ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *PSEUDOMONAS* SP. PHDV1 ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΟΛΥ-(3-ΥΔΡΟΞΥ-ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ)-ΕΣΤΕΡΑ (PHB)

ΔΡΑΚΩΝΑΚΗ ΑΘΗΝΑ

Υπεύθυνος Καθηγητής: ΤΣΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

POSTGRADUATE PROGRAMME IN CHEMISTRY

BIOLOGICAL AND ORGANIC CHEMISTRY

BIOCHEMISTRY LABORATORY

Master Thesis

Generation of genetically modified strains of *Pseudomonas* sp. phDV1 to optimize the production of poly-(3-hydroxy-butyrate)-ester (PHB)

DRAKONAKI ATHINA

Master Thesis Supervisor: TSIOTIS GEORGIOS

HERAKLION 2021

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Τσιώτης Γεώργιος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων)

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παυλίδης Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Τομέας Βιοχημείας,

Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Molecular Membrane Biology Department του Max Planck Institute of Biophysics στη Φρανκφούρτη της Γερμανίας. Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές και φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους ανθρώπους με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε σε προπτυχιακό και σε μεταπτυχιακό επίπεδο καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την Μεταπτυχιακή μου Διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Γεώργιο Τσιώτη, καθώς μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριό του, τόσο για την εκπόνηση της διπλωματικής, όσο και της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Υπήρξε πάντα διαθέσιμος στο να προσφέρει βοήθεια και συμβουλές, καθοδήγηση και ενθάρρυνση. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την απίστευτη ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο Ινστιτούτο Max Planck Βιοφυσικής καθώς η εμπειρία μου εκεί είχε καταλυτικό ρόλο σε μετέπειτα αποφάσεις μου. Επιπλέον, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη και Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη, που δέχθηκαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν την παρούσα διατριβή. Οι παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους συνέβαλαν σημαντικά στη διαμόρφωση της τελικής μορφής του κειμένου. Επιπλέον οφείλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Σπύρο για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε και για πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε τόσο σε προπτυχιακό αλλά και σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Hartmut Michel για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να εργαστώ στο εργαστήριο του, στο τμήμα Molecular Membrane Biology στην Φρανκφούρτη.

Στη συνέχεια θα ήθελα να δώσω και ένα εγκάρδιο ευχαριστώ στα μέλη της ομάδας των εργαστηρίων με τα οποία συνεργαστήκαμε εξαιρετικά σε ένα πολύ ευχάριστο περιβάλλον, και πολύ ιδιαίτερα στα άτομα με τα οποία είχα την τύχη να δουλέψω πιο στενά, περνώντας αρκετές ώρες μαζί εντός και εκτός του εργαστηρίου. Πέρα από τα μέλη του δικού μου εργαστηρίου, θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω και τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Γανωτάκη, του κυρίου Παυλίδη, καθώς και του τμήματος Molecular Membrane Biology για τη συνεργασία, το ζεστό και ευχάριστο κλίμα και για το ότι ένιωσα τα εργαστήρια σαν δεύτερο σπίτι μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αλέξανδρο Λυρατζάκη για την βοήθεια του, εντός και εκτός εργαστηρίου. Πλέον δεν μπορώ να τον χαρακτηρίσω ως απλό συνάδελφο αλλά πολύ καλό μου φίλο με τον οποίο ανυπομονώ να συνεργαστώ ξανά στο μέλλον. Ένα θερμό ευχαριστώ αξίζει στον προπτυχιακό φοιτητή, Ερμή Γελαδά, που με βοήθησε στην εκπλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής. Η όρεξη του για δουλειά, η ψυχολογική στήριξη που μου πρόσφερε, η υπομονή και η πραότητα του συνέβαλλαν σε μεγάλο βαθμό στο να ανταπεξέλθω στα απαιτητικά ωράρια και στα εμπόδια που προκύπταν. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Ντανιέλα Σπάχο, την Αφροδίτη Γιαπιντζάκη, την Αναστασία-Μαρία Πιλούδη, την Ειρήνη Μαθιουδάκη για τη συνεργασία μας τον καιρό αυτόν και την ευχάριστη ατμόσφαιρα του εργαστηρίου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ αξίζει σε τρία πανέμορφα κορίτσια τα οποία πλέον εκπληρώνουν τα δικά τους όνειρα. Θεοφανία Ανδρεαδάκη, Μαλαματένια Παπαβασιλείου και Θάλεια Σακολέβα υπήρξατε και είστε πλέον στήριγμα εντός και εκτός εργαστηρίου. Οι στιγμές που περάσαμε θα μου μείνουν αξέχαστες και θα τις αναπολώ όσα χρόνια και αν περάσουν.

Φυσικά, θα ήταν λάθος να μην ευχαριστήσω θερμά τον Dr. Hao Xie για την προθυμία να με διδάξει, να με βοηθήσει στην διατριβή αλλά και να μου παρέχει χρήσιμες συμβουλές. Ο πάντοτε φιλικός του και ευγενικός του χαρακτήρας υπήρξε σημαντικός παράγοντας στο να ανταπεξέλθω σε μία ξένη χώρα. Τα υπόλοιπα άτομα που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι η Radhika Khera, ο Kanwal Kayastha, η Larissa Müller και η Tejaswi Kalavacharla, τα οποία με φρόντισαν και με έκαναν να νιώσω άνετα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καλούς μου φίλους και κοντινούς μου ανθρώπους που με στηρίξαν και έκαναν όμορφες τις δύσκολες στιγμές και ομορφότερες τις καλές στιγμές. Βρίσκονταν πάντα στο πλευρό μου και με ενθάρρυναν σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου! Ένα μεγάλο ευχαριστώ φυσικά θα ήθελα να αποδώσω και στην οικογένειά μου, και ιδιαίτερα στους γονείς και στον αδερφό μου, οι οποίοι με πολλή αγάπη και υπομονή με βοήθησαν να φτάσω σήμερα εδώ και πάντα με πρότρεπαν να κυνηγάω τα όνειρα μου και να μην χάνω ποτέ το κουράγιο μου παρά τις αντιξοότητες που θα συναντούσα.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΘΗΝΑ ΔΡΑΚΩΝΑΚΗ

Έλλης Αλεξίου 13, 71414 Ηράκλειο, Κρήτης, Ελλάδα

Τηλ: +306980328128

Προσωπικό E-mail: athinadrakonaki_@hotmail.com

Ημερομηνία Γέννησης: 07/11/1996

Εθνικότητα: Greek

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2019-2021 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Γενική Χημεία- Βιολογική και Οργανική Χημεία (Msc)**

Ινστιτούτο Max Planck – Τμήμα Βιοφυσικής, Ομάδα Μοριακής Μεμβρανικής Βιολογίας, Max von Laue Strasse 3, 60438, Φρανκφούρτη, Γερμανία,

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Ηράκλειο 70013, Κρήτη, Ελλάδα

Μεταπτυχιακή Εργασία: ‘’Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas.* sp phDV1 για βελτιστοποίηση της παραγωγής πολύ-(3-υδρόξυ-βουτυρικού)-εστέρα (PHB)’’

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

09/2014-07/2019: **Πτυχίο Χημείας (BsC), Βαθμολογία 7.28/10**

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Ηράκλειο 70013, Κρήτη, Ελλάδα

Πτυχιακή Εργασία: "Μεταβολομική μελέτη του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDv1 παρουσία φαινόλης με φασματοσκοπία NMR"

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

01/2021-05/2021: **Erasmus+ Placement**

Ινστιτούτο Max Planck – Τμήμα Βιοφυσικής, Ομάδα Μοριακής Μεμβρανικής Βιολογίας, Max von Laue Strasse 3, 60438, Φρανκφούρτη, Γερμανία

Επιβλέπων: Dr. Hao Xie

02/2020-05/2020 και 10/2021-12/2021: **Βοηθός Καθηγητή: Προπτυχιακά Εργαστήρια Βιοχημείας**

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Ηράκλειο 70013, Κρήτη, Ελλάδα

07/2019-09/2019: **Πρακτική Άσκηση σε Μικροβιολογικό Εργαστήριο**

Ζωγράφου 10, 71201 Ηράκλειο, Κρήτης, Ελλάδα

Επιβλέπουσα: Δρ. Καρβελά- Αγγελάκη Ασημίνα

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ:

Εργασιακές Βιοχημεία

- Καλλιέργειες μικροβίων (Βακτήρια)
- Υπέρηχοι/ French press
- Τεχνικές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και DNA (SDS-PAGE, BN-PAGE, Western blot, Agarose Gel Electrophoresis, PCR)

- Φυγοκέντριση
- Διαβάθμιση Ζάχαρης (Step/ Linear)

Μοριακή Βιολογία

- Πέψη με περιοριστικά ένζυμα
- Transformation/Ηλεκτροπόρωση
- Ligation
- Σχεδιασμός Primer
- Διαγραφή γονιδίων μέσω συστήματος λ-Red
- Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση

Αναλυτικές Τεχνικές

- Φασματομετρία UV/Vis
- Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC)
- Χρωματογραφία συγγένειας
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Ψηφιακές

- Microsoft Office ●●●●●
- Clone Manager 9 ●●●○○
- Origin Pro ●●●●○

Γλώσσες

- Ελληνικά ●●●●●
  Μητρική γλώσσα

- Αγγλικά ●●●●○
  Certificate of Proficiency in English, University of Michigan, ECPE

- Γερμανικά ●○○○○
  Goethe-Zertifikat B1, Zertifikat Deutsch Zeugnis,

ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις

Kanavaki, Iliana, **Athina Drakonaki**, Ermis D. Geladas, Apostolos Spyros, Hao Xie, and Georgios Tsiotis. 2021. "Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Pseudomonas* sp. phDV1 Strain Grown on Phenol as Carbon Sources" *Microorganisms* 9, no. 8: 1636.

https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636.

Eirini Mathioudaki, Katerina Arvaniti, Cornelia Muenke, **Athina Drakonaki**, Iosif Vranakis, Myrto Koutantou, Anna Psaroulaki, Hao Xie, Georgios Tsiotis, Expression, purification and characterization of the IcmG and IcmK proteins of the type IVB secretion system from *Coxiella burnetii*, Protein Expression and Purification, Volume 186, 2021,105905, ISSN 1046-5928, https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105905.

Συνέδρια

- **15th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations**, Online, University of Graz, Austria, Ιούλιος 19-22 2021 (Poster)
- **18th National Congress of the Greek Society of Clinical Chemistry- Clinical Biochemistry**, Online, Οκτώβριος 15-17 2020 (Παρουσία)
- **21th Postgraduates' Conference on Chemistry 2018,** Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα, Μάιος 15- 17, 2019 (Attendance)
- **9th International Conference of Hellenic Crystallographic Association (HECRA)**, Πάτρα, Ελλάδα, Οκτώβριο 05-07, 2018 (Παρουσία)
- **20th Postgraduates' Conference on Chemistry 2018,** Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα, Ιούνιος 25- 27, 2018 (Παρουσία)
- **19th Postgraduates' Conference on Chemistry 2017**, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα, Μάιος 2-4, 2017 (Παρουσία)

Εθελοντισμός

- **Γραμματέας στο Διοικητικό Συμβούλιο των Μεταπτυχιακών Φοιτητών** στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, ακαδημαϊκό έτος 2019-2020
- **ESN (Erasmus Student Network) Buddy** για ένα εξάμηνο: ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 Χειμερινό εξάμηνο
- **Μέλος Εθελοντικής Ομάδας Επίδειξης Πειραμάτων** σε σχολεία και φεστιβάλ, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, ακαδημαϊκά έτη 2015-2018.

Μέλος σε οργανισμούς **Ένωση Ελλήνων Χημικών (2019-Σήμερα)**

CURICULUM VITAE

ATHINA DRAKONAKI

13 Ellis Alexiou Str., 71414 Heraklion, Crete, Greece

TEL: +306980328128

Personal E-mail: athinadrakonaki_@hotmail.com

Date of Birth: 07/11/1996

Nationality: Greek

EDUCATION

2019-Present: **Master's in General Chemistry: Biological and Organic Chemistry (Msc) (Expected to graduate in October)**

Max Planck Institute of Biophysics, Molecular Membrane Biology Group, Max von Laue Strasse 3, 60438, Frankfurt am Main, Germany,

University of Crete, Department of Chemistry 10 Voutes, Heraklion 70013, Crete, Greece

Master Thesis: ''Generation of genetically modified strains of *Pseudomonas* sp. phDV1 to optimize the production of poly-(3-hydroxy-butyrate)-ester (PHB)''

Supervisor: Prof. Tsiotis Georgios

09/2014-07/2019: **University of Crete**, Department of Chemistry Voutes, Heraklion 70013, Crete, Greece

Undergraduate Thesis: "Metabolomic study of *Pseudomonas* sp.

phDv1 during phenol degradation using NMR Spectroscopy"

Supervisor: Prof. Tsiotis Georgios

WORK EXPERIENCE

01/2021-05/2021: **Erasmus+ Placement**

Max Planck Institute for Biophysics, Molecular Membrane Biology Group, Max von Laue Strasse 3, 60438, Frankfurt am Main, Germany

Supervisor: Dr. Hao Xie

02/2020-05/2020 and 10/2021-12/2021: **Teaching Assistant: Undergraduate Biochemistry Laboratory**

University of Crete, Department of Chemistry Voutes, Heraklion 70013, Crete, Greece

07/2019-09/2019: **Traineeship in Microbiology Laboratory**

Zografou 10, 712 01 Heraklion, Crete, Greece

Supervisor: Dr. Karvela- Aggelaki Asimina

SKILLS:

Work related

Biochemistry

- Preparing buffers, Microbial cultivation (Bacteria)
- Sonication/ French press
- Techniques of proteins and DNA electrophoresis (SDS-PAGE, BN-PAGE, Western blot, Agarose Gel Electrophoresis, PCR)
- Centrifugation
- Sucrose Gradient (Step/ Linear)

Molecular Biology

- Digestion
- Transformation/Electroporation
- Ligation
- Primer Design
- Gene Deletion by λ-Red Recombination System
- Site directed mutagenesis

Analytical techniques

- UV/Vis spectroscopy
- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)
- Thin Layer Chromatography (TLC)
- Affinity Chromatography
- Gel filtration Chromatography

Digital

- Microsoft Office ●●●●●
- Clone Manager 9 ●●●○○
- Origin Pro ●●●●○

Languages

- Greek ●●●●●
  Native speaker

- English ●●●●○
  Certificate of Proficiency in English, University of Michigan, ECPE

- German ●○○○○
  Goethe-Zertifikat B1, Zertifikat Deutsch Zeugnis,

ADDITIONAL INFORMATION

Publications

Kanavaki, Iliana, **Athina Drakonaki**, Ermis D. Geladas, Apostolos Spyros, Hao Xie, and Georgios Tsiotis. 2021. "Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Pseudomonas* sp. phDV1 Strain Grown on Phenol as Carbon Sources" *Microorganisms* 9, no. 8: 1636. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636

Eirini Mathioudaki, Katerina Arvaniti, Cornelia Muenke,

Athina Drakonaki, Iosif Vranakis, Myrto Koutantou, Anna Psaroulaki, Hao Xie, Georgios Tsiotis, Expression, purification and characterization of the IcmG and IcmK proteins of the type IVB secretion system from *Coxiella burnetii*, Protein Expression and Purification, Volume 186, 2021, 105905, ISSN 1046-5928, https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105905.

Conferences

- **15th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations**, Online, University of Graz, Austria, July 19-22 2021 (Poster)
- **18th National Congress of the Greek Society of Clinical Chemistry- Clinical Biochemistry**, Online, October 15- 17 2020 (Attendance)
- **21th Postgraduates' Conference on Chemistry 2018, Heraklion**, Crete, Greece, May 15- 17, 2019 (Attendance)
- **9th International Conference of Hellenic Crystallographic Association (HECRA)**, Patras, Greece, October 05-07, 2018 (Attendance)
- **20th Postgraduates' Conference on Chemistry 2018, Heraklion**, Crete, Greece, June 25- 27, 2018 (Attendance)
- **19th Postgraduates' Conference on Chemistry 2017**, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017 (Attendance)

Volunteering

- **Secretary of Postgraduate Students' Association** in University of Crete, Department of Chemistry, academic year 2019-2020
- **ESN (Erasmus Student Network) Buddy** for one semester: academic year 2019-2020 fall semester
- **Performance and presentation of educational chemical experiments** in different schools and festivals, organized by University of Crete, Department of Chemistry, academic years 2015-2018.

Membership in Organizations

Association of Greek Chemists (2019-Present)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύπανση του περιβάλλοντος από τα πλαστικά αποτελεί μία από τις κυριότερες επιπτώσεις της παρουσίας του ανθρώπου στον πλανήτη. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος έχουν προταθεί διάφορες λύσεις, μεταξύ των οποίων και η αντικατάσταση των συμβατικών με μία σειρά πολυμερών που παράγονται από μικροοργανισμούς. Μία από τις πιο μελετημένες κατηγορίες βιοπλαστικών αποτελούν τα πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκά (PHAs). Το πιο μελετημένο πολυμερές που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία είναι ο πολυ-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB). Παράγεται από αρκετούς μικροοργανισμούς και ορισμένα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης.

Το βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο έχει την ικανότητα να παράγει το PHB. Το πολυμερές στο εσωτερικό των κυττάρων οργανώνεται σε μια δομή επονομαζόμενη καρβόσωμα. Πάνω στη δομή αυτή βρίσκονται πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον σχηματισμό, την σύνθεση καθώς και τον καταβολισμό του. Τα ένζυμα αυτά είναι η συνθάση (phaC), η αποπολυμεράση (phaZ), οι φασίνες (phaP) και η πρωτεΐνη ρυθμιστής (phaR). Η συνθάση και η αποπολυμεράση σχετίζονται με τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του PHB ενώ οι φασίνες έχουν καταλυτικό ρόλο στον σχηματισμό του πολυμερούς. Η πρωτεΐνη ρυθμιστής ελέγχει την έκφραση των φασινών.

Αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί είχαν ως σκοπό την βελτίωση παραγωγής του PHB σε διάφορους μικροοργανισμούς χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές μοριακής βιολογίας. Η διατριβή επικεντρώνεται στην βελτίωση παραγωγής του πολυμερούς μέσω της διαγραφής των γονιδίων phaR και phaZ στο συγκεκριμένο στέλεχος. Τα μεταλλάγματα που δημιουργήθηκαν, ΔphaR και ΔphaZ, μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν σε επίπεδο ανάπτυξης και παραγωγής PHB με το WT.

Λέξεις κλειδιά: *Pseudomonas* sp. phDV1, PHB, ομόλογος ανασυνδυασμός, ΔphaR, ΔphaZ

ABSTRACT

Environmental pollution by plastics is one of the main impacts of man's presence on the planet. Various solutions have been proposed to address the problem, including the replacement of conventional plastics with polymers produced by micro-organisms. One of the most studied categories of bioplastics are poly-hydroxy-alkanoates (PHAs). The most studied polymer belonging to this category is the poly-hydroxy-butyrate (PHB). It is produced by several microorganisms and some plants under stress conditions.

Pseudomonas sp. phDV1 is a gram-negative bacterium, which has the ability to produce PHB. The polymer in the cells is organised into a structure known as carbosome. In this structure there are proteins associated with its formation, synthesis and catabolism. These enzymes are: a synthase (phaC), a depolymerase (phaZ), phasins (phaP) and a protein regulator (phaR). The synthase and the depolymerase are associated with the synthesis and degradation of PHB, while phasins have a catalytic role in the formation of the polymer. The protein regulator controls the expression of phasins.

Several studies that have been carried out have aimed at improving the production of PHB in various microorganisms using various molecular biology techniques. The thesis focuses on enhancing polymer production by deletion of phaR and phaZ genes in the specific strain. The mutations created, ΔphaR and ΔphaZ, were studied and compared with WT.

Keywords: *Pseudomonas* sp. phDV1, PHB, homologous recombination, ΔphaR, ΔphaZ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 23

1.1 Ρύπανση πλαστικών 23

1.2 Τα βιοπλαστικά ως λύση ενάντια στην ρύπανση πλαστικών 24

1.3 Πολ-υδροξυ-αλκανοϊκά (PHAs) 26

1.3.1 Κατηγοριοποίηση και χρήσεις των PHAs 27

1.3.2 Σύσταση PHA στα κύτταρα 28

1.3.3 Βιοσυνθετικό μονοπάτι των PHAs 29

1.3.4 Γονιδιωματική ανάλυση της σύνθεσης των PHAs 31

1.4 Πολυ-3-(R)-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB) 33

1.5 Βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 34

1.6 Gene knock-out: Ομόλογος ανασυνδυασμός 35

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 38

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 38

3.1 Δημιουργία μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ 38

3.1.1 Σχεδιασμός γραμμικού DNA υποστρώματος 39

3.1.2 Σχεδιασμός εκκινητών 39

3.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 40

3.1.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 43

3.1.5 Απομόνωση linear DNA από πηκτή αγαρόζης 43

3.1.6 Καλλιέργεια κυττάρων *Pseudomonas.* sp. phDV1+pMK_Reds 44

3.1.7 Μετασχηματισμός (Transformation) 44

3.1.8 Απομόνωση γενωμικού DNA 45

3.1.9 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini (Ligation) 46

3.1.10 Απομόνωση πλασμιδίου 46

3.1.11 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα 46

3.1.12 Νουκλεοτιδική αλληλούχιση (Sequencing) 47

3.1.13 Απομάκρυνση του πλασμιδίου pMK_Reds (Plasmid curing) 47

3.2 Καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDV1 και των μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ 48

3.2.1 Στερεή καλλιέργεια 49

3.2.2 Προκαλλιέργεια 50

3.2.3 Υγρή καλλιέργεια 50

3.2.3 Συλλογή κυττάρων 50

3.2.4 Λύση κυττάρων 50

3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB) 51

3.3.1 Παρατήρηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα με μικροσκοπία φθορισμού 51

3.3.2 Απομόνωση πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα 52

3.3.3 Ποσοτικοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα 52

3.3.4 Ταυτοποίηση πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 53

3.4 Βιοχημική ανάλυση 53

3.4.1 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford 53

3.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS- PAGE).... 54

3.4.3 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών που προορίζονται για ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS/MS 56

3.4.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MALDI- TOF MS/MS 57

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 59

4.1 Δημιουργία και ταυτοποίηση μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ..... 59

4.2 Παρατήρηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα με μικροσκοπία φθορισμού..... 69

4.3 Απομόνωση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB) 73

4.4 Ποσοτικοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)..... 75

4.5 Ταυτοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)..... 78

4.6 Μελέτη των πρωτεϊνών του καρβοσώματος στο οποίο οργανώνεται ο πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB)..... 79

4.7 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών στα απομονωμένα σφαιρίδια PHB με MALDI-TOF MS/MS 82

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 84

5.1 Συμπεράσματα 84

5.2 Μελλοντικοί στόχοι 84

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 86

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 96

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 107

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 110

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PHA: Polyhydroxyalkanoates

PHB: Polyhydroxybutyrate

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

HR: Homologous Recombination

WT: Wild Type

gDNA: genomic DNA

pDNA: plasmid DNA

dsDNA: double stranded DNA

Km: Καναμυκίνη

Cm: Χλωραμφενικόλη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ρύπανση πλαστικών

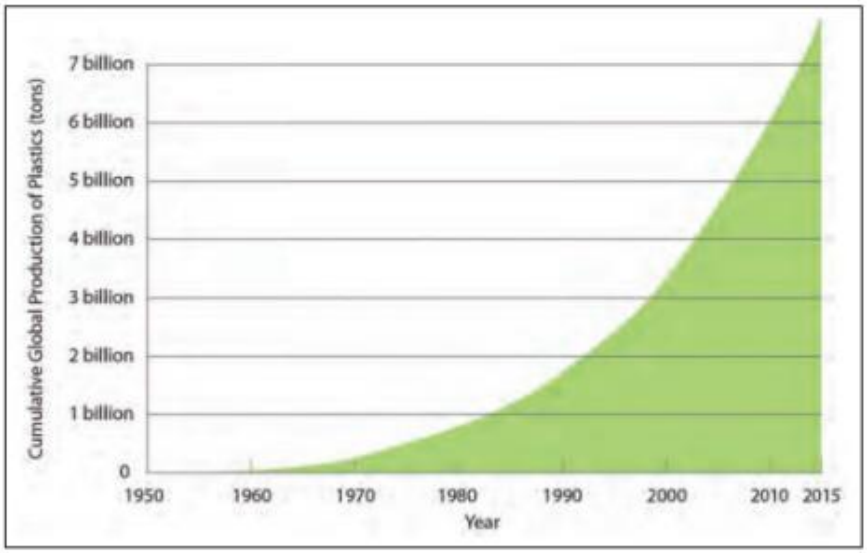
Ο όρος «πλαστικό» είναι μια κοινή ονομασία για μία ευρεία κατηγορία ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους που προέρχονται από μία ευρεία κατηγορία συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών ενώσεων.[1] Συμβατικά, προέρχονται από πετροχημικά και μπορούν να περιέχουν πρόσθετα, οργανικά ή μη, για την βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Τέτοιου είδους ενώσεις αποτελούν αλογονομένες φαινόλες και υδρογονάνθρακες ή ενώσεις που περιέχουν κάδμιο, μόλυβδο, αρσενικό κ.α.[2] Είναι ελαφρύ, ανθεκτικό και φτηνό, χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν εξαιρετικό υποψήφιο για πληθώρα προϊόντων.[3] Η χρήση του καταλαμβάνει μεγάλο μέρος της καθημερινότητας και αποτελεί μία από τις κυριότερες μορφές ρύπανσης, ιδιαίτερα όσον αφορά το θαλάσσιο περιβάλλον αλλά και το έδαφος.[4]

Σε παγκόσμια κλίμακα, η παραγωγή των πλαστικών υπολογίζεται στους 6,3 δισεκατομμύρια τόνους μεταξύ 1950 και 2018, ενώ το ποσοστό το οποίο έχει ανακυκλωθεί αγγίζει μόνο το 9%.[5] Η παραγωγή τους μόνο για το 2018 ανέρχεται στους 360 εκατομμύρια τόνους με το 17% να έχει παραχθεί στην Ευρώπη.[6] Εκτιμάται ότι το 10% των οικιακών αποβλήτων και το 60-80% των αποβλήτων που συναντώνται σε παραλίες και στους ωκεανούς αποτελείται από πλαστικά είδη.[7] Αυτά τα δεδομένα καθιστούν την ρύπανση πλαστικών ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα της σύγχρονης εποχής.

Τα πλαστικά, πέρα από τη χημική τους σύσταση, μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το μέγεθος τους, τα μακροπλαστικά και τα μικροπλαστικά. Τα μακροπλαστικά έχουν διάμετρο μεγαλύτερη των 20 mm ενώ τα μικροπλαστικά μικρότερη των 5 mm. Πρόσφατες έρευνες υπέδειξαν ότι το πλαστικό μπορεί να υπάρξει στο περιβάλλον σε ακόμα μικρότερο μέγεθος, τάξης νανομέτρων, και ονομάζονται νάνοπλαστικά.[8]

Αν και υπάρχει ιδιαίτερη ανησυχία για την επίδραση των νανοπλαστικών, πρωταγωνιστικό ρόλο στις έρευνες έχουν τα μικροπλαστικά. Το μέγεθος των

μικροπλαστικών εξαρτάται από τον τρόπο παρασκευής τους ή από την επεξεργασία που υφίστανται κατά την μερική αποικοδόμηση των μακροπλαστικών. Αποτελούν δε την κύρια μορφή ρύπανσης των οικοσυστημάτων.[9,10] Πέρα από την φυσική και την χημική καταστροφή, θέτει σε κίνδυνο τους ζωντανούς οργανισμούς στο περιβάλλον που ζουν, συμπεριλαμβανομένου και τον άνθρωπο.



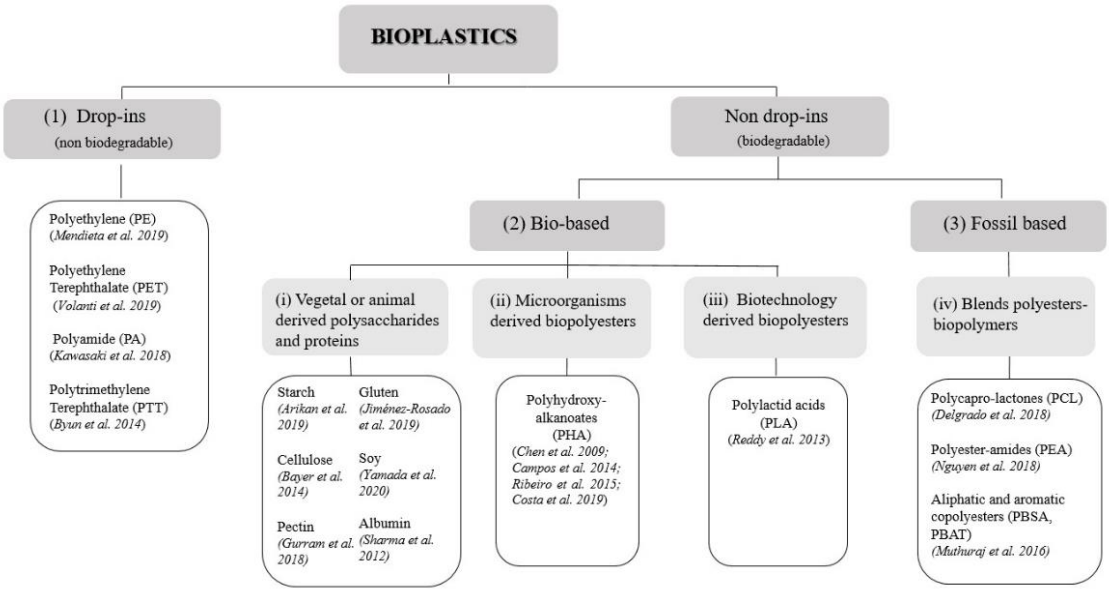
Εικόνα 1.1- Αθροιστική παραγωγή πλαστικού από το 1960. Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Annals of Global Health, Human health and ocean pollution, P. Landrigan et al, [COPYRIGHT] 2020.

