

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

**Κλωνοποίηση και μελέτη της περιοχής έναρξης αντιγραφής του  
πλασμιδίου pSMA198 του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198  
στον *Lactococcus lactis* MG1363**

**ΕΛΕΝΗ Α.Δ. ΜΑΪΣΤΡΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**



**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

**ΜΕΛΗ**

ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ ΠΕΤΡΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ



## **Ευχαριστίες**

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

*Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τη συνδρομή τους στην εκπόνηση της εργασίας αυτής:*

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

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

*Στη συνέχεια, τον Δρ. Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου, για το γεγονός ότι με επέλεξε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια και την ολοκλήρωση της αυτής της μελέτης. Επιπλέον τον ευχαριστώ για το χρόνο που μου διέθεσε και για όλα όσα με δίδαξε.*

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

*Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για την άψογη συνεργασία μας.*

*Την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη στήριξη και συμπαράστασή τους καθώς και για τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

*Ελένη Α-Δ Μαΐστρου*



---

## Περίληψη

Ο *Streptococcus macedonicus* αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος του γένους *Streptococcus* και απομονώνεται κυρίως από ζυμούμενα τρόφιμα όπως και ο *Streptococcus thermophilus*. Όμως ο *S. macedonicus* είναι συγγενικό είδος με τα ευκαιριακά συμβιωτικά παθογόνα του συμπλέγματος *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*.

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε το πλασμίδιο pSMA198, που απομονώθηκε από το γαλακτοκομικό στέλεχος *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 με στόχο να βρεθούν νέα στοιχεία σε σχέση με τον κύριο οικολογικό θώκο του βακτηρίου αυτού. Με βάση τις ομοιότητες που είχαν τα προφίλ των αλληλουχιών της πρωτεΐνης έναρξης της αντιγραφής (Rep) και της θέσης έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του πλασμιδίου, το pSMA198 ανήκει στην οικογένεια πλασμιδίων περιορισμένου εύρους ξενιστών pCI305/pWV02. Τα πλασμίδια της οικογένειας αυτής βρίσκονται κυρίως στα είδη του γένους *Lactococcus* ενώ το πλασμίδιο pSMA198 είναι το πρώτο που αναφέρεται και εντοπίζεται στο γένος *Streptococcus*. Η συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας του pSMA198 πάνω στις περιοχές *ori*, στην αρχή έναρξης της μεταφοράς του (*oriT*) και σε όλο το μήκος του πλασμιδίου εμφάνισαν έναν υψηλό βαθμό ομοιότητας με τα πλασμίδια pSK11, pVF22 και pIL5. Τα πλασμίδια αυτά έχουν απομονωθεί από στελέχη του *Lactococcus lactis* που προέρχονται από το γάλα ή από προϊόντα του. Η φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης Rep του pSMA198 έδειξε ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που είναι συγγενείς με αυτήν, προέρχεται από γαλακτοκομικά στελέχη του γένους *Lactococcus*.

Με τα ευρήματα αυτά γίνεται η υπόθεση ότι ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 απέκτησε το πλασμίδιο pSMA198 από τον *L. lactis*, μέσω οριζόντιας μεταφοράς, μίας γενετικής ανταλλαγής, που συνέβη στο παρελθόν πολύ πιθανόν σε περιβάλλον γάλακτος ή σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Προκειμένου να ενισχυθεί η υπόθεση αυτή πειραματικά, κλωνοποιήθηκε η περιοχή έναρξης της αντιγραφής *ori-rep-orfX* του πλασμιδίου pSMA198, στον *Lactococcus lactis* MG1363. Με όχημα το πλασμίδιο pUC19, δημιουργήθηκε ένας παλίνδρομος φορέας μεταξύ των στελεχών *S. macedonicus* ACA-DC 198 και *Escherichia coli*, το πλασμίδιο pORI198. Το πλασμίδιο αυτό κλωνοποιήθηκε με επιτυχία στο στέλεχος *L. lactis* MG136, όπου εμφάνισε 100% σταθερότητα για 100 γενεές και αριθμό αντιγράφων (2-3 αντίγραφα ανά κύτταρο) ίδιο με αυτόν του *S. macedonicus*. Έτσι, δημιουργήθηκε για πρώτη φορά παλίνδρομο πλασμίδιο του *S. macedonicus* με τον *L. lactis*, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα ο *S. macedonicus* να απέκτησε το πλασμίδιο αυτό από τον *L. lactis*.

Με τη μελέτη αυτή, παραθέτονται μοριακά στοιχεία για την προσαρμογή του *S. macedonicus* στο περιβάλλον του γάλακτος και στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

---

## Abstract

*Streptococcus macedonicus* is a very interesting species of the genus *Streptococcus* and it is mostly isolated from fermented foods similarly to *Streptococcus thermophilus*. However, *S. macedonicus* is closely related to commensal opportunistic pathogens of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex.

In this study, in order to provide novel clues about the main ecological niche of the dairy strain *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, the pSMA198 plasmid was isolated and analyzed. Based on the sequence similarity profiles of the plasmid's replication initiation protein (Rep) and origin of replication (*ori*), pSMA198 belongs to the narrow host range pCI305/pWV02 family found primarily in the genus *Lactococcus* and it is the first such plasmid to be reported in the genus *Streptococcus*. Comparative analysis of the pSMA198 sequence over its *ori*, origin of transfer (*oriT*) or entire length revealed a high degree of similarity with plasmids pSK11b, pVF22 and pIL5, respectively isolated from *Lactococcus lactis* strains deriving from milk or its products. Phylogenetic analysis of the pSMA198 Rep protein showed that the vast majority of closely related proteins derive from dairy isolates within the genus *Lactococcus*. According to these findings it is assumed that *S. macedonicus* ACA-DC 198 acquired pSMA198 plasmid from *L. lactis* via an ancestral genetic exchange event that took place most probably in milk or dairy products. To strengthen this hypothesis experimentally, the origin of replication region (*ori-rep-orfX*) of the pSMA198 plasmid, was cloned in *L. lactis* MG1363. Having as a vehicle the pUC19 plasmid, there was created the pORI198 plasmid, a shuttle vector between the strains *S. macedonicus* ACA-DC 198 and *Escherichia coli*. This plasmid was successfully cloned in the strain *L. lactis* MG1363, where it was 100% stable for 100 generations and its plasmid copy number (2-3 copies per cell) was the same with *S. macedonicus*. Therefore, this is the first time a shuttle vector between *S. macedonicus* and *L. lactis* was created. This fact enhances the likelihood that *S. macedonicus* acquired this plasmid from *L. lactis*.

With this study are provided the first molecular and evolutionary evidence for the habituation of *S. macedonicus* to the dairy environment.



---

## Ερευνητικό άρθρο

Κατά τη διάρκεια αυτής της Μεταπτυχιακής εργασίας υποβλήθηκε το ερευνητικό άρθρο το οποίο βρίσκεται σε διαδικασία κρίσης:

### **Analysis of the lactococcal plasmid pSMA198 found in *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 supports the dairy origin of the species**

Konstantinos Papadimitriou<sup>1,\*</sup>, Rania Anastasiou<sup>1</sup>, Eleni Maistrou<sup>1</sup>, Thomas Plakas<sup>1,2</sup>, Nikos C. Papandreou<sup>2</sup>, Stavros J. Hamdrakas<sup>2</sup>, Stéphanie Ferreira<sup>3</sup>, Philip Supply<sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>, Pierre Renault<sup>8</sup>, Bruno Pot<sup>4, 5, 6, 7</sup> and Effie Tsakalidou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece

<sup>2</sup> Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 157 01 Athens, Greece

<sup>3</sup> Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59000 Lille, France

<sup>4</sup> Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), F-59019 Lille, France

<sup>5</sup> Inserm U1019, F-59019 Lille, France

<sup>6</sup> CNRS UMR8204, F-59021 Lille, France

<sup>7</sup> Univ Lille de Nord France, F-59000 Lille, France

<sup>8</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France

---

---

# Περιεχόμενα

Περίληψη .....	vii
Abstract.....	viii
Ερευνητικό άρθρο .....	ix
<b>1 Εισαγωγή.....</b>	<b>1-1</b>
1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια .....	1-1
1.1.1 Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	1-2
1.1.2 Συστηματική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	1-2
1.2 Γένος <i>Streptococcus</i> .....	1-3
1.2.1 <i>Streptococcus macedonicus</i> .....	1-5
1.3 Πλασμιδιακό DNA.....	1-7
1.3.1 Μηχανισμοί αντιγραφής πλασμιδίων .....	1-8
1.3.1.1 Μηχανισμός αντιγραφής θήτα .....	1-8
1.4 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων με έμφαση στη βακτηριακή σύζευξη.....	1-10
<b>2 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....</b>	<b>13</b>
<b>3 Υλικά &amp; Μέθοδοι .....</b>	<b>3-14</b>
3.1.1 Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους .....	3-14
3.2 Πειραματική Διαδικασία.....	3-15
3.2.1 Σχολιασμός του πλασμιδίου pSMA198 .....	3-15
3.2.2 Ανάλυση νουλεσιδίων και πρωτεϊνών και φυλογενετική ανάλυση.....	3-15
3.2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) .....	3-16
3.2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA .....	3-17
3.2.5 Κατασκευή παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης (shuttle vector) .....	3-17
3.2.5.1 Ενίσχυση του τμήματος ori- <i>rep</i> -oriX του πλασμιδίου pSMA 198 καθώς και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη από το πλασμίδιο pGh9:ISS1 .....	3-17
3.2.5.1.1 Ανάλυση των τμημάτων DNA σε πηκτική αгарόζη .....	3-18
3.2.5.1.2 Εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτική αгарόζη .....	3-19
3.2.5.2 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης.....	3-20
3.2.5.3 Ένθεση τμημάτων DNA σε φορείς κλωνοποίησης.....	3-20
3.2.5.4 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τους παλίνδρομους φορείς κλωνοποίησης ..	3-21
3.2.5.4.1 Διατεταγμένες αποικίες (patches) και Colony PCR.....	3-21
3.2.5.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	3-22
3.2.5.6 Πέψη του πλασμιδιακού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη .....	3-23
3.2.5.7 Ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη (Erm) .....	3-24
3.2.5.8 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τα πλασμίδια pORI198 και pEP1377198.....	3-24
3.2.6 Αλληλούχιση των παλίνδρομων φορέων (pORI198 και pEP1377198).....	3-24
3.2.7 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων του <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 με τους παλίνδρομους φορείς .....	3-25
3.2.8 Έλεγχος σταθερότητας του πλασμιδίου pORI198 στον <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....	3-26
3.2.9 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων pSMA198 και pORI198 στον <i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198 και στον <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, αντίστοιχα (Plasmid Copy Number, PCN) .....	3-26
<b>4 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....</b>	<b>4-30</b>
4.1 Το πλασμίδιο pSMA198 ανήκει στην οικογένεια pCI305/pWV02 του γένους <i>Lactococcus</i> ..	4-30
4.2 Το πλασμίδιο pSMA198 μεταφέρθηκε στον <i>Streptococcus macedonicus</i> από τον <i>Lactococcus lactis</i> σε περιβάλλον γάλακτος .....	4-34

---

4.3	Κατασκευή του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης pORI198 .....	4-39
4.3.1	Ενίσχυση του τμήματος <i>ori-ter-orfX</i> του πλασμιδίου pSMA 198 καθώς και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη από το πλασμίδιο pGh9:ISS1.....	4-39
4.3.2	Πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης .....	4-40
4.3.3	Ένθεση τμημάτων DNA σε φορείς κλωνοποίησης .....	4-40
4.3.4	Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τους παλίνδρομους φορείς κλωνοποίησης .	4-40
4.3.5	Πέψη του πλασμιδιακού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	4-41
4.3.6	Ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη (Erm).....	4-42
4.3.7	Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με το πλασμίδιο pORI198 .....	4-42
4.4	Αλληλούχηση των παλίνδρομων φορέων (pORI198 και pEP1377198) .....	4-42
4.5	Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων του στελέχους <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, με τους παλίνδρομους φορείς .....	4-43
4.6	Έλεγχος σταθερότητας του πλασμιδίου pORI198 στον <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....	4-44
4.7	Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων pSMA198 και pORI198 στον <i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198 και στον <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, αντίστοιχα (Plasmid Copy Number, PCN).....	4-45
<b>5</b>	<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>5-46</b>
<b>6</b>	<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>6-47</b>

## Κατάλογος Εικόνων

- Εικ. 1-1: Φυλογενετικό δέντρο που φαίνεται η σχέση του *Streptococcus macedonicus* με τα υπόλοιπα είδη των στρεπτόκοκκων (De Vuyst & Tsakalidou 2008).....1-5
- Εικ. 1-2: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αντιγραφής τύπου θήτα. (*Genetics, 2<sup>nd</sup> Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company) .....1-8
- Εικ. 1-3: Το μοντέλο της βιοσύνθεσης της συζευκτικής σύριγγας στο τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων, από το ένζυμο σορτάση (sortase), (Mandlik *et al.* 2008).....1-11
- Εικ. 1-4: Απεικόνιση της οριζόντιας μεταφοράς των γονιδίων, στο δέντρο της ζωής. Τονίζονται τα πέντε βήματα της μεταφοράς ενός γονιδίου σε νέο ξενιστή, εντός του κλάδου των βακτηρίων. ....1-12
- Εικ. 4-1: Ο χάρτης του πλασμιδίου ρSMA198. Οι αλληλουχίες *ori* και *oriT* τονίζονται με κόκκινο χρώμα. Τα 12 λειτουργικά γονίδια αναπαριστώνται με μωβ, ενώ με κίτρινο απεικονίζονται τα 5 ψευδογονίδια. ....4-30
- Εικ. 4-2: Πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνών RepB που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του πλασμιδίου ρSMA198, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών των πλασμιδίων ρCI305 και ρWV02. Το διακεκομμένο βέλος με τις παύλες και τις διπλές άκρες, περιλαμβάνει την περιοχή που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, Rep. Το διακεκομμένο βέλος με τις τελείες και τις διπλές άκρες, περιλαμβάνει το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης RepB του *Lactococcus lactis*. Τα συνεχόμενα βέλη με τις διπλές άκρες αναπαριστούν τις δύο περιοχές όπου εμφανίζονται τα δομικά μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το ClustalW, καθώς η εύρεση των αυτοτελών δομικών στοιχείων εντός των πρωτεϊνών διεξήχθη με το εργαλείο InterProScan. ....4-31
- Εικ. 4-3: Πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας του σημείου έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του πλασμιδίου ρSMA198 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες σε συγγενικά του πλασμίδια, συμπεριλαμβανομένων και των *ori* των πλασμιδίων ρCI305 και ρWV02. Οι περιοχές που οριοθετούνται με βέλη είναι οι εξής: (i) μια περιοχή πλούσια σε αδείνη και θυμίνη (AT-rich region) (ii) τρεις επαναλήψεις μίας αλληλουχίας 22bp (22bp-DR) (iii) δύο αναστροφές επαναλήψεις (IRa και IRb). Οι υπογραμμισμένες περιοχές είναι οι εξής: (i) οι υποκινητές στις θέσεις “-35” και “-10” (ii) η αλληλουχία σύνδεσης με το ριβόσωμα (Ribosome Binding Site, RBS) (iii) το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της πρωτεΐνης Rep. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το ClustalW. ....4-33
- Εικ. 4-4: Πολλαπλή στοίχιση μεταξύ του σημείου έναρξης της μεταφοράς (*oriT*) του πλασμιδίου ρSMA198 και των αντίστοιχων αλληλουχιών σε συγγενικά του πλασμίδια, συμπεριλαμβανομένου και του ρCI305. Τα διακεκομμένα βέλη αντιστοιχούν στις 6 αναστροφές επαναλήψεις και τα συνεχόμενα βέλη στις δύο επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 14 νουκλεοτιδίων. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο ClustalW.....4-34
- Εικ. 4-5: Ολική στοίχιση της αλληλουχίας του πλασμιδίου ρSMA198, έναντι των πλασμιδίων ρSK11b(A), ρVF22(B) και ρIL5(C), σε μία κυκλική απεικόνιση. Τα επίπεδα ομοιότητας των τοπικών στοίχισεων και στις τρεις περιπτώσεις, ανάλογα με το χρώμα με το οποίο αναπαριστώνται, χωρίζονται σε 4 ομάδες: (i) κόκκινες γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 75-100% (ii) πορτοκαλί γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 50-75% (iii) πράσινες γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 25-50% (iv) μπλε γραμμές: επίπεδα στοίχισης: χαμηλότερα από 25%. Σε κάθε ένα από τα τρία γραφήματα, είναι σημειωμένες οι θέσεις είτε της αλληλουχίας έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του πλασμιδίου ρSMA198 ή της αλληλουχίας έναρξης της μεταφοράς του (*oriT*), προκειμένου να είναι σαφής η κατεύθυνση της αλληλουχίας του DNA του ρSMA198 σε κάθε περίπτωση. Για το σχεδιασμό της εικόνας χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Circoletto. ....4-35
- Εικ. 4-6: Φυλογενετικό δέντρο μεγίστης πιθανότητας της πρωτεΐνης έναρξης της αντιγραφής (Rep), του πλασμιδίου ρSMA198 και 144 ακόμα πρωτεϊνών με παρόμοια λειτουργία. Για κάθε κλάδο του δέντρου καταγράφεται η πιθανότητα εμπιστοσύνης του εκφρασμένη σε ποσοστό %. Το βέλος δείχνει τη θέση που έχει πάρει η ακολουθία της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου ρSMA198 μέσα στο φυλογενετικό δέντρο. Το άγκιστρο περιλαμβάνει όλες τις

---

	πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στην ίδια ομάδα του φυλογενετικού δέντρου μαζί με την πρωτεΐνη Rep του πλασμιδίου pSMA198. Η περιοχή αυτή εμφανίζεται και σε μεγέθυνση στα δεξιά του φυλογενετικού δέντρου, με τη θέση της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου pSMA198 επίσης να προσδιορίζεται με ένα βέλος. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε στη διαδικτυακή πλατφόρμα phylogeny.fr.....	4-38
Εικ. 4-7:	Η πηκτή αγαρόζης με τα τμήματα <i>ori-rep-orfX</i> και <i>erm</i> , με τους αντίστοιχους εκκινητές	4-39
Εικ. 4-8:	Η πηκτή αγαρόζης του γραμμικού πλασμιδίου pEP1377 .....	4-40
Εικ. 4-9:	Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR, με τους αριθμούς των πλασμιδίων (1: pEP1377, 2: pUC19) και των αποικιών, στα ~3.600 και ~2.600 bp, αντίστοιχα.....	4-41
Εικ. 4-10:	Η πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης των p2.5 και p2.6 με το περιοριστικό ένζυμο PstI .	4-41
Εικ. 4-11:	Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR .....	4-42
Εικ. 4-12:	Ο χάρτης του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης pORI198. Με κόκκινο απεικονίζεται η αρχή έναρξης της αντιγραφής, με μωβ βέλη τα γονίδια <i>rep-orfX</i> , με κίτρινο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη ( <i>erm</i> ), ενώ με πράσινο βέλος τονίζεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ( <i>amp</i> ). .....	4-43
Εικ. 4-13:	Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR .....	4-44

## Κατάλογος Πινάκων

Πίν. 3-1:	Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα θρεπτικά υποστρώματα, όπου Amp (Αμπικιλίνη, Ampicillin), Car (Καρβενικιλίνη, Carbenicillin), Erm (Ερυθρομυκίνη, Erythromycin). .....	3-14
Πίν. 3-2:	Εκκινητές .....	3-28
Ραβδόγραμμα 4-1:	Σταθερότητα πλασμιδίου pORI198 στον <i>L. lactis</i> MG1363 για 100 γενεές .....	4-45

---

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Η ιδέα να χαρακτηριστούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) ως μια ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών διαμορφώθηκε στις αρχές του 1900, αφού είχαν προηγηθεί μέχρι τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, πρωτοποριακές επιστημονικές και τεχνολογικές εξελίξεις. Η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα κίνησαν από νωρίς το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Ο Pasteur συνέβαλε σημαντικά στη μελέτη της οξυγαλακτικής ζύμωσης το 1857, ακολουθούμενος από τον Lister που απομόνωσε για πρώτη φορά καθαρή βακτηριακή καλλιέργεια του *Bacterium lactis* το 1873. Το 1890 προτάθηκε η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως εναρκτήριες καλλιέργειες στα τυριά και στο ξινόγαλα, γεγονός που άνοιξε το δρόμο στην εκβιομηχάνιση των ζυμώσεων στα τρόφιμα. Τα βακτήρια αυτά συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό αυθόρμητων ζυμώσεων των τροφίμων, αλλά είναι επίσης πολύ στενά συνδεδεμένα και με τον ανθρώπινο οργανισμό (Stiles & Holzapfel 1997).

