



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ
ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΠΟΛΥΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ**

**ΒΑΝΔΕΡΑ Ι. ΕΛΠΙΝΙΚΗ
MSc ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ
ΕΛΠΙΝΙΚΗΣ ΒΑΝΔΕΡΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή, που διορίστηκε για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Ελπινίκης Βανδέρα, με την υπ' αριθμ. 884^Α/30-05-2014 απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σύμφωνα με το άρθρο 13 του Νόμου 2083/92 όπως συμπληρώθηκε και τροποποιήθηκε με το άρθρο 9 παρ. 4 του Νόμου 3685/2008, συνήλθε σήμερα στις 20 Ιουνίου 2014 και ώρα 12:00 στην αίθουσα Φ₂-145 του Τμήματος Χημείας και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψήφιας με τίτλο:

**«ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΒΙΟΑΠΟΛΟΜΗΣΗΣ
ΠΟΛΥΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ»**

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλλαν ερωτήσεις προς την υποψήφια τόσο γενικού περιεχομένου όσο και σχετικές με το θέμα της διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και της υποψήφιας ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.


Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι **έμειναν απόλυτα ικανοποιημένοι από την προφορική παρουσίαση καθώς και τον όγκο και ποιότητα της ερευνητικής εργασίας.**

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε **ομόφωνα** ότι η διατριβή της κ. Ελπινίκης Βανδέρα παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, η δε υποψήφια απέκτησε τόσο τις γνώσεις όσο και την τεχνική κατάρτιση, ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού της πεδίου.

Μετά από αυτά απεφάσισε **ομόφωνα** να εγκρίνει τη διατριβή με τον βαθμό **Άριστα**

Ιωάννινα 20-06-2014


Η Επταμελής Επιτροπή

Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια 

Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα 

Περυσινάκης Άγγελος, τ.Επίκουρος Καθηγητής, μέλος Τριμ. Επιτροπής 

Τζάκος Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής 

Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής 

Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής 

Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, μέλος Τριμ. Επιτροπής 

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Νουκλεϊνικών Οξέων στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος «Ηράκλειτος II» και με τίτλο «Μοριακές προσεγγίσεις μηχανισμών βιοαποδόμησης πολυαρωματικών υδρογονανθράκων».

Σε αυτό το σημείο θέλω να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον αείμνηστο Καθηγητή Δραΐνα Κωνσταντίνο που μου έδωσε την ευκαιρία να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα. Για όσους βρέθηκαν στο εργαστήριό του αποτέλεσε πέρα από δάσκαλο και φίλο που μας άνοιξε την καρδιά του και το σπιτικό του και μας έκανε μέρος της ζωής του.

Θερμά θέλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, η οποία είναι και η επιβλέπουσα της παρούσης διατριβής, για την καθοδήγησή της και τις ουσιαστικές συμβουλές κατά την εκπόνηση των πειραμάτων, όσο και για τη βοήθειά της κατά τη συγγραφή του κειμένου της διατριβής. Η αμέριστη από μέρους της κατανόηση, η υπομονή και η πραότητα του χαρακτήρα της έκανε τη συνεργασία μας πολύ εύκολη και ευχάριστη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Άγγελο Περιουνάκη για το χρόνο που πάντα απλόχερα μου διέθετε, τις συμβουλές και τη βοήθειά του σε όποιο τεχνικό πρόβλημα προέκυπτε και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά για τις υποδείξεις του κατά την εκπόνηση της διατριβής. Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τους προαναφερθέντες για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη διόρθωση και βελτίωση του κειμένου της διατριβής.

Ιδιαίτερώς θέλω να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, μέλος της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για όλη τη γνώση που μου έχει μεταδώσει στις μοριακές τεχνικές και για την ουσιαστική συμβολή της στην σχεδίαση και εκτέλεση πειραμάτων της διατριβής. Η προθυμία της για την οποιαδήποτε βοήθεια με διευκόλυνε κατά πολύ σε όλη την πορεία υλοποίησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες από το Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», τον Ερευνητή Α΄ βαθμίδας κ. Γεώργιο Παναγιώτου που παρείχε την υλικοτεχνική υποστήριξη για την διεξαγωγή των πρωτεωμικών αναλύσεων, καθώς και την Dr. Μαρτίνα Σαμιωτάκη για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τους συνεργάτες από το Πανεπιστήμιο της Louvaine στο Βέλγιο, τον Καθηγητή κ. Αγάθο Σπυρίδωνα για την υλικοτεχνική υποστήριξη και την Dr. Πούλη Μαρία για τη διεξαγωγή κάποιων πειραμάτων στο πλαίσιο της συνεργασίας μέσω του προγράμματος «Ηράκλειτος II».

Επίσης, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής στον Καθηγητή κ. Τσουκάτο Δημόκριτο, στον Καθηγητή κ. Φριλίγγο Ευστάθιο και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα, για το χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και διόρθωση της διατριβής προς την τελική της διαμόρφωση.

Οφείλω να ευχαριστήσω από καρδιάς τους συνεργάτες και φίλους Dr. Παραπούλη Μαρία και Dr. Καραμπίκα Ευγενία, γιατί ως προπορευόμενες μου ανοίγουν ένα παράθυρο για να κοιτάω το μέλλον και τους Ευθυμιόπουλο Χάρη και Τσαγκογιάννη Νώντα γιατί μου θυμίζουν τα όνειρα του παρελθόντος. Θερμά ευχαριστώ και όλους τους συναδέλφους που κατά καιρούς οι δρόμοι μας συναντήθηκαν, για τη φιλική ατμόσφαιρα και την ευχάριστη και ομαλή συνεργασία. Ευχαριστώ όλους μου τους φίλους που επί χρόνια με περιβάλλουν με αγάπη, με στηρίζουν και με κάνουν να νιώθω ότι δεν πορεύομαι μόνη και ιδιαίτερα την «αδερφή» Μαρίνα και τον άνθρωπο της καρδιάς μου Γιάννη.

Ευγνώμων θα είμαι πάντα στους γονείς μου για τα όσα μου ενέπνευσαν, για τα όσα μου παρείχαν, για την ηθική τους συμπαράσταση και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φυσικοχημικές ιδιότητες και τοξικότητα αυτών.....	1
1.1.1 Προέλευση των PAHs και η πορεία τους στο περιβάλλον.....	3
1.2 Βιοαποδόμηση	5
1.2.1 Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση PAHs.....	7
1.3 Βακτήρια που αποδομούν PAHs.....	8
1.4 Αποδόμηση του φαινανθρενίου	9
1.5 Βακτηριακές διοξυγονάσεις.....	13
1.5.1 Διοξυγονάσεις υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα.....	14
1.5.1.1 Δομή διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα	14
1.5.1.2 Ταξινόμηση των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης.....	21
1.5.1.3 Γενετική ποικιλομορφία RHDs σε Gram- και Gram+ βακτήρια	28
1.5.2 Διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα.....	31
1.5.2.1 Ταξινόμηση διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα και μηχανισμοί δράσης αυτών	33
1.5.2.2 Οικογένεια curin πρωτεϊνών	39
1.5.3 Καταβολισμός φθαλικού οξέος.....	41
1.5.4 Καταβολισμός πρωτοκατεχοϊκού οξέος	43
1.5.4.1 meta-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 2,3- θέση	44
1.5.4.2 meta-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 4,5- θέση	45
1.5.4.3 ortho-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 3,4- θέση	50
1.6 Πρωτεωμική ανάλυση στη μελέτη της βιοαποδόμησης PAHs	53
1.7 Το γένος <i>Arthrobacter</i>	58
1.7.1 Το στέλεχος <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	62
1.8 Σκοπός της διατριβής.....	68
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	71
2.1 Χημικές ουσίες και όργανα	71
2.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδία	72
2.3 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων	77

2.3.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων βακτηρίων <i>E. coli</i> , Luria Bertani Broth (LB).....	77
2.3.2 Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια κυττάρων του βακτηρίου <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> MM M9.....	77
2.4 Μικροβιακές καλλιέργειες	79
2.5 Αντιβιοτικά.....	79
2.6 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα του στελέχους Sph3 με τη μέθοδο CTAB (mini-preparation).....	80
2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων	82
2.7.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini-preparation)	82
2.7.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την αυτοματοποιημένη διαδικασία (kit) Nucleospin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel (Γερμανίας)	83
2.8 Απομόνωση ολικού RNA.....	84
2.8.1 Απομόνωση ολικού RNA από βακτήρια με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin RNA / Protein της Macherey - Nagel (Γερμανίας).....	86
2.8.2 Κατεργασία απομονωμένου RNA με δεοξυριβονουκλεάση I	87
2.9 Καθαρότητα του DNA και του RNA (Sambrook and Russell, 2001).....	89
2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	89
2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	92
2.11.1 Αντίδραση σύνθεσης cDNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο PrimeScript™ 1 st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)	94
2.12 Ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης qRT-PCR και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR ...	95
2.12.1 Τρόποι ανίχνευσης προϊόντων ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.....	97
2.12.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου.....	103
2.13 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	107
2.13.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)	107
2.14 Ηλεκτροφόρηση του DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	108
2.15 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey - Nagel (Γερμανίας)	110
2.16 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Sambrook <i>et al.</i> , 2001).....	111

2.16.1 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Zero Blunt® pCR Cloning kit της Invitrogen	115
2.17 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA	117
2.17.1 Μέθοδος Kushner <i>et al.</i> , 1978.....	117
2.17.2 Μέθοδος Chung and Miller, 1988.....	118
2.17.3 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> και μετασχηματισμός (Mandel and Higa, 1970).....	119
2.18 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> και μετασχηματισμός με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (Zhang <i>et al.</i> , 2011).....	120
2.19 Μέτρηση φθορισμού.....	123
2.20 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με χρήση του προγράμματος BLAST2 και σύνθεση εκκινητών.....	123
2.21 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 με μηχανική λύση.....	124
2.22 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 με χημική λύση (Kim <i>et al.</i> , 2004, με μικρές τροποποιήσεις).....	125
2.23 Ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση στο στέλεχος <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 χωρίς χρήση πηκτών με μεθοδολογία nanoLC-MS/MS.....	126
2.24 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry (1951).....	126
2.25 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (1976).....	127
2.26 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κυτταρικά εκχυλίσματα του στελέχους Sphe3.....	127
2.27 Προσδιορισμός των καταλυτικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων διοξυγονασών του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος Diox.1 και Diox.2.....	128
2.28 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET system manual Novagen, 2001)	131
2.29 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970)	133
2.30 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni ⁺ -NTA αγαρόζης (Rohdich <i>et</i> <i>al.</i> , 2001, Herz <i>et al.</i> , 2000)	137
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	141
3.1 Ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.	141
3.2 Μελέτη γονιδίων υπεύθυνων για την αρχική προσβολή του αρωματικού πυρήνα μέσω υδροξυλίωσης.....	141
3.2.1 Φυλογενετική ανάλυση των Rhd1α, Rhd2α και Rhd3α και συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών.....	150

3.2.2 Αναπαράσταση τριτοταγούς δομής στο χώρο (3D-modelling) της Rhd1αβ και Rhd2αβ των πλασμιδίων pASPHE301 και pASPHE302.....	157
3.2.3 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>rhd1a</i> και <i>rhd1β</i> του πλασμιδίου pASPHE301, <i>rhd2a</i> και <i>rhd2β</i> του πλασμιδίου pASPHE302 και <i>rhd3β</i> του χρωμοσώματος.....	160
3.2.4 Κλωνοποίηση των γονιδίων <i>rhd1a</i> και <i>rhd1β</i> και υπερέκφραση των γονιδιακών προϊόντων.....	164
3.2.4.1 <i>In vivo</i> δοκιμές οξειδωσης διαφορετικών υποστρωμάτων PAHs από την διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης Rhdαβ.....	169
3.3 Διοξυγονάσες του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος.....	169
3.3.1 Ετερόλογη έκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ανασυνδυασμένων Diox1 και Diox2.....	180
3.3.1.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων <i>diox1</i> και <i>diox2</i> και υπερέκφραση των πρωτεϊνών Diox1 και Diox2.....	180
3.3.1.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων Diox1 και Diox2.....	182
3.3.2 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>diox1</i> και <i>diox2</i> με την τεχνική qRT-PCR...	187
3.4 Μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος <i>Sphe3</i>	190
3.4.1 Έλεγχος της συμμεταγραφής των γονιδίων 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος <i>Sphe3</i>	191
3.4.2 Μελέτη πιθανής περιοχής προαγωγού του οπερονίου του 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος <i>Sphe3</i>	193
3.4.3 Ανάπτυξη συστήματος ομόλογης έκφρασης γονιδίων στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> <i>Sphe3</i>	194
3.4.4 Πορεία δημιουργίας πλασμιδιακών κατασκευών για την ομόλογη έκφραση του πιθανού προαγωγού του οπερονίου του 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος (<i>Ppca</i>)	197
3.4.5 Πειράματα μέτρησης φθορισμού για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του πιθανού προαγωγού <i>Ppca</i>	200
3.5 Έλεγχος συν-μεταβολισμού παρουσία και άλλων PAHs.....	201
3.6 Συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> <i>Sphe3</i> κατά την ανάπτυξή του σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακος.....	203
3.6.1 Σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ από τις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους <i>A. phenanthrenivorans</i> <i>Sphe3</i>	204
3.6.2 Αποτελέσματα πρωτεωμικής ανάλυσης με βάση τη λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών	206
3.6.2.1 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην καταβολική πορεία του φαινανθρενίου	206

3.6.2.2 Πρωτεΐνες του κυτταρικού φακέλου	217
3.6.2.3 Πρωτεΐνες μεταφορείς	217
3.6.2.4 Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση	218
3.7.2.5 Πρωτεΐνες του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα	218
3.6.2.6 Πρωτεΐνες του μεταβολισμού των αμινοξέων.....	219
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	233
4.1 Διευκρίνηση της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	233
4.1.1 Διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3.	235
4.1.2 Διοξυγονάσες του 1H2NA στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	245
4.1.3 Καταβολισμός πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος <i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	250
4.2 Μελέτη της απόκρισης κυττάρων του στελέχους <i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3 με ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ σε διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης.....	252
Α. Πρωτεΐνες του κυτταρικού φακέλου.....	252
Β. Πρωτεΐνες μεταφορείς.....	255
Γ. Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση	258
Δ. Πρωτεΐνες του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα.....	260
Ε. Πρωτεΐνες του μεταβολισμού των αμινοξέων.....	261
4.3 Καταστολή των καταβολικών γονιδίων από τη γλυκόζη.....	265
4.4 Συν-μεταβολισμός ΡΑΗs από το στέλεχος Sphe3	266
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	269
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	277

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ADP: Διφωσφορική αδενοσίνη

Ap: αμπικυλίνη

APS: υπερθειϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate)

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

bp: ζεύγη βάσεων

BSA: αλβουμίνη ορού βοοειδούς (bovine serum albumin)

Cm: χλωραμφαινικόλη

CTAB: κετύλιο τριμεθυλαμμώνιο βρώμιο (cetyl trimethylammonium bromide)

Da: Daltons

DEPC: διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (diethylpyrocarbonate)

diox1: γονίδιο διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (πλασμιδιο pASPHE301), *Sphe3*

diox2: γονίδιο διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (χρωμόσωμα), *Sphe3*

DMSO : Διμέθυλοσουλφοξείδιο

DNA: δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

dNTP : (δεσόξυ) τριφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο

DTT : διθειοθρεϊτόλη

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

et al., : και συνεργάτες

EtBr : Βρωμιούχο αιθίδιο

FAD: Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

FADH₂: Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

FMN: Φλαβινομονονουκλεοτίδιο

for: forward 5' -> 3' φορά

g: γραμμάριο

GC-MS: Αέρια χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

h: ώρα

IPTG: ισοπροπουλοθειο-β-D-γλακτοσίδιο

ISP: Πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (Iron-Sulfur protein)

kb: χιλιάδα βάσεων (κιλοβάσεις)

kDa: χιλιάδα Dalton

Km: καναμυκίνη

LB: Luria-Bertani Θρεπτικό μέσο

LC-MS: Υγρή Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)

mg: χιλιοστό του γραμμαρίου

min: λεπτό

MM M9: θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης M9 (Minimal Medium M9)

MOPS : 2N-μορφολινο-προπανοσουλφονικό οξύ

NAD: Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NADH: Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

NADP: Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NADPH: Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

NTA: Νιτριλο-τριοξικό οξύ (nitriloacetic acid)

PAHs: Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)

O.D.: οπτική πυκνότητα

O/N: όλη τη νύχτα

PCA: πρωτοκατεχοϊκό οξύ (protocatechuic acid/protocatechuate)

PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

PMSF : φαινυλο-μεθυλο-φωσφοσυλο- φοθριδίο (phenylmethyl sulfonyl fluoride)

Ppca: περιοχή πιθανής περιοχής προαγωγού οπερονίου καταβολισμού πρωτοκατεχοϊκού οξέος μέσω *meta*-σχάσης (πλασμίδιο pASPHE301), Sphe3

qRT-PCR: Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Rev: reverse 3' -> 5' φορά

RHDs: Διοξυγονάσες Υδροξυλίωσης Αρωματικού Πυρήνα (Ring-Hydroxylating Dioxygenases)

rhd1a: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, α υπομονάδα (πλασμίδιο pASPHE301), SphE3

rhd1β: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, β υπομονάδα (πλασμίδιο pASPHE301), SphE3

rhd2a: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, α υπομονάδα (πλασμίδιο pASPHE302), SphE3

rhd2β: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, β υπομονάδα (πλασμίδιο pASPHE302), SphE3

rhd3a: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, α υπομονάδα (χρωμόσωμα), SphE3

rhd3β: γονίδιο διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα, β υπομονάδα (χρωμόσωμα), SphE3

Rif: ριφαμπικίνη

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

rpm: περιστροφές ανά λεπτό

RT-PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

SDS: Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο

SDS-PAGE: SDS-ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

TEMED: N-N-N'-N' τετραμεθυλο-διαμινομεθάνιο (N-N-N'-N'-tetramethyldiaminethane)

Tris: Τρις-υδροξυ-μεθυλαμινομεθάνιο

X-Gal: 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδονυλ-β-D-γαλακτοσίδιο

1H2NA: 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ (1-hydroxy-2-naphthoate)

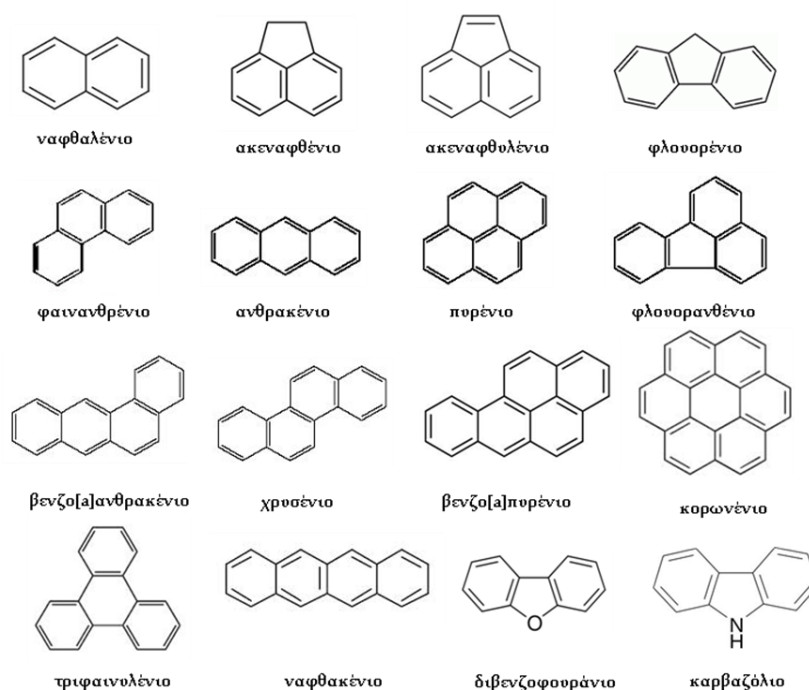
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φυσικοχημικές ιδιότητες και τοξικότητα αυτών

Η ποιότητα της ζωής είναι άρρηκτα και αναπόφευκτα συνδεδεμένη με την ποιότητα του περιβάλλοντος. Η πληθυσμιακή έκρηξη έχει οδηγήσει σε εντατικοποίηση των καλλιεργειών και των κατασκευαστικών βιομηχανικών μονάδων για τον εφοδιασμό της ανθρωπότητας, οδηγώντας σε εκτεταμένη ρύπανση του περιβάλλοντος με την απελευθέρωση πλήθους ξενοβιοτικών ενώσεων στο έδαφος, στον υδροφόρο ορίζοντα και την ατμόσφαιρα. Όλες αυτές οι εξελίξεις είναι εξαιρετικά δυσμενείς προς το περιβάλλον απουσία κατάλληλης διαχείρισης (Vidali, 2001; Kumar, 2011). Από τους πιο διαδεδομένους ρυπαντές του εδάφους είναι οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs), οι οποίοι όμως δεν παράγονται μόνο από βιομηχανική δραστηριότητα (βλέπε § 1.1.1) και αντιπροσωπεύουν γύρω στο 20% της βιομάζας της γης (Díaz *et al.*, 2012). Γενικά ο όρος PAHs έχει αποδοθεί σε υδρογονάνθρακες που αποτελούνται από αρωματικούς δακτυλίους σε διάφορες διαμορφώσεις και συνίστανται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα (C) και υδρογόνου (H). Όταν υπάρχουν υποκαταστάσεις από άτομα οξυγόνου και αζώτου (N), οι οποίες είναι αρκετά συχνές, τότε μιλάμε για ετεροκυκλικές ενώσεις (Σχήμα 1.1.1.1). Μικρού μοριακού βάρους (LMW-PAHs) χαρακτηρίζονται οι PAHs που περιέχουν μέχρι τρεις αρωματικούς δακτυλίους, ενώ υψηλού μοριακού βάρους (HMW-PAHs) εκείνοι με περισσότερους από τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους. Οι χαρακτηριστικές αυτές δομές προσδίδουν στις αρωματικές ενώσεις φυσικοχημικές ιδιότητες που τις καθιστούν εξαιρετικά υδρόφοβες, χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και συνεπώς επίμονους ρυπαντές (Doyle *et al.*, 2008).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των PAHs οφείλονται στην αρωματικότητα αυτών των ενώσεων που τους παρέχει μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα. Η αύξηση του μεγέθους και της πολυπλοκότητας (angularity) στη δομή των PAHs έχει σαν

αποτέλεσμα την αυξημένη ηλεκτροχημική σταθερότητα αυτών των μορίων (Harvey 1997), την αύξηση των σημείων ζέσεώς τους, την αύξηση της υδροφοβικότητας και τη μείωση της πιητικότητάς τους, με αποτέλεσμα την μακρόχρονη παραμονή τους στο περιβάλλον (Cerniglia, 1992, Harvey, 1997, Wilson και Jones, 1993; Kanaly και Harayama 2000; Doyle *et al.* 2008; Haritash and Kaushik 2009; Seo *et al.* 2009; Kanaly and Harayama 2010). Η αύξηση του μεγέθους και της πολυπλοκότητας (angularity) στη δομή των PAHs, εκτός από την περιβαλλοντική επιβάρυνση επιφέρει και ταυτόχρονη αύξηση της τοξικής τους δράσης (Cerniglia, 1992).



Σχήμα 1.1.1 Χαρακτηριστικές δομές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων.

Οι PAHs είναι από τις πιο συχνά απαντώμενες ρυπογόνες ενώσεις στο περιβάλλον, ιδιαίτερα στις αναπτυγμένες χώρες, σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές και βρίσκονται στην ατμόσφαιρα, στο έδαφος και στο νερό, σε διάφορα ιζήματα και υπόγεια νερά μέχρι και στα βάθη των ωκεανών (Doyle *et al.* 2008, Kanaly and Harayama, 2010). Η δε ανίχνευσή τους και σε διαστρικές περιοχές,

δείχνει ότι η παρουσία τους ξεπερνά τα όρια του πλανήτη μας (Kanaly and Harayama, 2010).

Η υπηρεσία Τοξικών Ενώσεων και Καταγραφής Ασθενειών (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR), έχει αναφέρει την επίδραση στην υγεία 17 ενώσεων PAHs (ATSDR, 1996). Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Η. Π. Α (Environmental Protection Agency, EPA) έχει κατατάξει 28 PAHs σαν ρυπαντές υψηλής προτεραιότητας λόγω της τοξικότητάς τους (EPA, 2009) που μπορεί να επιφέρει τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις.

Οι LMW-PAHs είναι τοξικοί σε θαλάσσιους οργανισμούς (πλαγκτόν, ψάρια, οστρακοειδή) αλλά και στον άνθρωπο, όπου για παράδειγμα το φαινανθρένιο έχει αναφερθεί πως είναι ήπιο αλλεργιογόνο (Mrozik *et al.*, 2003), ενώ οι HMW-PAHs θεωρούνται καρκινογόνοι και μεταλλαξιογόνοι (Mueller *et al.* 1990; Dean-Ross *et al.* 2002). Οι PAHs είναι λιποδιαλυτές ενώσεις, που απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών και βιοσυσσωρεύονται στους λιπαρούς τους ιστούς (Cerniglia, 1984). Η βιολογική ενεργοποίηση αυτών των ενώσεων οδηγεί στην παραγωγή εποξειδίων διολών από την οξείδωση των PAHs μέσω του συστήματος P450 του κυτοχρώματος (Samanta *et al.*, 2002). Τα δραστικά αυτά ενδιάμεσα σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης όταν συνδέονται ομοιοπολικά με τα μακρομόρια των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών, ενώ οδηγούν και στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Και οι δυο αυτές δράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων στο DNA και την καρκινογένεση (Phale *et al.*, 2007; Muñoz and Albores, 2011).

1.1.1 Προέλευση των PAHs και η πορεία τους στο περιβάλλον

Οι πηγές προέλευσης των PAHs στο περιβάλλον είναι τόσο φυσικές όσο και ανθρωπογενείς. Στις πηγές φυσικής προέλευσης συγκαταλλέγονται:

(α) πετρογενείς διεργασίες που περιλαμβάνουν τις θερμικές γεωλογικές αντιδράσεις παραγωγής ορυκτών καυσίμων και μεταλλευμάτων. PAHs πετρογενούς προέλευσης, όπως για παράδειγμα αυτοί που βρίσκονται στο πετρέλαιο, είναι σε πολύ υψηλά ποσοστά ακυλο-υποκατεστημένοι.

(β) πυρογενείς διεργασίες που περιλαμβάνουν την ατελή καύση οργανικής ύλης (Mastral and Callén, 2000) όπως συμβαίνει για παράδειγμα κατά τις ηφαιστειακές εκρήξεις, τις πυρκαγιές δασών, την καύση κάρβουνου, ξύλου και ακατέργαστου πετρελαίου. Οι PAHs πυρογενούς προέλευσης συνίστανται κυρίως από μη υποκατεστημένους PAHs (Seo *et al.*, 2009; Wilson and Jones, 1993).

Οι ανθρωπογενείς πηγές προέλευσης των PAHs είναι οι πιο καθοριστικές κι εκείνες με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην εκτεταμένη ρύπανση του περιβάλλοντος. Σε αυτές συγκαταλέγονται η καύση ορυκτών καυσίμων και απορριμάτων, η διαρροή προϊόντων πετρελαίου κατά τη μεταφορά του και η διαρροή βενζίνης κατά την αυτοκίνηση, η λειτουργία βιομηχανιών παραγωγής αερίου και γαιάνθρακα, καθώς και της βιομηχανίας κατεργασίας ξύλου, όπου γίνεται εκτεταμένη χρήση κρεοζωτελαίου που συνίσταται κατά 85% από PAHs και μεταξύ αυτών περιέχει και ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες όπως διβενζοφουράνιο και καρβαζόλιο (Juhász and Naidu, 2000; Seo *et al.*, 2009). Τέλος, η παρουσία PAHs έχει αναφερθεί στον καπνό του τσιγάρου, καθώς και σε ψημένα στα κάρβουνα και τηγανισμένα φαγητά (Cerniglia, 1992; Wilson and Jones, 1993; Kanaly and Harayama, 2000). Οι ανωτέρω διεργασίες σε συνδυασμό με τα παγκοσμίου επιπέδου συστήματα μεταφοράς και διανομής πετρελαίου και την αυξημένη βιομηχανική δραστηριότητα έχει οδηγήσει στην κατανομή των PAHs σε όλα τα γεωγραφικά πλάτη και μήκη του πλανήτη (Kanaly and Harayama, 2000; Obayori and Salam, 2010).

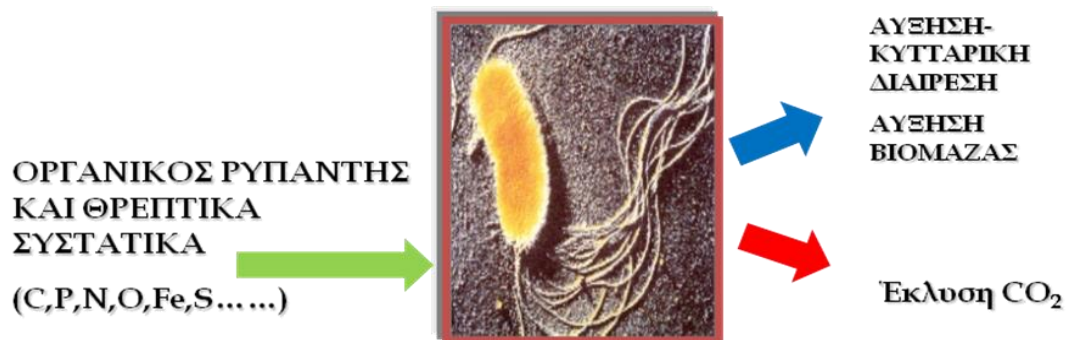
Στις βιομηχανικά αναπτωγμένες χώρες οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες καύσης είναι η κύρια πηγή προέλευσης των PAHs στο έδαφος, με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της περιεκτικότητας σε PAHs στο έδαφος τα τελευταία 100-150 χρόνια (Juhász and Naidu, 2000). Το σύγχρονο ενδιαφέρον για την κατάληξη των PAHs στο περιβάλλον απορρέει από την απειλή που αυτοί αποτελούν για τη δημόσια υγεία, λόγω της μεγάλης διασποράς τους, της μικρής βιοδιαθεσιμότητάς τους-λόγω αυξημένης προσρόφησης και της βιοσυσσώρευσης μέσω της τροφικής αλυσίδας (Phillips, 1983; Peng *et al.*, 2008; Obayori and Salam, 2010; Kanaly and Harayama, 2000 και 2010).

Η απομάκρυνση των PAHs από το περιβάλλον γίνεται είτε μέσω αβιοτικών πορειών (εξάτμιση, φωτοοξειδωση, χημική οξείδωση, καθίζηση, βιοσυσσώρευση), είτε μέσω της βιοτικής πορείας της βιοαποδόμησης (Cerniglia, 1992; Haritash and Kaushik, 2009; Obayori and Salam, 2010).

1.2 Βιοαποδόμηση

Η εκτεταμένη ρύπανση των εδαφών με PAHs σύντομα οδήγησε στην εφαρμογή συμβατικών τεχνικών εξυγίανσης που περιλάμβαναν αφαίρεση, τροποποίηση ή απομόνωση των ρυπαντών. Τέτοιου είδους τεχνικές περιλάμβαναν εκσκαφή του ρυπασμένου εδάφους και την αποτέφρωση ή τον περιορισμό του. Εντούτοις, αυτές οι μέθοδοι έχουν κριθεί ως υψηλού κόστους και ενέχουν υψηλά ποσοστά μεταφοράς της ρύπανσης σε άλλα σημεία (Dua *et al.*, 2002; Haritash and Kaushik, 2009).

Η βιοτεχνολογία κατάφερε να άρει τους ανωτέρω περιορισμούς με τη χρήση της τεχνολογίας της βιοαποκατάστασης που είναι η πλέον κατάλληλη για τον καθαρισμό ευρέως φάσματος οργανικών ρυπαντών. Με τον όρο βιοαποκατάσταση περιγράφεται η αποκατάσταση της υγιεινής των οικοσυστημάτων μέσω βιοαποδόμησης των ενώσεων ρυπαντών (Vidali, 2001). Με τη βιοαποδόμηση επιτυγχάνεται η απλοποίηση ή ολική διάσπαση της μοριακής δομής των οργανικών ενώσεων με φυσιολογικές αντιδράσεις που καταλύονται από μικροοργανισμούς (Alexander 1981 και 1994), χωρίς τη χρήση χημικών ενώσεων και με κατά πολύ μικρότερο κόστος (Haritash and Kaushik, 2009). Έτσι, βιοαποδόμηση είναι η μεταβολική διεργασία η οποία περιλαμβάνει τη διάσπαση μιας οργανικής ένωσης στα ανόργανα συστατικά της (ανοργανοποίηση). Κύριο ρόλο σε αυτή τη διεργασία κατέχουν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι μετατρέπουν τις οργανικές ενώσεις σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και λιγότερο πολύπλοκες (βιομετατροπή) με παράλληλη αύξηση της κυτταρικής τους βιομάζας και εν τέλει τις μετατρέπουν σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα κατά την αερόβια αποδόμηση και μεθάνιο κατά την αναερόβια (ανοργανοποίηση) (Hoerppel and Hinchee, 1994; van Agteren 1998; Haritash and Kaushik 2009).



Σχήμα 1.2.1 Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας της βιοαποδόμησης.

Η βιοαποκατάσταση των ρυπασμένων εδαφών που γίνεται *in situ* δεν περιλαμβάνει εκσκαφή ή απομάκρυνση ρυπασμένου εδάφους, αλλά διεξάγεται επι τόπου στο σημείο της ρύπανσης, σε αντίθεση με την *ex situ* βιοαποκατάσταση η οποία απαιτεί την εκσκαφή του εδάφους (Kumar, 2011).

Τα βακτήρια λόγω της μεγάλης τους μεταβολικής προσαρμοστικότητας, τροποποιώντας τις καταβολικές τους δραστηριότητες, μπορούν και χρησιμοποιούν τις πολύπλοκες χημικές ενώσεις που ρυπαίνουν το περιβάλλον σαν πηγές ενέργειας (Díaz and Prieto, 2000). Επιπλέον, η δυνατότητά τους για γρήγορη γενετική εξέλιξη ενισχύει την πιθανότητα της απόκτησης νέου μεταβολικού δυναμικού για την αποδόμηση νεοεισαχθέντων στο περιβάλλον ξενοβιοτικών χημικών ουσιών (Chauhan and Jain, 2010). Κατά τη μικροβιακή λοιπόν βιοαποδόμηση, η θεμελιώδης γνώση των ποικίλων μικροβιακών μεταβολικών διεργασιών μπορεί να δώσει τη δυνατότητα της καλύτερης δυνατής εκμετάλλευσης του μεταβολικού δυναμικού των βακτηρίων, με σκοπό την πλήρη εξάλειψη αρωματικών ρυπαντών με οικονομικό τρόπο, συμβάλλοντας έτσι στην εξυγίανση του περιβάλλοντος (Cao *et al.*, 2009).

Η μικροβιακή βιοαποδόμηση κατά την οποία οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και ενέργειας είναι δυνατόν να διεξάγεται:

(α) υπό αερόβιες συνθήκες, όταν το οξυγόνο χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων

(β) υπό αναερόβιες συνθήκες, όταν σαν τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται ουσίες όπως τα νιτρικά (NO_3^-), τα θειικά (SO_4^{2-}) και τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}).

Είναι δυνατόν όμως μικροβιακή βιοαποδόμηση να λαμβάνει χώρα και μέσω της διεργασίας του συν-μεταβολισμού, κατά την οποία οργανικές ενώσεις τροποποιούνται από μικροοργανισμούς, λόγω της μη εκλεκτικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν διάφορα ένζυμα έναντι ενός μεγάλου εύρους υποστρωμάτων, χωρίς να αποτελούν πηγή άνθρακα και ενέργειας για αυτούς. Η εν λόγω διεργασία πραγματοποιείται τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες (van Agteren *et al.*, 1998).

Η αποδόμηση μιας ένωσης εξαρτάται τόσο από αβιοτικούς όσο και βιοτικούς παράγοντες (Doyle *et al.* 2008). Πιο συγκεκριμένα η πορεία της βιοαποδόμησης μπορεί να επηρεάζεται από:

- το περιβάλλον: ιστορικό ρύπανσης, σύσταση, υφή, πορώδες εδάφους, pH, θερμοκρασία, υγρασία, οξυγόνο, αλατότητα, θρεπτικά συστατικά (νερό, ανόργανα συστατικά, πηγή άνθρακα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες), παρουσία άλλων τοξικών ουσιών
- το υπόστρωμα: φυσικοχημικές ιδιότητες, συγκέντρωση, βιοδιαθεσιμότητα, κατανομή, τοξικότητα
- τους μικροοργανισμούς: σύσταση των πληθυσμών, επιδράσεις μεταξύ όμοιων πληθυσμών, επιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών, κατανομή των μικροοργανισμών, συγκέντρωση, ενζυμική δραστηριότητα. (Doyle *et al.* 2008; Haritash and Kaushik 2009).

1.2.1 Αερόβια μικροβιακή αποδόμηση PAHs

Η αερόβια μικροβιακή βιοαποδόμηση περιλαμβάνει δυο σημεία κλειδιά στις πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων. Αρχικά, θα πρέπει να αποσταθεροποιηθεί ο αρωματικός δακτύλιος και εν συνεχεία, να γίνει η σχάση αυτού. Και στα δυο αυτά βήματα στον αερόβιο καταβολισμό κυρίαρχο ρόλο κατέχουν οι διοξυγονάσες. Κατά την **αερόβια** αποδόμηση των PAHs με τη δράση

διοξυγονασών γίνεται εισαγωγή μοριακού οξυγόνου στον αρωματικό δακτύλιο προς σχηματισμό *cis*-διϋδροδιολών και μετατροπή αυτών σε (υποκατεστημένες) κατεχόλες. *ortho*- και *meta*-σχάση της κατεχόλης οδηγεί στο σχηματισμό παραγώγων ενώσεων που διοχετεύονται στις πορείες του κεντρικού μεταβολισμού. Κάθε δακτύλιος προσβάλλεται κατά τον ίδιο τρόπο (van Agteren *et al.*, 1998).

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων σχηματίζουν συνήθως δέσμες που απαρτίζονται από τα καταβολικά γονίδια που κωδικοποιούν για τα καταβολικά ένζυμα, γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταφορείς που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη και μεταφορά των αρωματικών ενώσεων εντός των κυττάρων και ρυθμιστικά γονίδια που ρυθμίζουν την έκφραση των καταβολικών γονιδίων και των γονιδίων μεταφορέων (Khomeikov *et al.*, 2008). Καταβολικά γονίδια εντοπίζονται τόσο σε χρωμοσώματα όσο και σε καταβολικά πλασμίδια στους μικροοργανισμούς. Η παρουσία των καταβολικών γονιδίων σε πλασμίδια δίνει στα βακτήρια το πλεονέκτημα της διευκολυνόμενης οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς των εν λόγω γονιδίων εντός του μικροβιακού πληθυσμού, με αποτέλεσμα τη γρήγορη προσαρμογή τους κατά την παρουσία νέων ξενοβιοτικών ενώσεων στα οικοσυστήματα που διαβιούν (Cao *et al.*, 2009).

1.3 Βακτήρια που αποδομούν PAHs

Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των βακτηρίων που αποδομούν PAHs ολοένα και αυξάνεται, με πληθώρα φυλογενετικά ποικιλόμορφων βακτηριακών στελεχών που μπορούν να καταβολίσουν PAHs όπως π.χ ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο και πυρένιο να έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορα περιβάλλοντα. Μεταξύ αυτών και πολλά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από χώμα και ποικίλλουν από Gram- α - β - και γ - πρωτεοβακτήρια (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) ενώ μεταξύ των Gram+ πιο αντιπροσωπευτικά είναι τα γένη των Ακτινοβακτηρίων και Βακίλλων (*Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Janibacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*,

Staphylococcus) (για εκτενή ανασκόπηση Koukkou and Vandera, 2011). Ακόμα δεν έχει γίνει κάποια αναφορά για βακτήρια που καταβολίζουν PAHs με έξι ή και περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Εν τούτοις, αρκετές αναφορές υπάρχουν για βακτήρια που καταβολίζουν βενζο[α]πυρένιο παρουσία κάποιου άλλου PAH σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα στελέχη PYR-1 και RJGII-135 του γένους των *Mycobacterium* (Moody *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 1996), τα στελέχη *Sphingobium* EPA505 (Ye *et al.*, 1996), *Sphingomonas* VKM B-2434 (Bahosin *et al.*, 2008), *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003 (Juhasz *et al.*, 2000, 2002) και *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 (Rentz *et al.*, 2008). Οι υψηλού μοριακού βάρους PAHs ανθίστανται στην βιοαποδόμηση από μικροοργανισμούς λόγω της μικρής τους βιοθιαθεσιμότητας.

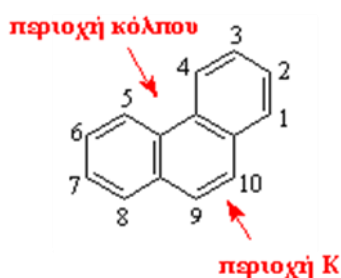
Εκτός από βακτήρια έχουν αναφερθεί και μύκητες που καταβολίζουν PAHs. Νηματοειδείς μύκητες και βασιδιομύκητες έχει αναφερθεί πως καταβολίζουν ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο, πυρένιο, φλουορένιο, βενζο[α]πυρένιο, βενζο[α]ανθρακένιο κλπ (Peng *et al.*, 2008).

1.4 Αποδόμηση του φαινανθρενίου

Το φαινανθρένιο, ένας τρικυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ιζήματα, χώμα και περιοχές ρίψης απορριμάτων (Moody *et al.*, 2001). Πρόκειται για τον μικρότερο αρωματικό υδρογονάνθρακα που διαθέτει περιοχή K και περιοχή κόλπου (Σχήμα 1.4.1). Μέσω αυτών των περιοχών σχηματίζονται εποξειδία, τα οποία είναι άκρως καρκινογόνα (Samanta *et al.*, 1999 και 2002). Για το λόγο αυτό συχνά χρησιμοποιείται σαν ένωση μοντέλο για την μελέτη του μεταβολισμού ανώτερων PAHs με αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση, όπως για παράδειγμα το βενζο[α]πυρένιο, το βενζο[α]ανθρακένιο και το χρυσένιο (Mrozik *et al.*, 2003; Phale *et al.*, 2007).

Η αποδόμηση του φαινανθρενίου από βακτήρια έχει εκτενώς μελετηθεί. Πληθώρα βακτηριακών στελεχών που αποδομούν φαινανθρένιο σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί με εκπροσώπους από τα γένη *Acidovorax* (Samanta *et al.*, 1999), *Arthrobacter* (Samanta *et al.*, 1999;

Seo *et al.*, 2006; Kallimanis *et al.*, 2009), *Brevibacterium* (Samanta *et al.*, 1999), *Burkholderia* (Kang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2007), *Mycobacterium* (Guerin and Jones, 1988; Boldrin *et al.*, 1993; Churchill *et al.*, 1999; Moody *et al.*, 2001; Kim and Freeman, 2005), *Pseudomonas* (Balashova *et al.*, 1999; Prabhu and Phale, 2003), *Comamonas* (Goyal and Zylstra, 1997), *Sphingomonas* (Story *et al.*, 2001; Pinyakong *et al.*, 2003; Baboshin *et al.*, 2008) και *Nocardia* (Iwabuchi *et al.*, 1998c; Zeinali *et al.*, 2007 και 2008).



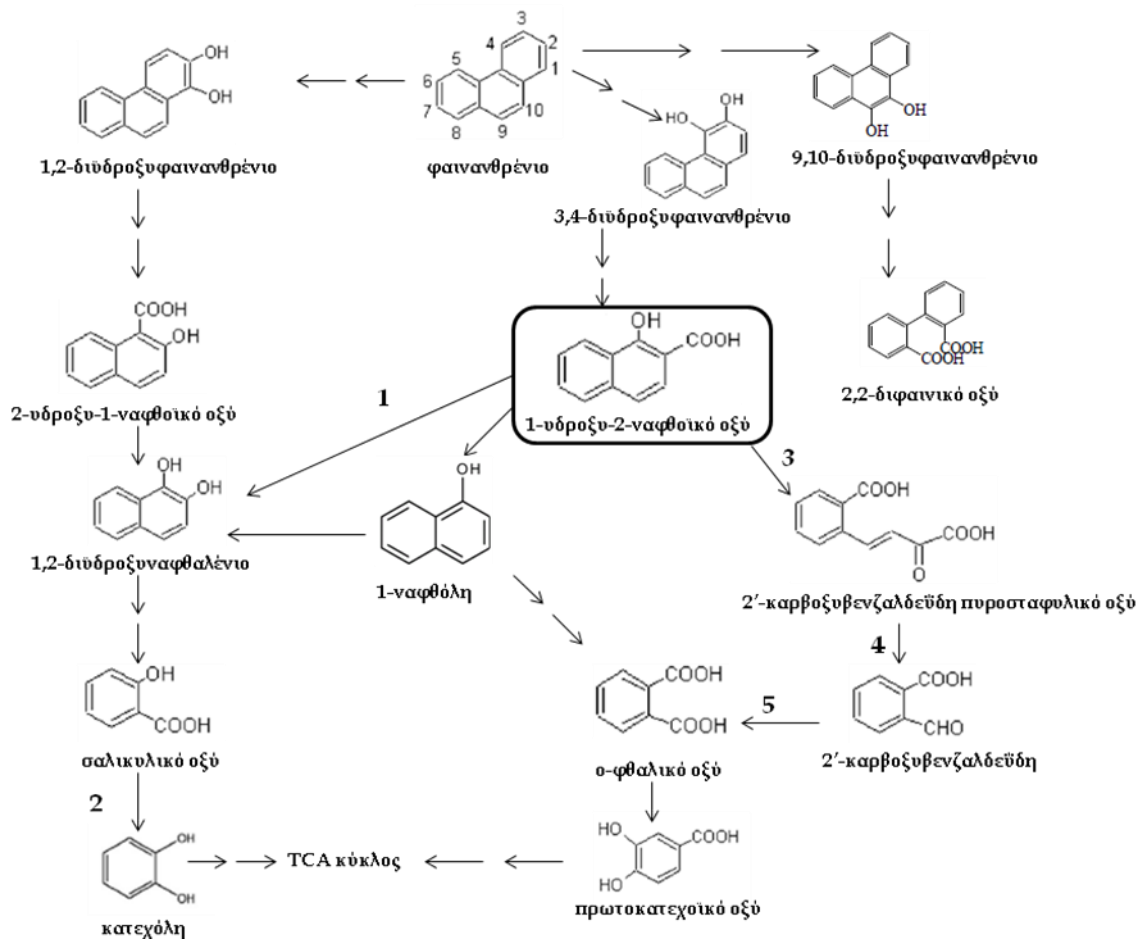
Σχήμα 1.4.1 Απεικόνιση των περιοχών “κόλπου” και “Κ” του φαινανθρενίου.

Στα βακτήρια ο καταβολισμός του φαινανθρενίου προχωράει κυρίως μέσω 3,4-υδροξυλίωσης προς σχηματισμό 3,4-διυδροξυ-3,4-διυδροφαινανθρενίου και αφυδρογόνωση της διόλης προς σχηματισμό 3,4-διυδροξυφαινανθρενίου. Η διόλη εν συνεχεία μέσω *ortho*-σχάσης μεταβολίζεται προς καρβοξυλικό οξύ του 2-(2-καρβοξυβινυλ)-ναφθαλενίου και μέσω *meta*-σχάσης προς 4-(1-υδροξυναφθαλεν-2-υλ)-2-οξο-βουτ-3-ενοϊκό οξύ, όπου και τα δυο προϊόντα στη συνέχεια μετατρέπονται σε 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ. Το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ μεταβολίζεται περαιτέρω κυρίως μέσω των εξής δύο πορειών:

(α) με τη δράση της υδροξυλάσης του 1-υδροξυ-2ναφθοϊκού οξέος μετατρέπεται σε 1,2-διυδροξυναφθαλένιο, εν συνεχεία σε σαλικυλικό οξύ το οποίο με τη δράση της σαλικυλικής υδροξυλάσης μετατρέπεται σε κατεχόλη. Αυτή η πορεία είναι η ονομαζόμενη πορεία του 1,2- διυδροξυναφθαλενίου και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Evans *et al.* (1965) και

(β) η δράση της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος οδηγεί σε μετατροπή του 1-υδροξυ-2ναφθοϊκού οξέος σε 2-καρβοξυβενζαλδεϋδη του

πυροσταφυλικού οξέος η οποία με τη δράση της υδρατάσης/αλδολάσης της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη και τέλος με τη δράση της αφυδρογονάσης της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης σε *ortho*-φθαλικό οξύ. Το *ortho*-φθαλικό οξύ μεταβολίζεται περαιτέρω προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Αυτή η πορεία έχει επικρατήσει να λέγεται η πορεία του φθαλικού (Barnsley, 1983; Iwabuchi and Harayama, 1998b).



Σχήμα 1.4.2 Προτεινόμενες καταβολικές πορείες του φαινανθρενίου από βακτήρια. Με μονό βελάκι συμβολίζονται αντιδράσεις ενός βήματος, ενώ με διπλό αντιδράσεις περισσότερων βημάτων. 1. υδροξυλάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, 2. σαλικυλική υδροξυλάση, 3. διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, 4. υδρατάση/αλδολάση της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος και 5. αφυδρογονάση της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης.

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η δράση μιας αποκαρβοξυλάσης μπορεί να οδηγήσει και στο σχηματισμό 1-ναφθόλης από το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, η οποία

μεταβολίζεται είτε μέσω σαλικυλικού είτε μέσω ο-φθαλικού (Prabhu and Phale, 2003).

Για βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχει αναφερθεί ότι ο καταβολισμός του φαινανθρενίου προχωρά κυρίως μέσω 3,4-υδροξυλίωσης και εν συνεχεία *meta*-σχάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος προς σχηματισμό σαλικυλικού οξέος (Mrozik *et al.*, 2003). Σε στέλεχος *Aeromonas* έχει αναφερθεί ότι ο καταβολισμός του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος προχωρά μέσω της πορείας του ο-φθαλικού (Kiyohara and Nagao, 1977). Οι Pinyakong *et al.* (2000), αναφέρουν ότι στο στέλεχος *Sphingomonas* P2 λαμβάνει χώρα 1,2- και 3,4- διοξυγόνωση και εν συνεχεία *meta*-σχάση για την αποδόμηση του φαινανθρενίου (Pinyakong *et al.*, 2000). Πορεία 3,4- διοξυγόνωσης και *meta*-σχάσης έχει αναφερθεί και για το *Mycobacterium* SNP11 (Pagnout *et al.*, 2007). Σε καλλιέργεια στελέχους *Burkholderia* C3 στην οποία συμπληρώνονταν το φαινανθρένιο, βρέθηκε πως η αργή αντίδραση καταβολισμού του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, είναι αυτή που ευνοεί την 1,2-διοξυγόνωση τελικά (Seo *et al.*, 2007). Σε στέλεχος *Arthrobacter* sp. P1-1 βρέθηκε ότι διενεργείται 1,2-, 3,4- και 9,10- διοξυγόνωση του φαινανθρενίου, με επικρατέστερη την *ortho*-σχάση μέσω της πορείας του ο-φθαλικού (Seo *et al.*, 2006). Τέλος, σε στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, έχει αποδειχθεί ότι η οξειδωση του φαινανθρενίου οδηγεί σε 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ το οποίο καταβολίζεται μέσω ο-φθαλικού οξέος (Μ.Δ.Ε Καβακιώτη; Διδακτορική διατριβή Καλλιμάνη; Vandera *et al.*, 2012).

Γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου που έχουν ταυτοποιηθεί από διάφορους μικροοργανισμούς εντοπίζονται είτε στο χρωμόσωμα, είτε σε καταβολικά πλασμίδια. Στο στέλεχος *Comamonas testosteroni* τα γονίδια καταβολισμού του φαινανθρενίου βρίσκονται στο χρωμόσωμα του στελέχους (Goyal and Zylstra, 1997), ενώ επίσης στο χρωμόσωμα εντοπίζονται τα αντίστοιχα γονίδια από το στέλεχος *Nocardioides* KP7 (Saito *et al.*, 2000). Επίσης, στα στελέχη *Acinetobacter iwoffi*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium*, *Vibrio* sp. και *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν με βάση με την ιδιότητα ανάπτυξής τους σε φαινανθρένιο και διβενζοθειοπένιο, εκδίωξη των

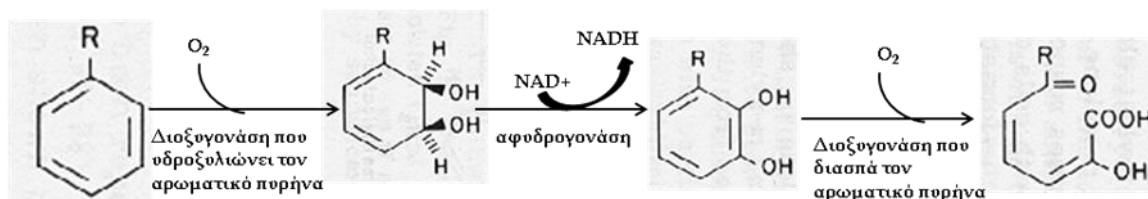
καταβολικών πλασμιδίων (curing), έδειξε ότι τα πλασμίδια δεν εμπλέκονται στον καταβολισμό των ανωτέρω αρωματικών ενώσεων στα προαναφερθέντα στελέχη (Okoro *et al.*, 2009).

Υπάρχουν όμως αναφορές και για τον εντοπισμό γονιδίων καταβολισμού του φαινανθρενίου σε καταβολικά πλασμίδια διαφόρων βακτηριακών στελεχών. Στο στέλεχος *Mycobacterium* BG1, ο καταβολισμός του φαινανθρενίου πραγματοποιείται μέσω *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και τα υπεύθυνα γονίδια έχουν εντοπιστεί σε τρία καταβολικά πλασμίδια (Guerin and Jones, 1988). Στο στέλεχος *Alcaligenes faecalis* AFK2, γονίδια καταβολισμού του φαινανθρενίου εντοπίζονται στο καταβολικό πλασμίδιο PHK2 (Kiyohara *et al.*, 1990) Για τα στελέχη *Sphingomonas* K514 και HS362 γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό φαινανθρενίου αναφέρεται επίσης πως εντοπίζονται σε καταβολικό πλασμίδιο (Cho and Kim, 2001; Hwa *et al.*, 2005). Σε πλασμίδιο έχουν εντοπιστεί και τα γονίδια για τον καταβολισμό του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Staphylococcus* PN/Y (Mallick *et al.*, 2007). Τέλος, στο στέλεχος *Arthrobacter keyseri* 12B, που καταβολίζει φαινανθρένιο γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, έχουν εντοπιστεί σε πλασμίδιο (Eaton, 2001).

1.5 Βακτηριακές διοξυγονάσες

Κατά την αερόβια αποδόμηση οι βακτηριακές διοξυγονάσες καταλύουν την ενσωμάτωση μοριακού οξυγόνου στα υποστρώματα των αρωματικών ενώσεων (Mason and Cammack, 1992; Butler and Mason, 1997). Οι διοξυγονάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν μη-αιμικό σίδηρο στο ενεργό κέντρο και ονομάζονται διοξυγονάσες τύπου Rieske μη-αιμικού σιδήρου (Harayama *et al.*, 1992). Υπάρχουν δυο κατηγορίες διοξυγονασών, εκείνες που καταλύουν την υδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα και η δράση τους απαιτεί NAD(P)H σαν δότη ηλεκτρονίων κι εκείνες που επιφέρουν τη σχάση του αρωματικού πυρήνα, χωρίς την απαίτηση για παρουσία NAD(P)H. Η διϋδροξυλίωση των αρωματικών

πυρήνων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση των διοξυγονασών σχάσης αυτού (Σχήμα 1.5.1) (Gibson and Parales, 2000).



Σχήμα 1.5.1 Δράση διοξυγονασών κατά την αερόβιο αποδόμηση αρωματικών πυρήνων.

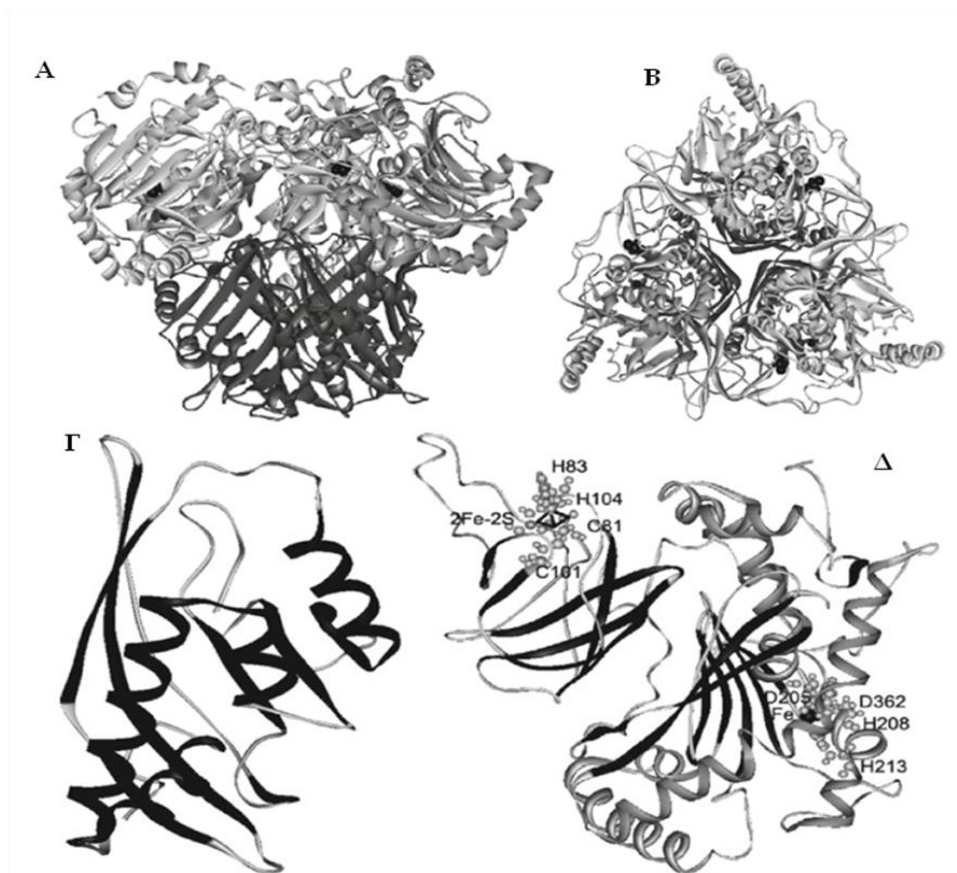
1.5.1 Διοξυγονάσεις υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα

1.5.1.1 Δομή διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικού πυρήνα

Οι διοξυγονάσεις αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικών πυρήνων (Ring Hydroxylating Dioxygenases-RHDs) είναι πολυσύνθετα ενζυμικά συστήματα αποτελούμενα από δύο ή τρεις πρωτεΐνες και συνίστανται από την οξυγονάση και μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ferraro *et al.*, 2005; Kweon *et al.*, 2008; Jouanneau *et al.*, 2011). Η οξυγονάση του συστήματος μπορεί να είναι ομοολιγομερές (α_n), στερούμενο β υπομονάδας (Butler and Mason, 1997; Sato *et al.*, 1997; Nojiri *et al.*, 2005) ή ετεροολιγομερές ($\alpha_n\beta_n$). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι οξυγονάσεις αποτελούνται από α υπομονάδα (μεγέθους ~50 kDa) και β υπομονάδα (μεγέθους ~20 kDa) οι οποίες συγκροτούν ετεροεξαμερές $\alpha_3\beta_3$.

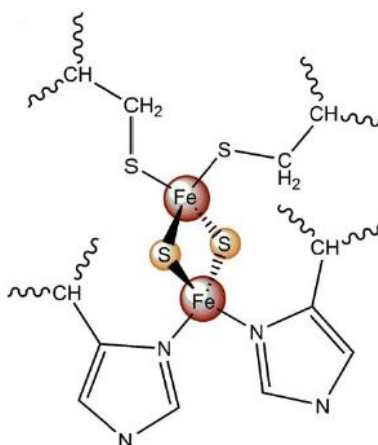
Η α υπομονάδα, που καλείται και μεγάλη υπομονάδα, περιλαμβάνει δυο συντηρημένες περιοχές, μια περιοχή πρωτεΐνης σιδήρου-θείου (Iron Sulfur Protein- ISP) στο N-τελικό άκρο που φέρει ένα συντηρημένο κέντρο Rieske [2Fe-2S] και στο C-τελικό άκρο την καταλυτική περιοχή που περιέχει συντηρημένη περιοχή για τη δέσμευση του μονοπυρήνου σιδήρου και είναι το σημείο στο οποίο γίνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων στα μόρια του οξυγόνου προκειμένου αυτά να ενεργοποιηθούν και να υδροξυλιώσουν το αρωματικό υπόστρωμα (Jiang *et al.*, 1996).

Τυπική δομή ετεροεξαμερούς $\alpha_3\beta_3$ βρέθηκε για πρώτη φορά στη διοξυγονάση του ναφθαλενίου από το στέλεχος *Pseudomonas* NCIB 9816-4 (Kauppi *et al.*, 1998). Το εξαμερές σύμπλοκο παρουσιάζει τη δομή μανιταριού με τις α_3 υπομονάδες να εντοπίζονται στο καπάκι, ενώ τις β_3 στο στέλεχος (Σχήμα 1.5.1.1.1). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στην σύνδεση των α υπομονάδων μεταξύ τους είναι συντηρημένα στις αλληλουχίες των διοξυγονασών $\alpha\beta$ υπομονάδων και γι' αυτό τα εξαμερή είναι η κοινή τεταρτοταγής δομή όλων αυτού του τύπου διοξυγονασών (Kauppi *et al.*, 1998).



Σχήμα 1.5.1.1.1 Τυπική δομή διοξυγονασών αρχικής δροξυλίωσης με αντιπροσωπευτική την $NDO_{NCIB9816-4}$. (A) Φαίνεται η δομή μανιταριού του εξαμερούς με τις α υπομονάδες στο καπάκι (ανοιχτό γκρι) και τις β στο στέλεχος (σκούρο γκρι). Το Rieske κέντρο και ο σίδηρος στο καταλυτικό κέντρο φαίνονται με μαύρο χρώμα. (B) Άποψη από τον κάθετο άξονα του $NDO \alpha_3\beta_3$ εξαμερούς. (Γ) Δευτεροταγής δομή της β υπομονάδας της οξυγονάσης $NDO-O_{NCIB9816-4}$ και (Δ) Δευτεροταγής δομή της α υπομονάδας της οξυγονάσης $NDO-O_{NCIB9816-4}$. Στο κέντρο Rieske το ένα άτομο σιδήρου συντονίζεται από τα κατάλοιπα Cys81 και Cys101, ενώ το δεύτερο από τα κατάλοιπα His83 και His104. Στο καταλυτικό κέντρο το άτομο σιδήρου συντονίζεται από τα κατάλοιπα His208 και His213, καθώς και από το γεφυρωτικό κατάλοιπο του ασπαρτικού οξέος Asp362.

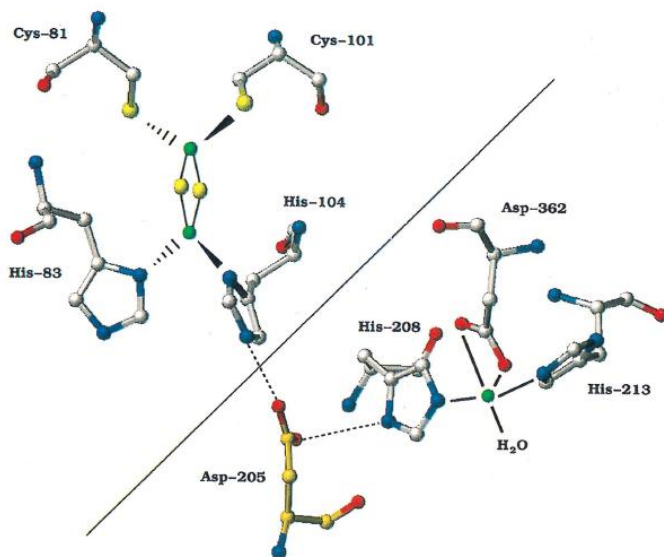
Η ανάλυση αλληλουχιών διαφόρων α υπομονάδων τύπου Rieske πρωτεϊνών, έχει αποκαλύψει την παρουσία μιας εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής στο N-τελικό άκρο με μοτίβο αλληλουχίας C-X-H-X₁₅₋₁₇-C-X-X-H (Mason and Cammack, 1992). Οι δυο συντηρημένες κυστεΐνες και οι δυο ιστιδίνες συντονίζουν το σίδηρο του συμπλόκου [2Fe-2S] στην πρωτεΐνη. Τα ιόντα θείου γεφυρώνουν τα ιόντα σιδήρου, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ρομβικού σχήματος. Το άτομο σιδήρου που συνδέεται με τα κατάλοιπα κυστεϊνών είναι τριθενές, ενώ ο σίδηρος που συνδέεται με τα κατάλοιπα ιστιδινών ανάγεται από τρισθενής σε δισθενής (Σχήμα 1.5.1.1.2) (Ferraro *et al.*, 2005).



Σχήμα 1.5.1.1.2 Συντονισμός των συμπλόκων τύπου Rieske [2Fe-2S] από τα κατάλοιπα ιστιδινών και κυστεϊνών (Ferraro *et al.*, 2005).

Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στη συμβολή μεταξύ δυο α υπομονάδων και ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το κέντρο Rieske [2Fe-2S] της μιας υπομονάδας στον μονοπύρρηνο σίδηρο της παρακείμενης. Στην καταλυτική περιοχή στο C-τελικό άκρο των α υπομονάδων εντοπίζεται ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (Asp205) με ρόλο γεφυρωτικού καταλοίπου, το οποίο σε κάθε συμβολή α-α υπομονάδων σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μια ιστιδίνη (His104) του κέντρου Rieske [2Fe-2S] της μιας α υπομονάδας και με μια ιστιδίνη (His208) της καταλυτικής περιοχής της παράπλευρης α υπομονάδας, παρέχοντας έτσι μια άμεση οδό για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ISP στην καταλυτική

περιοχή των α υπομονάδων των ετερομερών συμπλόκων (Σχήμα 1.5.1.1.3) (Kauppi *et al.*, 1998; Furusawa *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2010).

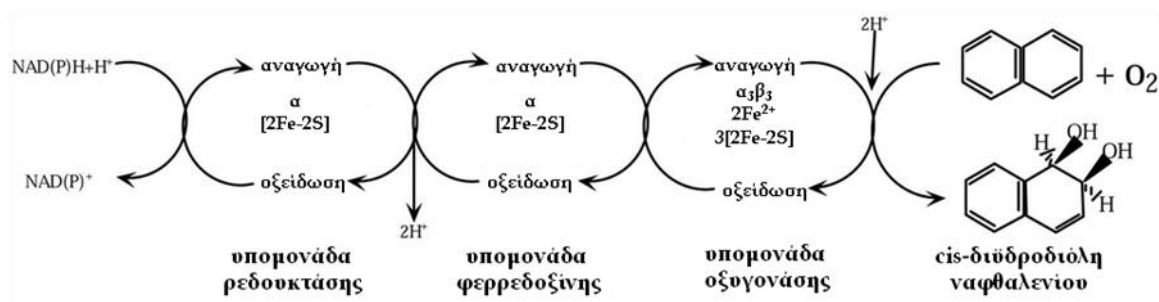


Σχήμα 1.5.1.1.3 Δομή του ενεργού κέντρου της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από το στέλεχος *Pseudomonas* NCIB 9816-4, NDO-O₉₈₁₆₋₄ (Kauppi *et al.*, 1998) και προτεινόμενη πορεία μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κέντρο Rieske της μίας α υπομονάδας δια μέσου του καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος (Asp205, που απεικονίζεται με χρυσό) στο μονοπύρρηνο σίδηρο της παράπλευρης α υπομονάδας. Τα αμινοξέα άνω της διαγώνιου ανήκουν στο κέντρο Rieske της μίας α υπομονάδας. Τα αμινοξέα κάτω της διαγώνιας γραμμής ανήκουν στο καταλυτικό κέντρο της παρακείμενης α υπομονάδας. Η χρωματική απεικόνιση ατόμων έχει ως εξής: κόκκινο:οξυγόνο, μπλε: άζωτο, κίτρινο: θείο και πράσινο: σίδηρος (Parales *et al.*, 1999).

Μεταλλάξεις του καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος (Asp) προς αλανίνη (Ala), γλουταμινικό οξύ (Glu), ασπαραγίνη (Asn) ή γλουταμίνη (Glu) οδήγησαν σε μη επαρκή κατάλυση του ναφθαλενίου προς *cis*-διϋδροδιόλη του ναφθαλενίου σε *Pseudomonas* NCIB 9816-4 (Parales *et al.*, 1999). Επίσης εντοπίζονται δυο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης που συντονίζουν το μονοπύρρηνο σίδηρο (His208 και His 213, για την NDO-O_{NCIB9816-4}) (Parales *et al.*, 1999; Parales, 2003). Στην περιοχή αυτή ημι-συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων που διαφέρουν μεταξύ των διοξυγονασών θεωρείται ότι ευθύνονται για την εξειδίκευση των αντίστοιχων διοξυγονασών σε διαφορετικά υποστρώματα (Ferraro *et al.*, 2005). Πράγματι, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποστρωμάτων και των αμινοξικών

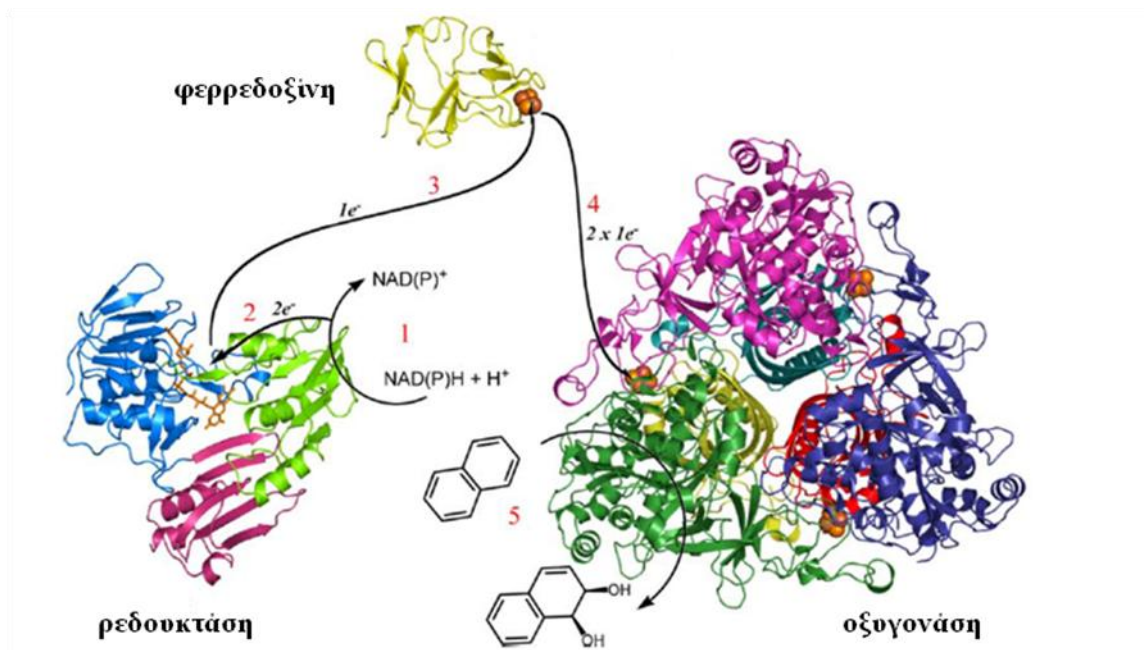
καταλοίπων του ενεργού κέντρου πιστεύεται πως ελέγχουν τον προσανατολισμό του υποστρώματος προς το κέντρο μονοπύρηνου σιδήρου, καθορίζοντας έτσι την στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης (Jouanneau *et al.*, 2011).

Δυο βοηθητικές πρωτεΐνες, μια φερρεδοξίνη η οποία περιέχει κέντρο τύπου Rieske [2Fe-2S] και μια φλαβοπρωτεΐνη ρεδουκτάση (μπορεί να περιέχει είτε FAD είτε FMN θέση πρόσδεσης) συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες μέσω της οξείδωσης του NAD(P)H, παρέχουν το αναγωγικό δυναμικό στις υπομονάδες της οξυγονάσης (Mason and Cammack, 1992; Butler and Mason, 1997; Kweon *et al.*, 2008).



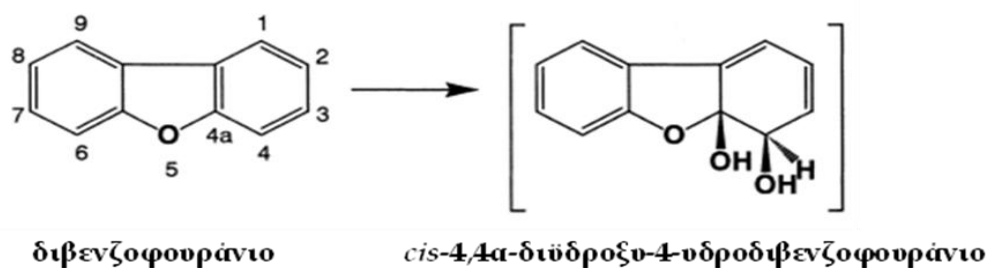
Σχήμα 1.5.1.1.4 Απεικόνιση του συστήματος διοξυγονάσης του ναφθαλενίου NDO.

Συνοψίζοντας λοιπόν, τα συστήματα οξυγονασών των πρωτεϊνών Rieske μη αιμικού σιδήρου διεκπεραιώνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την οξείδωση του NAD(P)H με σκοπό την ενεργοποίηση του μοριακού O_2 που θα δράσει για την διϋδροξυλίωση των αρωματικών δακτυλίων. Η δράση των υπομονάδων των συστημάτων διοξυγονασών αυτού του τύπου απεικονίζεται στα Σχήματα 1.5.1.1.4 και 1.5.1.1.5.



Σχήμα 1.5.1.1.5 Σύστημα διοξυγονάσης Rieske αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικού δακτυλίου. (1) η ρεδουκτάση (BPDO-R_{KKS102}) οξειδώνει το NAD(P)H σε NADP⁺ δεσμεύοντας 2 ηλεκτρόνια (2) αυτά παραμένουν στη ρεδουκτάση και 1 ηλεκτρόνιο τη φορά μεταφέρεται στη φερρεδοξίνη (BPDO-F_{LB400}), η οποία τα διοχετεύει στο Rieske σύμπλοκο της οξυγονάσης (BPDO-O_{RHA1}). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται δυο φορές για κάθε μόριο διϋδροξυλιωμένου προϊόντος που σχηματίζεται στο κέντρο του μονοπύρηνου σιδήρου (Ferraro *et al.*, 2005). BPDO-R_{KKS102}: ρεδουκτάση συστήματος διοξυγονάσης διφαινυλίου του στελέχους *Pseudomonas* KKS102 (Senda *et al.*, 2000). BPDO-F_{LB400}: φερρεδοξίνη συστήματος διοξυγονάσης διφαινυλίου του στελέχους *Burkholderia xenovorans* LB400 (Couture *et al.*, 2001) και BPDO-O_{RHA1}: οξυγονάση συστήματος διοξυγονάσης διφαινυλίου του στελέχους *Rhodococcus* RHA1 (Furusawa *et al.*, 2004).

Τα υποστρώματα του ναφθαλενίου, φαινανθρενίου και οι 4-δακτυλίων PAHs σχηματίζουν διϋδροξυλιωμένα παράγωγα με τη δράση των πλευρικών διοξυγονασών (lateral) με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου NDO. Αντίστοιχα, το φλουορένιο και τα ετεροατομικά ανάλογά του όπως το διβενζοφουράνιο, καρβαζόλιο και διβενζοθειοπένιο απαιτούν τη δράση των γωνιακών (angular) διοξυγονασών. Σε αυτή την αντίδραση το άτομο άνθρακα που συνδέεται με την καρβονυλική ομάδα της 9-φλουορενόνης (για το φλουορένιο) ή των ετεροατόμων (στα ανάλογα διβενζοφουρανίου και καρβαζολίου) και το παρακείμενο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου είναι εκείνα που οξειδώνονται (Σχήμα 1.5.1.1.6) (Nojiri *et al.*, 2001).



Σχήμα 1.5.1.1.6 Αντίδραση γωνιακής διϋδροξυλίωσης του διβενζοφουρανίου.

Η πρώτη κρυσταλλική δομή που προσδιορίστηκε ήταν αυτή της διοξυγονάσης του ναφθαλενίου (NDO-O₉₈₁₆₋₄) από *Pseudomonas* NCIB 9816-4 (Kauppi *et al.*, 1998) και έκτοτε έχουν αναφερθεί οι κρυσταλλικές δομές άλλων 10 α υπομονάδων διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης. Πρόκειται για τις: διοξυγονάση διφαινυλίου (BPDO-O_{RHA1}) από *Rhodococcus* RHA1 (Furusawa *et al.*, 2004), διοξυγονάση ναφθαλενίου (NDO-O_{NCIMB12038}) από *Rhodococcus* NCIMB12038 (Gakhar *et al.*, 2005), διοξυγονάση διφαινυλίου (BPDO-O_{B1}) από *Sphingobium yanoikuyae* B1 (Ferraro *et al.*, 2007), διοξυγονάση νιτροβενζενίου (NBDO-O_{JS675}) από *Comamonas* JS765 (Friemann *et al.*, 2005), διοξυγονάση κουμενίου (CDO-O_{IP01}) από *Pseudomonas fluorescens* IP01 (Dong *et al.*, 2005), μονοοξυγονάση 2-οξοκινολίνης (OMO-O₈₆) από *Pseudomonas putida* 86 (Martins *et al.*, 2005), 1,9α-διοξυγονάση του καρβαζολίου (CARDO-O_{CA10}) από *Pseudomonas resinovorans* CA10 (Nojiri *et al.*, 2005), διοξυγονάση τολουολίου (TDO-O_{F1}) από *Pseudomonas putida* F1 (Lee *et al.*, 2005), διοξυγονάση από *Sphingomonas* CHY-1 (Jakoncic *et al.*, 2007) και 1,9α-διοξυγονάση του καρβαζολίου (CARDO-O_{IC177}) από *Nocardioides aromaticivorans* IC177 (Inoue *et al.*, 2006a). Όλες οι προαναφερθείσες διοξυγονάσες εμφανίζουν α₃β₃ τεταρτοταγή δομή, με εξαίρεση την διοξυγονάση καρβαζολίου από *Pseudomonas resinovorans* CA10, τη διοξυγονάση του καρβαζολίου (CARDO-O_{IC177}) από *Nocardioides aromaticivorans* IC177 και τη μονοοξυγονάση 2-οξοκινολίνης (OMO-O₈₆) από *Pseudomonas putida* 86, που συνιστούν ομοτριμερή περιέχουσες μόνο α υπομονάδες (α₃).

Διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης από διάφορα στελέχη συνοψίζονται στον Πίνακα 1.5.1.

1.5.1.2 Ταξινόμηση των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης

Παρόλο που οι RHDs έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, παρόμοιες τεταρτοταγείς δομές και συντηρημένα αμινοξέα στο Rieske και το καταλυτικό τους κέντρο, παρουσιάζουν διαφορές στην αμινοξική τους αλληλουχία και στις δομές των υπομονάδων αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Kweon *et al.*, 2008; Jouanneau *et al.*, 2011).

Το 1992 έγινε μια πρώτη προσπάθεια κατηγοριοποίησης των RHDs με βάση τις σχετιζόμενες πρωτεΐνες που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και τη φύση του οξειδοαναγωγικού τους κέντρου (Batie *et al.*, 1992). Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός στα επόμενα χρόνια νέων διοξυγονασών που δεν ενέπιπταν στις κατηγορίες κατά Batie *et al.* οδήγησε στη δημιουργία νέου συστήματος κατηγοριοποίησης το 2001, από τους Nam *et al.* (2001). Το νέο αυτό σύστημα βασίστηκε στις ομολογίες των αμινοξικών αλληλουχιών των α υπομονάδων των διοξυγονασών και είχε το πλεονέκτημα της άμεσης κατηγοριοποίησης οποιασδήποτε νέας διοξυγονάσης της οποίας οι μεταφορείς ηλεκτρονίων του συστήματος ήταν άγνωστοι. Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση οι RHDs διαχωρίστηκαν σύμφωνα με την εξειδίκευσή τους για το αρωματικό υπόστρωμα. Έτσι, οι τύπου I είναι διοξυγονάσες που διαθέτουν μόνο την α υπομονάδα, επιδεικνύουν μεγάλη ανομοιομορφία ως προς τις αμινοξικές τους αλληλουχίες και το εύρος των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων, σε σχέση με τις διοξυγονάσες των άλλων κατηγοριών. Οι τύπου II εκπροσωπούνται από τις διοξυγονάσες τολουολίου/βενζοϊκού οξέος, οι τύπου III από διοξυγονάσες ναφθαλενίου και PAHs και οι τύπου IV από διοξυγονάσες τολουολίου/διφαινυλίου (Nam *et al.*, 2001). Πρόσφατα ένα πιο πολύπλοκο σύστημα κατηγοριοποίησης RHDs προτάθηκε από τους Kweon *et al.* (2008), στο οποίο λαμβάνονται υπόψη και οι αλληλουχίες των μεταφορέων ηλεκτρονίων του συστήματος της διοξυγονάσης. Στις ομάδες λοιπόν όπως προτάθηκαν από τους

Nam et al. προστέθηκε και η ομάδα V η οποία περιέχει διοξυγονάσες που έχουν ταυτοποιηθεί από Gram+ βακτήρια των γενών *Nocardioides*, *Mycobacterium* και *Arthrobacter* (Saito et al., 2000; Eaton, 2001; Krivobok et al., 2003; Kim et al., 2006). Άλλο ένα χαρακτηριστικό της ανωτέρω ομάδας διοξυγονασών είναι ότι η υπομονάδα της φερρεδοξίνης περιέχει κέντρο [3Fe-4S] σε αντίθεση με υπομονάδες φερρεδοξίνης από συστήματα διοξυγονασών Gram- βακτηρίων, οι οποίες περιέχουν κέντρο [2Fe-2S].

Πρόσφατη μελέτη κατατάσσει τις RHDs με βάση τη φυλογενετική ανάλυση των α υπομονάδων και καταλήγει ότι ο κυρίαρχος παράγοντας που διαφοροποιεί τις RHDs είναι η προτίμηση προς το υπόστρωμα που καταλύουν σε συνδυασμό με τα σημεία που γίνεται η προσβολή του αρωματικού δακτυλίου. Με αυτά τα κριτήρια οι RHDs διαχωρίζονται σε τέσσερις ομάδες A-D και σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τις υπομονάδες που τις απαρτίζουν, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι υπομονάδες που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της αλυσίδας ροής ηλεκτρονίων (Chakraborty et al., 2012).

Πίνακας 1.5.1 Διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης αρωματικών πυρήνων από διάφορα στελέχη.