1.2 Τα βιοπλαστικά ως λύση ενάντια στην ρύπανση πλαστικών

Η αντιμετώπιση της ρύπανσης από πλαστικό αποτελεί μία πρόκληση. Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ανέπτυξε μέτρα όσον αφορά την αντιμετώπιση της ρύπανσης, απαγορεύοντας τα πλαστικά μιας χρήσης από το 2021. Πέρα από την πρόληψη, οι λύσεις που έχουν προταθεί περιλαμβάνουν την σωστή διαχείριση των αποβλήτων και τη χρήση πιο οικολογικών εναλλακτικών.[11] Η σωστή διαχείριση των αποβλήτων περιλαμβάνει την ανακύκλωση και τη βιοαποικοδόμηση. Μία άλλη δημοφιλής πρόταση είναι η χρήση βιοπλαστικών.[12]

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Βιοπλαστικών, ένα υλικό ορίζεται ως «βιοπλαστικό» αν διαθέτει βιολογική βάση, αν είναι βιοαποικοδομήσιμο ή έχει και τα δύο χαρακτηριστικά.[13] Τα βιοπλαστικά αποτελούν μόνο το 1% της ετήσιας παραγωγής πλαστικών, αλλά εκτιμάται, ότι η παραγωγή τους θα αυξηθεί στο μέλλον.[14] Προέρχονται από μόνο ή μερικώς ανανεώσιμες πηγές, όπως φυτικά λίπη και έλαια, άμυλο καλαμποκιού, κυτταρίνη και γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, μπορούν να προέρχονται από αγροτικά απόβλητα ή να παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς.[15]

Τα βιοπλαστικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα τη σύσταση τους και την δυνατότητα να αποικοδομηθούν (Εικόνα 1.2). Οι δύο βασικές κατηγορίες είναι τα βιοδιασπώμενα και τα μη βιοδιασπώμενα. Τα βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά διαχωρίζονται πλέον σε αυτά που έχουν βιολογική βάση και σε αυτά που προέρχονται από ορυκτά.



Εικόνα 1.2- Σχηματική απεικόνιση της κατηγοριοποίησης των βιοπλαστικών. Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Polymers, Natural Polymeric Materials: A Solution to Plastic Pollution from the Agro-Food SectorM. Acquavia et al, [COPYRIGHT] 2021.[19]

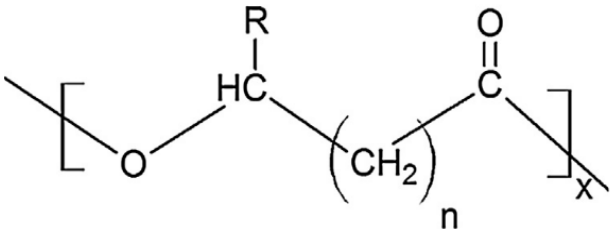
Για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως «βιοπλαστικό» υπόκειται σε διάφορες δοκιμές και εφόσον τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά τότε φέρει και την ανάλογη ετικέτα.[16]

Από όλες τις κατηγορίες των βιοπλαστικών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για τα αυτά που παράγονται από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν μέσω του μεταβολισμού τους να παράγουν τα πρόδρομα μόρια (μονομερή) για την σύνθεση των πολυμερών ή ακόμα και το ίδιο το πολυμερές. Το πολυμερές που θα παραχθεί, συνεπώς και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες, εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, τις συνθήκες που θα αναπτυχθεί και την πρώτη ύλη που του παρέχεται ως πηγή άνθρακα.[17] Συνήθως, έχουν λιπόφιλη φύση και επιτρέπουν την επιβίωση των μικροοργανισμών υπό συνθήκες καταπόνησης.

1.3 Πολ-υδροξυ-αλκανοϊκά (PHAs)

Τα πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκά αποτελούν μία κατηγορία βιοπλαστικών που έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια. Η ανακάλυψη τους έγινε το 1920 και υπήρξε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον από 1990 και μετέπειτα.[18]

Πρόκειται για μία οικογένεια γραμμικών πολυεστέρων που παράγονται από βακτήρια σε συνθήκες καταπόνησης αλλά και ορισμένα φυτά. Η σύνθεση των PHAs στα βακτήρια πραγματοποιείται σε συνθήκες καταπόνησης, όπως η έλλειψη αζώτου, φωσφόρου και οξυγόνου, σε περιβάλλον με περίσσεια άνθρακα. Αποτελούνται από βιοδιασπώμενα και μη- τοξικά υδροξυ-αλκονοϊκά οξέα (Εικόνα 1.3) και παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα πλαστικά που προέρχονται από πετροχημικά. [19,20]



Εικόνα 1.3 - Γενικευμένη δομή πολυ- υδροξυ- αλκανοϊκών. Το (n) έχει εύρος από 1-4, το (x) από 100-300000 και το (R) είναι η αλκυλομάδα.[20]

1.3.1 Κατηγοριοποίηση και χρήσεις των PHAs

Στα PHAs υπάρχει μεγάλη ποικιλία όσον αφορά τη μοριακό βάρος και τη δομή της πλευρικής αλυσίδας. Ανάλογα το μέγεθος την πλευρικής αλυσίδας (R), τα PHAs διαχωρίζονται σε short-chain length (scl-PHA), medium-chain length (mcl-PHA) και long-chain length (lcl-PHA), με τα τελευταία να έχουν μελετηθεί λιγότερο καθώς είναι πιο σπάνια (Πίνακας 1.1). Το πολυ(3-υδροξυ-βαλερικό) (PHV) αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα scl-PHA, ενώ το πολυ(3-υδροξυ-οκτανοϊκό) (PHO) είναι τυπικό παράδειγμα mcl- PHA. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 150 μονομερή PHA, το οποίο τα καθιστά την μεγαλύτερη ομάδα φυσικών πολυεστέρων.[21,22]

Πίνακας 1.1- Κατηγορίες των PHAs με βάση τον αριθμό ατόμων της αλκυλομάδας (R).

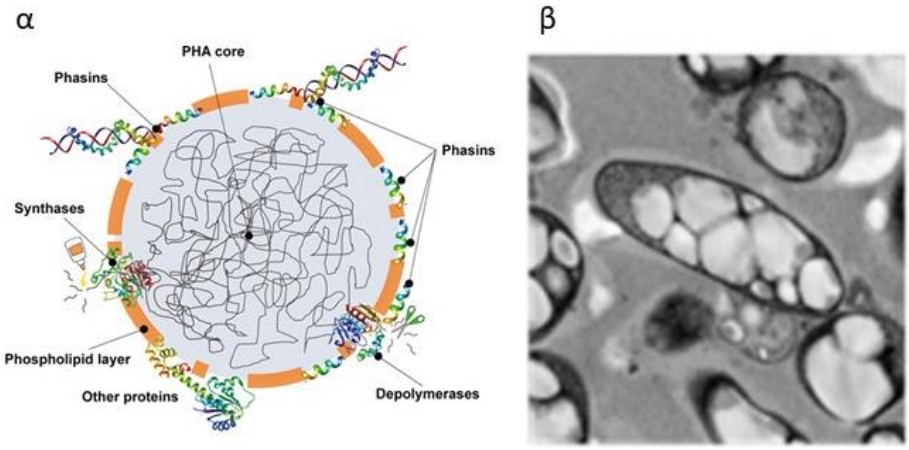
Κατηγορία PHAs	**Αριθμός ατόμων άνθρακα**
short- chain length PHAs	3- 5 άτομα άνθρακα
medium- chain length PHAs	6- 14 άτομα άνθρακα
long- chain length PHAs	περισσότερα από 14 άτομα άνθρακα

Οι ιδιότητες που παρουσιάζουν τα mcl-PHAs με τα scl-PHAs είναι αρκετά διαφορετικές, το οποίο είναι αναμενόμενο λόγω της διαφορετικής τους σύστασης. Τα scl-PHAs είναι κρυσταλλικά, που τα καθιστά αρκετά σκληρά και άκαμπτα. Αντιθέτως, τα mcl-PHAs επειδή είναι πιο εύκαμπτα λειτουργούν ως ελαστομερή.[23]

Η χρήση των PHAs έχει εδραιωθεί από διάφορες εταιρείες λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Μελλοντικά, θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν ένα μεγάλο αριθμό των συμβατικών πλαστικών. Προς το παρόν, χρησιμοποιούνται σε διάφορα είδη συσκευασιών, όπως στα τρόφιμα, στα καλλυντικά κ.α. Αρκετά υποσχόμενη είναι και η εφαρμογή τους σε πεδία όπως η βιοϊατρική, η γεωπονία και η βιομηχανία φαρμάκων. Η χρήση τους στον τομέα της γεωπονίας περιλαμβάνει την ενθυλάκωση (encapsulation) σπόρων, λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων.[24] Στην βιοϊατρική μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσωρινό μόσχευμα, ως ράμματα, ως επιθέματα και στην μηχανική ιστών. Στην φαρμακευτική βιομηχανία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την αργή απελευθέρωση δραστικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό.[20,25]

1.3.2 Σύσταση PHA στα κύτταρα

Τα PHAs οργανώνονται στο κυτταρόπλασμα των μικροοργανισμών σαν κοκκώδη σώματα που λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας, που ονομάζονται καρβοσώματα. Όταν υπάρχει έλλειψη άνθρακα στο περιβάλλον του μικροοργανισμού, το πολυμερές αποικοδομείται και τα μονομερή χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα για την επιβίωση του. Το μέγεθος των συγκεκριμένων σωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 0,2-0,5 μm.[26] Τα σώματα αποτελούνται περίπου από 97,5% πολυεστέρα, 2% πρωτεΐνες και 0,5% φωσφολιπίδια. Στον πυρήνα του σώματος βρίσκεται το υδρόφοβο πολυμερές που περιβάλλεται από μία μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και διάφορες πρωτεΐνες (Εικόνα 1.4). Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με τον μεταβολισμό των PHA ενώ ορισμένες έχουν ρυθμιστικό ρόλο.[27,28]



Εικόνα 1.4- (α) Σχηματική απεικόνιση δομής σωματιδίων PHA

Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Microbial Biotechnology, Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. B. Maestro, J. Sanz, [COPYRIGHT] 2017

(β) Απεικόνιση σωματιδίων PHA σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα *E. coli* μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπία διεύλεσης (TEM)

Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Scientific Reports, Bioengineered polyester beads co-displaying protein and carbohydrate-based antigens induce protective immunity against bacterial infection. M. González-Miró et al, [COPYRIGHT] 2018

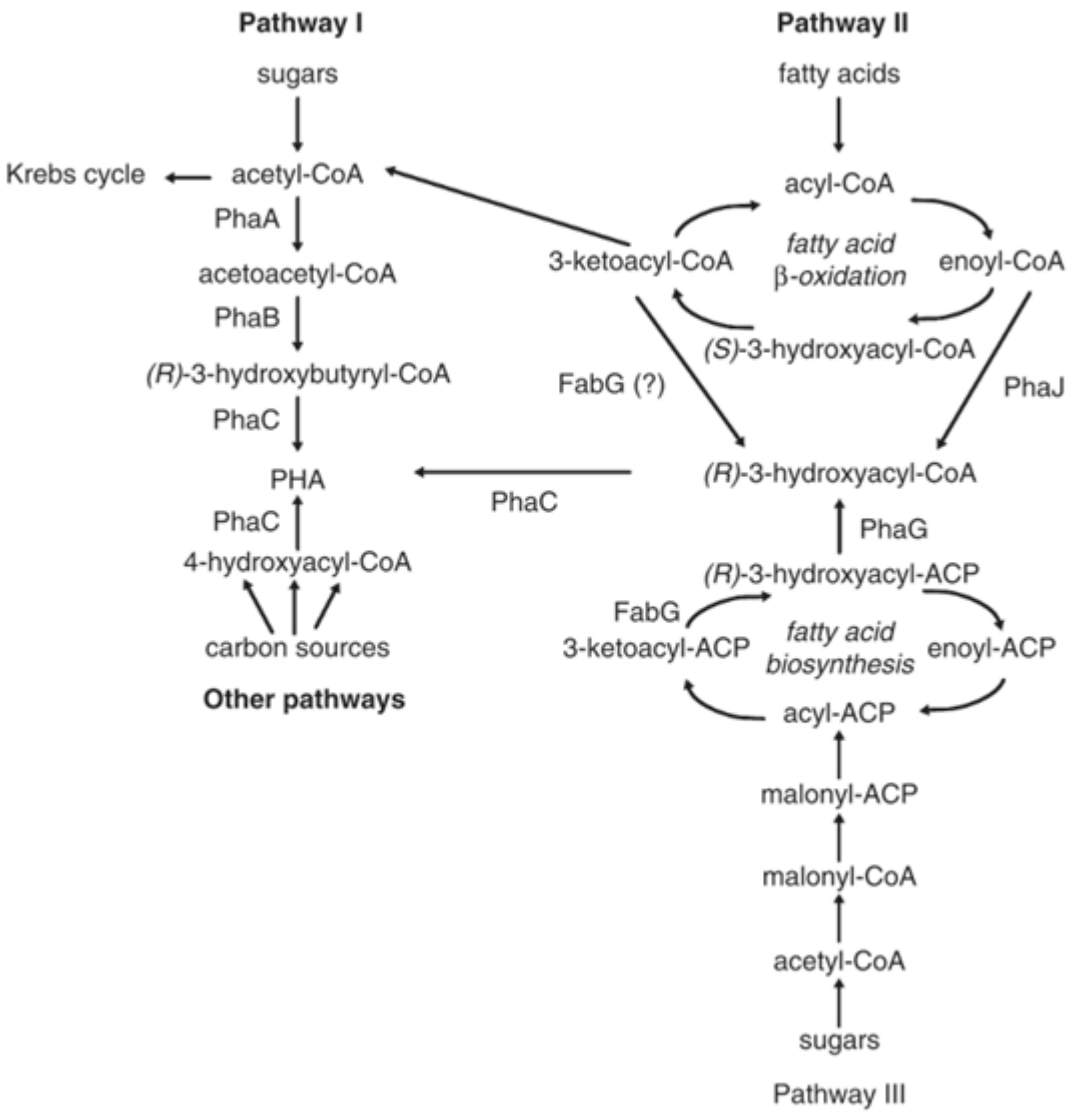
Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των σωματιδίων έχουν δομικό αλλά και λειτουργικό ρόλο και αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως granule associated proteins (GAPs). Υπάρχουν οι PHA συνθάσες (PhaC), οι PHA αποπολυμεράσες (PhaZ), οι φασίνες (PhaP) και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες (PhaR). Η PHA συνθάση και η PHA αποπολυμεράση είναι υπεύθυνες, όπως υποδεικνύει και το όνομα τους, για την σύνθεση και την διάσπαση του πολυμερούς, αντίστοιχα. Οι φασίνες είναι δομικές πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του σωματιδίου.[29] Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες δρουν ως καταστολείς του εκκινητή του PhaP αλλά και του ίδιου τους του γονιδίου. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να προσδένονται στα PHA.[30]

1.3.3 Βιοσυνθετικό μονοπάτι των PHAs

Ο σχηματισμός των PHA μπορεί να διαχωριστεί σε τρία βασικά βήματα (Εικόνα 1.5). Αρχικά, η παρεχόμενη πηγή άνθρακα απορροφάται από τον μικροοργανισμό. Στη συνέχεια, το ανάλογο υδρόξυ- αλκανοϊκό οξύ μετατρέπεται στον αντίστοιχο θειοεστέρα. Τέλος, ο θειοεστέρας χρησιμοποιείται από την PHA συνθάση για την βιοσύνθεση του πολυμερούς. Οι αντιδράσεις που περιλαμβάνονται στο δεύτερο βήμα είναι πολύ πολύπλοκες με μόνο ένα μέρος τους να έχει κατανοηθεί.

Υπάρχουν τρία γνωστά βιοσυνθετικά μονοπάτια των PHAs από διαφορετικούς μικροοργανισμούς.[24] Η σύσταση του μονομερούς εξαρτάται άμεσα από τον μικροοργανισμό, την πηγή άνθρακα που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.[31] Η σύνθεση από τα βακτήρια *Ralstonia eutropha* ξεκινάει από το ακέτυλο-CoA. Μία β- κετοθειολάση καταλύει την σύμπτυξη δύο μορίων ακέτυλο-CoA, σχηματίζοντας το ακέτο- ακέτυλο-CoA. Έπειτα, το ακέτο- ακέτυλο-CoA ανάγεται σε R-(–)-3- υδρόξυ- βουτυρικό-CoA από την στερεοεκλεκτική αναγωγάση του ακετο- ακέτυλο-CoA.[32] Το μονοπάτι αυτό είναι το συνηθέστερο για την σύνθεση του πολύ- υδρόξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB). Στα βακτήρια γένους *Rhodospirillum rubrum*, εμπλέκονται δύο ακόμα ένζυμα. Επειδή από την αναγωγή του ακέτο- ακέτυλο-CoA προκύπτει S-(+)-3- υδρόξυ- βουτυρικό-CoA, είναι απαραίτητη δύο

υδρατασών του ενοΰλο-CoA για να το μετατρέψουν στο R ισομερές.[33] Τέλος, τα περισσότερα βακτήρια γένους *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα να συνθέτουν PHAs που αποτελούνται από διάφορα 3- υδρόξυ- λιπαρά οξέα. Όταν στο περιβάλλον διατίθενται αλκάνια, οξειδώνονται στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα και αυτά με την σειρά τους ενεργοποιούνται από τις αντίστοιχες θειοκινάσες και αποικοδομούνται μέσω β-οξείδωσης. Τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου της β- οξείδωσης μετατρέπονται με την βοήθεια υδρατασών του ενοΰλο-CoA, επιμερασών ή αναγωγασών του κετο-άκυλ-CoA σε R-(–)-3-υδρόξυ-άκυλ-CoA. Στη συνέχεια, αυτό πολυμερίζεται από την συνθάση του PHA. Σε περίπτωση που η πηγή άνθρακα δεν είναι υδρογονάνθρακες η σύνθεση του πολυμερούς πραγματοποιείται και μέσω της de novo σύνθεσης των λιπαρών οξέων.[34] Το ένζυμο «μεσάζοντας» στην περίπτωση αυτή είναι μια πρωτεΐνη μεταφορέας, η τρανσφεράση-CoA (phaG), η οποία μεταφέρει το R-(–)- υδρόξυ-άκυλο κατάλοιπο στο CoA. Η ύπαρξη του συγκεκριμένου γονιδίου έχει ταυτοποιηθεί σε αρκετά είδη *Pseudomonas*, όπως για παράδειγμα *Pseudomonas putida* KT2440.[35]



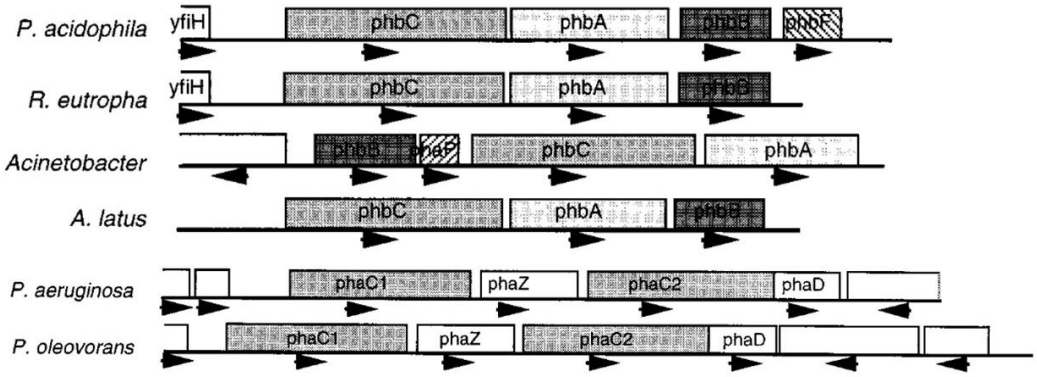
Εικόνα 1.5- Σχηματική απεικόνιση των τριών γνωστών μεταβολικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των PHAs. Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Journal of Applied Microbiology, Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. R. Verlinden et al, [COPYRIGHT] 2007

1.3.4 Γονιδιωματική ανάλυση της σύνθεσης των PHAs

Ένα μεγάλο εύρος γονιδίων που εμπλέκονται στον σχηματισμό και στην αποικοδόμηση των PHA έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί.[36] Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, υπάρχει πληθώρα μεταβολικών μονοπατιών που μπορούν να εμπλακούν στον αναβολισμό και καταβολισμό των PHAs. Γι' αυτό το

λόγο, θα αναφερθούν τα γονίδια που εμπλέκονται στα τελευταία βήματα για την σύνθεση του πολυ-3-(R)-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα P(3HB), καθώς και αυτά που εμπλέκονται στην σύνθεση και αποικοδόμηση του.

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στα τελευταία βήματα στην σύνθεση του P(3HB) είναι η β-κετοθειολάση (PhbA), η αναγωγάση του του ακετο-ακέτυλο-CoA (PhbB) και η συνθάση που οδηγεί στον πολυμερισμό (PhbC). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα παραπάνω ένζυμα είναι συνήθως οργανωμένα σε ένα οπερόνιο (phbCAB).[37] Για την αποικοδόμηση του πολυμερούς απαιτείται η αποπολυμεράση (phaZ) ενώ για τον σχηματισμό των σωματιδίων είναι απαραίτητες οι φασίνες (phaF και phaI).[38,39]

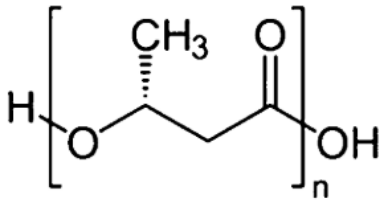


Εικόνα 1.6- Γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των PHAs οργανωμένα σε οπερόνια σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Αναδημοσιεύθηκε με άδεια από την Creative Commons Attribution, Περιοδικό: Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.. L. Madison, G. Huisamn, [COPYRIGHT] 1999

Δεδομένου της πολυπλοκότητας που περιλαμβάνει η βιοσύνθεση του πολυμερούς, δεν παρουσιάζουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ίδια οργάνωση γονιδίων.. Για παράδειγμα, οι μικροοργανισμοί *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas acidophila*, και *R. eutropha* έχουν οργανωμένα τα γονίδια σε οπερόνια ενώ σε στελέχη του γένους *Pseudomonas*, όπως *P. oleovorans* και *P. Aeruginosa*, τα γονίδια βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις.[40] (Εικόνα 1.6).

1.4 Πολυ-3-(R)-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB)

Ο πολυ-3-(R)-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB) διαθέτει όλες τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που διαθέτουν τα PHAs, όπως οι παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα συμβατικά πλαστικά, καθώς και ότι μπορεί να παραχθεί από πληθώρα μικροοργανισμών.[41] Περισσότερα από 20 είδη βακτηρίων έχουν ταυτοποιηθεί που παράγουν PHB. Μερικά από αυτά είναι *Bacillus mega-terium*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Alcaligenes eutrophus*, *M. extorquens*, *P. putida*, *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, κ.α.[42]

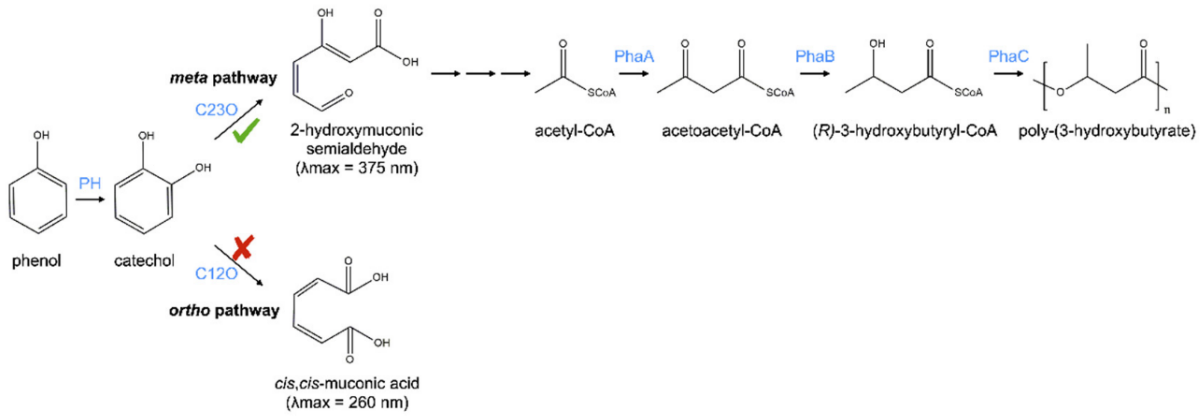


Εικόνα 1.7- Δομή του πολυ-3-(R)- υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB).

Το PHB αποτελεί το απλούστερο ομοπολυμερές της κατηγορίας scl-PHA (Εικόνα 1.7) και το εκτενέστερα μελετημένο. Το μέσο μοριακό του βάρος κυμαίνεται από 2-4 x 10^3 KDa και επηρεάζεται άμεσα από τον μικροοργανισμό που παράγεται, το περιβάλλον ανάπτυξης του και την μέθοδο εξαγωγής του πολυμερούς. Έχει υψηλή θερμοκρασία τήξεως, είναι αρκετά κρυσταλλικό και διαθέτει αρκετά χαμηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο, νερό και διοξείδιο του άνθρακα.[43] Οι μηχανικές του ιδιότητες ανταγωνίζονται ενες αυτές του πολυπροπυλενίου. Επιπλέον, το μονομερές μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση φαρμάκων ή σαν πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση διάφορων χειρόμορφων ενώσεων.[44] Ακόμη, λόγω της βιοσυμβατότητας του με το ανθρώπινο σώμα χρησιμοποιείται στην κατασκευή ιστών, σαν φορέας δραστικών ουσιών στη φαρμακοβιομηχανία και στα μοσχεύματα.[45]

1.5 Βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1

Το *Pseudomonas* sp. phDV1 αποτελεί ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο που απομονώθηκε από έδαφος μολυσμένο από απόβλητα διυλιστηρίων στη Δανία.[46] Το γενετικό του υλικό αποτελείται από ένα και μοναδικό χρωμόσωμα μήκους 4,727,628 bps με το περιεχόμενο G+C να είναι 62.3%. Παρουσιάζει ομοιότητα της τάξεως 99.93% και 99.41% με το γενετικό υλικό των *Pseudomonas pseudoalcaligenes* και *Pseudomonas mendocina* NK-01 αντιστοίχως.[47] Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει την ικανότητα ανάπτυξης μέσω της αποικοδόμησης αρωματικών οργανικών ενώσεων, όπως η φαινόλη, καθιστώντας το έναν εξαιρετικό υποψήφιο μικροοργανισμό για βιοεξυγίανση. Μέσω πρωτεομικής ανάλυσης έχει ταυτοποιηθεί ένα μεγάλο ποσοστό των ενζύμων που εμπλέκονται στο συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι. Τελικό προϊόν του meta- μεταβολικού μονοπατιού αποτελεί η ακεταλδεΰδη, η οποία όταν συνδεθεί με το συνένζυμο CoA δίνει το πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των PHAs, ακέτυλο-CoaA (Εικόνα 1.8). Περαιτέρω μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος, ανέδειξε ότι έχει την δυνατότητα να παράγει PHB όταν καταναλώνει φαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. [48]



Εικόνα 1.8- Meta- μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 που οδηγεί στην βιοσύνθεση του PHB.[48]

1.6 Gene knock-out: Ομόλογος ανασυνδυασμός

Το gene knock-out (KO) αποτελεί μία γενετική τεχνική, η οποία στοχεύει στην απενεργοποίηση της λειτουργίας ενός γονιδίου.[49] Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να διευκρινιστεί η λειτουργία αγνώστων γονιδίων, να εντοπιστούν πρωτεΐνες και να ανακαλυφθούν τυχόν συσχετίσεις γονιδίων με ασθένειες.[50,51]

Μία από τις in vivo τεχνικές που χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορα βακτήρια και μύκητες είναι αυτή του ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR) είναι ένας μεταβολικός μηχανισμός, ο οποίος στοχεύει στην διασφάλιση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού.[52] Συναντάται σε όλους τους οργανισμούς με τον μηχανισμό να διαφέρει ανάλογα τον τύπο του κυττάρου, ενώ συγκεκριμένα στους προκαρυωτικούς οργανισμούς επιτρέπει την ανταλλαγή γενετικού υλικού.[53]

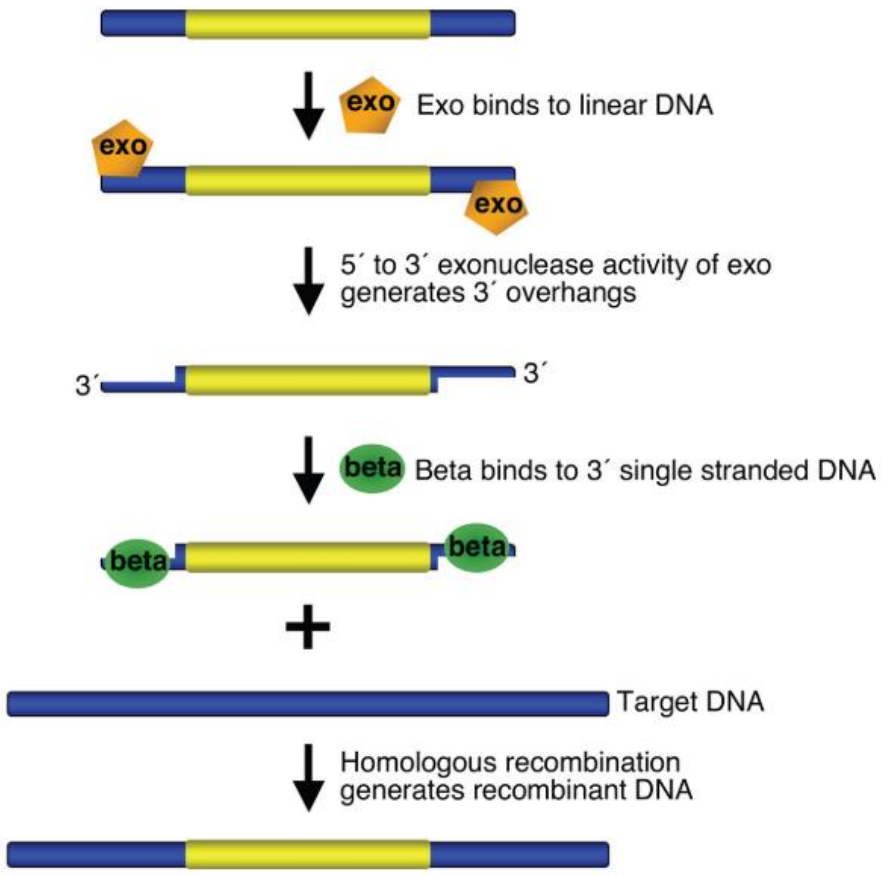
Σε όλους του οργανισμούς ο ομόλογος ανασυνδυασμός περιλαμβάνει τα ίδια βασικά βήματα. Ο μηχανισμός έχει μελετηθεί εκτενώς στο *Escherischia coli*. Πιο συγκεκριμένα, όταν υπάρχει θραύσμα στη διπλή έλικα του DNA ακολουθεί η επιδιόρθωση του με τη βοήθεια του ενζύμου RecBCD. Το σύμπλοκο αποτελείται από τρεις υπομονάδες με διαφορετικές λειτουργίες (Πίνακας 1.2).[54]

Πίνακας 1.2- Υπομονάδες του ενζύμου RecBCD και οι λειτουργίες τους.

