

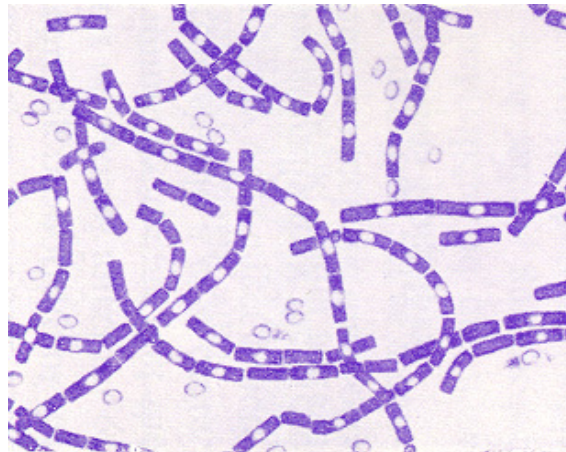
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βιοχημικός χαρακτηρισμός και γενετική ανάλυση του ενζύμου BA0150 από τον
παθογόνο μικροοργανισμό *Bacillus anthracis*



ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΓΚΕΚΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2011

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βιοχημικός χαρακτηρισμός και γενετική ανάλυση του ενζύμου BA0150 από τον
παθογόνο μικροοργανισμό *Bacillus anthracis*

Υπεύθυνος καθηγητής: Βασίλης Μπουριώτης

Στο εξώφυλλο απεικονίζονται βλαστητικά κύτταρα κατά την εκθετική φάση του *Bacillus anthracis* [Current Science 2002, 82(8): 1220-1226].

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), σε συνεργασία με το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ευχαριστώ τον επικεφαλής του εργαστηρίου και υπεύθυνο καθηγητή, κ. Βασίλη Μπουριώτη για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος και για την καθοδήγησή του στα δύσκολα σημεία της ανάλυσης. Ευχαριστώ, επίσης, τον καθηγητή κ. Κώστα Τοκατλίδη και τον ερευνητή κ. Κυριάκο Πετράτο που ήταν επιβλέποντες στην παρούσα εργασία αλλά και για όλες τις συζητήσεις που είχα μαζί τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαίρη Τζανοδασκαλάκη, το Δημήτρη Κουτσιούλη, την Εύη Μπαλωμένου, τη Σοφία Αρναουτέλη, την κ. Μαρία Μαρκάκη και την κ. Αλεξάνδρα Σιάκουλη για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχα μαζί τους και την υποστήριξη που μου προσέφεραν. Η βοήθειά τους αλλά και η επιστημονική τους καθοδήγηση ήταν πολύ σημαντικές όσον αφορά στο θεωρητικό αλλά και το τεχνικό μέρος των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αγαπητούς Θανάση και Χρήστο καθώς και τους επιστήθιους Μαρίνα και Κωνσταντίνο για την άμεση συμπαράσταση και βοήθειά τους.

Η ηθική και υλική στήριξη από την οικογένειά μου και ειδικά από το μικρό Κάκι υπήρξε καθοριστική για την πραγματοποίηση αυτού του έργου. Τους ευχαριστώ όλους.

Σωτήριος Γκέκας

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	10
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
A.1. Δομή της πεπτιδογλυκάνης	11
A.2. Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης	12
A.3. Πεπτιδογλυκάνη και παθογένεια	15
A.4. Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (PDAs)	16
A.5. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών	18
A.6. Το βακτήριο <i>Bacillus anthracis</i>	19
A.6.1. Βλαστητικά κύτταρα	20
A.6.2. Ενδοσπόρια	21
A.6.3. Βλάστηση σπορίων	22
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
B.1. Υλικά.	26
B.2. Μέθοδοι	27
B.2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>ba0150</i>	27
B.2.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> με την πλασμιδιακή κατασκευή pET26b/ <i>ba0150</i>	28
B.2.3. Υπερπαραγωγή της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης BA0150 σε κύτταρα <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	29
B.2.4. Απομόνωση του ενζύμου BA0150	29
B.2.5. Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης BA0150	31
B.2.6. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών	33

B.2.7. Προσδιορισμός μοριακού βάρους της BA0150	33
B.2.8. Απαλοιφή του γονιδίου <i>ba0150</i>	33
B.2.9. Σύζευξη με το στέλεχος 7702 του <i>B. anthracis</i>	36
B.2.10. Ευαισθησία του μεταλλάγματος στη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη	37
B.2.11. Αυτόλυση	38
B.2.12. Απομόνωση σπορίων	38
B.2.13. Βλάστηση σπορίων	38
B.2.14. Κυτταρικός εντοπισμός (localization) της πρωτεΐνης BA0150	39
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
Γ.1. Στοίχιση της αλληλουχίας BA0150 του <i>B. anthracis</i> και σύγκριση με άλλες απακετυλάσες πολυσακχαριτών	42
Γ.2. Κλωνοποίηση, έκφραση και υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BA0150 σε κύτταρα <i>E. coli</i>	43
Γ.3. Απομόνωση του ενζύμου BA0150	44
Γ.4. Εξέταση πιθανών υποστρωμάτων του ενζύμου BA0150	46
Γ.5. Απαλοιφή του γονιδίου <i>ba0150</i>	46
Γ.5.1. Ετερόλογη σύζευξη με το στέλεχος 7702 του <i>B. anthracis</i>	47
Γ.6. Ευαισθησία στη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη	49
Γ.7. Αυτόλυση	53
Γ.8. Βλάστηση σπορίων	56
Γ.9. Κυτταρικός εντοπισμός (localization) της BA0150	58
Γ.9.1. Ετερόλογη σύζευξη με το στέλεχος 7702 του <i>B. anthracis</i>	58
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	64
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί τον κυριότερο πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα και βιωσιμότητα του βακτηριακού κυττάρου. Είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από δύο σάκχαρα, την N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (GlcNAc) και το N-ακετυλ-μουραμικό οξύ (MurNAc) συνδεδεμένο με μία μικρή ομάδα αμινοξέων. Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα δυναμικό μόριο και έχει κεντρικό ρόλο σε μια σειρά βιολογικών λειτουργιών των βακτηριακών κυττάρων (ανάπτυξη κυττάρων, διαίρεση, αυτόλυση και σπορίωση σε ορισμένα είδη) καθώς και στην παθογένεια, μέσω τροποποιήσεων που υφίσταται κατά τις παραπάνω διαδικασίες. Μια από αυτές τις τροποποιήσεις είναι η απακετυλίωση που πραγματοποιείται από εξειδικευμένα ένζυμα, τις απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (PDAs). Οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης ανήκουν στην οικογένεια εστερασών υδατανθράκων 4 (CE-4 family) και απακετυλιώνουν τα κατάλοιπα N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλ-μουραμικού οξέος του επαναλαμβανόμενου δισακχαρίτη της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης.

Ανάλυση του γονιδιώματος του οργανισμού *Bacillus anthracis* αποκάλυψε την ύπαρξη 11 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν για υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών, από τις οποίες 6 είναι υποθετικές απακετυλάσες N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης και οι υπόλοιπες 5 υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ενζύμου BA0150 από τον παθογόνο μικροοργανισμό *B. anthracis*. Το συγκεκριμένο ένζυμο ανήκει στην κατηγορία των υποθετικών απακετυλασών πολυσακχαριτών και εμφανίζει 61% ταυτότητα με το ένζυμο PdaB, μία υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών από τον οργανισμό *B. subtilis* που σχετίζεται με τη σπορίωση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου *ba0150* σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (pET26b) και ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης μετά από επαγωγή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ενζύμου σε δύο χρωματογραφικά στάδια, χρησιμοποιώντας προσροφητές Ni-NTA agarose και μοριακής διήθησης Sephacryl S200 HR. Ακολούθησαν προκαταρκτικά πειράματα βιοχημικού χαρακτηρισμού με χρήση ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων γλυκολ-

χιτίνης, καθώς και N-ακετυλοχιτοολιγομερών. Ωστόσο, το ένζυμο δεν παρουσίασε ενεργότητα σε κανένα από τα παραπάνω υποστρώματα.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο βιολογικός ρόλος του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής ανάλυσης (με τη μέθοδο απενεργοποίησης του γονιδίου) και κυτταρικού εντοπισμού. Μέχρι στιγμής απομονώθηκε στέλεχος του *B. anthracis* μόνο με απλό ανασυνδυασμό. Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε φαινότυπο πολύ διαφορετικό σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου. Τα βλαστητικά κύτταρα του μεταλλάγματος εμφάνισαν πιο επιμηκυσμένες αλυσίδες ενώ το σχήμα τους ήταν παραλλαγμένο (καμπυλωτό) σε σχέση με τα αντίστοιχα του αγρίου τύπου. Επίσης, το μετάλλαγμα εμφάνισε ανθεκτικότητα στη δράση της λυσοζύμης αλλά ευαισθησία στη μουτανολυσίνη.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το ενδιαφέρον που υπάρχει για τον *B. anthracis* ως ένα επικίνδυνο βιολογικό όπλο, η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει βάση για το σχεδιασμό φαρμάκων τα οποία θα στοχεύουν ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση και την τροποποίηση των πολυσακχαριτών του *B. anthracis*.

ABSTRACT

Peptidoglycan is the basic polysaccharide of the bacterial cell wall and it is responsible for the stability and viability of the bacterial cell. It is a polymer of a repeating disaccharide-peptide unit, N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) and N-acetyl-muramic acid (MurNAc) cross-linked with a small group of amino acids. Peptidoglycan is a dynamic molecule and plays a crucial role in many biological functions of bacterial cells (bacterial growth, division, autolysis and spore formation in some species) as well as in pathogenesis, through modifications of peptidoglycan from the procedures above. Such a modification is the deacetylation of peptidoglycan via the specialized enzymes peptidoglycan deacetylases (PDAs). Peptidoglycan deacetylases belong to carbohydrate esterase family 4 (CE4) and de-*N*-acetylate the *N*-acetyl-glucosamine and the *N*-acetyl-muramic acid residues of the di-sugar repeats in bacterial peptidoglycan.

The genome of *Bacillus anthracis* contains 11 open reading frames (ORFs) encoding for putative polysaccharide deacetylases. Six of these have been proposed to be peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylases and the other five polysaccharide deacetylases. The gene *ba0150* from *B. anthracis* codes for a putative polysaccharide deacetylase and is homologous to PdaB (61% identity), a putative polysaccharide deacetylase from *B. subtilis*, that is involved in sporulation.

In this study, *ba0150* was cloned and expressed in *E. coli* cells. The recombinant enzyme was purified to homogeneity employing Ni-NTA agarose and Sephacryl S200 HR chromatography and was further characterized. The protein was not active on glycol- chitin, GMDP and N-acetyl chitooligomers substrates.

In order to elucidate the biological role of BA0150, genetic analysis (knock out) and cellular localization experiments were performed. So far we have isolated *B. anthracis* strain with single recombination events. The mutant showed abnormally elongated-curved cells and a delay in autolysis and spore germination. Furthermore, the mutant was resistant against lysozyme, but more sensitive against mutanolysin.

Considering the interest on *B. anthracis* as a potential bioweapon, these studies may set a basis for potential drug design applications targeting enzymes involved in biosynthesis and modification of *B. anthracis* polyssacharides.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP: adenosine triphosphate, **BSA:** bovine serum albumin, **CDA:** chitin deacetylase, **cpm:** counts per minute, **DMF:** dimethylformamide, **DTT:** dithiothreitol, **GFP:** green fluorescent protein, **GlcNAc:** N-acetyl-glucosamine, **(GlcNAc)₂:** diacetylchitobiose, **(GlcNAc)₃:** tri-N-acetyl-chitotriose, **(GlcNAc)₄:** tetra-N-acetyl-chitotetraose, **(GlcNAc)₅:** penta-N-acetyl-chitopentaose, **(GlcNAc)₆:** hexa-N-acetyl-chitohexaose, **GMDP:** N-acetyl-D-glucosamine-(β-1,4)-N-acetylmuramyl-L-alanine disoglutamine, **IPTG:** isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, **MES:** 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, **MurNAc:** N-acetyl-muramic acid, **PDA:** peptidoglycan deacetylase, **PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride, **RFP:** red fluorescent protein, **SDS:** sodium dodecyl sulphate, **Tris:** tris hydroxymethyl methylamine

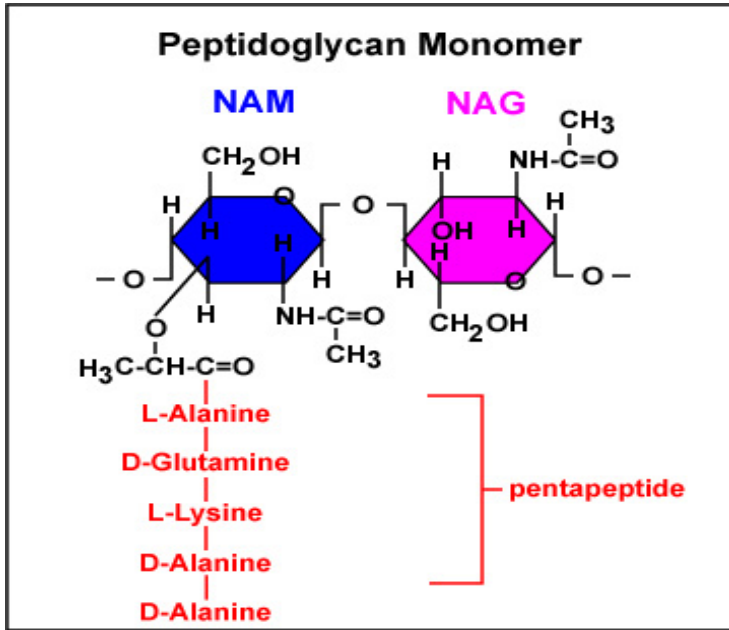
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Δομή της πεπτιδογλυκάνης

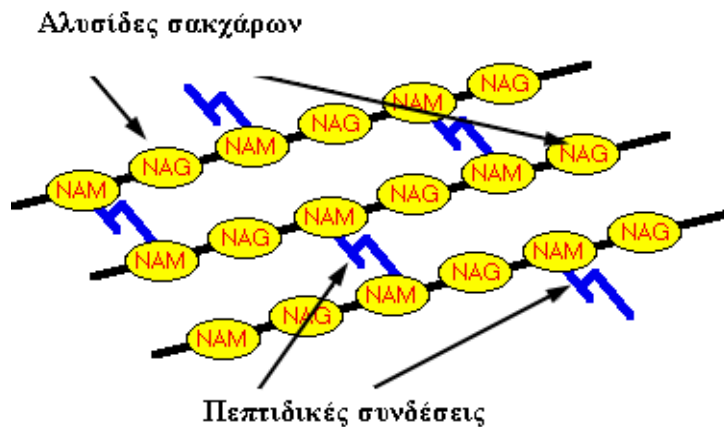
Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το βασικό και θεμελιώδες συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος σε όλα τα βακτήρια και βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. Η κύρια λειτουργία της είναι η διατήρηση της κυτταρικής ευστάθειας του βακτηρίου, διαμορφώνοντας και διατηρώντας το κυτταρικό του σχήμα. Παράλληλα, προφυλάσσει το κύτταρο από διάρρηξη λόγω εσωτερικής ωσμωτικής πίεσης, προσφέροντας ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα [1]. Ο ρόλος της πεπτιδογλυκάνης είναι επίσης σημαντικός σε μια σειρά βιολογικών λειτουργιών των βακτηριακών κυττάρων όπως είναι η αυτόλυση και η σπορίωση (σε ορισμένα είδη), μέσω των τροποποιήσεων που υφίσταται η πεπτιδογλυκάνη κατά τον κύκλο ζωής του κυττάρου [2].

Το μακρομόριο της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες σακχάρων, που συνδέονται μεταξύ τους με μικρές «πεπτιδικές» γέφυρες. Το μονομερές της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από δύο ενωμένα αμινοσάκχαρα, την N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (GlcNAc) και το N-ακετυλ-μουραμικό οξύ (MurNAc), του οποίου η γαλακτική ομάδα είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά με ένα πενταπεπτίδιο. Η σύνδεση μεταξύ των καταλοίπων MurNAc και GlcNAc επιτυγχάνεται μέσω β-1,4- N-γλυκοζιτικών δεσμών, ενώ τα πεπτίδια τα οποία συμμετέχουν στη δομή του πολυμερούς της πεπτιδογλυκάνης ποικίλλουν από είδος σε είδος. Το πιο σύνηθες πενταπεπτίδιο έχει την ακόλουθη σύσταση: L-Ala-D-Glu-meso-DAP-D-Ala-D-Ala. Συχνά το μέσο-διαμινοπιμελικό οξύ (meso-DAP) αντικαθίσταται από την L-lys (Εικόνα 1) [3].

A)



B)

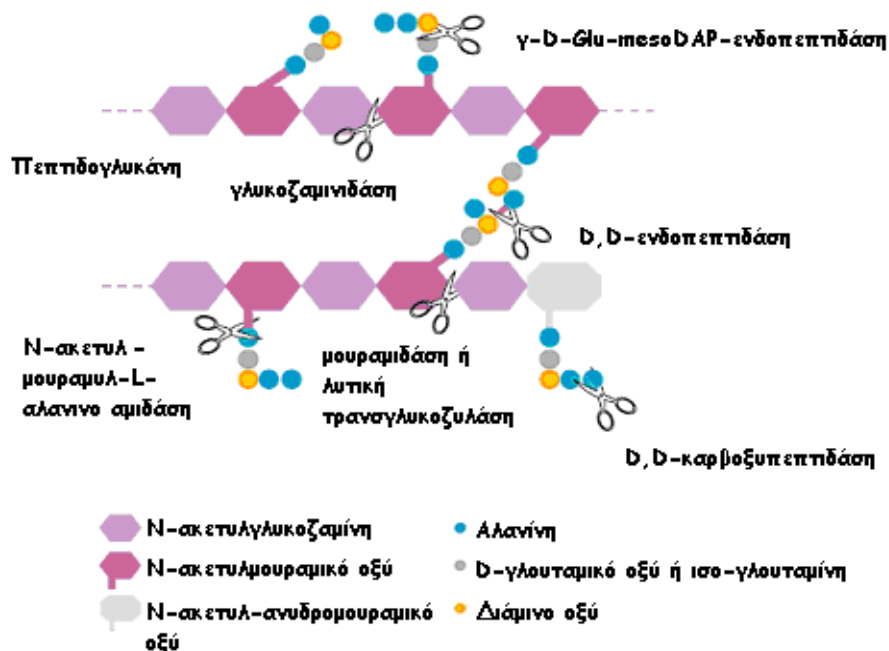


Εικόνα 1. Δομή πεπτιδογλυκάνης. Α) Η επαναλαμβανόμενη μονάδα σακχάρων (NAM-NAG) με το πενταπεπτίδιο (το τρίτο αμινοξύ μπορεί να είναι λυσίνη ή DAP). Β) Οι σακχαρικές αλυσίδες και ο τρόπος σύνδεσής τους μέσω πεπτιδίων. NAG: N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη, NAM: N-ακετυλ-μουραμικό οξύ.

A.2. Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης

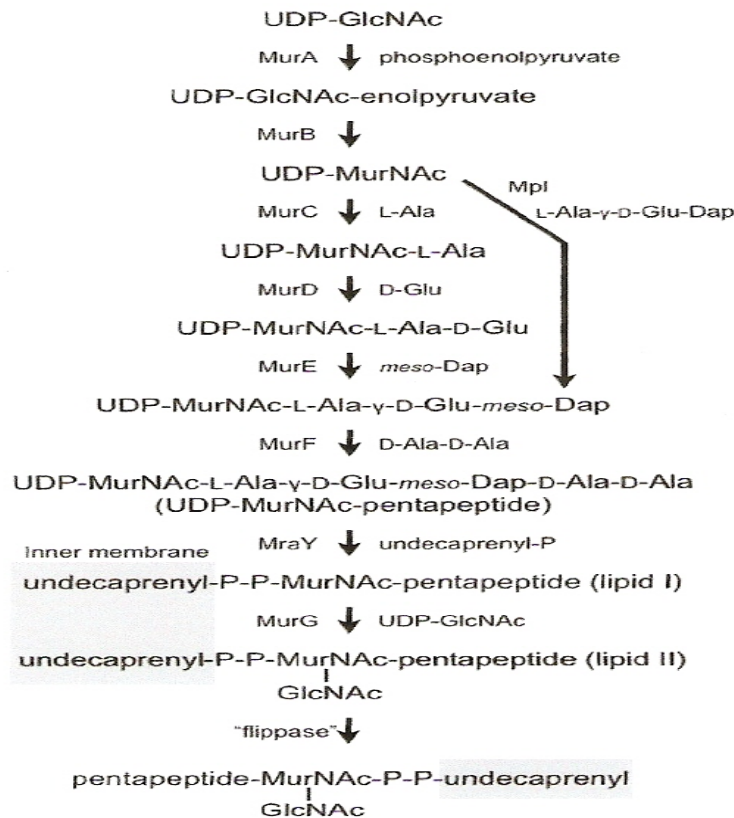
Η σύνθεση νέας πεπτιδογλυκάνης αποτελεί μέρος της διαδικασίας αύξησης του κυττάρου πριν την κυτταρική διαίρεση. Αυτό το νέο κυτταρικό υλικό πρέπει να προστεθεί στο υπάρχον τοίχωμα χωρίς την απώλεια της δομικής ακεραιότητας. Μικρά ανοίγματα σχηματίζονται στο τοίχωμα, στο σημείο της διαίρεσης, από υδρολυτικά ένζυμα τα οποία έχουν παρόμοια δράση με τη λυσοζύμη. Το νέο υλικό

εισάγεται κατά μήκος των ανοιγμάτων αυτών. Οι υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 2) εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους και εμπλέκονται σε σειρά διαδικασιών, πέραν της αύξησης και διαίρεσης του κυττάρου [4].