Το φυσικό τους περιβάλλον ποικίλει. Απαντώνται στο σώμα των ανθρώπων και των ζώων αλλά και στα φυτά, ως συμβιωτικά. Έχουν σημαντικό ρόλο ως εναρκτήριες καλλιέργειες στη βιομηχανία των ζυμούμενων τροφίμων διότι προκαλούν σύντομη οξίνιση του ακατέργαστου υλικού, μέσω παραγωγής οργανικών οξέων (κυρίως του γαλακτικού οξέος). Επίσης, λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αιθανόλης και βακτηριοσινών, επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής και αυξάνουν τη μικροβιολογική ασφάλεια του προϊόντος. Επιπλέον, με την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, εξωπολυσακχαριτών και διαφόρων ενζύμων βελτιώνουν την υφή και συνεισφέρουν στο οργανοληπτικά αποδεκτό προφίλ του τελικού προϊόντος (Leroy & De Vuyst 2004). Ταυτόχρονα, κατά τη ζύμωση των προϊόντων βελτιώνεται η πεπτικότητα τους και η θρεπτική τους αξία καθώς εμπλουτίζονται με απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα και βιταμίνες. Για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιούνται στην παραγωγή διαφόρων τροφίμων ζύμωσης, ζωικής (γάλα, κρέας, ψάρι) ή φυτικής (κρασί, λαχανικά, ελιές) προέλευσης.

Κάποια είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν χαρακτηριστεί και ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί, όπως έχει ορισθεί από τους Guarner και Schaafsma το 1998 και τον Tannock το 2002. Προβιοτικοί είναι οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που κατά την κατανάλωσή τους σε συγκεκριμένες ποσότητες ασκούν ευεργετική επίδραση στην υγεία πέρα από τις εγγενείς ιδιότητες της βασικής διατροφής. Τα οφέλη που έχουν προταθεί ότι προκύπτουν από την κατανάλωσή τους είναι πολλά και μπορεί να είναι γενικά, όπως η

---

ρύθμιση της δραστηριότητας του εντέρου, ή στοχευμένα, όπως η ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών της γαστρεντερικής οδού (π.χ. τα *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* και *Helicobacter pylori*) (Ljungh & Wadström 2005). Επίσης, φαίνεται να υπάρχουν ενδείξεις για αντικαρκινική δράση των βακτηρίων αυτών. Τα τελευταία χρόνια με βάση τη προβιοτική τους δράση έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τέτοιες εφαρμογές είναι σε προβιοτικά τρόφιμα («λειτουργικά» τρόφιμα) (Schiffrin & Blum 2001), σε προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες και ως ζωντανά εμβόλια (Wells & Robinson 1996, Mercenier *et al.* 2000).

### 1.1.1 Φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν μια ετερογενή ομάδα θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι και αεροανθεκτικοί, μη σπορογόνοι, που παίρνουν σχηματισμούς ραβδίων ή κόκκων και δε διαθέτουν κυτόχρωμα γεγονός που τους καθιστά αρνητικούς στην καταλάση. Διαθέτουν χαμηλή αναλογία (%) των βάσεων γουανίνη - κυτοσίνη (G+C) στο μόριο του DNA τους που δεν υπερβαίνει το 55%. Ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους έχουν το εύρος των 30-40 °C και είναι ανθεκτικοί στα οξέα. Επίσης, έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν σάκχαρα κυρίως σε γαλακτικό οξύ μέσω ομοζυμωτικού (παραγωγή μόνο γαλακτικού οξέος) ή ετεροζυμωτικού (παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, CO<sub>2</sub> και αιθανόλης) μεταβολισμού. Χαρακτηρίζονται από απλό μεταβολισμό υδατανθράκων (άνθρακας ως πηγή ενέργειας) και πρωτεϊνών (άζωτο ως πηγή ενέργειας), από περιορισμένες ικανότητες βιοσύνθεσης και από μικρά γονιδιώματα (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

### 1.1.2 Συστηματική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η συστηματική κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι ένας κλάδος της επιστήμης που διαρκώς εξελίσσεται. Κατά το παρελθόν, υπήρξαν διάφορες προσεγγίσεις προκειμένου να ταξινομηθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως για παράδειγμα η μορφολογική και φαινοτυπική τους ανάλυση. Πλέον με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και την ανακάλυψη νέων γονιδίων 16s rRNA καθώς και με τον εμπλουτισμό βάσεων δεδομένων με αυτά, η κατάταξή τους γίνεται σε μοριακό επίπεδο. Με τα σημερινά δεδομένα τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη Lactobacillales της κλάσης Bacilli του φύλλου Firmicutes. Χωρίζονται σε έξι οικογένειες που περιλαμβάνουν 40 γένη συνολικά. Το μεγάλο εύρος των έξι αυτών οικογενειών υποδηλώνει και την ποικιλομορφία εντός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Tsakalidou & Papadimitriou 2011):



- 
- Aerococcaceae (με επτά γένη)
  - Carnobacteriaceae (με 16 γένη)
  - Enterococcaceae (με επτά γένη)
  - Lactobacillaceae (με τρία γένη)
  - Leuconostoccaceae (με τέσσερα γένη)
  - Streptococcaceae (με τρία γένη)

Τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που είναι σημαντικά στα τρόφιμα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*.

Αρχικά, το γένος *Streptococcus* λόγω κατάταξής του βάσει των μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του περιελάμβανε και τα γένη *Enterococcus* και *Lactococcus*. Με τη δημιουργία του εξελικτικού δέντρου στον κλάδο Clostridium των θετικών κατά Gram βακτηρίων που βασίστηκε στις ομοιότητες της αλληλουχίας του 16s rRNA, εμφανίστηκε η καταλληλότητα του διαχωρισμού των μέχρι τότε στρεπτοκόκκων σε τρία γενετικά διακριτά γένη: *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Lactococcus* (Stiles & Holzapfel 1997). Μετά το διαχωρισμό αυτό, αρκετά είδη τα οποία είχαν αρχικά ταξινομηθεί στο γένος *Streptococcus* κατατάχθηκαν στα άλλα δύο γένη.

Όπως προαναφέρθηκε, σημαντικό είναι το γεγονός ότι η συστηματική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει μεταβληθεί από το παρελθόν και συνεχώς αναπτύσσεται. Αυτό σημαίνει πως αναμένονται διάφορες μετατροπές στον τρόπο κατάταξής τους στο μέλλον.

## 1.2 Γένος *Streptococcus*

Το γένος *Streptococcus* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1884 από τον Rosenbach. Η πρώτη προσπάθεια να διαχωριστούν οι στρεπτόκοκκοι έγινε το 1903 από τον Shottmuller, ο οποίος χρησιμοποίησε την αιμόλυση για να κάνει τη διάκριση μεταξύ των στελεχών που ήταν β-αιμολυτικά από αυτά που δεν ήταν. Την προσπάθεια αυτή την ακολούθησαν μελέτες πάνω στις ζυμώσεις και στην ανθεκτικότητα των στρεπτοκόκκων ενώ το 1933 ο Lancefield ανέπτυξε μια τεχνική ανάδειξης συγκεκριμένων ομάδων αντιγόνων, τα οποία συσχετιζόνταν με τα β-αιμολυτικά στελέχη. Το 1937, ο Sherman πρότεινε ένα τρόπο να χωριστούν οι στρεπτόκοκκοι σε τέσσερεις κατηγορίες συνδυάζοντας όλες τις προαναφερθείσες μεθόδους. Η διάκριση αυτή δε διαφέρει ιδιαίτερα από τα σημερινά συστήματα αναγνώρισης των στρεπτοκόκκων που βασίζονται στην ομαδοποίηση των οροτύπων (serogrouping, ομαδοποίηση βακτηρίων που περιέχουν ένα κοινό αντιγόνο) (Facklam 2002).

---

Οι στρεπτόκοκκοι *sensu lato* είναι ευρέως διαδεδομένοι ως παθογόνα του ανθρώπου και των ζώων. Απαντώνται στο στόμα και στην χλωρίδα του εντέρου των ανθρώπων και ζώων, στο ακατέργαστο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και στα φυτά.

Αργότερα, με βάση την 16s rRNA ταυτοποίηση και άλλες βιοχημικές δοκιμασίες, οι στρεπτόκοκκοι έχουν υποκατηγοριοποιηθεί σε τρία γένη: (i) *Streptococcus sensu stricto* που απαρτίζονται από την πλειονότητα των γνωστών ειδών (ii) *Enterococcus* για την ομάδα των εντεροκόκκων και (iii) *Lactococcus* για τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους. (Tsakalidou *et al.* 1998)

Η διάκριση του γένους αυτού στηρίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο βαθμό στην αιμόλυση. Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι προκαλούν την πλήρη αιμόλυση των ερυθροκυττάρων. Στην ομάδα των β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων ανήκουν δώδεκα είδη. Οι μη β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι προκαλούν το σχηματισμό μίας πρασινωπής ή καφετιάς ζώνης γύρω από αποικίες που βρίσκονται σε άγαρ με αίμα, γεγονός που δεν οφείλεται σε πραγματική αιμόλυση αλλά σε αποχρωματισμό καθώς και απώλεια καλίου από τα ερυθροκύτταρα. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα εξής είδη: 1) *S. pneumoniae*, 2) τα μέλη του συμπλέγματος *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* (*S. bovis*, *S. equinus*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus pasteurianus* και *Streptococcus lutetiensis*), 3) *Streptococcus suis* και 4) οι πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι (*Viridans Streptococci*) (Facklam 2002).

Πλέον, μπορούν να περιγραφούν διαφορετικές ομάδες 16s rRNA εντός του γένους *Streptococcus*: τα *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pyogenic* και *S. salivarius*. Με βάση τα δεδομένα της αλληλουχίας του 16s rRNA, ο *S. thermophilus* έχει στενή συγγένεια με τους *S. salivarius* και *S. vestibularis*. Επιπροσθέτως, τα δεδομένα του υβριδισμού DNA:DNA έδειξαν μια στενή σχέση μεταξύ των ειδών *S. bovis* και *S. equinus* (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

Όπως προαναφέρθηκε πολλά είδη του γένους *Streptococcus* είναι συμβιωτικά με τον άνθρωπο και τα ζώα και είναι παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα. Αυτό δε συμβαίνει με τον *S. thermophilus* ο οποίος ανήκει στην κατηγορία GRAS (Generally Recognized As Safe) και χρησιμοποιείται ευρέως ως εναρκτήριο καλλιέργεια σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ανάπτυξη του στρεπτόκοκκου στο γάλα τον ώθησε να ακολουθήσει ένα εξελικτικό μονοπάτι που αποκλίνει από τους παθογόνους ομοειδείς του καθώς προσαρμόστηκε σε ένα καλά καθορισμένο και σταθερό οικολογικό θώκο, το γάλα. Συνεπώς αξίζει να σημειωθεί ότι

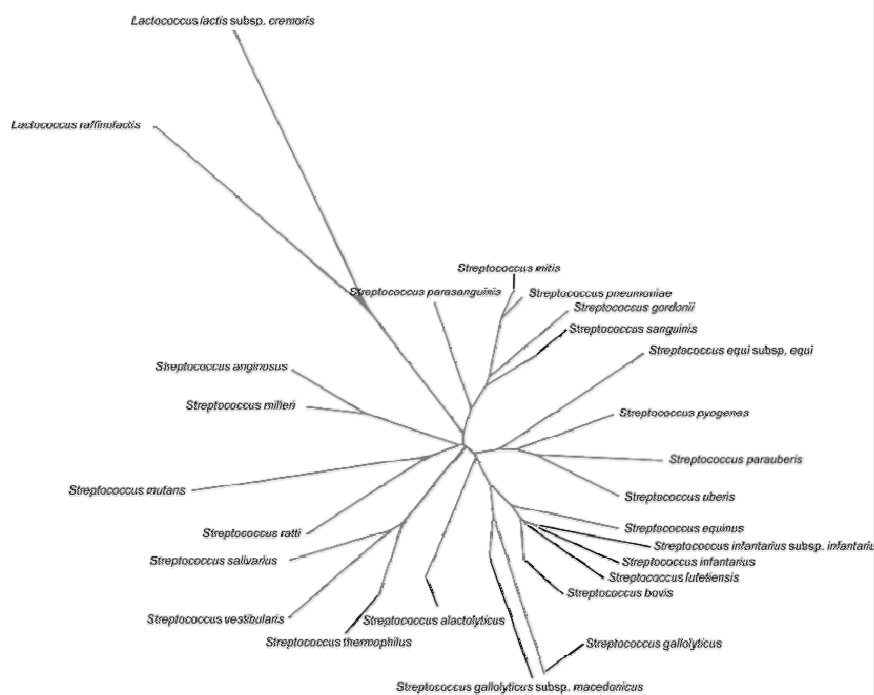
η προσαρμογή αυτή των στρεπτόκοκκων στο περιβάλλον του γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα να σημαντικά μειωμένο δυναμικό παθογένειάς τους (Bolotin *et al.* 2004)

### 1.2.1 *Streptococcus macedonicus*

Έχοντας λάβει την ονομασία του από τον τόπο στον οποίο βρέθηκε για πρώτη φορά, τη Μακεδονία (Βόρεια Ελλάδα), ο *S. macedonicus* απομονώθηκε κατά τη διάρκεια μιας έρευνας πάνω στα οξυγαλακτικά βακτήρια Ελληνικού Κασσεριού, φυσικής ζύμωσης (Tsakalidou *et al.* 1998). Ο *S. macedonicus* ανήκει στην οικογένεια Streptococcaceae, στην τάξη Lactobacillales, στην κλάση Bacilli, του φύλου Firmicutes.

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση του 16s rRNA ανήκει στο σύμπλεγμα *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (*S. bovis*/*S. equinus* complex, SBSEC) και είναι συγγενικό είδος των *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Streptococcus pasteurianus* καθώς και με τον *Streptococcus infantarius*.

Ο *S. macedonicus* φαίνεται πως ανήκει στην ετερογενή ομάδα του *S. bovis*, ενώ ο *S. thermophilus*, ο οποίος βρίσκεται και αυτός σε τρόφιμα ζύμωσης, ανήκει στην ομάδα του *S. salivarius* 16s rRNA. Στην Εικ. 1-1 εμφανίζονται οι φυλογενετικές σχέσεις καθώς και οι αποστάσεις μεταξύ των βακτηριακών ειδών του γένους των στρεπτοκόκκων.



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

---

Το κυκλικό χρωμόσωμα του *S. macedonicus* ACA-DC 198 αποτελείται από 2.130.034 bp (ζεύγη βάσεων) με περιεκτικότητα G+C 37,6% η οποία ανήκει στις χαμηλότερες τιμές εντός των διαθέσιμων γονιδιωμάτων των στρεπτοκόκκων. Στο γονιδίωμά του υπάρχουν 2.192 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα οποία καλύπτουν το 87,3% του χρωμοσώματος του *S. macedonicus*. Από τις αλληλουχίες αυτές οι 192 ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά ψευδογονίδια. Βάσει της συγκριτικής ανάλυσης των γονιδιωμάτων καθώς και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών *S. macedonicus*, *S. pasteurianus*, *S. infantarius* και *S. gallolyticus*, φαίνεται ότι τα τρία πρώτα είδη μπορεί να εξελίσσονται υπό φυσική επιλογή, η οποία τα οδηγεί σε απώλεια γονιδίων καθώς και σε αποσύνθεση του γονιδιώματός τους σε σύγκριση με το γονιδίωμα του *S. gallolyticus* (Paradimitriou *et al.* 2014).

Η διαδικασία της απώλειας γονιδίων ήταν έντονη κατά την εξέλιξη όλων των γενεαλογιών της τάξης των Lactobacillales, αλλά αρκετά είδη ξεχωρίζουν στο βαθμό της απώλειας αυτής. Πιο συγκεκριμένα ο *S. thermophilus* δεν υπέστη μόνο απώλεια γονιδίων αλλά έχει και αρκετά καινούρια ψευδογονίδια γεγονός που υποδηλώνει μία συνεχή διαδικασία αποσύνθεσης του γονιδιώματός του καθώς και την απώλεια της παθογένειάς του (Makarova & Koonin 2007). Συνεπώς, ενισχύεται ο ισχυρισμός ότι και ο *S. macedonicus* βρίσκεται σε εξελικτική διαδικασία αποσύνθεσης γονιδίων.

Πέρα από τον *S. thermophilus*, αρκετοί στρεπτόκοκκοι έχουν ως φυσικό περιβάλλον τους το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι στρεπτόκοκκοι αυτοί ανήκουν κυρίως στο σύμπλεγμα SBSEC. Η ακριβής πορεία που θα εξηγούσε την παρουσία τους στο γάλα δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη. Θεωρητικά, επειδή μερικά είδη του συμπλέγματος αυτού εμφανίζονται φυσικά στη γαστρεντερική οδό ή στο δέρμα του μαστού των ζώων που θηλάζουν, θα μπορούσαν να έχουν μεταφερθεί παθητικά στο γάλα. Επίσης είναι γνωστό ότι είδη του SBSEC εμπλέκονται σε ανθρώπινες παθήσεις όπως η ενδοκαρδίτιδα, η μηνιγγίτιδα, η βακτηραιμία και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Ωστόσο, ο *S. macedonicus* που ανήκει στο συγκεκριμένο σύμπλεγμα, όπως έχει προαναφερθεί, έχει προταθεί ότι προσαρμόστηκε στο γάλα και ότι θα μπορούσε να μην είναι παθογόνος. Οι υποθέσεις αυτές στηρίζονται στο γεγονός ότι ο βασικός οικολογικός θώκος του *S. macedonicus* φαίνεται να είναι τα φυσικά ζυμούμενα τρόφιμα, κυρίως γαλακτικής προέλευσης παρόμοια με τον *S. thermophilus*. (Paradimitriou *et al.* 2014)

---

### 1.3 Πλασμιδιακό DNA

Τα ρεπλικόνια εξωχρωμοσωματικού DNA που απαντώνται κυρίως στα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια καθώς και σε κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γνωστά ως πλασμίδια. Αρχικά ο όρος πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε από τον Lederberg για να περιγράψει όλους τους εξωχρωμοσωμικούς κληρονομικούς καθοριστικούς παράγοντες και τώρα χρησιμοποιείται για να περιγράψει το εξωχρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων που αντιγράφεται αυτόνομα (Actis 2014).

Γενικά, τα πλασμίδια δε θεωρούνται απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηρίων αλλά λόγω του ότι έχουν την ικανότητα να κωδικοποιούν καθοριστικούς γενετικούς παράγοντες δίνουν τη δυνατότητα στους ξενιστές τους να επιβιώνουν καλύτερα σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και να ανταγωνίζονται καλύτερα με άλλους μικροοργανισμούς, οι οποίοι καταλαμβάνουν τον ίδιο οικολογικό θώκο με αυτούς. Οι παράγοντες που κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια προσδίδουν στον ξενιστή τους ιδιότητες, όπως η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και τοξικά βαρέα μέταλλα, η παραγωγή βακτηριοσινών, η αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών, η ανθεκτικότητα στη ραδιενέργεια κ.α. (Mølbak *et al.* 2003).