Γονίδιο	Υπομονάδα	Λειτουργία
RecB	beta	3'-5' ελικάση, νουκλεάση
RecC	gamma	Αναγνωρίζει την αλληλουχία X (Chi) (5'-GCTGGTGG-3')
RecD	alpha	5'-3' ελικάση

Συνοπτικά, το σύμπλοκο μετατρέπει το κατεστραμμένο μόριο DNA σε δύο μόρια που διαθέτουν 3΄ μονήρη άκρα. Στη συνέχεια, τα άκρα αυτά με τη βοήθεια της πρωτεΐνης RecA που συνδέεται στην αλληλουχία X προσδένονται σε ομόλογες περιοχές του γενετικού υλικού. Χάρη στα μονήρη άκρα, πραγματοποιείται η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα τις ομόλογες περιοχές.[55]

Ο μηχανισμός στα βακτήρια είναι στατικός και αρκετά συντηρητικός. Αυτό όμως αλλάζει δραστικά όταν αποτελούν τα βακτήρια ξενιστές του βακτηριοφάγου λ. Κατά τον πολλαπλασιασμό του βακτηριοφάγου λ στα βακτήρια, μέσω του λυτικού κύκλου, εκφράζονται τα γονίδια του συστήματος ανασυνδυασμού (lambda red system). Το σύστημα ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λ αποτελείται τρία γονίδια, τα exo, beta και gam. Τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά καταλύουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό του υποστρώματος DNA με την αλληλουχία στόχο. Τα γονίδια βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο P_L. Η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το γονίδιο exo είναι μία εξωνουκλεάση που δημιουργεί 3΄ άκρα.[56] Η πρωτεΐνη beta είναι υπεύθυνη για τον επανασχηματισμό των συμπληρωματικών κλώνων.[57] Τέλος, η πρωτεΐνη gam προσδένεται στο σύμπλοκο RecBCD εμποδίζοντας την δράση του.[58]



Εικόνα 2.8- Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η πρωτεΐνη exo δημιουργεί 3' άκρα. Η πρωτεΐνη beta προσδένεται στα 3' άκρα και η πρωτεΐνη gam (που δεν απεικονίζεται) παρεμποδίζει το σύπλοκο RecBCD να αποικοδομήσει τα τμήματα DNA. [77]

Η σημασία του συστήματος ανασυνδυασμού είναι αρκετά μεγάλη για τον κύκλο ζωής του βακτηριοφάγου λ. Προωθεί την αντιγραφή του γενετικού υλικού των φάγων στο εσωτερικό των κυττάρων. Έχει προταθεί ότι συμβάλλει στην προστασία του από τους προστατευτικούς μηχανισμούς των βακτηρίων. Παράλληλα, αποτελεί σημαντικό τρόπο εξέλιξης της οικογένειας των φάγων.

Το 1998 αναφέρθηκε ότι οι πρωτεΐνες ανασυνδυασμού από το σύστημα του βακτηριοφάγου λ αποτελεί μία αρκετά αποδοτική μέθοδο ανασυνδυασμού γονιδίων.[59] Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για εισαγωγή ή διαγραφή επιλεγμένων αλληλουχιών, για σημειακές μεταλλάξεις ή μικρές αλλαγές, όπως η προσθήκη σηματοδοτικών πρωτεΐνών.[60] Η στρατηγική της συγκεκριμένης τεχνικής περιλαμβάνει

την δημιουργία του υποστρώματος DNA, την έκφραση των γονιδίων που βοηθούν τον ομόλογο ανασυνδυασμό στον ξενιστή, την εισαγωγή του υποστρώματος στον ξενιστή και την επιλογή των κλώνων. Η επιλογή των κλώνων πραγματοποιείται συνήθως με την προσθήκη μίας αλληλουχίας σηματοδότη, όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό στο DNA υπόστρωμα.[61]

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο έχουν αποδείξει, ότι το βακτήριο *Pseudomonas* sp. phDV1 έχει την ικανότητα να παράγει πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αύξηση της παραγωγής του πολυεστέρα μέσω της διαγραφής δύο γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τον μεταβολισμό (phaZ) και την σύνθεση του πολυμερούς (phaR). Τα μεταλλάγματα που δημιουργούνται μελετώνται και συγκρίνονται με το WT τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην παραγωγή του πολυεστέρα σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δημιουργία μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ

Η δημιουργία των δύο μεταλλαγμάτων βασίζεται στην τεχνολογία του ομόλογου ανασυνδυασμού. Για να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η διαγραφή των γονιδίων απαιτείται η έκφραση των γονιδίων του βακτηριοφάγου λ-Red. Τα γονίδια αυτά έχουν εισαχθεί στο βακτήριο με τη βοήθεια ενός πλασμιδίου, του pMK_Reds, το οποίο προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη (Cm). Με αυτόν τον

τρόπο δημιουργείται το στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1+pMK_Red$_S$ το οποίο χρησιμοποείται στην παρούσα διατριβή για την δημιουργία των μεταλλαγμάτων.

Για να πραγματοποιηθεί η διαγραφή των γονιδίων εισάγεται στα κύτταρα το DNA υπόστρωμα, το οποίο φέρει δύο ομόλογες περιοχές ως προς το γενετικό υλικό του βακτηρίου και το γονίδιο ανθεκτικότητας κάποιου αντιβιοτικού, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι η καναμυκίνη (Km). Το γονίδιο ανθεκτικότητας είναι απαραίτητο για την διαλογή των επιτυχών μεταλλαγμάτων.

3.1.1 Σχεδιασμός γραμμικού DNA υποστρώματος

Το DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την διεξαγωγή του ομόλογου ανασυνδυασμού φέρει δύο χαρακτηριστικά, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη και τις ομόλογες περιοχές από το κάθε γονίδιο.

Πιο συγκεκριμένα, το DNA υπόστρωμα για την διαγραφή του γονιδίου phaR έχει μήκος 1907 bps ενώ το αυτό για το phaZ έχει 1949 bps. Το γονίδιο ανθεκτικότητας καναμυκίνης έχει μήκος 795 bps ενώ οι ομόλογες περιοχές που βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου κυμαίνονται στα 500 bps. (Παράρτημα 1)

3.1.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιείται με το λογισμικό Clone Manager 9. Για τον πολλαπλασιασμό της κάθε αλληλουχίας στόχου δημιουργούνται δύο εκκινητές, ο Forward και ο Reverse. Οι δύο εκκινητές αποτελούνται από 25-35 ζεύγη βάσεων με ποσοστό G/C 40-60%. Κάθε ζεύγος εκκινητών έχει σχεδιαστεί με σκοπό να υπάρχει συμπληρωματικότητα με τις εκάστοτε ομόλογες περιοχές του κάθε γονιδίου. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (Tm).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1- Αλληλουχίες εκκινητών.

Ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία 5΄→ 3΄
phaR- F	CACGACCTGCAGGGCAGCAAC
phaR-R	TGCGTGACCCGCAGGCCTTC
phaR-F1	GGTGGTCAGGAAGAGGTAGGCGTAGGCATACCG
phaR-R1	GGCAAGGTATTCGAGAGCGTCGAGCAGCTCAGTCAG
DelZ-A-F	AGGCGCGCTACATGACCAATAGCG
DelZ-A-R	TGGGGTTGCCCGGCGGGTTGAGAATG
phaZ-F	ACGCCATGGGACTCCTGCTAC
phaZ-R	GAGGTGCCAGGTCGGATCAGC
pMini-F	ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC
pMini-R	TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG

3.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία in vitro τεχνική πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό των υποστρωμάτων DNA, καθώς και για την ταυτοποίηση των νέων κλώνων.

Μία αντίδραση PCR έχει τρία διαδοχικά στάδια που συγκροτούν έναν πλήρη κύκλο, κατά τον οποίο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται αρκετές φορές μέχρι η ποσότητα του DNA να πολλαπλασιαστεί σε μεγάλο βαθμό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκυκλωτές και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλωτής TGradient (Biometra).

Τα βήματα της αντίδρασης είναι:

1) Αποδιάταξη του DNA (Denaturation)

Η διπλή έλικα αποδιατάσσεται με τη βοήθεια υψηλής θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία αυτή κυμαίνεται μεταξύ 94°C-98°C και καθορίζεται από την φύση του DNA που πρόκειται αν πολλαπλασιαστεί.

2) Προσαρμογή των εκκινητών (Annealing)

Οι εκκινητές συνδέονται, σύμφωνα με την συμπληρωματικότητά τους, στις αποδιατεταγμένες έλικες του DNA. Η θερμοκρασία για να πραγματοποιηθεί αυτό κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 50°C-65°C.

3) Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension)

Στο στάδιο αυτό, το DNA επιμηκύνεται με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία σε αυτήν την περίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 75°C- 80°C και εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πολλαπλασιάζεται.

Η σύσταση των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2- Αναλυτική σύσταση των αντιδράσεων PCR.

	Analytical reaction (10 μL)	Preparation reaction (50 μL)	Final Concentration
Phusion GC Master Mix (Thermo Scientific)	8,8 μL	44 μL	1xGC MM, 200 μM dNTPs (each one) 3% DMSO 1,5 mM $MgCl_2$ Phusion DNA Polymerase 0,02 U/μL

Forward Primer (10 pmol/μL)	0,5 μL	2,5 μL	0,5 μM
Reverse Primer (10 pmol/μL)	0,5 μL	2,5 μL	0,5 μM
DNA template	gDNA several ng ή plasmid pg-ng	gDNA 50-200 ng ή plasmid 1 pg-10 ng	< 250 ng

Για την επαλήθευση και την εξακρίβωση των προϊόντων χρησιμοποιείται η μικρής κλίμακας, ενώ για την προετοιμασία υποστρωμάτων η μεγαλύτερης κλίμακας αντίδραση. Οι συνθήκες που πραγματοποιείται κάθε αντίδραση PCR καταγράφονται παρακάτω:

1) 98°C (30 s ή 1 min): Πρώτη αποδιάταξη
2) 94°C (10 s): Δεύτερη αποδιάταξη
4) 55-72°C (30 s): Υβριδισμός
5) 72°C (15-30 s/kbp): Πολυμερισμός
6) 72°C (10 min): Τελικός πολυμερισμός
7) 4°C : Διατήρηση

Τα βήματα (2)-(4) επαναλαμβάνονται για 35 φορές.

Ο χρόνος της πρώτης αποδιάταξης εξαρτάται από το υπόστρωμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Το gDNA απαιτεί περισσότερο χρόνο για να αποδιαταχθεί από ότι το pDNA. Η θερμοκρασία που απαιτείται για τον υβριδισμό των εκκινητών ελέγχεται με διαβάθμιση θερμοκρασίας (temperature gradient) και επιλέγεται η βέλτιστη για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

3.1.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για τον έλεγχο του εκάστοτε προϊόντος της PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού φορτίου κατά μήκος της πηκτής. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου, τα νουκλεϊκά οξέα μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Το μέγεθος των προϊόντων εκτιμάται σε σύγκριση με τα μεγέθη που εμφανίζονται από τον marker.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

- 1% w/v αγαρόζη
- 1x TAE Buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA)

Διάλυμα καθόδου

- 1x TAE Buffer

Το προϊόν της αντίδρασης PCR αναμειγνύεται με κατάλληλο όγκο 6x Loading Dye (Thermo Scientific) πριν πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για περίπου 40 λεπτά. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή επωάζεται για 15-20 λεπτά σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθίδιου (Carl Roth) και στη συνέχεια για 10 λεπτά σε νερό. Η πηκτή παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και το μέγεθος του εκάστοτέ προϊόντος εκτιμάται με βάση τον Marker (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

3.1.5 Απομόνωση linear DNA από πηκτή αγαρόζης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, συγκρίνεται το μέγεθος τους προϊόντος της PCR με τον Marker. Εάν το προϊόν έχει το σωστό μέγεθος τότε γίνεται η απομόνωση του. Με τη βοήθεια ιατρικού νυστεριού κόβονται οι επιθυμητές λωρίδες πηκτής. Το γενετικό υλικό απομονώνεται με τη χρήση του Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του DNA (ng/μL) και η καθαρότητα του (Λόγοι 260/280 και 260/230) μετρούνται με το Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Peqlab).

3.1.6 Καλλιέργεια κυττάρων *Pseudomonas.* sp. phDV1+pMK_Red$_S$

Για την εισαγωγή του υποστρώματος DNA που απαιτείται για την διαγραφή των δύο γονιδίων phaR και phaZ είναι απαραίτητη η καλλιέργεια κυττάρων *Pseudomonas.* sp. phDV1 που φέρουν το πλασμίδιο pMK_Red$_S$. Τα κύτταρα που φέρουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο είχαν δημιουργηθεί εκ των προτέρων με την μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης που περιγράφεται παρακάτω (3.1.7).

Η καλλιέργεια (10 mL) πραγματοποιείται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB (Lysogeny Broth), που περιέχει 170 μg/mL αντιβιοτικό χλωραμφενικόλης (Cm). Αρχικά, πραγματοποιείται εμβολιασμός από ολονύχτια προκαλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί υπό τις ίδιες συνθήκες. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 32°C υπό ανάδευση (220 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) να φτάσει περίπου στο 0.5. Η επαγωγή έκφρασης των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό πραγματοποιείται με την προσθήκη της L-αραβινόζης σε συγκέντρωση 0.2% στην καλλιέργεια. Ακολουθεί περαιτέρω επώαση για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα προετοιμάζονται για ηλεκτροπόρωση.

3.1.7 Μετασχηματισμός (Transformation)

<u>Χημικός μετασχηματισμός</u>

Τα δεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται είναι τα Turbo Competent *E. coli* (New England BioLabs) και Stellar™ *E. coli* (Clonetech, Takara Bio). Ο χημικός μετασχηματισμός σε κάθε περίπτωση έγινε με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

<u>Ηλεκτροπόρωση (Electroporation)</u>

Αφού περάσουν 4 ώρες επώασης από την επαγωγή της καλλιέργειας με L-αραβινόζη σε τελική συγκέντρωση 0.2%, λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL. Ο αριθμός των δειγμάτων εξαρτάται από τον αριθμό των μετασχηματισμών. Κάθε δείγμα υπόκειται σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με 300 mM διαλύματος ζάχαρης. Μετά από τις πλύσεις τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μL 300 mM διαλύματος ζάχαρης.

Τα επαναιωρημένα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικές κυψελίδες κατάλληλες για ηλεκτροπόρωση. Σε κάθε κυψελίδα προστίθεται υπόστρωμα DNA (ανάλογα το γονίδιο-στόχος) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με εύρος 4 μg-6 μg.

Οι συνθήκες της ηλεκτροπόρωσης (Gene Pulser Xcell electroporation system, Bio-Rad) που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με τις οδηγίες του κατασκευαστή για κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa*.

Μετά την ηλεκτροπόρωση, προστίθενται 900 μL θρεπτικού μέσου SOC στα κύτταρα, τα οποία επωάζονται για τουλάχιστον 2 ώρες στους 32°C υπό ανάδευση (220 rpm). Στη συνέχεια, τα κύτταρα διασπείρονται σε τρυβλίο με LB (Lysogeny Broth), που περιέχει 170 μg/mL χλωραμφενικόλης (Cm) και 100 μg/mL καναμυκίνης (Km). Τα τρυβλία επωάζονται στους 32°C για 48 ώρες. Οι αποικίες που αναπτύσσονται υπόκεινται σε περαιτέρω έλεγχο για την εξακρίβωση της διαγραφής των γονιδίων.

3.1.8 Απομόνωση γενωμικού DNA

Από το τρυβλίο επιλέγονται μονήρεις αποικίες με σκοπό να εξεταστεί αν η διαγραφή των γονιδίων είναι επιτυχής. Οι αποικίες αναπτύσσονται στους 32°C υπό ανάδευση (220 rpm) σε 5 mL LB (Lysogeny Broth) που περιέχει 170 μg/mL χλωραμφενικόλης (Cm) και 100 μg/mL καναμυκίνης (Km). Για την απομόνωση του γενωμικού DNA χρησιμοποιείται το Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για Gram-negative βακτήρια.

Έπειτα, το γενωμικό DNA χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα για αντιδράσεις PCR, ώστε να εξακριβωθεί η ύπαρξη του γονιδίου αντίστασης στην καναμυκίνη (Km^R) στη σωστή θέση του γονιδιώματος. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται οι ίδιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για τον πολλαπλασιασμό του υποστρώματος linear dsDNA. Ως αντίδραση control χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα το γενωμικό DNA απομονωμένο από το Wild Type (WT).

3.1.9 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini (Ligation)

Για την εισαγωγή των επιθυμητών τμημάτων DNA σε πλασμίδιο (pMini) χρησιμοποιείται το NEB PCR Cloning Kit (New England BioLabs) σύμφωνα τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σύμφωνα με αυτές, η αναλογία του εισαχθέντος DNA ως προς το πλασμίδιο πρέπει να είναι 3:1. Η απαιτούμενη ποσότητα DNA (ng) υπολογίζεται με τη βοήθεια του online tool από την εταιρεία (NEBioCalculator, NEB).

3.1.10 Απομόνωση πλασμιδίου

Μετά τον χημικό μετασχηματισμό, επιλέγονται μερικές αποικίες για την απομόνωση του πλασμιδίου. Οι αποικίες καλλιεργούνται στους 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) σε LB (Lysogeny Broth) με 100 μg/mL αμπικιλλίνη. Εάν πρόκειται για high-copy-number πλασμίδιο η καλλιέργεια έχει όγκο 5 mL, ενώ για low-copy-number έχει όγκο 25 mL.

Για την απομόνωση των πλασμιδίων χρησιμοποιείται το QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλουση του pDNA πραγματοποιείται με nuclease-free H_2O. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του προσδιορίζεται στο NanoDrop.

3.1.11 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη με περιοριστικά ένζυμα πραγματοποιείται για να ελεγχθεί αν το πλασμίδιο περιέχει την σωστή αλληλουχία DNA. Έπειτα, τα θραύσματα ελέγχονται σε πηκτή αγαρόζης.

Η επιλογή του περιοριστικού ενζύμου, καθώς και το μήκος και ο αριθμός των θραυσμάτων γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού Clone Manager 9. Η θέση πέψης του ενζύμου που επιλέγεται βρίσκεται εντός του γονιδίου αντίστασης της καναμυκίνης (Km^R).

Για την πέψη χρησιμοποιούνται 100-200 ng pDNA. Ανάλογα το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιείται απαιτούνται και διαφορετικές συνθήκες. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία είναι το FastDigest HindIII (Thermo

Scientific) με το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα 10X FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific). Η πέψη πραγματοποιείται στους 37ºC για 30 λεπτά.

3.1.12 Νουκλεοτιδική αλληλούχιση (Sequencing)

Τα προϊόντα της PCR που παρουσιάζουν την επιθυμητή θέση στην πηκτή, σε σχέση με τον Marker στέλνονται για νουκλεοτιδική αλληλούχιση (Eurofins). Για κάθε αλληλούχιση απαιτούνται περίπου 1000 ng pDNA και πραγματοποιείται χωριστά για τον κάθε εκκινητή, μία με τον Forward και μία με τον Reverse. Τα αποτελέσματα της εταιρείας συγκρίνονται με την επιθυμητή αλληλουχία (Παράρτημα 2) με τη βοήθεια του online tool Multalin Sequence Alignment.[62]

3.1.13 Απομάκρυνση του πλασμιδίου pMK_RedS (Plasmid curing)

Επόμενο στάδιο της δημιουργίας των στελεχών είναι η απομάκρυνση του πλασμιδίου pMK_RedS. Για την απομάκρυνση των πλασμιδίων από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς υπάρχουν διάφορες τεχνικές.[63] Για τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα χρησιμοποιήθηκε σαν τεχνική απομάκρυνσης πλασμιδίου η ηλεκτροπόρωση. Στόχος είναι η δημιουργία πόρων στην μεμβράνη των κυττάρων με απώτερο σκοπό την απομάκρυνση του πλασμιδίου.

Πρώτο βήμα της διαδικασίας αποτελεί η προετοιμασία καλλιεργειών από τα δύο μεταλλάγματα. Οι καλλιέργειες (5-10 mL) πραγματοποιούνται σε θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, δηλαδή 170 μg/mL χλωραμφενικόλη και 100μg/mL καναμυκίνη. Η επώαση πραγματοποιείται στους 32ºC υπό ανάδευση (220 rpm) για 16-18 ώρες. Έπειτα, τα κύτταρα προετοιμάζονται και υπόκεινται σε ηλεκτροπόρωση, όπως περιεγράφηκε παραπάνω (Ενότητα 3.1.7). Η διαφορά έγκειται στον αριθμό των παλμών που εφαρμόζονται. Για την απομάκρυνση του πλασμιδίου από τα μεταλλάγματα, τα δείγματα υπόκεινται σε εύρος 2-4 παλμών. Μετά το πέρας της ηλεκτροπόρωσης, στα δείγματα προστίθεται 900 μL θρεπτικού μέσου SOC. Στη συνέχεια, επωάζονται για μία ώρα στους 32ºC υπό ανάδευση (220 rpm).

Τελευταίο βήμα της όλης διαδικασίας είναι η διασπορά των κυττάρων σε τρυβλία. Σε πρώτο στάδιο τα κύτταρα διασπείρονται σε τρυβλίο με LB και 100 μg/mL καναμυκίνη. Αφού επωαστεί στους 32ºC για 24-48 ώρες επιλέγονται μονήρεις αποικίες από το τρυβλίο και μεταφέρονται σε δύο νέα, ένα τρυβλίο πανομοιότυπο με το αρχικό, δηλαδή περιέχει LB και 100 μg/mL καναμυκίνη, και ένα που περιέχει LB, 100 μg/mL καναμυκίνη και 170 μg/mL χλωραμφενικόλη.

3.2 Καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDV1 και των μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ

Για την καλλιέργεια της *Pseudomonas* sp. phDV1, καθώς και των υπόλοιπων στελεχών απαιτείται, πρωτίστως, η καλλιέργεια σε τρυβλίο (στερεή καλλιέργεια). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εμβολιασμός σε προκαλλιέργεια και μετά από ολονύχτια επώαση εμβολιάζεται η κύρια καλλιέργεια. Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες και τα υλικά είναι αποστειρωμένα ή/και έχουν φιλτραριστεί με φίλτρο 0,22 μm. Η προσθήκη των αντιβιοτικών στις καλλιέργειες πραγματοποιείται από πυκνά διαλύματα, 50 mg/mL σε νερό για την καναμυκίνη (Km) και 34 mg/mL σε 90% αιθανόλη για την χλωραμφενικόλη (Cm). Η ανάπτυξη των κυττάρων παρατηρείται φωτομετρικά στα 600 nm (Perkin Elmer Lamda 20).

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για το κάθε θρεπτικό μέσο παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3.3 - Συστατικά θρεπτικού μέσου Lysogeny Broth (L.B.) με pH 7,4.

Peptone	5 g/L
NaCl	5 g/L
Yeast Extract	2.5 g/L

Πίνακας 3.4- Συστατικά κύριας καλλιέργειας του βακτηρίου.

5x M9 άλατα ή 5x M9-N	200 mL/L
R-Salts[a]	7 mL/L
$MgSO_4$ 1 M	2 mL/L
$CaCl_2$ 1 M	0.1 mL/L
Διάλυμα ηλεκτρικού νατρίου 0.5 M	20 mL/L ή 42 mL/L[b]

[a] Η σύσταση των R-Salts είναι 10% w/v $MgSO_4.7H_2O$,1% w/v $FeSO_4.7H_2O$.

[b] Η ποσότητα ηλεκτρικού οξέος που προστίθεται στην καλλιέργεια εξαρτάται από την συνθήκη που μελετάται, για τις συνθήκες μάρτυρα (control) (C/N=1/9) προστίθενται 20 mL/L (10 mM), ενώ για τις συνθήκες μειωμένου αζώτου (C/N=20/1) προστίθενται 42 mL/L (21 mM).

Πίνακας 3.5- Σύσταση συμπυκωμένων θρεπτικών 5x M9 και 5x M9-N.

Διάλυμα 5x M9 αλάτων (C/N= 1/9)	Διάλυμα 5x M9-N αλάτων (C/N=20/1)
Na_2HPO_4 37.61 g/L	Na_2HPO_4 37.61 g/L
KH_2PO_4 15 g/L	KH_2PO_4 15 g/L
NaCl 2.5 g/L	NaCl 2.5 g/L
NH_4Cl 5 g/L	NH_4Cl 0.28 g/L

3.2.1 Στερεή καλλιέργεια

Όλα τα βακτήρια φυλάσσονται σε 20% glycerol stock στους -80ºC. Το πρώτο στάδιο για την καλλιέργεια των στελεχών είναι η ανάπτυξη τους σε στερεό θρεπτικό μέσο LB (1.5% άγαρ) με το κατάλληλο αντιβιοτικό, όταν αυτό είναι απαραίτητο (Πίνακας 3.3). Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών είναι 100 μg/mL για την καναμυκίνη (Km) και 170 μg/mL για την χλωραμφενικόλη. Μικρή ποσότητα από το bacterial stock απλώνεται σε τρυβλίο και επωάζεται στους 32ºC για 24-48 ώρες.

3.2.2 Προκαλλιέργεια

Μετά το πέρας της ανάπτυξης του στελέχους στο τρυβλίο, μία αποικία εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό μέσο L.B. όπου παραμένει υπό ανάδευση στους 32°C για 14-16 ώρες. Στο θρεπτικό μέσο προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά σε ίδια συγκέντρωση με το στερεό μέσο, όταν αυτό είναι απαραίτητο.