Εικόνα 2. Υδρολάσες πεπτιδογλυκάνης. Σχηματική αναπαράσταση της στιβάδας πεπτιδογλυκάνης με τα ψαλίδια να υποδηλώνουν το δεσμό που υδρολύεται από την αντίστοιχη υδρολάση.

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης περιλαμβάνει δυο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός της πρόδρομης υπομονάδας πεπτιδογλυκάνης, ενός δισακχαριτικού πενταπεπτιδίου, στο κυτταρόπλασμα. Μέσα από ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι έξι σταδίων παράγεται το UDP-N-ακετυλ-μουραμικό πενταπεπτίδιο από την UDP-N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη. Για τη μεταφορά του πρόδρομου μορίου μέσα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ένα λιπίδιο, η βακτοπρενόλη (λιπίδιο I), παίζει το ρόλο του μεταφορέα. Η βακτοπρενόλη συνδέεται ομοιοπολικά με την N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη και οδηγεί στο σχηματισμό του λιπιδίου II, το οποίο βοηθά το δισακχαριτικό πενταπεπτίδιο να διαπεράσει το εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 3) [4,5,6].



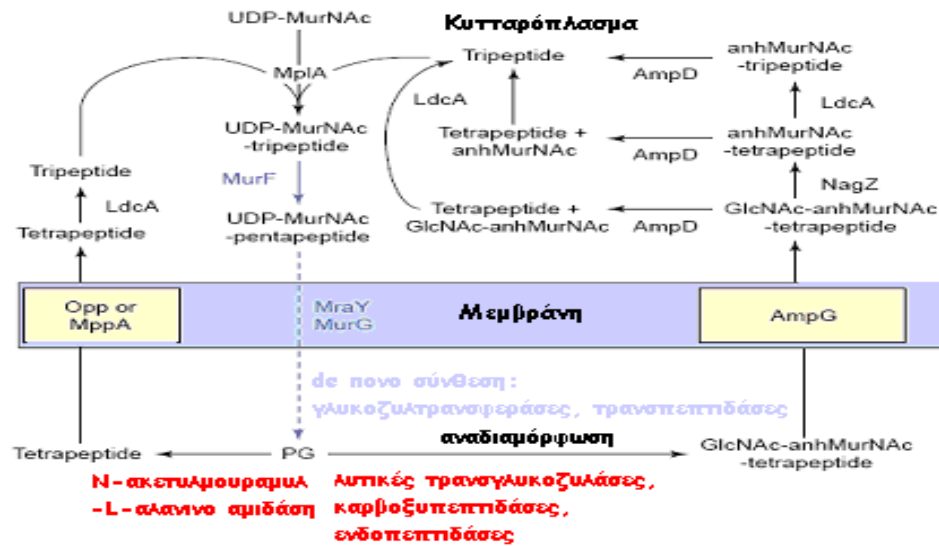
Εικόνα 3. Βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τον πολυμερισμό, ο οποίος πραγματοποιείται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Ο πολυμερισμός της πεπτιδογλυκάνης απαιτεί δύο ενζυμικές δραστηριότητες: τρανσγλυκοζυδάσες, οι οποίες πολυμερίζουν τις αλυσίδες γλυκάνης καταλύοντας το σχηματισμό του γλυκοζιτικού δεσμού και τρανσπεπτιδάσες, οι οποίες σχηματίζουν τις συνδέσεις πεπτιδίων μεταξύ καταλοίπων μουραμικού οξέος σε γειτονικές αλυσίδες γλυκάνης [5,6].

Στα Gram- βακτήρια η πεπτιδογλυκάνη ανακυκλώνεται και επαναχρησιμοποιείται για εκ νέου σύνθεση ή για άλλους σκοπούς ενώ στα Gram+ αποβάλλεται στο περιβάλλον και ίσως μόνο τα πεπτίδια να ανακυκλώνονται [3].

Δύο μονοπάτια ανακύκλωσης είναι γνωστά (Εικόνα 4). Το Opp μονοπάτι χρησιμοποιεί το σύστημα μεταφοράς ολιγοπεπτιδίων για την ανακύκλωση των πεπτιδικών τμημάτων που προκύπτουν από τη δράση N-ακετυλ-μουραμυλ-L-αλανινοαμιδασών. Τα δισακχαριτικά πεπτίδια που αποτελούν προϊόν της συνδυαστικής δράσης λυτικών τρανσγλυκοζυδασών, ενδοπεπτιδασών και καρβοξυπεπτιδασών μεταφέρονται διαμέσου της μεμβράνης μέσω του AmpG μονοπατιού. Για την

επαναχρησιμοποίησή τους απαιτείται η περαιτέρω αποικοδόμησή τους από N-ακετυλ-γλυκοζαμιινιδάσες που ελευθερώνουν την N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη καθώς και από N-ακετυλ-ανυδρο-μουραμυλ-L-αλανινο αμιδάσες που διαχωρίζουν το πεπτιδικό από το σακχαρικό κομμάτι [3,7].



Εικόνα 4. Το μονοπάτι ανακύκλωσης της πεπτιδογλυκάνης είναι το αποτέλεσμα δράσης των υδρολασών πεπτιδογλυκάνης (με κόκκινο χρώμα). Το υλικό αναδιαμόρφωσης της πεπτιδογλυκάνης μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω των Amp και Opp συστημάτων μεταφοράς.

A.3. Πεπτιδογλυκάνη και παθογένεια

Η πεπτιδογλυκάνη εμφανίζει διάφορες βιολογικές δραστηριότητες όπως είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων, η κυτταροτοξικότητα, η επαγωγή αυτοάνοσων νοσημάτων κλπ [3]. Οι περισσότεροι παράγοντες μολυσματικότητας αποτελούν μικρά τμήματα πεπτιδογλυκάνης (μουροπεπίδια) που προκύπτουν από την υδρόλυση και την ανακύκλωση των συστατικών της. Η ανακάλυψη των κυτταροπλασματικών υποδοχέων Nod1 και Nod2 (nucleotide-binding oligomerization domain) ως αισθητήρων μουροπεπτιδίων άρχισε να ρίχνει φως σε μηχανισμούς αναγνώρισης της πεπτιδογλυκάνης από τους ξενιστές καθώς και σε μηχανισμούς που αναπτύσσει το βακτήριο για να αποφύγει την απόκριση του ξενιστή [8].

Ο υποδοχέας Nod1 αναγνωρίζει το μουροπεπίδιο GlcNAc-MurNAc-L-alanine-γ-D-glutamate-mesoDAP (GMTriPdap) και ο Nod2 αναγνωρίζει το GlcNAc-MurNAc-L-alanine-D-glutamate (GMDP). Το γεγονός ότι οι Nod υποδοχείς αποτελούν

αισθητήρες πεπτιδογλυκάνης και αναγνωρίζουν προϊόντα αποικοδόμησης πεπτιδογλυκάνης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αναγνώριση από τον ξενιστή προϋποθέτει επεξεργασία της πεπτιδογλυκάνης από ενδογενείς υδρολάσες ή από ένζυμα του ξενιστή (π.χ. λυσοζύμη) [8,9].

Η ικανότητα προσβολής των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή είναι ζωτικής σημασίας για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό. Είναι γνωστό ότι τα παθογόνα βακτήρια τροποποιούν το κυτταρικό τους τοίχωμα το οποίο αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από πεπτιδογλυκάνη. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τροποποιήσεις όπως η N-απακετυλίωση, η N-γλυκοζυλίωση και η O-ακετυλίωση των σακχαρικών αλυσίδων. Οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν την επιμήκυνση της πεπτιδογλυκάνης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του κυττάρου αλλά και την αναγνώριση του βακτηρίου από τον ξενιστή [10,11].

Από τις τρεις παραπάνω τροποποιήσεις, ο κύριος αμυντικός μηχανισμός των βακτηρίων που σχετίζεται με την τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης είναι η απακετυλίωση υποκαταστατών N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Η τροποποίηση αυτή εμποδίζει την πρόσδεση της λυσοζύμης στην πεπτιδογλυκάνη και τη μετέπειτα υδρόλυσή της. Τα ένζυμα, υπεύθυνα για αυτές τις τροποποιήσεις είναι οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης [10,11].

A.4. Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (PDAs)

Οι απακετυλάσες N-ακετυλογλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης ανήκουν στην οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων CE4 η οποία περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από σημαντική ομολογία και λειτουργικές ομοιότητες [12]. Στην οικογένεια CE4 ανήκουν οι απακετυλάσες της χιτίνης, απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης, απακετυλάσες χιτοολιγοσακχαριτών και εστεράσες ακετυλοξυλάνης. Τα ένζυμα αυτά έχουν μια κοινή συντηρημένη επικράτεια (NodB domain) και σημαντικές λειτουργικές ομοιότητες, αφού καταλύουν την υδρόλυση O- ή N- προσδεδεμένης ακετυλομάδας από τον αντίστοιχο πολυσακχαρίτη [12,13].

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί επτά απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης καθώς και τα αντίστοιχα γονίδιά τους: PgdA από *S. pneumoniae* [14], BC1960 και BC3618 από *Bacillus cereus* [15], PgdA από *L. monocytogenes* [16], PgdA από *Lactococcus lactis*

[17], HB310 από *H. pylori* [18] και PgdA από *Streptococcus suis* [19]. Το πρώτο γονίδιο (*pgdA*) που κωδικοποιεί για μια απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης μελετήθηκε στον οργανισμό *S. pneumoniae* [14].

Ο *Streptococcus pneumoniae* τροποποιεί τις σακχαρικές του αλυσίδες απακετυλιώνοντας κατάλοιπα GlcNAc της πεπτιδογλυκάνης, με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητά του στη δράση της λυσοζύμης [14]. Μελέτες έδειξαν ότι απενεργοποίηση του γονιδίου *pgdA* οδήγησε σε τροποποίηση της δομής της πεπτιδογλυκάνης και υπερευαισθησία στη λυσοζύμη. Επίσης, ενδοπεριτονιακές ενέσεις σε ποντικούς με το συγκεκριμένο στέλεχος πνευμονιόκοκκου (Δ *pgdA*) είχαν ως αποτέλεσμα μείωση της παθογένειάς του [20].

Τα πρώτα δεδομένα σχετικά με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης προήλθαν από τη μελέτη δύο ανασυνδυασμένων ενζύμων του *Bacillus cereus*. Τα ανασυνδυασμένα ένζυμα μπορούσαν να απακετυλιώσουν υποστρώματα ολιγομερών GlcNAc, υποστρώματα πεπτιδογλυκάνης από *B. subtilis* και *H. pylori* και γλυκολ-χιτίνη [15].

Η N-απακετυλίωση είναι η κύρια τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης και στο βακτήριο *Listeria monocytogenes*, δίνοντας τη δυνατότητα στο συγκεκριμένο παθογόνο να διαφεύγει του μηχανισμού άμυνας του ανθρώπου και ως εκ τούτου να εισβάλλει στο ανοσοποιητικό του σύστημα. Απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης στη *Listeria*, οδήγησε σε ευαισθησία του μεταλλάγματος στη δράση της λυσοζύμης. [16].

Ο *S. suis* αποτελεί κύριο παθογόνο των χοίρων και φορέα ζωνοσογόνων νόσων. Πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου *pgdA*, που είναι υπεύθυνο για την N-απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης, αυξήθηκε κατά την αλληλεπίδραση του βακτηρίου με ουδετερόφυλα *in vitro*, καθώς και *in vivo*, μέσω ενέσιμης χορήγησης σε ποντικούς, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι ο *S. suis* ενισχύει την απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης του υπό τις συνθήκες αυτές [19].

Οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης σχετίζονται άμεσα και με τη βλάστηση των σπορίων βακτηρίων, όπως του *B. anthracis* [21,22]. Παράδειγμα αποτελεί η δράση της PdaA από τον *B. subtilis* [23], που συμμετέχει στη μετατροπή του μουραμικού οξέος σε μουραμική δ-λακτάμη των βακτηριακών σπορίων. Το ένζυμο PdaA δρα συνεργατικά με μια αμιδάση της μουραμοϋλ-L-αλανίνης, η οποία καταλύει την

υδρόλυση των πλευρικών πεπτιδίων από τα κατάλοιπα MurNAc. Κατόπιν, ακολουθεί η N-απακετυλίωση των καταλοίπων MurNAc από το ένζυμο PdaA, προς σχηματισμό μουραμικής δ-λακτάμης, το φυσικό υπόστρωμα υδρολυτικών ενζύμων των τοιχωμάτων των σπορίων. Τα υδρολυτικά ένζυμα είναι αναγκαία για την ενυδάτωση των σπορίων και κατ' επέκταση για την επιστροφή του βακτηρίου στο φυσιολογικό μεταβολικό του ρυθμό. Πειράματα μεταλλαγής ή απενεργοποίησης του γονιδίου *pdaA* έδωσαν φαινότυπο παντελούς έλλειψης μουραμικής δ-λακτάμης με αποτέλεσμα την αναστολή της βλάστησης των σπορίων [21,22].

Η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης σε άλλα παθογόνα βακτήρια υποδεικνύει ότι η απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί έναν γενικότερο μηχανισμό των βακτηρίων προκειμένου να επιτεθούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Από τις παραπάνω μελέτες είναι κατανοητό ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης αποτελούν στόχους αντιβιοτικών φαρμάκων, όπως αποδείχθηκε από τη μειωμένη μολυσματικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών σε διάφορα παθογόνα [15].

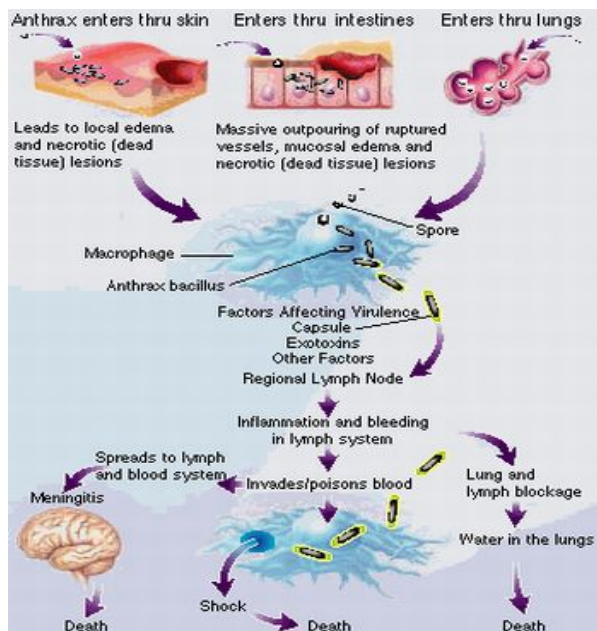
A.5. Απακετυλάσες πολυσακχαριτών

Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί τρεις απακετυλάσες πολυσακχαριτών, οι οποίες δεν δρουν στην πεπτιδογλυκάνη και τα υποστρώματά τους δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Το γονίδιο *pgdA* κωδικοποιεί μία από τις δύο υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών στο μικροοργανισμό *Streptococcus mutans* [24]. Πειράματα απενεργοποίησης του γονιδίου έδωσαν φαινότυπο μη υπερευαισθησίας στη λυσοζύμη, καταδεικνύοντας ότι η PgdA δεν δρά στην πεπτιδογλυκάνη, ενώ οι αποικίες του μεταλλάγματος είχαν διαφορετική υφή σε σχέση με τον άγριο τύπο. [24]. Ο *Streptococcus iniae* είναι ένας υδρόβιος ζωνοσογόνος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να προσβάλει και τον άνθρωπο μέσω των ψαριών. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Pdi, μία υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών από τον *S. iniae*, σχετίζεται με την παθογένειά του, καθώς πειράματα μεταλλαξογένεσης στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, έδωσαν φαινότυπο ανθεκτικότητας στη λυσοζύμη [25]. Τέλος, πρόσφατες εκτιμήσεις σχετικά με το ρόλο των βακτηριακών απακετυλασών στην παθογένεια περιλαμβάνουν και το μικροοργανισμό *Staphylococcus epidermis*. Έρευνες έδειξαν ότι η απακετυλίωση πολυσακχαριτών

στον *S. epidermis* είναι ζωτικής σημασίας για την ανθεκτικότητά του απέναντι στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή [26].

A.6. Το βακτήριο *Bacillus anthracis*

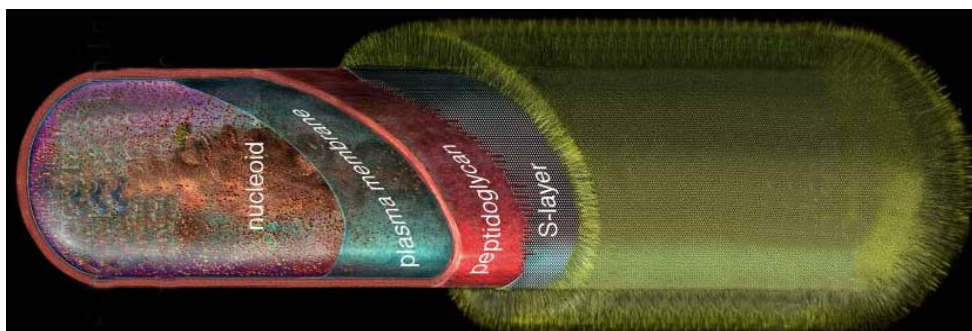
Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Bacillus anthracis* ανήκει στα Gram+ βακτήρια τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια και είναι υπεύθυνος για την ασθένεια του άνθρακα [27]. Προσβολή του ξενιστή από αυτό το βακτήριο προκαλεί τρεις μορφές νόσου: την δερματική, την πνευμονική και την εντερική. Η δερματική μορφή είναι ήπια προκαλώντας τις περισσότερες φορές τοπικά οιδήματα, ενώ η πνευμονική και εντερική μορφή είναι συνήθως θνησιγόνες. Τα ενδοσπόρια του *B. anthracis* προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα του ξενιστή όπου και ξεκινά η διαδικασία της βλάστησης. Τα βακτήρια στην συνέχεια ελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος όπου και πολλαπλασιάζονται, με αποτέλεσμα την πρόκληση σηπτικού σοκ, αναπνευστική καταπόνηση, οργανική ανεπάρκεια και τελικά το θάνατο (Εικόνα 5) [28]. Τα ενδοσπόρια του *B. anthracis* μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως βιολογικό όπλο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ταχυδρομικά γράμματα που εστάλησαν στις ΗΠΑ μετά το τρομοκρατικό χτύπημα που συνέβη το 2001.



Εικόνα 5. Εναλλακτικά μονοπάτια παθογένειας του *B. anthracis* στον άνθρωπο.

A.6.1. Βλαστητικά κύτταρα

Ο *B. anthracis* μπορεί να συνυπάρξει σε 2 μορφές, αυτή του βλαστητικού κυττάρου και του ενδοσπορίου. Στο εσωτερικό του βλαστητικού κυττάρου (Εικόνα 6) βρίσκεται ο πυρήνας ο οποίος περιέχει το γενετικό υλικό, και περιβάλλεται από την πλασματική μεμβράνη και ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Ο *B. anthracis* διαθέτει επίσης ένα πολυμερές, τον ουδέτερο πολυσακχαρίτη, που τον διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Bacillus*. Ο ουδέτερος πολυσακχαρίτης αποτελείται από γαλακτόζη, N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη και N-ακετυλ-μαννοζαμίνη και είναι απαραίτητος προκειμένου να αγκυροβολήσουν σε αυτόν αυτολυτικά ένζυμα και έτσι να γίνει η διχοτόμηση του κυτταρικού τοιχώματος κατά την κυτταρική διαίρεση. Ο ουδέτερος πολυσακχαρίτης είναι τροποποιημένος με κατάλοιπα πυροσταφυλικού οξέος και με τον τρόπο αυτό αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες οι οποίες αγκυροβολούν στην στοιβάδα-S. Η πρωτεϊνικής φύσεως στοιβάδα-S (S-layer) αποτελείται από πρωτεΐνες. Έχειδειχθεί ότι η συγκεκριμένη στοιβάδα συμβάλλει στη διαφυγή του βακτηρίου από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Ο *B. anthracis* έχει επίσης μια μοναδική κάψουλα η οποία αποτελείται από πολυ-D-γλουταμικό οξύ. Ο παθογόνος παράγοντας που διαχωρίζει τον *B. anthracis* από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Bacillus* κωδικοποιείται σε δύο πλασμίδια, το pXO1 (κωδικοποιεί την τοξίνη του άνθρακα) και το pXO2 (κωδικοποιεί τα γονίδια της κάψουλας) Η κάψουλα προστατεύει το εκβλαστημένο βακτήριο το οποίο έχει υπεισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος από τη διαδικασία της φαγοκύτωσης. Η τοξίνη του άνθρακα αποτελείται από τρία συστατικά, ένα προστατευτικό αντιγόνο (PA), ένα θνησιγόνο παράγοντα (LF, μεταλλοπρωτεάση) και ένα παράγοντα οιδήματος (EF, αδενυλική κυκλάση εξαρτημένη από την καλμοδουλίνη) [27,28].



