbeta μπόρεσαν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, η εξαρτώμενη λειτουργία αλληλεπίδρασης δεν μπορεί να αφεθεί απέξω. Επιπλέον, ανεξάρτητα από το μηχανισμό, ένα αρχικό όφελος των βΦΤ στο *P. putida* KT2440 εμφανίζεται να είναι η αύξηση της επιβίωσής του στο περιβάλλον με την ενίσχυση της ανοχής του σε έλλειψη σιδήρου (Chen *et al.*, 2010).

Ως μελλοντική εργασία, θα μπορούσαμε να ασχοληθούμε με σίγηση των γονιδίων της βακτηριοφερριτίνης για να διαπιστώσουμε την αντίδραση των βακτηρίων και τις πιθανές εναλλακτικές στρατηγικές τους στη λήψη και αποθήκευση του σιδήρου. Επιπλέον, θα μπορούσαμε με διάφορες μεταλλάξεις να παρακολουθήσουμε την αφομοίωση του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο, τον σχηματισμό του πυρήνα σιδήρου, την κινητική των αντιδράσεων της φερροξειδοποίησης και την πιθανή αντικατάσταση των ιόντων σιδήρου στο διπύρηνο κέντρο από άλλα μέταλλα που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με το σίδηρο, όπως ο Zn, ένα φαινόμενο το οποίο έχει παρατηρηθεί σε ορισμένα βακτήρια και αξίζει περαιτέρω διερεύνησή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R. and Andrews, S.C.** (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *Journal of Bacteriology* 181(5): 1415-1428.
- Al-Massad, F., Kadir, F. and Moore, G.** (1992) Animal ferritin and bacterioferritin contain quinines. *The Journal of Biochemistry* 283(Pt 1): 177-180.
- Almiron, M., Link, A.J. and Furlong, D.** (1992) A novel DNA binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Development* 6: 2646-2654.
- Andrews, S., Findlay, J., Guest, J., Harrison, P., Keen, J. and Smith, J.** (1991) Physical, chemical and immunological properties of the bacterioferritins of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1078(1): 111-116.
- Andrews, S., Harrison, P. and Guest, J.** (1989). Cloning, Sequencing, and Mapping of the Bacterioferritin Gene (bfr) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 171(7): 3940- 3947.
- Andrews, S., Robinson, A. and Rodríguez-Quñones, F.** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 27: 215-237.
- Andrews, S., Smith, J., Guest, J. and Harrison, P.** (1989) Amino acid sequence of the bacterioferritin (cytochrome b1) of *Escherichia coli*-K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158(2): 489-496.
- Andrews, S., Smith, J., Yewdall, S., Guest, J. and Harrison, P.** (1991). Bacterioferritins and ferritins are distantly related in evolution. Conservation of ferroxidase-center residues. *FEBS Letters* 293(1-2): 164-168.
- Andrews S.C.** (1998) Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 40: 281-351.
- Andrews, S.C., Le Brun, N.E., Barynin, V., Thomson, A.J., Moore, G.R., Guest, J.R. and Harrison, P.M.** (1995) Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme free variants. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 23268-23274.
- Archibald, F.** (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology Letters* vol. 19: 29-32.
- Baaghil, S., Lewin, A., Moore, G. R. and Le Brun, N. E.** (2003) Core formation in *Escherichia coli* bacterioferritin requires a functional ferroxidase center. *Biochemistry* 42: 14047-14056.