Πρωτεΐνες	Στελέχη	οξυγονάσες α υπομονάδες	Accession No.	Αναφορές
BenA	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	βενζοϊκού	YP_046122	Barbe <i>et al.</i> , 2004
AntA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ADP1	ανθρανυλικού	AF071556	Bundy <i>et al.</i> , 1998
BenA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ADP1	βενζοϊκού	AF009224	Neidle <i>et al.</i> , 1991
PhnAc	<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2	φαινανθρενίου	AB024945	Kiyohara <i>et al.</i> , 1982
PhtAa	<i>Arthrobacter keyseri</i> 12B	φθαλικού	AF331043	Eaton, 2001
CbdA	<i>Burkholderia cepacia</i> 2CBS	αλοβενζοϊκού	CAA55681	Haak <i>et al.</i> , 1995
OphA2	<i>Burkholderia cepacia</i> DBO1	φθαλικού	AF095748	Chang and Zylstra, 1998
AntAc	<i>Burkholderia cepacia</i> DBO1	ανθρανυλικού	AAO83639	Chang <i>et al.</i> , 2003
DntAc	<i>Burkholderia</i> DNT	2,4-δινιτροτολουολίου	U62430	Suen <i>et al.</i> , 1996
PhnAc	<i>Burkholderia</i> RP007	φαινανθρενίου/ναφθαλενίου	AF061751	Laurie and Lloyd-Jones, 1999
BphA	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 (formerly <i>Pseudomonas</i> LB400)	διφαινουλίου	M86348	Erickson and Mondello, 1992
NbzAc	<i>Comamonas</i> JS764	νιτροβενζενίου	AAL76202	Lessner <i>et al.</i> , 2002

BphA	<i>Comamonas testosteroni</i> B-356	διφαινυλίου	U47637	Sylvestre <i>et al.</i> , 1996
IphA2	<i>Comamonas testosteroni</i> YZW-D	ισοφθαλικού	AY923836	Wang <i>et al.</i> , 1995
BphA1	<i>Cupriavidus oxalaticus</i> A5	διφαινυλίου	CAD61140	Toussaint <i>et al.</i> , 2003
PhnA1	<i>Cycloclasticus</i> A5	ανθρανυλικού	BAC81541	Kasai <i>et al.</i> , 2003
XylC1	<i>Cycloclasticus oligotrophus</i> RB1	πρωτεΐνη σιδήρου-θείου	U51165	Wang <i>et al.</i> , 1996
PdoA1	<i>Mycobacterium 6PY1</i>	πυρενίου	CAD38647	Krivobok <i>et al.</i> , 2003
PdoA2	<i>Mycobacterium 6PY1</i>	πυρενίου	CAD38643	Krivobok <i>et al.</i> , 2003
NidA	<i>Mycobacterium</i> S65	πυρενίου	AF546904	Sho <i>et al.</i> , 2004
NidA3	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	φλουορανθενίου	AAAY85176	Kim <i>et al.</i> , 2006
PhtAa	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	φθαλικού	AAQ91914	Stingley <i>et al.</i> , 2004b
NidA	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	πυρενίου	AF249301	Khan <i>et al.</i> , 2001
CarAa	<i>Nocardioides aromaticivorans</i> IC177	καρβαζολίου	Q2HWI0	Inoue <i>et al.</i> , 2006b
PhdA	<i>Nocardioides</i> KP7	φαινανθρενίου	AB017794	Saito <i>et al.</i> , 1999
BphA1f	<i>Novosphingobium</i> (formerly <i>Sphingomonas</i>) <i>aromaticivorans</i> F119	βενζοϊκού	NP_049062	Romine <i>et al.</i> , 1999
DbfA1	<i>Paenibacillus</i> YK5	διβενζοφουρανίου	BAE53401	Iida <i>et al.</i> , 2006b
NahAc	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	ναφθαλενίου	AAZ93388	Jeon <i>et al.</i> , 2006

DitA1	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> BKME-9	διτερπενίου	AF119621	Martin and Mohn, 1999
PahA3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PaK1	ναφθαλενίου	D84146	
AntA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	ανθρανυλικού	AAG05900	Stover <i>et al.</i> , 2000
CumA1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01	κουμενίου	BAA07074	Dong <i>et al.</i> , 2005
NtdAc	<i>Pseudomonas</i> JS42	2-νιτροτολουολίου	U49504	Parales <i>et al.</i> , 1996
TcbAa	<i>Pseudomonas</i> P51	χλωροβενζολίου	U15298	Werlen <i>et al.</i> , 1996
OxoO	<i>Pseudomonas putida</i> 86	2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνη 8-μονοοξυγονάση	Y12655	Rosche <i>et al.</i> , 1997
TodC1	<i>Pseudomonas putida</i> F1	τολουολίου	J04996	Zylstra and Gibson, 1989
NahAc	<i>Pseudomonas putida</i> G7	ναφθαλενίου	YP_534822	Tsuda and Iino, 1990
BenA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	βενζοϊκού	NP_745305	Nelson <i>et al.</i> , 2002
XylX	<i>Pseudomonas putida</i> mt2	τολουολίου	NP_542871	Greated <i>et al.</i> , 2002
NdoB	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816	ναφθαλενίου	M23914	Kurkela <i>et al.</i> , 1988
NahAc	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816-4	ναφθαλενίου	NP_863072	Dennis and Zylstra, 2004
AntA	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	ανθρανυλικού	BAC41526	Maeda <i>et al.</i> , 2003
CarAa	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	καραβζολίου	AB088420	Maeda <i>et al.</i> , 2003
NahAc	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10	ναφθαλενίου	AAD02136	Bosch <i>et al.</i> , 1999

NagAc	<i>Rastolnia</i> U2	ναφθαλενίου	AF036940	Zhou <i>et al.</i> , 2001
BphA1	<i>Rhodococcus globerulus</i> P6	διφαινυλίου	X80041	Asturias <i>et al.</i> , 1995
NidA	<i>Rhodococcus</i> I24	ναφθαλενίου	AF121905	Treadway <i>et al.</i> , 1999
NarAa	<i>Rhodococcus</i> NCIMB12038	ναφθαλενίου	AF082663	Larkin <i>et al.</i> , 1999
BopX	<i>Rhodococcus</i> sp. 19070	βενζοϊκού	AAK58903	Haddad <i>et al.</i> , 2001
NarAa	<i>Rhodococcus</i> sp. P200	ναφθαλενίου	AAR05114	Kulakov <i>et al.</i> , 2005
BenA	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	βενζοϊκού	BAB70698	Kitagawa <i>et al.</i> , 2001
BphA1	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	διφαινυλίου	BAA06868	Masai <i>et al.</i> , 1995
EtbAa1	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	αιθυλβενζενίου	YP_708484	McLeod <i>et al.</i> , 2006
PadAa1	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	φθαλικού	YP_707370	McLeod <i>et al.</i> , 2006
DbfA1	<i>Rhodococcus</i> YK2	διβενζοφουρανίου	BAC00802	Iida <i>et al.</i> , 2002b
BphA1f	<i>Sphingobium</i> (formerly <i>Sphingomonas</i>) <i>yanoikuyae</i> B1	διφαινυλίου/ναφθαλενίου	ABM91740	Ni Chadhain <i>et al.</i> , 2007
XylX	<i>Sphingobium</i> (formerly <i>Sphingomonas</i>) <i>yanoikuyae</i> B1	τολουολίου/βενζοϊκού	ABM79785	Ni Chadhain <i>et al.</i> , 2007
ArhA1	<i>Sphingomonas</i> A4	ακεναφθενίου/ακεναφθυλενίου	BAD34447	Pinyakong <i>et al.</i> , 2004
CarAa	<i>Sphingomonas</i> CB3	καρβαζολίου	AF060489	Shepherd and Lloyd-Jones, 1998

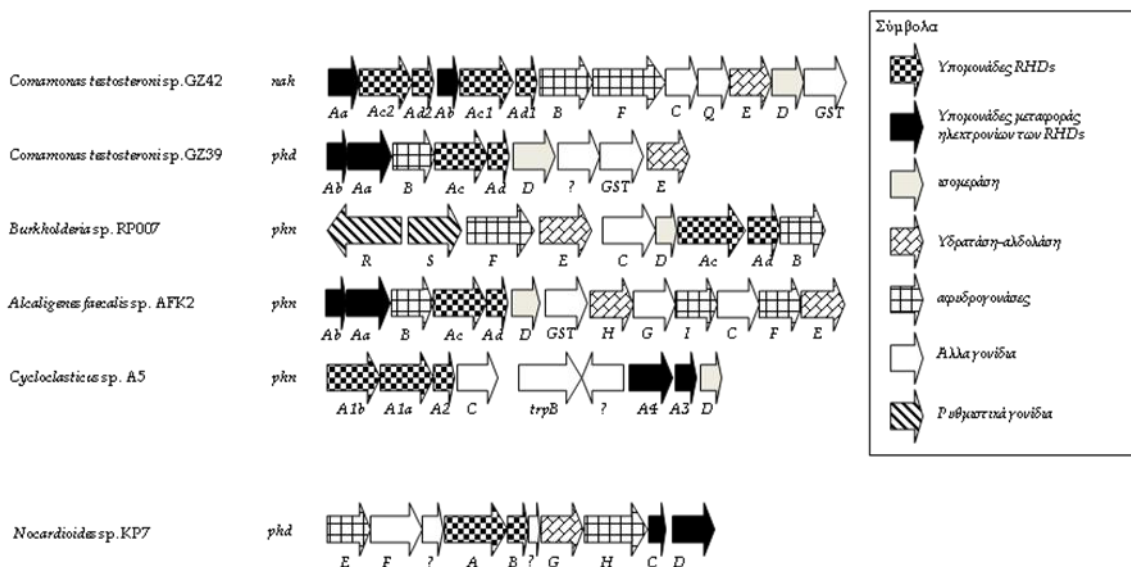
PhnA1a	<i>Sphingomonas</i> CHY-1	υδροξυλίωσης δακτυλίου	AJ633551	Demaneche <i>et al.</i> , 2004
DbfA1	<i>Sphingomonas</i> KA1		BAF03470	Habe <i>et al.</i> , 2002
AntAc	<i>Sphingomonas</i> KA1	ανθρανυλικού	YP_717961	Shintani <i>et al.</i> , 2007
	<i>Sphingomonas</i> KA1	καρβαζολίου	YP_717981	Shintani <i>et al.</i> , 2007
FlnA1	<i>Sphingomonas</i> LB126	φλουορενίου/διβενζοφουρανίου	EU024110	Schuler <i>et al.</i> , 2008
NahA1f	<i>Sphingomonas</i> LH128	ναφθαλενίου	EU024112	Schuler <i>et al.</i> , 2009
DnxA1	<i>Sphingomonas</i> RW1	διοξίνης, διβενζο-π-διοξίνης, διβενζοφουρανίου	X72850	Armengaud <i>et al.</i> , 1998
ThnA1	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> TFA (<i>Sphingomonas macrogolitabida</i>)	τετραλίνης	AF157565	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
DbfA1	<i>Terrabacter</i> DBF63	φλουορενίου	BAC75993	Habe <i>et al.</i> , 2004
PhtA1	<i>Terrabacter</i> DBF63	φθαλικού	BAC54156	Habe <i>et al.</i> , 2003
DbfA1	<i>Terrabacter</i> YK3	διβενζοφουρανίου	BAC06602	Iida <i>et al.</i> , 2002a

1.5.1.3 Γενετική ποικιλομορφία RHDs σε Gram- και Gram+ βακτήρια

Παρόλο που η δράση των RHDs είναι κοινή για όλα τα βακτηριακά στελέχη και απαιτεί τη συνδρομή υπομονάδων με ρόλο αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, ωστόσο από τα γονίδια διοξυγονασών που ολοένα χαρακτηρίζονται από διάφορα βακτηριακά στελέχη προκύπτει ότι η οργάνωσή τους κρύβει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αρχική υδροξυλίωση των αρωματικών πυρήνων συχνά έχει βρεθεί πως είναι οργανωμένα σε οπερόνια που φέρουν τις δυο υπομονάδες διοξυγονάσης, τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης για την αρχική υδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα. Επίσης, σε αυτές τις οργανωμένες δομές εντοπίζονται συχνά και γονίδια που κωδικεύουν για αφυδρογονάσεις, υδρατάσεις/αλδολάσεις, καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Άλλες πάλι φορές έχει παρατηρηθεί ότι τα γονίδια που κωδικεύουν τις υπομονάδες της διοξυγονάσης και της φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης είναι σε διαφορετικά σημεία στο γονιδίωμα των βακτηρίων. Σε ορισμένα στελέχη υπάρχουν περισσότερα από ένα ζευγή γονιδίων που κωδικεύουν τις α και β υπομονάδες διοξυγονασών στο γονιδίωμά τους, τα οποία μπορεί να μοιράζονται από κοινού τις υπομονάδες μιας φερρεδοξίνης και μιας ρεδουκτάσης, ενώ υπάρχουν και αναφορές όπου γονίδια που κωδικεύουν τις υπομονάδες αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν έχουν εντοπιστεί πλησίον των γονιδιακών συμπλεγμάτων που κωδικεύουν ένζυμα καταβολισμού των αρωματικών ενώσεων.

Στην περίπτωση των στελεχών *Comamonas testosteroni* GZ39 και *Alcaligenes faecalis* AFK2, που καταβολίζουν φαινανθρένιο, καθώς και στα στελέχη *Rastolnia* U2 και *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, έχει παρατηρηθεί ότι τα γονίδια *phdB* (GZ39), *phnF* (AFK2), και *nagGH* (U2 και CJ2), αντίστοιχα, που κωδικεύουν για αφυδρογονάσεις διϋδροδιόλης παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων που κωδικεύουν τις διοξυγονάσεις αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου και ναφθαλενίου και των γονιδίων που κωδικεύουν τις υπομονάδες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Σχήμα 1.5.1.1.1) (Kiyohara *et al.*, 1982; Goyal and Zylstra, 1997; Zhou *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2006). Στο στέλεχος *Burkholderia* RP007 που καταβολίζει φαινανθρένιο έχει βρεθεί πως από τη δέσμη των γονιδίων της

διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου λείπουν τα γονίδια των υπομονάδων της φερρεδοξίνης και της ρεδοκτάσης (Laurie and Lloyd-Jones, 1999) (Σχήμα 1.5.1.1.1) και το ίδιο έχει διαπιστωθεί από τους Krinovok *et al.* (2003), σε στέλεχος *Mycobacterium* 6PY1 που καταβολίζει πυρένιο. Στο δε στέλεχος *Mycobacterium* 6PY1, τα γονίδια που κωδικεύουν τις υπομονάδες της διοξυγονάσης Pdo1 και Pdo2 βρέθηκαν σε δυο διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος, ενώ δεν εντοπίστηκαν γονίδια που να κωδικεύουν τις υπομονάδες μεταφορέων ηλεκτρονίων στις περιοχές αυτές (Krinovok *et al.*, 2003). Αντίθετα, στο στέλεχος *Cycloclasticus* A5 τα γονίδια που κωδικεύουν για τη διοξυγονάση και τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδοκτάσης βρίσκονται σε ένα γονιδιακό σύμπλεγμα (Kasai *et al.*, 2003) όπως επίσης έχει αναφερθεί και για το στέλεχος *Nocardioides* KP7 που καταβολίζει φαινανθρένιο (Σχήμα 1.5.1.1.1) (Saito *et al.*, 1999 και 2000).



Σχήμα 1.5.1.1.1 Οργάνωση καταβολικών γονιδίων των PAH από αντιπροσωπευτικά στελέχη πρωτεοβακτηρίων και του Gram+ *Nocardioides* KP7 (Jouanneau *et al.*, 2011).

Στα στελέχη *Novosphingomium aromaticivorans* F199 (Romine *et al.*, 1999), *Sphingobium yanoikuyae* B1 (Ni Chadhain *et al.*, 2007), *Sphingobium* P2 (Pinyakong *et al.*, 2003) και *Sphingomonas* LH128 (Schuler *et al.*, 2009) έχουν βρεθεί έξι ζεύγη γονιδίων που κωδικεύουν για α και β υπομονάδες διοξυγονασών αρχικής

υδροξυλίωσης. Στα προαναφερθέντα στελέχη έχει εντοπιστεί μόνο ένα γονίδιο που κωδικεύει για υπομονάδα φερρεδοξίνης και ένα για υπομονάδα ρεδουκτάσης.

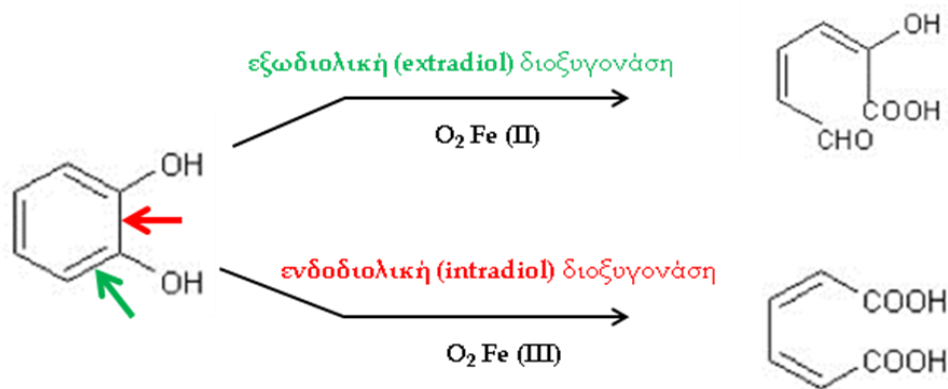
Επιπλέον, στο γένος *Sphingomonads* έχει αναφερθεί ότι γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων είναι διασπαρμένα στο γονιδίωμα τους σε αντίθεση με τις οργανωμένες σε σύμπλεγμα και πολλές φορές τις συμμεταγραφόμενες σε οπερόνια, δομές γονιδίων άλλων βακτηρίων (Khara *et al.*, 2014). Πολλαπλά αντίγραφα γονιδίων που κωδικεύουν για α και β υπομονάδες RHDs φαινανθρενίου, πυρενίου και φθαλικού έχουν βρεθεί και στο *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, ενώ σε όλο το σύμπλεγμα καταβολικών γονιδίων υπάρχει μια υπομονάδα φερρεδοξίνης και μια ρεδουκτάσης (Kim *et al.*, 2008a). Έχει λοιπόν υποτεθεί ότι οι πολλαπλές υπομονάδες διοξυγονασών μοιράζονται από κοινού τις υπομονάδες της φερρεδοξίνης και της ρεδουκτάσης όπως αναφέρεται και για το στέλεχος *Sphingomonas* CHY-1 (Demaneche *et al.*, 2004).

Στο στέλεχος *Sphingomonas macrogolitabida* TFA βρέθηκαν δυο οπερόνια για τον καταβολισμό της τετραλίνης. Στο ένα από αυτά εντοπίστηκαν τα γονίδια των α και β υπομονάδων της RHD και στο δεύτερο τα γονίδια που κωδικεύουν για τους μεταφορείς ηλεκτρονίων (Moreno-Ruiz *et al.*, 2003).

Έχουν επίσης βρεθεί και χαρακτηριστεί στελέχη που καταβολίζουν υποστρώματα φλουορενίου και διβενζοφουρανίου με τη δράση γωνιακών διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης. Ένα στέλεχος *Terrabacter* DBF63 έχει βρεθεί να έχει τα γονίδια *dbfA1A2* που κωδικεύουν για τη διοξυγονάση οργανωμένα σε οπερόνιο, με το γονίδιο *dbfA3* που κωδικεύει για τη φερρεδοξίνη να βρίσκεται καθοδικά αυτών. Μάλιστα, η υπομονάδα της φερρεδοξίνης του περιγραφόμενου στελέχους βρέθηκε να είναι τύπου [3Fe-4S] (Kasuga *et al.*, 2001; Takagi *et al.*, 2005). Ομόλογα γονίδια έχουν βρεθεί και στα στελέχη *Terrabacter* YK3 και *Rhodococcus* YK2 που επίσης καταβολίζουν διβενζοφουράνιο (Iida *et al.*, 2002a) και σε στέλεχος *Shingomonas* LB126 που καταβολίζει φλουορένιο (Schuler *et al.*, 2008).

1.5.2 Διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα

Κατά βάση οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικές καταβολικές πορείες για την αποδόμηση των διαφόρων αρωματικών ενώσεων. Ωστόσο, η αερόβια αποδόμηση των ποικίλων αυτών ενώσεων οδηγεί στο σχηματισμό κάποιων κοινών ενδιάμεσων μεταβολιτών, όπως (υποκατεστημένη) κατεχόλη, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, γεντισικό οξύ, υδροξυκινόνη και συγγενικές αυτών ενώσεις όπως ομοπρωτοκατεχοϊκό, ομογεντισικό και διϋδροξυφαινυλπροπιονικό οξύ. Υποστρώματα στα οποία δρουν οι διοξυγονάσεις σχάσης του αρωματικού πυρήνα είναι και το σαλικυλικό οξύ και η 2-αμινοφαινόλη (Vaillancourt *et al.*, 2004 και 2006; Pérez-Pentoya *et al.*, 2010a). Τα κοινά αυτά ενδιάμεσα στη συνέχεια υπόκεινται σε οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα και τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων τροφοδοτούν τις αντιδράσεις του κεντρικού μεταβολισμού (Pérez-Pentoya *et al.*, 2010a). Η οξυγονολυτική διάσπαση του αρωματικού πυρήνα των κατεχολικών ενδιάμεσων καταλύεται από δυο διαφορετικές κατηγορίες διοξυγονασών.

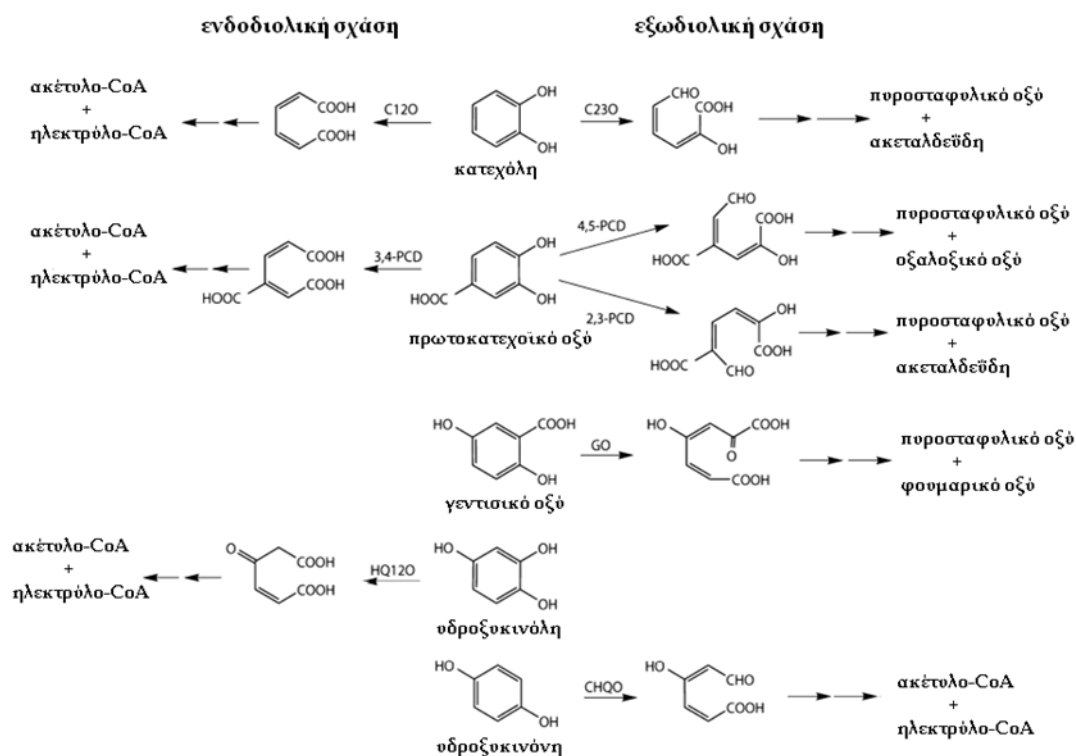


Σχήμα 1.5.2.1 Δράση ενδοδιολικών και εξωδιολικών διοξυγονασών για τη σχάση αρωματικών δακτυλίων.

Οι ενδοδιολικές (intradiol) διοξυγονάσεις, είναι διοξυγονάσεις που χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe (III) και καταλύουν τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου σε θέση *ortho*-, δηλαδή μεταξύ των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου, προς σχηματισμό δικαρβοξυλικών οξέων. Αντίθετα, οι εξωδιολικές (extradiol) διοξυγονάσεις, χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe (II) και καταλύουν τη διάσπαση του

αρωματικού δακτυλίου σε θέση *meta*-, δηλαδή παραπλεύρως των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων του δακτυλίου, οπότε προκύπτουν καρβοξυλικά οξέα που φέρουν επιπρόσθετα και αλδεϋδομάδα (Vaillancourt *et al.*, 2004 και 2006). Έχουν επίσης αναφερθεί εξωδιολικές διοξυγονάσεις που αντί μη-αιμικού Fe (II), χρησιμοποιούν Mn (II) σε στελέχη *Bacillus* (Hatta *et al.*, 2003; Miyazawa *et al.*, 2004).

Η δράση των ενδοδιολικών διοξυγονασών προϋποθέτει την ύπαρξη γειτονικών υδροξυλομάδων και πέραν των κατεχολικών υποστρωμάτων, άλλα υποστρώματα για αυτές τις διοξυγονάσεις αποτελούν οι υποκατεστημένες κατεχόλες όπως το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και η 2-υδροξυκινόλη.



Σχήμα 1.5.2.2 Προϊόντα αντιδράσεων των κεντρικών μεταβολιτών κατά την αποδόμηση αρωματικών ενώσεων από τη δράση διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού δακτυλίου (Vaillancourt *et al.*, 2004).

Γενικότερα, οι εξωδιολικές διοξυγονάσεις διενεργούν τη σχάση σε μια ευρύτερη ποικιλία υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων αυτών του γεντισικού, σαλικυλικού, της υδροξυκινόνης και της 2-αμινοφαινόλης και έτσι, συμμετέχουν

σε περισσότερες βιολογικές πορείες, συμπεριλαμβανομένων βιοσυνθετικών πορειών και πορειών καταβολισμού αρωματικών αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα η ομογεντισική διοξυγονάση εμπλέκεται στον καταβολισμό της φαινυλαλανίνης και τυροσίνης, ενώ η 3-υδροξυανθρανυλική διοξυγονάση στον καταβολισμό της τρυπτοφάνης. Τα υποστρώματα των εξωδιολικών διοξυγονασών λοιπόν μπορεί να είναι υδροξυλιωμένα σε *para*- θέση ή/και να περιέχουν καρβοξυλομάδα ή αμινομάδα στη θέση της δευτέρης υδροξυλομάδας (Vaillancourt *et al.*, 2004 και 2006) (Σχήμα 1.5.2.1). Τα προϊόντα της ενδοδιολικής και εξωδιολικής δράσης διοξυγονασών με αποτέλεσμα τη διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων των κύριων ενδιάμεσων μεταβολιτών που προκύπτουν κατά τις πορείες καταβολισμού αρωματικών ενώσεων συνοψίζονται στο Σχήμα 1.5.2.2.

1.5.2.1 Ταξινόμηση διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα και μηχανισμοί δράσης αυτών

Οι ενδοδιολικές και εξωδιολικές διοξυγονάσες δεν εμφανίζουν δομικές ομοιότητες ούτε ομοιότητες μεταξύ των αμινοξικών τους αλληλουχιών γι' αυτό και θεωρείται ότι ανήκουν εξελικτικά σε διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων.

Από μελέτες δομικών χαρακτηριστικών και αμινοξικών αλληλουχιών προκύπτει ότι οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες ανήκουν σε μια εξελικτική γενιά (Vaillancourt *et al.*, 2006). Έτσι, οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες είναι, όπως προαναφέρθηκε, μεταλλοένζυμα που χρησιμοποιούν μη-αιμικό Fe(III) που κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη δέσμευση και την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου στην αντίδραση σχάσης του αρωματικού δακτυλίου. Το μεταλλικό ιόν συνδέεται με δυο κατάλοιπα τυροσίνης και δυο ιστιδίνης τα οποία είναι συντηρημένα μεταξύ των ενδοδιολικών διοξυγονασών, ενώ στη σύνδεση αυτή προσδένεται και μια υδροξυλομάδα που προέρχεται από το διαλύτη. Σε αυτή τη δομή γίνεται η πρόσδεση του υποστρώματος οδηγώντας στο σχηματισμό ενός σιδηρο-ακυλοπερόξο ενδιάμεσου. Οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες ενεργοποιούν το υπόστρωμα για ηλεκτρονιόφιλη προσβολή από το οξυγόνο (Fretzner, 2012; Guzik *et al.*, 2013).

Οι εξωδιολικές διοξυγονάσες είναι, όπως προαναφέρθηκε, μεταλλοένζυμα που περιέχουν μη-αιμικό Fe(II). Το μεταλλικό ιόν συνδέεται με δυο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα γλουταμικού οξέος, ενώ στη σύνδεση αυτή προσδένονται και τρεις υδροξυλομάδες που προέρχονται από το διαλύτη. Και πάλι σύνδεση του υποστρώματος σε αυτή τη δομή οδηγεί σε σιδηρο-αλκυλοπερόξο ενδιάμεσο ενεργοποιώντας το οξυγόνο για πυρηνόφιλη προσβολή του υποστρώματος (Vaillancourt *et al.*, 2006; Fetzner, 2012). Ο διαφορετικός προσανατολισμός του σιδηρο-αλκυλοπερόξο ενδιάμεσου, που εξαρτάται από το υπόστρωμα, δημιουργεί διαφορετικούς στερεο-ηλεκτρονιακούς παράγοντες για την κάθε κατηγορία ενζύμων, εξηγώντας τη διαφορετική τους δράση (Vaillancourt *et al.*, 2006).

Βάση δομικών διαφορών οι ενδοδιολικές διοξυγονάσες ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες: αυτή των 3,4-διοξυγονασών του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (ομάδα I) και εκείνη των διοξυγονασών κατεχόλης/1,2-υδροξυκινόλης (ομάδα II). Οι διοξυγονάσες κατεχόλης/1,2-υδροξυκινόλης είναι διμερή που αποτελούνται από όμοιες ή παρόμοιες υπομονάδες $(\alpha\text{Fe}^{3+})_2$, ενώ οι 3,4-διοξυγονάσες του πρωτοκατεχοϊκού οξέος είναι ολιγομερή σύμπλοκα $(\alpha\beta\text{Fe}^{3+})_{2-12}$ που συνίστανται από δυο υπομονάδες (Guzik *et al.*, 2013) (Πίνακας 1.5.2.1.1). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενδοδιολικών διοξυγονασών είναι η 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού από *Pseudomonas putida* B-10 (Ohlendorf *et al.*, 1988), η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης από *Acinetobacter* ADP1 (Vetting and Ohlendorf, 2000) και 1,2-διοξυγονάση υδροξυκινόλης από *Nocardioides simplex* 3E (Ferraroni *et al.*, 2005).

Σε αντίθεση, οι εξωδιολικές διοξυγονάσες ταξινομούνται σε τρεις εξελικτικά ανεξάρτητες ομάδες (Πίνακας 1.5.2.1.1) (Eltis and Bolin, 1996).

Πίνακας 1.5.2.1.1 Ταξινόμηση των διοξυγονασών οξείας αρωματικών δακτυλίων (Vaillancourt *et al.*, 2006).

Κατηγορία	Ομάδα	Υπομονάδες	Ένζυμα	Στέλεχος	Αναφορά
Ενδοδιολικές	I	(αβ) ₁₂	3,4-διοξυγονάση πρωτοκατεχοϊκού	<i>Pseudomonas putida</i> B-10	Ohlendorf <i>et al.</i> , 1988
	II	α ₂	1,2-διοξυγονάση κατεχόλης	<i>Acinetobacter</i> ADP1	Vetting and Ohlendorf, 2000
		α ₂	1,2-διοξυγονάση υδροξυκινόλης	<i>Nocardioides simplex</i> E3	Ferraroni <i>et al.</i> , 2005
Εξωδιολικές	I	α ₈	1,2-διοξυγονάση διϋδροξυδιφαινυλίου	2,3 <i>Burkholderia</i> LB400	Han <i>et al.</i> , 1995
		α ₄	2,3-διοξυγονάση κατεχόλης	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	Kita <i>et al.</i> , 1999
		α ₄	2,3-διοξυγονάση ομοπρωτοκατεχοϊκού	<i>Burkholderia fuscum</i>	Vetting <i>et al.</i> , 2004
		α _x	διοξυγονάση		

		χλωροϋδροκινόνης		
	α_2	1,2-διοξυγονάση 2,3- διϋδροξυδιφαινθλίου	<i>Rhodococcus globerulus</i> P6	Asturias <i>et al.</i> , 1994
	α_2	L-3,4-διοξυγονάση διϋδροξυφαινυλαλανίνης (L- DOPA)	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Novotna <i>et al.</i> , 2004
II	α_4	1,2-διοξυγονάση 2,3- διϋδροξυφαινυλπροπιονικού	<i>Escherichia coli</i>	Bugg, 1993
	α_3	διοξυγονάση γαλλικού	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Nogales <i>et al.</i> , 2005
	α_x	2,3-διοξυγονάση ομοπρωτοκατεχοϊκού	<i>Escherichia coli</i> C	Roper and Cooper, 1990
	α_x	2,3-διοξυγονάση κατεχόλης	<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP222	Kabisch and Fortnagel, 1990
	$\alpha_2\beta_2$	4,5-διοξυγονάση πρωτοκατεχοϊκού	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SYK-6	Sugimoto <i>et al.</i> , 1999
	$\alpha_4\beta_4$	4,5-διοξυγονάση	<i>Comamonas</i>	Mampel <i>et al.</i> , 2005

		πρωτοκατεχοϊκού	<i>testosteroni</i> T-2	
	$\alpha_2\beta_2$	1,6-διοξυγονάση 2-αμινοφαινόλης	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	Davis <i>et al.</i> , 1999
III	α_4	διοξυγονάση γεντισικού	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Hapel and Lipscomb, 1990
cupin	α_6	διοξυγονάση 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού	<i>Nocardioides</i> KP7	Iwabuchi and Harayama, 1998b

x: η ολιγομερική κατάσταση του ενζύμου είναι άγνωστη

Στην ομάδα I των εξωδιολικών διοξυγονασών περιλαμβάνονται ένζυμα που αποτελούνται από ενός είδους υπομονάδα και καταλύουν την οξυγονολυτική σχάση των κατεχολικών παραγώγων σε πολλές πορείες αποδόμησης μονο- και πολυ- αρωματικών υδρογονανθράκων (Eltis and Bolin, 1996), όπως βενζενίου, τολουολίου, φαινόλης, διφαινυλίου, ναφθαλενίου, διβενζοφουρανίου και διτερπενοειδών. Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται οι 2,3-διοξυγονάσες της κατεχόλης, οι 1,2-διοξυγονάσες του 2,3-διϋδροξυδιφαινυλίου, οι διοξυγονάσες του 1,2-διϋδροξυναφθαλενίου καθώς και οι 2,3-διοξυγονάσες του ομοπρωτοκατεχοϊκού που έχουν βρεθεί σε ακτινοβακτήρια (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010b).

Στην ομάδα II κατατάσσονται ένζυμα τα οποία ευθύνονται για τον καταβολισμό του πρωτοκατεχοϊκού οξέος μέσω της πορείας της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού. Οι ανωτέρω διοξυγονάσες συνίστανται από δυο ξεχωριστές υπομονάδες. Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται και οι 2,3-διοξυγονάσες ομοπρωτοκατεχοϊκού των πρωτεοβακτηρίων, όπως η αντίστοιχη διοξυγονάση από *E. coli* (Roper and Cooper, 1990), ενώ οι αντίστοιχες διοξυγονάσες των ακτινοβακτηρίων ανήκουν στην ομάδα I (Vetting *et al.*, 2004). Από δυο ξεχωριστές υπομονάδες συνίστανται και οι 1,6-διοξυγονάσες της αμινοφαινόλης, ενώ οι 1,2-διοξυγονάσες του 2,3-διϋδροξυφαινυλπροπιονικού περιέχουν ενός είδους υπομονάδα (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010b).

Η ομάδα III περιέχει διοξυγονάσες επίσης μιας υπομονάδας και είναι διαφορετική από τις δυο προηγούμενες ομάδες διότι αποδομεί 1,4- και 2,5-διϋδροξυλιωμένα υποστρώματα όπως το γεντισικό, το ομογεντισικό και η υδροξυκινόνη. Οι 1,2-διοξυγονάσες του γεντισικού, οι οποίες διασπούν τον αρωματικό πυρήνα ανάμεσα από την καρβοξυλομάδα και τις υδροξυλομάδες προς σχηματισμό μαλεϋλπροσταφυλικού (Σχήμα 1.5.2.2) ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Έχει αναφερθεί ότι ο καταλυτικός μηχανισμός των διοξυγονασών του γεντισικού είναι ίδιος με αυτόν των εξωδιολικών διοξυγονασών των ομάδων I και II, όμως φυλογενετικά οι διοξυγονάσες της ομάδας III σχηματίζουν ξεχωριστό βρόγχο, κάτι που δείχνει ότι έχουν κοινό πρόγονο (Hirano *et al.*, 2007). Σε αυτή

λοιπόν την ομάδα κατατάσσονται και οι διοξυγονάσες του ομογεντισικού, του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού, του υδροξυανθραυλικού (Vaillancourt *et al.*, 2006) και του σαλικυλικού (Matera *et al.*, 2008). Οι διοξυγονάσες του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού, του υδροξυανθραυλικού και του σαλικυλικού είναι μοναδικές μεταξύ των διοξυγονασών σχάσης διότι διασπούν μονοϋδροξυλιωμένους αρωματικούς πυρήνες (Matera *et al.*, 2008).

Είναι φανερό ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ προτιμώμενων υποστρώματων και εξέλιξης των εξωδιολικών διοξυγονασών. Παρατηρεί κανείς ότι διοξυγονάσες της 2,3-κατεχόλης, πιθανόν διαφορετικής ολιγομερικής σύστασης, εντοπίζονται και στην I αλλά και στη II ομάδα. Αυτό συμβαίνει γιατί η εξειδίκευση του υποστρώματος των περισσότερων διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα δεν έχει διερευνηθεί σε βάθος (Vaillancourt *et al.*, 2006).

1.5.2.2 Οικογένεια *cupin* πρωτεϊνών

Όλες οι προαναφερθείσες διοξυγονάσες της 3^{ης} ομάδας (III) ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών *cupin*, οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον μια συντηρημένη δομή έξι αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών που σχηματίζουν δομή β-βαρελιού. Έτσι προέκυψε και η ονομασία τους από τη Λατινική λέξη “cura” που σημαίνει μικρό βαρέλι (Dunwell *et al.*, 2001; Khuri *et al.*, 2001; Fetzner, 2012). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι “monocupins” αν έχουν μια μοναδική περιοχή *cupin* ή “biscopins” αν περιέχουν δυο. Είναι παρούσες σε όλα τα βασίλεια της ζωής και συνιστούν μια πολυποικίλη λειτουργικά οικογένεια στην οποία περιέχονται μη ενζυμικές πρωτεΐνες, όπως αποθηκευτικές πρωτεΐνες των σπόρων σε φυτά, μεταγραφικοί ρυθμιστές και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση, καθώς και πάρα πολλά ένζυμα, όπως πρωτεάσες, επιμεράσες, αποκαρβοξυλάσες και πολλές οξυγονάσες (Dunwell *et al.*, 2001; Matera *et al.*, 2008; Fetzner, 2012). Παρόλο που οι περισσότερες ενζυμικές πρωτεΐνες αυτής της οικογενείας έχει βρεθεί πως χρησιμοποιούν ιόν σιδήρου στο ενεργό κέντρο, ωστόσο έχουν αναφερθεί και μέλη που χρησιμοποιούν χαλκό, ψευδάργυρο, κοβάλτιο και νικέλιο σαν συμπαραγόντες, επιτρέποντας έτσι, παρά

την απόλυτα όμοια τεταρτοταγή τους δομή, στα ένζυμα να καταλύουν μια ποικιλία βιοχημικών αντιδράσεων (Dunwell *et al.*, 2001; Matera *et al.*, 2008).

Η χαρακτηριστική δομή curpin περιέχει δυο συντηρημένα μοτίβα, για το Μοτίβο I η χαρακτηριστική συντηρημένη αλληλουχία είναι: G(X)₅HXHX_{3,4}E(X)₆G, ενώ για το Μοτίβο II: G(X)₅PXG(X)₂H(X)₃N. Κάθε μοτίβο αντιστοιχεί σε δυο β έλικες που διαχωρίζονται από άλλες δυο β έλικες με μια παρεμβαλλόμενη θηλειά. Τα δυο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και του γλουταμινικού στο μοτίβο 1, μαζί με το δεύτερο συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης στο μοτίβο 2, διεκπεραιώνουν τη σύνδεση του μεταλλικού ιόντος και έχουν βρεθεί να είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλη την οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών (Dunwell *et al.*, 2001; Khuri *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2007; Matera *et al.*, 2008; Fretzner, 2012).

Έχουν αναφερθεί κρυσταλλικές δομές για διοξυγονάσες του γεντισικού από *Escherichia coli* O157:H7 (Adams *et al.*, 2006) και *Silicibacter pomeroyi* (Chen *et al.*, 2008), καθώς και για τη διοξυγονάση του σαλικυλικού από *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12 (Matera *et al.*, 2008). Όλες οι ανωτέρω διοξυγονάσες παρουσιάζουν παρόμοιες bicurpin αναδιπλώσεις.

Η διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού του στελέχους *Nocardioides* KP7 παρουσιάζει ομοιότητες με την 1,2-διοξυγονάση του σαλικυλικού από *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12 (Matera *et al.*, 2008), όπως και με διοξυγονάσες του γεντισικού. Όμως το γεντισικό και το σαλικυλικό δεν αποτελούν υποστρώματα ούτε και αναστολείς της συγκεκριμένης διοξυγονάσης, κάτι που δείχνει μια αυστηρή εξειδίκευση του ενζύμου προς το υπόστρωμα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού (Iwabuchi and Harayama, 1998b). Αντίθετα, η διοξυγονάση του σαλικυλικού του *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12, παρουσιάζει καταλυτική δράση σε ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων όπως γεντισικού, 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού, αλλά και σαλικυλικού και υποκατεστημένου σαλικυλικού (Matera *et al.*, 2008).

Πρόσφατα οι Ferraroni *et al.* (2012), απέδειξαν ότι δυο αμινοξικά κατάλοιπα ευθύνονται για το διαχωρισμό των διοξυγονάσεων του σαλικυλικού και γεντισικού από εκείνες του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού. Πρόκειται για τη λευκίνη 38 (Leu38) και

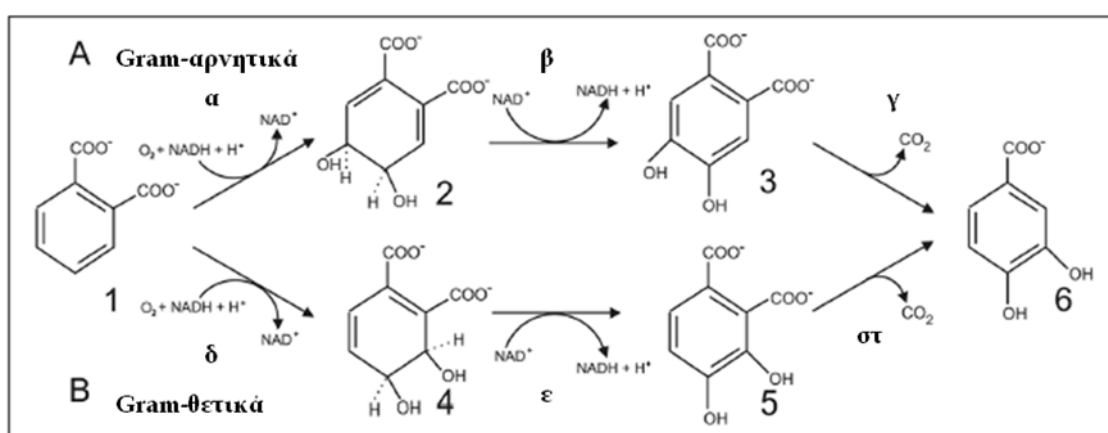
την αλανίνη 85 (Ala85) στη διοξυγονάση του σαλικυλικού του *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12. Η λευκίνη 38 (Leu38) είναι επίσης συντηρημένη και στις αλληλουχίες των διοξυγονασών του γεντισικού, ενώ στη θέση της αλανίνης 85 (Ala85) μπορεί να φέρουν και βαλίνη. Στις διοξυγονάσες όμως του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού υπάρχουν γλουταμίνη (Gln) και ιστιδίνη (His) στις αντίστοιχες θέσεις (βλέπε Κεφάλαιο 3, Αποτελέσματα §3.3, Σχήμα 3.3.3). Μεταλλάξεις που επέφεραν αλλαγή της Leu38 σε Gln στη διοξυγονάση του σαλικυλικού του *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12, οδήγησαν στην απώλεια της ευρείας καταλυτικής δράσης του ενζύμου (υποστρώματα γεντισικού, 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού, σαλικυλικού και υποκατεστημένου σαλικυλικού), με μόνα καταλυόμενα τελικώς υποστρώματα αυτά του γεντισικού και 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού. Μάλιστα, η καταλυτική δράση του ενζύμου για το υπόστρωμα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού βρέθηκε 11πλάσια σε σχέση με εκείνη για το υπόστρωμα του γεντισικού. Αλλαγή της Ala85 σε His οδήγησε και πάλι σε αυξημένη καταλυτική δράση για το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό και πλήρη απώλεια της δυνατότητας δράσης σε υπόστρωμα γεντισικού. Αποδεικνύεται έτσι, η μεγάλη συγγένεια μεταξύ διοξυγονασών του γεντισικού και του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού (Ferraroni *et al.*, 2012).

1.5.3 Καταβολισμός φθαλικού οξέος

Όπως έχει αναφερθεί, η διαδοχική δράση των διοξυγονασών υδροξυλίωσης και σχάσης των αρωματικών δακτυλίων ποικίλλων αρωματικών υποστρωμάτων, κατά την αερόβια αποδόμηση, οδηγεί στο σχηματισμό κάποιων ενδιάμεσων κεντρικών μεταβολιτών, όπως για παράδειγμα κατεχόλες, πρωτοκατεχοϊκό οξύ και γεντισικό οξύ (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010a). Ο σχηματισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος προκύπτει από τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος. Από τις αερόβιες πορείες αποδόμησης που έχουν προταθεί για τα διάφορα αερόβια βακτηριακά στελέχη, είναι γνωστό ότι το φθαλικό οξύ είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης της πορείας αποδόμησης του φαινανθρενίου, του ανθρακενίου, του

φλουορενίου, του φλουορανθενίου και του πυρενίου (Peng *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009).

Η πορεία αποδόμησης του φθαλικού περιγράφηκε για πρώτη φορά στο στέλεχος *Burkholderia cepacia* (Batie *et al.*, 1987) και από τότε έχουν αναφερθεί πολλά στελέχη που καταβολίζουν φθαλικό, τερεφθαλικό και ισοφθαλικό. Η πορεία αποδόμησης του φθαλικού διαφέρει μεταξύ Gram+ και Gram- βακτηρίων (Σχήμα 1.5.3.1).



Σχήμα 1.5.3.1 Πορεία αποδόμησης φθαλικού οξέος σε (A) Gram- και (B) Gram+ βακτήρια. Οι χημικές ενώσεις όπως συμβολίζονται είναι οι εξής: (1): φθαλικό οξύ, (2): *cis*-4,5-διϋδροξυ-4,5-διϋδροφθαλικό οξύ, (3): 4,5- διϋδροξυφθαλικό οξύ, (4): *cis*-3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικό οξύ, (5): 3,4- διϋδροξυφθαλικό οξύ, (6): πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Τα ένζυμα όπως συμβολίζονται είναι τα κάτωθι: (α): 4,5-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, (β): αφυδρογονάση του *cis*-4,5-διϋδροξυ-4,5-διϋδροφθαλικού οξέος, (γ): αποκαρβοξυλάση του 4,5- διϋδροξυφθαλικού οξέος, (δ): 3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, (ε): αφυδρογονάση του *cis*-3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος και (στ): αποκαρβοξυλάση του 3,4- διϋδροξυφθαλικού οξέος.

Σε Gram+ βακτήρια η αρχική οξειδωση του φθαλικού γίνεται με τη δράση της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού προς 3,4-διϋδρο-3,4-διϋδρόξυ φθαλικό το οποίο υπόκειται αφυδρογόνωση και αποκαρβοξυλίωση για το σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Eaton, 2001; Habe *et al.*, 2003; Stingley *et al.*, 2004b; Choi *et al.*, 2005; Stanislauskiene *et al.*, 2011). Αντίθετα, σε Gram- βακτήρια (*Burkholderia cepacia*, *Comamonas testosteroni* και *Pseudomonas*), η διϋδροξυλίωση του φθαλικού γίνεται στα άτομα άνθρακα 4 και 5 με σχηματισμό 4,5-διϋδροξυφθαλικού του οποίου η αποκαρβοξυλίωση οδηγεί επίσης στο σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού

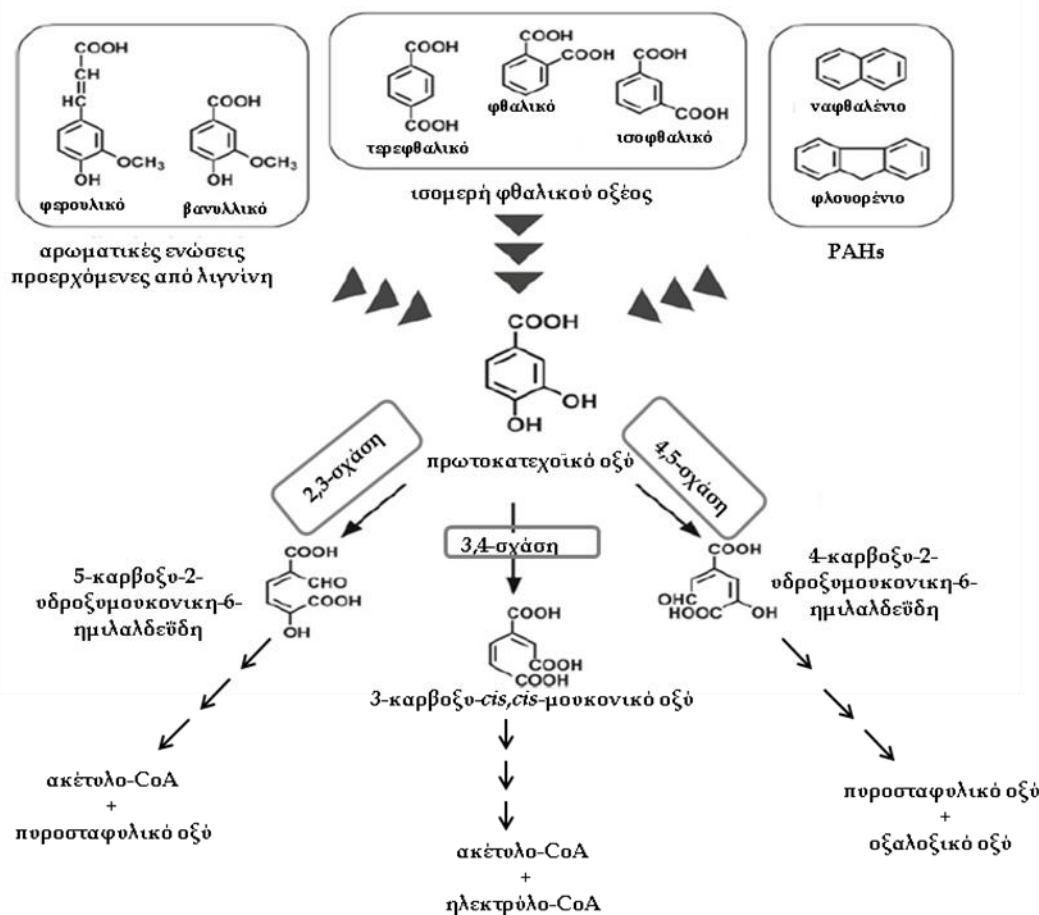
οξέος (Chang and Zylstra, 1998; Nomura *et al.*, 1992). Η παρουσία της 4,5-διοξυγονάσης του φθαλικού έχει αναφερθεί μόνο σε πρωτεοβακτήρια και πρόκειται για μια διοξυγονάση τύπου Riekse μη-αιμικού σιδήρου που αποτελείται από μια μόνο υπομονάδα. Η 3,4-διοξυγονάση του φθαλικού έχει αναφερθεί σε ακτινοβακτήρια και είναι επίσης μια τύπου Riekse διοξυγονάση μη-αιμικού σιδήρου που αποτελείται όμως από δυο υπομονάδες α και β και συνοδεύεται από τις υπομονάδες αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010a).

1.5.4 Καταβολισμός πρωτοκατεχοϊκού οξέος

Όπως προαναφέρθηκε, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποτελεί έναν από τους ενδιάμεσους κεντρικούς μεταβολίτες (μαζί με την κατεχόλη και το γεντιοϊκό οξύ), που σχηματίζονται κατά την αποδόμηση ποικίλων αρωματικών ενώσεων (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010a). Χαμηλού μοριακού βάρους αρωματικές ενώσεις προερχόμενες από τη λιγνίνη, όπως το φερουλικό, το βανυλλικό και το 4-κουμαρικό οξύ (Harwood and Parales, 1996; Masai *et al.*, 2007), ισομερή του φθαλικού οξέος (Eaton, 2001; Choi *et al.*, 2005; Sasoh *et al.*, 2006), χλωροβενζοϊκά οξέα (Nakatsu and Wyndham, 1993), μεθυλιωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες όπως το τολουόλιο και το ξυλένιο (Harwood and Parales, 1996), καθώς και αρωματικοί υδρογονάνθρακες όπως ναφθαλένιο, φλουορένιο και φαινανθρένιο (Goyal and Zylstra, 1997; Eaton, 2001; Wattiau *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2009) κατά την αποδόμησή τους οδηγούν στο σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ μεταβολίζεται μέσω της δράσης ενδοδιολικών ή εξωδιολικών διοξυγονασών για τη σχάση του αρωματικού του δακτυλίου. Λόγω της ασύμμετρης δομής του, η *meta*-σχάση μπορεί να λάβει χώρα είτε στη 2,3- (Kasai *et al.*, 2009), είτε στην 4,5- θέση (Ono *et al.*, 1970). *ortho*-σχάση λαμβάνει χώρα στην 3,4- θέση και ενδιάμεσο κατά την πορεία της *ortho*-σχάσης είναι το β-κετοαδιπικό οξύ. Σε πολλά βακτήρια η πορεία καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού συγκλίνει με την πορεία καταβολισμού κατεχόλης με κοινό ενδιάμεσο την ενολο-λακτόνη του β-κετοαδιπικού οξέος. Η πορεία αυτή έχει επικρατήσει να ονομάζεται πορεία

του β-κετοαδιπικού οξέος και αποτελείται από τους κλάδους του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και της κατεχόλης (Harwood and Parales, 1996).

Μέσω των ανωτέρω πορειών, τα προϊόντα περαιτέρω διάσπασης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος διοχετεύονται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Σχήμα 1.5.4.1).



Σχήμα 1.5.4.1 Αρωματικές ενώσεις των οποίων οι πορείες καταβολισμού οδηγούν στο σχηματισμό πρωτοκατεχοϊκού οξέος και οι τρεις πορείες σχάσης αυτού (Kamimura and Masai, 2014).

1.5.4.1 *meta*-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 2,3- θέση

Η 2,3-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος προκύπτει από τη δράση της 2,3-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και σχηματίζεται 5-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΰδη, η οποία με μια αλληλουχία αντιδράσεων διασπάται σε πυροσταφυλικό οξύ και ακέτυλο-CoA (Kasai *et al.*, 2009) (Σχήμα 1.5.4.1). Βέβαια, 2,3-διοξυγονάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει αναφερθεί μόνο για

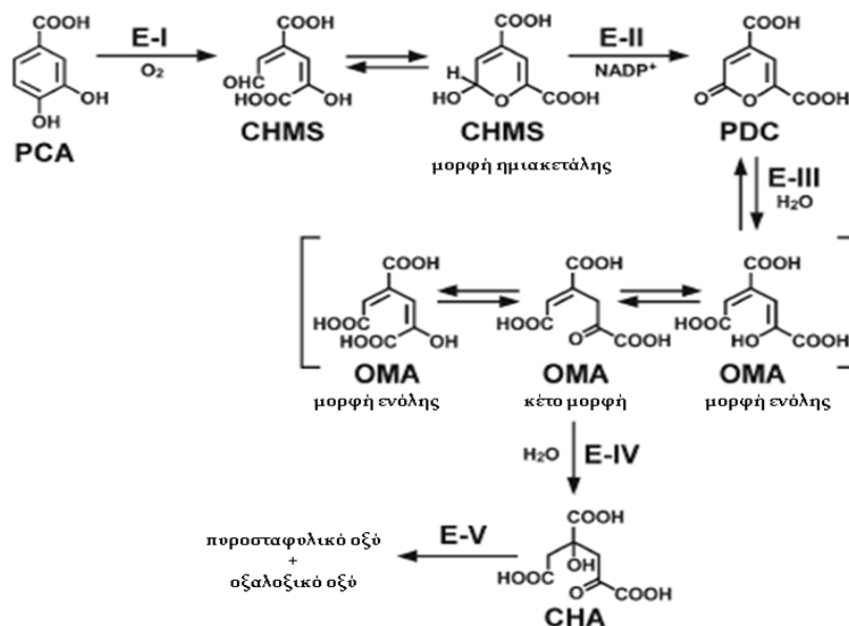
το στελέχος *Paenibacillus* JJ-1B (πρώην *Bacillus macerans*) (Wolgel *et al.*, 1993) και πρόσφατα οι Kasai *et al.* (2009), χαρακτήρισαν για πρώτη φορά όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία της 2,3-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους αυτού το οποίο καλλιεργήθηκε σε 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Kasai *et al.*, 2009). Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι όλα τα γονίδια της πορείας επάγονται παρουσία 4-υδροξυβενζοϊκού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος και συμμεταγράφονται συνιστώντας ένα οπερόνιο, με εξαίρεση αυτό του μεταγραφικού ρυθμιστή, ο οποίος διαπίστωσαν ότι δρα σαν καταστολέας του οπερονίου. Η 2,3-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού χαρακτηρίστηκε σαν εξωδιολική διοξυγονάση τύπου II και φυλογενετικά ομοιάζει με β υπομονάδες 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος, οπότε διατυπώνεται η υπόθεση της διαφορετικής εξέλιξης από κάποιο κοινό πρόγονο. Κάποια από τα γονίδια αυτής της πορείας εντοπίζονται και στο γονιδίωμα του στελέχους *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, ενώ όλα εντοπίστηκαν με μελέτη *in silico* στο πρόσφατα δημοσιευμένο γονιδίωμα του στελέχους *Geobacillus* Y412MC61. Η παρουσία των γονιδίων (*pra*) που κωδικεύουν ένζυμα για την πορεία *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος μόνο σε γονιδιώματα βακίλλων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πορεία της σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 2,3- θέση έχει εξελικτικά αποκτηθεί μόνο από βακτήρια αυτού του γένους (Kasai *et al.*, 2009).

1.5.4.2 *meta*-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 4,5- θέση

Η *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος που λαμβάνει χώρα στις θέσεις 4,5- καταλύεται από την 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Η πορεία *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει αναφερθεί για τα στελέχη: *Sphingomonas* LB126 (Wattiau *et al.*, 2001), *Comamonas* E6 (Kamimura *et al.*, 2010b), *Comamonas testosteroni* BR6020 (Providenti *et al.*, 2001), *Pseudomonas staminea* NGJ1 (Maruyama *et al.*, 2004), *Sphingobuim* SYK-6 (Noda *et al.*, 1990) και *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton, 2001).

Στην πορεία αυτή το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (PCA) με τη δράση της 4,5-διοξυγονάσης (E-I) μετατρέπεται σε 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη

(CHMS). Η CHMS μετατρέπεται χωρίς τη δράση κάποιου ενζύμου σε ημιακεταλική μορφή και έπειτα οξειδώνεται από την αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης (E-II) προς 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικό οξύ (PDC). Εν συνεχεία, με τη δράση της υδρολάσης του 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικού οξέος (E-III), σχηματίζονται κέτο και ένολο ταυτομερή του 4-οξαλομεσακονικού οξέος (OMA) που βρίσκονται σε ισορροπία. Το 4-οξαλομεσακονικό οξύ με τη δράση της υδρολάσης του 4-οξαλομεσακονικού (E-IV) μετατρέπεται σε 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικό οξύ (CHA) το οποίο τελικά με τη δράση της υδρατάσης του 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικού οξέος (E-V) δίνει πυροσταφυλικό οξύ και οξαλοξικό οξύ τα οποία διοχετεύονται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Masai *et al.*, 2007) (Σχήμα 1.5.4.2.1).



Σχήμα 1.5.4.2.1 Προτεινόμενη πορεία 4,5-οξάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

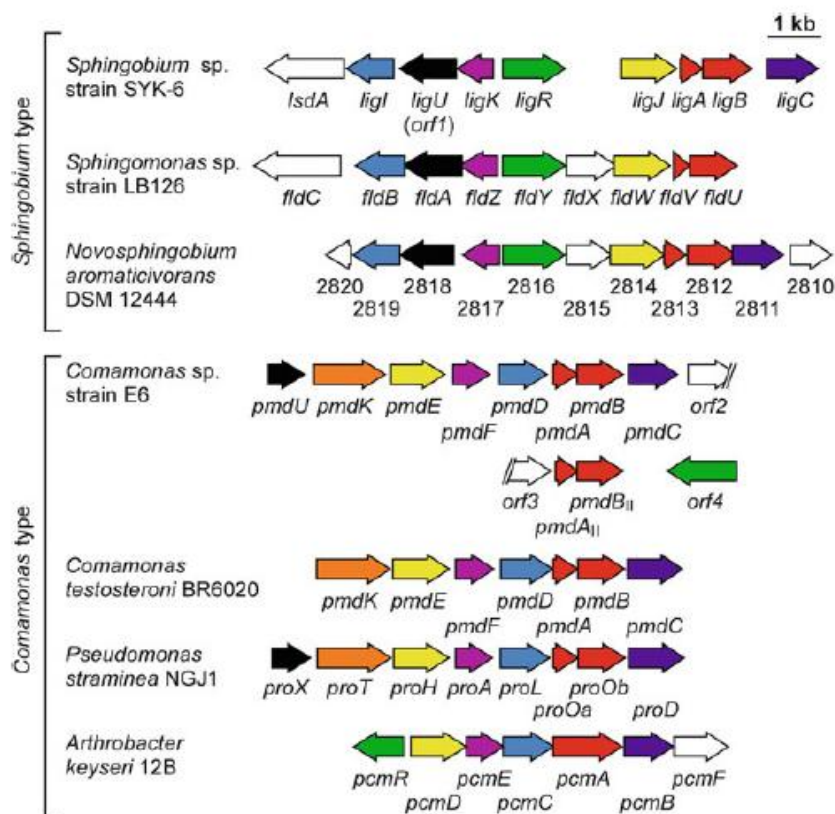
Οι Masai *et al.* (2007), πρότειναν το διαχωρισμό της οργάνωσης των γονιδίων της ανωτέρω πορείας σε δυο τύπους. Η τύπου *Sphingobium*, περιλαμβάνει τα γονίδια *lig* από *Sphingobium* SYK-6, τα γονίδια *fld* από *Sphingomonas* LB126 και τα γονίδια από *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 (από την αλληλούχηση του

γονιδιώματος του στελέχους), τα οποία συνιστούν ξεχωριστές μεταγραφικές μονάδες (Masai *et al.*, 2007). Πρόσφατα μάλιστα, οι Kamimura *et al.* (2010) απέδειξαν ότι τα γονίδια *lig* από *Sphingobium* SYK-6 συνιστούν τρεις μεταγραφικές μονάδες (*ligK-orf1-ligI-lsdA*, *ligJ-ligA-ligB-ligC* οπερόνια και το μονοκιστρονικό *ligR*) (Kamimura *et al.*, 2010a).

Αντίθετα, η οργάνωση των γονιδίων *pmd* σε *Comamonas* E6, είναι παρόμοια με εκείνη των γονιδίων *pmd* από *Comamonas testosteroni* BR6020, *pro* από *Pseudomonas straminea* και *pcm* από *Arthronacter keyseri* 12B και γι' αυτό προτάθηκαν σαν τύπου *Comamonas*. Τα γονίδια δε αυτού του τύπου φαίνεται να συνιστούν ένα οπερόνιο, κάτι που πρόσφατα αποδείχθηκε από τους Kamimura *et al.* (2010) για το στέλεχος *Comamonas* E6 (Kamimura *et al.*, 2010b). Επιπλέον, βρέθηκε ότι στο στέλεχος *Comamonas* E6 υπάρχουν δυο διαφορετικά ζεύγη γονιδίων που κωδικεύουν για 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, τα *pmdAB* και *pmdA_{II}B_{II}* τα προϊόντα των οποίων έχουν μεγάλη ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, τα προϊόντα PmdA και PmdA_{II} εμφανίζουν ταυτότητα κατά 69.1% σε αμινοξικό επίπεδο, ενώ τα PmdB και PmdB_{II} εμφανίζουν ταυτότητα κατά 97.9%. Πλησίον των γονιδίων *pmdA_{II}B_{II}* δεν βρέθηκαν άλλα γονίδια που κωδικεύουν ένζυμα της πορείας *meta*-σπάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Στέλεχος *Comamonas* E6 στο οποίο τα γονίδια *pmdA_{II}B_{II}* εκδιώχθηκαν, παρατηρήθηκε ότι καλλιεργείται με χρήση μοναδικής πηγής άνθρακα το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Kamimura *et al.*, 2010b).

4,5-PCA διοξυγονάσες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τα στελέχη *Sphingobium* SYK-6 (Noda *et al.*, 1990), *Comamonas testosteroni* BR6020 (Providenti *et al.*, 2001), *Pseudomonas straminea* NGJ1 (Maruyama *et al.*, 2004) και *Comamonas testosteroni* T-2 (Mampel *et al.*, 2005). Οι περισσότερες PCA 4,5-διοξυγονάσες συνίστανται από δυο διαφορετικές υπομονάδες α και β, μεγάλη και μικρή υπομονάδα αντίστοιχα και είναι ετεροτετραμερή α₂β₂ (Kamimura and Masai, 2014). Στο ενεργό κέντρο της β υπομονάδας υπάρχει θέση δέσμευσης του ιόντος Fe(II) (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010a). Σύμφωνα με την ομαδοποίηση που έχει γίνει

από τους Vaillancourt et al. (2006) η PCA 4,5-διοξυγονάση είναι μια εξωδιολική διοξυγονάση τύπου II (Vaillancourt et al., 2006).



Σχήμα 1.5.4.2.2 Συγκριτική απεικόνιση της γενετικής οργάνωσης συμπλεγμάτων γονιδίων της πορείας *meta*-οξείας του πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε διάφορα βακτήρια. Γονίδια: α υπομονάδα PCA 4,5-διοξυγονάσης, *ligA*, *fldV*, *pmdA*, *pmdA_{II}*, *proOa*; β υπομονάδα PCA 4,5-διοξυγονάσης, *ligB*, *fldU*, *pmdB*, *pmdB_{II}*, *proOb*; γονίδιο PCA 4,5-διοξυγονάσης, *pcmA*; γονίδιο αφυδρογονάσης CHMS, *ligC*, *pmdC*, *proD*, *pcmB*; γονίδιο υδρολάσης PDC, *ligI*, *fldB*, *pmdD*, *proL*, *pcmC*; γονίδιο υδρατάσης OMA, *ligJ*, *fldW*, *pmdE*, *proH*, *pcmD*; γονίδιο αλδολάσης CHA, *ligK*, *fldZ*, *pmdF*, *proA*, *pcmE*; γονίδιο ταυτομεράσης OMA, *ligU* (*orf1*), *fldA*, *pmdU*, *proX*; μεταγραφικός ρυθμιστής *ligR*; γονίδιο πιθανού μεταγραφικού ρυθμιστή *fldY*, *pcmR*; γονίδιο πιθανού μεταφορέα, *pmdK*, *proT*; πιθανό γονίδιο αλκοολικής αφυδρογονάσης, *fldC*, *pcmF* (Kamimura and Masai, 2014).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο στέλεχος *Arthrobacter keyseri* 12B, η PCA 4,5-διοξυγονάση συνίσταται από μια υπομονάδα (PcmA) (Σχήμα 1.5.4.2.2), η οποία περιέχει περιοχές ομόλογες α και β υπομονάδων στο N- τελικό και C- τελικό άκρο, αντίστοιχα (Eaton, 2001).

Κρυσταλλική δομή υπάρχει μόνο από την PCA 4,5-διοξυγονάση του *Sphingobium* SYK-6. Πρόκειται για ετεροτετραμερές δομής $\alpha_2\beta_2$, με το ενεργό κέντρο να εντοπίζεται στην περιοχή της β υπομονάδας όπου δυο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα γλουταμικού οξέος διενεργούν τη δέσμευση του ιόντος Fe(II) (Sugimoto *et al.*, 1999).

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων της πορείας *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε θέση 4,5- στα στελέχη *Sphingobium* SYK-6 και *Comamonas* E6. Ο μεταγραφικός ρυθμιστής LigR βρέθηκε πως είναι τύπου LysR και επέδειξε ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με τον μεταγραφικό ρυθμιστή από *Shinorhizobium meliloti*, που έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει θετικά την έκφραση των οπερονίων των γονιδίων που κωδικεύουν τα ένζυμα της 3,4-σχάσης (*ortho*-σχάση) του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (MacLean *et al.*, 2006 και 2008). Έτσι λοιπόν, ο μεταγραφικός ρυθμιστής LigR επάγει την έκφραση των οπερονίων *ligK-ligU-ligI-lsdA* και *ligJ-ligA-ligB-ligC* στο στέλεχος SYK-6 (Σχήμα 1.5.4.2.2) παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος, ενώ η μεταγραφή του *ligR* καταστέλλεται από το προϊόν του (Kamimura *et al.*, 2010a).

Σε *Comamonas* E6 βρέθηκε ότι η μεταγραφή των *pmd* γονιδίων επάγεται κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ και 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικό οξύ (ενδιάμεσο της πορείας 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος). Ανοδικά του οπερονίου των γονιδίων *pmd* εντοπίστηκε μια περιοχή παλίνδρομων επαναλήψεων, ενδεικτική του σημείου πρόσδεσης μεταγραφικού ρυθμιστή LyR-τύπου. Όμως, στο οπερόνιο των γονιδίων *pmd* που κωδικεύουν τα ένζυμα της πορείας δεν βρέθηκε κάποιο γονίδιο μεταγραφικού ρυθμιστή. Το *orf4* στην περιοχή του δεύτερου ζεύγους γονιδίων PCA 4,5-διοξυγονάσης (*pmdA_{II}B_{II}*) (Σχήμα 1.5.4.2.2), επέδειξε κάποια ομοιότητα με LysR-τύπου μεταγραφικούς ρυθμιστές, ωστόσο αποδείχθηκε ότι αυτό δεν εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση του *pmd* οπερονίου (Kamimura *et al.*, 2010b).

Ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με χαρακτηριστικά μεταγραφικού ρυθμιστή (*pcmR*) έχει εντοπιστεί ανοδικά του οπερονίου των *pcm* γονιδίων στο *Arthrobacter*

keyseri 12B (Σχήμα 1.5.4.2.2), η λειτουργία του όμως δεν έχει μελετηθεί (Eaton, 2001).

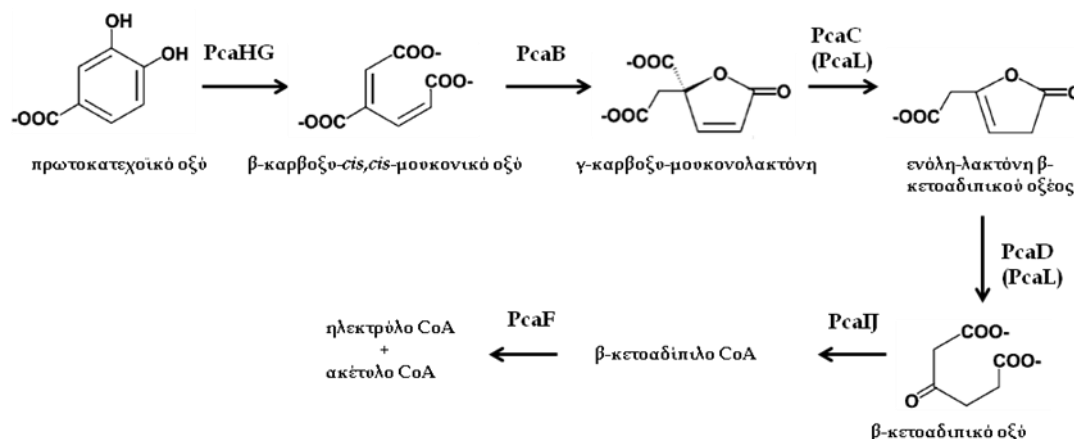
Εκτενέστερη μελέτη για την αποσαφήνιση του ρόλου των πιθανών γονιδίων μεταγραφικών ρυθμιστών από τα προαναφερθέντα οπερόνια, είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης που διέπουν την πορεία 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στα βακτήρια.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στο στέλεχος *Arthrobacter keyseri* 12B, έχει αναφερθεί η ταυτόχρονη παρουσία γονιδίων υπεύθυνων για την *ortho*- (3,4-) και *meta*- (4,5-) πορεία σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. Η *meta*-σχάση επάγεται κατά τον καταβολισμό φθαλικού οξέος, ενώ η *ortho*-σχάση κατά τον καταβολισμό 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Eaton and Ribbons, 1982). Η ταυτόχρονη παρουσία γονιδίων που κωδικεύουν για ένζυμα *ortho*- και *meta*-σχάσης έχει αναφερθεί και στο στέλεχος *Burkholderia phymatum* STM815, αλλά οι συνθήκες επαγωγής της έκφρασής τους δεν έχουν καθόλου μελετηθεί (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010b; Pérez-Pantoja *et al.*, 2012).

1.5.4.3 *ortho*-σχάση πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε 3,4- θέση

Η πορεία του β-κετοαδιπικού, είναι παρούσα σε ταξονομικά διαφορετικά βακτήρια ή μύκητες. Κωδικεύεται σχεδόν πάντα από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα, με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό αρωματικών ενώσεων που προκύπτουν από φυσικές διεργασίες (π.χ λιγνίνη) καθώς και στον καταβολισμό ρυπαντών του περιβάλλοντος. Εντοπίζεται πάντα σε βακτήρια που καταβολίζουν χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις, αφού οι χλωριωμένες κατεχόλες που σχηματίζονται σαν ενδιάμεσα καταβολίζονται από τα ένζυμα αυτής της πορείας. Η παρουσία της πορείας του β-κετοαδιπικού έχει παρατηρηθεί σχεδόν αποκλειστικά σε μικροοργανισμούς του εδάφους, αφού μέσω αυτής καταβολίζονται αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από φυτά (Harwood and Parales, 1996; Parke *et al.*, 2000). Εκπρόσωποι μεταξύ των Gram+ βακτηρίων ανήκουν στα γένη *Rhodococcus* (Eulberg *et al.*, 1998), *Streptomyces* (Iwagami *et al.*, 2000), *Arthrobacter* (Paul *et al.*, 2004), *Terrabacter* (Habe *et al.*, 2005) και

Corynebacterium (Shen and Liu, 2005), ενώ μεταξύ των Gram- έχουν αναφερθεί βακτήρια των γενών *Pseudomonas* (Harwood *et al.*, 1994), *Acinetobacter* (Gerischer *et al.*, 1998), *Burkholderia* (Zylstra *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 2004), *Agrobacterium* (Parke, 1997), *Azotobacter* (Durham *et al.*, 1980) και *Shinorhizobium* (MacLean *et al.*, 2006).



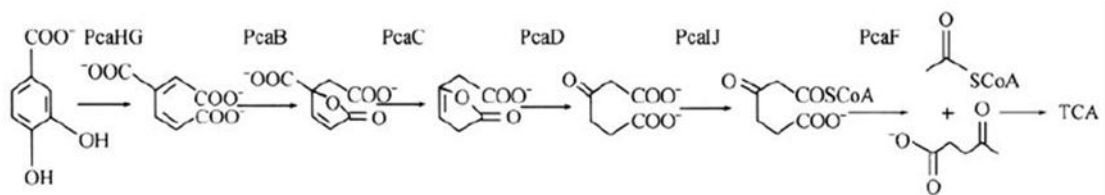
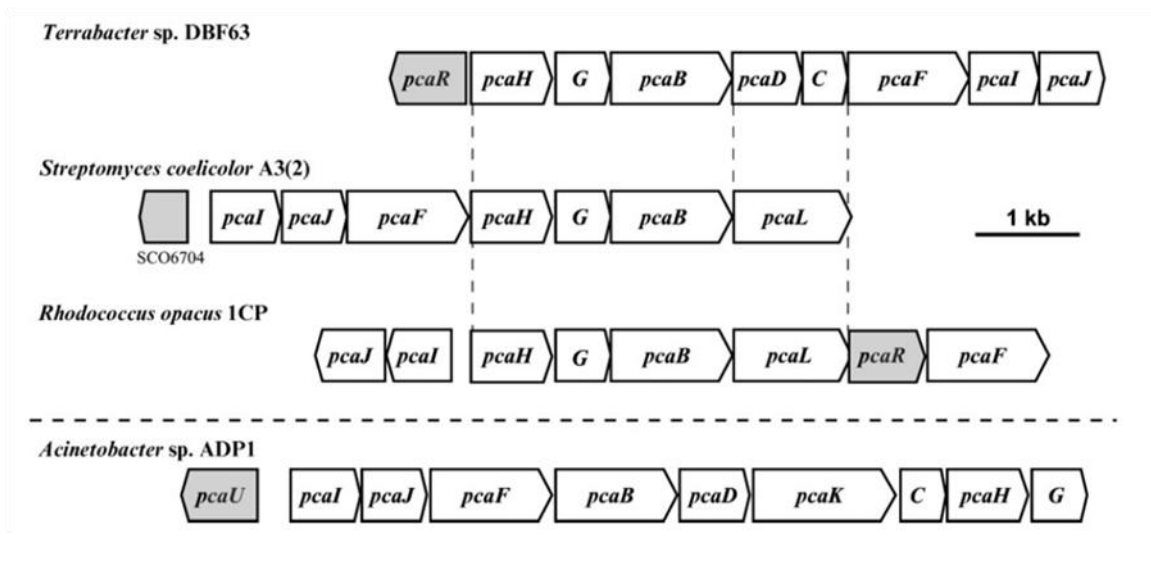
Σχήμα 1.5.4.3.1 Προτεινόμενη καταβολική πορεία *ortho*-σχάσης πρωτοκατεχοϊκού οξέος από βακτήρια. Τα ένζυμα που επιδρούν σε κάθε στάδιο της πορείας είναι τα εξής: (PcaHG). 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, (PcaB). κυκλοϊσομεράση του β -καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος, (PcaC [PcaL]). αποκαρβοξυλάση της γ -καρβοξυμουκονολακτόνης, (PcaD [PcaL]). υδρολάση ενόλη-λακτόνης του β -κετοαδιπικού οξέος, (PcaIj). ηλεκτρώλο-CoA μετατοπίαση του β -κετοαδιπικού οξέος και (PcaF). θειολάση του β -κετοαδιπύλο CoA.

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ υπόκειται σε *ortho*-σχάση υπό την καταλυτική δράση της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, η οποία είναι μια ενδοδιολική διοξυγονάση μη αιμικού-σιδήρου που απαρτίζεται από δυο διαφορετικές υπομονάδες α και β (Σχήμα 1.5.4.3.1) (Harwood and Parales, 1996). Η δέσμευση του ιόντος σιδήρου γίνεται από κατάλοιπα ιστιδίνης και τυροσίνης που έχουν εντοπιστεί στη β υπομονάδα, όπως προέκυψε από τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου στο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (Ohlendorf *et al.*, 1994).

Σε ότι αφορά τα πρωτεοβακτήρια, η πορεία της *ortho*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος είναι βιοχημικά συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Όμως η γενετική οργάνωση των γονιδίων, η ρύθμιση της έκφρασης τους και οι ενώσεις που επάγουν την έκφρασή τους είναι διαφορετικές,

υποδεικνύοντας τις διαφορετικές προσαρμοστικές αποκρίσεις (Harwood and Parales, 1996; Park *et al.*, 2000).

Σε ότι αφορά τα ακτινοβακτήρια υπάρχει περιορισμένη πληροφορία για τα καταβολικά γονίδια (*pca*) που εμπλέκονται στην πορεία *ortho*-σπάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και μέχρι στιγμής λίγα συστήματα έχουν καλά μελετηθεί, σε *Rhodococcus* (Eulberg *et al.*, 1998; Patrauchan *et al.*, 2005), *Streptomyces* (Iwagami *et al.*, 2000), *Corynebacterium* (Shen and Liu, 2005) και *Terrabacter* (Habe *et al.*, 2005).



Σχήμα 1.5.4.3.2 Γενετική οργάνωση γονιδίων καταβολισμού πρωτοκατεχοϊκού οξέος (*pca*) μέσω *ortho*-σπάσης σε ακτινοβακτήρια. Η γενετική οργάνωση των *pca* γονιδίων του στελέχους *S. coelicolor* A3(2) και *Rhodococcus opacus* 1CP που απεικονίζονται, είναι ταυτόσημες με εκείνων των στελεχών *Streptomyces* sp. 2065 (Iwagami *et al.*, 2000) και *Rhodococcus* RHA1 (Patrauchan *et al.*, 2005), αντίστοιχα. Πιθανά ρυθμιστικά γονίδια έχουν σκιαστεί με γκρι χρώμα. Για σύγκριση, κάτω της διακεκομμένης γραμμής δίνεται και η γενετική οργάνωση των γονιδίων *pca* εκπροσώπου πρωτεοβακτηρίων (*Acinetobacter* ADP1). Τέλος, κάτω της συμπαγούς γραμμής φαίνονται οι αντιδράσεις που καταλύουν τα αντίστοιχα κωδικευόμενα ένζυμα στην πορεία καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Habe *et al.*, 2005).

Σε όλα τα ανωτέρω στελέχη τα γονίδια *pca* έχουν βρεθεί σε περιοχές του χρωμοσώματος, με μόνη εξαίρεση εκείνα του στελέχους *Terrabacter* DBF63 που

εντοπίστηκαν σε γραμμικό πλασμίδιο pDBF1 (Habe *et al.*, 2005). Στα στελέχη *Streptomyces* και *Rhodococcus* έχει αναφερθεί η παρουσία ενός γονιδίου *pcaL* το οποίο αποτελεί σύντηξη των γονιδίων που κωδικεύουν την υδρολάση ενολο-λακτόνης του β-κετοαδιπικού (*pcaD*) και την αποκαρβοξυλάση γ-καρβοξυμουκονολακτόνης (*pcaC*) (Σχήμα 1.5.4.3.2) (Eulberg *et al.*, 1998; Iwagami *et al.*, 2000; Patrauchan *et al.*, 2005), κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα όσα έχουν αναφερθεί για πρωτεοβακτήρια στα οποία υπάρχουν δυο ξεχωριστά γονίδια *pcaC* και *pcaD*. Στο στέλεχος *Terrabacter* DBF63, όμως βρέθηκαν δυο γονίδια *pcaC* και *pcaD*, που κωδικεύουν τα ανωτέρω ένζυμα, κάτι που έχει επίσης αναφερθεί στο στέλεχος *Corynebacterium glutamicum* (Shen and Liu, 2005). Στα στελέχη *Terrabacter* DBF63 και *Streptomyces coelicolor* A3(2), τα *pca* γονίδια συμμεταγράφονται συνιστώντας οπερόνιο και το πιθανό γονίδιο ρύθμισης της μεταγραφής *pcaR* βρίσκεται ανοδικά των οπερονίων (Habe *et al.*, 2005). Αντίθετα, στο στέλεχος *Rhodococcus opacus* 1CP τα *pcaIJ* γονίδια συνιστούν ξεχωριστή μεταγραφική μονάδα και το γονίδιο ρυθμιστής *pcaR* βρέθηκε να συμμεταγράφεται με την δεύτερη μεταγραφική μονάδα *pcaHGBL* (Σχήμα 1.5.4.3.2) (Eulberg *et al.*, 1998). Αυτή η διαφορά στην οργάνωση των γονιδίων επηρεάζει τη ρύθμιση της έκφρασής τους. Στο DBF63 η έκφραση του *pcaR* βρέθηκε να είναι συστατική και να μην επάγεται παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος, ενώ η έκφραση του *pcaR* στο *Rhodococcus opacus* 1CP, είναι πιθανόν επαγόμενη μια και αυτό συμμεταγράφεται με τα δομικά γονίδια που κωδικεύουν τις υπομονάδες της διοξυγονάσης (Habe *et al.*, 2005).

Από τα όσα λοιπόν αναφέρθηκαν είναι φανερό ότι τα ένζυμα της πορείας είναι πολύ συντηρημένα μεταξύ των βακτηρίων, αλλά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται στην οργάνωση αυτών και την ρύθμιση της έκφρασής τους.

1.6 Πρωτεωμική ανάλυση στη μελέτη της βιοαποδόμησης PAHs

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, η βιοαποδόμηση με τη χρήση μικροοργανισμών για την απομάκρυνση περιβαλλοντικών ρυπαντών, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη βιοτεχνολογική εφαρμογή που εκτός από αποτελεσματική

είναι ασφαλής για το περιβάλλον και οικονομική. Η πλήρης αλληλούχιση γονιδιωμάτων μικροοργανισμών με τη δυνατότητα να καταβολίζουν ποικίλλες αρωματικές ενώσεις έχει συμβάλλει σημαντικά στην αποσαφήνιση των πορειών που χρησιμοποιούν για την ανοργανοποίηση των αρωματικών ενώσεων. Παρόλαυτά, εκτιμάται ότι ένα ποσοστό 30-40% των ανοιχτών πλασίων ανάγνωσης στο πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού, είναι αγνώστου λειτουργίας ή υποθετικής λειτουργίας σε βιοχημικό επίπεδο και δεν μπορούν να συσχετιστούν με τα ήδη γνωστά γονίδια (Zao and Poh, 2008; Chauhan and Jain, 2010). Η εφαρμογή τεχνικών γονιδιωματικής ανάλυσης συνδυάζοντας παραδοσιακές τεχνικές τόσο βιολογικές όσο και μοριακής γενετικής αποσκοπεί στην κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών των γονιδίων και του τρόπου με τον οποίο τα γονίδια και τα προϊόντα τους λειτουργούν στα κύτταρα (Zao and Poh, 2008). Έχει οδηγήσει έτσι, στην ταυτοποίηση και σε μεγάλο βαθμό κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων που μετέχουν στις καταβολικές πορείες αρωματικών υδρογονανθράκων και έχει συμβάλλει σημαντικά στην βελτίωση των εφαρμοζόμενων τεχνικών βιοαποδόμησης (Kim *et al.*, 2009).

Παρόλαυτα, η γονιδιωματική ανάλυση δεν αποτελεί παρά μια απλουστευτική προσέγγιση, του ενός ή περισσότερων γονιδίων που οδηγούν σε ένα συγκεκριμένο φαινότυπο (Fu *et al.*, 2014). Η έκφραση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου είναι το αποτέλεσμα της δράσης πρωτεϊνικών μορίων και όχι των γονιδίων που συνιστούν το γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού (Singh and Nagaraj, 2006). Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο η συμβολή της πρωτεωμικής ανάλυσης, σε συνδυασμό με τις ανωτέρω τεχνικές, είναι ουσιαστικής σημασίας για την πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών της μικροβιακής βιοαποδόμησης (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

Οι νέες τεχνικές πρωτεωμικής ανάλυσης εφαρμόζονται με σκοπό την κατανόηση των οικουμενικών αλλαγών τόσο στη σύσταση όσο και στην έκφραση των πρωτεϊνών, λόγω προσαρμοστικών αποκρίσεων των μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, προσφέροντας έτσι μια δυναμική προσέγγιση στην

κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας (Kim *et al.*, 2007; Lacerda and Reardon, 2009). Μέσω των τεχνικών λειτουργικής πρωτεωμικής προσφέρεται η δυνατότητα της κατανόησης του πώς οι συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον διέπουν την έκφραση του πρωτεώματος. Έτσι λοιπόν, ο χαρακτηρισμός ενζύμων που μετέχουν στις πορείες βιοαποδόμησης αλλά και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτών των πορειών, των πρωτεϊνών μεταφορέων οργανικών ενώσεων, όσων επάγονται παρουσία συνθηκών καταπόνησης των κυττάρων, καθώς και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις μεταβολικές πορείες παραγωγής ενέργειας για τα κύτταρα, είναι απαραίτητος για την εφαρμογή ορθολογικών τεχνικών βιοαποδόμησης (Kim *et al.*, 2007; Singh and Nagaraj, 2006; Zao and Poh, 2008).

Τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα από πρωτεωμικές αναλύσεις του μεταβολισμού των αρωματικών υδρογονανθράκων έχουν προκύψει με εφαρμογή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών διπλής διάστασης (2 Dimension Electrophoresis-2DE) σε συνδυασμό με ανάλυση των πρωτεϊνών με Φασματοσκοπία μάζας (MS analysis) (Kim *et al.*, 2009). Η τεχνική αυτή έχει κάποια σοβαρά μειονεκτήματα, όπως την αδυναμία ανίχνευσης χαμηλής αφθονίας πρωτεϊνών, υδρόφοβων μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και πρωτεϊνικών μορίων με ακραία ισοηλεκτρικά σημεία (pI) και μοριακά βάρη. Άλλο ένα μειονέκτημα αυτής της τεχνικής αποτέλεσε η περιορισμένη επαναληψιμότητα της εικόνας των πρωτεϊνικών κηλίδων μεταξύ διαφορετικών πηκτών (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

Η πρόσφατη τεχνολογία ανάλυσης ακατέργαστων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων χωρίς τη χρήση πηκτών σε συνδυασμό με μεθοδολογία φασματοσκοπίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, nanoLC-MS/MS (shotgun proteomics), έχει καταφέρει να άρει τους ανωτέρω περιορισμούς. Αποτελεί ένα δυναμικό εργαλείο ανάλυσης του οικουμενικού πρωτεώματος, αφού μέσω αυτής μπορούν να ταυτοποιηθούν πάνω από 1.000 πρωτεΐνες του αναλυόμενου μικροοργανισμού. Η ευαισθησία της τεχνικής επιτρέπει την ταυτοποίηση ακόμη και ρυθμιστικών πρωτεϊνών που δεν βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα (Kim *et al.*, 2007).

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να καταβολίζει μια συγκεκριμένη αρωματική ένωση αξιολογείται από την ανάλυση του πρωτεώματος σε κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία της συγκεκριμένης αρωματικής ένωσης. Η παρουσία ρυθμιστικών πρωτεϊνών και ενζύμων κλειδιά της καταβολικής πορείας οδηγεί στη διευκρίνιση αυτής. Επίσης, η ταυτοποίηση των επαγόμενων ενζύμων σε σχέση με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα δίνει τη δυνατότητα της γενετικής τροποποίησης μικροοργανισμών με στόχο την πιο αποτελεσματική βιοαποδόμηση (Zhao and Poh, 2008).

Συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ κυττάρων αναπτυγμένων σε διάφορους αρωματικούς υδρογονάνθρακες έχει πραγματοποιηθεί για τη διευκρίνιση των καταβολικών πορειών πολλών βακτηριακών στελεχών. Στο στέλεχος *Corynebacterium glutamicum* συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που επάγονται αποκλειστικά παρουσία των αντίστοιχων αρωματικών υποστρωμάτων (βενζοϊκό, 4-κρεζόλη, φαινόλη και ρεσορκινόλη) που χρησιμοποιήθηκαν (Qi *et al.*, 2007). Αναλύσεις του μεμβρανικού πρωτεώματος του ίδιου στελέχους παρουσία βενζοϊκού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος σε σύγκριση με τη γλυκόζη, αναφέρουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις των κυττάρων παρουσία των αρωματικών ενώσεων, ενώ οδήγησαν και στην ταυτοποίηση δυο μορίων μεταφορέων του βενζοϊκού οξέος (Haußmann *et al.*, 2009; Haußmann and Poetsch, 2012).

Στο στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440 παρουσία του οργανικού διαλύτη φαινόλη, εντοπίστηκαν γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης (Kurbatov *et al.*, 2006), ενώ αναφέρονται και οι οικουμενικές αποκρίσεις του μικροοργανισμού από την ανάλυση του μεμβρανικού πρωτεώματος παρουσία φαινόλης (Roma-Rodrigues *et al.*, 2010). Σε άλλη μελέτη του πρωτεώματος του ίδιου στελέχους όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία βενζοϊκού οξέος, αναφέρεται η ταυτοποίηση ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του βενζοϊκού οξέος, μεταξύ των οποίων η 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και 17 ένζυμα της πορείας του β-κετοαδιπικού οξέος (Yun *et al.*, 2011). Σε στέλεχος *Pseudomonas putida* DOT-T1E που καλλιεργήθηκε παρουσία

τολουολίου, αναφέρεται η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον καταβολισμό του τολουολίου (Segura *et al.*, 2005), ενώ σε στέλεχος *Pseudomonas* DJ-12 μελετήθηκε η επαγωγή πρωτεϊνών σχετιζόμενων με καταπόνηση παρουσία διφαινυλίου, 4-χλωροδιφαινυλίου και 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος κατά την ανάπτυξη των κυττάρων (Park *et al.*, 2001).

Πρωτεωμική ανάλυση σε στέλεχος *Comamonas* CNB-1 παρουσία 4-χλωρονιτροβενζενίου οδήγησε στην αποσαφήνιση της πορείας καταβολισμού της συγκεκριμένης αρωματικής ένωσης με την ταυτοποίηση 19 πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πορεία καταβολισμού (Zhang *et al.*, 2009).

Σημαντική είναι η συμβολή της πρωτεωμικής ανάλυσης στην αποσαφήνιση πορειών καταβολισμού αρωματικών ενώσεων σε στελέχη ακτινοβακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα στο στέλεχος *Rhodococcus* TFB διευκρινίστηκε η πορεία καταβολισμού του φθαλικού οξέος, ενώ βρέθηκε ότι κατά τον καταβολισμό ναφθαλενίου και τετραλίνης επάγονται από κοινού κάποια ένζυμα (Tomás-Gallardo *et al.*, 2006). Σε στέλεχος *Rhodococcus* RHA1, στην προσπάθεια διερεύνησης της πορείας καταβολισμού φθαλικού και βενζοϊκού οξέος, με συνδυασμό πρωτεωμικής ανάλυσης και μοριακών τεχνικών διευκρινίστηκαν οι ανωτέρω πορείες και επιπλέον χαρακτηρίστηκε στην πορεία του β-κετοαδιπικού οξέος τόσο ο κλάδος καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, όσο και της κατεχόλης που συγκλίνουν στο σχηματισμό ενολο-λακτόνης του β-κετοαδιπικού οξέος. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν πρωτεϊνικά μόρια με πιθανή λειτουργία μεταφορέων του φθαλικού οξέος (Patrauchan *et al.*, 2005).

Παράδειγμα της συμβολής της πρωτεωμικής ανάλυσης στη διεκρίνιση της καταβολικής πορείας PAHs υψηλού μοριακού βάρους αποτελούν οι εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο στέλεχος *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Αρχικές μελέτες οδήγησαν στην ταυτοποίηση των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης NidA και NidA3 (Khan *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004), ενώ πιο πρόσφατες μελέτες που ακολούθησαν, μετά την πλήρη αλληλούχιση του γονιδιώματος του εν λόγω στελέχους, οδήγησαν στην πλήρη αποσαφήνιση της πορείας καταβολισμού του πυρενίου και φλουορανθενίου (Kweon *et al.*, 2007;

Kim *et al.*, 2008a). Σε μεταλλαγμένο στέλεχος *M. vanbaalenii* 8F7 που δεν διαθέτει το γονίδιο *nidA* που κωδικοποιεί για τη διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης του πυρενίου NidA, μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης παρουσία πυρενίου, παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφραση άλλων διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης που επιφέρουν λειτουργική αναπλήρωση του καταβολισμού του πυρενίου (Kim *et al.*, 2012). Η πορεία καταβολισμού φλουορανθενίου έχει διευκρινιστεί μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης και στο στέλεχος *Mycobacterium* JS14 (Lee *et al.*, 2007), ενώ η σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ του *Mycobacterium aromatorans* JS19b1 σε υποστρώματα φαινανθρενίου, φθαλικού οξέος και γλυκόζης οδήγησε στην ταυτοποίηση ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό ποικιλίας αρωματικών ενώσεων μεταξύ των οποίων το φαινανθρένιο, το διφαινύλιο και το διβενζοθειοπένιο (Seo *et al.*, 2011). Τέλος, κατά την ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ παρουσία πυρενίου και γλυκόζης στο στέλεχος *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK, ανιχνεύθηκαν ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό του πυρενίου, αλλά και διαφορές στην έκφραση ενζύμων που εμπλέκονται σε πορείες του κεντρικού μεταβολισμού των κυττάρων, παρουσία πυρενίου σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Badejo *et al.*, 2013b).

Στο στέλεχος *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης, παρουσία διαφόρων φαινολικών υποστρωμάτων και διαφορετικών θερμοκρασιών, περιγράφονται οι προσαρμοστικές αλλαγές των κυττάρων σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Unell *et al.*, 2009). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η συνολική μεταβολική απόκριση κυττάρων *Arthrobacter* FB24 κατά την ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Cr (IV) (Henne *et al.*, 2009).

1.7 Το γένος *Arthrobacter*

Το γένος *Arthrobacter* προτάθηκε για πρώτη φορά το 1947 από τους Conn and Dimmick (Conn and Dimmick, 1947). Τα βακτήρια του γένους *Arthrobacter* κατατάσσονται ταξονομικά στο φύλλο των Ακτινοβακτηρίων (Actinobacteria) που είναι θετικά κατά Gram και χαρακτηρίζονται από την υψηλή περιεκτικότητα σε G+C, στην κατηγορία των Ακτινομυκήτων (Actinomycetales), μαζί με τα γένη

Mycobacterium, *Gordonia*, *Nocardioides*, *Coryneform* (Loveland-Curtze *et al.*, 1999) και στην οικογένεια των Μικροκόκκων (Micrococcaceae), μαζί με τα γένη *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Janibacter*, *Terrabacter* (Hennessee and Li, 2010).

Το πιο διακριτό χαρακτηριστικό αυτών των βακτηρίων είναι η αλλαγή στη μορφολογία τους κατά την ανάπτυξή τους σε συνθετικό (χημικά καθορισμένο) μέσο ανάπτυξης. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης τα κύτταρα έχουν σχήμα ακανόνιστου ραβδίου, ενώ στη στατική φάση ανάπτυξης παίρνουν σχήμα κόκκου, ένας κύκλος που επαναλαμβάνεται κατά τη μεταφορά των κυττάρων σε φρέσκο μέσο ανάπτυξης (Jones and Keddie, 2006).

Τα βακτήρια του γένους *Arthrobacter* δεν περιέχουν μυκολικά οξέα στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα ευθύγραμμης αλυσίδας καθώς επίσης iso- και anteiso- κορεσμένα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Collins *et al.*, 1987). Η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματός τους περιέχει λυσίνη ως διαμινοξύ και οι αναπνευστικές λιποκινόνες που περιέχουν είναι οι ακόρεστες μενακινόνες με 8 ή 9 ισοπρενοειδείς μονάδες (MK-8, MK-9) και διϋδρογονωμένες μενακινόνες με 9 ισοπρενοειδείς μονάδες [MK-9(H₂)]. Επιπλέον, η σύσταση των φωσφολιπιδίων συνίσταται κυρίως από διφωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλογλυκερόλη και φωσφατιδυλοινοσιτόλη (Keddie and Jones, 2006). Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι το υψηλό ποσοστό % G+C που κυμαίνεται από 59-66% (Keddie and Jones, 2006). Όλα τα στελέχη του γένους είναι αερόβια, κάποια όμως έχουν επιδείξει αναερόβια αύξηση, προσαρμογή που προφανώς διευκολύνει την επιβίωσή τους στο περιβάλλον του χώματος, ελλείψει οξυγόνου. Ο τύπος του μεταβολισμού τους είναι αναπνευστικός, ενώ έχουν αναφερθεί και στελέχη *Arthrobacter* που παράγουν προϊόντα ζύμωσης από υδατάνθρακες (Eschbach *et al.*, 2003). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 25-30 °C. Τα περισσότερα στελέχη αυτού του γένους καλλιεργούνται σε θερμοκρασίες 10-35 °C, πολλά καλλιεργούνται στους 5 °C, ενώ λίγα είναι εκείνα που καλλιεργούνται στους 37 °C (Keddie and Jones, 2006).

Στελέχη του γένους *Arthrobacter* έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές και από διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες όπως θαλάσσια ύδατα, λίμνες, ακόμη και από το παγωμένο περιβάλλον της Ανταρκτικής (Gurta *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2000; Margesin *et al.*, 2004a). Έχει αναφερθεί η παρουσία τους και σε τρόφιμα, με στελέχη που έχουν απομονωθεί από την επιφάνεια τυριών και από ζωτικά όργανα ψαριών (Irlinger *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 1999). Αν και στελέχη του γένους έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα ανθρώπων με ανοσοποιητική ανεπάρκεια, τα περισσότερα στελέχη του είδους δεν είναι παθογόνα (Wauters *et al.*, 2000).

Εντοπίζονται σε αφθονία σε όλα τα εδάφη ρυπασμένα ή μη (Jerke *et al.*, 2008), με τη δυνατότητα να καταβολίζουν ευρεία ποικιλία ξενοβιοτικών ενώσεων. Η περιβαλλοντική επικράτηση των στελεχών του γένους *Arthrobacter* οφείλεται στη δυνατότητα επιβίωσης των στελεχών για μακρά χρονικά διαστήματα κάτω από συνθήκες καταπόνησης που προκαλούνται από διατροφικές ελλείψεις, θερμοκρασιακές μεταβολές και την παρουσία τοξικών χημικών ενώσεων. Η μορφογένεση του *Arthrobacter* από τη μορφή του ραβδίου σε αυτή του κόκκου πιστεύεται ότι προσδίδει στα βακτήρια αυτού του γένους την ικανότητα της επιβίωσης κάτω από συνθήκες έντονης καταπόνησης, με τη μορφή του κόκκου να θεωρείται η πιο σταθερή (Mongodin *et al.*, 2006).

Έτσι, πληθώρα στελεχών του γένους έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί αποτελεσματικά στον καταβολισμό οργανικών ρυπαντών όπως φαινόλες και αλογονωμένα παράγωγα αυτών (Lin and Wang, 1991; Bae *et al.*, 1996; Kar *et al.*, 1996 και 1997; Westerberg *et al.*, 2000; Karigar *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008b; Ferreira *et al.*, 2008), παρασιτοκτόνα όπως χλωριωμένα διφαινύλια, ατραζίνη και διχλωροφαινυλοδιμεθυλουρία (Engelhardt *et al.*, 1982; Turnbull *et al.*, 2001; Strong *et al.*, 2002; Widehem *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Wang and Xie, 2012), αλκάνια και αλογονωμένα αλκάνια (Scholtz *et al.*, 1988; Ionata *et al.*, 2005), χλωροβενζοϊκό οξύ (Marks *et al.*, 1984), ο-νιτροβενζοϊκό οξύ (Pandey *et al.*, 2003), p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Paul *et al.*, 2004), διβενζοθειοπένιο και καρβαζόλιο (Seo *et al.*, 2006a). Έχουν επίσης αναφερθεί στελέχη που απομονώθηκαν από

περιοχές ρυπασμένες με βαρέα μέταλλα (Joynt *et al.*, 2006), ενώ σε κάποια στελέχη αναφέρεται η δυνατότητα αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου Cr (VI), που είναι άκρως τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό (Horton *et al.*, 2006; Henne *et al.*, 2009).

Παρόλο που στελέχη του γένους με τη δυνατότητα να καταβολίζουν PAHs έχουν αναφερθεί (Grifoll *et al.*, 1992 και 1995a; Samanta *et al.*, 1999; Eaton, 2001; Daane *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2006b; Kallimanis *et al.*, 2007), οι έρευνες για τον καταβολισμό των PAHs από αυτά τα στελέχη είναι περιορισμένες, και ο ρόλος των γονιδίων που μετέχουν σε αυτές τις καταβολικές πορείες δεν έχει διεκρινιστεί (Hennessee and Li, 2010).

Η διατροφική προσαρμοστικότητα, λαμβάνοντας υπόψιν την ευρύτητα υποστρωμάτων που τα στελέχη του γένους καταβολίζουν, είναι χαρακτηριστική των ειδών που δεν παρουσιάζουν απαίτηση βιταμινών ή άλλων αυξητικών παραγόντων (Jones and Keddie, 2006).

Μελέτες σε σχέση με την αντοχή στελεχών του γένους σε χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλές συγκεντρώσεις χημικών ενώσεων, καταδεικνύουν ότι στελέχη του γένους *Arthrobacter* είναι πολλά υποσχόμενα για εφαρμοσμένη βιοαποδόμηση σε ψυχρά περιβάλλοντα. Το στέλεχος *Arthrobacter chlorophenolicus* βρέθηκε να επιβιώνει καλύτερα και να είναι μεταβολικά πιο ενεργό σε χαμηλότερες από ότι υψηλότερες θερμοκρασίες (Backman *et al.*, 2004), ενώ το στέλεχος AG31 επέδειξε μεγαλύτερη αντοχή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χημικών ενώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες (Margesin *et al.*, 2004b). Σε πρόσφατη μελέτη τους οι Fahy *et al.* (2008), αναφέρουν αυξημένη παρουσία στελεχών του γένους *Arthrobacter* σε μικροβιακές κοινότητες ρυπασμένων υπόγειων υδάτων, παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος (Fahy *et al.*, 2008).

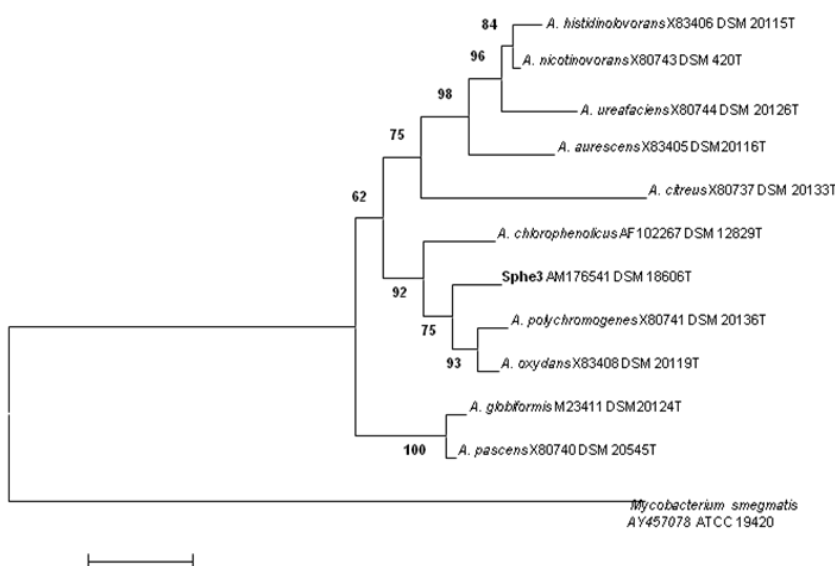
Έτσι, βακτήρια του γένους *Arthrobacter*, με τα μοναδικά χαρακτηριστικά της επικράτησης λόγω της μεγάλης αντοχής που επιδεικνύουν σε αντίξοες συνθήκες (διατροφικής έλλειψης και διακύμανσης της θερμοκρασίας), αλλά και στην τοξικότητα χημικών ενώσεων, σε συνδυασμό με τη μεταβολική

προσαρμοστικότητα, που τους επιτρέπει να καταβολίζουν ποικιλία ξενοβιοτικών ενώσεων, παρουσιάζουν εξαιρετικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Στην κατανόηση των καταβολικών ιδιοτήτων στελεχών *Arthrobacter*, συνεισφέρει σημαντικά η πρόσφατη αλληλούχηση των γονιδιωμάτων πέντε περιβαλλοντικών στελεχών του γένους. Η αλληλούχηση του *Arthrobacter aurescens* TC1 (Mongodin *et al.*, 2006), με την ιδιότητα καταβολισμού ατραζίνης, του *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (Kallimanis *et al.*, 2011), που καταβολίζει φαινανθρένιο, του *Arthrobacter* FB24 (Nakatsu *et al.*, 2013), που απομονώθηκε από έδαφος ρυπασμένο με βαρέα μέταλλα και υδρογονάνθρακες, του *Arthrobacter* Rue61a (Niewerth *et al.*, 2012), που καταβολίζει κιναλδίνη και του *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, που καταβολίζει *para*-υποκατεστημένες φαινόλες και *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137, από το Joint Genome Institute. Η προσέγγιση αυτή έχει ανοίξει το δρόμο για γονιδιωματικές μελέτες προς την κατεύθυνση της κατανόησης των μηχανισμών βιοαποδόμησης των στελεχών του γένους. Σε συνδυασμό με τις ανωτέρω γονιδιωματικές προσεγγίσεις, μελέτες του πρωτεώματος των ανωτέρω στελεχών θα συμβάλλουν στην κατανόηση των φυσιολογικών αποκρίσεων των κυττάρων παρουσία των τοξικών ξενοβιοτικών ενώσεων που αποδοθούν. Επί του παρόντος, έχει αναφερθεί μόνο η μελέτη του πρωτεώματος του *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, κατά την ανάπτυξη του σε 4-νιτροφαινόλη, 4-χλωροφαινόλη και φαινόλη στις θερμοκρασίες των 5 και 28 °C (Unell *et al.*, 2009), καθώς και του *Arthrobacter* FB24, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εξασθενούς χρωμίου Cr(VI) (Henne *et al.*, 2009).

1.7.1 Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 απομονώθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού από χώμα ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο προερχόμενο από την περιοχή της Περιβλέπου στα Ιωάννινα, όπου για περισσότερο από 30 χρόνια λειτουργούσε εργοστάσιο κατεργασίας ξύλου (Kallimanis *et al.*, 2007). Το στέλεχος Sphe3 παρουσιάζει την ικανότητα ανάπτυξης παρουσία φαινανθρενίου σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας και μάλιστα καταβολίζει το φαινανθρένιο

σε συγκεντρώσεις μέχρι 400 mg/L και με ταχύτερους ρυθμούς από άλλα στελέχη της βιβλιογραφίας (Grifoll *et al.*, 1992; Samanta *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2006b).



Σχήμα 1.7.1.1 Φυλογενετικό δέντρο που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) και προέκυψε από τη σύγκριση κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδικτυο αλληλουχιών 16S rRNA γονιδίων στελεχών συγγενών ως προς το στέλεχος *Sphe3* (Kallimanis *et al.*, 2007).

Πρόκειται για Gram+, αερόβιο, μη κινητικό βακτήριο, με το διακριτό χαρακτηριστικό όλων των στελεχών του γένους, αυτό της εναλλασσόμενης μορφολογίας ακανόνιστου ραβδίου-κόκκου, κατά τον κύκλο ανάπτυξης του. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 30-37 °C, ενώ το βέλτιστο pH 7.0-7.5. Τα κύρια φωσφολιπίδια στη μεμβράνη των κυττάρων του στελέχους *Sphe3* είναι η διφωσφατιδυλογλυκερόλη, η φωσφατιδυλογλυκερόλη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Τα κυρίαρχα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι τα iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, C_{16:0} και anteiso-C_{17:0}, εκπροσωπώντας ποσοστό >86% επί των συνολικών λιπαρών οξέων. Η κυρίαρχη ισοπρενοειδής κινόνη βρέθηκε να είναι η μενακινόνη-8 (MK-8) (Kallimanis *et al.*, 2007).

Στο στέλεχος *Sphe3* έχει διαπιστωθεί πως παρουσία φαινανθρενίου, επέρχεται αλλαγή στη σύσταση των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης. Εφόσον το στέλεχος *Sphe3* περιέχει μόνο κορεσμένα λιπαρά οξέα, αλλαγές στο λόγο των iso

προς anteiso κορεσμένων διακλαδούμενων λιπαρών οξέων επηρεάζουν τη ρευστότητα της μεμβράνης παρουσία των λιπόφιλων αρωματικών ενώσεων. Βρέθηκε λοιπόν ότι ο λόγος iso/anteiso μειώνεται στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία του υποστρώματος του φαινανθρενίου, σε σχέση με κύτταρα που καλλιεργούνται σε γλυκόζη. Τα anteiso λιπαρά οξέα καταλαμβάνουν μεγαλύτερες διατμηματικές περιοχές συγκρινόμενα με iso λιπαρά οξέα, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης (Kallimanis *et al.*, 2007). Παρόμοιες μελέτες του μηχανισμού αλλαγής της σύστασης των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης έχουν αναφερθεί σε *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 (Unell *et al.*, 2007), καθώς και *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 (Sharma *et al.*, 2007), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων οργανικών ενώσεων. Διαπιστώνεται δε, ότι ο ίδιος μηχανισμός αλλαγής της σύστασης των λιπαρών οξέων της μεμβράνης χρησιμοποιείται και για την προσαρμογή του στελέχους *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Unell *et al.*, 2007).

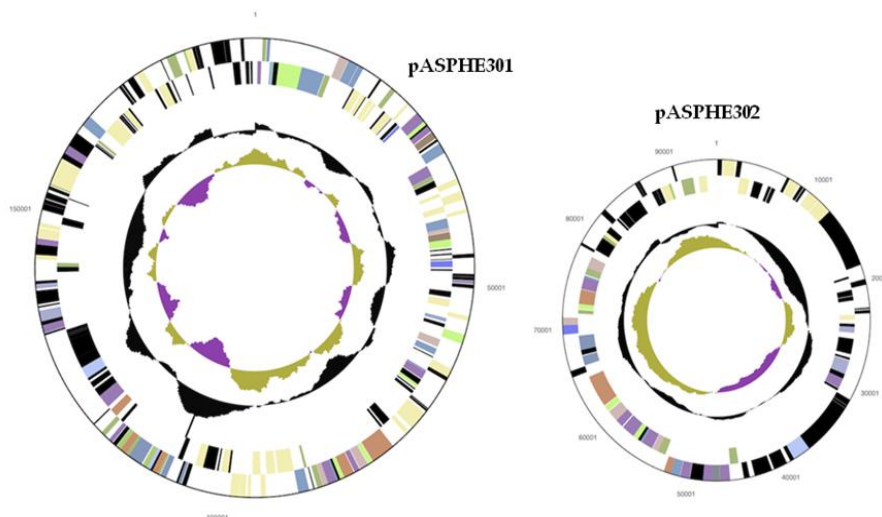
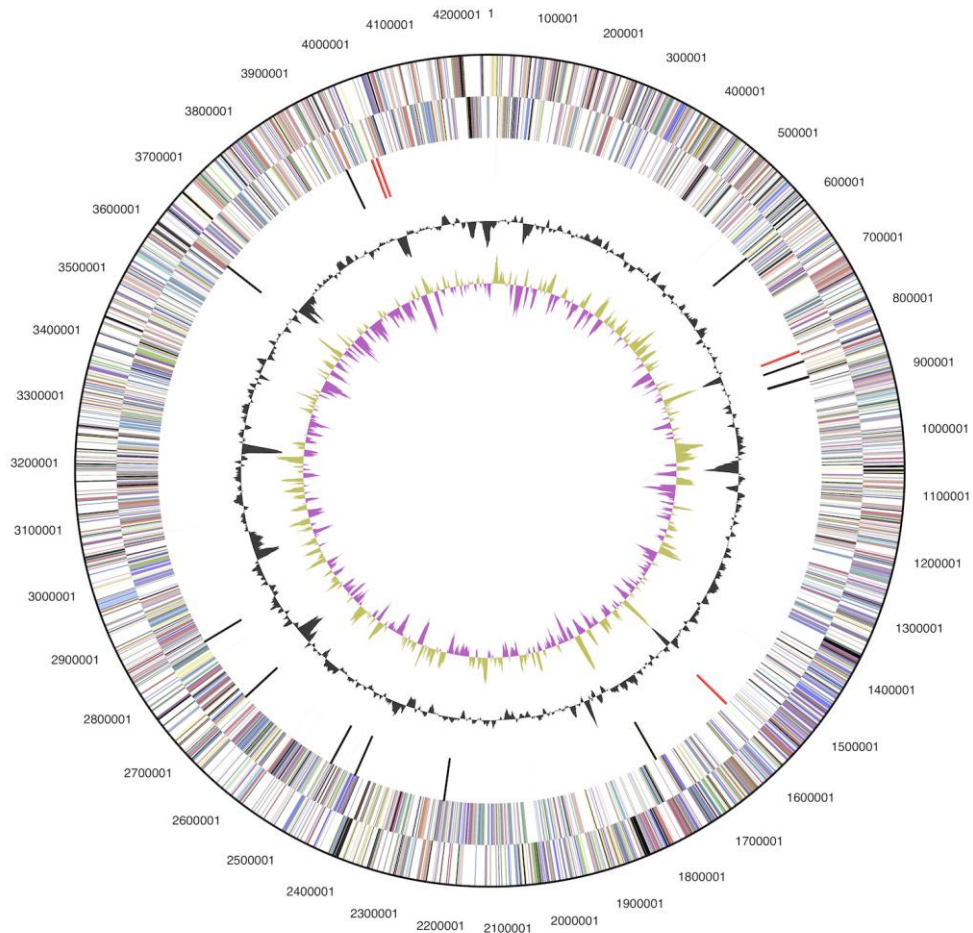
Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, έχει δείξει ότι η πρόσληψη του φαινανθρενίου από τα κύτταρα του στελέχους Sρhe3 γίνεται με δυο μηχανισμούς: (α) με παθητική διάχυση, όπως διαπιστώθηκε για κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε γλυκόζη και (β) με ενεργό μηχανισμό μεταφοράς, που βασίζεται στο πρωτονιακό δυναμικό, όπως διαπιστώθηκε για κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία φαινανθρενίου (Kallimanis *et al.*, 2007).

Έχει διαπιστωθεί ότι το *A. phenanthrenivorans* Sρhe3 φαίνεται να καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του ο-φθαλικού οξέος. Κύτταρα του στελέχους Sρhe3 καλλιεργούνται με χρήση μοναδικών πηγών άνθρακα και ενέργειας το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, την 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη, το φθαλικό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο παρουσία σαλικυλικού οξέος (Σχήμα 1.4.2) (Kallimanis *et al.*, 2009; Μ. Δ. Ε. Καβακιώτη). Επιπλέον, 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 (Σχήμα 1.4.2) (Kallimanis *et al.*, 2009; Μ. Δ. Ε. Καβακιώτη).

Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος με χρωματογραφία στήλης, από κυτταρικό εκχύλισμα του στελέχους *Srhe3* παρουσία φαινανθρενίου σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τετραμερές συνιστώμενο από υπομονάδες των 45 kDa, συνολικού μοριακού βάρους 180 kDa (Μ. Δ. Ε. Καβακιώτη; Vandera *et al.*, 2012). Εν συνεχεία, βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου έδειξε την εξειδίκευσή του προς το υπόστρωμα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, αφού δεν επέδειξε δραστικότητα παρουσία των υποστρωμάτων 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης, 3-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, φθαλικού οξέος και σαλικυλικού οξέος.

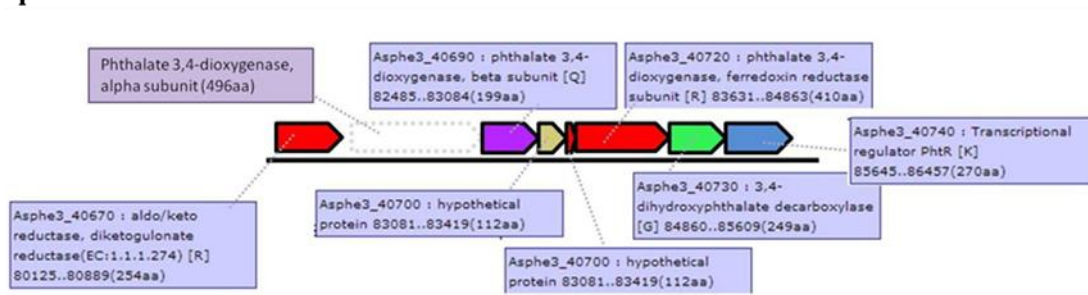
Πρόσφατα ολοκληρώθηκε και η αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος του στελέχους *Srhe3*, που πραγματοποιήθηκε από το Joint Genome Institute (JGI) (<http://www.jgi.doe.gov>). Βρέθηκε ότι το γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3* συνίσταται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 4.250.414 bp, με περιεχόμενο G+C 66%, καθώς και δυο κυκλικά πλασμίδια περιεχομένου G+C 62%, έκαστο. Το μεγαλύτερο εκ των δύο ονομάζεται pASPHE301 και έχει μέγεθος 190.450 bp, το δε μικρότερο pASPHE302 και έχει μέγεθος 94.456 bp (Σχήμα 1.7.1.2) (Kallimanis *et al.*, 2011).



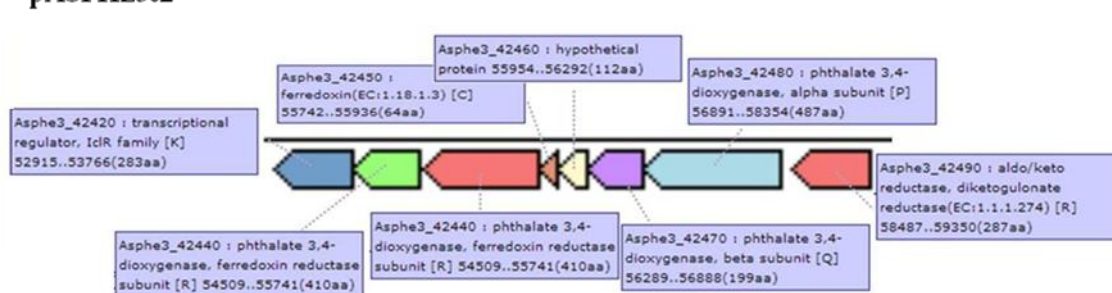
Σχήμα 1.7.1.2 Χάρτης του χρωμοσώματος και των δυο καταβολικών πλασμιδίων pASPHE301 και pASPHE302 του στελέχους *A. phenanthrenivorans* Sρhe3.

Προκαταρκτικές, *in silico* μελέτες στο πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3* κατέδειξαν την ύπαρξη γονιδίων που κωδικεύουν διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου καθώς και γονιδιακών συμπλεγμάτων που πιθανόν να εμπλέκονται στον καταβολισμό του φθαλικού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

ρASPHE301



ρASPHE302



Σχήμα 1.7.1.3 Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των γονιδίων καταβολισμού του φθαλικού οξέος στα δυο καταβολικά πλασμίδια ρASPHE301 και ρASPHE302 του στελέχους *Srhe3* (Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου).

Σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη διαπιστώθηκε ότι κάθε ένα από τα δύο πλασμίδια του στελέχους *Srhe3*, ρASPHE301 και ρASPHE302, φέρει ένα σύμπλεγμα οκτώ υποθετικών γονιδίων τα προϊόντα των οποίων ενδέχεται να συνιστούν ένζυμα για τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Σχήμα 1.7.1.3). Η μελέτη *in silico* έδειξε ότι τα δύο ανωτέρω συμπλέγματα παρουσιάζουν την ίδια δομή και οργάνωση γονιδίων και εμφανίζουν 87% ταυτότητα μεταξύ τους σε επίπεδο συνολικής νουκλεοτιδικής

αλληλουχίας. Αποδείχθηκε ότι αυτά τα γονίδια συμμεταγράφονται συνιστώντας οργανωμένο οπερόνιο και ακολούθησε μελέτη πιθανής περιοχής προαγωγού, η οποία δυστυχώς δεν επέδειξε κάποια δραστικότητα. Τέλος, αναπτύχθηκε σύστημα για τον μετασχηματισμό και την ομόλογη έκφραση γονιδίων στο στέλεχος *Srhe3*, με τη χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων (Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου).

1.8 Σκοπός της διατριβής

Από τους πιο διαδεδομένους και επίμονους ρυπαντές του περιβάλλοντος είναι οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, οι οποίες πέραν των δυσάρεστων συνεπειών τους για το περιβάλλον, είναι επιπλέον τοξικές, μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες, απειλώντας την ανθρώπινη υγεία. Κατά συνέπεια, η απομάκρυνσή τους μέσω της βιοαποδόμησης συγκεντρώνει τεράστιο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Τις τελευταίες δεκαετίες πληθώρα μικροβιακών στελεχών από ρυπασμένες περιοχές έχουν απομονωθεί και χαρακτηρίστη με βάση την ικανότητά τους να καταβολίζουν διάφορους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs). Επιπλέον, η ανάλυση των γονιδιωμάτων ολοένα και περισσότερων στελεχών με δυνατότητα καταβολισμού των αρωματικών ενώσεων, είναι εξαιρετικής σημασίας για τις εφαρμοσμένες μελέτες παρακολούθησης των μικροβιακών πληθυσμών που αποδομούν αρωματικές ενώσεις σε ρυπασμένες περιοχές. Για την βελτιστοποίηση των τεχνικών βιο-αποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών μέσω της εκμετάλλευσης του τεράστιου καταβολικού δυναμικού των μικροοργανισμών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποσαφήνιση των καταβολικών πορειών των διαφόρων αρωματικών ενώσεων από χαρακτηρισμένα βακτηριακά στελέχη, καθώς και ο χαρακτηρισμός των ενζύμων που μετέχουν στις ανωτέρω καταβολικές πορείες με στόχο την σε βάθος κατανόηση των προσαρμοστικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται στα βακτήρια παρουσία των ξеноβιοτικών αυτών ενώσεων.

Σκοπό επομένως της παρούσης ερευνητικής μελέτης, αποτέλεσε η αποσαφήνιση της πορείας βιοαποδόμησης του φαινανθρενίου από ένα νέο βακτηριακό

στέλεχος, το οποίο έχει απομονωθεί στο εργαστήριό μας από περιοχή ρυπασμένη με PAHs. Το στέλεχος αυτό, το οποίο αποτελεί νέο είδος του γένους *Arthrobacter* έχει ονομαστεί *Arthrobacter phenanthrenivorans* (Sρhe3) και πρόσφατα σε συνεργασία με το Joint Genome Institute (JGI), ολοκληρώθηκε η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματός του.

Πιο συγκεκριμένα σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν:

1) Ο εντοπισμός και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου, τόσο στα δυο καταβολικά πλασμίδια όσο και στο κυκλικό χρωμόσωμα του στελέχους Sρhe3. Προκειμένου να εντοπιστούν οι συνθήκες που ευνοούν την έκφραση των γονιδίων αυτών, στόχο αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασής τους σε μεταγραφικό επίπεδο.

2) Η πρωτεωμική ανάλυση του στελέχους Sρhe3 παρουσία των αρωματικών ενώσεων φαινανθρενίου και φθαλικού οξέος, προκειμένου αφενός να ταυτοποιηθούν όλα τα καταβολικά γονίδια που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες ώστε σε συνδυασμό με τη γονιδιακή ανάλυση να διευκρινιστεί πλήρως η καταβολική πορεία του φαινανθρενίου στο στέλεχος Sρhe3, και αφετέρου να μελετηθεί η απόκριση των κυττάρων στην παρουσία αρωματικών ενώσεων.

3) Η πρωτεωμική ανάλυση του στελέχους Sρhe3 παρουσία γλυκόζης ή μίγματος γλυκόζης-φαινανθρενίου προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή καταστολή από τη γλυκόζη.

4) Ο έλεγχος του συν-μεταβολισμού PAHs από το στέλεχος Sρhe3 για τη πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών αποδόμησης.

Η κατανόηση των μηχανισμών προσαρμογής του στελέχους Sρhe3 παρουσία ξενοβιοτικών ενώσεων συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών βιοαποδόμησης που χρησιμοποιούν τα βακτήρια. Η θεμελιώδης κατανόηση των ανωτέρω μηχανισμών, θα οδηγήσει σε πιο αποτελεσματική γενετική τροποποίηση των βακτηρίων με απώτερο στόχο την πιο αποτελεσματική εφαρμογή των τεχνικών βιοαποδόμησης που θα συμβάλλουν στην απορρύπανση του περιβάλλοντος.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χημικές ουσίες και όργανα

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (pro analysis) των εταιρειών Merck, Fluka και Sigma. Τα θρεπτικά υλικά ήταν των εταιριών Oxoid και LAB M. Τα περιοριστικά ένζυμα, η λιγάση, η KapaTaq, η KapaHiFi πολυμεράση και το Kapa SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (2X) Universal ήταν από την εταιρεία TaKaRa. Τέλος, οι πολυμεράσες DynaZyme EXT και Phusion ήταν της εταιρείας FINNZYMES, ενώ για τα πειράματα RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το Robust RT-PCR kit της εταιρίας FINNZYMES.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν τα ακόλουθα:

1. **Πιπέτες:** Gilson (P2, P10, P20, P200, P1000, P5000)
2. **Φυγόκεντροι:** MIKRO 12-24 (Hettich Zentrifyngen), Hettich UNIVERSAL, SIGMA 2K 15, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge Dupont Instruments (κεφαλές GS-3 και SS-34).
3. **Φωτόμετρα:** Spectronic 21 (Milton Roy Company), SHIMATZU MODEL 1201.
4. **Ανακινούμενοι επωαστήρες:** ORBITAL SHAKER Forma Scientific, New Brunswick Scientific Gyrotory Water Bath Shaker MODEL G76
5. **Λυοφιλοποιητές:** SAVANT Speed Vac SC100 Refrigerated Condensation Trap RT-100, Heto Cool Line PLFD-1.0-110
6. **Υπερκαταψύκτης:** FORMA Scientific -80°C FREEZER
7. **Laminar Flow:** Microflow Safety Cabinet Class II, Series 'SE' Model 51424/2
8. **Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA:** Consort BIORAD
9. **Κλίβανος αποστείρωσης:** Tuttnauer 3870 E
10. **DNA Thermal Cycler:** PTC-100 version 7.0 thermocycler (MJ Reasearch Inc.)
11. **pH μετρο:** Corning pH meter 440
12. **Συσκευές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών:** Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD Protean™ II Slab Cell
13. **Σύστημα φωτογράφισης:** BIO GENE V97 Software FOR WINDOWS 95, BIO-PROFILE IMAGE ANALYSIS SOFTWARE KODAK ds 1D Digital Science
14. **Τροφοδοτικά:** BIORAD, LKB
15. **Υδατόλουτρα:** UNITEK HB-130 DRY BLOCK HEAT BATH
16. **Περισταλτική αντλία:** Miniplus 3, Gilson

17. **Gradient former** : BIORAD MODEL 385 GRADIENT FORMER
18. **Real-time PCR thermocycler**: DNA Engine Opticon 2 (MJ Research) with Opticon Monitor 2 software.
19. **Nanodrop**: Quawell Q3000, UV spectrophotometer και software: Quawell Q3000, DNA/proteins analyzer. Quawell Technology, Inc. San Jose, CA, USA
20. **Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης**: Xcell Gene Pulser και κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης Bio-Rad Laboratories, CA, USA.
21. **Mini-Bead beater**: BIOSPEC PRODUCTS.
22. **Φθορισμόμετρο**: Shimadzu

2.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη, τα πλασμίδια, καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στους Πίνακες 2.2.1, 2.2.2 και 2.2.3, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.2.1: Βακτηριακά στελέχη.

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Αναφορές
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
DH5a	F ⁻ φ80dlacZΔM 15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Hanahan 1983
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
Rosetta	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (R _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> λ(DE3)	Novagen
<u><i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i></u>		
Sphe3	Φυσικός Τύπος	Kallimanis <i>et al.</i> , 2009

Πίνακας 2.2.2 Πλασμιδια.

Πλασμιδιο	Ανθεκτικότητα	Μέγεθος (kb)	Αναφορές
pET29c(+)	Km ^r	5.372	Novagen
pCR-blunt	Km ^r	3.512	Invitrogen
pUC18	Ap ^r	2.686	Boehinger and Manheim
pART2	Km ^r	4.634	Sandu <i>et al.</i> , 2005
pART2- <i>gfp</i>	Km ^r	5.301	Sandu <i>et al.</i> , 2005
pCR- blunt:: <i>Ppca</i>	Km ^r	3.780	Αυτή η εργασία
pART2- <i>gfp</i> :: <i>Ppca</i>	Km ^r	5.374	Αυτή η εργασία
pCR-blunt::FL- <i>Ppca</i>	Km ^r	5.554	Αυτή η εργασία
pUCENB	Ap ^r	3.256	Μ.Δ.Ε Κουρτιδου
pUCENB:: <i>Ppca</i>	Ap ^r	3.329	Αυτή η εργασία
pIZ1016	Gm ^r	6.300	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
pIZ1036	Km ^r	6.500	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
pCR- blunt:: <i>rhdaβ</i>	Km ^r	5.544	Αυτή η εργασία
pET29c(+>:: <i>rhdaβ</i>	Km ^r	7.378	Αυτή η εργασία
pIZ1016:: <i>rhdaβ</i>	Gm ^r	8.332	Αυτή η εργασία
pIZ1036:: <i>rhdaβ</i>	Km ^r	8.532	Αυτή η εργασία
pIZ:: <i>pdo1</i>	Km ^r	carrying the <i>pdo1</i> from	Krivobok <i>et al.</i> , 2003

6PY1			
pET15b	Ap ^r	5.708	Novagen
pETDC21	Ap ^r	carrying the <i>phtAdAc</i> from 6PY1	Y. Jouanneau group
pIZ-CD	Gm ^r	without the <i>phdCD</i> from KP7	Y. Jouanneau group
pBRCD	Gm ^r	carrying the <i>phdCD</i> from KP7	Krivobok <i>et al.</i> , 2003
pCR- blunt::<i>diox1</i> flank	Km ^r	4.885	Vandera <i>et al.</i> , 2012
pCR- blunt::<i>diox2</i> flank	Km ^r	4.920	Vandera <i>et al.</i> , 2012
pCR- blunt::<i>diox1</i>	Km ^r	4.831	Vandera <i>et al.</i> , 2012
pCR- blunt::<i>diox2</i>	Km ^r	4.702	Vandera <i>et al.</i> , 2012
pET29c(+>::<i>diox1</i>	Km ^r	6.441	Vandera <i>et al.</i> , 2012
pET29c(+>::<i>diox2</i>	Km ^r	6.441	Vandera <i>et al.</i> , 2012

Πίνακας 2.2.3 Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές.

Όνομασία	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίου (5' →3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)
Προσδιορισμός της έκφρασης της των γονιδίων που πιθανώς κωδικεύουν διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης στο pASPH301, pASPH302 και στο χρωμόσωμα		
rhd1α_{for}	CAACGGAGGAAAGCTCGTAG	198
rhd1α_{rev}	TCCATCACGATGTCCAGGTA	
rhd1β_{for}	ATG ACA ATC GAA GCA CAG ACA C	140
rhd1β_{rev}	AGG TCC TGC GCC ATG AGG	
rhd2α_{for}	TACGTGCTGCTGAACTCCTG	204
rhd2α_{rev}	AAGGCCCCAGTTCTGCTTAT	
rhd2β_{for}	CGGACTACTCGAAGGGACAG	135
rhd2β_{rev}	TGTACTGGTAGTCGTCIGCGA G	
rhd3α_{for}	ACATCATCGAAGAGGCAAC	Το ζεύγος δεν έδωσε προϊόν PCR
rhd3α_{rev}	GGTCCCACACTTCCTCAAGA	
rhd3β_{for}	CCGTTACAACACGACGGATA	104
rhd3β_{rev}	CGTTCCTCAGGACGACCTTC	
gyrβ_{for}	GGCTAACGACAATACAGATA	210
gyrβ_{rev}	ACCACTTCATAAACAAGG T	
Κλωνοποίηση των γονιδίων <i>rhd$\alpha\beta$</i> στους φορείς pIZ1016, pIZ1036 και pET29c		
rhd$\alpha\beta$_{for}	ACACAAT <u>GTCGACT</u> TTGGAGACA <u>CATATG</u> TCTG	1998
rhd$\alpha\beta$_{rev}	GATGCCCC <u>AAGCTT</u> ACTCCTTCGT CACATG	
Πειράματα λειτουργικού χαρακτηρισμού των 1-H2NA διοξυγονασών		
Diox1F	AAAGTCCGGGTGCATCGCG	1373
Diox1R	GGTCTCGTCGAGATTGATCG	
Diox2F	ACGATGAGCTCGACCATGCG	1408
Diox2R	CGTTCCCGACCTTTTACG	
pETdiox1F	CGAAGGAGACAAC <u>CATATG</u> GATT CAGTC	1.186
pETdiox1R	GAGGATCCCATAGTTCATCC	
pETdiox2F	CGAAGGAGACCAC <u>CATATG</u> GATT	1164

CAGTC		
pETdiox2R	CGTGCGGGATCCACAGTTCG	
1mRNA_{for}	GACGCGGGCAACCCTTA	188
1mRNA_{rev}	TGATCGGTGACGAACGA	
2mRNA_{for}	TCAGCCGGGAATGAGTT	190
2mRNA_{rev}	GTGTCAGTCTGCATCGT	
gyrβ_{for}	GGCTAACGACAATACAGATA	210
gyrβ_{rev}	ACCACTTCATAAACAAGGT	
Έλεγχος συμμεταγραφής με RT-PCR των γονιδίων <i>meta</i> -σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος του στελέχους <i>Sphe3</i>		
pcaRT1_{for}	AATACGTCCGATCCCATGAC	583
pcaRT1_{rev}	TCATGAGCTTGAGCTGGTTG	
pcaRT2_{for}	CATCGACCTTCTACCAAGG	450
pcaRT2_{rev}	GTTGTCACCAGGCTGTAGCA	
pcaRT3_{for}	GATAACGAGGAAGCCAAACG	362
pcaRT3_{rev}	CGCCTGTACGATGACGTTT	
pcaRT4_{for}	GTCGACTACATCCCGCAGAT	438
pcaRT4_{rev}	CCGATCATCATGTCTCGGTA	
pcaRT5_{for}	GAATGGCAGCACATGGAGTA	515
pcaRT5_{rev}	ACGGAATCTCGACCTGCAC	
pcaRT6_{for}	ACGGTATTGAGCTGCAGGAT	358
pcaRT6_{rev}	CGTCCATCGATGACTTTCAC	
pcaRT7_{for}	CACCTGCGTGAGAACATGG	470
pcaRT7_{rev}	CTCGTCGGCATTCGTAAAG	
Μελέτη της πιθανής περιοχής προαγωγού του οπερονίου του 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος <i>Sphe3</i>		
FL-Ppca_{for}	ACGCGATTCTAACGATCCAC	2042
FL-Ppca_{rev}	GGTGTCCGCATTGAGGTAGT	
Ppca_{for}	GAATAACTGACCATGGGATG	268
TG		
Ppca_{rev}	GGATGTCGGGATCCACGG	

*Με έντονη και υπογραμμισμένη γραφή φαίνονται οι θέσεις περιορισμού.

2.3 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων

2.3.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων βακτηρίων *E. coli*, Luria Bertani Broth (LB)

1% (w/v) NaCl

0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης

1% τρυπτόνη

pH 7.5 με διάλυμα NaOH 1 N

Για την παρασκευή πλήρους στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας LA (Luria Agar) προστίθενται επιπλέον 1.6% άγαρ και ακολουθεί αποστείρωση.

2.3.2 Θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης για την καλλιέργεια κυττάρων του βακτηρίου *Arthrobacter phenanthrenivorans* MM M9

Παρασκευή MM M9 (100 ml)

Αποστειρώνονται 75-78 ml απονισμένου H₂O και όταν η θερμοκρασία μειωθεί στους 50° C, προστίθενται τα παρακάτω διαλύματα, τα οποία έχουν ήδη αποστειρωθεί ξεχωριστά:

5X M9 20 ml

MgSO₄ 0.1 M 2 ml

CaCl₂ 0.01 M 1 ml

TE 1 ml

5X M9 (500 ml):

Na₂HPO₄ 2H₂O 21.25 g

KH₂PO₄ 7.50 g

NaCl 1.25 g

NH₄Cl 2.50 g

TE (L):

FeCl₃ x6H₂O 200 mg

MnSO₄ xH₂O 400 mg

ZnSO₄ x7H₂O 400 mg

CuSO₄ x5H₂O 62.5 mg

H₃BO₃ 500 mg

H₂MoO₄ x2H₂O 160 mg

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων (TE) αποστειρώνεται με φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης μεγέθους πόρων 0.45 μm.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9, αποστειρώνεται νερό με άγαρ (1.6 g άγαρ με 75 - 78 ml ύδατος για 100 ml θρεπτικού μέσου) και αφού κρυώσει (50 °C), προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα.

Πίνακας 2.3.2.1: Πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *A. phenanthrenivorans* Sph3.

Πηγή άνθρακα	Τελική συγκέντρωση	Διάλυμα αποθήκευσης
Γλυκόζη	4mg/ml	Υδατικό διάλυμα γλυκόζης 40%
Φαινανθρένιο	200μg/ml	Διάλυμα φαινανθρενίου σε διαιθυλαιθέρα 5% w/v
Φθαλικό οξύ	2.5mg/ml	Υδατικό διάλυμα φθαλικού οξέος 5% w/v
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	15 mM	Υδατικό διάλυμα πρωτοκατεχοϊκού οξέος 30 mM
Φαινολοξικό οξύ	1 mM, 5 mM, 15 mM	Υδατικό διάλυμα φαινολοξικού οξέος 30 mM

Στον Πίνακα 2.3.2.1 φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις καθώς και τα διαλύματα αποθήκευσης των πηγών άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *Arthrobacter phenanthrenivorans* Srhe3 σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9.

2.4 Μικροβιακές καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες του βακτηρίου *E. coli* επωάζονται στους 37° C υπό συνεχή ανάδευση. Οι καλλιέργειες του στελέχους Srhe3 επωάζονται στους 30° C υπό συνεχή έντονη ανακίνηση.

2.5 Αντιβιοτικά

Πίνακας 2.5.1: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό/διαλύτης	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (µg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. phenanthrenivorans</i>
Αμπικιλίνη (Ap)/ds H ₂ O	100	120/60
Καναμυκίνη (Km)/ds H ₂ O	50	140/60

Πίνακας 2.5.2: Τρόπος δράσης αντιβιοτικών- μηχανισμός ανθεκτικότητας

Αντιβιοτικό	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός ανθεκτικότητας
Ap	Εμποδίζει τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών, αναστέλλοντας τη δράση της τρανσipeπτιδάσης. Έτσι προκαλείται ο τερματισμός της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.	Το γονίδιο <i>bla</i> κωδικεύει το ένζυμο β-λακταμάση το οποίο διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού
Km	Προσδένεται στο 70S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA(mRNA).	Το γονίδιο <i>kam</i> κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με το ριβόσωμα.

Τα αντιβιοτικά προστίθενται μετά την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας και όταν η θερμοκρασία αυτών έχει μειωθεί στους 45-50° C. Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών γίνεται με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης μεγέθους πόρων 0.45 μm. Τα αλκοολικά διαλύματα των αντιβιοτικών δεν χρειάζονται αποστείρωση. Στους Πίνακες 2.5.1 και 2.5.2 συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τρόπος δράσης τους και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας.

2.6 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από κύτταρα του στελέχους *Sph3* με τη μέθοδο CTAB (mini-preparation)

1. Από καλλιέργεια κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί O/N φυγοκεντρούμε 1.5 ml σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι για 5 min και ακολουθεί απόχυση του υπερκειμένου.
2. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 740 μl TE
3. Προσθήκη 20 μl διαλύματος λυσοζύμης (100 mg/ml) και επώαση για 12 ώρες στους 37° C.
4. Προσθήκη 40 μl διαλύματος 10% SDS.
5. Προσθήκη 4 μl διαλύματος προνάσης (20 mg/ml) και επώαση για 12 ώρες στους 37° C.
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος 5M NaCl και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος CTAB/ NaCl προθερμασμένου στους 65° C και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα.
8. Επώαση για 10 min στους 65° C.
9. Προσθήκη 0.5 ml διαλύματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και καλή ανάδευση.

10. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλογή της υδατικής φάσης και μεταφορά αυτής σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
11. Προσθήκη 0.5 ml διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής (25:24:1) και καλή ανάδευση.
12. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 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 0.6 του όγκου ισοπροπανόλη (-20° C) και ακολουθεί επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 15 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
15. Έκπλυση του ιζήματος με 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση 15 min σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.
16. Γίνεται απομάκρυνση υπολειμμάτων υπερκειμένου με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.
17. Το ίζημα επαναιωρείται σε 20 μl διαλύματος TE και RNase [99 μl TE+ 1 μl RNase (10 mg/ml)], μεταφέρεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και επωάζεται στους 37° C για 20 min.
18. Φυλάσσεται στους -20° C για περαιτέρω χρήση.

Διάλυμα CTAB/NaCl: 4.1 g NaCl σε 80 ml H₂O και σε αυτά προστίθενται πολύ αργά, με ταυτόχρονη πολύ ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 65° C, 10 g CTAB. Η πλήρης διάλυση του CTAB επιτυγχάνεται σε 3 ώρες ή και περισσότερο. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH= 8

2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων

Οι μέθοδοι αλκαλικής λύσεως για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζονται στα εξής: Σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες του DNA διασπώνται (μετουσίωση). Κατά την ουδετεροποίηση το πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται, ενώ το χρωμοσωμικό παραμένει μετουσιωμένο λόγω μεγέθους, διευκολύνοντας έτσι την εκλεκτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

2.7.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini-preparation)

Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας και ακολουθεί την εξής πειραματική διαδικασία:

1. Από καλλιέργεια 1.5 ml τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 λεπτά.
2. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl διαλύματος I και το εναιώρημα επώαζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στο παραπάνω εναιώρημα 200 μl διαλύματος II και το μίγμα επώαζεται σε μίγμα πάγου-νερού (0° C) για 10 λεπτά.
4. Ακολουθεί η προσθήκη 150 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε μίγμα πάγου-νερού (0° C) για 5 λεπτά.
5. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Στη συνέχεια συλλέγονται 400 μl από το υπερκείμενο σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο στο οποίο προστίθενται 320 μl ψυχρής (-20° C) ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
7. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

8. Ακολουθεί συλλογή του ιζήματος, ξήρανση και επαναιώρηση σε 300 μl TE.
9. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 30 μl CH₃COONa 3M pH=5.5 και 800 μl ψυχρής (-20 °C) αιθανόλης και το μίγμα επωάζεται στους -80 °C για 30 λεπτά.
10. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά στους 4° C, το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται και επαναιωρείται στον κατάλληλο όγκο νερού ή διαλύματος TE.

Διαλύματα

Διάλυμα I: 50 mM γλυκόζης
25 mM Tris (τρις-υδροξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH= 8
10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
5 mg/ml λυσοζύμης
Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20° C.

Διάλυμα II: 0.2 N NaOH
1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν την χρήση του.

Διάλυμα III: 3 M CH₃COOK pH= 5.5

Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH= 8

2.7.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την αυτοματοποιημένη διαδικασία (kit) Nucleospin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel (Γερμανίας)

1. Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων

Φυγοκέντρηση καλλιέργειας κυττάρων 1-5 ml για 30 sec σε 11000 g και απομάκρυνση με πιπέτα όσο το δυνατόν περισσότερου υπερκείμενου.

2. Κυτταρική λύση

Προσθήκη 250 μl διαλύματος A1 και επαναιώρηση των κυττάρων με χρήση περιστροφικού αναδευτήρα. Προσθήκη 250 μl διαλύματος A2. Απαλή ανάδευση για 6-8 φορές (χωρίς χρήση περιστροφικού αναδευτήρα) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min το πολύ. Προσθήκη 300 μl διαλύματος A3 και απαλή ανάδευση 6-8 φορές. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 11000 g σε θερμοκρασία

δωματίου.

3. Δέσμευση του DNA

Μεταφορά του υπερκείμενου σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 g και απόχυση του διηθήματος.

4. Έκπλυση και ξήρανση της στήλης

Προσθήκη 600 μl A4 και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 g. Προσθήκη 500 μl προθερμασμένου διαλύματος AW (50° C) και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 g (Προαιρετικό στάδιο. Συνίσταται μόνο κατά την περίπτωση χρήσης στελεχών HB101 ή JM με υψηλό περιεχόμενο σε νουκλεάσες). Φυγοκέντρηση για 2 min σε 11000 g για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.

5. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA

Προσθήκη 50 μl διαλύματος AE, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση σε 11000 g για 1min.

2.8 Απομόνωση ολικού RNA

Γενικές παρατηρήσεις για το χειρισμό του RNA

(α) Χειρισμός του RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι πολύ σταθερά και ενεργά ένζυμα τα οποία γενικά δεν απαιτούν άλλους παράγοντες για να δράσουν. Από τη στιγμή που οι ριβονουκλεάσες είναι πολύ δύσκολο να αδρανοποιηθούν και ακόμα και ελάχιστες ποσότητες είναι αρκετές για να καταστρέψουν το RNA, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται πλαστικό ή γυάλινο σκεύος χωρίς πρώτα να εξαλειφθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης με ριβονουκλεάσες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με ριβονουκλεάσες τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης όσο και μετά την απομόνωσή του. Προκειμένου να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον ελεύθερο RNασών, θα πρέπει να ληφθούν μια σειρά προληπτικών μέτρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας όπως αυτά περιγράφονται παρακάτω.

(β) Γενικές οδηγίες

Κατά τον χειρισμό του RNA θα πρέπει να ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασφαλιστικές τεχνικές. Τα χέρια καθώς και η σκόνη είναι πιθανοί φορείς βακτηρίων και μούχλας που είναι οι πιο διαδεδομένες πηγές μολύνσεων με ριβονουκλεάσες. Η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό των διαλυμάτων και των δειγμάτων RNA είναι επιβεβλημένη προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση με ριβονουκλεάσες οι οποίες πιθανόν να προέρχονται είτε από το δέρμα είτε από σκονισμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. 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.

(γ) Πλαστικός εξοπλισμός μιας χρήσεως

Συνίσταται η χρήση αποστειρωμένου πλαστικού εξοπλισμού μιας χρήσεως (μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια, ρύγχη πιπιετών 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 (διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ).

(δ) Κατεργασία με DEPC (Diethylpyrocarbonate)

Η κατεργασία με DEPC, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εξάλειψη των ριβονουκλεασών από το νερό και άλλα διαλύματα. Το διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (DEPC) καταστρέφει την ενζυμική δραστηριότητα των ριβονουκλεασών καθώς και άλλων πρωτεϊνών, τροποποιώντας τις ομάδες -NH₂, -SH και -OH, όπου αυτές υπάρχουν. Για την κατεργασία διαλυμάτων με DEPC, προστίθεται DEPC 0.1% 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.

2.8.1 Απομόνωση ολικού RNA από βακτήρια με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin RNA / Protein της Macherey - Nagel (Γερμανίας)

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ο σωστός αριθμός κυττάρων προκειμένου να αποκτηθεί η μέγιστη ποσότητα και καθαρότητα RNA με τις στήλες Nucleospin RNA / Protein. Δυο παράγοντες επηρεάζουν τη χρήση της μέγιστης ποσότητας κυττάρων:

- Η ικανότητα πρόσδεσης του RNA στη στήλη (100 µg)
- Ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος RP1 που απαιτείται για επαρκή λύση. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την πειραματική διαδικασία περιορίζει την αρχική ποσότητα των κυττάρων στο μέγιστο των 1×10^9

Για καλλιέργειες βακτηρίων που περιέχουν υψηλή ποσότητα RNA θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός κυττάρων προκειμένου να μην ξεπεραστεί η μέγιστη χωρητικότητα πρόσδεσης των στηλών με RNA και αντίστροφα.

Η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA από Gram-αρνητικά βακτήρια έχει ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 6.000 rpm / 4 °C / 5 min. (Δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν πάνω από 1×10^9 κύτταρα). Προσεκτική απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού μέσου καλλιέργειας γιατί πιθανόν να δημιουργήσει προβλήματα στα επόμενα στάδια της διαδικασίας.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 µl TE το οποίο περιέχει λυσοζύμη 200 µg/ml με περιστροφική ανάδευση και επώαση του δείγματος για 10 min στους 37 °C.
3. Προσθήκη 350 µl ρυθμιστικού διαλύματος RP1 (Προσοχή : στο ρυθμιστικό διάλυμα RP1 πρέπει να έχει διαλυθεί η β-μερκαπτοαιθανόλη πριν τη χρήση του) και ακολουθεί ανάμιξη με περιστροφική ανάδευση.
4. Για να εξαλειφθεί το κολλώδες και η θολότητα του δείγματος αυτό διαβιβάζεται στη Nucleospin Filter units και φυγοκεντρείται σε 11.000 g / 1 min. Αν παρατηρηθούν κάποια αδιάλυτα στοιχεία τότε το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι για να πραγματοποιηθούν

τα επόμενα στάδια.

5. Προσθήκη στο υπερκείμενο 350 μl αιθανόλης (70%) και ομογενοποίηση με χρήση πιπέτας. Στο στάδιο αυτό είναι πιθανός ο σχηματισμός ιζήματος, η παρουσία του οποίου όμως δεν επηρεάζει τη διαδικασία.
6. Μεταφορά του διαλύματος μαζί με το ίζημα που πιθανόν να έχει σχηματιστεί σε μια στήλη Nucleospin RNA /Protein. Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm/30 sec. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υγρό που συλλέγεται στο σωληνάκι μέσα στο οποίο είναι η στήλη.
7. Προσθήκη 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος MDB και φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm/1 min για απομάκρυνση των αλάτων από τη στήλη.
8. Σε απαλλαγμένο από RNάσες μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προετοιμάζεται το διάλυμα αντίδρασης DNάσης με προσθήκη 90 μl ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης και 10 μl ενεργοποιημένης DNάσης. Ομογενοποίηση του διαλύματος με χρήση πιπέτας. Μεταφορά 95 μl από το ανωτέρω διάλυμα στη στήλη και επώαση αυτής για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος RA2 και φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm / 30 sec. Μεταφορά της στήλης σε νέο συλλεκτικό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.
10. Προσθήκη 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm / 30 sec.
11. Προσθήκη 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm / 2 min. Μεταφορά της στήλης σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι απαλλαγμένο από RNάσες.
12. Ακολουθεί έκλουση του RNA σε 60 μl H₂O απαλλαγμένου από RNάσες και φυγοκέντρηση 10.000 rpm / 1 min

2.8.2 Κατεργασία απομονωμένου RNA με δεοξυριβονουκλεάση 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: 20-50μg

10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNase I: 5μl

DNase I: 2μl (10units)

αναστολέας RNασών: 20units

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

2. Επώαση για 20-30 λεπτά στους 37°C.

3. Προσθήκη 50μl ddH₂O κατεργασμένο με DEPC και 100μl 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 10μl CH₃COONa 3M και 250μl παγωμένης αιθανόλης 100% ακολουθούμενη από ανάδευση. Παραμονή για 20 λεπτά στους -80°C.

8. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000rpm στους 4°C και απόχυση του υπερκείμενου.

9. Έκπλυση του ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 70%. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12.000rpm στους 4°C και απόχυση του υπερκείμενου.

10. Ξήρανση του ιζήματος.

11. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50μl ddH₂O κατεργασμένο με DEPC.

Διαλύματα

10 x ρυθμιστικό διάλυμα DNασης I :

400mM Tris HCl pH 7.5

80mM MgCl₂

50mM DDT (π, π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο)

Αιθανόλη 100%

2.9 Καθαρότητα του DNA και του RNA (Sambrook and Russell, 2001)

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνεται μια μέτρηση απορρόφησης στα 260 nm και μία στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι : $O.D_{260}=1$ αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος, ενώ η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι : $O.D_{260}=1$ 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 UV φασματοφωτομέτρου Quawell Q3000.

2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

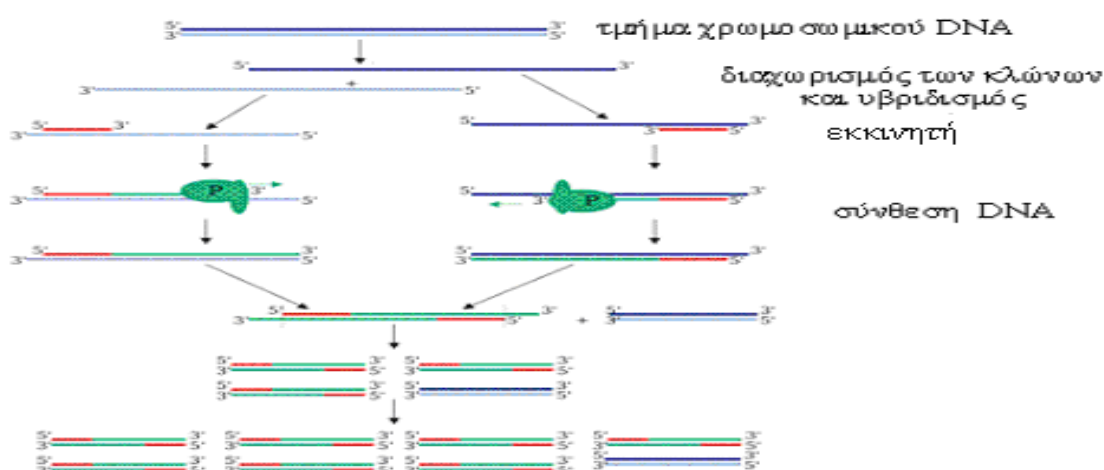
Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική PCR προσφέρει με έναν απλό τρόπο την κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ζωντανών κυττάρων εκμεταλλεύομενη δυο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Όμως για να μπορέσει να αρχίσει την σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν διαχωριστούν οι δυο 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 υβρίδισε 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 ένα κλώνο και οι δυο 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 δυο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους περίπου 94° C.
2. Ψύξη του μίγματος για να υβριδίσουν οι εκκινητές με τους δυο 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 2.10.1: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής 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. Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι: KapaTaq και KapaHiFi από την εταιρεία TaKaRa, καθώς και οι DynaZyme EXT και Phusion της εταιρείας FINNZYMES.

Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH ₂ O	64 µl
10X ρυθμιστικού δ/τος	10 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	5 µl
dNTPs (10 mM)	10 µl
Εκκινητής 1	3 µl (30 pmols)
Εκκινητής 2	3 µl (30 pmols)
Εκμαγείο DNA	4 µl (30-100 ng)
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 5 min στους 98⁰ C ακολουθούμενη από 30 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:
 - ✓ Μετουσίωση για 1 min στους 98⁰ C
 - ✓ Αναδιάταξη για 2 min σε θερμοκρασία κατάλληλη, ανάλογα με τους χρησιμοποιούμενους κάθε φορά εκκινητές
 - ✓ Επιμήκυνση για 3 min στους 72⁰ C
- Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο και για 10 min στους 72⁰ C.

Οι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρία VBC-BIOTECH στη Γερμανία.

2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Αρχή της μεθόδου (Stryer, L. 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 κυλούν από το RNA στο DNA, το αντίστροφο από την κανονική κατεύθυνση της μεταφοράς πληροφοριών (απ' αυτό πήρε και το όνομα του το ένζυμο που καταλύει αυτό το περιεργό 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 πολύ-A στο 3' άκρο των περισσότερων ευκαρυωτικών μορίων 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 (Stryer, L. 1988).

Πειραματική πορεία

Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται η AMV (Avian Myeloblastosis Virus) αντίστροφη μεταγραφάση για τη σύνθεση της αλυσίδας του cDNA και DyNAzyme EXT πολυμεράση για τη σύνθεση της δεύτερης cDNA αλυσίδας και την ενίσχυση του DNA. Η σύνθεση του cDNA και η ενίσχυση του με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR), γίνονται διαδοχικά στο ίδιο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι, ακολουθώντας ένα συνεχές θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα.

Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O απαλλαγμένο από RNάσες	έως τελικό όγκο 50 μl
10X RobusT ρυθμιστικό δ/μα	5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
Εκκινητής 1	10 pmol
Εκκινητής 2	10 pmol
Εκμαγείο RNA	10 pg -1 μg
AMV RT (5U/μl)	1 μl (2.5 U)
DyNAzyme EXT DNA Polymerase 1U/μl	2 μl
Αναστολέας RNάσης*	x μl
Τελικός όγκος	50 μl

* Η χρήση του αναστολέα RNάσης δεν είναι υποχρεωτική, συνιστάται όμως για τον αποκλεισμό της δράσης RNάσων που ενυπάρχουν έστω και σε ίχνη, ιδιαίτερα όταν το εκμαγείο RNA που χρησιμοποιείται έχει συγκέντρωση χαμηλότερη από 10 ng.

Η αντίδραση RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή PTC-100 version 7.0 thermocycler (MJ Research Inc.) στις ακόλουθες συνθήκες:

- Σύνθεση της αλυσίδας του cDNA στους 60° C για 60 min.
- Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και μετουσίωση του υβριδίου cDNA-RNA στους 94° C για 2 min.
- Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης ακολουθούμενη από 30 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:
 - ✓ Μετουσίωση για 30 sec στους 94° C
 - ✓ Αναδιάταξη για 30 sec σε θερμοκρασία κατάλληλη, ανάλογα με τους χρησιμοποιούμενους κάθε φορά εκκινητές
 - ✓ Επιμήκυνση για 1-1.5 min/kb στους 72° C

- Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο και για 5-10 min στους 72° C.

2.11.1 Αντίδραση σύνθεσης cDNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)

Πειραματική πορεία

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι, και όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή, προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Τυχαία 6-μερή (random 6-mers) (50 μM): 2 μl (100 pmol για q)RT-PCR
- dNTPs (10 mM το καθένα): 1 μl
- εκμαγείο RNA: 0.5 μg
- dH₂O RNase-free

μέχρι τελικό όγκο: 10 μl

2. Γίνεται επώαση των δειγμάτων για 5 min στους 65° C κι αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο.

3. Ετοιμάζεται το επόμενο βήμα της αντίδρασης για τα ανωτέρω μίγματα, ως εξής:

- μίγμα εκμαγείου RNA: 10 μl
- 5X PrimeScript™ buffer: 4 μl
- αναστολέας RNασών (40 U/μl): 0.5 μl (20 U)
- PrimeScript™ RTase (200 U/μl): 1.0 μl (200 U)
- dH₂O RNase-free: 4.5 μl

Συνολικός όγκος: 20 μl

4. Γίνεται ήπια ανάδευση του μίγματος

5. Ακολουθεί επώαση του μίγματος στις ακόλουθες συνθήκες:

- 10 min στους 30° C
- 42 min στους 50° C

6. Ακολουθεί απενεργοποίηση των ενζύμων στους 70° C για 15 min, αντί για τους 95° C για 5 min, προκειμένου να δημιουργηθεί κάποια εγκοπή (nicking) στη συντηθήμενη cDNA αλυσίδα. Αμέσως μετά τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για να ψυχθούν.

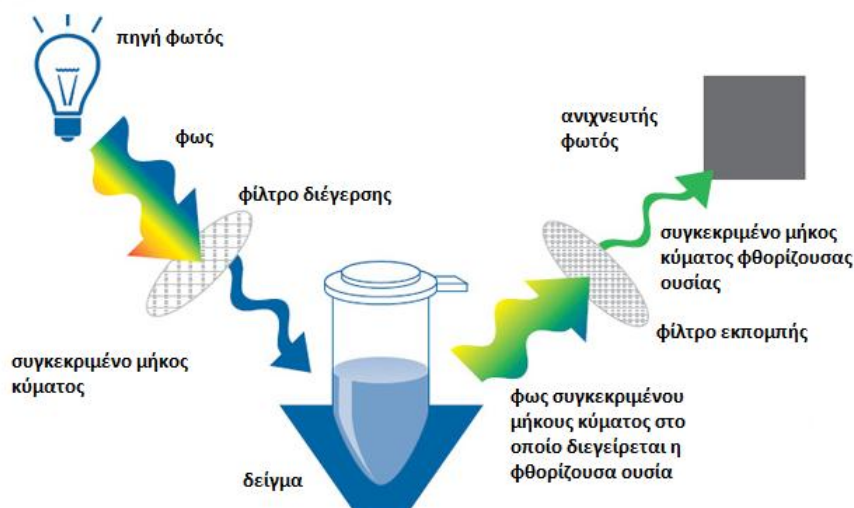
7. Γίνεται φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C .

2.12 Ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης qRT-PCR και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR

Αρχή της μεθόδου (Principles of qPCR, Finnzymes, Espoo, Finland)

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 ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR, γίνεται ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. 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 δυνατό 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 επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η βασική αρχή λειτουργίας ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου συνοψίζεται στο Σχήμα 2.12.1. 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 ανακλώμενο φως διέγερσης περνά από φίλτρο πριν

την ανίχνευση και μόνο τα επιλεγμένα μήκη κύματος φθορισμού επιτρέπεται να περάσουν στον ανιχνευτή.

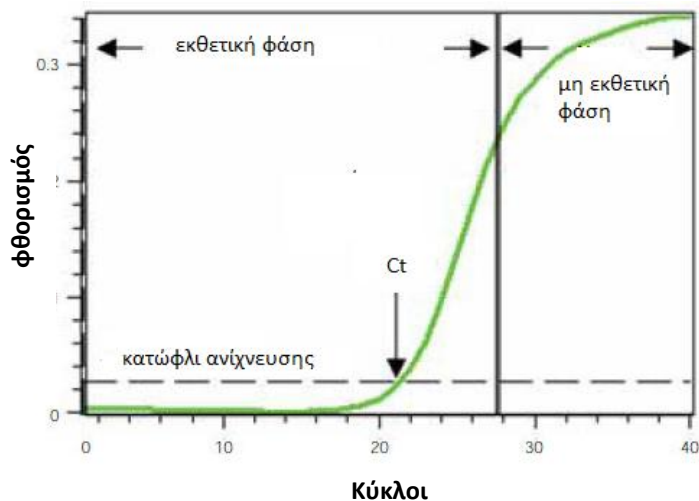


Σχήμα 2.12.1. Βασική αρχή ανίχνευσης φθορισμού σε όργανο PCR πραγματικού χρόνου.

Βασικές έννοιες

Στην αρχή της αντίδρασης το σήμα του 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 qRT-PCR αντίδρασης είναι πολύ υψηλή (προσεγγίζει το 100%) και παραμένει σταθερή καθόλη 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 πλατώ, τα επίπεδα του σήματος μειώνονται, οπότε και η ένταση του φθορισμού δεν συσχετίζεται με τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού υποστρώματος DNA. Η ουδός κύκλου Ct (**threshold cycle**) είναι μια παράμετρος που χρησιμοποιείται

στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR και αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων που χρειάζονται για να επιτευχθεί ένα ανιχνεύσιμο επίπεδο φθορισμού μεγαλύτερο εκείνου του αρχικού υποστρώματος.



Σχήμα 2.12.2. Το κατώφλι ανίχνευσης ορίζεται πάνω από τον ενδογενή φθορισμό των αντιδρώντων μορίων και ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται μέχρι την ούδο κύκλου είναι η παράμετρος Ct. Απεικονίζονται η εκθετική φάση και το πλατώ της αντίδρασης.

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.

2.12.1 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 qRT-PCR γίνεται είτε:

α. με την ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας που δεσμεύεται μη ειδικά σε δίκλιωνα μόρια DNA,

β. είτε με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

α. Ανίχνευση μέσω μη ειδικής δέσμευσης φθορίζουσας ουσίας σε δίκλιωνα μόρια DNA

Σε αυτή την περίπτωση η ανίχνευση γίνεται με χρήση φθορίζουσών ουσιών οι οποίες προσδένονται χωρίς διάκριση σε δίκλιωνα μόρια DNA. Αποτελεί τη απλούστερη και οικονομικότερη προσέγγιση της μεθόδου ενώ ταυτόχρονα δεν χρειαζόμαστε συγκεκριμένες πληροφορίες για την αλληλουχία στόχο. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μεθόδου καθορίζεται από τον σχεδιασμό των εκκινητών.

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

Ένα από τα πιο συνηθισμένα είδη φθορίζουσών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αυτή είναι το SYBR® Green I. Το πλεονέκτημα του SYBR® Green είναι η απλότητά του. Η δράση του είναι παρόμοια με εκείνη του βρωμιούχου αιθιδίου, αλλά αντίθετα με αυτό, το SYBR® Green δεν παρεμποδίζει τις DNA πολυμεράσες, οπότε μπορεί να προστεθεί απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης PCR.

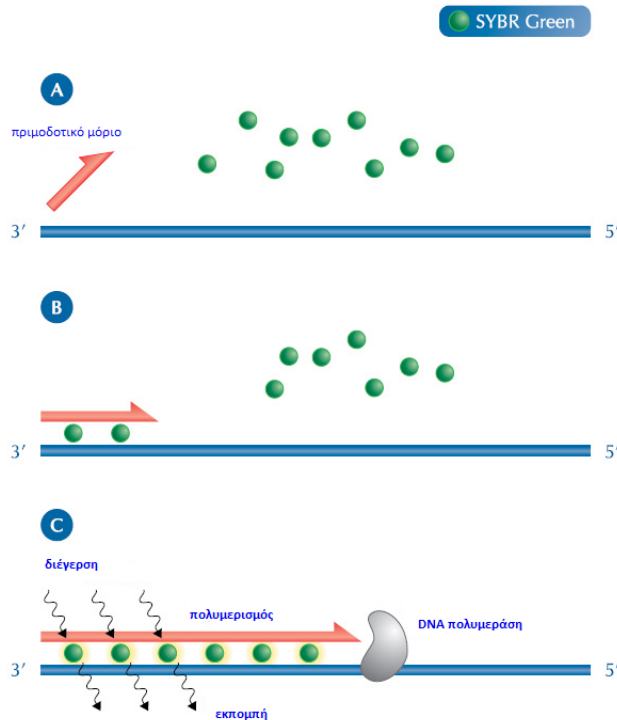
Το SYBR® Green επίσης έχει χαμηλότερο background φθορισμού από ότι το βρωμιούχο αιθίδιο, μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλότερες συγκεντρώσεις δίκλιωνου DNA, και δεν είναι τοξικό.

Άλλα πλεονεκτήματα της χρωστικής αυτής είναι:

- ο απλός σχεδιασμός
- η ικανότητα να ελέγχουμε πολλά γονίδια γρήγορα
- το χαμηλότερο κόστος (οι ιχνηθέτες κοστίζουν πολύ περισσότερο)

- η δυνατότητα ανάλυσης καμπύλης τήξης (melting curve) η οποία μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την εξειδίκευση της αντίδρασης πολλαπλασιασμού.

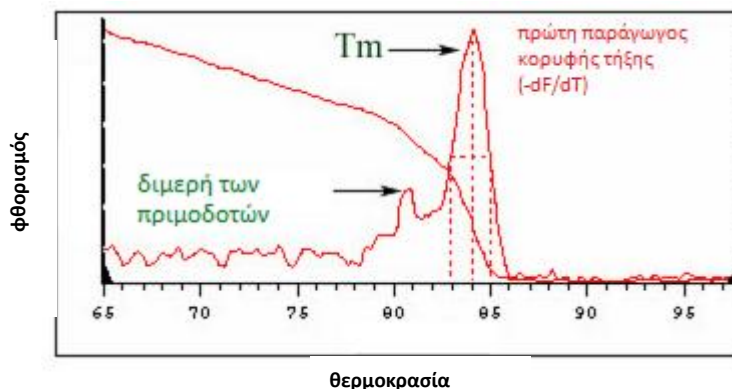
Στο σχήμα που ακολουθεί συνοψίζεται ο τρόπος δράσης του SYBR® Green.



Σχήμα 2.12.1.1. Τρόπος δράσης του SYBR® Green. A) γίνεται η μετουσίωση του DNA και τα μόρια του SYBR® Green είναι ελεύθερα στο μίγμα της αντίδρασης, B) γίνεται υβριδοποίηση των εκκινητών και τα μόρια του SYBR® Green δεσμεύονται στο δίκλωνο DNA, C) γίνεται επιμήκυνση του εκμαγείου με τη δράση της DNA πολυμεράσης και περισσότερα μόρια SYBR® Green δεσμεύονται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο προϊόν, οδηγώντας στην εκθετική αύξηση των επιπέδων φθορισμού.

Το βασικότερο μειονέκτημα στη χρήση φθοριζουσών ουσιών μη ειδικής δέσμησης σε δίκλινα μόρια DNA είναι το γεγονός ότι μπορούν να εκπέμπουν παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου DNA ακόμα και ανεπιθύμητων προϊόντων ή διμερών των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η σύνθεση και ανίχνευση των συγκεκριμένων προϊόντων στόχων και κατά συνέπεια αλλοιώνεται η πρότυπη καμπύλη. Στις αντιδράσεις λοιπόν όπου γίνεται χρήση της χρωστικής SYBR® Green είναι απαραίτητη η ανάλυση της καμπύλης-τήξης (**melting curve analysis**). Η ανάλυση καμπύλης-τήξης γίνεται μετά το τέλος του πολλαπλασιασμού, και επιτρέπει να διακριθούν

τα προϊόντα της αντίδρασης και να αναλυθεί η εξειδίκευσή της, χωρίς να χρειαστεί ανάλυση των προϊόντων σε πηκτώματα αγαρόζης. Η αρχή της ανάλυσης αυτής είναι ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από μια χαμηλή τιμή (όπου όλες οι αλληλουχίες είναι υβριδοποιημένες) σε υψηλή, προκαλώντας διαχωρισμό των αλυσίδων. Καθώς το DNA αποδιατάσσεται, το SYBR Green απελευθερώνεται και παρατηρείται μείωση στον φθορισμό. Δύο παράγοντες είναι σημαντικοί στη θερμοκρασία τήξης: το μέγεθος του δίκλωνου DNA και το περιεχόμενο σε κατάλοιπα GC. Όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο σε GC κατάλοιπα και όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος της αλυσίδας, τόσο υψηλότερη θα είναι και 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 ($-dF/dT$).

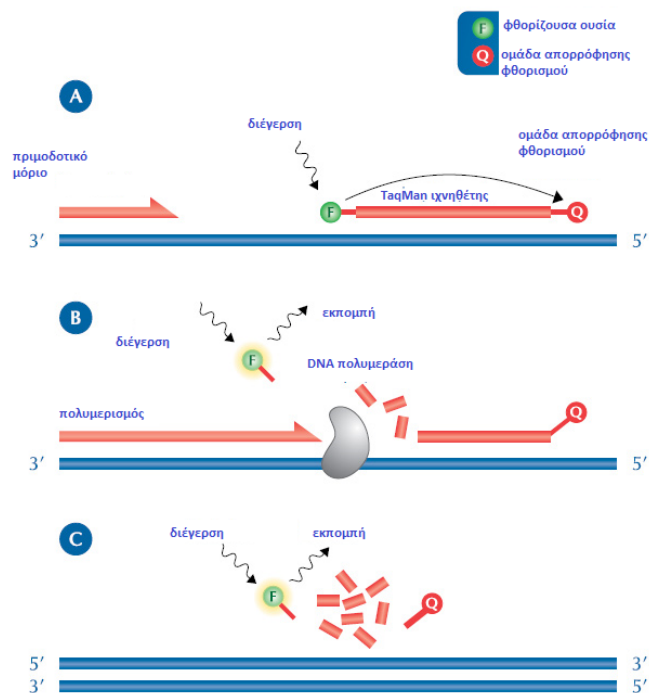


Σχήμα 2.12.1.2. Καμπύλη τήξης στην οποία φαίνεται η τιμή τήξης T_m ενός συγκεκριμένου προϊόντος ενίσχυσης καθώς και μια κορυφή που αντιστοιχεί στα διμερή των πριμοδοτών και η οποία μπορεί να εμποδίσει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση.