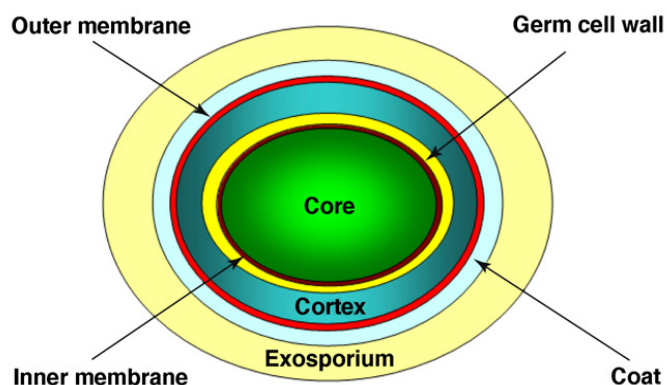
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής του βλαστητικού κυττάρου του *B. anthracis*.

A.6.2. Ενδοσπόρια

Τα ενδοσπόρια σχηματίζονται από βλασθητικά κύτταρα σε απάντηση στα περιβαλλοντικά σήματα που υποδεικνύουν ένα περιορισμένο παράγοντα για βλαστική ανάπτυξη, όπως εξάντληση ενός βασικού θρεπτικού. Ονομάζονται έτσι, επειδή σχηματίζονται ενδοκυτταρικά, παρά το γεγονός ότι απελευθερώνονται σταδιακά από το μητρικό κύτταρο (σποράγγειο) ως ελεύθερα σπόρια. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ο πιο ανθεκτικός τύπος κυττάρου στη φύση και μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα για μεγάλες χρονικές περιόδους [2,29]. Τα ώριμα σπόρια είναι πάρα πολύ ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές πιέσεις όπως υψηλή θερμοκρασία, ακτινοβολία, οξέα, κλπ. Διατηρούν τη βιωσιμότητά τους επ' αόριστον, ώστε κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, αναπτύσσονται σε βλασθητικά κύτταρα. Ο σχηματισμός των ενδοσπορίων αποτελεί μία σύνθετη μορφή ανάπτυξης σε ένα σχετικά απλό (προκαρυωτικό) κύτταρο [2].

Η δομή του ενδοσπορίου (Εικόνα 7) διαφέρει από την αντίστοιχη των βλασθητικών κυττάρων. Εξωτερικά υπάρχει το εξωσπόριο, μία στοιβάδα που αποτελείται από διάφορες πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η λειτουργία του δεν είναι ακόμη γνωστή, ωστόσο συνεισφέρει στην παθογένεια των σπορίων. Ακολούθως υπάρχει μία ακόμη στοιβάδα η οποία λειτουργεί σαν κάλυμμα (coat layer). Η συγκεκριμένη στοιβάδα αποτελείται από πρωτεΐνες και προστατεύει τα σπόρια από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Αμέσως μετά υπάρχει η εξωτερική διλιπιδική μεμβράνη η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του ενδοσπορίου. Κάτω από την εξωτερική μεμβράνη υπάρχει ο φλοιός (cortex) ο οποίος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη. Ωστόσο υπάρχουν δύο διαφοροποιήσεις, η ύπαρξη καταλοίπων μουραμικής-δ-λακτάμης και μουραμικού οξέος συνδεδεμένου μόνο με κατάλοιπο αλανίνης (αντί του πενταπεπτιδίου), που απουσιάζουν στην πεπτιδογλυκάνη των βλασθητικών κυττάρων. Η ύπαρξη στη συνέχεια του βλασθητικού κυτταρικού τοιχώματος (germ cell wall), το οποίο αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη, είναι πολύ σημαντική καθώς θα αποτελέσει το κυτταρικό τοίχωμα για τα μελλοντικά βλασθητικά κύτταρα. Ακολούθως υπάρχει η εσωτερική διλιπιδική μεμβράνη, η οποία έχει χαμηλή διαπερατότητα σε μικρά μόρια και συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των σπορίων σε ορισμένα χημικά μόρια. Τέλος στο εσωτερικό βρίσκεται ο πυρήνας (core), ο οποίος περιέχει το γενετικό υλικό. Η χαμηλή περιεκτικότητα του πυρήνα σε νερό αλλά και

τα υψηλά επίπεδα διπικολινικού οξέος και η παρουσία δισθενών κατιόντων (Ca-DPA), συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του σπορίου [29].



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της δομής του σπορίου του *B. anthracis*.

A.6.3. Βλάστηση σπορίων

Αν και τα σπόρια μπορούν να παραμείνουν σε αδρανή κατάσταση για μεγάλη χρονική περίοδο, η προσθήκη συγκεκριμένων θρεπτικών στο μέσο ανάπτυξης προκαλεί την βλάστησή τους. Τα θρεπτικά που προκαλούν την βλάστηση των σπορίων είναι συγκεκριμένα για το κάθε στέλεχος ή είδος που δημιουργεί σπόρια. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά προσδένονται σε ειδικές πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη των σπορίων που ονομάζονται υποδοχείς βλάστησης (germinant receptors) [29].

Στον *B. anthracis* έχουν βρεθεί πέντε υποδοχείς βλάστησης (GerH, GerK, GerL, GerS και GerX) [30]. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των σπορίων του βακτηρίου και ενεργοποιούνται παρουσία θρεπτικών συστατικών πλούσιων σε L-αλανίνη και ινοσίνη. Η πρόσδεση των θρεπτικών στους υποδοχείς βλάστησης προκαλεί την απελευθέρωση μονοσθενών κατιόντων (H^+ , K^+) και διπικολινικού οξέος. Η απελευθέρωση των συγκεκριμένων ιόντων εξισορροπείται με την πρόσληψη νερού, όμως η αύξηση σε περιεκτικότητα νερού του πυρήνα δεν είναι ικανή προκειμένου να αρχίσει η βλάστηση των σπορίων [29,30]. Ακολούθως πραγματοποιείται η υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης του φλοιού από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται GSLEs (germination-specific cortex lytic enzymes) [31].

Τα ένζυμα GSLEs είναι αυτολυσίνες που υδρολύουν το φλοιό των σπορίων αναγνωρίζοντας τα κατάλοιπα μουραμικής δ-λακτάμης. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα ένζυμα SCLEs (spore cortex lytic enzymes), τα οποία αποπολυμερίζουν την πεπτιδογλυκάνη του φλοιού και τα ένζυμα CFLEs (cortical fragment lytic enzymes), τα οποία αποδομούν τον φλοιό που έχει ήδη υδρολυθεί. Και οι δύο κατηγορίες ενζύμων έχουν βρεθεί σε πολλά βακτήρια τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια [31]. Στον *B. anthracis*, από τις τέσσερις αυτολυσίνες τύπου GSLEs που έχουν βρεθεί, τρεις ανήκουν στην κατηγορία SCLEs (CwlJ1, CwlJ2, SleB) [32,33] και μία στην κατηγορία CFLEs (SleL) [34]. Η πρωτεΐνη CwlJ1 μπορεί να επάγει από μόνη της τη βλάστηση των σπορίων και είναι ο κύριος παράγοντας στην προκαλούμενη από την απελευθέρωση διπικολινικού οξέος βλάστησή τους. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την ενζυμική της δραστηριότητα. Η CwlJ2 συνεισφέρει και αυτή στη διαδικασία της βλάστησης, όχι όμως στον ίδιο βαθμό όπως η CwlJ1 [32,33].

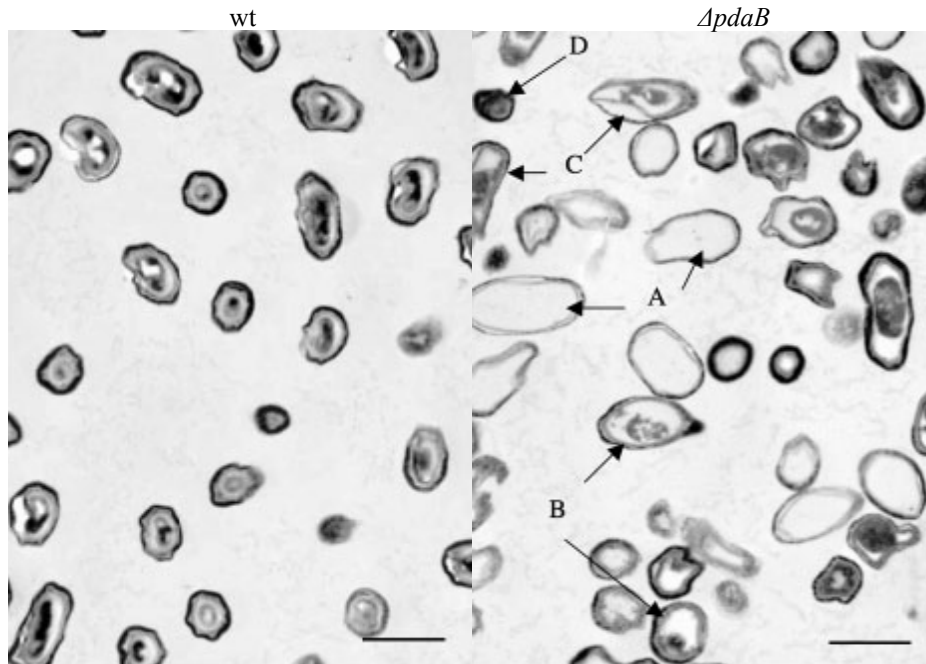
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης τροποποιούν ένα από τα σημαντικότερα πολυμερή του βακτηριακού κυττάρου με αποτέλεσμα να θεωρείται πιθανή η εμπλοκή τους σε διαδικασίες που σχετίζονται με την παθογένεια του βακτηρίου. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τα συγκεκριμένα ένζυμα δίνουν έναυσμα για τη διερεύνηση άγνωστων πτυχών της δράσης τους, ώστε να δοθεί η δυνατότητα για τη χρήση τους σε συγκεκριμένες εφαρμογές [3].

Ανάλυση του γονιδιώματος του οργανισμού *B. anthracis* αποκάλυψε την ύπαρξη 11 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών, από τις οποίες 6 είναι υποθετικές απακετυλάσες N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης και οι υπόλοιπες 5 υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών [15].

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ενζύμου BA0150 από τον παθογόνο μικροοργανισμό *B. anthracis*. Το συγκεκριμένο ένζυμο ανήκει στην κατηγορία των υποθετικών απακετυλασών πολυσακχαριτών και εμφανίζει 61% ταυτότητα με το ένζυμο PdaB, μία υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών από τον οργανισμό *B. subtilis*. Πειράματα απενεργοποίησης του γονιδίου *pdaB* είχαν ως αποτέλεσμα τον ελλειπή σχηματισμό σπορίων. Συγκεκριμένα, η δομή των σπορίων του μεταλλαγμένου στελέχους διέφερε από την αντίστοιχη του αγρίου τύπου (Εικόνα 8) και παρατηρήθηκε αναστολή στη βλάστησή τους οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η PdaB είναι απαραίτητη για τη βλάστηση των σπορίων [35].

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια μελέτη σχετικά με το βιοχημικό χαρακτηρισμό και το βιολογικό ρόλο της PdaB. Στην παρούσα εργασία έγιναν προκαταρκτικά πειράματα βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου για την ταυτοποίηση του υποστρώματός του. Τέλος, για να διευκρινιστεί ο βιολογικός ρόλος του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής ανάλυσης (με τη μέθοδο του knock out) και κυτταρικού εντοπισμού.



Εικόνα 8. Απεικόνιση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σπορίων του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους *ΔpdaB*. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος παρατηρήθηκε ετερογένεια στον πληθυσμό των σπορίων: άδεια σπόρια που περιέχουν μόνο το κάλυμμα (A), σπόρια χωρίς το φλοιό (B), μη καλοσχηματισμένα σπόρια (C), μικρός αριθμός σπορίων αγρίου τύπου (D).

Ο χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου ενζύμου θα αποτελέσει ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας των απακετυλασών πολυσακχαριτών αλλά και την περαιτέρω μελέτη της *in vivo* δράσης και του ρόλου τους στη φυσιολογία και την παθογένεια του *B. anthracis*. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου του ενζύμου BA0150 με την προοπτική ανάπτυξης αναστολέων του ενζύμου με αντιβακτηριακή δραστηριότητα.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. Υλικά

Οι νουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB).

Το βακτηριακό στέλεχος *B. anthracis* 7702 (pXO1⁺, pXO2⁻), το στέλεχος *E. coli* HB101, και ο πλασμιδιακός φορέας pUC19 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προήλθαν από το εργαστήριο της Δρ. Agnes Fouet, Ινστιτούτο Παστέρ, Γαλλία.

Τα στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν BL21 (DE3) pLys, DH5a, DH10b και προήλθαν από την εταιρεία Novagen.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pET26b και pGEM-T Easy που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση και την απαλοιφή του γονιδίου *ba0150* προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Novagen και Promega αντίστοιχα.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων καθώς και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα προήλθαν από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology, New England Biolabs GmbH, Roche και FINNZYMES.

Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν της εταιρείας Difco Laboratories και Merck. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich Inc., Promega Corporation, Boehringer Mannheim GmbH, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Qiagen Ltd.

Η προμήθεια των χρωματογραφικών υλικών Ni-NTA agarose και Sephacryl S200 HR έγινε από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH.

Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου ήταν από την εταιρεία Fermentas Life Sciences.

Η φλουορεσκαμίνη (fluorescamine), που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινών, προμηθεύτηκε από την εταιρεία BioChemika. Η προμήθεια

N-ακετυλολιγιοσάκχαριτών έγινε από την εταιρεία Sigma Chemicals και την Seikagaku Corporation.

Τα φίλτρα υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν (YM10) ήταν από την Amicon. Ο [H³] οξικός ανυδρίτης προμηθεύτηκε από την New England Nuclear.

Η συσκευή FLUOstar Galaxy προμηθεύτηκε από την εταιρεία BMG Labtechnologies GmbH.

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έγιναν με τη χρήση μικροσκοπίων Nikon ECLIPSE E800 και Olympus BH-2.

B.2. Μέθοδοι

B.2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου *ba0150*

Το γονίδιο *ba0150* απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του οργανισμού *Bacillus anthracis* 7702. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA και εκκινητές τα oligονουκλεοτίδια: *ba0150-For* (5'-CCC ATA TGT TTT TCA ACT GCT ACA GGG-3') (με ενσωματωμένη την περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση NdeI) και *ba0150-Rev* (5'-CCC TCG AGT TGA ACA TCT TTA CTT TTCG-3') (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την XhoI ενδονουκλεάση) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό και απομόνωση του. Στη συνέχεια, το απομονωμένο γονίδιο καθαρίστηκε ώστε να μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα.

Για την ενσωμάτωση του γονιδίου *ba0150* στον πλασμιδιακό φορέα pET26b ήταν αναγκαία η τροποποίηση του φορέα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν συμβατά άκρα μεταξύ τους κατά την αντίδραση συγκόλλησης. Έτσι πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και XhoI.

Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα, έγινε αντίδραση συγκόλλησης στους 16 °C για 16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής:

- 50-100 ng φορέα

- ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπ όψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για τυφλά άκρα είναι 5-10 : 1.
- 2 μl 1× ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10× : 0.5 M Tris pH 7.4, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M DTT, 10 mM spermidine, 10 mM ATP, 1 mg/ml BSA)
- 2 μl ATP (20mM)
- 1 μl T4 DNA λιγάση (3-5units)
- H₂O μέχρι 20μl τελικό όγκο

Η πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό BL21-DH5a κυττάρων, τα μετασχηματισμένα κύτταρα ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση του γονιδίου ενδιαφέροντος μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης των αποικιών (Colony PCR) και μετά την απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής το ένθεμα στάλθηκε για νουκλεοτιδική αλληλούχηση, όπου διαπιστώθηκε η ένθεση του γονιδίου στο σωστό σημείο, δηλαδή σε θέση όπου μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με βάση το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

B.2.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* με την πλασμιδιακή κατασκευή pET26b/ba0150

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα ακολούθησε ο μετασχηματισμός κυττάρων BL21 (DE3) pLys *E. coli*. Η διαδικασία ήταν η εξής:

- Μεταφορά των δεκτικών κυττάρων από τους -80 °C στον πάγο.
- Προσθήκη του DNA στα κύτταρα (όχι περισσότερο από 200 ng).
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Θερμικό σοκ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42 °C για 90 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 900 μl LB και επώαση για 45 λεπτά στους 37 °C.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3500 rpm.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων.
- Άπλωμα σε τριβλίο με LB και αντιβιοτικά επιλογής (καναμικίνη, χλωραμφαινικόλη).
- Επώαση στους 37 °C για 16 ώρες.

Το μετασηματισμένο στέλεχος διατηρήθηκε στους -80°C σε 50% γλυκερόλη τελική συγκέντρωση μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

B.2.3. Υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BA0150 σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) pLys

Για την υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός σε κύτταρα BL21 (DE3) pLYS *E. coli* με την πλασμιδιακή κατασκευή. Από το τρυβλίο με τα μετασηματισμένα κύτταρα συλλέχθηκε μοναδική αποικία με την οποία μολύνθηκε υγρή καλλιέργεια LB/καναμικίνη/χλωραμφαινικόλη (για 1 lt διαλύματος Luria-Bertani Medium: 10 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 10 g NaCl και προσθήκη διαλύματος καναμικίνης και χλωραμφαινικόλης σε τελικές συγκεντρώσεις 100 $\mu\text{g/ml}$ και 34 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός από την προκαλλιέργεια σε 1 lt φρέσκου θρεπτικού μέσου LB/καναμικίνη/χλωραμφαινικόλη (αραίωση 1/50) και ακολούθησε επώαση στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει το 0.6. Στην καλλιέργεια προστέθηκε επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,3 mM και ακολούθησε επώαση για 7 ώρες στους 30°C . Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε (20 λεπτά στις 6.500 rpm, στους 4°C), συλλέχθηκε η βακτηριακή πελέττα και αποθηκεύθηκε στους -20°C . Από σύνολο 1 lt βακτηριακής καλλιέργειας ελήφθησαν περίπου 3,7 g πάστα κυττάρων.

B.2.4. Απομόνωση του ενζύμου BA0150

Εκχύλιση:

Η πάστα κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (1g πάστας σε 3 ml διαλύματος): 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,3 mg/ml λυσοζύμη. Ακολούθησε επώαση στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 2,5 ώρες. Ανά 30 min γινόταν προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Μετά από 45 min έγινε προσθήκη λυσοζύμης τόση ώστε να διπλασιαστεί η αρχική της συγκέντρωση στο διάλυμα. Μετά από επώαση 1,5 ώρα στον πάγο, έγινε προσθήκη του ενζύμου DNase σε τελική συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$, αλλά και MgCl_2 10 mM. Μετά από 1 ώρα επώασης, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 20 λεπτά στις 10.000 x g, ώστε

να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα και να συλλεχθεί το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολούθως, η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε 15 ml διάλυμα: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 2% Triton x 100, έτσι ώστε να σπάσουν οι μεμβράνες και να ληφθεί η πρωτεΐνη. Το δείγμα επαναδιαλύθηκε για 4 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 14.000 rpm στους 4 °C, όπου και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθως το υπερκείμενο υπέστη διαπίδυση σε διάλυμα: 50 mM Tris –HCl pH 7.6, 500 mM NaCl (διάλυμα A) για 16 ώρες στους 4 °C.

Χρωματογραφία σε προσροφητή Ni-NTA agarose:

Το πρωτεϊνικό δείγμα αναμείχθηκε με 12,5 ml προσροφητή Ni-NTA agarose για 2 ώρες στους 4 °C, το οποίο με τη σειρά του είχε εξισορροπηθεί με το διάλυμα A. Ακολούθησε ο εγκιβωτισμός της στήλης με το υλικό και το πρωτεϊνικό δείγμα μαζί, όπου και συλλέχθηκε 15 ml νεκρός όγκος (void). Στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση με 10 όγκους στήλης με διάλυμα: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, με ταχύτητα 2 ml/min. Ύστερα εφαρμόστηκε διαβαθμισμένη έκπλυση 0-500 mM ιμιδαζόλιο με 10 όγκους στήλης με διάλυμα που περιείχε: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 500 mM NaCl, 500 mM ιμιδαζόλιο, με ταχύτητα 2 ml/min. Κατά τη διάρκεια της έκπλυσης, οι πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν ακροφύσιο ιστιδινών αποσυνδέονται από τη στήλη Ni-NTA agarose, καθώς δεν μπορούν να ανταγωνιστούν για τις θέσεις πρόσδεσης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, αναμίχθηκαν και υπέστησαν διαπίδυση σε διάλυμα με σύσταση: 25 mM Tris-HCl pH 7.6 για 16 ώρες στους 4 °C.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε προσροφητή Sephacryl S200 HR

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος αποτέλεσε το τελευταίο στάδιο καθαρισμού του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Αφού η κολώνα εξισορροπήθηκε με διάλυμα 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 200mM NaCl, φορτώθηκε το πρωτεϊνικό δείγμα, ακολούθησε έκπλυση με το διάλυμα εξισορρόπησης (1 όγκος στήλης) και συλλέχθηκαν τα εκλουόμενα κλάσματα. Τα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα

ενζύμου ελέγχθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκεντρώθηκαν και διατηρήθηκαν στους 4 °C.

