

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται
σε καταβολικές πορείες αποδόμησης αρωματικών
ενώσεων από το βακτήριο *Arthrobacter*
phenanthrenivorans, Sphe3.

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ασημακούλα Σταματία

Απρίλιος, 2017

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται
σε καταβολικές πορείες αποδόμησης αρωματικών
ενώσεων από το βακτήριο *Arthrobacter*
phenanthrenivorans, Sphe3.

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ασημακούλα Σταματία

Απρίλιος, 2017

Η παρούσα Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιοτεχνολογία».

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής διεξήχθη στο ερευνητικό εργαστήριο της Βιοχημείας στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστίες

Πρώτη απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διατριβής μου κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση αυτής της διατριβής. Η διαρκής βοήθεια και καθοδήγησή της τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή ήταν καθοριστικές για την επίτευξη του στόχου μου. Η εκτίμησή μου στο πρόσωπό της είναι αμέριστη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής: την κα. Αφένδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Χατζηλουκά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Φριλίγγο, Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Τζαβάρα, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα άτομα που στελέχωσαν το ερευνητικό εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας το διάστημα διεξαγωγής του πειράματός μου και κυρίως ευχαριστώ τους Ευγενία Καραμπίκα, Νώντα Τσαγκογιάννη, Αγγελική Καλογεροπούλου για τις συμβουλές, τη συμπαράσταση και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν. Ωστόσο, οι πιο θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να έχουν παραλήπτη τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελπινίκη Βανδέρα, της οποίας η καθοδήγηση υπήρξε ουσιαστική καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα άτομα του ερευνητικού εργαστηρίου της Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για τη θερμή φιλοξενία και το ευχάριστο κλίμα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Βαγγέλη Σφήκα για τη βοήθεια και το χρόνο που μου αφιέρωσε.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους. Στην οικογένειά μου, που είναι πάντα δίπλα μου, στηρίζει τις επιλογές μου και αποτελεί αρωγό της παρούσας προσπάθειας. Στους φίλους μου, που κάθε επίτευγμά μου το χαίρονται σα δικό τους. Στο σύντροφό μου, που δε με αφήνει στιγμή να αμφιβάλλω για τις δυνατότητές μου. Σας ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου και θα βάζω πάντα τα δυνατά μου να σας κάνω υπερήφανους.

Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται σε καταβολικές πορείες αποδόμησης αρωματικών ενώσεων από το βακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans*, Sphe3.

Περίληψη

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι ευρέως διαδεδομένοι και δομικά ποικιλόμορφοι, κοινοί περιβαλλοντικοί ρυπαντές προερχόμενοι από φυσικές διεργασίες (δασικές πυρκαγιές), αλλά και από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (επεξεργασία πετρελαίου). Χαρακτηρίζονται από ιδιότητες καρκινογένεσης και μεταλλαξιγένεσης και συνιστούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία μέσω της βιοσυσσώρευσής τους στην τροφική αλυσίδα. Ένας από τους αποτελεσματικότερους τρόπους απομάκρυνσης των PAH από το περιβάλλον είναι η μικροβιακή βιοαποδόμηση. Οι μικροοργανισμοί δια μέσου πολύπλοκων μεταβολικών διεργασιών επιτυγχάνουν την πλήρη εξάλειψη των αρωματικών ρυπαντών με οικονομικό τρόπο κι έτσι κατέχουν εξέχουσας σημασίας ρόλο στην εξυγίανση του περιβάλλοντος μέσω της διεργασίας της βιοαποδόμησης.

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που απομονώθηκε από έδαφος ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο, έχει την ιδιότητα να καταβολίζει αρωματικές ενώσεις όπως φαινανθρένιο, φθαλικό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας.

Μετά από *in silico* μελέτες επιλέχθηκαν τα γονίδια έντεκα διοξυγονασών και ενός μεταγραφικού παράγοντα του Sphe3 που εμπλέκονται στις πορείες καταβολισμού των PAH και μελετήθηκαν τα επίπεδα μεταγραφής τους με real-time qRT-PCR, όταν το Sphe3 καλλιεργείται σε MM M9 με γλυκόζη, φαινανθρένιο, φθαλικό, πρωτοκατεχοϊκό, βενζοϊκό ή γεντισικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Όλα τα υπό μελέτη γονίδια επάγονται σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα το υπόστρωμα. Την αρχική υδροξυλίωση των υποστρωμάτων φαίνεται να επιτελούν τα γονίδια των διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα που εντοπίζονται στο μεγάλο πλασμίδιο του Sphe3. Παρουσία φαινανθρενίου και των ενδιάμεσων μεταβολιτών του (φθαλικό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ) φαίνεται να ακολουθείται η πορεία του ο-φθαλικού και στη συνέχεια η πορεία 4,5-σπάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, ενώ η πορεία 3,4-σπάσης του πρωτοκατεχοϊκού φαίνεται να ευνοείται σε υπόστρωμα βενζοϊκού οξέος. Παρουσία βενζοϊκού και γεντισικού οξέος φαίνεται πως το Sphe3 χρησιμοποιεί διαφορετικές καταβολικές πορείες, εφόσον ευνοείται η μεταγραφή των διοξυγονασών της κατεχόλης και του γεντισικού.

Περαιτέρω μελέτες μέσω των “-omics” τεχνολογιών θα ρίξουν φως στις διαφορετικές πορείες καταβολισμού στο Sphe3. Η γνώση των καταβολικών αυτών πορειών θα οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών βιοαποδόμησης που χρησιμοποιούν τα βακτήρια για τη διάσπαση ξενοβιοτικών ουσιών και θα βοηθήσει στο σχεδιασμό αποδοτικότερων στρατηγικών βιοαποκατάστασης.

Transcriptional study of genes involved in catabolic degradation pathways of aromatic compounds in *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants, whose carcinogenicity and recalcitrance has caused great public health concern. One of the most effective ways of removing these compounds from the environment is microbial biodegradation. *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 is capable of using phenanthrene as the sole source of carbon and energy. *In silico* studies have led to the identification of genes involved in PAH degradation both in the catabolic plasmids and the chromosome of Sphe3.

In the present work the transcription of 11 Sphe3 dioxygenase genes and a transcriptional factor gene were studied in order to investigate the different catabolic pathways in relation to various aromatic growth substrates. Sphe3 cells were cultured on MM M9 with glucose, phenanthrene, phthalate, protocatechuate, benzoate and gentisate as sole carbon sources and transcription of the genes was studied by real-time qRT-PCR.

All the PAH catabolic genes seemed to be induced at different levels depending on the substrate. The ring hydroxylating dioxygenase genes of the large catabolic plasmid seem to be responsible for the initial dioxygenation of aromatic compounds in Sphe3. In the presence of phenanthrene and its intermediate metabolites (phthalate and protocatechuate), the catabolic pathway seems to proceed through the *o*-phthalate pathway and further 4,5-dioxygenation of protocatechuate, whereas, 3,4-dioxygenation of protocatechuate seems to be favored when benzoate is used as a substrate. In the presence of benzoate and gentisate different catabolic pathways seem to be used by strain Sphe3 since the expression of catechol and gentisate dioxygenases is favored.

Further research through “omics” studies in order to gain insight into the different catabolic pathways used by Sphe3 is required. The elucidation of such catabolic pathways would lead to a better understanding of the biodegradation mechanisms employed by bacteria for the dissipation of xenobiotic compounds and therefore, pave the way towards more efficient bioremediation approaches.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

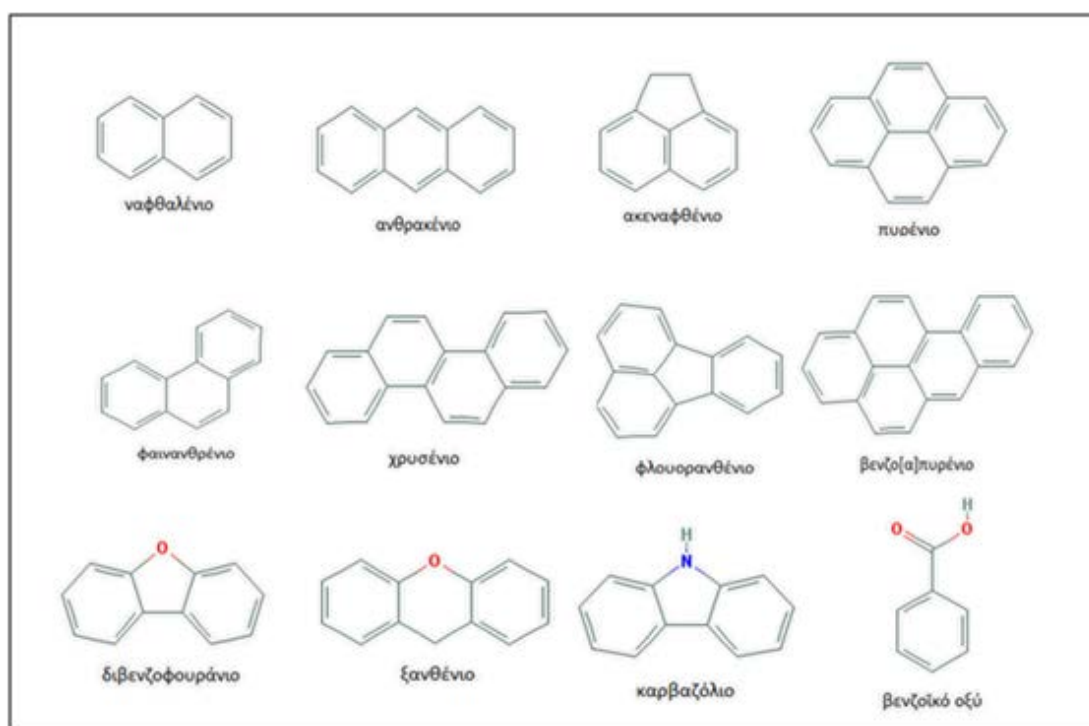
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ	1
1.1.1	Φυσικοχημικές ιδιότητες	1
1.1.2	Τοξικότητα	2
1.1.3	Προέλευση των ΡΑΗ και η κατανομή τους στο περιβάλλον	3
1.2	ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ	4
1.2.1	Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση ΡΑΗ	6
1.3	ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΑΠΟΔΟΜΟΥΝ ΡΑΗs	7
1.4	ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΑΝΘΡΕΝΙΟΥ	9
1.5	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΙΟΞΥΓΟΝΑΣΕΣ	11
1.5.1	Διοξυγονάσες υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα	11
1.5.2	Διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού πυρήνα	15
1.6	ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΘΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	18
1.7	ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΧΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	19
1.8	ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	23
1.9	ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΤΙΣΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ-ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΤΕΧΟΛΗΣ	26
1.10	ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>ARTHROBACTER</i>	26
1.10.1	Το στέλεχος <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	27
1.11	ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	33
2.2	ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ	33
2.3	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	34
2.4	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	35
2.4.1	Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων βακτηρίου, <i>Luria Broth Bertani (LB)</i>	35
2.4.2	Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια κυττάρων βακτηρίου, <i>Minimal Medium M9</i>	35
2.4.3	Πηγές άνθρακα	36
2.5	ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	37
2.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY	37
2.7	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ CTAB (MINI-PREPARATION)	38
2.8	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟ (ΚΙΤ) KEYPREP ΤΗΣ ANACHEM	39
2.9	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟ (ΚΙΤ) NUCLEOSPIN® RNA ΤΗΣ MACHEREY NAGEL (ΓΕΡΜΑΝΙΑΣ)	40
2.10	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	42
2.11	ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ RNA ΜΕ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ DNASE I	44
2.12	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	45
2.13	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	46
2.14	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ (REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION, RT-PCR)	48
2.14.1	Αντίδραση σύνθεσης cDNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο <i>PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa)</i>	48
2.15	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ QPCR ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ QRT-PCR	49
2.15.1	Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	52
2.15.1.1	Ανίχνευση μέσω μη ειδικής δέσμησης φθορίζουσας ουσίας σε δίκλινα μόρια DNA	52

2.15.1.2	Ανίχνευση με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου	54
2.15.2	Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
3.1	<i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	59
3.2	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	63
3.3	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΡΗΕ3.....	86
3.4	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	89
3.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ QRT-PCR	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	99
4.1	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΡΗΕ3 ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	99
4.2	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	108
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		110

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (συντομογραφία: ΠΑΥ, αγγλικά: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, συντομογραφία: PAHs) είναι οργανικές χημικές ενώσεις που περιέχουν αποκλειστικά άτομα άνθρακα (C) και υδρογόνου (H) και αποτελούνται από πολλαπλούς αρωματικούς δακτυλίους σε γραμμική, ευθεία ή γωνιακή διάταξη (Di-Toro et al. 2000). Επισήμως αυτή η τάξη των χημικών ενώσεων χαρακτηρίζεται από την έλλειψη περαιτέρω διακλαδισμένων υποκαταστάσεων σε αυτές τις αρωματικές δομές. Υποκαταστάσεις από άτομα οξυγόνου (O) και αζώτου (N) σε αυτές τις αρωματικές δομές χαρακτηρίζονται ως ετεροκυκλικές ενώσεις.



Σχήμα 1.1 Χαρακτηριστικές δομές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων.

1.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, τους επιτρέπουν να κατανέμονται σε αέρα, έδαφος και σε ύδατα, όπου η παρουσία τους είναι ευρέως διαδεδομένη (Sverdrup et al. 2002; Latimer & Zheng 2003; Baklanov et al. 2006).

Οι PAHs χωρίζονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Μικρού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight PAHs) χαρακτηρίζονται οι PAHs που περιέχουν μέχρι τρεις αρωματικούς δακτυλίους. Οι πιο χαρακτηριστικές χημικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το ναφθαλένιο, με δύο αρωματικούς δακτυλίους και τα ανθρακένιο και φαινανθρένιο, με τρεις αρωματικούς δακτυλίους. Υψηλού μοριακού βάρους (High Molecular Weight PAHs) χαρακτηρίζονται οι PAHs που περιέχουν πάνω από τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους.

Οι PAHs ως καθαρές ουσίες, υφίστανται ως ωχρό ή πρασινωπό-κίτρινο, λευκό ή άχρωμο κρύσταλλο και έχουν μια αχνή και αρωματική οσμή. Τα βασικά χαρακτηριστικά των PAH είναι τα υψηλά σημεία τήξης και βρασμού (ως εκ τούτου είναι στερεοί), η χαμηλή πίεση ατμού και η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Τα δύο τελευταία χαρακτηριστικά τείνουν να μειώνονται με την αύξηση του μοριακού βάρους, αντίθετα, η αντίσταση στην οξείδωση και η αναγωγική ικανότητα αυξάνονται (Masih 2012). Η διαλυτότητα των PAH μειώνεται για κάθε επιπλέον δακτύλιο (Masih et al. 2010).

Οι PAHs σε θερμοκρασία δωματίου είναι συνήθως στερεοί, εξαιρετικά υδρόφοβοι και είναι πολύ διαλυτοί σε οργανικούς διαλύτες, επειδή είναι εξαιρετικά λιπόφιλα μόρια. Η διαλυτότητα των PAH στο νερό είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν. Επίσης εκδηλώνουν φωτοευαισθησία, θερμοανθεκτικότητα και αγωγιμότητα (Akyüz & Çabuk 2010).

1.1.2 Τοξικότητα

Η τοξικότητα των PAH αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1761 από τον Τζον Χίλ (John Hill), ένα γιατρό ο οποίος κατέγραψε μια υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου της ρινικής κοιλότητας σε χρήστες καπνού (Cerniglia 1984).

Στις αρχές του 1900 αναγνωρίστηκε ευρέως η σύνδεση της ρητίνης, της αιθάλης και της ανθρακόπισσας με την καρκινογένεση. Μια σειρά επιδημιολογικών μελετών έδειξαν ότι διάφορες επαγγελματικές ομάδες πιθανώς εκτεθειμένες σε σύνθετα μίγματα που περιέχουν PAHs βρίσκονται σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, του στήθους, του δέρματος, της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου (Mastrangelo et al. 1996) καθώς και αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη (Barnett et al. 2010). Εκτός από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος, αυξανόμενες ενδείξεις υποστηρίζουν την ύπαρξη αναπτυξιακής τοξικότητας από προγεννητική ή πρώιμη μεταγεννητική έκθεση σε PAHs (Perera et al. 2003).

Οποιαδήποτε ποσότητα των ενώσεων PAH θεωρείται επικίνδυνη για το περιβάλλον. Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους και της χαμηλής διαλυτότητας, οι PAHs είναι ανθεκτικοί στη βιοαποδόμηση και μπορούν να βιοσυσσωρευτούν στο περιβάλλον μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ως εκ τούτου, οι PAHs στο περιβάλλον αντιπροσωπεύουν μια μακροπρόθεσμη απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι εξαιρετικά λιποδιαλυτές ενώσεις που απορροφώνται άμεσα από το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών (Cerniglia 1984) και κατανέμονται ταχέως στους λιπαρούς ιστούς. Ο μεταβολισμός των PAH πραγματοποιείται μέσω του συστήματος του κυτοχρώματος P-450 με οξείδωση ή υδροξυλίωση σαν πρώτο βήμα (Stegeman et al. 2001) με αρχικά προϊόντα εποξειδία που μετατρέπονται περαιτέρω σε *trans*-διϋδροδιόλες (Shou et al. 1996). Τα δραστικά αυτά ενδιάμεσα μόρια δημιουργούν ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA (Rice & Baker 2007) και έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σε ένα φάσμα κυτταρικών μεταλλάξεων που μπορεί να είναι τερατογόνες (Marston et al. 2001; Wells et al. 2010).

1.1.3 Προέλευση των PAH και η κατανομή τους στο περιβάλλον

Οι PAHs υπάρχουν σε αφθονία στο σύμπαν και εικάζεται ότι έχουν σχηματιστεί ήδη στα πρώτα δύο δισεκατομμύρια χρόνια μετά τη Μεγάλη Έκρηξη (Hudgins et al. 2005) σε συνδυασμό με το σχηματισμό νέων άστρων και εξωπλανητών (Hoover, 2014).

Η κύρια πηγή προέλευσης των PAH είναι η ατελής καύση οργανικής ύλης όπως κάρβουνο, πετρέλαιο και ξύλο. Οι PAHs δεν συντίθενται χημικά για βιομηχανικούς σκοπούς. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες εμπορικές χρήσεις για αρκετούς από αυτούς. Κυρίως χρησιμοποιούνται σαν ενδιάμεσα για φάρμακα, αγροτικά προϊόντα, θερμοσκληρυνόμενες πλαστικές ύλες, λιπαντικά υλικά, φωτογραφικά προϊόντα. Εν τούτοις, οι γενικές χρήσεις κάποιων PAH είναι:

- *Ανθρακένιο*: παρασκευή χρωστικών, βαφών, πλαστικών, φυτοφαρμάκων και φαρμακευτικών προϊόντων.
- *Φλουορανθένιο*: παρασκευή αγροχημικών, βαφών και φαρμακευτικών προϊόντων.
- *Φλουορένιο*: παρασκευή φαρμακευτικών, χρωστικών, βαφών, φυτοφαρμάκων και θερμοσκληρυντικών προϊόντων.
- *Φαινανθρένιο*: παρασκευή ρητινών και φυτοφαρμάκων.
- *Πυρένιο*: παρασκευή χρωστικών.

Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες μπορεί να περιέχονται στην άσφαλτο που χρησιμοποιείται για την κατασκευή δρόμων, καθώς και για μονώσεις στεγών. Επιπλέον, ειδικά διυλισμένα προϊόντα των PAH χρησιμοποιούνται επίσης στον τομέα των ηλεκτρονικών και των υγρών κρυστάλλων (Abdel-shafy & Mansour 2016).

Τα ακόλουθα τρία είδη διεργασιών: πυρογενείς, πετρογενείς και βιολογικές, είναι οι κύριες πηγές προέλευσης των PAH στο περιβάλλον (Abdel-shafy & Mansour 2016).

Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται πυρόλυση, οι PAHs πυρογενούς προέλευσης σχηματίζονται όταν οργανικές ουσίες εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία χαμηλών επιπέδων οξυγόνου ή απουσία αυτού. Η ξηρά απόσταξη άνθρακα σε οπτάνθρακα και ανθρακόπισσα, ή η θερμική πυρόλυση υπολειμμάτων πετρελαίου σε ελαφρύτερους υδρογονάνθρακες είναι πυρολυτικές διεργασίες που συμβαίνουν σκόπιμα. Εν τω μεταξύ, άλλες ακούσιες διεργασίες συμβαίνουν κατά την ατελή καύση καυσίμων σε αυτοκίνητα και φορτηγά, κατά την ατελή καύση ξύλου σε δασικές πυρκαγιές και τζάκια, και κατά την ατελή καύση καυσίμων ελαίων σε συστήματα θέρμανσης. Οι θερμοκρασίες στις οποίες συμβαίνουν οι πυρογενείς διεργασίες κυμαίνονται μεταξύ 350° και 1200° C. Οι πυρογενείς PAHs βρίσκονται συνήθως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αστικές περιοχές και σε τοποθεσίες πιο κοντά σε πηγές των PAH. Επιπλέον, οι PAHs μπορούν να σχηματίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακατέργαστα έλαια που περιέχουν PAHs σχηματίστηκαν πάνω από εκατομμύρια χρόνια πριν σε θερμοκρασίες 100° – 150° C.

Οι πετρογενείς διεργασίες περιλαμβάνουν θερμικές αντιδράσεις παραγωγής ορυκτών καυσίμων, όπως η ωρίμανση του αργού πετρελαίου. PAHs πετρογενούς προέλευσης είναι κοινά λόγω της ευρείας μεταφοράς, της αποθήκευσης και της χρήσης αργού πετρελαίου και των προϊόντων του. Κύριες πηγές των PAH πετρογενούς προέλευσης αποτελούν οι πετρελαιοκηλίδες στον ωκεανό και στο γλυκό νερό, υπόγειες και υπέργειες διαρροές

δεξαμενών αποθήκευσης, η συσσώρευση τεράστιου αριθμού μικρών εκκρίσεων βενζίνης, λαδιών κινητήρα και ουσιών σχετικών με τις μεταφορές.

Από την άλλη, δεν είναι αρκετά γνωστό ότι PAHs μπορούν να παραχθούν βιολογικά. Για παράδειγμα, μπορούν να συντεθούν από ορισμένα φυτά και βακτήρια ή να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης της φυτικής ύλης (Wilson & Jones 1993). Ο τρόπος σχηματισμού των PAH μπορεί να είναι είτε φυσικός είτε ανθρωπογενής.

Παραδείγματα φυσικών πηγών PAH περιλαμβάνουν: δασικές πυρκαγιές, ηφαιστειακές εκρήξεις, βακτηριακές συνθέσεις και συνθέσεις από φύκη, πετρελαιοκηλίδες, διάβρωση των ιζηματογενών πετρωμάτων που περιέχουν υδρογονάνθρακες πετρελαίου και αποσύνθεση νεκρών φυτικών τμημάτων.

Τα παραδείγματα ανθρωπογενών πηγών προέλευσης PAH ποικίλουν:

- Μεγάλες εγκαταστάσεις στις οποίες πραγματοποιείται ατελής καύση (βιομηχανικές εγκαταστάσεις και αποτεφρωτήρες).
- Διάσπαρτες πηγές (εκπομπές καυσαερίου αυτοκινήτων και αεριωθούμενων αεροσκαφών, καπνός από ξυλόσομπες, καπνός πούρων και τσιγάρων, οικιακά μπάρμπεκιου).
- Άλλες ανθρωπογενείς πηγές των PAH περιλαμβάνουν διαρροές πετρελαιοειδών προϊόντων, λυματολάσπη, και απόβλητα πίσσας ή κρεοζωτέλαιου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ατελής καύση είτε φυσική, είτε ανθρωπογενής, έχει αναγνωριστεί ως ο σπουδαιότερος συντελεστής ύπαρξης των PAH στο περιβάλλον (Zhang et al. 2009)

Οι PAHs είναι ευρέως διαδεδομένοι ως ρυπαντές στην ατμόσφαιρα και μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις πριν από την εναπόθεσή τους μέσω ατμοσφαιρικής κατακρήμνισης σε έδαφος, υδάτινο περιβάλλον, ιζήματα, βλάστηση ή ζώα (Ravindra et al. 2008).

Φυσικές και ανθρωπογενείς πηγές των PAH, σε συνδυασμό με τα παγκόσμια συστήματα μεταφοράς, έχουν ως αποτέλεσμα την κατανομή των PAH σε όλο τον πλανήτη με συνέπεια οι PAHs να μεταφέρονται από την ατμόσφαιρα στη βλάστηση και τελικώς να βιοσυσσωρεύονται σε διάφορες τροφικές αλυσίδες (Edwards 1983; Wagrowski & Hites 1997).

Η απομάκρυνση των PAH από το περιβάλλον πραγματοποιείται με τεχνολογίες που κατηγοριοποιούνται σε φυσικοχημικές (εκχύλιση με διαλύτη), χημικές (οξειδωση με διάφορα χημικά), θερμικές (αποτέφρωση) και βιολογικές (βιοαποδόμηση, αερόβια και αναερόβια επεξεργασία, φυτοαπορρόπανση) (Gan et al. 2009).

1.2 Βιοαποδόμηση

Οι PAHs μπορούν να απομακρυνθούν από το περιβάλλον με αρκετές φυσικές και χημικές μεθόδους όπως προσρόφηση, εξάτμιση, φωτόλυση και χημική οξειδωση, αλλά οι μέθοδοι αυτές έχουν αρκετά μειονεκτήματα όπως το κόστος και η πολυπλοκότητα. Οι συμβατικές αυτές τεχνικές, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, δεν καταστρέφουν τους παράγοντες

ρύπανσης εντελώς, αλλά αντιθέτως τους μεταφέρουν σε άλλα σημεία. Για να λυθεί αυτό το φλέγον πρόβλημα, η ερευνητική κοινότητα επινόησε μια αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική αποκατάστασης γνωστή ως βιοαποδόμηση, η οποία τελειοποιείται σταδιακά για την καταπολέμηση της ρύπανσης. Αυτή η τεχνική αξιοποιεί τις ικανότητες αποτοξικοποίησης που έχουν οι μικροοργανισμοί για να μετατρέψουν τα επικίνδυνα οργανικά απόβλητα, συμπεριλαμβανομένων των ξενοβιοτικών ουσιών σε αβλαβή προϊόντα, συχνά σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό (Bamforth & Singleton 2005; Johnsen et al. 2005).

Βιοαποδόμηση είναι η μεταβολική διεργασία η οποία περιλαμβάνει τη διάσπαση μιας οργανικής ένωσης στα ανόργανα συστατικά της (ανοργανοποίηση). Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς μετατρέπουν τις οργανικές ενώσεις σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και λιγότερο πολύπλοκες (βιομετατροπή) με παράλληλη αύξηση της κυτταρικής τους μάζας και τελικά, τις μετατρέπουν σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα κατά την αερόβια αποδόμηση, με το οξυγόνο να χρησιμοποιείται ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων και σε μεθάνιο κατά την αναερόβια, με τελικούς δέκτες ηλεκτρονίων ουσίες όπως τα νιτρικά (NO_3^-), τα θειικά (SO_4^{2-}) και τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) (Haritash & Kaushik 2009; Gan et al. 2009). Η μικροβιακή βιοαποδόμηση μπορεί να συμβεί και μέσω της διεργασίας του συμμεταβολισμού, κατά την οποία πραγματοποιείται ταυτόχρονη αποδόμηση δύο οργανικών ενώσεων, όπου η αποδόμηση της δεύτερης ένωσης εξαρτάται από την παρουσία της πρώτης, χωρίς να αποτελεί για το μικροοργανισμό πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η διεργασία του συμμεταβολισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες (Janke & Fritsche 1985).

Η βιοαποδόμηση αντιμετωπίζει τους περιορισμούς που προκύπτουν από τις περισσότερες φυσικοχημικές διεργασίες με την καταστροφή πολλών οργανικών ρυπαντών με μειωμένο κόστος, υπό συνθήκες περιβάλλοντος και ως εκ τούτου έχει γίνει μια δημοφιλής εναλλακτική λύση απομάκρυνσης ρυπαντών, συμπεριλαμβανομένων και των PAH (Kastner 2000; Jorgensen 2007; Abdel-shafy & Mansour 2016).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της βιοαποδόμησης μιας ένωσης είναι τόσο βιοτικοί όσο και αβιοτικοί (Liu et al. 2017):

- οι μικροοργανισμοί: σύσταση πληθυσμών, αλληλεπίδραση μεταξύ πληθυσμών, συγκέντρωση, ενζυμική δραστηριότητα,
- περιβαλλοντικές συνθήκες: σύσταση εδάφους, ιστορικό ρύπανσης, pH, θερμοκρασία, οξυγόνο, επίπεδα αζώτου και φωσφορικών, κατάσταση αερισμού, παρουσία άλλων τοξικών ουσιών,
- το υπόστρωμα: φυσικοχημικές ιδιότητες, συγκέντρωση, τοξικότητα, βιοδιαθεσιμότητα.

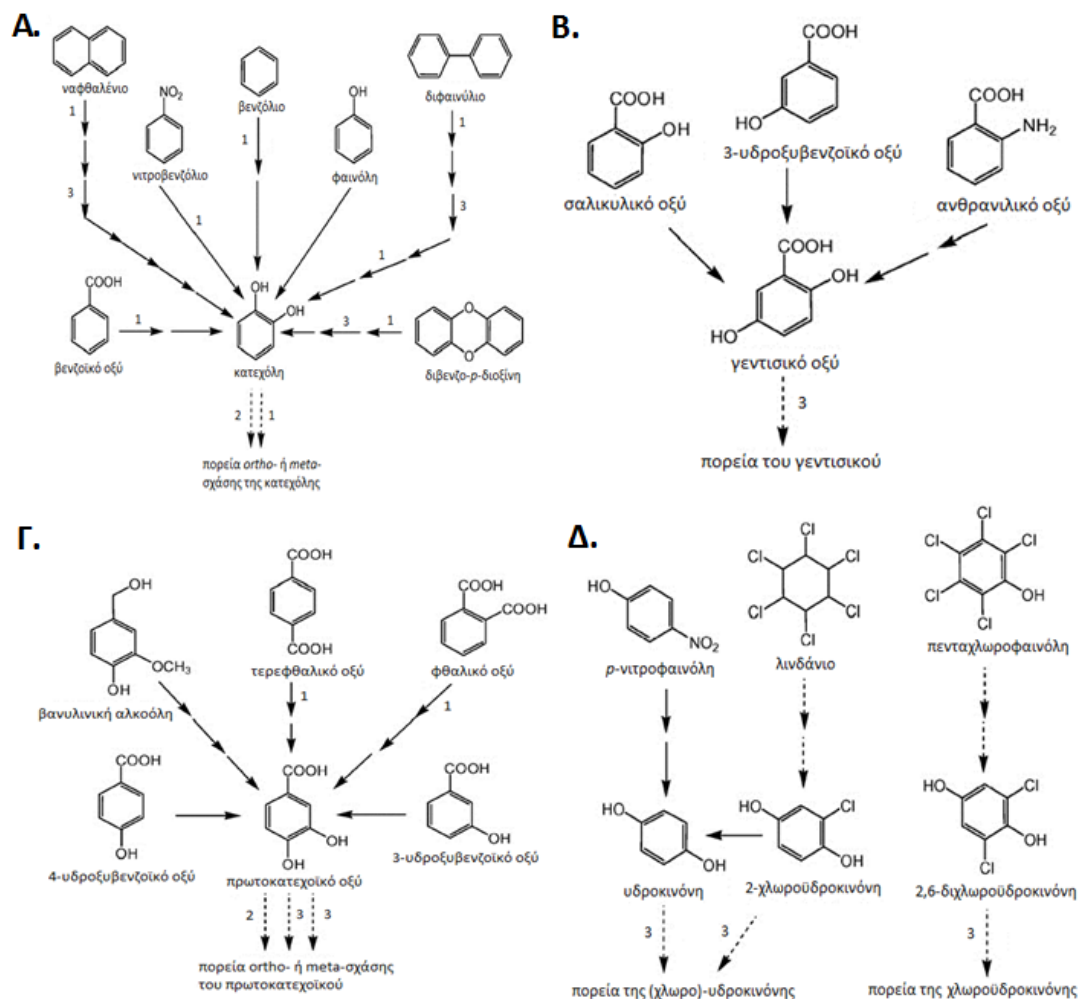
Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν απομονωθεί όλο και περισσότεροι μικροοργανισμοί, ικανοί να ανοργανοποιούν πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και μελετώνται όλο και περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό των PAH. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η διερεύνηση των ποικίλων μικροβιακών μεταβολικών διεργασιών, ώστε να

εμπλουτιστούν οι γνώσεις για τη μικροβιακή βιοαποδόμηση και την καλύτερη αξιοποίησή της στην εξάλειψη των αρωματικών ρυπαντών από το περιβάλλον (Cao et al. 2009).

Η βιοαποδόμηση των PAH έχει παρατηρηθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί σε ρυπασμένα ιζήματα και εδάφη υπάρχουν υπό αναερόβιες συνθήκες και η βιοαποδόμηση των ρυπαντών συμβαίνει κάτω από αυτές τις συνθήκες. Η αναερόβια βιοαποδόμηση των PAH είναι μια αργή διαδικασία, της οποίας ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (Coates et al. 1996).

1.2.1 Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση PAH

Κατά κανόνα οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν κάποια χαρακτηριστική καταβολική πορεία για κάθε τύπο αρωματικής ένωσης. Ωστόσο, η αερόβια αποδόμηση των αρωματικών ενώσεων συνήθως διεξάγεται μέσω ενός από τους παρακάτω τέσσερις ενδιάμεσους μεταβολίτες: κατεχόλη, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ ή υδροκινόνη (Σχήμα 1.2) (Vaillancourt et al. 2006).



Σχήμα 1.2 Ενδεικτικές πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων που οδηγούν σε έναν από τους τέσσερις ενδιάμεσους μεταβολίτες: Α. κατεχόλη, Β. γεντισικό οξύ, Γ. πρωτοκατεχοϊκό οξύ και Δ. υδροκινόνη. Κάθε βέλος αντιστοιχεί σε ένα βήμα αντίδρασης. Τα διακεκομμένα βέλη αντιστοιχούν σε πολλά βήματα αντίδρασης. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση. 1: οξυγονάση μη αιμικού σιδήρου τύπου Rieske, 2: ενδοδιολική διοξυγονάση, 3: εξωδιολική διοξυγονάση (Vaillancourt et al. 2006).

Η βιοαποδόμηση υπό αερόβιες συνθήκες περιλαμβάνει την εισαγωγή και των δύο ατόμων του μοριακού οξυγόνου στον αρωματικό πυρήνα του PAH, μια αντίδραση που καταλύεται από ένα πολυσύνθετο ένζυμο, τη διοξυγονάση. Η διοξυγονάση αποτελείται από μια αναγωγάση (ρεδουκτάση), μια φερρεδοξίνη και μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (Harayama et al. 1992).

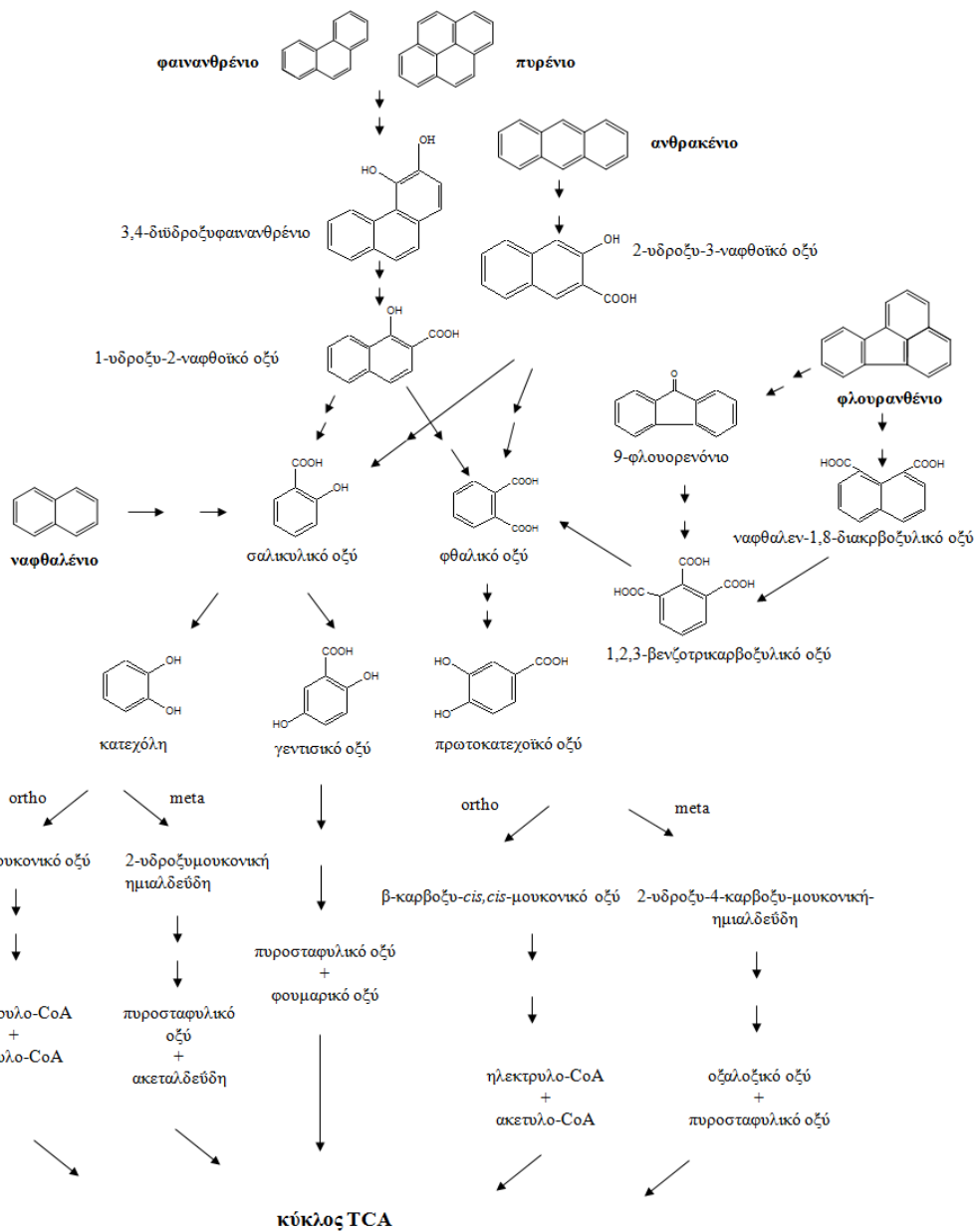
Το πρώτο βήμα στη βιοαποδόμηση των PAH είναι η δράση της διοξυγονάσης υδροξυλίωσης, η οποία ενσωματώνει άτομα οξυγόνου στον αρωματικό δακτύλιο του PAH, σχηματίζοντας μια *cis*-διϋδροδιόλη. Η *cis*-διϋδροδιόλη επαναρωματοποιείται από αφυδρογονάσες και σχηματίζει διϋδροξυλιωμένα ενδιάμεσα. Τα ενδιάμεσα αυτά των διολών υπόκεινται σε αλλαγές στον δακτύλιο από διοξυγονάσες σχάσης του δακτυλίου, μέσω *ortho*- ή *meta*-σχάσης και σχηματίζουν ενδιάμεσα, όπως η κατεχόλη, που διοχετεύονται τελικά στον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA) (Cerniglia 1992; Mallick et al. 2011).

Στον αναερόβιο καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων ακολουθείται μια διαφορετική στρατηγική για τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου, κυρίως βασισμένη σε αναγωγικές αντιδράσεις. Ενώ η αερόβια βιοαποδόμηση αρωματικών ενώσεων αποτελεί αντικείμενο μελέτης αρκετών δεκαετιών, η αναερόβια βιοαποδόμηση αρωματικών ενώσεων αποτελεί μια πιο πρόσφατη ανακάλυψη των μικροβιακών δυνατοτήτων που χρήζει περαιτέρω κατανόησης (Foght 2008; Carmona et al. 2009).

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων συνήθως εντοπίζονται σε συστάδες που απαρτίζονται από τα καταβολικά γονίδια που κωδικεύουν για τα καταβολικά ένζυμα, γονίδια που κωδικεύουν για πρωτεΐνες μεταφορείς, υπεύθυνες για την πρόσληψη και μεταφορά των αρωματικών ενώσεων εντός των κυττάρων και ρυθμιστικά γονίδια, που ρυθμίζουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Καταβολικά γονίδια εντοπίζονται τόσο στα χρωμοσώματα όσο και στα πλασμίδια των μικροοργανισμών. Η παρουσία καταβολικών γονιδίων στα πλασμίδια δίνει στα βακτήρια το πλεονέκτημα της διευκολυνόμενης οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς των γονιδίων αυτών μέσα στον πληθυσμό, με αποτέλεσμα τη γρήγορη προσαρμογή τους παρουσία νέων ξενοβιοτικών ενώσεων στα οικοσυστήματα όπου διαβιούν (Cao et al. 2009).

1.3 Βακτήρια που αποδομούν PAHs

Τα βακτήρια, τα οποία έχουν εμφανιστεί πάνω από τρία δισεκατομμύρια χρόνια πριν, έχουν αναπτύξει στρατηγικές για την απόκτηση ενέργειας από σχεδόν κάθε ένωση και θεωρούνται οι απόλυτοι καθαριστές της φύσης. Εξαιτίας της γρήγορης προσαρμοστικότητάς τους, τα βακτήρια χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση ή την εξυγίανση περιβαλλοντικών ρυπαντών. Διάφορα βακτήρια έχουν βρεθεί να αποδομούν πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, με την αποδόμηση του ναφθαλενίου και του φαινανθρενίου να αποτελούν τις πιο ευρέως μελετημένες (Ghosal et al. 2016).



Σχίμα 1.3 Προτεινόμενες πορείες αποδόμησης PAH στα βακτήρια (Κουκκου ΑΙ, 2011).

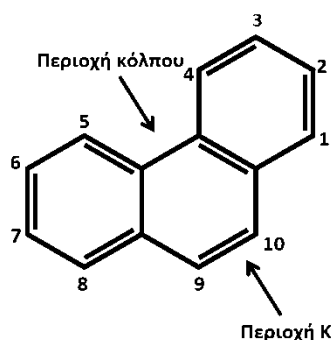
Οι βιοχημικές πορείες του βακτηριακού μεταβολισμού των PAH έχουν μελετηθεί. Σε σύγκριση με τους υψηλού μοριακού βάρους PAHs, οι μικρού μοριακού βάρους PAHs είναι πιο διαλυτοί στο νερό και συνεπώς πιο επιρρεπείς στη βιοαποδόμηση (Pannu *et al.*, 2003). Οι PAHs μικρού μοριακού βάρους, όπως το ναφθαλένιο, το φαινανθρένιο και το ανθρακένιο, αποδομούνται εύκολα από βακτήρια στο χώμα και υπό εργαστηριακές συνθήκες (Cerniglia 1992; Sutherland *et al.* 1995). Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα για τη μικροβιακή αποδόμηση PAH μεγάλου μοριακού βάρους έχει προοδεύσει και έχουν αναφερθεί κάποια στελέχη ικανά για την αποδόμηση τέτοιων PAH (Kanaly & Harayama 2000; Peng *et al.* 2008; Seo *et al.* 2009). Βακτηριακά στελέχη ικανά να αποδομούν PAHs

έχουν απομονωθεί επανειλημμένα, κυρίως από το χώμα. Βακτήρια ικανά να αποδομούν PAHs ανήκουν, ενδεικτικά, στα γένη *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium*, *Sphingomonas* (Seo et al. 2009).

Έχουν μελετηθεί επίσης αρκετοί μύκητες ικανοί να αποδομούν PAHs. Κάποιοι νηματοειδείς μύκητες, βασιδιομύκητες, μύκητες λευκής σήψης και δευτερομύκητες έχουν βρεθεί να αποδομούν PAHs πιο αποδοτικά σε σχέση με τα βακτήρια (Peng et al. 2008).

1.4 Αποδόμηση φαινανθρενίου

Το φαινανθρένιο, ένας τρικυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας, εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε μολυσμένα από PAHs ιζήματα, χώματα και χωματερές (Moody et al. 2001). Η βακτηριακή αποδόμηση του φαινανθρενίου έχει μελετηθεί εκτενώς. Ποικίλα βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί, όπως τα: *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, και *Sphingomonas* με την ικανότητα να χρησιμοποιούν το φαινανθρένιο σαν τη μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Seo et al. 2009). Το φαινανθρένιο διαθέτει την περιοχή κόλπου (bay region) και την Κ-περιοχή (Σχήμα 1.4). Μέσω των περιοχών αυτών μπορούν να σχηματιστούν εποξειδία, τα οποία είναι άκρως καρκινογόνα (Samanta & Chakraborti 1999; Samanta et al. 2002). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα μοντέλο για μελέτες του καταβολισμού PAH με καρκινογόνο δράση, όπως το βενζο[α]πυρένιο, το βενζο[α]ανθρακένιο και το χρυσένιο (Samanta et al. 1999).

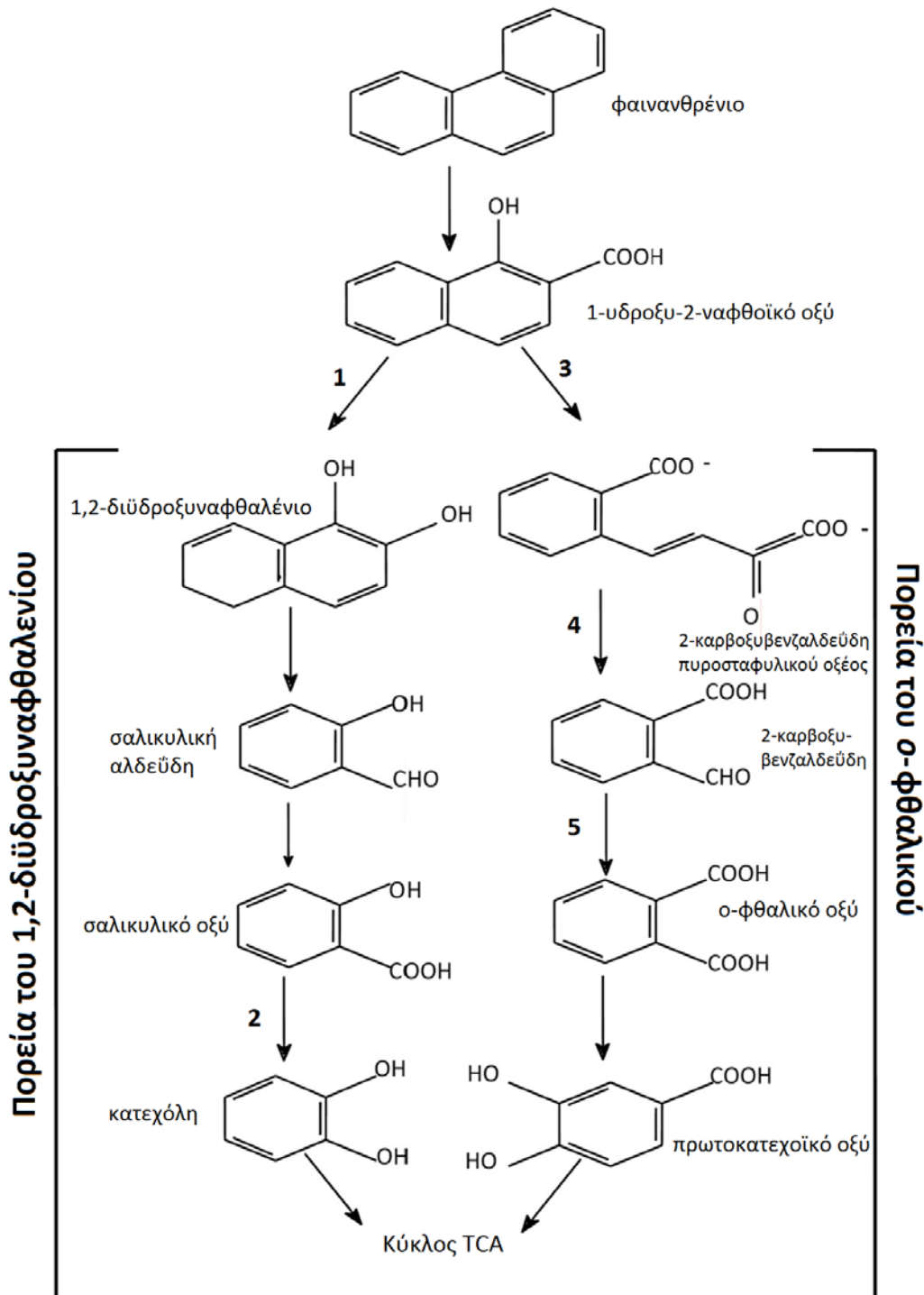


Σχήμα 1.4 Απεικόνιση των περιοχών "κόλπου" και "Κ" του φαινανθρενίου.