3.2.3 Υγρή καλλιέργεια

Η υγρή καλλιέργεια του κάθε στελέχους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θρεπτικό μέσο M9R ή M9R-N (Πίνακας 3.4). Αφού αναπτυχθεί η προκαλλιέργεια γίνεται εμβολιασμός 1% στην κύρια καλλιέργεια. (Πίνακας 3.5) Η πηγή άνθρακα είναι το ηλεκτρικό οξύ, σε συγκεντρώσεις 10 mM ή 21 mM, ανάλογα την συνθήκη που μελετάται. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, όταν αυτά είναι απαραίτητα, είναι ίδια με αυτή της προκαλλιέργειας και της στερεής καλλιέργειας. Η ανάπτυξη πραγματοποιείται στους 32°C για 72 ώρες υπό ανάδευση (220 rpm). Μετά το πέρας των 72 ωρών τα κύτταρα συλλέγονται για μελέτη.

3.2.3 Συλλογή κυττάρων

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται μέσω φυγοκέντρισης (Sepatech Suprafuge 22, Heraeus) στα 6000 x *g* για 10 λεπτά στους 4°C. Πραγματοποιείται μία πλύση των κυττάρων με 20 mL 0.1 M Tris-HCl pH 7.5. Τα κύτταρα ψύχονται με υγρό άζωτο και φυλάσσονται στου -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

3.2.4 Λύση κυττάρων

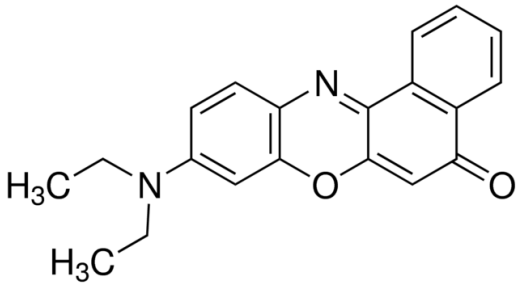
Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasonic Processor UP200S, Hielscher). Τα κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από τις καλλιέργειες επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 με αναλογία 5 mL διαλύματος ανά 1,5 gr κυττάρων. Οι συνθήκες που πραγματοποιείται

η λύση των κυττάρων είναι 30% Amplitude σε 10 κύκλους (15 s σε υπέρηχους, 45 s σε ηρεμία) στους 4°C .

3.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)

3.3.1 Παρατήρηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα με μικροσκοπία φθορισμού

Για την παρατήρηση του πολυμερούς στο εσωτερικό των κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική Nile Red (Nile blue oxazone). Η χρωστική προσδένεται επιλεκτικά σε σταγονίδια λιπιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Λόγω της δομής που φιλοξενείται το πολυμερές στο εσωτερικό των κυττάρων, η χρωστική προσδένεται πάνω σε αυτή επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την παρατήρηση του.



Εικόνα 3.1- Δομή χρωστικής Nile Red.

Για την πορεία παραγωγής του πολυμερούς στα κύτταρα, λαμβάνονται δείγματα των 2 mL από την κύρια καλλιέργεια ανά 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται μέσω φυγοκέντρισης στα 14000 x g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (Eppendorf 5415C Centrifuge) και επαναιωρούνται σε 100 μL θρεπτικού μέσου. Λαμβάνονται 4 μL κυττάρων και αναμειγνύονται με 1 μL διαλύματος Nile Red (250 μg/mL σε DMSO).

Για την παρατήρηση των κυττάρων, απαιτείται η προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών με αγαρόζη. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 100 μL διαλύματος θερμού (60°C) διαλύματος αγαρόζης (1% w/v σε νερό). Αφήνεται για 2

λεπτά να στεγνώσει. Πάνω στο στρώμα αγαρόζης τοποθετούνται 1-2 μL κυττάρων που έχουν βαφτεί με διάλυμα Nile Red. Αφού στεγνώσουν για μερικά δευτερόλεπτα, τοποθετείται η καλυπτρίδα.

Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο (Nikon ECLIPSE E800, Jenoptik ProgRes CF CCD 1.4 M.P. Microscope Camera, Nikon Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply) με ελαιοβυθιζόμενο φακό 100x. Λαμβάνονται εικόνες οπτικής και μικροσκοπίας φθορισμού (διέγερση 562/40 nm, εκπομπή 594 nm).

3.3.2 Απομόνωση πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα

Η απομόνωση του πολυεστέρα πραγματοποιείται μέσω διαβάθμισης ζάχαρης (sucrose gradient). Η διαβάθμιση ζάχαρης είναι μία τεχνική μέσω της οποίας μπορούν να διαχωριστούν υποκυττάρια σωματίδια ανάλογα το ισοπυκνικό τους σημείο. Η διαβάθμιση μπορεί να είναι είτε συνεχής είτε διαδοχική. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται η διαδοχική διαβάθμιση ζάχαρης (step sucrose gradient). Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται η απομόνωση του PHB στην native μορφή του, δηλαδή στη μορφή που υπάρχει στο εσωτερικό των κυττάρων.

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται είναι 1,33 M, 1,67 M και 2 M σε 0.1 M Tris-HCl pH 7.5. Από το κάθε διάλυμα χρησιμοποιούνται 3 mL και από το δείγμα 1.5 mL. Η μόνη προετοιμασία που απαιτείται για το κάθε δείγμα είναι η λύση των κυττάρων μέσω υπερήχων. Η υπερφυγοκέντριση πραγματοποιείται στα 210000 x *g* για 3 ώρες στους 4°C (Sorvall Ultra 800). Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης έχουν σχηματιστεί οι επιθυμητές λωρίδες, οι οποίες συλλέγονται. Για να απομακρυνθεί το διάλυμα της ζάχαρης, τα δείγματα πλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl pH 7.5. Οι πλύσεις πραγματοποιούνται στις 14000 x *g* για 20 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος.

3.3.3 Ποσοτικοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα

Η ποσοτικοποίηση του πολυμερούς επιτυγχάνεται μέσω της απομόνωσης του στην ελεύθερη μορφή. Τα κύτταρα, εφόσον είναι γνωστή η μάζα τους, επωάζονται σε

χλωροφόρμιο (1:3) στους 60°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί vortex για 10 λεπτά για λύση των κυττάρων. Το χλωροφόρμιο που περιέχει διαλυμένο το πολυμερές μεταφέρεται σε Falcon που έχει προζυγιστεί. Σε αυτό, προστίθεται ο τετραπλάσιος όγκος ψυχρής μεθανόλης (-20°C). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του πολυμερούς (σχηματισμός λευκού ιζήματος). Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 6000 x *g* για 20 λεπτά στους 4°C. Τα δείγματα αφήνονται για ξήρανση και ζυγίζονται.

3.3.4 Ταυτοποίηση πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Το απομονωμένο πολυμερές, είτε στην ελεύθερη είτε στην native μορφή του, διαλύεται σε 600 μL $CDCl_3$ (Deutero GmbH) με τη βοήθεια υπερήχων. Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα 5 mm NMR και τα φάσματα λαμβάνονται σε DPX-300 (Bruker). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το λογισμικό TopSpin 4.1.1.

3.4 Βιοχημική ανάλυση

3.4.1 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μία φασματοφωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες αλλάζει χρώμα. Η χρωστική δημιουργεί σύμπλοκο με την πρωτεΐνη, παρουσιάζοντας απορρόφηση στα 595 nm. Γνωρίζοντας την απορρόφηση μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος, με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA από ορό βοδιού.

Σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων τοποθετούνται 1-10 μL πρωτεΐνης BSA 1 mg/mL σε διπλέτες. Ο τελικός όγκος είναι 210 μL και το αντιδραστήριο Bradford 200 μL. Ο

υπολειπόμενος όγκος συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl pH 7.5. Μετά από επώαση 5 λεπτών, μετριέται η απορρόφηση στα 595 nm. Σαν τυφλό χρησιμοποιούνται 10 μL ρυθμιστικού και 200 μL Bradford. Για τα άγνωστα δείγματα πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία με τις κατάλληλες αραιώσεις (1:10 ή 1:100).

3.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS- PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE έχει ως σκοπό τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Πριν την διεξαγωγή του πειράματος, τα δείγματα υφίστανται επεξεργασία κατά την οποία οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και αποκτούν το ίδιο φορτίο.

<u>Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου</u>

Η πηκτή ακρυλαμιδίου αποτελείται από την πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Διαφέρουν ως προς την συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που περιέχουν, καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο το μέγεθος των πόρων της πηκτής (Πίνακας 3.6).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής είναι:

- AB-mix buffer (49.5% T, 3% C)
- 3x Gel Buffer (3 M Tris, 0.3% SDS, pH 8.45)
- Glycerol (100%)
- Ammonium Persulfate (APS) 10% w/v
- TEMED

Πίνακας 3.6- Αναλυτική σύσταση της πηκτής επιστοίβασης και της πηκτής διαχωρισμού.

	Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel), 4%	Πηκτή διαχωρισμού (separating gel), 12%
AB- mix	1 mL	6 mL
3x Gel Buffer	4 mL	10 mL
100% Glycerol	-	3 gr
10% w/v APS	90 μL	150 μL
TEMED	9 μL	15 μL
H_2O	12 mL (τελικός όγκος)	30 mL (τελικός όγκος)

<u>Διαλύματα</u>

3x Διάλυμα παρασκευής δειγμάτων (Sample Buffer)

- 12% SDS
- 10% Glycerol
- 6% Mercaptoethanol
- 0.05% Serva blue
- 150 mM Tris-HCl, pH= 7

Running Buffers

- 10x Anode Buffer (1 M Tris, pH 8.9)
- 10x Cathode Buffer (1 M Tris, 1 M Tricine, 1% SDS, pH 8.25)

Διάλυμα χρώσης

- 10% v/v Phosphoric acid

- 10% w/v Ammonium Sulfate
- 0.12% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250
- 20% Methanol

Διάλυμα αποχρωματισμού

- 7% v/v Acetic acid
- 5% Methanol,
- Nanopure H_2O

Κάθε πρωτεϊνικό δείγμα αναμειγνύεται με το Sample Buffer με την κατάλληλη αναλογία και επωάζεται για 40 λεπτά στους 60ºC. Σε κάθε θέση της πηκτής φορτώνονται συνολικά 20 μg πρωτεΐνης, εφόσον η συσκευή έχει πληρωθεί με το cathode buffer (1x) και το anode buffer (1x). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 20 mA και μόλις τα δείγματα περάσουν την πηκτή επιστοίβασης, η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 40 mA. Μόλις ολοκληρωθεί, η πηκτή επωάζεται στην χρώση για 12-16 ώρες. Έπειτα, ακολουθεί ο αποχρωματισμός και η παρατήρηση της πηκτής.

3.4.3 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών που προορίζονται για ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS/MS

Η πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση της θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που έχει την ιδιότητα να διασπάει πεπτιδικούς δεσμούς των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη στο C-τερματικό άκρο.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1) Οι πρωτεϊνικές λωρίδες από την πηκτή του SDS-PAGE κόβονται σε μικρά τμήματα και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα Eppendorf.

2) Τα τμήματα της πηκτής αποχρωματίζονται με τρεις διαδοχικές πλύσεις με 50% v/v ακετονιτρίλιο (ACN) και 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο (ABS) διάρκειας 15 λεπτών.

3) Ακολουθεί η αναγωγή των πηκτών με τη χρήση 10 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε 50 mM ABS, με επώαση υπό ανάδευση για 45 λεπτά στους 56ºC.

4) Στη συνέχεια, γίνεται αλκυλίωση με 55 mM ιωδοακεταμίδιο (IAA) σε 50 mM ABS, με επώαση υπό ανάδευση για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.

5) Τα τεμάχια της πηκτής πλένονται με 50 mM ABS και 50% ACN επί 15 λεπτά, διαδοχικά, συνολικά τρεις φορές.

6) Κατόπιν, οι πηκτές αφυδατώνονται με την προσθήκη 100% ACN και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιείται πριν την προσθήκη της θρυψίνης.

7) Στα αφυδατωμένα τμήματα της πηκτής, προστίθενται 25-30 μL πρωτεολυτικού διαλύματος (20 μg θρυψίνης) και αφήνονται σε πάγο για 30-90 λεπτά. Έπειτα, επωάζονται στους 37ºC για 14-16 ώρες.

8) Πραγματοποιούνται διαδοχικές επωάσεις των δειγμάτων διάρκειας 30 λεπτών, σε πρώτο στάδιο με διάλυμα 50% ACN/ 0.1% τριφθορικού οξέος (TFA) και έπειτα με διάλυμα 100% ACN. Τα υπερκείμενα από τις πλύσεις αυτές συλλέγονται και ενώνονται, ανακτώντας με αυτόν τον τρόπο τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής.

9) Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια φυλάσσονται στους -20ºC μέχρι να τοποθετηθούν στο στόχο.

3.4.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MALDI- TOF MS/MS

Τα αποξηραμένα πεπτίδια διαλυτοποιούνται σε 5 μL διαλύματος 50% ACN/ 0.1% TFA. Έπειτα, 1 μL διαλύματος μήτρας α-κυανο-4-κινναμωμικού οξέος (8.6 mg/mL) σε 50% ACN/ 0.1% TFA και τοποθετείται στην μεταλλική πλάκα του στόχου.

Ο στόχος εισέρχεται στον φασματογράφο μάζας και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται μέσω αργής εξαγωγής και τη χρήση ανακλαστήρα με τις παρακάτω παραμέτρους: Laser smartbeam II συχνότητας 200 Hz για φάσματα MS με τάση επιτάχυνσης 20.15 kV για την πηγή ιόντων I και 18.10 kV για την πηγή ιόντων II, 90 ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600 kDa, για τα φάσματα MS/MS με τη μεθοδολογία LIFT με τάση επιτάχυνσης 19.6 kV για την πηγή ιόντων I και 3.80 kV για την πηγή ιόντων II. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2.3 ενώ τα φάσματα που ελήφθησαν ήταν εύρους μαζών 700-3900 kDa. Για κάθε πεπτίδιο δόθηκε εντολή να παρθούν 12 MS/MS.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Biotools με βάση δεδομένων για το στέλεχος *Pseudomonas* sp. phDV1 και κωδικό στη Uniprot , UP000258809 .

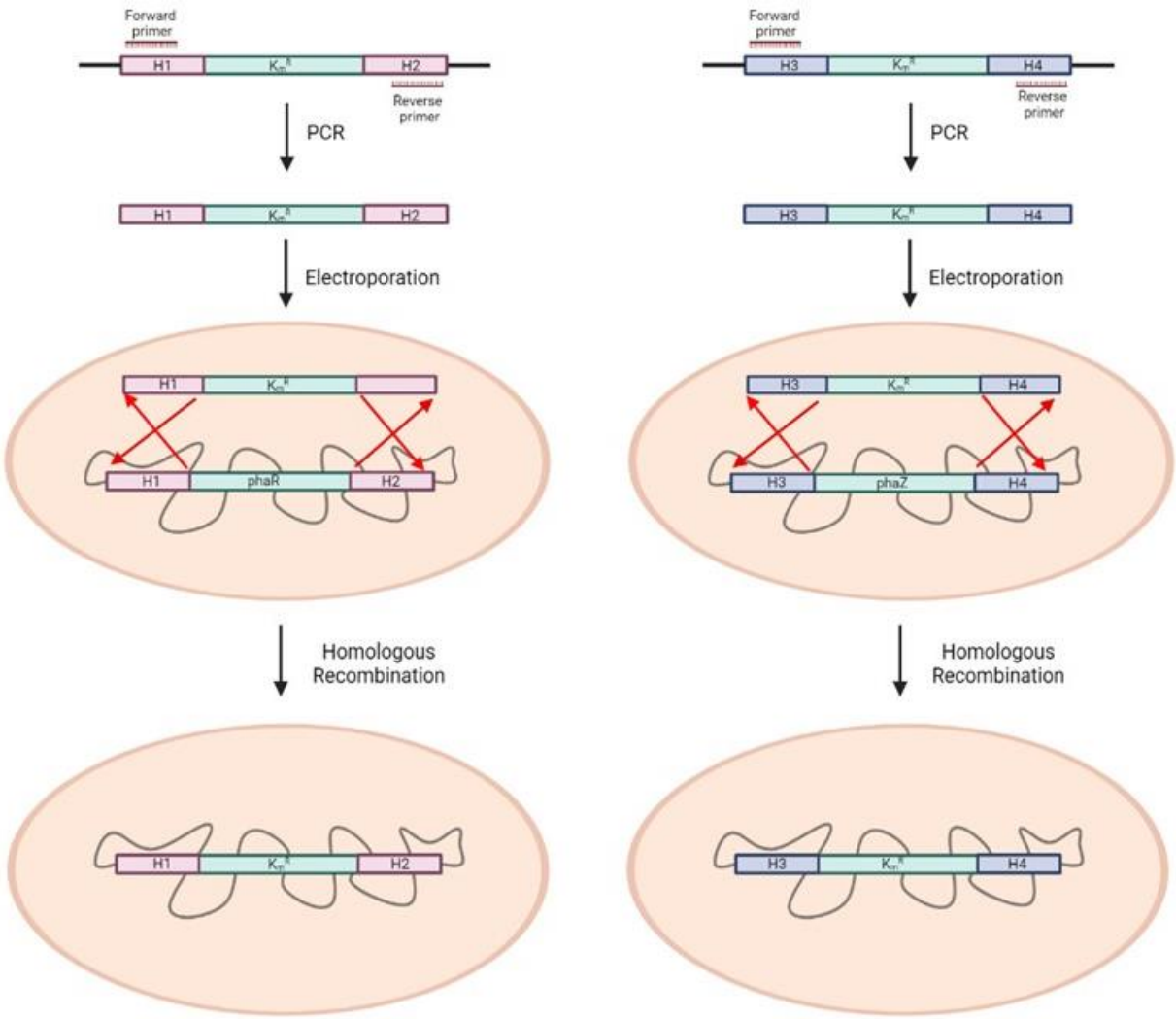
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Δημιουργία και ταυτοποίηση μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ

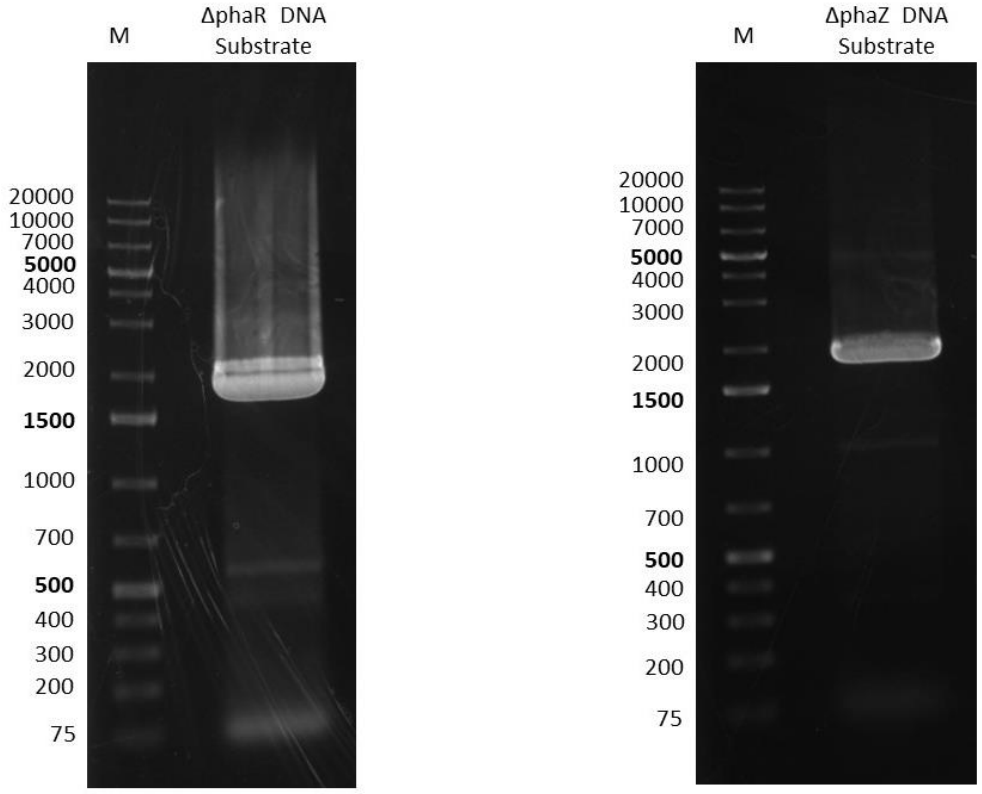
Στη συγκεκριμένη εργασία, στόχος ήταν η δημιουργία δύο μεταλλαγμάτων του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. phDV1, του μεταλλάγματος ΔphaR και του ΔphaZ. Η επιλογή διαγραφής των συγκεκριμένων γονιδίων έγινε με βάση την βιβλιογραφική λειτουργία των γονιδίων. Το γονίδιο phaR είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της έκφρασης των φασίνων (phaP) ενώ το γονίδιο phaZ εκφράζει την αποπολυμέραση του PHB.

Για την δημιουργία των μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ σε πρώτο στάδιο σχεδιάστηκε το DNA υπόστρωμα. Το DNA υπόστρωμα φέρει δύο ομόλογες περιοχές με το εκάστοτε γονίδιο και το γονίδιο ανθεκτικότητας προς την καναμυκίνη (Km^R). Οι ομόλογες περιοχές έχουν μήκος περίπου 200-500 bps. (Παράρτημα 1)

Σε επόμενο στάδιο, ήταν απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός, ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροπόρωση. Μετά τις αντιδράσεις PCR εκτιμάται αν υπάρχει το επιθυμητό προϊόν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Το βάρος του προϊόντος είναι 2177 bps για το ΔphaR και 1912 bps για το ΔphaZ.(Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.1- Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας για την διαγραφή των γονιδίων phaR και phaZ. Μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό δημιουργούνται τα μεταλλάγματα ΔphaR και ΔphaZ αντιστοίχως. Δημιουργήθηκε μέσω την πλατφόρμας Biorender.

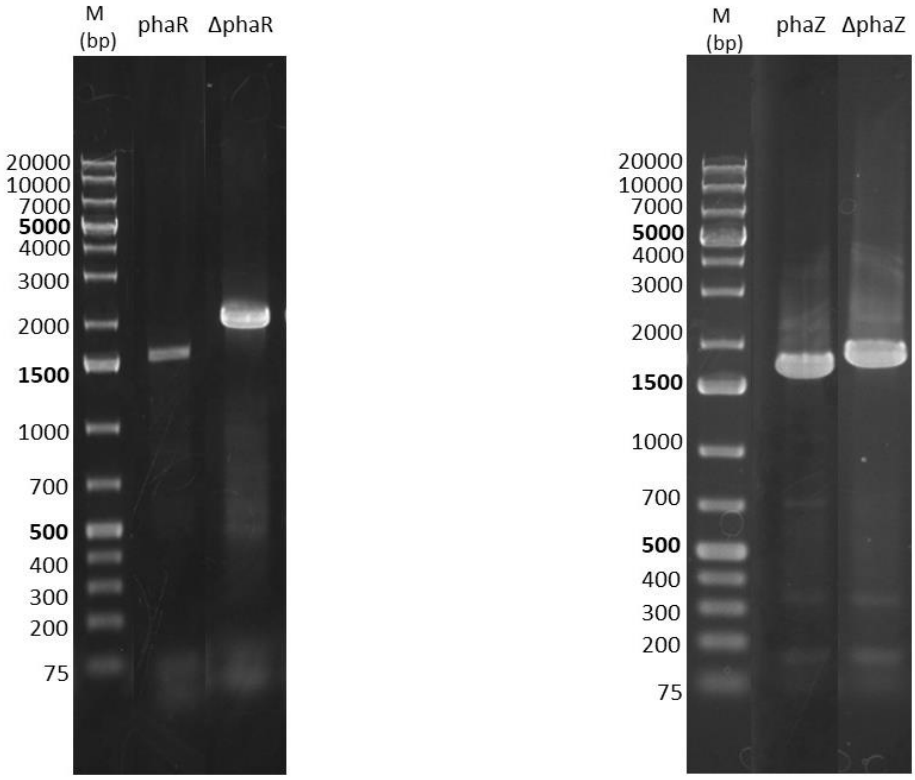


Εικόνα 4.2- Πηκτές αγαρόζης που απεικονίζουν το μήκος βάσεων των DNA υποστρωμάτων, το ΔphaR (αριστερά) και το ΔphaZ (δεξιά).

Μετά την ηλεκτροπόρωση, τα βακτήρια απλώθηκαν σε τρυβλίο με LB που περιείχε 100 μg/mL Km και 170 μg/mL Cm. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε διάστημα 48 ωρών ελέγχθηκαν για την επιτυχή διαγραφή του γονιδίου. Σε πρώτο στάδιο γίνεται η απομόνωση του gDNA του βακτηρίου WT και των μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ. Μέσω μιας αντίδρασης PCR με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του υποστρώματος, γίνεται ο πρώτος έλεγχος για την απουσία των γονιδίων. Οι εκκινητές προσδένονται στις ομόλογες περιοχές του αντίστοιχου γονιδίου. Αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε, διότι τα γονίδια έχουν διαφορετικό μήκος βάσεων από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη σε συνδυασμό με τις ομόλογες περιοχές (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1- Μήκη αλληλουχιών των γονιδίων phaR, phaZ και των υποστρωμάτων DNA ΔphaR, ΔphaZ.

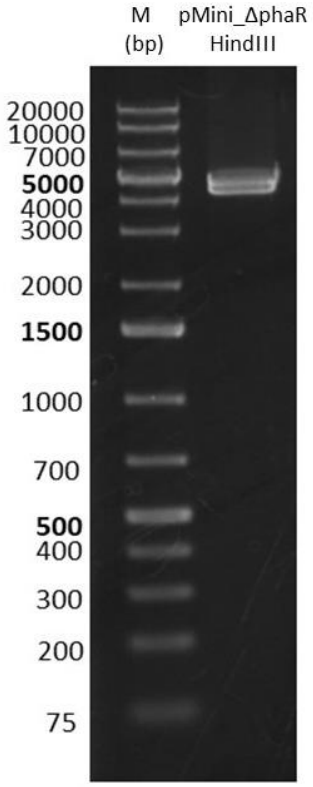
Γονιδιακή αλληλουχία	Μήκος αλληλουχίας (bps)
phaR	1744
ΔphaR	2177
phaZ	1996
ΔphaZ	1949



Εικόνα 4.3- Σύγκριση προϊόντων από αντίδραση PCR που χρησιμοποιείται το γενωμικό υλικό από το WT και τα δύο μεταλλάγματα.

Εφόσον το μήκος βάσεων ήταν σωστό, οι αλληλουχίες απομονώθηκαν από τις πηκτές αγαρόζης και ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο pMini (NEB, New England BioLabs) για φύλαξη. Ως επιπλέον βήμα ελέγχου για το ΔphaR έγινε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Σύμφωνα με τις θέσεις πέψης του συγκεκριμένου

ενζύμου, μετά την αντίδραση αναμένονταν η θραυσματοποίηση του πλασμιδίου σε ένα τμήμα που βρίσκεται στο εσωτερικό της αλληλουχίας του γονίδιου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Το αναμενόμενο προϊόν είχε μήκος 4332 bps (Εικόνα 4.4).

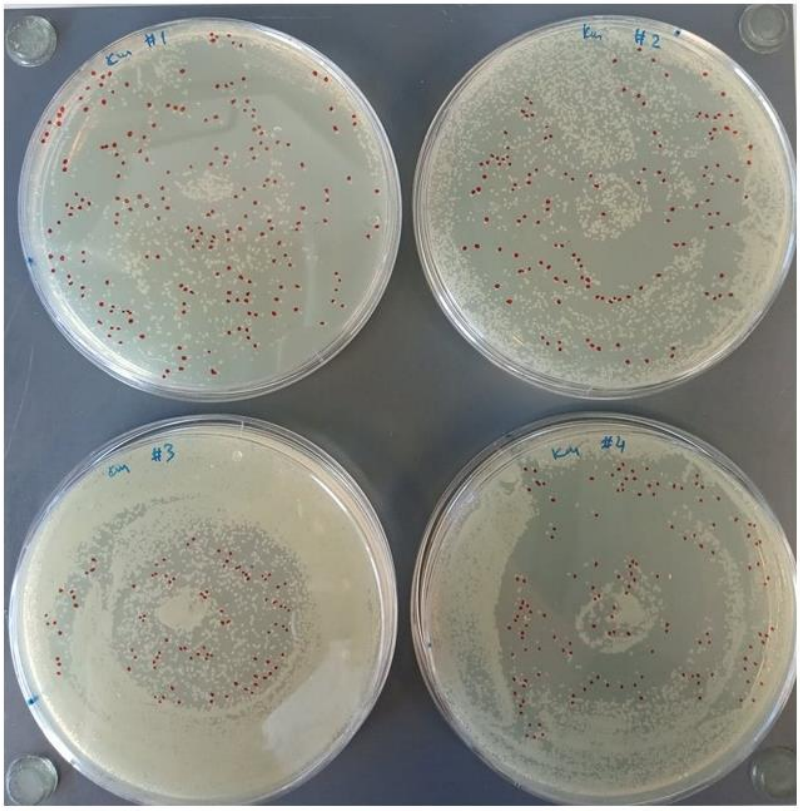


Εικόνα 4.4- Πηκτή αγαρόζης με δείγμα που έχει πεπτεί με το περιοριστικό ένζυμο HindIII.