Το μέγεθος των πλασμιδίων ποικίλει από 1.000 περίπου μέχρι και 1.000.000 bp (ζεύγη βάσεων) και τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να έχουν περισσότερα από ένα είδος πλασμιδίου. Γενικά, τα βακτηριακά πλασμίδια αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του ξενιστή συχνά όμως για την αντιγραφή τους βασίζονται σε παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον ξενιστή τους. Ο αριθμός των αντιγράφων των πλασμιδίων ανά κύτταρο ξενιστή είναι καθορισμένος και κυμαίνεται από ένα ή δύο μέχρι και αρκετές εκατοντάδες (Actis 2014). Ως επί το πλείστον τα πλασμίδια είναι δίκλινα κυκλικά μόρια DNA αλλά πλέον έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη και γραμμικά πλασμίδια (Hinnebusch & Tiiiy 1993).

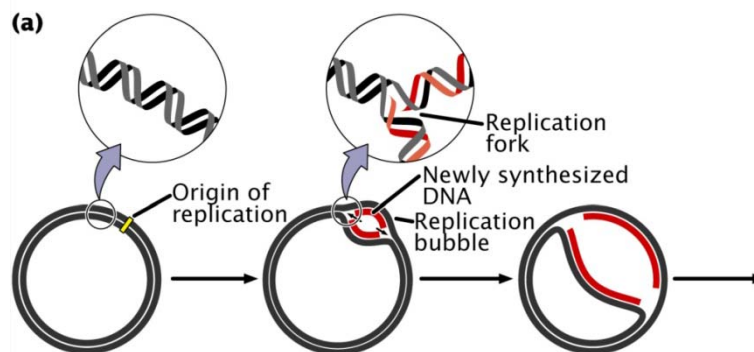
Τα πλασμίδια φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες διαφόρων βιολογικών λειτουργιών και περιέχουν μια βασική περιοχή που απαρτίζεται από γονίδια και αλληλουχίες που εμπλέκονται στην αντιγραφή των ίδιων των πλασμιδίων καθώς και στον έλεγχο της. Η περιοχή αυτή συνίσταται από τα σημεία έναρξης της αντιγραφής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

### 1.3.1 Μηχανισμοί αντιγραφής πλασμιδίων

Οι μηχανισμοί αντιγραφής των πλασμιδίων είναι οι εξής τρεις: (i) η εκτόπιση κλώνου, (ii) ο μηχανισμός θήτα και (iii) ο μηχανισμός κυλιόμενης αντιγραφής (Solar *et al.* 1998). Επίσης, υπάρχει και ο μηχανισμός αντιγραφής των γραμμικών πλασμιδίων. Στην παρούσα μελέτη εστιάζεται η αντιγραφή των πλασμιδίων στα οξυγαλακτικά βακτήρια με το μηχανισμό θήτα.

#### 1.3.1.1 Μηχανισμός αντιγραφής θήτα

Η αντιγραφή των πλασμιδίων μέσω του μηχανισμού θήτα έχει μελετηθεί κυρίως στα πρότυπα κυκλικά πλασμίδια των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ωστόσο, ο τρόπος αυτός αντιγραφής έχει επίσης περιγραφεί και για πλασμίδια που έχουν απομονωθεί από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Lactococcus*. Η αντιγραφή του DNA μέσω του μηχανισμού θήτα περιλαμβάνει την τήξη των αρχικών κλώνων, τη σύνθεση ενός εκκινήτη RNA και την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Η σύνθεση του DNA είναι συνεχής στον έναν κλώνο, τον προπορευόμενο (leading strand) και διακεκομμένη στον άλλο κλώνο, τον δευτερεύοντα (lagging strand), παρόλο που η σύνθεση των δύο κλώνων φαίνεται να είναι συνδεδεμένη. Με μερικές εξαιρέσεις, τα πλασμίδια που αντιγράφονται μέσω του μηχανισμού θήτα, απαιτούν μια πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, την πρωτεΐνη Rep, την οποία και κωδικοποιούν. Μερικά από αυτά τα ρεπλικόνια, κατά το αρχικό στάδιο της σύνθεσης του προπορευόμενου κλώνου, μπορεί να χρειαστούν την DNA πολυμεράση I του κυττάρου, στο οποίο βρίσκονται. Σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα ενδιάμεσα στάδια αυτού του τύπου της αντιγραφής φαίνονται ως τυπικά μόρια σχήματος θήτα. Τα μόρια αυτά κατά την πέψη τους με ένζυμα που κόβουν εντός της αντιγραμμένης περιοχής, δίνουν μόρια σχήματος Y (“forks”), (Εικ. 1-2).



Εικ. 1-2: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αντιγραφής τύπου θήτα. (*Genetics, 2<sup>nd</sup> Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company)

---

Οι θέσεις έναρξης της αντιγραφής των πλασμιδίων (*ori*) μπορούν να ορισθούν ως: (i) η ελάχιστη αλληλουχία του πλασμιδίου που μπορεί να υποστηρίξει την αυτόνομη αντιγραφή του, (ii) η περιοχή όπου γίνεται η τήξη των κλώνων του DNA προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής, ή (iii) οι απαραίτητες βάσεις πάνω στις οποίες ξεκινά η σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου. Οι θέσεις αυτές περιλαμβάνουν περιοχές που είναι απαραίτητες για αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται είτε από πλασμίδια είτε και από το κύτταρο στο οποίο βρίσκονται. Οι πρωτεΐνες Rep αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής και παράγουν ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο εκκίνησης στο οποίο πραγματοποιούνται σημαντικές μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις (Rep-DNA, Rep-Rep, Rep με άλλες πρωτεΐνες εκκίνησης του κυττάρου ξενιστή). Επίσης, πολλές πρωτεΐνες Rep μπορούν να παράγουν σύμπλοκα που ρυθμίζουν αρνητικά τη σύνθεσή τους καθώς και τη συχνότητα της εκκίνησης. Βάσει στοιχίσεων αμινοξικών αλληλουχιών διαφόρων πρωτεϊνών Rep από πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό θήτα κατασκευάζονται φυλογενετικά δέντρα. Σημειώνεται ότι όσον αφορά τις πλασμιδιακές αλληλουχίες, η εξέλιξή τους μπορεί να γίνει όχι μόνο με μετάλλαξη ή επιλογή αλλά και με οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Το γεγονός αυτό συνιστά μία επιπρόσθετη δυσκολία στην καθιέρωση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των πλασμιδίων (Solar *et al.* 1998).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν τέσσερις οικογένειες ρεπλικονίων θήτα. Τα πλασμίδια του γένους *Lactococcus* ως επί το πλείστον κατατάσσονται στην οικογένεια ρCI305/ρWV02 που έχει ως πρότυπο το ρCI305, με περιορισμένο εύρος ξενιστών και αντιγράφεται με το μηχανισμό θήτα. Το ρCI305 απομονώθηκε από τον *L. lactis* έχει μήκος 8.700 ζεύγη βάσεων και χαρακτηρίζεται από μία περιοχή πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη, μία περιοχή όπου επαναλαμβάνονται 22 ζεύγη βάσεων 3,5 φορές και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rep (Hayes *et al.* 1990). Τα πλασμίδια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Streptococcus*, με τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι τώρα, δεν κατατάσσονται στην εν λόγω οικογένεια.

Μερικά ρεπλικόνια θήτα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, εμφανίζουν ένα γονίδιο καταρροϊκά της πρωτεΐνης Rep που ονομάζεται “*orfX*” (open reading frame) και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rep. Το γεγονός όμως ότι δεν υπάρχει αυτό το γονίδιο σε όλα τα πλασμίδια που αντιγράφονται με το μηχανισμό θήτα σημαίνει ότι δε μπορεί να αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία σε αυτή την περιοχή (Kiewiet *et al.* 1993). Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι σε ορισμένα

---

πλασμίδια η περιοχή αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής τους, ελέγχοντας τον αριθμό των αντιγράφων τους, καθώς και της σταθερότητάς τους (Hayes *et al.* 1991).

## 1.4 Οριζόντια μεταφορά γονιδίων με έμφαση στη βακτηριακή σύζευξη

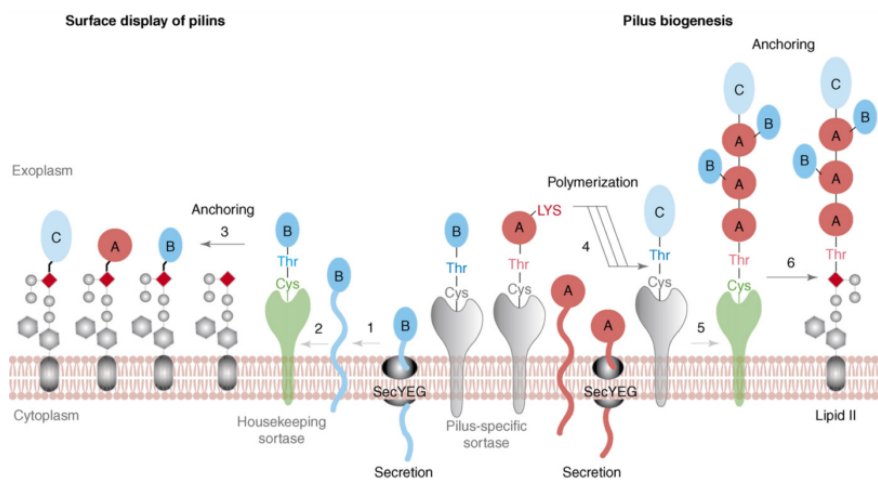
Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων αναφέρεται στην ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ ειδών, όπως είναι η βακτηριακή σύζευξη.

Το γεγονός ότι μεταθετά γενετικά στοιχεία μπορούν να ανταλλάσσονται μεταξύ των βακτηρίων συμβάλλει στην ποικιλομορφία των βακτηριακών γονιδιωμάτων. Ως συστατικά της οριζόντιας ομάδας γονιδίων, τα μεταθετά γενετικά στοιχεία περιλαμβάνουν αλληλουχίες ένθεσης, τρανσποζόνια, βακτηριοφάγους, πλασμίδια και συνδυασμούς των στοιχείων αυτών. Μέσω της αλληλούχησης ολόκληρων γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών αναδύονται στοιχεία που υποστηρίζουν την ανάμιξη γονιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς, μεταξύ μελών των βασιλείων Bacteria, Archaea και Eukarya, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των μυκήτων και των ανθρώπινων κυττάρων. Ο ρόλος των πλασμιδίων στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι σημαντικός, καθώς επιτρέπουν στους βακτηριακούς πληθυσμούς να αποκτήσουν νέες ιδιότητες που μπορεί να τους δώσουν το πλεονέκτημα της επιβίωσης, όπως η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, η ικανότητα να χρησιμοποιήσουν νέες πηγές άνθρακα κ.α. (Sørensen *et al.* 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς. Εδώ γίνεται αναφορά στην οριζόντια μεταφορά μέσω βακτηριακής σύζευξης. Κατά τη βακτηριακή σύζευξη δημιουργείται μία συζευκτική σμήριγγα μεταφοράς γενετικού υλικού, της οποίας η βιοσύνθεση έχει περιγραφεί κυρίως για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Όμως, όσον αφορά τα θετικά κατά Gram βακτήρια, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι σμηρίγγων που διαφέρουν δομικά από εκείνες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ο ένας τύπος είναι κοντά και λεπτά ραβδία μήκους 70-500 nm και διαμέτρου 1-2 nm ενώ ο δεύτερος τύπος, είναι μία πολύ μακρύτερη και ελαστική σμήριγγα (0,3-3 μm), με διάμετρο 3-10 nm. Σε αντίθεση με τις αρνητικές κατά Gram σμήριγγες οι μεγάλες υπομονάδες της σμηρίγγας ενώνονται με ομοιοπολικούς δεσμούς και τότε προσδένεται το ραβδί της σμηρίγγας στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω του ενζύμου σορτάση (sortase, μία εξειδικευμένη τρανσπεπτιδάση), (Proft & Baker 2009). Το ένζυμο σορτάση, κωδικοποιείται από το γονιδίωμα των περισσότερων θετικών κατά Gram βακτηρίων και



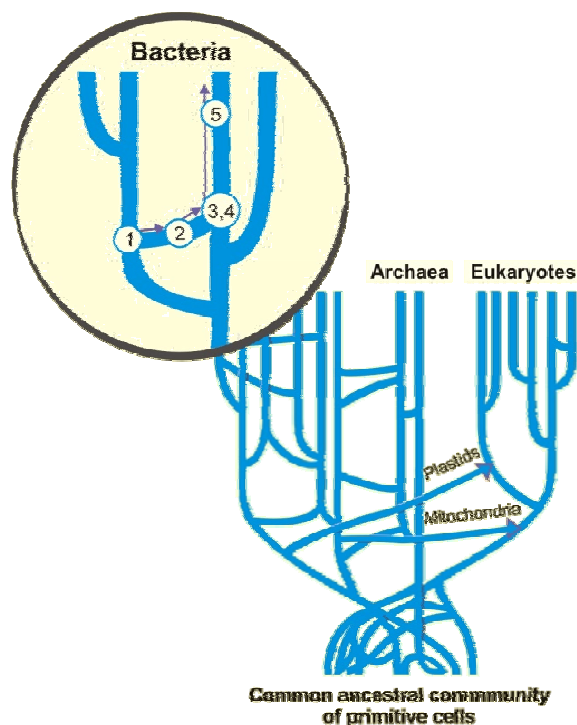
καταλύει την πρόσδεση επιφανειακών πρωτεϊνών στο κυτταρικό τοίχωμα δημιουργώντας εγκάρσιες γέφυρες στη δομή της πεπτιδογλυκάνης (Εικ. 1-3), (Mandlik *et al.* 2008).



Εικ. 1-3: Το μοντέλο της βιοσύνθεσης της συζευκτικής σύμριγγας στο τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων, από το ένζυμο σορτάση (sortase), (Mandlik *et al.* 2008).

Για να πραγματοποιηθεί η οριζόντια μεταφορά ενός γονιδίου από ένα γονιδίωμα σε ένα άλλο απαιτούνται τέσσερα ή πέντε διακριτά βήματα (Smets & Barkay 2005). Κατά το πρώτο βήμα προετοιμάζεται το DNA που θα μεταφερθεί από το κύτταρο δότη στο κύτταρο δέκτη. Η προετοιμασία του DNA που πρόκειται να μεταφερθεί, μέσω βακτηριακής σύζευξης, γίνεται μέσω συγκεκριμένου ενζύμου που αναγνωρίζει και κόβει ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό ενός συγκεκριμένου διουκλεοτιδίου στο πλασμίδιο. Το διουκλεοτίδιο αυτό βρίσκεται σε μία θέση εγκοπής της περιοχής έναρξης της μεταφοράς (*oriT*) μιας πρωτεΐνης κινητοποίησης (mobilization protein) του πλασμιδίου (Grohmann & Espinosa 2003). Στο δεύτερο βήμα στην διαδικασία, πραγματοποιείται η φυσική επαφή μεταξύ των δύο κυττάρων (δότης-δέκτης) και στο τρίτο βήμα ο κλώνος που έχει κοπεί μεταβιβάζεται από το βακτήριο δότη στο βακτήριο δέκτη. Κατά το τέταρτο βήμα της διαδικασίας, γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του μονόκλωνου πλασμιδιακού DNA που έχει μεταφερθεί στο βακτήριο-δέκτη. Το δίκλωνο πλασμιδιακό DNA που προέκυψε έχει την ικανότητα της ανεξάρτητης αντιγραφής του από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Κάποια πλασμίδια, τα οποία μεταφέρονται όπως προαναφέρθηκε μπορεί να εμπεριέχουν αλληλουχίες στο DNA τους (όπως οι αλληλουχίες ένθεσης) που μπορούν να μεταπηδούν από τα πλασμίδια στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου και αντίθετα. Οι εν λόγω αλληλουχίες μπορούν να ενσωματωθούν τελικά στο χρωμόσωμα του βακτηρίου δέκτη, αποτελώντας τμήμα του γονιδιώματός του το οποίο θα μεταφερθεί και στους

απογόνους του. Αυτό αποτελεί και το πέμπτο βήμα της διαδικασίας της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Επειδή όμως δε φέρουν όλα τα πλασμίδια τέτοιου τύπου αλληλουχίες το βήμα αυτό θεωρείται προαιρετικό (Smets & Barkay 2005), (Εικ. 1-4).



Εικ. 1-4: Απεικόνιση της οριζόντιας μεταφοράς των γονιδίων, στο δέντρο της ζωής. Τονίζονται τα πέντε βήματα της μεταφοράς ενός γονιδίου σε νέο ξενιστή, εντός του κλάδου των βακτηρίων.

Ένας από τους κυριότερους λόγους της αύξησης των βακτηριακών πληθυσμών που φέρουν την ικανότητα αντίστασης σε πολλά αντιβιοτικά, είναι η βακτηριακή συζευκτική μεταφορά των πλασμιδίων, η οποία θεωρείται και ως ο πιο αποτελεσματικός τρόπος οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Grohmann & Espinosa 2003). Επίσης, έχουν αναγνωριστεί ότι πολλά πλασμίδια που μεταφέρονται μέσω βακτηριακής σύζευξης προσδίδουν στα βακτήρια δέκτες και άλλες ιδιότητες όπως η παραγωγή βακτηριοσινών, η αντίσταση στους βακτηριοφάγους, η παραγωγή πρωτεΐναιών και ο καταβολισμός της λακτόζης (Mills *et al.* 2002, van Kranenburg *et al.* 2000, Gasson 1990).

---

## 2 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο *Streptococcus macedonicus* αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος του γένους *Streptococcus* αφού η πλέον διαδεδομένη πηγή απομόνωσής του είναι τα τρόφιμα ζύμωσης, γεγονός που ισχύει και για τον *Streptococcus thermophilus*. Η παρουσία του *S. thermophilus* στο γάλα τον κάνει να διαφέρει από τα συγγενικά του είδη, διότι έχει χάσει την παθογένειά του. Με την ίδια λογική και ο *S. macedonicus* φαίνεται να παρουσιάζει στοιχεία προσαρμογής στο περιβάλλον του γάλακτος. Η δημοσίευση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* δίνει τη δυνατότητα να διερευνηθεί η ύπαρξη μοριακών στοιχείων που να υποδηλώνουν την προσαρμογή του στο γάλα.

Στην παρούσα εργασία αναλύεται το πλασμίδιο pSMA198, που απομονώθηκε από το στελέχος *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 (Paradimitriou *et al.* 2012), με στόχο να διευκρινισθεί η αρχική προέλευσή του ώστε να προσδιοριστεί, έμμεσα, ο κύριος οικολογικός θώκος του βακτηρίου αυτού. Παράλληλα, σκοπός της μελέτης είναι η δημιουργία ενός παλίνδρομου φορέα, με βάση το σκελετό της αντιγραφής *ori-rep-orfX* του πλασμιδίου pSMA198, μεταξύ των *S. macedonicus* ACA-DC 198, *Escherichia coli* και *Lactococcus lactis* MG1363, καθώς και ο έλεγχος της σταθερότητάς του στον τελευταίο και ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων του. Η μελέτη αυτή στοχεύει στην επιβεβαίωση της υπόθεσης ότι ο *S. macedonicus* απέκτησε το πλασμίδιο pSMA198 μέσω οριζόντιας μεταφοράς από το *L. lactis* στο περιβάλλον του γάλακτος ή των γαλακτοκομικών προϊόντων.