β. Ανίχνευση με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών οι οποίοι υβριδοποιούνται με μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

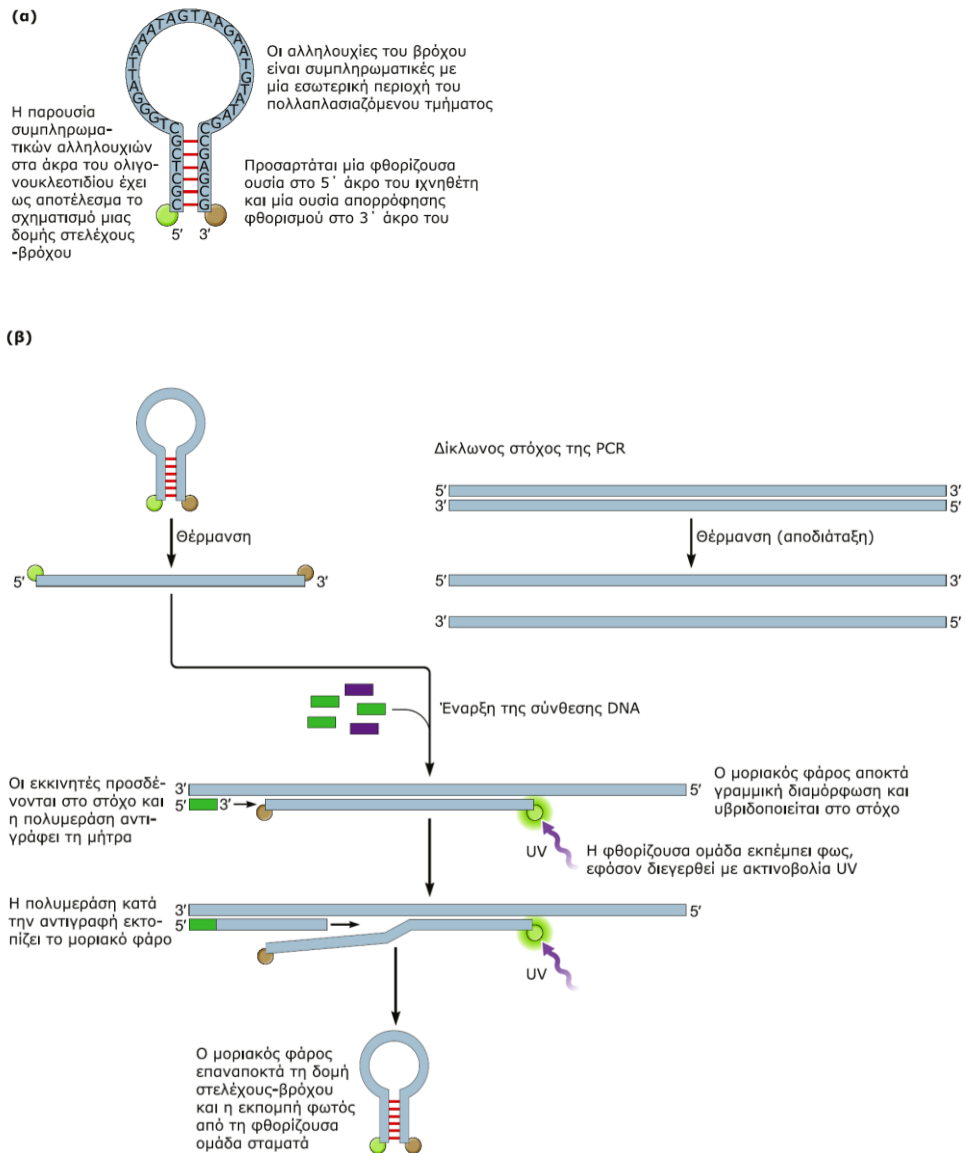
Στις τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται ιχνηθέτες ολιγονουκλεοτιδίων που φέρουν φθορίζουσες ετικέτες και έχουν σχεδιαστεί για να υβριδίζουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι υδρολύομενοι ιχνηθέτες ή αλλιώς TaqMan® ιχνηθέτες καθώς και εκείνοι δομής φουρκέτας, με τους μοριακούς φάρους να είναι και οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι.

Στην τεχνολογία των TaqMan® ιχνηθετών φθορίζουσα ουσία τοποθετείται στο 5' άκρο του ιχνηθέτη, ενώ στο 3' άκρο τοποθετείται ομάδα απορρόφησης φθορισμού, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο οι δυο χρωστικές ζευγάρι δότη-δέκτη. Αναλυτικά ο τρόπος δράσης τους φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 2.12.1.3. Τρόπος δράσης των TaqMan® ιχνηθετών.

A) Εκκινητές και ιχνηθέτης υβριδίζουν στην αλληλουχία στόχο. Η φθορίζουσα ουσία διεγείρεται και περνά την ενέργειά της στην ομάδα απορρόφησης φθορισμού με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται φθορισμός. B) Η DNA πολυμεράση δρώντας συναντά τον ιχνηθέτη ο οποίος και υδρολύεται στο 5' άκρο απελευθερώνοντας τη φθορίζουσα ουσία. Η εκπομπή της φθορίζουσας ουσίας δεν περιορίζεται πλέον από τη δράση της ομάδας απορρόφησης φθορισμού και μπορεί να ανιχνευτεί αύξηση του φθορισμού. C) Η DNA πολυμεράση υδρολύει όλη την ποσότητα του ιχνηθέτη και ολοκληρώνεται η επιμήκυνση της αλυσίδας. Τα επίπεδα φθορισμού είναι ανάλογα της ποσότητας των ενισχυόμενων αλληλουχιών στόχων.



Σχήμα 2.12.1.4. (α) Τυπική δομή μοριακού φάρου (molecular beacon) **(β)** Εκκινητές και ιχνηθέτης με γραμμική πλέον διαμόρφωση υβριδίζουν στην αλληλουχία στόχο. Η γραμμική πλέον διαμόρφωση του ιχνηθέτη έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φθορίζουσας ένωσης από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται αύξηση του φθορισμού. Η πολυμεράση κατά την αντιγραφή εκτοπίζει το μοριακό φάρο, με αποτέλεσμα κατά το πέρας της αντίδρασης ο εκτοπισμένος μοριακός φάρος να επαναποκτά την αρχική του δομή στελέχους-βρόγχου και να παύει η εκπομπή από τη φθορίζουσα ουσία.

Στην τεχνολογία με χρήση ιχνηθετών δομής φουρκέτας, πιο διαδεδομένοι είναι οι μοριακοί φάροι (molecular beacons). Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια που σχηματίζουν δομές στελέχους-βρόγχου ένεκα του ότι οι αλληλουχίες στα άκρα του νουκλεοτιδίου είναι συμπληρωματικές, ενώ οι αλληλουχίες του βρόγχου είναι

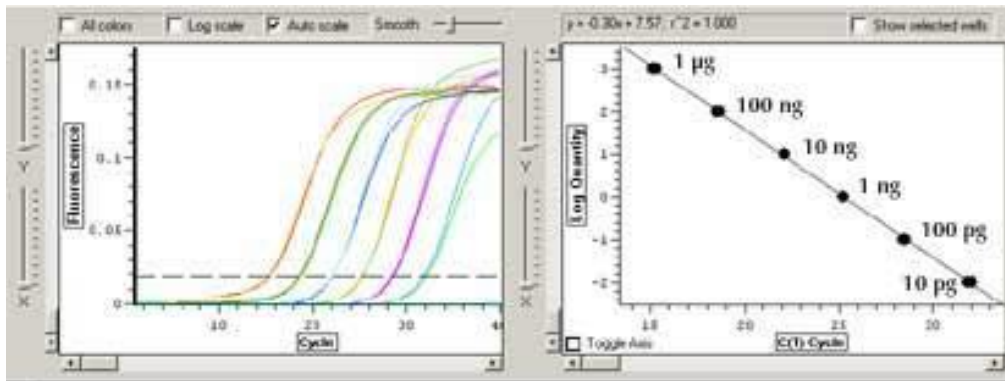
συμπληρωματικές με μια περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Στο 5' άκρο τοποθετείται φθορίζουσα ουσία, ενώ στο 3' άκρο ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Η δομή βρόγχου διατηρεί σε κοντική απόσταση την φθορίζουσα ουσία και την ομάδα απορρόφησης φθορισμού, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να σβένεται με μεταφορά ενέργειας από τη μια ομάδα στην άλλη. Η δομή αλλά και ο τρόπος δράσης των μοριακών φάρων αναλύεται στο Σχήμα 2.12.1.4.

2.12.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Υπάρχουν δυο στρατηγικές για την ανάλυση των αποτελεσμάτων από αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου: 1. απόλυτη ποσοτικοποίηση και 2. σχετική ποσοτικοποίηση.

Μέθοδος απόλυτης ποσοτικοποίησης

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων ή της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Διαδοχικές αραιώσεις δείγματος γνωστής ποσότητας (που μπορεί να είναι ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA, γονιδιωματικό DNA, προϊόν PCR ή και cDNA που να περιέχει το γονίδιο στόχο) συσχετίζονται γραμμικά με τις τιμές Ct. Έτσι, είναι δυνατός 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.



Σχήμα 2.12.2.1. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης.

Απόδοση της ενίσχυσης (amplification efficiency)

Η απόδοση μιας αντίδρασης qRT-PCR 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 y άξονα έχουμε την τιμή Ct και στον x άξονα την τιμή $\log(\text{ng DNA/cDNA/copies κλπ})$ έχουμε:

$$\text{Απόδοση PCR (E)} = [(10^{-1/\text{κλίση}}) - 1] \times 100\%$$

Μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης

Στη μέθοδο αυτή 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 απαραίτητη είναι 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 συνηθέστερα χρησιμοποιούνται γονίδια κυτταρικής οικονομίας (**housekeeping genes**) όπως για παράδειγμα τα γονίδια των: GAPDH, 18S ή 16S rRNA, β -ακτίνης, γυράσης κ.ά. Πρέπει κανείς να λαμβάνει υπόψη ότι η έκφραση ακόμα και των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας ποικίλλει σε κάποιο βαθμό και γι' αυτό προτείνεται η εξέταση της σταθερότητας της έκφρασης διαφόρων γονιδίων για κάθε πείραμα.

Πειραματική πορεία

Μετά την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα του στελέχους *S. cerevisiae* που καλλιεργήθηκαν με μοναδικές πηγές άνθρακα φαινανθρένιο, γλυκόζη, γλυκόζη και φαινανθρένιο και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης όπως αναφέρεται αναλυτικά στην § 2.8.1 και την σύνθεση cDNA (§ 2.11.1) ακολούθησε η ποσοτική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου qRT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων.

Έτσι λοιπόν η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σε πλακέτες με 96 πηγαδάκια (MJ Research) και σε όργανο DNA Engine Opticon™ System (MJ Research). Σαν χρωστική χρησιμοποιήθηκε το KAPA™ SYBR® FAST qPCR kit Master Mix (2X) Universal, που έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται σε δίκλινα μόρια DNA. Μια τυπική σύσταση της αντίδρασης σε τελικό όγκο 20 μ l περιέχει 19 μ l SYBR Green Master mix το οποίο περιέχει και τη DNA πολυμεράση KAPA SYBR™, 200 nM από τον κάθε εκκινητή και τέλος 1 μ l 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 ακόλουθο:

- Μετουσίωση για 3 min στους 95 °C, ακολουθούμενη από 40 κύκλους με τα εξής στάδια:
 - ✓ 10 sec στους 95 °C
 - ✓ 20 sec στους 58 °C
 - ✓ 30 sec στους 72 °C
 - ✓ ανάγνωση πλακέτας
- τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο στους 72 °C
- καμπύλη τήξης από 50 °C έως 90 °C, ανάγνωση κάθε 0.2 °C για 2 sec
- επώαση στους 4 °C

Για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια και επαναληψιμότητα της qRT-PCR το κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν. Έλεγχος για τυχόν μολύνσεις πραγματοποιήθηκε με μια αντίδραση χωρίς εκμαγείο για κάθε χρησιμοποιούμενο ζευγάρι εκκινητών. Ως γονίδια αναφοράς εξετάστηκαν ως προς τη σταθερότητα της έκφρασής τους στις εξεταζόμενες συνθήκες τα γονίδια 16S rRNA και το γονίδιο της γυράσης β (*gyrβ*).

Επιλέχθηκε το γονίδιο της γυράσης β (*gyrβ*), λόγω της σταθερότητας έκφρασης που εμφάνισε στις εξεταζόμενες συνθήκες. Η ποσότητα σε mRNA κάθε αγνώστου δείγματος κανονικοποιήθηκε με το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς. Πρότυπες καμπύλες σχεδιάστηκαν με κάθε χρησιμοποιούμενο ζευγάρι εκκινητών χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 10, 5, 1, 0.5, 0.2, και 0.1 ng ολικού RNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη και αποτελούν τον βαθμονομητή (Johnson *et al.*, 2000). Οι αποδόσεις των αντιδράσεων προσδιορίστηκαν από τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών (Corbella and Puyet, 2003; Pfaffl, 2001). Τα αποτελέσματα της qRT-PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με δείγμα βαθμονομητή (ανάπτυξη παρουσία γλυκόζης) και η ποσότητά τους υπολογίστηκε σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς (*gyrβ*). Έτσι λοιπόν, τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ο λόγος της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς τον βαθμονομητή διαιρούμενο με το λόγο της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς (Applied biosystems manual, 1997).

2.13 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αρχή της μεθόδου

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στις κλωνοποιήσεις DNA είναι βακτηριακά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6), και διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων του DNA που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, με τις αποστάσεις προτύπων ζωνών DNA γνωστού μεγέθους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις παρασκευαστικές εταιρείες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg DNA του φάγου λ σε 1 ώρα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου (Sambrook *et al.*, 1989).

2.13.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook *et al.*, 2001)

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20 μl, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι όπου τοποθετούνται τα εξής:

1. Κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (ds H₂O), για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.
2. Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης.
3. Ορισμένη ποσότητα DNA (0.5-1.0 μg).
4. 1 μl περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 U/ μl).

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 30° C ή στους 37° C (ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου) για 1-2 ώρες. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Ορισμένα περιοριστικά ένζυμα απενεργοποιούνται με επώαση στους 65° C. Σε περίπτωση μερικής πέψης οι παραπάνω συνθήκες της αντίδρασης τροποποιούνται: ο χρόνος της αντίδρασης μειώνεται σε 1-15 min και η συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου είναι από 10 έως 100 φορές μικρότερη.

2.14 Ηλεκτροφόρηση του DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA στο πήγμα αγαρόζης είναι οι εξής:

Το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήγμα αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογάριθμου 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.

Η τάση πεδίου. Ο καλύτερος διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.

Η διαμόρφωση του DNA. Τα μόρια του DNA μπορούν να έχουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις:

α) Κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιϊκό DNA)

β) Κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια τα οποία έχουν

εγκοπές στη μία αλυσίδα)

γ) Ευθύγραμμο μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια DNA τα οποία έχουν υποστεί πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης, έχουν διαφορετική κινητικότητα. Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: μόριο ανοιχτού κύκλου, ευθύγραμμο μόριο και μόριο κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου (Grinsted and Benett, 1988).

Πειραματική πορεία

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0.7- 2 g αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηγματος). Στην φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος ΤΑΕ και τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη.
2. Όταν η θερμοκρασία της παραπάνω φιάλης μειωθεί τους 50° C, προστίθεται ο κατάλληλος όγκος βρωμιούχου αιθιδίου, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του στο διάλυμα να είναι 0.5 µg/ml.
3. Το παραπάνω μίγμα αποχώνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει οπότε αφαιρείται το κτένι για τη δημιουργία των φρεατίων.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προστίθεται ο κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (G.L.B) σε αναλογία 5:1 αντίστοιχα. Το διάλυμα G.L.B. περιέχει γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα να μην διαχέεται και να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου. Επίσης το διάλυμα αυτό περιέχει δύο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές των οποίων η μετακίνηση στο πηγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική για το τέλος της ηλεκτροφόρησης.
5. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια του πηγματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πηγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA-

βρωμιούχου αιθιδίου τα οποία εμφανίζονται σαν ζώνες ρόδινου χρώματος. Η φωτογράφιση του πηγματος γίνεται με συσκευή Kodak.

Διαλύματα

Διάλυμα ΤΑΕ (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: 0.25% κυανό της βρωμοφαινόλης
0.25% κυανολικό ξυλένιο
30% γλυκερόλη

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.

2.15 Απομόνωση DNA από πηγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey - Nagel (Γερμανίας)

1. Η ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το πηγμα αγαρόζης, ζυγίζεται (1 g = 1 ml) και τοποθετείται σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα
2. Για κάθε 100mg αγαρόζης προστίθενται 200 μl διάλυμα NT.
3. Το δείγμα επωάζεται στους 50° C μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μείγμα ενώ αναδεύεται ανά 2-3 min
4. Το μείγμα τοποθετείται σε στήλη Nucleospin Extract II και φυγοκεντρείται για 1 min σε 11000 g. Το υπερκείμενο αποχύνεται
5. Προστίθενται 600 μl διάλυμα NT3, φυγοκέντρωση για 1 min σε 11000 g και γίνεται απόχυση του υπερκείμενου
6. Φυγοκέντρωση για 2 min σε 11000 g για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη

7. Προσθήκη 15-50 μl διάλυμα NE, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και τέλος φυγοκέντρηση για 1 min σε 11000 g.

2.16 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Sambrook *et al.*, 2001)

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA πρέπει να ικανοποιούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- α) Να φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο διευκολύνει την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων (συνήθως κωδικεύει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).
- β) Να μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους (μετασηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).
- γ) Να είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες.
- δ) Να περιέχουν ένα μεγάλο εύρος μονών θέσεων περιορισμού, οι οποίες αναγνωρίζονται από διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτές οι θέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση διαφόρων μορίων DNA.

Μερικές από τις θέσεις αυτές πρέπει να βρίσκονται εντός των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικεύουν ενζυμικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (γονίδια αναφοράς). Ένα κοινό τέτοιο σύστημα αποτελεί τμήμα του οπερονίου της λακτόζης. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον προαγωγό του οπερονίου και τμήμα του γονιδίου *lacZa*, το οποίο κωδικεύει ένα πεπτίδιο του αμινο-τελικού άκρου 146 αμινοξέων του ενζύμου β-γαλακτοζιτάση. Ως κύτταρα δέκτες χρησιμοποιούνται στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που περιέχουν το λειτουργικό τμήμα του γονιδίου *lacZ* που κωδικεύει την περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου. Τα δύο αυτά ατελή πολυπεπτιδικά μόρια της β-γαλακτοζιτάσης που παράγονται από την έκφραση των αντίστοιχων αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του χρωμοσώματος του ξενιστή, μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται και να προκύπτει η λειτουργική πρωτεΐνη (α-συμπλήρωση) (Ullmann *et al.*, 1967). Εντός της αλληλουχίας του αμινοτελικού τμήματος του γονιδίου *lacZa* του πλασμιδίου έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα μια περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης και καλείται πολυσυνδέτης (multilinker). Ο πολυσυνδέτης δεν

επιρεάζει την ικανότητα του αμινοτελικού πεπτιδίου να συμπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* ως προς τη δραστικότητα της β -γαλακτοζιτάσης. Εισαγωγή ενός ξένου τμήματος DNA σε αυτή την περιοχή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του μηνύματος για την παραγωγή του συμπληρωματικού πεπτιδίου του αμινοτελικού άκρου της β -γαλακτοζιτάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β -γαλακτοζιτάσης και επομένως η διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδίων γίνεται με τη χρησιμοποίηση δύο ουσιών, της X-gal και του ισοπροπυλοθειο- β -D-γαλακτοζιτη (IPTG). Η πρώτη αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β -γαλακτοζιτάσης, η διάσπαση του οποίου δίνει μπλε χρώμα στις αποικίες. Η δεύτερη δρα ως επαγωγός της μεταγραφής του γονιδίου *lacZ*. Έτσι, οι βακτηριακές αποικίες που περιέχουν ανασυνδυασμένα ή μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια διακρίνονται εύκολα σε στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής, ως λευκές ή μπλε αποικίες αντίστοιχα.

ε) Να διατηρούνται σταθερά μέσα στα κύτταρα ξενιστές. Τα πλασμίδια πρέπει να φέρουν κατάλληλη περιοχή έναρξης αντιγραφής (replicon), την οποία να αναγνωρίζει το σύστημα αντιγραφής των κυττάρων ξενιστών τα οποία χρησιμοποιούνται.

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Στάδιο πρώτο

Γίνεται πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί υπόκεινται σε μονή πέψη (πέψη με μία περιοριστική ενδονουκλεάση), πρέπει να γίνεται κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση ώστε να αποφεύγεται η επανακυκλοποίησή του. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδιακού φορέα, αποφωσφορυλιώντας τα 5'-P άκρα του. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί υπόκεινται σε διπλή πέψη (πέψη με δύο περιοριστικές

ενδονουκλεάσες), κατά κανόνα δεν χρειάζεται η κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση γιατί δεν υπάρχει κίνδυνος επανακυκλοποίησής του.

Η επίδραση με αλκαλική φωσφατάση γίνεται ως εξής:

1. Μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA γίνεται καταβύθιση του και επαναιώρηση του σε 100 μl Tris pH=7.5. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 11 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl αλκαλικής φωσφατάσης.
2. Το διάλυμα επωάζεται στους 37° C για μία ώρα.
3. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται δύο όγκοι φαινόλης:χλωροφορμίου (1:1 v/v), για την απομάκρυνση της αλκαλικής φωσφατάσης. Το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Η πάνω φάση (υδατική), μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και προστίθενται 2 όγκοι ψυχρής αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους -80° C για 30 λεπτά.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 0° C.

Το ίζημα εκπλένεται με 200 μl αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται όπως στο προηγούμενο βήμα.

7. Γίνεται ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρηση του σε 10 μl ds H₂O.

Αν η πέψη του πλασμιδιακού φορέα ή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί δημιουργεί απότομα άκρα τότε η κλωνοποίηση δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο στην περίπτωση των κολλωδών άκρων. Σε περίπτωση που η πέψη του ενός τμήματος DNA δημιουργεί απότομα άκρα και του άλλου κολλώδη, μπορούν να δημιουργηθούν απότομα άκρα στο τμήμα του DNA που έχει κολλώδη άκρα χρησιμοποιώντας την T₄ DNA πολυμεράση. Η T₄ DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για να γεμίσει τα 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα με σημασμένα ή μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs).

Το γέμισμα με T₄ DNA πολυμεράση ακολουθεί την εξής διαδικασία:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται τα εξής:
 - α) Το γραμμικό DNA το οποίο είναι επαναιωρημένο σε 35 μl ds H₂O.
 - β) 5 μl BSA.

- γ) 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της T₄ DNA πολυμεράσης.
 - δ) 1 μl από κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs συγκέντρωσης 10 mM.
 - ε) 1 μl DNA T₄ DNA πολυμεράση.
2. Το παραπάνω μίγμα τοποθετείται στους 37° C για μία ώρα.
 3. Η αντίδραση της πολυμεράσης σταματάει με την προσθήκη 1 μl EDTA 0.5 M και 50 μl TE.
 4. Γίνεται καταβύθιση του DNA και έκπλυσή του με 70% αιθανόλη.
 5. Το DNA επαναιωρείται σε 15 μl ds H₂O.

Στάδιο δεύτερο

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνδεση (ligation) των δύο ευθυγράμμων μορίων με την επίδραση της λιγάσης. Αυτό το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5' και 3' φωσφορικά άκρα του τμήματος στόχου και του φορέα.

Η αντίδραση της λιγάσης γίνεται ως εξής:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθενται τα εξής:
 - α) 6-8 μl (0.2 μg) ευθύγραμμου πλασμιδιακού φορέα.
 - β) 6-8 μl (0.8 μg) ευθύγραμμου DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα.
 - γ) 2 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης.
 - δ) 1-2 μl T₄ DNA λιγάση (10 U/μl).
 - ε) Ο απαιτούμενος όγκος ds H₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 20 μl.
2. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται στους 16° C για την περίπτωση κολλωδών άκρων ή στους 25° C για την περίπτωση απότομων άκρων για τη διάρκεια τουλάχιστον 18 ωρών.

Στάδιο τρίτο

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στην παρούσα εργασία η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έγινε με την

ανίχνευση της δραστικότητας του ενζύμου β -γαλακτοζιτάσης απουσία του οποίου οι μετασυσζευγμένες αποικίες παραμένουν λευκές.

1. Ετοιμάζεται στερεό θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Επιστρώνεται όλη η επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου με 40 μ l διαλύματος X-gal και 4 μ l διαλύματος IPTG/τροβλίο.
3. Τα τροβλία τοποθετούνται στους 37° C για μία ώρα ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.
4. Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων του βακτηρίου *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εμβολιασμός τους στα τροβλία με το θρεπτικό μέσο επιλογής από κατάλληλη αραιώση ώστε να προκύψουν 150-200 αποικίες ανά τροβλίο. Τα τροβλία επωάζονται στους 37° C για μία νύχτα.
5. Την επομένη τα τροβλία μεταφέρονται στους 4° C για 3-4 ώρες, ώστε να γίνει πιο έντονο το μπλε χρώμα των μη ανασυνδυασμένων αποικιών.
6. Στη συνέχεια επιλέγονται οι λευκές αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ελέγχονται με απομόνωση και ανάλυση του περιέχοντος πλασμιδιακού DNA.

Διαλύματα

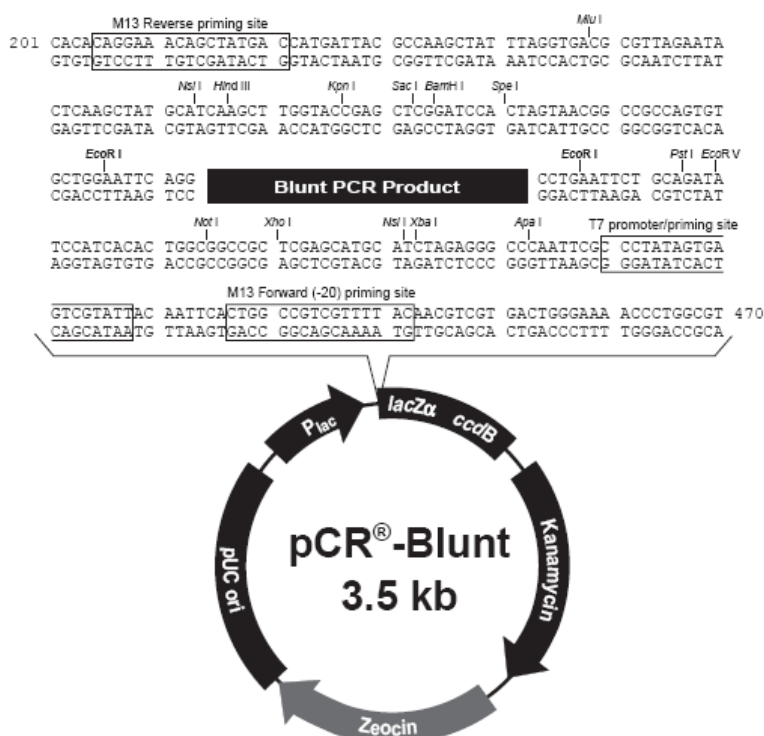
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside): 20 mg/ml σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινά φιαλίδια στους -20° C.
IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside): 200 mg/ml σε dsH₂O, το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μ m και φυλάσσεται στους -20°C.

2.16.1 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Zero Blunt® pCR Cloning kit της Invitrogen

Ο φορέας pCR®-Blunt είναι ένας φορέας μεγέθους 3.5 kb (Σχήμα 2.16.1.1) που επιτρέπει την απευθείας επιλογή ανασυνδυασμένων κυττάρων μέσω διακοπής της έκφρασης του θανατηφόρου γονιδίου *ccdB*. Το προϊόν του *ccdB* εκφράζεται ως υβριδική πρωτεΐνη με το τμήμα *LacZa* του πεπτιδίου του *LacZ*. Αυτό έγινε για να αξιοποιηθεί η αποδεδειγμένη τεχνική της διακοπής έκφρασης του γονιδίου *LacZ*

και για να συμπεριληφθούν οι θέσεις universal των εκκινήτων M13 (forward και reverse).

Ο ανασυνδυασμένος φορέας εισάγεται και αντιγράφεται σε στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* που δεν περιέχει τον καταστολέα lac (π.χ. *lacI^q*) και επομένως επιτρέπει την συνεχή έκφραση του γονιδίου *lac*. Θετικοί κλώνοι επιλέγονται απευθείας χωρίς χρήση X-Gal και IPTG.



Σχήμα 2.16.1.1: Γονιδιακός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR®-blunt για κλωνοποίηση προϊόντων PCR με απότομα άκρα.

Διαδικασία κλωνοποίησης στο φορέα pCR® Blunt

Οι συνθήκες της αντίδρασης της ligation είναι οι εξής:

Γραμμικός φορέας pCR® Blunt (25 ng)	1 μl
Προϊόν PCR με απότομα άκρα (Expand polymerase)	1-5* μl
10X Διάλυμα Ligation	1 μl
Αποστειρωμένο νερό	τελικός όγκος 10 μl
<u>T4 DNA λιγάση (4.0 Units/ml)</u>	<u>1 μl</u>
Τελικός όγκος	10 μl

* προσθήκη προϊόντος PCR παραπάνω από 5 μl επηρεάζει την αντίδραση ligation εξαιτίας των

αλάτων της αντίδρασης PCR.

Ακολουθεί επώαση στους 16° C για 1 h ή O/N.

Το μίγμα φυγοκεντρείται ήπια και τοποθετείται στον πάγο έως ότου προετοιμαστούν τα επιλεκτικά κύτταρα ή στους -20° C για παραπέρα χρήση.

Η επιλογή γίνεται κατευθείαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB και Km (50 μg/ml).

2.17 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσληψη πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, τα οποία έχουν καταστεί επιλεκτικά μετά από επίδραση με ιόντα ασβεστίου.

2.17.1 Μέθοδος Kushner *et al.*, 1978

Πειραματική πορεία

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* στέλεχος DH5a, σε 20 ml Luria Broth, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.): 0.1-0.2 στα 600 nm.
2. 1.5 ml καλλιέργειας τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος πλύσεως (Δ1) και φυγοκέντρησή τους στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2) και επωάζεται για 30 λεπτά σε μίγμα νερού-πάγου (0° C).
5. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2).
7. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 3 μl DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο),

- γίνεται ήπια ανάδευση και ακολουθεί η προσθήκη 3-15 μl πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
8. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε μίγμα νερού-πάγου (0°C) για 30 λεπτά.
 9. Ακολουθεί θερμικό πλήγμα με τοποθέτηση του μικροφυγοκεντρικού σωληναρίου σε υδατόλουτρο των 43.5°C για ένα λεπτό.
 10. Το κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάζεται σε 3 ml L.B. και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για μία ώρα, για την ανάρρωση των κυττάρων και την αντιγραφή και έκφραση του πλασμιδιακού DNA.
 11. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα υπόλοιπα 2.8 ml της καλλιέργειας, φυγοκεντρώνονται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2 ml Luria Broth και εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Διαλύματα

Διάλυμα πλύσεως ($\Delta 1$)

10 mM RbCl, 10mM MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) pH= 7.0

Διάλυμα ασβεστίου ($\Delta 2$)

10 mM RbCl, 100 mM MOPS pH= 6.5, 50 mM CaCl_2

Τα διαλύματα 1 και 2 αποστειρώνονται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm .

2.17.2 Μέθοδος Chung and Miller, 1988

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* στέλεχος BL21(DE3), σε 20 ml Luria Broth, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.): 0.3-0.6 στα 600nm.
2. 1.0 ml από την παραπάνω καλλιέργεια τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 1 min.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης απορρίπτεται και ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 μl διαλύματος TSB.

4. Επώαση για 10 min σε μίγμα νερού-πάγου (0° C).
5. Προστίθεται πλασμιδιακό DNA.
6. Επώαση για 5-30 min σε μίγμα νερού-πάγου (0° C).
7. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 900 μl TSB + 20 mM glucose.
8. Ακολουθεί επώαση στους 37° C υπό ανάδευση για 1 h, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί ο χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
9. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Διαλύματα

TSB: Luria Broth pH 6.1
10% PEG 3.350
5% DMSO
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

2.17.3 Παρασκευή επιλεκτικών κυττάρων *E. coli* και μετασχηματισμός (Mandel and Higa, 1970)

1. Συλλογή 100 ml κυττάρων DH5α σε οπτική απορρόφηση O.D_(600 nm): 0.350.
2. Επώαση για 10 min σε πάγο.
3. Φυγοκέντρηση 10min/ 4° C/ 2.700 g και εν συνεχεία απόχυση του υπερκειμένου.
4. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 30 ml TB (Transformation Buffer), φυγοκέντρηση 10min/ 4° C/ 2.700 g και εν συνεχεία απόχυση του υπερκειμένου.
5. Ήπια επαναιώρηση σε 4 ml TB.

Τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε απευθείας για μετασχηματισμό ή

να αποθηκευτούν επί διάστημα ενός έως δύο μηνών στους -80°C ως εξής:

Προσθήκη 10-15% γλυκερόλης και μεταφορά 200 μl σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια.

Ο μετασχηματισμός με χρήση των ανωτέρω επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιείται με τη ακόλουθη διαδικασία:

1. Τα κύτταρα ξεπαγώνουν ήπια σε πάγο.
2. Προσθήκη πλασμιδιακού DNA και επώαση για 30 min σε πάγο.
3. Θερμικό σοκ για 45 sec στους 43.5°C .
4. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου Luria Broth (LB) σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και τα κύτταρα αφήνονται να αναρρώσουν για να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA για 30-45 min στους 37°C .
5. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

TB (Transformation buffer): 50 mM CaCl_2

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

2.18 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων *Arthrobacter phenanthrenivorans* και μετασχηματισμός με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (Zhang *et al.*, 2011).

A. Επιδεκτικά κύτταρα

i. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων με τη χρήση πενικιλίνης

1. Εμβολιασμός 0.1% από καλλιέργεια σε στατική φάση κυττάρων *A. phenanthrenivorans* χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 100 ml LB και ακολουθεί επώαση στους 30°C , υπό ανάδευση για 8-10 ώρες.
2. Όταν η καλλιέργεια φτάσει σε απορρόφηση $\text{O.D}_{(600\text{ nm})}$: 0.3-0.5, προστίθεται πενικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και αφήνονται για 1 ακόμα ώρα.
3. Με το πέρας της 1 ώρας η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο και επωάζεται για 10 min.
4. Φυγοκέντρωση 3.200 rpm/ 20 min/ 4°C .

5. Έκπλυση των κυττάρων με 5 ml παγωμένου διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (EB) και φυγοκέντρηση 3.200 rpm/ 20 min/ 4° C. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται **εις τριπλούν**.
6. Γίνεται x100 συμπύκνωση των κυττάρων με τελική επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (EB).
7. Ποσότητες 60 μl μοιράζονται σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -80° C για μελλοντική χρήση.

ii. Παρασκευή επιδεικτικών κυττάρων με τη χρήση λυσοζύμης

1. Εμβολιασμός 0.1% από καλλιέργεια σε στατική φάση κυττάρων *A. phenanthrenivorans* χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 100 ml LB και ακολουθεί επώαση στους 30° C, υπό ανάδευση για 8-10 ώρες.
2. Όταν η καλλιέργεια φτάσει σε απορρόφηση $O.D_{(600\text{ nm})}$: 0.3-0.5, τοποθετείται σε πάγο και επωάζεται για 10 min
3. Φυγοκέντρηση 3.200 rpm/ 20 min/ 4° C.
4. Γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (EB), το οποίο περιέχει λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 4 μg/ml και ακολουθεί επώαση του αιωρήματος στους 37° C για 30 min.
5. Φυγοκέντρηση 3.200 rpm/ 20 min/ 4° C.
6. Έκπλυση των κυττάρων με 5 ml παγωμένου διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (EB) και φυγοκέντρηση 3.200 rpm/ 20 min/ 4° C. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται **εις τριπλούν**.
7. Γίνεται x100 συμπύκνωση των κυττάρων με τελική επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (EB).
8. Ποσότητες 60 μl μοιράζονται σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -80° C για μελλοντική χρήση.

Διαλύματα

Πενικιλίνη G μέτα καλίου άλας: 30 mg/ml σε αιθανόλη

Διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης (EB): 10% γλυκερόλη

0.5M σορβιτόλη

B. Ηλεκτροδιάτρηση

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροδιάτρηση (**electroporation**) είναι μια διαδικασία κατά την οποία εφαρμόζοντας ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και η διαπερατότητα της μεμβράνης ενός κυττάρου αυξάνονται, αποσταθεροποιώντας παροδικά την μεμβράνη και σχηματίζοντας "μεμβρανικούς πόρους" οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να εισέλθει εντός του κυττάρου οποιοδήποτε πολικό μόριο, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες.

Πειραματική πορεία

1. Ξεπαγώνουμε ήπια σε πάγο ποσότητα 200 μl επιδεκτικών κυττάρων και ταυτόχρονα ψύχουμε κυψελίδες 0.2 cm.
2. Στο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι που περιέχει τα επιδεκτικά κύτταρα μεταφέρουμε ποσότητα 500 ng πλασμιδιακού DNA (*Η μέγιστη ποσότητα σε όγκο που μπορεί κανείς να προσθέσει είναι το 1/10 του όγκου των χρησιμοποιούμενων επιδεκτικών κυττάρων).
3. Ακολούθως τα επιδεκτικά κύτταρα με το πλασμιδιακό DNA μεταφέρονται σε κυψελίδα και τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης, στην οποία έχουν προηγουμένως ρυθμιστεί οι ακόλουθες παράμετροι: 3000V (15kV/cm), 25 μF, 400 Ω.
4. Μετά την διοχέτευση ηλεκτρικού παλμού προσθέτουμε γρήγορα σε κάθε κυψελίδα 800 μl διαλύματος ανάρρωσης πιπετάρουμε και μεταφέρουμε σε πλαστικό σωληνάκι καλλιέργειας των 10 ml.
5. Τα κύτταρα επωάζονται για 5 ώρες στους 30° C υπό ανάδευση, προκειμένου να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
6. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.2 ml καθώς και διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Διαλύματα

Διάλυμα ανάρρωσης: LB+ 0.5 M σορβιτόλη

*Χρησιμοποιούνται κυψελίδες 0.2 cm Bio-Rad Laboratories, CA, USA, οι οποίες προηγουμένως έχουν πλυθεί σχολαστικά με αιθανόλη και έχουν αποστειρωθεί με έκθεση σε UV ακτινοβολία για 5 min.

2.19 Μέτρηση φθορισμού

Η μέτρηση του φθορισμού των μετασυζευγμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο φθορισμόμετρο. Ο εκλυόμενος φθορισμός μετρήθηκε σε υγρή καλλιέργεια μετασυζευγμένων κυττάρων *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, με το πλασμίδιο pART2- gfp::Prca, πραγματοποιώντας διέγερση των κυττάρων στα 488nm και ανίχνευση της εκπομπής στα 511nm (Douka *et al.*, 2001).

Η πορεία που ακολουθήθηκε για τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό είναι η εξής:

1. 30ml καλλιέργειας κυττάρων που βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής φάσης, φυγοκεντρώνεται για 10 λεπτά στις 6000g στους 4°C.
2. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 30ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 10mM, pH 8.0 και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 6000g στους 4°C.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 3ml του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος. Από το εναιώρημα αυτό φυλάσσονται 100μl για ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και στο υπόλοιπο μετράται άμεσα ο φθορισμός.

2.20 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με χρήση του προγράμματος BLAST2 και σύνθεση εκκινητών

Η σύνθεση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις PCR έγινε από την εταιρεία VBC BIOTECH. Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA έγινε από την εταιρεία MacroGen στην Κορέα και MWG-Biotech στη

Γερμανία. Η αλληλουχία βάσεων DNA που προέκυψε, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Vector NTI, ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), καθώς και το Lalign (Huang and Miller, 1991). Η ανεύρεση τυχόν ομολογιών με γνωστές αλληλουχίες κατατεθειμένες σε τράπεζα δεδομένων (EMBL-Heidelberg), έγινε με το πρόγραμμα BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) της τράπεζας δεδομένων EMBL-Heidelberg όπως περιγράφεται από τους Ausubel *et al.* (1999). Η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη χρήση του προγράμματος MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνικών μορίων καθώς και η δημιουργία τρισδιάστατων πρωτεϊνικών μοντέλων έγινε με τη χρήση της πλατφόρμας Phyre 2 (Kelley and Sternberg, 2009), η δε πρόβλεψη πιθανών σημείων πρόσδεσης του υποστρώματος στα ένζυμα έγινε με το 3DLigandSite (Wass *et al.*, 2010).

2.21 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sph63 με μηχανική λύση

1. Καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους Sph63 συλλέγεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης (O.D: 0.3-0.5) και ακολουθεί φυγοκέντριση 6.000 rpm/20 min/4° C.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTT.
3. Το κυτταρικό αιώρημα τοποθετείται σε σωληνάρια τα οποία περιέχουν κατά τα 2/3 του όγκου τους σφαιρίδια ζirkονίου διαμέτρου 0.1 mm.
4. Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων σε σφαιρόμυλο για 10 min, με εναλλάξ 1 min θραύση και 1 min επώαση σε παγόλουτρο.
5. Φυγοκέντριση 12.000 rpm/20 min/4° C. Συλλογή υπερκλειμένου και προσθήκη 1 mM PMSF ως αναστολέα πρωτεασών.

2.22 Απομόνωση ακατέργαστου κυτταρικού εκχυλίσματος από κύτταρα του στελέχους *Arthrobacter phenanthrenivorans* Srhe3 με χημική λύση (Kim *et al.*, 2004, με μικρές τροποποιήσεις)

1. Καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους Srhe3 συλλέγεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης (O.D: 0.3-0.5) και ακολουθεί φυγοκέντριση 6.000 rpm/20 min/4° C.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.6 και η ποσότητα αυτή μοιράζεται σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια ώστε αυτά να περιέχουν 100 µl.
3. Σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι προστίθεται 1 ml Pre-lysis buffer και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37° C.
4. Φυγοκέντριση 12.000 rpm/ 2 min και απόχυση υπερκειμένου.
5. Έκπλυση των κυττάρων με 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.6 και ακολούθως φυγοκέντριση 12.000 rpm/ 2 min και απόχυση υπερκειμένου.
6. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml Lysis buffer και ακολουθεί βράσιμο των δειγμάτων στους 100° C για 15-20 min με ενδιάμεση έντονη ανάδευση (vortex).
7. Φυγοκέντριση 15.000 rpm/30 min/4° C.
8. Συλλογή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και προσθήκη 1 mM PMSF ως αναστολέα πρωτεασών.

Διαλύματα

Pre-lysis buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 7.6

0.03% PMSF

0.005% χλωραμφαινικόλη

18% σακχαρόζη

50 mg/ml λυσοζύμη

Lysis buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 7.6

0.3% SDS

60 mM DTT

2.23 Ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphε3 χωρίς χρήση πηκτών με μεθοδολογία nanoLC-MS/MS

Τα ακατέργαστα κυτταρικά εκχυλίσματα του στελέχους Sphε3 (όπως προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου της §2.22) που προέκυψαν από την ανάπτυξη του παρουσία φαινανθρενίου, φθαλικού, γλυκόζης και φαινανθρενίου με γλυκόζη εστάλησαν για περαιτέρω επεξεργασία, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

2.24 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry (1951)

Αρχή της μεθόδου

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 γίνονται είναι:

- α) ο σχηματισμός συμπλόκου Cu^{2+} -πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας).
- β) η αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού και του φωσφορομολυβδαινικού άλατος που περιέχονται στο αντιδραστήριο του Folin-Ciocalteus, από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο, προς κυανούν του βολφραμίου και κυανούν του μολυβδαινίου αντίστοιχα.

Αντιδραστήρια

1. 2% κ.β. Na_2CO_3 σε απεσταγμένο νερό.
2. 0.5% κ.β. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου. (Ο θεϊκός χαλκός προστίθεται στο διάλυμα του κιτρικού νατρίου).
3. Ανάμιξη των διαλυμάτων 1 και 2 σε αναλογία 50:1 v/v πριν την χρήση.
4. Αντιδραστήριο φαινόλης: αναμιγνύεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 v/v, λίγο πριν την χρήση.
5. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) 0.2 mg/ml σε 0.5 N NaOH.
6. Διάλυμα 1 N NaOH.

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 1 ml με 0.5 N NaOH. Στη συνέχεια προστίθεται 5 ml διαλύματος (3), αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Προστίθενται 0.5 ml αντιδραστηρίου (4), αναδεύεται αμέσως και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Το σχηματιζόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 750 nm. Η περιεχόμενη πρωτεΐνη προσδιορίζεται από μια κατά περιοχές γραμμική πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA (0-200 µg).

2.25 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (1976)

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm.

Πειραματική πορεία

1. Γίνεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm συναρτήσεως της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2.5 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 µg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60 sec και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα ως 40 µl δείγματος αιωρείται σε 2.5 ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 sec και φωτομετρείται στα 595 nm.

2.26 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κυτταρικά εκχυλισματα του στελέχους *Sphe3*

I. Προσδιορισμός δραστηριότητας διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (Iwabuchi and Harayama, 1998b)

Η δραστηριότητα της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος υπολογίζεται με φωτομετρικό προσδιορισμό στα 300 nm σε κυβελίδα όγκου 1 ml. Σύμφωνα με

την περιγραφή του Barnsley (1983), η απορρόφηση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος είναι μέγιστη στα 340 nm και η μετατροπή του σε 2-καρβοξυβενζαλδεϋδη-πυροσταφυλικό οξύ έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας κορυφής στα 300 nm. Η σύσταση της αντίδρασης στα 600 μl είναι η ακόλουθη:

- 500 μl υποστρώματος
- κατάλληλη ποσότητα ενζύμου
- συμπλήρωση του όγκου με δ/μα 10 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.5

Γίνεται μέτρηση της μετατροπής του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος σε 2-καρβοξυβενζαλδεϋδη-πυροσταφυλικό οξύ στα 300 nm στους 30° C για 60 sec.

Υπόστρωμα: 18 mg 1-H₂NA σε 1 L δ/τος 10 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.5

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απενεργοποιημένο κυτταρικό εκχύλισμα, το οποίο παρασκευάστηκε με θέρμανση στους 100° C για 10 min.

Ένα Unit ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmole υποστρώματος σε ένα λεπτό.

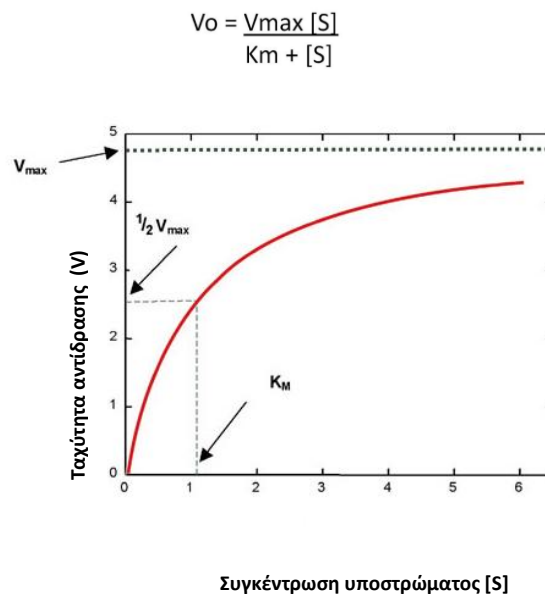
2.27 Προσδιορισμός των καταλυτικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων διοξυγονασών του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος Diox.1 και Diox.2

Αρχή της μεθόδου (Stryer, 1988)

Συχνά οι αντιδράσεις ενζύμων-υποστρωμάτων μελετώνται μέσω της κινητικής προσέγγισης προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός δράσης των ενζύμων. Μετρώνται παράμετροι των καταλυόμενων από ένζυμα αντιδράσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και ενζύμου και χρησιμοποιούνται κινητικά μοντέλα για να περιγράψουν την κινητική συμπεριφορά των ενζύμων. Ένα γνωστό μοντέλο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων είναι το κατά Michaelis-Menten.

Από την εξίσωση προκύπτει ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι ίση με την σταθερά Michaelis-Menten ($[S]=K_m$), όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της ($V=V_{max}/2$) (Σχήμα 2.27.1). Στην ουσία πρόκειται για τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα. Με άλλα λόγια, εάν ένα ένζυμο έχει

μικρή K_m , επιτυγχάνει το μέγιστο της καταλυτικής του δράσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος κι έτσι όσο μικρότερη είναι η K_m , τόσο πιο καλός καταλύτης είναι το ένζυμο για μια αντίδραση. Η τιμή της K_m εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH του διαλύματος, τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση και την ιοντική ισχύ. Για τα περισσότερα ένζυμα οι τιμές K_m κυμαίνονται από 10^{-1} έως 10^{-7} M.



Σχήμα 2.27.1. Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης (V) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten, καθώς και η εξίσωση που περιγράφει το κινητικό μοντέλο. Όπου V_{max} είναι η μέγιστη ταχύτητα και K_m είναι η σταθερά Michaelis-Menten.

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_m η ταχύτητα κατάλυσης είναι ίση με τον αριθμό μετατροπής k_{cat} . Σαν αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου (turnover number) ορίζεται ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα του χρόνου, από ένα μόριο ενζύμου όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Εν τούτοις, πολλά ένζυμα δεν είναι συνήθως κορεσμένα με υπόστρωμα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο λόγος $[S]/K_m$ κυμαίνεται μεταξύ 0.01 και 1.0. Έτσι, όταν $[S] \ll K_m$, η ενζυμική ταχύτητα εξαρτάται από την τιμή του λόγου k_{cat}/K_m και από

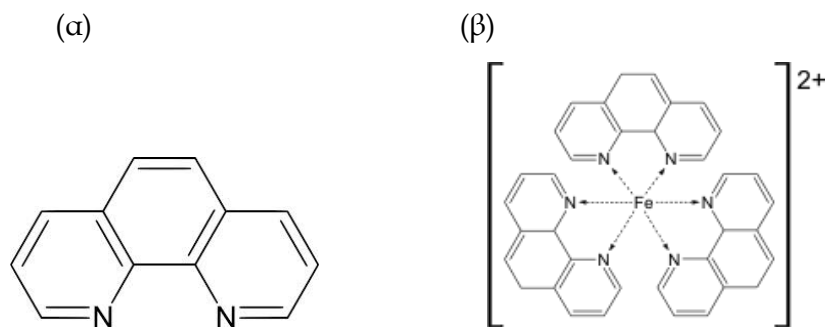
τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Ο λόγος k_{cat}/K_m στην ουσία εκφράζει την καταλυτική απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Εάν ο λόγος είναι:

α. Υψηλός, που σημαίνει $k_{cat} > K_m$, τότε το ένζυμο μετατρέπει περισσότερη ποσότητα του δεσμευμένου από αυτό υποστρώματος σε προϊόν. Η αύξηση της μετατροπής σε προϊόν μπορεί να αποδοθεί σε δυο λόγους, είτε γιατί το υπόστρωμα δεσμεύεται πιο ειδικά στο ένζυμο- απόρροια της χαμηλής τιμής της K_m , είτε γιατί μεγαλύτερη ποσότητα δεσμευμένου από το ένζυμο υποστρώματος μετατρέπεται σε προϊόν- απόρροια του υψηλού αριθμού μετατροπής k_{cat} .

β. Χαμηλός, που σημαίνει $k_{cat} < K_m$, τότε το ένζυμο μετατρέπει λιγότερη ποσότητα του δεσμευμένου από αυτό υποστρώματος σε προϊόν.

Ένζυμα με υψηλό λόγο k_{cat}/K_m έχουν πετύχει την κινητική τελειότητα και το μόνο που περιορίζει την καταλυτική ταχύτητα είναι ο ρυθμός με τον οποίο συναντούν το υπόστρωμα μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης (Berg, 2002).

Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από ειδικά μόρια και ιόντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για την κατανόηση του μηχανισμού ενζυμικής δράσης. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Η δράση των συμπλόκων των διοξυγονασών απαιτεί την παρουσία μη-αιμικού Fe, είτε Fe(III) στην περίπτωση των ενδοδιολικών (intradiol) διοξυγονασών, είτε Fe(II) στην περίπτωση των εξωδιολικών (extradiol) διοξυγονασών. Για την αντιστρεπτή αναστολή της δράσης των διοξυγονασών χρησιμοποιούνται χηλικές ενώσεις και πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η ο-φαινανθρολίνη. Πρόκειται για μια ετεροκυκλική οργανική ένωση [Σχήμα 2.27.2.(α)]. Ως διοδοντικός προσδέτης, η ο-φαινανθρολίνη σχηματίζει σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα όπως Fe(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II). Κατά την αντίδραση ο-φαινανθρολίνης με Fe(II), σχηματίζεται το σύμπλοκο της σιδηροΐνης (ferroin) [Σχήμα 2.27.2 (β)].



Σχήμα 2.27.2. (α) Δομή της ο-φαινανθρολίνης και (β) δομή του συμπλόκου της σιδηροΐνης (ferroin).

Πειραματική πορεία

Οι τιμές Km προσδιορίστηκαν σε κλάσματα των απομονωμένων πρωτεϊνών Diox1 και Diox2 χρησιμοποιώντας εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος 1H2NA από 0.005 έως 0.15 mM, παρουσία 0.1 mM FeSO₄ και 0.1 mM ασκορβικού οξέος. Για τον προσδιορισμό της αντιστρεπτής αναστολής των απομονωμένων πρωτεϊνών Diox1 και Diox2, χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων του αναστολέα ο-φαινανθρολίνη από 0.25 μM έως 30 μM. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της κινητικής έγινε με χρήση του λογισμικού Microcal Origin (Microcal software, 1999) με μη γραμμική προσαρμογή της εξίσωσης Michaelis-Menten.

2.28 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET system manual Novagen, 2001)

Το σύστημα pET είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli*. Τα στοχευόμενα γονίδια κλωνοποιούνται στους φορείς pET κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη πηγής T7 RNA πολυμεράσης στα κύτταρα του ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και δραστική που σχεδόν όλη η ενέργεια του κυττάρου χρησιμοποιείται τελικά για την έκφραση του στοχευόμενου γονιδίου. Είναι ενδεικτικό ότι λίγη ώρα μετά την επαγωγή

παράγεται σχεδόν το 50% της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ικανότητα να διατηρεί τα στοχευόμενα γονίδια ουσιαστικά μη αντιγραφόμενα σε μη-επαγόμενη κατάσταση. Τα υπό έκφραση γονίδια μεταφέρονται αρχικά σε ξενιστές οι οποίοι δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, μειώνοντας έτσι την πλασμιδιακή αστάθεια που οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες πιθανόν να είναι τοξικές για τα κύτταρα του ξενιστή. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε ξενιστές έκφρασης οι οποίοι περιέχουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του προαγωγού *lacUV5* και η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG.

Ακόμα και απουσία IPTG, υπάρχει έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης από τον προαγωγό *lacUV5* στους ξενιστές DE3. Αν λοιπόν τα στοχευόμενα γονίδια είναι τοξικά για στο βακτήριο *E. coli* ακόμα και αυτό το χαμηλό επίπεδο έκφρασης μπορεί να εμποδίσει τη σταθεροποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στους ξενιστές DE3. Για αυτό το πρόβλημα υπάρχουν πολλές λύσεις.

Μια προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση φορέων οι οποίοι περιέχουν τον καλούμενο προαγωγό T7 *lac*. Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν μια αλληλουχία του ρυθμιστή *lac* καθοδικά του προαγωγού T7. Περιέχουν επίσης τον φυσικό προαγωγό και την κωδικεύουσα περιοχή του καταστολέα *lac* (*lacI*), προσανατολισμένο έτσι ώστε οι προαγωγοί T7 *lac* και *lacI* να έχουν διαφορετική κατεύθυνση. Όταν χρησιμοποιούνται οι φορείς στους DE3 ξενιστές για την έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων, ο καταστολέας *lac* δρα:

- στο χρωμόσωμα του ξενιστή στον προαγωγό *lacUV5* για να καταστείλει τη μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης από την πολυμεράση του ξενιστή και
- στον ανασυνδυασμένο φορέα στον προαγωγό T7 *lac* προκειμένου να καταστείλει τη μεταγραφή του στοχευόμενου γονιδίου.

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών είναι η

ακόλουθη:

1. Κλωνοποίηση γονιδίων στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης. Στην εργασία αυτή ο φορέας που επιλέχθηκε ήταν ο pET29c(+).
2. Μετασηματισμός με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο των ξενιστών BL21(DE3).
3. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5 ml L.B με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37° C.
4. Εμβολιασμός κατάλληλης ποσότητας (1:20) σε 20 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D)_{600nm}=0.4-0.6.
5. Προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 1 mM).
6. Λαμβάνονται δείγματα του 1 ml σε χρόνους : 0 min, 1 h, 2 h, 3 h και 4 h.
7. Φυγοκέντρωση
8. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1X διαλύματος φορτώσεως όγκου αναλόγου της οπτικής πυκνότητας του δείγματος (120μl /0.6 O.D_{600nm}).
9. Αποθήκευση στους -20° C ή πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αφού τα δείγματα επωαστούν για 5 min στους 95 °C και φυγοκεντρηθούν.

Διαλύματα

1X διάλυμα φόρτωσης : 50mM Tris pH 6.8
 2% SDS
 0.1% κρυσταλλικής βρωμοφαινόλης
 10% γλυκερόλη
 β-μερκαπτοαιθανόλη

2.29 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970)

Αρχή της μεθόδου

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πήγματα πολυακρυλαμίδιου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορροπαντικό

SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήγμα. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στο πήγμα πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως π.χ. στους ευκαρυώτες N- ή O- γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήγμα. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω του πήγματος επιστοιίβαξης το οποίο είναι αρκετά πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού.

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στο πήγμα επιστοιίβαξης σχηματίζουν ένα προπορευόμενο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας, η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπτίδια στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH του πήγματος ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που

προκύπτουν μεταναστεύουν στο πήγμα διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στο πήγμα διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Τα πήγματα πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) κατά την παρασκευή των πηγμάτων επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το APS (Υπερθειικό αμμώνιο). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στο πήγμα.

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

1. Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
2. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 L περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από την επιφάνεια των πηγμάτων.
3. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρησή τους σε διάλυμα 1 x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης και φόρτωσή τους στο πήγμα.
4. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 Volt μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος το πήγμα.
5. Το πήγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο υπάρχει διάλυμα χρώσης (staining solution) και βάφεται για 1 h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
6. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηγματος με την εμβάπτισή του σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) 1 x 15 min, 1 x O/N, υπό ανάδευση.
7. Τέλος ακολουθεί ξήρανση του πηγματος στους 80° C για 30-45 min.

Διαλύματα

1 x διάλυμα φόρτωσης: 50 mM Tris pH 6.8

2 % SDS

0.1 % μπλε βρωμοφαινόλης

10 % γλυκερόλη

2-μερκαπτοαιθανόλη

10 x διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 144 gr γλυκίνη (250 mM pH 8.3)

20 gr Tris base (25 mM)

50 ml SDS 10 % (0.1 %)

Διάλυμα χρώσης (για 100 ml): 0,1 gr Coomassie Brilliant Blue R-250

40 ml ds H₂O

50 ml μεθανόλη

10 ml οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού: 10 % μεθανόλη ή αιθανόλη

10 % οξικό οξύ

Πίνακας 2.29.1: Συστάσεις πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Πήγμα διαχωρισμού	8 %	10 %	12 %	15 %	Πήγμα επιτοίβαξης (5%)
ακρυλαμίδιο:bis (29:1)	2.67 ml	3.33 ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
dsH ₂ O	4.75 ml	4.09 ml	3.2 ml	2.2 ml	2.8 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl
10 % APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	20 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	5 μl

*Τα APS και TEMED προστίθενται λίγο πριν γίνει η επισοίβαξη των δυο διαλυμάτων αφού και τα δυο δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου.

2.30 Καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγχιστείας Ni²⁺-NTA αγαρόζης (Rohdich *et al.*, 2001, Herz *et al.*, 2000)

Αρχή της μεθόδου

Η στήλη Ni²⁺-NTA ανήκει σε μια ειδική κατηγορία στηλών χρωματογραφίας αγχιστείας που ονομάζεται IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Το νιτριλο-τριοξικό οξύ (NTA) έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ιόν νικελίου πολύ καλύτερα από άλλες χηλικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, οι στήλες νικελίου με το NTA δεσμεύουν 100-1000 φορές περισσότερο αποτελεσματικά πρωτεΐνες με ουρά έξι ιστιδινών από ότι ανάλογες στήλες ιμινο-διοξικού οξέως (IDA, η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τέτοιου είδους χρωματογραφίες).

Πειραματική πορεία

(I) Επαγωγή της καλλιέργειας

1. Επώαση 20 ml προκαλλιέργειας στους 37° C υπό ανάδευση, O/N.
2. Εμβολιασμός 1:20 σε 2 L θρεπτικού μέσου ανάπτυξης και επώαση στους 37° C υπό γρήγορη ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm φτάσει περίπου 0.6.
3. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (μη επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1X διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (120 μl /0.6 O.D_{600nm}). Το δείγμα τοποθετείται στους -20° C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
4. Επαγωγή της καλλιέργειας με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
5. Επώαση της καλλιέργειας για 4 επιπλέον ώρες.
6. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (επαγόμενος μάρτυρας) φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 1X διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική

πυκνότητα του δείγματος (120 μ l / 0.6 O.D_{600nm}). Το δείγμα τοποθετείται στους -20° C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 5500 rpm / 4° C / 20 min.

Στο στάδιο αυτό το ίζημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

(II) Λύση των κυττάρων

1. Αν τα κύτταρα βρίσκονται στους -20° C αφήνονται για 15 min σε πάγο για να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια επαναιωρούνται σε 5 ml/gr διαλύματος A.
2. Γίνεται λύση των κυττάρων με υπερήχους (χρησιμοποιούνται 8 παλμοί των 10 sec στα 300 W, με περίοδο ψύξης μεταξύ των παλμών 10 sec).
3. Φυγοκέντρηση 6.000 rpm / 4 ° C / 20 min.
4. Συλλογή του υπερκειμένου για εφαρμογή σε στήλη Ni²⁺-NTA.

(III) Χρωματογραφία

1. Εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα A με ροή 2 ml/min.
2. Πέρασμα από τη στήλη όλου του υπερκειμένου, οπότε φεύγουν από τη στήλη όλες οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες.
3. Ακολουθεί πλύση της στήλης με 20 ml διαλύματος A.
4. Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 20 ml διαλύματος B με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.
5. Ακολουθεί έκλυση με 120 ml διαλύματος Γ με δημιουργία πυκνοτήτων βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που συλλέγονται υπόκεινται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα πρωτεϊνικά πηγμάτα σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Διαλύματα

Διάλυμα A : 100 mM Tris-HCl pH 8.0
 500 mM NaCl
 20 mM ιμιδαζόλιο

0.5 mM PMSF

Διάλυμα Β : 100 mM Tris-HCl pH 8.0
500 mM NaCl
20-100 mM ιμιδαζόλιο

Διάλυμα Γ : 100 mM Tris-HCl pH 8.0
500 mM NaCl
100-500 mM ιμιδαζόλιο

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Η πλήρης ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους Sphe3 ολοκληρώθηκε πρόσφατα από το DOE Joint Genome Institute (JGI), στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Kallimanis *et al.*, 2011). Το γονιδίωμα περιέχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα 4.250.414 ζευγών βάσεων με 66% περιεχόμενο σε G+C (Σχήμα 1.7.1.2) και δυο πλασμίδια, ένα 190.450 ζευγών βάσεων το αναφερόμενο στο εξής ως pASPHE301 κι ένα 94.456 ζευγών βάσεων το αναφερόμενο στο εξής ως pASPHE302, με 62% περιεχόμενο σε G+C (Σχήμα 1.7.1.2).

Από το σύνολο των 4.288 γονιδίων, τα 4.212 κωδικεύουν για πρωτεΐνες. Η πλειοψηφία αυτών σε ποσοστό 73.8% έχει προβλεπόμενη λειτουργία, ενώ το εναπομείναν ποσοστό αποτελείται από πρωτεΐνες που χαρακτηρίστηκαν ως υποθετικές πρωτεΐνες (Kallimanis *et al.*, 2011).

3.2 Μελέτη γονιδίων υπεύθυνων για την αρχική προσβολή του αρωματικού πυρήνα μέσω υδροξυλίωσης

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή (§ 1.2.1 και § 1.5), ο αερόβιος καταβολισμός των αρωματικών υδρογονανθράκων ξεκινά με την υδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα ενσωματώνοντας δυο άτομα οξυγόνου. Ρόλο κλειδί σε αυτή τη διαδικασία κατέχουν οι Διοξυγονάσες Αρχικής Υδροξυλίωσης, που ονομάζονται Ring Hydroxylating Dioxygenases (RHDs).

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης του γονιδιώματος του στελέχους Sphe3, πραγματοποιήθηκε μελέτη *in silico* για τον εντοπισμό πιθανών γονιδίων που κωδικεύουν για RHDs. Εντοπίστηκαν λοιπόν τέτοια γονίδια τόσο στα δυο πλασμίδια (pASPHE301, pASPHE302) όσο και στο χρωμόσωμα του στελέχους Sphe3.

Στο pASPHE301 εντοπίστηκαν γονίδια τα οποία προβλέπεται βάσει της αλληλουχίας του DNA τους να κωδικεύουν για τη μεγάλη και τη μικρή

υπομονάδα διοξυγονάσης υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα και τα οποία στο εξής θα αναφέρονται ως *rhd1a* και *rhd1b*, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αμινοξικών αλληλουχιών των ανωτέρω γονιδίων με άλλες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο με χρήση του προγράμματος BlastP φαίνονται στον Πίνακα 3.2.1.

Καθοδικά των γονιδίων που κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του στελέχους *Srhe3* στο πλασμίδιο pASpHE301, εντοπίζεται ένα γονίδιο που κωδικεύει για μια υποθετική πρωτεΐνη (Σχήμα 3.2.1, I.3). Ανάλυση BlastP για την υποθετική πρωτεΐνη κατέδειξε ταυτότητα αυτής κατά 51% με την αφυδρογονάση διόλης (NidC) από *Rhodococcus* sp. I24 (Treadway *et al.*, 1999), ενώ βρέθηκε επίσης να έχει ταυτότητα κατά 52% και 48% με δυο υποθετικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα οπερόνια του φθαλικού του στελέχους *Srhe3* στο pASpHE301 και pASpHE302 πλασμίδιο, αντίστοιχα.

Επίσης, το προϊόν του επόμενου καθοδικά γονιδίου έχει καταχωρηθεί (JGI) ως αφυδρογονάση άγνωστης εξειδίκευσης (Σχήμα 3.2.1, I.4). Από ανάλυση BlastP αυτή φαίνεται να έχει ταυτότητα κατά 81% με αφυδρογονάση διϋδροδιόλης από *Rhodococcus opacus* TKN14 (Maruyama *et al.*, 2005), 81% με την αφυδρογονάση της *cis*-διϋδροδιόλης του ναφθαλενίου του στελέχους *Rhodococcus opacus* B4 (Na *et al.*, 2005), 73% με αφυδρογονάση της *cis*-διϋδροδιόλης του ναφθαλενίου του στελέχους *Rhodococcus* I24 (Treadway *et al.*, 1999), 80% με αφυδρογονάση διϋδροδιόλης από *Rhodococcus opacus* SAO101 (Kimura *et al.*, 2006), 50% με πιθανή αφυδρογονάση διϋδροδιόλης από *Mycobacterium* sp. SNP11 (Pagnout *et al.*, 2005) και 50% με μικρής αλυσίδας αφυδρογονάση από *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK (Badejo *et al.*, 2013a). Υποθέτουμε λοιπόν ότι πρόκειται για την αφυδρογονάση που είναι υπεύθυνη για την αφυδρογόνωση των προϊόντων υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου.

Τέλος, για το προϊόν του γονιδίου καταχωρημένου ως διϋδροπικολινική συνθάση/λυάση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος (Σχήμα 3.1.1, I.5) η ανάλυση BlastP έδειξε ταυτότητα κατά 74% με την πιθανή αλδολάση NarC του *Rhodococcus*

opacus B4 (Na *et al.*, 2005) και 44% με την υδρατάση-αλδολάση PhdJ από το *Mycobacterium vanbaalenii*, PYR-1 (Stingley *et al.*, 2004a). Οι NarC και PhdJ έχουν χαρακτηριστεί ως υδρατάσες-αλδολάσες της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού, ένζυμο που φέρει εις πέρας τη μετατροπή του 2'-καρβοξυβενζαλκυροσταφυλικού οξέος σε 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδη και πυροσταφυλικό οξύ. Τέλος, ταυτότητα κατά 53% σημειώνεται και με την υδρατάση-αλδολάση που εντοπίζεται καθοδικά των υπομονάδων α και β της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του διβενζοφουρανίου στο στέλεχος *Rhodococcus opacus* SAO101 (Kimura *et al.*, 2006) (Σχήμα 1.4.2).

Στο pASPHE302 εντοπίστηκαν επίσης γονίδια που κωδικεύουν για την α και τη β υπομονάδα της διοξυγονάσης υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα τα οποία στο εξής θα αναφέρονται ως *rhd2a* και *rhd2b*, αντίστοιχα (Σχήμα 3.2.1, II.1 και II.2). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αμινοξικών αλληλουχιών τους με άλλες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο με χρήση του προγράμματος BlastP φαίνονται στον Πίνακα 3.2.1.

Ανοδικά των γονιδίων *rhd2a* και *rhd2b* εντοπίζεται ένα γονίδιο του οποίου το προϊόν είναι καταχωρημένο ως NAD(FAD)-εξαρτώμενη αφυδρογονάση (Σχήμα 3.2.1, II.3). Ανάλυση BlastP έδειξε ταυτότητα αυτής κατά 40% με την PhtAd φερρεδοξίνη ρεδουκτάση του συμπλέγματος γονιδίων καταβολισμού του φθαλικού οξέος από *Rhodococcus* sp. TFB (Tomás-Gallardo *et al.*, 2006) και 37% με την φερρεδοξίνη ρεδουκτάση της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού οξέος στο *Rhodococcus jostii* RHA1 (Takeda *et al.*, 2010). Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι πρόκειται για την υπομονάδα της φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης του γονιδιακού τόπου όπου εντοπίζονται γονίδια υπεύθυνα για την αρχική διϋδροξυλίωση του φαινανθρενίου στο pASPHE302 του Sphe3. Τέλος, το προϊόν του γονιδίου που χαρακτηρίστηκε από το JGI ως περμεάση εκροής αραβινόζης (Σχήμα 3.2.1, II.6), από ανάλυση BlastP παρουσιάζει ομολογία με πρωτεΐνες μεταφορείς της Μείζονος Υπεροικογενείας Διευκολυνόμενης μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily-MFS proteins), οι οποίες είναι μεταφορείς με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα ιόντων, φωσφορικών, σακχάρων,

αντιβιοτικών, νευροδιαβιβαστών, νουκλεοσιδίων, αμινοξέων και πεπτιδίων (Pao *et al.*, 1998). Χαρακτηριστικά, βρέθηκε ταυτότητα κατά 99% με μεταφορέα MFS από *Arthrobacter* FB24 και 43% με τη πρωτεΐνη NorA αυτής της οικογενείας από *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton, 2001). Πιθανόν λοιπόν το γονίδιο αυτό να κωδικεύει κάποιον μεταφορέα.

Όπως εκτενώς αναφέρεται στην Εισαγωγή (§ 1.5.1.3), τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αρχική υδροξυλίωση των αρωματικών πυρήνων συχνά έχει βρεθεί πως είναι οργανωμένα σε οπερόνια που φέρουν τις δυο υπομονάδες διοξυγονάσης, τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης για την αρχική υδροξυλίωση του αρωματικού πυρήνα. Επίσης, σε αυτές τις οργανωμένες δομές εντοπίζονται συχνά και γονίδια που κωδικεύουν για αφυδρογονάσες, υδρατάσες/αλδολάσες, καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Άλλες πάλι φορές έχει παρατηρηθεί οι υπομονάδες της διοξυγονάσης και της φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης να είναι σε διαφορετικά σημεία στο γονιδίωμα των βακτηρίων. Σε ορισμένα στελέχη υπάρχουν περισσότερα από ένα ζευγάρια υπομονάδων α και β διοξυγονασών στο γονιδίωμά τους, τα οποία μπορεί να μοιράζονται από κοινού τις υπομονάδες μιας φερρεδοξίνης και μιας ρεδουκτάσης. Τα ανωτέρω σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ανάλυσης BlastP, ενισχύουν την υπόθεσή μας ότι τα γονίδια *rhd1a*, *rhd1b* του πλασμιδίου pASPHE301 καθώς και τα *rhd2a*, *rhd2b* του pASPHE302 είναι πιθανά γονίδια διοξυγονασών υπεύθυνων για την αρχική υδροξυλίωση αρωματικών πυρήνων.

Οι α υπομονάδες διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου από τα δυο πλασμίδια pASPHE301 και pASPHE302 (Rhd1 α και Rhd2 α) εμφανίζουν μεταξύ τους 33% ομολογία, ενώ οι β (Rhd1 β και Rhd2 β) 40%.

Στο χρωμόσωμα εντοπίστηκαν δυο γονίδια καταχωρημένα (JGI) ως η μεγάλη υπομονάδα διοξυγονάσης διϋδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα (RHD) και η μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης του φαινυλπροπιονικού οξέος, οι οποίες στο εξής θα αναφέρονται ως *rhd3a* και *rhd3b* (Σχήμα 3.2.1, III.2 και IV.2). Αυτά βρίσκονταν σε διαφορετικά σημεία στο χρωμόσωμα του στελέχους Sphe3 και όχι πλησίον μεταξύ τους, κάτι που βέβαια δεν είναι ασυνήθιστο, εφόσον έχει αναφερθεί σε

σελέχη του γένους *Mycobacterium* ότι γονίδια που κωδικεύουν για α και β υπομονάδες διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης βρίσκονται χωριστά και διασπαρμένα στο γονιδίωμα σε διάφορα γονιδιακά συμπλέγματα (Kim *et al.*, 2008a, Zhang and Anderson, 2012). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αμινοξικών τους αλληλουχιών με άλλες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο με ανάλυση BlastP φαίνονται στον Πίνακα 3.2.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης BlastP για την μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης του φαινυλπροπionικού οξέος του χρωμοσώματος, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αυτή βρίσκεται πλησίον της α υπομονάδας της 1,2-διοξυγονάσης βενζοϊκού οξέος, δείχνουν ότι μπορεί και να πρόκειται για την β υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης βενζοϊκού οξέος του χρωμοσώματος. Από τις δυο αυτές υπομονάδες του χρωμοσώματος, η Rhd3α εμφανίζει ταυτότητα της τάξης του 33% με την Rhd2α και η Rhd3β 30% με την Rhd2β, τις αντίστοιχες πιθανές υπομονάδες διοξυγονάσης διϋδροξυλίωσης του φαινανθρενίου από το πλασμίδιο pASPHE302.

Πίνακας 3.2.1 Αποτελέσματα ανάλυσης BlastP πιθανών RHDs του στελέχους Sphe3.

RHDs στο στέλεχος Sphe3	% ταυτότητα	μικροοργανισμός	αριθμός κατάθεσης σε διεθνή βάση δεδομένων (GeneBank accession no.)	αναφορά
pASPHE301				
Rhd1α (JGI: διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης, μεγάλη υπομονάδα)	76% (357/472 αα) μεγάλη υπομονάδα διοξυγονάσης ναφθαλενίου	<i>Rhodococcus opacus</i> B4	BAH47212.1	Na <i>et al.</i> , 2005
	75% (356/472 αα) μεγάλη υπομονάδα διοξυγονάσης ναφθαλενίου (NidA)	<i>Rhodococcus</i> I24	AAD25395.1	Treadway <i>et al.</i> , 1999
	54% (235/436 αα) α υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	ABP43029.1	Badejo <i>et al.</i> , 2013a
	54% (235/436 αα) α υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Mycobacterium</i> 6PY1	CAD38643.1	Krivobok <i>et al.</i> , 2003
Rhd1β (JGI: μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης φαινυλπροπιονικού οξέος)	79% (135/171 αα) μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Rhodococcus opacus</i>	BAD02378.1	Kimura <i>et al.</i> , 2006)

	78% (134/171 αα) μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης (NidB)	<i>Rhodococcus</i> I24	AAD25396.1	Treadway <i>et al.</i> , 1999
	53% (83/156 αα) μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Mycobacterium</i> 6PY1	CAD38644.1	Krivobok <i>et al.</i> , 2003
pASPHE302				
Rhd2α (JGI: διοξυγονάση φαιτυλοπροπιον ικού οξέος, α υπομονάδα)	75% (339/453 αα) α υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Mycobacterium</i> <i>gilvum</i> PYR-GCK	ABP43042.1	Badejo <i>et</i> <i>al.</i> , 2013a
	40% (176/444 αα) α υπομονάδα διοξυγονάσης διβενζοφουρανίου	<i>Rhodococcus</i> sp. p52	AER45738.1	Peng <i>et al.</i> , 2013
	40% (176/444 αα) μεγάλη υπομονάδα διοξυγονάσης γωνιακής υδροξυλίωσης	<i>Terrabacter</i> DBF63	BAC75993.1	Habe <i>et</i> <i>al.</i> , 2004
Rhd2β (JGI: μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης φαιτυλοπροπιον ικού οξέος)	68% (113/166 αα) β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Mycobacterium</i> <i>gilvum</i> PYR-GCK	ABP43041.1	Badejo <i>et</i> <i>al.</i> , 2013a
	44% (71/163 αα)	<i>Gordonia</i> sp. KTR9	AFR47906.1	Chen <i>et</i> <i>al.</i> , 2012

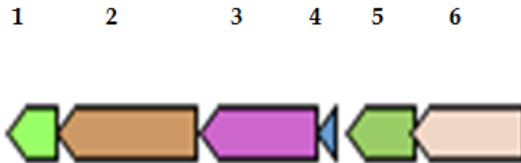
	β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης			
	40% (74/184 αα) β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης	<i>Sphingomonas wittchii</i> RW1	ABQ70621.1	Miller <i>et al.</i> , 2010
Χρωμόσωμα				
Rhd3α (JGI: μεγάλη υπομονάδα διοξυγονάσης φαινολπροπιον ικού οξέος)	55% (222/407 αα) Rieske διοξυγονάση Fe-S	<i>Gordonia</i> sp. KTR9	AFR47837.1	Chen <i>et al.</i> , 2012
	55% (223/409 αα) Rieske διοξυγονάση Fe-S	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2	AFA71350.1	Hiessl <i>et al.</i> , 2012
Rhd3β (JGI: μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης φαινολπροπιον ικού οξέος)	74% (122/165 αα) μικρή υπομονάδα 1,2- διοξυγονάσης βενζοϊκού οξέος	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	EHI40308.1	Holder <i>et al.</i> , 2011
	73% (121/165 αα) β υπομονάδα 1,2- διοξυγονάσης βενζοϊκού οξέος	<i>Rhodococcus</i> RHA1	BAB70699.1	Kitagawa <i>et al.</i> , 2001
	70% (116/166 αα) β υπομονάδα 1,2- διοξυγονάσης βενζοϊκού οξέος	<i>Rhodococcus</i> sp. 19070	AAK58904.1	Haddad <i>et al.</i> , 2001

I. pASPHE301



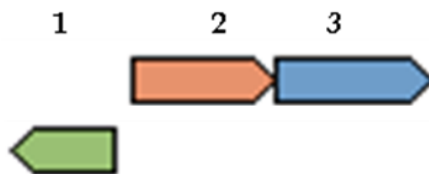
1. *rhd1a*, 2. *rhd1β*, 3. πιθανή αφυδρογονάση διόλης, 4. αφυδρογονάση διϋδροδιόλης (JGI: αφυδρογονάση άγνωστης εξειδίκευσης), 5. υδρατάση-αλδολάση (JGI: διυδροπικολινική συνθάση/λύαση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος)

II. pASPHE302



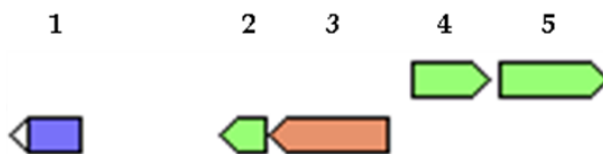
1. *rhd2a*, 2. *rhd2β*, 3. πιθανή υπομονάδα φερρεδοξίνης ρεδοκτάσης (JGI: NAD(FAD)-εξαρτώμενη αφυδρογονάση), 4. φερρεδοξίνη, 5. μεταγραφικός ρυθμιστής, 6. περμεάση εκροής αραβινόζης

III. Χρωμόσωμα, περιοχή α υπομονάδας



1. μεταγραφικός ρυθμιστής, 2. *rhd3a*, 3. ρεδοκτάση φλαβοδοξίνης

IV. Χρωμόσωμα, περιοχή β υπομονάδας



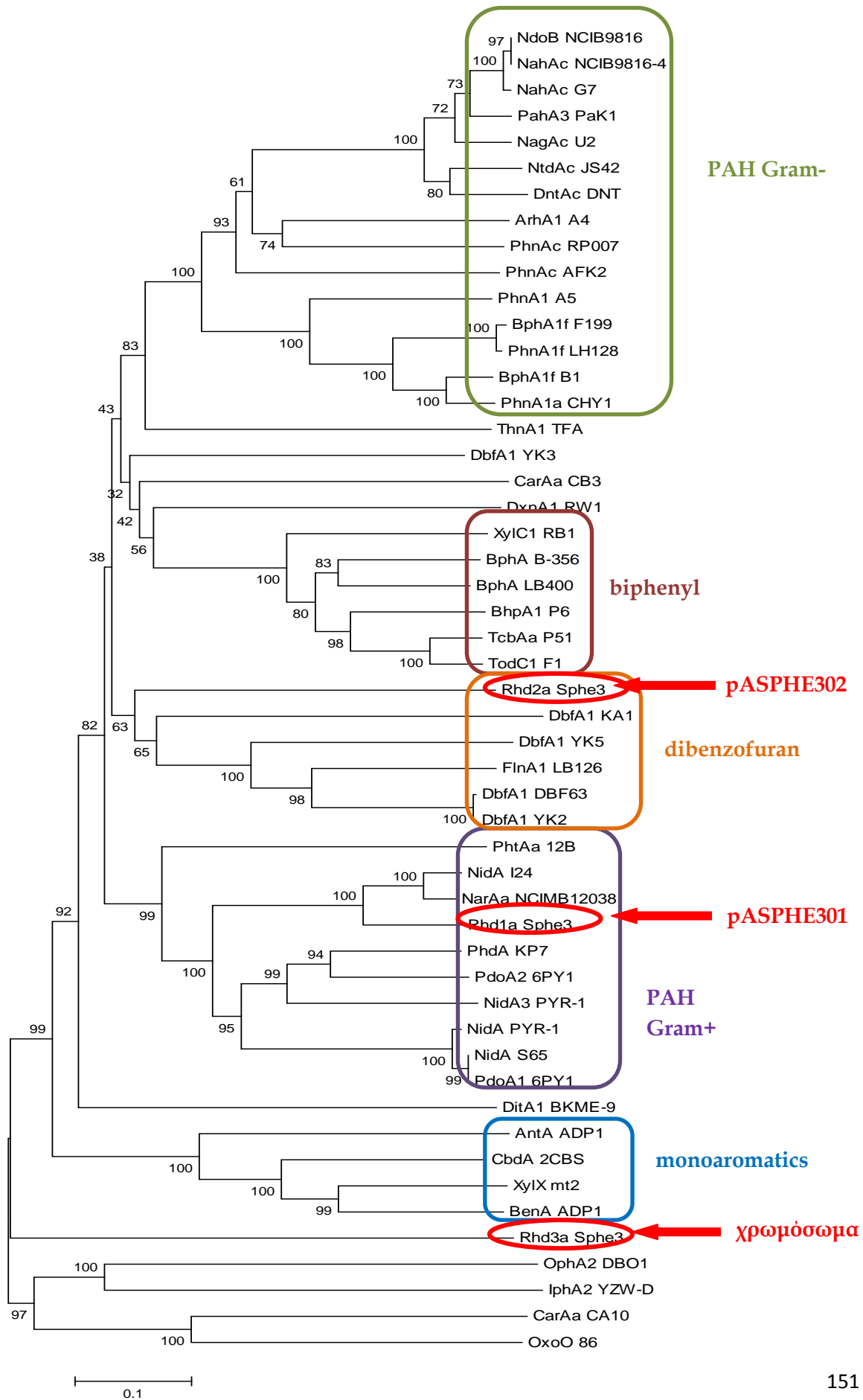
1. αφυδρογονάση του 1,2-διϋδροκυκλοεξα-3,5-διεν-1-καρβοξυλικού, 2. *rhd3β*, 3. α υπομονάδα της 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού οξέος, 4. 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, 5. μεταφορέας βενζοϊκού οξέος.