Τέλος, τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν από το την πηκτή αγαρόζης της Εικόνας 4.3 στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Eurofins. Έπειτα, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης συγκρίθηκαν με τις επιθυμητές αλληλουχίες. Όταν διαπιστώθηκε ότι οι αλληλουχίες ήταν σωστές έγινε προσπάθεια απομάκρυνσης του πλασμιδίου pMK_Reds. (Παράρτημα 1)

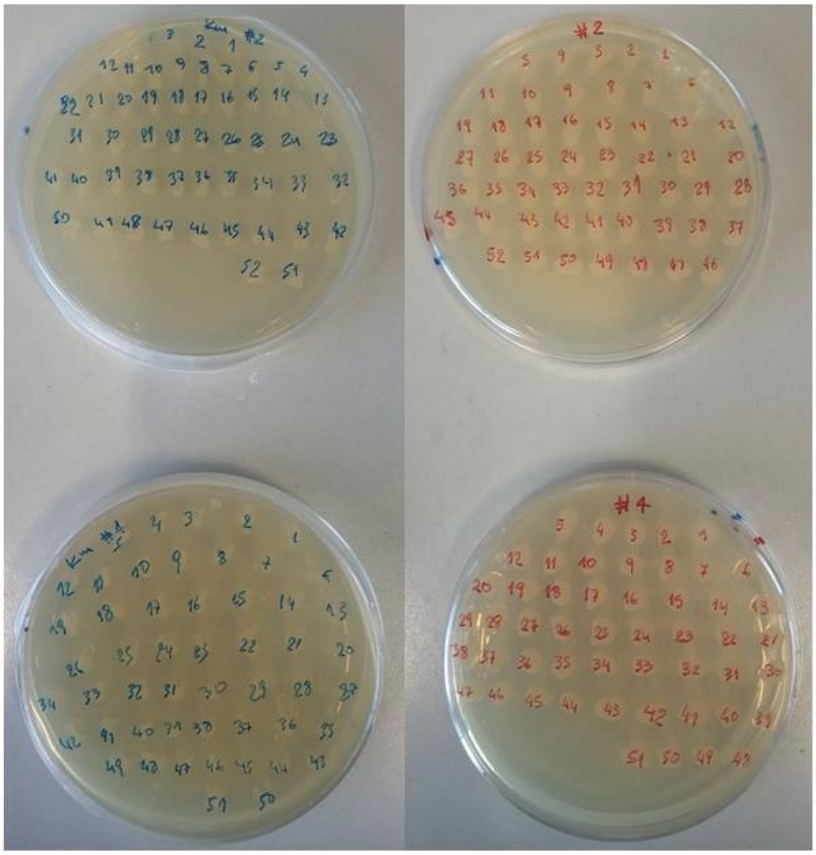
Για την απομάκρυνση του πλασμιδίου από τα μεταλλάγματα εφαρμόστηκε ηλεκτροπόρωση. Συνολικά, έγιναν τέσσερις προσπάθειες. Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε διαφορετικός αριθμός παλμών. Σε κανένα δείγμα δεν ήταν εφικτή η

απομάκρυνση του πλασμιδίου από τα μεταλλάγματα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα τρυβλία με δείγματα μετά την ηλεκτροπόρωση (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5- Τρυβλία με θρεπτικό LB και 100 μg/mL καναμυκίνη με κύτταρα μετά από ηλεκτροπόρωση. Ο αριθμός πάνω στο κάθε τρυβλίο αντιπροσωπεύει τον αριθμό των παλμών που εφαρμόστηκε στα κύτταρα.

Από το κάθε τρυβλίο αυτό επιλέχθηκαν τυχαία μονήρεις αποικίες και απλώθηκαν εκ νέου στα δύο τρυβλία, σε ένα που περιέχει μόνο καναμυκίνη και σε ένα που περιέχει καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη. Οι αποικίες που έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν στο τρυβλίο με την καναμυκίνη, αλλά όχι στο τρυβλίο που περιέχει την χλωραμφενικόλη δεν διαθέτουν το πλασμίδιο. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται παρακάτω δύο από τις τέσσερις συνθήκες που δοκιμάστηκαν (Εικόνα 4.6). Τα δύο τρυβλία αντιπροσωπεύουν κύτταρα που δέχτηκαν δύο και τέσσερις παλμούς. Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις η απομάκρυνση του πλασμιδίου, καθώς οι αποικίες που απομονώθηκαν είναι ικανές να αναπτυχθούν και στα δύο τρυβλία.



Εικόνα 4.6- Τρυβλία με κύτταρα από μονήρεις αποικίες μετά την ηλεκτροπόρωση με σκοπό απομάκρυνση πλασμιδίου. Τα κύτταρα πρώτα απλώνονται σε τρυβλία που περιέχουν καναμυκίνη (μπλε) και στη συνέχεια οι ίδιες αποικίες μεταφέρονται σε τρυβλία με καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη (κόκκινο). Τα κύτταρα έχουν υποστεί δύο παλμούς (πάνω) και τέσσερις παλμούς (κάτω).

Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες που έγιναν δεν ήταν εφικτή η απομάκρυνση του πλασμιδίου. Εκτιμάται ότι πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιο επεμβατικές μέθοδοι, όπως η χρήση διάφορων παραγόντων ή διαφορετικών μεθόδων. Για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν προταθεί οι παράγοντες πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange) και η μυτομυκίνη C (mitomycin C).[64–66] Μία μέθοδος ακόμα που έχει προταθεί είναι τα κύτταρα να υποστούν αρκετούς κύκλους ψύξης-απόψυξης.[63]

Παρόλα αυτά, καθώς το πλασμίδιο δεν περιέχει κάποιο γονίδιο που επηρεάζει την παραγωγή του PHB, συνεχίστηκε η μελέτη των μεταλλαγμάτων παρουσία του πλασμιδίου.

4.1 Ανάπτυξη κυττάρων *Pseudomonas* sp. phDV1 και των μεταλλαγμάτων ΔphaR/ ΔphaZ

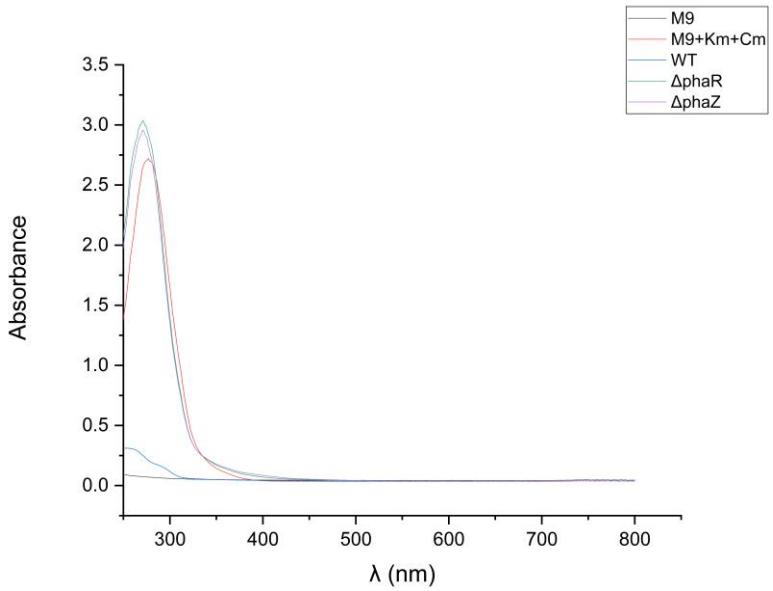
Επόμενο στάδιο της δημιουργίας των μεταλλαγμάτων είναι η μελέτη τους, ώστε να εξακριβωθεί πως επιδρά η διαγραφή των γονιδίων phaR και phaZ, τόσο στο φαινότυπο αλλά και στην ανάπτυξη του βακτηρίου.

Όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα, τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε δύο συνθήκες: σε M9 θρεπτικό μέσο (C/N= 1/9) και σε M9-N θρεπτικό μέσο (C/N=20/1). Οι καλλιέργειες των κυττάρων έγιναν για 72 ώρες στους 32°C υπό ανάδευση. Η κάθε συνθήκη και το κάθε στέλεχος μελετήθηκαν σε τριπλέτες.

Στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων, παρουσιάστηκε διαφορά όσον αφορά τον χρωματισμό των καλλιεργειών στο θρεπτικό μέσο M9 (Εικόνα 4.7).

Εικόνα 4.7- Καλλιέργειες κυττάρων: (A) WT σε M9 (αριστερά) και σε M9-N (δεξιά), (B) ΔphaR σε M9 (αριστερά) και σε M9-N (δεξιά) και (Γ) ΔphaZ σε M9 (αριστερά) και σε M9-N (δεξιά).

Για να εξακριβωθεί από που προέρχεται ο χρωματισμός λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στα θρεπτικά μέσα.



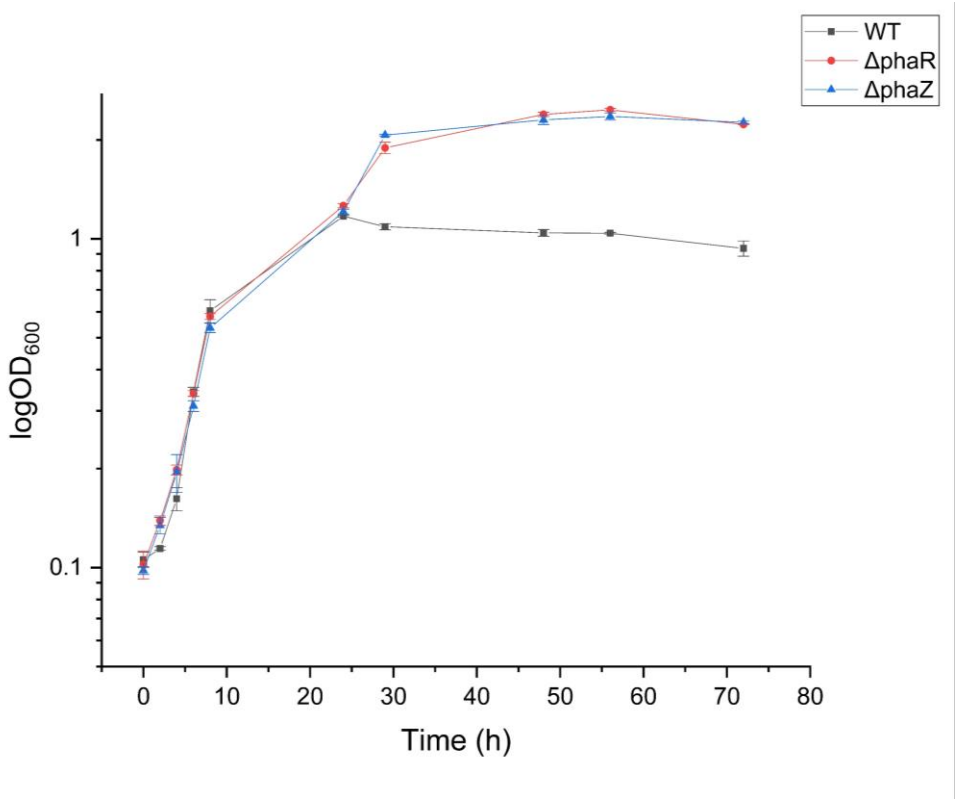
Εικόνα 4.8- Φάσματα UV-Vis που λήφθηκαν στο θρεπτικό μέσο πριν την καλλιέργεια κυττάρων και μετά από 72 ώρες ανάπτυξης των στελεχών.

Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θρεπτικό μέσο πριν τον εμβολιασμό τους με τα μεταλλάγματα και μετά το πέρας των 72 ωρών ανάπτυξης (Εικόνα 4.8). Και στις δύο περιπτώσεις, πριν την λήψη του φάσματος πραγματοποιήθηκε μία φυγοκέντριση (6000 x *g*, 3 λεπτά) για την απομάκρυνση ιζήματος και των κυττάρων.

Το θρεπτικό M9 πριν τον εμβολιασμό δεν εμφανίζει καμία χαρακτηριστική κορυφή, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς αποτελεί ένα διάλυμα αλάτων. Μετά την ανάπτυξη του WT στο θρεπτικό μέσο M9, η κορυφή που εμφανίζεται σχετίζεται με ενώσεις που εκκρίνονται από τα κύτταρα στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η κορυφή που συναντάται στην περίπτωση του θρεπτικού που καλλιεργούνται τα μεταλλάγματα οφείλεται στην παρουσία της χλωραμφενικόλης. Πιο συγκεκριμένα, όταν καλλιεργούνται τα μεταλλάγματα, το θρεπτικό μέσο M9 εμπεριέχει δύο αντιβιοτικά, την καναμυκίνη και την χλωραμφενικόλη. Η χλωραμφενικόλη εμφανίζει μέγιστο στα 278 nm σε αντίθεση με την καναμυκίνη που η απορρόφηση της είναι αρκετά χαμηλή χωρίς την προσθήκη κάποιου χρωμοφόρου.[67,68] Ωστόσο, τα αντιβιοτικά δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων αλλά προστέθηκαν στις καλλιέργειες με σκοπό την αποφυγή μόλυνσης.

Επόμενο βήμα, αποτελούσε η μελέτη του τρόπου ανάπτυξης του βακτηρίου και των μεταλλαγμάτων. Ο τρόπος ανάπτυξης των στελεχών στις δύο συνθήκες εμφανίζει διαφορές. Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης που δημιουργήθηκαν.

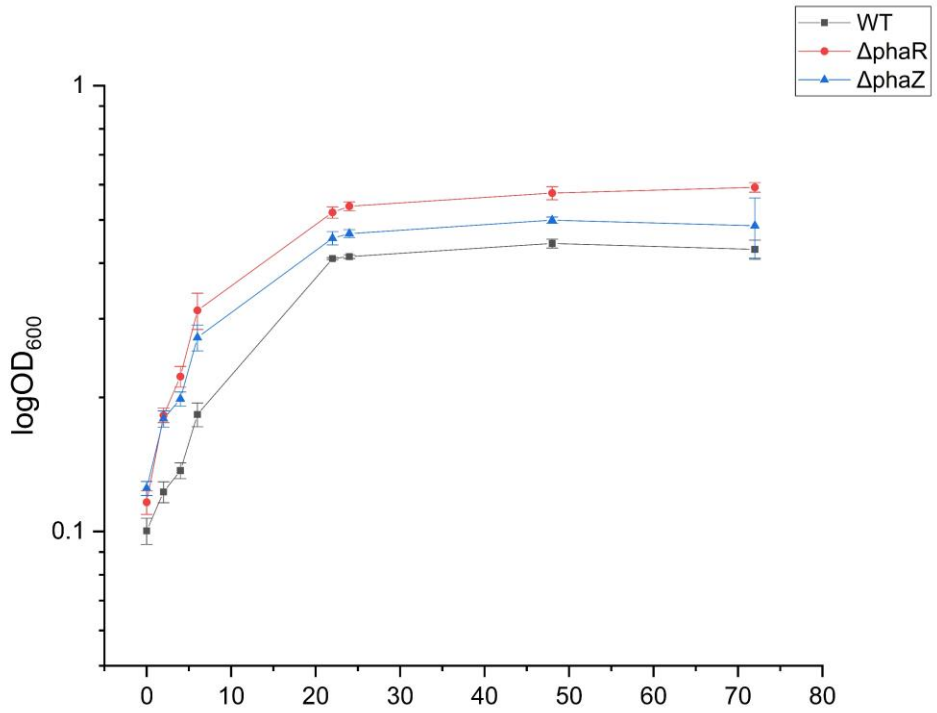
Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε ο τρόπος ανάπτυξης των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο M9. Το M9 είναι ένα από τα συνηθέστερα μέσα ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Το WT κατά τις πρώτες 24 ώρες αναπτύσσεται εκθετικά, ενώ μεταβαίνει στη φάση του θανάτου μετά τις 55 ώρες. Τα δύο μεταλλάγματα, εμφάνισαν μεγαλύτερη ανάπτυξη και μεγαλύτερη εκθετική φάση από το WT.



Εικόνα 4.9- Καμπύλη ανάπτυξης του WT και των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο M9.

Στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο ήταν M9-N παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη μεταξύ του WT και των μεταλλαγμάτων. Παρόλα αυτά, η γενικότερη ανάπτυξη των κυττάρων ήταν σαφέστερα μειωμένη από αυτήν που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο M9. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η

περιορισμένη συγκέντρωση αζώτου παρεμποδίζει βασικές λειτουργίες των κυττάρων όπως η πρωτεϊνοσύνθεση και η σύνθεση νουκλεϊκών οξέων.



Εικόνα 4.3- Καμπύλη ανάπτυξης του WT και των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο M9-N.

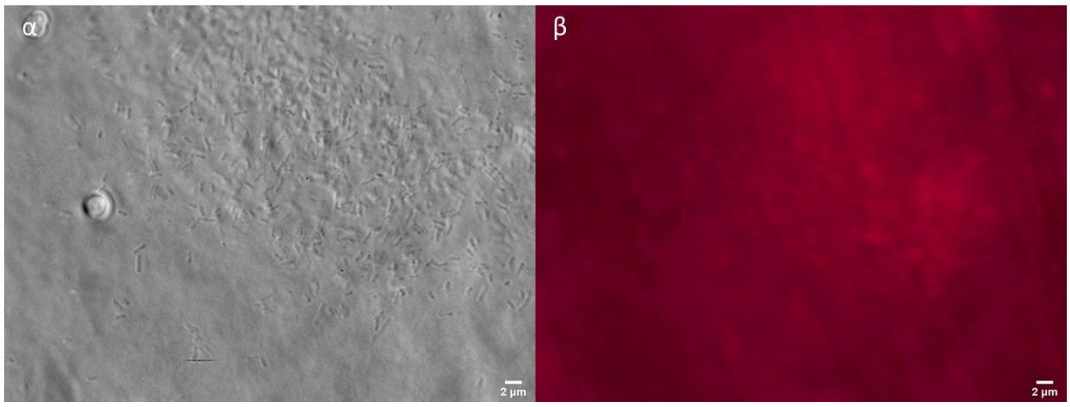
4.2 Παρατήρηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα με μικροσκοπία φθορισμού

Το WT και τα μεταλλάγματα καλλιεργούνται στα δύο θρεπτικά μέσα M9 και M9-N. Κατά την διάρκεια των καλλιεργειών λαμβάνονται ανά 24 ώρες δείγματα για παρατήρηση του PHB μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού.

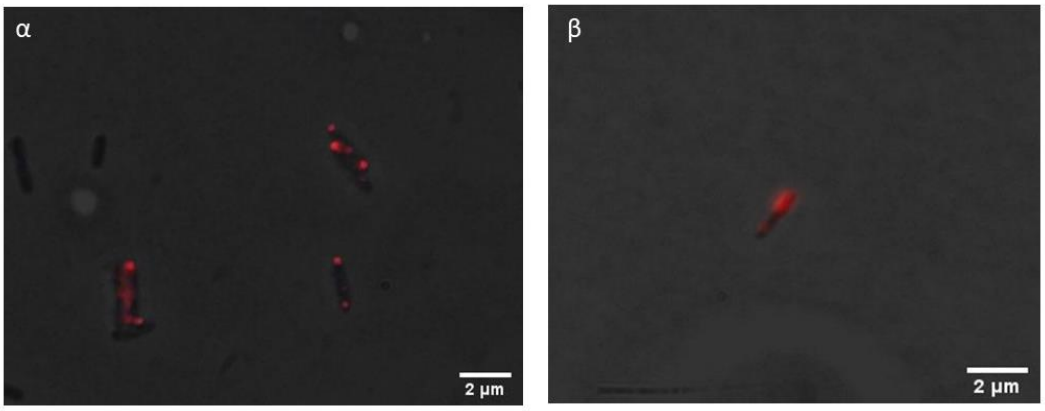
Για να γίνει εφικτή η παρατήρηση του PHB χρησιμοποιείται η χρωστική Nile Red. Έχει την ικανότητα να προσδένεται σε ενδοκυττάρια λιπίδια και υδρόφοβες

πρωτεΐνες. Η πρόσδεση της χρωστικής στο PHB προσδίδει στα κυστίδια ένα κόκκινο χρώμα κατά τον φθορισμό της.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες που λήφθηκαν την χρονική στιγμή μηδέν (t=0). Για τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από προκαλλιέργειες σε LB. Το WT δεν παράγει PHB ούτε σε LB ούτε σε θρεπτικό μέσο M9 (Εικόνα 4.11).



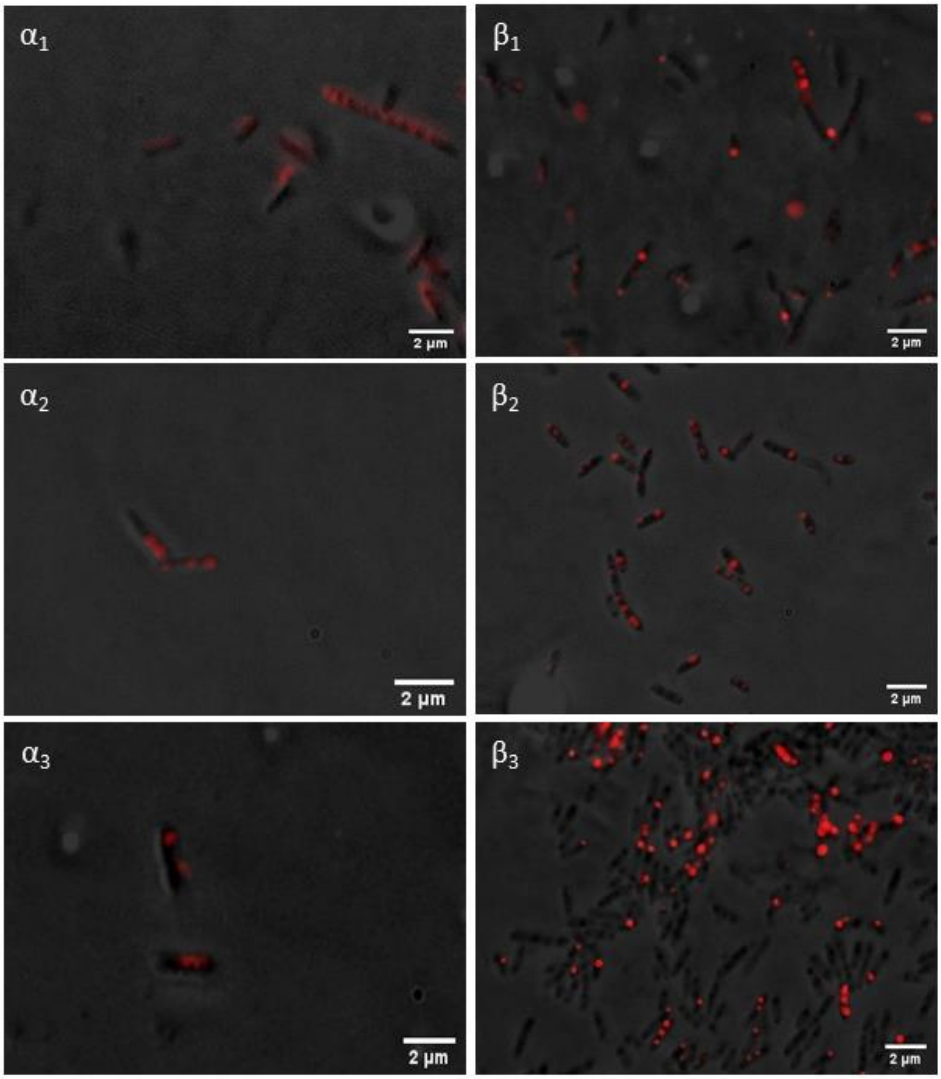
Εικόνα 4.4- Απεικόνιση του WT σε LB από καλλιέργεια 16-18 ωρών: (α) εικόνα φωτεινού πεδίου και (β) εικόνα φθορισμού με Nile Red.



Εικόνα 4.5- Συνδυαστική απεικόνιση (εικόνα φωτεινού πεδίου και εικόνα φθορισμού με Nile Red) των μεταλλαγμάτων σε LB από καλλιέργεια 16-18 ωρών: (α) ΔphaR (β) ΔphaZ.

Οι εικόνες που λήφθηκαν για τα μεταλλάγματα ΔphaR και ΔphaZ σε θρεπτικό LB παρουσιάζουν στο εσωτερικό των κυττάρων PHB. Αυτό δείχνει, ότι οι διαγραφές των γονιδίων επηρεάζουν την παραγωγή του PHB (Εικόνα 4.12).

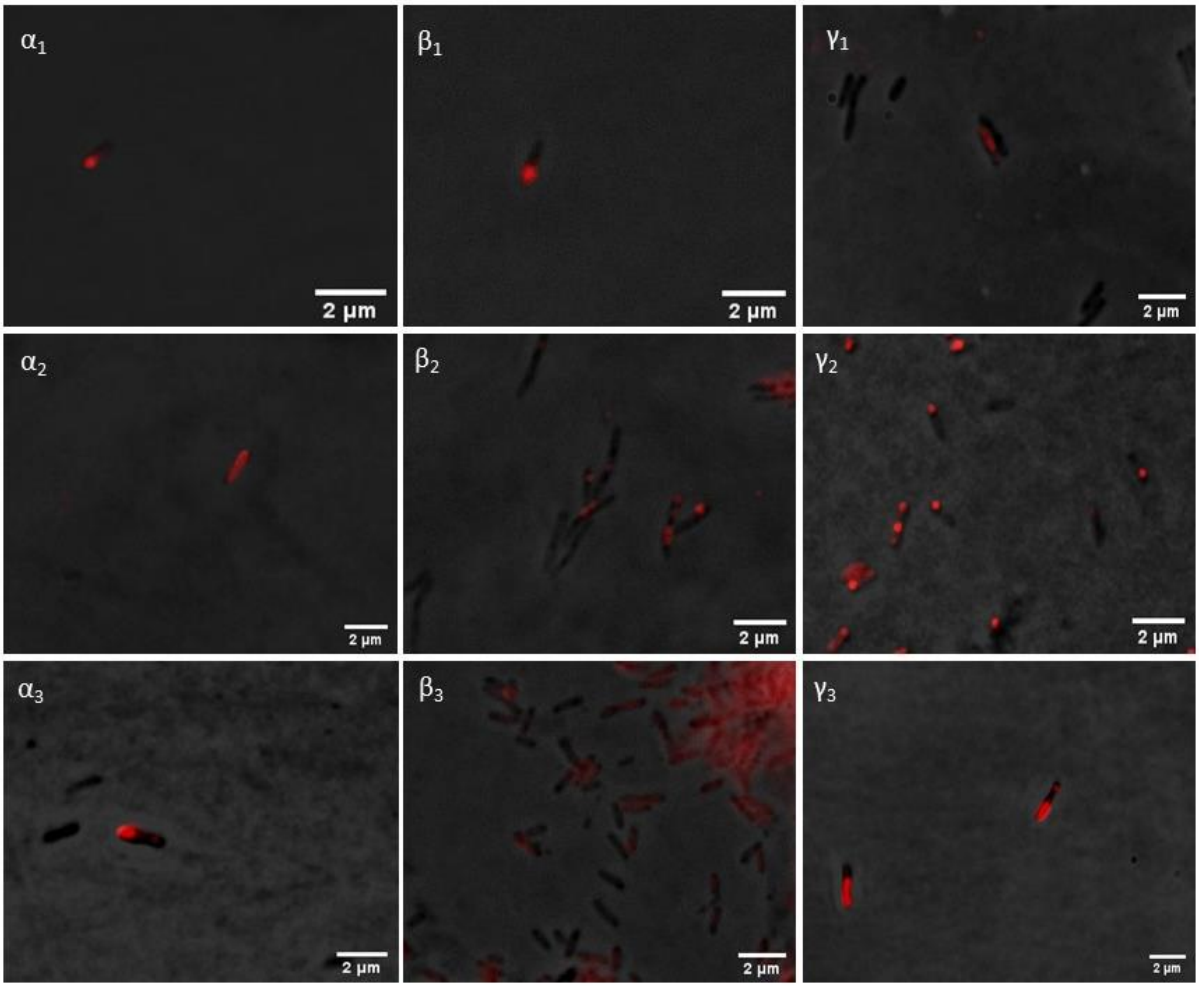
Η απεικόνιση του PHB από κύτταρα που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο M9 πραγματοποιήθηκε μόνο στα μεταλλάγματα, επειδή το WT δεν παράγει PHB υπό φυσιολογικές συνθήκες.



Εικόνα 4.13- Συνδυαστική απεικόνιση (εικόνα φωτεινού πεδίου και εικόνα φθορισμού με Nile Red) των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο M9 στις 24 (1), στις 48 (2) και 72 ώρες (3): (α) ΔphaR και (β) ΔphaZ.

Παρατηρώντας τις εικόνες μικροσκοπίας εξάγεται το συμπέρασμα, ότι τα μεταλλάγματα εμφανίζουν και τα δύο σε ικανοποιητικό βαθμό παραγωγή του PHB στις 24, 48 και 72 ώρες επώασης (Εικόνες 4.13). Συνεπώς, η απουσία των γονιδίων επηρεάζει την παραγωγή του πολυμερούς σε θετικό βαθμό.