### 3 Υλικά & Μέθοδοι

#### 3.1.1 Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους

Στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη:

- *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198
- *Escherichia coli* (επιδεκτικά κύτταρα – HST08 Stellar™ competent cells)
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363

Αναλυτικότερα, το στέλεχος του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 προήλθε από τη συλλογή ACA-DC του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα M17 (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) με 0.5% w/v γλυκόζη (Sigma, Taufkirchen, Germany) (GM17), σε θερμοκρασία 37 °C. Το στέλεχος του *Escherichia coli* HST08 Stellar™ αναπτύχθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υγρό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (LB) (1% w/v tryptone (DUCHEFA, Haarlem, The Netherlands), 0,5% w/v yeast extract (Biokar) και 1% w/v NaCl (Merck Darmstadt, Germany, pH 7.5) και σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB με 1.5% w/v άγαρ (Biokar) και με προσθήκη αντιβιοτικών σε συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον Πίν. 3-1, σε θερμοκρασία 37 °C. Το τρίτο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 που προήλθε από τη συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα GM17 και σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα GM17, 1.5% w/v άγαρ (Biokar) και 2 µg/mL ερυθρομυκίνη (Erm, Erythromycin), σε θερμοκρασία 30 °C.

Πίν. 3-1: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα θρεπτικά υποστρώματα, όπου Amp (Αμπικιλίνη, Ampicillin), Car (Καρβενικιλίνη, Carbenicillin), Erm (Ερυθρομυκίνη, Erythromycin).

Θρεπτικό Υπόστρωμα	Στέλεχος	Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (µg/mL)
Luria-Bertani (LB)	<i>Escherichia coli</i>	Erm	200
Luria-Bertani (LB)	<i>Escherichia coli</i>	Amp/Car	50/50
GM17	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Erm	2

Οι εμβολιασμοί των καλλιέργειών έγιναν με 1% (v/v) εμβόλιο σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Σε 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος, εμβολιάστηκαν 50 µL καλλιέργειας από κρυσταλλίδιο (vial) που περιείχε 1 mL με 10% καλλιέργεια (v/v), 20% γλυκερόλη (v/v) και 70% (v/v) θρεπτικό υπόστρωμα, αποθηκευμένο στους -80 °C και επώαστηκαν για 24 h (ο/η) στην αντίστοιχη, για το εκάστοτε στέλεχος, θερμοκρασία. Για τις ανανεώσεις των καλλιέργειών χρησιμοποιήθηκε επίσης 1% (v/v) εμβόλιο από επωασμένη καλλιέργεια.

---

## 3.2 Πειραματική Διαδικασία

### 3.2.1 Σχολιασμός του πλασμιδίου pSMA198

Η αλληλουχία του pSMA198 ταυτοποιήθηκε κατά την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του *S. macedonicus* 198, όπως περιγράφεται από προηγούμενες μελέτες (Paradimitriou *et al.* 2014, Paradimitriou *et al.* 2012).

Για την πρόβλεψη γονιδίων καθώς και το σχολιασμό του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκαν δύο *ab initio* εργαλεία σχολιασμού το RAST και το BASys. Επίσης, για το λεπτομερή λειτουργικό σχολιασμό των πρωτεϊνών που προέκυψαν από τα προαναφερθέντα εργαλεία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα WU-Blast που αναζητά όμοιες νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες σε βιολογικές βάσεις δεδομένων. Τα πιθανά ψευδογονίδια αναγνωρίστηκαν βάσει της παρουσίας ή απουσίας αλληλουχιών που προσδέονται στο ριβόσωμα (ribosome-binding sequences, RBS), του μήκους της κωδικοποιούσας αλληλουχίας καθώς και των μετατοπίσεων του πλαισίου ανάγνωσης που είχε ως αποτέλεσμα διακεκομμένα γονίδια. Τα τμήματα έναρξης της αντιγραφής (*ori*) και έναρξης της κινητικότητας (*oriT*) του pSMA198 ταυτοποιήθηκαν βάσει αλληλουχιών, οι οποίες είχαν προκαθοριστεί σε προηγούμενες μελέτες από πλασμίδια συγγενικά με αυτό.

### 3.2.2 Ανάλυση νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών και φυλογενετική ανάλυση

Επιπροσθέτως, με τις αναζητήσεις που διεξήχθησαν με τα WU-BlastN και WU-BlastP οι νουκλεοτιδικές και πρωτεϊνικές αλληλουχίες στοιχίστηκαν με το ClustalW. Διάφορα χαρακτηριστικά εντός των στοιχίσεων (π.χ. άμεσες επαναλήψεις, ανεστραμμένες επαναλήψεις και άλλες σημαντικές αλληλουχίες) καθορίστηκαν με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία και χειρονακτικά. Προκειμένου να εντοπισθούν μοτίβα εντός των πρωτεϊνικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το InterProScan. Για τη φυλογενετική ανάλυση ακολούθησε επιδιόρθωση των πολλαπλών στοιχίσεων των αλληλουχιών με το πρόγραμμα Gblocks και τα μέγιστης πιθανότητας φυλογενετικά δέντρα προέκυψαν βάσει του αλγόριθμου PhyML. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης του κάθε κλάδου του φυλογενετικού δέντρου υπολογίστηκαν με το  $\chi^2$  παραμετρικό τεστ aLRT (approximate likelihood-ratio test). Για τη γραφική απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο TreeDyn. Η συγκριτική ανάλυση του pSMA198 με άλλα πλασμίδια έγινε με το εργαλείο Circoletto και με το λογισμικό Kodon (Applied Maths N.V., Sint-Martens-Latem, Belgium).

---

### 3.2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA)

Η απομόνωση του γενωμικού DNA (gDNA) του *S. macedonicus* 198 (καθώς και του *L. lactis* spp. *cremoris* MG1363, που αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.7) πραγματοποιήθηκε με το GenElute™ Bacterial Genomic DNA της εταιρείας Sigma σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

- Σε σωληνάριο Eppendorf μικροφυγοκέντρωσης των 2 mL εισήχθησαν περίπου 5 mL καλλιέργειας επωασμένης για 24h (o/n). Φυγοκεντρήθηκαν, ανά 1.6 mL, για 2 min σε 12.000 × g απορρίφθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το ίζημα της καλλιέργειας (pellet).
- Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 200 μL διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 20 mg/mL και επώαστηκαν στους 37 °C για 1 h.
- Προστέθηκαν 20 μL διαλύματος RNάσης (RNase A) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 10 min.
- Προστέθηκαν 20 μL πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, συγκέντρωσης 20 mg/mL). Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης, Lysis C. Ακολούθησε επώαση για άλλα 15 min, ανακίνηση για 15 sec και επώαση στους 55 °C για 10 min προκειμένου να ληφθεί ένα ομογενοποιημένο μείγμα.
- Σε στήλες πρόσδεσης που συναρμολογήθηκαν, προστέθηκαν 500 μL διαλύματος προετοιμασίας της στήλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 12.000 × g για 1 min και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
- Στα δείγματα με το διάλυμα λύσης, προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης (EtOH, 95-100%) και ακολούθησε ανακίνηση για 5-10 sec.
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν με απόχυση στις στήλες πρόσδεσης, φυγοκεντρήθηκαν σε 6.500 × g για 1 min και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής (collection tube).
- Προστέθηκαν 500 μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Solution I) στη στήλη πρόσδεσης, φυγοκεντρήθηκαν για 1 min σε 6.500 × g και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής.
- Προστέθηκαν 500 μL διαλύματος έκπλυσης (Wash Solution) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 13.000 × g για 3 min προκειμένου να στεγνώσουν οι στήλες. Ακολούθησε επιπλέον φυγοκέντρωση για 1 min σε 13.000 × g και οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο συλλογής.

- 
- Προστέθηκαν 40  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκλουσης (Elution Solution) στο κέντρο της κάθε στήλης και φυγοκεντρήθηκαν σε  $6.500 \times g$  για 2 min. Προστέθηκαν άλλα 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκπλυσης και φυγοκεντρήθηκαν σε  $6.500 \times g$  για 2 min.
  - Το προϊόν της έκλουσης περιείχε καθαρό γενωμικό DNA, το οποίο αποθηκεύτηκε στους  $4^\circ \text{C}$ .

### 3.2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων που προέκυψαν, έγινε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο μικροποσοτήτων Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A) το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Ο μηδενισμός της συσκευής γινόταν με αποστειρωμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και στη συνέχεια τοποθετούνταν σταγόνες 2  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα. Η φωτομέτρηση για το DNA γινόταν σε μήκος κύματος 260nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.) υπολογίσθηκε αυτόματα η συγκέντρωση. Παράλληλα, γινόταν μέτρηση του ίδιου δείγματος και στα 280 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες. Ο λόγος της  $\text{O.D.}_{260\text{nm}}/\text{O.D.}_{280\text{nm}}$  εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης. Όταν ο λόγος ισούται με 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Όταν όμως είναι μικρότερος του 1.8 τότε είναι πιθανό να υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης στο δείγμα.

### 3.2.5 Κατασκευή παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης (shuttle vector)

Για τη δημιουργία του παλίνδρομου φορέα χρησιμοποιήθηκαν ως οχήματα δυο πλασμίδια, το pUC19 (In-Fusion® HD Cloning Kit, Clontech Laboratories, CA, USA) και το pEP1377, το οποίο μας παραχώρησε ο Dr Benoit Foligne από το Institut Pasteur στη Lille (IPL), (CIIL: Center for Infection & Immunity of Lille, Team 9 : Lactic Acid Bacteria & Mucosal Immunity - Lille, FRANCE).

#### 3.2.5.1 Ενίσχυση του τμήματος *ori-rep-orfX* του πλασμιδίου pSMA 198 καθώς και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη από το πλασμίδιο pGh9:ISS1

Για την ενίσχυση των τμημάτων του DNA χρησιμοποιήθηκε η Hi Fidelity πολυμεράση Kapa HiFi™ HotStart, της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS, Wilmington, MA 01887 United States. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν σχεδιασμένες ώστε να παρουσιάζουν

---

συμπληρωματικότητα αφενός με τα άκρα του τμήματος που θέλαμε να ενισχύσουμε και εφετέρου με την περιοχή του πλασμιδίου, στο οποίο επρόκειτο να κλωνοποιηθεί το κάθε προϊόν του PCR. Πραγματοποιήθηκε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με κατάλληλους εκκινητές (primers) τους pr1Fn/pr1R και τους pr2Fn/pr2R, προκειμένου να ενισχυθούν από το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA το pSMA198, το τμήμα *ori-rep-orfX*, μεγέθους 2.617 bp. Ομοίως με την ίδια PCR ενισχύθηκε και από το πλασμίδιο pGh9:ISS1 το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη μεγέθους περίπου 1.100 bp, με τους κατάλληλους εκκινητές τους ErmF/ErmR (Πίνακας I). Η κάθε αντίδραση PCR περιείχε τα ακόλουθα:

5x HiFi Buffer	5 $\mu$ L
Kappa 10 mM dNTPs	0,75 $\mu$ L
Primer Forward	1 $\mu$ L
Primer Reverse	1 $\mu$ L
DNA template	1 $\mu$ g
Kapa poly	1 $\mu$ L
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	έως τα 25 $\mu$ L
Τελικός όγκος	25 $\mu$ L

Το γενωμικό DNA αρχικά αποδιατάχθηκε, στους 95 °C για 5 min. Ακολούθησε παραμονή στους 95 °C για 30 sec και η θερμοκρασία έπεσε στους 65 °C για 1 λεπτό, οπότε και έγινε η προσαρμογή των εκκινητών στη μήτρα του DNA (Annealing). Στους 72 °C για 3 min ξεκίνησε η δράση της πολυμεράσης και άρχισαν να συντίθενται οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA, από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια. Στο τέλος του πρώτου κύκλου, είχαν δημιουργηθεί δύο αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας των τμημάτων DNA *ori-rep-orfX* και Erm. Πραγματοποιήθηκαν 35 τέτοιοι κύκλοι και ακολούθησε επώαση στους 72 °C για 20 min για να ολοκληρωθεί η σύνθεση των ημιτελών αλυσίδων. Τα σωληνάρια με τα επιθυμητά τμήματα DNA αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

#### 3.2.5.1.1 Ανάλυση των τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζη

Για επιβεβαίωση, τα τμήματα αυτά αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (0.004 Tris-acetate, 1 mM EDTA), προστέθηκε 1% w/v αγαρόζη.



- 
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη.
  - Έπειτα ψύχθηκε μέχρι τους 60 °C και προστέθηκαν 2μL διαλύματος βρωμιούχου αιτιδίου 10mg/mL (Sigma, Taufkirchen, Germany). Η τελική συγκέντρωση στην πηκτή ήταν 10 μg/mL.
  - Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε ειδική χτένα και έπηξε σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζοντας την πηκτή.
  - Η χτένα απομακρύνθηκε και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 × TAE. Στα κενά πηγαδάκια που σχηματίστηκαν από τη χτένα τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγηθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer- 0.25% w/v Bromophenol blue, 0.25% w/v Xylene cyanol, 40% w/v glycerol).
  - Η πηκτή ηλεκτροφορείται στα 120 V για περίπου μισή ώρα με 45 min.
  - Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής σε ειδικό UV θάλαμο.

### 3.2.5.1.2 Εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης

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

- Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, αποκόπηκε το επιθυμητό τμήμα DNA από την πηκτή αγαρόζης και απομακρύνθηκε η περιττή ποσότητά της.
- Αφού καθορίστηκε το βάρος της πηκτής που αποκόπηκε, τοποθετήθηκε σε σωληνάριο Eppendorf μικροφυγοκέντρισης.
- Για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης (συγκέντρωσης < 2 %) προστέθηκαν 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer NT1) και ακολούθησε επώαση του δείγματος για 5 – 10 min στους 50 °C με ανάδευση ανά 2 – 3 min μέχρι να διαλυθεί τελείως το αποκομμένο τμήμα πηκτής.
- Για την πρόσδεση του DNA σε νέο σωληνάριο των 2 mL, τοποθετήθηκε στήλη NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, φορτώθηκαν περίπου 700 μL δείγματος και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1 min σε 12.000 × g. Απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη μεμβράνη και το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.
- Για την έκπλυση της μεμβράνης προστέθηκαν στη στήλη 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer NT3), ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1 min σε 12.000 × g και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη μεμβράνη.

- 
- Προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης και να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min σε  $12.000 \times g$ .

Για να γίνει η έκλυση του DNA, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο του 1,5 mL, προστέθηκαν 15 – 30  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer NE) επώαστηκε για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε  $12.000 \times g$ . Στη συνέχεια μετρήθηκε συγκεντρώση του DNA στα δείγματα.

### 3.2.5.2 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης

Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pEP1377 πραγματοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο Hind III (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) σύμφωνα με την αντίδραση:

pDNA	1,5 $\mu\text{g}$
10xBuffer	5 $\mu\text{L}$
Hind III	2 $\mu\text{L}$
απιονισμένο $\text{H}_2\text{O}$	μέχρι τα 50 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	50 $\mu\text{L}$

Τα δείγματα επώαστηκαν στους  $37^\circ\text{C}$  για 3 h και αποθηκεύτηκαν στους  $-20^\circ\text{C}$ .

Ο γραμμικός πλέον φορέας, προϊόν της πέψης, ηλεκτροφορήθηκε στα 60 V για 2 h και εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.5.1.2.

### 3.2.5.3 Ένθεση τμημάτων DNA σε φορείς κλωνοποίησης

Οι παλίνδρομοι φορείς κλωνοποίησης κατασκευάστηκαν με την ένθεση των καθαρού τμήματος *ori-rep-ori'* που εκχυλίστηκε από την πηκτή (purified DNA fragment) στους ειδικά διαμορφωμένους φορείς (pUC19 γραμμικό, pEP1377 πέψη με HindIII).

Η ένθεση πραγματοποιήθηκε με το In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit σύμφωνα με την αντίδραση:

5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2 $\mu\text{L}$
Vector (50ng/ $\mu\text{L}$ )	(100 ng)
DNA fragment (2.617 bp)	(50 ng)
Απιονισμένο $\text{H}_2\text{O}$	έως τα 10 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	10 $\mu\text{L}$

---

Τα δείγματα επωάστηκαν στους 50 °C για 15 min, τοποθετήθηκαν σε πάγο, φυγοκεντρήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα προκειμένου να κατακρημνιστεί το υλικό στο σωληνάριο Eppendorf και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Στο σημείο αυτό κατασκευάστηκε ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης που ονομάστηκε pEP1377198, ο οποίος είχε ως όχημα το πλασμίδιο pEP1377.

#### **3.2.5.4 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με τους παλίνδρομους φορείς κλωνοποίησης**

Επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* HST08 Stellar™ μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της ένθεσης της παρ. 3.2.5.3 (pUC19+ori-rep-orfX και pEP1377198). Τα κύτταρα ξεπάγωσαν σε πάγο και χωρίστηκαν, ανά 75 µL, σε 4 σωληνάρια του 1,5 mL. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 5 µL προϊόντος ένθεσης και ακολούθησε επώαση σε πάγο για 30 min. Κατόπιν τα δείγματα επωάστηκαν για 45 s στους 42 °C και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 1-2 min. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 450µL SOC medium (διατηρημένου στους 37 °C) και επωάστηκαν για 1 h ακριβώς στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Προκειμένου να εντοπισθούν τα επιτυχώς μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* ακολούθησε επιφανειακή εξάπλωση 100 και 20 µL (ανά τρυβλίο) από τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και συγκεντρώσεις αντιβιοτικών Amp 50 µg/mL και Car 50 µg/mL, όπως αναφέρεται στον Πίν. 3-1, καθώς και 40 µL Xgal για τα κύτταρα που έφεραν το pUC19. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 37 °C ο/η για επώαση.

##### **3.2.5.4.1 Διατεταγμένες αποικίες (patches) και Colony PCR**

Για να εντοπιστούν οι μετασχηματισμένες αποικίες *E. coli* δημιουργήθηκαν διατεταγμένες αποικίες (patches) εις διπλούν και σε αυτές έγινε Colony PCR.

Με σκοπό τη λύση των κυττάρων του *E. coli* και την "απελευθέρωση" του πλασμιδιακού DNA οι αποικίες τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο Eppendorf με 20 µL νερό, το οποίο, στη συνέχεια παρέμεινε στους 94 °C για 4 min. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min και 4 µL από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε στο Colony PCR. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές M13F/ M13R (Πίν. 3-2) κατά την αντίδραση:

2xMix (Kapa Taq Ready

Mix PCR kit, Kapa Biosystems)      12,5 µL

M13F (forward primer)                      0,5 µL

---

M13R (reverse primer)	0,5 $\mu$ L
plasmid DNA	4 $\mu$ L
απιονισμένο H <sub>2</sub> O	7,5 $\mu$ L
Τελικός όγκος	25 $\mu$ L

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του Colony PCR σε πηκτή αγαρόζης στα 90V και επιλέχθηκαν οι αποικίες, των οποίων τα πλασμίδια έδωσαν στο PCR προϊόν στο αναμενόμενο μέγεθος στην πηκτή αγαρόζης 1%.

### 3.2.5.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Οι μεταλλαγμένες αποικίες στελεχών *E. coli* που επιλέχθηκαν εμβολιάστηκαν σε LB υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με Ampicillin 100  $\mu$ g/mL και επώαστηκαν ο/η στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα δείγματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit NucleoSpin® Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel:

- Σε σωληνάριο Eppendorf μικροφυγοκέντρωσης των 2 mL εισήχθησαν περίπου 5 mL κορεσμένης καλλιέργειας επωασμένης για 24h. Φυγοκεντρήθηκαν, ανά 1,6 mL, για 1 min στις 11.000  $\times$  g. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το ίζημα της καλλιέργειας (pellet).
- Το ίζημα επαναιωρήθηκε με προσοχή να μην παραμείνουν συσσωματώματα κυττάρων, σε 250  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension Buffer A1).
- Προστέθηκαν 250  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer A2), ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου 6 – 8 φορές, για να αποφευχθεί η θραύση του γενωμικού DNA και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min ή μέχρι το εναιώρημα να φανεί διαυγές.
- Προστέθηκαν 300  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης (Neutralization Buffer A3) και ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου 6 – 8 φορές, για να αποφευχθεί η θραύση του γενωμικού DNA.
- Για τον καθαρισμό του κυτταρολύματος έγινε φυγοκέντρωση για 5 min σε 11.000  $\times$  g και επανάληψή της σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν ήταν διαυγές.
- Για τη δέσμευση του DNA, τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο των 2 mL, στήλη NucleoSpin® Plasmid, έγινε μετάγγιση του υπερκείμενου του προηγούμενου βήματος, ανά 750  $\mu$ L και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1 min σε 11.000  $\times$  g έως ότου μεταγγισθεί όλο το κυτταρόλυμα.