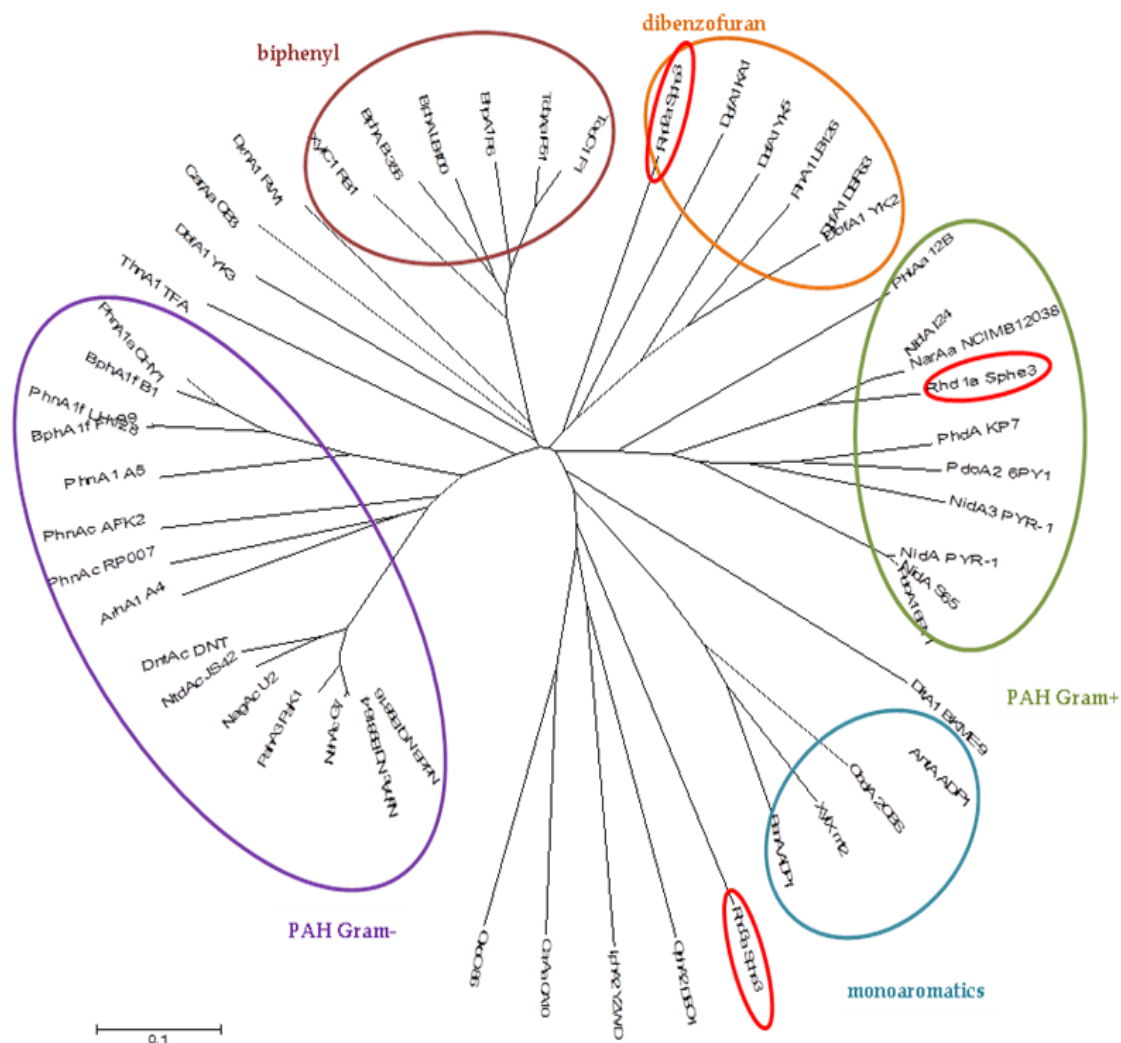
Σχήμα 3.2.1 Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των πιθανών γονιδίων RHDs στα πλασμιδια pASPHE301 (I), pASPHE302 (II) και στο χρωμόσωμα (III) και (IV) του στελέχους *Srhe3*.

3.2.1 Φυλογενετική ανάλυση των Rhd1α, Rhd2α και Rhd3α και συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών

Η κρυσταλλική δομή της 1,2-διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από το στέλεχος *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4, έδειξε ότι η α υπομονάδα των συστημάτων διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης είναι εκείνη που καθορίζει την αναγνώριση του υποστρώματος από το ολοένζυμο. Η β υπομονάδα δεν περιέχει συμπαραγοντες και φαίνεται να έχει δομικό ρόλο για το ολοένζυμο, ενώ επιπλέον οι β υπομονάδες έχουν πολύ μικρό αριθμό αμινοξέων, από τα συνολικά περίπου 200 που αποτελούν χαρακτηριστικό μέγεθος τέτοιων υπομονάδων (Kaurri *et al.*, 1998). Φυλογενετική ανάλυση για την σύγκριση διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης διενεργείται με α υπομονάδες αυτών (Nam *et al.*, 2001; Kweon *et al.*, 2008).

Πραγματοποιήθηκε λοιπόν φυλογενετική ανάλυση για τις α υπομονάδες των πιθανών διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου Rhd1α, Rhd2α και Rhd3α των πλασμιδίων pASPHE301, pASPHE302 και του χρωμοσώματος του στελέχους Sphe3, αντίστοιχα. Το φυλογενετικό δέντρο προέκυψε με ανάλυση neighbour-joining κατόπιν σύγκρισης κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο αμινοξικών αλληλουχιών α υπομονάδων διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικών πυρήνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 4 (Σχήμα 3.2.1.1) (Tamura *et al.*, 2007).





Σχήμα 3.2.1.1 Φυλογενετικό δέντρο που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) και προέκυψε από σύγκριση κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδικτυο αμινοξικών αλληλουχιών των α υπομονάδων διοξυγονασών υδροξυλίωσης αρωματικών πυρήνων. Η ομαδοποίηση σε υποκατηγορίες έγινε με βάση την εξειδίκευση σε χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Οι συντμήσεις είναι οι εξής (οι αριθμοί κατάθεσης σε διεθνείς βάσεις δεδομένων του διαδικτύου δίνονται στις παρενθέσεις):

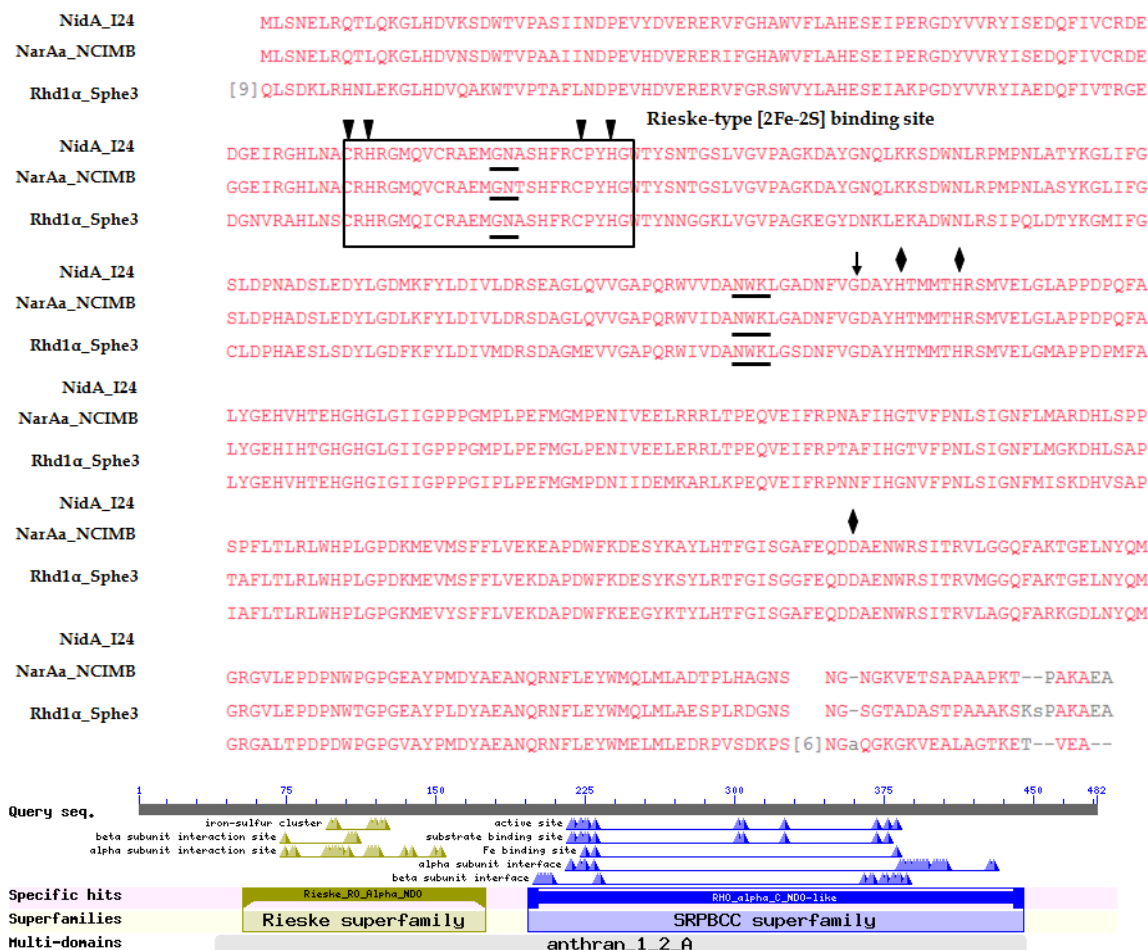
PhnAc_AFK2, phenanthrene, *Alcaligenes faecalis* AFK2 (AB024945); ArhA1_A4, acenaphthene and acenaphthylene, *Sphingomonas* sp. strain A4 (BAD34447); PhnAc_RP007, phenanthrene, *Burkholderia* sp. RP007 (AF061751); PahA3_PaK1, naphthalene, *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 (D84146); NagAc_U2, naphthalene, *Ralstonia* sp. U2 (AF036940); NahAc_G7, naphthalene, *Pseudomonas putida* G7 (YP_534822); NdoB_NCIB9816, naphthalene, *Pseudomonas putida* NCIB9816 (M23914); NahAc_NCIB9816-4, naphthalene, *Pseudomonas putida* NCIB9816-4 (NP_863072); NtdAc_JS42, 2-nitrotoluene, *Pseudomonas* sp. JS42 (U49504); DntAc_DNT, 2,4-dinitrotoluene, *Burkholderia* sp. DNT (U62430); PhnA1_A5, naphthalene, *Cycloclasticus* sp. strain A5 (AB102786); BphA1f_F199, biphenyl, *Sphingomonas aromaticivorans* F119 (AF079317); NahA1f_LH128, phenanthrene, *Sphingomonas* sp. strain LH128 (EU024112); BphA1f_B1, biphenyl, *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (ABM91740); PhnA1a_CHY1, chrysene, *Sphingomonas* sp. strain CHY-1 (AJ633551);

PhtAa_12B, phthalate, *Arthrobacter keyseri* 12B (AF331043); NidA_I24, indene, *Rhodococcus* sp. I24 (AF121905); NarAa_NCIMB12038, naphthalene *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (AF082663); Rhd1 α _Sphe, phenanthrene, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (ADX75094); Rhd2 α _Sphe, phenanthrene, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (ADX75329); Rhd3 α _Sphe, phenanthrene, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (ADX71443); NidA3_PYR-1, pyrene, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAY85176); PhdA_KP7, phenanthrene, *Nocardioides* sp. KP7 (AB017794); PdoA2_6PY1, pyrene, *Mycobacterium* sp. strain 6PY1 (CAD38643); NidA_PYR-1, pyrene, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AF249301); NidA_S65, pyrene, *Mycobacterium* sp. S65 (AF546904); PdoA1_6PY1, pyrene, *Mycobacterium* sp. strain 6PY1 (CAD38647); DitA1_BKME-9, diterprenoid, *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 (AF119621); AntA_ADAP1, anthranilate, *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (AF071556); CbdA_2CBS, 2-halobenzoate, *Burkholderia cepacia* 2CBS (X79076); XylX_mt2, toluate, *Pseudomonas putida* mt2 (M64747); BenA_ADAP1, benzoate, *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (AF009224); OphA2_DBO1, phthalate, *Burkholderia cepacia* DBO1 (AF095748); IphA2_YZW-D, isophthalate, *Comamonas testosteroni* YZW-D (AY923836); CarAa_CA10, carbazole, *Pseudomonas resinovorans* CA10 (AB088420); OxoO_86, 1-oxo-1,2-dihydroquinoline, *Pseudomonas putida* 86 (Y12655); DbfA1_KA1, carbazole, *Sphingomonas* sp. KA1 (BAF03470); DbfA1_YK5, dibenzofuran, *Paenibacillus* sp. strain YK5 (BAE53401); FlnA1_LB126, fluorene, *Sphingomonas* sp. strain LB126 (EU024110); DbfA1_DBF63, fluorene, *Terrabacter* sp. strain DBF63 (BAC75993); DbfA1_YK2, dibenzofuran, *Rhodococcus* sp. strain YK2 (BAC00802); DbfA1_YK3, dibenzofuran, *Terrabacter* sp. strain YK3 (BAC06602); CarAa_CB3, carbazole, *Sphingomonas* CB3 (AF060489); DxnA1_RW1, dibenzo-*p*-dioxin, *Sphingomonas* sp. RW1 (X72850); XylC1_RB1, unknown substrate, *Cycloclasticus oliotropus* RB1 (U51165); BphA1_P6, biphenyl, *Rhodococcus globerulus* P6 (X80041); TcbAa_P51, chlorobenzene, *Pseudomonas* sp. P51 (U15298); TodC1_F1, toluene, *Pseudomonas putida* F1 (J04996); BphA_B-356, biphenyl, *Comamonas testosteroni* B-356 (U47637); BphA_LB400, biphenyl, *Burkholderia cepacia* LB400 (M86348); ThnA1_TFA, tetralin, *Sphingopyxis macrogoltabida* TFA (AF157565).

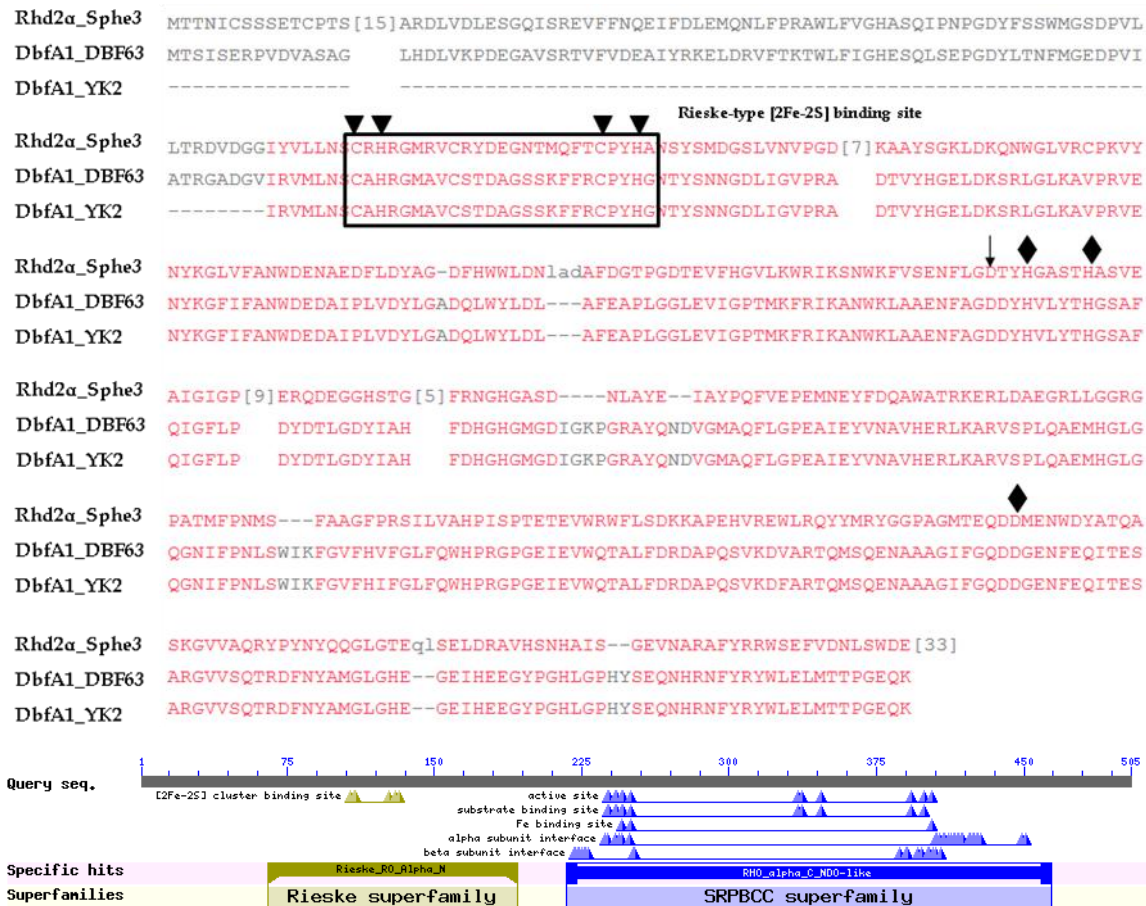
Η ανωτέρω ανάλυση δείχνει ότι η Rhd1 α ανήκει στον κλάδο των α υπομονάδων που έχουν βρεθεί σε *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*, *Arthrobacter* και είδη *Mycobacterium* (Saito *et al.*, 2000 ; Treadway *et al.*, 1999 ; Nojiri *et al.*, 2002 ; Eaton *et al.*, 2001 ; Sho *et al.*, 2004). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή §1.5.1.3, οι διοξυγονάσες αυτού του κλάδου είναι διοξυγονάσες που μοιάζουν με την 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου και μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που κωδικεύουν για τις υπομονάδες της αλυσίδας ροής ηλεκτρονίων δεν βρίσκονται πλησίον των γονιδίων των διοξυγονοσών και οι υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης δρουν βοηθητικά για παραπάνω από μια διοξυγονάσες. Τέλος, οι υπομονάδες φερρεδοξίνης αυτού του κλάδου είναι συνηθέστερα του τύπου [3Fe-4S] (Kweon *et al.*, 2008).

Οι πιο συγγενείς φυλογενετικά διοξυγονάσες της Rhd1 α είναι η NidA_I24 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου από *Rhodococcus* sp. I24 (Treadway *et al.*, 1999) και η NarAa_NCIMB, 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου από *Rhodococcus* sp.

NCIMB12038 (Gakhar *et al.*, 2005). Επιλέχθηκαν λοιπόν για συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών τους προκειμένου να εντοπιστούν συντηρημένες περιοχές (Σχήμα 3.2.1.2).



Σχήμα 3.2.1.2 Πλήρης στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών των α υπομονάδων των διοξυγονασών NidA_I24, *Rhodococcus* sp. I24 (AF121905); NarAa_NCIMB, *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (AF082663); Rhd1a_Sphe3, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (ADX75094) και αποτέλεσμα ανάλυσης BlastP της Rhd1a_Sphe3. Τα συντηρημένα κατάλοιπα που συντονίζουν το μονοπύρρηνο σίδηρο υποδεικνύονται με ρόμβους. Σε πλαίσιο περικλείεται η περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Rieske σιδήρου-θείου. Με τρίγωνα υποδεικνύονται τα συντηρημένα κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Rieske [2Fe-2S] που συνιστούν το μοτίβο: C-X-HRG-X₈-GN-X₅-CX₂YHG (Mason and Cammack, 1992). Το γεφυρωτικό κατάλοιπο του ασπαρτικού οξέος υποδεικνύεται με βελάκι. Με υπογράμμιση διακρίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα Gly-Asn στην περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Rieske σιδήρου-θείου και Asn-Trp-Lys στην περιοχή πρόσδεσης του Fe²⁺, τα οποία δίνουν στοιχεία για την κατάταξη των RHOs σε κατηγορίες (Nam *et al.*, 2001).



Σχήμα 3.2.1.3 Πλήρης στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών των α υπομονάδων των διοξυγονασών DfbA1_YK2, *Rhodococcus* sp. YK2 (BAC00802); DfbA1_DBF63, *Terrabacter* sp. DBF63 (BAC75993); Rhd2α_Sphe3, *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (ADX75329) και αποτέλεσμα της ανάλυσης BlastP της Rhd2α_Sphe3. Τα συντηρημένα κατάλοιπα που συντονίζουν το μονοπύρρηνο σίδηρο υποδεικνύονται με ρόμβους. Σε πλαίσιο περικλείεται η περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Rieske σιδήρου-θείου. Με τρίγωνα υποδεικνύονται τα συντηρημένα κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Rieske [2Fe-2S] που συνιστούν το μοτίβο: C-X-HRG-X₈-GN-X₅-CX₂YHG (Mason and Cammack, 1992). Το γεφυρωτικό κατάλοιπο του ασπαρτικού οξέος υποδεικνύεται με βελάκι.

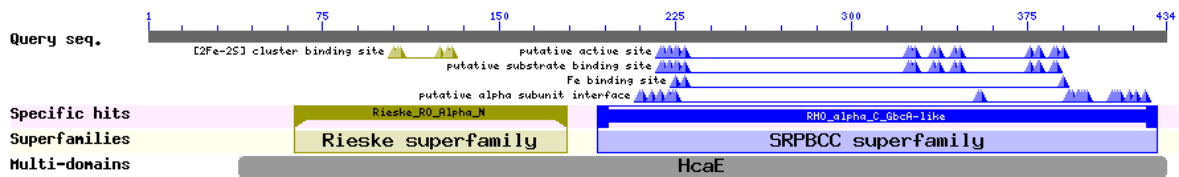
Για την Rhd2α η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι πιο συγγενείς της φυλογενετικά διοξυγονάσες είναι διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης διβενζοφουρανίου και φλουορενίου, οι οποίες σχηματίζουν έναν ξεχωριστό κλάδο κατά τη φυλογενετική ανάλυση των α υπομονάδων τους. Επιλέχθηκαν για συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών δυο αλληλουχίες υπομονάδων ακτινοβακτηρίων, με στόχο τον εντοπισμό συντηρημένων περιοχών, η α υπομονάδα διοξυγονάσης του διβενζοφουρανίου DfbA1_YK2, *Rhodococcus* sp.

YK2 (Iida *et al.*, 2002a) και η α υπομονάδα διοξυγονάσης του φλουορενίου DfbA1_DBF63 από *Terrabacter* sp. DBF63 (Habe *et al.*, 2004) (Σχήμα 3.2.1.3).

Από τη συγκριτική λοιπόν ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των Rhd1α και Rhd2α φαίνεται ξεκάθαρα ότι έχουν στο N-τελικό άκρο Rieske [2Fe-2S] κέντρο και η καταλυτική περιοχή βρίσκεται στο C-τελικό άκρο όπου υπάρχει περιοχή δέσμευσης για τον μονοπύρρηνο σίδηρο. Ο μονοπύρρηνος σίδηρος προκαλεί την ενεργοποίηση του οξυγόνου το οποίο πρόκειται να ενσωματωθεί στο υπόστρωμα. Όπως αναλύθηκε και στην Εισαγωγή § 1.5.1.1 στο Rieske [2Fe-2S] κέντρο των διοξυγονασών Rhd1α και Rhd2α εντοπίζονται δυο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Rhd1α: Cys97, Cys117 και Rhd2α: Cys107, Cys127) και δυο ιστοιδίνης (Rhd1α: His99, His120 και Rhd2α: His109, His130) που συντονίζουν δυο ιόντα σιδήρου (Σχήματα 3.2.1.2 και 3.2.1.3). Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στη συμβολή μεταξύ δυο α υπομονάδων και ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το Rieske [2Fe-2S] κέντρο της μιας υπομονάδας στον μονοπυρηνικό σίδηρο της παρακείμενης. Σε κάθε συμβολή α-α υπομονάδων υπάρχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (Rhd1α: Asp222 και Rhd2α: Asp242) (Σχήματα 3.2.1.2 και 3.2.1.3), το οποίο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μια ιστοιδίνη του κέντρου Rieske [2Fe-2S] της μιας α υπομονάδας και με μια ιστοιδίνη της καταλυτικής περιοχής της παράπλευρης υπομονάδας, παρέχοντας έτσι μια άμεση οδό για τη μεταφορά ηλεκτρονίων (Kauppi *et al.*, 1998; Furusawa *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2010).

Τέλος, από τη φυλογενετική ανάλυση φαίνεται ότι συγγενής φυλογενετικά διοξυγονάση προς την Rhd3α είναι μια αρχική διοξυγονάση οξείδωσης του καρβαζολίου από *Pseudomonas* sp. CA10 (Maeda *et al.*, 2003) μια DitA διοξυγονάση από το στέλεχος *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 που καταβολίζει διτερπένιο και η 8-μονοξυγονάση της 2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνης του στελέχους *Pseudomonas putida* 86 (Martins *et al.*, 2005). Οι ομολογίες που επιδεικνύει σε αμινοξικό επίπεδο ωστόσο με αυτές τις διοξυγονάσες είναι της τάξης του 18% και χαμηλότερες.

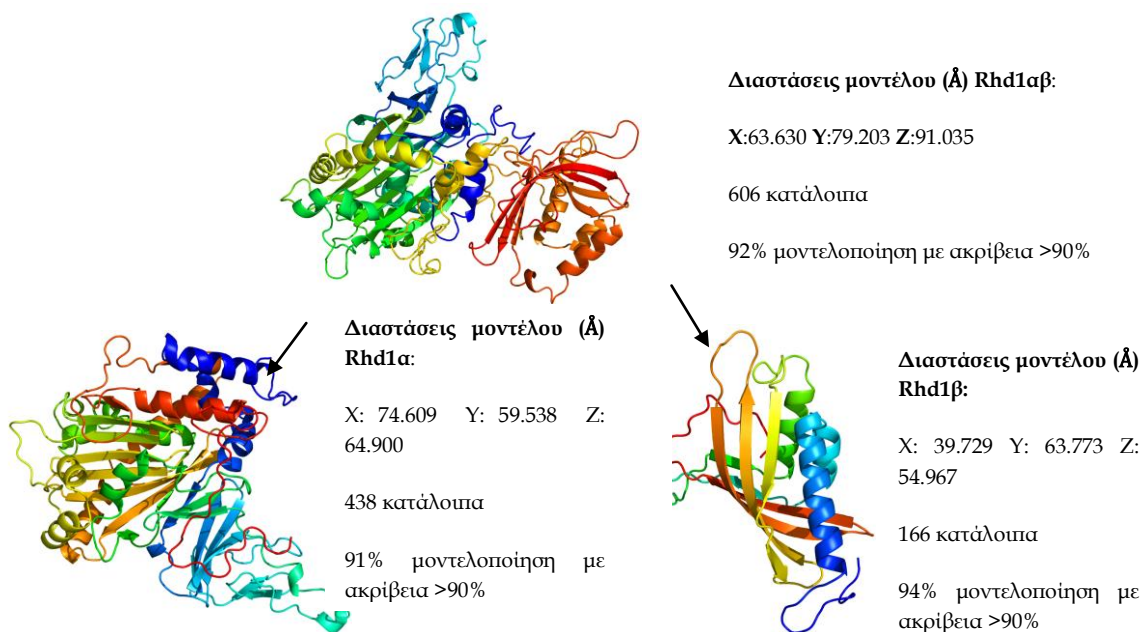
Η ανάλυσή της με BlastP δείχνει ότι πρόκειται για διοξυγονάση Rieske [2Fe-2S] με τις συντηρημένες περιοχές του κέντρου Rieske [2Fe-2S] και την περιοχή δέσμευσης του μονοπύρηνου σιδήρου (Σχήμα 3.2.1.4).



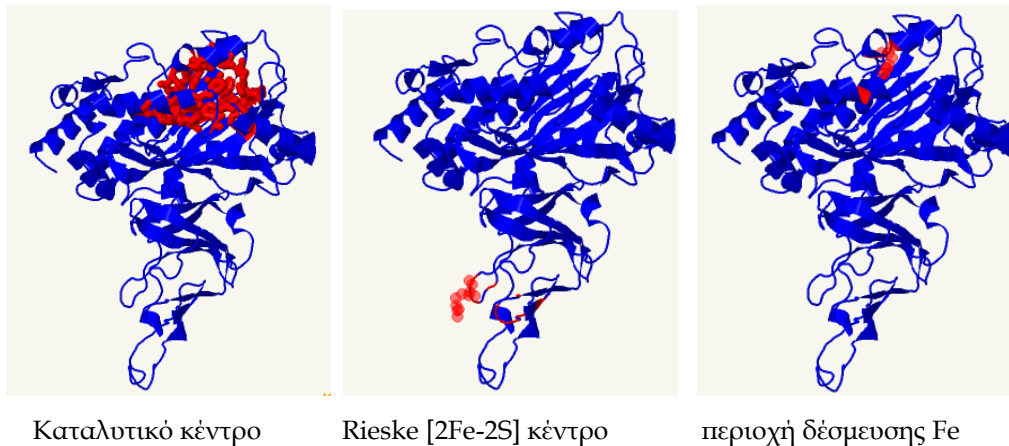
Σχήμα 3.2.1.4 Ανάλυση BlastP της Rhd3a υπομονάδας.

3.2.2 Αναπαράσταση τριτοταγούς δομής στο χώρο (3D-modelling) της Rhd1αβ και Rhd2αβ των πλασμιδίων pASPHE301 και pASPHE302

Η αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής στο χώρο (3D-modelling) των Rhd1α και Rhd1β του πλασμιδίου pASPHE301 καθώς και των Rhd2α και Rhd2β του πλασμιδίου pASPHE302 έγινε με το πρόγραμμα Phyre².



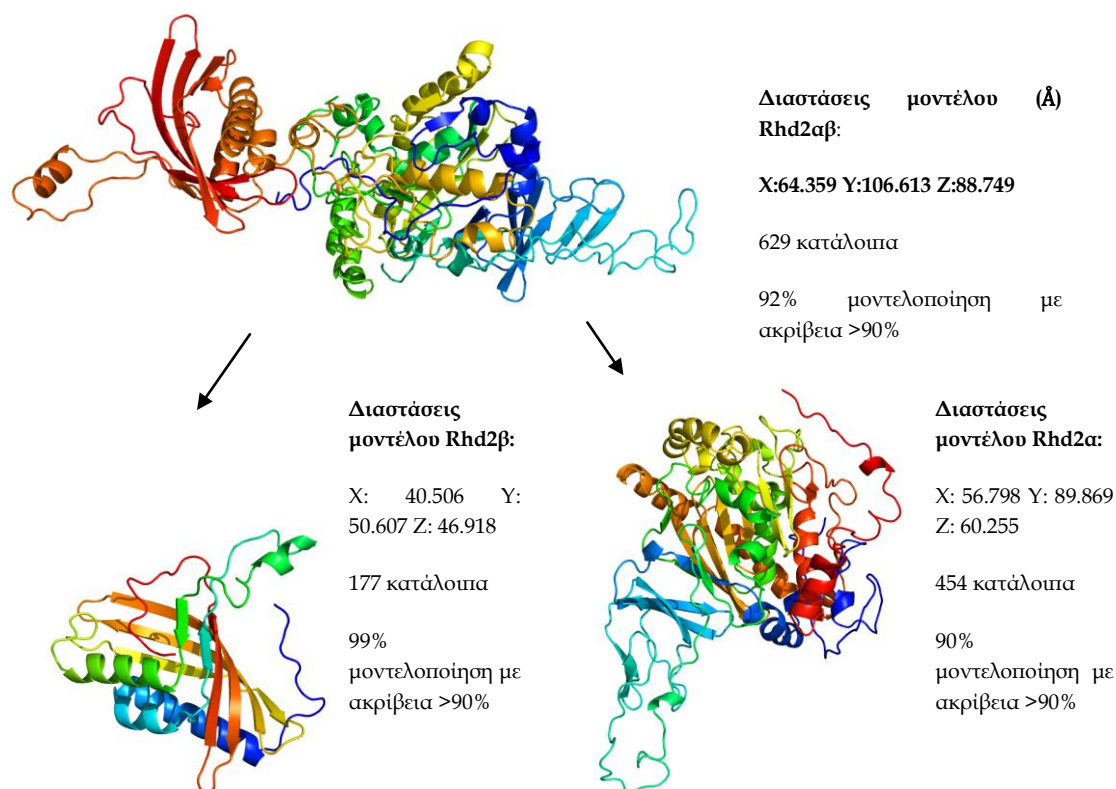
Σχήμα 3.2.2.1 3D μοντέλο της Rhd1αβ του Sphe.



Σχήμα 3.2.2.2 Αναπαράσταση της περιοχής του καταλυτικού κέντρου, της περιοχής του Rieske [2Fe-2S] κέντρου και της περιοχής δέσμευσης του ιόντος Fe.

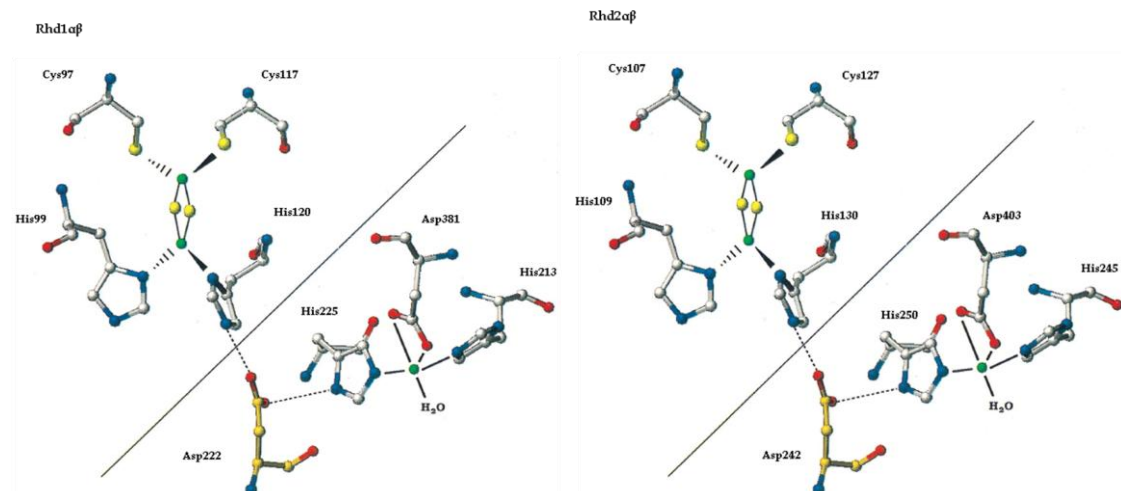
Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της Rhd1α και Rhd1β έγινε με βάση την 78% ομολογία, που παρουσιάζει η α υπομονάδα με την 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου του *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (NDO-O₁₂₀₃₈), η οποία δημοσιεύτηκε το 2005 (Gakhar *et al.*, 2005). Όπως όλες οι κρυσταλλικές δομές της 1,2-διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 (NDO-O₉₈₁₆₋₄) (Kauppi *et al.*, 1998), *Sphingomonas* CHY-1 (PHNI-O_{CHY-1}) (Jakoncic *et al.*, 2007) και *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (NDO-O₁₂₀₃₈) (Gakhar *et al.*, 2005) δείχνουν, ότι πρόκειται για ένα ετερομερές δομής α₃β₃, με τις τρεις α υπομονάδες και τις τρεις β υπομονάδες να σχηματίζουν τριμερή, προστατεύοντας ένα μεγάλο τμήμα της προσβάσιμης επιφάνειάς τους. Το σχήμα του εξαμερούς συμπλόκου ομοιάζει με αυτό ενός μανιταριού του οποίου το στέλεχος περιέχει τις β₃ υπομονάδες και το καπάκι τις α₃ υπομονάδες.

Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της Rhd2α και Rhd2β έγινε με βάση την μόλις 45% ομολογία που παρουσιάζει η Rhd2α με ISP τμήμα α υπομονάδας διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης και με την 40% ομολογία που εμφανίζει η β υπομονάδα με την NTF2-τύπου οικογένεια πρωτεϊνών (Murzin *et al.*, 1995). Δεν αντιστοιχίζεται λοιπόν η Rhd2αβ με κάποιο γνωστό μοντέλο διοξυγονάσης, αλλά η πρόβλεψη γίνεται με βάση τις συντηρημένες λειτουργικές περιοχές που εμφανίζουν διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης.



Σχήμα 3.2.2.3 3D μοντέλο της Rhd2αβ του *Srhe*.

Όπως προτάθηκε από τους Parales et al. (1999) για την NDO από *Pseudomonas* NCIB 9816-4, η δομή του ενεργού κέντρου και η προτεινόμενη πορεία μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κέντρο Rieske [2Fe-2S] της μιας α υπομονάδας γίνεται μέσω του γεφυρωτικού καταλοίπου του Asp205, στο μονοπύρρηνο σίδηρο της παράπλευρης α υπομονάδας (Parales et al., 1999) (§ 1.5.1.1, Σχήμα 1.5.1.1.3). Βάσει αυτού του μοντέλου, έγινε απεικόνιση του ενεργού κέντρου και της πορείας μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ δυο παράπλευρων α υπομονάδων μέσω του γεφυρωτικού καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος για την Rhd1α και την Rhd2α του στελέχους *Srhe3* (Σχήμα 3.2.2.4).

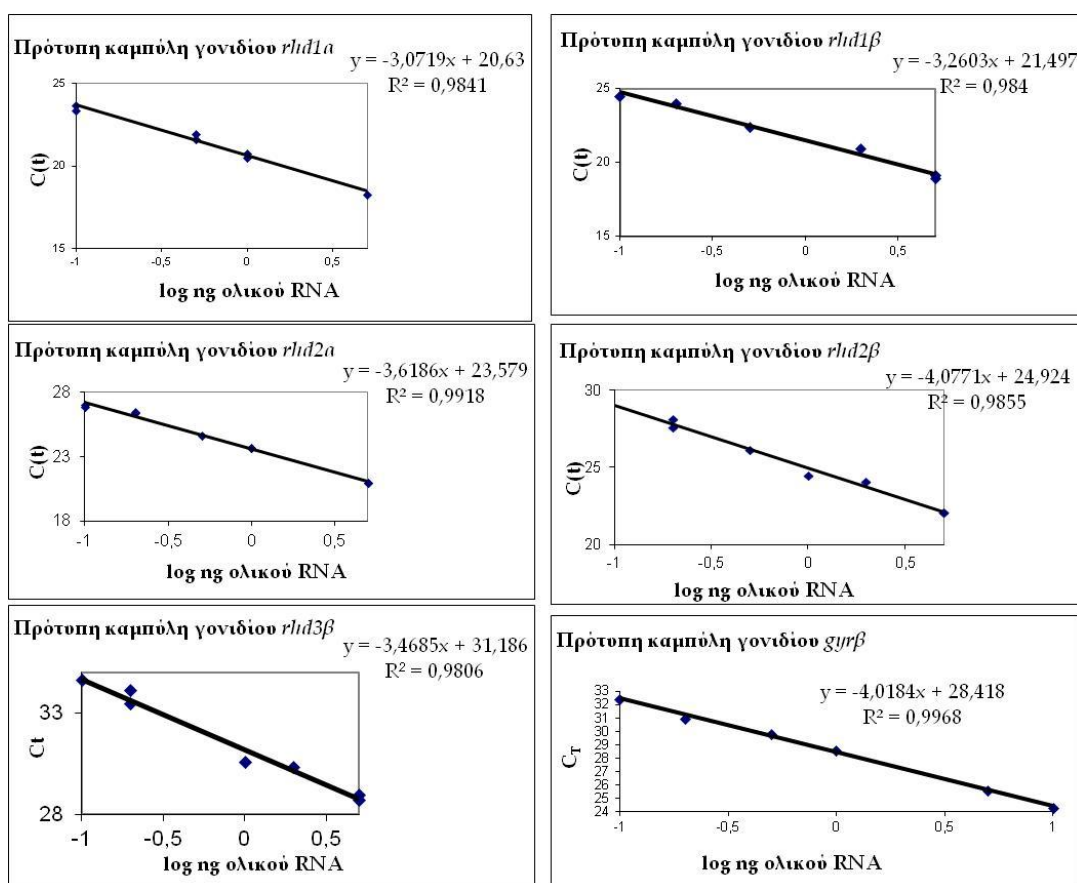


Σχήμα 3.2.2.4 Απεικόνιση του ενεργού κέντρου των Rhd1αβ και Rhd2αβ και προτεινόμενη πορεία ηλεκτρονίων από το κέντρο Rieske [2Fe-2S] της μιας α υπομονάδας, μέσω του γεφυρωτικού καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος (Asp222 για την Rhd1αβ και Asp242 για την Rhd2αβ) στο μονοπύρρηνο σίδηρο της παράπλευρης α υπομονάδας. Τα αμινοξέα άνω της διαγώνιας γραμμής εντοπίζονται στο κέντρο Rieske [2Fe-2S] της μιας α υπομονάδας, ενώ εκείνα κάτω από τη διαγώνια γραμμή εντοπίζονται στην καταλυτική περιοχή της παράπλευρης α υπομονάδας. Τα διαφορετικά χρώματα αναπαριστούν τα διαφορετικά άτομα. Κόκκινο: οξυγόνο, μπλε: άζωτο, κίτρινο: θείο, πράσινο: σίδηρος. Προσαρμογή του προτεινόμενου ενεργού κέντρου της NDO (Parales *et al.*, 1999), στις Rhd1αβ και Rhd2αβ του στελέχους Sphε3.

3.2.3 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *rhd1a* και *rhd1β* του πλασμιδίου pASPHE301, *rhd2a* και *rhd2β* του πλασμιδίου pASPHE302 και *rhd3β* του χρωμοσώματος

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος των γονιδίων *rhd1a*, *rhd1β*, *rhd2a*, *rhd2β*, *rhd3a* και *rhd3β* που πιθανώς κωδικεύουν για διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης στον καταβολισμό του φαινανθρενίου, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασής τους μέσω της τεχνικής της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση των ανωτέρω γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους Sphε3 που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9 με μοναδικές πηγές άνθρακα (i) φαινανθρένιο, (ii) γλυκόζη και (iii) φαινανθρένιο και γλυκόζη και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι § 2.8.1 και 2.11.1).

Όπως περιγράφεται στην § 2.12 (Υλικά και Μέθοδοι, Πειραματική πορεία qRT-PCR), η ποσότητα του RNA στα δείγματα προσδιορίστηκε σε σχέση με την ποσότητα του RNA ενός γονιδίου αναφοράς *gyrβ* και κάθε άγνωστο δείγμα κανονικοποιήθηκε ως προς το περιεχόμενο mRNA του γονιδίου αυτού. Η κατασκευή των προτύπων έγινε με χρήση εκμαγείου ολικού RNA- από κύτταρα ανεπτυγμένα σε γλυκόζη σε ποσότητες 10, 5, 1, 0.5, 0.2, και 0.1 ng (Johnson *et al.*, 2000)- που ενισχύθηκε σε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου με χρήση των εκκινητών που παρατίθενται του Πίνακα 2.2.3 (§ 2.2, Υλικά και Μέθοδοι) (Σχήμα 3.2.3.1).



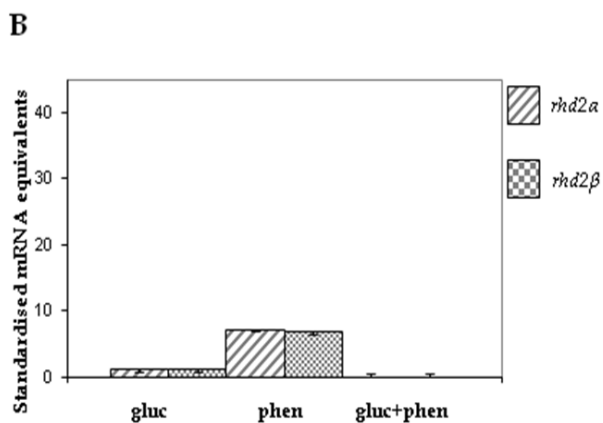
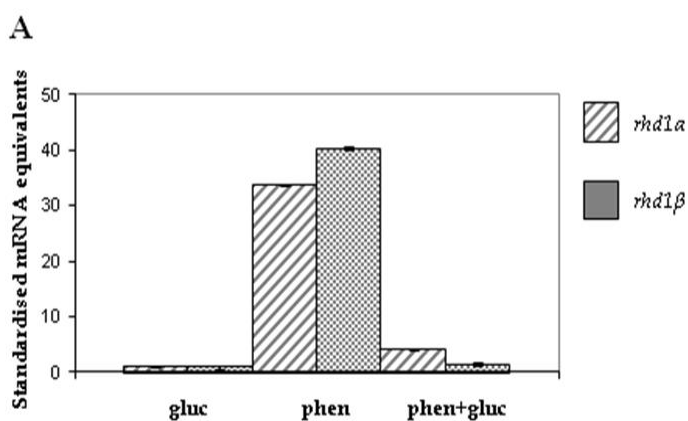
Σχήμα 3.2.3.1 Πρότυπες καμπύλες γονιδίων *rhd1α*, *rhd1β*, *rhd2α*, *rhd2β*, *rhd3β* και *gyrβ*.

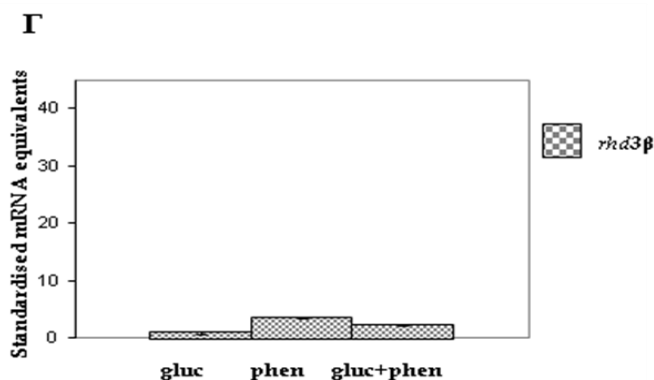
Δεν κατέστη δυνατή η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *rhd3α* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα, διότι το ζεύγος εκκινητών *rhd3α_{for}/rhd3α_{rev}* (Πίνακας 2.2.3) που σχεδιάστηκαν για ενίσχυση της περιοχής της μεγάλης υπομονάδας της

διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του χρωμοσώματος, κατόπιν επανειλημμένων προσπαθειών δεν έδωσε ποτέ προϊόν PCR.

Έτσι, στο σημείο αυτό θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της έκφρασης μόνον του *rhd3β* γονιδίου, που επίσης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα.

Η απόδοση (E) της qRT-PCR ενός κύκλου στην εκθετική φάση υπολογίστηκε από τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών σύμφωνα με την εξίσωση $E=10^{(-1/κλίση)}$ (Pfaffl, 2001; Corbella and Puyet, 2003) και βρέθηκε να είναι 2.1, 2.0, 1.9, 1.8 και 1.8 για τα *rhd1α*, *rhd1β*, *rhd2α*, *rhd2β*, *rhd3β* και *gyrβ*, αντίστοιχα, επιδεικνύοντας πολύ καλή γραμμικότητα (παράγοντες συσχέτισης $0.9806 < R^2 < 0.9968$). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης και συνοψίζονται στα γραφήματα που ακολουθούν (Σχήμα 3.2.3.2).





Γονίδια	Υποστρώματα		
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φαινανθρένιο+γλυκόζη
<i>rhd1a</i>	1±0,228	33,742±0,115	4,079±0,188
<i>rhd1β</i>	1±0,360	40,377±0,241	1,497±0,364
<i>rhd2a</i>	1±0,245	6,950±0,098	0,159±0,214
<i>rhd2β</i>	1±0,248	6,711±0,171	0,161±0,337
<i>rhd3β</i>	1±0,263	3,721±0,366	2,326±0,188

Σχήμα 3.2.3.2 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *rhd1a* και *rhd1β* (Α), *rhd2a* και *rhd2β* (Β) και *rhd3β* (Γ) στα υποστρώματα γλυκόζης, φαινανθρενίου και γλυκόζης με φαινανθρένιο. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrβ*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων παρουσία γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τοπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.2.3.2, η έκφραση των γονιδίων *rhd1a* και *rhd1β* είναι 33πλάσια και 40πλάσια, αντίστοιχα, σε κύτταρα καλλιέργειας με φαινανθρένιο σε σχέση με τη γλυκόζη. Η έκφραση των γονιδίων *rhd2a* και *rhd2β* παρουσία του φαινανθρενίου είναι 7πλάσια σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ το γονίδιο *rhd3β* εμφανίζει παρόμοια έκφραση σε κύτταρα από καλλιέργειες με φαινανθρένιο, γλυκόζη ή φαινανθρένιο με γλυκόζη μαζί. Αξιοσημείωτο είναι ότι παρουσία φαινανθρενίου μαζί με γλυκόζη στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των

κυττάρων, υπάρχει καταστολή της έκφρασης τόσο των γονιδίων *rhd1a* και *rhd1β* που βρίσκονται στο πλασμιδίο pASPHE301, όσο και των γονιδίων *rhd2a* και *rhd2β* που βρίσκονται στο πλασμιδίο pASPHE302.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η έκφραση των γονιδίων *rhd2a* και *rhd2β* του πλασμιδίου pASPHE302, παρουσία φαινανθρενίου είναι κατά 5 φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή των αντίστοιχων γονιδίων από το πλασμιδίο pASPHE301.

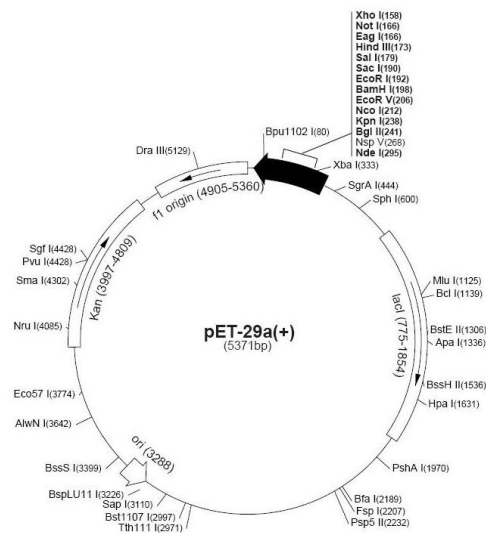
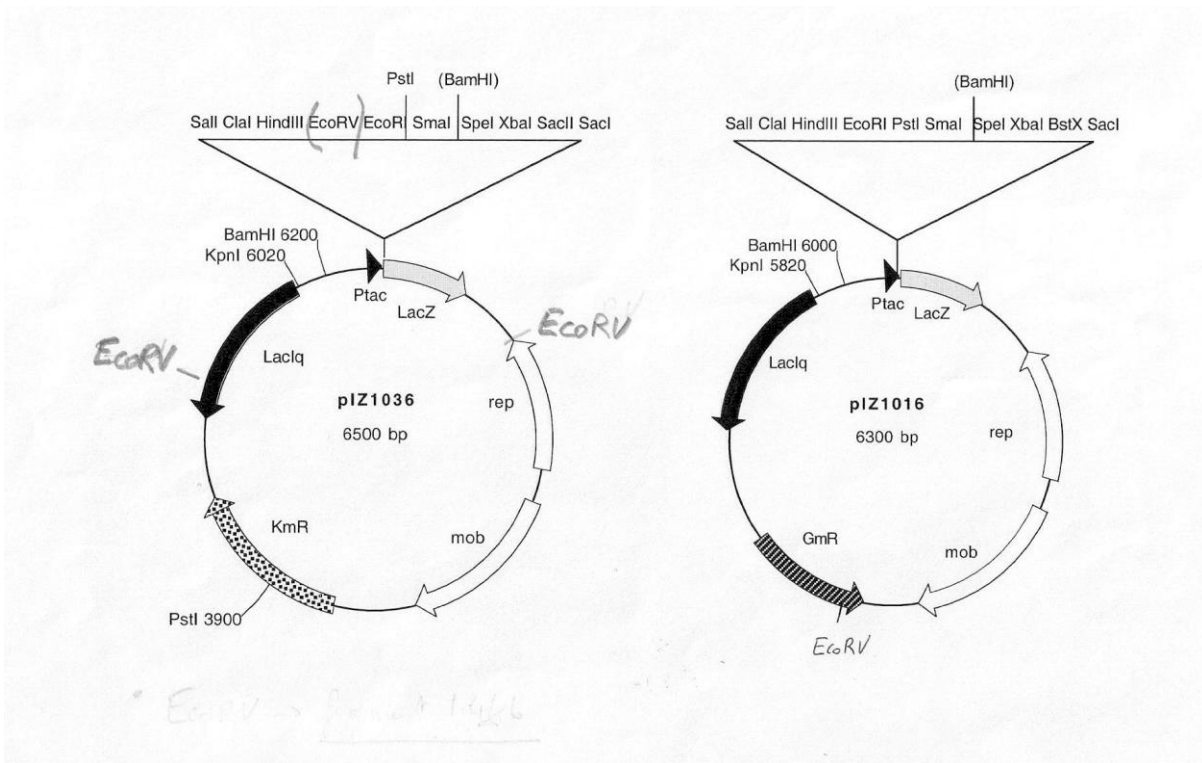
3.2.4 Κλωνοποίηση των γονιδίων *rhd1a* και *rhd1β* και υπερέκφραση των γονιδιακών προϊόντων

Όπως αναφέρθηκε τα γονίδια *rhd1a* και *rhd1β* που εντοπίστηκαν στο πλασμιδίο pASPHE301, πιθανώς κωδικεύουν για την α και β υπομονάδα της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα. Τα γονίδια αυτά εισχύθηκαν με PCR, κλωνοποιήθηκαν και υπερεκφράστηκαν τα γονιδιακά τους προϊόντα με σκοπό το λειτουργικό τους έλεγχο.

Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή § 1.5.1.1, για την ενζυμική μελέτη των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης απαιτείται η παρουσία των υπομονάδων της φερρεδοξίνης και της φερρεδοξίνης ρεδοκτάσης που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι ενζυμικές μελέτες πραγματοποιούνται *in vivo* με ανίχνευση προϊόντων διϋδροδιολών που προκύπτουν από την οξείδωση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Saito *et al.*, 2000).

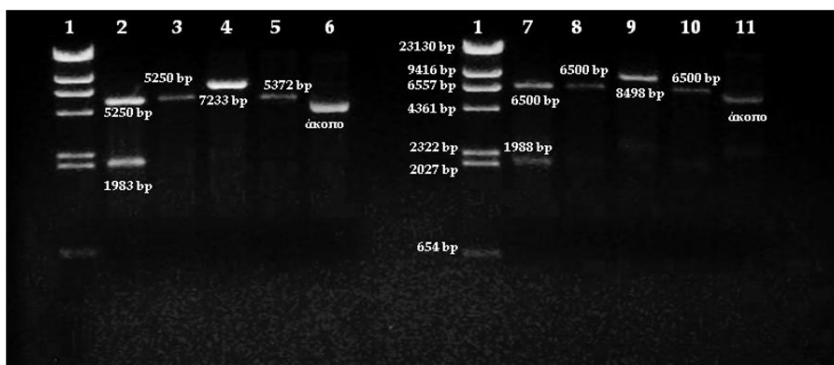
Η ομάδα του Yves Jouanneau (CEA, iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université J. Fourier, Grenoble, France), μας παραχώρησε τους φορείς κλωνοποίησης pIZ1016 και pIZ1036 (Σχήμα 3.2.4.1) (Moreno-Ruiz *et al.*, 2003), στους οποίους πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων *rhdαβ* συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής πρόσδεσης της ριβοσωμικής υπομονάδας (Ribosome binding site- Rbs). Επιπλέον, τα γονίδια *rhdαβ* συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής πρόσδεσης της ριβοσωμικής υπομονάδας κλωνοποιήθηκαν και σε φορέα pET29c(+) για πιο ισχυρή επαγωγή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης υπό τον προαγωγό T7 χωρίς να κωδικεύεται η ουρά ιστιδινών εφόσον δεν θα

ακολουθήσει απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας. Οι κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριό μας, ενώ τα πειράματα υπερέκφρασης και ανάλυσης των διϋδροδιολών με αέριο χρωματογραφία (GC) πραγματοποιήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Πούλη Μαρία και το συνεργαζόμενο στο πλαίσιο του προγράμματος «Ηράκλειτος II» εργαστήριο του Καθηγητού Αγάθου Σπυριδώνα, στη Louvain του Βελγίου.

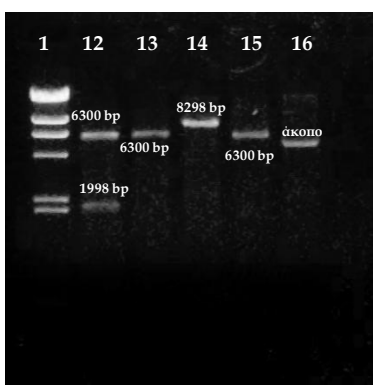


Σχήμα 3.2.4.1. Πλασμιδιακοί χάρτες φορέων κλωνοποίησης pIZ1036, pIZ1016 και pET29c(+).

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση με PCR των γονιδίων *rhdaβ* και τα οποία φέρουν κατάλληλες περιοριστικές θέσεις για την εν συνεχεία κλωνοποίηση των προϊόντων στους ανωτέρω φορείς φαίνονται στον Πίνακα 2.2.3 (§ 2.2, Υλικά και Μέθοδοι).



- Lane 1: λDNA/*Hind*III
 Lane 2: pET29c::*rhdaβ* /*Nde*I-*Hind*III (5250bp+1983bp)
 Lane 3: vector pET29c/*Nde*I-*Hind*III (5250bp)
 Lane 4: pET29c::*rhdaβ*/*Xba*I (7233bp)
 Lane 5: vector pET29c/ *Xba*I (5372bp)
 Lane 6: pET29c::*rhdaβ*/ άκοπο
 Lane 7: pIZ1036::*rhdaβ*/*Sal*I-*Hind*III (6500bp+1998bp)
 Lane 8: vector pIZ1036/ *Sal*I-*Hind*III (6500bp)
 Lane 9: pIZ1036::*rhdaβ*/*Hind*III (8498bp)
 Lane 10: vector pIZ1036/*Hind*III (6500bp)
 Lane 11: pIZ1036::*rhdaβ*/ άκοπο



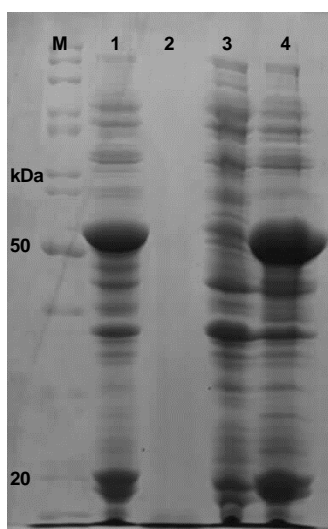
- Lane 12: pIZ1016::*rhdaβ*/*Sal*I-*Hind*III (6300bp+1998bp)
 Lane 13: vector pIZ1016/*Sal*I-*Hind*III (6300bp)
 Lane 14: pIZ1016::*rhdaβ*/*Hind*III (8298bp)
 Lane 15: vector pIZ1016/*Hind*III (6300bp)
 Lane 16: pIZ1016::*rhdaβ*/undigested

Σχήμα 3.2.4.2 Πέψεις με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες στους κλώνους pET29c::*rhdaβ*, pIZ1036::*rhdaβ* και pIZ1016::*rhdaβ*.

Στο Σχήμα 3.2.4.2 αποδεικνύεται η επιτυχής υποκλωνοποίηση, με πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, της αλληλουχίας των γονιδίων διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης (*rhdaβ*) του στελέχους *Srhe3* στους κατάλληλους φορείς κλωνοποίησης.

Τα πρώτα πειράματα για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης και οι *in vivo* δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα που έφεραν τα πλασμίδια (*pIZ36::rhdaβ*)(*pETDC21*) ή (*pIZ36::rhdaβ*)(*pET15b*) (Πίνακας 2.2.2), όπου δεν ανιχνεύτηκαν διϋδροδιόλες του φαινανθρενίου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* που εκφράζουν την ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη Pdo1 από *Mycobacterium* sp. 6PY1 (διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης πυρενίου και φαινανθρενίου) (Krivobok *et al.*, 2003), με ή χωρίς τις υπομονάδες που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου ανιχνεύτηκαν ύστερα από GC-ανάλυση προϊόντα οξείδωσης όπως 3,4 και 9,10-διϋδροδιόλες του φαινανθρενίου. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης με χρήση του πλασμιδίου *pET29c::rhdaβ* με στόχο την υπερέκφραση της διοξυγονάσης του στελέχους *Srhe3* στο φορέα *pET29c(+)*. Η ανάπτυξη σε LB των μετασχηματισμένων *E. coli* BL21(DE3) με το πλασμίδιο *pET29c::rhdaβ*, οδήγησε σε περιορισμένη ποσότητα βιομάζας. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* Rosetta με το πλασμίδιο *pET29c::rhdaβ*.

Στη συνέχεια τα κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο *pBRCD* το οποίο φέρει τις υπομονάδες της φερρεδοξίνης (*phdC*) και της ρεδουκτάσης (*phdD*) από *Nocardioides* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000). Εξετάστηκε επίσης σειρά κυττάρων, ως control, με το ίδιο πλασμίδιο χωρίς τις υπομονάδες που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων *pIZ-CD* (Πίνακας 2.2.2). Ένεκα του ότι το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι συμβατό με τους φορείς *pET*, τα κύτταρα δέκτες *E. coli* μετασχηματίστηκαν και με τα δυο ανωτέρω πλασμίδια *pET29c::rhdaβ* και *pBRCD*. Ακολούθησε επαγωγή με χρήση IPTG, ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie blue (Σχήμα 3.2.4.3).



Σχήμα 3.2.4.3 Ανάλυση SDS-PAGE της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Rhd1αβ σε *E. coli*.

Διαδρομή 1:(pET29c::*rhdαβ*),

Διαδρομή 2: Pdo1 πρωτεΐνη μάρτυρας,
 Διαδρομή 3: (pET29c:: *rhdαβ*)(pBRCD),
 Διαδρομή 4: (pET29c:: *rhdαβ*)(pIZ-CD)
 Διαδρομή M: πρότυπο μοριακών βαρών

Στο Σχήμα 3.2.4.3 φαίνονται καθαρά δυο πολυπεπίδια των αναμενόμενων μεγεθών για την υπομονάδα α (~50 kDa) και για την β (~20 kDa), στις διαδρομές 1 και 4. Στη διαδρομή 3, που αντιστοιχεί σε κύτταρα που φέρουν τα πλασμίδια (pET29c::*rhdαβ*) (pBRCD), φαίνεται πως λείπει η μεγάλη υπομονάδα (α) της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του στελέχους Sph63. Τέλος, στη διαδρομή 2 δεν εμφανίζεται η αναμενόμενη ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Pdo1 που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας, κάτι που πιθανόν να οφείλεται σε κάποιο λάθος κατά την κατεργασία του αντίστοιχου δείγματος.

Τα ανωτέρω μετασχηματισμένα κύτταρα επώαστηκαν με 100 mg L^{-1} φαινανθρένιο προκειμένου να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα. Σε όλες τις καλλιέργειες ταυτοποιήθηκαν 3, 4-διϋδροδιόλες του φαινανθρενίου με ανάλυση GC κι έτσι αποδεικνύεται ότι τα γονιδιακά προϊόντα των γονιδίων *rhdαβ* αντιστοιχούν στις α και β υπομονάδες διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα (RHD). Η παρουσία των υπομονάδων που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα της διοξυγονάσης κι έτσι είναι πιθανόν μεταφορείς ηλεκτρονίων των κυττάρων δέκτη *E. coli* να υποκαθιστούν/ αναπληρώνουν τους ειδικούς μεταφορείς ηλεκτρονίων του συστήματος της διοξυγονάσης. Τα καλύτερα και με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας, σε σχέση με το

εσωτερικό πρότυπο 2-,3-διϋδροξυδιφαινύλιο, επέδειξαν οι καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* με pET29c::*rhdaβ* που επέφεραν πιο αποτελεσματική οξείδωση του φαινανθρενίου (Διδακτορική διατριβή Μαρίας Πούλη).

3.2.4.1 *In vivo* δοκιμές οξείδωσης διαφορετικών υποστρωμάτων PAHs από την διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης Rhdaβ

Προκειμένου να εξεταστεί η εξειδίκευση ή μη της Rhdaβ χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* με pET29c::*rhdaβ* που επέφεραν αποτελεσματική οξείδωση του φαινανθρενίου εις διπλούν. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε LB για 5 ώρες στους 37 °C και ακολούθησε επαγωγή με IPTG 0.2 mM και επώαση Ο/Ν. Εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν, εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε οπτική απορρόφηση OD₆₀₀ περίπου 2 σε MM M9 και 0.2% (v/w) γλυκόζη. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 5 h παρουσία διαφορετικών PAHs (100 mg L⁻¹) και ταυτοποίηση των διϋδροδιολών με αέρια χρωματογραφία GC. Εξετάστηκαν οι ακόλουθοι PAHs: φαινανθρένιο, ναφθαλένιο, φλουρένιο, καρβαζόλιο, ανθρακένιο, φλουορανθένιο, πυρένιο, χρυσένιο, βενζο[α]πυρένιο και βενζο[α]ανθρακένιο.

Κατόπιν σύγκρισης των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων με εκείνα των προτύπων, παράγωγα διϋδροδιολών ανιχνεύτηκαν μόνο στα δείγματα επώασης των κυττάρων με φαινανθρένιο. Τα παράγωγα αυτά αντιστοιχούν σε 3,4-διϋδροδιόλες του φαινανθρενίου, όπως φάνηκε και για προηγούμενα αποτελέσματα. Δεν εντοπίστηκαν κορυφές για τα δείγματα κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία άλλων PAHs χαμηλότερου ή υψηλότερου μοριακού βάρους (Διδακτορική διατριβή Μαρίας Πούλη).

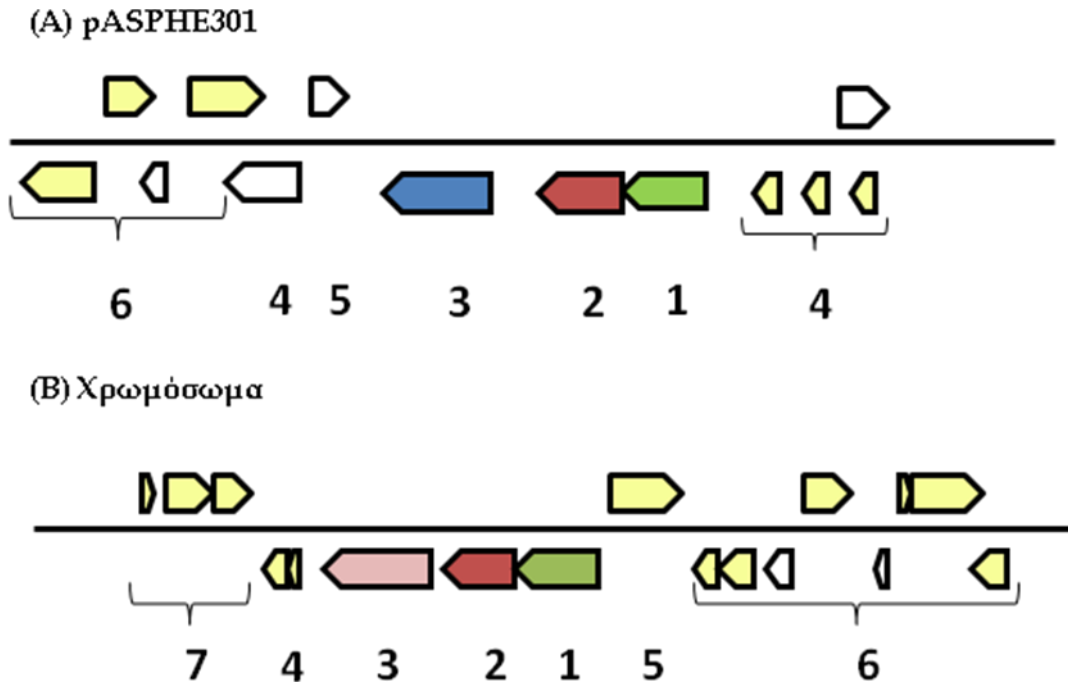
3.3 Διοξυγονάσεις του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (§ 1.5.2), εκτός από τις διοξυγονάσεις υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα, μια άλλη μεγάλη κατηγορία

διοξυγονασών που εμπλέκονται στον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων είναι οι διοξυγονάσες σχάσης του αρωματικού πυρήνα. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (1H2NA), προϊόν καταβολισμού του φαινανθρενίου (Σχήμα 1.4.2).

Η ανάλυση του πλήρους γονιδιώματος του στελέχους *Srhe3* έδειξε την ύπαρξη δυο γονιδίων διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (1H2NA). Το ένα εντοπίστηκε στο καταβολικό πλασμίδιο *pASpHE301* και ονομάστηκε *diox1*, ενώ το δεύτερο στο χρωμόσωμα και ονομάστηκε *diox2* (Σχήμα 3.3.1). Τα δυο αυτά γονίδια εμφανίζουν 90% μεταξύ τους ταυτότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και 93% σε αμινοξικό επίπεδο.

Στο Σχήμα 3.3.1 απεικονίζεται η οργάνωση των γονιδίων *diox1* και *diox2* στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3*. Καθοδικά των γονιδίων *diox1* και *diox2* εντοπίζεται το γονίδιο της υδρατάσης-αλδολάσης της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος. Ο χαρακτηρισμός αυτού του γονιδίου ως υδρατάση-αλδολάση της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού, το οποίο έχει καταχωρηθεί από το JGI ως διϋδροπικολινική συνθάση/λυάση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος [Σχήμα 3.3.1, (A) και (B): 2], βασίζεται στην ομολογία σε ποσοστό 77% (σε αμινοξικό επίπεδο) που εμφανίζει με την αντίστοιχη υδρατάση-αλδολάση του στελέχους KP7 των *Nocardiooides* (Iwabuchi and Harayama, 1998a). Πρόκειται για το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του *trans*-2-καρβοξυβενζαλκυροσταφυλικού οξέος (προϊόν οξείδωσης του 1-H2NA) σε 2-καρβοξυβενζαλδεΐδη και πυροσταφυλικό (Σχήμα 1.4.2).



Σχήμα 3.3.1. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των γονιδίων *diox1* στο πλασμίδιο pASPHE301(A) και *diox2* στο χρωμόσωμα (B) του στελέχους Sph3. (A): 1. *diox1*, 2. υδρατάση-αλδολάση της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (JGI: διϋδροπικολινική συνθάση/λύαση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος), 3. αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης (JGI: NAD-εξαρτώμενη αλδεΐδη), 4. υποθετικές πρωτεΐνες, 5. πρωτεΐνη αντιγραφής του DNA και 6. τρανσποζάσες.

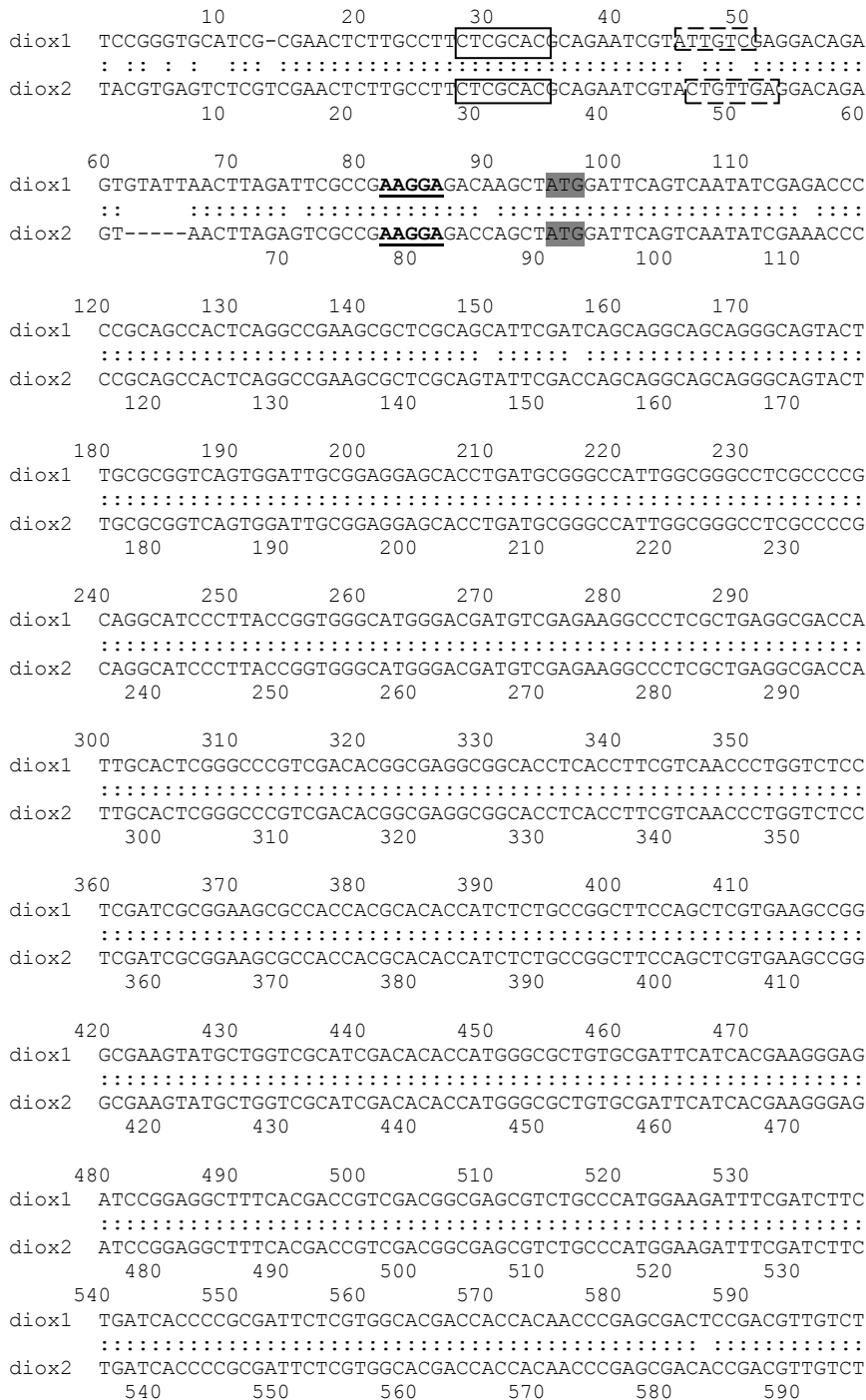
(B): 1. *diox2*, 2. υδρατάση-αλδολάση της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (JGI: διϋδροπικολινική συνθάση/λύαση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος), 3. πιθανός μεταφορέας του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (JGI: περμάση εκροής αραβινόζης), 4. υποθετικές πρωτεΐνες, 5. ιντεγράση, 6. τρανσποζάσες και υποθετικές πρωτεΐνες και 7. τρανσποζάση της οικογενείας *IS4*.

Επιπλέον, το ένζυμο που φέρει το χαρακτηρισμό της αφυδρογονάσης NAD-εξαρτώμενης αλδεΐδης (JGI) και βρίσκεται πλησίον της υδρατάσης-αλδολάσης της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού στο pASPHE301 [Σχήμα 3.3.1, (A): 3], χαρακτηρίστηκε ως αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης εφόσον εμφανίζει 74% ομολογία (σε αμινοξικό επίπεδο) με το αντίστοιχο ένζυμο του στελέχους *Nocardioides* KP7 (Iwabuchi and Harayama, 1997). Η αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης καταλύει την μετατροπή της καρβοξυβενζαλδεΐδης σε ο-φθαλικό οξύ (Σχήμα 1.4.2).

Στο χρωμόσωμα, η περμεάση εκροής αραβινόζης (όπως χαρακτηρίστηκε από το JGI) [Σχήμα 3.3.1, (B): 3] που βρίσκεται πλησίον της υδρατάσης-αλδολάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος παρουσιάζει ομολογία σε

ποσοστό 88% (σε αμινοξικό επίπεδο) με πιθανό μεταφορέα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Nocardioides* sp. KP7, κάτι που την καθιστά πιθανό μεταφορέα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος.

Έγινε σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *diox1* και *diox2*, συμπεριλαμβανομένων και των 5' πλευρικών τους περιοχών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3.2.



```

600      610      620      630      640      650
diox1  GGCTCGACGGCCTCGACATAGGCCTTCTCTTCGCGCCTCGGTGCAGTCTACTACGAGCCCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  GGCTCGACGGCCTCGACATAGGCCTTCTCTTCGCGCCTCGGTGCAGTCTACTACGAGCCCT
      600      610      620      630      640      650

660      670      680      690      700      710
diox1  ACGGCGACGACAGCCAGAACGTGCGCCCTTCGAGCAGCGAAGGCATCGGAACCCGCGAGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  ACGGCGACGACAGCCAGAACGTGCGCCCTTCGAGCAGCGAAGGCATCGGAACCCGCGAGCC
      660      670      680      690      700      710

720      730      740      750      760      770
diox1  ACTGGCTGCGTCCAACGTGGGAACGCGGTTCGCGAGAGCAGACTGCCCGTGCCTATCCCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  ACTGGCTGCGTCCAACGTGGGAACGCGGTTCGCGAGAGCAGACTGCCCGTGCCTATCCCT
      720      730      740      750      760      770

780      790      800      810      820      830
diox1  GGAGCGAAGTCAAAGCGCGCTCAATCTCTACGACCTCGACGCGGGCAACCCCTTACGACG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  GGAGCGAAGTCAAAGCGCGACTCGACCTCTACGATCTCTCAGCCGGGAATGAGTTCGACG
      780      790      800      810      820      830

840      850      860      870      880      890
diox1  GGCTGGCGCTGCGATACGCCAATCCGGTACTGGTGGCCCGACGATGGCCACCATGGACT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  GACTGCGCCTGCGTACGCCAACCCCGTACGCGGGCGGGCCACCATGCCGACCATGGACT
      840      850      860      870      880      890

900      910      920      930      940      950
diox1  GCTGGGTGCAACGCCTCGCCCCAGGGTTCGATGGCAAGGCCACCGCCGTTTCATCCAGCG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  GCTGGGTGCAACGCCTCGCCCCAGGGTTCGATGGCCGCACGCACCGCCGTTTCATCCAGCG
      900      910      920      930      940      950

960      970      980      990      1000      1010
diox1  CGGTCACTTACGTTATCTCTGGCTCCGGCTCGTTCGTCACCGATGACGAGACGATCAGCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  CGATCACCTACGTCATCTCGGGTTCGGGCACGATGCAGACTGACACCGAGACGATCACGT
      960      970      980      990      1000      1010

1020      1030      1040      1050      1060      1070
diox1  TCGTGCCCGGCGACGTCATCGCGCTTCCGAACTGGACTAACTTTTCGATGGGTGAATGCCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  TCTCGGCAGGTGATGTCATCACGCTCCCGAACTGGACGAACTTCCGGTGGACGAAACGACT
      1020      1030      1040      1050      1060      1070

1080      1090      1100      1110      1120      1130
diox1  CCCCAGACTGAGTCGGTACAGCTCTTCTCGATGCACGACATTCCCTGCACTGCAGGCTTTTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  CCGCCACCGAGCCGGTTCAGCTCTTCTCGATGCATGACATTCCCGCGCTGCAGGCGTTCG
      1080      1090      1100      1110      1120      1130

1140      1150      1160      1170      1180      1190
diox1  GCCTGCTTACGAAGAACCAGGAAATCGATTCTCAACGCGACACCCGCGCCCGTGAACCCTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  GACTGCTTATGAAGAGCCGAGTCGATCCTCAACGCGACCCCTGCGCCCGGAAATCCCT
      1140      1150      1160      1170      1180      1190

1200      1210      1220      1230      1240      1250
diox1  CTCCGCCACTCAAGCCAATCTACCGGGCTGGCGCCTTCTACGATCAGGATGAACATACTGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
diox2  CGCCCTCGCTCAAGCCGATCTACCGTCCCGGCGCCTTCTACGACAGGACGAACTGACTGA
      1200      1210      1220      1230      1240      1250

```

Σχήμα 3.3.2. Πλήρης στοίχιση των νοουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *diox1* και *diox2* συμπεριλαμβανομένων και των 5'-πλευρικών αυτών αλληλουχιών. Σε πλαίσιο με συμπαγείς και με διακεκομμένες γραμμές σημειώνονται οι προβλεπόμενες -35 και -10 περιοχές των πιθανών περιοχών προαγωγών, ενώ τα κωδικόνια έναρξης και τερματισμού σημειώνονται σε γκρι φόντο.