Στα βακτήρια ο καταβολισμός του φαινανθρενίου ξεκινά με την 3,4-υδροξυλίωση προς *cis*-3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφαινανθρένιο, το οποίο υφίσταται ενζυματική αφυδρογόνωση και σχηματίζεται το 3,4-διϋδροξυφαινανθρένιο. Στη συνέχεια, η διόλη μεταβολίζεται σε 1,2-διόλη του ναφθαλενίου μέσω *ortho*-σχάσης προς σχηματισμό του 2-(2-καρβοξυ-βινυλ)-ναφθαλέν-1-καρβοξυλικό οξύ και μέσω *meta*-σχάσης προς 4-(1-υδροξυ-ναφθαλεν-2-υλ)-2-οξο-βουτ-3-ενοϊκό οξύ (Seo et al. 2006). Και τα δυο προϊόντα μετατρέπονται στη συνέχεια σε 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω μέσω των εξής πορειών (Σχήμα 1.5) (Seo et al. 2009):

1. Πορεία του 1,2-διϋδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, κατά την οποία το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ με τη δράση της υδροξυλάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος μετατρέπεται σε 1,2-διϋδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, στη συνέχεια σε σαλικυλικό οξύ και αυτό σε κατεχόλη με τη δράση της σαλικυλικής υδροξυλάσης.

2. Πορεία του *o*-φθαλικού, κατά την οποία το 1-υδροξύ-2-ναφθοϊκό οξύ με τη δράση της διοξυγονάσης του 1-υδροξύ-2-ναφθοϊκού οξέος μετατρέπεται σε 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη του πυροσταφυλικού οξέος, η οποία με τη δράση της υδρατάσης/αλδολάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη, η οποία καταλήγει με τη δράση της αφοδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης σε *ortho*-φθαλικό οξύ. Το *ortho*-φθαλικό οξύ μεταβολίζεται προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ.



Σχήμα 1.5 Προτεινόμενες πορείες αποδόμησης του φαινανθρενίου από βακτήρια. 1: υδροξυλάση του 1-υδροξύ-2-ναφθοϊκού οξέος, 2: σαλικυλική υδροξυλάση, 3: διοξυγονάση του 1-υδροξύ-2-ναφθοϊκού οξέος, 4:

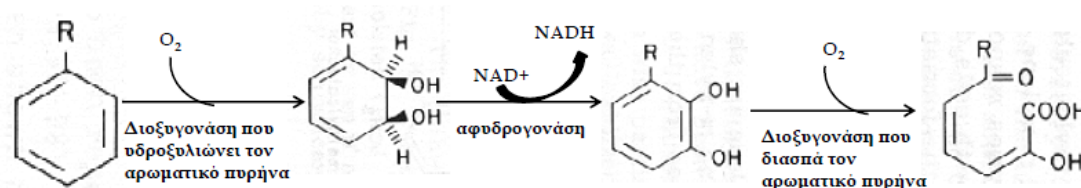
υδρατάση/αλδολάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος, 5: αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης (Seo et al. 2009).

Έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου από διάφορους μικροοργανισμούς και εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε καταβολικά πλασμίδια.

1.5 Βακτηριακές διοξυγονάσες

Κατά την βιοαποδόμηση υπό αερόβιες συνθήκες, η ενσωμάτωση του μοριακού οξυγόνου στον αρωματικό δακτύλιο του PAH καταλύεται από τις βακτηριακές διοξυγονάσες. Οι διοξυγονάσες είναι μεταλλοένζυμα με μη-αιμικό σίδηρο στο ενεργό κέντρο και ονομάζονται διοξυγονάσες τύπου Rieske μη-αιμικού σιδήρου (Harayama et al. 1992). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1. Διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα, που η δράση τους απαιτεί NAD(P)H ως δότη ηλεκτρονίων, και
2. Διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού πυρήνα, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία NAD(P)H, ενώ είναι απαραίτητη η διϋδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα για να μπορέσουν να δράσουν.

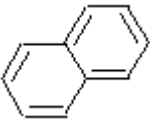
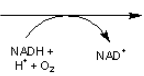
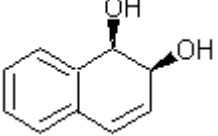


Σχήμα 1.6 Διάσπαση αρωματικών πυρήνων από διοξυγονάσες κατά την αερόβια αποδόμηση.

1.5.1 Διοξυγονάσες υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα

Οι διοξυγονάσες υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα (Ring Hydroxylating Dioxygenases-RHDs) καταλύουν την αρχική αντίδραση στη βακτηριακή βιοαποδόμηση μιας μεγάλης ποικιλίας αρωματικών και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, χλωριωμένων αρωματικών, νιτροαρωματικών, αμινοαρωματικών και ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων και αρωματικών οξέων. Οι διοξυγονάσες υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο σαν υπόστρωμα, προσθέτοντας και τα δύο άτομα του O₂ στον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος. Μέχρι σήμερα, πάνω από 100 διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα έχουν αναγνωρισθεί με βάση τη βιολογική τους δραστηριότητα ή την ομοιότητα στη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Πίνακας 1.1 Αντιπροσωπευτικοί τύποι αντιδράσεων *cis*-διϋδροξυλίωσης που καταλύονται από διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα.

Τύπος αντίδρασης	Υπόστρωμα	Ένζυμο	Προϊόν
<i>cis</i> -διϋδροξυλίωση	 ναφθαλένιο	διοξυγονάση του ναφθαλενίου 	 <i>cis</i> -1,2- διϋδροδιόλη

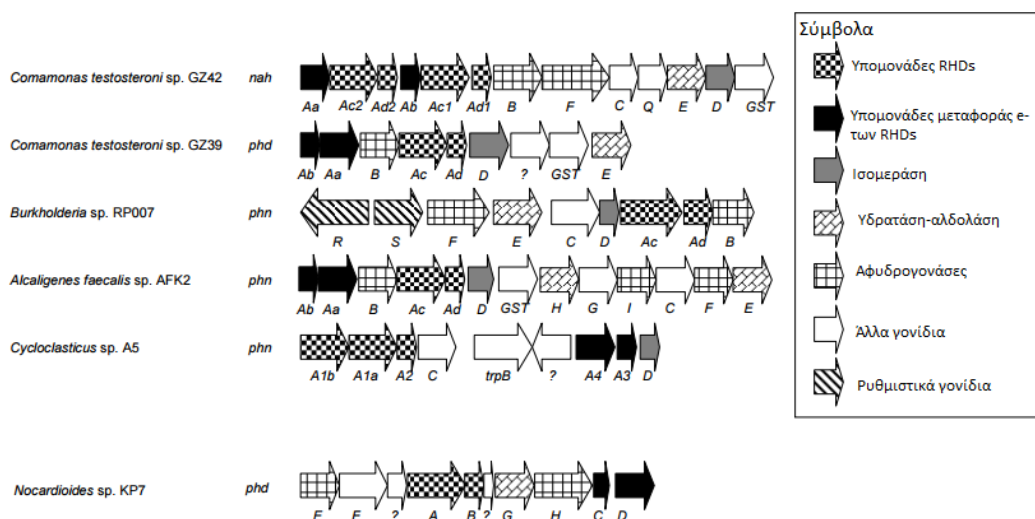
Συνοψίζοντας, τα συστήματα οξυγονασών των πρωτεϊνών Rieske μη αιμικού σιδήρου διεκπεραιώνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την οξείδωση του NAD(P)H ώστε να ενεργοποιηθεί το μοριακό O₂ που θα δράσει για τη διϋδροξυλίωση των αρωματικών δακτυλίων (Σχήμα 1.7).

Πίνακας 1.2 Ταξινόμηση διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα (Kweon et al. 2008).

Τάξη	Υπομονάδα	Ρεδουκτάση	Φερρεδοξίνη	Ενζυμικό σύστημα
I	Iα	α	FNRC-type FMN[2Fe-2S]P	- Aniline dioxygenase (<i>Acinetobacter</i> sp. YAA) Aniline oxygenase (<i>Pseudomonas putida</i> UCC22)
	Iαβ	α+β	FNRC-type FAD[2Fe-2S]R	- Phenoxybenzoate dioxygenase (<i>Alcaligenes</i> sp. BR60) Phenoxybenzoate dioxygenase (<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> POB310) Phthalate dioxygenase (<i>Burkholderia cepacia</i> DBO1) Toluene sulfonate monooxygenase (<i>Comamonas testosteroni</i> T-2)
II		α+β	FNRN-type FAD[2Fe-2S]R	- 2-Halobenzoate 1,2-dioxygenase (<i>Pseudomonas cepacia</i> 2CBS) Benzoate 1,2-dioxygenase (<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1) Anthranilate dioxygenase (<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1)
III	IIIα	α	FNRN-type FAD[2Fe-2S]R	[2Fe-2S]- type Carbazole 1,9a-dioxygenase (<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10)
	IIIαβ	α+β	FNRN-type FAD[2Fe-2S]R	[2Fe-2S]- type Naphthalene dioxygenase (<i>Pseudomonas</i> sp. 9816-4) 3,4-Dihydroxyphenanthrene dioxygenase (<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2) PAH dioxygenase (<i>Pseudomonas putida</i> OUS82) Naphthalene dioxygenase (<i>Ralstonia</i> sp. U2) Salicylate 5-hydroxylase (<i>Ralstonia</i> sp. U2)
IV		α+β	GR-type FAD	[2Fe-2S]- type Carbazole dioxygenase (<i>Sphingomonas</i> sp. CB3) Dioxin dioxygenase (<i>Sphingomonas</i> sp. RW1) Biphenyl dioxygenase (<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1) Toluene dioxygenase (<i>Pseudomonas putida</i> F1) Biphenyl 2,3-dioxygenase (<i>Pseudomonas</i> sp. LB400) Biphenyl dioxygenase (<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707)
V		α+β	GR-type FAD	[3Fe-4S]- type Phenanthrene dioxygenase (<i>Nocardioides</i> sp. KP7) Phthalate dioxygenase (<i>Terrabacter</i> sp. DBF63) Phthalate dioxygenase (<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1)

FNR: φερρεδοξίνη-NADP⁺ ρεδοκτάση; GR: γλουταθειονική ρεδοκτάση; PAH: πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Οι διοξυγονάσες υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα εντοπίζονται σε μια ποικιλία αρνητικών κατά Gram και θετικών κατά Gram βακτηρίων και είναι σημαντικές για τον καταβολισμό μιας ευρείας γκάμας περιβαλλοντικών ρύπων. Αν και η δράση τους είναι κοινή για όλα τα βακτηριακά στελέχη, η οργάνωση των γονιδίων τους χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αρχική υδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα συνήθως είναι οργανωμένα σε οπερόνια που κωδικεύουν για τις δύο υπομονάδες διοξυγονάσης, τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδοκτάσης. Σε αυτά τα οπερόνια εντοπίζονται συχνά και γονίδια που κωδικεύουν για αφυδρογονάσες, υδρατάσες/αλδολάσες καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Parales & Resnick 2006).



Σχήμα 1.8 Οργάνωση καταβολικών γονιδίων των PAH από αντιπροσωπευτικά στελέχη πρωτεοβακτηρίων, καθώς και του Gram⁺ *Nocardioideis* KP7 (Jouanneau et al. 2011).

Γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό των PAH μελετήθηκαν αρχικά σε στελέχη *Pseudomonas* που αναπτύχθηκαν παρουσία ναφθαλενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό του ναφθαλενίου ομαδοποιούνται σε δύο στενά συνδεδεμένα οπερόνια, τα οποία εντοπίζονται σε ένα πλασμίδιο, όπως αναφέρθηκε αρχικά για το πλασμίδιο NAH7 του στελέχους *Pseudomonas putida* G7 (Yen & Gunsalus 1982; Yen & Serdar 1988). Το ένα οπερόνιο περιλαμβάνει γονίδια που κωδικεύουν τη διοξυγονάση του ναφθαλενίου (*nahAaAbAcAd*) καθώς και γονίδια που κωδικεύουν ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό του σαλικυλικού οξέος (*nahABFCQED*). Το δεύτερο οπερόνιο ονομάζεται *sal* (*nahGTHINLQMKJ*) και κωδικεύει ένζυμα για τη μετατροπή του σαλικυλικού σε ενδιάμεσους μεταβολίτες που θα εισέλθουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Μεταξύ των δύο οπερονίων και με προσανατολισμό την αντίθετη κατεύθυνση εντοπίζεται το γονίδιο *nahR*, το οποίο κωδικεύει ένα μεταγραφικό παράγοντα τύπου LysR, ο οποίος ελέγχει την έκφραση και των δύο οπερονίων (Schell 1985; Tropel & van der Meer 2004). Η οργάνωση των γονιδίων καταβολισμού του ναφθαλενίου είναι παρόμοια και σε άλλα

στελέχη του γένους *Pseudomonas*, όπως NCIB 9816-4 (Simon et al. 1993) and *P. stutzeri* (Bosch et al. 1999; Bosch et al. 2000).

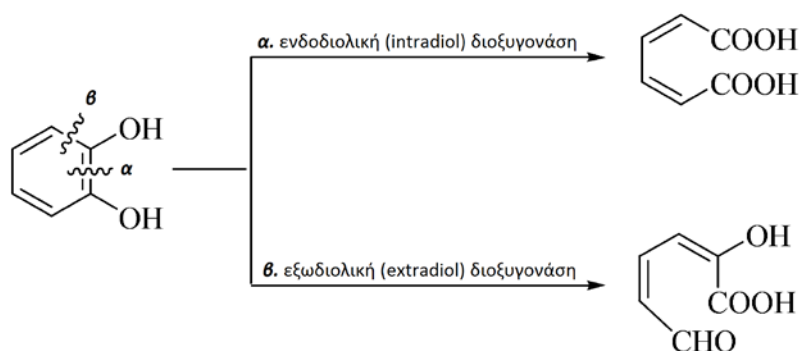
Έχουν χαρακτηριστεί γονίδια καταβολισμού των PAH που κωδικεύουν διοξυγονάσες και είναι εξελικτικά διαφορετικά από τα γονίδια *nah*, και οι μελέτες για αυτά τα γονίδια συνεχώς πληθαίνουν. Σε στελέχη *Comamonas testosteroni* η οργάνωση των γονιδίων (*phd*) που συμμετέχουν στον καταβολισμό του φαινανθρενίου βρέθηκε να είναι όμοια με την οργάνωση των αντίστοιχων γονιδίων του γένους *Pseudomonas*, με μόνη διαφορά ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια αφυδρογονάση διϋδροδιόλης (*phdB*) να εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικεύουν τη διοξυγονάση του φαινανθρενίου (Goyal & Zylstra 1997). Ίδια οργάνωση βρέθηκαν να έχουν τα γονίδια που συμμετέχουν στον καταβολισμό του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Alcaligenes faecalis* AKF2 (Kiyohara et al. 1982). Ωστόσο, το στέλεχος AKF2 έχει αποδειχθεί ότι καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του οφθαλικού, ενώ στα στελέχη *C. testosteroni* ακολουθείται η πορεία του σαλυκυλικού οξέος, όπως στα στελέχη *Pseudomonads*. Παρόμοια οργάνωση των γονιδίων καταβολισμού του φαινανθρενίου με το στέλεχος AKF2 βρέθηκε να έχουν τα αντίστοιχα γονίδια στο στέλεχος *Burkholderia* sp. RP007, με τη διαφορά ότι απουσίαζαν τα γονίδια που κωδικεύουν τις υπομονάδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στο στέλεχος *Cycloclasticus* A5, το γονίδιο *phnA1A2* που κωδικεύει τη διοξυγονάση του φαινανθρενίου και το γονίδιο *phnA3A4* που κωδικεύει μια φερρεδοξίνη και μια ρεδουκτάση ανήκουν σε μια συστάδα γονιδίων μεγέθους 10.5 kb (Kasai et al. 2003). Στο στέλεχος *Nocardioides* sp. KP7 υπάρχει μια συστάδα γονιδίων *phdEFABGHCD* που περιέχει τα εξής γονίδια: *phdE* που κωδικεύει μια αφυδρογονάση της διϋδροδιόλης, *phdF* που κωδικεύει μια εξωδιολική διοξυγονάση, *phdAB* που κωδικεύει τις α και β υπομονάδες της διοξυγονάσης του φαινανθρενίου και τα *phdG*, *phdH*, *phdC* και *phdD* που κωδικεύουν μια αλδολάση/υδρατάση, μια αφυδρογονάση αλδεΐδης, μια φερρεδοξίνη και μια ρεδουκτάση αντίστοιχα. Τα ένζυμα που κωδικεύονται από αυτή τη συστάδα γονιδίων καταλύουν τη μετατροπή του φαινανθρενίου σε 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ (Saito et al. 2000).

1.5.2 Διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού πυρήνα

Οι διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού πυρήνα (Ring-Cleaving Dioxygenases) καταλύουν το κρίσιμο βήμα διάσπασης του αρωματικού πυρήνα, αφού αυτός έχει αποσταθεροποιηθεί από τη δράση των διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα (Harayama et al. 1992).

Κατά βάση, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν κάποια χαρακτηριστική καταβολική πορεία για να αποδομήσουν κάθε τύπο αρωματικής ένωσης. Συγγενικές ενώσεις των προαναφερθέντων τεσσάρων χημικών ενώσεων (της κατεχόλης, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, του γεντισικού οξέος, της υδροκινόνης), όπως ομοπρωτοκατεχοϊκό, διϋδροξυφαινυλπροπιονικό και ομογεντισικό οξύ, μπορούν να αποτελέσουν ενδιάμεσους μεταβολίτες. Επιπλέον, τουλάχιστον δύο τύποι ενώσεων έχουν αναγνωριστεί ως υποστρώματα για τη δράση των διοξυγονασών σχάσης αρωματικού πυρήνα, το σαλυκυλικό οξύ και η 2-αμινοφαινόλη (Vaillancourt et al. 2006). Στη συνέχεια, τα κοινά αυτά ενδιάμεσα υπόκεινται σε οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα και τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών τροφοδοτούν τις αντιδράσεις του κεντρικού μεταβολισμού (Harwood & Parales 1996).

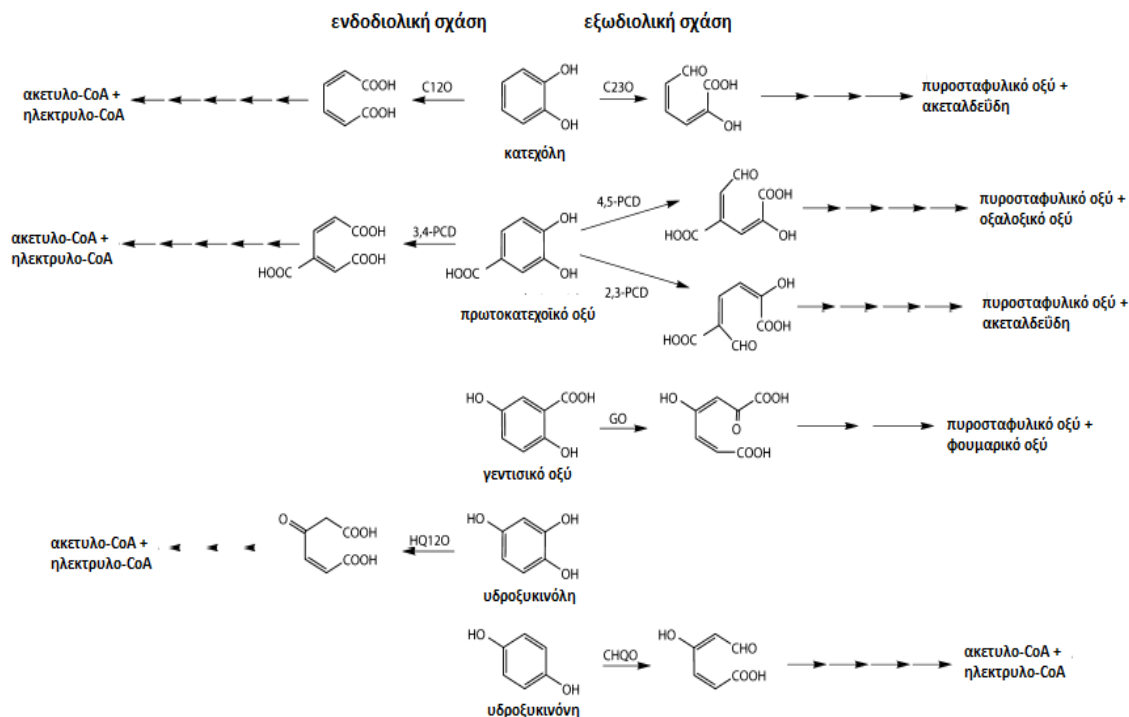
Η διάσπαση του αρωματικού πυρήνα των κατεχολικών ενδιάμεσων ενώσεων καταλύεται από δύο διακριτές κατηγορίες διοξυγονασών: τις ενδοδιολικές (intradiol) και τις εξωδιολικές (extradiol) διοξυγονάσες (Harayama & Rejik, 1989).



Σχήμα 1.9 Δράση διοξυγονασών σχάσης αρωματικού πυρήνα.

Οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe(III) για τη διάσπαση του αρωματικού πυρήνα, η οποία γίνεται στην *ortho*-θέση, δηλαδή μεταξύ των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου και σχηματίζονται δικαρβοξυλικά οξέα. Αντιθέτως, οι εξωδιολικές διοξυγονάσες χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe(II) για τη διάσπαση του αρωματικού πυρήνα, η οποία γίνεται σε *meta*-θέση, δηλαδή παρακείμενα των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου και σχηματίζονται καρβοξυλικά οξέα που φέρουν μια αλδεϋδομάδα (Vaillancourt et al. 2006). Υπάρχουν αναφορές για εξωδιολικές διοξυγονάσες που χρησιμοποιούν Mn(II) αντί μη-αιμικού Fe(II) (Que & Reynolds 2000; Hatta et al. 2003; Miyazawa 2004).

Γενικά, οι εξωδιολικές διοξυγονάσες φαίνεται να είναι πιο ευέλικτες ως προς την επιλογή των υποστρωμάτων σε σχέση με τις ενδοδιολικές, που η δράση τους προϋποθέτει την ύπαρξη γειτονικών υδροξυλομάδων. Οι εξωδιολικές διοξυγονάσες συμμετέχουν, λοιπόν, σε περισσότερες βιολογικές πορείες, συμπεριλαμβανομένων βιοσυνθετικών πορειών και πορειών καταβολισμού αρωματικών αμινοξέων. Τα υποστρώματα των εξωδιολικών μπορεί να είναι υδροξυλιωμένα σε *para*-θέση ή/και να περιέχουν μια καρβοξυλομάδα ή αμινομάδα στη θέση της δεύτερης υδροξυλομάδας (Vaillancourt et al. 2006).

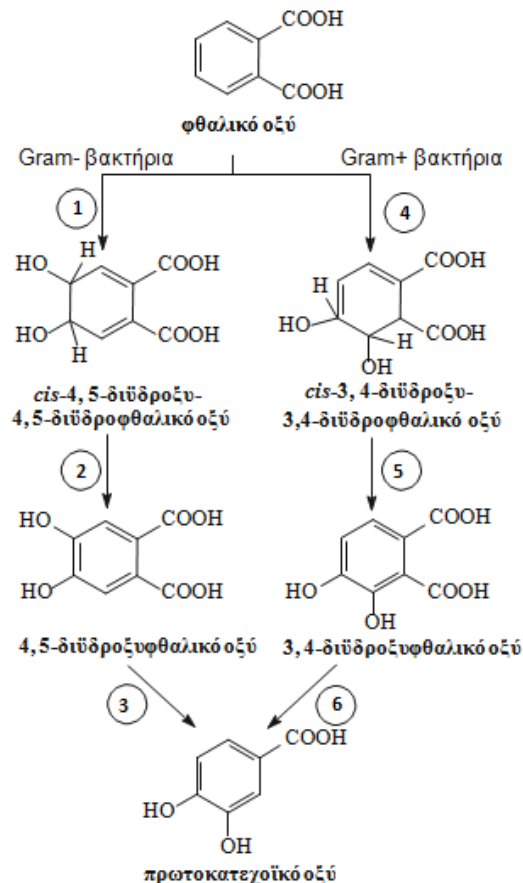


Σχήμα 1.10 Προϊόντα αντιδράσεων που καταλύονται από τις διοξυγονάσες σχάσης αρωματικού δακτυλίου. Κάθε βέλος αντιπροσωπεύει αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο. Η ακεταλδεΐδη εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων ως ακετυλο-CoA (Vaillancourt et al. 2006).

Αν και οι διακρίσεις μεταξύ των δύο κατηγοριών φαίνονται ήσσονος σημασίας, στην πραγματικότητα τα ένζυμα αυτά έχουν εντελώς διαφορετικές δομές καθώς και μηχανισμούς κατάλυσης (Bugg & Lin 2001). Οι ενδοδιολικές και εξωδιολικές διοξυγονάσες δεν εμφανίζουν ομοιότητες στις αμινοξικές τους αλληλουχίες και συνεπώς θεωρείται ότι ανήκουν εξελικτικά σε διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων. Μετά από ανάλυση αλληλουχίας και μελέτες δομικών χαρακτηριστικών, οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες φαίνεται να ανήκουν σε μια εξελικτική γενιά και χωρίζονται σε δύο ομάδες: η 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού (ομάδα I) με σύσταση υπομονάδων $(\alpha\beta)_{12}$ και οι 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και 1,2-διοξυγονάση της υδροξυκινόλης (ομάδα III) με σύσταση $(\alpha)_2$. Αντιθέτως, οι εξωδιολικές διοξυγονάσες ανήκουν σε τρεις τύπους εξελικτικά ανεξάρτητων οικογενειών: την ομάδα I που περιλαμβάνει ένζυμα με ένα ή δύο χαρακτηριστικά μοτίβα, όπως η 1,2-διοξυγονάση του διϋδροξυδιφαινυλίου, την ομάδα II που περιλαμβάνει ένζυμα με μία ή δύο διαφορετικές υπομονάδες, όπως η διοξυγονάση του γαλλικού και η 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού και την ομάδα III (υπεροικογένεια curipin). Η ομάδα III περιλαμβάνει ένζυμα με χαρακτηριστική δομή β-βαρελίου, η οποία περιέχει δύο συντηρημένα χαρακτηριστικά μοτίβα. Η δομή β-βαρελίου προκύπτει από έξι αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα, όπου τα δύο πρώτα αποτελούν το πρώτο συντηρημένο μοτίβο και τα δύο τελευταία το δεύτερο. Ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα III των εξωδιολικών διοξυγονασών είναι η διοξυγονάση του γεντισικού οξέος του στελέχους *Pseudomonas testosteroni*, όπως και η διοξυγονάση 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Nocardioides* KP7 (Vaillancourt et al. 2006).

1.6 Καταβολισμός φθαλικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.4, κατά την αποδόμηση του φαινανθρενίου μέσω της πορείας του *o*-φθαλικού προκύπτει ο σχηματισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Η πορεία αποδόμησης φθαλικού οξέος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1987 για το στέλεχος *Burkholderia ceracia* (Batie et al. 1987) και από τότε η βιβλιογραφία εμπλουτίζεται συνεχώς με αναφορές σε νέα στελέχη που καταβολίζουν φθαλικό οξύ. Η πορεία αποδόμησης του φθαλικού οξέος διαφέρει μεταξύ αρνητικών κατά Gram και θετικών κατά Gram βακτηρίων και παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί:



Σχήμα 1.11 Πορεία αποδόμησης φθαλικού οξέος σε αρνητικά κατά Gram- και θετικά κατά Gram+ βακτήρια. Τα ένζυμα που καταλύουν κάθε αντίδραση συμβολίζονται με αριθμούς. 1: 4,5-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, 2: αφυδρογονάση του *cis*-4,5-διϋδροξυ-4,5-διϋδροφθαλικού οξέος, 3: αποκαρβοξυλάση του 4,5-διϋδροξυφθαλικού οξέος, 4: 3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, 5: αφυδρογονάση του *cis*-3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος, 6: αποκαρβοξυλάση του 3,4-διϋδροξυφθαλικού οξέος (Prakash & Lal 2013).

Σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια η αρχική διϋδροξυλίωση του φθαλικού γίνεται στα άτομα άνθρακα 4 και 5 με σχηματισμό 4,5-διϋδροξυ-4,5-διϋδροφθαλικού οξέος, το οποίο αφυδρογονώνεται προς 4,5-διϋδροξυφθαλικό και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται προς σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια η διϋδροξυλίωση του φθαλικού γίνεται στα άτομα άνθρακα 3 και 4 με σχηματισμό 3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος, το οποίο αφυδρογονώνεται προς 3,4-διϋδροξυφθαλικό και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται προς σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Η παρουσία της 4,5-διοξυγονάσης του φθαλικού έχει αναφερθεί μόνο σε πρωτεοβακτήρια. Είναι μια διοξυγονάση τύπου Rieske μη-αιμικού σιδήρου και αποτελείται από μια υπομονάδα. Η

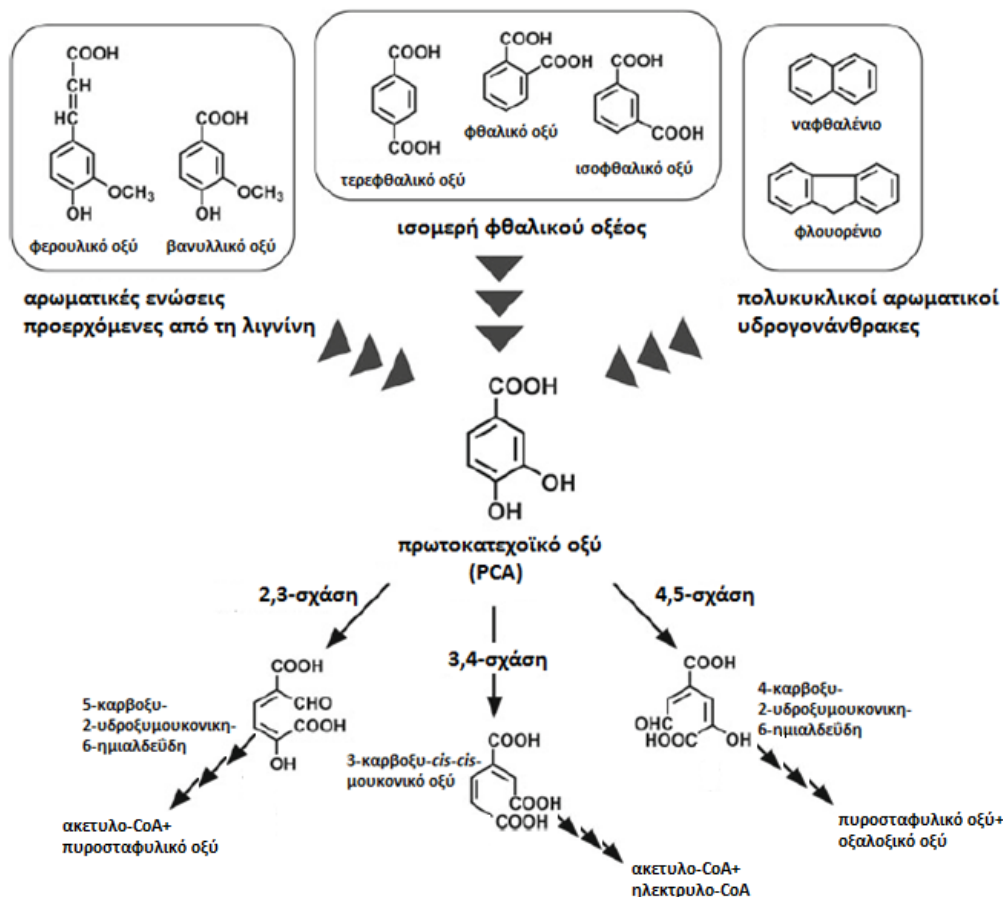
παρουσία της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού έχει παρατηρηθεί σε ακτινοβακτήρια και είναι μια διοξυγονάση τύπου Rieske μη-αιμικού σιδήρου, που αποτελείται από δυο υπομονάδες α και β , μαζί με τις υπομονάδες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ρεδουκτάση και φερρεδοξίνη (Pérez-Pantoja et al. 2010).

1.7 Καταβολισμός πρωτοκατεχοϊκού οξέος

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ είναι ένας από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες που σχηματίζονται κατά την αποδόμηση ποικίλων αρωματικών ενώσεων, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.5.2, συμπεριλαμβανομένων και μικρού μοριακού βάρους ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη (Masai et al. 2007), πετροχημικές αρωματικές ενώσεις, όπως ισομερή του φθαλικού οξέος (Sasoh et al. 2006), χλωροβενζοϊκά οξέα (Nakatsu et al. 2013), πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως ναφθαλένιο, φλουορένιο και τα ανάλογά του (Seo et al. 2009). Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ μεταβολίζεται μέσω της δράσης ενδοδιολικών, *ortho*-σχάση στην 3,4-θέση, ή εξωδιολικών διοξυγονασών, *meta*-σχάση στην 2,3- ή 4,5-θέση, για τη σχάση του αρωματικού του πυρήνα. Είναι γνωστό ότι το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποδομείται μέσω τριών διακριτών καταβολικών πορειών:

1. Πορεία 2,3-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Crawford et al. 1979), κατά την οποία ο αρωματικός πυρήνας του πρωτοκατεχοϊκού διασπάται από την 2,3-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού με προϊόν την 5-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεΐδη. Τα τελικά προϊόντα της πορείας αυτής είναι πυροσταφυλικό οξύ και ακετυλο-συνένζυμο Α.
2. Πορεία 3,4-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Harwood & Parales 1996), κατά την οποία ο αρωματικός πυρήνας του πρωτοκατεχοϊκού διασπάται από την 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού με προϊόν το 3-καρβοξυ-*cis-cis*-μουκονικό οξύ. Ενδιάμεσο προϊόν αυτής της πορείας αποτελεί το β -κετοαδιπικό οξύ, κατά το οποίο έχει επικρατήσει να ονομάζεται η πορεία. Τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της πορείας του β -κετοαδιπικού οξέος είναι τα ηλεκτρουλο-συνένζυμο Α και ακετυλο-συνένζυμο Α.
3. Πορεία 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Dagley et al. 1960). Αρχικό στάδιο της πορεία αυτής είναι η διϋδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα του πρωτοκατεχοϊκού από την 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού με προϊόν την 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεΐδη. Τα τελικά προϊόντα της πορείας αυτής είναι τα πυροσταφυλικό οξύ και οξαλοξικό οξύ.

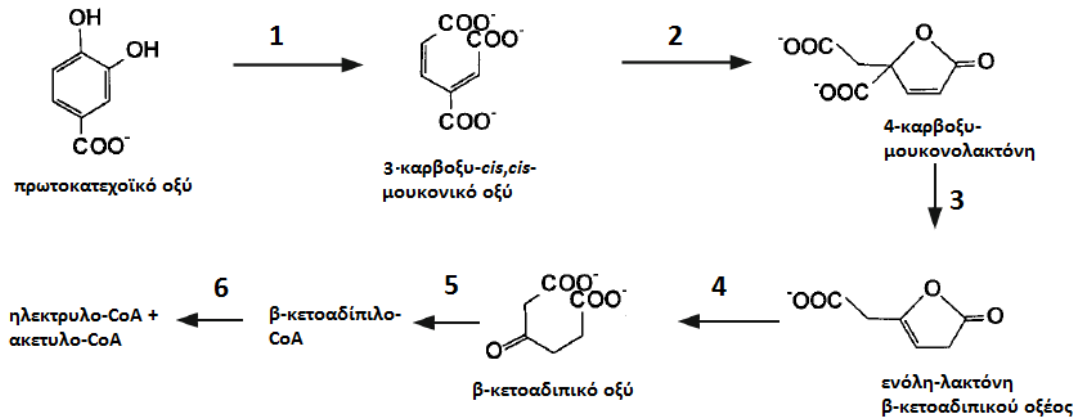
Και οι τρεις πορείες διοχετεύουν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Σχήμα 1.12).



Σχήμα 1.12 Αρωματικές ενώσεις των οποίων οι πορείες καταβολισμού οδηγούν στο σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος και οι τρεις πορείες σχάσης αυτού (Nojiri et al. 2014).

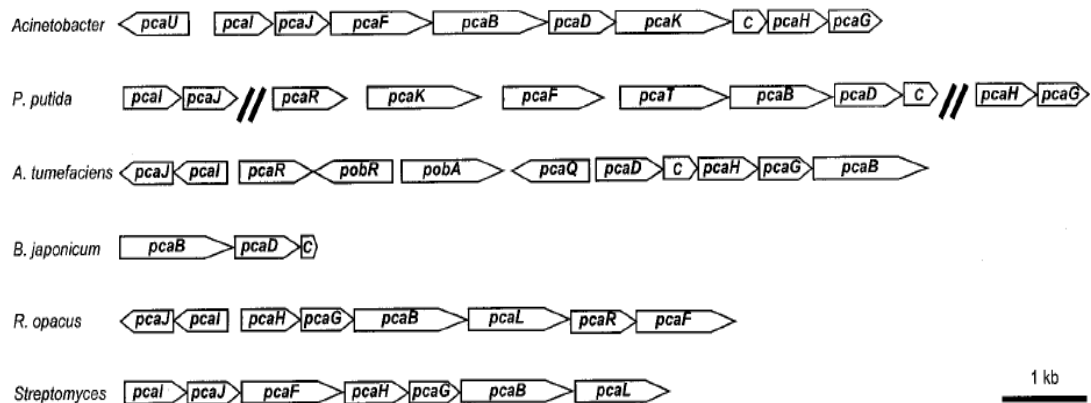
Όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία της 2,3-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού χαρακτηρίστηκαν το 2009 στο στέλεχος *Raenibacillus* sp. με υπόστρωμα 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Διαπιστώθηκε ακόμη, ότι όλα τα γονίδια της πορείας επάγονται παρουσία του προαναφερθέντος υποστρώματος καθώς και πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Επιπλέον, τα γονίδια εντοπίζονται σε οπερόνιο και όλα συμμεταγράφονται με εξαίρεση το μεταγραφικό ρυθμιστή του οπερονίου. Η 2,3-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού βρέθηκε να ανήκει στις τύπου II εξωδιολικές διοξυγονάσες (Kasai et al. 2009).

Τα ένζυμα που καταλύουν την πορεία 3,4-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού ή αλλιώς, πορεία του β-κετοαδιπικού κωδικεύονται συνήθως από γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα των μικροοργανισμών. Η πορεία του β-κετοαδιπικού παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά σε μικροοργανισμούς του εδάφους, καθώς μέσω αυτής καταβολίζονται αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά. Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ υπόκειται σε *ortho*-σχάση (Σχήμα 1.13), υπό την καταλυτική δράση της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, μιας ενδοδιολικής διοξυγονάσης μη-αιμικού σιδήρου, που αποτελείται από δύο διαφορετικές υπομονάδες α και β.



Σχήμα 1.13 Προτεινόμενη πορεία 3,4-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. 1: 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού, 2: κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος, 3: αποκαρβοξυλάση 4-καρβοξυ-μουκονολακτόνης, 4: υδρολάση ενόλη-λακτόνης β-κετοαδιπικού, 5: ηλεκτρυλο-CoA τρανσφεράση β-κετοαδιπικού οξέος, 6: θειολάση β-κετοαδιπυλο-CoA (Contzen & Stolz 2000).

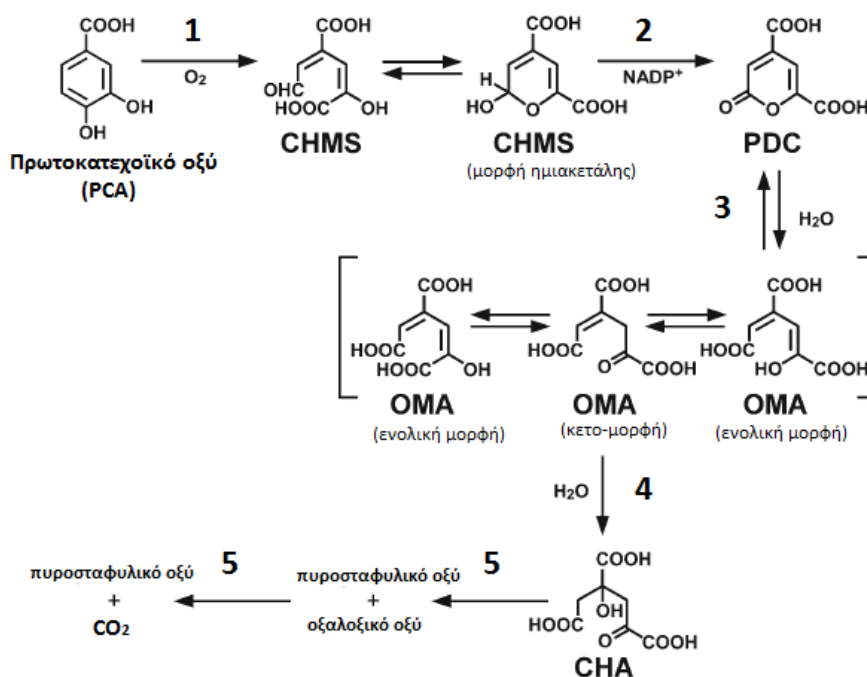
Αν και η πορεία του β-κετοαδιπικού είναι βιοχημικά συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών στελεχών, η γενετική οργάνωση των γονιδίων (Σχήμα 1.14), η ρύθμιση της έκφρασης και οι ενώσεις που επάγουν την έκφρασή τους είναι διαφορετικές, κάτι που εξηγεί τις διαφορετικές προσαρμοστικές απαιτήσεις (Harwood & Parales 1996).



Σχήμα 1.14 Οργάνωση γονιδίων (*pca*) της πορείας 3,4-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε διάφορα βακτήρια. *pcaI*: ηλεκτρυλο-CoA τρανσφεράση του β-κετοαδιπικού (α υπομονάδα), *pcaJ*: ηλεκτρυλο-CoA τρανσφεράση του β-κετοαδιπικού (β υπομονάδα), *pcaF*: θειολάση β-κετοαδιπυλο-CoA, *pcaH*: 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού (β υπομονάδα), *pcaG*: 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού (α υπομονάδα), *pcaB*: κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος, *pcaL*: υδρολάση ενόλη-λακτόνης β-κετοαδιπικού (Iwagami et al. 2000).

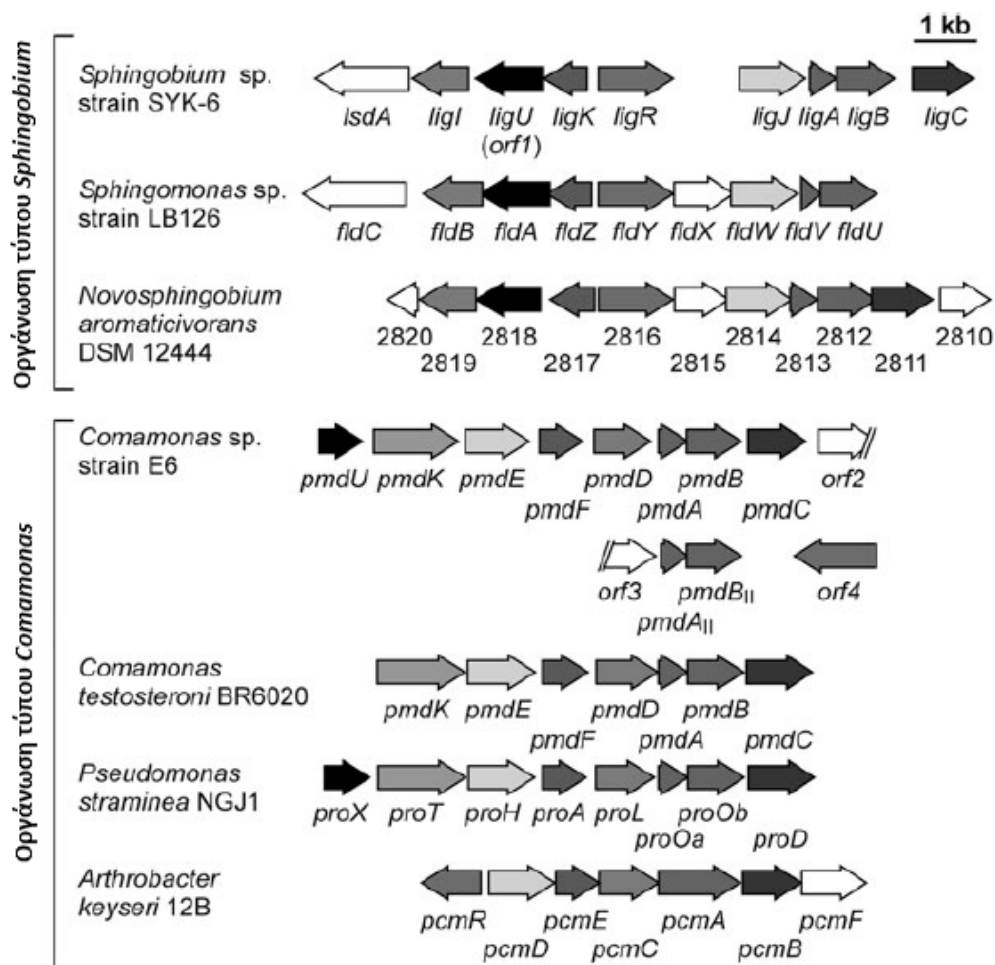
Η πορεία της 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος αρχίζει με τη *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού στις θέσεις 4,5, αντίδραση που καταλύει η 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού με προϊόν την 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη (CHMS). Η CHMS παίρνει την ημιακεταλική της μορφή και στη συνέχεια οξειδώνεται από την αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης προς 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικό (PDC). Το PDC υδρολύεται προς 4-οξαλομεσακονικό (OMA) και αυτό υδρολύεται προς 4-καρβοξυ-υδροξυ-2-οξαδιπικό (CHA). Το CHA με τη δράση της υδρατάσης του 4-καρβοξυ-υδροξυ-2-οξαδιπικού δίνει ως προϊόν πυροσταφυλικό οξύ και

οξαλοξικό. Το σχήμα που ακολουθεί περιγράφει αναλυτικά την πορεία 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.



Σχήμα 1.15 Προτεινόμενη πορεία 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Ένζυμα 1: 4,5-διοξυγονάση PCA; 2: αφυδρογονάση της CHMS; 3: υδρολάση του PDC; 4: υδρατάση του OMA; 5: αλδολάση/οξαλοξική αποκαρβοξυλάση του CHA. Συνομογραφίες: CHMS: 4-υδροξυ-2-υδροξυμουκονική-6-ημιαλδεΐδη, PDC: 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικό, OMA: 4-οξαλομεσακονικό, CHA: 4-καρβοξυ-υδροξυ-2-οξοαδιτικό (Kamimura & Masai, 2014).

Η οργάνωση των γονιδίων της πορείας 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού χωρίζεται σε δύο τύπους: η οργάνωση των γονιδίων τύπου *Sphingobium* και την οργάνωση γονιδίων τύπου *Comamonas* (Masai et al. 2007). Η οργάνωση των SYK-6 *lig* γονιδίων για την πορεία 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού είναι αρκετά όμοια με αυτή των *fld* γονιδίων στο στέλεχος *Sphingomonas* sp. LB126, το οποίο φαίνεται να αποτελείται από αρκετές μεταγραφικές μονάδες (οργάνωση τύπου *Sphingobium*). Η οργάνωση και η σειρά των γονιδίων της πορείας 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού στα στελέχη *Comamonas* sp. strain E6 (*pmd*), *C. testosteroni* BR6020 (*pmd*), *P. straminea* NGJ1 (*pro*), και *A. keyseri* 12B (*pcm*) είναι παρόμοια και αυτός ο τύπος συμπλέγματος γονιδίων φαίνεται να αποτελεί ένα οπερόνιο (οργάνωση τύπου *Comamonas*) (Kamimura et al. 2010).



Σχήμα 1.16 Τύποι οργάνωσης γονιδίων της πορείας 4,5-σάξης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού: *ligA*, *fldV*, *pmdA*, *pmdA_{II}* και *proOa*; β υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού: *ligB*, *fldU*, *pmdB*, *pmdB_{II}* και *proOb*; γονίδιο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού: *pcmA*; γονίδια αφυδρογονάσης CHMS: *ligC*, *pmdC*, *proD* και *proOb*; γονίδια υδρολάσης του PDC: *ligI*, *fldB*, *pmdD*, *proL* και *pcmC*; γονίδια της υδρατάσης του OMA: *ligJ*, *fldW*, *pmdE*, *proH* και *pcmD*; γονίδια του CHA: *ligK*, *fldZ*, *pmdF*, *proA* και *pcmE*; γονίδια ταυτομεράσης OMA: *ligU* (*orf1*), *fldA*, *pmdU* και *proX*; γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα: *ligR*; γονίδια πιθανού μεταγραφικού παράγοντα: *fldY* και *pcmR*; γονίδια πιθανού μεταφορέα: *pmdK* και *proT*; πιθανά γονίδια αλκοολικής δεϋδρογονάσης: *fldC* και *pcmF* (Kamimura & Masai, 2014).