Επόμενο στάδιο ήταν η μικροσκοπική μελέτη του WT και των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο M9-N. Σκοπός ήταν η σύγκριση της ικανότητας παραγωγής PHB σε συνθήκες καταπόνησης. Σε αυτές τις συνθήκες αναμένεται να παραχθεί και από το WT το πολυμερές. (Εικόνα 4.14)



Εικόνα 4.14- Συνδυαστική απεικόνιση (εικόνα φωτεινού πεδίου και εικόνα φθορισμού με Nile Red) των μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο M9-N στις 24 (1), στις 48 (2) και 72 ώρες (3): (α) WT (β) ΔphaR και (γ) ΔphaZ.

Από τις εικόνες μικροσκοπίας είναι φανερό, ότι το WT έχει την δυνατότητα να παράγει το πολυμερές όταν αναπτύσσεται σε συνθήκες μειωμένου αζώτου. Αυτό συμφωνεί και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.[69–73] Τα μεταλλάγματα με την σειρά τους εμφανίζουν PHB στο εσωτερικό των κυττάρων. Το βακτήριο και τα μεταλλάγματα φαίνεται να παράγουν το πολυμερές στις 24, 48 και 72 ώρες επώασης.

Έχοντας την ένδειξη σε ποιες συνθήκες παράγεται το πολυμερές, σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε προσπάθεια απομόνωσης και χαρακτηρισμού του.

4.3 Απομόνωση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)

Η απομόνωση του PHB στην native μορφή του πραγματοποιείται με μη συνεχόμενη διαβάθμιση ζάχαρης (step sugar-gradient). Μετά την λύση των κυττάρων, τα δείγματα φορτώνονται στα σωληνάρια με την διαβάθμιση και φυγοκεντρούνται. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι το πολυμερές εντοπίζεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 1.33M και 1.67M διαλυμάτων ζάχαρης με τη μορφή μιας λευκής ή ελαφρώς καφέ χρώματος λωρίδας.[74]

Τα αποτελέσματα από την διαβάθμιση ζάχαρης από δείγματα καλλιεργειών σε M9 φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 4.15).

Εικόνα 4.15- Αποτελέσματα διαβάθμισης από καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο M9 του WT (A), ΔphaR (B) και ΔphaZ (Γ).

Οι επιθυμητές λωρίδες, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, εμφανίζονται στα δύο μεταλλάγματα. Αντίθετα, στο WT δεν παρατηρείται ο σχηματισμός κάποιας λωρίδας, το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς το βακτήριο δεν βρίσκεται σε συνθήκες καταπόνησης. Αντίθετα, η διαγραφή των γονιδίων phaR και phaZ φαίνεται, σε πρώτο στάδιο, να επηρεάζει την παραγωγή του PHB. Οι δύο λωρίδες των μεταλλαγμάτων απομονώθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαβάθμιση ζάχαρης για δείγματα από καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο M9-N. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφανίζονται παρακάτω (Εικόνα 4.16).

Εικόνα 4.6- Αποτελέσματα διαβάθμισης από καλλιέργειες σε M9-N του WT (A), ΔphaR (B) και ΔphaZ (Γ).

Παρατηρείται ότι και στα τρία δείγματα υπάρχει η ενδεικτική λωρίδα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, καθώς το θρεπτικό που αναπτύσσεται είναι σχεδιασμένο, ώστε να επάγει την παραγωγή του πολυμερούς λόγω του μειωμένου αζώτου.

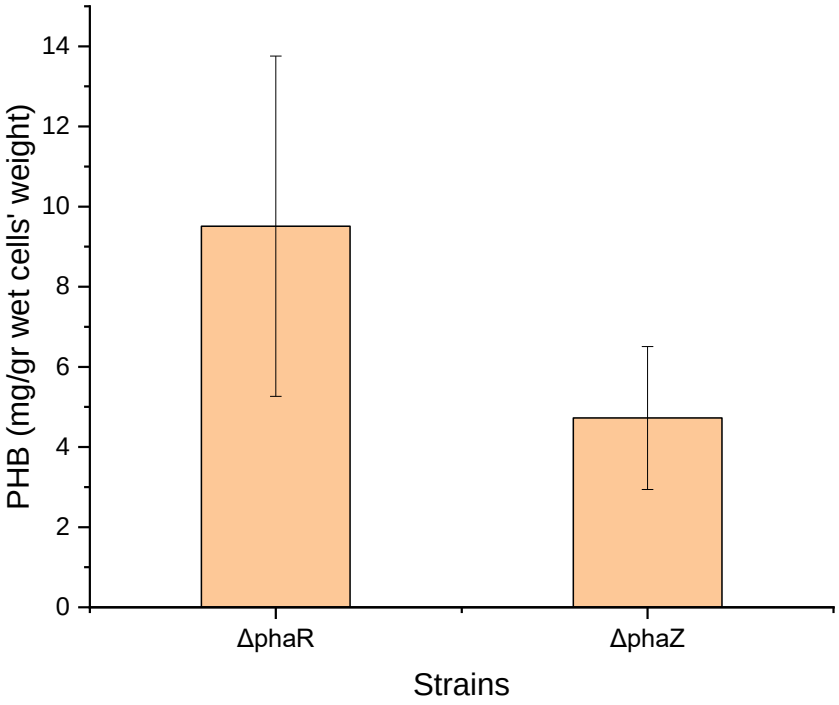
Οι λωρίδες που εμφανίζονται στην εκάστοτε συνθήκη απομονώνονται για περαιτέρω μελέτη.

4.4 Ποσοτικοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)

Για την ποσοτικοποίηση του πολυμερούς ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Αφού συλλεχθούν τα κύτταρα, και είναι γνωστό το βάρος τους, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση με το χλωροφόρμιο. Η

ποσότητα του πολυμερούς που παράγεται υπολογίζεται με βάση το βάρος του (mg) ανά γραμμάριο κυττάρων (wet cells' weight).

Το WT στο θρεπτικό M9 δεν μπορεί να συνθέσει το πολυμερές, όπως είναι φανερό και από την προηγούμενη παράγραφο (4.2). Συνεπώς, δεν έγινε προσπάθεια ποσοτικοποιήσης. Τα μεταλλάγματα παρουσίασαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Εικόνα 4.17) :



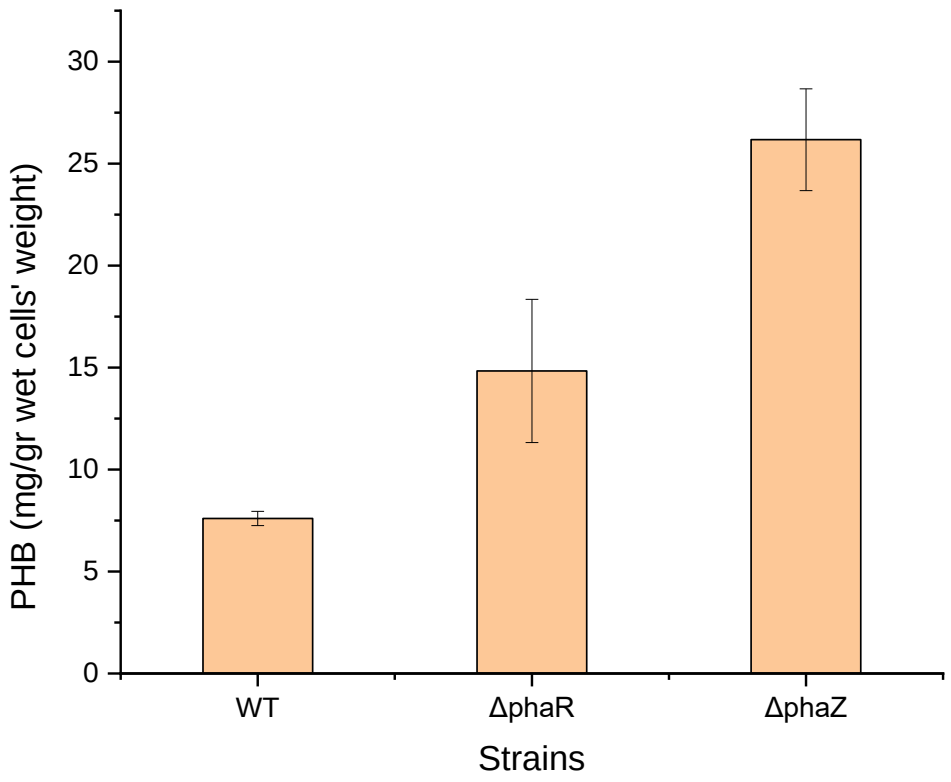
Εικόνα 4.7- Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης του PHB σε κύτταρα του WT, ΔphaR και ΔphaZ σε θρεπτικό μέσο M9.

Πίνακας 4.4- Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του PHB από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο M9.

Μετάλλαγμα	PHB (mg/gr wet cells' weight)
ΔphaR	9,50 ± 4,25
ΔphaZ	4,72 ± 1,78

Στο θρεπτικό μέσο M9 παρατηρείται ότι τα μεταλλάγματα έχουν την δυνατότητα παραγωγής PHB, με το ΔphaR να εμφανίζει μεγαλύτερη ποσότητα από το ΔphaZ.

Η ποσοτικοποίηση του PHB σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο M9-N παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 4.18)



Εικόνα 4.18- Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης του PHB σε κύτταρα του WT, ΔphaR και ΔphaZ σε θρεπτικό μέσο M9-N.

Πίνακας 4.5- Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του PHB από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο M9-N.

Βακτηριακό στέλεχος	PHB (mg/gr wet cells' weight)
WT	7,60 ± 0,35
ΔphaR	36,45 ± 8,62
ΔphaZ	26,17 ± 2,49

Από τη διαβάθμιση ζάχαρης υπήρχε η ένδειξη παραγωγής PHB και από τα τρία στελέχη σε θρεπτικό μέσο M9-N. Από την ποσοτικοποίηση προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχει βελτίωση της παραγωγής του πολυμερούς με την διαγραφή των γονιδίων. Το μετάλλαγμα ΔphaR παράγει μεγαλύτερη ποσότητα από το WT και το ΔphaZ (Πίνακας 4.5).

Πέρα από την συγκεκριμένη μέθοδο, απαραίτητη κρίνεται και η χρήση της HPLC για την ποσοτικοποίηση του πολυμερούς καθώς θα παρέχει αποτελέσματα μεγαλύτερης ακρίβειας.

4.5 Ταυτοποίηση του πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB)

Η ταυτοποίηση του πολυμερούς στην κάθε συνθήκη γίνεται με φασματοσκοπία NMR. Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία από τις πιο ενδεδειγμένες μεθόδους μελέτης των PHAs, καθώς προσφέρει πληροφορίες για την δομή του μονομερούς, τον τρόπο σύνδεσης και το μεταβολισμό τους.[75] Οι χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζει το PHB κατά την ^{1}H NMR φασματοσκοπία είναι τρεις (Πίνακας 4.7).[75]

Πίνακας 4.6- Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων του PHB κατά την φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Πρωτόνια	Χημική Μετατόπιση (ppm)
PHB (CH)	5,27
PHB (CH_2)	2,57
PHB (CH_3)	1,29

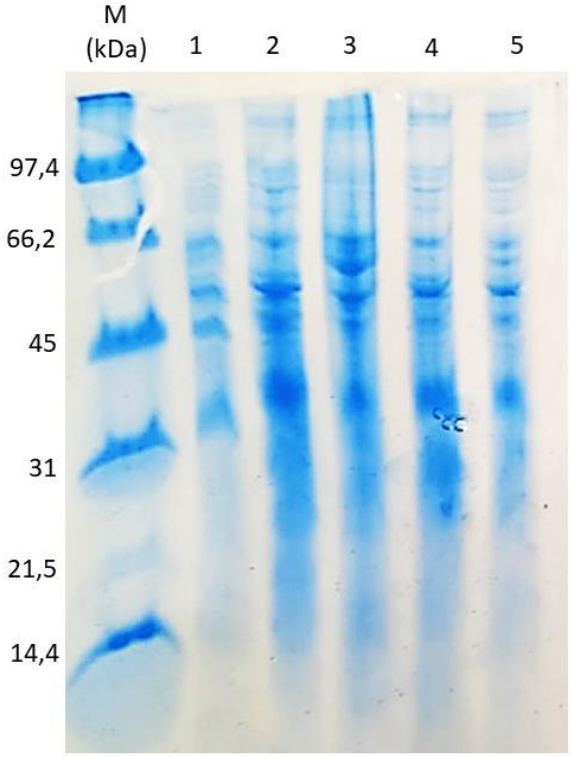
Πέρα από τις βιβλιογραφικές τιμές, οι χημικές μετατοπίσεις συγκρίθηκαν με το PHB που παράγεται κατά την κατανάλωση φαινόλης από το βακτήριο.[76] Τα φάσματα λήφθηκαν σε δείγματα που έχουν απομονωθεί, είτε μέσω της διαβάθμισης ζάχαρης, είτε μέσω της εκχύλισης με χλωροφόρμιο.

Στα φάσματα που λήφθηκαν παρατηρούνται οι δύο κύριες κορυφές, αυτή των πρωτονίων του μεθυλενίου (CH_2) και του μεθυνίου (CH). Η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου είναι δυσκολότερο να εντοπιστεί καθώς αλληλεπικαλύπτεται από άλλες κορυφές στην περιοχή που ανήκουν σε άλλες ενώσεις, όπως διάφορα λιπίδια. Το WT έχει την ικανότητα να παράγει PHB όταν αναπτύσσεται Το μετάλλαγμα ΔphaZ παράγει PHB κατά την καλλιέργεια του και στα δύο θρεπτικά μέσα, M9 και M9-N. Για το μετάλλαγμα ΔphaR ήταν επιτυχής η ταυτοποίηση του πολυμερούς σε θρεπτικό μέσο M9 αλλά όχι σε M9-N (Παράρτημα 3). Ωστόσο, με βάση τα υπόλοιπα αποτελέσματα, όπως η μικροσκοπία και η διαβάθμιση ζάχαρης αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη του πολυμερούς.

4.6 Μελέτη των πρωτεϊνών του καρβοσώματος στο οποίο οργανώνεται ο πολυ-(R)-3-υδροξυ-βουτυρικός εστέρας (PHB)

Αφού υπολογιστεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση σε κάθε κλάσμα που απομονώθηκε από την διαβάθμιση ζάχαρης, τα δείγματα προετοιμάστηκαν για SDS-PAGE. Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν η παρατήρηση τυχόν αλλαγών

που προκύπταν από την διαγραφή των γονιδίων και στα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα.



Εικόνα 4.8- SDS- PAGE 4-12% δειγμάτων PHB (1) WT M9-N, (2) ΔphaR M9, (3) ΔphaR M9-N, (4) ΔphaZ M9, (5) ΔphaZ M9-N.

Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα PHB και έχουν εντοπιστεί στο γενετικό υλικό του βακτηρίου είναι (Πίνακας 4.7):

Πίνακας 4.7- Πρωτεΐνες που βρίσκονται πάνω στα σφαιρίδια PHB.

Ονοματολογία	NCBI Reference Sequence	Γονίδιο	Μήκος γονιδίου (bp)	Μοριακό βάρος πρωτεΐνης (kDa)
Class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	WP_011911904.1	phaC	1701	63.9
Acetoacetyl-CoA reductase	WP_116617563.1	phbB	756	26.8
Polyhydroxyalkanoate synthesis repressor	WP_010563433.1	phaR	525	19.82
Poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase	WP_003458999.1	phaZ	858	31.57
Poly(hydroxyalkanoate) granule-associated protein (phasin)	WP_003458991.1	-	447	15.9
Phasin family protein	WP_003464225.1	-	567	19.88
Class II poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	WP_116617767.1	phaC	1683	62.601
Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein	WP_084342163.1	PhaF	783	26

Πρώτο βήμα ήταν η παρατήρηση του μοτίβου της πηκτής. Το μοτίβο των πρωτεϊνών δεν αλλάζει σε μεγάλο βαθμό. Σε επόμενο στάδιο, η πηκτή προετοιμάστηκε για MALDI-TOF MS/MS.

4.7 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών στα απομονωμένα σφαιρίδια PHB με MALDI-TOF MS/MS

Στην πηκτή της παραπάνω ενότητας (4.6) πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση με σκοπό την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και τον σχηματισμό των PHB. Μετά τη θρυψινοποίηση τα πεπτίδια αναλύθηκαν με MALDI-TOF MS/MS.

Δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση πρωτεϊνών σχετικές με τα PHB στα πεπτίδια από όλες τις συνθήκες και τα στελέχη. Παρόλα αυτά έγινε ταυτοποίηση αρκετών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, στο μεγαλύτερο ποσοστό, είναι μεταφορείς ή υποδοχείς είτε σχετίζονται με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Ωστόσο, σε παλαιότερες μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης που έγιναν στο στέλεχος έχουν ταυτοποιηθεί οι εξής πρωτεΐνες κατά την κατανάλωση διάφορων ρύπων (Πίνακας 4.8):

Πίνακας 4.8- Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω nLC-ESI-MS/MS.

Ονοματολογία	Uniprot ID	Γονίδιο	Φαινόλη	o-cresol	m-cresol	p-cresol
Class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	A0A385B2S5	phaC	✓	✓	✓	✓
Acetoacetyl-CoA reductase	A0A385B2Z5	phbB	✓	✓	✓	✓
Phasin family protein	A0A385B2N3	-	✓	✓	-	-

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

5.1 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκαν δύο γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *Pseudomonas* sp. phDV1, το ΔphaR και το ΔphaZ. Τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν συγκριτικά με το WT, όσον αφορά την ανάπτυξη τους και την ικανότητα τους να παράγουν πολυμερές PHB. Στο θρεπτικό μέσο M9 τα μεταλλάγματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανάπτυξη από το WT, ενώ στο μέσο με μειωμένο άζωτο όλα τα στελέχη έχουν παρόμοια ανάπτυξη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού με σκοπό την παρατήρηση παραγωγής του PHB τόσο στο WT, όσο και στα μεταλλάγματα. Το WT έχει την ικανότητα να παράγει PHB μόνο κατά την ανάπτυξη του σε θρεπτικό με μειωμένο άζωτο ενώ τα μεταλλάγματα μπορούν να παράγουν περισσότερο PHB σε όλες τις συνθήκες. Στη συνέχεια, απομονώθηκε το PHB από όλες τις συνθήκες και μελετήθηκε το πρωτεϊνικό του μοτίβο σε όλες τις συνθήκες. Παρατηρήθηκε ότι το μοτίβο δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Σε επόμενο στάδιο έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και τον σχηματισμό των PHB με τη χρήση MALDI-TOF MS/MS. Δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση καμίας πρωτεΐνης σχετικής με το μονοπάτι αυτό. Παρόλα αυτά ταυτοποιήθηκαν αρκετές μεμβρανικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης του πολυμερούς στην εκάστοτε συνθήκη που μπορεί να παραχθεί. Τα μεταλλάγματα έχουν την ικανότητα να παράγουν PHB σε μεγαλύτερη ποσότητα από το WT. Τέλος, έγινε ταυτοποίηση του PHB μέσω φασματοσκοπίας NMR.

5.2 Μελλοντικοί στόχοι

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προσφέρουν νέες προοπτικές για την μελέτη του μεταλλαγμάτων ΔphaR και ΔphaZ. Σε πρώτο στάδιο, μπορεί να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της ποσότητας PHB που παράγεται με την χρήση

αναλυτικών τεχνικών, όπως η υγρή και η αέρια χρωματογραφία. Επίσης, η απομάκρυνση του πλασμιδίου από τα μεταλλάγματα ολοκληρώνει την δημιουργία των knock-out (KO) μεταλλαγμάτων. Ακόμη, η μεταβολομική και η πρωτεομική ανάλυση θα συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών των μεταλλαγμάτων και ιδιαίτερα, πώς η απουσία του γονιδίου phaR, επηρεάζει το σχηματισμό του PHB. Επιπλέον, μεγάλο ενδιαφέρον θα αποτελούσε και η ανάπτυξη των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ρύπους ως πηγή άνθρακα. Οι ρύποι αυτοί περιλαμβάνουν την φαινόλη, καθώς και απόβλητα από κατεργασία στέμφυλων. Εφόσον η ανάπτυξη κριθεί επιτυχής, είναι εφικτή και η εξακρίβωση παραγωγής του πολυμερούς δεδομένου ότι οι πηγές αυτές άνθρακα προκαλούν στρες στο βακτήριο. Τέλος, μπορεί να επιτευχθεί περαιτέρω βελτιστοποίηση της παραγωγής του πολυμερούς με την χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας, όπως η δημιουργία ενός μεταλλάγματος στο οποίο απουσιάζουν και τα δύο γονίδια. Μία ενδιαφέρουσα πρόταση, ακόμη, αποτελεί η δημιουργία ενός μεταλλάγματος στην οποία υπάρχει η δυνατότητα υπερέκφρασης της συνθάσης του PHB.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Verma, R.; Vinoda, K. S.; Papireddy, M.; Gowda, A. N. S. Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. *Procedia Environ. Sci.* **2016**, *35*, 701–708. https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.069.

(2) Hahladakis, J. N.; Velis, C. A.; Weber, R.; Iacovidou, E.; Purnell, P. An Overview of Chemical Additives Present in Plastics: Migration, Release, Fate and Environmental Impact during Their Use, Disposal and Recycling. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *344*, 179–199. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014.

(3) Derraik, J. G. B. The Pollution of the Marine Environment by Plastic Debris: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *44* (9), 842–852. https://doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00220-5.

(4) Li, W. C.; Tse, H. F.; Fok, L. Plastic Waste in the Marine Environment: A Review of Sources, Occurrence and Effects. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566–567*, 333–349. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084.

(5) Okunola A, A.; Kehinde I, O.; Oluwaseun, A.; Olufiropo E, A. Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review. *J. Toxicol. Risk Assess.* **2019**, *5* (2). https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510021.

(6) Plastics Europe, G. M. R.; Conversio Market & Strategy GmbH. Plastics - the Facts 2019 https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data.

(7) Barnes, D. K. A.; Milner, P. Drifting Plastic and Its Consequences for Sessile Organism Dispersal in the Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* **2005**, *146* (4), 815–825. https://doi.org/10.1007/s00227-004-1474-8.

(8) Molenaar, R.; Chatterjee, S.; Kamphuis, B.; Segers-Nolten, I. M. J.; Claessens, M. M. A. E.; Blum, C. Nanoplastic Sizes and Numbers: Quantification by Single Particle Tracking. *Environ. Sci. Nano* **2021**, *8* (3), 723–730. https://doi.org/10.1039/D0EN00951B.

(9) Alomar, C.; Estarellas, F.; Deudero, S. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in Coastal Shallow Sediments, Spatial Variation and Preferential Grain Size. *Mar. Environ. Res.* **2016**, *115*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.01.005.

(10) Van Cauwenberghe, L.; Devriese, L.; Galgani, F.; Robbens, J.; Janssen, C. R. Microplastics in Sediments: A Review of Techniques, Occurrence and Effects. *Mar. Environ. Res.* **2015**, *111*, 5–17. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007.

(11) Ashter, S. A. New Developments in Bioplastics Engineering. In *Introduction to Bioplastics Engineering*; Elsevier, 2016; pp 251–274. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39396-6.00010-5.

(12) Shen, M.; Song, B.; Zeng, G.; Zhang, Y.; Huang, W.; Wen, X.; Tang, W. Are Biodegradable Plastics a Promising Solution to Solve the Global Plastic Pollution? *Environ. Pollut.* **2020**, *263* (Pt A), 114469. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469.

(13) Bioplastics https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/.

(14) Andreeßen, C.; Steinbüchel, A. Recent Developments in Non-Biodegradable Biopolymers: Precursors, Production Processes, and Future Perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (1), 143–157. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9483-6.

(15) Rhodes, C. J. Plastic Pollution and Potential Solutions. *Sci. Prog.* **2018**, *101* (3), 207–260. https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211.

(16) Filiciotto, L.; Rothenberg, G. Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts. *ChemSusChem* **2021**, *14* (1), 56–72. https://doi.org/10.1002/cssc.202002044.

(17) Barnard, G. N.; Sanders, J. K. M. The Poly-β-Hydroxybutyrate Granule in Vivo. A New Insight Based on NMR Spectroscopy of Whole Cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (6), 3286–3291. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94064-0.

(18) Guzik, M.; Witko, T.; Steinbüchel, A.; Wojnarowska, M.; Sołtysik, M.; Wawak, S. What Has Been Trending in the Research of Polyhydroxyalkanoates? A Systematic Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8* (September). https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00959.

(19) Acquavia, M.; Pascale, R.; Martelli, G.; Bondoni, M.; Bianco, G. Natural Polymeric Materials: A Solution to Plastic Pollution from the Agro-Food Sector. *Polymers (Basel).* **2021**, *13* (1), 158. https://doi.org/10.3390/polym13010158.

(20) Możejko-Ciesielska, J.; Kiewisz, R. Bacterial Polyhydroxyalkanoates: Still Fabulous? *Microbiol. Res.* **2016**, *192* (2016), 271–282. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010.

(21) Li, Z.; Yang, J.; Loh, X. J. Polyhydroxyalkanoates: Opening Doors for a Sustainable Future. *NPG Asia Mater.* **2016**, *8* (4), e265–e265. https://doi.org/10.1038/am.2016.48.

(22) Raza, Z. A.; Abid, S.; Banat, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, Production, Recent Developments and Applications. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2018**, *126* (October 2017), 45–56. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001.

(23) Luzier, W. D. Materials Derived from Biomass/Biodegradable Materials. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1992; Vol. 89, pp 839–842. https://doi.org/10.1073/pnas.89.3.839.

(24) Verlinden, R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D.; Radecka, I. Bacterial Synthesis of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102* (6), 1437–1449. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.

(25) González-Miró, M.; Rodríguez-Noda, L. M.; Fariñas-Medina, M.; Cedré-Marrero, B.; Madariaga-Zarza, S.; Zayas-Vignier, C.; Hernández-Cedeño, M.; Kleffmann, T.; García-Rivera, D.; Vérez-Bencomo, V.; Rehm, B. H. A. Bioengineered Polyester Beads Co-Displaying Protein and Carbohydrate-Based Antigens Induce Protective Immunity against Bacterial Infection. *Sci.*

Rep. **2018**, *8* (1), 1888. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20205-7.

(26) Lenz, R. W.; Marchessault, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 1–8. https://doi.org/10.1021/bm049700c.

(27) Muneer, F.; Rasul, I.; Azeem, F.; Siddique, M. H.; Zubair, M.; Nadeem, H. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *J. Polym. Environ.* **2020**, *28* (9), 2301–2323. https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1.

(28) Maestro, B.; Sanz, J. M. Polyhydroxyalkanoate-Associated Phasins as Phylogenetically Heterogeneous, Multipurpose Proteins. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10* (6), 1323–1337. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718.

(29) Shively, J. M. Prokaryote Inclusions: Descriptions and Discoveries. In *Inclusions in Prokaryotes*; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2006; pp 3–20. https://doi.org/10.1007/7171_001.

(30) Long, J.-Y.; Song, K.-L.; He, X.; Zhang, B.; Cui, X.-F.; Song, C.-F. Mutagenesis of PhaR, a Regulator Gene of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis of Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae Caused Pleiotropic Phenotype Changes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9* (December), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03046.

(31) Amadu, A. A.; Qiu, S.; Ge, S.; Addico, G. N. D.; Ameka, G. K.; Yu, Z.; Xia, W.; Abbew, A.-W.; Shao, D.; Champagne, P.; Wang, S. A Review of Biopolymer (Poly-β-Hydroxybutyrate) Synthesis in Microbes Cultivated on Wastewater. *Sci. Total Environ.* **2021**, *756*, 143729. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143729.

(32) Shrivastav, A.; Kim, H.-Y.; Kim, Y.-R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013* (January 2015), 581684. https://doi.org/10.1155/2013/581684.

(33) Moskowitz, G. J.; Merrick, J. M. Metabolism of Poly-β-Hydroxybutyrate. II.

Enzymic Synthesis of D-(-)-β-Hydroxybutyryl Coenzyme A by an Enoyl Hydrase from Rhodospirillum Rubrum. *Biochemistry* **1969**, *8* (7), 2748–2755. https://doi.org/10.1021/bi00835a009.

(34) Huijberts, G. N. M.; Eggink, G.; de Waard, P.; Huisman, G. W.; Witholt, B. Pseudomonas Putida KT2442 Cultivated on Glucose Accumulates Poly(3-Hydroxyalkanoates) Consisting of Saturated and Unsaturated Monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58* (2), 536–544. https://doi.org/10.1128/aem.58.2.536-544.1992.

(35) Rehm, B. H. A.; Krüger, N.; Steinbüchel, A. A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. The PhaG Gene from Pseudomonas Putida KT2440 Encodes a 3-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein-Coenzyme a Transferase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (37), 24044–24051. https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24044.

(36) Reddy, C. S. .; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V. . Polyhydroxyalkanoates: An Overview. *Bioresour. Technol.* **2003**, *87* (2), 137–146. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2.

(37) Huisman, G. W.; de Leeuw, O.; Eggink, G.; Witholt, B. Synthesis of Poly-3-Hydroxyalkanoates Is a Common Feature of Fluorescent Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55* (8), 1949–1954. https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1949-1954.1989.