Με έντονη γραφή και υπογράμμιση φαίνεται η περιοχή Shine-Dalgarno, συμπληρωματική με το 3' άκρου του γονιδίου 16S rRNA.

```

B.cen_GDO      -----MTHPDATARAYARIAEQRLAHLWESLHNLVPTS--PQPAQAAI
A.aven_GDO     ----MDTTTLARPAEAGAQTSARQAYYDRIARHGMAHLWESLHSLVPRE--PRPQAVPAF
E.col_GDO      -----MTDNNQNSREQFYQHISGQNLTHLWESLHHLVPKT--PNANCAPAY
X.pol_GDO      -----MSFAKAPMDTAERQNFYKKIDDQSYTALWTVLNNIITPE--PRSNCLPHV
P.sal_SDO      MQNEKLDHESVTQAMQPKDTPELRALYKSFEEESIIEHLWTQLGDLMPH--PKSKAVPHV
B.hal_GDO      -----METNAFFQSKEVLDNFNKLQNYHLGHLWVSIPEIMHKE--PKPDAVPYL
Diox1          -----MDSVNIETPAATQAEALAVFDQQAAGQYLRGQWIAEEHLMRAIGGPRPAGIPYR
Diox2          -----MDSVNIETPAATQAEALAVFDQQAAGQYLRGQWIAEEHLMRAIGGPRPAGIPYR
Noc_HNDO       -----MNSSNTGAPEAAQAATLEAFDRRAEQYLRGQWIAEEHLMRAIGGPRPAGIPYR
Myc_HNDO       -----MSTAEISGLHEFDAELEAANLRGQWIIYDDMLESVVGPKPAGVFPFL

```

```

B.cen_GDO      WKYAQVRDLVMQAGSVISA-EEAVRRLVLEENPGLP-----GKSSMTPNLYAGLQLLILPG
A.aven_GDO     WRYEDVRPLVMQAGELISA-EEAVRRLVLEENPGLP-----GRASITSTLYAGLQLLILPG
E.col_GDO      WNYQEIRPLLESGLLIGA-KEAVRRLVLEENPALR-----GQSSITATLYAGLQLLIMPG
X.pol_GDO      WRFHEAKDYLLLEAGGLITA-KEAERRVLEENPGLR-----GQSRITTSLYAGLQIVMPD
P.sal_SDO      WKWSTLLRLARKSGELVPVGRGGERRALGLANPGLG-----GNAYISPTMWAGIQYLGPR
B.hal_GDO      WKWETIEKKLQEATEIFTPDRGGERRAIFYLANPGTLNRKPPGWASTNTLYAAVQLLILPG
Diox1          WAWDDVEKALAEATIALGP-VDTARRHLTFVNPGLLD----RGSATHTTISAGFQLVKPG
Diox2          WAWDDVEKALAEATIALGP-VDTARRHLTFVNPGLLD----RGSATHTTISAGFQLVKPG
Noc_HNDO       WEWKSVEVALDEATIALGP-VDTARRHLTFVNPGLMD----RGSATHTTISAGFQLVKPG
Myc_HNDO       WRWQDVHAKLLKSCDVMP-E-SLTARRNLSFINP-----DARGTHTTINMGMQMLKPG

```

Μοτίβο 1

Μοτίβο 2

	H	H	E	G		G	P	G	H	N																																																		
B.cen_GDO	E	I	A	P	S	H	R	H	T	Q	S	A	L	R	F	I	V	E	G	N	-	G	A	T	V	A	N	G	E	R	T	T	M	H	F	G	D	F	I	I	T	P	S	W	A	W	H	D	H	G	N	P	S	V	E	D	G	G	E	
A.aven_GDO	E	V	A	P	S	H	R	H	T	Q	S	A	L	R	F	I	V	E	G	K	-	G	A	T	V	A	N	G	E	R	T	T	M	H	F	G	D	F	I	I	T	P	S	W	T	W	H	D	H	G	N	P	A	A	E	D	E	G	G	E
E.col_GDO	E	V	A	P	S	H	R	H	N	Q	S	A	L	R	F	I	V	E	G	K	-	G	A	F	T	A	V	D	G	E	R	T	P	M	N	E	G	D	F	I	L	T	P	Q	W	R	W	H	D	H	G	N	P	----	G	D	E			
X.pol_GDO	E	V	A	P	A	H	R	H	S	Q	S	A	L	R	L	V	L	D	G	N	-	G	A	H	T	S	V	D	G	E	R	T	I	M	S	F	G	D	F	I	I	T	P	P	W	T	W	H	D	H	G	N	S	----	T	D	E			
P.sal_SDO	E	T	A	P	E	H	R	H	S	Q	N	A	F	R	F	V	E	G	E	-	G	W	T	V	V	N	G	D	P	V	R	M	S	R	G	D	L	L	L	T	P	G	W	C	F	H	G	H	N	D	----	T	D	Q						
B.hal_GDO	E	V	A	P	S	H	R	H	T	Q	S	A	L	R	F	I	Q	K	G	K	-	G	A	Y	S	T	V	Q	Q	R	L	F	M	E	E	G	D	F	L	T	T	P	K	G	L	W	H	G	H	E	G	----	T	D						
Diox1	E	V	C	W	S	H	R	H	T	M	G	A	V	R	F	I	T	K	G	D	P	E	A	F	T	T	V	D	G	E	R	L	P	M	E	D	F	D	L	L	I	T	P	R	F	S	W	H	D	H	N	P	S	----	D	S				
Diox2	E	V	C	W	S	H	R	H	T	M	G	A	V	R	F	I	T	K	G	D	P	E	A	F	T	T	V	D	G	E	R	L	P	M	E	D	F	D	L	L	I	T	P	R	F	S	W	H	H	H	N	P	S	----	D	T				
Noc_HNDO	E	V	C	W	S	H	R	H	T	M	S	A	V	R	F	V	T	K	G	H	P	D	A	F	T	A	V	D	G	E	R	L	P	M	E	D	F	D	L	L	I	T	P	R	F	S	W	H	D	H	N	S	G	----	D	A				
Myc_HNDO	E	I	A	Y	A	H	R	H	T	M	A	A	L	R	F	A	I	Q	G	G	P	L	V	T	V	D	G	E	P	C	M	D	T	Y	D	L	V	L	T	P	R	T	W	H	D	H	E	N	A	T	----	S	E							

```

B.cen_GDO      PVVWLDGLDIPLVANLDAGFAENYPEAVQPVNRPEGDSFARFGHN--MVPVRHRVSDPTS
A.aven_GDO     PVVWLDGLDIPLIHLDAGFAENYPEAVQPVNRAEGHSFATFGHN--MAPVRHRAADPTS
E.col_GDO      PVIWLDGLDLPLVNLIGCGFAEDYPPEEQPVTRKEGDYLPRYAAN--MLPLRHQTGN-SS
X.pol_GDO      PMIWLDGLDIAVVSFLDASFEEYGADEQPIVHNIGDSSARYGAN--LMPVDFVHKGLAS
P.sal_SDO      PMAWIDGLDIPFSQQMDVGFEEFGSDRVTDYATPNFSRGERLWCHPGLRPLSGLQNTVAS
B.hal_GDO      PMYWMDCLDIPFIYSTGATFFEPHPEKLESPLPDNYGARKYQGG--MVRPIGDRNRQDA
Diox1          DVVWLDGLDIGLLFALGAVYYEYPYGDDSQNVRP---SSSEGIGTRSHWLRPTWERGRESR
Diox2          DVVWLDGLDIGLLFALGAVYYEYPYGDDSQNVRP---SSSEGIGTRSHWLRPTWERGRESR
Noc_HNDO       DVVWLDGLDIGLLQSLGAVFYEYPYGDDSQNVRP---SSSEGIGTRSHWLRPTWERGRESR
Myc_HNDO       NVVWLDVLDIGLVGLNVPFYEYPYEGEMRQPQRE---DPGEHLADRGMLRPAWEQVKAAN

```

```

B.cen_GDO      PVFSYPYARSREALDALYRNGE-----LDAWDGVKLRVNPATGGWPMPTIATFMQFLPA
A.aven_GDO     PIFSYPYDRSREALDQLFRQGE-----LDAWDGVKLRVNPATGGWPMPTMATFLQLFLPA
E.col_GDO      PIFNYRYDRSREVLHDLTRLGD-----ADEWDGYKMRVNPVTTGGYPMPMSMGAFLLQLLPK
X.pol_GDO      PIFNYPYERSREALALKKSQE-----WDRCHGLKMRVNPVDGGWAMPPTIATGLQLLPK
P.sal_SDO      FIGAYRWEFTDRALTEQLLLEDEGQPATVAPGHAAIRVNPPTGGDVMPTRLRCEFHRLRA
B.hal_GDO      PLGSYKWTQTEAALEGLSAFEP-----DPFDGTAVEFINPSTGQTANPTIAAWMQLLPT
Diox1          LPVRYPWSEVKARLNLYDL DAG-----NPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAP
Diox2          LPVRYPWSEVKARLDLYDLSAG-----NEFDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAP
Noc_HNDO       LPIRYPWKEVNARLDVYDL DAG-----TPYDGLALRYANPVTGGPTMATMDCWVQRLAP
Myc_HNDO       FPYRYPWRDVERQLQRMAGLAG-----SPYDGVVLRVNPVTTGGSTMPTLDCWVQLLRP
               *      *                       .: : ** *       .: :       .: *

```

```

              Μοτίβο 3                    Μοτίβο 4
          G   H H   E       G             G   P G H   N
B.cen_GDO  -GFDGRPYRSTDATVYCI VEGSGTAVVGDQAFAPAFPHDIFVAP---SWAPVRLSASRDSVL
A.aven_GDO  -GFQGRTRYRATDATVFSVVEGSGSTARIGGSTFQFGPRDFTVAP---SWVPVQLAATQDAVL
E.col_GDO   -GFASRVARTT DSTIYHVVEGSGQVIIGNETFSFSKDI FVVP---TWHGVSFQTTQDSVL
X.pol_GDO   -GFSAAPYRST DAMVFVVLEGS GKSQIGGKEI IWGPKDVFVAP---SWHWVTHMPLLETVF
P.sal_SDO   -GTETATRNEVGSTVFQVFEAGAVVMNGETTKLEKGD MFVVP---SWVPWSLQPAETQFDL
B.hal_GDO   -GFHSKAHRHTNSAIYHVYKGE GYTVIDGIRYDWSFGDYFVVPNW-AWHEHVNLSSTKEALL
Diox1       -GFDGKAHRSSSAVTYV I SGSGSFVT DDE T ISFVHG DVI ALPNWTFNFRWVNASPTESVQL
Diox2       -GFDGRTHRRSSSAITYVI I SGSGTMQT DTE T ITFSAG DVI T LFNWTFNFRWTFNDSATEPVQL
Noc_HNDO    -GFDGKSHRRSSSAITYVI I SGSGTMVTE D E T I T F N R G D V I S L P N W T F R W T N D S E I E P V L L
Myc_HNDO    -GQQTEAHRHTSSAVYFVVRGEGTTTVVDGVELDWGHHDSFVVPNWSTHHEVNRSAENALL
          *-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

```

```

B.cen_GDO      FSYSDRPVLSALNLLREARD-----
A.aven_GDO     FSYSDRPVQIALNLHRELRM-----
E.col_GDO      FSYSDRPVQEALGLFREARY-----
X.pol_GDO      FTYSDRVAQEKLGWLWREDRGNQE-----
P.sal_SDO      FRFSDAPIMEALSFMRTKIEGQK-----
B.hal_GDO      FSTNDLPIMEMLGLQQEEVYPRNQGYQEIKGEFAPLFA-----
Diox1          FSMHDI PALQAFGLLYE EPESILNATPAPVNP TPPLKPIYRAGAFYDQDEL
Diox2          FSMHDI PALQAFGLLYE EPESILNATPAPANPSPSLKPIYRPGAFYDQDEL
Noc_HNDO       FSMHDI PALEAFGLLYE EPAILNATPAPINPTPSLNPIYRPGAFYDQDEL
Myc_HNDO       FSVNDI PTLKALDLYE EP ELSLGTQPFPPVPANLRAR-----
               *      *           .: :

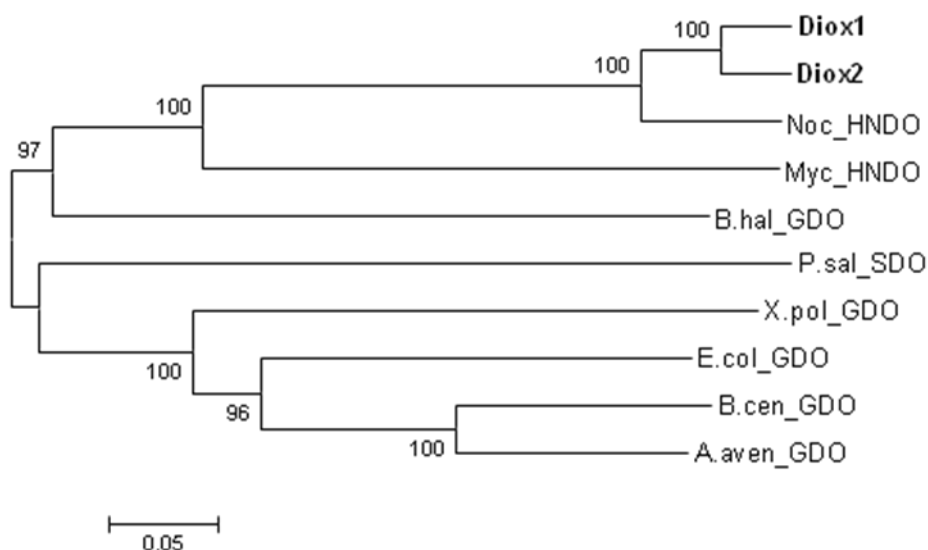
```

Σχήμα 3.3.3. Πλήρης στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών των Diox1, Diox2 με εκείνες άλλων συγγενών προς αυτές διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα που βρίσκονται κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο. Οι συντμήσεις είναι οι εξής (οι αριθμοί κατάθεσης σε διεθνείς βάσεις δεδομένων του διαδικτύου δίνονται στις παρενθέσεις):

B.cen_GDO: *Burkholderia cenocepacia* MCO-3, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (YP_001777018.1); A.aven_GDO: *Acidovorax avenae* ATCC19860, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (YP_004232675.1); E.col_GDO: *E. coli* O157:H7 strain EDL933, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (Q8X655); X.pol_GDO: *Xanthobacter polyaromaticivorans*, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (BAC98955.1); P.sal_SDO: *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, διοξυγονάση του 1,2-σαλικυλικού οξέος (AAQ91293.1); B.hal_GDO: *Bacillus halodulerans* C-125, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (NP242868.1); Diox1: *A.phenanthrenivorans*, διοξυγονάση του 1H2NA (YP_004243241.1); Diox2: *A. phenanthrenivorans*, διοξυγονάση του 1H2NA (YP_004241483.1); Noc_HNDO: *Nocardia* sp. KP7, διοξυγονάση του 1H2NA (BAA31235.2); Myc_HNDO: *Mycobacterium* sp. CH1, διοξυγονάση του 1H2NA (ACN38281.1); Συντηρημένα αμινοξέα μεταξύ πρωτεϊνών της cupin οικογενείας (consensus amino acid residues) φαίνονται άνωθεν των συγκρινόμενων αλληλουχιών. Τα μοτίβα cupin στο N-τελικό άκρο περικλύονται σε συμπαγές πλαίσιο, ενώ τα αντίστοιχα στο C-τελικό άκρο σε διακεκομένο πλαίσιο. Τέσσερα κατάλοιπα ιστιδίνης, στοιχειώδη για τη δράση διοξυγονάσης σκιάζονται με γκρι χρώμα. Με ρόμβους και μέσα συμπαγές πλαίσιο φαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για το διαχωρισμό διοξυγονασών 1H2NA (Gln32 και His80, για τις Diox1 και Diox2) από τις υπόλοιπες διοξυγονάσεις του γεντισικού και σαλικυλικού οξέος, σύμφωνα με τους Ferraroni *et al.* (2012).

Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών Diox1 και Diox2 με εκείνες γνωστών διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα που είναι κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο, έδειξε την ύπαρξη συντηρημένων *cupin* περιοχών, χαρακτηριστικές αυτών των διοξυγονασών (Σχήμα 3.3.3). Οι διοξυγονάσες του 1-H2NA φαίνεται λοιπόν να είναι μέλη της *cupin* οικογενείας πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν κάποια χαρακτηριστικά μοτίβα και πιο συγκεκριμένα ένα μοτίβο δέσμευσης μετάλλων: G(X)₅HXH(X)_{3,4}E(X)₆G καθώς κι ένα δεύτερο μοτίβο: G(X)₅PXG(X)₂H(X)₃N, όπως αναλυτικά έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή (§ 1.5.2.2). Δυο κατάλοιπα ιστιδίνης (HXH) στο πρώτο μοτίβο και μια ιστιδίνη στο δεύτερο μοτίβο, όλες στοιχειώδεις για την ύπαρξη δράσης διοξυγονάσης, βρέθηκαν να είναι πλήρως συντηρημένες και στις δυο διοξυγονάσες Diox1 και Diox2 (Hirano *et al.*, 2007; Vandera *et al.*, 2012).

Στη συνέχεια έγινε φυλογενετική ανάλυση των Diox1 και Diox2 και συγγενών αυτών πρωτεϊνών, όπως απεικονίζεται στο φυλογενετικό δέντρο που ακολουθεί.



Σχήμα 3.3.4. Φυλογενετικό δέντρο που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) των Diox1, Diox2 και άλλων συγγενών αυτών διοξυγονασών σχάσης του αρωματικού πυρήνα. Οι τιμές bootstrap φαίνονται στους βρόγχους. Οι συντμήσεις είναι οι εξής (οι αριθμοί κατάθεσης σε διεθνείς βάσεις δεδομένων δίνονται στις παρενθέσεις):

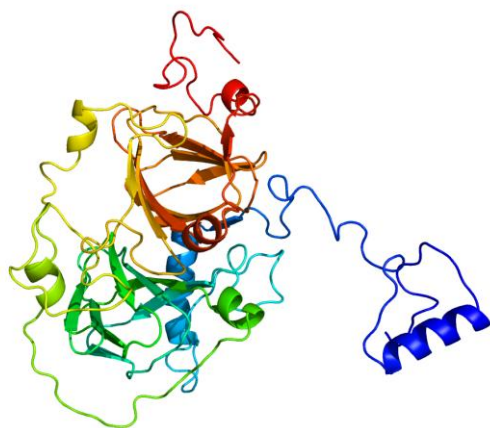
Diox1: *A.phenanthrenivorans*, διοξυγονάση του 1H2NA (YP_004243241.1); Diox2: *A.phenanthrenivorans*, διοξυγονάση του 1H2NA (YP_004241483.1); Noc_HNDO: *Nocardia* sp. KP7,

διοξυγονάση του 1H2NA (BAA31235.2); Myc_HNDO: *Mycobacterium* sp. CH1, διοξυγονάση του 1H2NA (ACN38281.1); B.hal_GDO: *Bacillus halodulderans* C-125, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (NP242868.1); P.sal_SDO: *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, διοξυγονάση του 1,2-σαλικυλικού οξέος (AAQ91293.1); X.pol_GDO: *Xanthobacter polyaromaticivorans*, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (BAC98955.1); E.col_GDO: *E. coli* O157:H7 strain EDL933, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (Q8X655); B.cen_GDO: *Burkholderia cenocepacia* MCO-3, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (YP_001777018.1); A.aven_GDO: *Acidovorax avenae* ATCC19860, διοξυγονάση του 1,2-γεντισικού οξέος (YP_004232675.1).

Με χρήση του προγράμματος Phyre², έγινε πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνικών μορίων Diox1 και Diox2, καθώς και αναπαράσταση της δομής τους στο χώρο (3D-modelling) (Σχήματα 3.3.5 και 3.3.6).

Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης Diox1 έγινε με βάση την 37% ομολογία που εμφανίζει με την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 (Adams *et al.*, 2006).





Διαστάσεις μοντέλου Diox1 (Å): X: 64.336 Y: 70.191 Z: 75.865

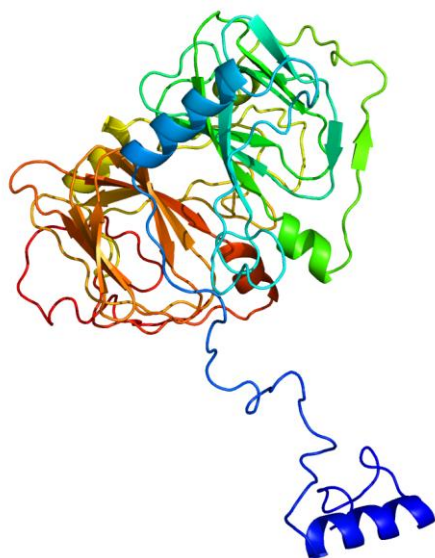
348 κατάλοιπα

90% μοντελοποίηση με >90% ακρίβεια

Σχήμα 3.3.5 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής και μοντέλο 3D της πρωτεΐνης Diox1 με χρήση του προγράμματος Phyre².

Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης Diox2 έγινε με βάση την 31% ομολογία που εμφανίζει με την 1,2-διοξυγονάση του γεντισικού από το στέλεχος *Silicibacter pomeroyi* (Chen *et al.*, 2008).





Διαστάσεις μοντέλου Diox2 (Å): X: 67.293 Y: 54.329 Z: 79.680

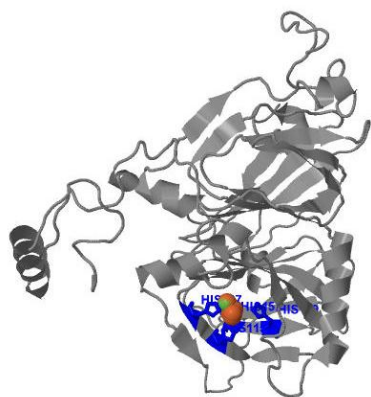
371 κατάλοιπα

96% μοντελοποίηση με >90% ακρίβεια

Σχήμα 3.3.6 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής και μοντέλο 3D της πρωτεΐνης Diox2 με χρήση του προγράμματος Phyre².

Με χρήση του προγράμματος 3DLigandSite έγινε πρόβλεψη των πιθανών θέσεων πρόσδεσης του υποστρώματος για τις πρωτεΐνες Diox1 και Diox2 (Σχήμα 3.3.7).

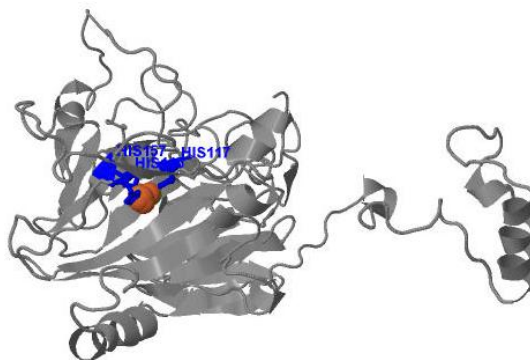
A) Diox1



Προβλεπόμενες θέσεις πρόσδεσης:

¹¹⁵His, ¹¹⁷His, ¹⁵⁷His, ¹⁵⁹His

B) Diox2



Προβλεπόμενες θέσεις πρόσδεσης:

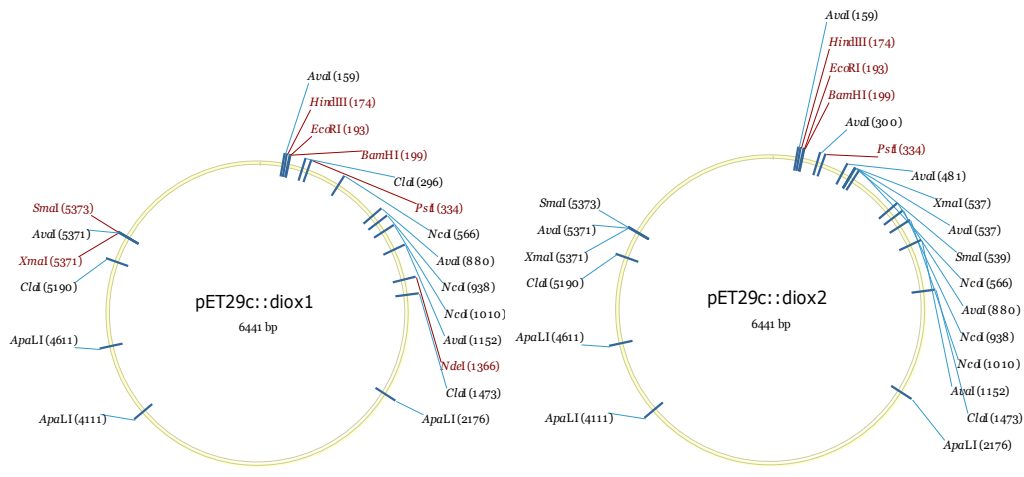
¹¹⁵His, ¹¹⁷His, ¹⁵⁷His

Σχήμα 3.3.7 Τριδιάστατη αναπαράσταση (3DLigandSite) όπου φαίνεται το πιθανό σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος στα πρωτεϊνικά μόρια Diox1 και Diox2, καθώς και τα κατάλοιπα στα οποία συνδέεται το υπόστρωμα. Με μπλέ χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στο καταλυτικό κέντρο των πρωτεϊνών, ενώ με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα μόρια του υποστρώματος.

3.3.1 Ετερόλογη έκφραση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ανασυνδυασμένων *Diox1* και *Diox2*

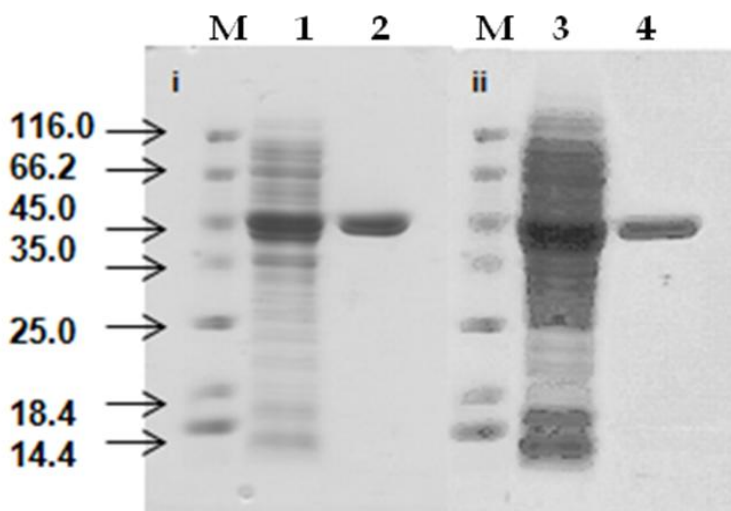
3.3.1.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων *diox1* και *diox2* και υπερέκφραση των πρωτεϊνών *Diox1* και *Diox2*

Λόγω της μεγάλης ομοιότητας μεταξύ των γονιδίων *diox1* και *diox2* σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, σχεδιάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών *Diox1F/Diox1R* και *Diox2F/Diox2R* (Πίνακας 2.2.3) ώστε να συμπεριλαμβάνουν και τις πλευρικές αυτών αλληλουχίες, για να βεβαιωθεί η επιλεκτική ενίσχυση του κάθε γονιδίου. Με εκμαγείο γονιδιωματικό DNA του στελέχους *Sph*3 ενισχύθηκαν δυο περιοχές μεγέθους 1.373 bp και 1.408 bp που περιείχαν τα γονίδια *diox1* και *diox2*, αντίστοιχα. Ακολούθησε υποκλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορέα pCR-blunt (Invitrogen), οδηγώντας στην κατασκευή των πλασμιδίων pCR-blunt::*diox1*flank και pCR-blunt::*diox2*flank (Πίνακας 2.2.3) και επιβεβαιώθηκε η ορθότητα των ενθέσεων με αλληλούχιση. Οι ανωτέρω κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγείο για την ενίσχυση των γονιδίων *diox1* και *diox2* με επιλεκτικό σχεδιασμό κατάλληλων θέσεων ένθεσης σε νέα ζεύγη εκκινητών [pET*diox1F/pETdiox1R* και pET*diox2F/pETdiox2R*] (Πίνακας 2.2.3) για εν συνεχεία υποκλωνοποίηση σε φορέα υπερέκφρασης pET29c⁽⁺⁾ (Novagen). Τα προϊόντα της ενίσχυσης υποκλωνοποιήθηκαν για ακόμη μια φορά στον φορέα pCR-blunt (Invitrogen) και η ορθότητα των ενθέσεων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση. Τελικά, τα *diox1* και *diox2* υποκλωνοποιήθηκαν σε pET29c⁽⁺⁾ στις περιοριστικές θέσεις *NdeI/BamHI* διατηρώντας το πλαίσιο ανάγνωσης ώστε να κωδικοκεύεται και μια ουρά έξι ιστιδινών (6His-tag) στο C-τελικό άκρο των πρωτεϊνικών μορίων (Σχήμα 3.3.1.1.1) Κύτταρα ξενιστές BL21(DE3) του στελέχους *E.coli* μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pET29c::*diox1* και pET29c::*diox2* και ακολούθησε υπερέκφραση.



Σχήμα 3.3.1.1.1 Πλασμιδικοί χάρτες των πλασμιδίων pET29c::diox1 και pET29c::diox2.

Ύστερα από τη συλλογή και τη λύση των κυττάρων, ακολούθησε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία στήλης αγκιστείας Ni⁺-NTA (Υλικά και Μέθοδοι, § 2.30). Δραστικότητα διοξυγονάσης του 1H2NA προσδιορίστηκε στα κλάσματα που εκλούστηκαν σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 110 mM. Στη συνέχεια, τα κλάσματα αυτά συλλέχθηκαν και ακολούθησε SDS-PAGE καθώς και κινητική ανάλυση των ενζυμικών εκχυλισμάτων. Από την SDS-PAGE ανάλυση προέκυψαν διακριτές ζώνες μεγέθους ~42 kDa- όπως προσδιορίζεται από τις πηκτές πολυακρυλαμιδίου- μέγεθος που είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα 45 kDa που αντιστοιχούν στο φυσικό ένζυμο.



Σχήμα 3.3.1.1.2 Πηκτές πολυακρυλαμιδίου από ανάλυση SDS-PAGE των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Απομόνωση των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών Diox1 (i) και Diox2 (ii) από το στέλεχος A.

phenanthrenivorans. Πρωτεϊνικοί δείκτες μοριακών βαρών σε kDa (Διαδρομές M), ακατέργαστο κυτταρικό εκχύλισμα από *E. coli* BL21/ pET29c::*diox1* (Διαδρομή 1) και *E. coli* BL21/ pET29c::*diox2* (Διαδρομή 3), πρωτεϊνικά κλάσματα Diox1 (Διαδρομή 2) και Diox2 (Διαδρομή 4) απομονωμένα από στήλη χρωματογραφίας Ni⁺-NTA.

3.3.1.2 Προσδιορισμός της δραστικότητας των ενζύμων Diox1 και Diox2

Σε απομονωμένα δραστικά κλάσματα των πρωτεϊνών Diox1 και Diox2, ακολούθησε προσδιορισμός της δραστικότητας διοξυγονάσης 1H2NA (Υλικά και Μέθοδοι, §2.26) και βρέθηκε της τάξης των 2.44 $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ και 3.17 $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, αντίστοιχα. Με την προσθήκη στο διάλυμα 0.1 mM FeSO₄ και 0.1 mM L-ασκορβικού οξέος, η δραστικότητα αυξήθηκε σχεδόν κατά 50%, αποδεικνύοντας έτσι ότι η διοξυγονάση του 1H2NA του στελέχους *Srhe3* χρειάζεται Fe(II) για να δράσει, όπως έχει ήδη αναφερθεί για τις αντίστοιχες διοξυγονάσεις στο στέλεχος *Nocardioides* sp. KP7, καθώς και στο στέλεχος *Pseudomonas* sp. PPD (Iwabuchi and Harayama, 1998b; Deveryshetty and Phale, 2009) (Πίνακας 3.3.1.1.2). Αξιζει να σημειωθεί ότι συγκεντρώσεις Fe(II) μεγαλύτερες του 0.1 mM στο διάλυμα είχαν σαν συνέπεια τη μείωση της δραστικότητας και των δυο ομολόγων.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η σταθερότητα των δραστικών κλασμάτων κατά την αποθήκευσή τους για διάφορα χρονικά διαστήματα. Πιο συγκεκριμένα, η αποθήκευση των δραστικών κλασμάτων για το χρονικό διάστημα μιας ημέρας στους 4° C, παρουσία ή απουσία FeSO₄ και L-ασκορβικού οξέος οδηγεί σε απώλεια της δραστικότητάς τους σε ποσοστό περίπου 70%, ενώ η αποθήκευση για χρονικό διάστημα μιας ημέρας παρουσία ή απουσία FeSO₄ και L-ασκορβικού οξέος στους -20° C, οδηγεί στην απώλεια της δραστικότητας μέχρι το ποσοστό του 95% (Πίνακας 3.3.1.1.2). Η αποθήκευση των ενζύμων στους 4° C για χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας, απουσία FeSO₄ και L-ασκορβικού οξέος είχε σαν αποτέλεσμα να χάσουν το 95% της δραστικότητάς τους, ενώ για το ίδιο διάστημα αποθήκευση στους -80° C απουσία FeSO₄ και L-ασκορβικού οξέος οδήγησε σε απώλεια της δραστικότητάς τους σε ποσοστό 60% (Πίνακας 3.3.1.1.2). Τέλος, χρήση 10% (v/v) αιθανόλης, 20% (v/v) γλυκερόλης και 1 mM DTT, κατά την

αποθήκευση των ενζύμων, δεν οδήγησε σε σταθεροποίησή τους.

Πίνακας 3.3.1.1.2. Έλεγχος σταθερότητας των δραστικών κλασμάτων των ενζύμων Diox1 και Diox2 υπό διαφορετικές εξεταζόμενες συνθήκες.

Ειδική δραστηριότητα διοξυγονάσης του 1H2NA ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) σε απομονωμένα δραστικά κλάσματα	Εξεταζόμενες συνθήκες (παρουσία 0.1 mM 1H2NA)									
	FeSO ₄ /L-ασκορβικό οξύ (0.1 mM)									
	-					+				
	Αποθήκευση					Αποθήκευση				
	1 ημέρα		1 εβδομάδα			1 ημέρα		1 εβδομάδα		
4 °C		-20 °C			4 °C		-80 °C			
Diox1	2.44	0.79	0.11	0.12	0.98	3.58	0.90	0.54	-	-
Diox2	3.17	0.94	0.16	0.16	1.26	4.56	1.1	0.43	-	-

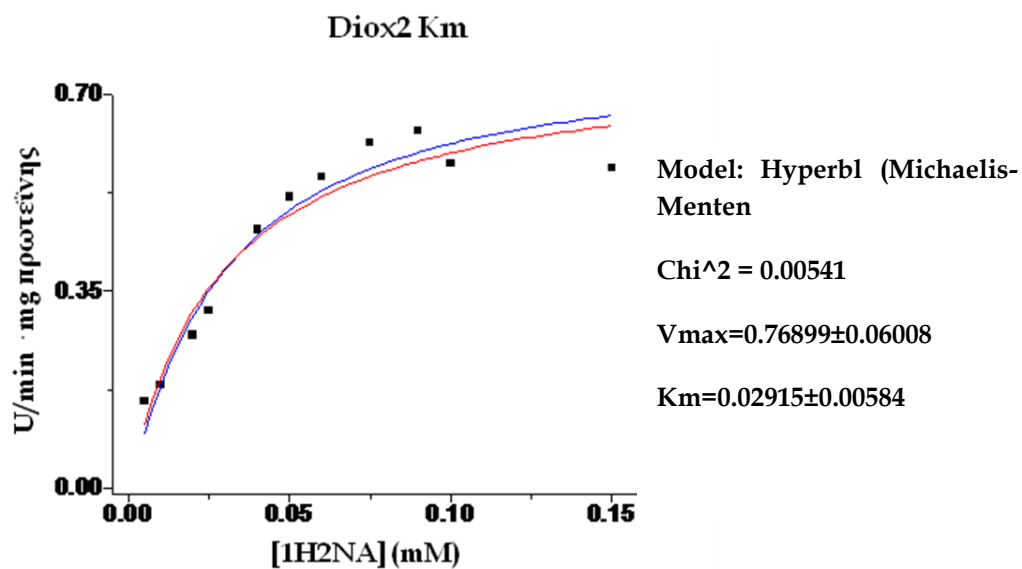
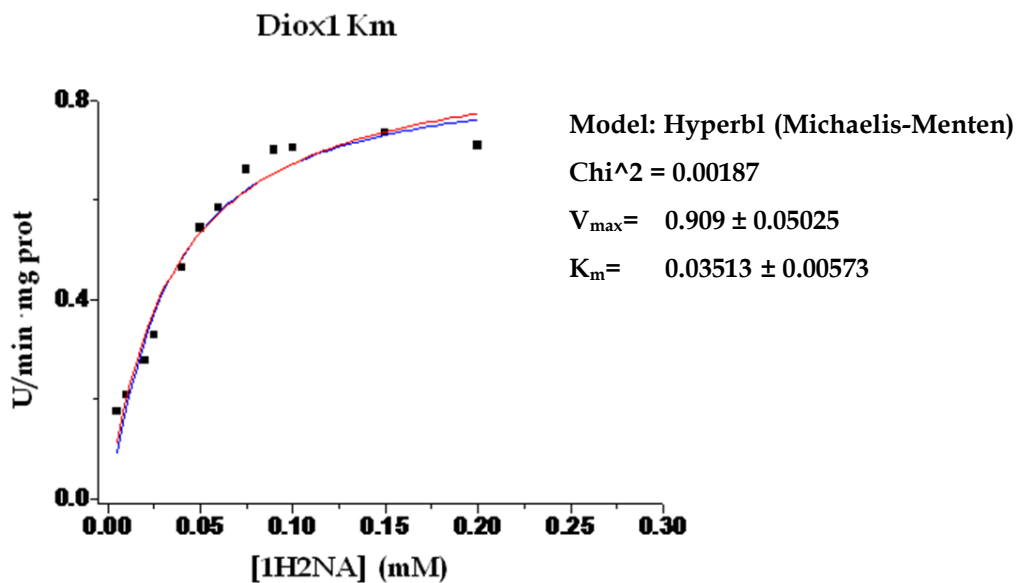
Κινητική μελέτη των δραστικών κλασμάτων Diox1 και Diox2

Για την κινητική μελέτη των δραστικών κλασμάτων Diox1 και Diox2, πραγματοποιήθηκε εκ νέου διαχωρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία στήλης αγχιστείας Ni²⁺-NTA από καλλιέργεια κυττάρων 2.5 L. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος 1H2NA 0.005-0.15 mM, παρουσία 0.1 mM FeSO₄ και 0.1 mM L-ασκορβικού οξέος, όπου βρέθηκε η βέλτιστη τιμή δραστηριότητας.

Πίνακας 3.3.1.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στις δραστηότητες των διοξυγονάσων 1H2NA για τα δραστικά κλάσματα των Diox1 και Diox2.

Συγκέντρωση υποστρώματος (mM)	Ειδική δραστηότητα διοξυγονάσης 1-H2NA ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
	Diox1	Diox2
0.005	0.34	0.38
0.01	0.405	0.46
0.02	0.54	0.68
0.025	0.64	0.79
0.04	0.90	1.14
0.05	1.04	1.29
0.06	1.13	1.38
0.075	1.28	1.53
0.09	1.35	1.58
0.1	1.36	1.43
0.15	1.42	1.41
0.2	1.37	-

Οι ανωτέρω τιμές εισήχθησαν στο πρόγραμμα Microcal Origin, βάσει του οποίου έγινε και ο προσδιορισμός των τιμών των παραμέτρων K_m και V_{max} και προέκυψαν τα παρακάτω γραφήματα, με μη γραμμική προσαρμογή της εξίσωσης Michaelis-Menten.



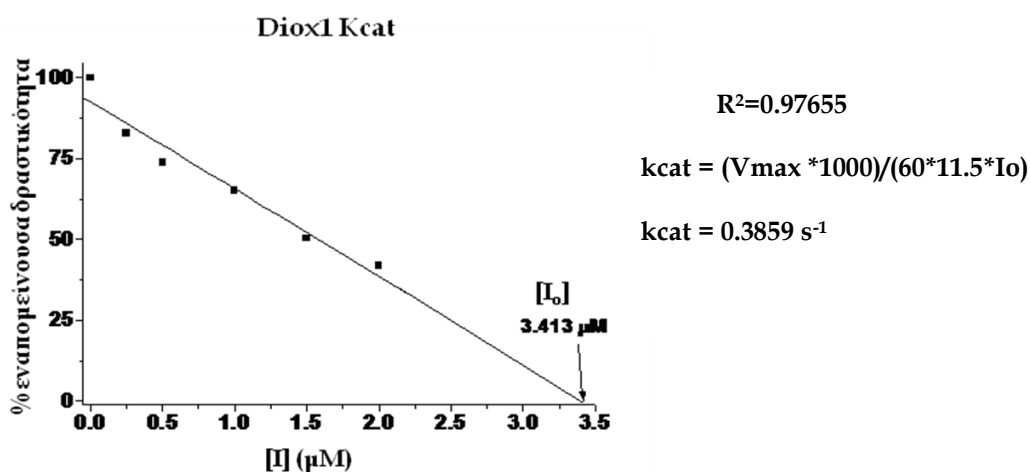
Σχήμα 3.3.1.2.1 Γραφική παράσταση για τον υπολογισμό των τιμών K_m και V_{\max} των Diox1 και Diox2.

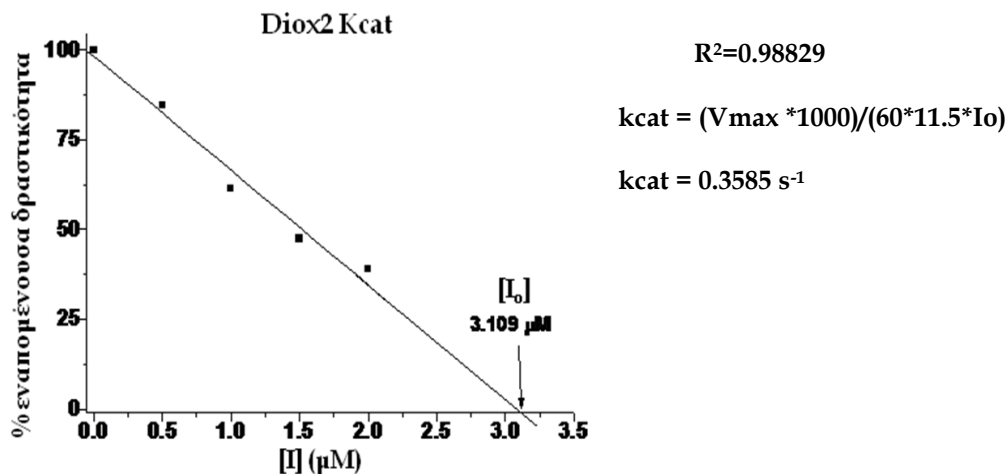
Για τον υπολογισμό της σταθεράς K_{cat} χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας ο-φαινανθρολίνη σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.25-10 μM .

Πίνακας 3.3.1.2.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του αναστολέα ο-φαινανθρολίνης στις δραστηρότητες των διοξυγονάσων 1-H2NA για τα δραστικά κλάσματα των Diox1 και Diox2.

Συγκέντρωση αναστολέα ο-φαινανθρολίνη [I] (μM)	% εναπομένονσα ειδική δραστηρότητα διοξυγονάσης 1-H2NA	
	Diox1	Diox2
0.25	82.9	100
0.5	73.8	84.6
1	65.1	61.5
1.5	50.4	47.5
2	41.9	38.9
2	30.6	28.4
4	20.6	20.4
5	17.8	14.8
6.5	13.2	11.9
8	10.5	9.3
10	7.7	6.8

Οι ανωτέρω τιμές εισήχθησαν στο πρόγραμμα Microcal Origin, βάσει του οποίου έγινε και ο προσδιορισμός των τιμών της παραμέτρου K_{cat} και προέκυψε το παρακάτω γράφημα της μορφής $y=a+bx$.





Σχήμα 3.3.1.2.2 Γραφική παράσταση της μορφής $y=a+bx$ για τον υπολογισμό του τίτλου των ενζύμων DioX1 και DioX2 και της τιμής K_{cat} .

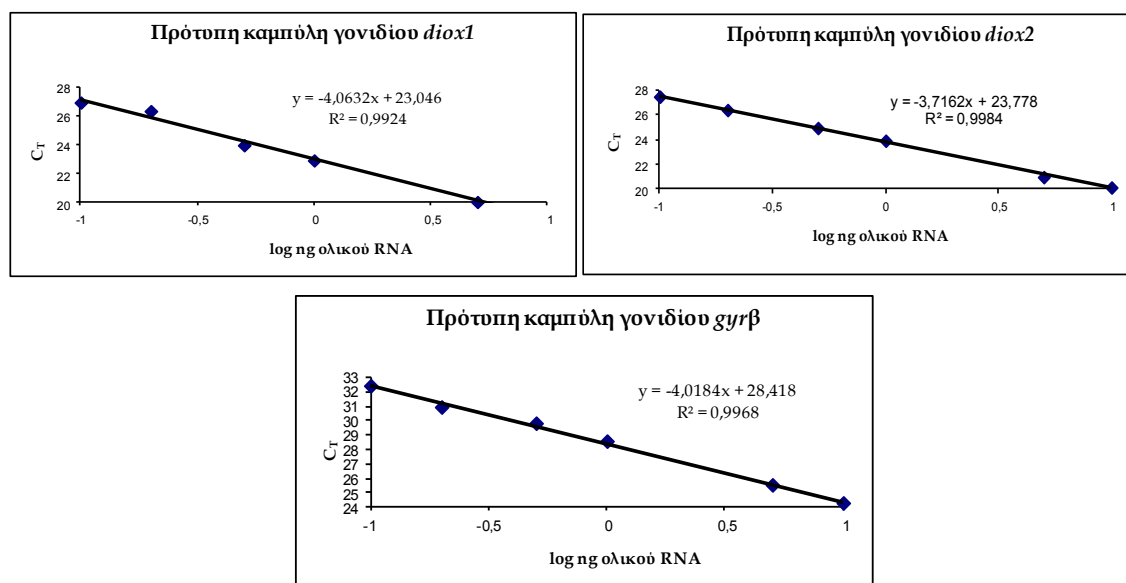
Οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων DioX1 και DioX2 είναι παρόμοιες. Οι τιμές K_m βρέθηκαν να είναι $35 \pm 5.7 \mu\text{M}$ για το DioX1 και $29 \pm 5.8 \mu\text{M}$ για το DioX2. Οι σταθερές K_{cat}/K_m των δυο ανασυνδυασμένων ενζύμων βρέθηκαν να είναι $11 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ για την DioX1 και $12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της αναστολής υποστρώματος σε συγκεντρώσεις έως $150 \mu\text{M}$. Η παρουσία του αναστολέα ο-φαινανθρολίνη σε συγκέντρωση $10 \mu\text{M}$ επέφερε την πλήρη αναστολή της δράσης των ενζύμων DioX1 και DioX2, η οποία και αποκαταστάθηκε στα αρχικά επίπεδα με την προσθήκη Fe(II) στο διάλυμα.

3.3.2 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *diox1* και *diox2* με την τεχνική qRT-PCR

Με χρήση της τεχνικής της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου, προσδιορίστηκε η ποσοτική διαφορά στα μεταγγραφα των γονιδίων *diox1* και *diox2* που κωδικεύουν δυο διοξυγονάσες τις του 1-H2NA. Η έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε σε κύτταρα του στελέχους *Srhe3* που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9 με μοναδικές πηγές άνθρακα (i) φαινανθρένιο, (ii) γλυκόζη και (iii) φαινανθρένιο και γλυκόζη.

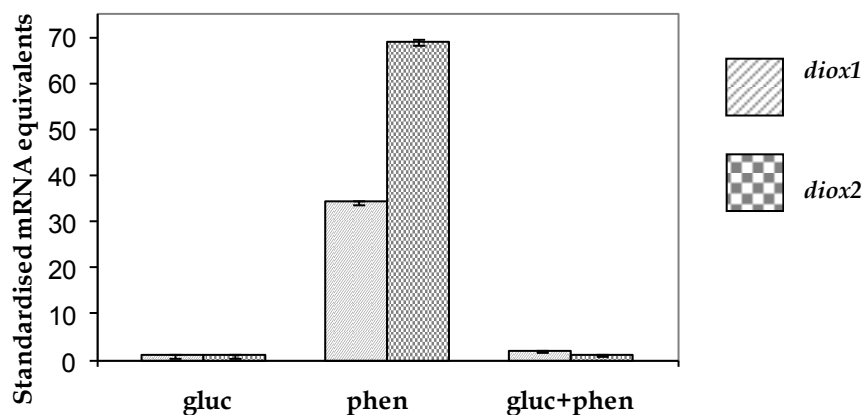
Η ποσότητα του RNA στα δείγματα κανονικοποιήθηκε ως προς το περιεχόμενο

mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrβ* και η κατασκευή των προτύπων καμπυλών έγινε όπως περιγράφεται αναλυτικά στις §§ 2.12 (Υλικά και Μέθοδοι) και 3.2.3, με χρήση των εκκινητών $1\text{mRNA}_{\text{for}}/1\text{mRNA}_{\text{rev}}$ (για το γονίδιο *diox1*), $2\text{mRNA}_{\text{for}}/2\text{mRNA}_{\text{rev}}$ (για το γονίδιο *diox2*) και $\text{gyr}\beta_{\text{for}}/\text{gyr}\beta_{\text{rev}}$ (για το γονίδιο *gyrβ*) (Πίνακας 3.3.1.1.1) (Σχήμα 3.3.2.1).



Σχήμα 3.3.2.1 Πρότυπες καμπύλες για τα γονίδια *diox1*, *diox2* και *gyrβ*.

Η απόδοση (E) της qRT-PCR ενός κύκλου στην εκθετική φάση υπολογίστηκε από τις κλίσεις των προτύπων καμπυλών σύμφωνα με την εξίσωση $E=10^{(-1/\kappa\lambda\iota\sigma\eta)}$ (Pfaffl, 2001; Corbella and Puyet, 2003) και βρέθηκε να είναι 1.76, 1.86 και 1.8 για τα *diox1*, *diox2* και *gyrβ*, αντίστοιχα, επιδεικνύοντας πολύ καλή γραμικότητα (παράγοντες συσχέτισης $0.9924 < R^2 < 0.9968$). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης και συνοψίζονται στο γράφημα που ακολουθεί (Σχήμα 3.3.2.2).



Γονίδια	Υποστρώματα		
	Γλυκόζη	Φαινανθρένιο	Φαινανθρένιο+γλυκόζη
<i>diox1</i>	1±0,365	34,047±0, 511	1,929±0,183
<i>diox2</i>	1±0,380	68,934±0,513	1,069±0,220

Σχήμα 3.3.2.2 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *diox1* και *diox2*, στα υποστρώματα γλυκόζης, φαινανθρενίου και γλυκόζης με φαινανθρένιο. Το mRNA των γονιδίων στόχων έχει κανονικοποιηθεί ως προς το περιεχόμενο σε mRNA του γονιδίου αναφοράς *gyrB*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων παρουσία γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σαν βαθμονομητής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

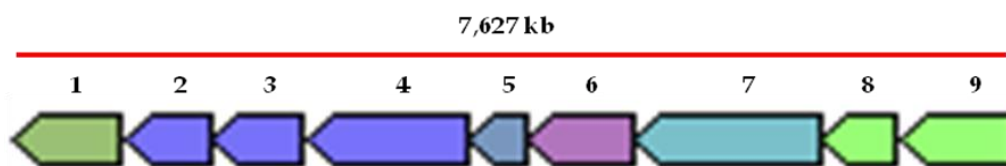
Και τα δυο γονίδια είναι φανερό ότι επάγονται παρουσία φαινανθρενίου, ενώ πολύ χαμηλά επίπεδα μεταγραφής παρατηρούνται παρουσία του υποστρώματος της γλυκόζης όπως επίσης και παρουσία του μίγματος της γλυκόζης μαζί με φαινανθρένιο. Το γονίδιο διοξυγονάσης 1H2NA του χρωμοσώματος (*diox2*) παρουσιάζει διπλάσια έκφραση σε σχέση με το ομόλογό του στο πλασμίδιο pASPHE301 (*diox1*). Συγκεκριμένα το γονίδιο *diox1* εμφανίζει 34 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο φαινανθρένιο σε σχέση με τη γλυκόζη και το *diox2* 69 φορές μεγαλύτερη έκφραση.

3.4 Μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος *Srhe3*

Όπως εκτενώς αναφέρεται στην Εισαγωγή (§ 1.5.4), το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποτελεί έναν από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου. Ο περαιτέρω καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος λαμβάνει χώρα με σχάση του δακτυλίου είτε σε 3,4-θέση (*ortho*-σχάση) (§ 1.5.4.3), είτε σε 2,3-θέση (*meta*-σχάση) (§ 1.5.4.1), είτε σε 4,5-θέση (*meta*-σχάση) (§ 1.5.4.2).

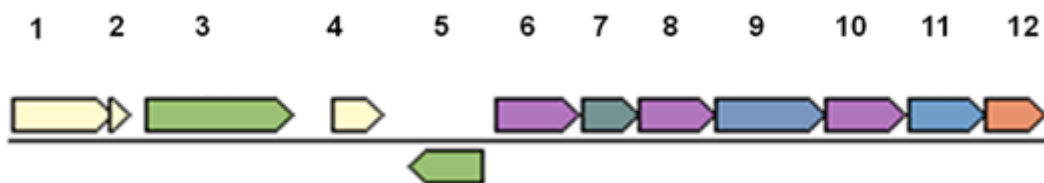
Η μελέτη *in silico* στο στέλεχος *Srhe3* έδειξε ότι η αποδόμηση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος αυτό μπορεί να λάβει χώρα είτε μέσω 3,4-διοξυγόνωσης (*ortho*-σχάση) (Σχήμα 1.5.4.3.1), είτε μέσω 4,5- διοξυγόνωσης (*meta*-σχάση) (Σχήμα 1.5.4.2.1). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την *ortho*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος εντοπίζονται στο χρωμόσωμα, ενώ τα υπεύθυνα για τη *meta*-σχάση γονίδια εντοπίζονται στο πλασμιδίο pASPHE302 και η οργάνωσή τους στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3* απεικονίζεται στα Σχήματα 3.4.1 και 3.4.2, αντίστοιχα.

Η ταυτόχρονη παρουσία γονιδίων υπεύθυνων για την *ortho*- (3,4-) και *meta*- (4,5-) πορεία σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει επίσης αναφερθεί στο στέλεχος *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton and Ribbons, 1982) (βλέπε § 1.5.4.2).



1. μεταγραφικός ρυθμιστής της πορείας του β -κετοαδιπικού (PcaR, PcaU, PcbR), 2. μεταφοράση βουτύρο-CoA: οξικού-CoA, 3. α υπομονάδα μεταφοράσης του 3-οξοαδιπικού-CoA, 4. ακετυλμεταφοράση του ακετυλο-CoA, 5. αποκαρβοξυλάση της 4-καρβοξυμουκονολακτόνης, 6. ενολο-λακτόνη του 3-οξοαδιπικού οξέος, 7. κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis*, *cis*-μουκονικού οξέος, 8. α υπομονάδα της 3,4-διοξυγόνωσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, 9. β υπομονάδα της 3,4-διοξυγόνωσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.

Σχήμα 3.4.1 Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των γονιδίων που μετέχουν στην *ortho*-σχάση σε 3,4-θέση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3*.



1. τρανσποζάση, 2. υποθετική πρωτεΐνη, 3. υποθετική πρωτεΐνη, 4. υποθετική πρωτεΐνη, 5. ρυθμιστική πρωτεΐνη (LysR-type), 6. υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος, 7. αλδολάση του 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικού οξέος, 8. υδρολάση της 2-πυρρονης-4,6-δικαρβοξυλικού οξέος, 9. 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος α και β υπομονάδα, 10. αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης, 11. πιθανή οξειδοοδουκτάση, 12. περιπλασματική υπομονάδα συστήματος μεταφοράς τύπου ABC του μολυβδαινικού.

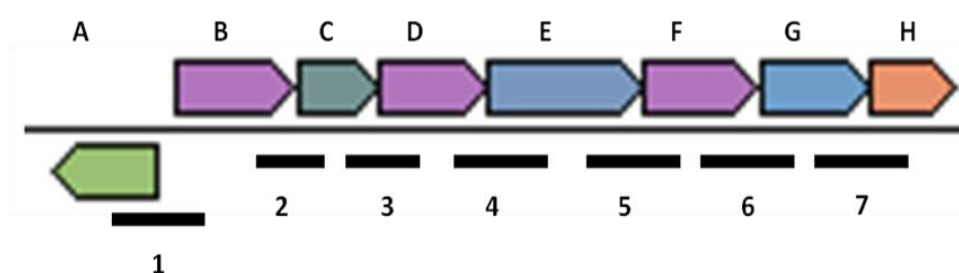
Σχήμα 3.4.2 Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των γονιδίων που μετέχουν στη *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο pASPHE302 του στελέχους *Srhe3*.

3.4.1 Έλεγχος της συμμεταγραφής των γονιδίων 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος *Srhe3*

Στη συνέχεια της μελέτης της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Srhe3*, εστίασαμε στην κατώτερη μεταβολική πορεία του καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος που λαμβάνει χώρα μέσω *meta*-σχάσης (Σχήμα 1.5.4.2.1).

Η οργάνωση που εμφανίζουν τα γονίδια αυτά (Σχήμα 3.4.2) μας οδήγησε στο να εξετάσουμε αν συμμεταγράφονται. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων (Πίνακας 2.2.3), η λογική σχεδιασμού των οποίων φαίνεται στο Σχήμα 3.4.1.2.

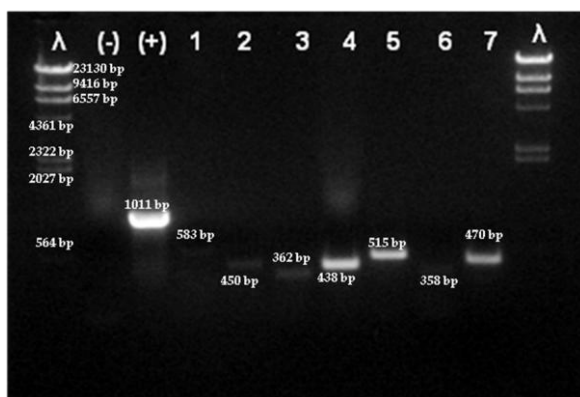
I)



A. ρυθμιστική πρωτεΐνη (LysR-type), B. υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος, C. αλδολάση του 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικού οξέος, D. υδρολάση του 2-πυρρονη-4,

6-δικαρβοξυλικού οξέος, E. 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος α και β υπομονάδα, F. αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης, G. πιθανή οξειδοοξειδοκτάση, H. περιπλασματική υπομονάδα συστήματος μεταφοράς τύπου ABC του μολυβδαινικού. Με αριθμούς αναπαρίστανται τα προϊόντα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής των αντίστοιχα αριθμημένων εκκινητών.

II)



Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης με τα αντίστοιχα προϊόντα αντίδρασης RT-PCR (1-7), λ. μάρτυρας λDNA/HindIII, (-) αρνητικός μάρτυρας [αντίδραση χωρίς αντίστροφη μεταγραφή], (+) θετικός μάρτυρας [1011 bp ιϊκού RNA από *E. coli*].

Σχήμα 3.4.1.2 I) Περιοχές σχεδιασμού εκκινητών για την πραγματοποίηση αντιδράσεων RT-PCR στα γονίδια που μετέχουν στη *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και II) Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης με τα αντίστοιχα προϊόντα αντίδρασης RT-PCR.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.4.1.2 όλα τα γονίδια που συμμετέχουν στις αντιδράσεις *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Σχήμα 1.5.4.2.1) στην κατώτερη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου συμματράφονται συνιστώντας ένα καλά οργανωμένο οπερόνιο.

3.4.2 Μελέτη πιθανής περιοχής προαγωγού του οπερονίου του 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος *Srhe3*



A. ρυθμιστική πρωτεΐνη (LysR-type), B. υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος, C. αλδολάση του 4-καρβοξυ-4-υδροξυ-2-οξοαδιπικού οξέος, D. υδρολάση της 2-πυρρονης-4, 6-δικαρβοξυλικού οξέος, E. 4,5-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος α και β υπομονάδα, F. αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης, G. πιθανή οξειδοοδουκτάση, H. περιπλασματική υπομονάδα συστήματος μεταφοράς τύπου ABC του μολυβδαινικού. Με αριθμούς αναπαρίστανται τα προϊόντα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής των αντίστοιχα αριθμημένων εκκινήτων.

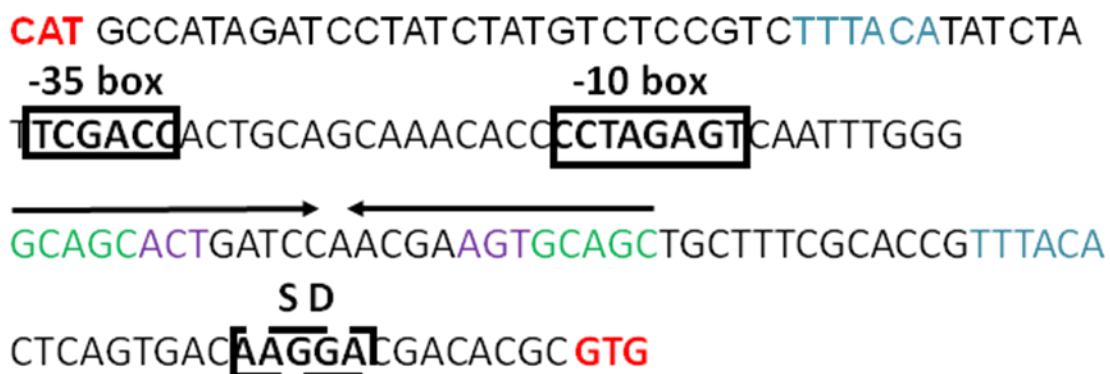
Σχήμα 3.4.2.1 Οπερόνιο πρωτοκατεχοϊκού οξέος μεγέθους 7.654 bp στο στέλεχος *Srhe3*. Απεικόνιση της διαγονιδιακής περιοχής που πιθανόν να εμπεριέχει περιοχή προαγωγού του οπερονίου.

Αφού αποδείχθηκε ότι το σύμπλεγμα γονιδίων των 7.654 kb συμμεταγράφεται και συνιστά καλά οργανωμένο οπερόνιο, έγινε έλεγχος των αλληλουχιών ανοδικά του γονιδίου της ρυθμιστικής πρωτεΐνης για τον εντοπισμό πιθανών περιοχών προαγωγού, όπου όμως δεν εντοπίστηκε κάποια τέτοια περιοχή. Έτσι, στη συνέχεια στηριζόμενοι και σε δεδομένα της βιβλιογραφίας, εστίασαμε στη διαγονιδιακή περιοχή των 145 ζευγών βάσεων που υποδεικνύεται στο ανωτέρω σχήμα, όπου και εντοπίστηκε πιθανή περιοχή με χαρακτηριστικά προαγωγού κάνοντας χρήση του λογισμικού BPRM-Prediction of Bacterial Promoters (Solovyev and Salamov, 2011).

test sequence
 Length of sequence- 145
 Threshold for promoters - 0.20
 Number of predicted promoters - 1
 Promoter Pos: 76 LDF- 2.04
 -10 box at pos. 61 CCCTAGAGT Score 29
 -35 box at pos. 41 TCGACC Score 7

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at 76:
 metJ: CTTTACAT at position 27 Score - 14
 rpoD15: AGAGTCAA at position 65 Score - 8



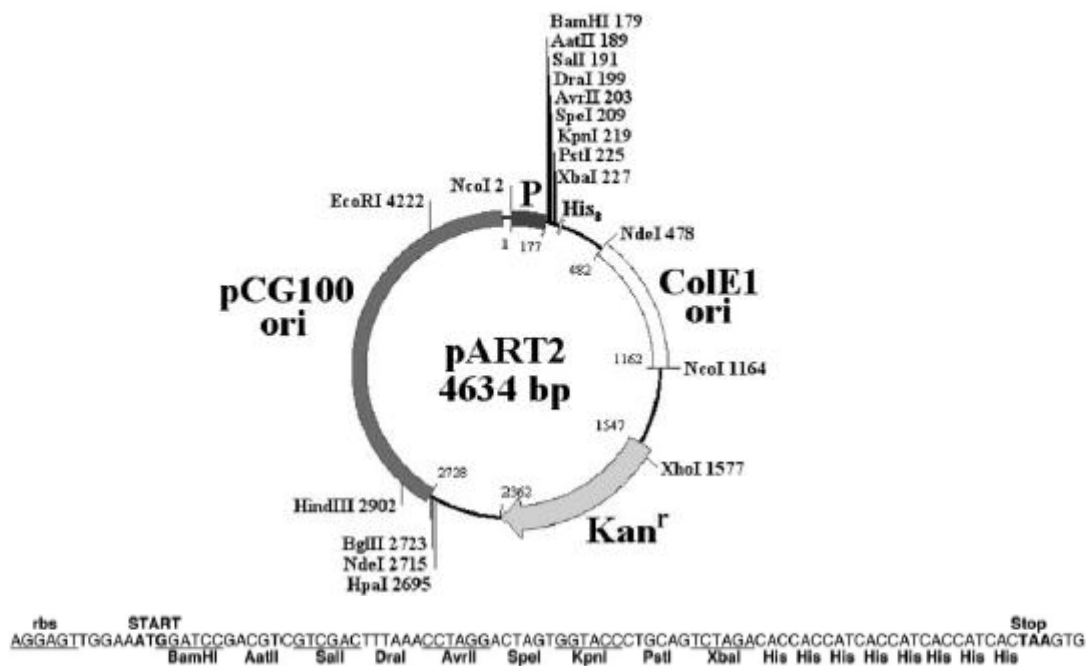
Σχήμα 3.4.2.2. Ανάλυση περιοχής πιθανού προαγωγού κάνοντας χρήση του λογισμικού BPPROM-Prediction of Bacterial Promoters (Solovyeu and Salamov, 2011). Σε συμπαγές πλαίσιο περιλαμβάνονται οι πιθανές -10 και -35 περιοχές του προαγωγού, ενώ σε πλαίσιο με διακεκομμένες γραμμές η πιθανή περιοχή Shine-Dalgarno (S D). Με αντιστροφές βελάκια φαίνονται περιοχές αντιστροφών επαναλήψεων. CAT: κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου της ρυθμιστικής πρωτεΐνης, ενώ GTG: κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου της υδρατάσης του 4-οξαλομεσακονικού οξέος.

Κατόπιν, έγινε σχεδιασμός πειραμάτων προκειμένου να ενισχυθεί με PCR η περιοχή πιθανού προαγωγού, να υποκλωνοποιηθεί σε φορέα και να γίνει ομόλογη έκφραση σε κύτταρα του στελέχους *Sphe3*.

3.4.3 Ανάπτυξη συστήματος ομόλογης έκφρασης γονιδίων στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans Sphe3*

Για την πληρέστερη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων καταβολισμού των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων μελετήσαμε τη δυνατότητα

ανάπτυξης ενός συστήματος έκφρασης στο *Arthrobacter phenanthrenivorans*. Τα περισσότερα γονίδια που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα σε στελέχη του γένους *Arthrobacter*, έχουν κλωνοποιηθεί και εκφραστεί στο βακτήριο *Escherichia coli* ή σε άλλα βακτήρια ξενιστές αν και πολλές από τις πρωτεΐνες έχουν απομονωθεί και καθαριστεί απευθείας από ακατέργαστα κυτταρικά εκχυλίσματα στελεχών *Arthrobacter*. Η ετερόλογη έκφραση όμως μπορεί να οδηγήσει σε ανενεργά πρωτεϊνικά ένζυμα, λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, απουσίας συμπαραγόντων ή μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων. Η ανάπτυξη λοιπόν ενός συστήματος έκφρασης στο *Arthrobacter phenanthrenivorans* είναι απαραίτητη για τη μελέτη της έκφρασης των καταβολικών γονιδίων σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση του στελέχους. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε μέθοδος πρόσληψης DNA από το στέλεχος μέσω της τεχνικής της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).



Σχήμα 3.4.3.1 Χάρτης του πλασμιδίου pART2 που παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: pCG100 και ColE1 θέσεις αρχής της αντιγραφής, Kan^r γονίδιο αντοχής στην καναμυκίνη, P περιοχή προαγωγού/χειριστή του γονιδίου *hdnO* και His₈ κωδικεύουσα αλληλουχία για δημιουργία ουράς 8 ιστιδινών. Το γονίδιο *gfp* είναι κλωνοποιημένο στον συγκεκριμένο φορέα στις θέσεις BamHI/XbaI της περιοχής του πολυσυνδέτη, δίνοντας έτσι το πλασμίδιο pART2-gfp.

Στα πειράματα πρόσληψης χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pART2 και pART2-gfp που ήταν ευγενική προσφορά της κ. Sandu Christinel (Laboratory of Apoptosis and Cancer Biology, The Rockefeller University, NY). Τα πλασμίδια έχουν κατασκευαστεί για την έκφραση γονιδίων με ξενιστή το *A. nicotineovorans* και στο Σχήμα 3.4.3.1 φαίνεται ο πλασμιδιακός χάρτης του pART2 (Sandu *et al.*, 2005).

Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή του πρωτοκόλλου που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Zhang *et al.*, 2011) για άλλα στελέχη του γένους *Arthrobacter* (*Arthrobacter globiformis* ATCC 8010, *Arthrobacter nicotineovorans* ATCC 49919, *Arthrobacter aurescens* ATCC 13344, *Arthrobacter crystallopoietes* ATCC 15481 και *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 7562).

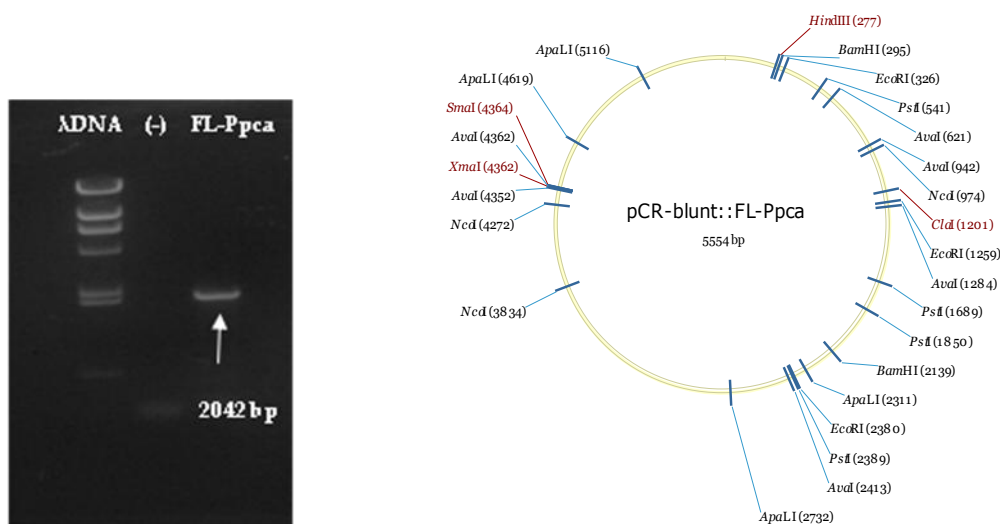
Ως δείκτης επιλογής χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη, παρουσία του οποίου το βακτήριο *A. phenanthrenivorans* δεν καλλιεργείται, όπως επιβεβαιώθηκε με δοκιμές ανάπτυξης (growth tests). Η παρασκευή επιλεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση παραγόντων που επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λυσοζύμη και το αντιβιοτικό πενικιλίνη.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων στις συνθήκες: 15kV/cm, 25 μF, 400 Ω και εισαγωγή του πλασμιδίου pART2-gfp στα επιλεκτικά κύτταρα. Ακολούθησε ανάπτυξη σε τρυβλία με Luria Bertani άγαρ παρουσία ως αντιβιοτικού επιλογής την καναμυκίνη, οπότε και διαπιστώθηκε η επιτυχία του μετασχηματισμού του στελέχους *A. phenanthrenivorans* με το πλασμίδιο pART2-gfp.

Προς περαιτέρω επιβεβαίωση, ακολούθησε ανάπτυξη των αποικιών σε υγρές καλλιέργειες Luria Bertani (LB) με αντιβιοτικό καναμυκίνη, απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης-αφού προηγήθηκε επώαση σε λυσοζύμη (4 mg/ml) για 45 min στους 37 °C- και τέλος πέψη με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων για την επιβεβαίωση της μεταφοράς του πλασμιδίου pART2-gfp στα κύτταρα του *A. phenanthrenivorans*.

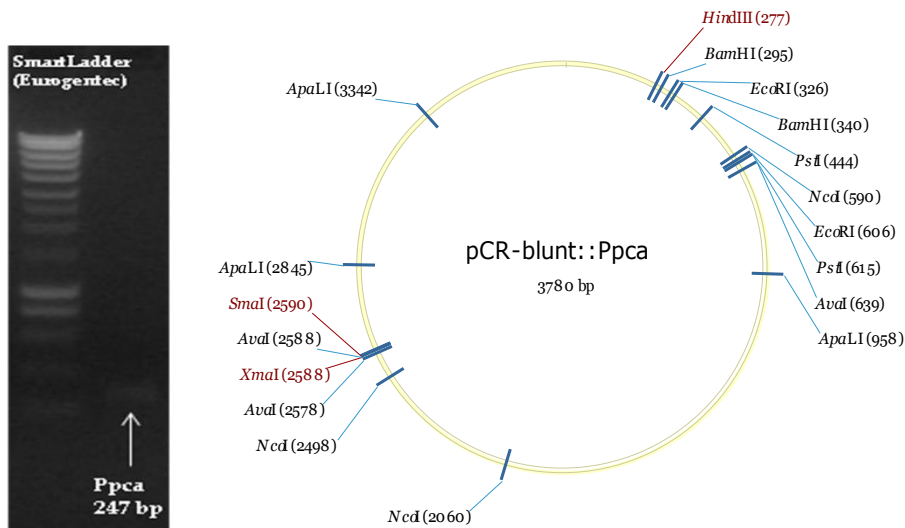
3.4.4 Πορεία δημιουργίας πλασμιδιακών κατασκευών για την ομόλογη έκφραση του πιθανού προαγωγού του οπερονίου του 4,5-πρωτοκατεχοϊκού οξέος (*Ppca*)

Με εκμαγείο γονιδιωματικό DNA του στελέχους *Srhe3* πραγματοποιείται αντίδραση PCR για την ενίσχυση μιας περιοχής μεγέθους 2042 bp που εμπεριέχει την πιθανή περιοχή του *Ppca* προαγωγού, με χρήση των εκκινητών FL-*Ppca* for / FL-*Ppca* rev (Πίνακας 2.2.3) και υποκλωνοποίηση του προϊόντος σε φορέα pCR-blunt (Σχήμα 3.4.4.1).



Σχήμα 3.4.4.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης όπου φαίνεται το προϊόν PCR FL-*Ppca* και πλασμιδιακός χάρτης της κατασκευής pCR-blunt::FL-*Ppca* που προκύπτει με την υποκλωνοποίηση του προϊόντος αυτού σε φορέα pCR-blunt.

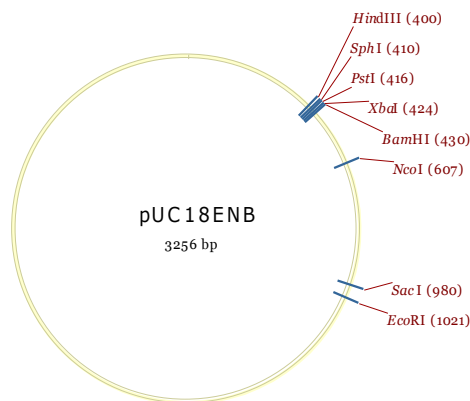
Σχεδιάστηκαν εκ νέου εκκινητές *Ppca*_{for}/*Ppca*_{rev} (Πίνακας 2.2.3) για την παραλαβή περιοχής μεγέθους 268 bp που εμπεριέχει τον πιθανό προαγωγό, η οποία ενισχύθηκε με χρήση του εκμαγείου pCR-blunt::FL-*Ppca*.



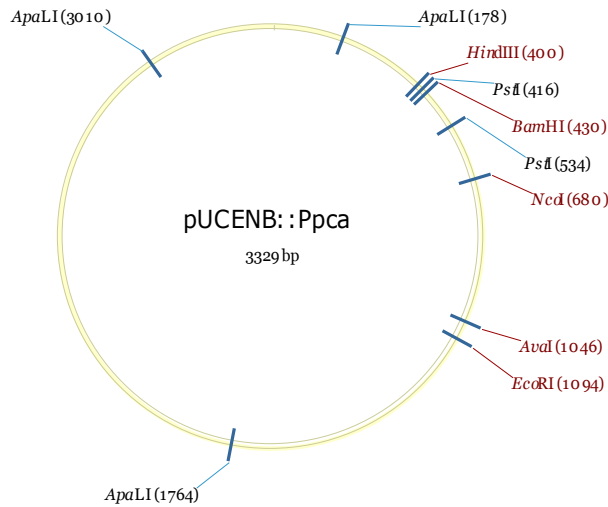
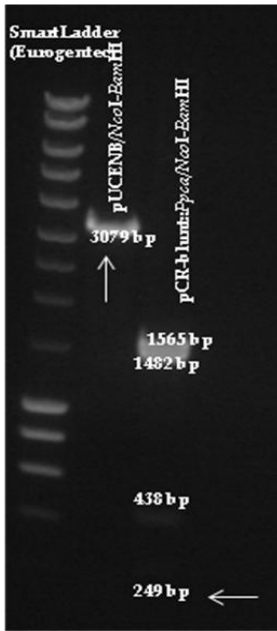
Σχήμα 3.4.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης όπου φαίνεται το προϊόν PCR *Ppca* (268 bp) και πλασμιδιακός χάρτης της κατασκευής pCR-blunt::*Ppca* που προκύπτει με την υποκλωνοποίηση του προϊόντος αυτού σε φορέα pCR-blunt.

Σε αυτή τη φάση η ορθότητα της ένθεσης ελέγχθηκε με αλληλούχηση.

Η περιοχή *Ppca* υποκλωνοποιήθηκε σε θέσεις ένθεσης *NcoI*/*BamHI* (Σχήμα 3.4.4.4) στο πλασμίδιο pUC18ENB (πρόκειται για ένθεση τμήματος του πλασμιδίου pART2-gfp/*EcoRI*-*BamHI* στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου pUC18, Σχήμα 3.4.4.3, Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου).

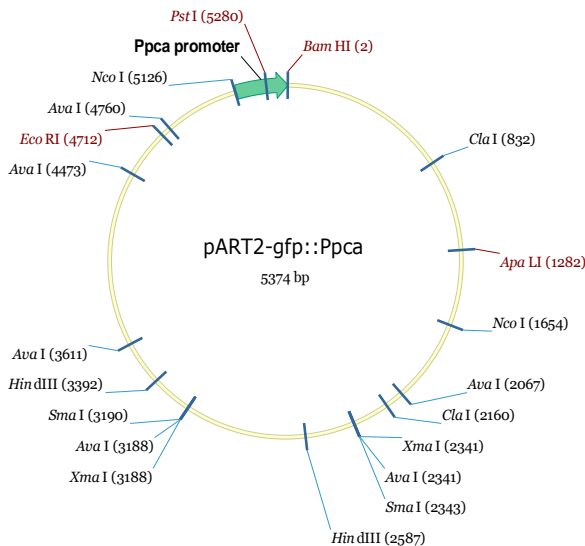
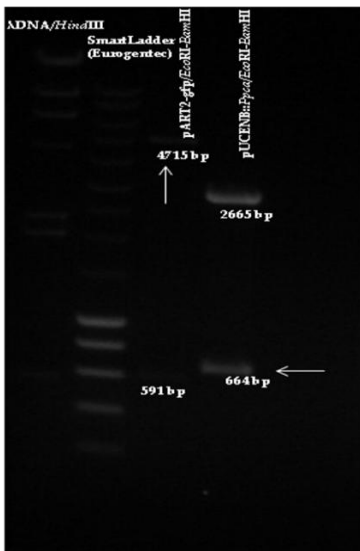


Σχήμα 3.4.4.3 Χάρτης του πλασμιδίου pUC18ENB (Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου).



Σχήμα 3.4.4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης όπου φαίνεται η περιοριστική ανάλυση του πλασμιδίου pUCENB/*NcoI-BamHI* και του πλασμιδίου pCR-blunt::*Ppca/NcoI-BamHI*. Με βέλη υποδεικνύονται οι ζώνες που κόπηκαν από το πήγμα αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης για να προκύψει το πλασμίδιο pUCENB::*Ppca* του οποίου ο πλασμιδιακός χάρτης παρατίθεται.

Τελευταίο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι υποκλωνοποίηση τμήματος *EcoRI-BamHI* από το pUCENB::*Ppca*, που περιέχει και τον προαγωγό του πρωτοκατεχοϊκού, στο πλασμίδιο pART2-gfp.



Σχήμα 3.4.4.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης όπου φαίνεται η περιοριστική ανάλυση του πλασμιδίου pART2-gfp/*EcoRI-BamHI* και του πλασμιδίου pUCENB::*Ppca/EcoRI-BamHI*. Με βέλη υποδεικνύονται οι ζώνες που κόπηκαν από το πήγμα αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης για να προκύψει το πλασμίδιο pART2-gfp::*Ppca* του οποίου ο πλασμιδιακός

χάρτης παρατίθεται.

Ακολούθησε μετασηματισμός κυττάρων του στελέχους *Srhe3* με τα πλασμίδια *pART2*, *pART2-gfp* και *pART2-gfp::Prca* με τη τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης όπως αναλύθηκε στην §3.3.3.

3.4.5 Πειράματα μέτρησης φθορισμού για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του πιθανού προαγωγού *Prca*

Έγιναν προκαλλιέργειες O/N σε LB ή LB+ 0.1% Tween για τα: *Srhe3/pART2* (αρνητικός μάρτυρας), *Srhe3/ pART2-gfp* (θετικός μάρτυρας) και *Srhe3/pART2-gfp::Prca*.

*Παρατήρηση: στο ανασυνδυασμένο στέλεχος *Srhe3/pART2-gfp::Prca* κατά την ανάπτυξη σε LB σχηματίζονται συσσωματώματα σε πολύ έντονο βαθμό, για το λόγο αυτό η επώαση γίνονταν σε LB+ 0.1% Tween.

Εν συνεχεία κύτταρα προκαλλιέργειας εμβολιάζονται σε MM M9 με πηγές άνθρακα πρωτοκατεχοϊκό οξύ (15 mM), γλυκόζη (0.4%) και φαινανθρένιο (0.01%) με αντιβιοτικό Kan (60 µg/µl) και επώάζονται O/N. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην §2.19 και η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο Shimadzu με διέγερση στα 488 nm και εκπομπή στα 511 nm (Douka *et al.*, 2001).

Σε όλα τα εξεταζόμενα υποστρώματα τα κύτταρα του στελέχους *Srhe3/pART2-gfp* που χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας, παρουσιάζουν πολύ έντονο φθορισμό γιατί φέρουν τον ιδιοσυστατικό προαγωγό του γονιδίου της οξειδάσης της 6-D-υδροξυνοκωτίνης από το πλασμίδιο *pAO1* του στελέχους *A. nicotineovorans* (Sandu *et al.*, 2005). Δυστυχώς, από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι τα κύτταρα *Srhe3/pART2-gfp::Prca* εμφανίζουν τιμές φθορισμού ανάλογες αυτών που επιδεικνύουν τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας (*Srhe3/pART2*) και που δεν φέρουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη (Πίνακας 3.4.5.1). Η επιλεγμένη προς εξέταση λοιπόν περιοχή δεν εμφανίζει δραστικότητα προαγωγού, παρόλο που διαθέτει χαρακτηριστικά προαγωγού.

Πίνακας 3.4.5.1 Τιμές φθορισμού για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του προαγωγού *Ppca*.

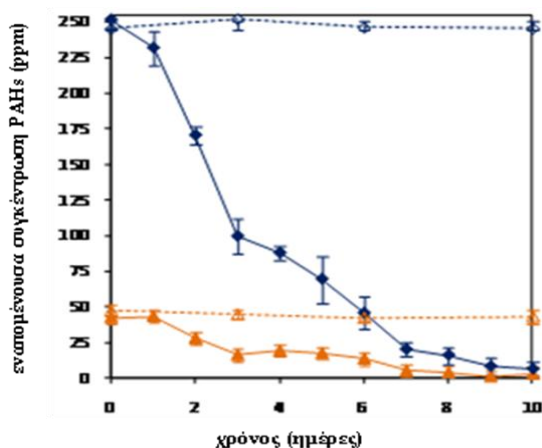
Υπόστρωμα	Ανασυνδυασμέ νο στέλεχος	Μ.Ο μετρήσεων φθορισμού	mg πρωτεΐνης στο δείγμα	Φθορισμός/ mg πρωτεΐνης
Γλυκόζη	<i>Sphe3/pART2</i>	197.5	12.3	16.1
	<i>Sphe3/pART2- gfp</i>	1015.7	12.3	82.6
	<i>Sphe3/pART2- gfp::Ppca</i>	160.7	9.9	16.2
Φαινανθρένιο	<i>Sphe3/pART2</i>	41.1	1.02	40.3
	<i>Sphe3/pART2- gfp</i>	1048.6	1.26	832.2
	<i>Sphe3/pART2- gfp::Ppca</i>	47.1	1.05	44.9
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	<i>Sphe3/pART2</i>	140.6	9.2	15.3
	<i>Sphe3/pART2- gfp</i>	1015.7	4.6	220.8
	<i>Sphe3/pART2- gfp::Ppca</i>	105.7	8.76	12.1

3.5 Έλεγχος συν-μεταβολισμού παρουσία και άλλων ΡΑΗs

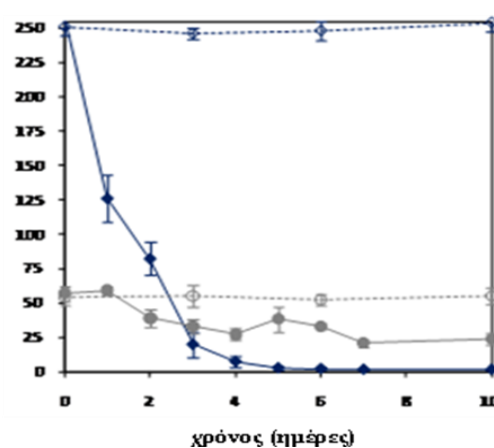
Για επιτυχή εξυγίανση των εδαφών με τη χρήση μικροοργανισμών, μέσω της βιοαποδόμησης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός ότι στο φυσικό περιβάλλον η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σχετίζεται με την ύπαρξη μιγμάτων πηγών άνθρακα λόγω της παρουσίας των ποικίλων υποστρωμάτων (Κονάρονά-Konar and Egli, 1998). Ο συν-μεταβολισμός είναι μια διεργασία που δεν οφείλει ενεργειακά το κύτταρο, αλλά αποτελεί πολύ επωφελή διεργασία για το

περιβάλλον, συντελώντας στην αποδόμηση των οργανικών ρύπων (Johnsen *et al.*, 2005). Επιπλέον, μέσω του φαινομένου του συν-μεταβολισμού ενοείται η αποδόμηση των PAHs υψηλού μοριακού βάρους.

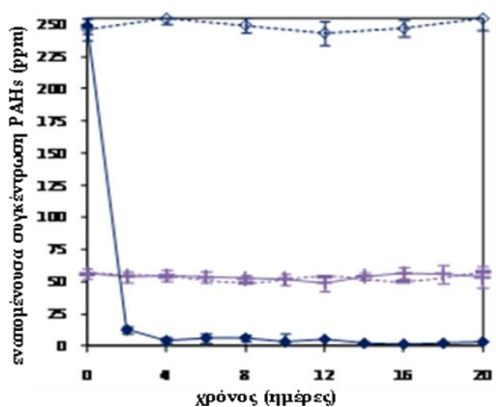
φαινανθρένιο/φλουορένιο



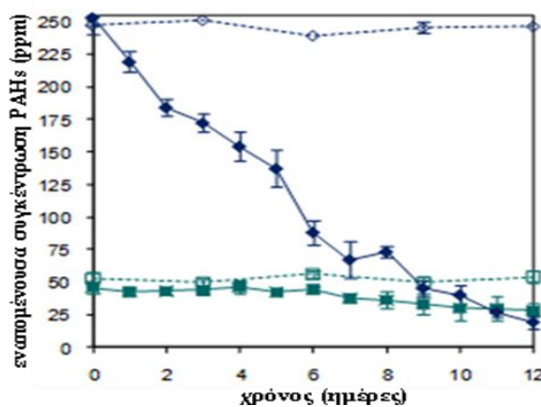
φαινανθρένιο/ανθρακενίου



φαινανθρένιο/χρυσένιο



φαινανθρένιο/φλουορανθένιο



Σχήμα 3.5.1 Αποδόμηση PAHs από το στέλεχος *Srhe3* σε δυαδικά συστήματα παρουσία φαινανθρενίου σε συγκέντρωση 250 mg L⁻¹ και φλουορένιου ή ανθρακενίου ή φλουορανθενίου ή χρυσένιου, σε συγκέντρωση 50 mg L⁻¹. Τα σύμβολα αναπαριστούν την εναπομένονσα συγκέντρωση: (♦) φαινανθρενίου, (▲) φλουορένιου, (●) ανθρακενίου, (■) φλουορανθενίου και (±) χρυσένιου. Μη γεμισμένα σύμβολα με διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε πειραματικές σειρές control νεκρών κυττάρων.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συν-μεταβολική δραστηριότητα στο στέλεχος *Srhe3* εξετάστηκαν τα δυαδικά συστήματα φαινανθρενίου με φλουορένιο ή ανθρακενίου, ή χρυσένιο, ή φλουορανθένιο. Η συγκέντρωση του φαινανθρενίου

που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μίγμα ήταν 250 mg L^{-1} , ενώ η συγκέντρωση για κάθε δευτερεύοντα PAH στα μίγματα ήταν 50 mg L^{-1} . Πειραματικές σειρές νεκρών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικός μάρτυρας. Μέσα στο χρονικό διάστημα 30 ημερών γινόταν συλλογή υπερκειμένου από τις καλλιέργειες, εκχύλιση των PAHs και προσδιορισμός της εναπομένουσας δραστηριότητάς τους με αέριο χρωματογραφία.

Στα ανωτέρω δυαδικά συστήματα διαπιστώθηκε ότι το φλουορένιο και το ανθρακένιο συν-καταβολίζονται πλήρως από το στέλεχος *Srhe3*, ενώ το φλουορανθένιο μερικώς. Η συγκέντρωση του χρυσενίου παραμένει ίδια κατά το χρόνο της επώασης των κυττάρων και συνεπώς το χρυσένιο δεν συν-καταβολίζεται στο δυαδικό σύστημα φαινανθρενίου/χρυσενίου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε δυαδικό σύστημα φαινανθρενίου/πυρενίου που εξετάστηκε, όπου επίσης παρατηρήθηκε ότι ο συν-καταβολισμός του πυρενίου είναι αμελητέος. Φαίνεται λοιπόν ότι τα μικρότερου μοριακού βάρους φλουορένιο και ανθρακένιο συν-καταβολίζονται παρουσία του φαινανθρενίου, ενώ το στέλεχος *Srhe3* αδυνατεί να συν-καταβολίσει τα μεγαλύτερα μοριακού βάρους φλουορανθένιο, πυρένιο και χρυσένιο (Διδακτορική διατριβή Μαρίας Πούλη).

3.6 Συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans* *Srhe3* κατά την ανάπτυξη του σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακος

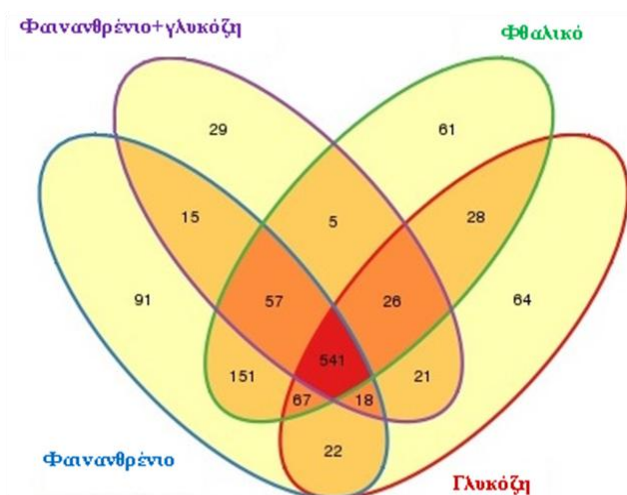
Για την πλήρη διευκρίνηση της πορείας αποδόμησης του φαινανθρενίου, καθώς επίσης και την μελέτη της απόκρισης των κυττάρων του στελέχους *Srhe3* στην παρουσία του, πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση των κυττάρων του *Srhe3* ύστερα από ανάπτυξή τους παρουσία διαφόρων άνθρακα. Ως πηγές άνθρακα επιλέχθηκαν το φαινανθρένιο, το φθαλικό οξύ που αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη του καταβολισμού του φαινανθρενίου (Σχήμα 1.4.2), η γλυκόζη καθώς επίσης και μίγμα φαινανθρενίου, γλυκόζης.