1.8 Καταβολισμός βενζοϊκού οξέος

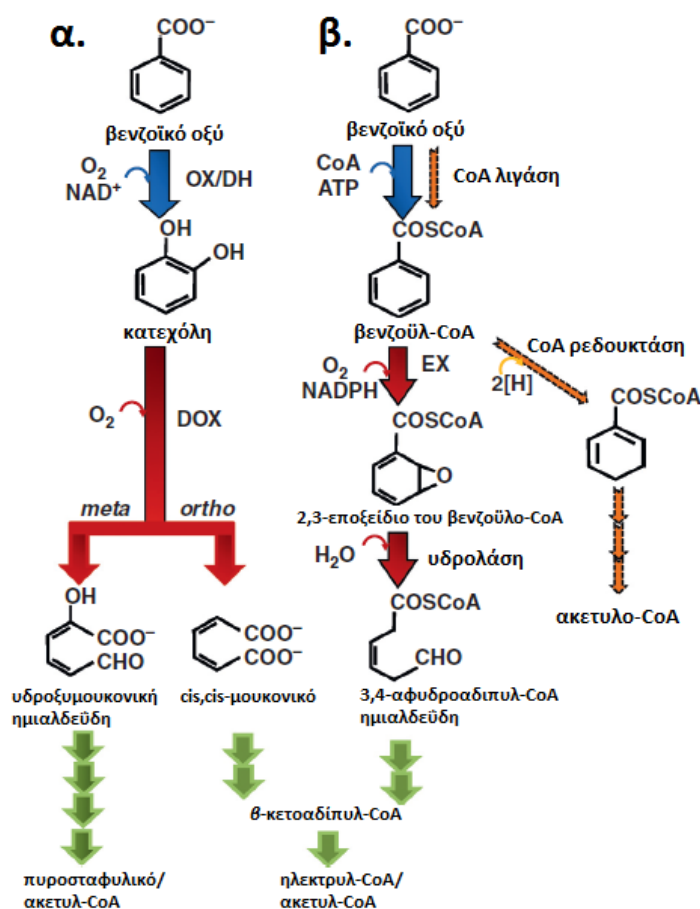
Τα βακτήρια έχουν υιοθετήσει τρεις διαφορετικές στρατηγικές για τον καταβολισμό του βενζοϊκού οξέος (Σχήμα 1.17):

1. Κατά την αναερόβια πορεία αποδόμησης, το βενζοϊκό οξύ αρχικά μετατρέπεται σε βενζοϋλ-CoA (benzoyl-CoA), το οποίο ανάγεται σε κυκλοεξα-1,5-διεν-1-καρβονυλο-CoA, το οποίο τελικά, με τη δράση της CoA λιγάσης και ρεδουκτάσης, διασπάται σε ακετυλο-CoA (Boll et al. 2014).
2. Κατά την αερόβια πορεία, το βενζοϊκό αρχικά οξειδώνεται από μονο-οξυγονάσες σε διϋδροξυλιωμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες, όπως η κατεχόλη, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ή το γεντισικό οξύ (Harwood & Parales, 1996). Οι διϋδροξυλιωμένοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες διασπώνται περαιτέρω από διάφορες διοξυγονάσες, όπως οι: 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, 3,4-διοξυγονάση του

πρωτοκατεχοϊκού οξέος και 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος (Harayama et al. 1992; Vaillancourt et al. 2006).

3. Η εξαρτώμενη από το ακετυλο-CoA πορεία του εποξειδίου περιλαμβάνει τη μετατροπή του βενζοϊκού οξέος σε βενζοΐλ-CoA (benzoyl-CoA) και στη συνέχεια σε εποξείδιο (2,3-εποξείδιο του βενζοΐλ-CoA), το οποίο ύστερα από αντιδράσεις που μοιάζουν στα στάδια των πορειών της β-οξειδωσης και του β-κετοαδιπτικού καταλήγει σε ηλεκτρυλο-CoA και ακετυλο-CoA (Zaar et al. 2004).

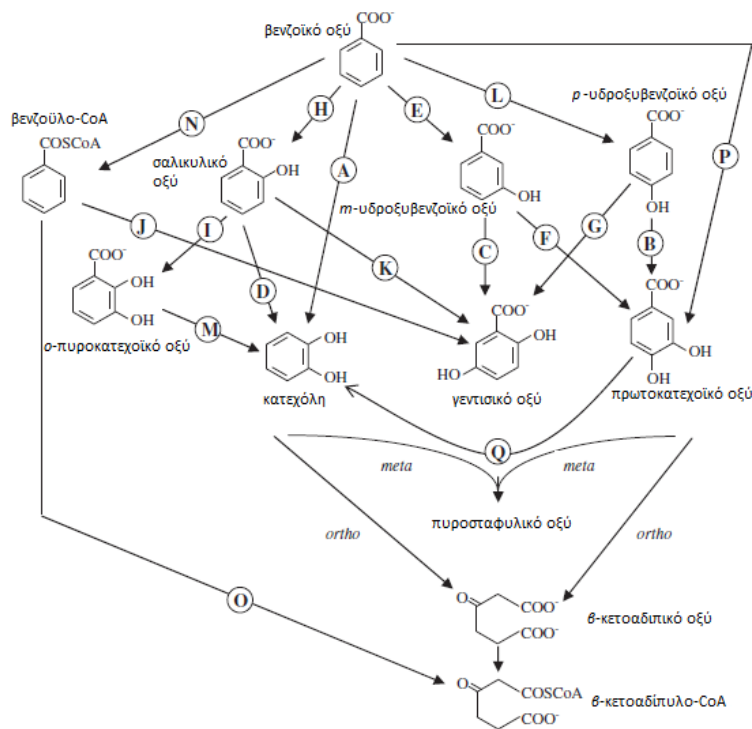
Είναι πιθανό πολλαπλές μεταβολικές πορείες του βενζοϊκού οξέος να συμβαίνουν ταυτόχρονα στα βακτήρια, με αποτέλεσμα η αποδόμηση του βενζοϊκού να είναι μια πολύπλοκη διαδικασία.



Σχήμα 1.17 Σχηματική απεικόνιση των 3 βακτηριακών πορειών για αποδόμηση του βενζοϊκού οξέος. (α) Πορεία αερόβιας αποδόμησης, (β) Πορεία εξαρτώμενη του ακετυλ-CoA του εποξειδίου. Με μπλε βελάκια απεικονίζεται η ενεργοποίηση, με κόκκινα βελάκια απεικονίζεται το βήμα σχάσης του αρωματικού πυρήνα και με πράσινα βελάκια η περαιτέρω διάσπαση σε κεντρικούς μεταβολίτες. Η *ortho*-σχάση της κατεχόλης (πορεία του β-κετοαδιπτικού) και η πορεία του βενζοΐλ-CoA συγκλίνουν στον κοινό μεταβολίτη β-κετοαδίτυλο-CoA. Η αναερόβια αποδόμηση του βενζοϊκού μοιράζεται μια κοινή αρχική αντίδραση με την πορεία του εποξειδίου, που καταλύεται από τη λιγάση του βενζοΐλ-CoA, αλλά τότε καταλύεται ένα αυστηρώς αναερόβιο βήμα αναγωγής δακτυλίου από μια ρεδοουκτάση και περαιτέρω αντιδράσεις που μοιάζουν στα στάδια της β-οξειδωσης (πορτοκαλί βέλη: αναερόβια πορεία αποδόμησης βενζοϊκού). Συντομογραφίες: OX: οξυγονάση υδροξυλίωσης δακτυλίου, DH: διϋδροδιολική αφυδρογονάση, DOX: διοξυγονάση σχάσης αρωματικού πυρήνα, EX: εποξειδάση (Díaz et al. 2013).

Η αερόβια βιοαποδόμηση του βενζοϊκού οξέος διεξάγεται μέσω διαφόρων πορειών προς σχηματισμό γεντισικού οξέος (2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ), πρωτοκατεχοϊκού οξέος και κατεχόλης ως ενδιάμεσους μεταβολίτες (van Gorcom et al. 1990; Chang & Zylstra 2008).

Η αερόβια πορεία αποδόμησης του βενζοϊκού απεικονίζεται στο Σχήμα 1.18 (Dagley et al. 1960; Hammann & Kutzner 1998; Li et al. 2013).



Σχήμα 1.18 Πορείες αερόβιας αποδόμησης του βενζοϊκού οξέος από μικροοργανισμούς. Στα κυκλάκια απεικονίζονται αριθμοί που αντιστοιχούν σε μικροοργανισμούς οι οποίοι παρουσιάζουν τη συγκεκριμένη πορεία καταβολισμού του βενζοϊκού. E+C: *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas acidovorans*, *Bacillus sp.*, E+F: *Pseudomonas PN-1*, *Pseudomonas testosteroni*, L+B: *Pseudomonas PN-1*, *Aspergillus niger*, *Klebsiella oxytoca C302*, *Trichosporon cutaneum*, L+B+Q: *Klebsiella oxytoca C302*, H+D: *Azotobacter vimlandii C-4*, P: *Rhodopseudomonas sp.*, *Vibrio 01*, P+Q: *Rhodopseudomonas sp.*, N+J: *Bacillus stearothermophilus PK1*, *Pseudomonas strain KB 740*, N+O: *Azoarcus evansii* & *Bacillus stearothermophilus*, B+Q: *Debaryomyces subglobosus N.C.Y.C.*, *Debaryomyces hansenii IC* (Li et al. 2013).

Η πορεία μετατροπής του βενζοϊκού μέσω του 3-υδροξυβενζοϊκού (*m*-υδροξυβενζοϊκό οξύ) προς σχηματισμό του γεντισικού οξέος ξεκινά με την οξείδωση του πυρήνα του γεντισικού οξέος, η οποία καταλύεται από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού. Το προϊόν της οξείδωσης μεταβολίζεται περαιτέρω από μια ισομεράση και στη συνέχεια από μια υδρολάση μέχρι το σχηματισμό φουμαρικού οξέος και τη διοχέτευσή του στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Liu & Zhou 2012).

Η πορεία καταβολισμού του γεντισικού οξέος έχει επικρατήσει ως η κεντρική πορεία καταβολισμού του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε κάποια βακτήρια, όπως *Burkholderia*

cepacia J2315, *Pseudomonas alcaligenes* P25X1, *Klebsiella pneumoniae* M5a1 και *Salmonella typhimurium* (Romero-Silva et al. 2013).

Η πορεία μετατροπής του βενζοϊκού οξέος μέσω του 3-υδροξυβενζοϊκού προς σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος αποδείχθηκε για το στέλεχος *Rhodopseudomonas palustris* και μέσω του 4-υδροξυβενζοϊκού για το στέλεχος *Aspergillus niger*. Αν και έχει αποδειχθεί ο σχηματισμός κατεχόλης από πρωτοκατεχοϊκό οξύ μέσω αποκαρβοξυλίωσής του με τη δράση της πρωτοκατεχοϊκής αποκαρβοξυλάσης στο στέλεχος *Klebsiella aerogenes* (πρώην *Aerobacter aerogenes*), η πλειοψηφία των μελετών υποδεικνύουν ότι η μετατροπή του βενζοϊκού οξέος πραγματοποιείται κυρίως μέσω της κατεχόλης (Urszula et al. 2009). Στελέχη βακτηρίων στα οποία έχουν βρεθεί και μελετηθεί αυτές οι πορείες είναι τα εξής: *Acinetobacter* sp. strain ADP1, *Acinetobacter baumannii* DU202, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Corynebacterium glutamicum* και *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (Perez-Pantoja et al. 2015).

1.9 Πορεία του γεντισικού οξέος-πορεία της κατεχόλης

Η πορεία του γεντισικού είναι μια κεντρική πορεία για την βακτηριακή αερόβια αποδόμηση ποικίλων αρωματικών ενώσεων, όπως 3-υδροξυβενζοϊκό και σαλικυλικό οξύ (2-υδροξυβενζοϊκό), φαινολικών ενώσεων όπως 2,5-ξυλενόλη, και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων συμπεριλαμβανομένων του ναφθαλενίου και του φαινανθρενίου.

Στα κατώτερα στάδια της πορείας καταβολισμού του ναφθαλενίου, το σαλικυλικό οξύ μεταβολίζεται περαιτέρω είτε μέσω της πορείας της κατεχόλης είτε μέσω της πορείας του γεντισικού. Το σαλικυλικό οξύ υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση από την 1-υδροξυλάση του σαλικυλικού οξέος προς σχηματισμό κατεχόλης. Η κατεχόλη διοχετεύεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος μέσω δύο πορειών στους μικροοργανισμούς: ενδοδιολική σχάση που καταλύεται από την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης (*ortho*-σχάση) με προϊόν το *cis*, *cis*-μουκονικό οξύ ή εξωδιολική σχάση (*meta*-σχάση) που καταλύεται από την 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης με προϊόν τη 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη. Το σαλικυλικό οξύ μετατρέπεται σε γεντισικό οξύ με τη δράση της σαλικυλικής 5-υδροξυλάσης. Το γεντισικό οξύ διασπάται από την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού προς σχηματισμό μαλεΐλοπυροσταφυλικού οξέος, το οποίο ισομεριώνεται προς σχηματισμό φουμαρυλοπυροσταφυλικού οξέος και με τη δράση μιας υδρολάσης σχηματίζεται πυροσταφυλικό και φουμαρικό οξύ (Mallik et al. 2011; Solyanikova, E. V. Emelyanova, et al. 2015).

1.10 Το γένος *Arthrobacter*

Το γένος *Arthrobacter* απομονώθηκε για πρώτη φορά από το έδαφος το 1889 (Koch et al. 1995) και προτάθηκε σαν γένος το 1947 (Conn & Dimmick 1947). Τα βακτήρια αυτού του γένους κατατάσσονται ταξινομικά στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων (Actinobacteria), τα οποία είναι θετικά κατά Gram βακτήρια με χαρακτηριστικό την υψηλή περιεκτικότητα σε G+C. Ανήκουν στην κατηγορία των Ακτινομυκήτων (Actinomycetales) και στην οικογένεια των Μικροκόκκων (Micrococccaceae). Το βασικό χαρακτηριστικό αυτών των βακτηρίων είναι η μορφολογική διαφοροποίηση κατά την ανάπτυξή τους σε σύνθετο μέσο ανάπτυξης. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης τα κύτταρα έχουν σχήμα ακανόνιστου ραβδίου, ενώ στη στατική φάση ανάπτυξης παίρνουν σχήμα κόκκου. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται όταν τα

κύτταρα μεταφερθούν σε φρέσκο μέσο ανάπτυξης (Cacciari & Lippi 1987; Yassin et al. 2011).

Όλα τα στελέχη του γένους είναι αερόβια, ενώ σε κάποια έχει παρατηρηθεί και αναερόβια ανάπτυξη, μια προσαρμογή που διευκολύνει την επιβίωσή τους στο περιβάλλον του εδάφους απουσία οξυγόνου. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 25-30° C, με κάποια στελέχη να καλλιεργούνται σε θερμοκρασίες 10-35° C, κάποια στους 5° C και κάποια στους 37° C (Chan & Johnson 1966; Unell et al. 2008).

Στελέχη του γένους *Arthrobacter* έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, όπως λίμνες, θαλάσσια ύδατα, από πάγο στην Αρκτική, από υπέδαφος, ακόμη και από ραδιενεργό περιβάλλον (van Waasbergen et al. 2000; Fredrickson et al. 2004). Επιπλέον, εδάφη μολυσμένα από χημικά και βαρέα μέταλλα είναι πλούσια σε αυτά τα βακτήρια. Η πανταχού παρουσία στελεχών αυτού του γένους οφείλεται, πιθανώς, στη μεγάλη ανθεκτικότητά τους σε διάφορες καταπονήσεις όπως μακροχρόνια έλλειψη τροφής, οξειδωτικό στρες, θερμοκρασιακές μεταβολές, αλλαγές στην οσμωτική πίεση, παρουσία τοξικών χημικών ουσιών (Stevenson 1961; Fong et al. 2001; Macur et al. 2004; Hanbo et al. 2004). Η ικανότητα επιβίωσης κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι πιθανό να οφείλεται στην ιδιαιτερότητα που χαρακτηρίζει το γένος *Arthrobacter*, να αλλάζει από τη μορφή του ραβδίου σε αυτή του κόκκου, η οποία είναι πιο σταθερή (Boylen & Ensign 1970; Boylen 1973).

Οι αξιοσημείωτες ικανότητες επιβίωσής τους συμβάλλουν στη σημασία που έχει το γένος *Arthrobacter* στην αποδόμηση ρύπων σε πολύπλοκα και ευμετάβλητα περιβάλλοντα. Το γένος *Arthrobacter* είναι ικανό να αποδομεί περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), η νιτρογλυκερίνη, πολλά παράγωγα του βενζολίου, αμινο-ετεροκυκλικές ενώσεις, εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα (Scholtz et al. 1987; Jain et al. 1994; Baitsch et al. 2001; Seo et al. 2006; Kallimanis et al. 2007; Husserl et al. 2010; Yao et al. 2015).

Έχουν αναφερθεί διάφορα στελέχη του γένους *Arthrobacter* ικανά να καταβολίζουν PAHs (Samanta et al. 1999; Kallimanis et al. 2007) ωστόσο, ο καταβολισμός των PAH δεν είναι πλήρως μελετημένος και ο ρόλος των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτόν δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

Η αλληλούχηση ολόκληρων των γονιδιωμάτων στελεχών του γένους *Arthrobacter* συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση της πορείας αποδόμησης των PAH, όπως για παράδειγμα η αλληλούχηση των στελεχών *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 (A6) (Backman & Jansson 2004), *Arthrobacter aurescens* TC1 (Mongodin et al., 2006), *Arthrobacter arilaitensis* Re117 (Re117) (Monnet et al. 2010), *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (Kallimanis et al. 2011), *Arthrobacter* sp. FB24 (FB24) (Nakatsu et al. 2013), *Arthrobacter* sp. W1 (Jiang et al. 2015).

1.10.1 Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

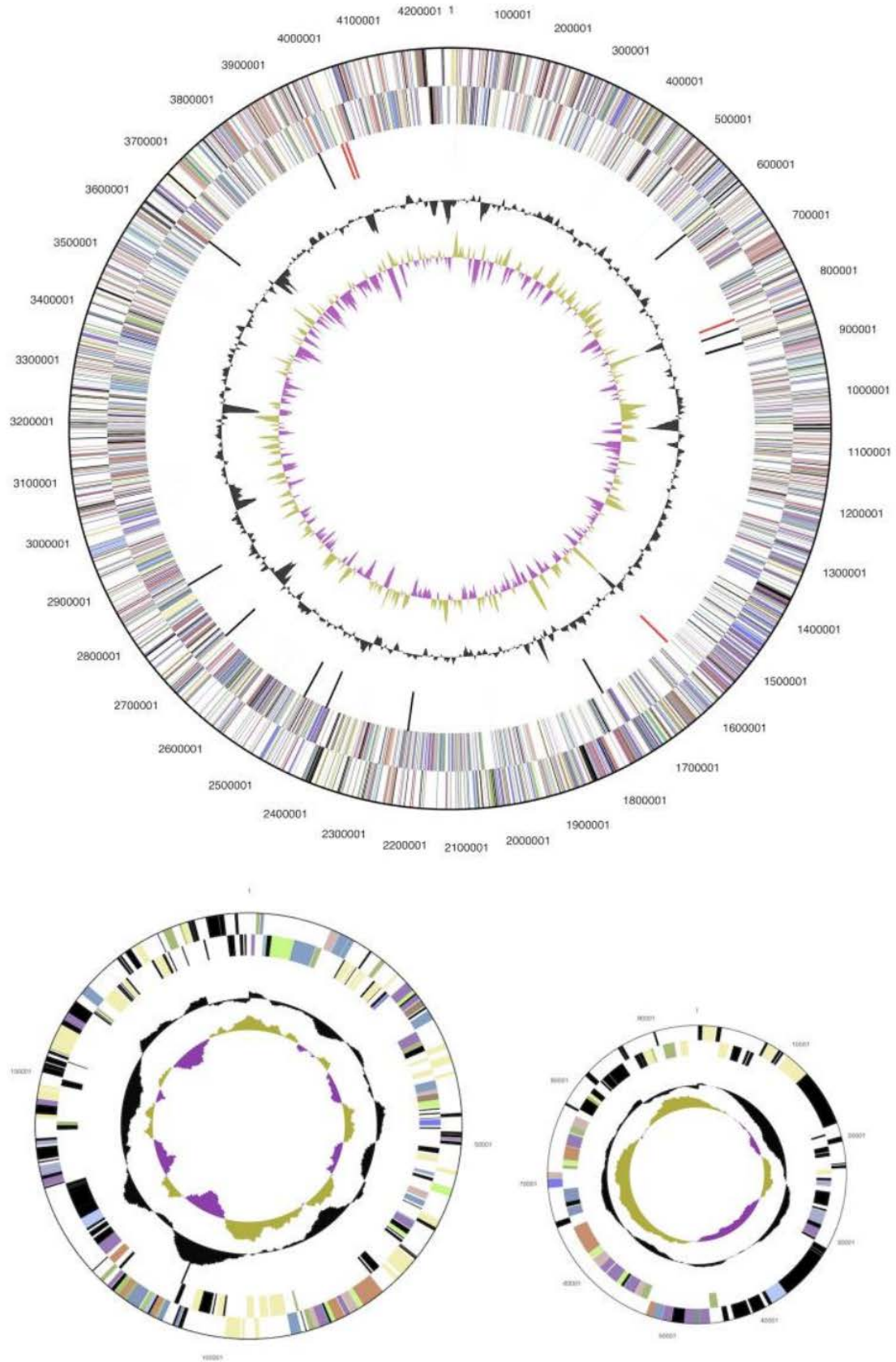
Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, απομονώθηκε από χώμα ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο προερχόμενο από την περιοχή της Περιβλέπτου (12 χιλιόμετρα βόρεια της πόλης των Ιωαννίνων), όπου μια βιομηχανία επεξεργασίας ξύλου λειτουργούσε για

περισσότερο από 30 χρόνια (Kallimanis et al. 2007). Το Sphe3 έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, ενώ μπορεί να το καταβολίζει σε συγκεντρώσεις μέχρι 400mg/L και με ταχύτερους ρυθμούς από άλλα στελέχη *Arthrobacter* της βιβλιογραφίας (Grifoll et al. 1992; Samanta et al. 1999; Seo et al. 2006).

Το Sphe3 είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, μη κινητικό και κατέχει την ιδιαιτερότητα της εναλλαγής μορφής από ραβδίο σε κόκκο κατά την ανάπτυξή του, όπως όλα τα στελέχη του γένους *Arthrobacter*. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 30-37° C και το βέλτιστο pH 7.0-7.5. Η πρόσληψη του φαινανθρενίου στο στέλεχος Sphe3 φαίνεται να πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς: με παθητική διάχυση, που παρατηρήθηκε για κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα της γλυκόζης και με ενεργό μηχανισμό μεταφοράς, που παρατηρήθηκε για κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα του φαινανθρενίου (Kallimanis et al. 2007).

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του φθαλικού οξέος, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία των εξής υποστρωμάτων ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας: 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη, φθαλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε καλλιέργεια με υπόστρωμα σαλικυλικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Μέσω ενζυμικών προσδιορισμών διαπιστώθηκε η ύπαρξη δραστηριότητας διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, καθώς και αφυδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν δραστηριότητες των υδροξυλασών του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος και του σαλικυλικού οξέος (Kallimanis et al. 2009; Μ.Δ.Ε. Καβακιώτης 2007).

Το γονιδίωμα του στελέχους Sphe3 αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 4.250.414 ζευγών βάσεων με τη σύσταση G+C στο 66%, καθώς και από δύο μικρά κυκλικά πλασμίδια περιεχομένου G+C 62%, το καθένα. Τα πλασμίδια ονομάστηκαν: rASphe301, το μεγαλύτερο και rASphe302, το μικρότερο κι έχουν μέγεθος 190.450 ζεύγη βάσεων και 94.456 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα (Kallimanis et al. 2011).



Σχήμα 1.19 Χάρτης γονιδιώματος του στελέχους *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το χρωμόσωμα του στελέχους και στο κάτω μέρος τα πλασμίδια pASPHE301 και pASPHE302.

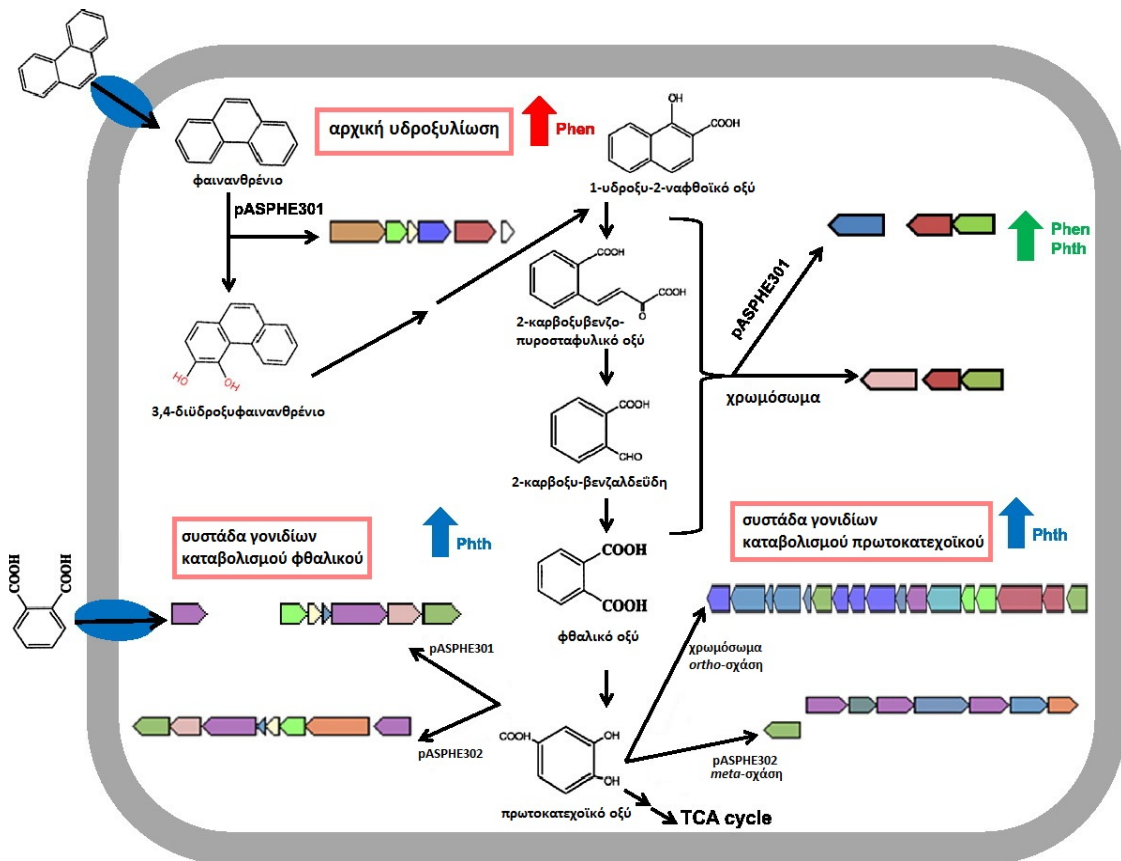
Μελέτες *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Sphe3* κατέδειξαν την ύπαρξη γονιδίων που κωδικεύουν για διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα, καθώς και γονιδιακών συμπλεγμάτων, που πιθανόν εμπλέκονται στον καταβολισμό αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων.

Δύο μεταβολικές πορείες είναι γνωστές για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου στα βακτήρια, αυτή του φθαλικού και αυτή του 1,2-διϋδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (κεφάλαιο 1.4). Και οι δύο πορείες περιλαμβάνουν το σχηματισμό του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος στα πρώτα στάδια. Δύο ομόλογα γονίδια διοξυγονασών του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, που εμπλέκονται στην αποδόμηση του φαινανθρενίου μέσω της πορείας του φθαλικού, ταυτοποιήθηκαν στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* *Sphe3*. Το ένα εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα, ενώ το άλλο στο πλασμίδιο. Και τα δύο γονίδια επάγονται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η παρουσία των δύο ομόλογων γονιδίων της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού στο *Sphe3* καθιστά το στέλεχος πιο αποτελεσματικό για αποδόμηση PAH και ως εκ τούτου πιο ευπροσάρμοστο σε ρυπασμένα περιβάλλοντα (Vandera et al. 2012).

Σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη διαπιστώθηκε ότι κάθε ένα από τα δύο πλασμίδια του στελέχους *Sphe3*, *pASPHE301* και *pASPHE302*, φέρει ένα σύμπλεγμα οκτώ υποθετικών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων ενδέχεται να συνιστούν ένζυμα για τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Τα γονίδια αυτά συμμεταγράφονται συνιστώντας οργανωμένο οπερόνιο (Μ.Δ.Ε. Κουρτίδου, 2013).

Δεδομένα πρωτεομικής και γονιδιωματικής ανάλυσης επέτρεψαν την αποσαφήνιση της καταβολικής πορείας του φαινανθρενίου στο *Sphe3* (Σχήμα 1.20). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή αρκετών πρωτεϊνών στην αποδόμηση αρωματικών υποστρωμάτων, με την ταυτοποίηση αυτών που συμμετέχουν στην αρχική υδροξυλίωση καθώς και στη σχάση του αρωματικού πυρήνα στην αποδόμηση του φαινανθρενίου σε φθαλικό, στην αποδόμηση φθαλικού οξέος, καθώς και στον καταβολισμό του πρωτοκατεχοϊκού (Vandera et al. 2015).

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1.7, ο καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος πραγματοποιείται είτε μέσω 3,4-διοξυγόνωσης (*ortho*-σχάση, γνωστή και σαν πορεία του β-κετοαδιπικού) με προϊόντα τους μεταβολίτες ακετυλο-CoA και ηλεκτρυλο-CoA, είτε μέσω 4,5-διοξυγόνωσης (*meta*-σχάση) με προϊόντα πυροσταφυλικό και οξαλοξικό οξύ. Στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* *Sphe3* η αποδόμηση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος φαίνεται να διεξάγεται μέσω και των δύο οδών, καθώς ανάλυση *in silico* στο γονιδίωμα του *Sphe3* αποκάλυψε πιθανές συστάδες γονιδίων στο πλασμίδιο *pASPHE302* και στο χρωμόσωμα, που εμπλέκονται στη *meta*- και *ortho*-σχάση, αντίστοιχα. Επιπλέον, όλες οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις *meta*- και *ortho*-σχάσεις, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση, όταν το *Sphe3* αναπτύσσεται παρουσία φθαλικού οξέος από ότι παρουσία φαινανθρενίου (Vandera et al. 2015).



Σχήμα 1.20 Προτεινόμενη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sph3, βασισμένη σε γονιδιωματική και πρωτεομική ανάλυση. Με κόκκινο απεικονίζονται ένζυμα των οποίων η έκφραση αυξάνεται παρουσία φαινανθρενίου σε σχέση με υπόστρωμα το φθαλικό οξύ, με μπλε απεικονίζονται ένζυμα των οποίων η έκφραση αυξάνεται παρουσία φθαλικού σε σχέση με υπόστρωμα το φαινανθρένιο και τέλος, με πράσινο απεικονίζονται ένζυμα που παρουσιάζουν παρόμοια επάρκεια παρουσία και των δύο υποστρωμάτων (Vandera et al. 2015).

1.11 Σκοπός εργασίας

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι ευρέως διαδεδομένοι περιβαλλοντικοί ρυπαντές. Οι PAHs έχουν ιδιότητες τερατογένεσης, καρκινογένεσης και μεταλλαξιγένεσης και συνιστούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία μέσω της βιοσυσσώρευσής τους στην τροφική αλυσίδα. Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους απομάκρυνσης των PAH από το περιβάλλον είναι η μικροβιακή βιοαποδόμηση. Πληθώρα μικροβιακών στελεχών έχουν απομονωθεί από ρυπασμένες περιοχές και έχουν χαρακτηριστεί με βάση την ικανότητά τους να καταβολίζουν διάφορους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που απομονώθηκε από μια ρυπασμένη- με κρεοζωτέλαιο-περιοχή στην Ήπειρο, είναι ικανό να αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Στην παρούσα διατριβή, σκοπός ήταν αρχικά να ανιχνευθούν *in silico* γονίδια του στελέχους *A.phenanthrenivorans* Sphe3 τα οποία εμπλέκονται τόσο στην αρχική υδροξυλίωση, όσο και στη σχάση του αρωματικού πυρήνα διαφόρων αρωματικών υποστρωμάτων και εντοπίζονται στο χρωμόσωμα ή/και στα καταβολικά πλασμίδια του Sphe3. Στη συνέχεια, να μελετηθούν τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων αυτών, όταν το Sphe3 αναπτύσσεται παρουσία διαφορετικών αρωματικών υποστρωμάτων με σκοπό τη διερεύνηση των πορειών καταβολισμού των υποστρωμάτων αυτών.

Η μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό PAH αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα για την κατανόηση και συσχέτιση των διάφορων καταβολικών πορειών μεταξύ τους στο Sphe3 με στόχο τη μελλοντική ανάπτυξη ορθολογικών στρατηγικών βιοαποδόμησης.

Κεφάλαιο 2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βακτηριακό στέλεχος

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το εξής:

Βακτηριακό στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Αναφορά
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	Άγριος τύπος	(Kallimanis et al. 2009)

2.2 Γονίδια προς μελέτη

Ύστερα από μελέτες *in silico* για τον εντοπισμό γονιδίων στα πλασμίδια και στο χρωμόσωμα του Sphe3, που εμπλέκονται στον καταβολισμό των PAH, επιλέχθηκαν 11 γονίδια διοξυγονασών και 1 γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα ώστε να μελετηθούν σε μεταγραφικό επίπεδο.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων των διοξυγονασών που επιλέχθηκαν για μελέτη, ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του IMG: the Integrated Microbial Genomes Database and Comparative Analysis System (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/edu/main.cgi>).

Στις μηχανές αναζήτησης: Find Genes → Gene Search επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες με τα εξής κριτήρια:

- τα γονίδια αναζητήθηκαν με τους όρους “dioxygenase”,
- το είδος του μικροοργανισμού επιλέχθηκε από το domain “Bacteria” και
- επιλέχθηκε το στέλεχος “*Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3”.

Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης επιλέχθηκαν 11 γονίδια, τα οποία με βάση τη βιβλιογραφία φαίνεται να εμπλέκονται στις πορείες αποδόμησης του φαινανθρενίου, του φθαλικού, του πρωτοκατεχοϊκού και του βενζοϊκού οξέος, καθώς και ένας πιθανός μεταγραφικός παράγοντας για το οπερόνιο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

Τα γονίδια παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.1 Υπό μελέτη γονίδια.

	Κωδικός γονιδίου (JGI)	Όνομα γονιδίου (JGI)	Κωδική ονομασία γονιδίου
1.	Asphe3_42640	α υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μικρό πλασμίδιο	<i>rhd2a</i>

2.	Asphe3_42630	β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μικρό πλασμίδιο	<i>rhd2b</i>
3.	Asphe3_40070	μεγάλη υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μεγάλο πλασμίδιο	<i>rhd1a</i>
4.	Asphe3_40080	μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μεγάλο πλασμίδιο	<i>rhd1b</i>
5.	Asphe3_40250	διοξυγονάση 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού	<i>diox1</i>
6.	Asphe3_38850	α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	<i>pca34a</i>
7.	Asphe3_38860	β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	<i>pca34b</i>
8.	Asphe3_42380	α,β υπομονάδες της 4,5 διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	<i>pca45ab</i>
9.	Asphe3_42340	πιθανός μεταγραφικός παράγοντας του οπερονίου της 4,5 διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	<i>pca45reg</i>
10.	Asphe3_35160	α υπομονάδα της 1,2 διοξυγονάσης του βενζοϊκού	<i>benz12cra</i>
11.	Asphe3_39840	1,2 διοξυγονάση του γεντισικού	<i>gent12lp</i>
12.	Asphe3_35170	1,2 διοξυγονάση της κατεχόλης	<i>cat12cr</i>

2.3 Εκκινήτες

Τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Primer3 Input (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2 Εκκινητές.

Ονομασία	Tm (°C)	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος(bp)
pca34α _{for}	60.03	GACGCCATCCTGGAAATCT	240
pca34α _{rev}	59.93	GAGGTAGATCCGGGTGAACA	
pca34β _{for}	60.23	CGTACCCATGGAAGAACCAC	248
pca34β _{rev}	59.77	GGTCAGGATGATGTCCCAGT	
pca45αβ _{for}	60.00	ACACCTCGGCACTATTCACC	162
pca45αβ _{rev}	60.02	CGTTGTACACCAGGATGACG	
pca45reg _{for}	60.14	ACGCCTTGGCACAAATAGAC	178
pca45reg _{rev}	59.84	TCGAGCCGTTCTACCTGAAT	
phpspα _{for}	60.20	TACGTGCTGCTGAACCTCTG	204
phpspα _{rev}	60.10	AAGGCCCCAGTTCTGCTTAT	
phpspβ _{for}	59.86	CGGACTACTCGAAGGGACAG	135
phpspβ _{rev}	59.14	TGTACTGGTAGTCGTCTGCGAG	
phlprα _{for}	60.01	CAACGGAGGAAAGCTCGTAG	198
phlprα _{rev}	59.92	TCCATCACGATGTCCAGGTA	
phlprβ _{for}	60.13	ATGACAATCGAAGCACAGACAC	141
phlprβ _{rev}	59.65	AGGTCCTGCGCCATGAGG	
1mRNA _{for}	59.67	GACGCGGGCAACCCTTA	188
1mRNA _{rev}	59.87	TGATCGGTGACGAACGA	
gent12lp _{for}	59.84	GGTGACTTCTGCTCACTCC	167
gent12lp _{rev}	61.24	ATATCAGGGGTGGCTTCGTC	
benz12cra _{for}	59.80	GACCGTGA AACCGGAATCAT	159
benz12cra _{rev}	60.00	GCCGATGTAGGTGGTGAAGT	
cat12cr _{for}	60.31	AAACGGATACCCGAAAGAG	198
cat12cr _{rev}	59.76	GGGCGTTGTACTCCTCGTAG	

Οι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics στη Γερμανία.

2.4 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων

2.4.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων βακτηρίου, Luria Broth Bertani (LB)

(Sambrook et al. 1989)

1% (w/v) NaCl
0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης
1% τρυπτόνη
pH 7.5 με διάλυμα NaOH 1N

Το πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LA (Luria Agar), παρασκευάζεται με την προσθήκη άγαρ 2% w/v στο υγρό θρεπτικό μέσο LB και ακολουθεί αποστείρωση. Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης που δεν πολυμερίζεται μέχρι τους 45° C.

2.4.2 Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια κυττάρων βακτηρίου, Minimal Medium M9

(Yamada et al. 2001)

Διάλυμα αλάτων 5 x M9	20% v/v
Διάλυμα MgSO ₄ 0.1M	2% v/v

Διάλυμα CaCl ₂ 0.01M	1% v/v
Διάλυμα ιχνοστοιχείων 100x	1% v/v
Πηγή άνθρακα	(κατάλληλη ποσότητα ανάλογα με τις απαιτήσεις και τις αντοχές του στελέχους σε κάθε υπόστρωμα)

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9, αποστειρώνεται νερό με άγαρ (2gr άγαρ με 75-78 ml ύδατος για 100ml θρεπτικού μέσου) και αφού πέσει η θερμοκρασία στους 50° C προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα.

Διαλύματα παρασκευής ελάχιστου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης M9

Διάλυμα αλάτων 5 x M9 (στο λίτρο)

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64.0g ή Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O :42.5g
KH ₂ PO ₄	15.0 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5.0 g

2.4.3 Πηγές άνθρακα

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι πηγές άνθρακα, τα διαλύματα αποθήκευσής τους και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων του *Srhe3* σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9.

Πίνακας 2.3 Πηγές άνθρακα.

Πηγή άνθρακα	Διάλυμα αποθήκευσης	Τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια	Αναφορά
Γλυκόζη	Υδατικό διάλυμα γλυκόζης 2.22M	22.2 mM	Vandera et al. 2015
Φαινανθρένιο	Διάλυμα φαινανθρενίου σε διαιθυλαιθέρα 280mM	1.12 mM	Vandera et al. 2015
Φθαλικό οξύ	Υδατικό διάλυμα φθαλικού οξέος 30mM	15 mM	Vandera et al. 2015
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Διάλυμα πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε διαιθυλαιθέρα 60mM	5 mM	Romero-Silva et al, 2013
Βενζοϊκό οξύ	Διάλυμα βενζοϊκού οξέος σε διαιθυλαιθέρα 750mM	5 mM	Romero-Silva et al, 2013
Γεντισικό οξύ	Διάλυμα γεντισικού οξέος σε διαιθυλαιθέρα 750mM	5 mM	Romero-Silva et al, 2013
Κατεχόλη	Υδατικό διάλυμα κατεχόλης	1 mM	Carvalho et al, 2006

2.5 Μικροβιακές καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες του στελέχους *Srhe3* επωάζονται στους 30° C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα συλλέγονται στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

2.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Αρχή μεθόδου (Lowry et al. 1951)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση των αλάτων του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteus με τις πρωτεΐνες, κατά την οποία σχηματίζεται μίγμα ανόργανων αλάτων (μπλε χρώμα). Οι δύο ξεχωριστές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι :

α) ο σχηματισμός συμπλόκου Cu^{2+} -πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας) και

β) η αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού και του φωσφορομολυβδαινικού άλατος που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus, από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο, προς κυανό του βολφραμίου και κυανό του μολυβδαινίου αντίστοιχα.

Προσδιορισμός

Το δείγμα των πρωτεϊνών επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα τουλάχιστον, με ίσο όγκο διαλύματος 1 N NaOH. Μετά το τέλος της επώασης συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι 1ml με 0.5 N NaOH. Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml διαλύματος 3, το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προστίθενται 0.5 ml διαλύματος 4, το δείγμα αναδεύεται αμέσως και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το σχηματιζόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 720 nm. Η περιεχόμενη πρωτεΐνη του δείγματος προσδιορίζεται με αναφορά σε μια γραμμική πρότυπη καμπύλη BSA (0-200 μg πρωτεΐνης).

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

2 % w/v Na_2CO_3 σε απεσταγμένο νερό.

0.5 % w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε διάλυμα 1% w/v κιτρικού νατρίου. (Ο θειικός χαλκός προστίθεται στο διάλυμα του κιτρικού νατρίου).

Ανάμιξη των διαλυμάτων 1 και 2 σε αναλογία 50:1 v/v πριν την χρήση. Το διάλυμα παραμένει σταθερό για 24 ώρες.

Αντιδραστήριο φαινόλης: Ανάμιξη αντιδραστήριου Folin-Ciocalteus με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 v/v, λίγο πριν την χρήση.

Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) 0.2 mg/ml σε 0.5 N NaOH.

Διάλυμα 1 N NaOH.

2.7 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο CTAB (mini-preparation)

1. 1.5 ml καλλιέργειας, που βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής ή στην αρχή της στατικής φάσης, φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10.000 rpm και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
2. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 740 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.
3. Ακολουθεί προσθήκη 20 μl διαλύματος λυσοζύμης (100mg/ml) με καλή ανάδευση και επώαση για 12 ώρες στους 37° C.
4. Προσθήκη 40 μl διαλύματος SDS 10% με καλή και ήπια ανάδευση.
5. Προσθήκη 4 μl διαλύματος προνάσης (20 mg/ml) με καλή ανάδευση και επώαση για 12 ώρες στους 37° C.
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος 5 M NaCl και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB/NaCl (προθερμασμένο στους 65° C) με καλή ανάδευση.
8. Επώαση για 10 min στους 65° C.
9. Προσθήκη 500 μl διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (24:1) με καλή ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
11. Προσθήκη 500 μl διαλύματος φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (25:24:1) με καλή ανάδευση.
12. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Σε αυτό το σημείο μετράμε τον όγκο της υδατικής φάσης.
13. Προσθήκη παγωμένης ισοπροπανόλης (-20° C) σε ποσότητα ίση με το 0.6 του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
15. Έκπλυση του ιζήματος με αιθανόλη 70% και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
16. Πραγματοποιείται απομάκρυνση υπολειμμάτων υπερκειμένου με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.
17. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 20 μl διαλύματος TE/RNase[99 μl TE + 1μl RNase (10 mg/ml)] και επώαση στους 37°C για 20 λεπτά.
18. Φυλάσσεται στους -20° C για περαιτέρω χρήση.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH:8.0

Διάλυμα λυσοζύμης 100 mg/ml

Προνάση 20 mg/ml

NaCl 5 M

SDS 10%

Χλωροφόρμιο

Φαινόλη

Ισοαμυλική αλκοόλη

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη 70%

RNase A 10 mg/ml

CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)/**NaCl** : 4.1 gr NaCl διαλύονται σε 80 ml H₂O και προστίθενται αργά 10 g CTAB με ταυτόχρονη θέρμανση (65° C) και πολύ ήπια ανάδευση. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περισσότερο από 3 ώρες μέχρι την πλήρη διάλυση του CTAB. Τέλος, προστίθεται H₂O μέχρι τελικού όγκου 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

2.8 Απομόνωση βακτηριακού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Keyprep της ANACHEM

1. Φυγοκέντρηση καλλιέργειας κυττάρων, που αναπτύχθηκαν σε 24 ώρες, στις 6.000 g για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
2. Προσθήκη 100 μl Buffer R1 και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπετάρισμα.
3. Προσθήκη 10 μl λυσοζύμης (100 mg/ml). Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση στους 37° C για 20 λεπτά. Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 3 λεπτά και απόχυση υπερκειμένου.
4. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος R2 και προσθήκη 20 μl πρωτεΐνης K. Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση στους 65° C για 20 λεπτά σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.
5. Προσθήκη 20 μl RNase A (DNase-free, 20 mg/ml). Ανάδευση και επώαση στους 37° C για 5 λεπτά.
6. Προσθήκη ποσότητας του ρυθμιστικού διαλύματος BG ίση με 2 φορές του συνολικού όγκου του διαλύματος και καλή ανάδευση με ανακίνηση αρκετές φορές μέχρι να αποκτηθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα. Ακολουθεί επώαση στους 65° C για 10 λεπτά.
7. Προσθήκη 200 μl αιθανόλης (100%). Ακολουθεί άμεση και καλή ανακίνηση.
8. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη και σε νέο καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 g για 1 λεπτό. Πραγματοποιείται απόχυση του υγρού που συλλέγεται στο σωληνάκι μέσα στο οποίο είναι η στήλη.
9. Η στήλη ξεπλένεται με 750 μl με το ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και φυγοκεντρείται στις 10.000 g για 1 λεπτό. Πραγματοποιείται απόχυση του υγρού που συλλέγεται στο σωληνάκι μέσα στο οποίο είναι η στήλη.
10. Η στήλη φυγοκεντρείται στις 10.000 g για 1 λεπτό για απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης.

11. Η στήλη τοποθετείται σε νέο καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και προστίθενται 50-100 μl προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (65° C) και ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά. Η στήλη φυγοκεντρείται στις 10.000 g για 1 λεπτό για την έκλουση του DNA.
12. Το DNA φυλάσσεται στους -20° C για περαιτέρω χρήση.

2.9 Απομόνωση ολικού RNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Nucleospin® RNA της Macherey Nagel (Γερμανίας)

Γενικές παρατηρήσεις για το χειρισμό του RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι πολύ σταθερά και ενεργά ένζυμα, τα οποία δεν απαιτούν άλλους παράγοντες για να δράσουν. Οι ριβονουκλεάσες είναι πολύ δύσκολο να αδρανοποιηθούν, ενώ ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες είναι αρκετές για να καταστρέψουν το RNA, για αυτό το λόγο δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλαστικό ή γυάλινο σκεύος χωρίς να εξαλειφθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης με ριβονουκλεάσες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του RNA όσο και μετά από αυτήν, έτσι ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του RNA με ριβονουκλεάσες. Για την εξασφάλιση ενός περιβάλλοντος ελεύθερου RNAσών, λήφθηκαν τα εξής μέτρα:

Κατά το χειρισμό του RNA θα πρέπει να ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές. Τα χέρια καθώς και η σκόνη είναι πιθανοί φορείς βακτηρίων και μούχλας που είναι οι πιο διαδεδομένες πηγές μόλυνσεων με ριβονουκλεάσες. Η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό των διαλυμάτων και των δειγμάτων RNA είναι επιβεβλημένη για την αποφυγή επιμόλυνσης με ριβονουκλεάσες, οι οποίες μπορεί να προέρχονται είτε από το δέρμα είτε από σκόνη στο εργαστηριακό περιβάλλον. Τα γάντια θα πρέπει να αλλάζονται τακτικά και τα μπουκαλάκια να παραμένουν με τα καπάκια κλειστά όταν δεν χρησιμοποιούνται. Το RNA που απομονώνεται θα πρέπει να διατηρείται σε πάγο.

Συνίσταται η χρήση αποστειρωμένου πλαστικού εξοπλισμού μιας χρήσεως (μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια, ρύγχη πιπेटών κλπ.). Τα ανωτέρω είναι συνήθως ελεύθερα RNAσών και δεν απαιτούν καμιά διαδικασία απομάκρυνσης των ριβονουκλεασών. Η απαλλαγή των διαλυμάτων από ριβονουκλεάσες επιτυγχάνεται με την κατεργασία τους με DEPC (δισαιθυλοπυροανθρακικό οξύ).

Κατεργασία με DEPC (Diethylpyrocarbonate)

Η κατεργασία με DEPC, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εξάλειψη των ριβονουκλεασών από το νερό και άλλα διαλύματα. Το δισαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (DEPC) καταστρέφει την ενζυμική δραστηριότητα των ριβονουκλεασών καθώς και άλλων πρωτεϊνών, τροποποιώντας τις ομάδες -NH, -SH και -OH, όπου αυτές υπάρχουν. Για την κατεργασία διαλυμάτων με DEPC, προστίθεται 0.1% DEPC και μετά από ανάδευση το διάλυμα αφήνεται για τουλάχιστον 12 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται όπου και το DEPC διασπάται, παράγοντας μια μικρή ποσότητα αιθανόλης, η οποία αντιδρώντας με ίχνη καρβοξυλικών οξέων, παράγει πτητικούς εστέρες στους οποίους οφείλεται και η χαρακτηριστική οσμή των κατεργασμένων διαλυμάτων. Αντιδραστήρια που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες (π.χ. Tris και EDTA), δευτεροταγείς ή τριτοταγείς αμίνες

(π.χ. HEPES) καθώς και αντιδραστήρια που δεν αποστειρώνονται, δεν μπορούν κατεργαστούν με DEPC.