- Για την έκπλυση της μεμβράνης της στήλης χρειάστηκε ένα επιπρόσθετο βήμα, προστέθηκαν 500  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer AQ), προθερμασμένου στους 50 °C και έγινε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000  $\times$  g όπου και απορρίφθηκε το ρευστό που διαπέρασε τη μεμβράνη.
- Έπειτα, προστέθηκαν 600  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης συμπληρωμένου με αιθανόλη (Wash Buffer A4) έγινε φυγοκέντρηση για 1min σε 11.000  $\times$  g και απορρίφθηκε το ρευστό που διαπέρασε τη μεμβράνη.
- Για την ξήρανση της μεμβράνης της στήλης, επώαστηκε στους 37 °C για 10 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000  $\times$  g.
- Για την έκλυση του DNA από τη μεμβράνη της στήλης, τοποθετήθηκε η στήλη σε νέο σωληνάριο του 1,5 mL, προστέθηκαν 30  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer AE). Η στήλη επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και φυγοκεντρήθηκε σε 11.000  $\times$  g για 1 min. Προστέθηκαν επιπλέον 30  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000  $\times$  g όπου απορρίφθηκε η στήλη με τη μεμβράνη και συλλέχθη το σωληνάριο του 1,5 mL με το πλασμιδιακό DNA.

Ακολούθησε η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA στα δείγματα (παρ. 3.2.4).

### **3.2.5.6 Πέψη του πλασμιδιακού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA (pDNA) που έφερε ως φορέα (vector) το pUC19, πραγματοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο PstI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) σύμφωνα με την αντίδραση:

pDNA	1,5 $\mu\text{g}$
10 $\times$ Buffer	5 $\mu\text{L}$
PstI	2 $\mu\text{L}$
10 $\times$ BSA	5 $\mu\text{L}$
απιονισμένο H <sub>2</sub> O	μέχρι τα 50 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	50 $\mu\text{L}$

Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 3 h και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

---

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.2.5.2, ο γραμμικός πλέον φορέας, προϊόν της πέψης, ηλεκτροφορήθηκε και εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.5.1.2.

### **3.2.5.7 Ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη (Erm)**

Ακολούθησε η ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη (insert Erm) στο γραμμικό φορέα που είχε απομονωθεί σε προηγούμενο στάδιο (παρ. 3.2.5.6), σύμφωνα με την αντίδραση της παραγράφου 3.2.5.3 με τη διαφορά ότι οι ποσότητες του γραμμικού φορέα και της ένθεσης ήταν 150 ng. Σημειώνεται ότι το pEP1377 εμπειρείχε ήδη το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη συνεπώς δε χρειάστηκε η διαδικασία αυτή.

Τα δείγματα επώαστηκαν στους 50 °C για 15 min, τοποθετήθηκαν σε πάγο, φυγοκεντρήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα προκειμένου να κατακρημνιστεί το υλικό στο σωληνάριο Eppendorf και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Με τις τεχνικές αυτές δημιουργήθηκε το πλασμίδιο που του αποδόθηκε η ονομασία pORI198.

### **3.2.5.8 Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* με τα πλασμίδια pORI198 και pEP1377198**

Ο μετασηματισμός του pORI198 και του pEP1377198 πραγματοποιήθηκε σε έτοιμα από το In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit κύτταρα *E. coli* σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 3.2.5.4 με τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, χωρισμένα σε δύο ομάδες τρυβλίων. Στη μεν πρώτη ομάδα Erm 250 µg/mL και στη δε δεύτερη Amp 100 µg/mL και Erm 160 µg/mL όπως αναφέρεται στον Πίν. 3-1.

Δημιουργήθηκαν διατεταγμένες αποικίες (patches) εις διπλούν και έγινε Colony PCR με τους εκκινητές M13F/ M13R 20 δειγμάτων κατά την αντίδραση που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5.4.1

Από τις αποικίες που επιλέχθηκαν, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.5.5 και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους (παρ. 3.2.4).

### **3.2.6 Αλληλούχηση των παλίνδρομων φορέων (pORI198 και pEP1377198)**

Το πλασμιδιακό DNA (pORI198 και pEP1377198) που απομονώθηκε, εστάλη για αλληλούχηση στην εταιρεία VBC-BIOTECH Service GmbH, Wien, Austria και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

---

### 3.2.7 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με τους παλίνδρομους φορείς

Οι παλίνδρομοι φορείς χρησιμοποιήθηκαν για το μετασηματισμό κυττάρων *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 τα οποία είχαν καταστεί επιδεκτικά σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο:

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

Για το μετασηματισμό, χρησιμοποιήθηκε 1μg πλασμιδιακού DNA και 40μL καλλιέργειας επιδεκτικών κυττάρων *L. lactis* MG1363, τα οποία εισήχθησαν σε κυψελίδα ηλεκτρομετασηματισμού (electroporation cuvette) με απόσταση ηλεκτροδίων 2mm και εκτέθηκαν σε ηλεκτρικό παλμό τάσεως 12,5 kV/cm, διάρκειας 4.5-5 ms σε MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). Αμέσως μετά, τα εναιωρήματα αναμίχθηκαν με 960μL παγωμένου SGM17, που περιείχε 20 mM MgCl<sub>2</sub> και 2 mM CaCl<sub>2</sub> (SGM17MC) και παρέμειναν σε πάγο για 5 min. Έπειτα έγιναν 3 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στα δείγματα με 100 μL καλλιέργειας και 900 μL SGM17. Κατόπιν τα πυκνά δείγματα καθώς και οι αραιώσεις τους επιστρώθηκαν (100μL καλλιέργειας/τρυβλίο) σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα GM17 που περιείχε συγκέντρωση αντιβιοτικού Erm 2 μg/mL. Στη συνέχεια τα τρυβλία αυτά τοποθετήθηκαν στους 37 °C όπου επώαστηκαν για 48 h (Holo & Nes 1989).

Από τις μεταλλαγμένες αποικίες, δηλαδή εκείνες που αναπτύχθηκαν παρουσία ερυθρομυκίνης, δημιουργήθηκαν τρυβλία με διατεταγμένες αποικίες που επώαστηκαν στους 37 °C ο/η. Κατόπιν εμβολιάστηκαν από τις διατεταγμένες αποικίες υγρά θρεπτικά υποστρώματα GM17 που επώαστηκαν στους 37 °C ο/η και ακολούθησε αποθήκευση των αποικιών σε φιαλίδια (vials) στους -80 °C, απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) κατά τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.3 καθώς και Colony PCR σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.5.4.1.

---

### 3.2.8 Έλεγχος σταθερότητας του πλασμιδίου pORI198 στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Αρχικά έγινε καταμέτρηση αποικιών από μία καλλιέργεια 12 ωρών και προσδιορίστηκε ο τελικός πληθυσμός της. Αυτό έγινε με στόχο να υπολογιστεί η συγκέντρωση του εμβολίου που θα εξασφάλιζε την ανάπτυξη του πληθυσμού για 10 γενεές σε 12 ώρες. Για τον υπολογισμό αυτόν, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος από τον οποίο προκύπτει και ο υπολογισμός του χρόνου γενεών (generation time):

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2}$$

Όπου:

n: ο αριθμός γενεών

B: ο αρχικός πληθυσμός (cfu/mL)

b: ο τελικός πληθυσμός (cfu/mL)

Βρέθηκε ότι με εμβόλιο 0,5% v/v από μία ο/n καλλιέργεια ο πληθυσμός του *L.lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αναπτύσσεται σε 12 ώρες για 10 γενεές. Η πρόβλεψη αυτή επιβεβαιώθηκε και πειραματικά.

Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα του πλασμιδίου pORI198 στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 πραγματοποιήθηκε 1% v/v εμβόλιο από φιαλίδιο που είχε αποθηκευθεί στους -80 °C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα GM17 που περιείχε το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη σε συγκέντρωση 2 µg/mL όπως φαίνεται στον Πίν. 3-1 και επώαστηκε στους 37 °C ο/n. Έπειτα η καλλιέργεια ανανεώθηκε για δεύτερη συνεχή φορά για να εξασφαλισθεί η απομάκρυνση των υπολειμμάτων της γλυκερόλης από το αρχικό εμβόλιο.

Στη συνέχεια ακολούθησαν δέκα διαδοχικές ανανεώσεις με εμβόλιο 0,5 % v/v σε GM17 ανά 12 h προκειμένου να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του στελέχους για περίπου 100 γενεές. Παράλληλα, ανά 24 h πραγματοποιήθηκε από τις καλλιέργειες που ανανεώνονταν, καταμέτρηση του πληθυσμού του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με ενσωμάτωση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε υπόστρωμα GM17 παρουσία ή απουσία 2 µg/mL ερυθρομυκίνης.

### 3.2.9 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων pSMA198 και pORI198 στον *S. macedonicus* ACA-DC 198 και στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αντίστοιχα (Plasmid Copy Number, PCN)

Για να ποσοτικοποιηθούν τα πλασμίδια pSMA198 και pORI198 στον *S. macedonicus* ACA-DC 198 και στον *L. lactis* MG1363 αντίστοιχα, απομονώθηκε το γενωμικό DNA του *S. macedonicus* ACA-DC 198 καθώς και του μετασηματισμένου *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363



---

που είχε αναπτυχθεί με ή χωρίς ερυθρομυκίνη στο θρεπτικό μέσο σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

- Σε σωληνάριο Eppendorf μικροφυγοκέντρωσης των 2 mL εισήχθησαν περίπου 5 mL καλλιέργειας επωασμένης για 16 h περίπου. Φυγοκεντρήθηκαν, ανά 1,6 mL, για 1 min στις  $11.000 \times g$ . Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το ίζημα της καλλιέργειας (pellet).
- Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 750  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης που περιείχε 0.15M NaCl, 50mM EDTA.
- Έπειτα τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 193  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης που περιείχε 20 mg/mL λυσοζύμης. Προστέθηκαν 7  $\mu$ L μουτανολυσίνης.
- Τοποθετήθηκαν σε πάγο για 10 min και επώαστηκαν στους 37 °C για 1 h.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 30  $\mu$ L πυκνού διαλύματος SDS (20%) και 15  $\mu$ L πυκνού διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10  $\mu$ g/mL).
- Ακολούθησε επώαση στους 55 °C για 30 min και δεύτερη επώαση στους 70 °C για 30 min.
- Ακολούθησε εκχύλιση του DNA με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1 (v/v), δυο φορές και μια φορά εκχύλιση με ίσο όγκο χλωροφορμίου.
- Για την εκχύλιση του κυτταρολύμματος χρησιμοποιήθηκε μείγμα ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφορμίου δύο φορές και μια φορά χλωροφόρμιο ίσου όγκου.
- Στο εκχύλισμα (~ 100  $\mu$ L) προστέθηκαν 10  $\mu$ L RNase (Macherey-Nagel, Düren, Germany) και επώαστηκε στους 37 °C για 15 min.
- Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Στα δείγματα γενωμικού DNA έγιναν 6 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους (παρ. 3.2.4).

Ακολούθησε PCR για να ελεγχθεί η ποιότητα των ομάδων των εκκινητών (primers *alaS* και *tufA*) που θα χρησιμοποιούνταν στο επόμενο στάδιο σύμφωνα με την αντίδραση:

2xMix	12,5 $\mu$ L
primer Forward	0,5 $\mu$ L
primer Reverse	0,5 $\mu$ L
gDNA	400ng
απιονισμένο H <sub>2</sub> O	μέχρι τα 25 $\mu$ L
Τελικός όγκος	25 $\mu$ L

---

Κατόπιν, τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 3%, λόγω του μικρού μεγέθους τους ( $\approx 100\text{bp}$  και  $250\text{bp}$ ) στα 90 V.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ποσοτική μέθοδος PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Οι αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA) χρησιμοποιώντας το KAPA SYBR® FAST qPCR master mix (KAPABIOSYSTEMS, Wilmington, MA 01887 United States)

Η αντιδραση του qPCR περιείχε:

2x buffer	10 $\mu\text{L}$
DNA	1 $\mu\text{L}$
primer Forward	0,4 $\mu\text{L}$
primer Reverse	0,4 $\mu\text{L}$
ROX low	10 $\mu\text{L}$
απιονισμενο H <sub>2</sub> O	μέχρι τα 20 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	20 $\mu\text{L}$ .

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

95 °C, 3 min

95 °C, 3 sec

60 °C, 30 sec

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε στον *S. macedonicus* ACA-DC 198 τμήμα  $\sim 100\text{bp}$  του γονιδίου *mcdM*, που υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα του, με τους εκκινητές *mcdM-F/mcdM-R* (Πίν. 3-2). Αντίστοιχα, για τον *L. Lactis ssp. cremoris* MG1363 πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα  $\sim 100$  bp του γονιδίου *tufA* (παράγοντας επιμήκυνσης) με τους εκκινητές *tufA-F/tufA-R* (Πίν. 3-2) και για τα πλασμίδια επιλέχθηκε τμήμα του γονιδίου *rep* με τους εκκινητές *repF/repR* (Πίν. 3-2). Ο σχετικός αριθμός των πλασμιδιακών αντιγράφων (PCN) προσδιορίστηκε με την εξίσωση  $PCN = (E_c)^{C_{tc}} / (E_r)^{C_{tr}}$  που λαμβάνει υπ' όψιν τις διαφορετικές αποδόσεις της αντίδρασης (efficiency, E) αλλά και τη διαφορά των ορίων κύκλου (Cycle Threshold, C<sub>T</sub>) μεταξύ των δυο αμπλικονίων (χρωμοσωμικού-c και πλασμιδιακού-p) (Skulj *et al.* 2008).

Πίν. 3-2: Εκκινητές

---

Primer	Gene	size nt	Sequence
M13F			GTAAAACGACGGCCAGT
M13R			CAGGAAACAGCTATGAC

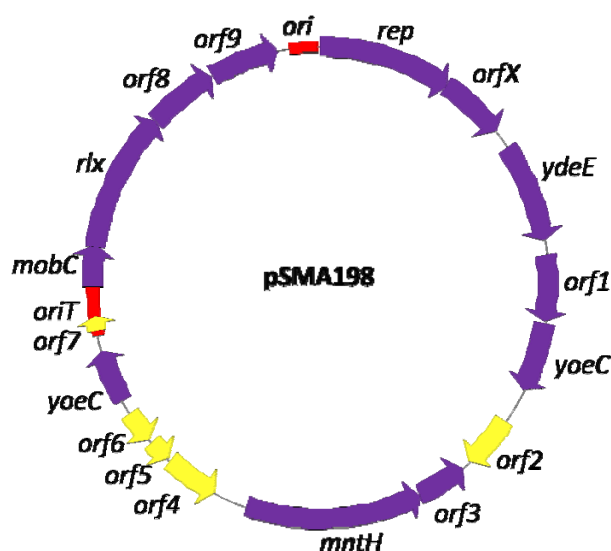
---

Primer	Gene	size nt	Sequence
pr2Fn	rep	1194	GAGCTCGGTACCCGGGGATCATGGACGAGCCA CTCGTATC
pr2R	orfX	585	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCATTCATCTATTT CTCCCTCTCTTC
ErmF1	ydeE	858	TGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGACGTATATAGAT TTCATAAAGTC
ErmR1	orf1	582	TTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGCATTCCCTTTAG TAACGTGTAAC
repF PCN 198 and MG	yoeC	591	GAAATCAACGCCCATACGTC
repR PCN 198 and MG	orf2	459	TATCGTCTGCACACCGTTTC
tufA-F PCN MG	orf3	438	GGTAGTTGTCGAAGAATGGAGTGTGA
tufA-R PCN MG	mntH	1578	TAAACCAGGTTCAATCACTCCACACA
mcdM-F PCN 198	orf4	480	CGGAATTCAGTTCTTTCTACGG
mcdM-R PCN 198	orf5	195	GCTTCACCAATAAGCGTTCC
pr1Fn			ACCATGATTACGCCAAGCTTATGGACGAGCCACTCGT ATC
pr1R			CCGAGCTCGGTACCAAGCTTTTCTTTACGTGCCTTAG AAGGAG

## 4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 4.1 Το πλασμίδιο pSMA198 ανήκει στην οικογένεια pCI305/pWV02 του γένους *Lactococcus*

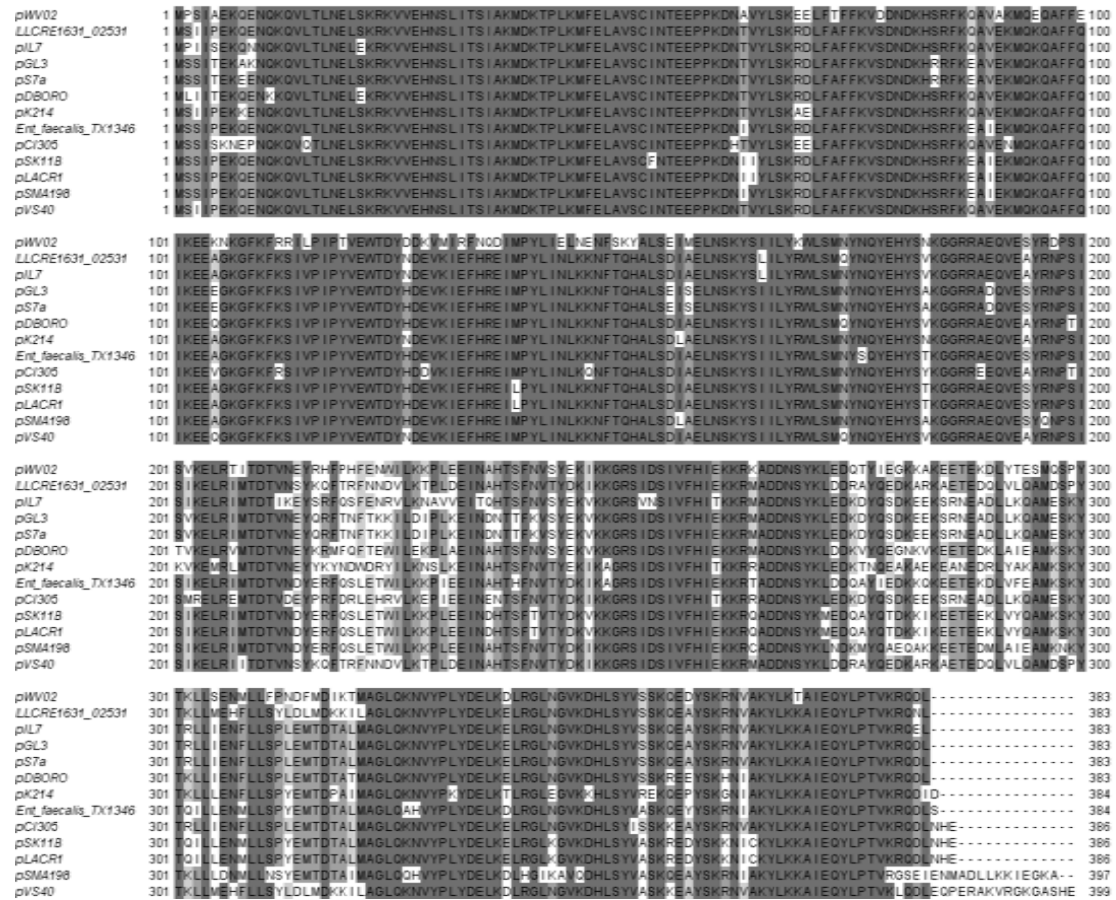
Ο *S. macedonicus* ACA-DC 198 φέρει ένα νέο πλασμίδιο 12.728 bp (ζευγών βάσεων) με την ονομασία pSMA198 (Paradimitriou *et al.* 2012). Το πλασμίδιο αυτό έχει ένα ποσοστό G+C 35,0%, το οποίο είναι χαμηλότερο από αυτό που περιέχεται στο χρωμόσωμα του *S. macedonicus* (37,6%) και υποδηλώνει πως μπορεί να προέρχεται από έναν άλλο οργανισμό. Στο pSMA198, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 17 πιθανά γονίδια (Εικ. 4-1).