B.2.5. Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης BA0150

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της BA0150 χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές μέθοδοι που κάθε μια παρείχε διαφορετικά πλεονεκτήματα ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας στην οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Ραδιομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε υπόστρωμα ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης.

Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε γλυκολ-χιτίνη (υδατοδιαλυτό παράγωγο της χιτίνης). Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί η ποσότητα ραδιοσημασμένου οξικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την ενζυμική απακετυλίωση της ραδιοσημασμένης γλυκολ-χιτίνης (Σχήμα 1).



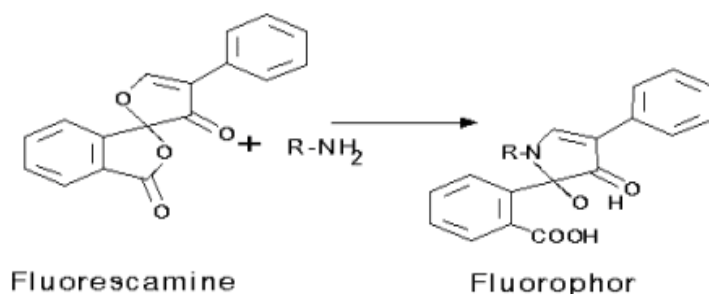
Σχήμα 1. Αντίδραση παραγωγής ραδιοσημασμένου οξικού οξέος από ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη.

Η αντίδραση απακετυλίωσης διεξήχθη σε 50 μl τελικό όγκο. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: 25 mM Hepes, pH 7.6, 25 mM MES pH 5.8 και 25 mM Tris-HCl pH 8.8. Τα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν (CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, NiSO₄) είχαν τελική συγκέντρωση 0.75 mM. Τα δείγματα επώαστηκαν για διαφορετικές χρονικές περιόδους και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη 100 μl διαλύματος 20 mM HCl/ 50 mM CH₃COOH. Στη συνέχεια, το οξικό οξύ εκχυλίστηκε από την υδατική φάση με 500 μl οξικού αιθυλεστέρα και μετρήθηκε με σπινθηρομετρία.

Μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε χιτοολιγομερή, μέσω σήμανσης των πρωτοταγών αμινών που προκύπτουν από την αντίδραση.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα μόριο που ονομάζεται φλουορεσκαμίνη και έχει την ικανότητα να προσδένεται σε πρωτοταγείς αμίνες δημιουργώντας ένα ιδιαίτερα σταθερό φθορίζον σύμπλοκο (Εικόνα 9). Οι πρωτοταγείς αμίνες παράγονται από την αντίδραση απακετυλίωσης των χιτοολιγομερών. Η παραγωγή πρωτοταγών αμινών ποσοτικοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκοζαμίνης.



Εικόνα 9. Αντίδραση της φλουορεσκαμίνης με πρωτοταγείς αμινομάδες.

Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί ο φθορισμός που παράγεται με την ένωση της φλουορεσκαμίνης με τις πρωτοταγείς αμίνες των χιτοολιγομερών που προέκυψαν από την αντίδραση (Σχήμα 2).

Η αντίδραση απακετυλίωσης διεξήχθη σε 100μl τελικό όγκο, με ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM HEPES pH 7.6, 0.5 mM CoCl₂, 453 nmol υποστρώματος και 6,3μg ενζύμου. Ο χρόνος επώασης ήταν 12 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C.

Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη 100 μl 0.4 M διαλύματος βορικού οξέος pH 8.5. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 μl φλουορεσκαμίνης σε DMF σε συγκέντρωση 2 mg/ml και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σήμανσης διεκόπη με προσθήκη 150 μl DMF/H₂O (1:1). Ο

φθορισμός ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του Fluostar Galaxy (BMG laboratories).



Σχήμα 2. Αντίδραση σήμανσης των πρωτοταγών αμινών που παράγονται από την ενζυμική απακετυλίωση χιτοολιγομερών, με φλουορεσκαμίνη.

B.2.6. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση έγινε σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) πυκνότητας 12,5%, με ασυνεχή συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των διαφόρων πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου καθώς και για τον προσδιορισμό του σχετικού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης.

B.2.7. Προσδιορισμός μοριακού βάρους της BA0150

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους της απακετυλάσης BA0150 χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S200 HR.
- Ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

B.2.8. Απαλοιφή του γονιδίου *ba0150*

Για τη δημιουργία του μεταλλάγματος *Δba0150* σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 1). Το πρώτο ζεύγος είναι συμπληρωματικό για μια περιοχή ανοδικά του προς διαγραφή γονιδίου και το δεύτερο ζεύγος είναι συμπληρωματικό μίας περιοχής καθοδικά.

Up-0150For	5'-GGAACTCCTTTCAGCACAGTTCTCTCTTTT-3'
Up-0150Rev	5'-TCCCCCGGGATCGTCTTATTACATG-3'
Down-0150For	5'-TCCCCCGGGCCTTGTAAATAACTTTAG-3'
Down-0150Rev	5'-TAAGTGGCAGCCGAAGCCACCTTT-3'

Πίνακας 1. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την απαλοιφή του *ba0150*.

Με αντίδραση πολλαπλασιασμού (PCR) απομονώθηκαν οι επιθυμητές περιοχές ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γένωμα του στελέχους 7702 του βακτηρίου *B. anthracis* (pXO1⁺, pXO2⁻) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM. Η αντίδραση πολλαπλασιασμού έγινε με την χρήση της πολυμεράσης High Fidelity Taq Polymerase, η οποία αφήνει προεξέχοντα κατάλοιπα αδερίνης. Ο φορέας pGEM είναι κατάλληλα διαμορφωμένος για να διαθέτει προεξέχοντα άκρα θυμίνης. Συνεπώς, ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης για 16 ώρες στους 4 °C. Μετά από μετασηματισμό των αντιδράσεων συγκόλλησης σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a, η επιλογή των θετικών αποικιών έγινε με βάση το χρώμα τους (blue/white selection). Μετά από έλεγχο με αντίδραση πολλαπλασιασμού, τόσο για την ύπαρξη του ενθέματος όσο και του προσανατολισμού των ενθεμάτων στο φορέα, έγινε η επιλογή των σωστών αποικιών.

Οι σωστές αποικίες απομονώθηκαν και έπειτα ακολούθησαν αντιδράσεις πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Για το γονίδιο *ba0150* έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα SmaI/PstI τόσο για την πλασμιδιακή κατασκευή pGEM/0150down (η πλασμιδιακή κατασκευή γίνεται ευθύγραμμη) όσο και για την πλασμιδιακή κατασκευή pGEM/0150up (απομόνωση μόνο του ενθέματος). Ακολούθησαν αντιδράσεις συγκόλλησης για τη δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής που διέθετε σαν ένθεμα την ανοδική περιοχή σε συνέχεια και ίδιο προσανατολισμό με την καθοδική περιοχή του γονιδίου. Μετά από μετασηματισμό των αντιδράσεων συγκόλλησης σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH10b, έγινε επιλογή των θετικών κλώνων με βάση το χρώμα τους (blue/white selection). Ύστερα από έλεγχο

των θετικών αποικιών με αντίδραση πολλαπλασιασμού, ακολούθησε η εισαγωγή κασέτας ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη.

Έχουν δημιουργηθεί τρεις κασέτες ανθεκτικότητας στην σπεκτινομυκίνη, ενσωματωμένες στον πλασμιδιακό φορέα pUC19 (Πίνακας 2).

SPC-H+2 [°]	TTTTAGTTGACTTCATTTATATTTTCCTCCTTAGCCTAATTGAGAGAAGTTTC TAT
SPC-H+1 [°]	TTTTAGTTGACTTCATTTATATTTTCCTCCTTAGCCTAATTGAGAGAAGTTTCT AT
SPC-H+3 [°]	TTTTAGTTGACCATTTATATTTTCCTCCTTAGCCTAATTGAGAGAAGTTTCTA T

Πίνακας 2. Νουκλεοτιδικές κασέτες ανθεκτικότητας στην σπεκτινομυκίνη.

Μετά από μελέτη του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της καθοδικής περιοχής της προς διαγραφή αλληλουχίας, έγινε επιλογή της κασέτας SPC-H+3[°]. Η κασέτα SPC-H+3[°] τροποποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο HincII, ενώ για την πλασμιδιακή κατασκευή pGEM/0150 up down πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με το περιοριστικό ένζυμο SmaI. Είναι γνωστό ότι τα δύο αυτά περιοριστικά ένζυμα δημιουργούν τυφλά άκρα επιτρέποντας την πραγματοποίηση αντίδρασης συγκόλλησης τυφλών άκρων (blunt end ligation). Η αντίδραση συγκόλλησης έγινε στους 4 °C για 16 ώρες. Μετά από μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH10b και έλεγχο των θετικών αποικιών με αντίδραση πολλαπλασιασμού, έγινε απομόνωση της σωστής πλασμιδιακής κατασκευής pGEM/0150 up spec down.

Τελευταίο βήμα αποτέλεσε η μεταφορά του τελικού ενθέματος (up spec down) από τον πλασμιδιακό φορέα pGEM στον φορέα pAT113 ο οποίος είναι ειδικός για σύζευξη και απενεργοποίηση γονιδίων στο βακτήριο *B. anthracis* (conjugative suicide plasmid used for gene inactivation in *B. anthracis*). Η πλασμιδιακή κατασκευή pGEM/0150 up spec down και ο φορέας pAT113 τροποποιήθηκαν με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και ακολούθως πραγματοποιήθηκε αντίδραση συγκόλλησης στους 4 °C για 16 ώρες. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* DH10b, ενώ η επιλογή σε αυτό το στάδιο έγινε με βάση την ανθεκτικότητα των

κλώνων στο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας του φορέα (καναμυκίνη) και στο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας της κασέτας (σπεκτινομυκίνη).

Το στάδιο ελέγχου των θετικών αποικιών με αντίδραση πολλαπλασιασμού ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* HB101. Η επιλογή έγινε με βάση την ανθεκτικότητα των κλώνων τόσο στην αμικικιλίνη (το γονίδιο βρίσκεται στον φορέα) όσο και στη σπεκτινομυκίνη (κασέτα).

B.2.9. Σύζευξη με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*

Η διαδικασία ετερόλογης σύζευξης ήταν η εξής: Αρχικά έγινε προκαλλιέργεια για 16 ώρες στους 37 °C με 5 ml θρεπτικού μέσου (LB) στο οποίο είχαν προστεθεί τα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και σπεκτινομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml, με την κυτταρική σειρά *E. coli* HB101, η οποία έχει μετασχηματιστεί με τις 3 πλασμιδιακές κατασκευές (προκαλλιέργεια α) και 5 ml θρεπτικού μέσου (BHI) στο οποίο είχε προστεθεί 0.5% γλυκερόλη τελική συγκέντρωση (για να καθυστερήσει η διαδικασία της σπορίωσης) με ένα πληθυσμό κυττάρων του στελέχους 7702 του *B. anthracis* (προκαλλιέργεια β). Ακολούθησε εμβολιασμός 50 ml θρεπτικού μέσου (LB) με την προκαλλιέργεια α και 20 ml θρεπτικού μέσου (BHI) με την προκαλλιέργεια β, έτσι ώστε η αρχική οπτική πυκνότητα εκκίνησης της καλλιέργειας στα 600 nm να είναι 0.05. Έπειτα έγινε επώαση των δύο καλλιεργειών στους 37 °C μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να γίνει 0.5. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* HB101 (5 min/ 4500 rpm/RT). Η βακτηριακή πελέτα εκπλύθηκε με 20 ml θρεπτικού μέσου για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του αντιβιοτικού. Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρήθηκε και η πελέτα επαναδιαλύθηκε με 20 ml θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια προστέθηκε στο εναιώρημα 5 ml από την καλλιέργεια του βακτηρίου *B. anthracis* και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml θρεπτικού μέσου (BHI) και τοποθετήθηκε σε δύο φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Millipore, HA, 0,45 µm) τα οποία βρίσκονταν σε δύο πιάτα στερεού θρεπτικού μέσου (BHI). Ακολούθησε επώαση στους 37 °C τουλάχιστον για 16 ώρες. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα δύο φίλτρα συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με ένα διάλυμα κολισινών (colicines D και E3) συνολικής ποσότητας 5 ml (επώαση 15 λεπτά στους 37 °C). Η διαδικασία αυτή θεωρείται απαραίτητη για την λύση των κυττάρων *E. coli*

τα οποία διαθέτουν την πλασμιδιακή κατασκευή άρα θα είναι και ανθεκτικά στην σπεκτινομυκίνη. Το τελικό διάλυμα απλώθηκε σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο (BHI) στο οποίο είχε απλωθεί το αντιβιοτικό σπεκτινομυκίνη. Ύστερα από την παραπάνω διαδικασία, οι αποικίες που προέκυψαν από την επώαση τουλάχιστον 18 ωρών στους 37 °C, οφείλουν να αντιστοιχούν σε κύτταρα του βακτηρίου *B. anthracis*, στο γένωμα του οποίου έγινε είτε απλός ανασυνδυασμός (ανάπτυξη αποικιών στο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας του φορέα pAT113) είτε διπλός ανασυνδυασμός (ανάπτυξη αποικιών στο αντιβιοτικό ανθεκτικότητας της κασέτας). Μετά από έλεγχο με αντίδραση πολλαπλασιασμού των θετικών αποικιών προκύπτουν τα μεταλλάγματα στα οποία έχει διαγραφεί το γονίδιο στόχος.

B.2.10. Ευαισθησία του μεταλλάγματος στη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη

Η πειραματική διαδικασία ήταν η εξής: Από ολονύχτια προκαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο (BHI + 0.5% γλυκερόλη τελική συγκέντρωση) τόσο του μεταλλάγματος, όσο και του αγρίου τύπου βακτηριακού κυττάρου του *B. anthracis* έγινε εμβολιασμός σε 30 ml θρεπτικού μέσου SPY [60 mM K_2HPO_4 , 45 mM KH_2PO_4 , 15 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM $MgSO_4$, 2.4 mM sodium citrate, 0,2% (wt/vol) glucose, 0.2% (wt/vol) bacto-yeast extract], έτσι ώστε η οπτική πυκνότητα να έχει μία αρχική τιμή 0.05 στα 600 nm. Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε την τιμή 0.5 (εκθετική φάση) τότε φυγοκεντρήθηκαν 10 ml της κάθε καλλιέργειας στις 4.500 rpm για 5 λεπτά. Η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος το οποίο περιείχε σουκρόζη 20%, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl και έγινε παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. Στην συνέχεια προστέθηκε λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 5 μ g/ml και 10 units μουτανολυσίνη και έγινε επώαση στους 37 °C για διαφορετικές χρονικές περιόδους και ταυτόχρονη παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Αντίστοιχα, άλλα 10 ml της αρχικής καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν όταν η οπτική πυκνότητα στα 600 nm έγινε 1.2 (στατική φάση) και ακολούθησε η ίδια διαδικασία.

B.2.11. Αυτόλυση

Η διαδικασία του ελέγχου ως προς την αυτόλυση ήταν η εξής: Από ολονόχτια προκαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο (BHI+ 0.5% γλυκερόλη τελική συγκέντρωση) τόσο του μεταλλάγματος, όσο και του αγρίου τύπου βακτηριακού κυττάρου του *B. anthracis* έγινε εμβολιασμός (αραίωση 1/50) σε 30 ml θρεπτικού μέσου SPY και ακολούθησε επώαση στους 37 °C. Όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε την τιμή 0.5 (εκθετική φάση) στα 600 nm τότε φυγοκεντρήθηκαν 10 ml της κάθε καλλιέργειας στις 4.500 rpm για 5 λεπτά. Η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος SPY χωρίς σουκρόζη στο οποίο προστέθηκε διάλυμα NaN_3 σε τελικές συγκεντρώσεις 10 mM και 50 mM. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C λαμβάνοντας διαδοχικές μετρήσεις της οπτικής τους πυκνότητας.

B.2.12. Απομόνωση σπορίων

Για την απομόνωση σπορίων τόσο του μεταλλάγματος, όσο και του αγρίου τύπου βακτηριακού κυττάρου του *B. anthracis* έγινε επίστρωση (streaking) σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο SPY. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 7 ημέρες. Τα σπόρια συλλέχθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl H_2O και ακολούθησαν 5 εκπλύσεις με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8.000 rpm κάθε φορά. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 70 °C και ακολούθησαν άλλα 5 πλυσίματα με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

B.2.13. Βλάστηση σπορίων

Η διαδικασία του ελέγχου ως προς τη βλάστηση σπορίων ήταν η εξής: Σπόρια τόσο του μεταλλάγματος όσο και του αγρίου τύπου βακτηριακού κυττάρου του *B. anthracis* αραιώθηκαν σε H_2O έτσι ώστε η οπτική πυκνότητα να έχει μία αρχική τιμή 0.2 στα 600 nm. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά στους 70 °C και αμέσως μετά φυγοκέντρηση για 5 min στις 8.000 rpm. Η πελέττα από κάθε δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος L-αλανίνη 25 mM, ινοσίνη 12,5 mM και 1 ml διαλύματος υγρού θρεπτικού μέσου (BHI). Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C λαμβάνοντας διαδοχικές μετρήσεις της οπτικής τους πυκνότητας.

B.2.14. Κυτταρικός εντοπισμός (localization) της πρωτεΐνης BA0150

Για τον εντοπισμό της BA0150, δημιουργήθηκε χμιαρική κατασκευή που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης BA0150 ενωμένο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RFP (Red Fluorescent Protein). Για τη δημιουργία του συγκεκριμένου στελέχους σχεδιάστηκαν αρχικά 2 ζεύγη oligονουκλεοτιδίων (Πίνακας 3). Το πρώτο ζεύγος είναι συμπληρωματικό για μια περιοχή ανοδικά του γονιδίου *ba0150*, καθώς και ολόκληρο το γονίδιο, εκτός από το κωδικόνιο λήξης (Up-frag). Το δεύτερο ζεύγος είναι συμπληρωματικό μίας περιοχής καθοδικά, μετά το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *ba0150* (Down-frag).

Up-fragFor	5'-CGGGATCCTTGAACATCTTTACTTTTCGTA CT TG-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI)
Up-fragRev	5'-CGGAATTCAACCCAAGCAAATCATCACCTC-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI)
Down-fragFor	5'- TCCCCCGGGAGTCAAAACGAGCAGCATCC-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση XmaI)
Down-fragRev	5'-CGGGATCCTTTTTTACACATAAAAAGCTCCATTACC-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI)

Πίνακας 3. Oligονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία χμιαρικής κατασκευής

Με αντίδραση πολλαπλασιασμού (PCR) απομονώθηκαν οι επιθυμητές περιοχές χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γένωμα του στελέχους 7702 του βακτηρίου *B. anthracis* (pXO1⁺, pXO2⁻). Η αντίδραση πολλαπλασιασμού έγινε με την χρήση της πολυμεράσης Fusion Hot Start DNA Polymerase. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε πέψη των αλληλουχιών Up-frag και Down-frag με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI & EcoRI και BamHI & XmaI αντίστοιχα, ώστε να κλωνοποιηθούν οι αλληλουχίες στον πλασμιδιακό φορέα pAT113. Προηγήθηκε πέψη του φορέα pAT113 χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI & XmaI, έτσι ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλα συμβατά άκρα και ακολούθησε αντίδραση τριπλής συγκόλλησης για 16 ώρες στους 16 °C. Μετά από μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH10b και έλεγχο των θετικών αποικιών με αντίδραση πολλαπλασιασμού, έγινε απομόνωση της σωστής πλασμιδιακής κατασκευής pAT/Up-frag-Down-frag.

Για την απομόνωση της αλληλουχίας RFP από τον πλασμιδιακό φορέα pRSETB σχεδιάστηκε κατάλληλο ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 4).

RFP/For	5'-CGGGATCCATGGCCTCCTCCGAG-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI)
RFP/Rev	5'-CGGGATCCTTAGGCGCCGGTGGAGTGG-3' (με ενσωματωμένη περιοριστική θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI)

Πίνακας 4. Ολιγονουκλεοτίδια για την απομόνωση της αλληλουχίας RFP.

Με αντίδραση πολλαπλασιασμού (PCR) απομονώθηκε η επιθυμητή περιοχή χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pRSETB. Η αντίδραση πολλαπλασιασμού έγινε με την χρήση της πολυμεράσης Fusion Hot Start DNA Polymerase. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη προεξέχοντων καταλοίπων αδενίνης με τη χρήση της πολυμεράσης Taq polymerase, με σκοπό την κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGEM. Ο φορέας pGEM είναι κατάλληλα διαμορφωμένος για να διαθέτει προεξέχοντα άκρα θυμίνης. Συνεπώς, ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης για 16 ώρες στους 16 °C και μετασχηματισμός της αντίδρασης συγκόλλησης σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a. Μετά από έλεγχο με αντίδραση πολλαπλασιασμού έγινε απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής pGEM/RFP.