Η απομόνωση του RNA του βακτηριακού στελέχους Sph6 περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων

25 ml καλλιέργειας φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά στις 11.000 g στους 4° C.

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE το οποίο περιέχει λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 10 mg/ml.

Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και επώαση για 1 ώρα στους 37° C.

2. Λύση κυττάρων

Στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος RA1 και 3.5 μl β-μερκαπτοαιθανόλη, με καλή ανάδευση (vortex).

3. Φιλτράρισμα του εναιωρήματος

Το μίγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη Nucleospin® Filter Column, η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής (2 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 11.000 g για 1 λεπτό, με την οποία επιτυγχάνεται φιλτράρισμα του μίγματος μέσω της στήλης και μείωση του ιξώδους και της θολερότητας του.

4. Ρύθμιση των συνθηκών δέσμησης του RNA

Στο διαυγές πλέον μίγμα προστίθενται 350 μl αιθανόλη 70% με καλή ανάδευση.

5. Δέσμηση του RNA

Μετά από καλή ανάδευση με πιπετάρισμα, το εναιώρημα μεταφέρεται στην ειδική στήλη Nucleospin® RNA II Column η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωληνάκι συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g.

Το υγρό απορρίπτεται και η ειδική στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

6. Αφαλάτωση της μεμβράνης της στήλης

Προστίθενται στη στήλη 350 μl ρυθμιστικό διάλυμα αφαλάτωσης της μεμβράνης (MDB, Membrane Desalting Buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 g. Το υγρό απορρίπτεται.

7. Αποδόμηση του DNA

Στη στήλη προστίθενται 95 μl DNase reaction mixture και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

8. Έκπλυση και ξήρανση της μεμβράνης

Πρώτη έκπλυση

Προστίθενται 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA2 στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Δεύτερη έκπλυση

Προστίθενται 600 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής.

Τρίτη έκπλυση

Προστίθενται 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα RA3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000 g. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι συλλογής erpendorf απαλλαγμένο από νουκλεάσες.

9. Έκλυση του ολικού RNA

Προστίθενται στη στήλη 60 μl νερού, απαλλαγμένου από RNασες, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 g και συλλογή του εκλουόμενου RNA.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH:8.0

Διάλυμα λυσοζύμης 100 mg/ml

β-μερκαπτοαιθανόλη

Αιθανόλη 70%

2.10 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Αρχή μεθόδου(Yamada et al. 2001; Voytas 2001)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης αποτελεί μια ηλεκτροχημική μέθοδο διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στο πήγμα και το DNA(ή το RNA) λόγω του αρνητικού του φορτίου κινείται προς το θετικό πόλο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Οι εξής παράγοντες επηρεάζουν τη μετακίνηση του DNA στο πήγμα αγαρόζης:

- **Το μέγεθος του τμήματος DNA.** Τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος. Αντίθετα, τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα. Συνεπώς τα μικρότερα μόρια εντοπίζονται προς το κάτω μέρος του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα προς το επάνω μέρος του πηκτώματος. Για να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται, τοποθετούμε πάντα στο πηκτώμα, εκτός από τα δείγματά μας, και έναν μάρτυρα με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους.
- **Η διαμόρφωση του DNA.** Τα μόρια του DNA μπορεί να έχουν τρεις διαμορφώσεις: Κυκλικά μόρια(form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιϊκό DNA), κυκλικά μόρια με εγκοπές(form-II:πλασμίδια που έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα) ή ευθύγραμμα μόρια(form-III:είναι συνήθως όλα τα μόρια που έχουν υποστεί πέψεις με

περιοριστικές ενδονουκλεάσες). Μόρια DNA ίδιου μεγέθους, αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης, έχουν διαφορετική κινητικότητα, με τα υπερελικωμένα μόρια να κινούνται ταχύτερα και να ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA (Grinsted and Benett, 1988). Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήγμα αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους τους.

- **Η συγκέντρωση της αγαρόζης.** Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αγαρόζης δίνεται από τον τύπο: $\log \mu = \log \mu_0 - k_r t$, όπου μ είναι η κινητικότητα του DNA, μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, k_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αγαρόζης.
- **Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πήκτωμα. Τα συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι το TBE και το TAE και χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 1x.
- **Η τάση πεδίου.** Ο καλύτερος διαχωρισμός μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.

Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα είτε κατά την παρασκευή του είτε με εμβάπτισή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 µg/ml για 15-20 λεπτά μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο δράση. Τα γάντια και τα πηκτώματα που περιέχουν βρωμιούχο αιθίδιο απορρίπτονται σε κάδους με σήμανση για τοξικά απόβλητα και υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία εξουδετέρωσης.

Πειραματική πορεία

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0.8-2 gr αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση του πήγματος). Στην κωνική φιάλη προστίθενται 150 ml διαλύματος Tris Acetate Acid/EDTA (TAE) και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές.
2. Η κωνική φιάλη ψύχεται στους $\sim 55^\circ$ C και προστίθεται στο διάλυμα κατάλληλος όγκος βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0.5 µg/ml.
3. Η ρευστή αγαρόζη αποχύνεται στο εκμαγείο, το οποίο περιέχει «χτένια», με προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Τα «χτένια» με την απομάκρυνσή τους, αφού σταθεροποιηθεί το πήγμα, θα δημιουργήσουν τις θέσεις υποδοχής (πηγαδάκια) των δειγμάτων.
4. Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προετοιμάζονται κατάλληλα. Προστίθεται σε καθένα από αυτά κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης, Gel

Loading Buffer (GLB) σε αναλογία 5:1 δείγμα-GLB. Το διάλυμα GLB περιέχει γλυκερόλη, η παρουσία της οποίας διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Το διάλυμα αυτό περιέχει και δύο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου), των οποίων η μετακίνηση στο πήγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική της πορείας των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

5. Το πήγμα αγαρόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήγμα κατά περίπου 1 mm. Κατά την πλήρωση με TAE της συσκευής ηλεκτροφόρησης εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.
6. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηγματος με πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου και εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα EtBr-DNA, τα οποία εμφανίζονται σαν πορτοκαλόχρωμες ζώνες. Η φωτογράφιση του πηκτώματος γίνεται με τη βοήθεια φωτογραφικών κώνων και ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.

Διαλύματα

Διάλυμα TAE (Tris-acetate):	0.04 M Tris-acetate
	0.001 M EDTA pH=8.0

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος 50x.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (GLB):	0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης
	0.25% κυανούν του ξυλενίου
	30% γλυκερόλη
Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.	

2.11 Κατεργασία απομονωμένου RNA με δεοξυριβονουκλεάση DNase I

Το ένζυμο DNase I είναι μια ενδονουκλεάση η οποία είναι ικανή να καταλύει σε τυχαίες θέσεις, την αποδόμηση τόσο των δίκλωνων όσο και των μονόκλωνων μορίων DNA, οδηγώντας σε ολιγονουκλεοτίδια με 5'-φωσφορικά άκρα.

Μετά την απομόνωση ολικού RNA, πραγματοποιείται πάντα κατεργασία με το ένζυμο DNase I, για την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος DNA.

Η κατεργασία με το ένζυμο DNase I, περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

1. Προετοιμασία αντιδρώντος μίγματος

Ολικό RNA: 20-50 µg

10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNase I: 5 µl

DNase I: 2 µl (10units)

αναστολέας RNασών: 20 units

ddH₂O κατεργασμένο με DEPC (απαλλαγμένο από RNασες) έως 50 µl

2. Επώαση για 20-30 λεπτά στους 37°C.
3. Προσθήκη 50 µl ddH₂O κατεργασμένο με DEPC και 100 µl διαλύματος φαινόλης: χλωροφορμίου (1:1) ακολουθούμενη από ανάδευση.
4. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.000rpm.
5. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Προσθήκη 100µl χλωροφορμίου ακολουθούμενη από ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.000rpm.
7. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Προσθήκη 10 µl 3M CH₃COONa και 250 µl παγωμένης αιθανόλης 100% ακολουθούμενη από ανάδευση. Παραμονή για 20 λεπτά στους -80° C.
8. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4° C και απόχυση του υπερκείμενου.
9. Έκπλυση του ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 70%. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4° C και απόχυση του υπερκείμενου.
10. Ξήρανση του ιζήματος.
11. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 µl ddH₂O κατεργασμένο με DEPC.

Διαλύματα

10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNασης I :	400 mM Tris HCl pH:7.5
	80 mM MgCl ₂
	50mM DDT (π, π'-διχλωρο- διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο)
	100%Αιθανόλη

2.12 Καθαρότητα και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων (Sambrook & Russell, 2001)

Μετά από κατάλληλες συγκεντρώσεις λαμβάνεται μια μέτρηση απορρόφησης στα 260 nm και μια στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: OD₂₆₀=1 αντιστοιχεί σε 50 µg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος, ενώ η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: OD₂₆₀=1 αντιστοιχεί σε 40 µg RNA/ml διαλύματος.

Τα διαλύματα του DNA και του RNA είναι καθαρά όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1.8.

Εναλλακτικά, γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA και του RNA με τη χρήση Quawell Q300 UV Spectrophotometer.

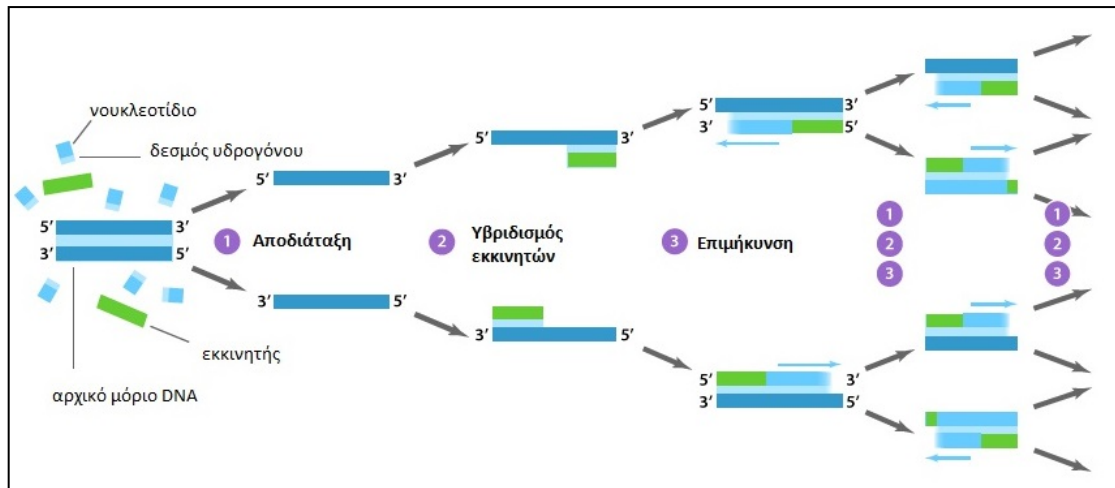
2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Αρχή μεθόδου (Mullis 1990)

Η τεχνική της PCR προσφέρει με έναν απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων εκμεταλλευόμενη δυο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για να μπορέσει, όμως, να ξεκινήσει η σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δύο κλώνοι ενός δίκλωνου μορίου DNA και χρησιμοποιηθεί ένα ολιγονουκλεοτίδιο που υβριδίζει σε ένα σημείο του ενός κλώνου, τότε θα αρχίσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου από το σημείο που υβριδισε το ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητής (primer). Επομένως μπορεί να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δυο εκκινητές που υβριδίζουν εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας, έτσι ώστε ο καθένας να είναι συμπληρωματικός με τον έναν κλώνο και οι δύο μαζί να καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος περίπου στους 94°C .
2. Ψύξη του μίγματος για να υβριδίσουν οι εκκινητές με τους δύο κλώνους. Η ακριβής θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας.
3. Λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA, με άνοδο της θερμοκρασίας συνήθως στους 72°C .



Σχήμα 2.1 Σχηματική απεικόνιση PCR.

Πειραματική πορεία

Οι αντιδράσεις γίνονται σε τελικό όγκο 50 μl και οι συνθήκες επιλέγονται ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των εκκινητών που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η KaraTaq από την εταιρεία TaKaRa.

Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH ₂ O	64 μl
10x ρυθμιστικού διαλύματος	10 μl
MgCl ₂ (2.5 mM)	5 μl
dNTPs (10mM)	10 μl
Εκκινητής 1 (sense)	3 μl (30pmols)
Εκκινητής 2 (antisense)	3 μl (30pmols)
Εκμαγείο DNA	4 μl (30-100ng)
Taq DNA polymerase	1 μl (2.5 U)
Τελικός όγκος	100 μl

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή PTC-100 version 7.0 thermocycler (MJ Research Inc.) στις ακόλουθες συνθήκες:

Μετουσίωση για 3 min στους 95° C ακολουθούμενη από 40 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:

- Μετουσίωση για 10 sec στους 95° C
- Αναδιάταξη για 20 sec στους 58° C (η θερμοκρασία επιλέγεται κάθε φορά ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών)
- Επιμήκυνση για 30 sec στους 72° C

Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο και για 10 min στους 72° C.

2.14 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Αρχή μεθόδου(Stryer 1988)

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης το RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση. Σε αυτή την περίπτωση οι γενετικές πληροφορίες μεταβιβάζονται από το RNA στο DNA, το αντίστροφο από την κανονική κατεύθυνση της μεταφοράς πληροφοριών (από αυτό πήρε και το όνομά του το ένζυμο που καταλύει αυτό το βήμα).

Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει μια αλυσίδα συμπληρωματική του εκμαγείου RNA, αν της δοθεί ένας εκκινητής που να περιέχει ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο και να διαθέτει βάσεις συμπληρωματικές του RNA. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτό το ένζυμο για να συνθέσουμε DNA από mRNA δίνοντας έναν ολιγο-dT ως εκκινητή, γιατί αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία mRNA. Η υπόλοιπη αλυσίδα cDNA συντίθεται παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών. Το RNA αυτού του υβριδίου RNA-DNA υδρολύεται εν συνεχεία σε υψηλότερο pH. Το 3' άκρο του DNA που σχηματίστηκε δημιουργεί μια κάμψη φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

2.14.1 Αντίδραση σύνθεσης cDNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa)

Η αυτοματοποιημένη μέθοδος PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser προσφέρει τη σύνθεση του cDNA καθώς και την αντίδραση εξάλειψης του γενωμικού DNA. Τα δείγματα RNA μπορούν να προεπεξεργαστούν με DNase I, αλλά σε αυτή την προεπεξεργασία η DNase I πρέπει να απενεργοποιηθεί και να εξαλειφθεί, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση ή απώλεια του RNA. Η σύνθεση του cDNA από RNA μπορεί να επιτευχθεί χωρίς απώλεια σε μια γρήγορη αντίδραση διάρκειας μικρότερης από 20 λεπτά. Το γενωμικό DNA εξαλείφεται με προσθήκη του gDNA Eraser, το οποίο έχει ισχυρή δραστηριότητα αποδόμησης του DNA, για 2 λεπτά στους 42° C. Στη συνέχεια προστίθεται ένα αντιδραστήριο της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, που περιλαμβάνει ένα συστατικό που αναστέλλει εντελώς την αποδόμηση του DNA και η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης λαμβάνει χώρα για 15 λεπτά.

Πειραματική πορεία

1. Αντίδραση εξάλειψης γενωμικού DNA

Η προετοιμασία του διαλύματος για την αντίδραση εξάλειψης του γενωμικού DNA πραγματοποιείται στον πάγο.

<Για κάθε αντίδραση>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα

5x gDNA Eraser ρυθμιστικό διάλυμα	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
συνολικό RNA	*1
H ₂ O απαλλαγμένο από RNάσες	*2
Συνολικός όγκος	10.0 μl

Ακολουθεί επώαση στους 42° C για 2 λεπτά.

*¹ : μέχρι 1 μg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση χρωστικής SYBR® Green και μέχρι 2 μg συνολικού RNA για ανάλυση qPCR με χρήση ιχνηθετών Taqman® Probe, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης συνολικού όγκου 20 μl.

*²: συμπληρώνεται μέχρι την πλήρωση του συνολικού όγκου.

2. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Η προετοιμασία του διαλύματος για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματοποιείται στον πάγο.

<Για κάθε αντίδραση>	
Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Διάλυμα αντίδρασης από το βήμα 1	10.0 μl
5x PrimeScript ρυθμιστικό διάλυμα 2 (για Real Time)	4.0 μl
PrimeScript RT μίγμα ενζύμων I	1.0 μl
RT μίγμα εκκινητών	1.0 μl
H ₂ O απαλλαγμένο από RNάσες	4.0 μl
Συνολικός όγκος	20.0 μl

Ακολουθεί επώαση στους 42° C για 20 λεπτά και αμέσως επώαση στους 85° C για 5 δευτερόλεπτα. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20° C.

2.15 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης qPCR και αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR

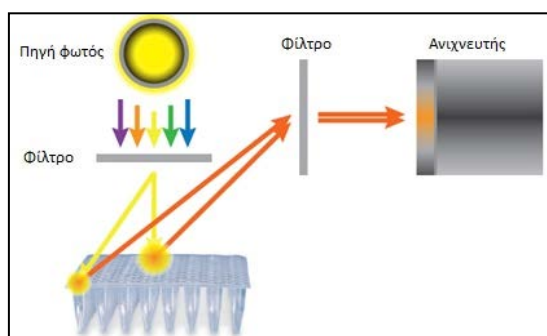
Αρχή μεθόδου (Higuchi et al. 1993; Jozefczuk & Adjaye 2011)

Στις αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου προσδιορίζουμε την ποσότητα του PCR προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR αντίδραση στην οποία η ποσοτικοποίηση γίνεται στο τελικό προϊόν το οποίο και προκύπτει μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων. Στη δε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR, γίνεται ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα,

στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας.

Το RNA μεταγράφεται σε cDNA το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την qPCR αντίδραση και σε αυτή την περίπτωση μιλάμε για αντίδραση 2 βημάτων. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση του προϊόντος στόχου κατά την πορεία της αντίδρασης είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με τη χρήση φθορίζοντων μορίων που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του DNA. Το σήμα του φθορισμού παρακολουθείται κατά την πορεία της αντίδρασης και η ένταση του φθορισμού συσχετίζεται με την ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική συνδυάζουν τη λειτουργία θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του DNA, οπτικού συστήματος για τη διέγερση των φθορίζουσών ουσιών και την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φθορισμού και διαθέτουν κατάλληλο λογισμικό για τη συλλογή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η βασική αρχή λειτουργίας ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου συνοψίζεται στο Σχήμα 2.2. Πηγή φωτός παράγει φως, το οποίο στη συνέχεια φιλτράρεται για να επιλεγεί το συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης της φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Η συσσώρευση των προϊόντων PCR παρακολουθείται μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού. Το αντανακλώμενο φως διέγερσης περνά από φίλτρο πριν την ανίχνευση και μόνο τα επιλεγμένα μήκη κύματος φθορισμού επιτρέπεται να περάσουν στον ανιχνευτή.



Σχήμα 2.2 Βασική αρχή ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου.

Ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

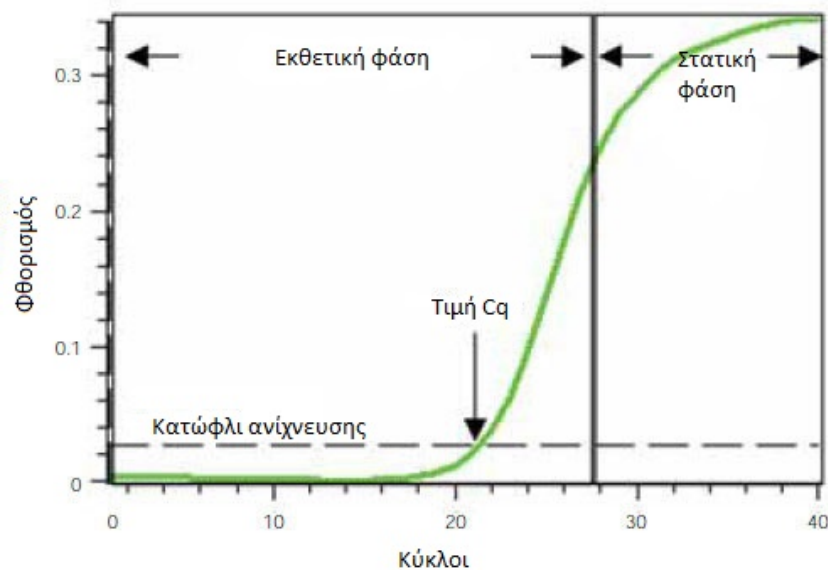
Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει

εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al. 2005; Kubista et al. 2006).

Βασικές έννοιες

Στην αρχή της αντίδρασης το σήμα φθορισμού είναι πολύ ασθενές και δεν μπορεί να ξεχωρίσει από το θόρυβο. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης η ποσότητα της DNA αλληλουχίας στόχου διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της έντασης του σήματος φθορισμού όταν ξεπεραστεί ένα κατώφλι ανίχνευσης (threshold line) κάτω από το οποίο διακρίνουμε μόνο τον ενδογενή φθορισμό των αντιδρώντων μορίων (background fluorescence). Η απόδοση της ενίσχυσης μιας ιδανικά σχεδιασμένης qPCR αντίδρασης είναι πολύ υψηλή (προσεγγίζει το 100%) και παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της εκθετικής φάσης (exponential phase). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση, όπου η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή και συνεπώς τα αποτελέσματα πιο αξιόπιστα. Στο τέλος της εκθετικής φάσης και στο σημείο κορεσμού (plateau), τα επίπεδα του σήματος μειώνονται, οπότε και η ένταση του φθορισμού δεν σχετίζεται με τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού υποστρώματος DNA. Η ουδός κύκλου Ct (threshold cycle) είναι μια παράμετρος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR και αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων που χρειάζονται για να επιτευχθεί ένα ανιχνεύσιμο επίπεδο φθορισμού μεγαλύτερο εκείνου του αρχικού υποστρώματος. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο στις αντιδράσεις.



Σχήμα 2.3 Γράφημα ενίσχυσης μιας αντίδρασης PCR.

2.15.1 Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Η χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας επιτρέπει τον διαρκή έλεγχο της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ειδικούς θερμοκυκλοποιητές εξοπλισμένους με μονάδες ανίχνευσης φθορισμού. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του πολλαπλασιασμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο. Η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης qPCR γίνεται είτε με την ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας που δεσμεύεται μη ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA, είτε με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

2.15.1.1 Ανίχνευση μέσω μη ειδικής δέσμευσης φθορίζουσας ουσίας σε δίκλινα μόρια DNA

Η ανίχνευση γίνεται με χρήση φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες προσδένονται χωρίς διάκριση σε δίκλινα μόρια DNA. Αποτελεί την απλούστερη και οικονομικότερη προσέγγιση της μεθόδου ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτούνται συγκεκριμένες πληροφορίες για την αλληλουχία στόχου. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μεθόδου καθορίζεται από το σχεδιασμό των εκκινητών.

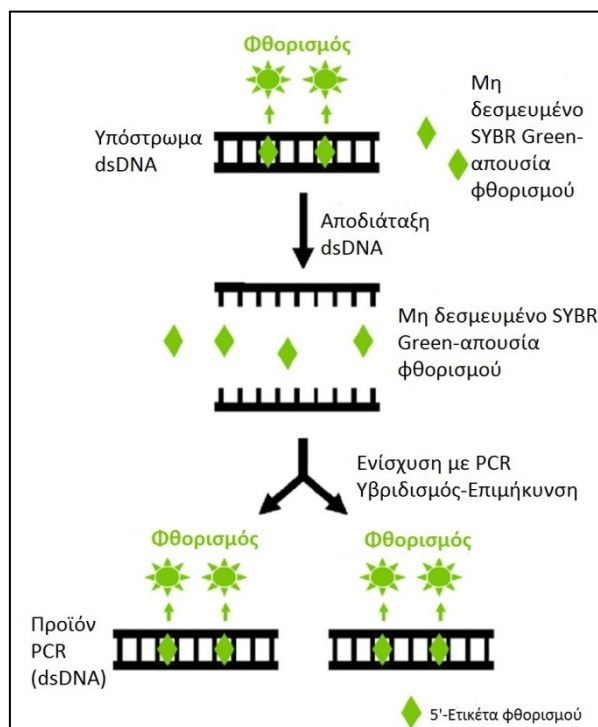
Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν ελάχιστα επίπεδα φθορισμού όταν υπάρχουν αδέσμευτες σε διάλυμα, ενώ ξεκινούν να φθορίζουν έντονα στο κατάλληλο μήκος κύματος μετά τη δέσμευσή τους σε δίκλινο DNA.

Μία από τις πιο συνηθισμένες φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αυτή είναι το SYBR®Green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα.

Το πλεονέκτημα του SYBR®Green είναι η απλότητά του. Η δράση του είναι παρόμοια με εκείνη του βρωμιούχου αιθιδίου, με τη διαφορά ότι το SYBR®Green δεν παρεμποδίζει τις DNA πολυμεράσες, οπότε μπορεί να προστεθεί απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης PCR.

Το SYBR®Green έχει χαμηλότερο background φθορισμό από ότι το βρωμιούχο αιθίδιο, μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλότερες συγκεντρώσεις δίκλωνου DNA και δεν είναι τοξικό.

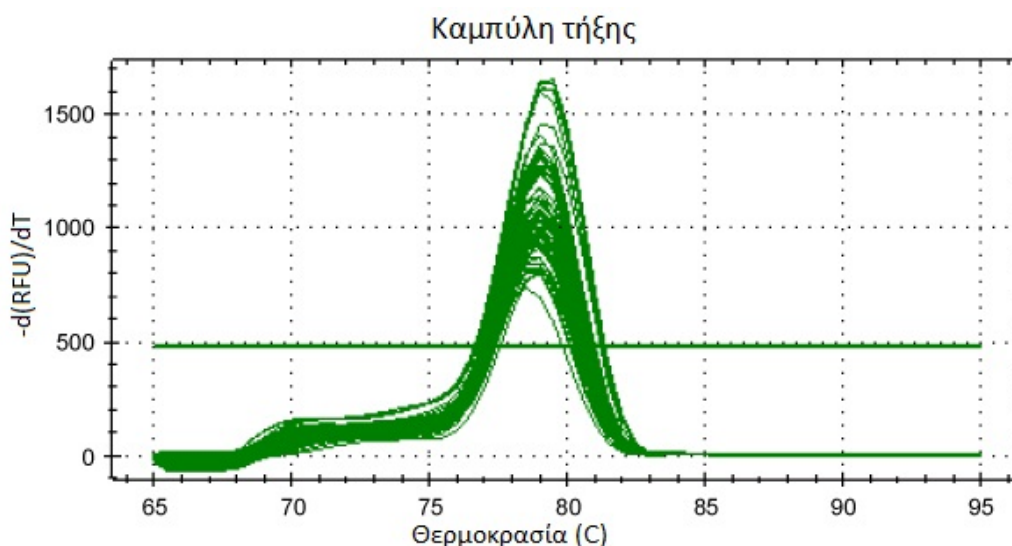
Στα πλεονεκτήματα του SYBR®Green συγκαταλέγονται ο απλός σχεδιασμός, η ικανότητα γρήγορης μελέτης πολλών γονιδίων, το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα ανάλυσης καμπύλης τήξης (melting curve) η οποία επιτρέπει να εκτιμήσουμε την εξειδίκευση της αντίδρασης πολλαπλασιασμού.



Σχήμα 2.4 Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης του SYBR Green.

Το βασικότερο μειονέκτημα στη χρήση φθοριζουσών ουσιών μη ειδικής δέσμευσης σε δίκλινα μόρια DNA είναι ότι μπορούν να εκπέμπουν παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου DNA, ακόμα και ανεπιθύμητων προϊόντων ή διμερών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η σύνθεση και ανίχνευση των συγκεκριμένων προϊόντων στόχων και κατά συνέπεια αλλοιώνεται η πρότυπη καμπύλη. Πάραυτα, ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών.

Σε αντιδράσεις που έχει χρησιμοποιηθεί η φθορίζουσα χρωστική SYBR®Green, είναι απαραίτητη η ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Η μελέτη της καμπύλης-τήξης μετά το πέρας της αντίδρασης επιτρέπει να διακριθούν τα προϊόντα της αντίδρασης και να αναλυθεί η εξειδίκευσή της, χωρίς να χρειαστεί ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της ανάλυσης αυτής είναι ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από χαμηλή τιμή (κατά την οποία όλες οι αλληλουχίες είναι υβριδοποιημένες) σε υψηλή, προκαλώντας διαχωρισμό των αλυσίδων. Καθώς το DNA αποδιατάσσεται, το SYBR®Green απελευθερώνεται και παρατηρείται μείωση του φθορισμού. Στη θερμοκρασία τήξης δύο είναι οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο: το μέγεθος του δίκλωνου DNA και το περιεχόμενο σε κατάλοιπα GC. Όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο σε GC κατάλοιπα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθος της αλυσίδας, τόσο υψηλότερη θα είναι η θερμοκρασία τήξης. Συγκρίνοντας τις θερμοκρασίες τήξης των αναμενόμενων προϊόντων, η παρουσία ενός μη ειδικού προϊόντος ή σχηματισμού διμερών από τους εκκινητές ανιχνεύεται εύκολα. Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται από το λογισμικό του οργάνου βάση των δεδομένων της καμπύλης τήξης, από την αρνητική πρώτη παράγωγο της αλλαγής του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία ($-dF/dT$).



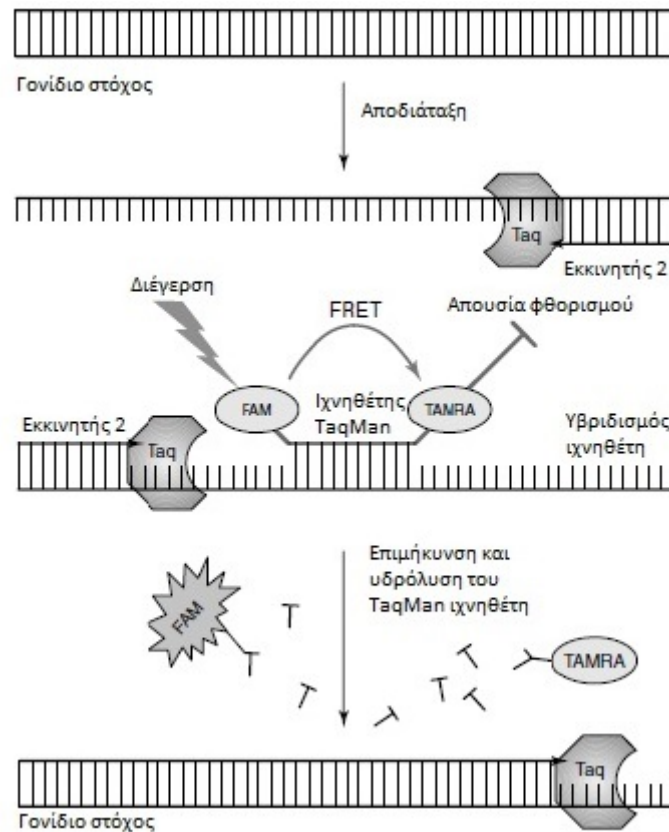
Σχήμα 2.5 Καμπύλη τήξης στην Real Time PCR.

2.15.1.2 Ανίχνευση με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τη χρήση ιχνηθετών ολιγονουκλεοτιδίων που φέρουν φθορίζουσες ετικέτες και έχουν σχεδιαστεί για να υβριδίζουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι υδρολυόμενοι ιχνηθέτες ή αλλιώς TaqMan® ιχνηθέτες (TaqMan probes) καθώς και εκείνοι δομής φουρκέτας, με συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους τους μοριακούς φάρους (molecular beacon probes).

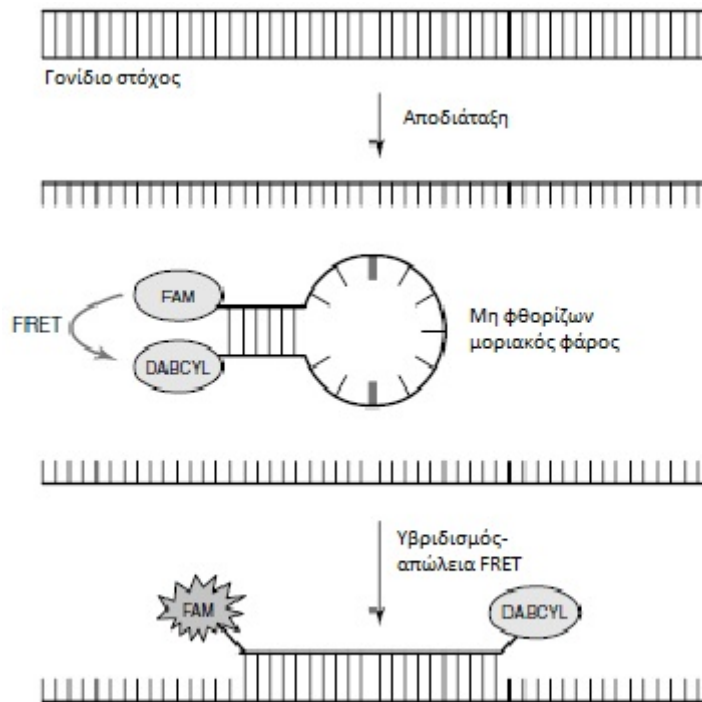
Στην τεχνολογία των TaqMan® ιχνηθετών τοποθετείται φθορίζουσα ουσία στο 5' άκρο του ιχνηθέτη, ενώ στο 3' άκρο τοποθετείται ομάδα απορρόφησης φθορισμού, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο ένα ζευγάρι δότη-δέκτη με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μεταφορά

ενέργειας μεταξύ τους (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Ο τρόπος δράσης τους φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 2.6 Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου ιχνηθετών TaqMan.

Στην τεχνολογία των ιχνηθετών με δομή φουρκέτας, πιο διαδεδομένοι είναι οι μοριακοί φάροι. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια που σχηματίζουν δομές στελέχους-βρόγχου, λόγω των συμπληρωματικών αλληλουχιών στα άκρα του νουκλεοτιδίου, ενώ οι αλληλουχίες του βρόγχου είναι συμπληρωματικές με μια περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Στο 5' άκρο τοποθετείται φθορίζουσα ουσία, ενώ στο 3' άκρο ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Η δομή βρόγχου διατηρεί σε κοντινή απόσταση τη φθορίζουσα ουσία και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να σβένεται με μεταφορά ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) από τη μία ομάδα στην άλλη. Η δομή και ο τρόπος δράσης των μοριακών φάρων αναλύεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 2.7 Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου μοριακών φάρων.

2.15.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

1. Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων ή της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Διαδοχικές αραιώσεις δείγματος γνωστής ποσότητας συσχετίζονται γραμμικά με τις τιμές Ct. Το δείγμα μπορεί να είναι: ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA, γονιδιωματικό DNA, προϊόν PCR ή και cDNA που να περιέχει το γονίδιο στόχο. Καθίσταται έτσι εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων με βάση τις Ct τιμές τους. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση η απόδοση της ενίσχυσης (amplification efficiency) θα πρέπει να είναι ίδια τόσο στα δείγματα όσο και στα πρότυπα.

Απόδοση της ενίσχυσης(amplification efficiency)

Η απόδοση μιας αντίδρασης qPCR μπορεί να υπολογιστεί από την πρότυπη καμπύλη. Τυπικά μια πρότυπη καμπύλη δεν είναι παρά η γραμμική εξάρτηση $Ct=f(\log \text{ ng DNA/cDNA/copies κλπ})$, οπότε και η κλίση αυτής της εξάρτησης σχετίζεται με την απόδοση της αντίδρασης PCR. Όσο πιο κοντά είναι οι αποδόσεις των αντιδράσεων των δειγμάτων και των προτύπων, τόσο πιο ακριβής είναι και η ποσοτικοποίηση.

Για ένα γράφημα όπου στον γ άξονα έχουμε την τιμή Ct και στον x άξονα την τιμή log (ng DNA/cDNA/copies κλπ) ισχύει: **Απόδοση PCR (E)=[(10^{-1/κλίση})-1]x100%**

2. Σχετική ποσοτικοποίηση

Στη σχετική ποσοτικοποίηση υπολογίζεται ο λόγος της ποσότητας ενός μορίου στόχου σε δείγμα προς την αντίστοιχη ποσότητα σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο συχνά καλείται και βαθμονομητής (calibrator). Τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση αναφέρονται σαν σχετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Κατά τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων με την qRT-PCR είναι απαραίτητη η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να διορθωθούν διάφορες μεταβλητές όπως η ποσότητα νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα, μεταβλητότητα του φθορισμού του οργάνου, η διακύμανση των αποδόσεων της αντίδρασης καθώς και η ποιότητα και καθαρότητα του δείγματος. Η κανονικοποίηση γίνεται με βάση ένα γονίδιο που χρησιμοποιείται σαν γονίδιο αναφοράς (reference gene). Ένα γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να έχει σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα και τις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται. Σαν γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνηθέστερα γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) όπως για παράδειγμα τα γονίδια των: GAPDH, 18S ή 16S rRNA, β-ακτίνης, γυράσης, κ.ά. Βέβαια η έκφραση ακόμα και των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας ποικίλλει σε κάποιο βαθμό και προτείνεται η εξέταση της σταθερότητας της έκφρασης διαφόρων γονιδίων για κάθε πείραμα.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[\Delta\Delta]CT}$, όπου $[\Delta\Delta]CT = [\Delta]CT_{\text{δείγματος}} - [\Delta]CT_{\text{αναφοράς}}$. Η $[\Delta]CT_{\text{δείγματος}}$ είναι η κανονικοποιημένη τιμή CT για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου συστατικής έκφρασης, ενώ η τιμή $[\Delta]CT_{\text{αναφοράς}}$ είναι η, αντίστοιχα, κανονικοποιημένη τιμή CT για το δείγμα αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (Livak & Schmittgen 2001).

Πειραματική πορεία

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα του στελέχους Sph63, που καλλιεργήθηκαν με διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκόζη, φαινανθρένιο, φθαλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, βενζοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ) και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και τη σύνθεση cDNA ακολούθησε η ποσοστική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων.

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλακέτες με 96 πηγάδια (PCR-Platten Low Profile 96 well, Kisker, Germany) και σε όργανο CFX96 Real-Time PCR (Bio Rad). Σαν χρωστική χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR® FAST qPCR kit Master Mix (2x) Universal, με την ιδιότητα να δεσμεύεται σε δίκλινα μόρια DNA. Μια τυπική σύσταση της αντίδρασης σε τελικό όγκο 20μl περιέχει 19μl SYBR Green Master mix το οποίο περιέχει και τη DNA πολυμεράση KAPA

SYBR™, 200nM από τον κάθε εκκινητή και τέλος 1μl από το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής σε διαφορετικές αραιώσεις. Η εξειδίκευση των εκκινητών καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης προσδιορίστηκαν αρχικά με συμβατική αντίδραση PCR. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής:

Μετουσίωση για 3 min στους 95° C ακολουθούμενη από 40 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:

- Μετουσίωση για 10 sec στους 95° C
- Αναδιάταξη για 20 sec στους 58° C
- Επιμήκυνση για 30 sec στους 72° C

Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο (1 min) στους 72° C.

Καμπύλη τήξης από 50° C έως 90° C, ανάγνωση κάθε 0.2° C για 2 sec.

Επώαση στους 4° C.

Το κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ακρίβεια και επαναληψιμότητα της qPCR. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν μολύνσεις με μια αντίδραση χωρίς εκμαγείο για κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το γονίδιο της γυράσης β (*gyrB*), λόγω της σταθερής του έκφρασης στις εξεταζόμενες συνθήκες. Η ποσότητα σε mRNA κάθε αγνώστου δείγματος κανονικοποιήθηκε με το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς. Οι πρότυπες καμπύλες σχεδιάστηκαν με κάθε χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 5, 2, 1, 0.5, 0.2 και 0.1 ng ολικού RNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη και αποτελούν το βαθμονομητή (Johnson et al. 2000). Οι αποδόσεις των αντιδράσεων προσδιορίστηκαν από τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών (Corbella & Puget 2003; Pfaffl 2001). Τα αποτελέσματα της qRT-PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με δείγμα βαθμονομητή, το υπόστρωμα γλυκόζης, και η ποσότητά τους υπολογίστηκε σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς, τη γυράση β. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ο λόγος της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το βαθμονομητή με το λόγο της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς (Dobbs & Hansen 2006).

Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

3.1 *In silico* μελέτη των γονιδίων

Υστερα από *in silico* μελέτες για την αναγνώριση γονιδίων του *Srpe3*, τα οποία εντοπίζονται στα πλασμίδια και στο χρωμόσωμα και εμπλέκονται στις πορείες καταβολισμού των PAH ή άλλων αρωματικών ενώσεων, επιλέχθηκαν 11 γονίδια διοξυγονασών και 1 γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα ώστε να μελετηθεί η μεταγραφή τους.

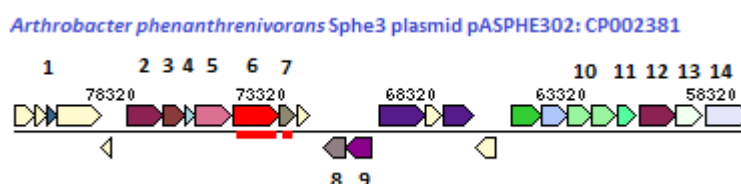
Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης (Κεφάλαιο 2.2) τα γονίδια που επιλέχθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακας 3.1. Με βάση την αναζήτηση στο JGI IMG/M, τα γονίδια φαίνεται να εμπλέκονται στις πορείες αποδόμησης του φαινανθρενίου, του φθαλικού, του πρωτοκατεχοϊκού, του γεντισικού και του βενζοϊκού οξέος. Επιλέχθηκε, ακόμη, ένας πιθανός μεταγραφικός παράγοντας για το οπερόνιο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

Πίνακας 3.1 Πληροφορίες για τα υπό μελέτη γονίδια.

Κωδική ονομασία γονιδίου	Προϊόν γονιδίου (JGI)	Κωδική ονομασία γονιδίου	Προϊόν γονιδίου (JGI)
<i>rhd2α</i>	α υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μικρό πλασμίδιο	<i>pca34b</i>	β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού
<i>rhd2β</i>	β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μικρό πλασμίδιο	<i>pca45ab</i>	α,β υπομονάδες της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού
<i>rhd1α</i>	μεγάλη υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μεγάλο πλασμίδιο	<i>pca45reg</i>	πιθανός μεταγραφικός παράγοντας του οπερονίου της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού
<i>rhd1β</i>	μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, μεγάλο πλασμίδιο	<i>benz12cra</i>	α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού
<i>diox1</i>	διοξυγονάση 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού	<i>gent12lp</i>	1,2 διοξυγονάση του γεντισικού
<i>pca34a</i>	α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού	<i>cat12cr</i>	1,2 διοξυγονάση της κατεχόλης

Η βάση δεδομένων του IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/edu/main.cgi>) παρέχει πληροφορίες για το κάθε γονίδιο. Παρακάτω παρουσιάζονται περιοχές στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3*, στις οποίες εντοπίζεται το κάθε υπό μελέτη γονίδιο, καθώς και γειτονικά του γονίδια. Σε όλα τα σχήματα το υπό μελέτη γονίδιο απεικονίζεται με φορά 5'-3'.

Η διοξυγονάση του φαινυλοπροπιονικού ανήκει στην κατηγορία διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα, όπως φαίνεται και από τη φυλογενετική ανάλυση (Σχήμα 3.8, Σχήμα 3.9). Τα γονίδια που κωδικεύουν για τη μεγάλη και τη μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού του στελέχους *Srhe3* εντοπίζονται και στα δύο καταβολικά πλασμίδια. Τα γονίδια που εντοπίζονται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο και κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού ονομάστηκαν *rhd2α* και *rhd2β* αντίστοιχα (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Περιοχή στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο του *Srhe3* που εντοπίζονται τα *rhd2α* (6) και *rhd2β* (7). 1: Πιθανός μεταγραφικός παράγοντας, 2: περμεάση, 3: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας GntR, 4: φερρεδοξίνη, 5: 3,4-διοξυγονάση του φθαλικού, υπομονάδα φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης, 6: α υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, 7: β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, 8: αλδοάση, 9: αφυδρογονάση του β-υδροξυοξικού, 10: πρωτεΐνες μεταφορείς τύπου ABC, 11: αμιδάση, 12: περμεάση, 13: ρεδουκτάση, 14: α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού. Τα μη αριθμημένα γονίδια κωδικεύουν για υποθετικές πρωτεΐνες.

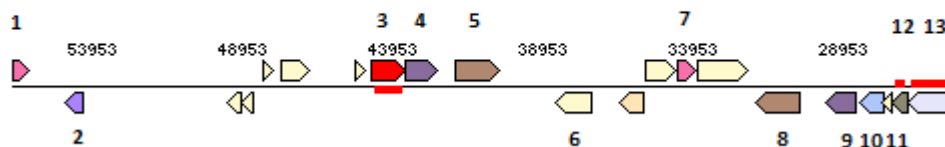
Τα γονίδια που κωδικεύουν για τη μεγάλη και τη μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού που εντοπίζονται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο του στελέχους *Srhe3* ονομάστηκαν *rhd1α* και *rhd1β* (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2 Περιοχή στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο του *Srhe3* που εντοπίζονται τα *rhd1α* (5) και *rhd1β* (6). 1: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας GntR, 2: ιντεγράση, 3: τρανσποζάσες, 4: μονοοξυγονάση του ανθρανιλοϋλ-CoA, 5: μεγάλη υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, 6: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού, 7: αφυδρογονάση άγνωστης εξειδίκευσης, 8: συνθάση διϋδροπικολινικού οξέος, 9: αφυδρογονάση της βανιλίνης, 10: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας TetR. Τα μη αριθμημένα γονίδια κωδικεύουν για υποθετικές πρωτεΐνες.

Η διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος ανήκει στις διοξυγονάσες σχάσης του αρωματικού πυρήνα. Τα γονίδια που κωδικεύουν για τη διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος στο στέλεχος *Srhe3* είναι το *diox1* (ASrhe3_40250), το οποίο εντοπίζεται στο πλασμίδιο pASPHE301 και το γονίδιο *diox2* (ASrhe3_22020), που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα (Vandera *et al.*, 2012). Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί το γονίδιο *diox1* που εντοπίζεται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο (Σχήμα 3.3).

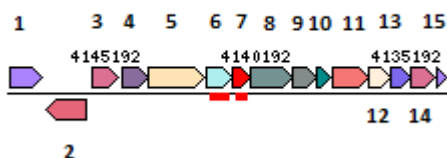
Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 plasmid pASPHE301: CP002380



Σχήμα 3.3 Περιοχή στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο του Sphe3 που εντοπίζεται το *dioX1* (3). 1: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας TetR, 2: ρεκομπινάση, 3: διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, 4: συνθάση διϋδροπικολινικού οξέος, 5: αφυδρογονάση, 6: τρoσποζάση, 7: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας TetR, 8: αφυδρογονάση της βανιλίνης, 9: συνθάση διϋδροπικολινικού οξέος, 10: αφυδρογονάση άγνωστης εξειδίκευσης, 11: υποθετική πρωτεΐνη, 12: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος, 13: μεγάλη υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος. Τα μη αριθμημένα γονίδια κωδικεύουν για υποθετικές πρωτεΐνες.

Οι διοξυγονάσεις του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ανήκουν στις διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα. Τα γονίδια που πιθανόν κωδικεύουν για τις α και β υπομονάδες της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του στελέχους Sphe3 και ονομάστηκαν *pca34a* και *pca34b* (Σχήμα 3.4).

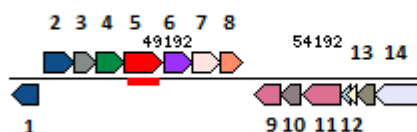
Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3: CP002379



Σχήμα 3.4 Περιοχή στο χρωμόσωμα του Sphe3 που εντοπίζονται τα *pca34a* (7) και *pca34b* (6). 1: λιγάση, 2: πρωτεΐνη μεταφοράς, 3: μεταγραφικός ρυθμιστής της οικογένειας IclR, 4: αφυδρογονάση, 5: διοξυγονάση του 4-υδροξυφαινυλπροσταφυλικού, 6: β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού, 7: α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού, 8: κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού, 9: ενολ-λακτονάση του 3-οξοαδιπικού, 10: αποκαρβοξυλάση της 4-καρβοξυμουκονολακτόνης, 11: ακετυλοτρανσφεράση του ακετυλο-CoA, 12: α υπομονάδα της CoA-τρανσφεράσης του 3-οξοαδιπικού, 13: τρανσφεράση, 14: μεταγραφικός ρυθμιστής της οικογένειας IclR, 15: μη χαρακτηρισμένη συντηρημένη πρωτεΐνη.

Τα γονίδια που συμμετέχουν στις αντιδράσεις *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος συνιστούν συστάδα μεγέθους ~7.5kb η οποία εντοπίζεται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο, pASPHE302. Μεταξύ αυτών των γονιδίων ανήκει και το υπό μελέτη, στην παρούσα εργασία, γονίδιο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, *pca45ab*. Ανοδικά του οπερονίου εντοπίζεται γονιδιακή περιοχή που κωδικεύει για τον πιθανό μεταγραφικό ρυθμιστή του και ονομάστηκε *pca45reg* (Σχήμα 3.5).