- Bartsch, R., Kakuno, T., Horio, T. and Kamen, M.** (1971). Preparation and Properties of *Rhodospirillum rubrum* Cytochromes c₂, c₆, and b_{557.5}, and Flavin Mononucleotide Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 246(14): 4489-4496.
- Beinert, H., Holm, R. H. and Munck, E.** (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-659.
- Bereswill, S., Waidner, U., Odenbreit, S., Lichte, F., Fassbinder, F., Bode, G. and Kist, M.** (1998) Structural, functional and mutational analysis of the pfr gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 144: 2505-2516.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E.** (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235-242.
- Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., Barra, D., Longhi, C., Valenti, P. and Chiancone, E.** (1997) A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 3259-3265.
- Bou-Abdallah, F., Lewin, A., Le Brun, N., Moore, G. and Chasteen, N.** (2002). Iron Detoxification Properties of *Escherichia coli* Bacterioferritin. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(4): 37064-37069.
- Bullen, J., Rogers, H. and Griffiths, E.** (1978). Role of iron in bacterial infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 80: 1-35.
- Bulen, W., LeComte, J. and Lough, S.** (1973). A hemoprotein from *Azotobacter* containing non-heme iron: Isolation and crystallization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 54(4): 1274-1281.
- Carrondo, M.** (2003). Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *The EMBO Journal* 22(9): 1959-1968.
- Chasteen, N.** (1998). Ferritin. Uptake, storage, and release of iron. *Metal Ions in Biological Systems* 35: 479-514.
- Cheesman, M., Kadir, F., Al-Basseet, J., Al-Massad, F., Farrar, J., Greenwood, C., Thomson, A. and Moore, G.** (1992). E.p.r. and magnetic circular dichroism spectroscopic characterization of bacterioferritin from *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *The Journal of Biochemistry* 286: 361-367.
- Cheesman, M., Le Brun, N., Kadir, F., Thomson, A., Moore, G., Andrews, S., Guest, J., Harrison, P., Smith, J. and Yewdall, S.** (1993). Haem and non-haem iron sites in *Escherichia coli* bacterioferritin: spectroscopic and model building studies. *The Journal of Biochemistry* 292: 47-56.

- Cheesman, M., Thomson, A., Greenwood, C., Moore, G. and Kadir, F.** (1990). Bis-methionine axial ligation of haem in bacterioferritin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature* 346: 771-773.
- Chen, M. and Crichton, R.** (1982). Purification and characterization of a bacterioferritin from *Azotobacter Chroococcum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 707: 1-6.
- Chen S., Bleam WF., Hickey WJ.,** (2010) Molecular analysis of two bacterioferritin genes (bfr{alpha} and bfr{beta}) in the model *Rhizobacterium, Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology* (16):5335-5343.
- Chipperfield, J. R. and Ratledge, C.** (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 13: 165-168.
- Cobessi, D., Huang, L., Ban, M., Pon, N., Daldal, F. and Berry, E.** (2002). The 2.6 Å resolution structure of *Rhodobacter capsulatus* bacterioferritin with meter-free dinuclear site and heme iron in a crystallographic 'special position'. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* D58: 29-38.
- Coelho, A., Macedo, S., Matias, P., Thompson, A., LeGall, J. and Carrondo, M.** (2001). Structure determination of bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans* by the MAD method at the Fe *K*-edge. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* D57: 326-329.
- Crichton, R. R. and Pierre, J. L.** (2001) Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* 14: 99-112.
- Crichton, R. R. and Ward, R. J.** (1992) Iron metabolism-new perspectives in view. *Biochemistry* 31: 11255-11264.
- Dautant, A., Meyer, J., Yariv, J., Precigoux, G., Sweet, R., Kalb, A. and Frolow, F.** (1998). Structure of a monoclinic crystal form of cytochrome *b1* (Bacterioferritin) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* D54: 16-24.
- Deeb, S. and Hager, L.** (1964). Crystalline cytochrome *b1* from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 239(4): 1024-1031.
- Evans Jr., D., Evans, D., Lampert, H. and Nakano, H.** (1995). Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. *Gene* 153(1): 123-127.
- Frolow, F., Kalb(Gilboa), A. and Yariv, J.** (1994). Structure of a unique two-fold symmetric haem-binding site. *Nature Structural and Molecular Biology* 1: 453-460.