Εικ. 4-1: Ο χάρτης του πλασμιδίου pSMA198. Οι αλληλουχίες *ori* και *oriT* τονίζονται με κόκκινο χρώμα. Τα 12 λειτουργικά γονίδια αναπαριστώνται με μωβ, ενώ με κίτρινο απεικονίζονται τα 5 ψευδογονίδια.

Το πρώτο γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου (Rep). Το γονίδιο *rep* εμφάνισε 87% ομοιότητα αλληλουχίας DNA με το αντίστοιχο γονίδιο που εντοπίζεται στον *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Makarova *et al.* 2006). Με βάση τα καλύτερα αποτελέσματα που έβγαλε το πρόγραμμα WU-Blast για την πρωτεΐνη Rep, ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες RepB των πλασμιδίων pCI305 και pWV02 (78% ομοιότητα, e-value  $8,3e^{-162}$  και 75% ομοιότητα, e-value  $2,9e^{-152}$ , αντίστοιχα), τα οποία είναι τα πρότυπα πλασμίδια της οικογένειας pCI305/pWV02 του γένους *Lactococcus*, που αντιγράφονται με το μηχανισμό θήτα (Hayes *et al.* 1990, Kiewiet *et al.* 1993). Η πολλαπλή στοίχιση των καλύτερων αποτελεσμάτων της πρωτεΐνης Rep από το πρόγραμμα WU-Blast,

συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών RepB των ρCI305 και ρWV02, εμφάνισε έναν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ τους (Εικ. 4-2).



Εικ. 4-2: Πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνών RepB που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του πλασμιδίου ρSMA198, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών των πλασμιδίων ρCI305 και ρWV02. Το διακεκομμένο βέλος με τις παύλες και τις διπλές άκρες, περιλαμβάνει την περιοχή που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, Rep. Το διακεκομμένο βέλος με τις τελείες και τις διπλές άκρες, περιλαμβάνει το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης RepB του *Lactococcus lactis*. Τα συνεχόμενα βέλη με τις διπλές άκρες αναπαριστούν τις δύο περιοχές όπου εμφανίζονται τα δομικά μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το ClustalW, καθώς η εύρεση των αυτοτελών δομικών στοιχείων εντός των πρωτεϊνών διεξήχθη με το εργαλείο InterProScan.

Η ανάλυση των εν λόγω πρωτεϊνών με το πρόγραμμα InterProScan έδειξε πως η πρωτεΐνη Rep περιλαμβάνει τρία αυτοτελή δομικά στοιχεία που είναι καταγεγραμμένα στην Pfam και αντιστοιχούν στα εξής: (i) στην πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής Rep (Rep\_3, PF01051), (ii) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης RepB του *L. lactis* (L\_lactis\_RepB\_C, PF06430) και (iii) στο μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας που έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το μόριο του DNA (Wing\_hlx\_DNA\_bd, G3DSA:1.10.10.10). Το πρώτο στοιχείο είναι τυπικό των πρωτεϊνών Rep των πλασμιδίων που αντιγράφονται με το μηχανισμό θήτα (Solar *et al.* 1998), ενώ ο συνδυασμός του με το δεύτερο στοιχείο φαίνεται να είναι συγκεκριμένο και χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών RepB της οικογένειας ρCI305/ρWV02. Παρόλο που στο άμνο-τελικό άκρο των πρωτεϊνών αυτών εντοπίστηκαν

---

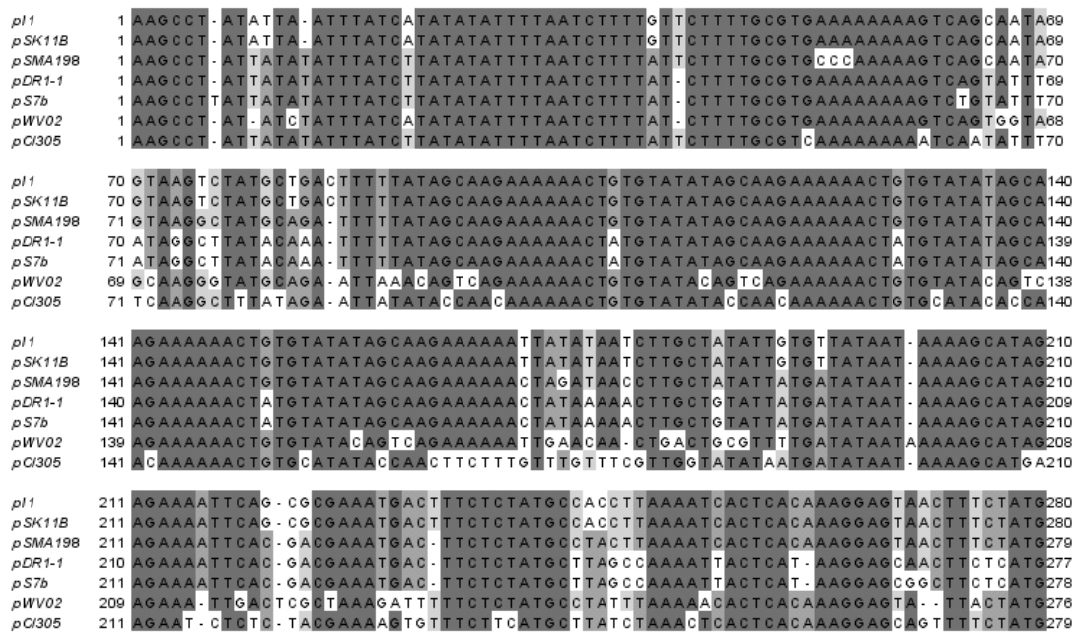
αρκετά υπολείμματα λευκίνης, οι δομικές προβλέψεις που διεξήχθησαν, έδειξαν πως τα υπολείμματα αυτά δε μπορούν να σχηματίσουν ένα φερμουάρ λευκίνης, σε αντίθεση με τα δεδομένα που υπάρχουν για το μοντέλο της πρωτεΐνης RepA του pS10 (Giraldo & Fernández-Tresguerres 2004), πλασμιδίου του γένους *Pseudomonas* καθώς και για την RepB του pCD4, πλασμιδίου του γένους *Lactococcus* (E & Stela 2001). Ωστόσο, η ιδιότητα αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RepB με το μόριο του DNA μπορεί να εξαρτάται από την παρουσία του μοτίβου έλικά-στροφή-έλικά που εντοπίζεται στην περιοχή Rep\_3 της πρωτεΐνης Rep (Εικ. 4-2).

Αμέσως μετά το γονίδιο *rep*, εντοπίζεται το γονίδιο *orfX* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μίας πρωτεΐνης, η οποία έχει προταθεί ότι συμμετέχει στον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων του πλασμιδίου στο κύτταρο-ξενιστή. Το γονίδιο *orfX* είναι σημαντικά λιγότερο συντηρημένο από το *rep*. Το γεγονός αυτό δεν ήταν μη αναμενόμενο, δεδομένου ότι σε μερικά πλασμίδια το *orfX* απουσιάζει, υποδηλώνοντας πως δεν πρέπει να θεωρείται απαραίτητο στοιχείο της αντιγραφής των πλασμιδίων που το φέρουν (Mills *et al.* 2006).

Άλλες πρωτεΐνες που πιθανώς να έχουν ενδιαφέρον και κωδικοποιούνται από τα γονίδια του pSMA198 είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας της μεταγραφής που ανήκει στην οικογένεια AraC (YdeE), μία πρωτεΐνη ανθεκτικότητας στο στρες (Orf3) της οικογένειας Usp (Universal stress protein) και μία πρωτεΐνη μεταφοράς του μαγγανίου (MntH). Το γονίδιο *orf1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης του κυττάρου, άγνωστης λειτουργίας. Τα πέμπτο και δωδέκατο κατά σειρά γονίδια, κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη (YoeC) σχετιζόμενη με το πλασμίδιο με ενεργότητα ιντεγκράσης/ρεκομπινάσης (integrase/recombinase). Πέντε περιοχές ORF είναι πιθανά ψευδογονίδια, οι τέσσερις (*orf2*, *orf4*, *orf5* και *orf6*) είναι τμήματα γονιδίων που αποτελούν μεταθετά στοιχεία, ενώ η πέμπτη (*orf7*), κωδικοποιεί μία αμινοξική αλληλουχία η οποία εμφανίζει 63% ομοιότητα με μία περικομμένη εκδοχή του κυτοχρώματος B που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο του *L. lactis*. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως το πλασμίδιο pSMA198 έχει υποστεί διαδικασίες γονιδιακής αποσύνθεσης.

Τα υπόλοιπα τέσσερα γονίδια του πλασμιδίου είναι πιθανώς συνδεδεμένα με την κινητικότητα του πλασμιδίου. Εκτός από τα *mobC* και *rlx* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταφοράς δύο επιπλέον γονίδια (*orf8* και *orf9*) κωδικοποιούν μία συντηρημένη υποθετική πρωτεΐνη και μία πρωτεΐνη της οικογένειας Fic, αντίστοιχα. Γονίδια, όπως το *orf9*, βρίσκονται συχνά στην ίδια περιοχή με τα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά του πλασμιδίου και είναι πιθανό να εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Das *et al.* 2010).

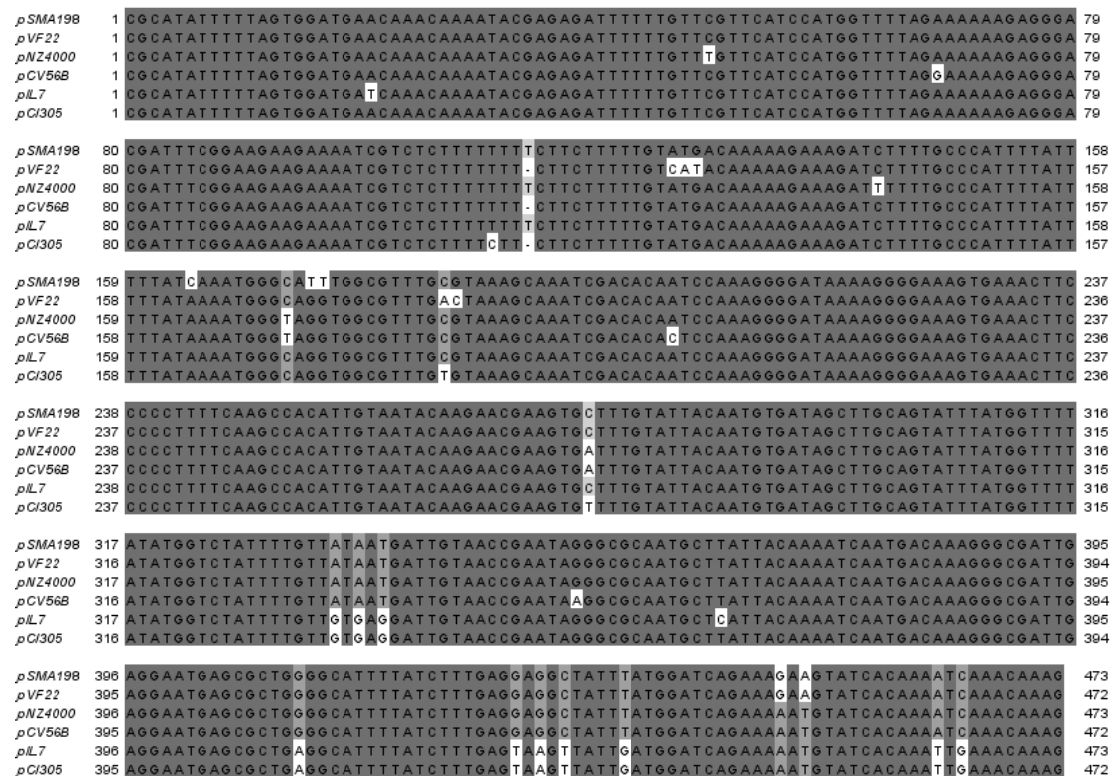
Εν συνεχεία, σε μία προσπάθεια ταυτοποίησης της έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του ρSMA198, έγινε έλεγχος του DNA αναρροϊκά του γονιδίου *rep*. Με το πρόγραμμα WU-Blastn διεξήχθησαν αναζητήσεις ομοιότητας και πολλαπλές συστοιχίσεις αλληλουχιών, οι οποίες έδειξαν προς τον τύπο της αλληλουχίας *ori* της οικογένειας των πλασμιδίων ρCI305/ρWV02. Έτσι καθορίστηκε ένα κομμάτι μεγέθους 242 νουκλεοτιδίων, το οποίο περιέχει μία περιοχή πλούσια σε A, T (αδενίνη, θυμίνη), τρισήμιση ευθείες επαναλήψεις (Direct Repeats, DRs) μίας αλληλουχίας 22 bp (ζευγών βάσεων) και δύο ανάστροφες επαναλήψεις (Inverted Repeats, IRs) (Εικ. 4-3). Το μοτίβο της αλληλουχίας *ori* του πλασμιδίου ρSMA198 καθώς και η ομοιότητα της πρωτεΐνης Rep με την πρωτεΐνη RepB του γένους *Lactococcus* δείχνουν ότι το ρSMA198 ανήκει με βεβαιότητα στην οικογένεια ρεπλικονίων ρCI305/ρWV02, η οποία συνήθως συναντάται σε είδη του γένους *Lactococcus* (Kiewiet *et al.* 1993, Hayes *et al.* 1990, Mills *et al.* 2006).



Εικ. 4-3: Πολλαπλή στοίχιση της αλληλουχίας του σημείου έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του πλασμιδίου ρSMA198 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες σε συγγενικά του πλασμίδια, συμπεριλαμβανομένων και των *ori* των πλασμιδίων ρCI305 και ρWV02. Οι περιοχές που οριοθετούνται με βέλη είναι οι εξής: (i) μια περιοχή πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη (AT-rich region) (ii) τρισήμιση επαναλήψεις μίας αλληλουχίας 22bp (22bp-DR) (iii) δύο ανάστροφες επαναλήψεις (IRa και IRb). Οι υπογραμμισμένες περιοχές είναι οι εξής: (i) οι υποκινητές στις θέσεις “-35” και “-10”(ii) η αλληλουχία σύνδεσης με το ριβόσωμα (Ribosome Binding Site, RBS) (iii) το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της πρωτεΐνης Rep. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το ClustalW.

Επιπροσθέτως, παρόλο που το ρSMA198 δεν έχει από μόνο του την ικανότητα να μεταφέρεται από το κύτταρο ξενιστή σε άλλο κύτταρο δέκτη, προβλέφθηκε μία αλληλουχία DNA αναρροϊκά του γονιδίου *mobC*, η οποία θα επέτρεπε τη μεταφορά του παρουσία ενός πραγματικού συζευκτικού πλασμιδίου. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται σημείο έναρξης της

μεταφοράς (*oriT*) του πλασμιδίου και εμπεριέχει μία περιοχή με έξι διαδοχικές ανάστροφες επαναλήψεις και δύο ευθείες επαναλήψεις μίας αλληλουχίας 14 νουκλεοτιδίων (Εικ. 4-4). Στο σημείο που βρίσκεται 8 βάσεις μετά την τρίτη ανάστροφη επανάληψη εντοπίστηκε μία θέση εγκοπής ίδια με αυτές που έχουν προταθεί για τα πλασμίδια pS7a και pS7b, τα οποία βρίσκονται στον *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* S50 που απομονώθηκε από βούτυρο (Strahinic *et al.* 2009). Οι δομές αυτές είναι υψηλά συντηρημένες σε διάφορα πλασμίδια του γένους *Lactococcus*, συμπεριλαμβανομένου και του pCI305 (Strahinic *et al.* 2009, Górecki *et al.* 2011).



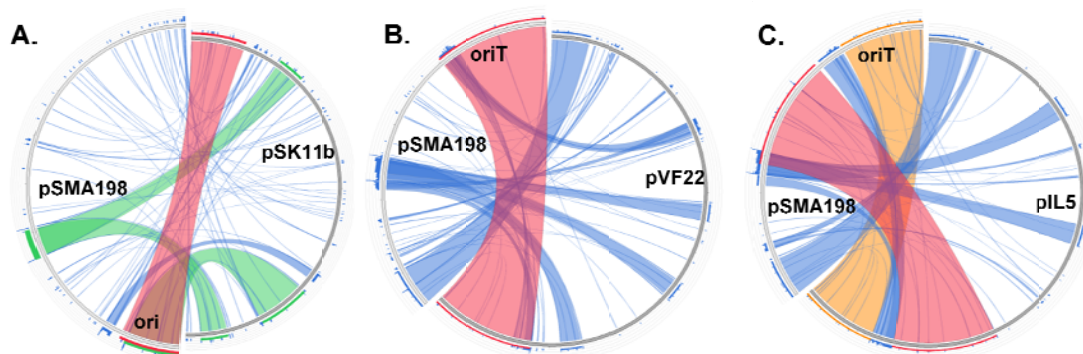
Εικ. 4-4: Πολλαπλή στοίχιση μεταξύ του σημείου έναρξης της μεταφοράς (*oriT*) του πλασμιδίου pSMA198 και των αντίστοιχων αλληλουχιών σε συγγενικά του πλασμίδια, συμπεριλαμβανομένου και του pCI305. Τα διακεκομμένα βέλη αντιστοιχούν στις 6 ανάστροφες επαναλήψεις και τα συνεχόμενα βέλη στις δύο επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 14 νουκλεοτιδίων. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο ClustalW.

## 4.2 Το πλασμίδιο pSMA198 μεταφέρθηκε στον *Streptococcus macedonicus* από τον *Lactococcus lactis* σε περιβάλλον γάλακτος

Η συγγένεια του pSMA198 με άλλα πλασμίδια διερευνήθηκε περαιτέρω. Αναζητήσεις με το πρόγραμμα WU-Blastn υποστηρίζουν ότι τα πλησιέστερα πλασμίδια προέρχονται από το γένος *Lactococcus*. Τα καλύτερα αποτελέσματα της αναζήτησης συστοιχίστηκαν κυκλικά με το pSMA198 χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Circoletto. Η αναζήτηση ξεκίνησε με τα *ori* και *oriT* του pSMA198 που έδειξαν τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας με τις αντίστοιχες περιοχές των



πλασμιδίων pSK11b (92% ομοιότητα) και pVF22 (94% ομοιότητα), αντίστοιχα. Το πλασμίδιο pSK11b έχει απομονωθεί από το στέλεχος *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία παρασκευής τυριών ως εναρκτήρια καλλιέργεια (Siezen *et al.* 2005). Το πλασμίδιο pVF22 έχει απομονωθεί από το στέλεχος *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DPC3901, το οποίο εντοπίστηκε στο τυρί από νωπό γάλα (Fallico *et al.* 2011). Ωστόσο, η ομοιότητα των αλληλουχιών μεταξύ του pSMA198 και των πλασμιδίων pSK11b και pVF22 περιοριζόταν σημαντικά στο σκελετό της αντιγραφής (*ori-rep-orfX*) ή της μεταφοράς του πλασμιδίου (*oriT-mobC-rlx-orf8-orf9*), αντίστοιχα (Εικ. 4-5). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναζήτηση του πλασμιδίου που θα είχε την υψηλότερη ομοιότητα με ολόκληρη την αλληλουχία του pSMA198. Το πλασμίδιο που ταυτοποιήθηκε ήταν το pIL5 που έχει απομονωθεί από το στέλεχος *L. lactis* subsp. *lactis* IL594, το οποίο είναι εναρκτήρια καλλιέργεια τυριού (Górecki *et al.* 2011). Το πλασμίδιο pIL5 εμφάνισε πάνω από 90% ομοιότητα με το 62% της αλληλουχίας του pSMA198, περιέχοντας ολόκληρο το σκελετό της μεταφοράς του πλασμιδίου (Εικ. 4-5). Τονίζεται ότι εκτός από τα πιο κοντινά αποτελέσματα, σε επίπεδο ομοιότητας, που προαναφέρθηκαν, η πλειονότητα των καλύτερων αποτελεσμάτων διαφορετικών χαρακτηριστικών του pSMA198 σε επίπεδο πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων, προερχόντουσαν από στελέχη του *L. lactis* που έχουν απομονωθεί από το γάλα ή τα προϊόντα του. Επομένως, είναι πολύ πιθανόν ότι το αρχικό κύτταρο δότης του πλασμιδίου pSMA198 να ήταν ένα στέλεχος του *L. lactis* από γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα.