Ακατέργαστα κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα του στελέχους *Srhe3* (§2.22) που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης MM M9

παρουσία των ανωτέρω πηγών άνθρακα, συλλέχθηκαν και εστάλησαν στο Ινστιτούτο Βιοιατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» (§2.23) για ανάλυση με τη μεθοδολογία nanoLC/MS-MS.

3.6.1 Σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ από τις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους *A. phenanthrenivorans* Sρhe3

Χαρακτηρίστηκαν 1197 πρωτεΐνες με προβλεπόμενη λειτουργία από τις τέσσερις εξεταζόμενες συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους Sρhe3, δηλαδή πάνω από το 1/3 των πρωτεϊνών με προβλεπόμενη λειτουργία, όπως έχουν βρεθεί από την ανάλυση του γονιδιώματος.



Σχήμα 3.6.1.1 Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τη συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ του στελέχους Sρhe3 παρουσία των διαφόρων χρησιμοποιούμενων πηγών άνθρακα. Στο διάγραμμα φαίνονται οι αλληλοεπικαλυπτόμενες καθώς και οι μοναδικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με μεθοδολογία LC-MS/MS από την κάθε συνθήκη.

Μεταξύ αυτών 541 πρωτεΐνες βρέθηκαν να είναι κοινές σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες, εκπροσωπώντας τον πυρήνα του πρωτεώματος (core proteome). Στα δείγματα από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φαινανθρένιο ανιχνεύθηκαν συνολικά 632 πρωτεΐνες, στο φθάλικο ανιχνεύθηκαν 602 πρωτεΐνες, στη γλυκόζη 605 πρωτεΐνες και τέλος στο μίγμα φαινανθρενίου με γλυκόζη 570 πρωτεΐνες. Ταυτοποιήθηκαν 91 πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται αποκλειστικά σε φαινανθρένιο, 61 στο φθάλικο, 64 στη γλυκόζη και 29 στο μίγμα φαινανθρενίου

3.6.2 Αποτελέσματα πρωτεωμικής ανάλυσης με βάση τη λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών

Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης οδήγησαν στην αποσαφήνιση της καταβολικής πορείας του φαινανθρενίου, αλλά ταυτόχρονα και στη διερεύνηση των διεργασιών της μεταβολικής προσαρμογής των κυττάρων του στελέχους *Srhe3* παρουσία των διαφορετικών πηγών άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων. Παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών του κυτταρικού φακέλου, πρωτεϊνών συστημάτων μεταφοράς, πρωτεϊνών σχετιζομένων με καταπόνηση, πρωτεϊνών του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα και μεταβολισμού των αμινοξέων. Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων ανα κατηγορία.

3.6.2.1 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην καταβολική πορεία του φαινανθρενίου

Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου συνιστούν το 18.8% επί των συνολικών πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν για κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου και το 22.4% για κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία φθαλικού. Πρόκειται κυρίως για ένζυμα με ρόλο κλειδί στην αποδόμηση των ΡΑΗ και τα οποία ανήκουν στις κατηγορίες των διοξυγονασών υδροξυλίωσης και σχάσης του αρωματικού πυρήνα καθώς επίσης και των αφυδρογονασών. Τα ένζυμα αυτά παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων του φαινανθρενίου και του φθαλικού συγκρινόμενα με τα επίπεδα έκφρασής τους στη γλυκόζη. Τα ένζυμα που ταυτοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.6.2.1.1).

Πίνακας 3.6.2.1.1 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον καταβολισμό PAHs και παρουσιάζουν αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους παρουσία φαινανθρενίου (Phen) και του φθαλικού (Phth) σε σχέση με τη γλυκόζη (Gluc).

Gene locus tag ^a	Όνομα πρωτεΐνης	LFQ ^b ratio Phen/Gluc	LFQ ^b ratio Phth/Gluc	p value Phen vs Gluc	p value Phth vs Gluc
Πορεία καταβολισμού των PAH					
Asphe3_40070	διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης, μεγάλη υπομονάδα (JGI) (Rhd1α)	581.29	147.47	1.01E-13	9.72E-11
Asphe3_40080	διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης, β υπομονάδα (JGI: μικρή υπομονάδα της διοξυγονάσης φαινυλπροπionικού οξέος) (Rhd1β)	39.92	12.72	6.36E-13	3.42E-05
Asphe3_42640	διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης, α υπομονάδα (JGI: διοξυγονάση του φαινυλπροπionικού οξέος, α υπομονάδα) (Rhd2α)	Phen	Phth	-	-
Asphe3_42630	διοξυγονάση αρχικής υδροξυλίωσης, β υπομονάδα (JGI: μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης του φαινυλπροπionικού οξέος) (Rhd2β)	Phen	Phth	-	-
Asphe3_40250	διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (Diox1)	7.18	10.37	1.15E-14	1.09E-13
Asphe3_22020	διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (Diox2)	11.15	23.14	3.73E-04	2.33E-06
Asphe3_40240	υδρατάση-αλδολάση της <i>trans</i> -2-	5.56	5.43	5.41E-09	9.70E-10

	καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (JGI: διϋδροπικολινική συνθάση/λυάση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος)				
Asphe3_22010	υδρατάση-αλδολάση της <i>trans</i> -2- καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (JGI: διϋδροπικολινική συνθάση/λυάση του N-ακετυλνευραμινικού οξέος)	49.38	108.68	1.23E-04	3.23E-07
Asphe3_40220	αφυδρογονάση της 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδης (JGI: NAD-εξαρτώμενη αφυδρογονάση αλδεΐδη)	6.20	5.66	3.92E-11	8.40E-12
Asphe3_42420	μεταγραφικός ρυθμιστής, IclR	Phen	Phth	-	0.23
Asphe3_40740	μεταγραφικός ρυθμιστής, PhtR	0.71	1.18	0.10	0.18
Asphe3_42490	αφυδρογονάση 3,4-διϋδρο-3,4- διϋδροξυφθαλικού οξέος (JGI: αλδο/κετο ρεδουκτάση, ρεδουκτάση δικετογλουτονικού)	Phen	Phth	1.66E-08	3.75E-11
Asphe3_42480	3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, α υπομονάδα	Phen	Phth	1.04E-14	1.74E-16
Asphe3_42470	3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, β υπομονάδα	Phen	Phth	2.88E-15	5.75E-15
Asphe3_42440	3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, υπομονάδα φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης	112.49	385.68	7.61E-11	2.19E-11
Asphe3_42430	αποκαρβοξυλάση του 3,4-διϋδροξυφθαλικού οξέος	Phen	Phth	3.79E-06	2.21E-07

Asphe3_42460	υποθετική πρωτεΐνη	Phen	Phth	6.69E-04	3.28E-12
Asphe3_40700	υποθετική πρωτεΐνη	Phen	Phth	-	-
Asphe3_40670	αφυδρογονάση 3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος (JGI: αλδο/κετο ρεδουκτάση, ρεδουκτάση δικετογλουτονικού)	Phen	Phth	-	-
Asphe3_40690	3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, β υπομονάδα	Phen	Phth	4.83E-08	1.04E-11
Asphe3_40720	3,4-διοξυγονάση του φθαλικού οξέος, υπομονάδα φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης	Phen	Phth	1.85E-11	1.02E-15
Asphe3_40730	αποκαρβοξυλάση του 3,4-διϋδροξυφθαλικού οξέος	Phen	Phth	-	-
Asphe3_38850	3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, α υπομονάδα	3.35	36.67	6.34E-03	3.47E-03
Asphe3_38860	3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, β υπομονάδα	35.96	125.30	1.58E-03	1.10E-07
Asphe3_38820	αποκαρβοξυλάση της 4-καρβοξυμουκονολακτόνης	Phen	Phth	-	-
Asphe3_38830	ενολο-λακτόνη του 3-οξοαδιπικού οξέος	Phen	Phth	-	-
Asphe3_38840	κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ- <i>cis,cis</i> -μουκονικού οξέος	Phen	Phth	-	0.05
Asphe3_42380	3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, β υπομονάδα, 3,4-διοξυγονάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, α υπομονάδα	Phen	Phth	2.29E-03	1.10E-06
Asphe3_42350	υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος	40.37	143.47	1.51E-06	1.12E-08

Asphe3_42370	υδρολάση του 2-πυρονη-4,6-δικαρβοξυλικού οξέος	Phen	Phth	2.35E-03	3.35E-07
Asphe3_42390	αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης	Phen	Phth	4.81E-06	3.55E-05
Asphe3_42340	μεταγραφικός ρυθμιστής	Phen	Phth	-	-

^a Locus tag numbers αποδίδονται σε κάθε γονίδιο που ταυτοποιήθηκε από τη γονιδιωματική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο JGI.

^b LFQ: Label Free Quantification- Ποσοτικοποίηση μη σημασμένων πρωτεϊνών.

Πρόκειται για μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, κατά την οποία δεν λαμβάνει χώρα σήμανση των πρωτεϊνών (πεπτιδίων) με κάποιο ισότοπο και η μόνη επεξεργασία στην οποία υπόκεινται τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, είναι η πέψη με θρυψίνη. Κατά τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η αυτόνομη σύγκριση κάθε δείγματος με κάθε άλλο όμοιο δείγμα, αφού προηγηθεί κανονικοποίηση της έντασης των κορυφών που προκύπτουν από τη χρωματογραφική ανάλυση κάθε πεπτιδίου, με χρήση του λογισμικού MaxQuant. Κανονικοποιούνται δείγματα από τρεις τουλάχιστον επαναλήψεις (για κάθε εξεταζόμενη συνθήκη) και έτσι προκύπτει η τιμή της Κανονικοποιημένης Έντασης κάθε κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε πεπτιδίο (LFQ Intensity), η οποία μπορεί να συγκριθεί αυτόνομα με την αντίστοιχη τιμή οποιουδήποτε άλλου δείγματος.

Phen: η πρωτεΐνη ήταν παρούσα μόνο σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου και όχι γλυκόζης, Phth: η πρωτεΐνη ήταν παρούσα μόνο σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου και όχι γλυκόζης

“-“ : η πρωτεΐνη δεν πέρασε τα κριτήρια της στατιστικής ανάλυσης

Οι πρωτεΐνες *Asphe3_40070* και *Asphe3_40080* που κωδικεύονται από τα γονίδια *rhd1a* και *rhd1β*, αντίστοιχα, (αναλυτική περιγραφή στην §3.2) και βρίσκονται στο *pASPHE301*, επέδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασής τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων του φαινανθρενίου και του φθαλικού σε σχέση με τη γλυκόζη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έκφρασή τους είναι περίπου 4πλάσια στο φαινανθρένιο σε σχέση με το φθαλικό, κάτι που ενισχύει την ένδειξη ότι αποτελούν τις διοξυγονάσεις που φέρουν εις πέρας την αρχική προσβολή στον αρωματικό δακτύλιο του φαινανθρενίου μέσω της υδροξυλίωσης (Σχήμα 3.6.2.1.2). Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Asphe3_42630* και *Asphe3_42640*, που κωδικεύονται από τα γονίδια *rhd2a* και *rhd2β*, αντίστοιχα, (αναλυτική περιγραφή στην §3.2) και βρίσκονται στο *pASPHE302*, ήταν χαμηλότερα στο φαινανθρένιο σε σχέση με το φθαλικό οξύ.

Σημαντική επίσης αύξηση στην έκφρασή τους παρουσίασαν οι πρωτεΐνες του πλασμιδίου *pASPHE301*, διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (*Asphe3_40250*) που κωδικεύεται από το γονίδιο *diox1*, η υδρατάση-αλδολάση της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΰδης του πυροσταφυλικού (*Asphe3_40240*) και η αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΰδης (*Asphe3_40220*) (αναλυτική περιγραφή §3.3). Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του χρωμοσώματος, διοξυγονάση του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (*Asphe3_22020*) που κωδικεύεται από το γονίδιο *diox2* και η υδρατάση-αλδολάση της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΰδης του πυροσταφυλικού (*Asphe3_22010*) (αναλυτική περιγραφή §3.3). Τα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών, όπως προκύπτει από την πρωτεωμική ανάλυση, είναι παρόμοια μεταξύ κυττάρων του στελέχους *Srhe3* που καλλιεργήθηκαν σε φαινανθρένιο ή φθαλικό (Σχήμα 3.6.2.1.2).

Ανιχνεύθηκαν επίσης και πρωτεΐνες των δυο οπερονίων, με 87% μεταξύ τους ταυτότητα, που φέρουν εις πέρας τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ και βρίσκονται στα πλασμίδια *pASPHE301* και *pASPHE302* (Σχήμα 1.7.1.3) (Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου). Έτσι, από το *pASPHE301* ταυτοποιήθηκαν η β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού οξέος (*Asphe3_40690*), η

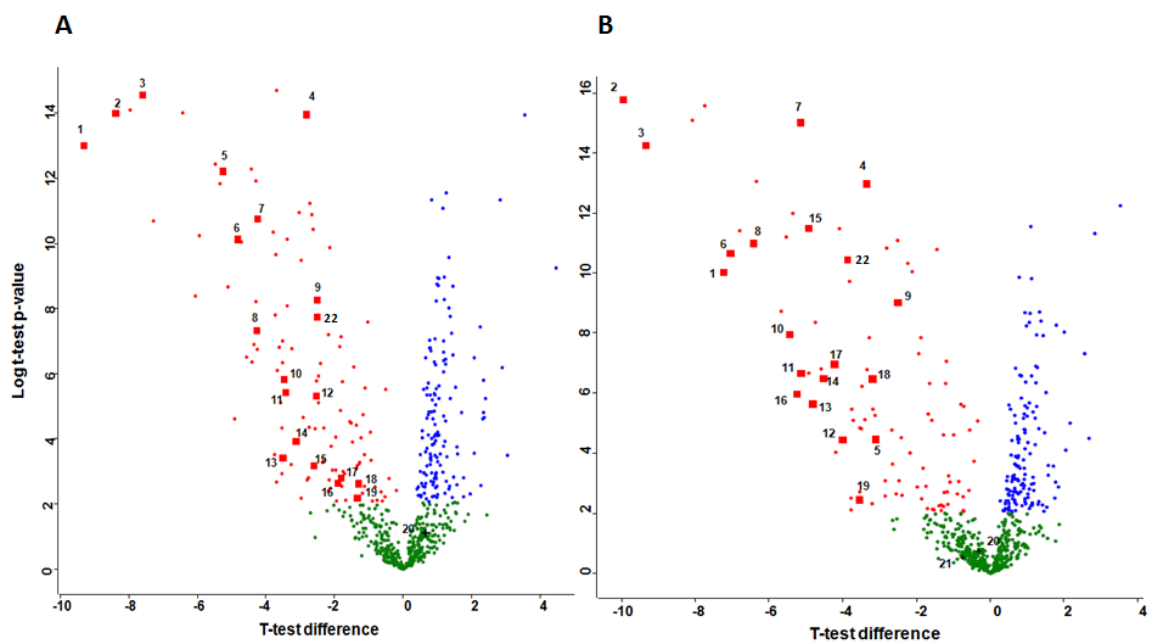
υπομονάδα της φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης (Asphe3_40720) και η αφυδρογονάση του 3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος (Asphe3_40670). Η αποκαρβοξυλάση 3,4-διϋδροξυφθαλικού οξέος (Asphe3_40730) και ο μεταγραφικός ρυθμιστής PhthR (Asphe3_40740) ανιχνεύθηκαν σε κάποια από τα δείγματα, αλλά δεν είναι ανάμεσα στις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες. Αντιστοίχως, από το pASPHE302 ταυτοποιήθηκαν η α και β υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού οξέος (Asphe3_42480 και Asphe3_42470, αντίστοιχα), η υπομονάδα της φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης (Asphe3_42430), η αφυδρογονάση του 3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος (Asphe3_42490) και η υποθετική πρωτεΐνη (Asphe3_42460), ενώ ο μεταγραφικός ρυθμιστής IclR (Asphe3_42420) και αυτού του οπερονίου ανιχνεύθηκε σε κάποια δείγματα αλλά δεν είναι ανάμεσα στις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι πρωτεΐνες που συνιστούν τα οπερόνια του φθαλικού οξέος στα δυο καταβολικά πλασμίδια του στελέχους *Srhe3*, από την πρωτεωμική ανάλυση βρέθηκε πως παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία του φθαλικού σε σχέση με το φαινανθρένιο (Σχήμα 3.6.2.1.2).

Όπως αναφέρθηκε και στην §3.4, η μελέτη *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3* κατέδειξε την ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στην *ortho*- όσο και στην *meta*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και εντοπίζονται στο χρωμόσωμα και στο pASPHE302, αντίστοιχα (Σχήματα 3.4.1 και 3.4.2). Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης με την ταυτοποίηση πρωτεϊνών και απο τις δυο πορείες καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έρχονται να επιβεβαιώσουν τα ανωτέρω αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά, ανιχνεύθηκαν η α και β υπομονάδα της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Asphe3_42380), η υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος (Asphe3_42350), η υδρολάση του 2-πυρόνη-4,6-δικαρβοξυλικού οξέος (Asphe3_42370), η αφυδρογονάση της 4-καρβοξυ-2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεϋδης (Asphe3_42390) που εμπλέκονται στη *meta*-σχάση, καθώς και η α υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Asphe3_38850) που εμπλέκεται στην *ortho*-σχάση. Επιπλέον, από την πορεία της *ortho*-σχάσης ανιχνεύθηκαν σε κάποια δείγματα και η

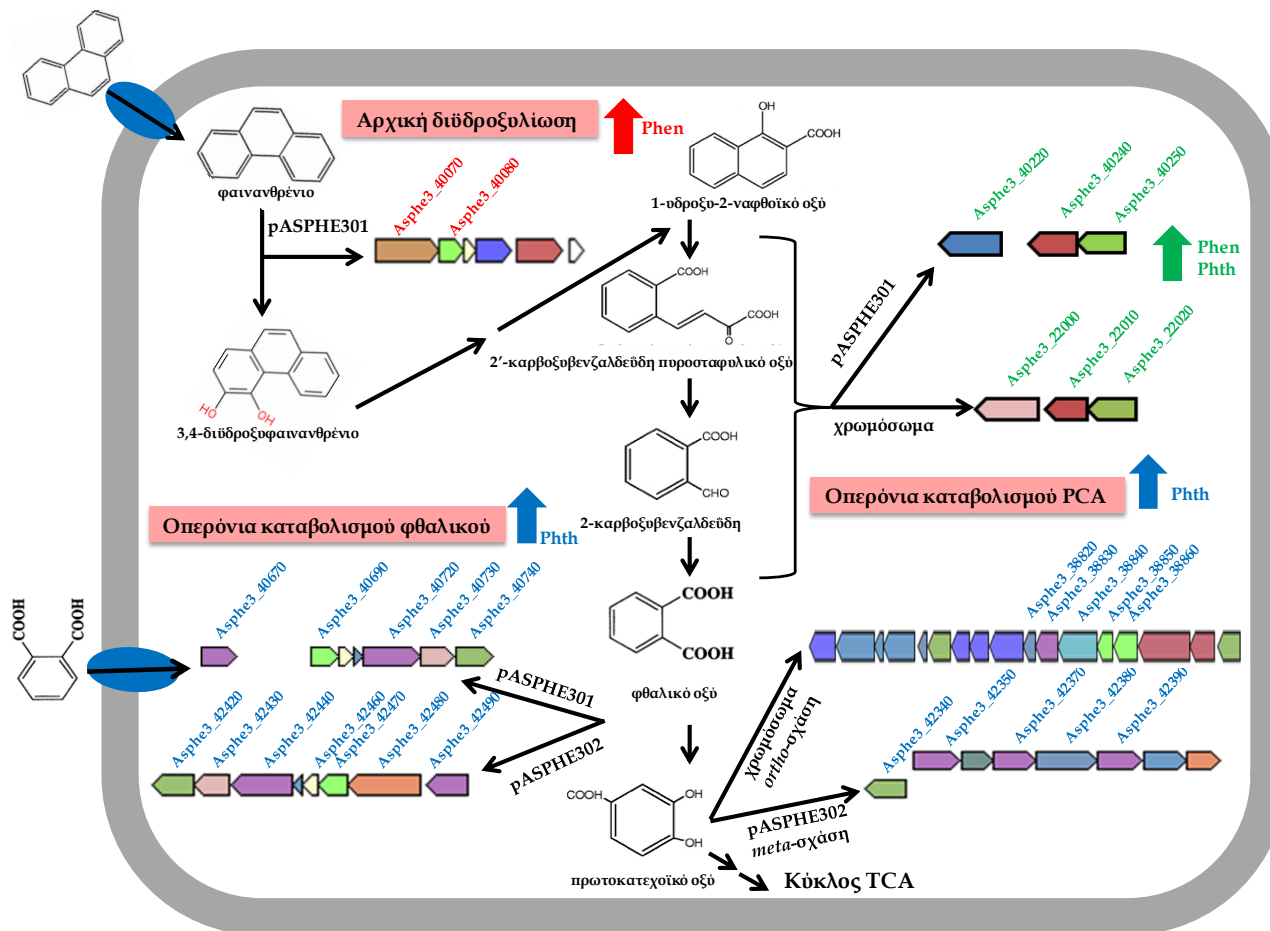
αποκαρβοξυλάση της 4-καρβοξυμουκονολακτόνης (Asphe3_38830) καθώς και η κυκλοϊσομεράση του 3-καρβοξυ-*cis,cis*-μουκονικού οξέος (Asphe3_38840) αλλά δεν είναι ανάμεσα στις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες. Από την πρωτεωμική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται τόσο στην *ortho*- όσο και στην *meta*- πορεία καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, είναι αυξημένα σε κύτταρα του στελέχους Sphe3 που καλλιεργήθηκαν παρουσία φθαλικού σε σχέση με το φαινανθρένιο (Σχήμα 3.6.2.1.2). Η διαφορά αυτή που παρατηρείται στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων παρουσία της μιας ή της άλλης αρωματικής ένωσης, μπορεί να αποδοθεί είτε στην ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών ελέγχου της ρύθμισης που ενεργοποιούνται από διαφορετικές αρωματικές ενώσεις, είτε στο ότι ο ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων του στελέχους Sphe3 παρουσία του φθαλικού σε σχέση με εκείνον του φαινανθρενίου μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών (Kurbatov *et al.*, 2006).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι όλα τα καταβολικά ένζυμα της πορείας αποδόμησης του φαινανθρενίου εμφανίζουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρουσία της γλυκόζης είτε κατά την αποκλειστική χρήση αυτής, είτε σε μίγμα αυτής με φαινανθρένιο.

Κατανομή των πρωτεϊνών με διαφορές στα επίπεδα έκφρασης παρουσία φαινανθρενίου ή φθαλικού σε σύγκριση με τη γλυκόζη απεικονίζεται στα διαγράμματα ηφαιστείου (volcano plots) που παρατίθενται (Σχήμα 3.6.2.1.1).



Σχήμα 3.6.2.1.1 Διαγράμματα ηφαιστείου (volcano plots) που αναπαριστούν την το μέγεθος (magnitude) (άξονας x) και την σημαντικότητα (significance) (άξονας y) της συγκριτικής ανάλυσης μεταξύ: (A) φαινανθρενίου σε σχέση με τη γλυκόζη και (B) φθαλικού σε σχέση με τη γλυκόζη. Οι κόκκινες και μπλέ κουκίδες αναπαριστούν τις στατιστικά σημαντικά μεταβαλλόμενες πρωτεΐνες, ενώ οι πράσινες τις στατιστικά μη σημαντικές πρωτεΐνες. Με κόκκινα τετράγωνα συμβολίζονται οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον καταβολισμό των PAHs. Αυτές είναι αριθμημένες και κάθε αριθμός αντιστοιχεί στους *Asphe3* αριθμούς όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3.6.2.1.1 (1:40070, 2: 42480, 3:42470, 4:40250, 5:40080, 6:42440, 7:40720, 8:40690, 9:40240, 10:42350, 11:42430, 12:42390, 13:22020, 14:22010, 15:42460, 16:42380, 17:38860, 18:42370, 19:38850, 20:40740, 21:42420, 22:42490).



Σχήμα 3.6.2.1.2 Προτεινόμενη πορεία καταβολισμού φαινανθρενίου στο *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sph3, με βάση γονιδιωματική και πρωτεωμική ανάλυση. Για κάθε στάδιο της πορείας απεικονίζεται και η οργάνωση των γονιδίων στο γονιδίωμα του στελέχους Sph3, που κωδικεύουν τα κατάλληλα πρωτεϊνικά μέρη τα οποία φέρουν εις πέρας τις περιγραφόμενες αντιδράσεις. Με κόκκινους αριθμούς Asphe3 αναπαρίστανται τα ένζυμα με αυξημένη έκφραση παρουσία φαινανθρενίου, με μπλέ τα ένζυμα με αυξημένη έκφραση παρουσία φθαλικού και με πράσινους τα ένζυμα με παρόμοιες εκφράσεις σε φαινανθρένιο και φθαλικό.

έχουν ταυτοποιηθεί από την πρωτεωμική ανάλυση (βλέπε Πίνακα 3.6.2.1.1), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα από τις μελέτες *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3*.

3.6.2.2 Πρωτεΐνες του κυτταρικού φακέλου

Μείωση στα επίπεδα έκφρασής τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων σε σύγκριση με τη γλυκόζη παρουσίασαν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους εμφάνισαν πρωτεΐνες που αποτελούν πρόδρομα μόρια στην σύνθεση των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων καθώς επίσης και ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Πίνακας 3.6.2.2.1). Επίσης, τα ένζυμα που εμπλέκονται στην β -οξειδωση των λιπαρών οξέων εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία των αρωματικών υποστρωμάτων και μάλιστα η αύξηση ήταν μεγαλύτερη παρουσία του φαινανθρενίου σε σχέση με το φθαλικό οξύ (Πίνακας 3.6.2.2.1).

3.6.2.3 Πρωτεΐνες μεταφορείς

Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε αρωματικά υποστρώματα παρατηρήθηκε η αύξηση της έκφρασης ενός συμμεταφορέα Na^+ /προλίνης (*Asphe3_08830*), καθώς και δυο πρωτεϊνών της οικογενείας των περμεασών εκροής αραβινόζης (*Asphe3_22000*, *Asphe3_24320*) που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3* (Πίνακας 3.6.2.2.1). Επίσης αυξημένα επίπεδα έκφρασης και μάλιστα υψηλότερα στο φθαλικό σε σύγκριση με το φαινανθρένιο, παρατηρήθηκαν για τις υπομονάδες ενός συστήματος μεταφορέων με κασσέτες δέσμευσης ATP (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού που εντοπίζεται στα πλασμίδια *pASPHE301* και *pASPHE303*, πλησίον των οπερονίων του φθαλικού κάθε πλασμιδίου (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Αντίθετα, υπομονάδες συστημάτων μεταφορέων τύπου ABC μεταλλικών ιόντων (*Asphe3_25060*), μολυβδαινικού (*Asphe3_28500*), φωσφορικού (*Asphe3_03480*), υδατανθράκων (*Asphe3_07840*), μονοσακχαριτών (*Asphe3_11410*, *Asphe3_11390*) και αμινοξέων (*Asphe3_29570*, *Asphe3_29550*) βρέθηκαν σε αυξημένα επίπεδα

κατά την ανάπτυξη των κυττάρων στη γλυκόζη (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Τέλος, ανιχνεύθηκε μια μετατοπίαση πρωτεΐνης, υπομονάδα SecA (Asphe3_25750) και μια μετατοπίαση πρωτεΐνης μέσω στόχευσης διδύμων αργινινών (twin arginine-targeting protein translocase), της TatA/E οικογενείας (Asphe3_19080), οι οποίες εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων.

3.6.2.4 Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση καθώς και πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μηχανισμούς σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνικών μορίων βρέθηκαν να αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασής τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1). Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Asphe3_18710) με πιθανό αποτοξινωτικό από ξενοβιοτικές ενώσεις ρόλο (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006) ταυτοποιήθηκε μόνο στα δείγματα όπου ήταν παρούσες οι αρωματικές ενώσεις, ενώ τέλος η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Asphe3_18050), με το ρόλο της μετρίασης του οξειδωτικού στρες, παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων.

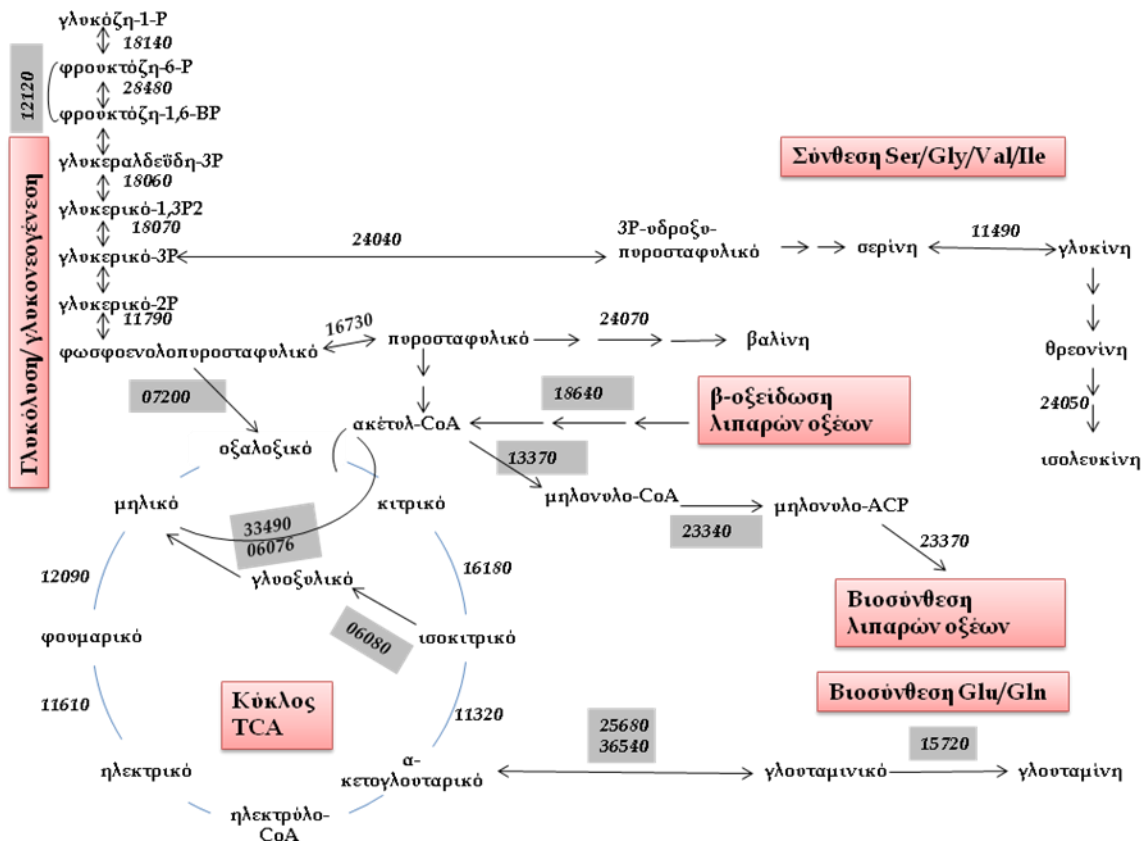
3.7.2.5 Πρωτεΐνες του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα

Τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις αρωματικές ενώσεις σε σύγκριση με τη γλυκόζη. Σε αντίθεση, αύξηση στην περίσσειά τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων επέδειξαν ένζυμα που εμπλέκονται στην πορεία της γλυκονεογένεσης (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1).

Ένζυμα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος παρουσιάζουν αύξηση της περίσσειάς τους στη γλυκόζη (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1).

Τέλος, αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων εμφάνισαν ένζυμα που κατέχουν ρόλο κλειδί στην πορεία του γλυοξυλικού, παρακαμπτήριοι του κύκλου του τρικαρβοξυλικού και συγκεκριμένα η

ισοκιτρική λυάση (Asphe3_06080) και δυο ομόλογα της μηλικής συνθάσης (Asphe3_06070, Asphe3_33490).



Σχήμα 3.6.2.5.1 Σχηματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα και του μεταβολισμού των αμινοξέων στο στέλεχος Sph3 κατά την ανάπτυξή του παρουσία των αρωματικών ενώσεων, εκπροσωπούμενων από αριθμούς Asphe3 (Πίνακας 3.6.2.2.1). Σε γκρι φόντο αναπαρίστανται οι πρωτεΐνες με αυξημένα επίπεδα έκφρασης, ενώ οι υπόλοιπες παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης.

3.6.2.6 Πρωτεΐνες του μεταβολισμού των αμινοξέων

Παρουσία των αρωματικών ενώσεων φαίνεται να ευνοείται η σύνθεση του γλουταμινικού και της γλουταμίνης από 2-οξογλουταρικό (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1). Αυξημένα επίσης επίπεδα έκφρασης στις αρωματικές ενώσεις παρατηρήθηκαν και για τα ένζυμα που καταλύουν την παραγωγή L-γλουταμικού μέσω L-ορνιθίνης. Αντίθετα, ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων της σερίνης, βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα

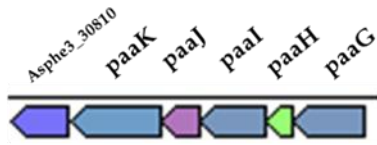
3.6.2.5.1). Το ένζυμο αφυδρογονάση της ημιαλδεύδης του ασπαρτικού (Asphe3_28660), που καταλύει τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης από ασπαρτικό εμφανίζει επίσης μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Τέλος, στο στέλεχος Sphe3 βρέθηκαν γονίδια που φέρουν εις πέρας τον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος (Πίνακας 3.6.2.2.1).

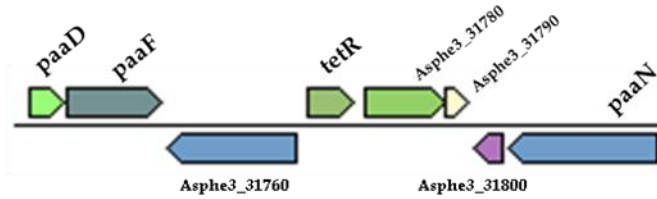
Ο καταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων, όπως για παράδειγμα της φαινυλαλανίνης, μπορεί στο στέλεχος Sphe3 να λαμβάνει χώρα μέσω της πορείας του φαινυλοξικού, όπως έχει αναφερθεί για άλλα βακτήρια (Teufel *et al.*, 2010). Πρόσφατα αναφέρθηκε πως το στέλεχος *Arthrobacter oxydans* CECT386, χρησιμοποιεί το φαινυλοξικό οξύ σαν μοναδική πηγή άνθρακα και χαρακτηρίστηκαν *in silico* τα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό του (Navarro-Llorens *et al.*, 2008). Επιπλέον, γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος βρέθηκαν και στο γονιδίωμα των στελεχών *Arthrobacter* FB24 και *Arthrobacter aurescens* TC1 (Navarro-Llorens *et al.*, 2008). Εξετάστηκε λοιπόν και διαπιστώθηκε πως και το στέλεχος Sphe3 χρησιμοποιεί το φαινυλοξικό οξύ σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (σε συγκεντρώσεις έως 15 mM) για την αερόβια ανάπτυξη του (Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 2.3.2.1). Εν συνεχεία, μελέτη *in silico* στο στέλεχος Sphe3 έδειξε την ύπαρξη γονιδιακών συμπλεγμάτων υπεύθυνων για τον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος, τα οποία εντοπίζονται σε δύο περιοχές στο χρωμόσωμα και η οργάνωσή τους μοιάζει με των αντίστοιχων γονιδίων που έχουν εντοπιστεί στο χρωμόσωμα του *Arthrobacter aurescens* TC1 (Σχήμα 3.6.2.6.1).

Ανοδικά των γονιδίων που κωδικεύουν τις υπομονάδες φαινυλοξικής-CoA οξυγονάσης (*paakJIHG*) για το στέλεχος Sphe3 και καθοδικά για το *A. aurescens*, εντοπίζεται ένα γονίδιο υδρατάσης του ενόυλο-CoA, το οποίο πιστεύεται ότι είναι ανάλογο του γονιδίου που κωδικεύει για την υδρατάση του ενόυλο-CoA *paab* των Gram- βακτηρίων, στα οποία έχει αναφερθεί ότι οι υπομονάδες της οξυγονάσης του φαινυλοξικού-CoA και της ανωτέρω υδρατάσης συνιστούν μια μεταγραφική μονάδα *paakJIHGB*.

Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3

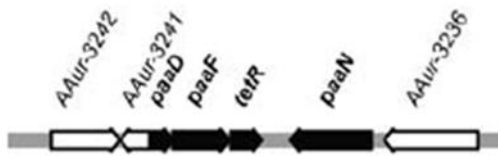


περιοχή I χρωμοσώματος

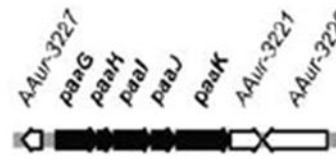


περιοχή II χρωμοσώματος

Arthrobacter aurescens (Navarro-Llorens et al., 2008)



περιοχή I χρωμοσώματος



περιοχή II χρωμοσώματος

Γονίδια υπεύθυνα για τον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος:

paaKJIHG: υπομονάδες οξυγονάσης του φαινυλοξικού-CoA, **paaD**: πρωτεΐνη αποδόμησης φαινυλοξικού οξέος, **paaF**: λιγάση του φαινυλοξικού-CoA, **tetR**: μεταγραφικός ρυθμιστής και **paaN**: πρωτεΐνη αποδόμησης φαινυλοξικού οξέος.

Υπόλοιπες πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα γονιδίων του στελέχους Sphe3:

Asphe3_30810: υδρατάση του ενόυλο-CoA, Asphe3_31760: οξειδοοδουκτάση Zn-εξαρτώμενη, οξειδοοδουκτάση NADPH: κίνησης, Asphe3_31780: πρωτεάση σερίνης, Asphe3_31790: υποθετική πρωτεΐνη, Asphe3_31800: γλυοζαλάση/πρωτεΐνη αντοχής σε βλεομυκίνη (bleomycin)

Υπόλοιπες πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα γονιδίων του *A. aurescens*:

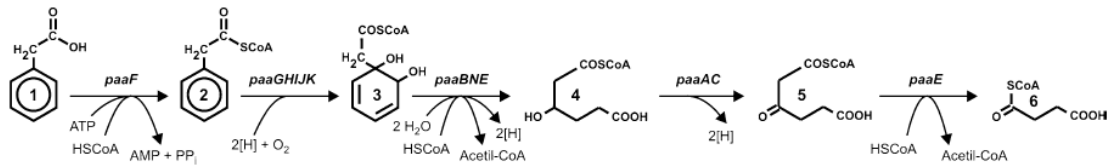
AAur_3241: ακετυλοτρανσφεράση, AAur_3236: υποθετική πρωτεΐνη, AAur_3227: μικρού μοριακού βάρους φωσφατάση φωσφοτυροσίνης, AAur_3221: υδρατάση του ενόυλο-CoA, AAur_3220: λιποπρωτεΐνη.

Σχήμα 3.6.2.6.1 Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των γονιδίων καταβολισμού του φαινυλοξικού οξέος στο *A. phenanthrenivorans* Sphe3 και *A. aurescens* TC1.

Κάποια από τα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος στα Gram- βακτήρια, δεν έχουν εντοπιστεί στα γονιδιώματα των στελεχών *Arthrobacter* (*Sphe3*, *FB24*, *aurescens*, *oxydans*) και πιο συγκεκριμένα από το οπερόνιο *paaABCDEF* (Teufel et al., 2010), εντοπίζονται μόνο τα γονίδια *paaD* και *paaF*.

Η βιοχημική πορεία αποδόμησης του φαινυλοξικού οξέος, όπως έχει προταθεί για το στέλεχος *E. coli* (Σχήμα 3.6.2.6.2), περιλαμβάνει τη μετατροπή του φαινυλοξικού οξέος σε φαινυλακετύλο-CoA, με τη δράση της λιγάσης του φαινυλοξικού οξέος (*paaF*). Ακολουθεί υδροξυλίωση και αναγωγή που καταλύεται από τις υπομονάδες της οξυγονάσης του φαινυλοξικού-CoA (*paaGHIJK*),

υδρολυτική σχάση του δακτυλίου και περαιτέρω αποδόμηση.



Σχήμα 3.6.2.6.2 Προτεινόμενη αερόβια πορεία καταβολισμού του φαινυλοξικού οξέος σε *E. coli* (Navarro-Llorens *et al.*, 2008). 1. φαινυλοξικό οξύ, 2. φαινυλακέτυλο-CoA, 3. *cis*-διϋδροδιόλη του φαινυλακέτυλο-CoA, 4. 3-υδροξυαδιϋλο-CoA, 5. 3-κετοαδιϋλο-CoA, 6. ηλεκτρώλο-CoA.

Πίνακας 3.6.2.2.1 Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους παρουσία των αρωματικών ενώσεων. Φαινανθρένιο: Phen, φθαλικό: Phth και γλυκόζη: Gluc.

Gene locus tag ^a	Όνομα πρωτεΐνης	LFQ ^b ratio Phen/Glu	LFQ ^b ratio Phth/Gluc	p value Phen vs Gluc	p value Phth vs Gluc
Πρωτεΐνες που εμφανίζουν αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους					
Πρωτεΐνες κυτταρικού φακέλου					
Asphe3_24080	αφυδρατάση διϋδροξικού οξέος	1.59	1.39	0.34	0.81
Asphe3_18640	αφυδρογονάση του ακυλο-CoA	8.77	2.66	1.89E-03	0.13
Asphe3_18660	θειολάση του 3-κετοακυλο-CoA	1.83	0.90	4.66E-04	0.63
Asphe3_23970	αποένζυμο αμινοτρανσφεράσης διακλαδισμένων αμινοξέων	2.65	2.09	2.97E-05	1.93E-03
Asphe3_23340	πρωτεΐνη-ακυλο-μεταφορέας S- μαλονυλτρανσφεράση	1.89	2.03	0.01	0.09
Asphe3_13770	καρβοξυλάση του ακετυλο/προπιονυλο- CoA, α υπομονάδα	3.83	4.79	6.3E-03	0.01

Πρωτεΐνες μεταφορείς					
Asphe3_08830	συμμεταφορέας Na ⁺ /προλίνης	Phen	Phth	2.35E-05	0.02
Asphe3_22000	πρωτεΐνη της οικογενείας των περμεασών εκροής αραβινόζης (πιθανός μεταφορέας του 1-υδροξυ-2- ναφθοϊκού οξέος)	Phen	Phth	3.14E-04	6.99E-03
Asphe3_24320	πρωτεΐνη της οικογενείας των περμεασών εκροής αραβινόζης	Phen	Phth	2.25E-05	8.57E-04
Asphe3_40640	υπομονάδα περμεάσης συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος)	Phen	Phth	0.02	7.76E-03
Asphe3_40630	υπομονάδα περμεάσης συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος)	Phen	Phth	5.81E-08	1.98E-03
Asphe3_40620	υπομονάδα ΑΤΡάσης συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος)	Phen	Phth	1.02E-14	2.74E-16
Asphe3_40610	περιπλασματική υπομονάδα	Phen	Phth	5.43E-13	6.56E-12

Asphe3_42540	<p>συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος) υπομονάδα ATPάσης συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος)</p>	Phen	Phth	6.81E-03	2.14E-07
Asphe3_42550	<p>περιπλασματική υπομονάδα συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού, (υπομονάδα πιθανού συστήματος μεταφοράς φθαλικού οξέος)</p>	545.84	1174.03	6.81E-03	8.76E-16

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση

Asphe3_36740	συνοδός πρωτεΐνη DnaK	1.46	1.06	0.05	0.41
Asphe3_36720	μοριακή συνοδός πρωτεΐνη της τάξης DnaJ με δομική περιοχή δακτύλων Zn στο C-άκρο	7.49	7.55	7.01E-04	5.31E-03
Asphe3_27290	συν-συνοδός πρωτεΐνη GroES	2.23	1.92	0.01	0.015

Asphe3_34150	οικουμενική πρωτεΐνη καταπόνησης ομοιάζουσα με UspA	2.09	2.10	0.01	8.49E-03
Asphe3_04950	οικουμενική πρωτεΐνη καταπόνησης ομοιάζουσα με UspA	6.22	6.15	1.86E-05	5.9E-04
Asphe3_36730	μοριακή συνοδός πρωτεΐνη GrpE (πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας)	0.77	0.96	0.97	0.64
Asphe3_20940	μοριακή συνοδός πρωτεΐνη (μικρή πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας)	2.78	1.86	0.03	0.64
Asphe3_18710	πιθανή S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης	Phen	Phth	0.44	0.52
Asphe3_18050	δισμουτάση υπεροξειδίου	1.78	1.99	0,19	-

Πρωτεΐνες κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα

Asphe3_07200	καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (GTP)	13.79	16.73	4.80E-11	3.44E-12
Asphe3_15280	πυροσταφυλική καρβοξυλάση	1.36	1.66	16.64E-04	2.76E-06
Asphe3_12120	διφωσφατάση της 1,6-φρουκτόζης, κατηγορία II	1.44	1.50	3.18E-06	1.71E-05
Asphe3_06080	ισοκιτρική λυάση	322.48	21.80	27.6E-05	28.9E-04
Asphe3_33490	μηλική συνθάση A	Phen	Phth	0.01	0.2
Asphe3_06070	μηλική συνθάση A	Phen	Phth	6.14E-06	66.02E-05

Πρωτεΐνες μεταβολισμού αμινοξέων

Asphe3_16710	γλουταμική συνθάση (NADH), μεγάλη υπομονάδα	0.37	0.59	0.01	0.12
Asphe3_16720	γλουταμική συνθάση (NADH), μικρή υπομονάδα	0.14	0.24	6.62E-07	9.44E-09
Asphe3_29360	NADPH-εξαρτώμενη γλουταμική συνθάση, οξειδοοξειδοκτάση τύπου βήτα αλυσίδας	0.49	0.47	0.02	1.58E-10
Asphe3_29250	αποένζυμο της 4-αμινοβουτυρικής αμινοτρανσφεράσης	1.55	1.35	0.01	0.1
Asphe3_36540	γλουταμική αφυδρογονάση (NADP)	2.39	2.48	0.46	0.15
Asphe3_25680	γλουταμική αφυδρογονάση (NAD)	12.40	9.62	1.62E-08	1.67E-07
Asphe3_15720	συνθετάση της L-γλουταμίνης	1.05	1.23	0.92	0.42
Asphe3_19480	δεακυλάση της ακετυλορνιθίνης / δεακυλάση τύπου δεηλεκτρυλάση του ηλεκτρολοδιαμινοπιμελικού	4.99	5.75	4.66E-04	3.04E-05
Asphe3_14760	αμινοτρανσφεράση της ακετυλορνιθίνης/ηλεκτρολορνιθίνης	4.22	3.84	0.02	0.03
Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αποδόμηση φαινολοξικού οξέος					
Asphe3_30810	υδρατάση του ενόυλο-CoA	3.16	2.00	4.85E-03	0.30
Asphe3_30820	οξυγονάση/ρεδοκτάση του	2.67	1.94	6.46E-07	2.54E-05

Asphe3_30840	φαινυλοξικο-CoA, υπομονάδα PaaK οξυγονάση του φαινυλοξικο-CoA, υπομονάδα PaaI	1.99	1.70	3.07E-04	23.25E-04
Asphe3_30850	οξυγονάση του φαινυλοξικο-CoA, υπομονάδα PaaH	4.34	2.36	1.76E-04	0.03
Asphe3_30860	οξυγονάση του φαινυλοξικο-CoA, υπομονάδα PaaG	5.01	3.93	9.06E-04	5.02E-06
Asphe3_31810	πρωτεΐνη αποδόμησης φαινυλοξικού οξέος paaN	3.16	2.00	2.74E-08	2.47E-06
Asphe3_31750	λιγάση του φαινυλοξικο-CoA	3.66	2.72	7.39E-08	1.73E-11

Πρωτεΐνες που εμφανίζουν μείωση στα επίπεδα έκφρασής τους

Πρωτεΐνες κυτταρικού φακέλου

Asphe3_15480	λιγάση του UDP-N- ακετυλμουραμυλ-τριπεπτιδίου-- D-αλανυλ-D-αλανίνης	0.71	0.48	0.04	0.03
Asphe3_33170	μεμβρανική καρβοξυπεπτιδάση (πενικιλίνο-δεσμευτική πρωτεΐνη)	0.49	0.44	0.02	7.17E-03
Asphe3_00250	D,D-τρανσπεπτιδάση της πεπτιδογλυκάνης κατά την ειδική κυτταρική επιμήκυνση	Gluc	0.22	2.91E-03	0.74
Asphe3_12450	πυροφωσφορυλάση της UDP-N- ακετυλογλυκοζαμίνης	0.41	0.64	3.64E-04	8.94E-03
Asphe3_27570	μουτάση της φωσφογλυκοζαμίνης	1.13	1.15	0.45	0.21

Asphe3_23370	3-οξοακυλο-(πρωτεΐνη-ακυλο-μεταφορέας) συνθάση II	0.49	0.62	5.81E-05	1.45E-04
---------------------	---	------	------	----------	----------

Πρωτεΐνες μεταφορείς

Asphe3_25060	περιπλασματική υπομονάδα/ επιφανειοπροσφυτική πρωτεΐνη συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) μεταλλικών ιόντων	0.63	0.31	0.01	2.71E-04
Asphe3_29570	πρωτεΐνη πρόσδεσης ATP μεταφορέας αμινοξέων (τύπου ABC), οικογένεια ΡΑΑΤ	0.55	0.59	3.20E-04	1.25E-04
Asphe3_29550	πρωτεΐνη πρόσδεσης υποστρώματος μεταφορέας αμινοξέων (τύπου ABC), οικογένεια ΡΑΑΤ	0.43	0.98	0.03	0.52
Asphe3_18500	υπομονάδα ΑΤΡάσης / πρωτεΐνη φωτοεπιδιόρθωσης (photorepair) PhrA συστήματος μεταφοράς (τύπου ABC) του μολυβδαινικού	0.44	0.61	1.19E-04	1.3E-04
Asphe3_07840	πρωτεΐνη πρόσδεσης ATP μεταφορέας υδρογονανθράκων (τύπου ABC), οικογένεια CUT1	0.75	0.78	3.47E-03	0.03
Asphe3_11410	πρωτεΐνη πρόσδεσης ATP μεταφορέας μονοσακχαριτών (τύπου ABC), οικογένεια CUT2	0.17	0.19	3.22E-04	3.21E-05

Asphe3_11390	πρωτεΐνη πρόσδεσης υποστρώματος μεταφορέας μονοσακχαριτών (τύπου ABC), οικογένεια CUT2	0.14	0.14	4.91E-12	4.88E-12
Asphe3_03480	πρωτεΐνη πρόσδεσης υποστρώματος μεταφορέας φωσφορικού (τύπου ABC), οικογένεια PhoT	0.51	0.43	0.02	6.59E-04
Asphe3_25750	μετατοπάση πρωτεΐνης, υπομονάδα secA	0.68	0.73	9.63E-05	1.6E-03
Asphe3_19080	μετατοπάση πρωτεΐνης μέσω στόχευσης διδυμων αργινινών (twin arginine-targeting protein translocase), TatA/E οικογένεια	0.35	0.55	0.03	0.24

Πρωτεΐνες κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα

Asphe3_18060	αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης	0.09	0.14	1.18E-14	0
Asphe3_16730	πυροσταφυλική κινάση	0.25	0.39	3.32E-07	2.19E-05
Asphe3_18070	φωσφογλυκερική κινάση	0.65	0.69	4.71E-03	3.92E-03
Asphe3_18140	ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	0.52	0.62	1.42E-04	36.81E-04
Asphe3_28480	6-φωσφοφρουκτοκινάση	0.16	0.32	5.86E-06	9.36E-04
Asphe3_06370	φωσφοενολοπυροσταφυλική	0.05	0.09	5.87E-10	5.91E-13

Asphe3_16180	καρβοξυλάση ακοτινάση	0.74	0.89	0.03	0.52
Asphe3_11610	ηλεκτρική αφυδρογονάση, α υπομονάδα	0.72	0.85	0.49	0.95
Asphe3_12090	φουμαράση	0.89	0.91	0.22	0.32
Asphe3_11320	ισοκιτρική σφυδρογονάση, NADP- εξαρτώμενη, μονομερούς τύπου	0.64	0.71	3.32E-07	2.56E-06
Asphe3_12670	διϋδρολιποαμιδική αφυδρογονάση, σύμπλοκο αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού/2-οξογλουταρικού	0.94	1.08	0.70	0.35

Πρωτεΐνες μεταβολισμού αμινοξέων

Asphe3_24070	ακετολακτική συνθάση, μεγάλη υπομονάδα	0.41	0.49	15.33E-04	46.71E-04
Asphe3_24050	ρεδουκτοΐσομεράση κετολ- οξέος	0.46	0.56	7.63E-05	8.49E-04
Asphe3_24040	αφυδρογονάση του D-3- φωσφογλυκερικού	0.44	0.48	1.12E-09	2.26E-09
Asphe3_11490	υδροξυμεθυλτρανοσφεράση της σερίνης	0.37	0.42	2.12E-09	1.20E-08
Asphe3_28660	αφυδρογονάση της ημιαλδεΐδης του ασπαρτικού	0.60	0.51	6.16E-04	5.92E-09

^a Locus tag numbers αποδίδονται σε κάθε γονίδιο που ταυτοποιήθηκε από τη γονιδιωματική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο JGI.

^b LFQ: Label Free Quantification

Rhen: η πρωτεΐνη ήταν παρούσα μόνο σε κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου και όχι γλυκόζης, Rhth: η πρωτεΐνη ήταν παρούσα μόνο σε κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου και όχι γλυκόζης.

“-“ : η πρωτεΐνη δεν πέρασε τα κριτήρια της στατιστικής ανάλυσης.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Διευκρίνιση της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3

Το στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3 καταβολίζει φαινανθρένιο σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας σε συγκεντρώσεις μέχρι και $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, υψηλότερες από όσες έχουν αναφερθεί για άλλα στελέχη του γένους (Kallimanis *et al.*, 2007).

Ο καταβολισμός του φαινανθρενίου από βακτήρια λαμβάνει χώρα μέσω δυο διαφορετικών πορειών, είτε μέσω της πορείας του φθαλικού οξέος (Kiyohara *et al.*, 1982; Iwabuchi and Harayama, 1997), είτε μέσω της πορείας του σαλικυλικού οξέος (Evans *et al.*, 1965) (Πιο αναλυτικά βλέπε § 1.4 και Σχήμα 1.4.2). Και στις δύο αυτές πορείες πρόδρομη ένωση αποτελεί το 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται είτε διοξυγόνωση και άνοιγμα του αρωματικού δακτυλίου προς σχηματισμό *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος, όπως έχει αναφερθεί για στελέχη των γενών *Mycobacterium* (Stingley *et al.*, 2004a), *Bacillus* (Doddamani and Ninnekar, 2000), *Micrococcus* (Gosh and Misra, 1983) και *Nocardioides* (Iwabuchi and Harayama, 1998b; Saito *et al.*, 1999 και 2000), είτε αποκαρβοξυλίωση και υδροξυλίωση προς σχηματισμό 1,2-διόλης του ναφθαλενίου (Pinyakong *et al.*, 2000; Prabhu and Phale, 2003). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και εναλλακτικές πορείες μεταβολισμού του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος μέσω 1-ναφθόλης (Samanta *et al.*, 1999; Prabhu and Phale, 2003) (Σχήμα 1.4.2). Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου από στελέχη του γένους *Arthrobacter*. Για το στέλεχος *Arthrobacter* P1-1 έχει αναφερθεί ότι ο καταβολισμός του φαινανθρενίου λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φθαλικού οξέος και δευτερευόντως μέσω σαλικυλικού (Seo *et al.*, 2006).

Το *A. phenanthrenivorans* Sphe3, φαίνεται να καταβολίζει το φαινανθρένιο μέσω της πορείας του φθαλικού οξέος, όπως προκύπτει από προηγούμενα πειράματα όπως:

(α) Κύτταρα του στελέχους Sphe3 καλλιεργούνται μόνο παρουσία 1-υδροξυ-2-

ναφθοϊκού οξέος, 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης, φθαλικού και πρωτοκατεχοϊκού οξέος σαν μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας, ενώ δεν παρατηρείται ανάπτυξη παρουσία σαλικυλικού οξέος (Σχήμα 1.4.2, Kallimanis *et al.*, 2009; Vandera *et al.*, 2012).

(β) Ανιχνεύτηκε δραστικότητα διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος καθώς και αφυδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε δραστικότητα υδροξυλάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος και του σαλικυλικού οξέος (Σχήμα 1.4.2, Vandera *et al.*, 2012).

(γ) Εντοπίστηκαν στα πλασμίδια pASPHE301 και pASPHE302 του στελέχους *Srhe3* σύμπλεγματα γονιδίων τα προϊόντα των οποίων ενδέχεται να συνιστούν ένζυμα για τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος προς πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Η μελέτη *in silico* έδειξε ότι τα δύο ανωτέρω συμπλέγματα παρουσιάζουν την ίδια δομή και οργάνωση γονιδίων και εμφανίζουν ταυτότητα της τάξης του 87% μεταξύ τους σε επίπεδο συνολικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Αποδείχθηκε ότι αυτά τα γονίδια συμμεταγράφονται συνιστώντας οργανωμένα οπερόνια (Σχήμα 1.7.1.3, Μ. Δ. Ε. Κουρτίδου).

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής οδήγησαν στην ταυτοποίηση σχεδόν όλων των γονιδίων του στελέχους *Srhe3* που συμμετέχουν στην πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου, τόσο με μοριακές προσεγγίσεις όσο και μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης. Η συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση χωρίς χρήση πηκτών με μεθοδολογία nanoLC-MS/MS δειγμάτων κυττάρων του στελέχους *Srhe3* από διαφορετικά υποστρώματα ανάπτυξης όπως φαινανθρένιο, φθαλικό και γλυκόζη αποτελεί την πρώτη μελέτη για το γένος *Arthrobacter*, αφού δεν υπάρχει κάποια πρότερη βιβλιογραφική αναφορά.

Συνοπτικά, μέσω της δράσης των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης Rhd1α-Rhd1β, επιτυγχάνεται η αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου προς 3,4-διϋδροδιόλη του φαινανθρενίου το οποίο εν συνεχεία με τη δράση διοξυγονασών που επιφέρουν σχάση του αρωματικού δακτυλίου καταβολίζεται προς 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκό οξύ. Στη συνέχεια, γίνεται διοξυγόνωση και άνοιγμα του αρωματικού δακτυλίου προς σχηματισμό *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού

οξέος με τη δράση των διοξυγονασών *diox1* και *diox2*. Η υδρατάση-αλδολάση της 2-καρβοξυβενζαλδεϋδης του πυροσταφυλικού οδηγεί στο σχηματισμό της 2-καρβοξυβενζαλδεϋδης, η οποία με τη δράση της αφυδρογονάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεϋδης οδηγεί στο σχηματισμό του φθαλικού οξέος. Το φθαλικό οξύ με τη διαδοχική δράση της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού οξέος, της αφυδρογονάσης του 3,4-διϋδροξυ-3,4-διϋδροφθαλικού οξέος και της αποκαρβοξυλάσης του 3,4-διϋδροξυφθαλικού οξέος μετατρέπεται σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Σχήμα 1.5.3.1).

Στην κατώτερη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου το πρωτοκατεχοϊκό οξύ καταβολίζεται είτε μέσω *ortho*-σχάσης (3,4-διοξυγόνωση) είτε μέσω *meta*-σχάσης (4,5-διοξυγόνωση). Κατά την *ortho*-σχάση το πρωτοκατεχοϊκό οξύ με τη διαδοχική δράση της 3,4-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, μιας κυκλοϊσομεράσης, μιας αποκαρβοξυλάσης, μιας ενολο-λακτόνης, μιας CoA-τρανσφεράσης και μιας CoA-θειολάσης μετρέπεται σε ακέτυλο-CoA και ηλεκτρώλο-CoA που εισέρχονται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Σχήμα 1.5.4.3.1).

Στη δε *meta*-σχάση το πρωτοκατεχοϊκό οξύ με τη διαδοχική δράση της 4,5-διοξυγονάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, μιας αφυδρογονάσης, μιας υδρολάσης, μιας υδρατάσης και μιας αλδολάσης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και οξαλοξικό οξύ που εισέρχονται εν συνεχεία στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Σχήμα 1.5.4.2.1).

4.1.1 Διοξυγονάσεις αρχικής υδροξυλίωσης στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3

Στο στέλεχος Sphe3 με ανάλυση *in silico* διαπιστώθηκε η ύπαρξη διοξυγονασών υπεύθυνων για την αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου σε *cis*-3,4-διϋδροξυφαινανθρένιο, τόσο στα δυο καταβολικά πλασμίδια όσο και στο χρωμόσωμα.

Στο pASPHE301 (190 kb) εντοπίστηκαν γονίδια που αντιστοιχούν στην α και β υπομονάδα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (*rhd1a*, *rhd1b*) και γειτνιάζουν με μια υποθετική πρωτεΐνη που εμφανίζει ταυτότητα κατά

51% με αφυδρογονάση διϋδροδιόλης (*Rhodococcus* sp. I24, Treadway *et al.*, 1999), μια δεύτερη αφυδρογονάση και μια υδρατάση-αλδολάση [Σχήμα 3.2.1 (I)]. Η ανωτέρω υδρατάση-αλδολάση μάλιστα, επιδεικνύει ταυτότητα κατά 43% και 42%, αντίστοιχα, με τις υδρατάσες-αλδολάσες της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού που εντοπίζονται καθοδικά των γονιδίων *diox1* και *diox2* στο pASPHE301 και στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3* [Σχήμα 3.3.1, (A) και (B): 2]. Φυλογενετική ανάλυση της α υπομονάδας δείχνει τη συγγενεία της με 1,2-διοξυγονάσες του ναφθαλενίου (Σχήμα 3.2.1.1). Πλήρης στοιχισή της αμινοξικής της αλληλουχίας με 1,2-διοξυγονάσες του ναφθαλενίου από τα στελέχη *Rhodococcus* sp. I24 (Treadway *et al.*, 1999) και *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038 (Gakhar *et al.*, 2005) φανερώνει την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών. Έτσι, η Rhd1α μπορεί να χωριστεί σε δυο διακριτά τμήματα, εκείνο που περιέχει το κέντρο Rieske [2Fe-2S] και την καταλυτική περιοχή που περιέχει το ιόν μη αιμικού σιδήρου (βλέπε Σχήμα 3.2.1.2) (Kauppi *et al.*, 1998). Στο σύμπλεγμα των γονιδίων του pASPHE301 ωστόσο δεν εντοπίστηκαν υπομονάδες που να αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες φερρεδοξίνη και φερρεδοξίνη ρεδουκτάση που συνιστούν το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων των διοξυγονασών [Σχήμα 3.2.1 (I)], όπως έχει επίσης αναφερθεί για το στέλεχος *Rhodococcus* I24 (Treadway *et al.*, 1999). Οι Treadway *et al.* (1999) αναφέρουν επίσης οργάνωση γονιδίων διοξυγονάσης του ναφθαλενίου στο *Rhodococcus* I24 που περιλαμβάνει τις α και β υπομονάδες της διοξυγονάσης, μια αφυδρογονάση και μια αλδολάση (Treadway *et al.*, 1999). Η παρουσία των δυο υπομονάδων της διοξυγονάσης και μιας αφυδρογονάσης διϋδροδιόλης του ναφθαλενίου έχει αναφερθεί και στο γραμμικό πλασμίδιο του στελέχους *Rhodococcus* NCIMB 12038. Οι συγγραφείς συγκρίνουν τις περιοχές των γονιδίων *nar* του στελέχους με άλλα δυο στελέχη *Rhodococcus* P200, P400 για τα οποία αναφέρουν την ίδια ακριβώς γονιδιακή οργάνωση (Kulakov *et al.*, 2005). Η τόσο παρόμοια οργάνωση των γονιδίων του στελέχους *Srhe3* στο pASPHE301 με τα ανωτέρω αναφερόμενα στελέχη, καθώς και το γεγονός ότι στη φυλογενετική ανάλυση η Rhd1α σχηματίζει έναν ξεχωριστό βρόγχο με τις NidA του I24 (Treadway *et al.*, 1999) και NarA του NCIMB12038

(Kulakov *et al.*, 2005), δείχνει ότι αυτές οι διοξυγονάσες πιθανόν να προέρχονται από κάποιο κοινό πρόγονο. Στο pASPHE301, το σύμπλεγμα των γονιδίων της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης έχει 58,4% περιεχόμενο σε G+C, ενώ το συνολικό % ποσοστό σε περιεχόμενο G+C του pASPHE301 είναι 62% και του γονιδιώματος είναι 65,4%. Ανοδικά και καθοδικά του συμπλέγματος των γονιδίων της διοξυγονάσης υπάρχουν πολλά γονίδια που κωδικούν για τρανσποζάσες, και δοθέντος του χαμηλότερου % περιεχόμενου σε G+C του ανωτέρω συμπλέγματος γονιδίων μπορούμε να υποθέσουμε ότι στην πορεία της εξέλιξης, μεταφορά αυτών των γονιδίων από άλλα βακτηριακά στελέχη μπορεί να έλαβε χώρα, μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Και για τα δυο ανωτέρω περιγραφόμενα συστήματα από στελέχη *Rhodococcus* γίνεται παραδοχή ότι είναι αδύνατο να λειτουργήσουν χωρίς την παρουσία συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων και οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι υπομονάδες της φερρεδοξίνης και της ρεδουκτάσης βρίσκονται σε άλλο σημείο στο γονιδίωμα (Treadway *et al.*, 1999; Kulakov *et al.*, 2005). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι υπομονάδες του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν είναι πάντα πλησίον των γονιδίων οξυγονασών και μικρός αριθμός υπομονάδων φερρεδοξίνης και φερρεδοξίνης ρεδουκτάσης μπορούν να χρησιμοποιούνται από περισσότερες οξυγονάσες (Kweon *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2010). Έτσι και στο στέλεχος Sphe3, το σύστημα διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του pASPHE301 φαίνεται να χρησιμοποιεί φερρεδοξίνη και ρεδουκτάση για τη μεταφορά ηλεκτρονίων που βρίσκεται σε άλλο σημείο στο γονιδιώμα του, με πιθανή τη χρήση εκείνων που εντοπίζονται στο σύμπλεγμα της αντίστοιχης διοξυγονάσης Rhd2αβ στο πλασμίδιο pASPHE302. Η φυλογενετική ανάλυση δείχνει ότι η Rhda1 είναι συγγενής προς τις 1,2-διοξυγονάσες του ναφθαλενίου που διαθέτουν υπομονάδες φερρεδοξίνης τύπου [2Fe-2S]. Εντούτοις, η Rhda1 βρίσκεται στον ίδιο κλάδο με τις PhdA (*Nocardioides* KP7) (Saito *et al.*, 2000) και PhtAa (*A. keyseri* 12B) (Eaton, 2001) (Σχήμα 3.2.1.1), των οποίων οι διοξυγονάσες χρησιμοποιούν για τη μεταφορά ηλεκτρονίων φερρεδοξίνη τύπου [3Fe-4S], όπως είναι αυτή του πλασμιδίου pASPHE302.

Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της Rhd1αβ έγινε με βάση την 78% ομολογία, που παρουσιάζει η α υπομονάδα με την 1,2-διοξυγονάση του ναφθαλενίου του *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (NDO-O₁₂₀₃₈), η οποία δημοσιεύτηκε το 2005 (Gakhar *et al.*, 2005). Φαίνεται ότι πρόκειται για ένα ετερομερές δομής α₃β₃, με τις τρεις α υπομονάδες και τις τρεις β υπομονάδες να σχηματίζουν τριμερή, προστατεύοντας ένα μεγάλο τμήμα της προσβάσιμης επιφάνειάς τους, όπως έχει αποδειχθεί από τις κρυσταλλικές δομές 1,2-διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 (NDO-O₉₈₁₆₋₄) (Kauppi *et al.*, 1998), *Sphingomonas* CHY-1 (PHNI-O_{CHY-1}) (Jakoncic *et al.*, 2007) και *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (NDO-O₁₂₀₃₈) (Gakhar *et al.*, 2005). Το σχήμα του εξαμερούς συμπλόκου ομοιάζει με αυτό ενός μανιταριού του οποίου το στέλεχος περιέχει τις β₃ υπομονάδες και το καπάκι τις α₃ υπομονάδες. Στην Rhd1α βρέθηκαν όλα τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα Rieske [2Fe-2S] διοξυγονασών, τόσο στην περιοχή του Rieske [2Fe-2S] κέντρου, όσο και στην καταλυτική περιοχή με τις θέσεις δέσμευσης του μη αιμικού σιδήρου (Σχήμα 3.2.1.2).

Όπως αναφέρεται από τους Kauppi *et al.* (1998), η β υπομονάδα δεν συνεισφέρει στην ειδικευση και τη στερεοεκλεκτικότητα του ενζύμου προς το υπόστρωμα και ο ρόλος της φαίνεται να είναι καθαρά δομικός. Το ίδιο έχει αναφερθεί και για τη β υπομονάδα διοξυγονάσης του ναφθαλενίου από *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (Gakhar *et al.*, 2005) καθώς και της αντίστοιχης 2,3-διοξυγονάσης του διφαινολίου του στελέχους *Rhodococcus* RHA1 (Furusawa *et al.*, 2004), όπως προκύπτει από μελέτη των κρυσταλλικών τους δομών.

Στο μικρό καταβολικό πλασμίδιο pASPHE302 (94 kb) εντοπίστηκαν επίσης οι α και β υπομονάδες πιθανής διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (Rhd2αβ). Στο γονιδιακό σύμπλεγμα που εντοπίζονται [Σχήμα 3.2.1, (II)] υπάρχουν επίσης γονίδια που κωδικεύουν για τις υπομονάδες του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων δηλαδή τη φερρεδοξίνη και μια πρωτεΐνη με ταυτότητα της τάξης του 40% και 37%, αντίστοιχα, με υπομονάδες φερρεδοξίνης ρεδοουκτάσης από τα στελέχη *Rhodococcus* TFB (Tomás-Gallardo *et al.*, 2006) και

Rhodococcus jostii RHA1 (Takeda *et al.*, 2010). Μάλιστα ανάλυση BlastP της φερρεδοξίνης, δείχνει ότι έχει χαρακτηριστικά φερρεδοξίνης τύπου [3Fe-4S], όπως προαναφέρθηκε. Ενώ τα ενζυμικά συστήματα των περισσότερων διοξυγονασών περιέχουν υπομονάδες φερρεδοξίνης τύπου [2Fe-2S], υπάρχουν αναφορές όπου φερρεδοξίνες τύπου [3Fe-4S] ή [4Fe-4S] παρέχουν ηλεκτρόνια στις διοξυγονάσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η DltA3 (σύστημα διοξυγονάσης διτερπενίου), από *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 (Martin and Mohn, 1999), η PhdC (σύστημα διοξυγονάσης φαινανθρενίου) από *Nocardioides* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000), η PhtC (σύστημα διοξυγονάσης φθαλικού) από *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton, 2001), η PhtA3 (σύστημα διοξυγονάσης φθαλικού) από *Terrabacter* sp. DBF63 (Habe *et al.*, 2003), καθώς και η DbfA3 (σύστημα 4,4α-διοξυγονάσης διβενζοφουρανίου) από *Terrabacter* sp. DBF63 (Takagi *et al.*, 2005). Επιπλέον, εντοπίζεται ακόμα ένα γονίδιο με πιθανό ρόλο μεταφορέα [Σχήμα 3.2.1 (II)].

Οι πιο συγγενείς φυλογενετικά διοξυγονάσεις για την Rhd2a είναι διοξυγονάσεις αρχικής υδροξυλίωσης διβενζοφουρανίου και φλουορενίου (Σχήμα 3.2.1.1). Επιλέχθηκαν για πλήρη στοίχιση των αμινοξικών τους αλληλουχιών με στόχο τον εντοπισμό συντηρημένων περιοχών η α υπομονάδα διοξυγονάσης του διβενζοφουρανίου DfbA1_YK2, από το στέλεχος *Rhodococcus* sp. YK2 (Iida *et al.*, 2002a) και η α υπομονάδα διοξυγονάσης του φλουορενίου DfbA1_DBF63 από το στέλεχος *Terrabacter* sp. DBF63 (Habe *et al.*, 2004). Φάνηκε λοιπόν ότι η Rhd2a έχει κέντρο Rieske [2Fe-2S] στο N-τελικό άκρο και η καταλυτική περιοχή βρίσκεται στο C-τελικό άκρο, όπου υπάρχει περιοχή δέσμευσης για το ιόν μη αιμικού σιδήρου, όπου και πάλι εντοπίστηκαν όλα τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα Rieske διοξυγονασών (Σχήμα 3.2.1.3).

Η φυλογενετική ανάλυση της Rhd2a υπομονάδας κατατάσσει την εν λόγω διοξυγονάση στις διοξυγονάσεις που έχουν εξειδίκευση σε διβενζοφουράνιο/φλουορένιο και η σύγκριση της αλληλουχίας της με τις αντίστοιχες ομόλογων διοξυγονάσεων από τα στελέχη των ακτινοβακτηρίων *Terrabacter* sp. DBF63 και *Rhodococcus* sp. YK2 και αποκάλυψε τις συντηρημένες περιοχές αυτών των ενζύμων (Σχήμα 3.2.1.3).

Η πρόβλεψη του μοντέλου για την τριδιάστατη απεικόνιση της Rhd2α και Rhd2β έγινε με βάση την μόλις 45% ομολογία που παρουσιάζει η Rhd2α με ISP τμήμα α υπομονάδας διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης και με την 40% ομολογία που εμφανίζει η β υπομονάδα με NTF2-τύπου οικογένεια πρωτεϊνών. Δεν αντιστοιχίζεται λοιπόν η Rhd2αβ με κάποιο γνωστό μοντέλο διοξυγονάσης, αλλά η πρόβλεψη γίνεται με βάση τις συντηρημένες λειτουργικές περιοχές που εμφανίζουν διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης.

Τα αποτελέσματα για τα αντίστοιχα γονίδια που εντοπίστηκαν στο χρωμόσωμα δεν είναι και τόσο ξεκάθαρα. Ναι μεν ανάλυση BlastP της Rhd3α δείχνει τη λειτουργία της ως Rieske [2Fe-2S], ωστόσο από τη φυλογενετική ανάλυση η ομολογία που παρουσιάζει με τις συγγενικές της πρωτεΐνες είναι πάρα πολύ χαμηλή, της τάξης του 18%. Για τη δε β υπομονάδα τα αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι μάλλον πρόκειται για τη μικρή υπομονάδα 1,2-διοξυγονάσης του βενζοϊκού οξέος.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των πιθανών διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του αρωματικού πυρήνα σε μεταγραφικό επίπεδο με τη χρήση της τεχνικής qRT-PCR, έδειξε ότι τα γονίδια *rhd1α* και *rhd1β* που κωδικεύουν τις υπομονάδες της διοξυγονάσης του πλασμιδίου pASPHE301 παρουσιάζουν 5πλάσια έκφραση σε σχέση με τα αντίστοιχα γονίδια *rhd2α* και *rhd2β* του πλασμιδίου pASPHE302. Ενώ το γονίδιο *rhd3β* που κωδικεύει για την πιθανή μικρή υπομονάδα διοξυγονάσης του χρωμοσώματος δεν βρέθηκε να επάγεται παρουσία φαινανθρενίου (Σχήμα 3.2.3.2).

Επιπλέον, κατά την πρωτεωμική ανάλυση, ανιχνεύθηκαν τόσο οι υπομονάδες της διοξυγονάσης των πλασμιδίων pASPHE301 (Asphe3_40070: Rhd1α και Asphe3_40080: Rhd1β), και pASPHE302 (Asphe3_42640: Rhd2α και Asphe3_42630: Rhd2β), όσο και η υπομονάδα Rhd3α του χρωμοσώματος (Asphe3_02250), ενώ δεν ανιχνεύθηκε η υπομονάδα Rhd3β που εντοπίζεται επίσης στο χρωμόσωμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι Rhd1α και Rhd1β, εμφανίζουν 4πλάσια έκφραση στο φαινανθρένιο σε σχέση με το φθαλικό οξύ, ενώ αντίθετα οι Rhd2α, Rhd2β και Rhd3α δεν φαίνεται να επάγονται

παρουσία του φαινανθρενίου, αφού τα επίπεδα έκφρασης τους φαίνεται να είναι υψηλότερα παρουσία του φθαλικού οξέος (Πίνακας 3.6.2.1.1). Ο συνδυασμός λοιπόν αυτών των αποτελεσμάτων οδήγησε στην υπόθεση ότι η διοξυγονάση που διενεργεί την αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου είναι αυτή του μεγάλου πλασμιδίου (Rhd1αβ) και στόχο αποτέλεσε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της.

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης πραγματοποιούνται *in vivo* ενζυμικές μελέτες με ανίχνευση των προϊόντων διϋδροδιολών που προκύπτουν από την οξείδωση των αρωματικών υδρογονανθράκων (Saito *et al.*, 2000). Ανάλογες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τα στελέχη *Mycobacterium* 6PY1 (Krivobok *et al.*, 2003), *Sphingomonas* CHY-1 (Demaneche *et al.*, 2004) και *Sphingomonas* LH128 (Schuler *et al.*, 2009), με *in vivo* δοκιμές παρουσία των υπομονάδων φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης κλωνοποιημένων σε διάφορους φορείς.

In vivo δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Rhd1αβ και έφεραν τα πλασμίδια (pIZ36::rhdαβ)(pETDC21) ή (pIZ36::rhdαβ)(pET15b) (βλέπε Πίνακα 2.2.2), δεν οδήγησαν στην ανίχνευση διϋδροδιολών του φαινανθρενίου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις καλλιέργειες ανάπτυξης των κυττάρων αρχικά χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη. Εν συνεχεία, τα κύτταρα επώαστηκαν με 100 mg L⁻¹ φαινανθρένιο προκειμένου να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστικότητα μέσω ανάλυσης GC. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μεταγραφικό επίπεδο καθώς και η πρωτεωμική ανάλυση, έδειξαν ότι τα ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό του φαινανθρενίου καταστέλλονται παρουσία της γλυκόζης. Αυτό εξηγεί λοιπόν την αποτυχία ανίχνευσης διϋδροδιολών του φαινανθρενίου σε καλλιέργειες κυττάρων που έφεραν τα πλασμίδια (pIZ36::rhdαβ)(pETDC21) ή (pIZ36::rhdαβ)(pET15b).

Αντίθετα, ανιχνεύθηκε η παρουσία 3,4-διϋδροδιολών του φαινανθρενίου σε κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο pET29c::rhdαβ παρουσία του πλασμιδίου pBRCd το οποίο φέρει τις υπομονάδες της φερρεδοξίνης (*phdC*) και της ρεδουκτάσης (*phdD*) από *Nocardioides* sp. KP7 (Πίνακας 2.2.2) (Saito *et al.*, 2000),

καθώς και με σειρά κυττάρων, ως control, με το ίδιο πλασμίδιο χωρίς τις υπομονάδες που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων pIZ-CD (Πίνακας 2.2.2) (Διδακτορική Διατριβή Μαρίας Πούλη). Η ανίχνευση διϋδροδιολών του φαινανθρενίου στις δοκιμές που έγιναν, υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, με χρήση του πλασμιδίου pET29c::*rhdαβ* μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα γονίδια υπερεκφράζονται υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού του βακτηριοφάγου T7 στο πλασμίδιο pET29c.

Έτσι, αποδεικνύεται ότι τα γονιδιακά προϊόντα των γονιδίων *rhd1α* και *rhd1β* αντιστοιχούν στις α και β υπομονάδες της διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου στο στέλεχος *Srhe3*. Η παρουσία των υπομονάδων που συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα της διοξυγονάσης κι έτσι είναι πιθανόν μεταφορείς ηλεκτρονίων των κυττάρων δέκτη *E. coli* να υποκαθιστούν/ αναπληρώνουν τους ειδικούς μεταφορείς ηλεκτρονίων του συστήματος της διοξυγονάσης. Ανίχνευση προϊόντων οξείδωσης PAHs ενεργών *in vivo* ανασυνδυασμένων ενζύμων που χρησιμοποιούν σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων των κυττάρων ξενιστών *E. coli* έχει αναφερθεί κατά την υπερέκφραση διοξυγονασών (Khan *et al.*, 2001; Demaneche *et al.*, 2004; Schuler *et al.*, 2008). Οι Saito *et al.* (2000) αναφέρουν ότι μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* με πλασμίδιο που φέρει το οπερόνιο των γονιδίων διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου (*phdABCD*) του στελέχους *Nocardioides* sp. KP7 οδήγησαν σε μετατροπή του φαινανθρενίου σε πιο υδρόφιλα προϊόντα εμφανίζοντας μεγάλη δραστηριότητα. Αντίστοιχα, φορείς με έλλειψη της φερρεδοξίνης (*phdABD*) ή της ρεδουκτάσης (*phdABC*), επέδειξαν επίσης δραστηριότητα, αλλά μικρότερη (Saito *et al.*, 2000). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν τη σχετικά μικρή εξειδίκευση των διοξυγονασών ως προς τις υπομονάδες που διεκπεραιώνουν τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στα ενζυμικά αυτά συστήματα. Φαίνεται έτσι, γιατί συστήματα διοξυγονάσης που δεν περιλαμβάνουν στο σύμπλεγμα των γονιδίων τους αντίστοιχα γονίδια φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης μπορούν να λειτουργούν εξίσου αποτελεσματικά. Έχει εκτεταμένα αναφερθεί ότι διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης από διάφορα

είδη βακτηρίων εμφανίζουν μικρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα με τη δυνατότητα ταυτόχρονης δράσης, με αποτέλεσμα την αρχική οξείδωση πολλών αρωματικών υποστρωμάτων (Resnick *et al.*, 1996; Kasunga *et al.*, 2001; Demaneche *et al.*, 2004; Pinyakong *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Pagnout *et al.*, 2007; Schuler *et al.*, 2009). Ωστόσο, στο στέλεχος *Srhe3* αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από τα ανωτέρω πειράματα εντοπίστηκαν μόνο προϊόντα οξείδωσης του φαινανθρενίου, με το ενζυμικό σύστημα να μην εμφανίζει κάποια δράση στα υποστρώματα του ανθρακενίου και φλουορενίου που έχει αποδειχθεί πως το στέλεχος *Srhe3* μπορεί να συν-μεταβολίσει.

Οδηγούμαστε έτσι στο συμπέρασμα ότι η *Rhd1αβ* που εντοπίζεται στο πλασμίδιο *pASpHE301* είναι μια διοξυγονάση με εξειδίκευση στο φαινανθρένιο. Η απουσία δραστηριότητας σε άλλους PAHs, μπορεί να εξηγήσει την ανάγκη παρουσίας του φαινανθρενίου για συν-μεταβολική ανάπτυξη.

Σε Gram+ βακτήρια έχει αναφερθεί η παρουσία πολλαπλών ενζυμικών συστημάτων που φέρουν εις πέρας την αρχική προσβολή του αρωματικού δακτυλίου. Μάλιστα σε ορισμένες αναφορές αποδεικνύεται η ύπαρξη διαφορετικών τέτοιων συστημάτων διοξυγονάσεων με εξειδίκευση σε διαφορετικά υποστρώματα (Kitagawa *et al.*, 2001; Krivobok *et al.*, 2003; Iwasaki *et al.*, 2006; Aly *et al.*, 2008; Kweon *et al.*, 2010). Πιθανόν, το πρώτο βήμα οξείδωσης των υπολοίπων PAH που συν-μεταβολίζει το στέλεχος *Srhe3* να διενεργείται από κάποιο άλλο ενζυμικό σύστημα διοξυγονάσης με πολύ πιθανό αυτό του πλασμιδίου *pASpHE302*. Η *Rhd2α* του *pASpHE302* διαπιστώθηκε πως φυλογενετικά κατατάσσεται στις διοξυγονάσεις που καταβολίζουν φλουορένιο και διβενζοφουράνιο, οι οποίες ανήκουν στις γωνιακές (angular) διοξυγονάσεις. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συν-μεταβολισμού έδειξαν πως το στέλεχος *Srhe3* έχει τη δυνατότητα να μετασχηματίζει πλήρως το φλουορένιο παρουσία φαινανθρενίου (Σχήμα 3.5.1). Το φλουορένιο πέρα από την *cis*-υδροξυλίωση προς 1,2- και 3,4-διυδροδιόλες (Casselas *et al.*, 1997; Grifoll *et al.*, 1992; Grifoll *et al.*, 1995b) έχει βρεθεί ότι μπορεί να οξειδωθεί προς 9-φλουορενόνη η οποία στη συνέχεια με γωνιακή διοξυγόνωση μετατρέπεται σε 1-υδρο-1, 1α-διυδροξυ-9-

φλουορενόνη (Trenz *et al.*, 1994; Grifoll *et al.*, 1994). Παρόλο που ΡΑΗ διοξυγονάσες έχει αναφερθεί πως οξειδώνουν φλουορένιο, ωστόσο τα αντίστοιχα στελέχη δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με χρήση μοναδικής πηγής άνθρακα φλουορένιο, με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των στελεχών *Sphingomonas* KA1, *Paenibacillus* YK5, *Novosphingobium aromaticivorans* F199, *Sphingobium yanoikuyae* B1 και *Sphingomonas* CHY-1 (Shintani *et al.*, 2007; Iida *et al.*, 2006; Romine *et al.*, 1999; Ni Chadhain *et al.*, 2007; Jouanneau *et al.*, 2006). Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται πως το στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3, αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα τέτοιων βακτηριακών στελεχών. Είναι επομένως πιθανόν, η Rhd2α να είναι μια γωνιακή διοξυγονάση, η οποία συμμετέχει στον συν-μεταβολισμό του φλουορενίου παρουσία του φαινανθρενίου. Βέβαια angular διοξυγονάσες έχουν αναφερθεί να επιφέρουν τόσο γωνιακή, πλευρική, όσο και μονοξυγόνωση (Nojiri *et al.*, 1999 και 2001). Δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ο μετασχηματισμός του φλουορενίου να γίνεται μέσω 1,2- ή 3,4-διοξυγόνωσης, όπως έχει προηγουμένα αναφερθεί για το *Arthrobacter* F101 (Casellas *et al.*, 1997). Η διευκρίνηση της πορείας αποδόμησης του φλουορενίου σε δυαδικό σύστημα με φαινανθρένιο, είναι σίγουρα κάτι που θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον και θα έδινε περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο της Rhd2α στην πορεία καταβολισμού αρωματικών ενώσεων από το στέλεχος Sphe3.