- Frolow, F., Kalb(Gilboa), A. and Yariv, J.** 1993. Location of haem in bacterioferritin of *Escherichia.coli*. Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography D49: 597-600.
- Grant, R.A., Filman, D.J., Finkel, S.E., Kolter, R. and Hogle, J.M.** (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. Nature Structural and Molecular Biology 5: 294-303.
- Grossman, M., Hinton, S., Minak-Bernero, V., Slaughter, C. and Stiefel, E.** (1992). Unification of the ferritin family of proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 89(6): 2419-2423.
- Harker, A. and Wullstein, L.** (1985). Evidence for Two Nonidentical Subunits of Bacterioferritin from *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology 162(2): 651-655.
- Harrison, P. and Arosio, P.**(1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1275(3): 161-203.
- Harrison, P., Hempstead, P., Artymiuk, P. and Andrews, S.** (1998). Structure-function relationships in the ferritins. Metal Ions in Biological Systems 35: 435-477.
- He-Li Liu, Hui-Na Zhou, Wei-Man Xing, Jian-Feng Zhao, Shu-Xing Lia, Ju-Fu Huang, Ru-Chang Bi,** (2004) 2.6 Å resolution crystal structure of the bacterioferritin from *Azotobacter vinelandii*. FEBS Letters 573(1-3): 93-98.
- Holmes, D.S. and Qiugley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical Biochemistry vol. 114:193-197.
- Ilari, A., Latella, M., Ceci, P., Ribacchi, F., Su, M., Giangiacomo, L., Stefanini, S., Chasteen, D. and Chiancone, E.** (2005). The unusual intersubunit ferroxidase center of *Listeria innocua* Dps is required for hydrogen peroxide detoxification but not for iron uptake. A Study with sitespecific mutants. Biochemistry 44: 5579-5587.
- Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E. and Tsernoglou, D.** (2000) The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. Nature Structural and Molecular Biology 7: 38-43.
- Imbert, M. and Blondeau, R.** (1998) On the iron requirement of *lactobacilli* grown in chemically defined medium. Current Microbiology 37: 64-6.
- Jin, W., Takagi, H., Pancorbo, B. and Theil, E.** (2001). “Opening” the Ferritin Pore for Iron Release by Mutation of Conserved Amino Acids at Interhelix and Loop Sites. Biochemistry 40: 7525-7532.
- Kadir, F. and Moore, G.** (1990). Bacterial ferritin contains 24 haem groups. FEBS Letters 271(1-2): 141-143.

- Keech, A., Le Brun, N., Wilson, M., Andrews, S., Moore, G. and Thomson, A.** (1997). Spectroscopy Studies of Cobalt(II) Binding to *Escherichia coli* Bacterioferritin. *The Journal of Biological Chemistry* 272(1): 422-429.
- Keilin, D.** (1934). Cytochrome and the supposed direct spectroscopic observation of oxidase. *Nature* 133: 290-291.
- Keilin, D. and Harpley, C.** (1941). Cytochrome System in Bacterium *Escherichia.coli* Commune. *The journal of Biochemistry* 35: 688-692.
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. and Melton, T.** (2003) Genus *Azotobacter*. In G. Garrity *et al* (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. II, The proteobacteria: 323-442.
- Kennedy and Bishop,** (2004) Genetics of Nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species of *Azotobacter*. History and current status. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon and W.E. Newton (eds.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in Free-Living Bacteria*: 27-52.
- Laemli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 376:514-516.
- Laulhère, J. and Briat, J.** (1993). Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *The Journal of Biochemistry* 290(Pt 3): 693-699.
- Lawson, D., Artymiuk, P., Yewdall, S., Smith, J., Livingstone, J., Treffry, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Thomas, C., Shaw, W. and Harrison, P.** (1991). Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* 349: 541-544.
- Le Brun, N., Andrews, S., Guest, J., Harrison, P., Moore, G. and Thomson, A.** (1995). Identification of the ferroxidase centre of *Escherichia coli* bacterioferritin. *The Journal of Biochemistry* 312: 385-392.
- Le Brun, N., Keech, A., Mauk, M., Mauk, A., Andrews, S., Thomson, A. and Moore, G.** (1996). Charge compensated binding of divalent metals to bacterioferritin: H⁺ release associated with cobalt(II) and zinc(II) binding at dinuclear metal sites. *FEBS Letters* 397(2-3): 159-163.
- Le Brun, N., Wilson, M., Andrews, S., Guest, J., Harrison, P., Thomson, A. and Moore, G.** (1993). Kinetic and structural characterization of an intermediate in the biomineralization of bacterioferritin. *FEBS Letters* 333(1-2): 197-202.
- Levi, S., Santambrogio, P., Corsi, B., Cozzi, A. and Arosio, P.** (1996). Evidence that residues exposed on the three-fold channels have active roles in the mechanism of ferritin iron incorporation. *The Journal of Biochemistry* 317(Pt 2): 467-473.