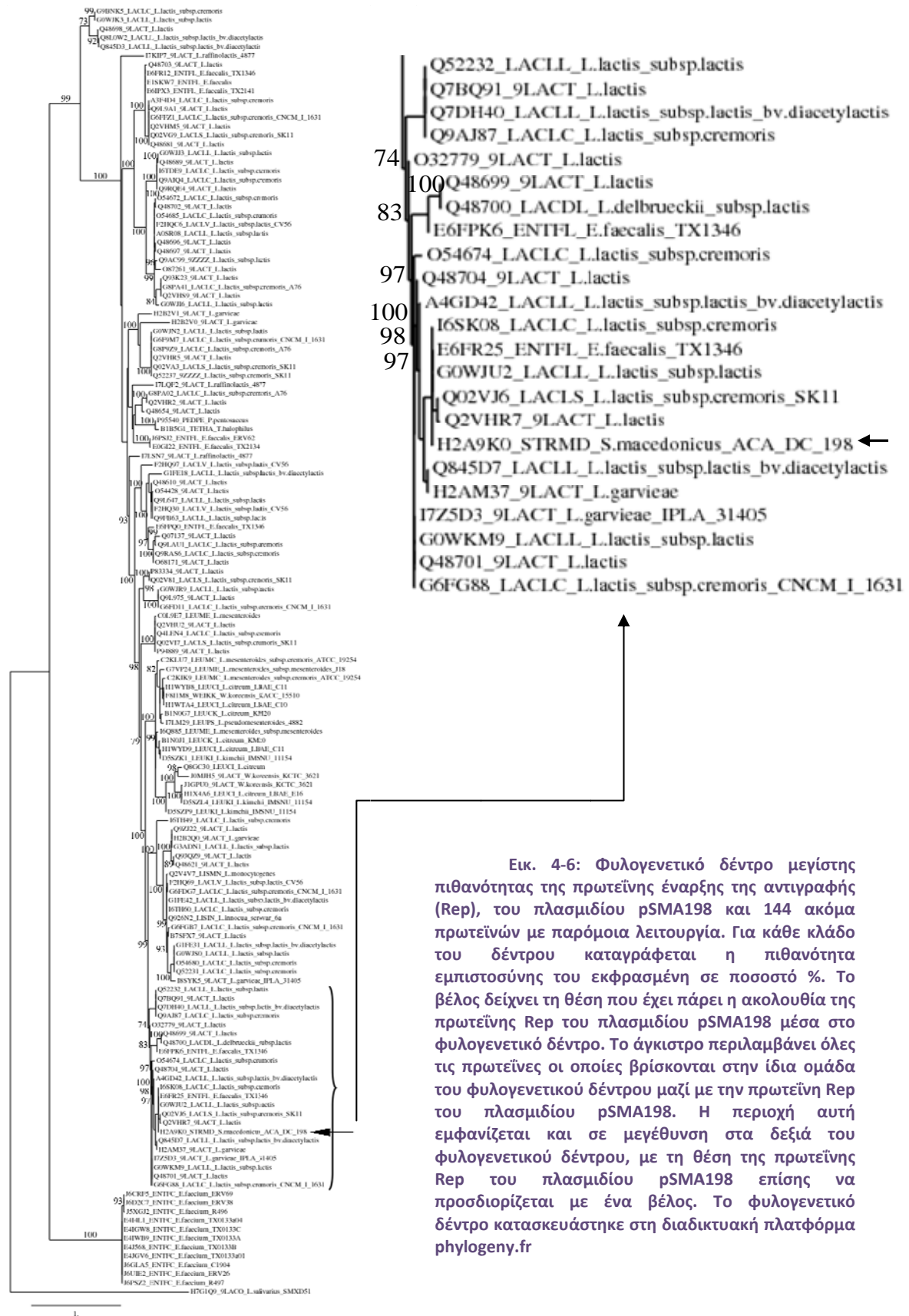


Εικ. 4-5: Ολική στοίχιση της αλληλουχίας του πλασμιδίου pSMA198, έναντι των πλασμιδίων pSK11b(A), pVF22(B) και pIL5(C), σε μία κυκλική απεικόνιση. Τα επίπεδα ομοιότητας των τοπικών στοίχισεων και στις τρεις περιπτώσεις, ανάλογα με το χρώμα με το οποίο αναπαριστώνται, χωρίζονται σε 4 ομάδες: (i) κόκκινες γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 75-100% (ii) πορτοκαλί γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 50-75% (iii) πράσινες γραμμές: επίπεδα στοίχισης: 25-50% (iv) μπλε γραμμές: επίπεδα στοίχισης: χαμηλότερα από 25%. Σε κάθε ένα από τα τρία γραφήματα, είναι σημειωμένες οι θέσεις είτε της αλληλουχίας έναρξης της αντιγραφής (*ori*) του πλασμιδίου pSMA198 ή της αλληλουχίας έναρξης της μεταφοράς του (*oriT*), προκειμένου να είναι σαφής η κατεύθυνση της αλληλουχίας του DNA του pSMA198 σε κάθε περίπτωση. Για το σχεδιασμό της εικόνας χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Circoletto.

Για την εύρεση επιπλέον αποδεικτικών στοιχείων της υπόθεσης αυτής, διεξήχθη φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης έναρξης της αντιγραφής, RepB (Εικ. 4-6). Η αλληλουχία

---

της πρωτεΐνης Rep του ρSMA198 τοποθετήθηκε εντός μίας ομάδας, στην οποία οι 17 από τις 19 πρωτεΐνες RepB του γένους *Lactococcus* προέρχονταν από γαλακτοκομικά στελέχη του *L. lactis*. Ολόκληρο το δέντρο αποτελούνταν από δύο βασικούς κλάδους. Στον πρώτο κλάδο, οι πρωτεΐνες RepB του *L. lactis* εμφανίζονταν πιο συχνά (91 από τις 100 αλληλουχίες του γένους *Lactococcus*, σε ένα σύνολο των 134 αλληλουχιών), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες RepB που βρίσκονται σποραδικά σε είδη εκτός του γένους *Lactococcus* και είναι διεσπαρμένες σε διαφορετικές ομάδες εντός του κλάδου αυτού (π.χ. *Listeria monocytogenes* DRDC8, *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* W9, *Tetragenococcus halophilus* H, *Weissella koreensis* KACC 15510 και *Leuconostoc* spp.), πρέπει να προέρχονται από τον *L. lactis*. Ο δεύτερος κλάδος, απαρτιζόταν πλήρως από πρωτεΐνες RepB του γένους *Enterococcus* που έχουν αποκλίσει από τις υπόλοιπες. Το γεγονός ότι μόνο 45 από τις 145 πρωτεΐνες RepB που συμπεριλήφθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση δεν ανήκαν σε είδη του γένους *Lactococcus*, συμφωνεί με την περιορισμένη διασπορά των πλασμιδίων της οικογένειας ρCI305/ρWV02 σε είδη εκτός του γένους *Lactococcus*, όπως φαίνεται από πρόσφατα πειραματικά δεδομένα που περιγράφουν τη φύση των πλασμιδίων αυτών με περιορισμένο εύρος ξενιστών (Kiewiet *et al.* 1993, Hayes *et al.* 1990).



Εικ. 4-6: Φυλογενετικό δέντρο μεγίστης πιθανότητας της πρωτεΐνης έναρξης της αντιγραφής (Rep), του πλασμιδίου pSMA198 και 144 ακόμα πρωτεϊνών με παρόμοια λειτουργία. Για κάθε κλάδο του δέντρου καταγράφεται η πιθανότητα εμπιστοσύνης του εκφρασμένη σε ποσοστό %. Το βέλος δείχνει τη θέση που έχει πάρει η ακολουθία της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου pSMA198 μέσα στο φυλογενετικό δέντρο. Το άγκιστρο περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στην ίδια ομάδα του φυλογενετικού δέντρου μαζί με την πρωτεΐνη Rep του πλασμιδίου pSMA198. Η περιοχή αυτή εμφανίζεται και σε μεγέθυνση στα δεξιά του φυλογενετικού δέντρου, με τη θέση της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου pSMA198 επίσης να προσδιορίζεται με ένα βέλος. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε στη διαδικτυακή πλατφόρμα phylogeny.fr

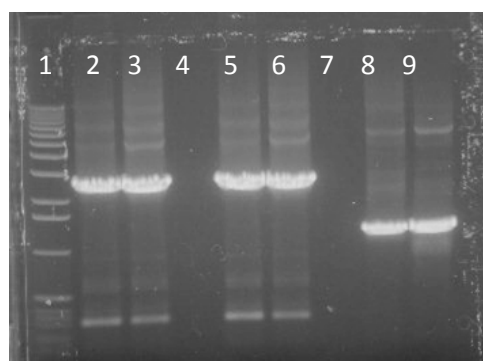
### 4.3 Κατασκευή του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης pORI198

Η *in silico* ανάλυση έδειξε ότι το πλασμίδιο pSMA198 αποκτήθηκε από τον *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198 μέσω οριζόντιας μεταφοράς από τον *Lactococcus lactis*. Για να ενισχυθεί η υπόθεση αυτή κλωνοποιήθηκε η περιοχή έναρξης αντιγραφής του εν λόγω πλασμιδίου στον *Lactococcus lactis* MG1363. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης pORI198, μεταξύ των στελεχών *Escherichia coli* – *Streptococcus macedonicus* και *Lactococcus lactis*, με βάση το σκελετό της αντιγραφής (τμήμα *ori-rep-orfX*) του pSMA198. Ως οχήματα, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pUC19 και pEP1377.

#### 4.3.1 Ενίσχυση του τμήματος *ori-rep-orfX* του πλασμιδίου pSMA 198 καθώς και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη από το πλασμίδιο pGh9:ISS1

Προκειμένου να κατασκευαστεί το pORI198, έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA του *S. macedonicus* και ενισχύθηκε το τμήμα *ori-rep-orfX* του πλασμιδίου pSMA198 με τους εκκινητές pr1Fn/pr1R και τους pr2Fn/pr2R. Επίσης, με τους εκκινητές ErmF/ErmR, ενισχύθηκε και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (*erm*) από το πλασμίδιο pGh9:ISS1, με στόχο την ένθεσή του στο πλασμίδιο pUC19. Η ένθεση αυτή εξυπηρέτησε την επιλογή των μετασηματισμένων αποικιών που έφεραν το pORI198. Το πλασμίδιο pEP1377 εμπεριείχε ήδη το εν λόγω γονίδιο, συνεπώς το στάδιο αυτό παραλήφθηκε.

Τα τμήματα αυτά αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και όπως φαίνεται και στην Εικ. 4-7, ενισχύθηκαν επιτυχώς και είχαν το κατάλληλο μέγεθος. Ακολούθησε η εκχύλιση των τμημάτων αυτών από την πηκτή αγαρόζης (Εικ. 4-7) προκειμένου να είναι έτοιμα για την ένθεσή τους στα πλασμίδια pUC19 και pEP1377.



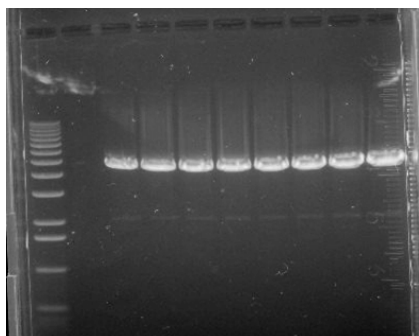
1	ladder 1kb
2	g198.1- pr1Fn/pr1R~2.600bp
3	g198.2- pr1Fn/pr1R~2.600bp
4	-
5	g198.1- pr2Fn/pr2R~2.600bp
6	g198.2- pr2Fn/pr2R~2.600bp
7	-
8	pGh9:ISS1-ErmF/ErmR ~1.100bp
9	pGh9:ISS1-ErmF/ErmR ~1.100bp

Εικ. 4-7: Η πηκτή αγαρόζης με τα τμήματα *ori-rep-orfX* και *erm*, με τους αντίστοιχους εκκινητές

---

### 4.3.2 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης

Για να επιτευχθεί η ένθεση των τμημάτων που ενισχύθηκαν τα πλασμιδιακά οχήματα έπρεπε να είναι γραμμικά. Το πλασμίδιο pUC19 ήταν από κατασκευής γραμμικό ενώ στο pEP1377 χρειάστηκε να γίνει πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII, η οποία έκοψε σε συγκεκριμένες θέσεις το πλασμίδιο.



Εικ. 4-8: Η πηκτή αγαρόζης του γραμμικού πλασμιδίου pEP1377

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, εκχύλιση από την πηκτή αγαρόζης (παράγραφος 3.2.5.1.1) και μέτρηση της συγκέντρωσής του (παράγραφος 3.2.4).

### 4.3.3 Ένθεση τμημάτων DNA σε φορείς κλωνοποίησης

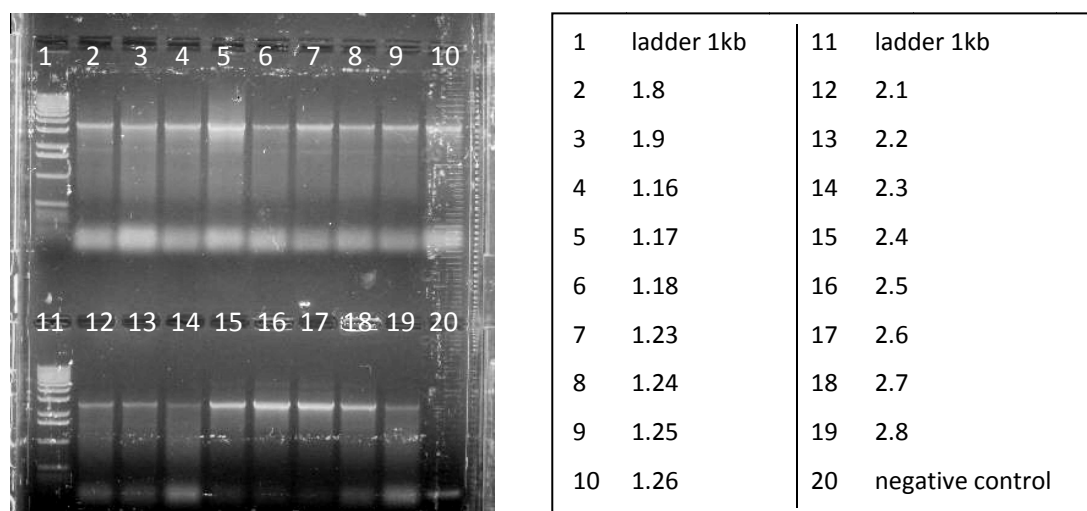
Στους γραμμικούς φορείς κλωνοποίησης pUC19 και pEP1377, πραγματοποιήθηκε η ένθεση του καθαρού τμήματος *ori-rep-orfX*, του πλασμιδίου pSMA198 όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.5.3.

Με τις τεχνικές αυτές κατασκευάστηκε ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης το pEP1377198, με όχημα το πλασμίδιο pEP1377.

### 4.3.4 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με τους παλίνδρομους φορείς κλωνοποίησης

Οι πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης pUC19 και pEP1377 που έφεραν την ένθεση χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*. Τα πλασμίδια αυτά έφεραν και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp). Συνεπώς, προκειμένου να επιλεχθούν οι επιτυχώς μετασηματισμένες αποικίες, έγινε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλίνη (Amp) και καρβενικιλίνη (Car), σε συγκεντρώσεις θανατηφόρες για τα αρνητικά κατά Gram κύτταρα *E. coli*. Στην περίπτωση του pUC19 επειδή περιλάμβανε και το γονίδιο *lacZ*, που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιήθηκε και X-gal για την ταυτοποίηση της παρουσίας του.

Στις μεταλλαγμένες αποικίες έγινε Colony PCR (Polymerase Chain Reaction) και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (Εικ. 4-9) για επιλογή των αποικιών που είχαν προσλάβει το σωστό πλασμίδιο με τις οποίες θα συνεχιζόταν η πειραματική διαδικασία.



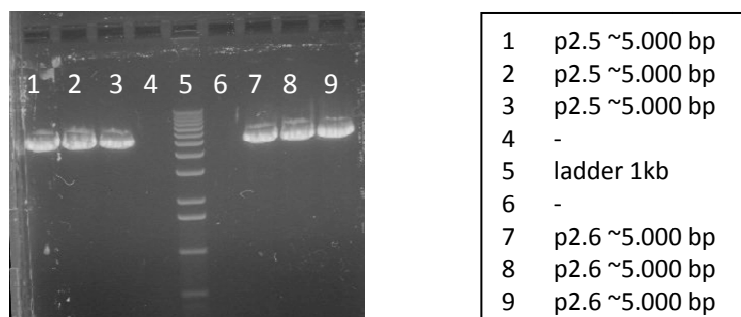
Εικ. 4-9: Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR, με τους αριθμούς των πλασμιδίων (1: pEP1377, 2: pUC19) και των αποικιών, στα ~3.600 και ~2.600 bp, αντίστοιχα

Από τις αποικίες που επιλέχθηκαν (με αριθμούς 2.5 και 2.6), απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA για περαιτέρω χρήση.

#### 4.3.5 Πέψη του πλασμιδιακού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Προκειμένου να γίνει η ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (Erm) στα p2.5 και p2.6, έγινε πέψη των πλασμιδίων με το περιοριστικό ένζυμο PstI το οποίο έκοψε σε συγκεκριμένη θέση τον πλασμιδιακό αυτό φορέα.

Το προϊόν της πέψης αυτής αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης, από την οποία και εκχυλίστηκε (Εικ. 4-10).



Εικ. 4-10: Η πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης των p2.5 και p2.6 με το περιοριστικό ένζυμο PstI

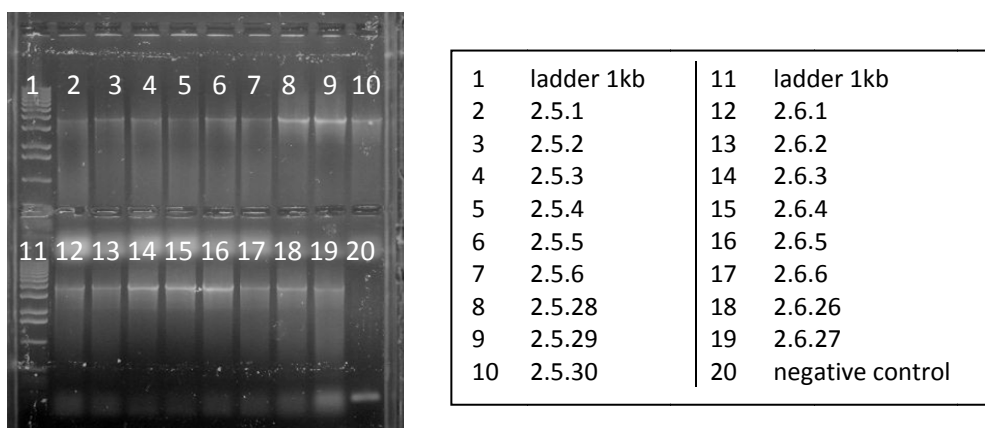
#### 4.3.6 Ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Ερυθρομυκίνη (Erm)

Στους γραμμικούς πλέον φορείς κλωνοποίησης p2.5 και p2.6, πραγματοποιήθηκε η ένθεση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη που είχε ενισχυθεί από το πλασμίδιο pGh9:ISS1 (Εικ. 4-7).