(38) Hokamura, A.; Fujino, K.; Isoda, Y.; Arizono, K.; Shiratsuchi, H.; Matsusaki, H. Characterization and Identification of the Proteins Bound to Two Types of Polyhydroxyalkanoate Granules in Pseudomonas SP. 61-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, *79* (8), 1369–1377. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1023250.

(39) De Eugenio, L. I.; Escapa, I. F.; Morales, V.; Dinjaski, N.; Galán, B.; García, J. L.; Prieto, M. A. The Turnover of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates in Pseudomonas Putida KT2442 and the Fundamental Role of PhaZ Depolymerase for the Metabolic Balance. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12* (1), 207–221. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02061.x.

(40) Madison, L. L.; Huisman, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63* (1), 21–53. https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999.

(41) SN, B.; G, S. Need for Bioplastics and Role of Biopolymer PHB: A Short Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2016**, *07* (02). https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000272.

(42) Heo, K.; Yoon, J.; Jin, K. S.; Jin, S.; Sato, H.; Ozaki, Y.; Satkowski, M. M.; Noda, I.; Ree, M. Structural Evolution in Microbial Polyesters. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (15), 4571–4582. https://doi.org/10.1021/jp711136x.

(43) Hankermeyer, C. R.; Tjeerdema, R. S. Polyhydroxybutyrate: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *159*, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1496-0_1.

(44) Ren, Q.; Grubelnik, A.; Hoerler, M.; Ruth, K.; Hartmann, R.; Felber, H.; Zinn, M. Bacterial Poly(Hydroxyalkanoates) as a Source of Chiral Hydroxyalkanoic Acids. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 2290–2298. https://doi.org/10.1021/bm050187s.

(45) Sabarinathan, D.; Chandrika, S. P.; Venkatraman, P.; Easwaran, M.; Sureka, C. S.; Preethi, K. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) from Pseudomonas Plecoglossicida and Its Application towards Cancer Detection. *Informatics Med. Unlocked* **2018**, *11* (March), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.009.

(46) Polymenakou, P. N.; Stephanou, E. G. Effect of Temperature and Additional Carbon Sources on Phenol Degradation by an Indigenous Soil Pseudomonad. *Biodegradation* **2005**, *16* (5), 403–413. https://doi.org/10.1007/s10532-004-3333-1.

(47) Xie, H.; Valsamidis, G.; Mathioudaki, E.; Tsiotis, G. Complete Genome Sequence of Pseudomonas Sp. Strain PhDV1, an Isolate Capable of Efficient Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Microbiol. Resour. Announc.* **2019**, *8* (2), 18–19. https://doi.org/10.1128/MRA.01171-18.

(48) Tsirogianni, E.; Aivaliotis, M.; Papasotiriou, D. G.; Karas, M.; Tsiotis, G.

Identification of Inducible Protein Complexes in the Phenol Degrader Pseudomonas Sp. Strain PhDV1 by Blue Native Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Amino Acids* **2006**, *30* (1), 63–72. https://doi.org/10.1007/s00726-005-0219-4.

(49) Nai-kun, Z. H. S.; Xing, Z. Gene Knockout Technology and Its Application in Microbial Breeding. *Biol. Res.* **2010**, No. January.

(50) Galli-Taliadoros, L. A.; Sedgwick, J. D.; Wood, S. A.; Körner, H. Gene Knock-out Technology: A Methodological Overview for the Interested Novice. *J. Immunol. Methods* **1995**, *181* (1), 1–15. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00017-5.

(51) Mitrikeski, P. T. Gene Knockout: The Technology of Gene Targeting. *Third Annu. Conf. Biotechnol. Transplant.* **2012**, No. September 2012.

(52) Li, X.; Heyer, W.-D. Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance. *Cell Res.* **2008**, *18* (1), 99–113. https://doi.org/10.1038/cr.2008.1.

(53) González-Torres, P.; Rodríguez-Mateos, F.; Antón, J.; Gabaldón, T. Impact of Homologous Recombination on the Evolution of Prokaryotic Core Genomes. *MBio* **2019**, *10* (1). https://doi.org/10.1128/mBio.02494-18.

(54) Jasin, M.; Rothstein, R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5* (11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740.

(55) Dillingham, M. S.; Kowalczykowski, S. C. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72* (4), 642–671. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-08.

(56) Little, J. W. An Exonuclease Induced by Bacteriophage λ. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (4), 679–686. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96258-7.

(57) Li, Z.; Karakousis, G.; Chiu, S. K.; Reddy, G.; Radding, C. M. The Beta Protein of Phage λ Promotes Strand Exchange. *J. Mol. Biol.* **1998**, *276* (4), 733–744.

https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1572.

(58) Murphy, K. C. Lambda Gam Protein Inhibits the Helicase and Chi-Stimulated Recombination Activities of Escherichia Coli RecBCD Enzyme. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (18), 5808–5821. https://doi.org/10.1128/jb.173.18.5808-5821.1991.

(59) Fels, U.; Gevaert, K.; Van Damme, P. Bacterial Genetic Engineering by Means of Recombineering for Reverse Genetics. *Front. Microbiol.* **2020**, *11* (September), 1–19. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.548410.

(60) Nakashima, N.; Miyazaki, K. Bacterial Cellular Engineering by Genome Editing and Gene Silencing. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (2), 2773–2793. https://doi.org/10.3390/ijms15022773.

(61) Wah Tang, P.; San Chua, P.; Kee Chong, S.; Saberi Mohamad, M.; Wen Choon, Y.; Deris, S.; Omatu, S.; Manuel Corchado, J.; Howe Chan, W.; Abdul Rahim, R. A Review of Gene Knockout Strategies for Microbial Cells. *Recent Pat. Biotechnol.* **2016**, *9* (3), 176–197. https://doi.org/10.2174/1872208310666160517115047.

(62) “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

(63) Trevors, J. Plasmid Curing in Bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *32* (3–4), 149–157. https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90286-7.

(64) Serdar, C. M.; Gibson, D. T.; Munnecke, D. M.; Lancaster, J. H. Plasmid Involvement in Parathion Hydrolysis by Pseudomonas Diminuta. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44* (1), 246–249. https://doi.org/10.1128/aem.44.1.246-249.1982.

(65) Boronin, A. M.; Naumova, R. P.; Grishchenkov, V. G.; Ilijinskaya, O. N. Plasmids Specifying ϵ-Caprolactam Degradation in Pseudomonas Strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, *22* (3), 167–170. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb00719.x.

(66) Trevors, J. T. Bacterial Plasmid Isolation and Purification. *J. Microbiol. Methods*

1985, *3* (5–6), 259–271. https://doi.org/10.1016/0167-7012(85)90008-9.

(67) Hussien, M. A.; Adam, M. E.; Shantier, S. W.; Garalnabi, E. A. E.; Gadkariem, E. A. Development and Validation of Colorimetric Method for the Quantitative Analysis of Kanamycin in Bulk and Pharmaceutical Formulation. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7* (4), 163–167. https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70424.

(68) Foye, W. O. Dictionary of Organic Compounds, 5th Ed. Edited by J. Buckingham, J. D. G. Cadogan, R. A. Raphael, C. W. Rees, and an International Advisory Board. Chapman and Hall, 733 Third Avenue, New York, NY 10017. 1982. 7766 Pp. 28 × 20.5 Cm. Price $1950.00 (Canada. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72* (5), 582–583. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600720537.

(69) Li, R.; Jiang, Y.; Wang, X.; Yang, J.; Gao, Y.; Zi, X.; Zhang, X.; Gao, H.; Hu, N. Psychrotrophic Pseudomonas Mandelii CBS-1 Produces High Levels of Poly-β-Hydroxybutyrate. *Springerplus* **2013**, *2* (1), 1–7. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-335.

(70) Alves, L. P. S.; Almeida, A. T.; Cruz, L. M.; Pedrosa, F. O.; de Souza, E. M.; Chubatsu, L. S.; Müller-Santos, M.; Valdameri, G. A Simple and Efficient Method for Poly-3-Hydroxybutyrate Quantification in Diazotrophic Bacteria within 5 Minutes Using Flow Cytometry. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2017**, *50* (1), e5492. https://doi.org/10.1590/1414-431x20165492.

(71) Matsusaki, H.; Manji, S.; Taguchi, K.; Kato, M.; Fukui, T.; Doi, Y. Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in Pseudomonas Sp. Strain 61-3. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (24), 6459–6467. https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6459-6467.1998.

(72) Kato, M.; Bao, H. J.; Kang, C. K.; Fukui, T.; Doi, Y. Production of a Novel Copolyester of 3-Hydroxybutyric Acid and Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoic Acids by Pseudomonas Sp. 61-3 from Sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45* (3), 363–370. https://doi.org/10.1007/s002530050697.

(73) Belal, E. B. Production of Poly-&beta-Hydroxybutyric Acid (PHB) by Rhizobium Elti and Pseudomonas Stutzeri. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2013**, *5* (6), 273–284. https://doi.org/10.19026/crjbs.5.5429.

(74) Tirapelle, E. F.; Müller-Santos, M.; Tadra-Sfeir, M. Z.; Kadowaki, M. A. S.; Steffens, M. B. R.; Monteiro, R. A.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Chubatsu, L. S. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from Herbaspirillum Seropedicae SmR1 - Old Partners, New Players. *PLoS One* **2013**, *8* (9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075066.

(75) Biradar, G. G.; Shivasharana, C. T.; Kaliwal, B. B. Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) Produced by Novel Bacterium Lysinibacillus Sphaericus BBKGBS6 Isolated From Soil. *J. Polym. Environ.* **2018**, *26* (4), 1685–1701. https://doi.org/10.1007/s10924-017-1054-x.

(76) Kanavaki, I.; Drakonaki, A.; Geladas, E. D.; Spyros, A.; Xie, H.; Tsiotis, G. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in Pseudomonas Sp. PhDV1 Strain Grown on Phenol as Carbon Sources. *Microorganisms* **2021**, *9* (8), 1636. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636.

(77) Sharan, S. K.; Thomason, L. C.; Kuznetsov, S. G.; Court, D. L. Recombineering: A Homologous Recombination-Based Method of Genetic Engineering. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (2), 206–223. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.227.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Α. Αλληλουχίες

Υπόστρωμα DNA για την δημιουργία του μεταλλάγματος ΔphaR

5'-
GGTGGTCAGGAAGAGGTAGGCGTAGGCATACCGGGCACTCTCCAGGTAGGCATCGGTGCG
GGCCTCCGCCGCCATCACCTTGCCGCCGTCCTGGGCTTCCTTCAGCCACAGCTCGGCCAG
CGTGAAGCCGCTGTTCGTCACGCAACCCCGTTGTGCTGTCCAGCGCCTCGCGGCAGGCCG
GCAGGTCAGCAAGGCAGCGCTTCTCATCACTGCCCACGACCTGCAGGGCAGCAACCGCCG
AAGCACTGAGGTTGCCGGTGGTCAACACATCACCGCGGCGCTGGGCCAGGTAATCATTGT
TGCTGACCGCCGTGACCTTGACCCCTGCACACCCGGCCAGCACTAGAACCAGCAGGACTG
ACGGAAAGCAACGCAGTGAACGACTCACAGTGAACGAAGTGGTGGTATAAGTTGAAGAGC
TCACAATCGGTAGATACCCATTACGTCGGAAATGGCGCGGATCATCACGATCCGCATATG
GTTCAGACGCCATCTCGACTGATACAGCGCGAAGTGATTCTGCTGGCGGTAGATGCCAGC
CCCAAGTAAGTATCTGCGAATATCTTACGGCCTTATATCCGAAAAACTAAAACAACCAAT
TATCCCCGCATTAACAATATATCTACACCGGGAGAGGCCTGAGATAATACCTGCCACAGA
CACTCCGACTCATAATGAGACGCTACACATGTCCGATGACGGCCACAGAGCCCCAGAGTC
CCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGC
GATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATC
ACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGAT
GAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGT
CACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGG
CGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCG
AGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATC
AAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAG
GTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGC
TTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAG
CCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAG
AACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG
TTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAA
TCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCTTGATCC
CCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCC
AACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCGTGACACGGCCGCCCTGCC
TTACTTGCGCCCGCCCGCAGCCTTGCCGGCTTCACGAGTGGCCTGACCGGCCGCGGAAGC
GGCGGCAGCGATGCCGTTCTCAGCGATCTCGGCTGCCTGCTTGGCGGCTTTCTGCGCGCT
TTCATAGACACTGCCGGCGCTTTCCAGTGCCGACTTGAGCACGGCTACCGCCGGTTCCGC

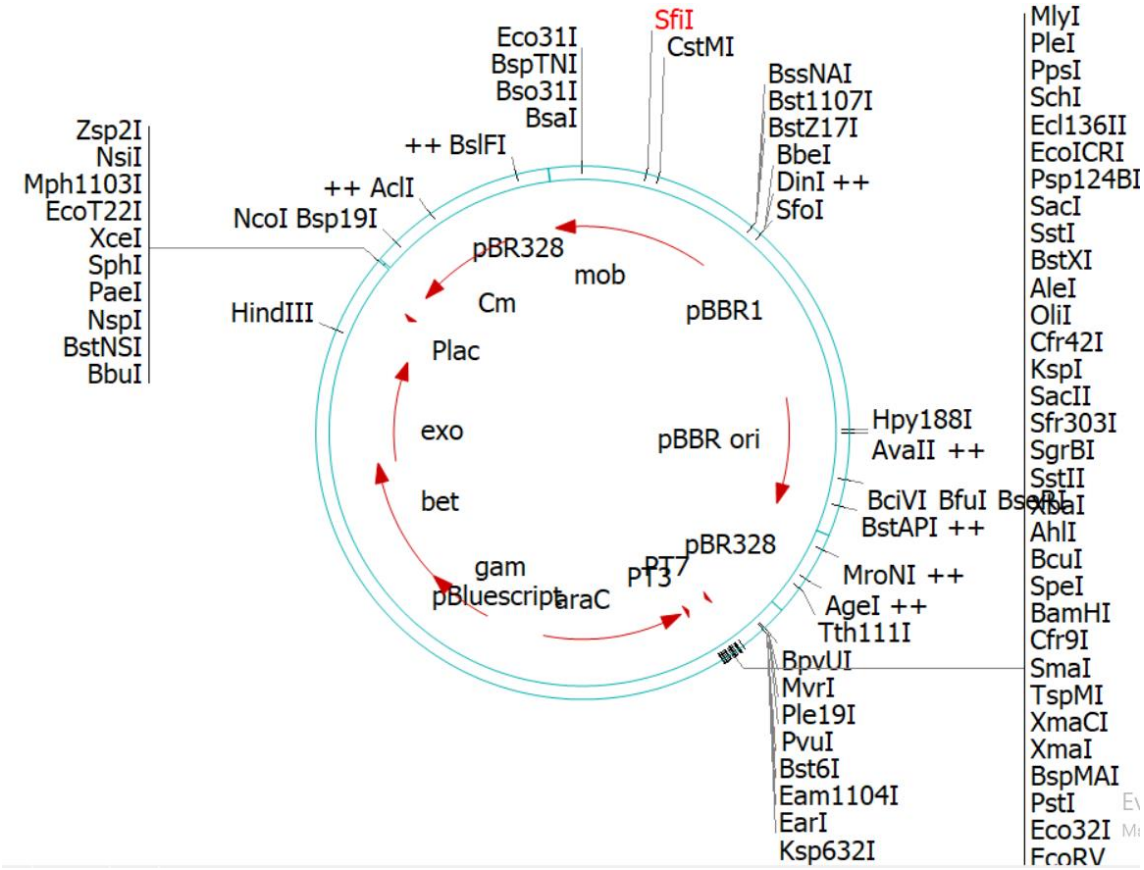
ACCCGCCGGGGCGTTTTTGGCGATAACGTCCACCAGTTCCCGCACCTGCTTGGTGCCCGC
CTCGACCTGGCGCTCGGCAAGCTTGGCGATATCCGCCTGCGTGCTGGAGACCAGATCGTA
CACCTCGCGATTGAACTCCAGCAGGCGCTCCGCCTGGGCTGCCGGCTGAGCGAAGGACGC
CTGCAACTCGGCGAAGGCCTGCGGGTCACGCACTGACAGCAGCTTGCGCAAGCTGTCGAA
CTGCTCGCCACTGGAAGCGCGTAGCGCCTTGAATTGCAACTGACTGAGCTGCTCGACGCT
CTCGAATACCTTGCC-3′

Υπόστρωμα DNA για την δημιουργία του μεταλλάγματος ΔphaZ

5′-
GGCACCACCGACCACATCACGCCATGGGACTCCTGCTACAAGTCGGCGCACCTGTTCGGC
GGCAAATGCGAGTTCGTGCTGTCCAACAGCGGCCATATCCAAAGCATTCTCAACCCGCCG
GGCAACCCCAAGGCGCGCTACATGACCAATAGCGCGATGCCGCTGGACCCGAAAGCCTGG
CAGGAAAGCTCGACCAAGCACGCCGACTCCTGGTGGCTACATTGGCAGACGTGGCTGAGC
GAACGCTCGGGCGAAACCAAGAATGCTCCACGGGCGCTGGGCAACAAGAAATTCCCGGCT
GGCGAAGCCGCACCAGGCACCTATGTGCACGAACGCTGATTTTCAGTCTCAACCGCAGTG
GCACCGGGAAGTGCCGCACGCCACGACGGTCTGACCGGCGTGGAACCAGGTAACCCCTGG
TAACCCTGGAGGCGGCCCGGACGGCCCTCTCCAGCGCTCAACTCCACAGGGGCTGCGCCT
ATGCCGCAACCATTCGTATTCCAGAGTCCCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGA
AGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCC
ATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGT
CCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGA
TATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCG
CCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCAT
CCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTT
GGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCATCAGCCA
TGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTT
CGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAG
GAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTCAGGG
CACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACA
CGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCA
CCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTC
ATCCTGTCTCTTGATCAGATCTTGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAG
CCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATT
CCGGTTCGCACCATTGCGCCAGCATTGACCGCACCATCTTGGTGCGCAATGTTCTGCGTG
CTCGACAAAGGGGCCGCTCAAGGCCTCTTGTTTTTCGACGCGGCGCTCTGGAATGCACTT
CCCGCGCGCCTGGTACAGGGCTTGCTGCACACCCTGCACAAGTACAAGGTGCGCGCCGAG
GCAGTCCGCGCCATGAAAGTCTCTAGACGGTTTGACGACGGAGTGCTGCCCCATGCGAGA
CAAGTCGAACCCGGCTTCACTGCCGGCACCCGCCAGTTTCATGAACGCCCAGAGCGCGGT

GGTGGGCGTGCGCGGTCGCGATCTGCTGTCCACCATGCGCCTGCTGGCTGCCCAGGGCCT
GAAGAATCCGGTGCGCAGTGGACGTCATCTGCTGGCCTTCGGCGGCCAGCTTGGCCGGGT
GCTGCTCGGCGATACCCTGCACAAGGTCAATCCGCAGGATGCGCGCTTCGCTGATCCGAC
CTGGCACCTCAATCCCTTCTACCGCCGCA -3′

Πλασμίδιο pMK_Reds



B. Αποτελέσματα αλληλούχισης

Αλληλούχιση πλασμιδίου pMini_ΔphaR με κόκκινο τα γονίδια ενδιαφέροντος)

```
           1                                                                                                    100
pMini-V2-D CTGATAATAA TTAATTAAGA CGTCAGAATT CTCGAGGCGG CCGCATGTGC GTCTCCCTAT AGTGAGTCGT ATTAATTTCG CGGGCGGAAC CCCTATTTGT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           101                                                                                                  200
pMini-V2-D TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           201                                                                                                  300
pMini-V2-D ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           301                                                                                                  400
pMini-V2-D GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTC CAATGATGAG CACTTTTAAA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           401                                                                                                  500
pMini-V2-D GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           501                                                                                                  600
pMini-V2-D CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           601                                                                                                  700
pMini-V2-D AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           701                                                                                                  800
pMini-V2-D CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAACTA TTAACTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           801                                                                                                  900
pMini-V2-D TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
           901                                                                                                                1000
pMini-V2-D TGGATCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1001                                                                                                               1100
pMini-V2-D AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACTTCATT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1101                                                                                                               1200
pMini-V2-D TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1201                                                                                                               1300
pMini-V2-D AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAAACCA CCGCTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1301                                                                                                               1400
pMini-V2-D CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTTCTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1401                                                                                                               1500
pMini-V2-D AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1501                                                                                                               1600
pMini-V2-D ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1601                                                                                                               1700
pMini-V2-D CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1701                                                                                                               1800
pMini-V2-D TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GGCGGAGCCT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1801                                                                                                               1900
pMini-V2-D ATGGAAAAAC GCCAGCAATG CGGCCTTTTT ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC TCACATGTTC TTTCCTGCGT TATCCCCTGA TTCTGTGGAT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1901                                                                                                               2000
pMini-V2-D AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG CGCCCAATAC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           2001                                                                                                               2100
pMini-V2-D GCAAACCGCC TCTCCCCGCG CGTTGGCCGA TTCATTAATG CAGCCGGTTC AGACAGGATA AAGAGGAACG CAGAATGTTA GACAACACCC GCTTACGCAT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           2101                                                                                                               2200
pMini-V2-D AGCTATTCAG AAATCAGGCC GTTTAAGCGA TGATTCACGA GAATTGCTGG CCCGCTGCGG CATAAAAATT AATTTACACA CTCAGCGCTG ATGAATCCCC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           2201                                                                                                               2300
pMini-V2-D TAATGATTTT GGTAAAAATC ATTAAGTTAA GGTGGACACA CATCTTGTCA TATGATTAAA TGGTTTCGCG AAAAATCAAT AATCAGACAA CAAGATGTGC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           2301                                                                                                               2400
pMini-V2-D GAACTCGATA TTTTACACGA CTCTCTTTAC CAATTCTGCC CCGAATTACA CTTAAAACGA CTCAACAGCT TAACGTTGGC TTGCCACGCA TTACTTGACT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           2401                                                                                                               2500
pMini-V2-D GTAAAACTCT CACTCTTACC GAACTTGGCC GTAACCTGCC AACCAAAGCG AGAACAAAAC ATAACATCAA ACGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA
         1                                                                    CAAAATCAA -CGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .cAAaATCAA .CGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA

           2501                                                                                                               2600
pMini-V2-D CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGATGG TGGTCAGGAA
         1 CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGATGG TGGTCAGGAA
 Consensus CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGATGG TGGTCAGGAA

           2601                                                                                                               2700
pMini-V2-D GAGGTAGGCG TAGGCATACC GGGCACTCTC CAGGTAGGCA TCGGTGCGGG CCTCCGCCGC CATCACCTTG CCGCCGTCCT GGGCTTCCTT CAGCCACAGC
         1 GAGGTAGGCG TAGGCATACC GGGCACTCTC CAGGTAGGCA TCGGTGCGGG CCTCCGCCGC CATCACCTTG CCGCCGTCCT GGGCTTCCTT CAGCCACAGC
 Consensus GAGGTAGGCG TAGGCATACC GGGCACTCTC CAGGTAGGCA TCGGTGCGGG CCTCCGCCGC CATCACCTTG CCGCCGTCCT GGGCTTCCTT CAGCCACAGC
```

```
           2701                                                                                                                                2800
pMini-V2-D TCGGCCAGCG TGGAAAGCCG CTGTTCGTCA CGCAACCCCG TTGTGCTGTC CAGCGCCTCG CGGCAGGCCG GCAGGTCAGC AAGGCAGCGC TTCTCATCAC
         1 TCGGCCAGCG TGGAAAGCCG CTGTTCGTCA CGCAACCCCG TTGTGCTGTC CAGCGCCTCG CGGCAGGCCG GCAGGTCAGC AAGGCAGCGC TTCTCATCAC
 Consensus TCGGCCAGCG TGGAAAGCCG CTGTTCGTCA CGCAACCCCG TTGTGCTGTC CAGCGCCTCG CGGCAGGCCG GCAGGTCAGC AAGGCAGCGC TTCTCATCAC

           2801                                                                                                                                2900
pMini-V2-D TGCCCACGAC CTGCAGGGCA GCAACCGCCG AAGCACTGAG GTTGCCGGTG GTCAACACAT CACCGCGGCG CTGGGCCAGG TAATCATTGT TGCTGACCGC
         1 TGCCCACGAC CTGCAGGGCA GCAACCGCCG AAGCACTGAG GTTGCCGGTG GTCAACACAT CACCGCGGCG CTGGGCCAGG TAATCATTGT TGCTGACCGC
 Consensus TGCCCACGAC CTGCAGGGCA GCAACCGCCG AAGCACTGAG GTTGCCGGTG GTCAACACAT CACCGCGGCG CTGGGCCAGG TAATCATTGT TGCTGACCGC

           2901                                                                                                                                3000
pMini-V2-D CGTGACCTTG ACCCCTGCAC ACCCGGCCAG CACTAGAACC AGCAGGACTG ACGGAAAGCA ACGCAGTGAA CGACTCACAG TGAACGAAGT GGTGGTATAA
         1 CGTGACCTTG ACCCCTGCAC ACCCGGCCAG CACTAGAACC AGCAGGACTG ACGGAAAGCA ACGCAGTGAA CGACTCACAG TGAACGAAGT GGTGGTATAA
 Consensus CGTGACCTTG ACCCCTGCAC ACCCGGCCAG CACTAGAACC AGCAGGACTG ACGGAAAGCA ACGCAGTGAA CGACTCACAG TGAACGAAGT GGTGGTATAA

           3001                                                                                                                                3100
pMini-V2-D GTTGAAGAGC TCACAATCGG TAGATACCCA TTACGTCGGA AATGGCGCGG ATCATCACGA TCCGCATATG GTTCAGACGC CATCTCGACT GATACAGCGC
         1 GTTGAAGAGC TCACAATCGG TAGATACCCA TTACGTCGGA AATGGCGCGG ATCATCACGA TCCGCATATG GTTCAGACGC CATCTCGACT GATACAGCGC
 Consensus GTTGAAGAGC TCACAATCGG TAGATACCCA TTACGTCGGA AATGGCGCGG ATCATCACGA TCCGCATATG GTTCAGACGC CATCTCGACT GATACAGCGC

           3101                                                                                                                                3200
pMini-V2-D GAAGTGATTC TGCTGGCGGT AGATGCCAGC CCCAAGTAAG TATCTGCGAA TATCTTACGG CCTTATATCC GAAAAACTAA AACAACCAAT TATCCCCGCA
         1 GAAGTGATTC TGCTGGCGGT AGATGCCAGC CCCAAGTAAG TATCTGCGAA TATCTTACGG CCTTATATCC GAAAAACTAA AACAACCAAT TATCCCCGCA
 Consensus GAAGTGATTC TGCTGGCGGT AGATGCCAGC CCCAAGTAAG TATCTGCGAA TATCTTACGG CCTTATATCC GAAAAACTAA AACAACCAAT TATCCCCGCA

           3201                                                                                                                                3300
pMini-V2-D TTAACAATAT ATCTACACCG GGAGAGGCCT GAGATAATAC CTGCCACAGA CACTCCGACT CATAATGAGA CGCTACACAT GTCCGATGAC GGCCACAGAG
         1 TTAACAATAT ATCTACACCG GGAGAGGCCT GAGATAATAC CTGCCACAGA CACTCCGACT CATAATGAGA CGCTACACAT GTCCGATGAC GGCCACAGAG
 Consensus TTAACAATAT ATCTACACCG GGAGAGGCCT GAGATAATAC CTGCCACAGA CACTCCGACT CATAATGAGA CGCTACACAT GTCCGATGAC GGCCACAGAG

           3301                                                                                                                                3400
pMini-V2-D CCCCAGAGTC CCGTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA GAAGGCGATG CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC
         1 CCCCAGAGTC CCGTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA GAAGGCGATG CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC
 Consensus CCCCAGAGTC CCGTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA GAAGGCGATG CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC

           3401                                                                                                                                3500
pMini-V2-D CCATTCGCCG CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG GTCCGCCACA CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA
         1 CCATTCGCCG CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG GTCCGCCACA CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA
 Consensus CCATTCGCCG CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG GTCCGCCACA CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA

           3501                                                                                                                                3600
pMini-V2-D AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG CGCCTTGAGC CTGGCGAACA
         1 AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG CGCCTTGAGC CTGGCGAACA
 Consensus AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG CGCCTTGAGC CTGGCGAACA
```

```
           3601                                                                                                                3700
pMini-V2-D GTTCGGCTGG CGCGAGCCCC TGATGCTCTT CGTCCAGATC ATCCTGATCG ACAAGACCGG CTTCCATCCG AGTACGTGCT CGCTCGATGC GATGTTTCGC
         1 GTTCGGCTGG GGCGAGCCCC TGATGCTCTT CG
 Consensus GTTCGGCTGG cGCGAGCCCC TGATGCTCTT CG........ .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           3701                                                                                                                3800
pMini-V2-D TTGGTGGTCG AATGGGCAGG TAGCCGGATC AAGCGTATGC AGCCGCCGCA TTGCATCAGC CATGATGGAT ACTTTCTCGG CAGGAGCAAG GTGAGATGAC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           3801                                                                                                                3900
pMini-V2-D AGGAGATCCT GCCCCGGCAC TTCGCCCAAT AGCAGCCAGT CCCTTCCCGC TTCAGTGACA ACGTCGAGCA CAGCTGCGCA AGGAACGCCC GTCGTGGCCA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           3901                                                                                                                4000
pMini-V2-D GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCCTGCA GTTCATTCAG GGCACCGGAC AGGTCGGTCT TGACAAAAAG AACCGGGCGC CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4001                                                                                                                4100
pMini-V2-D CACGGCGGCA TCAGAGCAGC CGATTGTCTG TTGTGCCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC CACCCAAGCG GCCGGAGAAC CTGCGTGCAA TCCATCTTGT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4101                                                                                                                4200
pMini-V2-D TCAATCATGC GAAACGATCC TCATCCTGTC TCTTGATCAG ATCTTGATCC CCTGCGCCAT CAGATCCTTG GCGGCAAGAA AGCCATCCAG TTTACTTTGC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4201                                                                                                                4300
pMini-V2-D AGGGCTTCCC AACCTTACCA GAGGGCGCCC CAGCTGGCAA TTCCGGTTCG CGTGACACGG CCGCCCTGCC TTACTTGCGC CCGCCCGCAG CCTTGCCGGC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4301                                                                                                                4400
pMini-V2-D TTCACGAGTG GCCTGACCGG CCGCGGAAGC GGCGGCAGCG ATGCCGTTCT CAGCGATCTC GGCTGCCTGC TTGGCGGCTT TCTGCGCGCT TTCATAGACA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4401                                                                                                                4500
pMini-V2-D CTGCCGGCGC TTTCCAGTGC CGACTTGAGC ACGGCTACCG CCGGTTCCGC ACCCGCCGGG GCGTTTTTGG CGATAACGTC CACCAGTTCC CGCACCTGCT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
            3901                                                                                                   4000
pMini-V2-D  GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCCTGCA GTTCATTCAG GGCACCGGAC AGGTCGGTCT TGACAAAAAG AACCGGGCGC CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4001                                                                                                   4100
pMini-V2-D  CACGGCGGCA TCAGAGCAGC CGATTGTCTG TTGTGCCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC CACCCAAGCG GCCGGAGAAC CTGCGTGCAA TCCATCTTGT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4101                                                                                                   4200
pMini-V2-D  TCAATCATGC GAAACGATCC TCATCCTGTC TCTTGATCAG ATCTTGATCC CCTGCGCCAT CAGATCCTTG GCGGCAAGAA AGCCATCCAG TTTACTTTGC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4201                                                                                                   4300
pMini-V2-D  AGGGCTTCCC AACCTTACCA GAGGGCGCCC CAGCTGGCAA TTCCGGTTCG CGTGACACGG CCGCCCTGCC TTACTTGCGC CCGCCCGCAG CCTTGCCGGC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4301                                                                                                   4400
pMini-V2-D  TTCACGAGTG GCCTGACCGG CCGCGGAAGC GGCGGCAGCG ATGCCGTTCT CAGCGATCTC GGCTGCCTGC TTGGCGGCTT TCTGCGCGCT TTCATAGACA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4401                                                                                                   4500
pMini-V2-D  CTGCCGGCGC TTTCCAGTGC CGACTTGAGC ACGGCTACCG CCGGTTCCGC ACCCGCCGGG GCGTTTTTGG CGATAACGTC CACCAGTTCC CGCACCTGCT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4501                                                                                                   4600
pMini-V2-D  TGGTGCCCGC CTCGACCTGG CGCTCGGCAA GCTTGGCGAT ATCCGCCTGC GTGCTGGAGA CCAGATCGTA CACCTCGCGA TTGAACTCCA GCAGGCGCTC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4601                                                                                                   4700
pMini-V2-D  CGCCTGGGCT GCCGGCTGAG CGAAGGACGC CTGCAACTCG GCGAAGGCCT GCGGGTCACG CACTGACAGC AGCTTGCGCA AGCTGTCGAA CTGCTCGCCA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            4701                                                        4765
pMini-V2-D  CTGGAAGCGC GTAGCGCCTT GAATTGCAAC TGACTGAGCT GCTCGACGCT CTCGAATACC TTGCC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....
```