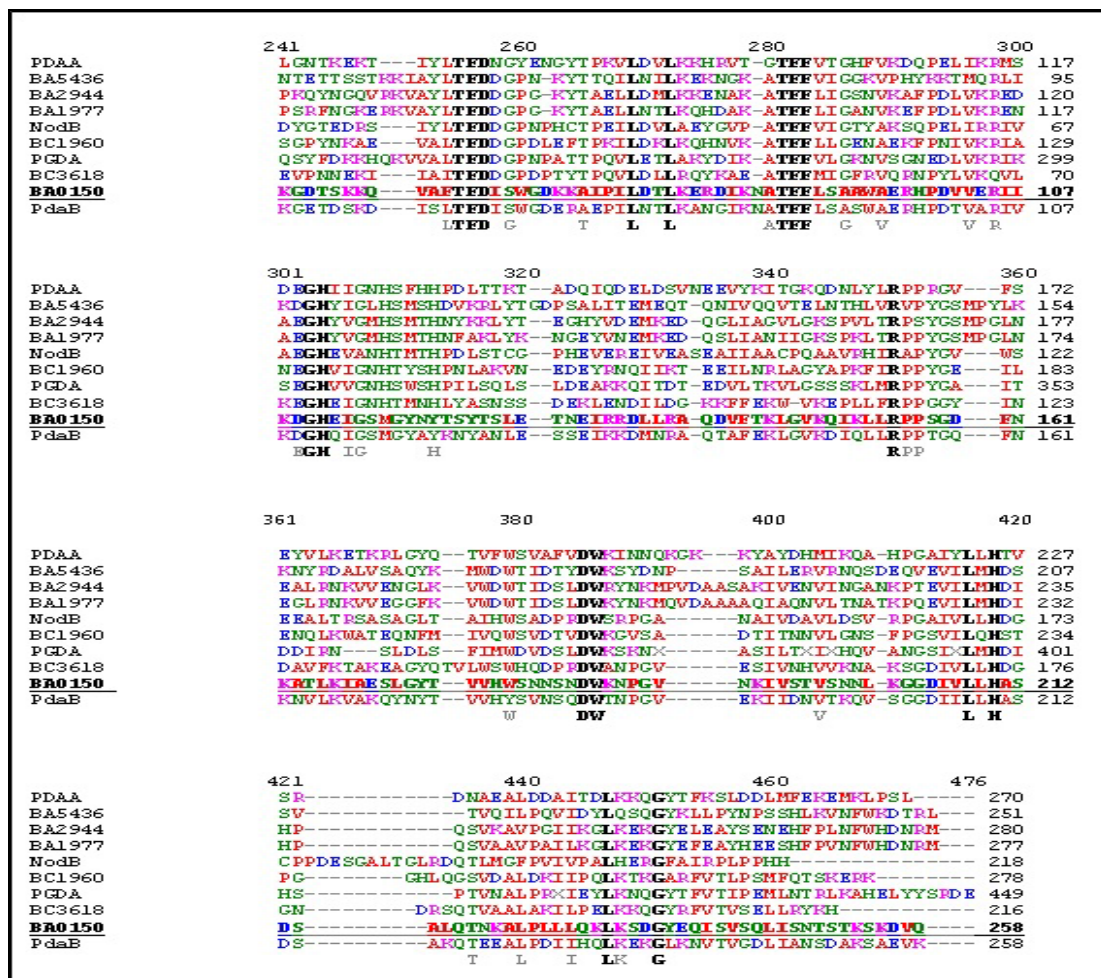
Προκειμένου να δημιουργηθεί η πλασμιδιακή κατασκευή pAT/Up-frag-rfp-Down-frag ακολούθησε η εξής διαδικασία: Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη της πλασμιδιακής κατασκευής pAT/Up-frag-Down-frag με τα περιοριστικά ένζυμα XmaI και PstI, προκειμένου να απαλειφθεί η περιοριστική θέση για το ένζυμο BamHI που περιέχει από μόνος του ο φορέας pAT113. Ακολούθησε αντίδραση συμπλήρωσης με τη χρήση Klenow με δραστικότητα εξωνουκλεάσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη της πλασμιδιακής κατασκευής pGEM/RFP με το περιοριστικό ένζυμο BamHI, με σκοπό την επιλογή της αλληλουχίας RFP. Επίσης με το ίδιο ένζυμο πραγματοποιήθηκε πέψη και στην κατασκευή pAT/Up-frag-Down-frag και ακολούθως αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης CIP, ώστε να μην μπορεί να «κλείσει» χωρίς να έχει ενσωματώσει την αλληλουχία RFP. Ύστερα πραγματοποιήθηκε αντίδραση συγκόλλησης στους 16 °C για 16 ώρες. Μετά από μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH10b και έλεγχο των

θετικών αποικιών με αντίδραση πολλαπλασιασμού, έγινε απομόνωση της σωστής πλασμιδιακής κατασκευής pAT/Up-frag-RFP-Down-frag. Τελευταίο βήμα αποτέλεσε ο μετασχηματισμός της αντίδρασης συγκόλλησης σε κύτταρα HB101 και η διαδικασία ετερόλογης σύζευξης με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Στοιχίση της αλληλουχίας BA0150 του *B. anthracis* και σύγκριση με άλλες απακετυλάσες πολυσακχαριτών

Παρακάτω (Εικόνα 10) παρατίθεται σχηματικά η στοιχίση αλληλουχιών ενζύμων της οικογένειας CE4 με το ένζυμο BA0150.



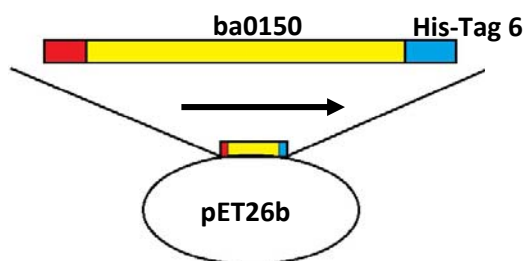
Εικόνα 10: Πολλαπλή στοιχίση αλληλουχιών μελών της οικογένειας CE4 με το ένζυμο BA0150. Τα μαύρα γράμματα υποδεικνύουν ταυτόσημα αμινοξικά κατάλοιπα σε όλες τις αλληλουχίες, ενώ τα γκρι αμινοξέα που είναι ίδια σε τουλάχιστον 3 αλληλουχίες. NodB, απακετυλάση χιτοολιγομερών από *S. meliloti*; BC1960 και BC3618, απακετυλάσες GlcNAc πεπτιδογλυκάνης από *B. cereus*; PGDA, απακετυλάση GlcNAc πεπτιδογλυκάνης από *S. pneumoniae*; PdaB, υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών από *B. subtilis*. Η στοιχίση έχει γίνει μόνο μεταξύ των αλληλουχιών που ανταποκρίνονται σε πιθανά καταλυτικά κέντρα.

Το ένζυμο BA0150 είναι μία υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών από τον παθογόνο μικροοργανισμό *B. anthracis*. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 254 αμινοξέα και το εκτιμώμενο μοριακό βάρος είναι 28.4 kDa. Με χρήση του διαδικτυακού λογισμικού πρόβλεψης πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών επικρατειών SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cgi), προέκυψε ότι η BA0150 διαθέτει μία προβλεπόμενη διαμεμβρανική αμινοτελική επικράτεια τύπου α-έλικας, μήκους 23 αμινοξέων και μία καρβοξυτελική επικράτεια με την ενεργότητα απακετυλάσης. Η BA0150 παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με άλλες πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα, εμφανίζει 61% ταυτότητα και 78% ομοιότητα με την πρωτεΐνη PdaB (NP_388038), μία υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών του *B. subtilis*, η οποία εμπλέκεται στη σπορίωση.

Γ.2. Κλωνοποίηση, έκφραση και υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BA0150 σε κύτταρα *E. coli*

Βασική προϋπόθεση για τη μελέτη της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης καθώς και της επίλυσης της δομής της είναι η παραγωγή της σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά στα οποία παράγεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου *ba0150* στον πλασμιδιακό φορέα pET26b και έκφραση σε κύτταρα *E. coli*.

Το γονίδιο *ba0150* απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *B. anthracis* μέσω αντίδρασης PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA του. Ακολούθησε η τροποποίηση του πλασμιδιακού φορέα pET26b με σκοπό τη δημιουργία συμβατών άκρων έτσι ώστε να ενσωματωθεί το γονίδιο μέσω αντίδρασης συγκόλλησης και να τοποθετηθεί κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του T₇ *lac* υποκινητή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων BL21 (DE3) pLys με την πλασμιδιακή κατασκευή (Εικόνα 11) και η επαγωγή της έκφρασης επετεύχθη με την προσθήκη IPTG. Οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης της BA0150 ήταν 30 °C, 0.3 mM IPTG και 7 ώρες επώασης.

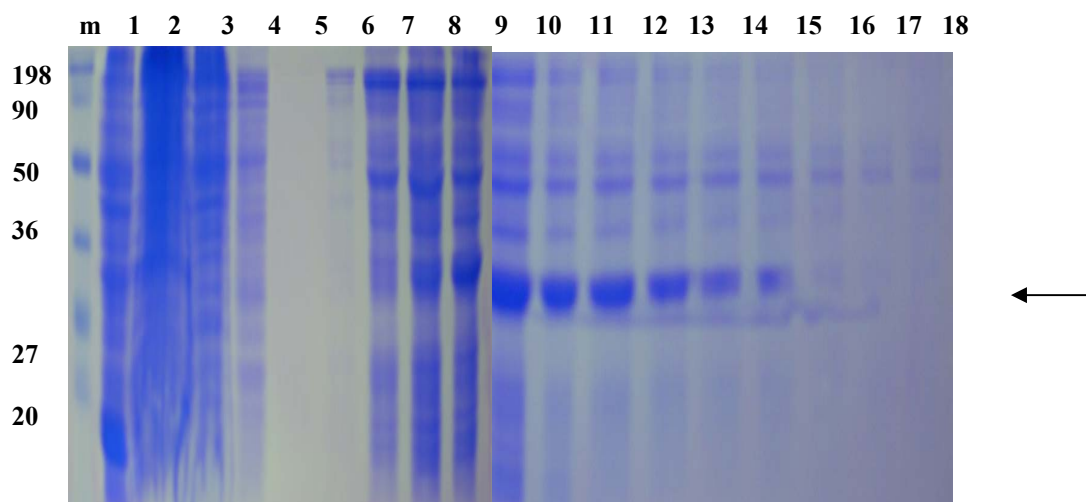


Εικόνα 11. Πλασμιδιακή κατασκευή pET26b/ba0150.

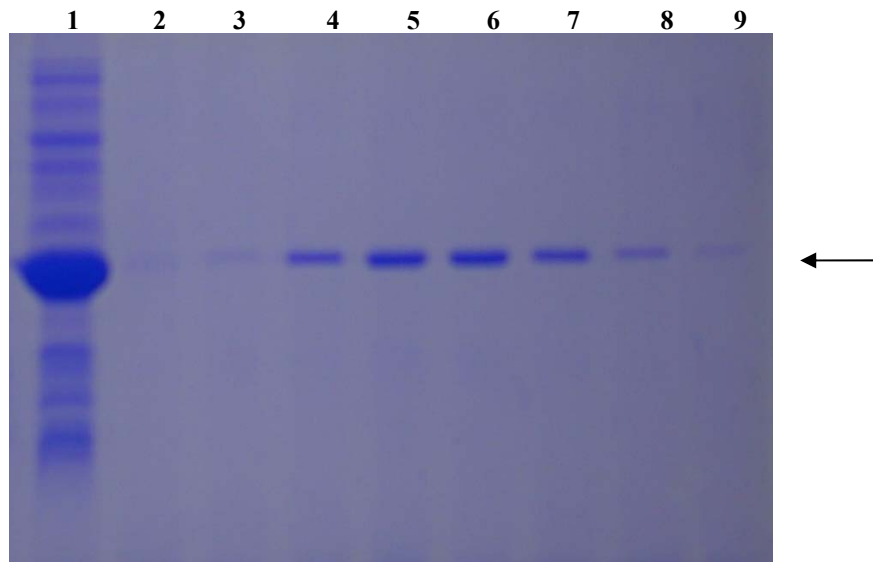
Γ.3. Απομόνωση του ενζύμου BA0150

Το σχήμα απομόνωσης του ενζύμου BA0150 από τον οργανισμό *B. anthracis*, ήταν το αποτέλεσμα μιας σειράς πειραμάτων, που είχαν ως στόχο την πλήρη διερεύνηση και κατανόηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του ενζύμου. Έτσι, δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες (συγκέντρωση άλατος, ποσότητα ιμιδαζολίου, σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος), διάφοροι προσροφητές (Ni-NTA agarose, Q Sepharose fast flow) και στήλη μοριακής διήθησης (Sephacryl S-200 HR) για την τελική απομόνωση καθαρού πρωτεϊνικού παρασκευάσματος. Τα στάδια και τα αποτελέσματα του σχήματος απομόνωσης του ενζύμου BA0150 παρουσιάζονται παρακάτω.

Για την απομόνωση του ενζύμου BA0150, το χρωματογραφικό σχήμα που ακολουθήθηκε περιελάμβανε αρχικά τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας (Ni-NTA agarose) και ακολούθως στήλη μοριακής διήθησης (Sephacryl S-200 HR). Με το συγκεκριμένο σχήμα η ποσότητα και η σχετική καθαρότητα της πρωτεΐνης ήταν η μέγιστη δυνατή (Εικόνες 12, 13).



Εικόνα 12. Πηκτώματα αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης μετά τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας (Ni-NTA agarose). Σύμφωνα με τον παραπάνω συμβολισμό στα πηκτώματα (εικόνα 16), το δείγμα m αποτελεί το μάρτυρα μοριακών βαρών (τα μεγέθη σε kDa). Το δείγμα 1 αντιστοιχεί στο υπερκείμενο μετά τη διάσπαση της κυτταρικής πάστας με λυσοζύμη. Τα δείγματα 2 και 3 είναι από το διάλυμα που εφαρμόστηκε στη στήλη και το «noïd» αντίστοιχα, ενώ το δείγμα 4 αντιστοιχεί σε εκείνο που προέκυψε μετά από έκπλυση της στήλης με το διάλυμα A. Το βέλος δείχνει τη ζώνη της απακετυλάσης BA0150. Από τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά δείγματα, αυτά τα οποία επιλέχθηκαν μετά από τη διαβαθμισμένη έκλουση για την επόμενη στήλη χρωματογραφίας είναι τα 11, 12 και 13.



Εικόνα 13. Πήκτωμα αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης του πρωτεϊνικού δείγματος μετά τον καθαρισμό σε στήλη Sephacryl S-200 HR. Σύμφωνα με τον παραπάνω συμβολισμό στο πήκτωμα, το δείγμα 1 είναι από το διάλυμα που εφαρμόστηκε στη στήλη. Τα υπόλοιπα αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά δείγματα μετά την έκλουση. Το βέλος δείχνει τη ζώνη της πρωτεΐνης BA0150.

Γ.4. Εξέταση πιθανών υποστρώματων του ενζύμου BA0150

Για την μελέτη των υποστρώματων στα οποία δρά το ένζυμο BA0150, πραγματοποιήθηκαν αρχικά *in vitro* αντιδράσεις απακετυλίωσης με N-ακετυλοχιτοολιγομερή. Η μελέτη της δράσης του ενζύμου σε χιτοολιγομερή έγινε με επώσεις του με τα υποστρώματα αυτά για 12 ώρες στους 37 °C. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: GlcNAc, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, καθώς και το GMDP και MurNAc. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα σε κανένα από τα παραπάνω υποστρώματα. Το αποτέλεσμα του υπολογισμού των παραγόμενων ελεύθερων πρωτοταγών αμινών μέσω της χημικής ουσίας φλουορεσκαμίνης, τόσο για το υπόστρωμα όσο και για το υπόστρωμα παρουσία ενζύμου, ήταν το ίδιο (τα δεδομένα δεν παρατίθενται).

Επίσης πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με ραδιοσημασμένη γλυκολ-χιτίνη σαν υπόστρωμα σε διάφορες συνθήκες. Η γλυκολ-χιτίνη δοκιμάστηκε σε εύρος θερμοκρασιών (37-50 °C), τιμών pH (5.8-8.8) και παρουσία διαφόρων μετάλλων (CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, NiSO₄, CuSO₄) για χρονικό διάστημα 12 ωρών. Και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα (τα δεδομένα δεν παρατίθενται).

Γ.5. Απαλοιφή του γονιδίου *ba0150*

Για την κατανόηση του βιολογικού ρόλου του ενζύμου BA0150 στην παθογένεια και τη φυσιολογία του *B. anthracis*, δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή στην οποία το γονίδιο *ba0150* αντικαταστάθηκε με κασέτα σπεκτινομυκίνης και ακολούθησαν πειράματα ετερόλογης σύζευξης με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*. Για τη δημιουργία του μεταλλάγματος $\Delta ba0150$, απομονώθηκαν οι επιθυμητές περιοχές ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM. Έπειτα ακολούθησαν αντιδράσεις πέψης με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και αντιδράσεις συγκόλλησης με σκοπό τη δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής που διέθετε σαν ένθεμα την ανοδική περιοχή σε συνέχεια και ίδιο προσανατολισμό με την καθοδική περιοχή του γονιδίου. Η επιλογή της κασέτας έγινε με γνώμονα τη διατήρηση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της καθοδικής περιοχής του προς διαγραφή γονιδίου, καθώς η εισαγωγή της κασέτας

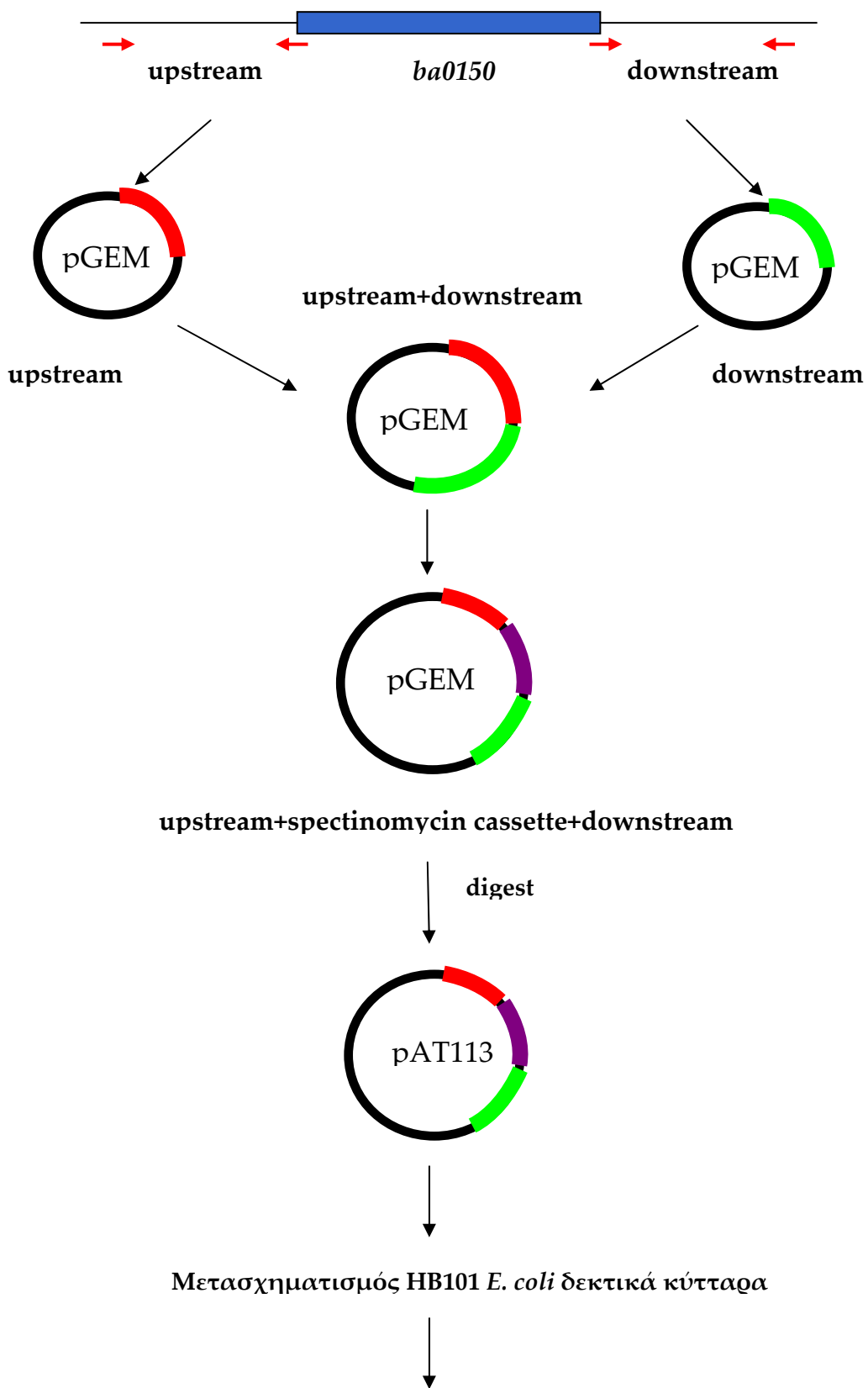
γίνεται μεταξύ της ανοδικής και της καθοδικής του περιοχής. Τελευταίο βήμα αποτέλεσε η μεταφορά του τελικού ενθέματος (up spec down) από την κατασκευή pGEM/0150 up spec down στο φορέα pAT113, μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* HB101 και ακολούθως η διαδικασία της ετερόλογης σύζευξης με κύτταρα *B. anthracis*. Η διαδικασία της απαλοιφής του ba0150 απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 14).