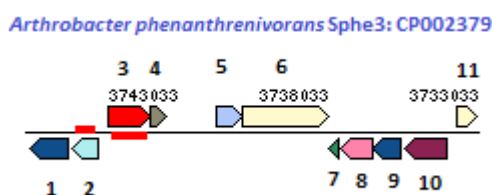
Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 plasmid pASPHE302: CP002381



Σχήμα 3.5 Περιοχή στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο του Sphe3 που εντοπίζονται τα *pca45reg* (1) και *pca45ab* (5). 1: μεταγραφικός παράγοντας, 2: υδρατάση, 3: αλδολάση του 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικού, 4: υδρολάση, 5: β υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού, α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης

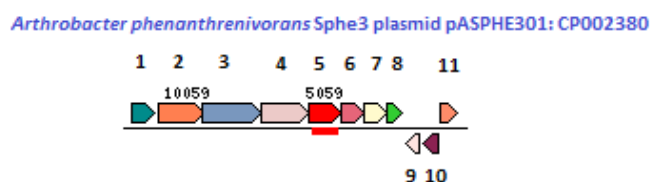
του πρωτοκατεχοϊκού, 6: αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυ-μουκονικής ημιαλδεΐδης, 7: πιθανή οξειδοαναγωγή, 8: πρωτεΐνη μεταφορέας τύπου ABC, 9: μεταγραφικός ρυθμιστής της οικογένειας IclR, 10: αποκαρβοξυλάση του διϋδροξυφθαλικού, 11: 3,4-διοξυγονάση του φθαλικού, 12: φερρεδοξίνη, 13: β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού, 14: α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού.

Η 1,2-διοξυγονάση του βενζοϊκού και η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης ανήκουν στις διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα. Το γονίδιο που κωδικεύει για την α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα και ονομάστηκε *benz12cra*, στην παρούσα μελέτη. Το γονίδιο που κωδικεύει για την 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης εντοπίζεται επίσης στο χρωμόσωμα και ονομάστηκε *cat12cr* (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6 Περιοχή στο χρωμόσωμα του Sphe3 που εντοπίζονται τα *benz12cra* (3) και *cat12cr* (2). 1: μεταφορέας του βενζοϊκού, 2: 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, 3: α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού, 4: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλπροπιονικού, 5: 1,2-διϋδροξυκυκλοεξα-3,5-διεν-1-καρβοξυλική αφυδρογονάση, 6: μεταγραφικός ρυθμιστής της οικογένειας luxR, 7: μουκολακτονική δ-ισομεράση, 8: επιμεράση, 9: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας LysR, 10: περμεάση, 11: ισομεράση του μαλεΐλπυροσταφυλικού.

Η 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού ανήκει στην κατηγορία διοξυγονάσεων σχάσης αρωματικού πυρήνα. Το γονίδιο που κωδικεύει για την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού εντοπίζεται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο, pASPHE301, και ονομάστηκε *gent12lp* (Σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.7 Περιοχή στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο του Sphe3 που εντοπίζεται το *gent12lp* (5). 1: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας PaaX, 2: οξειδοαναγωγή, 3: ακυλ-CoA συνθετάση, 4: διϋδροξυβενζοϊκή-AMP λυγάση, 5: 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού, 6: 2-κετο-4-πεντενοϊκή υδρατάση, 7: ισομεράση του μαλεΐλπυροσταφυλικού, 8: αδενυλική κινάση, 9: πιθανή μεμβρανική πρωτεΐνη, 10: μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας MarR.

3.2 Φυλογενετική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των διοξυγονασών, καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα σε επίπεδο πρωτεϊνών. Οι αμινοξικές αλληλουχίες επιλέχθηκαν από πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) με κριτήριο η ομοιότητα των αμινοξικών αλληλουχιών να είναι μεγαλύτερη του 75% και ομοπαράτέθηκαν στο πρόγραμμα Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τη χρήση του προγράμματος MEGA6.

Η φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των διοξυγονασών και του μεταγραφικού παράγοντα δείχνει τη συγγενεία τους με αντίστοιχα ένζυμα άλλων στελεχών, εντοπίζοντας την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών. Στη συνέχεια απεικονίζεται σε σχήματα η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών όπως πραγματοποιήθηκε στο Clustal Omega (Σχήμα ClustalO 1-Σχήμα ClustalO 9) και ακολουθεί η απεικόνιση των φυλογενετικών δέντρων όπως αυτά κατασκευάστηκαν στο MEGA6 (Σχήμα 3.8-Σχήμα 3.17).

Πίνακας 3.2 Επεξήγηση χρωμάτων στην ομοπαράθεση πρωτεϊνών στο Clustal Omega. Στο Clustal Omega η απεικόνιση αμινοξέων στην ομοπαράθεση πρωτεϊνών μπορεί να αποδοθεί χρωματικά.

Αμινοξέα	Χρώμα	Ιδιότητα
AVFPMILW	κόκκινο	μικρά + υδρόφοβα + αρωματικά-Υ
DE	μπλε	όξινα
RK	μωβ	βασικά-H
STYHCNGQ	πράσινο	υδροξύλιο + σουλφιδρύλιο + αμίνη + G
Άλλα	γκρι	μη γνωστά αμινοξέα

```
SFF24533.1 -----MPIDEALLERMLLRESVSEFLYREADLLDER--- 31
WP_077488177.1 -----MPTPDYSQGPDRWALLQEVSEFLFAEADLLDER--- 33
WP_013603163.1 -----MSTPDYSKGGDRWALLQEVSEFLFIEADLLDER--- 33
WP_011689767.1 -----MSTPDYSKGGDRWALLQEVSEFLFIEADLLDER--- 33
650468819 ADX75329 MTTNICSSSETCPTSETCPTPASQTEDPRRARDLVDESQGISREVFVN-QEIFDLEMQN 59
650468584 ADX75094 -----MSVTEEHQSQLSDKLRHNLKGLHVDVQAKWTVPTAFLNDPEVHDERER 49
: : * .
```

```
SFF24533.1 RYTEWLDMLAEDYQYSVPLRMNVAFGETDAREETR-----AGREICWFDE 76
WP_077488177.1 RYDEWLDLLADDYQYSVPLRMNVEYADADTRGETK-----AGSEVCWFDE 78
WP_013603163.1 RYNEWLDLLADDYQYSVPLRMNVEYAEADTRGETK-----SGSEVCWFDE 78
WP_011689767.1 RYNEWLDLLADDYQYSVPLRMNVEYAEADTRGETK-----AGSEVCWFDE 78
650468819 ADX75329 LFPRAWLFGVHASQIPNPGDYFSSWMGSDPVLVLLTRDVGDIYVLLNSCRHRGMVCRYDE 119
650468584 ADX75094 VFGRSWVYLAHESEIAKPGDYVVRVIAEDQFIVTRGEDGNVRAHLNSCRHRGMQICRAEM 109
: . :.. : * : * * : * . : *
```

```
SFF24533.1 GKETMSLR----- 84
WP_077488177.1 PKSTVELR----- 86
WP_013603163.1 PKSTVELR----- 86
WP_011689767.1 PKSTVELR----- 86
650468819 ADX75329 GNTMQFTCPYHAWSYSMDGSLVNVPGDLFGVPHMKAAYSGLDKQNWGLVRCPKVYNYKG 179
650468584 ADX75094 GNASHFRCPYHGWTYNNGGKLV-----GVPAKKEGYDNKLEKADWNLRSIPQLDITYKG 162
:
```

SFF24533.1	-----VDQLNTGLHWAEPP-----	98
WP_077488177.1	-----VMQLATGVHWAEPP-----	100
WP_013603163.1	-----VMQLATGVHWAEPP-----	100
WP_011689767.1	-----VMQLATGVHWAEPP-----	100
<u>650468819 ADX75329</u>	LVFANWDENAEDFLDYAGDFHWLNDLADAFDGTGPDTEVFGVLLKWRIKSNWKFVSENF	239
<u>650468584 ADX75094</u>	MIFGCLDPAHESLSDYLGDFFKFLDIVMDRSD---AGMEVVGAPQRWIVDANWKLGSDNF	219
	. : * .	
SFF24533.1	VSRISHLVTNI-----	109
WP_077488177.1	VSRVSHLVTNV-----	111
WP_013603163.1	VSRVSHLVTNV-----	111
WP_011689767.1	VSRVSHLVTNV-----	111
<u>650468819 ADX75329</u>	LGDYHGASTHASVEAIGIGPGRGKRRHGER-----QD	273
<u>650468584 ADX75094</u>	VGDAYHTMMTHRSMVELGMAPPDPMFALYGEHVHTEHGHGIGIIGPPPGIPLPEFMGMPD	279
	: . * .	
SFF24533.1	-----RLDAVELPEV-----AVSCRFLVYRNRVADETDFLV	140
WP_077488177.1	-----RIEEVAWPEV-----KLSRFLVYRNRVADETDFV	142
WP_013603163.1	-----RIEEVTWPEV-----KLSRFLVYRNRVADETDFV	142
WP_011689767.1	-----RIEEVTWPEV-----KLSRFLVYRNRVADETDFV	142
<u>650468819 ADX75329</u>	EGGHSTGRMKTSFRNGHGASDNLAYEIAYPQFVEPEMNEYFDQAWATRKEERLDAEGRLLG	333
<u>650468584 ADX75094</u>	NIIDEMKARLKPEQVEIFRPNNFIHGNVFPNLSI-----GNFMISKDHVSAPIAFLT	331
	* : . : : : : :	
SFF24533.1	GRRKDRLRQVGDSSHVVRELLDQSVLLA--KNLSIFV-----	177
WP_077488177.1	GRRQDTLRKTDDGWKVVRRYLLLDQTVLLA--KNLSVFL-----	179
WP_013603163.1	GRRKDTLRKTDDGWKVANRYLLLDQTVLLA--KNLSVFL-----	179
WP_011689767.1	GRRKDTLRKTDDGWKVANRYLLLDQTVLLA--KNLSVFL-----	179
<u>650468819 ADX75329</u>	GRGPATMFPNMSFAAGFPRISILVAHPISPTETEVWRWFLSDDKKAPEHVREWLRQYYMRYG	393
<u>650468584 ADX75094</u>	LR-----LWHPLPGKMEVYSFFLVEKDAPDWFKEEGYKTYLHTF	371
	* : : : : * :	
SFF24533.1	-----	177
WP_077488177.1	-----	179
WP_013603163.1	-----	179
WP_011689767.1	-----	179
<u>650468819 ADX75329</u>	GPAGMTEQDDMENWDYATQASKGVVAQRYPYNYQQGLGT-EQLSELDRAVHSNHAIISGEV	452
<u>650468584 ADX75094</u>	GISGAFEQDDAENWRSITRVLAGQFARKGDLNMQMGRGALTPDPDWPGPVAYPMDYAEA	431

Σχήμα ClustalO 1 Στοιχισμός των αλληλουχιών των α υπομονάδων των διοξυγονασών του φαινυλοπροπιονικού οξέος του στελέχους Sph3 (ADX75094-α υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο, ADX75329-α υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο) με αλληλουχίες διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα των εξής στελεχών: *Blastococcus* sp. DSM 46838 (μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης του 3-φαινυλοπροπιονικού οξέος SFF24533.1), *Sinomonas mesophila* (διοξυγονάση του 3-φαινυλοπροπιονικού οξέος WP_077488177.1), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (διοξυγονάση του 3-φαινυλοπροπιονικού οξέος WP_013603163.1) και *Arthrobacter* sp. FB24 (διοξυγονάση του 3-φαινυλοπροπιονικού οξέος WP_011689767.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

650468818 -----MSTPDYSKQDRWALLQEVSEFLFIEADLLDERRYNEWLDDLADDYQYSVPLRMN 55
650468585 MTIEAQTPTQTVVD----TAVREITEWLF AE AALLDAGKYREWLDLMAQDLHYVPLRV 56
WP_013602972.1 MTIEAQTPTQTVVD----TAVREITEWLF AE AALLDAGKYREWLDLMAQDLHYVPLRV 56
WP_017981166.1 -----MTTATEITD----ATVREITEWLF AE AALLDAGKYREWLDVVAEDLSYVPLRV 51
SFB53586.1 -----MTTATEITD----IKVREATEWLF AE AALLDAGKYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
WP_020501049.1 -----MTTATEITD----TTVREATEWLF AE AALLDAGKYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
pdb|2B1X|B -----MNTQTRVSD----TTVREITEWLYMEAGLLDAGKYREWLALVTEDLSYVPIRV 51
WP_007298128.1 -----MSTQTQISA----TTVREITEWLYMEAGLLDAGKYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
WP_005569760.1 -----MNTQTQISA----TTVREITDWLYMEAGLLDAGRYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
WP_017681825.1 -----MSTQTQISA----TTVREITDWLYMEAGLLDAGRYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
AAR05107.1 -----MSTQTQISA----TTVREITDWLYMEAGLLDAGRYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
ADM94828.1 -----MSTQTQISA----TTVREITDWLYMEAGLLDAGRYREWLDLVAEDLSYVPLRV 51
. : * : : * : * * * : * . * * * : : : * * * * : .

650468818 VEYAEADTRGETKSGSEVCWFDEPKSTVELRVMQLATGVHWAEEPVSRSVSHLVTVRIEE 115
650468585 RERE-----ETDIIEGMTLMDDWDAMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVVG 111
WP_013602972.1 RERE-----ETDIIEGMTLMDDWDAMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVVG 111
WP_017981166.1 RERE-----DTDIVEGMTLMDDWDSEMVRVLRLETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVAA 106
SFB53586.1 RERE-----ETDIVEGMTLMDDWDSEMVRVLRLETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVAA 106
WP_020501049.1 RERE-----ETDIVEGLTLMDDWDSEMVRVLRLETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVAA 106
pdb|2B1X|B RERE-----VTDVVEGTMHDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVRVAT 106
WP_007298128.1 RERE-----VTDVVEGMAHMDDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVQVAP 106
WP_005569760.1 RERE-----VTDVVEGTMHDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVQVAP 106
WP_017681825.1 RERE-----VTDVVEGMTLMDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVQVAP 106
AAR05107.1 RERE-----VTDVVEGTMHDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVQVAP 106
ADM94828.1 RERE-----VTDVVEGTMHDDADSMEMRVLRL ETEYAWAEDPPSRSRHFVTNVQVAP 106
* . : * : : * : : : * : * * * : * * * * * : : : * : * * * : : :

650468818 VTW-PEVKLSSRFLVYRNR-VADETDFFVGRRKDTRLKTDGKWKVANRYLLLDQTVLLAK 173
650468585 GDKDDEFKVTSNLLLYRTRGDVPTDYDILSGERHDVLRVDDGFHMVQRVVVLDQTTIMTH 171
WP_013602972.1 GDKDDEFKVTSNLLLYRTRGDVPTDYDILSGERHDVLRVDDGFHMVQRVVVLDQTTIMTH 171
WP_017981166.1 GEADEVAVKSNLLLYRTRGDVATFDILSGERHDVLRVAGGYRLARRVVVLDQTTIMTH 166
SFB53586.1 GEADEVAVKSNLLLYRTRGDVATFDILSGERHDVLRVAGGYRLVKKRVVLDQTTVMTH 166
WP_020501049.1 GEADEVAVKSNLLLYRTRGDVATFDILSGERHDVLRVAGGYRLAKRVVLDQTTVMTH 166
pdb|2B1X|B GDSEDEFKVTSNLLLYRTRGDVATYDVLVSGERTDVLRRAGDSFLMAKRVVLDQTTIMTH 166
WP_007298128.1 GDSEDEFEVTSNLLLYRTRGDVATYDVLVSGERKDVLRAGDGFRLAKRVVLDQTTIMTH 166
WP_005569760.1 GDSEDEFEVTSNLLLYRTRGDVATYDVLVSGERKDVLRAGDGFRLAKRVVLDQTTIMTH 166
WP_017681825.1 GDSEDEFEVTSNLLLYRTRGDVATYDVLVSGERKDVLRAGDGFRLAKRVVLDQTTIMTH 166
AAR05107.1 GDSEDEFEVTSNLLLYRTRGDVATYDILVSGERKDVLRAGDGFRLAKRVVLDQTTIMTH 166
ADM94828.1 GDSEDEFEVTSNLLLYRTRGDVATYDILVSGERKDVLRAGDGFRLAKRVVLDQTTIMTH 166
* . : * : : * : * . * : : * * * * * : . . . : . * : : * * * : : :

650468818 NLSVFL 179
650468585 NFALIM 177
WP_013602972.1 NFALIM 177
WP_017981166.1 NLALIM 172
SFB53586.1 NLALIM 172
WP_020501049.1 NLALIM 172
pdb|2B1X|B NLALIM 172
WP_007298128.1 NLALIM 172
WP_005569760.1 NLALIM 172
WP_017681825.1 NLALIM 172
AAR05107.1 NLALIM 172
ADM94828.1 NLA--- 169
* : :

Σχήμα ClustalO 2 Στοιχίση των αλληλουχιών των β υπομονάδων των διοξυγονασών του φαινυλοπροπιονικού οξέος του στελέχους Srho3 (650468585-β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο, 650468818- β υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο) με αλληλουχίες διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα των εξής στελεχών: *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_013602972.1), *Amycolatopsis methanolica* (WP_017981166.1), *Amycolatopsis marina* (SFB53586.1), *Pseudonocardiaceae* (WP_020501049.1), *Rhodococcus* Sp. (pdb|2B1X|B), *Rhodococcus imtechensis* (WP_007298128.1), *Rhodococcus wratislaviensis* (WP_005569760.1), *Rhodococcus* (WP_017681825.1), *Rhodococcus* sp. P400 (μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου AAR05107.1) και *Rhodococcus*_sp._B2-1 (μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου ADM94828.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες

WP_013601271.1	MDSVNIETPAATQAEALAVFDQQAAGQYLRGQWIAEEHLMRAIIGPRPAGIPYRWAWDDV	60
WP_013602983.1	MDSVNIETPAATQAEALAAFDQQAAGQYLRGQWIAEEHLMRAIIGPRPAGIPYRWAWDDV	60
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	MNSSNTGAPEAAQAATLEAFDRRAAEQYLRGQWIAEEHLMRAIIGPRPAGIPYRWEKSV	60
BAA23262.1	MNSSNTGAPEAAQAATLEAFDRRAAEQYLRGQWIAEEHLMRAIIGPRPAGIPYRWEKSV	60
	: * :* *:* * :* .*:*:** *****	
WP_013601271.1	EKALAEATIALGPVDTARRHLTFVNPGLLDGRGSATTHTISAGFQLVKPGEVCWSHRHTMG	120
WP_013602983.1	EKALAEATIALGPVDTARRHLTFVNPGLLDGRGSATTHTISAGFQLVKPGEVCWSHRHTMG	120
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	EVALDEATIALGPVDTARRHLTFVNPGLMDRGSATTHTISAGFQLVKPGEVCWSHRHTMS	120
BAA23262.1	EVALDEATIALGPVDTARRHLTFVNPGLMDRGSATTHTISAGFQLVKPGEVCWSHRHTMS	120
	* ** *****	
WP_013601271.1	AVRFITKGDPEAFTTVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHDHHPNSDIDVVWLDGLDIGLLFA	180
WP_013602983.1	AVRFITKGDPEAFTTVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHDHHPNSDIDVVWLDGLDIGLLFA	180
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	AVRFVTKGHPDAFTAVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHDHHPNSDIDVVWLDGLDIGLLQS	180
BAA23262.1	AVRFVTKGHPDAFTAVDGERLPMEDFDLLITPRFSWHDHHPNSDIDVVWLDGLDIGLLQS	180
	:.*:***:***** .*:*****:	
WP_013601271.1	LGAVYYPYGGDSSQNVPRSSSEGIIGTRSHWLRPTWERGSRPVRYPWSEVKARLDLYD	240
WP_013602983.1	LGAVYYPYGGDSSQNVPRSSSEGIIGTRSHWLRPTWERGSRPVRYPWSEVKARLDLYD	240
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	LGAVFYEPYGGDSSQNVPRSSSEGIIGTRSHWLRPTWERGSRPVRYPWSEVKARLDVYD	240
BAA23262.1	LGAVFYEPYGGDSSQNVPRSSSEGIIGTRSHWLRPTWERGSRPVRYPWSEVKARLDVYD	240
	*. * :***** .***. * :***: **	
WP_013601271.1	LSAGNEFDGLALRYANPVTGGPTMPTMDCWVQRLAPGFDGRTHRSSSAITYVISGSGTM	300
WP_013602983.1	LDAGNPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAPGFDGKAHRSSSAITYVISGSGSF	300
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	LDAGTPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAPGFDGKSHRRSSSAITYVISGSGTM	300
BAA23262.1	LDAGTPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAPGFDGKSHRRSSSAITYVISGSGTM	300
	*. * . :***** *****:*****:*****:*	
WP_013601271.1	QTDTEITIFSGADVITLPNWTNFRWTNDSATEPVQLFSMHDIPALQAFGLLYEEPESILN	360
WP_013602983.1	VTDEETISFVPGDVIALPNWTNFRWVNASPTESVQLFSMHDIPALQAFGLLYEEPESILN	360
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	VTEDEITIFNRGDVISLPNWTNFRWTNDSIEIEPVLLFSMHDIPALQAFGLLYEPEAILN	360
BAA23262.1	VTEDEITIFNRGDVISLPNWTNFRWTNDSIEIEPVLLFSMHDIPALQAFGLYEEPEAILN	360
	*:***:* ***** * * * *****:*****:***	
WP_013601271.1	ATPAPANPSPLKPIYRPGAFYDQDEL 387	
WP_013602983.1	ATPAPVNPPLKPIYRAGAFYDQDEL 387	
sp O24721.2 PHDI_NOCSK	ATPAPINPTPLNPIYRPGAFYDQDEL 387	
BAA23262.1	ATPAPINPTPLNPIYRAGAFYDQDEL 387	
	***** **:* * :***** *****	

Σχήμα ClustalO 3 Στοιχισμός της αλληλουχίας της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους Sph3 (WP_013601271.1) με ομόλογες αλληλουχίες στα εξής στελέχη: *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου WP_013602983.1), *Nocardioides* sp. KP7 (διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος O24721.2), *Nocardioides* sp. (διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος BAA23262.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

WP_066272508.1	MSNQT	KLVP	TPGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	IPDA	ILE	60					
WP_043450785.1	----	TKLV	PTGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	PPGV	PGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	IPDA	ILE	56					
WP_056080427.1	MSNST	KLVP	TPGQ	TVGPF	YGYAL	PYEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGQ	IPDA	ILE	60					
<u>650468463</u>	MSNPT	KLIP	TPGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	IPDA	ILE	60					
WP_013602853.1	MSNPT	KLIP	TPGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	IPDA	ILE	60					
SDS50222.1	MSNST	KLVP	TPGQ	TVGPF	YGYAL	PYEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGQ	IPDA	ILE	60					
WP_056335803.1	----	TKLV	PTGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	IPDA	ILE	56					
WP_018762900.1	----	TKLV	PTGQ	TVGPF	YGYAL	PFEK	DNELL	LAPG	SPGS	IRLQ	GT	VYD	GAGH	VPDA	ILE	56					
	***	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****						
WP_066272508.1	IWQP	DAEG	NILK	KTGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NSGV	FT	FTT	VNPG	PTK	QVPG	KPAA	PF	120			
WP_043450785.1	IWQP	DAEG	NVQR	TGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NTGV	YFT	FTT	VNPG	PTK	-----	PGA	APF	111			
WP_056080427.1	IWQP	DSEGN	VQR	TGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NSGV	YFT	FTT	VNPG	PTK	SVPG	KAAA	APF	120			
<u>650468463</u>	IWQP	DAEG	KVVQ	KTGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NTGV	YFT	FTT	VNPG	PTR	-----	PGA	APF	115			
WP_013602853.1	IWQP	DAEG	KVVQ	KTGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NTGV	YFT	FTT	VNPG	PTR	-----	PGA	APF	115			
SDS50222.1	IWQP	DSEGN	VQR	TGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NSGV	YFT	FTT	VNPG	PTK	-----	PGS	APF	115			
WP_056335803.1	IWQP	DAEG	NI	VQR	TGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NSGV	YFT	FTT	VNPG	PTK	-----	PGA	APF	111		
WP_018762900.1	IWQP	DAKGN	VQR	TGS	LVRD	GYT	FTG	WGRG	AVG	NSGV	YFT	FTT	VNPG	PTK	-----	PGA	APF	111			
	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****		
WP_066272508.1	ISVA	IFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDTE	ALAN	DPLL	RS	LD	PERR	KT	LIARR	DADG	GLT	WDV	RL	180		
WP_043450785.1	ISVA	IFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDTG	ALAN	DPLL	SS	LD	PERR	KT	LIARR	DADG	GLT	FD	IRL	171		
WP_056080427.1	ISVA	VFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	ENE	EAL	ASD	PLL	SS	LD	PERR	KT	LIARR	DP	DG	GLT	WD	IRL	180
<u>650468463</u>	ISVA	IFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDT	ALAN	DPLL	SS	LD	PERR	RT	LIARR	DP	DG	GLT	WD	VR	175	
WP_013602853.1	ISVA	IFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDT	ALAN	DPLL	SS	LD	PERR	RT	LIARR	DP	DG	GLT	WD	VR	175	
SDS50222.1	ISVA	IFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDTE	ALAN	DPLL	SS	LD	PERR	ST	LIARR	DP	DG	GLT	WD	IR	175	
WP_056335803.1	ISVA	LFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDTE	ALAN	DPLL	SS	LD	PERR	RT	LI	GRR	DP	DG	GLT	WD	IR	171
WP_018762900.1	ISVA	LFAR	GLTN	RLF	TR	IYLP	EDA	EAL	AKD	PLL	SS	LD	PERR	KT	LIARR	DP	DG	GLT	WD	IR	171
	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****	:	*****
WP_066272508.1	QGE	ETV	FL	DF	Q															192	
WP_043450785.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																183
WP_056080427.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																192
<u>650468463</u>	QGE	ETV	FL	DF	Q																187
WP_013602853.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																187
SDS50222.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																187
WP_056335803.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																183
WP_018762900.1	QGE	ETV	FL	DF	Q																183

Σχήμα ClustalO 4 Στοιχισή της αλληλουχίας της α υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους Sph3 (650468463-ADX74973) με ομόλογες αλληλουχίες στα εξής στελέχη: *Arthrobacter* sp. OY3WO11 (WP_066272508.1), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_043450785.1), *Arthrobacter* sp. Leaf137 (WP_056080427.1), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_013602853.1), *Pseudarthrobacter equi* (SDS50222.1), *Arthrobacter* sp. Soil764 (WP_056335803.1) και *Arthrobacter* sp. 135MFC05.1 (WP_018762900.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

650468464
 WP_013602854.1
 WP_066272510.1
 WP_043450908.1
 WP_050057194.1
 WP_045732642.1
 WP_015939000.1
 WP_056080425.1

MPEETNAQLETTDESVPPEAPKAAHLPDRAIETQADLSAEISALGEAYARALKDGAPEET
 MPEETNAQLETTDESVPPEAPKAAHLPDRAIETQADLSAEISALGEAYARALKDGAPEET
 MPEETNAQLDDESVPPEAPKAAHMPDRAIETQADLSAEINALGEAYARALKEGSSAET
 MPEDITAELESEELVPPAEPKAAHQPLDKAIESQADLSAEISAIGEAYQRALKDGAQPET
 MPEDINAELESEELVPPAEPKAAHLPDRAIETQADLSAEINAI GDAYVVRALKDGAPEEI
 MPEETNAQLESDSVPPEAPKAAHLPDKAIETQADLSAEISSIGEAYRRALKDGAQPET
 MPEETNAQPESDESVPPEAPKAAHLPDKAIETQADLSAEINSSIGEAYRRALKDGAQPET
 MPEETNAQPESDESVPPEAPKAAHLPDKAIETQADLSAEINSLGEAYRRALKDGAQPET
 : .*: :::* ** ***.***:*****.:*:* ***:**:

650468464
 WP_013602854.1
 WP_066272510.1
 WP_043450908.1
 WP_050057194.1
 WP_045732642.1
 WP_015939000.1
 WP_056080425.1

QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLQHADPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLQHADPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHDADPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHDADPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHTDPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHTDPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHTDPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 QPRLDYPPYRSSILRHPTKSLHHTDPETIEELYSFAFGHQDVHALESDLTIQHNGEPQGER
 *****:***** ***

650468464
 WP_013602854.1
 WP_066272510.1
 WP_043450908.1
 WP_050057194.1
 WP_045732642.1
 WP_015939000.1
 WP_056080425.1

IIVTGKVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVTGKVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANSSGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVSGKVLVDGDRPVAGQLVEIWQANSSGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 IIVAGRVLVDGDRPVAGQLVEIWQANASGRYIHKRDQHPAPIDPNFTGIGRCITGPDGSY
 *****:***** ***

650468464
 WP_013602854.1
 WP_066272510.1
 WP_043450908.1
 WP_050057194.1
 WP_045732642.1
 WP_015939000.1
 WP_056080425.1

RFITIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFITIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 RFTTIKPGAYPWKNHNLNWRPAIHHSFLFGTEFTQRIITQMYFPGDQLFPLDPIYQTIVD
 ** *****

650468464
 WP_013602854.1
 WP_066272510.1
 WP_043450908.1
 WP_050057194.1
 WP_045732642.1
 WP_015939000.1
 WP_056080425.1

QDARDRLVATYDHSITEPEWALGYNWDIILTGPKRTWTENEALGAAGDEE 290
 QDARDRLVATYDHSITEPEWALGYNWDIILTGPKRTWTENEALGAAGDEE 290
 QDARDRLVATYDHSITEPEWALGYNWDIILTGPKRTWTENEALGAAGDEE 290
 QDARDRLVATYDHSITEPEWALGYNWDIVLTGPKRTWTENEALGAAGDEE 290
 QDARDRLVANYDHSITEPEWALGYNWDIVLTGPKRTWTENEAFGTAGD-- 288
 QDARDRLVASYDHSITEPEWALGYNWDIVLTGAKRTWTENEALGAAGDDD 290
 QDARDRLVASYDHSITEPEWALGYNWDIVLTGAKRTWTENEALGAAGDDD 290
 QDARDRLVASYDHSITEPEWALGYNWDIVLTGAKRTWTENEALGADGDDD 290
 *****:***** ***

Σχήμα ClustalO 5 Στοιχισή της αλληλουχίας της β υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους Sphe3 (650468464-ADX74974) με ομόλογες αλληλουχίες στα εξής στελέχη: *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_013602854.1), *Arthrobacter* sp. OY3WO11 (WP_066272510.1), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_043450908.1), *Pseudarthrobacter siccitolerans* (WP_050057194.1), *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* (WP_045732642.1), *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* (WP_015939000.1) και *Arthrobacter* sp. Leaf137 (WP_056080425.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

OJV99932.1 MALDKPKYKNVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADREAYLDEWQLTPKA 60
 WP_076679503.1 MALDKPKYKNVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADREAYLDEWPLTPVQ 60
 WP_036311101.1 MTLDKPKYKNVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADREAYLDEWPLTPAQ 60
 WP_060916125.1 MTLDKPKYKNVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADREAYLDEWPLTPAQ 60
 WP_076708825.1 MTLDKPKYKNVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADREAYLDEWPLTPAQ 60
 WP_045257717.1 MALDKPKYKDVPGTTIYDAEQARKGYHNLQFMSLMKPENRGRFLADQEAAYLDEWPLNAVQ 60
 WP_015062507.1 MTLDKPKYKDVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADRGAAYLDEWPLNPVQ 60
 650468793 MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADRGAAYLDEWPLNPVQ 60
 WP_013603154.1 MTLDKPYNDVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADRGAAYLDEWPLNPVQ 60
 WP_011689793.1 MTLDKPYKDVPGTTIFDADQARKGYHNLQFMSLMKPENRERYLADRGAAYLDEWPLNPVQ 60

*:*****:**** *:***: *****:***: .**:*:***** *:***: ***** *

OJV99932.1 RQAVLDLIDLNTCIAEGGNIYFLAKLGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_076679503.1 RQAVLDFDLNTCIAEGGNIYFLSKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMVSGGRRPE 120
 WP_036311101.1 RQGVLDLIDLNTCIAEGGNIYFLSKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_076708825.1 RQGVLDLIDLNTCIAEGGNIYFLSKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_045257717.1 RQAVLDMDLNTMIAEGGNIYFLSKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_015062507.1 RQAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 650468793 RQAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_013603154.1 RQAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120
 WP_011689793.1 RQAVLDIDLNTCIAEGGNIYFLAKIGATHGLSFQQMAGSMTGMSEAAAYRDMMI GGGRRPE 120

** .:***:***: : *****:*.****.*****:*****:*****:*****

OJV99932.1 GNRMKDLDGWTPPQPEGEKAETMRPDAPAKLTSALYTSHPVAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 180
 WP_076679503.1 GNRKDLDLGWTPPS-TEKSQVMRPDAPARFTSALFTSHVPAIGAAMDHGKTQEPYWKVVF 179
 WP_036311101.1 GNRKDLDLGWAPPA-TEKSEVVRPDAPAKFTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 179
 WP_076708825.1 GNRKDLDLGWAPPA-TEKSEVMRRDAPAKFTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 179
 WP_045257717.1 GNRKDLDLGWTPPS-TEKATTFRPDAPATYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 179
 WP_015062507.1 GNRKDLDLGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 180
 650468793 GNRKDLDLGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 180
 WP_013603154.1 GNRKDLDLGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 180
 WP_011689793.1 GNRKDLDLGWTPPEPGEKAETVRQDAPAQYTSALFTSHVPAIGAAMD LGKTEEPYWKVVF 180
 * *:*****.*** ** : .: * :*** ***:***** *****:*****

OJV99932.1 DGYWTRKWAKENTPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDV 240
 WP_076679503.1 DGYEWTRAWAKENTPDVIIVYNDHATAFDNSIIPTFVLGTGDHYPVADEGYGPRPVPDV 239
 WP_036311101.1 DGYEWTRRWAKENTPDVVILVYNDHATAFDNSIIPTFVLGTGAHYPVADEGYGPRPVPDV 239
 WP_076708825.1 DGYEWTRRWAKENTPDVVILVYNDHATAFDNSIIPTFVLGTGAHYPVADEGYGPRPVPDV 239
 WP_045257717.1 DGYEWTRKWAKENTPDVVILVYNDHATAFDASIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDV 239
 WP_015062507.1 SGYEWTRWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDI 240
 650468793 SGYEWTRWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDV 240
 WP_013603154.1 SGYEWTRWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDV 240
 WP_011689793.1 SGYEWTRWAKENLPDVVILVYNDHATAFDSSIIPTFVLGTGA EYPVADEGYGPRPVPDV 240

.** *** ***** ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

OJV99932.1 KGYPEFAAHLAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVYGQVEEWPVKVIPLAVNVVQ 300
 WP_076679503.1 KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVFGDVDEWPCRVIPVPLVNVVQ 299
 WP_036311101.1 KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVFGDVDEWPCRVIPVPLVNVVQ 299
 WP_076708825.1 KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVFGDVDEWPCRVIPVPLVNVVQ 299
 WP_045257717.1 KGYPEFAAHLAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVYGQVEEWPVKVIPLAVNVVQ 299
 WP_015062507.1 KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVYGQVEEWPVRVPLAVNVVQ 300
 650468793 KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEVVVDHGLTVPLSLVYGQVEEWPVRVPLAVNVVQ 300

WP_013603154.1	KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEMVVDHGLTVPLSLVYGDVEEWPVRVIPLAVNVVQ	300
WP_011689793.1	KGYPELAAHIAQSVIQDDFDLTLVNEMVVDHGLTVPLSLVYGDVEEWPVKVIPLAVNVVQ	300
	*****:***:***:*.*****:*****:*.***:*****	
OJV99932.1	YVPVSGRRCYELGKALRRRAIDKWDGPELNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINQEWDNAFLD	360
WP_076679503.1	YVPVSGRRCYELGKAIARRALDKWEGPELKVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	359
WP_036311101.1	YVPVSGRRCYELGRAIRRALDKWDGPKLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	359
WP_076708825.1	YVPVSGRRCYELGRAIRRALDKWDGPKLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	359
WP_045257717.1	YVPVSGRRCYELGKALRRRAIDKWDGEQLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINKEWDNAFLD	359
WP_015062507.1	YVPVSGRRCYELGRALRRALDKWDGEPLKVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	360
650468793	YVPVSGRRCYELGRALRRALDKWDGEPLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	360
WP_013603154.1	YVPVSGRRCYELGRALRRALDKWDGEPLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	360
WP_011689793.1	YVPVSGRRCYELGRALRRALDKWDGEPLNVQIWTGGMSHQLQGPAGLINEEWDNAFLD	360
	*****:***:***:*.*****:*****:*.***:*****	
OJV99932.1	MLISDPLGLTEWPHIDYVDEAGSEGIELVMWLIARGAMDDQFGGGAPEVNHRYHVPASN	420
WP_076679503.1	HLIADPLGLTEWSHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGGAPDVNHRFYHVPASN	419
WP_036311101.1	HLIADPLGLTEWPHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGGEAPEMNHRFYHVPASN	419
WP_076708825.1	HLIADPLGLTEWPHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGGEAPEMNHRFYHVPASN	419
WP_045257717.1	HLIADPLGLTEWPHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGQSPVVDHRYHVPASN	419
WP_015062507.1	HLIADPVGLTEWQHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGSEPEVNHRYHVPASN	420
650468793	HLIADPVGLTEWQHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGSEPEVNHRYHVPASN	420
WP_013603154.1	HLIADPVGLTEWQHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGSEPEVNHRYHVPASN	420
WP_011689793.1	HLIADPVGLTEWQHMEYVDEAGSEGIELVDWLIARGAMDDQFGGSEPEVNHRYHVPASN	420
	.*:*:*****:*.***:*****:*****:*****:*.***:*****	
OJV99932.1	TAVGHLVITN---	430
WP_076679503.1	TAVGHLVISN---	429
WP_036311101.1	TAVGHLVMTNPT-	431
WP_076708825.1	TAVGHLVMTNPT-	431
WP_045257717.1	TAVGHLVISN---	429
WP_015062507.1	TAVGHLVLTNPTD	433
650468793	TAVGHLVLTNQT	433
WP_013603154.1	TAVGHLVLTNQT	433
WP_011689793.1	TAVGHLVLTNPTD	433
	*****:.*	

Σχήμα ClustalO 6 Στοιχισμός της αλληλουχίας της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους Sphe3 (650468793-ADX75303) με ομόλογες αλληλουχίες στα εξής στελέχη: *Microbacterium* sp. 67-17 (OJV99932.1-α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Microbacterium* sp. RU33B (WP_076679503.1-α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Microbacterium oleivorans* (WP_036311101.1-3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Microbacterium oleivorans* (WP_060916125.1-3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Microbacterium oleivorans* (WP_076708825.1- α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (WP_045257717.1-3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Arthrobacter* sp. J3.49 (WP_015062507.1- α υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος), *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_013603154.1-3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος) και *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* (WP_013603154.1-3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

WP_026536876.1	-MTFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
WP_043480996.1	-MTFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
WP_028270760.1	-MTFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
650468789	-MMFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
WP_011689712.1	-MMFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
AAK16528.1	-MKFTDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
WP_015062008.1	-MLFPDLNQIRTFVTLYE LRSV TGAARRLHVHTQPTVSYSLKRLRERFGDELFRREGNDMV	59
WP_045257713.1	-MSFADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	59
GAT74967.1	MMAFADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	60
WP_067357948.1	-MAFADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	59
WP_056279387.1	-MTLADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	59
WP_033105730.1	-MALADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	59
WP_036280856.1	-MALADLNQLR TFVVL YE LRSV TAAADR LHVTQPTVSYTLRRLRERFGDELFRREGHDMV	59
	* : ****.****.*****.* ** **:*:*****:*:**** * ** ***:**	
WP_026536876.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_043480996.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_028270760.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
650468789	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_011689712.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
AAK16528.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_015062008.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_045257713.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
GAT74967.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	120
WP_067357948.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_056279387.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_033105730.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
WP_036280856.1	PTAKATQFLFGPLHNAQA IDATVMGSDVFEPTGFSGELVLGLTSGEQTFLPPIMTALGR	119
	***** **.***:**.* ** ** :*:**.*:*****:***** ** *	
WP_026536876.1	AGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
WP_043480996.1	VGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
WP_028270760.1	VGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
650468789	AGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
WP_011689712.1	AGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
AAK16528.1	VGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
WP_015062008.1	VGADPRIQVERLDSDEVE SGLIRGIDLALTVSRIATPRLWRTHVRSVEYVALSSGSHPL	179
WP_045257713.1	EASTPHLQVERLDSQVE EGLIRGRIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSAEHPL	179
GAT74967.1	EASRPHLQVERVDADQVE EGLIRGRIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSAEHPL	180
WP_067357948.1	EASRPHLQVERVDADQVE EGLIRGRIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSAEHPL	179
WP_056279387.1	AGASPHLQVARLDSQVE DGLIRGIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSGQHPL	179
WP_033105730.1	AASSPHLQVARLDSQVE DGLIRGIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSGQHPL	179
WP_036280856.1	AASSPHLQVARLDSQVE DGLIRGIDLAMTSMIGSPRLWRTHVRAVEYVALSSGRHPL	179
	. : * : ** * : * : * : ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
WP_026536876.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_043480996.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_028270760.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
650468789	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_011689712.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
AAK16528.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_015062008.1	PATGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_045257713.1	PPTGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
GAT74967.1	PETGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	240
WP_067357948.1	PETGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_056279387.1	PPTGPEMFDRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_033105730.1	PETGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
WP_036280856.1	RGGPDMEFGRFRVRSARGGHVYPVQALTEHDLMSQVVL TMEEYGTVPVAVLEATDLVVL	239
	..*. *:*****.*.*****:*.****.* ** ***:**.*:*****:****.* **	
WP_026536876.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQSTPVELYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD EY	299
WP_043480996.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQSTPVELYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD EY	299
WP_028270760.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQSTPVELYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD EY	299
650468789	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQSTPVELYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD EY	299
WP_011689712.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQSTPVELYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD EY	299

AAK16528.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWSGGQSTPVLEYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD	299
WP_015062008.1	LPRHVAGVFCGWFPRLRIAELPWPQGQSTPVLEYTRREASLSQAQRWFRSLVLDAVAAD	299
WP_045257713.1	LPRHVAEVFCGWFPGLRIADLPWPGDSTPVSLYTRRDASLSPVQRWFRSLVLEAVSSGE	299

WP_056279387.1	LPRHVAEVFCGWFPGLRIADLPWPGQSTPVSVYTRREANLSAAQKWFRSVVLDAVTAGE	299
WP_033105730.1	LPRHVAEVFCGWFPGLRIAELPWPQGQSTPVSLYTRREASLSPAQRWFRSVVLDAVAAGE	299
WP_036280856.1	LPRHVAEVFCGWFPGLQIAELPWPQGQSTPVSLYTRREASLSPAQRWFRSVVRDAVTTDE	299

***** **.**** *:*:*:** ..*:*:*:*:**:*:**.*:*:**:*:*:**.*:**.*:**

WP_026536876.1	KSKS--	303
WP_043480996.1	KA----	301
WP_028270760.1	RS----	301
650468789	KS----	301
WP_011689712.1	KS----	301
AAK16528.1	KS----	301
WP_015062008.1	KS----	301
WP_045257713.1	PVDPSD	305
GAT74967.1	RRG---	303
WP_067357948.1	RRG---	302
WP_056279387.1	RTARAD	305
WP_033105730.1	RTRQR-	304
WP_036280856.1	RRSS--	303

Σχήμα ClustalO 7 Στοιχισή της αλληλουχίας του μεταγραφικού παράγοντα του οπερονίου της 4,5διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους Sphe3 (650468789) με ομόλογες αλληλουχίες (μεταγραφικοί παράγοντες τύπου LysR) στα εξής στελέχη: *Arthrobacter* sp. 9MFCol3.1 (WP_026536876.1), *Arthrobacter* sp. SPG23 (WP_043480996.1), *Arthrobacter* sp. UNC362MFTsu5.1 (WP_028270760.1), *Micrococcaceae* (WP_011689712.1), *Arthrobacter keyseri* (AAK16528.1), *Arthrobacter* (WP_015062008.1), *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (WP_045257713.1), *Microbacterium* sp. HM58-2(GAT74967.1), *Microbacterium* sp. HM58-2 (WP_067357948.1), *Microbacterium* sp. Root280D1 (WP_056279387.1), *Microbacterium profundum* (WP_033105730.1) και *Microbacterium* sp. CH12i (WP_036280856.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

WP_043457853.1 -----MTEN-QLDIRQENEGTAAEAGSKATERFVTSKPLGAGVRKERVLLAGALIK 52
 WP_056345985.1 -----MTEN-QLDTRQENEGTAVEAGSKATERFAASGKPTGAGVPKERVLLAGALIK 52
 WP_058932639.1 -----MTEN-QLDTRQENEGTAVEAGSKATERFAASGKPTGTGVPKERVLLAGALIK 52
 WP_064847435.1 -----MTDNPSAAHLKESQGTAVEAGTKATERFAASGKSKLDVPKERVLLAGALIK 53
 WP_035964176.1 -----MTDNPSAAHLKESQGTAVEAGTKATERFAASGKMSKLDVPKERVLLAGALIK 53
 WP_058858774.1 --MTNPQTEAVSTDARRENEGTAVEAGSKATERFAASGKLARLDVPKERVLLAGAAIK 57
 WP_035928370.1 -----MTET-HAATRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLAKLDVPKERVLLAGAAIK 52
 EYT53459.1 ---MEHTMTET-HAATRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLAKLDVPKERVLLAGAAIK 56
 WP_058873999.1 -----MTET-GAATRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLAKLDVPKERVLLAGAAIK 52
 WP_066280601.1 -----MTET-QVDIRNENEGTAVEAGSKATERFTASGKLSLSEVPKERVLLAGALIK 52
 650468101 ---MDTAMTET-QDTRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLSQLDVPKERVLLAGALIK 56
 SDP82010.1 MRNMEITMTET-QAESRKENEGTAVEAGSKATERFTASGKLSRPDPKERVLLAGALIK 59
 WP_043481025.1 ---MDITMTET-QADTRKEDEGTAVEAGSKATERFTVSGKLSRLDVPKERVLLAGALIK 56

: .:***:****:*****..*.* * ***** **

WP_043457853.1 AANDIVVEHEVTYEEYNALKAWLIKVGNDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTKGTIE 112
 WP_056345985.1 AANDIVVEHEVTYEEYNALKAWLIKVGNDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTKGTIE 112
 WP_058932639.1 AANDIVVEHEVTYEEYNALKAWLIKVGNDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTKGTIE 112
 WP_064847435.1 AANDIVVEHEVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSKERPGTVGTIE 113
 WP_035964176.1 AANDIVVEHEVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSKERPGTVGTIE 113
 WP_058858774.1 AINDIAVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTIEDVNSAERPAGVGTIE 117
 WP_035928370.1 AINDIAVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTIEDVNSQERPAGVGTIE 112
 EYT53459.1 AINDIAVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTIEDVNSQERPAGVGTIE 116
 WP_058873999.1 AINDIAVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTIEDVNSQERPAGVGTIE 112
 WP_066280601.1 AANDIVIEHEVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQERPQTKGTIE 112
 650468101 AANDIVVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTKGTIE 116
 SDP82010.1 AANDIVVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTVGTIE 119
 WP_043481025.1 AANDIVVEHQVTYEEYNALKAWLIKVGTDGEWPLFLDVWLEHTVEDVNSQDRPGTVGTIE 116

* ** .*:*****:*****:*****:****:****

WP_043457853.1 GPYYVPASPVLES PATLEMRGDEEGVPLQFSGRFTD TDGNPLQGAQLEIWHADAAGFY SQ 172
 WP_056345985.1 GPYYVPSSPVLES PATLEMRDNEEGVPLQFSGRFTD TDGNPIEGAQLEIWHADAAGFY SQ 172
 WP_058932639.1 GPYYVPNSPVLDS PATVEMRDEEDGVPLQFSGQFTD TDGNPIQGAQLEIWHADSAGFY SQ 172
 WP_064847435.1 GPYYVPNAPELQTPATLEMRDEEGTPLLFGHDFD TDGNPIKDAQVEIWHADAAGFY SQ 173
 WP_035964176.1 GPYYVPNAPELQTPATLEMRDEEGTPLLFGHDFD TDGNPIKDAQVEIWHADAAGFY SQ 173
 WP_058858774.1 GPYYVPDS PVLPTPATLEMRDEEGTPLLFGHFTDTEGNPIKDAQVEIWHADAAGFY SQ 177
 WP_035928370.1 GPYYVPDS PVLPTPATLQMRDEPGTPLLFGGRFTD TDGNPLQGAQVEIWHADANGFY SQ 172
 EYT53459.1 GPYYVPDS PVLPTPATLQMRDEPGTPLLFGGRFTD TDGNPLQGAQVEIWHADANGFY SQ 176
 WP_058873999.1 GPYYVPDS PVLPTPATLEMRDEPGTPLLFGGRFTD TDGNPIQGAQVEIWHADANGFY SQ 172
 WP_066280601.1 GPYYVPGPSPELATPATVLMRDGEEGTPLRF TGRFTD TNGNALQNAQVEIWHADAAGFY SQ 172
 650468101 GPYYVPGPSPELATPATVEMRDEEGTPLRF TGRFTGTEGNPIQGAQVEIWHADAAGFY SQ 176
 SDP82010.1 GPYYVPGPSALQTPATVEMRDEEGTPLHFSGRFTD TDGNPIQNAQVEIWHADSAGFY SQ 179
 WP_043481025.1 GPYYVPGPSPLLQTPGTVEMRDEEGTPLHFSGRFTD TDGNPIRNAQVEIWHADSAGFY SQ 176