- Liu, H. L., Zhou, H. N., Xing, W. M., Zhao, J. F., Li, S. X., Huang, J. F. and Bi, R. C.** (2004) 2.6 Å resolution crystal structure of the bacterioferritin from *Azotobacter vinelandii*. FEBS Letters 573: 93-8.
- Liu, X. and Theil, E.** (2005). Ferritins: Dynamic Management of Biological Iron and Oxygen Chemistry. Accounts of Chemical Research 38(3): 167-175.
- Macedo, S., Romao, C., Mitchell, E., Matias, P., Liu, M., Xavier, A., LeGall, J., Teixeira, M., Lindley, P. and Carrondo, M.** (2003). The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*. Nature Structural and Molecular Biology 10(4): 285-290.
- Madigan M., Martinko J., Parker J.,** (2005) Πανεπιστημιακές εκδόσεις κρήτης BROCK, Βιολογία των Μικροοργανισμών, vol. I: 433-434.
- Maldonado, R., Jiminez, J. and Casadesus, J.** (1994) Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle Journal of Bacteriology 176: 3911-3919.
- Mann, S., Williams, J., Treffry, A. and Harrison, P.** (1987). Reconstituted and Native Ironcores of Bacterioferritin and Ferritin. Journal of Molecular Biology 198(3): 405-416.
- Moore, G., Cheesman, M., Kadir, F., Thomson, A., Yewdall, S. and Harrison, P.** (1992). Spectroscopic identification of the haem axial ligands of haemoferritin and location of possible haem-binding sites in ferritin by molecular modeling. The Journal of Biochemistry 287: 457-460.
- Moore, G., Kadir, F. and Al-Massad, F.** (1992). Haem Binding to Ferritin and Possible Mechanisms of Physiological Iron Uptake and Release by Ferritin. Journal of Inorganic Biochemistry 47(3-4): 175-181.
- Moore, G., Mann, S. and Bannister, J.** (1986). Isolation and Properties of the Complex Nonheme-iron-containing Cytochrome *b557* (bacterioferritin) from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Inorganic Biochemistry 28(2-3): 329-336.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic application of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51 pt 1:263-73.
- Mullis, K., Faloona, F.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350.
- Notredame, C., Higgins, D. and Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. Journal of Molecular Biology 302: 205-217.
- Orino, K., Miura, T., Muto, S. and Watanabe, K.** 2005. Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. NCBI Resources DNA Sequencing 16(1): 58-64.

- Pandey, A., Bringel, F. and Meyer, J. M.** (1994) Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 735-739.
- Pead, S., Durrant, E., Webb, B., Larsen, C., Heaton, D., Johnson, J. and Watt, G.** (1995). Metal Ion Binding to Apo, Holo, and Reconstituted Horse Spleen Ferritin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 59: 15-27.
- Posey, J. E. and Gherardini, F. C.** (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288: 1651-1653.
- Price, D. and Joshi, J.** (1983). Ferritin: Binding of beryllium and other divalent metal ions. *The Journal of Biological Chemistry* 258(18): 10873-10880.
- Robert Janowski, 1 Tamar Auerbach-Nevo, and 2 Manfred S. Weiss** (2008) Bacterioferritin from My Bacterioferritin from *Mycobacterium smegmatis* contains zinc in its di-nuclear site. *Protein Science* July 2008, 17(7): 1138–1150.
- Robson, R.L., Chesshyre, J.A., Wheeler, C., Jones, R., Woodley, P.R and Postgate, J.R.** (1984) Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*.. *Journal of General Microbiology*: 1603-1612.
- Romão, C., Louro, R., Timkovich, R., Lubben, M., Liu, M., LeGall, J., Xavier, A. and Teixeira, M.** (2000). Iron-coproporphyrin III is a Natural Cofactor in Bacterioferritin from the Anaerobic Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEBS Letters* 480(2-3): 213-216.
- Romão, C., Regalla, M., Xavier, A., Teixeira, M., Liu, M. and Le Gall, J.** (2000). A Bacterioferritin from the Strict Anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 *Biochemistry* 39(23): 6841-6849.
- Simon C. Andrews, Andrea K. Robinson, Francisco Rodriguez-Quinones** (2003) Bacterial iron homeostasis. *School of Animal and Microbial Sciences*. vol. 27, Issue2-3: 215-237.
- Smith, J.** (2004). The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 30(3):173-185.
- Smith, J., Ford, G., Harrison, P., Yariv, J. and Kalb, A.** (1989). Molecular Size and Symmetry of Bacterioferritin of *Escherichia coli*. X-ray Crystallographic Characterization of Four Crystal Forms. *Journal of Molecular Biology* 205(2): 465-467.
- Smith, J., Quirk, A., Plank, R., Diffin, F., Ford, G. and Harrison, P.** (1988) The identity of *Escherichia coli* bacterioferritin and cytochrome b1. *The Journal of Biochemistry* 255: 737-740.