Γ.5.1. Ετερόλογη σύζευξη με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*

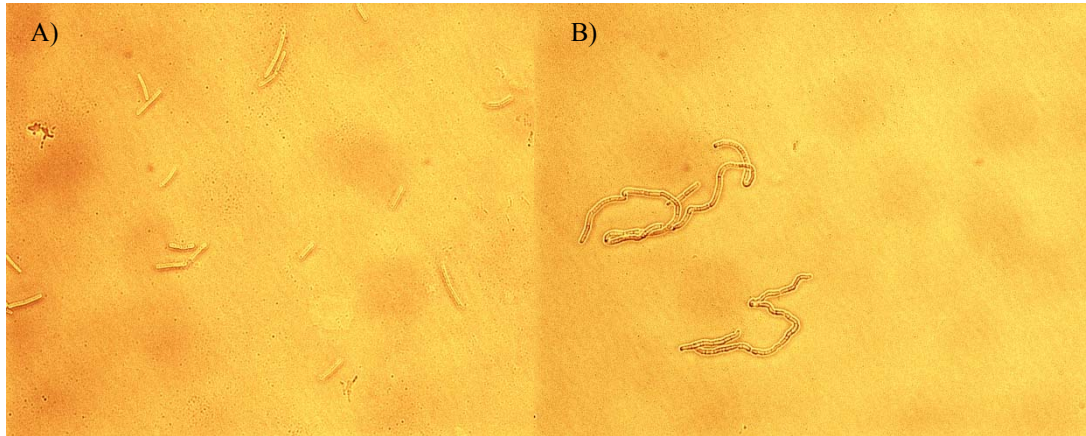
Υπάρχουν δύο πιθανά σενάρια ανασυνδυασμού από τη στιγμή που η πλασμιδιακή κατασκευή pAT/0150 up spec down εντεθεί στο γένωμα του *B. anthracis*. Το πρώτο σενάριο είναι να γίνει απλός ανασυνδυασμός, όπου ολόκληρο το πλασμίδιο έχει εντεθεί είτε ανοδικά είτε καθοδικά του γονιδίου *ba0150*, και το γονίδιο δεν έχει απαλειφθεί από το γένωμα. Το δεύτερο σενάριο είναι να γίνει διπλός ανασυνδυασμός, όπου το γονίδιο *ba0150* έχει απαλειφθεί από το γένωμα και αντικατασταθεί από την κασέτα σπεκτινομυκίνης.

Πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα ετερόλογης σύζευξης προκειμένου να επιτευχθεί διπλός ανασυνδυασμός και να απαλειφθεί το γονίδιο *ba0150* από το γένωμα του *B. anthracis*. Μέσω κατάλληλης αντίδρασης PCR έγινε αξιολόγηση των αποικιών που συλλέχθηκαν για την ύπαρξη ή όχι του γονιδίου *ba0150*. Μέχρι στιγμής απομονώθηκε στέλεχος του *B. anthracis* μόνο με απλό ανασυνδυασμό (παρουσία *ba0150* και κασέτας σπεκτινομυκίνης). Ωστόσο το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε φαινότυπο πολύ διαφορετικό σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου (Εικόνα 15), γεγονός που οδήγησε σε περαιτέρω πειράματα.

Σύμφωνα με την εικόνα 15, γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει σημαντική φαινοτυπική διαφορά μεταξύ των κυττάρων του αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος Δ *ba0150*. Τα βλαστητικά κύτταρα του μεταλλάγματος εμφανίζουν πιο επιμηκυσμένες αλυσίδες ενώ το σχήμα τους είναι παραλλαγμένο (καμπυλωτό) σε σχέση με τα αντίστοιχα του αγρίου τύπου.



Σύζευξη με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*.
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απαλοιφής του γονιδίου *ba0150* από το γένομα του *B. anthracis*.

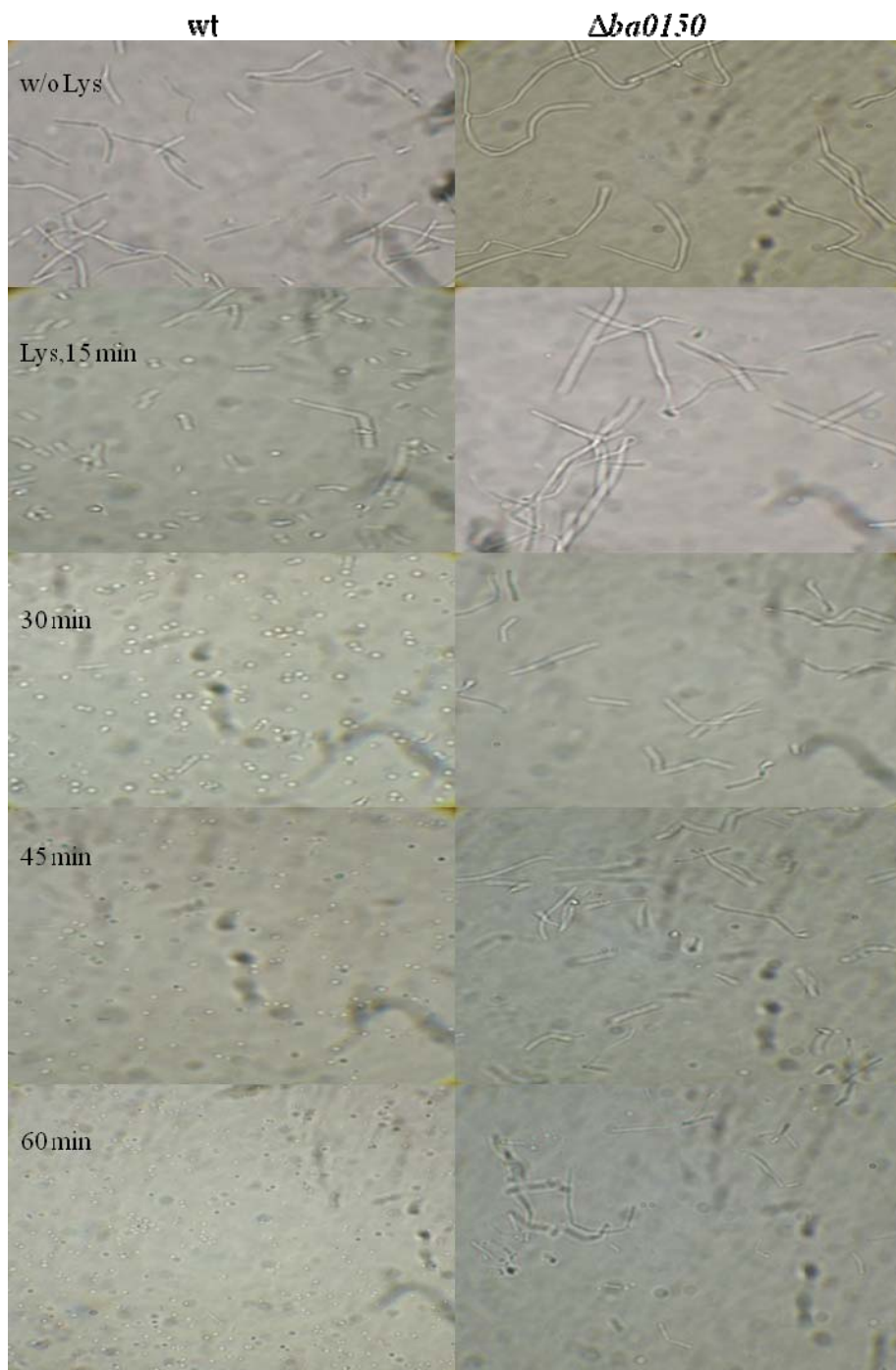


Εικόνα 15. Μικροσκοπική παρατήρηση βλαστητικών κυττάρων του στελέχους 7702 του *B. anthracis*. A) άγριος τύπος, B) $\Delta ba0150$.

Γ.6. Ευαισθησία στη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο του μεταλλάγματος ως προς την ευαισθησία/ανθεκτικότητά του στη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη, ήταν η παρατήρησή του στο οπτικό μικροσκόπιο πριν και μετά την προσθήκη λυσοζύμης και μουτανολυσίνης τόσο κατά την εκθετική πρόοδο της καλλιέργειας όσο και κατά τη στατική της φάση και η σύγκρισή του με τον άγριο τύπο. Τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος για το μετάλλαγμα συνοψίζονται κατωτέρω.

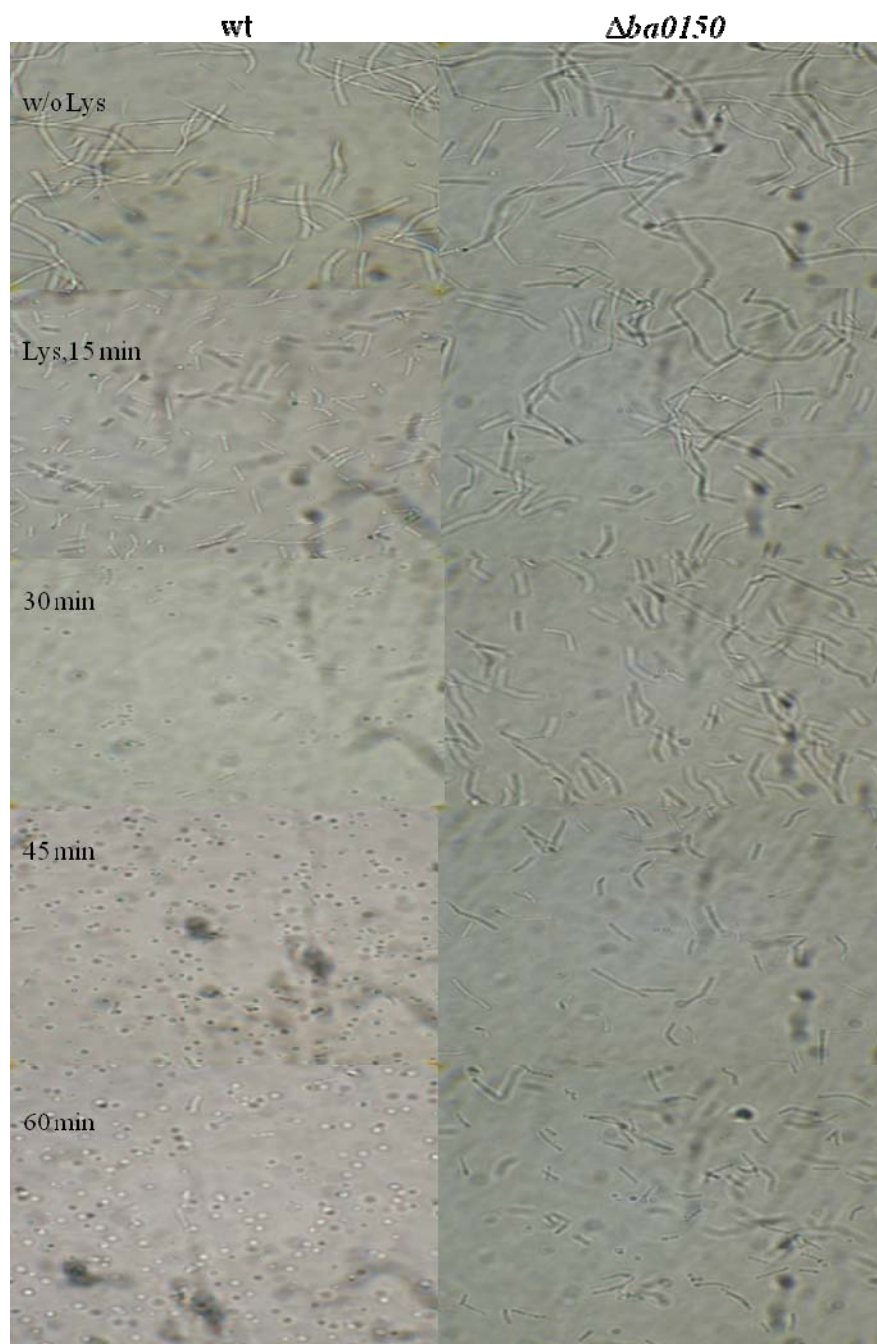
Σύμφωνα με την εικόνα 16, είναι αντιληπτό ότι εξακολουθεί να υπάρχει φαινοτυπική διαφορά μεταξύ του αγρίου τύπου και του $\Delta ba0150$ και στο θρεπτικό υλικό SPY. Ωστόσο κατά την εκθετική φάση της καλλιέργειας, μετά την προσθήκη της λυσοζύμης, το μετάλλαγμα παρουσίασε διαφορετική εικόνα σε σχέση με τον άγριο τύπο. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της λυσοζύμης δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στη μορφολογία των κυττάρων του $\Delta ba0150$, παρά μόνο μετά τα 45 λεπτά όπου παρατηρήθηκε ανάμεικτος πληθυσμός βλαστητικών κυττάρων και πρωτοπλαστών. Η παρουσία των πρωτοπλαστών στο μετάλλαγμα έγινε φανερή μετά το πέρας των 60 λεπτών από την προσθήκη της λυσοζύμης.



Εικόνα 16. Εκθετική φάση καλλιέργειας πριν και μετά την προσθήκη λυσοζύμης.

Σε αντίθεση με το μεταλλαγμένο στέλεχος, ο άγριος τύπος παρουσίασε μία εντελώς διαφορετική εικόνα. Μετά τα 15 πρώτα λεπτά από την προσθήκη της λυσοζύμης παρατηρήθηκε ανάμεικτος πληθυσμός βλαστητικών κυττάρων και πρωτοπλαστών. Ωστόσο, ο πληθυσμός των πρωτοπλαστών αυξήθηκε κατά κόρον μετά τα 30 λεπτά και στο χρονικό διάστημα της μίας ώρας τον πληθυσμό του αγρίου

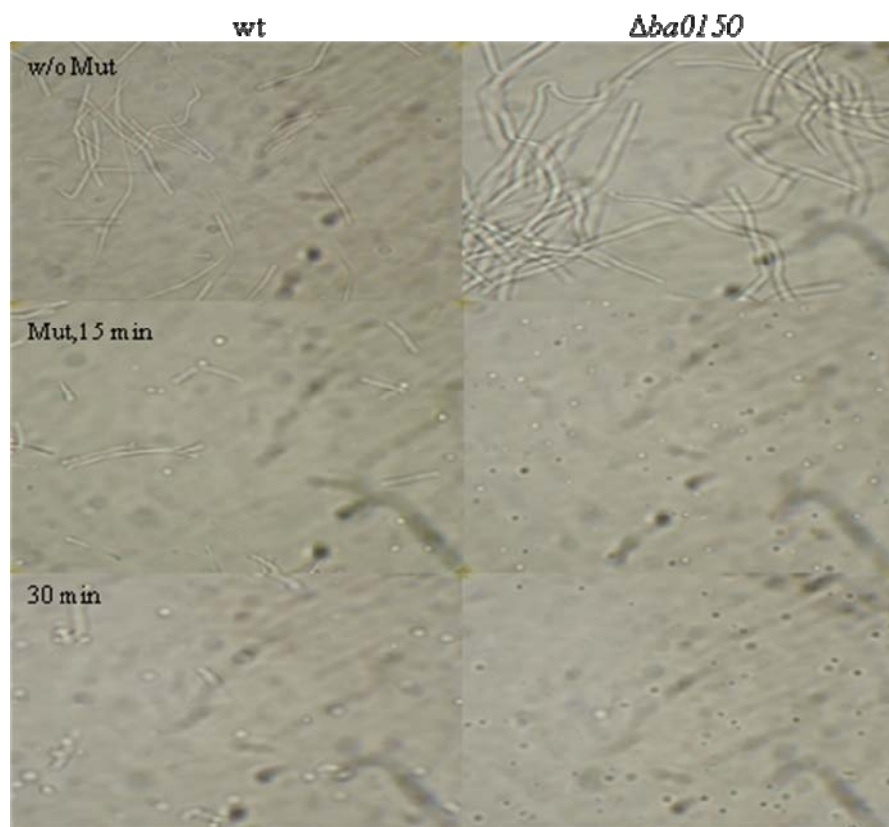
τύπου αποτελούσαν μόνο πρωτοπλάστες. Επομένως, στην εκθετική φάση του κυτταρικού κύκλου του *B. anthracis* ο άγριος τύπος εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της λυσοζύμης από ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος.



Εικόνα 17. Στατική φάση καλλιέργειας πριν και μετά την προσθήκη λυσοζύμης.

Κατά τη στατική φάση της καλλιέργειας, τόσο το μεταλλαγμένο στέλεχος όσο και ο άγριος τύπος παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά με την εκθετική φάση. Συγκεκριμένα, στα 15 πρώτα λεπτά μετά την προσθήκη της λυσοζύμης στο δείγμα παρατηρήθηκαν πρωτοπλάστες, ενώ άλλαξε και η μορφολογία των βλαστητικών

κυττάρων. Από το χρονικό διάστημα των 30 λεπτών και έπειτα ο πληθυσμός των πρωτοπλαστών αυξήθηκε σημαντικά. Αντίθετα στο μεταλλαγμένο στέλεχος παρατηρήθηκε διαφορά στη μορφολογία των βλαστητικών κυττάρων και εμφανίστηκαν πρωτοπλάστες. Ο πληθυσμός των πρωτοπλαστών ήταν εμφανής μετά το πέρας της μίας ώρας.



Εικόνα 18. Εκθετική φάση καλλιέργειας πριν και μετά την προσθήκη μουτανολυσίνης.

Η μουτανολυσίνη αποτελεί υδρολυτικό ένζυμο, το οποίο σε αντίθεση με τη λυσοζύμη, η οποία καταλύει τους β -1,4- N-γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων MurNAc και GlcNAc, έχει ευρύτερη δράση. Η μουτανολυσίνη μπορεί να υδρολύσει γλυκοζιτικούς δεσμούς όπως -GlcN-MurNAc-↓-GlcNAc-MurNAc-, -GlcNAc-MurNAc-↓-GlcN-MurNAc- και -GlcN-MurNAc-↓-GlcN-MurNAc- αλλά όχι -GlcNAc-Mur-GlcNAc-MurNAc- (τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις υδρόλυσης) [36,37].

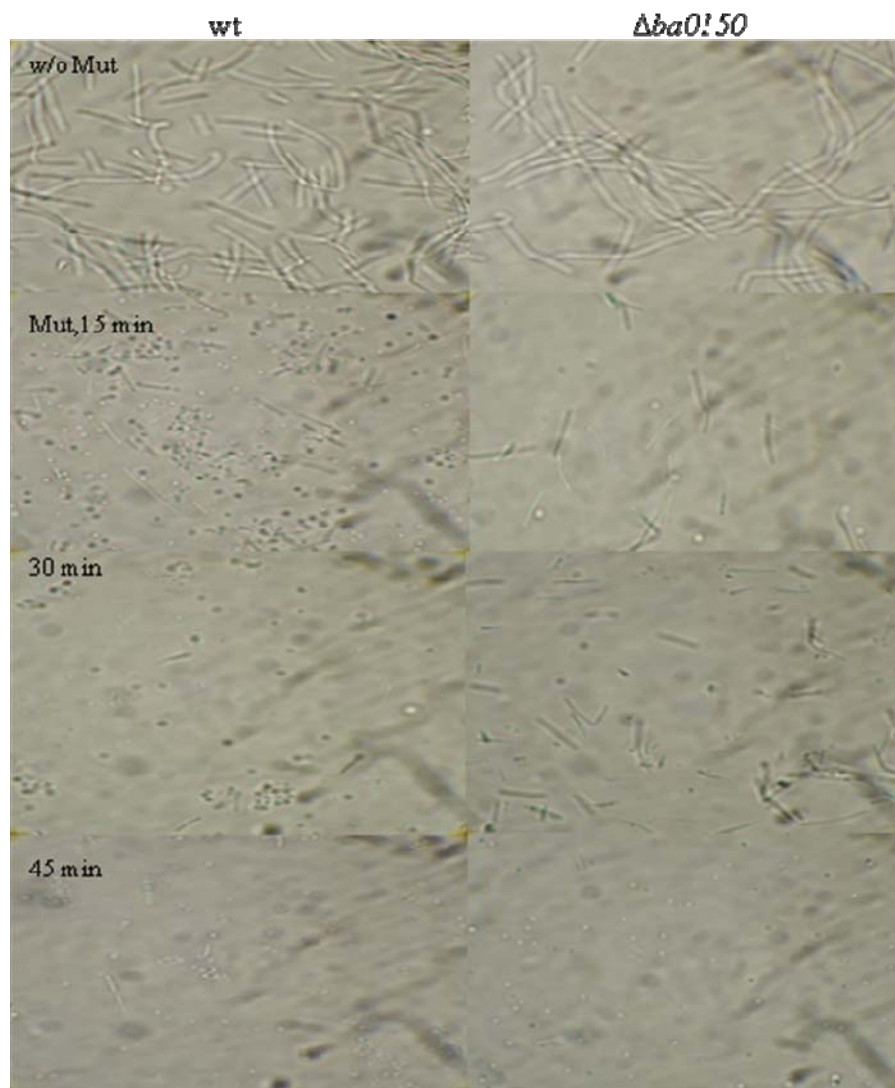
Στην περίπτωση της μουτανολυσίνης, κατά την εκθετική φάση της καλλιέργειας (Εικόνα 18), το μετάλλαγμα παρουσίασε διαφορετική εικόνα σε σχέση με τον άγριο τύπο. Συγκεκριμένα, 15 λεπτά μετά την προσθήκη της μουτανολυσίνης, τον

πληθυσμό του *Δba0150* αποτελούσαν σχεδόν αποκλειστικά πρωτοπλάστες, ενώ μετά το πέρας των 30 λεπτών δεν παρατηρήθηκε κανένα βλαστητικό κύτταρο. Αντίθετα, στον άγριο τύπο δεν υπήρξε τόσο ραγδαία μεταβολή. Μετά τα 15 πρώτα λεπτά από την προσθήκη της μουτανολυσίνης, παρατηρήθηκε μεταβολή στη μορφολογία των βλαστητικών κυττάρων, ενώ τον πληθυσμό του δείγματος αποτελούσαν βλαστητικά κύτταρα και πρωτοπλάστες. Στο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών ο αριθμός των πρωτοπλαστών αυξήθηκε σημαντικά ενώ ο αντίστοιχος των βλαστητικών κυττάρων μειώθηκε. Επομένως, στην εκθετική φάση το μετάλλαγμα εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της μουτανολυσίνης από ότι ο άγριος τύπος.