***** :* * :*.*: ** * * * * * .*:** :..*:*****: ****

WP_043457853.1 YAPGLPDWLF RGNVQADSNQGFMLHTRRPAPYQIPTDGACGQLIDAAGWHAWRPAHIHIK 232
 WP_056345985.1 YAPGLPEWLF RANVQADSNQGFVFLHTRMPAPYQIPTDGACGQLISAAGWHAWRPAHIHIK 232
 WP_058932639.1 YAPGLPDWLF RANVQADSEGHFVFLHTRMPAPYQIPTDGACGQLISAAGWHAWRPAHIHIK 232
 WP_064847435.1 YAPDMPEWLF RGTVKADENGHFEIHTMQPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 233
 WP_035964176.1 YAPDMPEWLF RGTVKADENGHFEIHTMQPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 233
 WP_058858774.1 YAPGLPEWLF RGTVKADENGYFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 237
 WP_035928370.1 YAPGLPEWLF RGTVKADENGYFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 232
 EYT53459.1 YAPGLPEWLF RGTVKADENGYFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 236
 WP_058873999.1 YAPGLPEWLF RGTVKADENGYFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLIAAAGWHAWRPAHIHIK 232
 WP_066280601.1 YAPGLPEWLF RGTVKADENGYFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLIEAAGWHAWRPAHIHIK 232
 650468101 YAPGLPEWLF RGTVKADQGRFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLINAAGWHAWRPAHIHIK 236
 SDP82010.1 YAPGLPDWLF RGTVKADDDGRFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLISAAGWHAWRPAHIHIK 239
 WP_043481025.1 YAPGLPEWLF RGTVKADDDGRFEINTMRPAPYQIPTDGACGQLISAAGWHAWRPAHIHIK 236

*** :*:****. *:***: * * : : * :*****:*****

WP_043457853.1 ASAPGYQSVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLNTTPTDGGAGEEATDYVLAKVGG 292
 WP_056345985.1 VSAPGFQSVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLHTTPTDGAAGEEASDYVLAKVGG 292
 WP_058932639.1 VSAPGYQPV TQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLNTTPTDGAAGEEASDYVLAKVGG 292
 WP_064847435.1 VSAPGYQLV TQQLYFPDPPHNEDDIASAVKPELMLDVQERADG-SGNEVQDYVLAKVGG 292
 WP_035964176.1 VSAPGYQLV TQQLYFPGDPHNEDDIASAVKPELMLDVQERADG-SGNEVQDYVLAKVGG 292
 WP_058858774.1 VSAPGYQLV TQQLYFPGDPHNEDDIASAVKPELMLDPAPRTDGRVGEVVYDYVLAKVGG 297
 WP_035928370.1 VSAPGHQLV TQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPKPRTDGGAGEEVYDYVLAKVGG 292

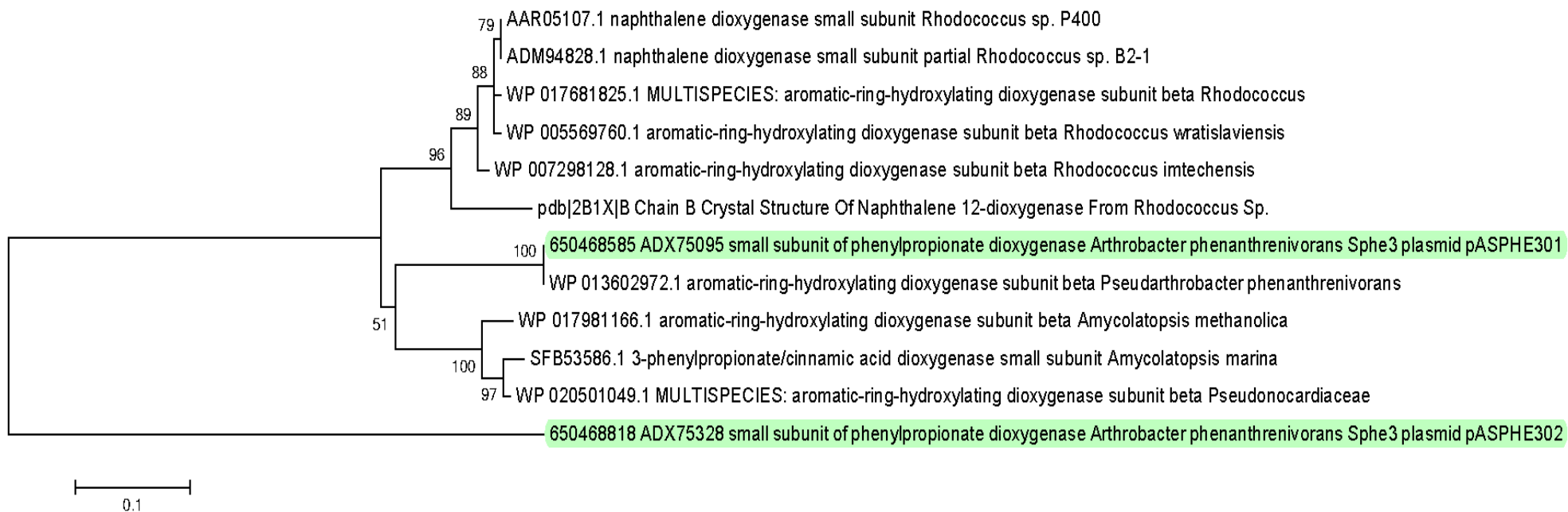
EYT53459.1	VSAPGHQLVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPKPRTDGGAGEEVVYDYVLAKEGQ	296
<u>650468101</u>	VSAPGYQPVVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPRPRTDGGAGEEVVYDYVLAKEGQ	296
SDP82010.1	VSAPGFQPVVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPKPRTDGQAGEEVVYNYVLAKEGQ	299
WP_043481025.1	VSAPGFQPVVTQQLYFPGDPHNADDIASAVKPELMLDPKPRTDGGAGEEVVYDYVLAKEGQ	296
	.****.* *****.**** *****. *:* *:. *:* ***** *:	
WP_043457853.1	HK	294
WP_056345985.1	SR	294
WP_058932639.1	SK	294
WP_064847435.1	SR	294
WP_035964176.1	SR	294
WP_058858774.1	VK	299
WP_035928370.1	TK	294
EYT53459.1	TK	298
WP_058873999.1	TK	294
WP_066280601.1	TK	294
<u>650468101</u>	IK	298
SDP82010.1	HK	301
WP_043481025.1	HK	298
	:	

Σχήμα ClustalO 8 Στοιχισή της αλληλουχίας της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του στελέχους Sph3 (650468101) με τις αλληλουχίες των 1,2-διοξυγονάσων της κατεχόλης των εξής στελεχών: *Arthrobacter* sp. 31Y (WP_043457853.1), *Arthrobacter* sp. Soil762 (WP_056345985.1), *Pseudarthrobacter sulfonivorans* (WP_058932639.1), *Kocuria* sp. ICS0012 (WP_064847435.1), *Kocuria marina* (WP_035964176.1), *Kocuria flava* (WP_058858774.1), *Kocuria* (WP_035928370.1), *Kocuria* sp. UCD-OTCP (EYT53459.1), *Kocuria polaris* (WP_058873999.1), *Arthrobacter* sp. OY3WO11 (WP_066280601.1), *Arthrobacter* sp. ok909 (SDP82010.1) και *Arthrobacter* sp. SPG23 (WP_043481025.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν θέσεις που έχουν ένα πλήρως συντηρημένο αμινοξύ. Η άνω κάτω τελεία (:) υποδεικνύει ομάδες με παρόμοιες ιδιότητες. Η κάτω τελεία (.) υποδεικνύει συντηρημένες ομάδες με διαφορετικές ιδιότητες.

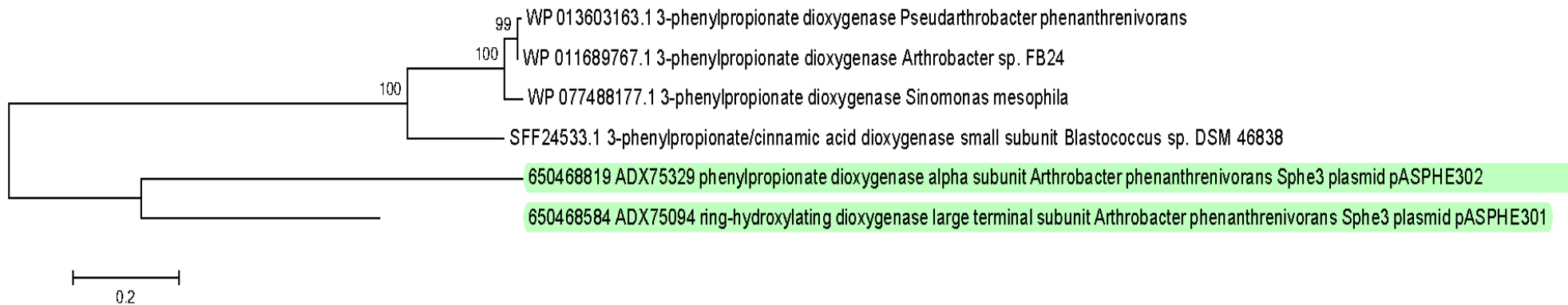
SD023406.1	-----MTHIDSTTEQSLEQLY	17
SDX34378.1	-----MSISAENTTHESVAASHALPEPTPEEAAQLEQLY	34
SEJ48146.1	-----MSISAENTTHESVAASHALPEPTPEEAAQLEQLY	34
SDW87333.1	-----MIENPTTHESVAAAHVVEPTAEAAAQLEQLY	31
SEI94190.1	-----MIENPTTHESVAAAHVVEPTAEAAAQLEQLY	31
GAB15705.1	MLGVTAAASLVSVVRPQVFALTEEAPVSAETTTHASVAAAHVAPEPTPEEAVQLEQLY	60
WP_043419772.1	-----MSISAETTTHASVAAAHVAPEPTPEEAVQLEQLY	34
<u>WP_013602951.1</u>	-----MTENITTHESVAASHTLPEPTAEAAAQLEQLY	31
SER04726.1	-----MSISAENVTHESVAASHALPEPTTEEAAAQLEQLY	34
WP_028269332.1	-----MSISAENTTHESVAASHALPEPTPEEAAQLEQLY	34
SDK91634.1	-----MSISAENTTHESVAAGHTAPEPTPEEAAQLEQLY	34
SDP49349.1	-----MIENTTHESVAAGHTAPEPTPEEAAQLEQLY	31
SFT91215.1	-----MSISAENTTHESVAAGHTAPEPTPEEAAQLEQLY	34
SDL25124.1	-----MSISAENTTHESVAAGHTAPEPTPEEAAQLEQLY	34
WP_018772865.1	-----MSISAENTTHESVAAGHTAPEPTPEEAAQLEQLY	34
	: * **::**	
SD023406.1	RDFDTEENLIPLWTEIADLMPMAPSPKAIHVWRWSTLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	77
SDX34378.1	KDFAAGNMVPLWTEIGDLMPMVPTPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
SEJ48146.1	KDFAAGNMVPLWTEIGDLMPMVPTPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
SDW87333.1	KDFAENLIPLWTEIGDLMPMVPTPKAVAHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	91
SEI94190.1	KDFAAGNMVPLWTEIGDLMPMVPTPKAVAHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	91
GAB15705.1	RDFESENLIPLWTEIGDLMPMVPSPKAVPHVWRWDDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	120
WP_043419772.1	RDFESENLIPLWTEIGDLMPMVPSPKAVPHVWRWDDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
<u>WP_013602951.1</u>	RDFDKENLIPLWTEIGDLMPMVPSPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	91
SER04726.1	QDFDKENLIPLWTEIGDLMPMVPSPKAVPHVWRWNDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
WP_028269332.1	RDFDRENLIPLWTEIADLMPMVPSPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
SDK91634.1	RDFDRENLIPLWTEIADLMPMVPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
SDP49349.1	RDFDRENLIPLWTEIADLMPMVPSPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	91
SFT91215.1	RDFDKENLIPLWTEIADLMPMVPTPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
SDL25124.1	RDFDRENLIPLWTEIADLMPMVPTPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
WP_018772865.1	QDFDRENLIPLWTEIADLMPMVPTPKAVPHVWRWSDLYPLAARAGDLVPVGRGGERRAIA	94
:**	*.:*****.*****.*:***:*****.*****	
SD023406.1	LANPGLGNVPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVAMR	137
SDX34378.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPREVAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVAMR	154
SEJ48146.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPREVAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVAMR	154
SDW87333.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPREVAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVAMR	151
SEI94190.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPREVAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVAMR	151
GAB15705.1	LANPGLGGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	180
WP_043419772.1	LANPGLGGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
<u>WP_013602951.1</u>	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPRETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	151
SER04726.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGPRETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
WP_028269332.1	LANPGLGGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
SDK91634.1	LANPGLGGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
SDP49349.1	LANPGLGNTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	151
SFT91215.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
SDL25124.1	LANPGLGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
WP_018772865.1	LANPGLAGTPYATPTLWAAIQYLGARETAPEHRHSQNAFRFVVEGEGVWTVVNGDPVRMS	154
	*****.*****.*:*****.*****	
SD023406.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	197
SDX34378.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
SEJ48146.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
SDW87333.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	211
SEI94190.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	211
GAB15705.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	240
WP_043419772.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
<u>WP_013602951.1</u>	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	211
SER04726.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
WP_028269332.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
SDK91634.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
SDP49349.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	211
SFT91215.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214
SDL25124.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDEPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDEATPDISRS	214

WP_018772865.1	RGDFLLTPGWNFHGHNDTDQPMAWIDGLDIPFVHYADAGFFFGTERVTDATPDISRS *****:*****:*****.***	214
SEJ48146.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAIRYS	274
SDW87333.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRY	271
SEI94190.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAIRYS	271
GAB15705.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRY	300
WP_043419772.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWEHTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRY	274
WP_013602951.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTNSPIAAYRWKYTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	271
SER04726.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWKYTDAALREQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRF	274
WP_028269332.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTDALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	274
SDK91634.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTDALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	274
SDP49349.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTDALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	271
SFT91215.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTDALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	274
SDL25124.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTERALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT	274
WP_018772865.1	ERLWAHPGLRPLSGLDDTTSSPIAAYRWEYTDALAEQLLLEDEGHPATVSQGHAAVRYT *****:.*:**.*****:.*:** *****:*****.***:	274
SDO23406.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGVTTREALREVGSVWQVFEGRSVVLNGETQIVEKGLDF	317
SDX34378.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTEPLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGENKQLAKGLDF	334
SEJ48146.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTEPLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGENKQLAKGLDF	334
SDW87333.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTEPLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGENKQLAKGLDF	331
SEI94190.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTEPLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGETKALAKGLDF	331
GAB15705.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTERLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGEPRNLAKGLDF	360
WP_043419772.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTERLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGEPRNLAKGLDF	334
WP_013602951.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATTEVREVGSVWQVFEGTGTVTLNGETRQLAKGLDF	331
SER04726.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATDTEVREVGSVWQVFEGTGSVVLNGETKQLAKGLDF	334
WP_028269332.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATTEAVREVGSVWQVFEGSGTATLNGEVRTLEKGLDF	334
SDK91634.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTESLREVGSVWQVFEGTGTVVLNGESRSLEKGLDF	334
SDP49349.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATTEVREVGSVWQVFEGTGSVVLNGETRNLAAGDLF	331
SFT91215.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTEILREVGSVWQVFEGSGVVLNGERKLEKGLDF	334
SDL25124.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGASTERLREVGSVWQVFEGSGVVLNGETRNLAAGDLF	334
WP_018772865.1	NPTTGGDVMPTIRAEFHRLRAGATQSLREVGSVWQVFEGSGVVLNGETRTLAKGLDF *****:.*:** ***** ***** * . **** : : *****	334
SDO23406.1	VVPSWVSWSLAA-----ETFDLFRFNDAPIFERLNFNRITYIEGPNE-	359
SDX34378.1	VVPSWQEWSLTADND---QPGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRK--	378
SEJ48146.1	VVPSWQEWSLTADND---QPGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRK--	378
SDW87333.1	VVPSWQEWSLHADND---QPGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	377
SEI94190.1	VVPSWQEWSLTADANAVTPTFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	380
GAB15705.1	VVPSWQEWSLQADAG--SQTGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRNK-	406
WP_043419772.1	VVPSWQEWSLQADAG--SQTGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRNK-	380
WP_013602951.1	VVPSWAAWSLQAE-----TEFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRTK-	373
SER04726.1	VVPSWAAWSLHAD-----TEFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRTK-	376
WP_028269332.1	VVPSWAEWSLQAGAD--SNATFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	381
SDK91634.1	VVPSWQEWSLQAGAG--SQTGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	381
SDP49349.1	VVPSWASWSLQAE-----TEFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRTK-	373
SFT91215.1	VVPSWAEWSLQAEAG--SQTGFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	381
SDL25124.1	VVPSWAAWSLQAE-----TEFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRKNA	377
WP_018772865.1	VVPSWQEWSLQAG-----TQFDLFRFSDAPIFERLNFNRITYIEGRTK-	376
**** * * *	***** ***** * * * * *	

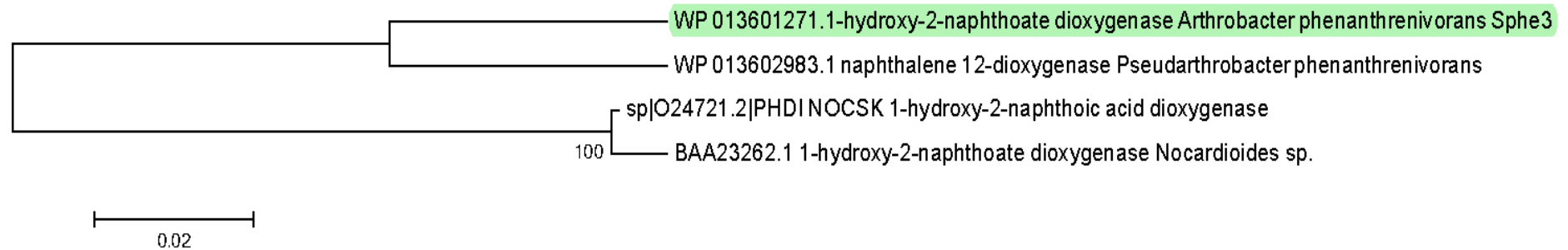
Σχήμα ClustalO 9 Στοιχισμός της αλληλουχίας της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος του στελεχούς Sph63 (WP_013602951.1) με ομόλογες αλληλουχίες των 1,2-διοξυγονασών του γεντισικού οξέος των εξής στελεχών: *Cryobacterium flavum* (SDO23406.1), *Arthrobacter* sp. cf158 (SDX34378.1), *Arthrobacter* sp. γρ096 (SEJ48146.1), *Arthrobacter* sp. cf158 (SDW87333.1), *Arthrobacter* sp. γρ096 (SEI94190.1), *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 (GAB15705.1), *Arthrobacter globiformis* (WP_043419772.1), *Arthrobacter* sp. OV608 (SER04726.1), *Arthrobacter* sp. UNC362MFTsu.1 (WP_028269332.1), *Arthrobacter* sp. ok362 (SDK91634.1), *Arthrobacter* sp. ok909 (SDP49349.1), *Arthrobacter* sp. on118 (SFT91215.1), *Arthrobacter* sp. on407 (SDL25124.1) και *Arthrobacter* sp. 131MFCol6.1 (WP_018772865.1) με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega. Αριστερά των αλληλουχιών αναγράφεται ο κωδικός της κάθε πρωτεΐνης όπως αυτές είναι καταχωρημένες στο NCBI. Δεξιά αναγράφεται η αρίθμηση των αμινοξέων.



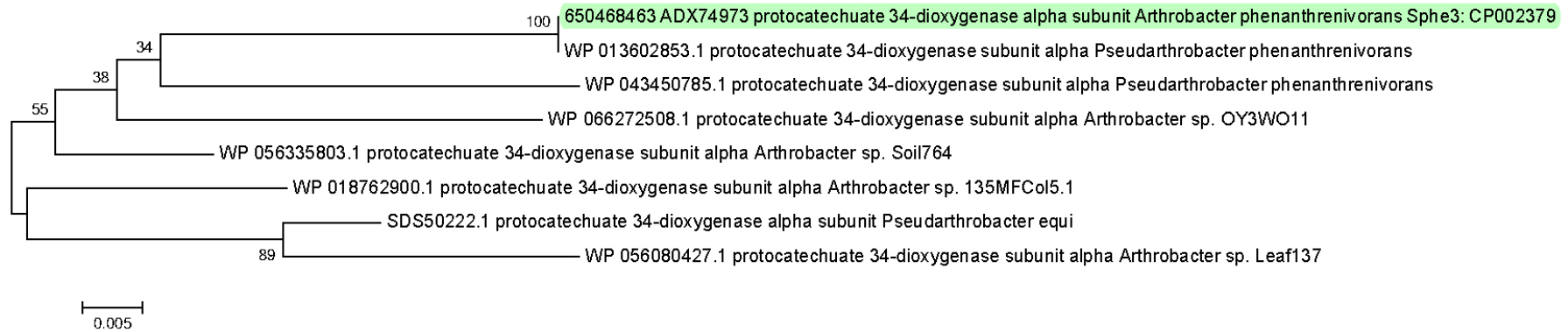
Σχήμα 3.8 Φυλογενετικό δέντρο των β υπομονάδων των διοξυγονασών του φαινυλοπροπιονικού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 12 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 186 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



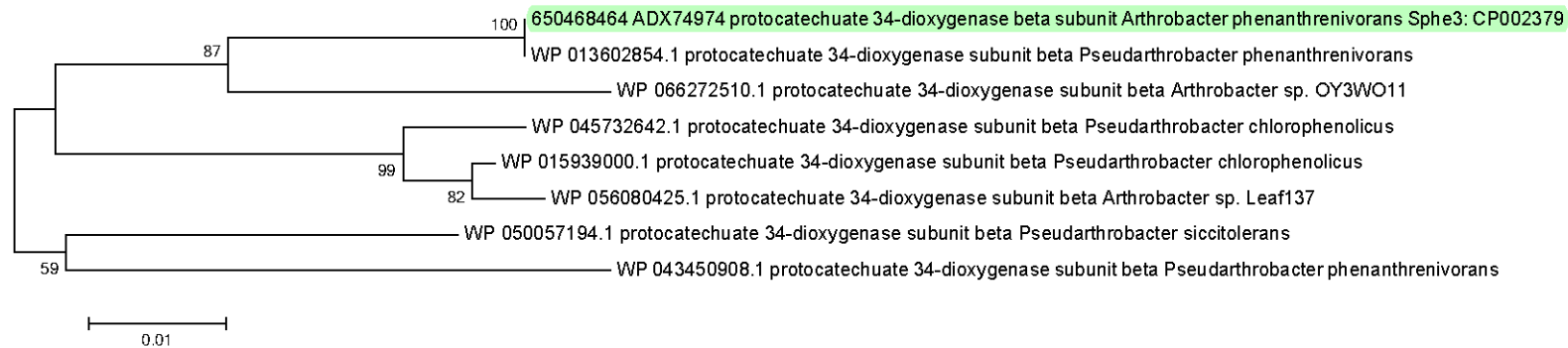
Σχήμα 3.9 Φυλογενετικό δέντρο των α υπομονάδων των διοξυγονάσων του φαινυλπροπιονικού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 6 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 535 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



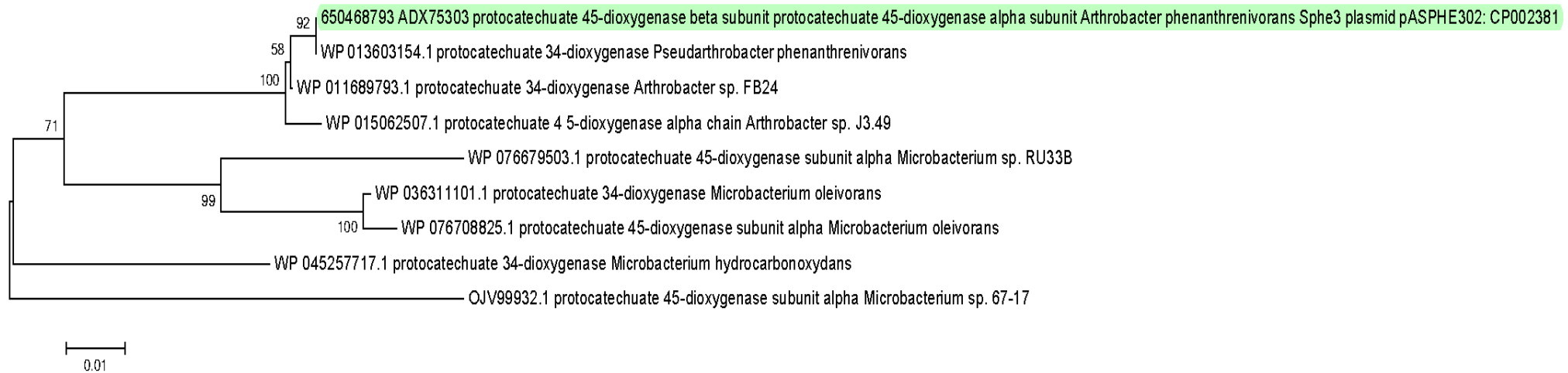
Σχήμα 3.10 Φυλογενετικό δέντρο της 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκής διοξυγονάσης. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 4 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 387 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



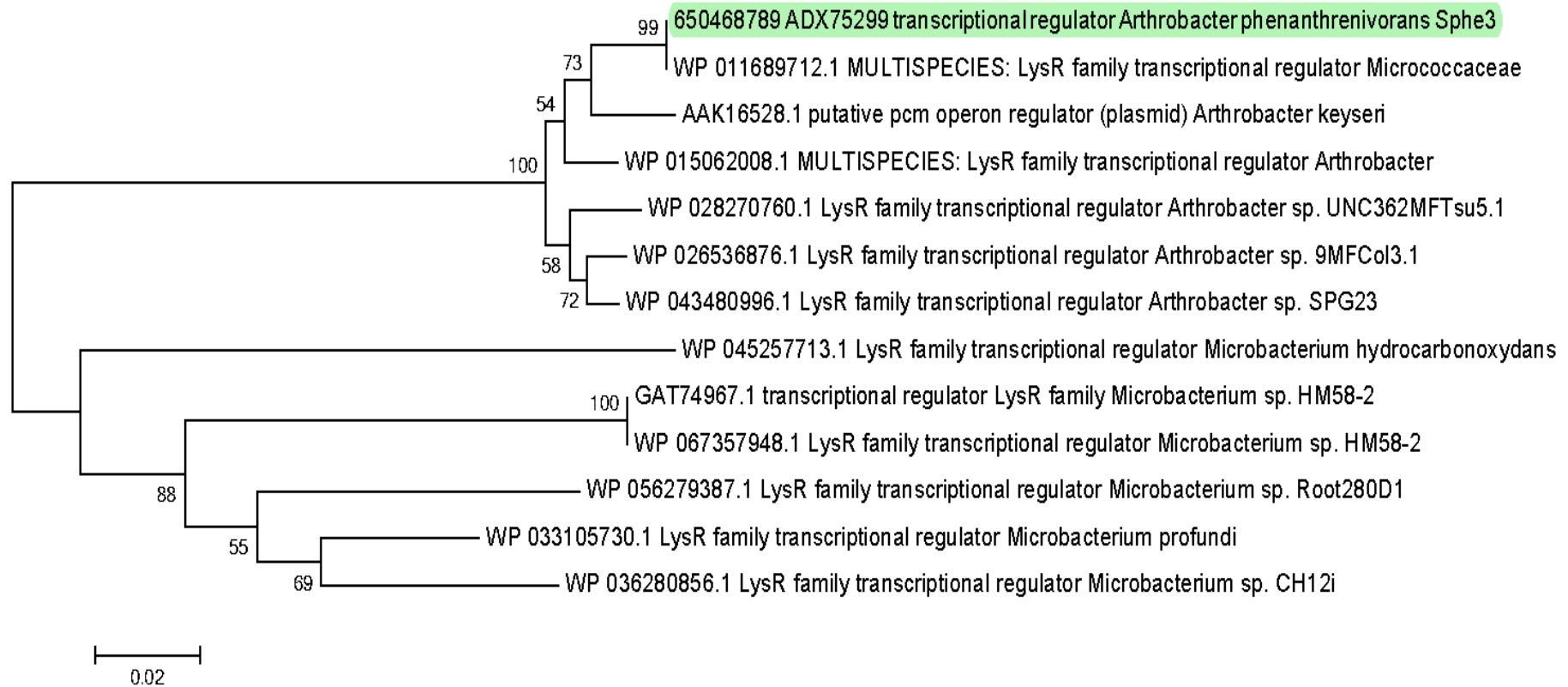
Σχήμα 3.11 Φυλογενετικό δέντρο της α υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 17 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 471 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



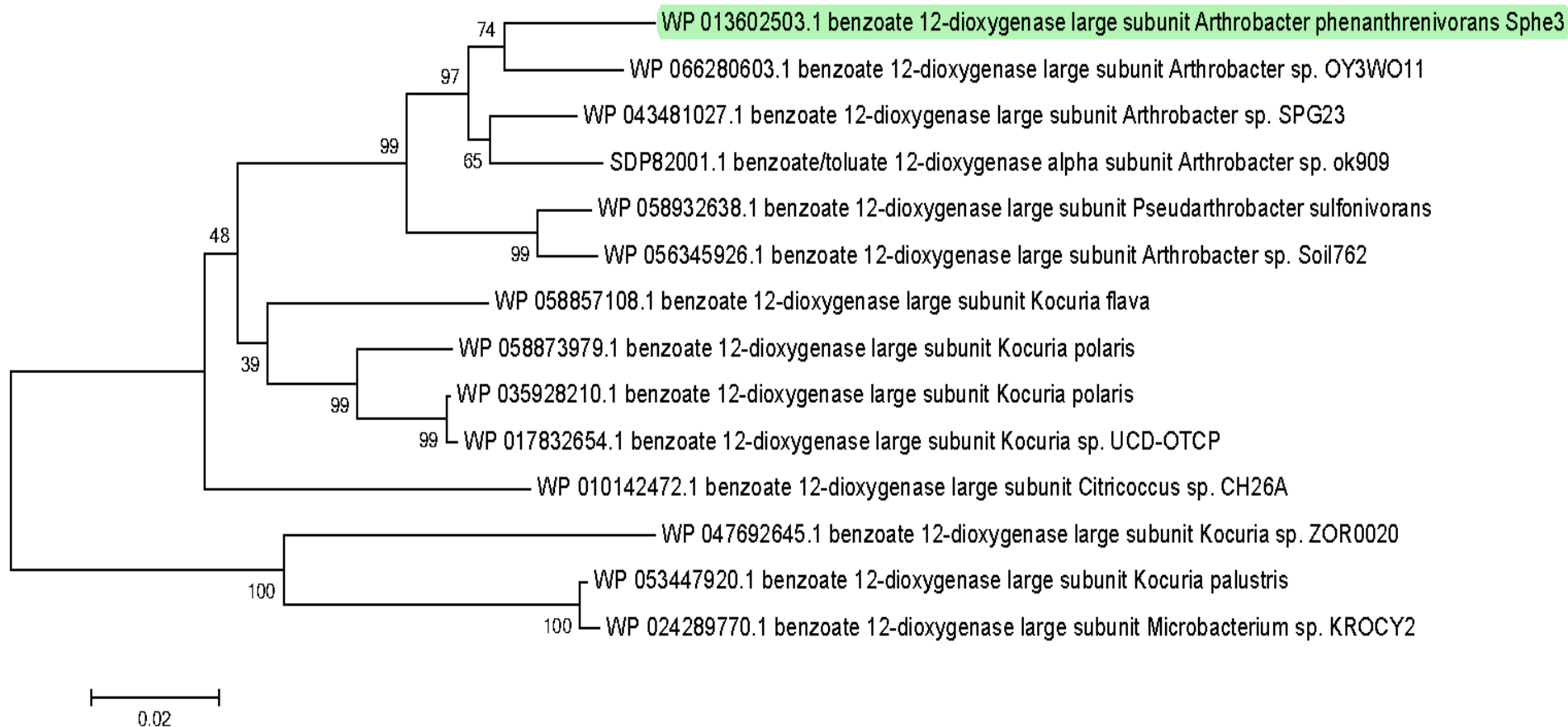
Σχήμα 3.12 Φυλογενετικό δέντρο της β υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 17 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 471 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



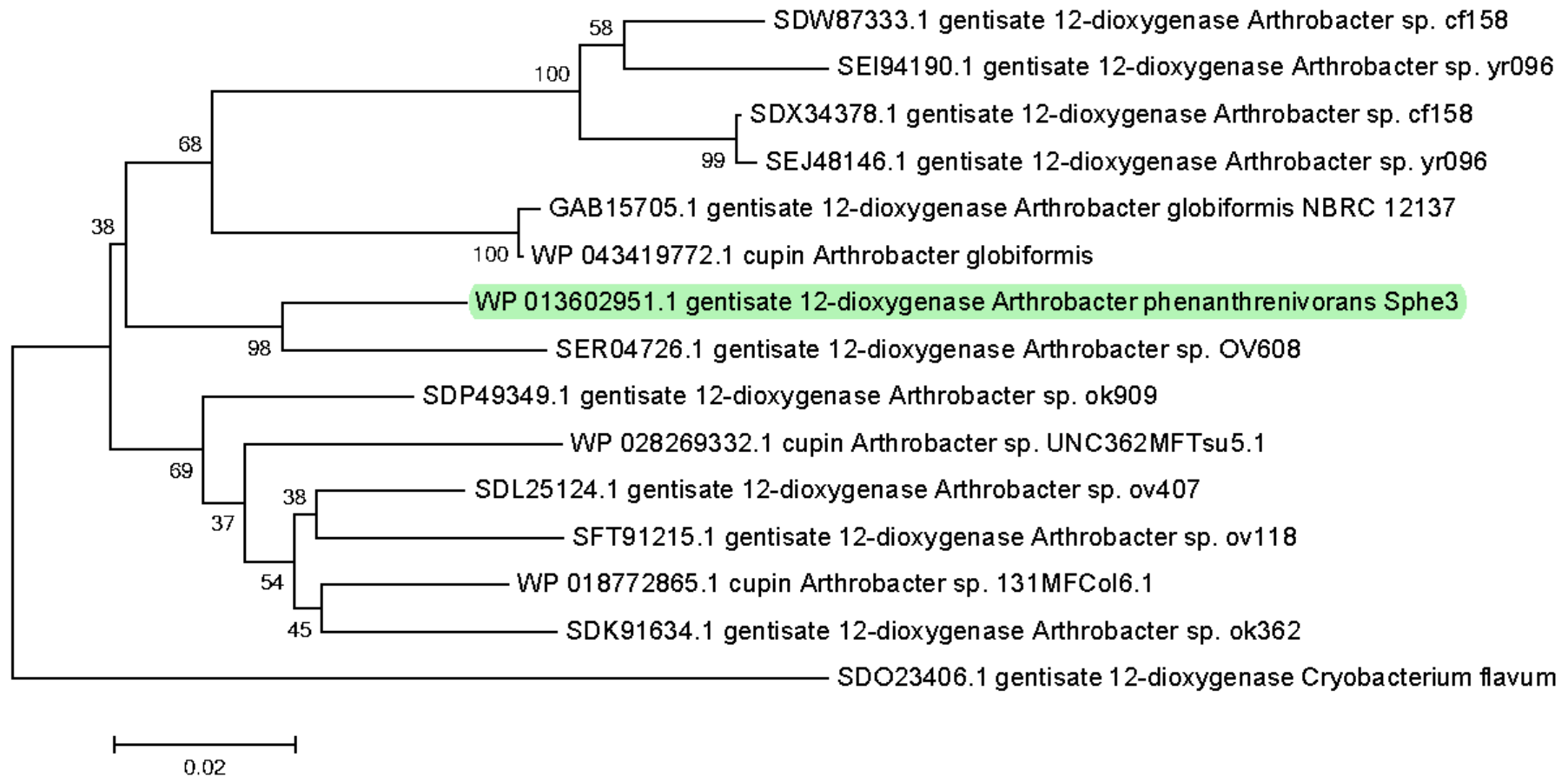
Σχήμα 3.13 Φυλογενετικό δέντρο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 17 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 471 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



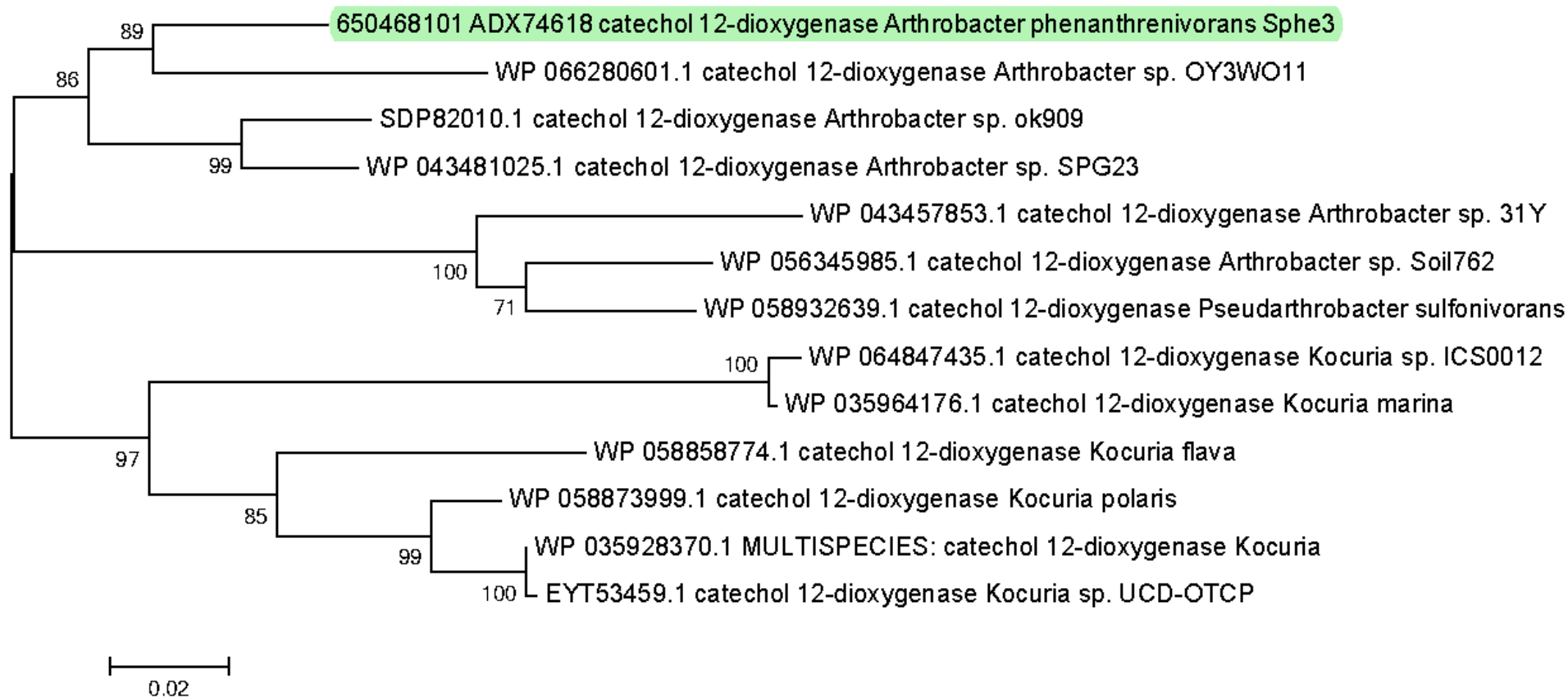
Σχήμα 3.14 Φυλογενετικό δέντρο του μεταγραφικού παράγοντα του οπερονίου της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 13 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 306 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



Σχήμα 3.15 Φυλογενετικό δέντρο της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 14 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 463 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



Σχήμα 3.16 Φυλογενετικό δέντρο της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 15 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 409 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.



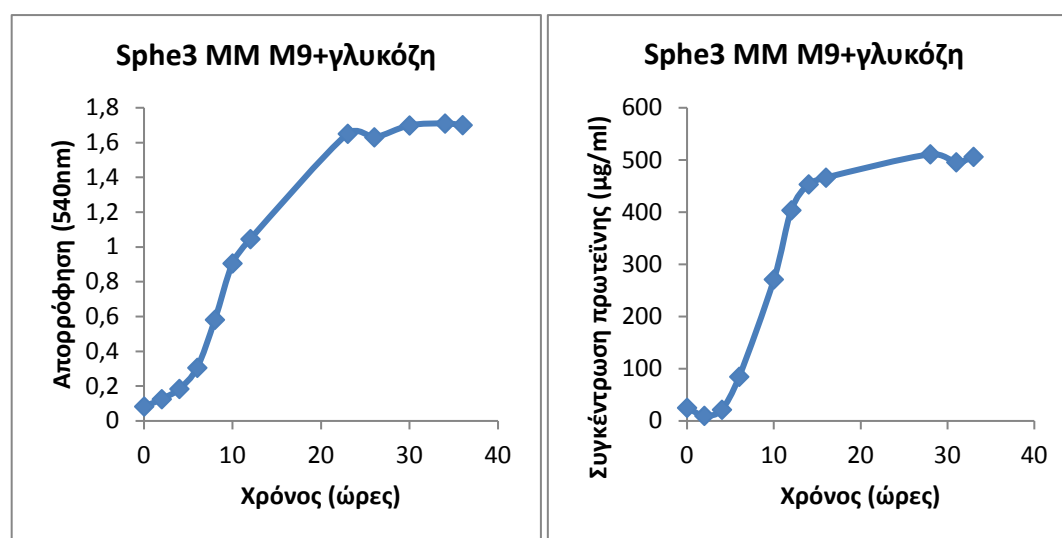
Σχήμα 3.17 Φυλογενετικό δέντρο της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες αμινοξικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 13 αμινοξικές αλληλουχίες. Όλες οι ασαφείς θέσεις απομακρύνθηκαν για κάθε ζεύγος αλληλουχιών. Υπάρχουν συνολικά 302 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA6.

3.3 Ανάπτυξη του στελέχους *Srhe3*

Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων του *Srhe3* σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9 ήταν: γλυκόζη, φαινανθρένιο, φθαλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, βενζοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ και κατεχόλη. Για κάθε καλλιέργεια κυττάρων *Srhe3* σε διαφορετική πηγή άνθρακα δημιουργήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm σε σχέση με το χρόνο και καμπύλες ανάπτυξης με βάση την παραγωγή πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο (προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Lowry).

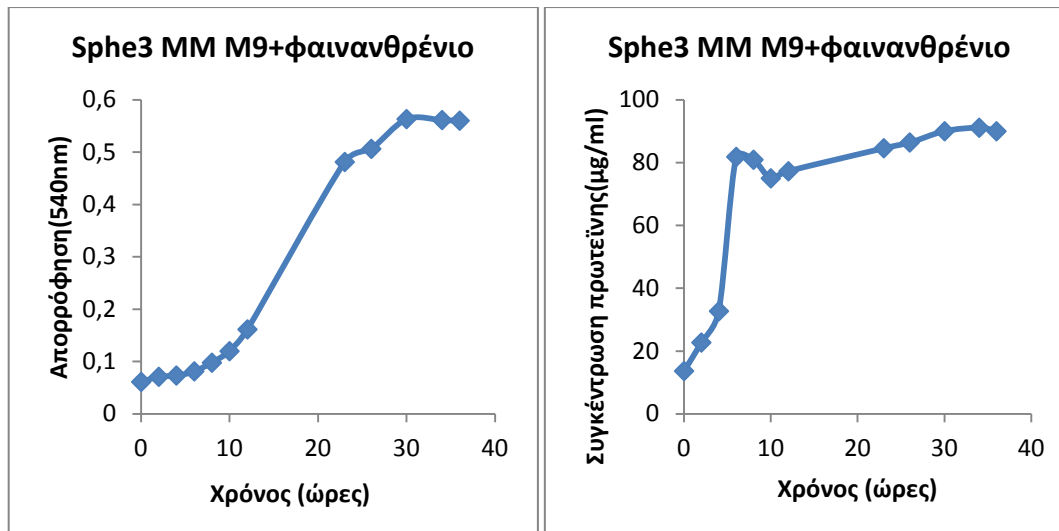
Με τη δημιουργία των καμπυλών ανάπτυξης κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της εκθετικής φάσης στην ανάπτυξη των κυττάρων, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η συλλογή των κυττάρων για την απομόνωση του RNA στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

Το *Srhe3* φαίνεται να αναπτύσσεται γρήγορα παρουσία γλυκόζης, καθώς εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης σε 8 ώρες. Στη στατική φάση φαίνεται να εισέρχεται μετά τις 20 ώρες (Γράφημα 3.1).



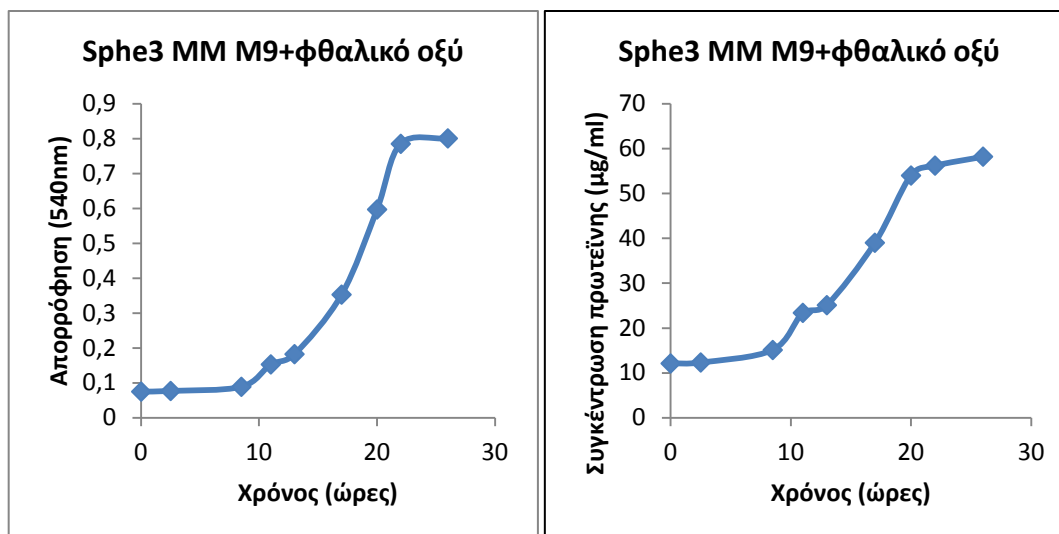
Γράφημα 3.1 Καμπύλη ανάπτυξης του *Srhe3* με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας τη γλυκόζη (22.2 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο.

Παρουσία φαινανθρενίου το *Srhe3* φαίνεται να εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 10 ώρες και φτάνει στη στατική φάση ανάπτυξης μετά τις 30 ώρες (Γράφημα 3.2).



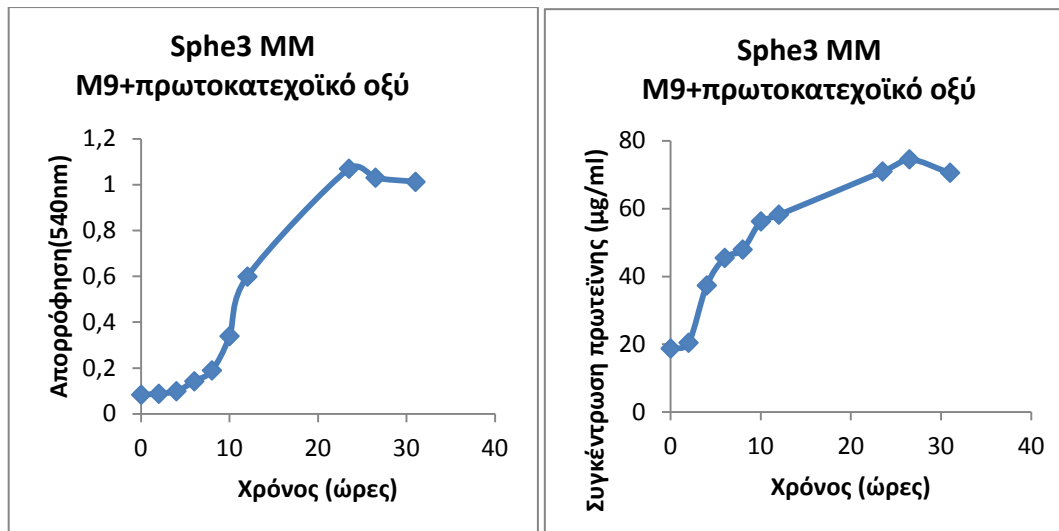
Γράφημα 3.2 Καμπύλη ανάπτυξης του Sphe3 με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το φαινανθρένιο (1.12 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο.

Παρουσία φθαλικού οξέος το Sphe3 φαίνεται να εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 13 ώρες και φτάνει στη στατική φάση ανάπτυξης μετά τις 22 ώρες (Γράφημα 3.3).