Αλληλούχιση πλασμιδίου pMini_ΔphaZ (με κόκκινο τα γονίδια ενδιαφέροντος)

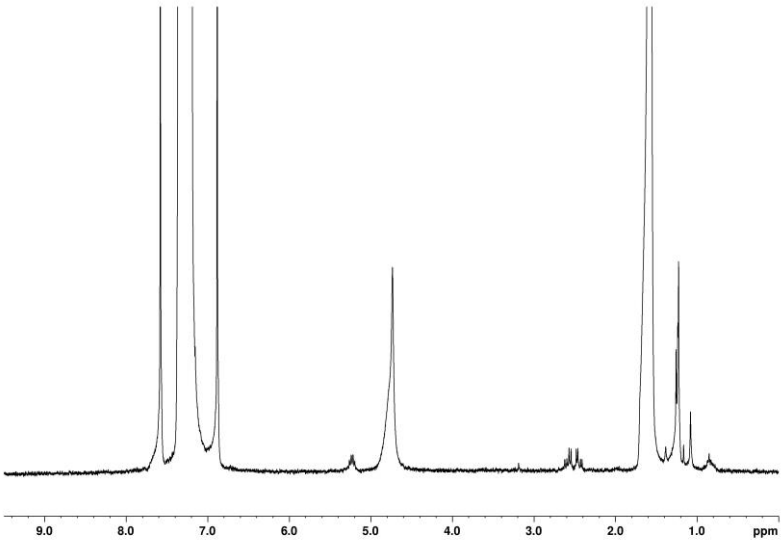
```
            1                                                                                                   100
pMini_Delp  CTGATAATAA TTAATTAAGA CGTCAGAATT CTCGAGGCGG CCGCATGTGC GTCTCCCTAT AGTGAGTCGT ATTAATTTCG CGGGCGGAAC CCCTATTTGT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            101                                                                                                 200
pMini_Delp  TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            201                                                                                                 300
pMini_Delp  ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            301                                                                                                 400
pMini_Delp  GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTC CAATGATGAG CACTTTTAAA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            401                                                                                                 500
pMini_Delp  GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            501                                                                                                 600
pMini_Delp  CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            601                                                                                                 700
pMini_Delp  AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            701                                                                                                 800
pMini_Delp  CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAACTA TTAACTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            801                                                                                                 900
pMini_Delp  TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            901                                                                                                1000
pMini_Delp  TGGATCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1001                                                                                               1100
pMini_Delp  AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACTTCATT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1101                                                                                               1200
pMini_Delp  TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1201                                                                                               1300
pMini_Delp  AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAAACCA CCGCTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1301                                                                                               1400
pMini_Delp  CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTTCTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1401                                                                                               1500
pMini_Delp  AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1501                                                                                               1600
pMini_Delp  ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1601                                                                                               1700
pMini_Delp  CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1701                                                                                               1800
pMini_Delp  TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GGCGGAGCCT
          1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
            1801                                                                                                                1900
pMini_Delp  ATGGAAAAAC GCCAGCAATG CGGCCTTTTT ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC TCACATGTTC TTTCCTGCGT TATCCCCTGA TTCTGTGGAT
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            1901                                                                                                                2000
pMini_Delp  AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG CGCCCAATAC
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            2001                                                                                                                2100
pMini_Delp  GCAAACCGCC TCTCCCCGCG CGTTGGCCGA TTCATTAATG CAGCCGGTTC AGACAGGATA AAGAGGAACG CAGAATGTTA GACAACACCC GCTTACGCAT
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            2101                                                                                                                2200
pMini_Delp  AGCTATTCAG AAATCAGGCC GTTTAAGCGA TGATTCACGA GAATTGCTGG CCCGCTGCGG CATAAAAATT AATTTACACA CTCAGCGCTG ATGAATCCCC
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            2201                                                                                                                2300
pMini_Delp  TAATGATTTT GGTAAAAATC ATTAAGTTAA GGTGGACACA CATCTTGTCA TATGATTAAA TGGTTTCGCG AAAAATCAAT AATCAGACAA CAAGATGTGC
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            2301                                                                                                                2400
pMini_Delp  GAACTCGATA TTTTACACGA CTCTCTTTAC CAATTCTGCC CCGAATTACA CTTAAAACGA CTCAACAGCT TAACGTTGGC TTGCCACGCA TTACTTGACT
         1
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

            2401                                                                                                                2500
pMini_Delp  GTAAAACTCT CACTCTTACC GAACTTGGCC GTAACCTGCC AACCAAAGCG AGAACAAAAC ATAACATCAA ACGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA
         1                                                                      AAAACTCA ACGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA
 Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..AAaAccaA ACGAATCGAC CGATTGTTAG GTAATCGTCA

            2501                                                                                                                2600
pMini_Delp  CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGATGG CACCACCGAC
         1  CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGAT-- ----------
 Consensus  CCTGCAGGAA GGTTTAAACG CATTTAGGTG ACACTATAGA AGTGTGTATC GCTCGAGGGA TCCGAATTCA GGAGGTAAAA ACCATGAT.. ..........

            2601                                                                                                                2700
pMini_Delp  CACATCACGC CATGGGACTC CTGCTACAAG TCGGCGCACC TGTTCGGCGG CAAATGCGAG TTCGTGCTGT CCAACAGCGG CCATATCCAA AGCATTCTCA
         1  ------ACGC CATGGGACTC CTGCTACAAG TCGGCGCACC TGTTCGGCGG CAAATGCGAG TTCGTGCTGT CCAACAGCGG CCATATCCAA AGCATTCTCA
 Consensus  ......ACGC CATGGGACTC CTGCTACAAG TCGGCGCACC TGTTCGGCGG CAAATGCGAG TTCGTGCTGT CCAACAGCGG CCATATCCAA AGCATTCTCA

            2701                                                                                                                2800
pMini_Delp  ACCCGCCGGG CAACCCCAAG GCGCGCTACA TGACCAATAG CGCGATGCCG CTGGACCCGA AAGCCTGGCA GGAAAGCTCG ACCAAGCACG CCGACTCCTG
         1  ACCCGCCGGG CAACCCCAAG GCGCGCTACA TGACCAATAG CGCGATGCCG CTGGACCCGA AAGCCTGGCA GGAAAGCTCG ACCAAGCACG CCGACTCCTG
 Consensus  ACCCGCCGGG CAACCCCAAG GCGCGCTACA TGACCAATAG CGCGATGCCG CTGGACCCGA AAGCCTGGCA GGAAAGCTCG ACCAAGCACG CCGACTCCTG

            2801                                                                                                                2900
pMini_Delp  GTGGCTACAT TGGCAGACGT GGCTGAGCGA ACGCTCGGGC GAAACCAAGA ATGCTCCACG GGCGCTGGGC AACAAGAAAT TCCCGGCTGG CGAAGCCGCA
         1  GTGGCTACAT TGGCAGACGT GGCTGAGCGA ACGCTCGGGC GAAACCAAGA ATGCTCCACG GGCGCTGGGC AACAAGAAAT TCCCGGCTGG CGAAGCCGCA
 Consensus  GTGGCTACAT TGGCAGACGT GGCTGAGCGA ACGCTCGGGC GAAACCAAGA ATGCTCCACG GGCGCTGGGC AACAAGAAAT TCCCGGCTGG CGAAGCCGCA

            2901                                                                                                                3000
pMini_Delp  CCAGGCACCT ATGTGCACGA ACGCTGATTT TCAGTCTCAA CCGCAGTGGC ACCGGGAAGT GCCGCACGCC ACGACGGTCT GACCGGCGTG GAACCAGGTA
         1  CCAGGCACCT ATGTGCACGA ACGCTGATTT TCAGTCTCAA CCGCAGTGGC ACCGGGAAGT GCCGCACGCC ACGACGGTCT GACCGGCGTG GAACCAGGTA
 Consensus  CCAGGCACCT ATGTGCACGA ACGCTGATTT TCAGTCTCAA CCGCAGTGGC ACCGGGAAGT GCCGCACGCC ACGACGGTCT GACCGGCGTG GAACCAGGTA

            3001                                                                                                                3100
pMini_Delp  ACCCCTGGTA ACCCTGGAGG CGGCCCGGAC GGCCCTCTCC AGCGCTCAAC TCCACAGGGG CTGCGCCTAT GCCGCAACCA TTCGTATTCC AGAGTCCCGT
         1  ACCCCTGGTA ACCCTGGAGG CGGCCCGGAC GGCCCTCTCC AGCGCTCAAC TCCACAGGGG CTGCGCCTAT GCCGCAACCA TTCGTATTCC AGAGTCCCGT
 Consensus  ACCCCTGGTA ACCCTGGAGG CGGCCCGGAC GGCCCTCTCC AGCGCTCAAC TCCACAGGGG CTGCGCCTAT GCCGCAACCA TTCGTATTCC AGAGTCCCGT

            3101                                                                                                                3200
pMini_Delp  CAGAAGAACT CGTCAAGAAG GCGATAGAAG GCGATGCGCT GCGAATCGGG AGCGGCGATA CCGTAAAGCA CGAGGAAGCG GTCAGCCCAT TCGCCGCCAA
         1  CAGAAGAACT CGTCAAGAAG GCGATAGAAG GCGATGCGCT GCGAATCGGG AGCGGCGATA CCGTAAAGCA CGAGGAAGCG GTCAGCCCAT TCGCCGCCAA
 Consensus  CAGAAGAACT CGTCAAGAAG GCGATAGAAG GCGATGCGCT GCGAATCGGG AGCGGCGATA CCGTAAAGCA CGAGGAAGCG GTCAGCCCAT TCGCCGCCAA

            3201                                                                                                                3300
pMini_Delp  GCTCTTCAGC AATATCACGG GTAGCCAACG CTATGTCCTG ATAGCGGTCC GCCACACCCA GCCGGCCACA GTCGATGAAT CCAGAAAAGC GGCCATTTTC
         1  GCTCTTCAGC AATATCACGG GTAGCCAACG CTATGTCCTG ATAGCGGTCC GCCACACCCA GCCGGCCACA GTCGATGAAT CCAGAAAAGC GGCCATTTTC
 Consensus  GCTCTTCAGC AATATCACGG GTAGCCAACG CTATGTCCTG ATAGCGGTCC GCCACACCCA GCCGGCCACA GTCGATGAAT CCAGAAAAGC GGCCATTTTC

            3301                                                                                                                3400
pMini_Delp  CACCATGATA TTCGGCAAGC AGGCATCGCC ATGGGTCACG ACGAGATCCT CGCCGTCGGG CATGCGCGCC TTGAGCCTGG CGAACAGTTC GGCTGGCGCG
         1  CACCATGATA TTCGGCAAGC AGGCATCGCC ATGGGTCACG ACGAGATCCT CGCCGTCGGG CATGCGCGCC TTGAGCCTGG CGAACAGTTC GGCTGGCGCG
 Consensus  CACCATGATA TTCGGCAAGC AGGCATCGCC ATGGGTCACG ACGAGATCCT CGCCGTCGGG CATGCGCGCC TTGAGCCTGG CGAACAGTTC GGCTGGCGCG

            3401                                                                                                                3500
pMini_Delp  AGCCCCTGAT GCTCTTCGTC CAGATCATCC TGATCGACAA GACCGGCTTC CATCCGAGTA CGTGCTCGCT CGATGCGATG TTTCGCTTGG TGGTCGAATG
         1  AGCCCCTGAT GCTCTTCGTC CAGATCATCC TGATCGACAA GACCGGCTTC CATCCGAGTA CGTGCTCGCT CGATGCGATG TTTCGCTTGG TGGTCGAATG
 Consensus  AGCCCCTGAT GCTCTTCGTC CAGATCATCC TGATCGACAA GACCGGCTTC CATCCGAGTA CGTGCTCGCT CGATGCGATG TTTCGCTTGG TGGTCGAATG

            3501                                                                                                                3600
pMini_Delp  GGCAGGTAGC CGGATCAAGC GTATGCAGCC GCCGCATTGC ATCAGCCATG ATGGATACTT TCTCGGCAGG AGCAAGGTGA GATGACAGGA GATCCTGCCC
         1  GGCAGGTAGC CGGATCAAGC GTATGCAGCC GCCGCATTGC ATCAGCCATG ATGGATACTT TCTCGGCAGG AGCAAGGTGA GATGACAGGA GATCCTGCCC
 Consensus  GGCAGGTAGC CGGATCAAGC GTATGCAGCC GCCGCATTGC ATCAGCCATG ATGGATACTT TCTCGGCAGG AGCAAGGTGA GATGACAGGA GATCCTGCCC
```

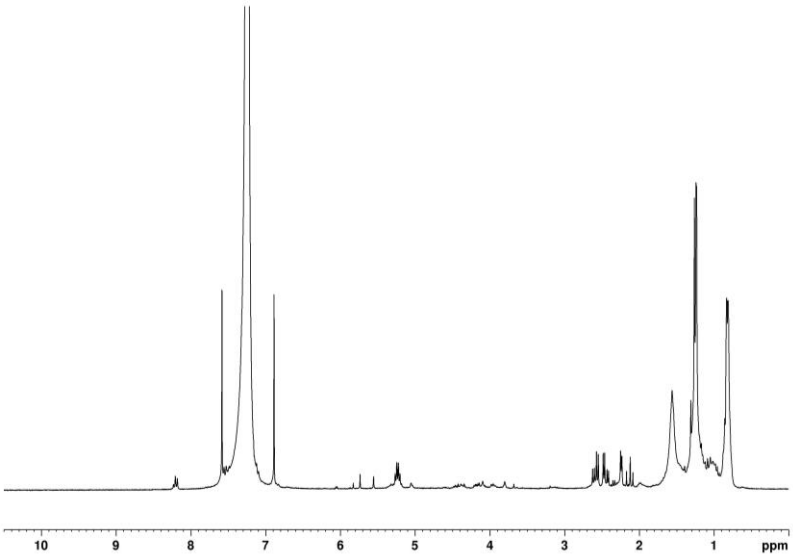
```
           3601                                                                                                                3700
pMini_Delp CGGCACTTCG CCCAATAGCA GCCAGTCCCT TCCCGCTTCA GTGACAACGT CGAGCACAGC TGCGCAAGGA ACGCCCGTCG TGGCCAGCCA CGATAGCCGC
         1 CGGCACTTCG CCCAATAGCA GCCAGTCCCT TCCCGCTTCA GTGACAACGT CAAGCACAGC TGCGCAAGGA ACGCCCGTCG TGGCCAGCCA CGAAAGCCG
 Consensus CGGCACTTCG CCCAATAGCA GCCAGTCCCT TCCCGCTTCA GTGACAACGT CaAGCACAGC TGCGCAAGGA ACGCCCGTCG TGGCCAGCCA CGAaAGCCG.

           3701                                                                                                                3800
pMini_Delp GCTGCCTCGT CCTGCAGTTC ATTCAGGGCA CCGGACAGGT CGGTCTTGAC AAAAAGAACC GGGCGCCCCT GCGCTGACAG CCGGAACACG GCGGCATCAG
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           3801                                                                                                                3900
pMini_Delp AGCAGCCGAT TGTCTGTTGT GCCCAGTCAT AGCCGAATAG CCTCTCCACC CAAGCGGCCG GAGAACCTGC GTGCAATCCA TCTTGTTCAA TCATGCGAAA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           3901                                                                                                                4000
pMini_Delp CGATCCTCAT CCTGTCTCTT GATCAGATCT TGATCCCCTG CGCCATCAGA TCCTTGGCGG CAAGAAAGCC ATCCAGTTTA CTTTGCAGGG CTTCCCAACC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4001                                                                                                                4100
pMini_Delp TTACCAGAGG GCGCCCCAGC TGGCAATTCC GGTTCGCACC ATTGCGCCAG CATTGACCGC ACCATCTTGG TGCGCAATGT TCTGCGTGCT CGACAAAGGG
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4101                                                                                                                4200
pMini_Delp GCCGCTCAAG GCCTCTTGTT TTTCGACGCG GCGCTCTGGA ATGCACTTCC CGCGCGCCTG GTACAGGGCT TGCTGCACAC CCTGCACAAG TACAAGGTGC
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4201                                                                                                                4300
pMini_Delp GCGCCGAGGC AGTCCGCGCC ATGAAAGTCT CTAGACGGTT TGACGACGGA GTGCTGCCCC ATGCGAGACA AGTCGAACCC GGCTTCACTG CCGGCACCCG
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4301                                                                                                                4400
pMini_Delp CCAGTTTCAT GAACGCCCAG AGCGCGGTGG TGGGCGTGCG CGGTCGCGAT CTGCTGTCCA CCATGCGCCT GCTGGCTGCC CAGGGCCTGA AGAATCCGGT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4401                                                                                                                4500
pMini_Delp GCGCAGTGGA CGTCATCTGC TGGCCTTCGG CGGCCAGCTT GGCCGGGTGC TGCTCGGCGA TACCCTGCAC AAGGTCAATC CGCAGGATGC GCGCTTCGCT
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4501                                4537
pMini_Delp GATCCGACCT GGCACCTCAA TCCCTTCTAC CGCCGCA
         1
 Consensus .......... .......... .......... .......
```

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

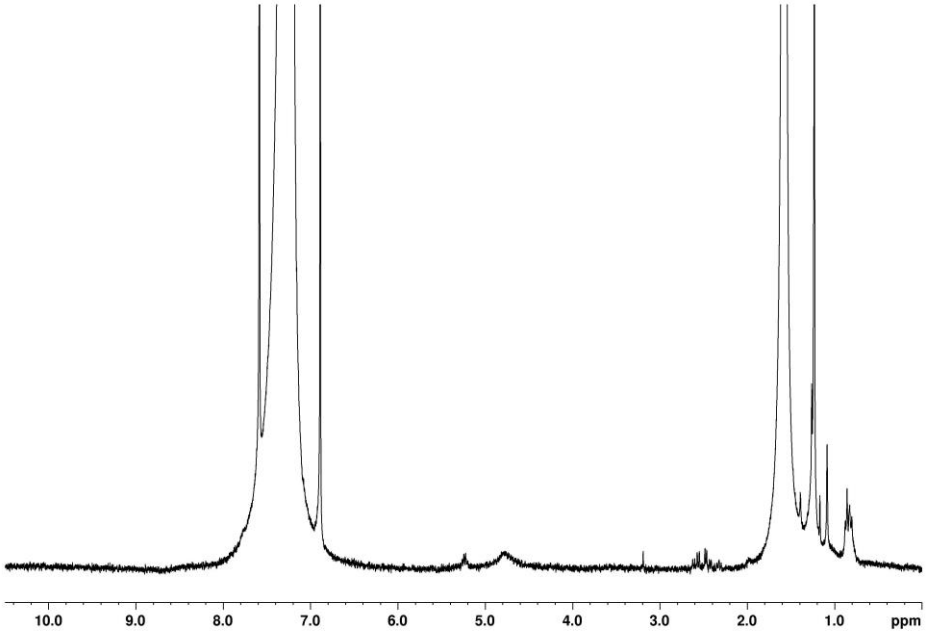
Φάσμα ^{1}H NMR PHB απομονωμένο από καλλιέργεια μεταλλάγματος ΔphaZ σε θρεπτικό μέσο M9



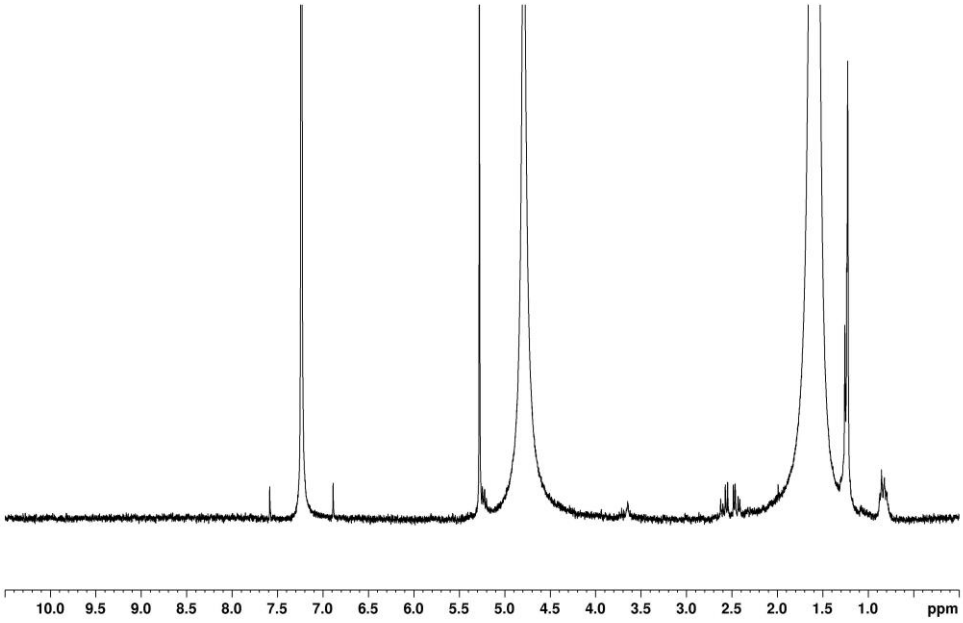
Φάσμα ^{1}H NMR PHB απομονωμένο από καλλιέργεια μεταλλάγματος ΔphaR σε θρεπτικό μέσο M9



Φάσμα ^{1}H NMR PHB απομονωμένο από καλλιέργεια μεταλλάγματος ΔphaZ σε θρεπτικό μέσο M9-N



Φάσμα ^{1}H NMR PHB απομονωμένο από καλλιέργεια WT σε θρεπτικό μέσο M9-N



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Title	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Protein MW (Da)	Status	pI-Value	Accession
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Pseudomonas	55	41	2	64123.00	Identified	5.90	A0A385B777
ATP synthase subunit beta OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237	87	75	5	49641.00	Identified	4.80	A0A385BDG7
Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_21370 PE=4	73	55	2	45613.00	Identified	5.00	A0A385BCU9
Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_17000 PE=4	122	65	5	48753.00	Identified	4.30	A0A385BAK7
Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_21370 PE=4	43	13	2	45613.00	Identified	5.00	A0A385BCU9
HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit O	35	15	3	38135.00	Identified	7.80	A0A385B396
Uncharacterized protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	9	0	4	32343.00	Undefined	9.50	A0A385B742
Uncharacterized protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	12	5	4	32343.00	Undefined	9.50	A0A385B742

Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_17000 PE=4	77	62	3	48753.00	Identified	4.30	A0A385BAK7
Phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR OS=Pseudomona	16	12	2	49816.00	Identified	9.80	A0A385BD08
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Pseudomonas	75	63	2	64123.00	Identified	5.90	A0A385B777
Uncharacterized protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	61	6	14	21579.00	Identified	5.90	A0A385B9V6
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Pseudomonas	65	58	2	64123.00	Identified	5.90	A0A385B777
Outer membrane protein OmpW OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=2532	40	35	6	24468.00	Identified	6.00	A0A385BD80
OmpA family protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZ	39	12	3	34964.00	Identified	4.80	A0A385B8K8
Uncharacterized protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	64	4	14	21579.00	Identified	5.90	A0A385B9V6
Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_21370 PE=4	46	30	2	45613.00	Identified	5.00	A0A385BCU9

Outer membrane protein OmpW OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=2532	56	55	10	24468.00	Identified	6.00	A0A385BD80
ATP synthase subunit beta OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237	143	127	8	49641.00	Identified	4.80	A0A385BDG7
Phosphoserine aminotransferase OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=2	0	0	8	39903.00	Undefined	4.90	A0A385B7T8
Arc family DNA-binding protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=2	7	5	27	12102.00	Undefined	5.80	A0A385B675
ATP synthase subunit alpha OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=25323	179	93	10	55485.00	Identified	5.40	A0A385BE93
Cytochrome b OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_188	37	4	2	46219.00	Identified	8.60	A0A385BCT5
Elongation factor P OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=ef	3	3	13	21471.00	Undefined	4.60	A0A385B7R1
Outer membrane protein OmpW OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=2532	27	21	6	24468.00	Identified	6.00	A0A385BD80
VacJ family lipoprotein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	131	78	15	25931.00	Identified	5.70	A0A385B719

Cytochrome c1 OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_18	24	16	5	29303.00	Identified	7.70	A0A385BBB6
OmpA family protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZ	29	25	3	34964.00	Identified	4.80	A0A385B8K8
Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit OS=Pseudomonas s	79	5	15	26662.00	Identified	7.50	A0A385B8F3
OmpA family protein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZ	47	37	3	34964.00	Identified	4.80	A0A385B8K8
Protein HflK OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=hflK PE=3	47	1	4	42996.00	Identified	5.00	A0A385B475
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Pseudomonas	68	61	2	64123.00	Identified	5.90	A0A385B777
Glutamine synthetase OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=D	46	46	3	52100.00	Identified	5.20	A0A385BCW9
ATP synthase subunit beta OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237	123	108	8	49641.00	Identified	4.80	A0A385BDG7
Porin OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=DZC76_21370 PE=4	25	8	2	45613.00	Identified	5.00	A0A385BCU9

Glutamate 5-kinase OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 GN=pro	8	2	5	39875.00	Undefined	7.90	A0A385B4L0
Excinuclease ABC subunit UvrA OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=25	5	1	2	95820.00	Undefined	6.60	A0A385B8W2
VacJ family lipoprotein OS=Pseudomonas sp. phDV1 OX=253237 G	126	113	20	25931.00	Identified	5.70	A0A385B719