Με τη διαδικασία αυτή, κατασκευάστηκε ο παλίνδρομος φορέας κλωνοποίησης, που του αποδόθηκε η ονομασία pORI198.

#### 4.3.7 Μετασηματισμός επιλεκτικών κυττάρων *E. coli* με το πλασμίδιο pORI198

Το πλασμίδιο pORI198 μετασηματίσε επιλεκτικά κύτταρα *E. coli*. Για τον εντοπισμό των επιτυχώς μεταλλαγμένων αποικιών έγινε επιφανειακή επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία και χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (Amp) και ερυθρομυκίνη (Erm). Οι αποικίες που έφεραν το πλασμίδιο αυτό ήταν ικανές για επιβίωση υπό τις συνθήκες των εν λόγω αντιβιοτικών. Με διεξαγωγή Colony PCR, επιλέχθηκαν οι αποικίες από τις οποίες έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA (Εικ. 4-11).

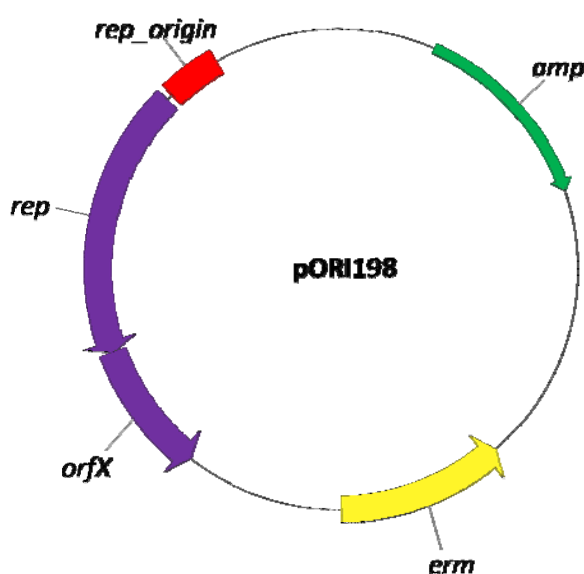


Εικ. 4-11: Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR

#### 4.4 Αλληλούχηση των παλίνδρομων φορέων (pORI198 και pEP1377198)

Έγινε αλληλούχηση των παλίνδρομων φορέων κλωνοποίησης pORI198 και pEP1377198. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης εισήχθησαν στο πρόγραμμα WU-Blastn. Το πρόγραμμα έδειξε ότι το pORI198 εκτός από την αλληλουχία του pUC19 έφερε 100% και την αλληλουχία του τμήματος *ori-rep-orfX* του pSMA198, καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (Εικ. 4-12). Όσον αφορά το πλασμίδιο pEP1377198, το

πρόγραμμα έδειξε ότι εκτός από την αλληλουχία του pEP1377, έφερε επίσης 100% την αλληλουχία του τμήματος *ori-rep-orfX* του pSMA198.



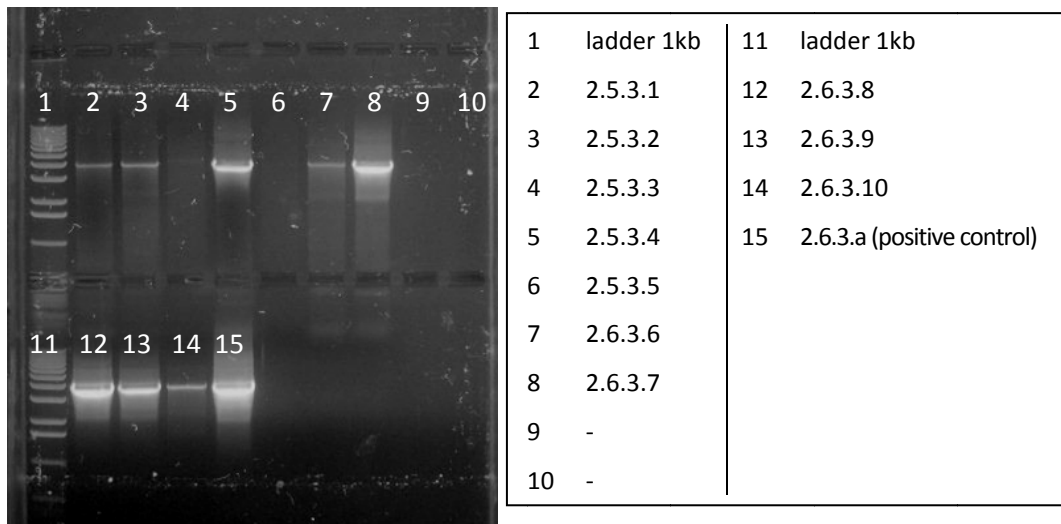
Εικ. 4-12: Ο χάρτης του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης pORI198. Με κόκκινο απεικονίζεται η αρχή έναρξης της αντιγραφής, με μωβ βέλη τα γονίδια *rep-orfX*, με κίτρινο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη (*erm*), ενώ με πράσινο βέλος τονίζεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη (*amp*).

#### 4.5 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων του στελέχους *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, με τους παλίνδρομους φορείς

Με στόχο να εκτιμηθεί η πιθανότητα μίας προγονικής ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ του *S. macedonicus* και του *L. lactis*, όσον αφορά το pSMA198, μετασηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με το pORI198 και το pEP1377198. Για τον εντοπισμό των μεταλλαγμένων αποικιών έγινε επιφανειακή επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία και χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη (Erm). Από τις επιτυχώς μετασηματισμένες αποικίες έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA και Colony PCR (Εικ. 4-13).

Σημειώνεται ότι οι αποικίες του *L. lactis* που μετασηματίστηκαν με το pEP1377198 δεν αναπτύχθηκαν στα τρυβλία με την ερυθρομυκίνη πράγμα που σημαίνει ότι δεν ήταν επιτυχής ο μετασηματισμός τους. Συνεπώς, το pEP1377198 δεν επιλέχθηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας αλλά το pORI198.

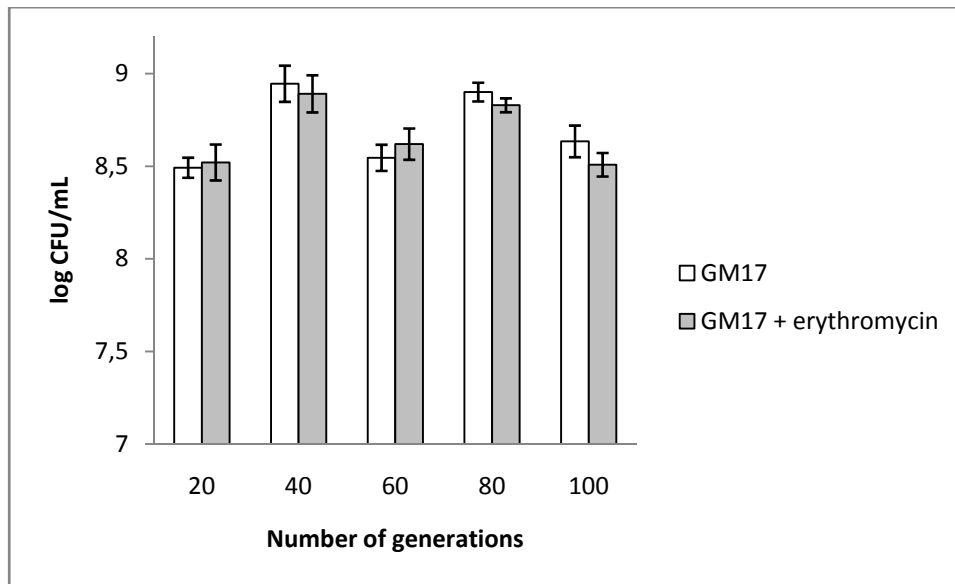




Εικ. 4-13: Η πηκτή αγαρόζης του Colony PCR

#### 4.6 Έλεγχος σταθερότητας του πλασμιδίου pORI198 στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα του πλασμιδίου pORI198 να αντιγράφεται στα κύτταρα του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αφού επετεύχθη η κλωνοποίησή του στο στέλεχος αυτό, μελετήθηκε η σταθερότητά του, με διαδοχικούς εμβολιασμούς ανά 12 ώρες μέχρι να συμπληρώσει τις 100 γενεές ανάπτυξης. Παρατηρήθηκε ότι το πλασμίδιο ήταν 100% σταθερό μέχρι και 100 γενεές. Στο Ραβδόγραμμα 4-1 που ακολουθεί φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν η καταμέτρηση του *L. lactis* γινόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα με Ερυθρομυκίνη και χωρίς (t-test,  $p > 0,05$ ). Όπου υπήρχε Ερυθρομυκίνη, καταμετρούνταν οι αποικίες που διατηρούσαν το πλασμίδιο ενώ στο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς το αντιβιοτικό η καταμέτρηση περιελάμβανε και κύτταρα που πιθανώς το είχαν χάσει.



Ραβδόγραμμα 4-1: Σταθερότητα πλασμιδίου pORI198 στον *L. lactis* MG1363 για 100 γενεές

#### 4.7 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων pSMA198 και pORI198 στον *S. macedonicus* ACA-DC 198 και στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, αντίστοιχα (Plasmid Copy Number, PCN)

Προσδιορίστηκε ότι ο αριθμός των αντιγράφων του πλασμιδίου pSMA198 στον *S. macedonicus* ACA-DC 198 καθώς και του pORI198 στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ήταν χαμηλοί (2-3 αντίγραφα ανά κύτταρο). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο σκελετός του pSMA198 έχει την ίδια αποδοτικότητα αντιγραφής και στους δύο ξενιστές. Ο χαμηλός αριθμός αντιγράφων του ρεπλικονίου του pSMA198 συνάδει με το χαμηλό αριθμό αντιγράφων άλλων φορέων που βασίζονται στα ρεπλικόνια της οικογένειας pCI305/pWV02 (Shareck *et al.* 2004).

Η επιτυχής κλωνοποίηση του ρεπλικονίου του pSMA198 στον *L. lactis* δείχνει επίσης την προσαρμογή του σε αυτό το είδος. Η ιδιότητα αυτή συνάδει με την υψηλή επικράτηση των πλασμιδίων της οικογένειας pCI305/pWV02, του γένους *Lactococcus*, στο φυλογενετικό δέντρο που περιγράφηκε πιο πάνω.

---

## 5 Συμπεράσματα

Τα ευρήματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι το πλασμίδιο pSMA198 είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας πλασμιδίων pCI305/pWV02 που αντιγράφονται με το μηχανισμό θήτα. Το πλασμίδιο της οικογένειας αυτής εντοπίζονται σε ένα περιορισμένο εύρος ξενιστών, κυρίως στα είδη του γένους *Lactococcus* (Kiewiet *et al.* 1993, Hayes *et al.* 1991). Το pSMA198 είναι το πρώτο πλασμίδιο του γένους *Streptococcus*, το οποίο περιγράφεται εντός της οικογένειας αυτής. Τα επίπεδα της ομοιότητας των ακολουθιών του σκελετού αντιγραφής/μεταφοράς του πλασμιδίου αυτού αντικατοπτρίζουν μία εξελικτική ιστορία σχέσης του με διαφορετικά πλασμίδια του γένους *Lactococcus*. Μπορεί λοιπόν να προταθεί ότι ο *S. macedonicus* απέκτησε το pSMA198 από τον *L. lactis* και ότι η ανταλλαγή αυτή συνέβει στο γάλα ή σε προϊόντα του γάλακτος. Όντως, τα πιο στενά συγγενικά πλασμίδια με το pSMA198 (π.χ. pSK11b, pVF22 και pIL5), έχουν απομονωθεί από τον *L. lactis* σε περιβάλλον γάλακτος. Επίσης, η πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής Rep του pSMA198 έδειξε υψηλή φυλογενετική συγγένεια με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες RepB των στελεχών του *L. lactis* που έχουν απομονωθεί σε γαλακτικό περιβάλλον.

Η επιτυχής κλωνοποίησή στον *L. lactis* του παλίνδρομου φορέα κλωνοποίησης pORI198 που φέρει την περιοχή έναρξης αντιγραφής του πλασμιδίου pSMA198 (*ori-rep-orfX*) του *S. macedonicus* δείχνει την προσαρμογή του στο είδος αυτό αφού το pORI198 εμφάνισε 100% σταθερότητα στον *L. lactis* για 100 γενεές και ο αριθμός των αντιγράφων του στον *L. lactis* (2-3 αντίγραφα ανά κύτταρο) ήταν ίδιος με τον αντίστοιχο αριθμό αντιγράφων του pSMA198 στον *S. macedonicus*. Η σταθερότητα του πλασμιδίου pORI198 στον *L. lactis* συνάδει με την υψηλή επικράτηση των πλασμιδίων pCI305/pWV02 στο γένος *Lactococcus*, όπως φάνηκε και από τη φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε. Ο χαμηλός αριθμός αντιγράφων του pORI198 είναι σύμφωνος με το χαμηλό αριθμό αντιγράφων άλλων φορέων που βασίζονται στα πλασμίδια της οικογένειας pCI305/pWV02.

Συνολικά, η *in silico* ανάλυση που διεξήχθη καθώς και τα πειραματικά ευρήματα που προέκυψαν παρέχουν στοιχεία ότι η απόκτηση του pSMA198 του *S. macedonicus* έγινε από τον *L. lactis* σε περιβάλλον γάλακτος.

---

## 6 Βιβλιογραφία

- Actis, L.A.M.E.T.H.C., 2014. BACTERIAL PLASMIDS: REPLICATION OF EXTRACHROMOSOMAL GENETIC ELEMENTS ENCODING RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL COMPOUNDS. *The Journal of infectious diseases*, 209(10), p.NP. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760730>.
- Bolotin, A. et al., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1554–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543133> [Accessed April 28, 2014].
- Das, D. et al., 2010. NIH Public Access. , 75(1), pp.264–271.
- E, R.L. & Stela, C. De, 2001. Molecular Characterization of a Theta Replication Plasmid and Its Use for Development of a Two-Component Food-Grade Cloning System for *Lactococcus lactis*. , 67(4), pp.1700–1709.
- Facklam, R., 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), pp.613–630. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Fallico, V. et al., 2011. Plasmids of raw milk cheese isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DPC3901 suggest a plant-based origin for the strain. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), pp.6451–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187126&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Gasson, M.J., 1990. In vivo genetic systems in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 7(1-2), pp.43–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176796> [Accessed May 1, 2014].
- Giraldo, R. & Fernández-Tresguerres, M.E., 2004. Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid*, 52(2), pp.69–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336485> [Accessed May 24, 2014].
- Górecki, R.K. et al., 2011. Adaptive potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in its 7 plasmids. *PLoS one*, 6(7), p.e22238. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3138775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].
- Grohmann, E. & Espinosa, M., 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. , 67(2), pp.277–301.
- Hayes, F. et al., 1991. Molecular Organization of the Minimal Replicon of Novel , Lactococcal Plasmid pCI305. *Plasmid*, 25, pp.16–26.
- Hayes, F., Daly, C. & Fitzgerald, G.F., 1990. Identification of the Minimal Replicon of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 Plasmid pCI305. *Applied and environmental*

- 
- microbiology*, 56(1), pp.202–9. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=183273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hinnebusch, J. & Tiiiy, K., 1993. MicroReview Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Molecular microbiology*, 10(5), pp.917–922.
- Holo, H. & Nes, I.F., 1989. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Applied and environmental microbiology*, 55(12), pp.3119–23. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kiewiet, R. et al., 1993. Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2. *Molecular microbiology*, 10(2), pp.319–327. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934823>.
- Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. & de Vos, W.M., 2000. Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. *Plasmid*, 43(2), pp.130–6. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686131> [Accessed April 28, 2014].
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, pp.67–78.
- Ljungh, Å. & Wadström, T., 2005. Lactic Acid Bacteria as Probiotics. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 7, pp.73–90.
- Makarova, K. et al., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), pp.15611–6. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2660350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Makarova, K.S. & Koonin, E. V, 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 189(4), pp.1199–1208. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
- Mandlik, A. et al., 2008. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in microbiology*, 16(1), pp.33–40. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2841691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2014].
- Mercenier, a, Müller-Alouf, H. & Grangette, C., 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Current issues in molecular biology*, 2(1), pp.17–25. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464916>.
- Mills, S. et al., 2002. Use of lactacin 481 to facilitate delivery of the bacteriophage resistance plasmid, pCBG104 to cheese starters. *Journal of applied microbiology*, 92(2), pp.238–246. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849351>.

- 
- Mills, S. et al., 2006. Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS microbiology reviews*, 30(2), pp.243–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472306> [Accessed May 24, 2014].
- Mølbak, L. et al., 2003. The plasmid genome database. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 11), pp.3043–3045. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600215>.
- Papadimitriou, K. et al., 2014. Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *BMC genomics*, 15(1), p.272. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713045> [Accessed April 12, 2014].
- Papadimitriou, K. et al., 2012. Complete genome sequence of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Journal of bacteriology*, 194(7), pp.1838–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3302469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2014].
- Proft, T. & Baker, E.N., 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences*: CMLS, 66(4), pp.613–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18953686> [Accessed May 25, 2014].
- Schiffrin, E.J. & Blum, S., 2001. Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Current opinion in biotechnology*, 12(5), pp.499–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604328>.
- Shareck, J. et al., 2004. *Cloning Vectors Based on Cryptic Plasmids Isolated from Lactic Acid Bacteria: Their Characteristics and Potential Applications in Biotechnology*, Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/07388550490904288> [Accessed May 28, 2014].
- Siezen, R.J. et al., 2005. Complete Sequences of Four Plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 Reveal Extensive Adaptation to the Dairy Environment Complete Sequences of Four Plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 Reveal Extensive Adaptation to the Dairy E.
- Skulj, M. et al., 2008. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microbial cell factories*, 7, p.6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 11, 2014].
- Smets, B.F. & Barkay, T., 2005. HORIZONTAL GENE TRANSFER: PERSPECTIVES AT A CROSSROADS OF SCIENTIFIC DISCIPLINES. *Nature reviews. Microbiology*, 3(September), pp.675–678.
- Solar, G. et al., 1998. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 62(2), pp.434–464.

- 
- Sørensen, S.J. et al., 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.700–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138098> [Accessed April 28, 2014].
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), pp.1–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168311>.
- Strahinic, I. et al., 2009. Molecular characterization of plasmids pS7a and pS7b from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50 as a base for the construction of mobilizable cloning vectors. *Journal of applied microbiology*, 106(1), pp.78–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040703> [Accessed May 26, 2014].
- Tsakalidou, E. et al., 1998. Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 2(1 998), pp.519–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731293>.
- Tsakalidou, E. & Papadimitriou, K., 2011. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* E. Tsakalidou & K. Papadimitriou, eds., Boston, MA: Springer US. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020631532202> [Accessed April 28, 2014].
- De Vuyst, L. & Tsakalidou, E., 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, 18(5), pp.476–485. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095869460700194X> [Accessed May 14, 2014].
- Wells, J.M. & Robinson, K., 1996. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles SITE. , pp.317–330.