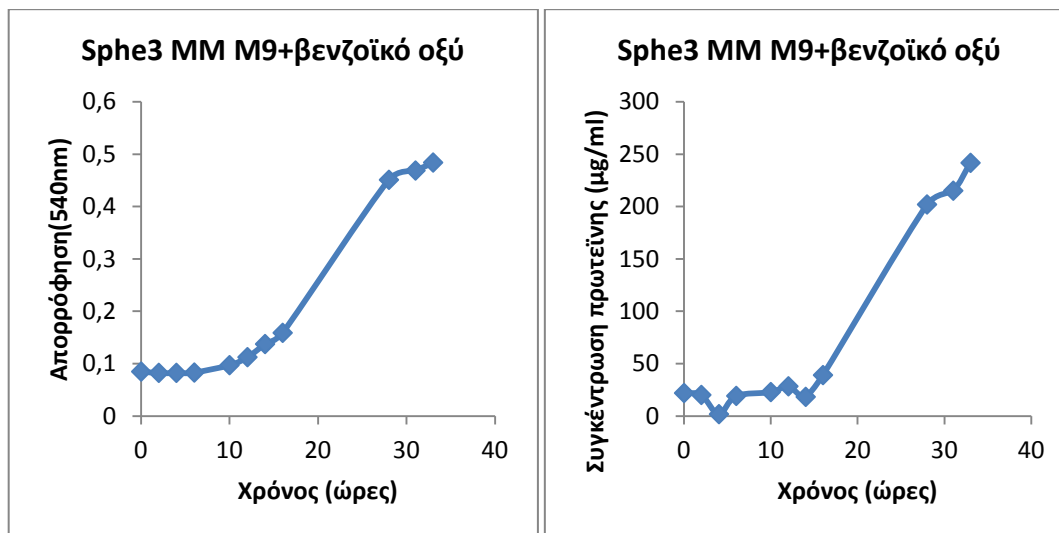
Γράφημα 3.3 Καμπύλη ανάπτυξης του Sphe3 με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το φθαλικό οξύ (15 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο.

Το στέλεχος Sphe3 αναπτύσσεται παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 9 ώρες και φτάνει στη στατική φάση ανάπτυξης μετά τις 25 ώρες (Γράφημα 3.4).



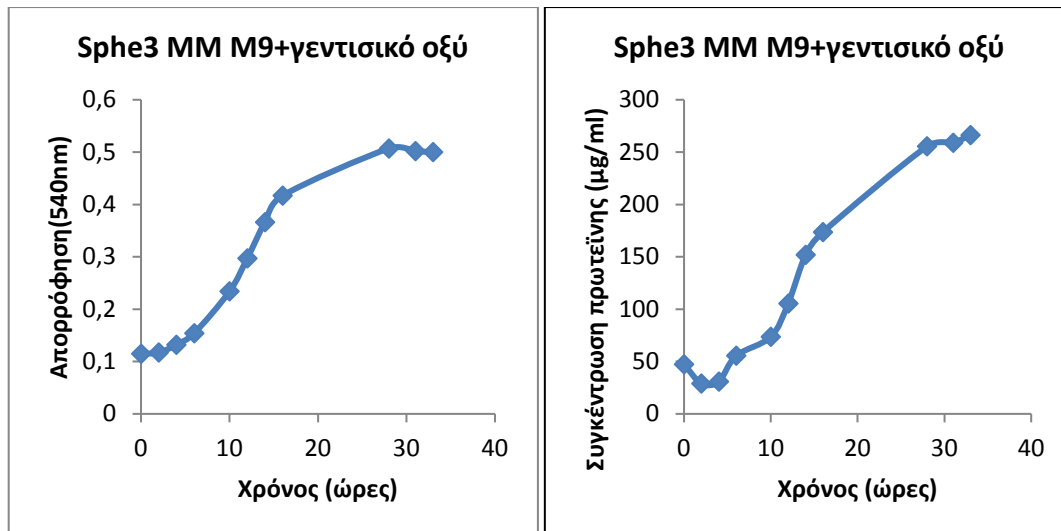
Γράφημα 3.4 Καμπύλη ανάπτυξης του Sphe3 με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (5 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο.

Το στέλεχος Sphe3 παρουσία βενζοϊκού οξέος φαίνεται να εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 13 ώρες και φτάνει στη στατική φάση ανάπτυξης μετά τις 30 ώρες (Γράφημα 3.5).



Γράφημα 3.5 Καμπύλη ανάπτυξης του Sphe3 με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το βενζοϊκό οξύ (5 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο.

Το στέλεχος Sphe3 παρουσία γεντισικού οξέος φαίνεται να εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης στις 10 ώρες και φτάνει στη στατική φάση ανάπτυξης μετά τις 30 ώρες (Γράφημα 3.6).



Γράφημα 3.6 Καμπύλη ανάπτυξης του *Sphe3* με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το γενετισικό οξύ (5 mM). Καμπύλη ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 540nm και καμπύλη απορρόφησης με βάση την παραγωγή πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο.

Το στέλεχος *Sphe3*, κατόπιν επανειλημμένων προσπαθειών, δεν φάνηκε να αναπτύσσεται με μοναδική πηγή άνθρακα την κατεχόλη (συγκέντρωση στην καλλιέργεια 1 mM).

3.4 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *Sphe3*, τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης, φαινανθρενίου, φθαλικού οξέος, πρωτοκατεχοϊκού οξέος, βενζοϊκού οξέος και γενετισικού οξέος ως μοναδικές πηγές άνθρακα και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.9 και τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για επιβεβαίωση του αποτελέσματος.



Σχήμα 3.18. Φωτογραφία δειγμάτων RNA ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στα πηγαδάκια 1: Μάρτυρας λ DNA-*HindIII*, 2:RNA *Sphe3* MM M9+γλυκόζη, 3:RNA *Sphe3* MM M9+φαινανθρένιο, 4:RNA *Sphe3* MM M9+φθαλικό οξύ, 5:RNA *Sphe3* MM M9+πρωτοκατεχοϊκό οξύ, 6:RNA *Sphe3* MM M9+βενζοϊκό οξύ, 7:RNA *Sphe3* MM M9+γενετισικό οξύ. Οι διπλές ζώνες που εμφανίζονται σε κάθε πηγαδάκι αντιστοιχούν στα

23s και 16s RNAs. Τυπικά θα έπρεπε να εμφανίζεται και μια ζώνη πιο χαμηλά που να αντιστοιχεί στο 5s RNA, αλλά αυτή δεν είναι πάντα ευδιάκριτη.

Η καθαρότητα και η ποσότητα του RNA σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε στο Quawell Q300 UV Spectrophotometer και οι τιμές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.3 Πίνακας μετρήσεων στο Quawell Q300.

RNA του Sph3 σε υπόστρωμα:	Καθαρότητα RNA (Abs 260/280)	Συγκέντρωση RNA(ng/ml)
γλυκόζη	2,52	1520,7
φαινανθρένιο	2,49	461,8
φθαλικό οξύ	2,47	538,5
πρωτοκατεχοϊκό οξύ	2,5	1055,9
βενζοϊκό οξύ	2,5	572,1
γεντισικό οξύ	2,49	403,6

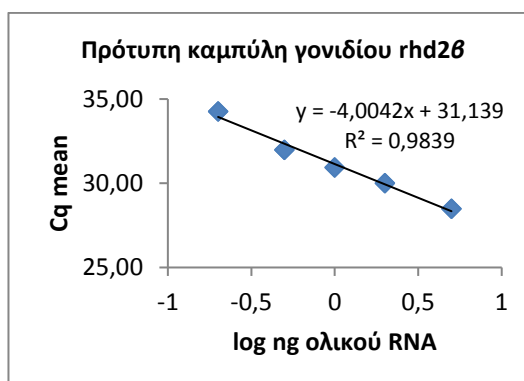
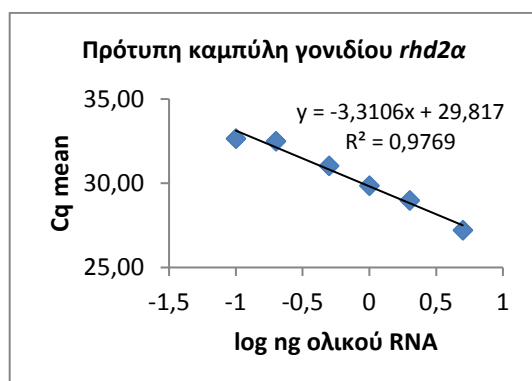
3.5 Προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος με την τεχνική qRT-PCR

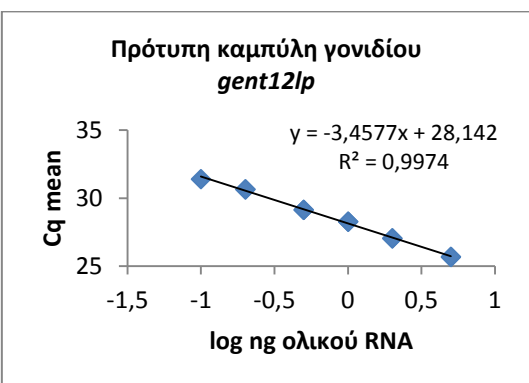
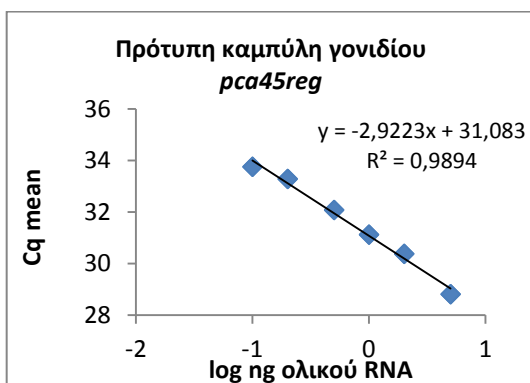
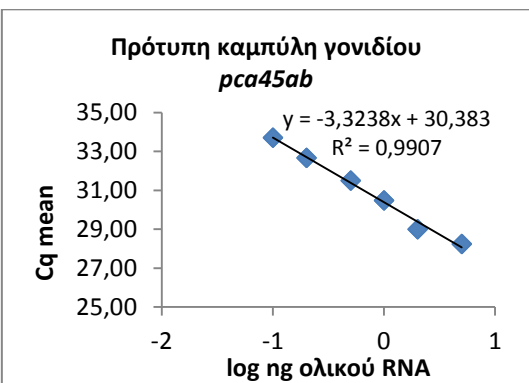
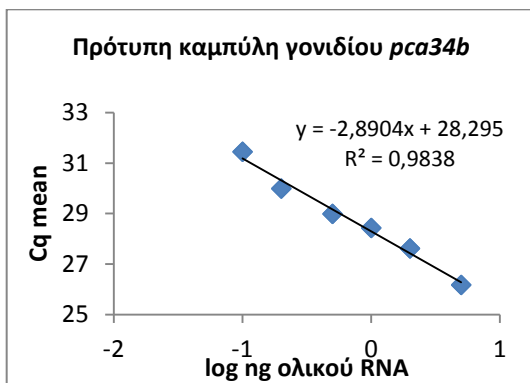
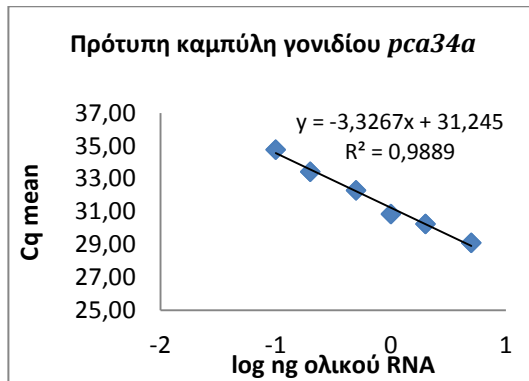
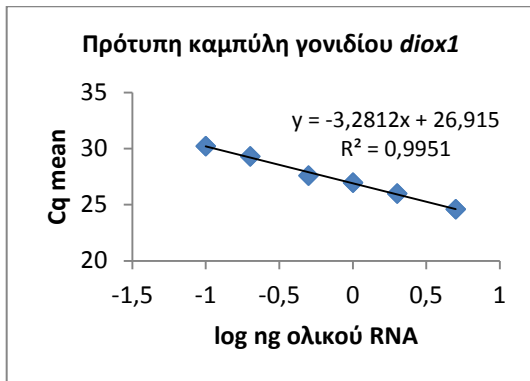
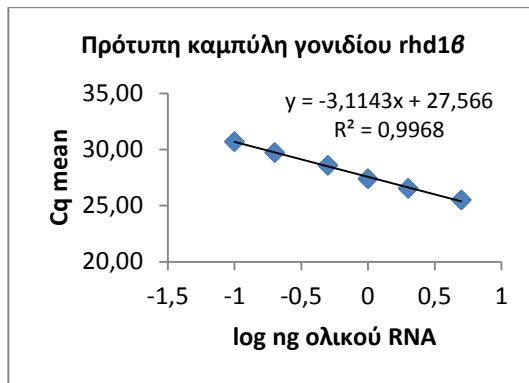
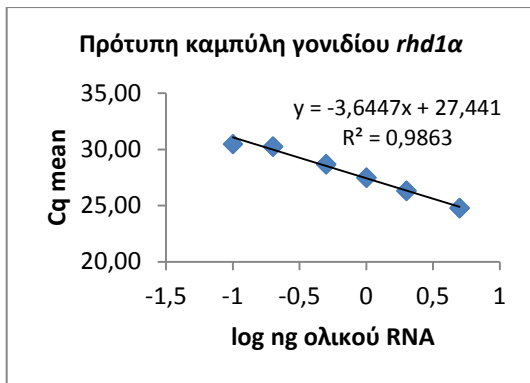
Τα δείγματα RNA μετατράπηκαν σε cDNA (Παράγραφος 2.14.1) και ακολούθησε η ποσοτική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος (Πίνακας 2.1) σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9 με μοναδικές πηγές άνθρακα (i)γλυκόζη, (ii)φαινανθρένιο, (iii)φθαλικό οξύ,(iv) πρωτοκατεχοϊκό οξύ, (v)βενζοϊκό οξύ και(vi) γεντισικό οξύ.

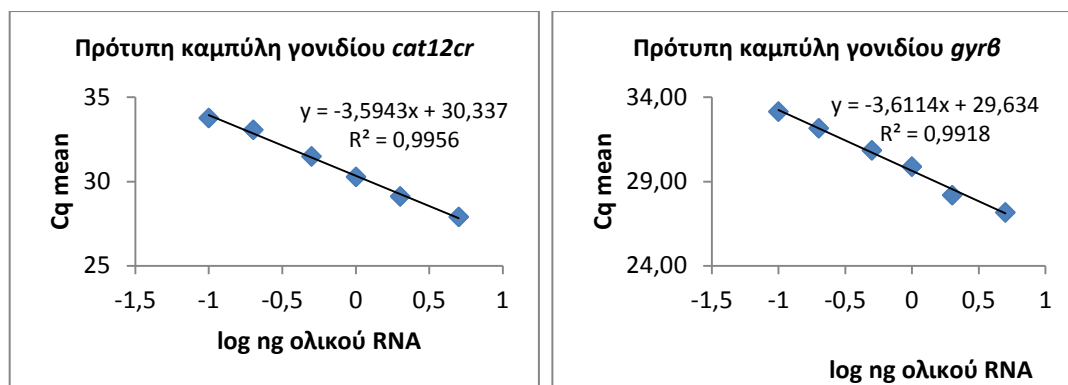
Η ποσότητα του RNA στα δείγματα προσδιορίστηκε σε σχέση με την ποσότητα του RNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB* και κάθε άγνωστο δείγμα κανονικοποιήθηκε ως προς το περιεχόμενο mRNA του γονιδίου αυτού. Η κατασκευή των προτύπων καμπυλών έγινε με χρήση εκμαγείου ολικού RNA από κύτταρα ανεπτυγμένα σε γλυκόζη σε ποσότητες 5, 2, 1, 0.5, 0.2 και 0.1 ng (Johnson *et al.*, 2000), που ενισχύθηκε σε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου με χρήση των κατάλληλων εκκινήτων για κάθε γονίδιο ενδιαφέροντος που παρατίθενται στον Πίνακα 2.2 (κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι).

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *benz12cra*, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα, δεν ήταν εφικτή. Αν και δοκιμάστηκαν επανειλημμένα διάφορες ποσότητες RNA για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, αυτή δεν κατέστη δυνατή.

Ακολουθούν οι πρότυπες καμπύλες των υπολοίπων 11 γονιδίων καθώς και αυτή της γυράσης β.







Σχήμα 3.19 Πρότυπες καμπύλες για τα γονίδια *rhd2α*, *rhd2β*, *rhd1α*, *rhd1β*, *diox1*, *pca34α*, *pca34β*, *pca45αβ*, *pca45reg*, *gent12lp*, *cat12cr* και *gyrβ*.

Η απόδοση (E) της qPCR ενός κύκλου στην εκθετική φάση υπολογίστηκε από τις κλίσεις των πρότυπων καμπυλών σύμφωνα με την εξίσωση $E=10^{(-1/κλίση)}$ (Pfaffl, 2001; Corbella and Puget, 2003). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η απόδοση της qPCR κάθε γονιδίου.

Πίνακας 3.4 Απόδοση της qPCR των υπό μελέτη γονιδίων.

Γονίδιο	Απόδοση ενίσχυσης $E=10^{(-1/κλίση)}$
<i>rhd2α</i>	1.89
<i>rhd2β</i>	1.94
<i>rhd1α</i>	2.00
<i>rhd1β</i>	1.77
<i>diox1</i>	1.88
<i>pca34α</i>	1.99
<i>pca34β</i>	2.20
<i>pca45αβ</i>	1.99
<i>pca45reg</i>	2.10
<i>gent12lp</i>	2.09
<i>cat12cr</i>	2.00
<i>gyrβ</i>	1.89

Στο Σχήμα 3.19, όπου παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες των υπό μελέτη γονιδίων, φαίνονται κάτω από τις εξισώσεις των ευθειών οι παράγοντες συσχέτισης ($0.9769 < R^2 < 0.9974$), επιδεικνύοντας έτσι καλή γραμμικότητα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης και συνοψίζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

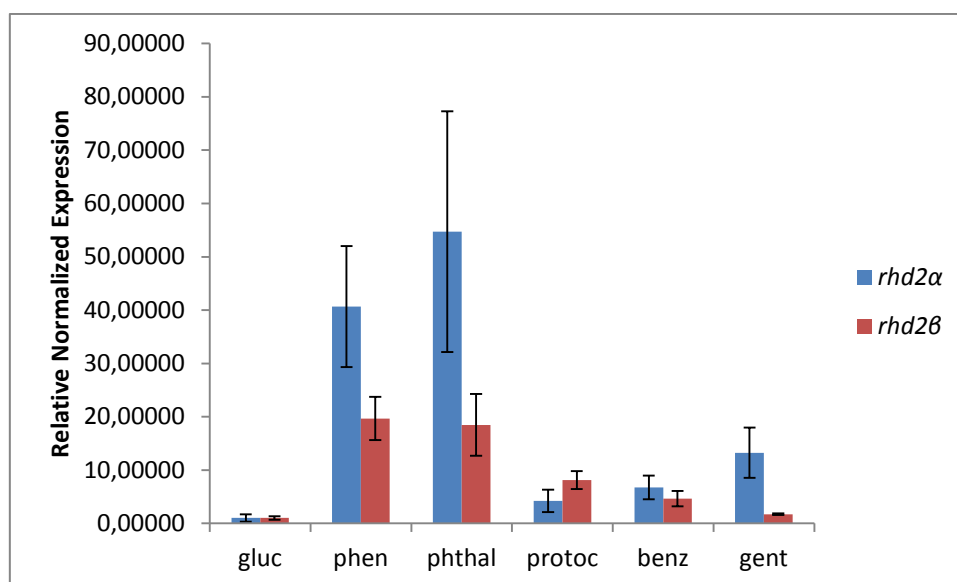
Τα υπό μελέτη γονίδια φαίνεται να επάγονται σε όλα τα αρωματικά υποστρώματα, με την έκφρασή τους σε μεταγραφικό επίπεδο να ποικίλλει από ελάχιστη μέχρι σημαντικά υψηλή, όπως φαίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3.5 Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές των επιπέδων μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων με την τυπική απόκλιση (κατά προσέγγιση στο πρώτο δεκαδικό ψηφίο) στα αρωματικά υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>rhd2α</i>	1 ± 0,7	40,7 ± 11,3	54,7 ± 22,6	4,2 ± 2,1	6,7 ± 2,2	13,2 ± 4,7

<i>rhd2B</i>	1 ± 0,3	19,7 ± 4,0	18,5 ± 5,8	8,1 ± 1,7	4,6 ± 1,4	1,7 ± 0,2
<i>rhd1α</i>	1 ± 0,1	186,2 ± 26,0	59,8 ± 20,01	100,7 ± 14,9	261,1 ± 71,7	33,0 ± 3,3
<i>rhd1B</i>	1 ± 0,3	2031,5 ± 518,2	44,7 ± 18,5	46,4 ± 18,1	184,8 ± 23,2	67,0 ± 24,4
<i>diox1</i>	1 ± 0,3	22,6 ± 7,2	16,2 ± 4,9	12,5 ± 2,9	22,3 ± 8,4	1,4 ± 0,4
<i>pca34a</i>	1 ± 0,3	13,0 ± 2,5	34,9 ± 13,5	65,2 ± 12,1	62,9 ± 17,7	0,9 ± 0,1
<i>pca34b</i>	1 ± 0,2	9,6 ± 2,4	43,6 ± 5,5	103,3 ± 29,1	91,8 ± 25,7	0,5 ± 0,1
<i>pca45ab</i>	1 ± 0,4	190,6 ± 33,3	275,2 ± 66,6	416,8 ± 66,6	28,0 ± 7,7	9,3 ± 0,7
<i>pca45reg</i>	1 ± 0,2	3,7 ± 1,3	14,4 ± 2,6	17,4 ± 7,4	9,3 ± 0,3	5,3 ± 0,6
<i>gent12lp</i>	1 ± 0,4	38,1 ± 15,1	6,9 ± 2,5	18,3 ± 3,5	7,6 ± 2,8	10,0 ± 2,5
<i>cat12cr</i>	1 ± 0,7	107,3 ± 15,6	17,6 ± 6,9	72,3 ± 46,1	4913,4 ± 436,9	67,0 ± 25,7

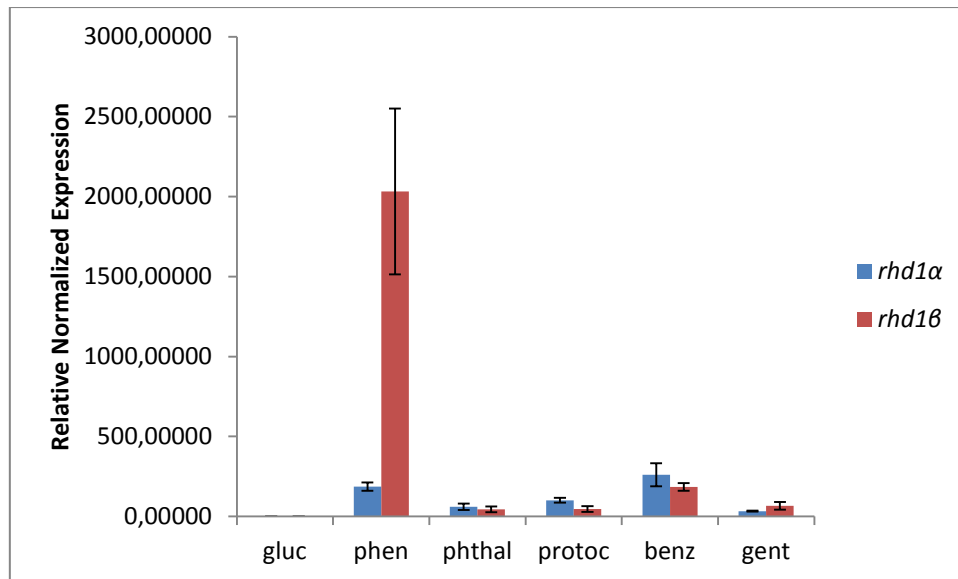
Ακολουθεί η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων σε γραφήματα και ο αντίστοιχος-σε-κάθε-γράφημα-πίνακας με τις τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων.



Γράφημα 3.7 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα του σελέχους *Srhe3*, που εντοπίζονται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο, στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.6 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων *rhd2α*, *rhd2B* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>rhd2α</i>	1 ± 0,692	40,674 ± 11,342	54,698 ± 22,568	4,231 ± 2,101	6,732 ± 2,227	13,229 ± 4,71
<i>rhd2B</i>	1 ± 0,335	19,674 ± 4,026	18,456 ± 5,797	8,112 ± 1,680	4,627 ± 1,445	1,717 ± 0,176



Γράφημα 3.8 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα του στελέχους *Srhe3*, που εντοπίζονται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο, στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.7 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων *rhd1α*, *rhd1β* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>rhd1α</i>	1± 0,088	186,195±26,005	59,782±20,031	100,728±14,932	261,041±71,691	33,033±3,346
<i>rhd1β</i>	1±0,345	2031,501±518,166	44,681±18,462	46,385±18,109	184,784±23,196	67,026±24,365

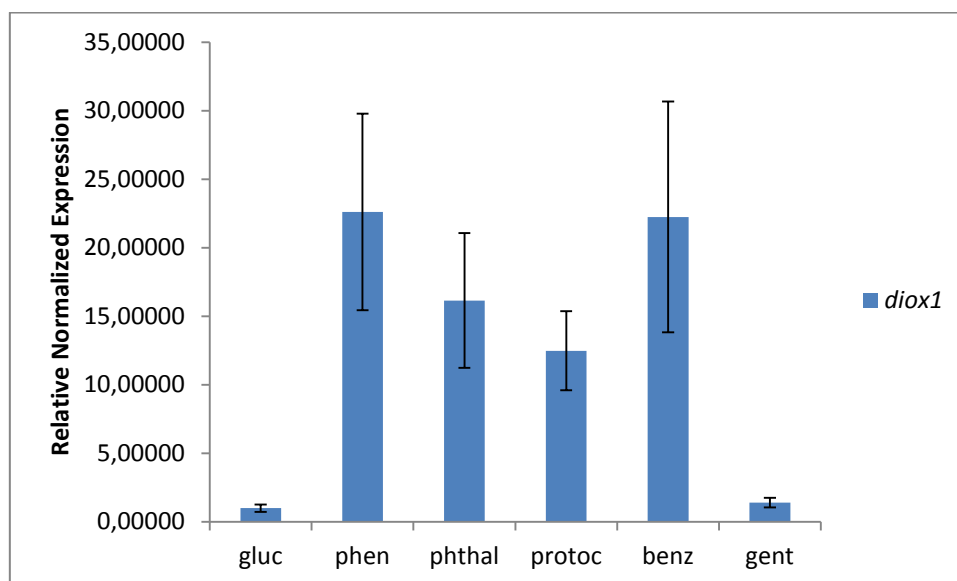
Παρουσία φαινανθρενίου η έκφραση των γονιδίων *rhd2α* και *rhd2β*, που κωδικεύουν για τη μεγάλη και μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης του φαινυλοπροπιονικού οξέος του πλασμιδίου *pASpHE302*, βρέθηκε να είναι 40 και 20 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ η έκφραση στα αντίστοιχα γονίδια, *rhd1α* και *rhd1β*, του πλασμιδίου *pASpHE301* προσδιορίστηκε να είναι 186 και 2032 φορές μεγαλύτερη σε κύτταρα καλλιέργειας με υπόστρωμα φαινανθρένιο σε σχέση με τη γλυκόζη.

Η έκφραση των γονιδίων *rhd2α* και *rhd2β* βρέθηκε να είναι 55 και 18 φορές μεγαλύτερη με υπόστρωμα φθαλικό σε σχέση με τη γλυκόζη και η έκφραση των *rhd1α* και *rhd1β* προσδιορίστηκε στις 60 και 45 φορές μεγαλύτερη.

Σε υπόστρωμα πρωτοκατεχοϊκού οξέος η έκφραση των *rhd2α* και *rhd2β* επάγεται μόλις 4 και 8 φορές περισσότερο σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ η έκφραση στα *rhd1α* και *rhd1β* βρέθηκε να είναι 101 και 46 φορές μεγαλύτερη στο πρωτοκατεχοϊκό σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης.

Η έκφραση των *rhd2α* και *rhd2β* επάγεται μόλις 6 και 4 φορές περισσότερο σε υπόστρωμα βενζοϊκού οξέος σε σχέση με τη γλυκόζη. Η έκφραση στα *rhd1α* και *rhd1β* βρέθηκε να είναι 261 και 185 φορές μεγαλύτερη σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία υποστρώματος βενζοϊκού οξέος σε σχέση με τη γλυκόζη.

Σε υπόστρωμα γεντισικού οξέος η έκφραση των *rhd2a* και *rhd2b* επάγεται 13 και 2 φορές περισσότερο σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ τα *rhd1a* και *rhd1b* εμφανίζουν έκφραση 33 και 67 φορές μεγαλύτερη σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία υποστρώματος γεντισικού οξέος σε σχέση με τη γλυκόζη.

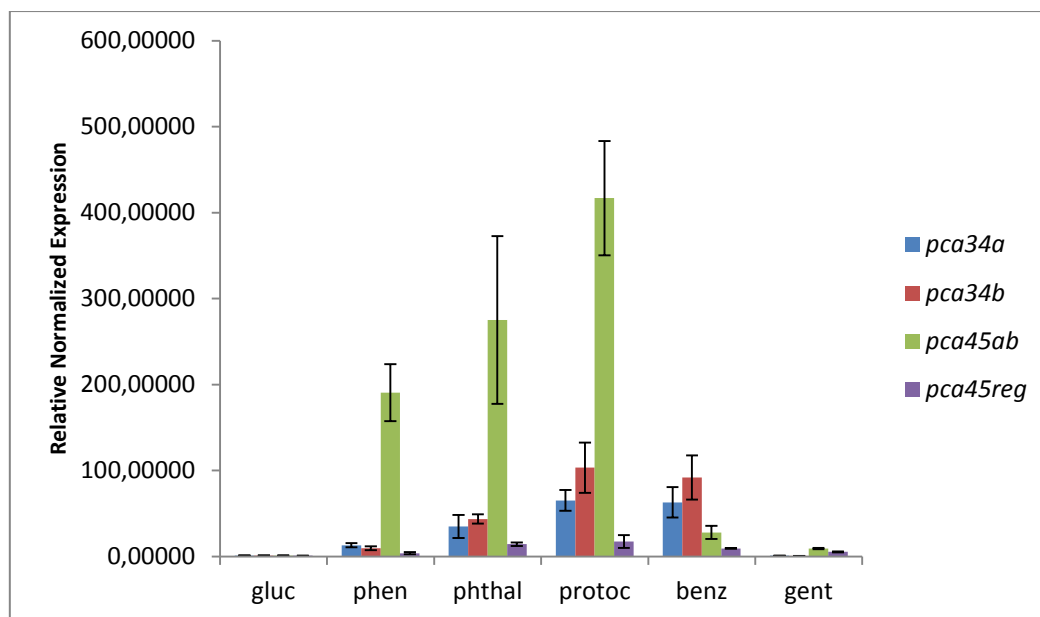


Γράφημα 3.9 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Srhe3*, που εντοπίζονται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο, στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gytB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.8 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου *diox1* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>diox1</i>	1 ± 0,271	22,604 ± 7,168	16,152 ± 4,922	12,485 ± 2,887	22,251 ± 8,413	1,400 ± 0,350

Το γονίδιο *diox1*, που κωδικεύει τη διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος και εντοπίζεται στο πλασμίδιο *rASPHE301*, εμφανίζει 23 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο φαινανθρένιο σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης, 16 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο φθαλικό οξύ, 12 φορές μεγαλύτερη στο πρωτοκατεχοϊκό οξύ, 22 φορές μεγαλύτερη στο βενζοϊκό οξύ και παρουσία γεντισικού οξέος η έκφραση του γονιδίου *diox1* επάγεται μόλις 1 φορά.



Γράφημα 3.10 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού του στελέχους *Srhe3* στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.9 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων *pca34a*, *pca34b*, *pca45ab* και *pca45reg* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>pca34a</i>	1± 0,327	13,026±2,455	34,983±13,501	65,169±12,147	62,923±17,688	0,869±0,113
<i>pca34b</i>	1±0,209	9,642±2,352	43,596±5,463	103,31±29,138	91,808±25,689	0,504±0,064
<i>pca45ab</i>	1±0,393	190,6±33,277	275,184±66,627	416,794±66,627	28,012±7,669	9,326±0,681
<i>pca45reg</i>	1±0,199	3,699±1,302	14,395±2,058	17,375±7,398	9,315±0,274	5,335±0,602

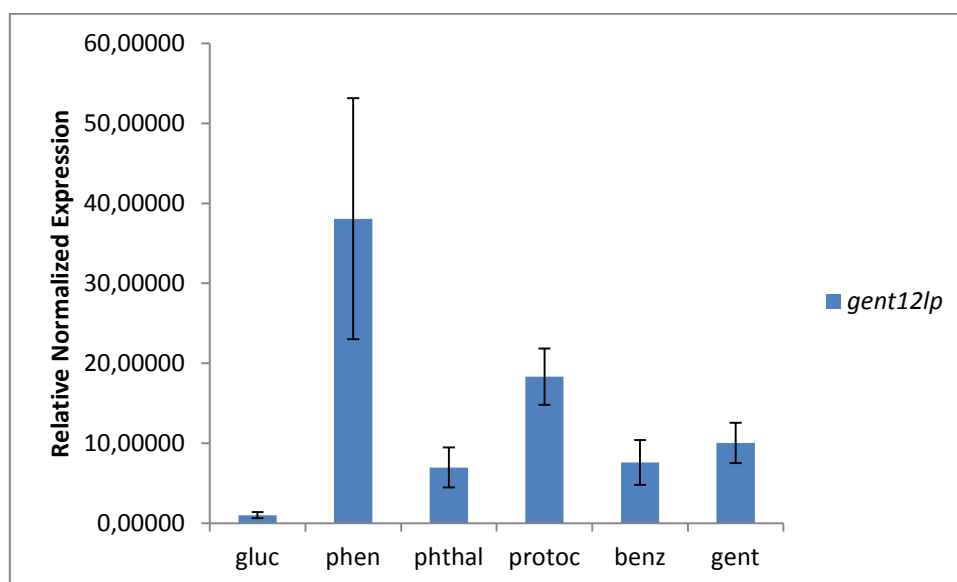
Η έκφραση των γονιδίων, που κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, *pca34a* και *pca34b* του στελέχους *Srhe3* σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν με υπόστρωμα φαινανθρένιο σε σχέση με τη γλυκόζη είναι 13 και 10 φορές μεγαλύτερη. Η έκφραση του *pca45ab*, που κωδικεύει την 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού βρέθηκε να είναι 190 φορές μεγαλύτερη στο φαινανθρένιο απ' ότι στη γλυκόζη, ενώ η έκφραση του *pca45reg*, το οποίο κωδικεύει για το μεταγραφικό παράγοντα του οπερονίου της 4,5 διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού, φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά.

Παρουσία φθαλικού οξέος η έκφραση των γονιδίων *pca34a* και *pca34b* σε σχέση με τη γλυκόζη είναι 35 και 44 φορές μεγαλύτερη. Το *pca45ab* εμφανίζει 275 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο φθαλικό οξύ απ' ότι στο υπόστρωμα της γλυκόζης, ενώ η έκφραση του *pca45reg* είναι 14 φορές μεγαλύτερη.

Τα γονίδια *pca34a* και *pca34b* εμφανίζουν 65 και 103 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο πρωτοκατεχοϊκό σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης. Η έκφραση του *pca45ab* είναι 417 φορές μεγαλύτερη στο πρωτοκατεχοϊκό οξύ απ' ότι στη γλυκόζη, ενώ η έκφραση του *pca45reg* είναι 17 φορές μεγαλύτερη.

Παρουσία βενζοϊκού οξέος τα γονίδια *rca34a* και *rca34b* εμφανίζουν 63 και 92 φορές μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης, η έκφραση του *rca45ab* είναι 28 φορές μεγαλύτερη και η έκφραση του *rca45reg* είναι 9 φορές μεγαλύτερη.

Η έκφραση των γονιδίων *rca34a* και *rca34b* φαίνεται να μην επάγεται στο γεντισικό οξύ. Η έκφραση του *rca45ab* είναι 9 φορές μεγαλύτερη και του *rca45reg* είναι 5 φορές μεγαλύτερη σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία υποστρώματος γεντισικού οξέος σε σχέση με τη γλυκόζη.

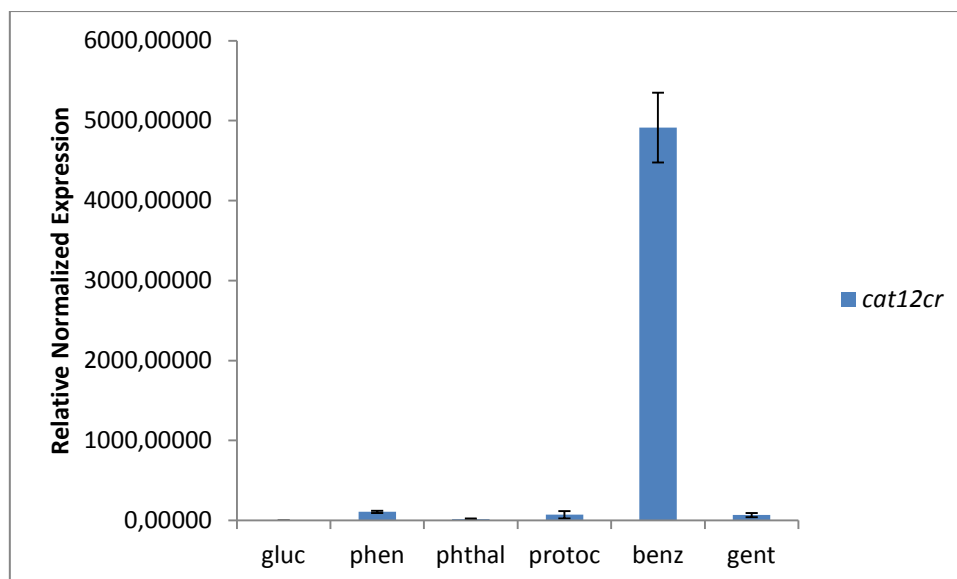


Γράφημα 3.11 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος του στελέχους *Srhe3*, που εντοπίζονται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο, στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.10 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου *gent12p* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>gent12p</i>	1±0,380	38,076±15,076	6,966±2,501	18,322±3,527	7,601±2,808	10,040±2,518

Η έκφραση του γονιδίου *gent12p*, που κωδικεύει την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού οξέος, είναι 38 φορές μεγαλύτερη σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινανθρενίου σε σχέση με τη γλυκόζη, σε κύτταρα καλλιέργειας με υπόστρωμα φθαλικό οξύ είναι 7 φορές μεγαλύτερη, σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία πρωτοκατεχοϊκού 18 φορές μεγαλύτερη, στο βενζοϊκό 7 φορές μεγαλύτερη και η έκφραση του *gent12p* είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη στο γεντισικό οξύ.



Γράφημα 3.12 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του στελέχους *Srhe3*, που εντοπίζονται στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο, στα υπό μελέτη υποστρώματα. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων.

Πίνακας 3.11 Τιμές των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου *cat12cr* με την τυπική απόκλιση στα υπό μελέτη υποστρώματα.

Γονίδια	Υποστρώματα					
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φθαλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Βενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
<i>cat12cr</i>	1±0,654	107,277±15,631	17,614±6,949	72,265±46,176	4913,431±43,6,957	67,041±25,67

Το γονίδιο της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης του στελέχους *Srhe3* φαίνεται να επάγεται σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία υποστρώματος φαινανθρενίου 107 φορές, 17 παρουσία φθαλικού οξέος, 72 παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος και 67 φορές με παρουσία γεντισικού οξέος, σε σχέση με τη γλυκόζη. Το γονίδιο *cat12cr* εμφανίζει 4913 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο βενζοϊκό οξύ σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης.

Κεφάλαιο 4 Συζήτηση

4.1 Ανάπτυξη του στελέχους *Srhe3* σε υποστρώματα αρωματικών ενώσεων

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* *Srhe3* απομονώθηκε από χώμα ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο σε περιοχή που λειτουργούσε βιομηχανία επεξεργασίας ξύλου. Έχει αποδειχθεί ότι το *Srhe3* καταβολίζει φαινανθρένιο σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας σε συγκεντρώσεις μέχρι και 400 mg/L, συγκεντρώσεις υψηλότερες από όσες έχουν αναφερθεί σε άλλα μέλη του γένους (Kallimanis et al., 2007).

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας απέδειξαν ότι το στέλεχος *Srhe3* είναι ικανό να καταβολίζει εκτός από φαινανθρένιο και φθαλικό ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στο σαλικυλικό οξύ (Kallimanis et al. 2009; Vandera et al. 2015).

Στην παρούσα διατριβή, το στέλεχος *Srhe3* εξετάστηκε κατά πόσον μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος, βενζοϊκού οξέος, γεντισικού οξέος και κατεχόλης ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Όπως φαίνεται από τις καμπύλες ανάπτυξης (Γράφημα 3.4, Γράφημα 3.5, Γράφημα 3.6) το *Srhe3* αναπτύσσεται παρουσία του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (5 mM), βενζοϊκού οξέος (5 mM) ή γεντισικού οξέος (5 mM) ως μοναδικών πηγών άνθρακα και ενέργειας, ύστερα από 9, 13 και 10 ώρες επωαστικής φάσης ανάπτυξης αντίστοιχα, ενώ αντίθετα δεν εμφανίστηκε ανάπτυξη παρουσία της κατεχόλης (1 mM) ως μοναδικής πηγής άνθρακα. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν είναι ανάλογες των συγκεντρώσεων που χρησιμοποίησαν οι Vandera και συνεργάτες για την ανάπτυξη του στελέχους *Srhe3* σε υπόστρωμα γλυκόζης, φαινανθρενίου και φθαλικού οξέος (Vandera et al. 2015). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το βενζοϊκό οξύ και το γεντισικό οξύ είναι ανάλογες των συγκεντρώσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί για άλλα βακτηριακά στελέχη (Carvalho et al. 2006; Romero-Silva et al. 2013).

Για την μελέτη, επομένως, της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικεύουν διοξυγονάσες, το *Srhe3* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9 παρουσία γλυκόζης (22.2 mM), φαινανθρενίου (1.12 mM), φθαλικού οξέος (15 mM), πρωτοκατεχοϊκού οξέος (5 mM), βενζοϊκού οξέος (5 mM), γεντισικού οξέος (5 mM) και κατεχόλης (1 mM) ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας.

Η αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου

Η διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης είναι ένα ένζυμο κλειδί για την αρχική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα των PAH υπό αερόβιες συνθήκες (Juhasz & Naidu 2000). Τυπικά, το αρχικό βήμα στην αερόβια βιοαποδόμηση των PAH είναι η εισαγωγή και των δύο ατόμων ενός μορίου οξυγόνου σε δύο άτομα άνθρακα του αρωματικού πυρήνα με προϊόν μια *cis*-διϋδροδιόλη, μια αντίδραση απαραίτητη για τη σχάση του αρωματικού πυρήνα (Habe & Otori 2003). Αυτό το βήμα καταλύεται από μια διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα. Η δομή της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από το στέλεχος *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 αποτελεί το πρωτότυπο της οικογένειας των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα (Kauppi et al. 1998).

Στο στέλεχος *Srhe3* με ανάλυση *in silico* εντοπίστηκαν διοξυγονάσες υπεύθυνες για την αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου (Πίνακας 3.1). Πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των α υπομονάδων των διοξυγονασών αυτών με αλληλουχίες ομόλογων ενζύμων στο ClustalOmega και εντοπίστηκαν συντηρημένα αμινοξέα με διοξυγονάσες του φαινυλοπροπιονικού σε στελέχη που ανήκουν στα γένη *Blastococcus*, *Sinomonas* και *Arthrobacter* (Σχήμα ClustalO 1, Σχήμα ClustalO 2).

Τα γονίδια που κωδικεύουν για τις διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου στο *Srhe3* εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και στα πλασμίδια και οι νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων του IMG: the Integrated Microbial Genomes Database and Comparative Analysis System (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/edu/main.cgi>) όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.1. Στο πλασμίδιο *pASPHE301* εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (διοξυγονάση του φαινυλοπροπιονικού, α υπομονάδα-ADX75094 και β υπομονάδα-ADX75095), τα *rhd1a* (*Asrhe3_40070*) και *rhd1b* (*Asrhe3_40080*) αντίστοιχα, ενώ στο πλασμίδιο *pASPHE302* εντοπίστηκαν αντίστοιχα γονίδια που κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (διοξυγονάση του φαινυλοπροπιονικού, α υπομονάδα-ADX75329 και β υπομονάδα-ADX75328), τα *rhd2a* (*Asrhe3_42640*) και *rhd2b* (*Asrhe3_42630*).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Παράγραφος 1.5.1) τα γονίδια αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα οργανώνονται σε οπερόνια που κωδικεύουν τις δύο υπομονάδες διοξυγονάσης, τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης. Σε αυτά τα οπερόνια εντοπίζονται συχνά και γονίδια που κωδικεύουν για αφυδρογονάσες, υδρατάσες/αλδολάσες καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Parales & Resnick 2006).

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του πυρήνα σε μεταγραφικό επίπεδο με τη χρήση της τεχνικής qPCR, έδειξε ότι επάγεται η μεταγραφή τους σε όλα τα αρωματικά υποστρώματα σε σχέση με τη γλυκόζη. Επιπλέον, τα γονίδια *rhd1a* και *rhd1b* του μεγάλου πλασμιδίου *pASPHE301* παρουσιάζουν 5 φορές και 10 φορές μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με τα αντίστοιχα γονίδια, *rhd2a* και *rhd2b* του μικρού πλασμιδίου *pASPHE302* παρουσία του φαινανθρενίου ως μοναδικής πηγής άνθρακα (Πίνακας 3.5). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα γονίδια διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα που εντοπίζονται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο *pASPHE301* είναι κυρίως υπεύθυνα για την αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Srhe3*.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας και αφορούσε στην πρωτεωμική μελέτη των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου από κύτταρα *Srhe3* που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινανθρενίου ή φθαλικού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Vandera et al. 2015). Από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης φαίνεται ότι η ρύθμιση της επαγωγής των ανωτέρω διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης πραγματοποιείται στο επίπεδο της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων.

Μεγαλύτερη επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του πυρήνα που εντοπίζονται στο μεγάλο πλασμίδιο (*rhd1a* και *rhd1b*)

παρατηρείται επίσης και παρουσία του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, του βενζοϊκού οξέος και του γεντισικού οξέος, ενώ αντίθετα, παρόμοια έκφραση παρατηρείται παρουσία του φθαλικού οξέος. Στην σύνθεση των καταβολικών ενζύμων φαίνεται ότι εμπλέκονται διάφοροι ρυθμιστικοί μηχανισμοί όπως έχει αναφερθεί και από τους Krinovok και συνεργάτες (2003) για το στέλεχος *Mycobacterium* sp. 6PY1. Οι συγγραφείς εντόπισαν δύο ένζυμα διοξυγονασών με εξειδίκευση στα αρωματικά υποστρώματα, το ένα (Pdo1) είναι υπεύθυνο για τη διϋδροξυλίωση του πυρενίου και του φαινανθρενίου και το άλλο (Pdo2) υπεύθυνο για την οξειδωση του φαινανθρενίου. Η διοξυγονάση Pdo1 εντοπίστηκε σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία βενζοϊκού οξέος, φαινανθρενίου ή πυρενίου, ενώ η διοξυγονάση Pdo2 εντοπίστηκε σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν μόνο παρουσία πυρενίου ή φαινανθρενίου. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η επαγωγή της έκφρασης των δύο ενζύμων εξαρτάται από την πηγή άνθρακα παρουσία της οποίας αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός και ότι η σύνθεση των καταβολικών ενζύμων επάγεται μάλλον από κάποιο μεταβολίτη της πορείας αποδόμησης ενός PAH και όχι πάντα από τον ίδιο τον PAH (Krinovok et al. 2003). Επίσης, ύστερα από πρωτογενή ανάλυση του στελέχους *Mycobacterium aromativorans* JS19b1^T, έχει αναφερθεί ότι τα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό του φαινανθρενίου ρυθμίζονται πολύ αυστηρά καθώς κανένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό του φαινανθρενίου δεν ανιχνεύθηκε σε κύτταρα του στελέχους *M. aromativorans* JS19b1^T όταν αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης ή πλήρους θρεπτικού μέσου (Seo et al. 2011). Επίσης, κανένα από τα υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου ένζυμα δεν ανιχνεύθηκε σε κύτταρα του στελέχους που αναπτύχθηκαν παρουσία φθαλικού οξέος, υποδηλώνοντας ότι οι PAH ή οι μεταβολίτες πριν το φθαλικό οξύ επάγουν τα καταβολικά ένζυμα (Seo et al. 2011). Οι μελέτες της ρύθμισης της μεταγραφής είναι περιορισμένες στα Gram θετικά βακτήρια και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την αποσαφήνιση των ρυθμιστικών μηχανισμών. Αντίθετα έχει αναφερθεί ότι το σαλικυλικό οξύ αποτελεί επαγωγέα της μεταγραφής των καταβολικών ενζύμων της ανώτερης πορείας καταβολισμού των αρωματικών ενώσεων στα Gram αρνητικά βακτήρια (Peng et al. 2008).