Κατά τη στατική φάση της καλλιέργειας (Εικόνα 19), τόσο το μεταλλαγμένο στέλεχος όσο και ο άγριος τύπος παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά με την εκθετική φάση. Συγκεκριμένα, 15 λεπτά μετά την προσθήκη της μουτανολυσίνης και τα δύο δείγματα εμφάνισαν ανάμεικτο πληθυσμό βλαστητικών κυττάρων και πρωτοπλαστών. Επίσης η μορφολογία των βλαστητικών κυττάρων διέφερε σε σχέση με την αντίστοιχη πριν την προσθήκη της μουτανολυσίνης. Στο χρονικό διάστημα των 45 λεπτών, τον πληθυσμό του μεταλλάγματος αποτελούσαν σχεδόν αποκλειστικά πρωτοπλάστες, ενώ ο άγριος τύπος εξακολούθησε να εμφανίζει ανάμεικτο πληθυσμό από βλαστητικά κύτταρα και πρωτοπλάστες. Επομένως και στη στατική φάση το μετάλλαγμα εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της μουτανολυσίνης από ότι ο άγριος τύπος.

Γ.7. Αυτόλυση

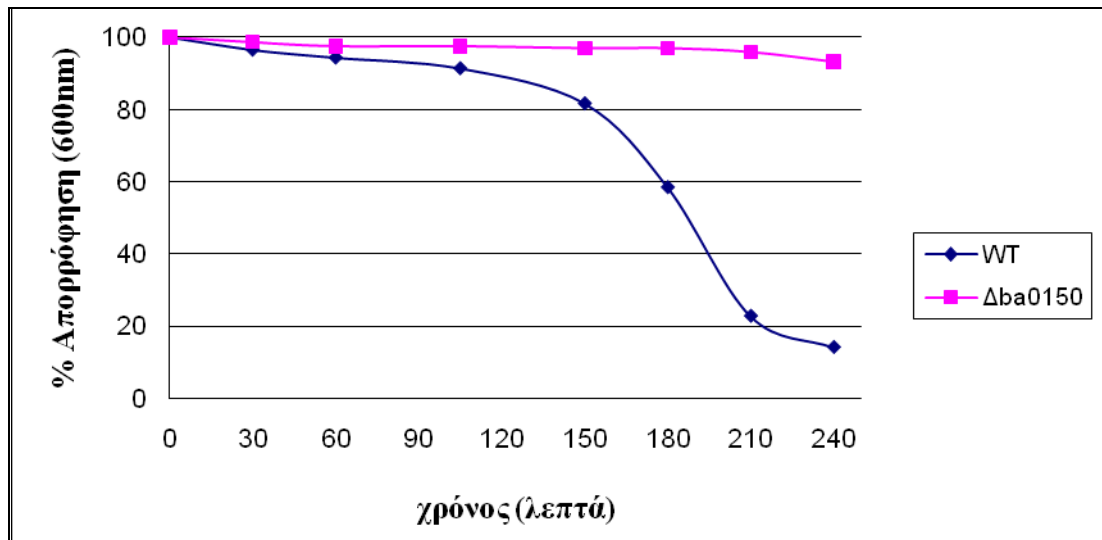
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο του μεταλλάγματος ως προς την αυτόλυση ήταν η επώασή του σε υγρό θρεπτικό SPY, παρουσία διαλύματος NaN_3 σε τελικές συγκεντρώσεις 10 mM και 50 mM, λαμβάνοντας διαδοχικές μετρήσεις της οπτικής του πυκνότητας και η σύγκρισή του με τον άγριο τύπο. Το αποτέλεσμα του εν λόγω πειράματος για το μετάλλαγμα συνοψίζεται παρακάτω



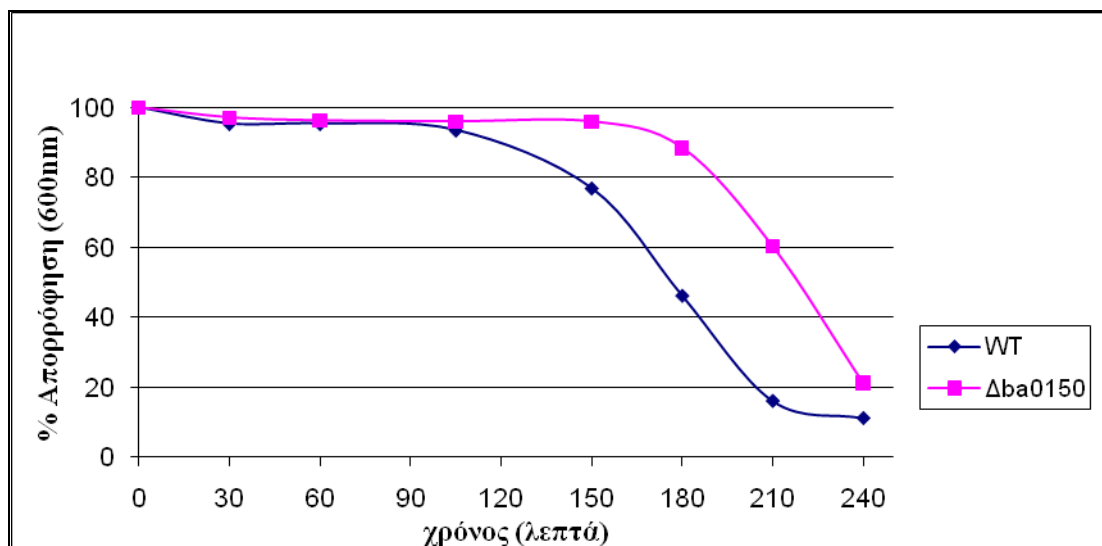
Εικόνα 19. Στατική φάση καλλιέργειας πριν και μετά την προσθήκη μουτανολυσίνης.

Η επώαση των κυττάρων παρουσία NaN_3 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενζύμων και συγκεκριμένα των αυτολυσινών, οι οποίες προσδένονται στο κυτταρικό τοίχωμα και αρχίζουν την αποδόμησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων η οποία με τη σειρά της προκαλεί μείωση της οπτικής πυκνότητας.

Σύμφωνα με το διάγραμμα (Εικόνα 20), παρουσία NaN_3 10 mM η οπτική πυκνότητα στα κύτταρα του μεταλλάγματος παρέμεινε σταθερή μέχρι τα πρώτα 180 λεπτά και ακολούθως εμφάνισε μία πολύ ελαφρά πτώση σε ποσοστό 5%. Αντιθέτως, η οπτική πυκνότητα στον άγριο τύπο παρέμεινε σταθερή μόνο για τα πρώτα 90 λεπτά και στη συνέχεια παρατηρήθηκε συστηματική πτώση έως 85% της αρχικής της τιμής.



Εικόνα 20. Διαγραμματική απεικόνιση της αυτόλυσης παρουσία NaN₃ 10 mM.



Εικόνα 21. Διαγραμματική απεικόνιση της αυτόλυσης παρουσία NaN₃ 50 mM.

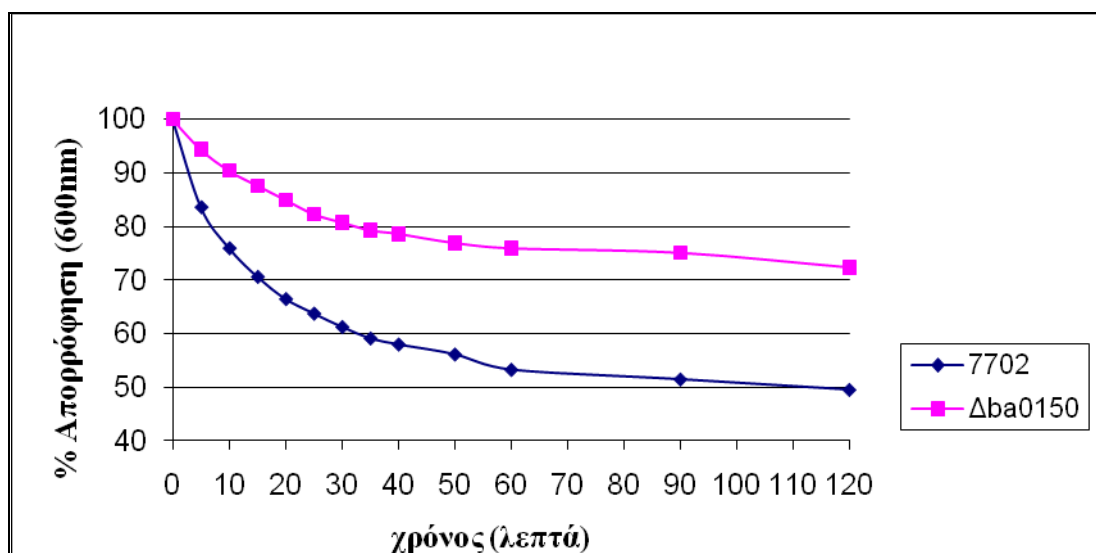
Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 21), όταν η συγκέντρωση του NaN₃ αυξήθηκε σε 50 mM, η οπτική πυκνότητα στα κύτταρα του μεταλλάγματος παρέμεινε σταθερή μέχρι τα πρώτα 150 λεπτά και ακολούθως εμφάνισε πτώση σε ποσοστό περίπου 80%. Η οπτική πυκνότητα στον άγριο τύπο εμφάνισε πάλι την ίδια σχεδόν εικόνα. Παρέμεινε σταθερή για τα πρώτα 100 λεπτά και στη συνέχεια παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση συστηματική πτώση έως 85% της αρχικής της τιμής.

Συμπερασματικά, η καμπύλη που αντιστοιχεί στον άγριο τύπο είχε σχεδόν ίδια συμπεριφορά και στα δύο διαγράμματα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση NaN₃.

Αυτό σημαίνει ότι η αυτόλυση στον άγριο τύπο δεν επηρεάστηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και παρέμεινε σε βαθμό η ίδια. Αντιθέτως, η καμπύλη που αντιστοιχεί στο μετάλλαγμα εμφάνισε διαφορετική συμπεριφορά. Παρουσία NaN_3 10 mM, παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, γεγονός που σημαίνει ότι τα κύτταρα του μεταλλάγματος υπέστησαν λύση σε πολύ μικρό βαθμό. Όταν η συγκέντρωση του διαλύματος αυξήθηκε σε 50 mM παρατηρήθηκε πτώση της καμπύλης μετά τα πρώτα 150 λεπτά. Επομένως, τα κύτταρα του μεταλλάγματος μετά από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα υπέστησαν λύση και η αυτόλυση επηρεάστηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης NaN_3 .

Γ.8. Βλάστηση σπορίων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο του μεταλλάγματος ως προς τη βλάστηση σπορίων ήταν η επώασή του σε 1 ml διαλύματος L-αλανίνη 25 mM, ινοσίνη 12,5 mM και 1 ml διαλύματος υγρού θρεπτικού μέσου (BHI) λαμβάνοντας διαδοχικές μετρήσεις της οπτικής του πυκνότητας και η σύγκρισή του με τον άγριο τύπο. Το αποτέλεσμα του εν λόγω πειράματος για το μετάλλαγμα συνοψίζεται παρακάτω.

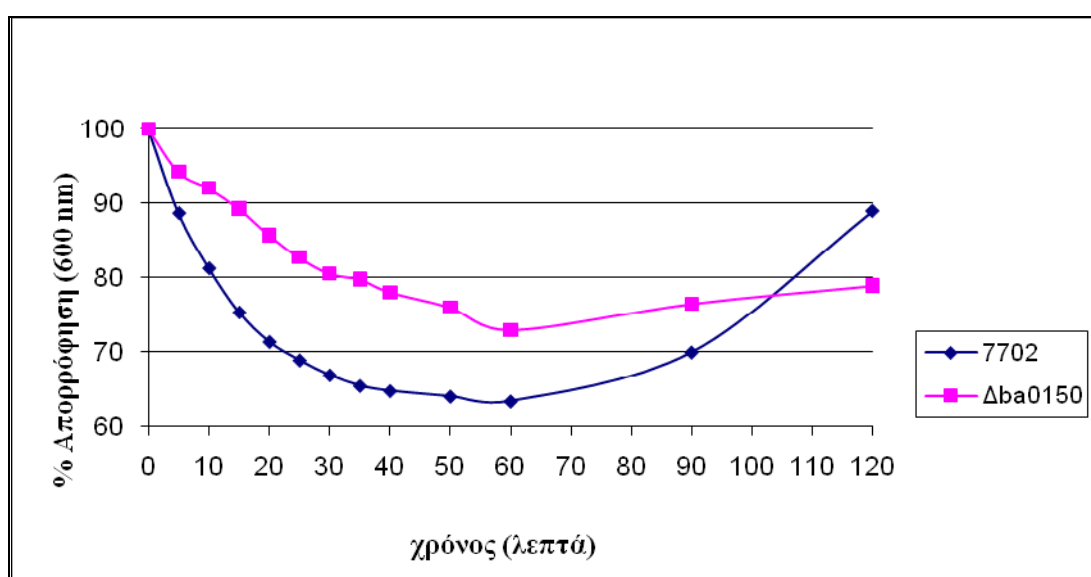


Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της βλάστησης σπορίων παρουσία L- αλανίνη 25 mM, ινοσίνη 12.5 mM.

Όταν πραγματοποιείται επώαση σπορίων παρουσία συστατικών που επάγουν τη βλάστησή τους, τα σπόρια ενυδατώνονται και η εξωτερική τους στοιβάδα αποσυντίθεται. Τα σπόρια απορροφούν περισσότερο φως από ότι τα βλαστητικά

κύτταρα. Έτσι, με την έναρξη της βλάστησης, τα σπόρια «μετασχηματίζονται» σε βλαστητικά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο η οπτική πυκνότητα μειώνεται. Όσο πιο γρήγορη είναι η διαδικασία της βλάστησης, τόσο πιο μεγάλη είναι η μείωση στην οπτική πυκνότητα.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 22), παρουσία διαλύματος L-αλανίνη 25 mM, ινοσίνη 12.5 mM, η καμπύλη που αντιστοιχεί στην οπτική πυκνότητα του μεταλλάγματος παρουσίασε μικρότερη πτώση σε σχέση με την αντίστοιχη του αγρίου τύπου. Επομένως, τα σπόρια του μεταλλάγματος βλάστησαν πιο αργά σε σχέση με τον άγριο τύπο.



Εικόνα 23. Διαγραμματική απεικόνιση της βλάστησης σπορίων παρουσία υγρού θρεπτικού μέσου (BHI).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 23), παρουσία θρεπτικού μέσου (BHI) η οπτική πυκνότητα του *Δba0150* μειώθηκε μέχρι τα πρώτα 60 λεπτά και στη συνέχεια παρουσίασε ελαφρά αύξηση. Την ίδια εικόνα αλλά με διαφορετικό ρυθμό ακολούθησε η καμπύλη του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, η οπτική πυκνότητα στον άγριο τύπο μειώθηκε μέχρι τα πρώτα 60 λεπτά και ακολούθως παρουσίασε αύξηση αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό από την αντίστοιχη του *Δba150*. Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση τα σπόρια του μεταλλάγματος βλάστησαν πιο αργά σε σχέση με τον άγριο τύπο.

Συμπερασματικά, και στις δύο περιπτώσεις επώασης των σπορίων, το μετάλλαγμα παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό βλάστησης σε σχέση με τον άγριο τύπο. Η μόνη διαφορά είναι ότι στο δεύτερο διάγραμμα (Εικόνα 23) η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε

και στα δύο δείγματα μετά την πρώτη ώρα και αυτό οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των βλαστητικών κυττάρων, εφόσον στο διάλυμα υπήρξε θρεπτικό μέσο.

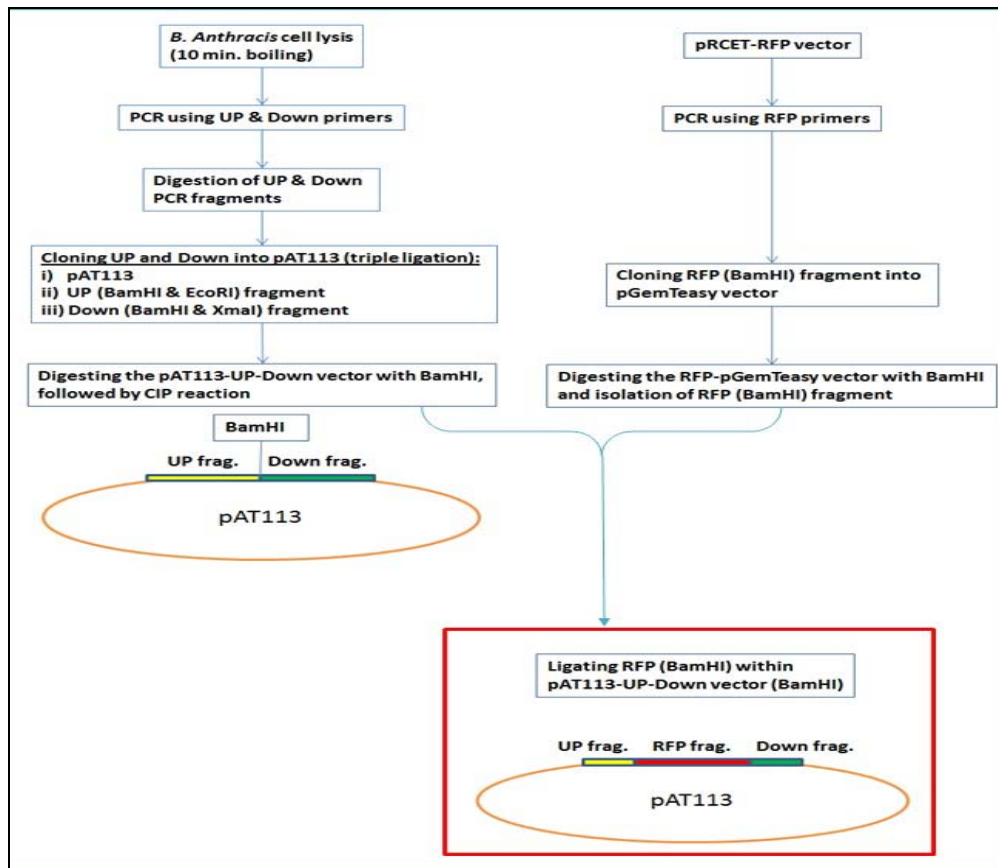
Γ.9. Κυτταρικός εντοπισμός (localization) της BA0150

Για τον εντοπισμό του ενζύμου BA0150 στον *B. anthracis*, δημιουργήθηκε χιμαιρική κατασκευή στην οποία το γονίδιο *ba0150* ήταν ενωμένο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί την RFP και ακολούθησαν πειράματα ετερόλογης σύζευξης με τον *B. anthracis*. Για τη δημιουργία της συγκεκριμένης κατασκευής, απομονώθηκε αρχικά το γονίδιο *ba0150* αλλά και οι επιθυμητές περιοχές ανοδικά και καθοδικά αυτού και στη συνέχεια αφού ακολούθησαν αντιδράσεις πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, οι αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pAT113. Σκοπός ήταν η δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής που διέθετε σαν ένθεμα το γονίδιο με την ανοδική του περιοχή (Up-frag) από το κωδικόνιο λήξης του *ba0150*, σε συνέχεια και ίδιο προσανατολισμό με την καθοδική του περιοχή (Down-frag) από το κωδικόνιο λήξης του *ba0150*.

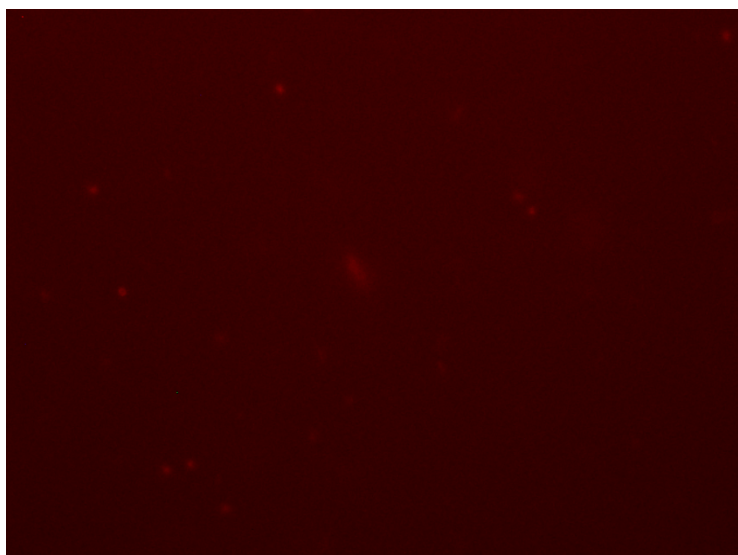
Επόμενο βήμα αποτέλεσε η απομόνωση της αλληλουχίας RFP και η κλωνοποίησή της στον φορέα pGEM μετά από πέψη με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο και προσθήκη προεξέχοντων καταλοίπων αδερίνης. Τελευταίο βήμα αποτέλεσε η μεταφορά του ενθέματος της RFP από την κατασκευή pGEM/RFP στο φορέα pAT113, έτσι ώστε να δημιουργηθεί η τελική κατασκευή pAT/Up-frag-RFP-Down-frag και ακολούθως η διαδικασία της ετερόλογης σύζευξης με τον *B. anthracis*. Η διαδικασία για τη δημιουργία της τελικής κατασκευής απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 24).