Stiefel, E. and Watt, G. (1979). *Azotobacter* cytochrome b557.5 is a bacterioferritin. *Nature* 279: 81-83.

Stillman, T., Hempstead, P., Artymiuk, P., Andrews, S., Hudson, A., Treffry, A., Guest, J. and Harrison, P. (2001). The High-resolution X-ray Crystallographic Structure of the Ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*; Comparison with Human H Ferritin (HuHF) and the Structures of Fe³⁺ and Zn²⁺ Derivatives. *Journal of Molecular Biology* 307: 587-603.

Stookey, L. (1970). Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron. *Analytical Chemistry* 42(7): 779-781.

Su., M., Cavallo, S., Stefanini, S., Chiancone, E. and Chasteen, N. (2005). The So Called *Listeria innocua* Ferritin Is a Dps Protein. Iron Incorporation, Detoxification, and DNA Protection Properties. *Biochemistry* 44: 5572-5578.

Swartz, L., Kuchinskas, M., Li, H., Poulos, T. L. and Lanzilotta, W. N. (2006) Redoxdependent structural changes in the *Azotobacter vinelandii* bacterioferritin: new insights into the ferroxidase and iron transport mechanism. *Biochemistry* 45: 4421-4428.

Takeda, S., Ohta, M., Ebina, S. and Nagayama, K. (1993). Cloning, expression and characterization of horse L-ferritin in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1174(2): 218-220.

Theil, E. (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Reviews in Biochemistry* 56: 289-315.

Thompson, J.P. and Skerman, V.B.D. (1979) *Azotobacteriaceae*, the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen fixing bacteria: 417-418.

Treffry, A., Zhao, Z., Quail, M., Guest, J. and Harrison, P. (1997). Dinuclear Center of Ferritin: Studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites. *Biochemistry* 36: 432-441.

Tsugita, A. and Yariv, J. (1985). Preliminary results for the primary structure of bacterioferritin of *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry* 231: 209-212.

Uthaiwan Suttisansanee, (2006). Thesis: Biochemistry in bacterioferritin. University of Waterloo, Ontario, Canada: 9-19.

Wai, S.N., Nakayama, K., Umene, K., Moriya, T. and Am.ako, K. (1996) Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: Contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Molecular Microbiology* 20: 1127-1134.

Watt, G.D., Frankel, R.B., Papaefthymiou, G.C., Spartalian, K. and Stiefel, E.I. (1986) Redox properties and mossbauer spectroscopy of *Azotobacter vinelandii* bacterioferritin. *Biochemistry* 25: 4330-4336.

Wiedenheft B., Mosolf J., Willits D., Yeager M., Dryden K., Young M. and Douglas T. (2005). An archaeal antioxidant: Characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proceedings in the National Academy of Science* 102(30): 10551-10556.

Weinberg, E. D. (1997) The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine* 40: 578-83.

Wong Steve (2009) Thesis: Catalysis of Iron core formation in *Escherichia coli* bacterioferritin. The University of British Columbia October 2009:1-19.

Yang, X., Le Brun, N. E., Thomson, A. J., Moore, G. R. and Chasteen, N. D. (2000) The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin. *Biochemistry* 39: 4915-4923.

Yariv, J. (1983). The identity of bacterioferritin and cytochrome b1. *BJ Letters*. 211-527.

Yariv, J., Kalb, A., Sperling, R., Bauminger, E., Cohen, S. and Ofer, S. (1981). The composition and the structure of bacterioferritin of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 197: 171-175.

Zhao, G.H., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E. and Chasteen, N.D. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells-A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 27689-27696.