Η διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος

Ο καταβολισμός του φαινανθρενίου στα βακτήρια πραγματοποιείται μέσω δύο διαφορετικών πορειών, είτε μέσω της πορείας του *o*-φθαλικού, είτε μέσω της πορείας του 1,2-διϋδροξυναφθαλενίου. Πρόδρομη ένωση και των δύο πορειών αποτελεί το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, το οποίο είτε θα μετατραπεί σε 1,2-διϋδροξυναφθαλένιο μέσω υδροξυλίωσης που σηματοδοτεί την πορεία του 1,2-διϋδροξυναφθαλενίου, είτε θα μετατραπεί σε 2-καρβοξυβενζαλδεϋδη του πυροσταφυλικού οξέος με τη δράση της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος που σηματοδοτεί την πορεία του *o*-φθαλικού (πιο αναλυτικά Κεφάλαιο 1.4).

Το 1999 οι Saito και συνεργάτες αναγνώρισαν τα υπεύθυνα γονίδια για τη μετατροπή του φαινανθρενίου σε 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ στο στέλεχος *Nocardioides* sp. KP7, τα οποία εντοπίζονται σε συστάδα καθοδικά των υπεύθυνων γονιδίων για τη μετατροπή του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος σε φθαλικό οξύ (Saito et al. 1999).

Στο *Srhe3* τα γονίδια που κωδικεύουν για τη διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος είναι το *diox1* (ASrhe3_40250), το οποίο εντοπίζεται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο pASPHE301 (Σχήμα 3.3) και το γονίδιο *diox2* ASrhe3_22020, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα (Vandera et al. 2012).

Και οι δύο διοξυγονάσες του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος στο *Srhe3* παρουσιάζουν παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες και εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλο ποσοστό ομολογίας σε νουκλεοτιδικό επίπεδο της τάξης του 90 % σε επίπεδο αμινοξέων και έχει διατυπωθεί η υπόθεση της αντιγραφικής μετάθεσης (Vandera et al. 2012) για τα γονίδια αυτά. Επιπλέον, παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης, όταν τα κύτταρα του στελέχους *Srhe3* αναπτύσσονται τόσο παρουσία φαινανθρενίου όσο και φθαλικού οξέος (Vandera et al. 2015). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταγραφή του *diox1* (ASrhe3_40250), το οποίο εντοπίζεται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο pASPHE301 (σχήμα 3.3).

Η αλληλουχία της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Srhe3* βρέθηκε να έχει ομολογία μεγαλύτερη του 75 % με την 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου του στελέχους *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* και με την διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Nocardioides* sp. KP7, με τις οποίες εμφάνισε συντηρημένες περιοχές όπως αυτές απεικονίζονται στο σχήμα της ομοπαράθεσης του Σχήμα ClustalO 3.

Προηγούμενη μελέτη της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Srhe3* όταν αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου προτείνει ότι το στέλεχος αυτό μεταβολίζει το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ μέσω του σχηματισμού της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεϋλδης του πυροσταφυλικού οξέος, καθώς ανιχνεύθηκε η δράση τόσο της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος όσο και η δράση της αφυδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεϋλδης του πυροσταφυλικού οξέος σε κύτταρα *Srhe* που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινανθρενίου. Την υπόθεση αυτή ενισχύει η απουσία της δράσης της υδροξυλάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος και της υδροξυλάσης του σαλικυλικού οξέος, ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία του σαλικυλικού οξέος (πορεία του 1,2-διυδροξυναφθαλενίου, Σχήμα 1.5). Φαίνεται λοιπόν, ότι στο *Srhe3* η πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου προχωράει μέσω φθαλικού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Vandera et al. 2012).

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος *diox1*, απέδειξε ότι επάγεται η μεταγραφή του όχι μόνο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία φαινανθρενίου (22 φορές), αλλά επίσης και παρουσία φθαλικού ή πρωτοκατεχοϊκού οξέος (16 και 10 φορές, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.8). Αντίθετα, παρουσία του γεντισικού οξέος δεν φάνηκε να επάγεται η μεταγραφή του. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, όπου φαίνεται ότι η πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου προχωράει μέσω φθαλικού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Vandera et al. 2015).

Παρόμοια αποτελέσματα απέδειξε μελέτη της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος στο στέλεχος *Pseudomonas* sp. PPD, όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προτείνουν ότι το στέλεχος *Pseudomonas* sp. PPD μεταβολίζει το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ μέσω του σχηματισμού της

trans-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος, καθώς ανιχνεύθηκε η δράση της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, της αφυδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος, διοξυγονάσεων του φθαλικού οξέος και της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Deveryshetty & Phale 2009).

Η μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου *diox1* του Sphe3 παρουσία βενζοϊκού οξέος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, καθώς το βενζοϊκό οξύ δεν αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη της ανωτέρω πορείας. Είναι όμως πιθανόν κάποιος ενδιάμεσος μεταβολίτης του καταβολισμού του βενζοϊκού οξέος να συμμετέχει στην μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου αυτού.

Στο στέλεχος *Nocardia otitidiscaviarum* TSH1 ανιχνεύθηκε το βενζοϊκό οξύ ως ένας από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες στην πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου, όταν κύτταρα του στελέχους αναπτύχθηκαν παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας (Zeinali et al. 2008). Η ανίχνευση των υπόλοιπων μεταβολιτών (1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, φθαλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) υποδεικνύουν σαν πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου την πορεία του φθαλικού. Η συνύπαρξη του βενζοϊκού και του φθαλικού οξέος έχει αναφερθεί στον καταβολισμό του ναφθαλενίου από το θερμόφιλο *Bacillus thermoleovorans* (Annweiler et al. 2000) και στον καταβολισμό του φλουορανθενίου στα *Mycobacterium* sp. PYR-1 και *Pasteurella* sp. IFA (Kelley et al. 1993; Seric et al. 1998) και έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η παρουσία του βενζοϊκού οξέος προκύπτει από περαιτέρω αποκαρβοξυλίωση του φθαλικού οξέος (Zeinali et al. 2008).

Οι διοξυγονάσεις του πρωτοκατεχοϊκού οξέος

Όπως έχει αναφερθεί, το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 φαίνεται να καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του φθαλικού οξέος, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

Στο στέλεχος Sphe3 ο περαιτέρω καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού πραγματοποιείται είτε μέσω 3,4-διοξυγόνωσης (*ortho*-σχάση ή πορεία του β-κετοαδιπικού), είτε 4,5-διοξυγόνωσης (*meta*-σχάση) και σχάση του αρωματικού πυρήνα (Σχήμα 1.12). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την *ortho*-σχάση, *pca34a* και *pca34b*, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος εντοπίζονται στο χρωμόσωμα και το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη *meta*-σχάση, *pca45ab*, εντοπίζεται στο πλασμίδιο rASPH302. Η παρουσία και των δύο πορειών στο Sphe3 επιβεβαιώθηκε με πρωτεωμική ανάλυση με την αναγνώριση όλων των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτές τις πορείες, αλλά και με τον προσδιορισμό της δράσης των διοξυγονάσεων της *ortho*- και *meta*-σχάσης σε εκχυλίσματα κυττάρων (Vandera et al. 2015).

Τα γονίδια που συμμετέχουν στις αντιδράσεις *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος συνιστούν συστάδα μοριακού μεγέθους ~7.5kb (Σχήμα 3.5). Μεταξύ των γονιδίων αυτών εντοπίζεται και το υπό μελέτη, στην παρούσα εργασία, γονίδιο της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, *pca45ab*. Ανοδικά του οπερονίου εντοπίζεται γονιδιακή περιοχή που κωδικεύει για τον πιθανό μεταγραφικό ρυθμιστή του, *pca45reg* (Σχήμα 3.5).

Η ομοπαράθεση της αλληλουχίας της α υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο ClustalOmega με ομόλογες αλληλουχίες έδειξε την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών μεταξύ των στελεχών *Arthrobacter* sp. OY3WO11,

Pseudarthrobacter phenanthrenivorans, *Arthrobacter* sp. Leaf137, *Pseudarthrobacter equi*, *Arthrobacter* sp. Soil764 και *Arthrobacter* sp. 135MFC05.1 (Σχήμα ClustalO 4).

Η αλληλουχία της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος ομοπαράτεθηκε με τις αλληλουχίες της α υπομονάδας της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος των στελεχών *Microbacterium* sp. 67-17, *Microbacterium* sp. RU33B, *Microbacterium oleivorans*, *Arthrobacter* sp. J3.49 και με τις αλληλουχίες της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος των στελεχών *Microbacterium oleivorans*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans* και *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* και εντοπίστηκαν συντηρημένες περιοχές μεταξύ τους (Σχήμα ClustalO 6).

Συντηρημένες περιοχές ανιχνεύθηκαν και μεταξύ του πιθανού μεταγραφικού ρυθμιστή και ομόλογών του πρωτεϊνών, που ανήκουν στην οικογένεια μεταγραφικών ρυθμιστών LysR, από στελέχη του γένους *Arthrobacter* και *Microbacterium* (Σχήμα ClustalO 7).

Η μελέτη της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν τις διοξυγονάσεις του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο Sph3 απέδειξε ότι ο καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού πραγματοποιείται κυρίως μέσω της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού όταν το Sph3 αναπτύσσεται σε υπόστρωμα φαινανθρένιο, φθαλικό ή πρωτοκατεχοϊκό, αφού η μεταγραφή του γονιδίου *rsa45ab* επάγεται 190, 275 και 416 αντίστοιχα (Γράφημα 3.10, Πίνακας 3.9). Η μεταγραφή των γονιδίων που συμμετέχουν στην *ortho*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (γονίδια *rsa43a* και *rsa34b*) παρουσιάζει επίσης επαγωγή παρουσία φαινανθρενίου, φθαλικού ή πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε σχέση με το υπόστρωμα της γλυκόζης αλλά πολύ μικρότερη από το γονίδιο *rsa45ab* που είναι υπεύθυνο για την *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα του Sph3 αναπτύσσονται παρουσία βενζοϊκού οξέος φαίνεται ότι προτιμάται η *ortho*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, αφού παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων *rsa34a* και *rsa34b* (62 και 91 φορές) σε σχέση με το γονίδιο *rsa45ab* του οποίου η μεταγραφή αυξάνεται 28 φορές σε σχέση με τη γλυκόζη ως υπόστρωμα (Γράφημα 3.10-Πίνακας 3.9).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου προχωράει κυρίως μέσω της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και είναι σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα πρωτεωμικής ανάλυσης (Vandera et al. 2015). Η μεταγραφή των γονιδίων της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος εμφανίζει μια μικρή αύξηση και παρουσία του γεντισικού οξέος (Γράφημα 3.10-Πίνακας 3.9), που δείχνει έναν πιθανό ρόλο του γεντισικού στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων αυτών, κάτι που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα που δείχνει ότι δεν υπάρχει μεταγραφή των γονιδίων *rsa34a* και *rsa34b*, που είναι υπεύθυνα για την *ortho*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, παρουσία του γεντισικού οξέος, αποκλείοντας μάλλον τη πιθανότητα ύπαρξης συμμετοχής του στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών.

Η παρουσία γονιδίων υπεύθυνων για τη *ortho*-σχάση και τη *meta*-σχάση αρωματικών ενώσεων στο ίδιο στέλεχος συνδέεται με την ικανότητα των μικροοργανισμών να καταβολίζουν ποικίλες αρωματικές ενώσεις, μέσω ευέλικτου μεταβολισμού. Το στέλεχος *Nocardia otitidiscaviarum* TSH1 καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του

φθαλικού και στη συνέχεια το πρωτοκατεχοϊκό οξύ υπόκειται *ortho*- και *meta*-σχάση (Zeinali et al. 2008). Έχει αναφερθεί η ύπαρξη *meta* και *ortho* πορείας καταβολισμού αρωματικών ενώσεων και στο *Sphingobium* sp. HV3. Οι *meta*- και *ortho*-πορείες έδειξαν διαφορική έκφραση αποδεικνύοντας ότι ο περίπλοκος μηχανισμός αποδόμησης στο *Sphingobium* sp. HV3 ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής (Sirila et al. 2010). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων ανάλογα με το υπόστρωμα ανάπτυξης των κυττάρων ώστε να αποφεύγεται ο ατελής καταβολισμός με συνέπεια την ύπαρξη τοξικών για τα κύτταρα μεταβολιτών.

Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων *pca*, που κωδικεύουν τα ένζυμα ηλεκτυλο-CoA τρανσφεράση του β-κετοαδιπικού, θειολάση β-κετοαδιπυλο-CoA, 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού, κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος και υδρολάση ενολο-λακτόνης β-κετοαδιπικού τα οποία συμμετέχουν στην πορεία του β-κετοαδιπικού οξέος, επάγεται από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες της πορείας (Harwood & Parales, 1996). Ωστόσο μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην επαγωγή από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες. Για παράδειγμα, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ επάγει την έκφραση όλων των γονιδίων της πορείας του πρωτοκατεχοϊκού στο στέλεχος *A. Calcoaceticus* (Canovas & Stanier 1967) ενώ κανένα από τα γονίδια *pca* δεν επάγεται στα βακτήρια *Nocardia* (Rann & Cain 1973) ή *Agrobacterium* (Parke 1993).

Η πορεία μετατροπής του βενζοϊκού μέσω του 3-υδροξυβενζοϊκού προς σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει αποδειχθεί για το στέλεχος *Rhodopseudomonas palustris* ενώ στο στέλεχος *Aspergillus niger* φαίνεται ότι μετατρέπεται μέσω του 4-υδροξυβενζοϊκού (Grant & Patel 1969).

Μελέτη των Romero-Silva και συνεργατών για το χαρακτηρισμό των καταβολικών πορειών του γεντισικού και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος *Burkholderia xenovorans* LB400 απέδειξε ότι ο καταβολισμός του βενζοϊκού οξέος μέσω του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος ακολουθεί την πορεία του πρωτοκατεχοϊκού, αλλά και την πορεία του γεντισικού οξέος (Romero-Silva et al. 2013).

Υπάρχουν βακτηριακά στελέχη στα οποία έχει αποδειχθεί η ύπαρξη μόνο της πορείας του β-κετοαδιπικού, όπως το *A. tumefaciens* A348 (Harwood & Parales, 1996). Οι Shen και Liu ταυτοποίησαν το γονίδιο *ncg12314-ncg12315* (*pcaHG*) που κωδικεύει για την 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, στο στέλεχος *Corynebacterium glutamicum* και πρότειναν ότι ο καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος στο συγκεκριμένο στέλεχος πραγματοποιείται μέσω της πορείας του β-κετοαδιπικού οξέος (Shen & Liu 2005).

Στα στελέχη *R. wratislaviensis* P1 και G10, κύτταρα των οποίων αναπτύχθηκαν παρουσία βενζοϊκού οξέος παρατηρήθηκε δραστηριότητα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης, κάτι που υποδηλώνει ότι για τον καταβολισμό του βενζοϊκού ίσως ακολουθούνται δυο πορείες αποδόμησης προς σχηματισμό των ενδιάμεσων μεταβολιτών πρωτοκατεχοϊκό οξύ και κατεχόλη (Solyanikova et al. 2015).

Πρωτεωμική ανάλυση και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας στο στέλεχος *Comamonas testosteroni* CNB-1 έδειξαν ότι ο καταβολισμός του 3- και του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος πραγματοποιείται μέσω της πορείας της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα τύπου LysR και παρατηρήθηκε επαγωγή του, όταν το *C. testosteroni* CNB-1 αναπτύσσεται παρουσία του 3- και του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος και φάνηκε να αποτελεί πιθανό ρυθμιστή της πορείας της 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Ni et al. 2013).

Το γονίδιο του πιθανού μεταγραφικού ρυθμιστή *pca45reg* στο στέλεχος *Srhe3* φαίνεται να εκφράζεται μόλις 3 φορές στο φαινανθρένιο, 14 στο φθαλικό, 17 στο πρωτοκατεχοϊκό, 9 στο βενζοϊκό και 5 στο γεντισικό σε σχέση με τη γλυκόζη. Από τη φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι ο πιθανός μεταγραφικός παράγοντας, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *pca45reg*, βρίσκεται κοντά εξελικτικά σε μεταγραφικούς παράγοντες τύπου LysR (Σχήμα 3.14). Στην πρωτεωμική ανάλυση του *Srhe3* ο μεταγραφικός ρυθμιστής της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, LysR, ανιχνεύθηκε μεν, αλλά δεν ήταν μεταξύ των σημαντικά ρυθμισμένων πρωτεϊνών (Vandera et al. 2015). Περαιτέρω μελέτες αποσιώπησης του γονιδίου *pca45reg* θα μπορούσαν να ρίξουν φως στον έλεγχο που ασκεί στο οπερόνιο των γονιδίων που συμμετέχουν στις αντιδράσεις *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, μελετώντας την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου.

Οι διοξυγονάσεις του γεντισικού οξέος και της κατεχόλης

Οι περισσότερες πορείες αποδόμησης συγκλίνουν σε κατεχολικά υποστρώματα τα οποία υπόκεινται είτε *ortho*- είτε *meta*-σχάση από ενδοδιολικές ή εξωδιολικές διοξυγονάσεις αντίστοιχα (Díaz et al. 2013). Ωστόσο υπάρχουν βακτηριακές καταβολικές πορείες που δεν περιλαμβάνουν ως ενδιάμεσο μεταβολίτη την κατεχόλη, αλλά γεντισικό οξύ, ομογεντισικό οξύ ή μονοϋδροξυλιωμένα αρωματικά οξέα που αποτελούν υποστρώματα για τη δράση εξωδιολικών διοξυγονασών σχάσης αρωματικού πυρήνα (Fetzner 2012) (Πιο αναλυτικά Παράγραφος 1.9).

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού οξέος του στελέχους *Srhe3* σε μεταγραφικό επίπεδο απέδειξε αυξημένη έκφραση όταν το *Srhe3* αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου, πρωτοκατεχοϊκού και γεντισικού οξέος (Γράφημα 3.11, Πίνακας 3.10). Φαίνεται ότι η διοξυγονάση του γεντισικού οξέος συμμετέχει, αν και σε πολύ μικρότερο βαθμό, στο καταβολισμό του φαινανθρενίου. Είναι δηλαδή πιθανόν να συνυπάρχει ως περιφερειακή πορεία αποδόμησης του φαινανθρενίου η πορεία μέσω γεντισικού οξέος. Αυτό το εύρημα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δεν έχει αναφερθεί για το γένος *Arthrobacter*, και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε έρευνα στο αλόφιλο στέλεχος *Martelella* AD-3, όπου μελετήθηκαν τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού παρουσία φαινανθρενίου και γεντισικού ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου 1,2-διοξυγονάσης του γεντισικού αυξήθηκαν κατά 6.5 φορές κατά τη διαδικασία αποδόμησης του φαινανθρενίου και 80.4 φορές παρουσία γεντισικού οξέος (Huang et al. 2015). Η συμμετοχή του γεντισικού οξέος στην αποδόμηση του φαινανθρενίου έχει αναφερθεί επίσης σε κύτταρα του στελέχους *Burkholderia* sp. C3 το οποίο είναι ικανό να καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω δύο πορειών. Η αρχική

υδροξυλίωση του φαινανθρενίου μπορεί να πραγματοποιηθεί στις θέσεις C-1,2 και C-3,4 και οι πορείες αυτές να συγκλίνουν στο σχηματισμό της 1,2-διόλης του ναφθαλενίου, η οποία μεταβολίζεται περαιτέρω είτε μέσω *ortho*-σχάσης προς σχηματισμό φθαλικού οξέος (πορεία του φθαλικού οξέος), είτε μέσω *meta*-σχάσης προς σχηματισμό γεντισικού οξέος (πορεία του γεντισικού οξέος) (Seo et al. 2007). Ομοίως το στέλεχος *Salmonella typhimurium* χρησιμοποιεί την πορεία του γεντισικού οξέος για να καταβολίζει το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το γεντισικό οξύ. Οι υδροξυλίωση του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος και 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού επάγονται όταν τα κύτταρα του στελέχους αναπτύσσονται παρουσία είτε 3-υδροξυβενζοϊκού είτε γεντισικού οξέος (Goetz & Harmuth 1992). Επίσης το στέλεχος *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038 είναι ικανό να αναπτύσσεται παρουσία ναφθαλενίου και 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος ως μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας και για τον καταβολισμό αυτών των αρωματικών ενώσεων ακολουθείται η πορεία του γεντισικού οξέος (Liu et al. 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα που υποδεικνύει την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (*cat12cr*) στο στέλεχος *Srhe3* παρουσία όλων των αρωματικών υποστρωμάτων, κάτι που υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή του γονιδίου αυτού στον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων στο *Srhe3* (Γράφημα 3.12, Πίνακας 3.11). Το αποτέλεσμα αυτό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, διότι τα κύτταρα του *Srhe3* δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία κατεχόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας. Ιδιαίτερα, η έκφραση του *cat12cr* εμφανίζει τεράστια αύξηση (4913 φορές, Πίνακας 3.11) όταν τα κύτταρα του *Srhe3* αναπτύσσονται παρουσία βενζοϊκού οξέος σε σχέση με την ανάπτυξή τους παρουσία γλυκόζης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τις περισσότερες μελέτες που αναφέρουν ότι ο καταβολισμός του βενζοϊκού οξέος στα βακτήρια προχωράει μέσω του σχηματισμού κατεχόλης και στη συνέχεια την οξειδωσή της μέσω της *ortho* σχάσης του πυρήνα (Urszula et al. 2009, Solyanikova et al. 2015). Η πορεία καταβολισμού του βενζοϊκού έχει επίσης αναφερθεί, όπως και για άλλες πορείες, ότι επάγεται από το υπόστρωμα (Karandikar et al. 2015).

Στο στέλεχος *B. Xenovorans* LB400 έχουν εντοπιστεί δύο πορείες αερόβιας αποδόμησης του βενζοϊκού οξέος. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη από αυτές τις πορείες είναι η πορεία της κατεχόλης, η οποία περιλαμβάνει την υδροξυλίωση του βενζοϊκού οξέος από μια διοξυγονάση και την *ortho*-σχάση της κατεχόλης από μια άλλη διοξυγονάση. Μια δεύτερη πορεία περιλαμβάνει τη διυδροξυλίωση του βενζοϋλ-CoA από μια διοξυγονάση, η οποία κωδικοεύεται από δύο γονιδιακούς τόπους, ένας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα (*boxc*) και ένας στο μεγάλο πλασμίδιο (*boxM*). Μελέτες απέδειξαν ότι οι πορείες επάγονται εξαρτώμενες από το υπόστρωμα: η πορεία της κατεχόλης προτιμάται όταν τα κύτταρα του LB400 αναπτύσσονται παρουσία βενζοϊκού οξέος, ενώ όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία διφαινυλίου προτιμάται η πορεία που δρα η-κωδικοεύομενη από το χρωμόσωμα-διοξυγονάση του βενζοϋλ-CoA (Denef et al. 2005).

Μελέτες σε κύτταρα του στελέχους *Acinetobacter radioresistens* S13 απέδειξαν ότι μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία βενζοϊκού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας και παρατηρήθηκε δραστηριότητα των 1,2-διοξυγονάση του βενζοϊκού και 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης. Μελετήθηκε, επιπλέον, η έκφραση των γονιδίων που διασπούν το βενζοϊκό οξύ σε κατεχόλη και περαιτέρω την κατεχόλη και παρατηρήθηκε στενή σύνδεση μεταξύ αυτών

των γονιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη και την έλλειψη πιθανών ρυθμιστικών στοιχείων μεταξύ των δύο ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) των παραπάνω γονιδίων, προτάθηκε ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη μετατροπή του βενζοϊκού σε κατεχόλη (γονίδια *benz*) και τα γονίδια που διασπούν την κατεχόλη (γονίδια *cat*) εκφράζονται συντονισμένα στο στέλεχος *A. radioresistens* S13 (Carosio et al. 2002).

Η τεράστια επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της 1,2 διοξυγονάσης της κατεχόλης στο στέλεχος *Srhe3* παρουσία βενζοϊκού οξέος ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας, ενώ τα κύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχούν παρουσία κατεχόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας, είναι πιθανόν να οφείλεται στην μη ύπαρξη κάποιου μεταφορέα της κατεχόλης εντός των κυττάρων.

Κάτι ανάλογο έχει αναφερθεί για τη μη ανάπτυξη κυττάρων *Burkholderia xenovorans* LB400 παρουσία 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Romero-Silva et al. 2013). Το *B. xenovorans* LB400 μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (5 mM) ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας, αλλά όχι παρουσία 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος (5 mM), κάτι που πιθανώς οφείλεται σε αποτελεσματική μεταφορά του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος και μη επαρκή μεταφορά του 3-υδροξυβενζοϊκού οξέος μέσα στα κύτταρα (Romero-Silva et al. 2013).

4.2 Μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταγραφή του γονιδίου της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού που εντοπίζεται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο *rASpHE301* του στελέχους *Srhe3*, όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης (22.2 mM), φαινανθρενίου (1.12 mM), φθαλικού οξέος (15 mM), πρωτοκατεχοϊκού οξέος (5 mM), βενζοϊκού οξέος (5 mM), γεντισικού οξέος (5 mM). Εκκρεμεί, ωστόσο, η μελέτη της σχέσης του με το αντίστοιχο γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα και του τρόπου που μπορεί να επηρεάζουν την πορεία αποδόμησης του φαινανθρενίου.

Επιπλέον, στο στέλεχος *Srhe3* εκκρεμεί η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού (*Asrhe3_35160*) ώστε να διασαφηνιστεί η πορεία καταβολισμού του βενζοϊκού οξέος, καθώς στην παρούσα εργασία δεν κατέστη δυνατή.

Μελετήθηκε μεταγραφικά η έκφραση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης σε διάφορα υποστρώματα, δίνοντας έτσι μια αρχική εικόνα για την *ortho*-σχάση της κατεχόλης. Παρόλαυτα, εκκρεμεί η μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου της 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης, υπεύθυνης για την *meta*-σχάση της κατεχόλης.

Παρουσία βενζοϊκού οξέος και γεντισικού οξέος το στέλεχος *Srhe3* φαίνεται να χρησιμοποιεί διαφορετικές καταβολικές πορείες και περαιτέρω μελέτες τόσο σε πρωτεωμικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο μεταβολιτών θα ρίξουν φως στις διάφορες καταβολικές πορείες που λαμβάνουν χώρα στο στέλεχος *Srhe3*.

Η διευκρίνιση αυτών των καταβολικών πορειών θα οδηγήσει σε μια βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών βιοαποδόμησης που χρησιμοποιεί το *Srhe3* για τον καταβολισμό διαφόρων αρωματικών, πολυκυκλικών και μη, ενώσεων που πολλές από αυτές, χαρακτηρίζονται ξενοβιοτικές και αποτελούν περιβαλλοντικούς ρυπαντές. Η κατανόηση

αυτή θα συνεισφέρει στο σχεδιασμό αποδοτικότερων μεθόδων βιοαποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών.

Βιβλιογραφία

- Abdel-shafy, H.I. & Mansour, M.S.M., 2016. Review. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source , environmental impact , effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), pp.107–123.
- Akyüz, M. & Çabuk, H., 2010. Gas–particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey. *Science of The Total Environment*, 408(22), pp.5550–5558.
- Annweiler, E. et al., 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene- derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), pp.518–523.
- Ashikawa, Y. et al., 2006. Electron Transfer Complex Formation between Oxygenase and Ferredoxin Components in Rieske Nonheme Iron Oxygenase System. *Structure*, 14(12), pp.1779–1789.
- Backman, A. & Jansson, J.K., 2004. Degradation of 4-Chlorophenol at Low Temperature and during Extreme Temperature Fluctuations by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Microbial Ecology*, 48(2), pp.246–253.
- Baitsch, D. et al., 2001. Gene Cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* Involved in Degradation of the Plant Alkaloid Nicotine: Cloning, Purification, and Characterization of 2,6-Dihydroxypyridine 3-Hydroxylase. *Journal of Bacteriology*, 183(18), pp.5262–5267.
- Baklanov, A. et al., 2006. Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 6(2), pp.1867– 1913.
- Bamforth, S.M. & Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(7), pp.723–736.
- Barnett, N.P. et al., 2010. Moderators and mediators of two brief interventions for alcohol in the emergency department. *Addiction (Abingdon, England)*, 105(3), pp.452–65.
- Batie, C.J., LaHaie, E. & Ballou, D.P., 1987. Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of biological chemistry*, 262(4), pp.1510–1518.
- Boll, M. et al., 2014. Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environmental microbiology*, 16(3), pp.612–627.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E. & Moore, E.R., 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 245(1), pp.65–74.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E. & Moore, E.R., 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 236(1), pp.149–157.
- Boylen, C.W., 1973. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* During Prolonged Periods of Extreme Desiccation. *Journal of Bacteriology*, 113(1), pp.33–37.

- Boylen, C.W. & Ensign, J.C., 1970. Intracellular Substrates for Endogenous Metabolism During Long-Term Starvation of Rod and Spherical Cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *Journal of Bacteriology*, 103(3), pp.578–587.
- Bugg, T.D.H. & Lin, G., 2001. Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: how do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chemical Communications*, (11), pp.941–952
- Bustin, S.A. et al., 2005. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), pp.597–601.
- Cacciari, I. & Lippi, D., 1987. Arthrobacters: Successful arid soil bacteria: A review. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 1(1), pp.1–30.
- Canovas, J.L. & Stanier, R.Y., 1967. Regulation of the enzymes of the beta-ketoadipate pathway in *Moraxella calcoacetica*. 1. General aspects. *European journal of biochemistry*, 1(3), pp.289–300.
- Cao, B., Nagarajan, K. & Loh, K.-C., 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), pp.207–228.
- Caposio, P. et al., 2002. Cloning and characterization of two catechol 1, 2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. , 153, pp.69–74.
- Carmona, M. et al., 2009. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), pp.71–133.
- Carvalho, M.F. et al., 2006. Degradation of Fluorobenzene by *Rhizobiales* Strain F11 via ortho Cleavage of 4-Fluorocatechol and Catechol. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), pp.7413–7417.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2–3), pp.351–368.
- Cerniglia, C.E., 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in applied microbiology*, 30, pp.31–71.
- Chan, E.C. & Johnson, M.B., 1966. Growth of *Arthrobacter citreus* at an elevated temperature. I. Promotion by associated microorganisms. *Canadian journal of microbiology*, 12(3), pp.581–584.
- Chang, H.-K. & Zylstra, G.J., 2008. Examination and expansion of the substrate range of m-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(1), pp.149–153.
- Coates, J.D., Anderson, R.T. & Lovley, D.R., 1996. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions. *Applied and environmental microbiology*, 62(3), pp.1099–1101.
- Conn, H.J. & Dimmick, I., 1947. Soil Bacteria Similar in Morphology to Mycobacterium and Corynebacterium. *Journal of bacteriology*, 54(3), pp.291–303.
- Contzen, M. & Stolz, A., 2000. Characterization of the genes for two protocatechuate 3, 4-dioxygenases from the 4-sulfocatechol-degrading bacterium *Agrobacterium radiobacter* strain S2. *Journal of bacteriology*, 182(21), pp.6123–6129.

- Corbella, M.E. & Puyet, A., 2003. Real-time reverse transcription-PCR analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), pp.2269–2275.
- Crawford, R.L., Bromley, J.W. & Perkins-Olson, P.E., 1979. Catabolism of protocatechuate by *Bacillus macerans*. *Applied and environmental microbiology*, 37(3), pp.614–618.
- Dagley, S., Evans, W.C. & Ribbons, D.W., 1960. New Pathways in the Oxidative Metabolism of Aromatic Compounds by Micro-Organisms. *Nature*, 188(4750), pp.560–566.
- Denef, V.J. et al., 2005. Growth Substrate- and Phase-Specific Expression of Biphenyl, Benzoate, and C1 Metabolic Pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Journal of Bacteriology*, 187(23), pp.7996–8005.
- Deveryshetty, J. & Phale, P.S., 2009. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PPD: Purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid dioxygenase. *Microbiology*, 155(9), pp.3083–3091.
- Di-Toro, D.M., McGrath, J. a & Hansen, D.J., 2000. Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria.I. Water and tissue. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(8), pp.1951–1970.
- Díaz, E., Jiménez, J.I. & Nogales, J., 2013. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), pp.431–442.
- Dobbs, K. & Hansen, P., 2006. Guide to using the Bio Rad CFX96 Real-Time PCR Machine.
- Edwards, A., 1983. Research Studies in the Problems of Assessment. *Journal of Analytical Psychology*, 28(4), pp.299–311.
- Fetzner, S., 2012. Ring-Cleaving Dioxygenases with a Cupin Fold. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), pp.2505–2514.
- Foght, J., 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2–3), pp.93–120.
- Fong, N.J. et al., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5–6), pp.750–756.
- Fredrickson, J.K. et al., 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), pp.4230–4241.
- Gan, S., Lau, E.V. & Ng, H.K., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), pp.532–549.
- Ghosal, D. et al., 2016. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(August), pp.1369.
- Goetz, F.E. & Harmuth, L.J., 1992. Gentisate pathway in *Salmonella typhimurium*: metabolism of *m*-hydroxybenzoate and gentisate. *FEMS Microbiology Letters*, 76(1–2), pp.45–9.

van Gorcom, R.F. et al., 1990. Isolation and molecular characterisation of the benzoate-para-hydroxylase gene (bphA) of *Aspergillus niger*: a member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. *Molecular & general genetics : MGG*, 223(2), pp.192–197.

Goyal, A.K. & Zylstra, G.J., 1997. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5–6), pp.401–407.

Grant, D.J. & Patel, J.C., 1969. Determination of each constituent in mixtures of catechol and protocatechuic acid, quinol and gentisic acid, phenol and *p*-hydroxybenzoic acid, and pryrogallol and gallic acid. *Analytical biochemistry*, 28(1), pp.139–149.

Grifoll, M. et al., 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and environmental microbiology*, 58(9), pp.2910–2917.

Habe, H. & Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(2), pp.225–243.

Hammann, R. & Kutzner, H.J., 1998. Key enzymes for the degradation of benzoate, *m*- and *p*-hydroxybenzoate by some members of the order Actinomycetales. *Journal of basic microbiology*, 38(3), pp.207–220.

Hanbo, Z. et al., 2004. Genetic and physiological diversity of phylogenetically and geographically distinct groups of *Arthrobacter* isolated from lead-zinc mine tailings. *FEMS microbiology ecology*, 49(2), pp.333–341.

Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E.L., 1992. Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. *Annual Review of Microbiology*, 46(1), pp.565–601.

Haritash, A.K. & Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), pp.1–15.

Harwood, C.S. & Parales, R.E., 1996. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), pp.553–590.

Hatta, T. et al., 2003. Characterization of a Novel Thermostable Mn(II)-dependent 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase from a Polychlorinated Biphenyl- and Naphthalene- degrading *Bacillus* sp. JF8. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp.21483–21492.

Higuchi, R. et al., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11(9), pp.1026–1030.

Hoover, Rachel (February 21, 2014). "Need to Track Organic Nano-Particles Across the Universe? NASA's Got an App for That". NASA.

Huang, L. et al., 2015. Identification and Characterization of a Novel Gentisate 1,2- Dioxygenase Gene from a Halophilic *Marteella* Strain. *Scientific Reports*, 5(March), p.14307.

Hudgins, D.M., Bauschlicher, Jr., C.W. & Allamandola, L.J., 2005. Variations in the Peak Position of the 6.2 μm Interstellar Emission Feature: A Tracer of N in the Interstellar Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Population. *The Astrophysical Journal*, 632, pp.316–332.

- Husserl, J., Spain, J.C. & Hughes, J.B., 2010. Growth of *Arthrobacter* sp. Strain JBH1 on Nitroglycerin as the Sole Source of Carbon and Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), pp.1689–1691.
- Iwagami, S.G., Yang, K. & Davies, J., 2000. Characterization of the Protocatechuic Acid Catabolic Gene Cluster from *Streptomyces* sp. Strain 2065. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), pp.1499–1508.
- Jain, R.K., Dreisbach, J.H. & Spain, J.C., 1994. Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4- benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Applied and environmental microbiology*, 60(8), pp.3030–3032.
- Janke, D. & Fritsche, W., 1985. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of basic microbiology*, 25(9), pp.603–619.
- Jiang, Y. et al., 2015. Genome Sequence of a Versatile Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium, *Arthrobacter* sp. W1. *Genome Announcements*, 3(2), pp.e00387-15.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y. & Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), pp.71–84.
- Johnson, M.R. et al., 2000. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 278(2), pp.175–184.
- Jorgensen, K.S., 2007. *In situ* bioremediation. *Advances in applied microbiology*, 61, pp.285– 305.
- Jouanneau, Y. et al., 2011. Ring-hydroxylating Dioxygenases Involved in PAH Biodegradation: Structure, Function, and Biodiversity. *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research*, pp.149–175.
- Jozefczuk, J. & Adjaye, J., 2011. Quantitative Real-Time PCR-Based Analysis of Gene Expression. In *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., pp. 99–109.
- Juhasz, A.L. & Naidu, R., 2000. Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. *Journal of applied microbiology*, 89(4), pp.642–650.
- Kallimanis, A. et al., 2009. *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2), pp.275–279.
- Kallimanis, A. et al., 2011. Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Standards in Genomic Sciences*, 4, pp.123–130.
- Kallimanis, A. et al., 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), pp.709–717.
- Kamimura, N. et al., 2010. Characterization of the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway Operon in *Comamonas* sp. Strain E6 and Discovery of a Novel Pathway Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), pp.8093–8101.
- Kanally, R.A. & Harayama, S., 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of bacteriology*, 182(8), pp.2059–2067.

- Karandikar, R., Badri, A. & Phale, P.S., 2015. Biochemical Characterization of Inducible 'Reductase' Component of Benzoate Dioxygenase and Phthalate Isomer Dioxygenases from *Pseudomonas aeruginosa* strain PP4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(2), pp.318–333.
- Kasai, Y. et al., 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Applied and environmental microbiology*, 69(11), pp.6688–6697.
- Kastner, M., 2000. Degradation of Aromatic and Polyaromatic Compounds. In *Biotechnology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 211–239.
- Kauppi, B. et al., 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure (London, England : 1993)*, 6(5), pp.571–586.
- Kelley, I. et al., 1993. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), pp.800– 806.
- Kiyohara, H. et al., 1982. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Applied and environmental microbiology*, 43(2), pp.458–461.
- Koch, C., Schumann, P. & Stackebrandt, E., 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali- Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *International journal of systematic bacteriology*, 45(4), pp.837–839.
- Koukkou AI, editor. Microbial Bioremediation of Non-metals. *Norfolk, UK: Caister Academic Press*; 2011/ Koukkou AI, Vandera E. Hydrocarbon-degrading Soil Bacteria: current research., p.93-117.
- Krivobok, S. et al., 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of bacteriology*, 185(13), pp.3828–3841.
- Kubista, M. et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), pp.95–125.
- Kweon, O. et al., 2008. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*, 9(1), pp.1–20.
- Latimer, J.S. & Zheng, J., 2003. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment. In *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7–33.
- Li, M. et al., 2013. Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, pp.577–582.
- Liu, S. et al., 2017. Bioresource Technology Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi : A mini review. *Bioresource Technology*, 224, pp.25–33.
- Liu, T.T. et al., 2011. Functional characterization of a gene cluster involved in gentisate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), pp.671–678.
- Liu, T.T. & Zhou, N.Y., 2012. Novel L-cysteine-dependent maleylpyruvate isomerase in the gentisate pathway of *Paenibacillus* sp. strain NyZ101. *Journal of Bacteriology*, 194(15), pp.3987–3994.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *METHODS*, 25, pp.402–408.

- Lowry, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–275.
- Macur, R.E. et al., 2004. Bacterial Populations Associated with the Oxidation and Reduction of Arsenic in an Unsaturated Soil. *Environmental Science & Technology*, 38(1), pp.104–111.
- Mallick, S., Chakraborty, J. & Dutta, T.K., 2011. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons : A review. , 37(June 2010), pp.64–90.
- Marston, C.P. et al., 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 22(7), pp.1077–1086.
- Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M., 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(1), pp.1–15.
- Masih, J. et al., 2010. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor atmosphere in the North central part of India. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), pp.190–198.
- Masih, J., 2012. Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. *Aerosol and Air Quality Research*, (November 2014), pp.515–525.
- Mastrangelo, G., Fadda, E. & Marzia, V., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental health perspectives*, 104(11), pp.1166–1170.
- Miyazawa, D., 2004. Genes for Mn(II)-dependent NahC and Fe(II)-dependent NahH located in close proximity in the thermophilic naphthalene and PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: cloning and characterization. *Microbiology*, 150(4), pp.993–1004.
- Monnet, C. et al., 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of Cheese. *PLoS ONE*, 5(11), p.e15489.
- Moody, J.D. et al., 2001. Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), pp.1476–1483.
- Mullis, K.B., 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*, 48(8), pp.579–582.
- Nakatsu, C.H. et al., 2013. Complete genome sequence of *Arthrobacter* sp. strain FB24. *Standards in genomic sciences*, 9(1), pp.106–116.
- Ni, B. et al., 2013. Assimilation of aromatic compounds by *Comamonas testosteroni* : characterization and spreadability of protocatechuate 4 , 5-cleavage pathway in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13), pp.6031–6041.
- Nojiri, H. et al., 2014. *Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve*. Tokyo: Springer Japan, pp.1-358.

- Parales, R.E. & Resnick, S.M., 2006. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. *Pseudomonas*, Vol4, pp.287-340.
- Parke, D., 1993. Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pcaQ* gene in response to beta-carboxy-cis,cis-muconate. *Journal of bacteriology*, 175(11), pp.3529–3535.
- Peng, R.-H. et al., 2010. A Profile of Ring-hydroxylating Oxygenases that Degrade Aromatic Pollutants. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*. United States, pp. 65–94.
- Peng, R.-H. et al., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), pp.927–955.
- Perera, F.P. et al., 2003. Effects of Transplacental Exposure to Environmental Pollutants on Birth Outcomes in a Multiethnic Population. *Environmental Health Perspectives*, 111(2), pp.201–205.
- Perez-Pantoja, D. et al., 2015. Hierarchy of Carbon Source Utilization in Soil Bacteria: Hegemonic Preference for Benzoate in Complex Aromatic Compound Mixtures Degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* Strain JMP134. *Applied and environmental microbiology*, 81(12), pp.3914–3924.
- Pérez-Pantoja, D., González, B. & Pieper, D.H., 2010. Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In K. N. Timmis, ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 799–837.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Prakash, O. & Lal, R., 2013. Role of unstable phenanthrene-degrading *Pseudomonas* species in natural attenuation of phenanthrene-contaminated site. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(1), pp.79–87.
- Que, L.J. & Reynolds, M.F., 2000. Manganese(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenases. *Metal ions in biological systems*, 37, pp.505–525.
- Rann, D.L. & Cain, R.B., 1973. Regulation of the Enzymes of Aromatic Ring Fission in the Genus *Nocardia*. *Biochemical Society Transactions*, 1(3), pp.658–661.
- Ravindra, K., Sokhi, R. & Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42(13), pp.2895–2921.
- Rice, H.R. & Baker, B.A., 2007. Workplace hazards to women's reproductive health. *Minnesota medicine*, 90(9), pp.44–47.
- Romero-Silva, M.J. et al., 2013. Genomic and Functional Analyses of the Gentisate and Protocatechuate Ring-Cleavage Pathways and Related 3-Hydroxybenzoate and 4-Hydroxybenzoate Peripheral Pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400 V. de Crécy-Lagard, ed. *PLoS ONE*, 8(2), p.e56038.
- Saito, A., Iwabuchi, T. & Harayama, S., 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 182(8), pp.2134–2141.
- Saito, A., Iwabuchi, T. & Harayama, S., 1999. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere*, 38(6), pp.1331–1337.

- Samanta, S.K., Chakraborti, A.K. & Jain, R.K., 1999. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1- naphthol. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(1), pp.98–107.
- Samanta, S.K., Singh, O. V. & Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), pp.243–248.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sasoh, M. et al., 2006. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), pp.1825–1832.
- Schell, M.A., 1985. Transcriptional control of the nah and sal hydrocarbon-degradation operons by the nahR gene product. *Gene*, 36(3), pp.301–309.
- Scholtz, R. et al., 1987. Degradation of Eighteen 1-Monohaloalkanes by *Arthrobacter* sp. Strain HA1. *Microbiology*, 133(2), pp.267–274.
- Seo, J. et al., 2006. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp . P1-1 : Initial its formation from naphthalene-1 , 2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere*, 65, pp.2388–2394.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S. & Li, Q.X., 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), pp.278–309.
- Seo, J., Keum, Y. & Li, Q.X., 2011. Comparative Protein and Metabolite Profiling Revealed a Metabolic Network in Response to Multiple Environmental Contaminants in *Mycobacterium aromativorans* JS19b1(T). *Journal of agricultural and food chemistry* 59(7), pp.2876– 2882.
- Seo, J.S. et al., 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation*, 18(1), pp.123–131.
- Sepic, E., Bricelj, M. & Leskovsek, H., 1998. Degradation of fluoranthene by *Pasteurella* sp. IFA and *Mycobacterium* sp. PYR-1:isolation and identification of metabolites. *Journal of applied microbiology*, 85(4), pp.746–754.
- Shen, X. & Liu, S., 2005. Key enzymes of the protocatechuate branch of the beta-ketoadipate pathway for aromatic degradation in *Corynebacterium glutamicum*. *Science in China. Series C, Life sciences*, 48(3), pp.241–249.
- Shou, M., Gonzalez, F.J. & Gelboin, H. V, 1996. Stereoselective Epoxidation and Hydration at the K-Region of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by cDNA-expressed Cytochromes P450 1A1 , 1A2 , and Epoxide Hydrolase. *Biochemistry*, 35(49), pp.15807–15813.
- Simon, M.J. et al., 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127(1), pp.31–37.
- Sipila, T.P. et al., 2010. *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using ortho- and meta-pathways with differential expression shown by RT- PCR. *Biodegradation*, 21(5), pp.771–784.

- Solyanikova, I.P., Emelyanova, E. V, et al., 2015. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100, pp.155–164.
- Stegeman, J.J. et al., 2001. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environmental science & technology*, 35(1), pp.54–62.
- Stevenson, I.L., 1961. Growth studies on *Arthrobacter globiformis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 7(4), pp.569–575.
- Stryer, L., 1988. Molecular basis of visual excitation. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp. 283–294.
- Sverdrup, L.E., Nielsen, T. & Krogh, P.H., 2002. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental science & technology*, 36(11), pp.2429–2435.
- Tropel, D. & van der Meer, J.R., 2004. Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp.474–500.
- Unell, M. et al., 2008. Degradation of mixtures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Biodegradation*, 19(4), pp.495–505.
- Urszula, G. et al., 2009. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40(2), pp.285–291.
- Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T. & Eltis, L.D., 2006. The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), pp.241–267.
- Vandera, E. et al., 2015. Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *Journal of Proteomics*, 113, pp.73-89.
- Vandera, E. et al., 2012. Heterologous expression and characterization of two 1-hydroxy-2- naphthoic acid dioxygenases from *Arthrobacter phenanthrenivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), pp.621–627.
- Voytas, D., 2001. Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in immunology*, Chapter 10, p.Unit 10.4.
- van Waasbergen, L.G. et al., 2000. Genetic diversity among *Arthrobacter* species collected across a heterogeneous series of terrestrial deep-subsurface sediments as determined on the basis of 16S rRNA and recA gene sequences. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), pp.3454–3463.
- Wagrowski, D.M. & Hites, R. a, 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. *Environmental Science & Technology*, 31(1), pp.279– 282.
- Wells, P.G. et al., 2010. Oxidative DNA Damage and Repair in Teratogenesis and Neurodevelopmental Deficits. , 109(Part C), pp.103–109.
- Wilson, S.C. & Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 81(3), pp.229–249.

- Yamada, Y. et al., 2001. Molecular analysis of Japanese patients with Rett syndrome: Identification of five novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Human Mutation*, 18(3), p.253.
- Yao, Y. et al., 2015. Comparative genome analysis reveals the molecular basis of nicotine degradation and survival capacities of *Arthrobacter*. *Scientific reports*, 5 , p.8642.
- Yassin, A.F. et al., 2011. *Arthrobacter equi* sp. nov., isolated from veterinary clinical material. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(Pt 9), pp.2089–2094.
- Yen, K.M. & Gunsalus, I.C., 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(3), pp.874–878.
- Yen, K.M. & Serdar, C.M., 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *Critical reviews in microbiology*, 15(3), pp.247–268.
- Zaar, A. et al., 2004. New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *Molecular microbiology*, 54(1), pp.223–238.
- Zeinali, M., Vossoughi, M. & Ardestani, S.K., 2008. Degradation of phenanthrene and anthracene by *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1 , a moderately thermophilic bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 105(2), pp.398–406.
- Zhang, Y. et al., 2009. Inhalation exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk of Chinese population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 106(50), pp.21063–21067.
- Καβακιώτης, Κ., 2007. Δ.Μ.Ε. Απομόνωση και χαρακτηρισμός της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος από ένα νέο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Arthrobacter* Sp. το οποίο αποδομεί φαινανθρένιο.
- Κουρτίδου, Ε., 2013. Δ.Μ.Ε. Συμβολή στη διευκρίνιση της πορείας αποδόμησης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στο εδαφοβακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3.