Γ.9.1. Ετερόλογη σύζευξη με το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*

Πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα ετερόλογης σύζευξης προκειμένου να επιτευχθεί ανασυνδυασμός και να εισαχθεί η αλληλουχία της RFP στο γένωμα του *B. anthracis*. Ωστόσο από το συγκεκριμένο στέλεχος δεν ελήφθησαν πληροφορίες σχετικά με τον κυτταρικό εντοπισμό του ενζύμου BA0150 στον *B. anthracis*, είτε λόγω χαμηλής έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης, είτε λόγω αποδόμησης της RFP από τον ίδιο το μικροοργανισμό.



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας χημαικικής κατασκευής στην οποία το γονίδιο *ba0150* είναι ενωμένο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί την RFP.



Εικόνα 25. Μικροσκοπική απεικόνιση φορτισμού σπορίων του *B. anthracis*, στο γένωμα του οποίου έχει εισαχθεί η αλληλουχία της RFP. Τα σπόρια απεικονίζονται με έντονο φθορίζον ερυθρό. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 587 nm, ενώ το μήκος κύματος εκπομπής 610 nm.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονιδίωμα του *Bacillus anthracis* [38] περιέχει 11 πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών, από τις οποίες οι έξι κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης, ενώ οι υπόλοιπες πέντε είναι υποθετικές απακετυλάσες πολυσακχαριτών [15].

Στην προσπάθεια να εξακριβωθεί ο ρόλος των απακετυλασών πολυσακχαριτών στη φυσιολογία του *B. anthracis*, στην παρούσα εργασία έγινε κλωνοποίηση και υπερέκφραση του γονιδίου *ba0150* στην *E. coli*, από το στέλεχος 7702 του *B. anthracis*. Επιπλέον, έγινε απομόνωση του ανασυνδυασμένου ενζύμου με σκοπό την κρυστάλλωση και την επίλυση της δομής του και προκαταρκτικά πειράματα βιοχημικού χαρακτήρισμού, ενώ για να διευκρινιστεί ο βιολογικός ρόλος του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής ανάλυσης (με τη μέθοδο απενεργοποίησης του γονιδίου) και κυτταρικού εντοπισμού.

Συγκρίνοντας το ένζυμο της παρούσας εργασίας με το αντίστοιχο (PdaB) από τον οργανισμό *B. subtilis*, ως προς τα ποσοστά ταυτότητας και ομοιότητας, προκύπτει ότι η υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών BA0150 έχει 61% ταυτότητα και 78% ομοιότητα με την υποθετική απακετυλάση πολυσακχαριτών PdaB η οποία σχετίζεται με τη σπορίωση. Παράλληλα, συγκριτικά με τις ήδη χαρακτηρισμένες απακετυλάσες N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης, το ένζυμο BA0150 εμφανίζει 31% ταυτότητα και 53% ομοιότητα με την PgdA του *Streptococcus pneumoniae* και 29% ταυτότητα και 48% ομοιότητα με την PdaA από τον οργανισμό *B. subtilis*. Η αμινοξική ταυτότητα και ομοιότητα με τις γνωστές απακετυλάσες πολυσακχαριτών περιορίζεται κυρίως στο καρβοξυτελικό τους άκρο, στο οποίο βρίσκεται η συντηρημένη περιοχή NodB. Βάσει της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής των απακετυλασών PdaA από *B. subtilis* και PgdA από *S. pneumoniae* θεωρείται πως τα συντηρημένα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου των ενζύμων [39,40].

Σχετικά με το βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου, δοκιμάστηκαν πολλά υποστρώματα σε διάφορες θερμοκρασίες, τιμές pH και για διάφορες χρονικές περιόδους. Ωστόσο, ως προς το λειτουργικό του ρόλο, το ένζυμο BA0150 δεν ήταν

σε θέση να απακετυλιώσει κάποιο από τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι ούτε το ένζυμο PdaB, με το οποίο η πρωτεΐνη BA0150 έχει 61% ταυτότητα, δεν έχει χαρακτηριστεί βιοχημικά ακόμη. Επίσης, το ανασυνδυασμένο ένζυμο δεν παρουσίασε κάποια ενεργότητα με την προσθήκη μετάλλου, με εξαίρεση το κοβάλτιο και το νικέλιο στα οποία παρουσίασε πολύ ελάχιστα αυξημένη δραστικότητα στη γλυκολ-χιτίνη (στα πλαίσια πειραματικού σφάλματος), παρά το γεγονός ότι δοκιμάστηκαν πολλά μέταλλα (CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, NiSO₄) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (τα δεδομένα δεν παρατίθενται). Κρυσταλλογραφικές μελέτες ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια CE-4 έδειξαν την παρουσία ενός συμπλόκου τριών καταλοίπων (δύο ιστιδινών και ενός ασπαρτικού οξέος) με ένα ιόν ψευδαργύρου. Η πλειοψηφία όμως των βιοχημικών μελετών για τα ίδια ένζυμα έφερε στο φώς την εντυπωσιακή αύξηση της ενεργότητας αυτών, με την προσθήκη κοβαλτίου. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η πλειοψηφία των ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια CE-4 είναι μεταλλοεξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία εξαιτίας της βιοδιαθεσιμότητας περιορίζονται στη χρήση ψευδαργύρου, ενώ *in vitro* δείχνουν προτίμηση σε πιο σπάνια στη φύση μέταλλα, όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο [39,40,41].

Για την εξακρίβωση του βιολογικού ρόλου του ενζύμου στη φυσιολογία και την παθογένεια του *B. anthracis*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής ανάλυσης (μέσω απενεργοποίησης του γονιδίου *ba0150*) και κυτταρικού εντοπισμού. Μέχρι στιγμής απομονώθηκε στέλεχος του *B. anthracis* μόνο με απλό ανασυνδυασμό, ωστόσο δε συνέβη το ίδιο με την PdaB από τον *B. subtilis*, όπου και απομονώθηκε στέλεχος με διπλό ανασυνδυασμό [35]. Αυτό ενδεχομένως να εξηγείται με δύο σενάρια. Αρχικά το γονίδιο *ba0150* να είναι ικανό και αναγκαίο (essential for life) για τη φυσιολογία του *B. anthracis*, και η απαλοιφή του από το γένωμα να μην είναι εφικτή. Επίσης, η απαλοιφή του *ba0150* μπορεί να επηρεάζει σημαντικά γειτονικά σε αυτό γονίδια, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιτευχθεί διπλός ανασυνδυασμός. Για το λόγο αυτό, πρόκειται να εφαρμοστεί η τεχνική «markerless gene replacement», στην οποία τελικό αποτέλεσμα είναι η αφαίρεση του μεγαλύτερου τμήματος του *ba0150*, χωρίς να γίνει αντικατάστασή του με γονίδιο ανθεκτικότητας. Σε αυτή την περίπτωση, δεν παρεμβάλλεται κάποιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) και επομένως δεν υπάρχει περίπτωση διατάραξης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης γειτονικών γονιδίων [42].

Το μεταλλαγμένο στέλεχος *Δba0150* παρουσίασε φαινότυπο πολύ διαφορετικό σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα βλαστητικά κύτταρα του μεταλλάγματος εμφάνισαν πιο επιμηκυσμένες αλυσίδες ενώ το σχήμα τους ήταν παραλλαγμένο (καμπυλωτό) σε σχέση με τα αντίστοιχα του αγρίου τύπου. Επίσης, το μετάλλαγμα παρουσίασε καθυστέρηση στη βλάστηση των σπορίων του. Συγκεκριμένα, η απενεργοποίηση του γονιδίου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή καταλοίπων μουραμικής δ-λακτάμης στο φλοιό των σπορίων, και επομένως να αναστέλλεται η δράση των υδρολυτικών ενζύμων GSLEs που απαιτούνται προκειμένου να βλαστήσουν τα σπόρια [43]. Ανάλογη συμπεριφορά παρουσιάστηκε και στην περίπτωση απενεργοποίησης του γονιδίου της PdaB από τον *B. subtilis* όσον αφορά τα σπόρια. Συγκεκριμένα, η δομή των σπορίων του μεταλλαγμένου στελέχους διέφερε από την αντίστοιχη του αγρίου τύπου και παρατηρήθηκε αναστολή στη βλάστησή τους οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η PdaB είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των σπορίων μετά το τελευταίο στάδιο της σπορίωσης [35]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι το *Δba0150* παρουσίασε καθυστέρηση στην αυτόλυση σε σχέση με τον άγριο τύπο. Σε αυτό ενδέχεται να συμβάλλουν πιθανές αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την πρόληψη της πρόσδεσης των αυτολυσινών στο κυτταρικό τοίχωμα και κατ' επέκταση της δράσης τους [44].

Είναι γνωστό ότι η μελέτη της επίδρασης της λυσοζύμης στα μεταλλάγματα καταδεικνύει το ρόλο των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης στην παθογένεια [3,9]. Πολλά παθογόνα μετριάζουν την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή μέσω τροποποίησης της πεπτιδογλυκάνης τους, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση απενεργοποίησης του γονιδίου της απακετυλάσης N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης του οργανισμού *L. monocytogenes*, όπου το μετάλλαγμα εμφάνισε ευαισθησία στη δράση της λυσοζύμης [16]. Στην παρούσα εργασία, το μετάλλαγμα εμφάνισε ανθεκτικότητα στη δράση της λυσοζύμης αλλά ευαισθησία στη δράση της μουτανολυσίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη δομή της πεπτιδογλυκάνης του μεταλλαγμένου στελέχους. Αν και τα δύο υδρολυτικά ένζυμα έχουν ως υπόστρωμα την πεπτιδογλυκάνη, ωστόσο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εξειδίκευσή τους διαφέρει [36,37].

Πειράματα κυτταρικού εντοπισμού με GFP (Green Fluorescent Protein) της PdaB στον *B. subtilis*, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη GFP που παρήχθη κατά το μεσαίο στάδιο της

σπορίωσης στο πρώιμο ενδοσπόριο, διαχύθηκε στο μητρικό κύτταρο κατά τα τελευταία στάδια της σπορίωσης. Επομένως, η PdaB ενδέχεται να είναι απαραίτητη για τη βλάστηση των σπορίων [35]. Σχετικά με το ένζυμο BA0150, δεν ελήφθησαν πληροφορίες όσον αφορά τον κυτταρικό εντοπισμό του στον *B. anthracis*. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη χαμηλή έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης, είτε στη μη σωστή αναδίπλωση της RFP με αποτέλεσμα το χαμηλό σήμα φθορισμού. Τα πειράματα κυτταρικού εντοπισμού θα συνεχιστούν με την κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης Ba0150-GFP. Θα χρησιμοποιηθεί μετάλλαγμα της GFP, η οποία έχει ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον κυτταρικό εντοπισμό άλλων πρωτεϊνών του *B. anthracis* (Μπαλωμένου Σ., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Για την περαιτέρω μελέτη και την εξακρίβωση του βιολογικού ρόλου του ενζύμου της παρούσας εργασίας, προβλέπεται να γίνει απομόνωση και ανάλυση της πεπτιδογλυκάνης, τόσο στα βλαστητικά κύτταρα όσο και στα σπόρια του μεταλλαγμένου στελέχους, (συνεργασία με τον Δρ. David Popham, Virginia Tech, Blacksburg, USA). Η διερεύνηση διαφόρων μορφολογικών ή άλλων αλλαγών στο συγκεκριμένο στέλεχος, θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τις βιολογικές διαδικασίες όπου εμπλέκεται. Επίσης, η μελέτη της δομής των σπορίων του μεταλλαγμένου στελέχους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης θα αποκαλύψει πολλά στοιχεία σχετικά με το ρόλο της απακετυλάσης στα σπόρια και τη βλάστησή τους. Παράλληλα, η χρήση του μεταλλαγμένου στελέχους για τη μόλυνση οργανισμών μοντέλων θα καταδείξει το ρόλο του ενζύμου στην παθογένεια.

Μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσιάσει επίσης η κρυστάλλωση και η λύση της δομής της BA0150 (συνεργασία με τον Δρ. David Christianson, University of Pennsylvania, USA), καθώς θα δώσει απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου, την εξειδίκευση (specificity) για το υπόστρωμά του και θα αποτελέσει εργαλείο μελέτης του καταλυτικού πυρήνα NodB. Κάτι τέτοιο θα φέρει στο φως τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο, το ρόλο πιθανών μεταλλικών ιόντων στην κατάλυση και θα επιτρέψει τη σύγκριση με τη δομή και κατ' επέκταση το ρόλο άλλων γνωστών απακετυλασών.

Με δεδομένο ότι το βακτήριο *B. anthracis* είναι εξαιρετικά επικίνδυνο αλλά παράλληλα πολύ ενδιαφέρον, καθώς θεωρείται ως πιθανό βιολογικό όπλο, ο χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου ενζύμου θα αποτελέσει ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας των απακετυλασών πολυσακχαριτών αλλά και την περαιτέρω μελέτη της *in vivo* δράσης και του ρόλου τους στη φυσιολογία και την παθογένεια του *B. anthracis*. Απώτερος στόχος είναι η ανάπτυξη αναστολέων του ενζύμου με αντιβακτηριακή δραστηριότητα.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Shockman, G.D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., and Massidda O. (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins and autolysis. *Microb Drug Resist*, 2(1):95-98.
2. Atrih, A., and Foster S.J. (1999) The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Kluwer Academic Publishers*, 75:299-307.
3. Boneca, I.G. (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Cur. Op. Microbiology*, 8: 46-53.
4. Heijenoort, J. V., and Gutmann, L. (2000) Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation , and susceptibility to β -lactams. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* 97: 5028-5030.
5. Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstuhl, C., Zarfel, G., and Koraimann, G. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology*, 151: 3455-3467.
6. Park, J.T. and Uehara, T. (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 72(2): 211-227.
7. Holtje, J.V. (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, 164: 243-254.
8. Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., and Mengin-Lecreulx, D. (2003) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.*, 278: 41702-41708.
9. Amano, K., Hayashi, Y., Araki, Y., and Ito, E. (1977) The action of lysozyme on peptidoglycan with N-unsubstituted glucosamine residues. Isolation of glycan fragments and their susceptibility to lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, 76: 299-307.
10. Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32:149-167.

11. Vollmer, W. (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 287-306.
12. Caufray, F., Martinou, A., Dupont, C. and Bouriotis, V. (2003) Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* 338 , 687-692.
13. Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N. and Bouriotis, V. (1993) The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 8005-8008.
14. Vollmer, W., and Tomasz, A. (2000) The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 275: 20496–20501.
15. Psylinakis, E., Boneca, I.G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S.J., Varum, K.M. and Bouriotis, V. (2005) Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem* 280: 30856–30863.
16. Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rousselle, J.C., Cayet, N., Prévost, M.C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D.J., Cossart, P. and Girardin, S.E. (2007) A critical role for peptidoglycan *N*-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104: 997–1002.
17. Meyrand, M., Boughammoura, A., Courtin, P., Mézange, C., Guillot, A. and Chapot-Chartier, M.P. (2007) Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 153: 3275-3285.
18. Wang, G., Olczak, A., Forsberg, L.S. and Maier, R.J. (2009) Oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 284: 6790-6800.
19. Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., de la Cruz Domínguez-Punaro, M., Harel, J., Bui, N.K., Vollmer, W. and Gottschalk, M. (2008) Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol.* 70(5): 1120-1135.

20. Vollmer, W. and Tomasz, A. (2002) Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 70(12): 7176-7178.
21. Fukushima, T., Yamamoto, H., Atrih, A., Foster, S.J. and Sekiguchi, J. (2002) A polysaccharide deacetylase gene (*pdaA*) is required for germination and for production of muramic δ -lactam residues in the spore cortex of *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* 184: 6007-6015.
22. Gilmore, M.E., Bandyopadhyay, D., Dean, A.M., Linnstaedt, S.D., and Popham, D.L. (2004) Production of muramic delta-lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 184: 6007-6015.
23. Blair, D.E., and van Aalten, D.M.F. (2004) Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with *N*-acetylglucosamine. *FEBS Letters* 570: 13-19.
24. Deng, D.M., Urch, J.E., ten Cate, J.M., Rao, V.A., van Aalten, D.M. and Crielaard, W. (2009) *Streptococcus mutans* SMU.623c codes for a functional, metal-dependent polysaccharide deacetylase that modulates interactions with salivary agglutinin. *J Bacteriol.* 191(1): 394-402.
25. Milani, C.J., Aziz, R.K., Locke, J.B., Dahesh, S., Nizet, V. and Buchanan, J.T. (2010) The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. *Microbiology.* 156(2): 543-54.
26. Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. and Otto, M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279, 54881–54886.
27. Fouet A. (2009) The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med.* 30(6): 374-385.
28. Weyant, R.S., Ezzell, J.W. and Popovic, T. (2001) Basic Laboratory Protocols for the presumptive identification of *Bacillus anthracis*. CDC, Centers for Disease Control and Prevention.
29. Setlow, P. (2007) I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology.* 15(4): 172-180.

30. Carr, K.A., Lybarger, S.R., Anderson, E.C., Janes, B.K. and Hanna, P.C. (2010) The role of *Bacillus anthracis* germinant receptors in germination and virulence. *Molecular Microbiology*. 75(2): 365-375.
31. Heffron J.D., Lambert, E.A., Sherry, N. and Popham, D.L. (2010) Contributions of four cortex lytic enzymes to germination of *Bacillus anthracis* spores. *Journal of Bacteriology*. 192(3): 763-770.
32. Heffron, J.D., Orsburn, B. and Popham, D.L. (2009) Roles of germination-specific lytic enzymes CwlJ and SleB in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 191(7): 2237-2247.
33. Heffron, J.D., Lambert, E.A., Sherry, N. and Popham, D.L. (2011) *In vitro* studies of peptidoglycan binding and hydrolysis by the *Bacillus anthracis* germination-specific lytic enzyme SleB. *Journal of Bacteriology*. 193(1): 125-131.
34. Dowd, M.M., Orsburn, B. and Popham, D.L. (2008) Cortex peptidoglycan lytic activity in germinating *Bacillus anthracis* spores. *Journal of Bacteriology*. 190(13): 4541-4548.
35. Fukushima, T., Tanabe, T., Yamamoto, H., Hosoya, S., Sato, T., Yoshikawa, H. and Sekiguchi, J. (2004) Characterization of a polysaccharide deacetylase gene homologue (pdaB0 on Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 136: 283-291.
36. Gilmore, M.E., Bandyopadhyay, D., Dean, A.M., Linnstaedt, S.D. and Popham, D.L. (2004) Production of muramic δ -lactamin *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 186: 80-89.
37. Budzik, J.M., Oh, S.Y. and Schneewind, O. (2008) Cell wall anchor structure of BcpA pili in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 283: 36676-36686.
38. Read, T., Peterson, S., Tourasse, N., Baillie, L., Paulsen, I., Nelson, K., Tettelin, H., Fouts, D., Eisen, J., Gill, S., Holtzapple, E., Okstad, O., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J., Beanan, M., Dodson, R., Brinkac, L., Gwinn, M., DeBoy, R., Madupu, R., Daugherty, S., Durkin, A., Haft, D., Nelson, W., Peterson, J., Pop, M., Khouri, H., Radune, D., Benton, J., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I., Weidman, J., Berry, K., Plaut, R., Wolf, A., Watkins, K., Nierman, W., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J., White, O., Salzberg, S., Thomason, B., Friedlander, A., Koehler, T., Hanna,

- P., Kolsto, A.-B. and Fraser, C. (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423: 81-86.
39. Blair, D.E., and van Aalten, D.M.F. (2004) Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetylglucosamine. *FEBS* 570: 13-19.
40. Blair, D.E., Schuttelkopf, A.W., MacRae, J.I., and van Aalten, D.M.F. (2005) Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 15429-15434.
41. Taylor, E.J., Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Vincent, F., Brzozowski, A.M., Dupont, C., Shareck, F., Centeno, M.S., Prates, J.A., Puchart, V., Ferreira, L.M., Fontes, C.M., Biely, P. and Davies, G.J. (2006) Structure and activity of two metal-ion dependent acetyl xylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to Peptidoglycan deacetylases. *J Biol Chem.* 281: 10968-10975.
42. Janes, B.K. and Stibitz, S. (2006) Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity.* 74(3): 1949-1953.
43. Popham, D.L., Helin, J., Costello, C.E. and Setlow, P. (1996) Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93: 15405-15410.
44. Smith, T.J., Blackman, S.A. and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, 146: 249-262.