Ένας επιπλέον λόγος που ενισχύει την υπόθεση ότι η Rhd2αβ συμμετέχει στον συν-μεταβολισμό των υπολοίπων ΡΑΗ που δοκιμάστηκαν στο στέλεχος Sphe3, είναι η παρουσία στο ενζυμικό αυτό σύστημα των υπομονάδων της φερρεδοξίνης και μιας πρωτεΐνης στην οποία αποδίδεται ο ρόλος της φερρεδοξίνης ρεδοκτάσης βάση της ταυτότητας που εμφανίζει με υπομονάδες φερρεδοξίνης ρεδοκτάσης από στελέχη *Rhodococcus*, όπως προαναφέρθηκε [Σχήμα 3.2.1, (II)]. Η παρουσία των υπομονάδων μεταφοράς ηλεκτρονίων λοιπόν στο σύστημα της Rhd2αβ διοξυγονάσης, πιθανόν να της δίνει τη δυνατότητα καταβολισμού εύρους ΡΑΗs.

Σε μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη β-πρωτεοβακτηρίου του γένους *Rhodocyclaceae* εντοπίστηκαν έξι ζεύγη γονιδίων με ομοιότητα ως προς α και β υπομονάδες

διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης, με το ένα μόνο να φέρει υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης. Ακολούθησε κλωνοποίηση, έκφραση σε *E. coli* και έλεγχος της δυνατότητας οξείδωσης εννιά υποστρωμάτων PAHs. Οι συγγραφείς διαπιστώνουν ότι όλα τα γονίδια είχαν τη δυνατότητα οξείδωσης PAHs και τονίζουν ότι εκείνο που φέρει και τις υπομονάδες φερρεδοξίνης και ρεδουκτάσης και μόνο οξειδώνει όλους τους PAHs, κάτι που αποδίδουν στο ότι αυτό αποτελούσε ολοκληρωμένο σύστημα που διαθέτει και τις υπομονάδες για τη μεταφορά ηλεκτρονίων (Singleton *et al.*, 2012).

Οι Kweon *et al.* (2010), πρότειναν ένα νέο σύστημα ταξινόμησης των διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης, στο οποίο λαμβάνονται υπόψιν κατά την ταξινόμηση και οι αλληλουχίες των μεταφορέων ηλεκτρονίων στη φυλογενετική ανάλυση των διοξυγονασών. Οι συγγραφείς τονίζουν ότι μια μορφή επιλεκτικής πίεσης για εξέλιξη των διοξυγονασών ασκείται από την παρουσία νέων υποστρωμάτων στο συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Kweon *et al.*, 2008). Η φυλογενετική ανάλυση των α υπομονάδων διοξυγονασών δείχνει ξεκάθαρα ότι η ομαδοποίησή τους γίνεται με βάση τα προτιμώμενα υποστρώματα καταβολισμού κι έτσι είναι φανερό ότι η δομή του υποστρώματος αποτελεί μια μορφή επιλεκτικής πίεσης για την εξέλιξη της πρωτεΐνης (Chakraborty *et al.*, 2012). Η προσαρμοστικότητα που επιδεικνύουν τα βακτήρια μέσω της χρήσης διαφορετικών συστημάτων μεταφορέων ηλεκτρονίων σίγουρα αποτελεί άλλη μια τέτοια πίεση για εξέλιξη. Οι Kweon και συνεργάτες κάνουν την παραδοχή ότι η υπομονάδα της φερρεδοξίνης είναι εκείνη που εμπλέκεται στην πορεία της εξέλιξης των διοξυγονασών γιατί σε σχέση με τη ρεδουκτάση έχει μικρότερη αλληλουχία και πιο απλή δομή, οπότε έχει το εξελικτικό πλεονέκτημα της γρήγορης προσαρμογής στο δυναμικά μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Kweon *et al.*, 2008).

4.1.2 Διοξυγονάσες του 1H2NA στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3

Όπως αναλύθηκε στην § 3.3.1, στο γονιδίωμα του στελέχους Sphe3 εντοπίστηκαν δυο ομόλογα γονίδια που κωδικεύουν για τη διοξυγονάση του 1H2NA με 90%

μεταξύ τους ταυτότητα σε νουκλεοτιδικό και 93% σε αμινοξικό επίπεδο. Το γονίδιο *diox1* εντοπίστηκε στο πλασμιδίο pASPHE301, ενώ το *diox2* στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3* (Σχήμα 3.3.1). Σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας είχε γίνει απομόνωση και καθαρισμός της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος με χρωματογραφία στήλης, από εκχυλίσματα κυττάρων στελέχους *Srhe3* που είχαν καλλιεργηθεί με μοναδική πηγή άνθρακα το φαινανθρένιο. Το μοριακό βάρος της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος είχε βρεθεί ίσο με 180 kDa. SDS-PAGE ανάλυση έδειξε ότι το μοριακό βάρος των υπομονάδων της διοξυγονάσης ήταν ίσο με 45 kDa, κάτι που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το ολοένζυμο είναι ομοτετραμερές (Μ.Δ.Ε. Καβακιώτη). Το αντίστοιχο ένζυμο από *Nocardioides* KP7 (Iwabuchi and Harayama, 1998b), έχει αναφερθεί πως είναι ομοεξαμερές 270 kDa, ενώ από *Pseudomonas* PPD επίσης ομοτετραμερές 160 kDa (Deveryshetty and Phale, 2009).

Οι πρωτεΐνες *Diox1* και *Diox2* υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν με σκοπό να μελετηθούν οι καταλυτικές τους ιδιότητες. Διοξυγονάσες του 1H₂NA έχουν απομονωθεί από τα στελέχη *Nocardioides* KP7 (Iwabuchi and Harayama, 1998b) και *Pseudomonas* PPD (Deveryshetty and Phale, 2009).

Οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων *Diox1* και *Diox2* είναι παρόμοιες. Οι τιμές K_m βρέθηκαν να είναι $35 \pm 5.7 \mu\text{M}$ για το *Diox1* και $29 \pm 5.8 \mu\text{M}$ για το *Diox2*. Οι τιμές K_m που βρέθηκαν για τα *Diox1* και *Diox2* είναι διπλάσιες και τριπλάσιες, αντίστοιχα, σε σχέση με τις τιμές που έχουν αναφερθεί για *Nocardioides* sp. KP7 και *Pseudomonas* sp. PPD, (Iwabuchi and Harayama, 1998b; Deveryshetty and Phale, 2009). Οι σταθερές K_{cat}/K_m και των δυο ενζύμων ($11 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ για την *Diox1* και $12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) είναι διπλάσιες σε σχέση με τις τιμές που έχουν αναφερθεί για τα ανωτέρω στελέχη. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της αναστολής υποστρώματος σε συγκεντρώσεις έως $150 \mu\text{M}$, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα όσα έχουν αναφερθεί για το στέλεχος *Nocaroides* KP7 (Iwabuchi and Harayama, 1998b). Αντιθέτως, οι Deveryshetty and Phale (2009) για το στέλεχος *Pseudomonas* sp. PPD, αναφέρουν την ύπαρξη του φαινομένου για συγκέντρωση υποστρώματος πάνω από $25 \mu\text{M}$, με τιμή K_i $116 \mu\text{M}$ (Deveryshetty

and Phale, 2009). Οι διοξυγονάσες του 1H2NA του *Sphe3* χρειάζονται Fe(II) για τη δράση τους αφού παρουσία Fe(II) αυξάνει κατά 50% η δραστηριότητά τους.

Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών Diox1 και Diox2 με εκείνες γνωστών διοξυγονασών σχέσης του αρωματικού πυρήνα που είναι κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο (Σχήμα 3.3.3) αποδεικνύει ότι οι διοξυγονάσες του 1-H2NA είναι μέλη της cupin οικογενείας πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν ένα μοτίβο δέσμευσης μετάλλων: G(X)₅HXH(X)_{3,4}E(X)₆G καθώς κι ένα δευτερο μοτίβο: G(X)₅PXG(X)₂H(X)₃N. Δυο κατάλοιπα ιστιδίνης (HXH) στο πρώτο μοτίβο και μια ιστιδίνη στο δευτερο μοτίβο, όλες στοιχειώδεις για την ύπαρξη δράσης διοξυγονάσης, βρέθηκαν να είναι πλήρως συντηρημένες και στις δυο διοξυγονάσες Diox1 και Diox2 (Hirano *et al.*, 2007).

Οι προβλεπόμενες θέσεις πρόσδεσης των μεταλλικών ιόντων που δρουν σαν συμπαραγοντες είναι τα κατάλοιπα ιστιδίνης (Hirano *et al.*, 2007) (Σχήμα 3.3.3). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η Diox1 όπως φαίνεται από τη μοντελοποίηση χρησιμοποιεί και τα τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης για τη δέσμευση του Fe(II), ενώ το μοντέλο της Diox2 δείχνει ότι αυτή χρησιμοποιεί μόνο τα τρία κατάλοιπα ιστιδίνης που έχει βρεθεί να είναι απολύτως απαραίτητα για τη δέσμευση του Fe(II) (Chua *et al.*, 2001).

Από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *diox1* και *diox2* σε μεταγραφικό επίπεδο με τη χρήση της τεχνικής qRT-PCR διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της διοξυγονάσης του 1H2NA του χρωμοσώματος (*diox2*) παρουσιάζει 2πλάσια έκφραση σε σχέση με το ομόλογό του στο πλασμίδιο pASPH301 (*diox1*), όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία φαινανθρενίου (Σχήμα 3.3.2.2). Μια πιθανή εξήγηση για τη διαφορά στην έκφραση των δυο γονιδίων είναι η διαφορά στην αλληλουχία των προβλεπόμενων -10 περιοχών των πιθανών περιοχών προαγωγών (Σχήμα 3.3.2). Διαφορές μεταξύ αλληλουχιών περιοχών προαγωγού μπορεί να καθορίζουν και τη διαφορετική ρύθμιση γονιδίων. Πρόσφατη μελέτη στο *Mycobacterium* KMS, με χρήση τεχνικής qRT-PCR, έδειξε ότι τέσσερα διαφορετικά γονίδια *nidB* που κωδικοποιούν για β υπομονάδες διοξυγονάσης αρχικής υδροξυλίωσης του πυρενίου, με σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες

περιοχών προαγωγών επάγονται στον ίδιο βαθμό παρουσία του πυρενίου, είτε αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμιδίο. Αντίθετα, γονίδια *nidA* (διοξυγονάσες που εμπλέκονται στον καταβολισμό του πυρενίου) και *benA* (διοξυγονάσες που εμπλέκονται στον καταβολισμό του βενζοϊκού οξέος), επάγονται μόνο παρουσία πυρενίου και βενζοϊκού οξέος, αντίστοιχα. Οι περιοχές προαγωγών αυτών των γονιδίων είναι πολύ διαφορετικές μεταξύ τους και ενεργοποιούνται παρουσία των διαφορετικών αρωματικών ενώσεων, κάτι που ενισχύει την υπόθεση ότι διαφορές στις αλληλουχίες των περιοχών προαγωγών προκαλούν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Zhang and Anderson, 2012).

Μέσω της πρωτεωμικής ανάλυσης ανιχνεύθηκαν οι διοξυγονάσες του 1H2NA DioX1 (*Asphe3_40250*) και DioX2 (*Asphe3_22020*) του πλασμιδίου pASPHE301 και του χρωμοσώματος του στελέχους *Srhe3*, αντίστοιχα, και οι οποίες εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν τόσο σε φαινανθρένιο όσο και φθαλικό. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν οι υπομονάδες της υδρατάσης-αλδολάσης της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (*Asphe3_40240* και *Asphe3_22010*), οι οποίες κωδικεύονται από τα γονίδια που βρίσκονται καθοδικά των γονιδίων των διοξυγονασών στο πλασμιδίο και το χρωμόσωμα, αντίστοιχα (Σχήμα 3.3.1, Πίνακας 3.7.2.2.1). Το ένζυμο αυτό, όπως έχει αναφερθεί, καταλύει τη μετατροπή της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος (προϊόν οξείδωσης του 1H2NA), σε 2'-καρβοξυβενζαλδεΐδη και πυροσταφυλικό οξύ.

Οι υδρατάσες-αλδολάσες της *trans*-2-καρβοξυβενζαλδεΐδης του πυροσταφυλικού (*Asphe3_40240* και *Asphe3_22010*) του pASPHE301 και του χρωμοσώματος, εμφανίζουν ταυτότητα κατά 43% και 42%, με την πιθανή υδρατάση-αλδολάση του συμπλέγματος των γονιδίων που εμπλέκονται στην αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου του pASPHE301 του στελέχους *Srhe3* (Σχήμα 3.2.1, I5).

Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η αφυδρογονάση της 2-καρβοξυβενζαλδεΐδης (*Asphe3_40220*) του πλασμιδίου pASPHE301, με το γονίδιο που την κωδικεύει να βρίσκεται καθοδικά του γονιδίου της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού του pASPHE301. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή της

καρβοξυβενζαλδεϋδης σε *o*-φθαλικό οξύ (Πίνακας 3.6.2.1.1, Σχήμα 1.4.2 και Σχήμα 3.3.1). Οι ανωτέρω πρωτεΐνες εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα τόσο στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φαινανθρένιο όσο και σε φθαλικό οξύ. Επίσης, αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών υποστρωμάτων παρατηρήθηκαν και για την πρωτεΐνη της οικογενείας των περμεασών εκροής αραβινόζης (Asphe3_22000) που βρίσκεται πλησίον της διοξυγονάσης του 1H2NA του χρωμοσώματος (Σχήμα 3.3.1, Πίνακας 3.6.2.2.1) και ανήκει στις πρωτεΐνες μεταφορείς της Μείζονος Υπεροικογενείας Διευκολυνόμενης μεταφοράς (Major Facilitator Super family-MFS), οι οποίες είναι μεταφορείς με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα ιόντων, φωσφορικών, σακχάρων, αντιβιοτικών, νευροδιαβιβαστών, νουκλεοσιδίων, αμινοξέων και πεπτιδίων (Pao *et al.*, 1998). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί πιθανό μεταφορέα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος, αφού μέσω ανάλυσης BlastP επιδεικνύει ταυτότητα σε ποσοστό 88% με πιθανό μεταφορέα του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος του στελέχους *Nocardioides* sp. KP7.

Στο στέλεχος *Srhe3* τα γονίδια που κωδικεύουν τις διοξυγονάσες του 1H2NA δεν φαίνεται να βρίσκονται σε σύμπλεγμα με όλα τα δομικά γονίδια που μετέχουν στην ανώτερη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου, όπως έχει αναφερθεί για τα Gram⁻ βακτήρια που αποδομούν αρωματικές ενώσεις και στα οποία η οργάνωση των γονιδίων γίνεται σε δυο συνήθως οπερόνια. Ένα οπερόνιο με τα γονίδια της ανώτερης και ένα με τα γονίδια της κατώτερης καταβολικής πορείας, όπως έχει αναφερθεί για στελέχη του γένους *Pseudomonads* (Harayama *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1999 και 2000). Αντίθετα, για τα ακτινοβακτήρια του γένους *Mycobacterium* έχει αναφερθεί ότι τα καταβολικά γονίδια βρίσκονται διεσπαρμένα στο γονιδιώμα τους (Kim *et al.*, 2008a; Zhang and Anderson, 2012). Παρατηρώντας την οργάνωση των γονιδίων στο πλασμίδιο και στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3* (Σχήμα 3.3.1), με την παρουσία του γονιδίου της υδρατάσης-αλδολάσης της 2-καρβοξυβενζαλδεϋδης του πυροσταφυλικού δίπλα από αυτό της διοξυγονάσης του 1H2NA και την ύπαρξη γονιδίων τρανσποζασών πλησίον των ανωτέρω γονιδίων μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η ταυτόχρονη αυτή παρουσία

τους είναι προϊόν αντιγραφικής μετάθεσης. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με την ύπαρξη υψηλού ποσοστού ομολογίας σε νουκλεοτιδικό επίπεδο των δυο αλληλουχιών των γονιδίων *diox1* και *diox2*, ενισχύει την υπόθεση της αντιγραφικής μετάθεσης. Γενικά, η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων διοξυγονασών σχάσης αρωματικών πυρήνων στα γονιδιώματα των βακτηρίων, θεωρείται ότι αποτρέπει τη συσσώρευση των τοξικών ενδιάμεσων κατεχόμενων όταν τα αρωματικά υποστρώματα βρίσκονται σε αφθονία (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010b). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι διπλασιασμοί γονιδίων δίνουν το πλεονέκτημα της μικροβιακής προσαρμογής στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Gevers *et al.*, 2004). Η ύπαρξη περισσότερων αντιγράφων καταβολικών γονιδίων στο γονιδίωμα των βακτηρίων τα καθιστά πιο ευπροσάρμοστα, δίνοντας τους το πλεονέκτημα της προσαρμογής και συνεπώς της επιβίωσης στα αφιλόξενα ρυπασμένα με PAHs περιβάλλοντα που ζουν.

4.1.3 Καταβολισμός πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος *A. phenanthrenivorans* Sphe3

Όπως εκτενώς αναφέρεται στην Εισαγωγή (§ 1.5.4), το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποτελεί έναν από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες της πορείας καταβολισμού του φαινανθρενίου. Η μελέτη *in silico* στο στέλεχος Sphe3 έδειξε ότι ο περαιτέρω καταβολισμός του πρωτοκατεχοϊκού οξέος μπορεί να λάβει χώρα είτε μέσω 3,4-διοξυγόνωσης (*ortho*-σχάση) (Σχήμα 1.5.4.3.1), είτε μέσω 4,5-διοξυγόνωσης (*meta*-σχάση) και σχάσης του αρωματικού δακτυλίου (Σχήμα 1.5.4.2.1). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την *ortho*-σχάση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος εντοπίζονται στο χρωμόσωμα, ενώ τα υπεύθυνα για τη *meta*-σχάση γονίδια, εντοπίζονται στο πλασμίδιο pASPHE302. Η ταυτόχρονη παρουσία γονιδίων υπεύθυνων για την *ortho*- (3,4-) και *meta*- (4,5-) πορεία σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει επίσης αναφερθεί στο στέλεχος *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton and Ribbons, 1982) (βλέπε § 1.5.4.2). Μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης ανιχνεύθηκαν πρωτεΐνες και από τις δυο πορείες καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στο στέλεχος Sphe3 μέσω *ortho*- και *meta*-σχάσης, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης *in silico*.

Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης όλων των ανιχνευθέντων πρωτεϊνών είναι αυξημένα σε κύτταρα στελέχους *Srhe3* που καλλιεργήθηκαν παρουσία του φθαλικού σε σχέση με το φαινανθρένιο (βλέπε § 3.6.2.1, Πίνακας 3.6.2.1.1, Σχήμα 3.6.2.1.2).

Εστιάζοντας στην κατώτερη μεταβολική πορεία του καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού οξέος που λαμβάνει χώρα μέσω *meta*-σχάσης (Σχήμα 1.5.4.2.1), με χρήση της RT-PCR διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια που συνιστούν το σύμπλεγμα των 7.654 kb (Σχήμα 3.4.1.2) και συμμετέχουν στις αντιδράσεις *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Σχήμα 1.5.4.2.1), στην κατώτερη πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου, συμμεταγράφονται συνιστώντας ένα καλά οργανωμένο οπερόνιο. Ανοδικά του γονιδίου της ρυθμιστικής πρωτεΐνης δεν εντοπίστηκαν πιθανές περιοχές προαγωγού (Σχήμα 3.4.2.1). Αντίθετα, περιοχή με χαρακτηριστικά προαγωγού εντοπίστηκε στην 145 bp διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ του γονιδίου που κωδικεύει το μεταγραφικό ρυθμιστή και του γονιδίου που κωδικεύει την υδρατάση του 4-οξαλομεσακονικού οξέος (Σχήμα 3.4.2.2). Για την ανάπτυξη ενός συστήματος ομόλογης έκφρασης γονιδίων στο στέλεχος *Srhe3*, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια *pART2* και *pART2-gfp* (Σχήμα 3.4.3.1) που έχουν κατασκευαστεί για την έκφραση γονιδίων σε ξενιστή *Arthrobacter nicotinovorans* (Sandu *et al.*, 2005). Τα ανωτέρω πλασμίδια, ήταν ευγενική προσφορά της κ. Sandu Christinel (Laboratory of Apoptosis and Cancer Biology, The Rockefeller University, NY). Μέσω διαδοχικών κλωνοποιήσεων (βλέπε § 3.4.4), δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή *pART2-gfp::Prca* (Σχήμα 3.4.4.5), στην οποία έχει υποκατασταθεί ο ιδιοσυστατικός προαγωγός του γονιδίου της οξειδάσης της 6-D-υδροξονικοτίνης (*hdnP*), από την πιθανή περιοχή προαγωγού του οπερονίου που κωδικεύει τα ένζυμα των αντιδράσεων 4,5-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (*Prca*). Από φθορισμομετρικούς προσδιορισμούς που ακολούθησαν διαπιστώθηκε πως η εξεταζόμενη περιοχή *Prca* πιθανόν δεν συνιστά τον προαγωγό του οπερονίου, παρόλο που διαθέτει χαρακτηριστικά προαγωγού.

4.2 Μελέτη της απόκρισης κυττάρων του στελέχους *A. phenanthrenivorans* Sphε3 με ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ σε διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης

Η συγκριτική ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση χωρίς χρήση πηκτών με μεθοδολογία nanoLC-MS/MS δειγμάτων κυττάρων του στελέχους Sphε3 από διαφορετικά υποστρώματα ανάπτυξης, αποκάλυψε μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνικών μορίων που μετέχουν σε διάφορες μεταβολικές πορείες και φανερώνουν τις μεταβολικές διεργασίες που ακολουθούν τα κύτταρα για την προσαρμογή τους στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα ανάπτυξης. Οι αλλαγές που παρατηρούνται συνιστούν και την πρώτη μελέτη για το συγκεκριμένο στέλεχος, αφού δεν υπάρχει κάποια άλλη αναφορά στη βιβλιογραφία.

A. Πρωτεΐνες του κυτταρικού φακέλου

Τα μικροβιακά κύτταρα προσαρμόζονται στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που τους επιφέρουν καταπόνηση, συμπεριλαμβανομένης και της παρουσίας τοξικών χημικών ενώσεων, αλλάζοντας τη ρευστότητα και διαπερατότητα της μεμβράνης τους δια μέσου της αλλαγής της λιπιδιακής της σύστασης. Όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί από την ομάδα μας, τα κύτταρα του στελέχους Sphε3 μειώνουν την αναλογία iso-/anteiso-λιπαρών οξέων παρουσία του φαινανθρενίου, κάτι που οδηγεί σε αλλαγή στη ρευστότητα της μεμβράνης (Kallimanis *et al.*, 2007). Στην παρούσα μελέτη, παρουσία των αρωματικών ενώσεων του φαινανθρενίου και του φθαλικού οξέος, διαπιστώθηκε η αύξηση της περιόσεως μιας αφυδρατάσης του διϋδροξικού οξέος (Asphε3_24080) (Πίνακας 3.6.2.2.1) με ρόλο κλειδί στην σύνθεση των διακλαδισμένων αμινοξέων, όπως για παράδειγμα αυτό της ισολευκίνης, η οποία πιθανόν να παίζει ρόλο στη βιοσύνθεση anteiso διακλαδισμένων λιπαρών οξέων στο στέλεχος Sphε3. Είναι γνωστό ότι τα α -κετο οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας που προέρχονται από τα αμινοξέα της βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (Willecke and Pardee, 1971 and Kaneda, 1991). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η αναλογία

iso/anteiso-λιπαρών οξέων πιθανόν να ελέγχεται από την αναλογία των αμινοξέων βαλίνης και λευκίνης για τα iso και ισολευκίνης για τα anteiso (Unell *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα, το αποένζυμο αμινοτρανσφεράσης διακλαδισμένων αμινοξέων (Asphe3_23970) (Πίνακας 3.6.2.2.1), που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση διακλαδισμένων αμινοξέων αυξάνει την περίσσειά του παρουσία των αρωματικών ενώσεων. Ο σημαντικός ρόλος των διακλαδισμένων αμινοξέων για τη βιοσύνθεση διακλαδισμένων λιπαρών οξέων και η μεταβολή των επιπέδων έκφρασής τους παρουσία διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων έχει επίσης αναφερθεί για το γένος *Bacillus* (Panda *et al.*, 2014).

Η καρβοξυλάση του ακετυλο/προπιονυλο-CoA, α υπομονάδα (Asphe3_13770), που κατέχει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων με το να τροποποιείται η καταλυτική της απόδοση ή η περίσσειά της (Numa and Tanabe, 1984) καθώς επίσης και η πρωτεΐνη-ακυλο-μεταφορέας S-μαλονυλτρανσφεράση (Asphe3_23340) που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων. Αντιθέτως, η 3-οξοακυλο-(πρωτεΐνη-ακυλο-μεταφορέας) συνθάση II (Asphe3_23370), υπεύθυνη για την έναρξη της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων εμφανίζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Αύξηση των επιπέδων έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων και μάλιστα μεγαλύτερη στο φαινανθρένιο σε σχέση με το φθαλικό, εμφάνισαν επίσης ένζυμα που εμπλέκονται στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και συγκεκριμένα η αφυδρογονάση του ακυλο-CoA (Asphe3_18640) και θειολάση του 3-κετοακυλο-CoA (Asphe3_18660) (Πίνακας 3.6.2.2.1). Αυτή η αύξηση της περισσειας ενζύμων που εμπλέκονται στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων πιθανόν να υποδηλώνει την απαίτηση ενέργειας από τα κύτταρα του στελέχους *Srhe3*, αφού μέσω της β-οξειδωσης μεγάλες αλυσίδες άνθρακα διασπώνται σε ακετυλο-CoA το οποίο τελικά εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος για την παραγωγή ενέργειας. Πέραν αυτού, η βιοσύνθεση και αποδόμηση των λιπαρών οξέων επάγεται ή καταστέλλεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης

προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση των λιπιδίων της μεμβράνης. Η ρύθμιση αυτών των πορειών έχει μελετηθεί εκτενώς σε κύτταρα *E. coli* και πρόσφατα έχει αναφερθεί η οικουμενική ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων σε Gram+ βακτήρια που διαθέτουν λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Fujita *et al.*, 2007). Από τις ενδείξεις της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι ο μηχανισμός μεταβολισμού των λιπαρών οξέων στο στέλεχος *Srhe3* θα άξιζε περαιτέρω διερεύνησης.

Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης φαίνεται να επηρεάζεται παρουσία των αρωματικών υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, η λιγάση του UDP-N-ακετυλμουραμοΐλ-τρηπεπτιδίου--D-αλανυλ-D-αλανίνης(Asphe3_15480) (Πίνακας 3.6.2.2.1) παρουσίασε υποδεκαπλάσια επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων σε σύγκριση με τη γλυκόζη. Η ίδια τάση σημειώθηκε και για την D,D-τρανοσπεπτιδάση της πεπτιδογλυκάνης κατά την ειδική κυτταρική επιμήκυνση (Asphe3_00250) και μια μεμβρανική καρβοξυπεπτιδάση (πενικιλίνο-δεσμευτική πρωτεΐνη) (Asphe3_33170) (Πίνακας 3.6.2.2.1), που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (Goffin and Chuysen, 1998). Επιπρόσθετα, η πυροφωσφορυλάση της UDP-N-ακετυλγλυκοζαμίνης (Asphe3_12450) και η μουτάση της φωσφογλυκοζαμίνης (Asphe3_27570) (Πίνακας 3.6.2.2.1), που συνιστούν πρωτεΐνες που κατέχουν ρόλο κλειδί στη βιοσύνθεση του προδρόμου μορίου της πεπτιδογλυκάνης της N-ακετυλγλυκοζαμίνης, βρέθηκαν να παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων σε σχέση με τη γλυκόζη. Μείωση των επιπέδων έκφρασης ενός ενζύμου που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος έχει βρεθεί με πρωτεωμική ανάλυση και σε *Corynebacterium glutamicum* (Haußmann and Poetsch, 2012), ενώ αντίθετα κατά την πρωτεωμική ανάλυση του στελέχους *Staphylococcus warneri* SG1 παρουσία βουτανόλης, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι μόρια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης (Fu *et al.*, 2013).

Οι τροποποιήσεις του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης καταδεικνύουν την

ύπαρξη ενός περίτεχνου και πολύπλοκου μηχανισμού, που δρα προκειμένου τα βακτήρια να προσαρμοστούν παρουσία των τοξικών χημικών ενώσεων που συναντούν στα περιβάλλοντα που διαβιούν και αναπτύσσονται.

B. Πρωτεΐνες μεταφορές

Η πρωτεωμική ανάλυση στο στέλεχος *Srhe3* οδήγησε στην ανίχνευση σημαντικού αριθμού μεμβρανικών συστημάτων μεταφοράς που συμμετέχουν στη μεταφορά οργανικών ενώσεων εντός του κυττάρου.

Όπως αναφέρθηκε και στην § 3.3, ανιχνεύθηκε ένας πιθανός μεταφορέας του 1H2NA (*Asphe3_22000*) που εντοπίζεται πλησίον της διοξυγονάσης του 1H2NA του χρωμοσώματος και παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών υποστρωμάτων. Παρόμοια επίπεδα έκφρασης εμφανίζει και μια πρωτεΐνη της οικογενείας των περμεασών εκροής αραβινόζης του χρωμοσώματος (*Asphe3_24320*). Και οι δυο πρωτεΐνες ανήκουν στις πρωτεΐνες μεταφορές της Μείζονος Υπεροικογενείας Διευκολυνόμενης μεταφοράς (Major Facilitator Super family-MFS), οι οποίες είναι μεταφορές με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα ιόντων, φωσφορικών, σακχάρων, αντιβιοτικών, νευροδιαβιβαστών, νουκλεοσιδίων, αμινοξέων και πεπτιδίων (Pao *et al.*, 1998). Τέλος, αυξημένα επίπεδα έκφρασης εμφάνισε παρουσία των αρωματικών ενώσεων και ένας συμμεταφορέας Na⁺/προλίνης (*Asphe3_08830*), που ανήκει στην οικογένεια Συμμεταφορέων Νατρίου Διαλυτών ουσιών (SSS: Solute:Sodium Symporter) (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Επίσης αυξημένα επίπεδα έκφρασης και μάλιστα υψηλότερα στο φθαλικό σε σύγκριση με το φαινανθρένιο, παρατηρήθηκαν για τις υπομονάδες συστημάτων μεταφοράς τύπου ABC των νιτρικού/σουλφονικού/δικαρβονικού που εντοπίζονται στα δυο πλασμίδια πλησίον του οπερονίου του φθαλικού. Από την πρωτεωμική ανάλυση ανιχνεύθηκαν δυο υπομονάδες περμεάσης (*Asphe3_40640*, *Asphe3_40630*), μια υπομονάδα ATPάσης (*Asphe3_40620*) και μια περιπλασματική υπομονάδα (*Asphe3_40610*) από το πλασμίδιο pASPHE301, καθώς επίσης και η υπομονάδα της ATPάσης (*Asphe3_42540*) και η περιπλασματική υπομονάδα (*Asphe3_42550*) από το πλασμίδιο pASPHE302 και

όλα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο φθαλικό σε σχέση με το φαινανθρένιο. Επιπλέον, οι υπομονάδες ATPάσης και οι περιπλασματικές υπομονάδες των δυο πλασμιδίων εμφανίζουν ταυτότητα της τάξης του 95% και 94.5% (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Είναι συνηθισμένο να εντοπίζονται γονίδια που κωδικεύουν υπομονάδες συστημάτων μεταφοράς τύπου ABC πλησίον καταβολικών γονιδίων (Díaz *et al.*, 2012; MacLean *et al.*, 2011). Μεταξύ των Gram+ βακτηρίων, το *Arthrobacter keyseri* 12B έχει αναφερθεί ότι διαθέτει ένα *ptr* οπερόνιο που κωδικεύει γονίδια ομόλογα συστημάτων μεταφορέων τύπου ABC (Eaton, 2001). Αρχικά, οι Patrauchan *et al.* (2005), αναφέρουν ότι με πρωτεωμική ανάλυση ταυτοποίησαν την πρωτεΐνη PatA, μια πιθανή υπομονάδα ATPάσης συστήματος μεταφοράς τύπου ABC, μόνο σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία φθαλικού οξέος (Patrauchan *et al.*, 2005). Στη συνέχεια, στο στέλεχος *Rhodococcus* RHA1, ένα σύστημα μεταφοράς τύπου ABC που κωδικεύεται από τα γονίδια *patADABC*, αναφέρθηκε πως είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά του φθαλικού οξέος (Hara *et al.*, 2010) και τα προβλεπόμενα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμφάνιζαν από 62-71% ομολογία με τα αντίστοιχα που κωδικεύουν τα γονίδια *ptr* του *Arthrobacter keyseri* 12B. Σύμφωνα με τους Hara *et al.* (2010), οι υπομονάδες των ATPασών συνιστούν τις πιο συντηρημένες υπομονάδες των συστημάτων μεταφορέων τύπου ABC (Hara *et al.*, 2010). Με βάση λοιπόν αυτό και προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των ταυτοποιημένων ATPασών (*Asphe3_40620*, *Asphe3_42540*) στο πιθανό σύστημα μεταφοράς του φθαλικού οξέος του στελέχους *Srhe3*, διεξήχθη βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων NCBI Conserved Domains (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Διαπιστώθηκε ότι και οι δυο ATPάσες διαθέτουν τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά Q-βρόγχου, μια H-βρόγχου/περιοχή αλλαγής, ένα μοτίβο Walker A/P- βρόγχου καθώς και ένα μοτίβο Walker B, στηρίζοντας έτσι την υπόθεσή μας ότι αποτελούν υπομονάδες ATPασών συστημάτων μεταφορέων τύπου ABC. Επιπρόσθετα, τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια εμφανίζουν 100% ταυτότητα με τα ανάλογα από *Arthrobacter keyseri* 12B και 94% ταυτότητα τόσο με πρωτεΐνες από *Rhodococcus* DK17 που κωδικεύονται από γονίδια σχετιζόμενα με

τον καταβολισμό του φθαλικού οξέος (Choi *et al.*, 2005), όσο και με τα ανάλογα πρωτεϊνικά μόρια από *Rhodococcus jostii* RHA1.

Αντίθετα, υπομονάδες συστημάτων μεταφορέων τύπου ABC μεταλλικών ιόντων (Asphe3_25060), μολυβδαινικού (Asphe3_28500), φωσφορικού (Asphe3_03480), υδρογονανθράκων (Asphe3_07840), μονοσακχαριτών (Asphe3_11410, Asphe3_11390) και αμινοξέων (Asphe3_29570, Asphe3_29550) βρέθηκαν να αυξάνουν την περίσσειά τους κατά την ανάπτυξη των κυττάρων στη γλυκόζη (Πίνακας 3.6.2.2.1).

Συμπερασματικά λοιπόν, φαίνεται πως το Sphe3 χρησιμοποιεί διαφορετικά συστήματα μεταφοράς προκειμένου να μεταφέρει εντός των κυττάρων τις διαφορετικές οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιεί ως πηγές άνθρακα. Έχει προηγουμένα αναφερθεί από αποτελέσματα πρωτεωμικής ανάλυσης στο *Arthrobacter chlorophenolicus*, πως μηχανισμοί πρόσληψης οργανικών ενώσεων τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασης τους αναλόγως του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος της 4-χλωροφαινόλης ή 4-νιτροφαινόλης (Unell *et al.*, 2009).

Από την πρωτεωμική ανάλυση διαπιστώθηκε και η ύπαρξη Sec και Tat συστημάτων μετατόπισης πρωτεϊνών εγκάρσια της μεμβράνης. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων παρατηρήθηκαν για την τρानσλοκάση πρωτεΐνης, υπομονάδα SecA (Asphe3_25750), ένα πρόδρομο πρωτεϊνικό μόριο ATPάσης με καθοριστικό ρόλο στην έκκριση των πρωτεϊνών, αυτόν της μοριακής μηχανής που οδηγεί στην μετατόπιση (VanWely *et al.*, 2001). Μειωμένα επίπεδα έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης αναφέρονται επίσης σε πρωτεωμική ανάλυση στελέχους *Corynebacterium glutamicum* παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος (Haußmann and Poetsch, 2012). Ανιχνεύθηκε μια μετατοπάση πρωτεΐνης μέσω στόχευσης διδυμων αργινινών (twin arginine-targeting protein translocase), της οικογενείας TatA/E (Asphe3_19080), με μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις αρωματικές ενώσεις. Έτσι, στο στέλεχος Sphe3 φαίνεται να υπάρχει σύστημα μετατοπάσης πρωτεϊνών μέσω στόχευσης διδυμων αργινινών [twin-arginine translocation (TAT) system], μέσω του οποίου εκκρίνονται πλήρως αναδιπλωμένες πρωτεΐνες με μοτίβο διδυμης αργινίνης εντός

της σηματοδοτικής αλληλουχίας τους εγκάρσια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπως έχει αναφερθεί για ακτινοβακτήρια του γένους *Mycobacterium* (Posey *et al.*, 2006).

Γ. Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταπόνηση καθώς και πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μηχανισμούς σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνικών μορίων βρέθηκαν να αυξάνουν τα επίπεδα έκφασής τους όταν τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1). Έτσι, ταυτοποιήθηκαν δυο οικογενειακές πρωτεΐνες καταπόνησης ομοιάζουσες με UspA (Asphe3_34150, Asphe3_04950), η μοριακή συνοδος πρωτεΐνη GrpE (Asphe3_36730), καθώς και μια μοριακή συνοδος πρωτεΐνη (Asphe3_20940) που ανήκουν στις πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας.

Η συνοδος πρωτεΐνη DnaK (Asphe3_36740), μαζί με την συν-συνοδο της, μοριακή συνοδο πρωτεΐνη της τάξης DnaJ με δομική περιοχή δακτύλων Zn (Asphe3_36720), αποτελούν μέρος του συστήματος θερμικής-καταπληξίας Hsp70 και βοηθούν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη μετάφραση με τη δέσμευσή τους στις υδρόφοβες περιοχές των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνικών αλυσίδων (Kim *et al.*, 2013). Η συν-συνοδος πρωτεΐνη GroES (Asphe3_27290), ανήκει στην Ομάδα I συνοδών πρωτεϊνών GroEL που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων όπου και μεταφέρονται οι μερικώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Η μοναδικότητά τους ως συνοδών πρωτεϊνών έγκειται στο ότι ενθυλακώνουν τις πρωτεΐνες, ένα μόριο τη φορά, σε μια κεντρική κοιλότητα προστατεύοντάς τις από το να σχηματίζουν συσσωματώματα. Οι συνοδες πρωτεΐνες GroES και GroEL υπόκεινται σε κυκλικές διεργασίες δέσμευσης και απελευθέρωσης, οι οποίες ρυθμίζονται αλλοστερικά από τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP σε περιοχές των υπομονάδων της GroEL (Kim *et al.*, 2013).

Πρωτεΐνες που επάγονται παρουσία ενός περιβαλλοντικού ερεθίσματος μπορεί να επάγονται και όταν τα κύτταρα συναντούν διαφορετικούς παράγοντες που

σχετίζονται με καταπόνηση, προσφέροντας έτσι αλληλοπροστασία ενάντια σε ποικίλλες μορφές καταπόνησης. Δεν πρόκειται παρά για προσαρμοστική απόκριση των βακτηρίων προκειμένου να επιβιώσουν στα αφιλόξενα για εκείνα φυσικά περιβάλλοντα (Park *et al.*, 2001).

Αύξηση στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα που εμπλέκονται σε μηχανισμούς απόκρισης σε καταπόνηση παρατηρήθηκε με χρήση τεχνολογίας μικροσυστοιχιών σε κύτταρα *Pseudomonas putida* παρουσία τολουολίου (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Η δε συνοδός πρωτεΐνη DnaK έχει συσχετιστεί με απόκριση καταπόνησης παρουσία αρωματικών ενώσεων σε κύτταρα *Pseudomonas* sp. DJ-12 (Park *et al.*, 2001). Πρόσφατη μεταμεταγραφική (metatranscriptomics) ανάλυση σε δείγματα από χώμα ρυπασμένο με φαινανθρένιο οδήγησε στην ταυτοποίηση ποικίλων μεταγραφημάτων με ρόλο στην απόκριση καταπόνησης και την αποτοξίνωση που παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία του φαινανθρενίου. Η μελέτη αυτή παρέχει μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ πρωτεϊνών απόκρισης σε καταπόνηση/αποτοξίνωση και πρόκληση καταπόνησης στους μικροοργανισμούς προερχόμενη από την παρουσία των PAHs (de Menezes *et al.*, 2012). Η S-τρανοφεράση της γλουταθειόνης (Asphe3_18710) με πιθανό αποτοξινωτικό από ξενοβιοτικές ενώσεις ρόλο (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006) ταυτοποιήθηκε μόνο στα δείγματα από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία των αρωματικών ενώσεων. Σύγκριση της αλληλουχίας της με την αντίστοιχη της S-τρανοφεράσης της γλουταθειόνης από *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Mvan_5043), η οποία έχει προταθεί πως έχει αποτοξινωτική λειτουργία στον καταβολισμό των PAHs (Kim *et al.*, 2008a και αναφορές εντός) αποκάλυψε μεταξύ τους ταυτότητα της τάξης του 73.2% σε αμινοξικό επίπεδο, κάτι που ενισχύει την υπόθεση ότι αυτό το ένζυμο συμμετέχει στην αποδόμηση επίμονων ρυπαντών, έχοντας το ρόλο του αποτοξινωτικού παράγοντα.

Τέλος, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Asphe3_18050), με το ρόλο της μετρίασης του οξειδωτικού στρες, παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων και αυτή μας η διαπίστωση συμφωνεί με προηγούμενα

ευρήματα σε κύτταρα *Mycobacterium* sp. JS14, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία φλουορανθινίου (Lee *et al.*, 2007).

Δ. Πρωτεΐνες του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα

Τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (Asphe3_18060), πυροσταφυλική κινάση (Asphe3_16730), φωσφογλυκερική κινάση (Asphe3_18070), ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Asphe3_18140), 6-φωσφοφρουκτοκινάση (Asphe3_28480) και φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυλάση (Asphe3_06370) παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις αρωματικές ενώσεις σε σύγκριση με τη γλυκόζη. Σε αντίθεση, αυξημένα επίπεδα παρουσία των αρωματικών ενώσεων εμφάνισαν ένζυμα που εμπλέκονται στην πορεία της γλυκονεογένεσης όπως για παράδειγμα η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (GTP) (Asphe3_07200), η πυροσταφυλική καρβοξυλάση (Asphe3_15280) και η διφωσφατάση της 1,6-φρουκτόζης, κατηγορία II (Asphe3_12120) (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1).

Ένζυμα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος όπως για παράδειγμα η ακοτινάση (Asphe3_16180), η α υπομονάδα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (Asphe3_11610), η φουμαράση (Asphe3_12090), η NADP-εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (Asphe3_11320) και διϋδρολιποαμιδική αφυδρογονάση μέρος του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού/2-οξογλουταρικού (Asphe3_12670), παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων έκφρασής τους παρουσία της γλυκόζης (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα όσα έχουν αναφερθεί για το στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440 (Kurbatov *et al.*, 2006).

Αντίθετα, αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων επέδειξαν ένζυμα όπως η ισοκιτρική λυάση (Asphe3_06080) και δυο ομόλογα της μηλικής συνθάσης (Asphe3_06070, Asphe3_33490) και τα οποία κατέχουν ρόλο κλειδί στην πορεία του γλυοξυλικού, παρακαμπτήριος του κύκλου του τρικαρβοξυλικού (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από πρωτεωμική ανάλυση σε κύτταρα *Arthrobacter*

chlorophenolicus που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινόλης (Unell *et al.*, 2009), καθώς και σε κύτταρα *Mycobacterium gilvum* PYR-1 που καλλιεργήθηκαν παρουσία πυρενίου (Badejo *et al.* 2008b). Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο στο *Mycobacterium* KMS, αναφέρει την ενεργοποίηση του κύκλου του γλυοξυλικού σε ποικιλία χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων (Zhang and Anderson, 2013a). Η παρακαμπτήρια πορεία του γλυοξυλικού είναι μια πορεία που αποδίδει ενέργεια στα κύτταρα δια μέσου της οποίας το ακέτυλο-CoA μεταβολίζεται παρακάμπτοντας τα ενεργοβόρα βήματα αποκαρβοξυλίωσης του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και χρησιμοποιεί τα τελικά προϊόντα από τον καταβολισμό των αρωματικών ενώσεων για την παραγωγή μεταβολιτών (οξαλοξικό, μηλικό, πυροσταφυλικό και φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ) που μετέχουν σε αναβολικές διεργασίες (Kurbatov, *et al.*, 2006).

E. Πρωτεΐνες του μεταβολισμού των αμινοξέων

Παρουσία των αρωματικών ενώσεων αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων: γλουταμινική συνθάση (NADH), μεγάλη υπομονάδα και μικρή υπομονάδα (Asphe3_16710 και Asphe3_16720, αντίστοιχα), οξειδοορεδοκτάση NADPH-εξαρτώμενη τύπου βήτα αλυσίδας γλουταμινική συνθάση (Asphe3_29360), αποένζυμο της 4-αμινοβουτυρικής αμινοτρανσφεράσης (Asphe3_29250), γλουταμική αφυδρογονάση (NADP) (Asphe3_36540), γλουταμινική αφυδρογονάση (NAD) (Asphe3_25680) και συνθετάση της L-γλουταμίνης (Asphe3_15720) (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1). Τα εν λόγω ένζυμα χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το 2-οξογλουταρικό οξύ οδηγούν στη σύνθεση των αμινοξέων του γλουταμινικού και της γλουταμίνης. Αυξημένα επίπεδα των ανωτέρω ενζύμων έχουν πρότερα αναφερθεί κατά την πρωτεωμική ανάλυση κυττάρων *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK που έχουν καλλιεργηθεί σε πυρένιο (Badejo *et al.*, 2013b). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις αρωματικές ενώσεις παρατηρήθηκαν και για τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση L-γλουταμινικού μέσω L-ορνιθίνης, την δεακυλάση της ακετυλορνιθίνης/δεακυλάση τύπου δεηλεκτρυλάση του ηλεκτρυλδιαμινοπιμελικού (Asphe3_19480)

και την αμινοτρανσφεράση της ακετυλορνιθίνης/ηλεκτρορνιθίνης (Asphe3_14760). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών των ενζύμων παρατηρήθηκαν και κατά την πρωτεωμική ανάλυση κυττάρων *Pseudomonas putida* KT2440 που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινόλης και πυροσταφυλικού σε σύγκριση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη (Kurbatov *et al.*, 2006).

Ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων της σερίνης, βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων. Χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων: ακετολακτική συνθάση, μεγάλη υπομονάδα (Asphe3_24070), ρεδουκτοϊσομεράση κετολο-οξέος (Asphe3_24050), αφυδρογονάση του D-3-φωσφογλυκερικού (Asphe3_24040) και υδροξυμεθυλτρανσφεράση της σερίνης (Asphe3_11490) (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.5.1). Κατά την ανάλυση του πρωτεώματος από κύτταρα *Corynebacterium glutamicum* που καλλιεργήθηκαν παρουσία πρωτοκατεχοϊκού σε σύγκριση με τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε επίσης μειωμένη έκφραση για τα ένζυμα της αφυδρογονάσης του φωσφογλυκερικού και της υδροξυμεθυλτρανσφεράσης της σερίνης (Haußmann and Poetsch, 2012). Τα αποτελέσματα των Haußmann and Poetsch (2012) ωστόσο είναι αντιφατικά για την ακετολακτική συνθάση και τη ρεδουκτοϊσομεράση κετολο-οξέος που όπως αναφέρουν παρουσία πρωτοκατεχοϊκού οξέος παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο κυτταροπλασματικό κλάσμα και μείωση στο μεμβρανικό κλάσμα (Haußmann and Poetsch, 2012). Το ένζυμο αφυδρογονάση της ημιαλδεΐδης του ασπαρτικού (Asphe3_28660), που καταλύει τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης από ασπαρτικό εμφανίζει επίσης μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των αρωματικών ενώσεων (Πίνακας 3.6.2.2.1) και το ίδιο αναφέρουν και οι Haußmann and Poetsch (2012) για το *Corynebacterium glutamicum* (Haußmann and Poetsch, 2012).

Πολλά γένη βακτηρίων έχει αναφερθεί πως χρησιμοποιούν ένα υβριδικό αερόβιο μονοπάτι για τον καταβολισμό αρωματικών ενώσεων, κατά το οποίο μεταβολίτες ενεργοποιούνται προς θειοεστέρες του CoA μέσω της δράσης μιας λιγάσης-CoA και η σχάση του αρωματικού δακτυλίου γίνεται υδρολυτικά και όχι

οξυγονολυτικά (Díaz *et al.*, 2012). Από την άλλη ο καταβολισμός του αρωματικού αμινοξέος της φαινυλαλανίνης στα βακτήρια γίνεται δια μέσου της πορείας του φαινυλοξικού οξέος (PAA) (Teufel *et al.*, 2010). Η πορεία ξεκινά με την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης οπότε προκύπτει το φαινυλοξικό οξύ το οποίο εν συνεχεία μετατρέπεται με τη δράση μιας λιγάσης φαινυλακετύλο-CoA σε φαινυλακετύλο-CoA. Ο αρωματικός πυρήνας του φαινυλακετύλο-CoA υπόκειται σε υδροξυλίωση, υδρολυτική σχάση και περαιτέρω αποδόμηση (Navarro-Llorens *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2012).

Γονιδιακά συμπλέγματα που κωδικεύουν την καταβολική πορεία του PAA έχουν αναφερθεί σε πληθώρα Gram- βακτηρίων όπως για παράδειγμα του *E. coli*, στελεχών του γένους *Pseudomonas* και *Burkholderia cenocepacia* (Ferrández *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1998; Alonso, *et al.*, 2003; Di Gennaro, *et al.*, 2007; Hamlin *et al.*, 2009; Shrivastava *et al.*, 2011). Αντιθέτως, η πορεία καταβολισμού του PAA σε Gram+ βακτήρια έχει ελάχιστα μελετηθεί. Αναφορές υπάρχουν για το στέλεχος *Rhodococcus* RHA1 (Navarro-Llorens *et al.*, 2005) και πρόσφατα οι Navarro-Llorens *et al.* (2008) χαρακτήρισαν τα γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό του φαινυλοξικού οξέος του στελέχους *Arthrobacter oxydans* CECT386 (Navarro-Llorens *et al.*, 2008). Συμπλέγματα *paal* γονιδίων έχουν ταυτοποιηθεί με ανάλυση *in silico* στο γονιδίωμα του *Corynebacterium glutamicum* (Shen *et al.*, 2012). Με ανάλυση *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Srhe3* διαπιστώθηκε η ύπαρξη στο χρωμόσωμά του παρόμοιων συμπλεγμάτων γονιδίων με εκείνων του *Arthrobacter aurescens*, τα οποία κωδικεύουν τον καταβολισμό του φαινυλοξικού και φαίνεται να είναι οργανωμένα σε οπερόνια (Navarro-Llorens *et al.*, 2008) (Σχήμα 3.6.2.6.1).

Ο καταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων, όπως για παράδειγμα της φαινυλαλανίνης, μπορεί στο στέλεχος *Srhe3* να λαμβάνει χώρα μέσω της πορείας του φαινυλοξικού, όπως έχει αναφερθεί για άλλα βακτήρια (Teufel *et al.*, 2010). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα (§ 3.6.2.6), το στέλεχος *Srhe3* χρησιμοποιεί το φαινυλοξικό σαν μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (σε συγκεντρώσεις έως 15 mM) για την αερόβια ανάπτυξή του.

Η πρωτεωμική ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση των ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του φαινυλοξικού όπως η υδρατάση του ενόυλ-CoA (Asphe3_30810), η οξυγονάση/ρεδουκτάση του φαινυλοξικού-CoA, η υπομονάδα PaaK (Asphe3_30820), η οξυγονάση του φαινυλοξικού-CoA, η υπομονάδα PaaI (Asphe3_30840), η οξυγονάση του φαινυλοξικού-CoA, η υπομονάδα PaaH (Asphe3_30850), η οξυγονάση του φαινυλοξικού-CoA, η υπομονάδα PaaG (Asphe3_30860), η πρωτεΐνη αποδόμησης φαινυλοξικού οξέος paaN (Asphe3_31810) και η λιγάση του φαινυλοξικού-CoA (Asphe3_31750) (Πίνακας 3.6.2.2.1, Σχήμα 3.6.2.6.1). Όλα τα προαναφερθέντα ένζυμα βρέθηκαν να αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης τους παρουσία του φαινανθρενίου και του φθαλικού σε σχέση με αυτό της γλυκόζης. Πρωτεωμική ανάλυση στο *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, οδήγησε στην ταυτοποίηση των ενζύμων της PAA πορείας καταβολισμού. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων βρέθηκαν σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία φαινυλοξικού οξέος, μικρότερη σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε βενζοϊκό και ανθρανυλικό οξύ, ενώ παρατηρήθηκε καταστολή στην έκφρασή τους παρουσία της σακχαρόζης (Li *et al.*, 2012). Χαρακτηριστικό είναι ότι και στο στέλεχος Sphe3 τα ένζυμα της πορείας PAA που ταυτοποιήθηκαν καταστέλλονται παρουσία τόσο της γλυκόζης όσο και του μίγματος φαινανθρενίου και γλυκόζης, που σημαίνει ότι καταστέλλονται από τη γλυκόζη. Η γλυκόζη έχει αναφερθεί ότι καταστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου της λιγάσης του φαινυλακετύλο-CoA και την PAA καταβολική πορεία μέσω της καταστολής της μεταφοράς του φαινυλοξικού οξέος εντός των κυττάρων του στελέχους *Pseudomonas putida* U (Shrivastava *et al.*, 2011 και αναφορές εντός). Αντίθετα, για το στέλεχος *Pseudomonas putida* CSV86 έχει αναφερθεί η προτιμώμενη χρήση φαινυλοξικού και 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος από γλυκόζη (Shrivastava *et al.*, 2011). Τέλος, στο στέλεχος *Burkholderia cenocepacia* K56-2, έλεγχος της δραστηριότητας των πιθανών περιοχών προαγωγών των καταβολικών γονιδίων *paa* με κλωνοποίησή τους σε σύστημα έκφρασης φθορίζουσας πρωτεΐνης eGFP, έδειξε την επαγωγή αυτών παρουσία φαινυλοξικού οξέος, ενώ η προσθήκη ηλεκτρικού οξέος και γλυκόζης στο υπόστρωμα του φαινυλοξικού οξέος οδήγησε

σε καταστολή της έκφρασης της eGFP πρωτεΐνης (Hamlin *et al.*, 2009).

4.3 Καταστολή των καταβολικών γονιδίων από τη γλυκόζη

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *rhd1a*, *rhd1b*, *rhd2a*, *rhd2b*, *diox1* και *diox2* σε μεταγραφικό επίπεδο με τη χρήση της τεχνικής qRT-PCR έδειξε ότι όλα επάγονται παρουσία φαινανθρενίου. Η επαγωγή ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό των PAHs παρουσία των αρωματικών ενώσεων είναι συνηθισμένη στη φύση και αυτό επιβεβαιώνει πρόσφατη μελέτη που αναφέρει την αύξηση των αντιγράφων γονιδίων διοξυγονασών που ανιχνεύτηκαν με PCR σε δείγματα χόματος που εμπλουτίστηκαν με φαινανθρένιο (Ding *et al.*, 2010), καθώς και μεταμεταγραφική (metatranscriptomics) ανάλυση σε δείγματα από χόμα ρυπασμένο με φαινανθρένιο που αναφέρει την αύξηση των μεταγραφημάτων σε αυτό σχετιζόμενων με τον καταβολισμό της αρωματικής ένωσης (de Menezes *et al.*, 2012).

Παρουσία της γλυκόζης παρατηρείται καταστολή της έκφρασης των καταβολικών γονιδίων που μελετήθηκαν, η οποία κυμαίνεται σε ποσοστά μεταξύ 88% και 98.5%. Η καταστολή των γονιδίων που εμπλέκονται στην καταβολική πορεία του φαινανθρενίου επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης. Παρουσία της γλυκόζης ή μίγματος φαινανθρενίου με γλυκόζη, σε σχέση με το φαινανθρένιο, τα επίπεδα των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τα αντίστοιχα γονίδια βρέθηκαν μειωμένα σε ποσοστά που κυμαίνονται από 72% έως 94%.

Πρόσφατη μελέτη *in silico* στο γονιδίωμα του στελέχους *Mycobacterium* KMS αποκάλυψε την παρουσία πιθανών γονιδίων που κωδικεύουν για φωσφοδιεστεράσες, αδενυλική κυκλάση και πρωτεΐνη που δεσμεύει cAMP (Zhang and Anderson, 2013b). Η ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση, τη λειτουργία και την αποδόμηση του cAMP αποτελεί ένδειξη ότι ο έλεγχος της ρύθμισης των καταβολικών γονιδίων πιθανόν να διαμεσολαβείται από έναν cAMP-εξαρτώμενο μηχανισμό. Έτσι, με βιοπληροφορική ανάλυση στο στέλεχος *Mycobacterium* KMS βρέθηκαν αλληλουχίες δέσμευσης του ενεργοποιημένου

συμπλόκου cAMP-CRP, στις αλληλουχίες πιθανών περιοχών προαγωγών των γονιδίων *nidA* που κωδικεύουν για τις α υπομονάδες διοξυγονασών αρχικής υδροξυλίωσης του πυρενίου στο χρωμόσωμα και το πλαμίδιο του *Mycobacterium* KMS (Zhang and Anderson, 2013b). Ανάλυση *in silico* στο γονιδίωμα του *Sphe3*, οδήγησε στον εντοπισμό ενός γονιδίου που κωδικεύει μια πρωτεΐνη δέσμευσης του cAMP (cAMP Receptor Protein-CRP), η οποία εμφανίζει ταυτότητα κατά 56.3% με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του στελέχους *Mycobacterium* KMS. Ο μηχανισμός καταστολής της έκφρασης καταβολικών γονιδίων στο στέλεχος *Sphe3*, είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

Καταστολή γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό πυρενίου παρουσία φρουκτόζης, οξικού, ηλεκτρικού οξέος και βενζοϊκού οξέος έχει επίσης αναφερθεί για το *Mycobacterium* KMS (Zhang and Anderson, 2013b). Γονιδιακά συμπλέγματα που εμπλέκονται στον καταβολισμό βενζυλικών εστέρων, ανθραυλικού, βενζοϊκού οξέος, υδροξυκιναμικών και δικαρβοξυλικών οξέων στο *Acinetobacter baylyi*, παρουσιάζουν καταστολή έκφρασης παρουσία διαφόρων υποστρωμάτων οξέων (Fischer *et al.*, 2008). Παρουσία ηλεκτρικού και *πυροσταφυλικού* οξέος παρατηρήθηκε καταστολή στην πορεία καταβολισμού του πρωτοκατεχοϊκού, *p*-υδροξυβενζοϊκού και βανυλικού οξέος μέσω της πορείας του *β*-κετοαδιπικού οξέος (Dal *et al.*, 2002). Σε *Pseudomonas putida* έχει διαπιστωθεί ότι ο μηχανισμός CRC εμπλέκεται στην καταστολή της πορείας του ομογεντιστικού, του βενζοϊκού, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και της κατεχόλης (Morales *et al.*, 2004). Πρόσφατα, η καταστολή γονιδίων καταβολισμού PCB/διφαινυλίου από τη γλυκόζη διαπιστώθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο για το στέλεχος *Rhodococcus jostii* RHA1 (Araki *et al.*, 2011), ενώ στο στέλεχος *Rhodococcus* TFB διαπιστώθηκε πως μια CRP-πρωτεΐνη εμπλέκεται στην καταστολή των γονιδίων καταβολισμού της τετραλίνης (Tomás-Gallardo *et al.*, 2012).

4.4 Συν-μεταβολισμός PAHs από το στέλεχος *Sphe3*

Στο φυσικό περιβάλλον η ανάπτυξη των βακτηρίων δεν σχετίζεται με την ύπαρξη ενός και μόνο θρεπτικού μέσου, αλλά κατά κανόνα με μίγματα πηγών άνθρακα

λόγω της πληθώρας των πιθανών υποστρωμάτων (Κονάρονά-Konar and Egli, 1998). Συνήθως απομονωμένα βακτηριακά στελέχη από περιβαλλοντικά δείγματα, αποδομούν μικρό εύρος PAHs και η ταυτόχρονη αποδόμηση αυτών σε μίγματα είναι πολύπλοκη, αφού είναι το αποτέλεσμα όχι μόνο βιοδιαθεσιμότητας, αλλά και μεταβολικών αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με φαινόμενα ανταγωνισμού ή και συν-μεταβολισμού (Bouchez *et al.*, 1995 και 1999). Ο συν-μεταβολισμός περισσότερων του ενός PAHs είναι διαδικασία που δεν ωφελεί το ίδιο το κύτταρο, εφόσον τα κύτταρα δεν μεταβολίζουν τις συν-καταβολιζόμενες ενώσεις προς παραγωγή ενέργειας (Johnsen *et al.*, 2005), ωστόσο αποτελεί μια πολύ επωφελή διεργασία για το περιβάλλον αφού διενεργεί την αποδόμηση των οργανικών ρύπων. Μέσω του φαινομένου του συν-μεταβολισμού μπορεί να μεγαλώσει το εύρος καταβολισμού PAH ενός συγκεκριμένου στελέχους, αφού η παρουσία ενός PAH μπορεί να διευκολύνει σημαντικά τον καταβολισμό του άλλου, συνεισφέροντας έτσι στην αποτελεσματικότερη αποδόμηση PAHs υψηλού μοριακού βάρους (Kanaly and Harayama, 2000; van Herrwijnen *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2008).

Τα μίγματα δυο PAHs που εξετάστηκαν στο στέλεχος *Sph3* δείχνουν πως το στέλεχος επιδεικνύει σημαντική ικανότητα συν-μεταβολισμού, εφόσον παρατηρήθηκε πλήρης μετατροπή του φλουορενίου και ανθρακενίου, και μερική μετατροπή του φλουορανθενίου παρουσία του φαινανθρενίου (Σχήμα 3.5.1). Δεν παρατηρήθηκε μετατροπή του χρυσενίου και πυρενίου σε δυαδικά συστήματα με φαινανθρένιο, τα οποία συνιστούν τους PAHs μεγαλύτερου μοριακού βάρους από όσους εξετάστηκαν.

Το φαινόμενο της ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας καταβολισμού περισσότερων του ενός PAHs καθώς και η βελτίωση του ρυθμού αποδόμησης διαφόρων PAHs σε μίγματα έχει αναφερθεί για πολλά στελέχη που αποδομούν αρωματικές ενώσεις (Kelley and Cerniglia, 1995; Shuttleworth and Cerniglia, 1996; Juhasz and Naidu, 2000; Dean-Ross *et al.*, 2002; López *et al.*, 2008)

Με αυτή του την ευρεία ικανότητα μετατροπής PAHs, το στέλεχος *Sph3* αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο και μπορεί να “στρατολογηθεί” στη μάχη της

αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), συγκαταλέγονται στους πιο διαδεδομένους και επίμονους ρυπαντές του περιβάλλοντος με άμεση συνέπεια στην ανθρώπινη υγεία. Για τη βελτιστοποίηση των τεχνικών βιοαποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών, μέσω της εκμετάλλευσης του τεράστιου καταβολικού δυναμικού των μικροοργανισμών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι αφενός η αποσαφήνιση των πορειών αποδόμησης των ρυπαντών από χαρακτηρισμένα βακτηριακά στελέχη και αφετέρου η σε βάθος κατανόηση των προσαρμοστικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται στα βακτήρια παρουσία των ξενοβιοτικών αυτών ενώσεων.

Σκοπός της παρούσης ερευνητικής μελέτης ήταν η αποσαφήνιση της πορείας βιοαποδόμησης του φαινανθρενίου από ένα νέο βακτηριακό στέλεχος το οποίο έχει απομονωθεί στο εργαστήριό μας από περιοχή ρυπασμένη με PAHs. Το στέλεχος αυτό, το οποίο αποτελεί νέο είδος του γένους *Arthrobacter*, έχει ονομαστεί *Arthrobacter phenanthrenivorans* (Sphe3) και πρόσφατα σε συνεργασία με το Joint Genome Institute (JGI), ολοκληρώθηκε η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματός του.

Μέσω της ανάλυσης *in silico* του γονιδιώματος, της μελέτης της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική qRT-PCR, της υπερέκφρασης πρωτεϊνών, καθώς επίσης και της πρωτεωμικής ανάλυσης με nanoLC/MS-MS σε κύτταρα στελέχους Sphe3 που καλλιεργήθηκαν παρουσία φαινανθρενίου, φθαλικού, γλυκόζης και μίγματος φαινανθρενίου με γλυκόζη, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός όλων των ενζύμων που εμπλέκονται στην πορεία καταβολισμού του φαινανθρενίου.

Πιο συγκεκριμένα, από την μελέτη *in silico* εντοπίστηκαν όλα τα καταβολικά γονίδια τόσο στο χρωμόσωμα όσο και στα δύο καταβολικά πλασμίδια (190 kb, 94 kb) του στελέχους Sphe3. Γονίδια που κωδικεύουν πιθανές διοξυγονάσες αρχικής υδροξυλίωσης του φαινανθρενίου εντοπίστηκαν στα δύο πλασμίδια και στο χρωμόσωμα. Με χρήση της τεχνικής qRT-PCR διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων αυτών που εντοπίζονται στο μεγάλο πλασμίδιο παρουσία του φαινανθρενίου, σε σχέση με αυτή των γονιδίων του μικρού πλασμιδίου ή του

χρωμοσώματος. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από την πρωτεωμική ανάλυση, όπου διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση των υπομονάδων της εν λόγω διοξυγονάσης του μεγάλου μόνο πλασμιδίου παρουσία του φαινανθρενίου και ακολούθησε λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων αυτών μέσω της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών που κωδικεύουν και της ανίχνευσης *in vivo* του 3,4-διϋδροξυφαινανθρενίου. Η εν λόγω διοξυγονάση εμφάνισε μεγάλη εξειδίκευση ως προς το φαινανθρένιο, κάτι που αναμενόταν αφού το στέλεχος *Srhe3* καταβολίζει μόνο φαινανθρένιο ως μοναδική πηγή άνθρακα. Τα πειράματα όμως του συν-μεταβολισμού, έδειξαν τη δυνατότητα του στελέχους να συν-καταβολίζει πλήρως το φλουρένιο και μερικώς το φλουορανθένιο παρουσία του φαινανθρενίου. Ο συνδυασμός αυτών των αποτελεσμάτων ενισχύει την υπόθεση ότι η διοξυγονάση που είναι υπεύθυνη για την αρχική υδροξυλίωση του φαινανθρενίου είναι αυτή του μεγάλου πλασμιδίου, ενώ η αντίστοιχη διοξυγονάση του μικρού πλασμιδίου πιθανόν εμφανίζει κάποια δράση στον συν-καταβολισμό του φλουορενίου και φλουορανθενίου στο στέλεχος *Srhe3*.

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των δύο γονιδίων της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (ενδιάμεσος μεταβολίτης καταβολισμού του φαινανθρενίου) που εντοπίζονται στο μεγάλο καταβολικό πλασμίδιο και στο χρωμόσωμα του στελέχους *Srhe3*, έδειξε ότι τα ένζυμα που κωδικεύουν ανήκουν στην οικογένεια των *cupin* πρωτεϊνών και έχουν παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες. Ο περαιτέρω καταβολισμός του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος προχωράει είτε μέσω της *ortho*- είτε μέσω της *meta*-σχάσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, όπως φάνηκε από την μελέτη *in silico* και αποδείχθηκε και από την πρωτεωμική ανάλυση. Η μελέτη των γονιδίων που κωδικεύουν τα ένζυμα της *meta*-σχάσης σε μεταγραφικό επίπεδο, έδειξε ότι τα γονίδια αυτά συμμεταγράφονται συνιστώντας ένα οργανωμένο οπερόνιο.

Τόσο από την πρωτεωμική ανάλυση όσο και από πειράματα qRT-PCR, φαίνεται ότι όλα τα ένζυμα που μετέχουν στην καταβολική πορεία του φαινανθρενίου καταστέλλονται παρουσία της γλυκόζης. Επιπλέον, η πρωτεωμική ανάλυση συνέβαλε και στην κατανόηση των μηχανισμών προσαρμογής του στελέχους

Srhe3 παρουσία ξενοβιοτικών ενώσεων. Έτσι, παρουσία των αρωματικών υποστρωμάτων παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης ενζύμων του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα και του μεταβολισμού των αμινοξέων, πρωτεϊνών μεταφορέων, πρωτεϊνών του κυτταρικού φακέλου και πρωτεϊνών που επάγονται παρουσία καταπόνησης. Η παρούσα πρωτεωμική ανάλυση αποτελεί και την πρώτη μελέτη παρουσία υποστρωμάτων PAHs και γλυκόζης σε στέλεχος *Arthrobacter*, αφού δεν υπάρχει κάποια πρότερη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία.

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons are among the most ubiquitous and recalcitrant environmental pollutants with adverse effects on human health. The optimization of bioremediation approaches in contaminated sites, though harnessing the enormous catabolic potential of bacteria, requires both the clarification of the catabolic pathways of the various pollutants from well-characterized bacterial strains and the profound understanding of the adaptive mechanisms employed by bacteria in the presence of such xenobiotic compounds.

The aim of the present research study was the clarification of the phenanthrene degradation pathway from a new bacterial strain previously isolated in our laboratory from a PAH contaminated site. This strain, which constitutes a new species of the genus *Arthrobacter* was named *Arthrobacter phenanthrenivorans* (Sphe3) and recently, in collaboration with the Joint Genome Institute (JGI), the whole sequencing of its genome was completed.

Through the genome's *in silico* analysis, the study of gene expression with qRT-PCR, protein overexpression, as well as whole proteome analysis employing nanoLC/MS-MS in Sphe3 cells grown in the presence of phenanthrene, phthalate, glucose and in a mixture of phenanthrene with glucose, the characterization of all the enzymes implicated in the phenanthrene degradation pathway was accomplished.

Specifically, *in silico* studies led to the identification of all the catabolic genes on both the chromosome and the two catabolic plasmids (190 kb, 94 kb) of Sphe3. Genes coding for possible ring hydroxylating dioxygenases responsible for the initial dihydroxylation of phenanthrene were identified in both plasmids and the chromosome. Gene expression studies by employing qRT-PCR, demonstrated increased expression levels of the genes located on the large catabolic plasmid in the presence of phenanthrene, when compared to the corresponding genes located on the small catabolic plasmid or the chromosome.

This result corroborates with the findings of the proteomic analysis, where increased levels of expression were observed only for the subunits of the

corresponding ring hydroxylating dioxygenase located on the large plasmid, in the presence of phenanthrene. The functional characterization of these genes was performed through the overexpression of the encoded proteins followed by the *in vivo* detection of 3,4-dihydrodihydroxyphenanthrene. As expected, this ring hydroxylating dioxygenase shows high specificity towards phenanthrene, since Sphe3 uses exclusively phenanthrene as a source of carbon and energy. However, experiments on the co-metabolic activity demonstrate the capability of the strain to fully co-metabolize fluorene and partially co-metabolize fluoranthene in the presence of phenanthrene. Together, these experimental results support the hypothesis that the dioxygenase mediating the initial hydroxylation of phenanthrene is that of the large catabolic plasmid, whereas the corresponding dioxygenase of the small catabolic plasmid possibly exhibits some activity in the co-metabolism of fluorene and fluoranthene in Sphe3.

The functional characterization of the two genes encoding the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase (intermediate metabolite in the phenanthrene degradation pathway), located on the large catabolic plasmid and the Sphe3 chromosome, demonstrated that the encoded enzymes belong to the cupin protein family and exhibit similar catalytic properties. Both *in silico* and proteomic analysis verify that degradation of 1-hydroxy-2-naphthoate proceeds through either the *ortho*- or *meta*-cleavage of protocatechuate. The study of the genes encoding the enzymes implicated in the *meta*-cleavage of protocatechuate at the transcriptional level, showed that these genes are co-transcribed, constituting an operon. Both proteomic analysis and qRT-PCR experimental results demonstrate that all the enzymes implicated in the phenanthrene degradation pathway are repressed, in the presence of the substrate of glucose.

Furthermore, the proteomic analysis contributed to the substantial understanding of the adaptation mechanisms used by Sphe3 in the presence of xenobiotic compounds. Therefore, in the presence of aromatic substrates the differential expression of proteins involved in the central carbon and aminoacid metabolism, transport proteins, cell envelope proteins and stress related proteins, was

observed. It should be noted that the present study constitutes the first proteomic study in the presence of PAHs and glucose in an *Arthrobacter* strain, since there is no previous reference in the literature.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abraham, W.-R., Wenderoth, D. F. and Gläßer, W. 2005. Diversity of biphenyl degraders in a chlorobenzene polluted aquifer. *Chemosphere*. 58(4):529-533.
2. Adams, M. A., Singh, V. K., Keller, B. O. and Jia, Z. Structural and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 61:1469-1484.
3. Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211:132-138
4. Alexander, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, New York, N. Y.
5. Alonso, S., Bartolomé-Martin, D., del Álamo, M., Díaz, E., García, J. L. and Parera, J. 2003. Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene*. 319:71-83.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
7. Aly, H. H. A., Huu, N. B., Wray, V., Junca, H. and Pieper, D. H. 2008. Two angular dioxygenases contribute to the metabolic versatility of dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* sp. strain HAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12):3812-3822.
8. Applied Biosystems. 1997. User bulletin no.2: ABI PRISM 7700 sequence detection system, revision A. Applied Biosystems, Foster City, CA.
9. Araki, N., Niikura, Y., Miyauchi, K., Kasai, D., Masai, E. and Fukuda, M. 2011. Glucose-mediated transcriptional repression of PCB/biphenyl catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20(1):53-62.
10. Armengaud, J., Happe, B. and Timmis, K. N. 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Shingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. *J. Bacteriol.* 180(15):3954-3966.
11. Asturias, J. A., Diaz, E. and Timmis, K. N. 1995. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenase from gram-negative bacteria. *Gene*. 156(1):11-18.
12. Asturias, J. A., Eltis, L. D., Prucha, M. and Timmis, N. K. 1994. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6.

- Identification of a new family of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* 269:7807-7815.
13. ATSDR. 1996. ToxFAQs™ for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=121&tid=25>.
 14. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Short protocols in molecular biology. 4th edition. A compendium of methods from current protocols in molecular biology. WILEY, N. Y.
 15. Backman, A., Maraha, N. and Jansson, J. K. 2004. Impact of temperature on the physiological status of a potential bioremediation inoculants, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):2952-2958.
 16. Badejo, A. C., Badejo, A. O., Shin, K. H. and Chai, Y. G. 2013a. A gene expression study of the activities of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to changes in salinity and pH during pyrene degradation. *PLoS One.* 8(2):e58066.
 17. Badejo, A. C., Choi, C. W., Badejo, A. O., Shin, K. H., Hyun, J. H., Lee, Y. G., Kim, S. I., Park, K. S., Kim, S. H., Jung, K. H., Chung, Y. H. and Chai, Y. G. 2013b. A global proteome study of *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK grown on pyrene and glucose reveals the activation of glyoxylate, shikimate and gluconeogenic pathways through the central carbon metabolism highway. *Biodegradation.* 24:741-752.
 18. Bae, H. S., Lee, J. M. and Lee, S.-T. 1996. Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter urefaciens* CPR706. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:125-129.
 19. Bahosin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T. L., Khan, S. U. and Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation* 19:567-576.
 20. Balashova, N. V., Kosheleva, I. A., Golovchenko, N. P. and Boronin, A. M. 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochem.* 35:291-296.
 21. Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S., Wincker, P., Ornston, L. N., Weissenbach, J.,

- Marliere, P., Cohen, G. N. and Medigue, C. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* 32(19):5766-5779.
22. Barnsley, E. A. 1983. Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate. *J. Bacteriol.* pp.113-117.
 23. Batie, C. J., Ballou, D. P. and Correll, C. C. 1992. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. In: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Editor: Muller, F.), pp:543-556. CRC Press: Boca Raton, FL.
 24. Battie, C. J., LaHaie, E., Ballou, D. P. 1987. Purification and characterization of phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* 262:1510-1518.
 25. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. 2002. *Biochemistry*, 5th edition. New York: W. H. Freeman.
 26. Boldrin, B., Tiehm, A. and Fritzsche, C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1927-1930.
 27. Bosch, R., García-Valdés, E. and Moore, E. R. B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas sutzeri* AN10. *Gene.* 236:149-157.
 28. Bosch, R., García-Valdés, E. and Moore, E. R. B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas sutzeri* AN10. *Gene.* 245:65-74.
 29. Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteele, J.-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:154-15.
 30. Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F. and Vandecasteele, J.-P. 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the degradation of aromatic polycyclic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation.* 10:429-435.
 31. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

32. Bugg, T. D. H. 1993. Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1202:258-264.
33. Bundy, B. M., Campbell, A. L. and Neidle, E. L. 1998. Similarities between antABC-encoded anthranilate dioxygenase and the benABC-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 180(17):4466-4474.
34. Butler, C. S. and Mason, J. R. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv. Microb. Physiol.* 38:47-84.
35. Cao, B., Nagarajan, K. and Loh, K.-C. 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:207-228.
36. Casellas, M. M., Grifoll, J. M., Bayona, J. M. and Solanas, A. M. 1997. New metabolites in the degradation of fluorine by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:819-826.
37. Cerniglia, C. E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30:31-71.
38. Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3:351-368.
39. Chakraborty, J., Ghosal, D., Dutta, A. and Dutta, T. K. 2012. An insight into the origin and functional evolution of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30(4):419-436.
40. Chang, H. K. and Zylstra, G. J. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 180(24):6529-6537.
41. Chang, H. K., Mosheni, P. and Zylstra, G. J. 2003. Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,-dioxygenase from *Burkholderia cepacia*. *J. Bacteriol.* 185(19):5871-5881.
42. Chauhan, A. and Jain, R. K. 2010. Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation.* 21:861-879.
43. Chen, H. P., Zhu, S. H., Casabon, I., Hallam, S. J., Crocker, F. H., Mohn, W. W., Indest, K. J. and Eltis, L. D. 2012. Genomic and transcriptomic studies of an RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)-degrading actinobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(21):7798-7800.

44. Chen, J., Li, W., Wang, M., Zhu, G., Liu, D., Sun, F., Hao, N., Li, X., Rao, Z. and Zhang, X. C. 2008. Crystal structure and mutagenic analysis of GDOsp, a gentistae 1,2-dioxygenase from *Salicibacter pomeroyi*. *Protein Sci.* 17:1362-1373.
45. Cho, J.-C. and Kim, S.-J. 2001. Detection of mega plasmid from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. strain KS14. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(4): 503-506.
46. Choi, K. Y., Kim, D., Sul, W. J., Chae, J.-C., Zylstra, G. J., Kim, Y. M. and Kim, E. 2005. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:207-213.
47. Chua, C. H., Feng, Y., Yeo, C. C. Khoo, H. E. and Poh, C. L. 2001. Identification of amino acid residues essential for catalytic activity of gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:141-146.
48. Chung, C. T. and Miller, R. H. 1988. A rapid and convenient method for preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 16:3580.
49. Churchill, S. A., Harper, J. P. and Churchill, P. F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:549-552.
50. Collins, M. D. 1987. Transfer of *Arthrobacter variabilis* (Muller) to the genus *Corynebacterium variabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:287-288.
51. Conn, H. J. and Dimmick, I. 1947. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *J. Bacteriol.* 54:291-303.
52. Corbella, M. E. and Puyet, A. 2003. Real-time reverse transcription-PCR analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4):2269-2275.
53. Couture, M. M., Colbert, C. L., Babini, E., Rosell, F. I., Mauk, A. G., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. 2001. Characterization of BphF, a Rieske-type ferredoxin with a low reduction potential. *Biochemistry.* 40:84-92.
54. Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J. and Häggblom, M. M. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2683-2691.

55. Dal, S., Steiner, I. and Gerischer, U. 2002. Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(4):389-404.
56. Davis, J. K., He, Z., Sommerville, C. C. and Spain, J. C. 1999. Genetic and biochemical comparison of 2-aminophenol 1,6-dioxygenase of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 to meta-cleavage dioxygenases: divergent evolution of 2-aminophenol meta-cleavage pathway. *Arch. Microbiol.* 172:330-339.
57. de Menezes, A., Clipson, N. and Doyle, E. 2012. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ. Microbiol.* 14(9):2577-2588.
58. Dean-Ros, D., Moody, J. and Cerniglia, C. E. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:1-7.
59. Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C. and Jouanneau, Y. 2004. Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain That Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6714-6725.
60. Dennis, J. J. and Zylstra, G. J. 2004. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J. Mol. Biol.* 341(3):753-768.
61. Deveryshetty, J. and Phale, P. S. 2009. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PPD: purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid dioxygenase. *Microbiology.* 155:3083-3091.
62. Di Gennaro, P., Ferrara, S., Ronco, I., Galli, E., Sello, G., Papacchini, M. and Bestetti, G. 2007. Styrene lower catabolic pathway in *Pseudomonas fluorescens* ST: identification and characterization of genes for phenylacetic acid degradation. *Arch. Microbiol.* 188:117-125.
63. Díaz, E. and Prieto, M. A. 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opini. Biotechnol.* 11:467-475.
64. Díaz, E. Jiménez, J. I. and Nogales, J. 2012. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24:1-12.
65. Ding, G.-C., Heuer, H., Zühlke, S., Spitteller, M., Pronk, G. J., Heister, K., Kögel-Knabner, I. and Smalla K. 2010. Soil type-dependent responses to phenanthrene as

- revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(14):4765-4771.
66. Doddamani, H. P. and Ninnekar, H. Z. 2000. Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species. *Curr. Microbiol.* 41:11-14.
 67. Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L. and deLorenzo, V. 2006. Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* 281(17):11981-11991.
 68. Dong, X., Fushinobu, S., Fukunda, E., Terada, T., Nakmura, S., Shimizu, K., Nojiri, H., Omori, T., Shoun, H. and Wakagi, T. 2005. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Bacteriol.* 187:2483-2490.
 69. Douka, E., Christogianni, A., Koukkou, A. I., Afendra, A. and Drainas, C. 2001. Use of a green fluorescent protein as a reporter in *Zymomonas mobilis* and *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199:245-251.
 70. Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M. and Clipson, N. 2008. Microbial PAH degradation. In: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 65, pp.27-54. Elsevier Inc.
 71. Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N. and Johri, A. K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:143-152.
 72. Dunwell, J. M., Culham, A., Carter, C. E., Sosa-Aguirre, C. R. and Googenough, P. W. 2001. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 26(12):740-746.
 73. Durham, D. R., Stirling, L. N. and Ornston, J. J. 1980. Intergenic evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry.* 19:149-155.
 74. Eaton, R. W. 2001. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* 183(12):3689-3703.
 75. Eaton, R. W. and Ribbons, D. W. 1982. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. *J. Bacteriol.* 151(1):48-57.

76. Eltis, L. D. and Bolin, J. T. 1996. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* 178(20):5930-5937.
77. Engelhardt, G., Ziegler, W., Wallnofer, P. R., Jarczyk, H. J. and Oehlmann, L. 1982. Degradation of the triazinone herbicide metamitron by *Arthrobacter* sp. DSM 20389. *J. Agr. Food Chem.* 30:278-282.
78. EPA. 2009. List of priority chemicals. In: United States Environmental Protection Agency Website. Available from: <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm>
79. Erickson, B. D. and Mondello, F. J. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174(9):2903-2912.
80. Eschbach, M., Mobitz, H., Rompf, A. and Jahn, D. 2003. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 223(2):227-230.
81. Eulberg, D., Lanker, S., Golovleva, L. and Schlömann, M. 1998. Characterization of protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate eno-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* 180(5):1072-1081.
82. Evans, W. C., Fernley, H. N. and Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochem. J.* 95:819-831.
83. Fahy, A., Ball, A. S., Lethbridge, G., McGenity, T. J. and Timmis, K. N. 2008. High benzene concentrations can favour Gram-positive bacteria in groundwaters from a contaminated aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65(3):526-533.
84. Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E. R., Luengo, J. M., García, J. L. and Díaz, E. 1998. Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273:25974-25986.
85. Ferraro, D. J., Brown, E. N., Yu, C.-L., Parales, R. E., Gibson, D. T. and Ramaswamy, S. 2007. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Structural Biology.* 7:10.

86. Ferraro, D. J., Gakhar, L. and Ramaswamy, S. 2005. Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:175-190.
87. Ferraroni, M., Seifert, J., Travkin, V. M., Thiel, M., Kaschabek, S., Scozzafava, A., Golovleva, L., Schlomann, M. and Briganti, F. 2005. Crystal structure of the hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Nocardioides simplex* E3, a key enzyme involved in polychlorinated aromatics biodegradation. *J. Biol. Chem.* 280:21144-21154.
88. Ferraroni, M., Steimer, L., Matera, I., Bürger, S., Scozzafava, A., Stolz, A. and Briganti, F. 2012. The generation of 1-hydroxy-2-naphthoate 1,2-dioxygenase by single point mutations of salicylate 1,2-dioxygenase- rational design of mutants and the crystal structures of the A85H and W104Y variants. *J. Struct. Biol.* 180:563-571.
89. Ferreira, M. I. M., Marchesi, J. R. and Janssen, D. B. 2008. Degradation of 4-fluorophenol by *Arthrobacter* sp. strain IF1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:709-717.
90. Fetzner, S. 2012. Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(8):2505-2514.
91. Fischer, R., Bleichrodt, F. S. and Gerischer, U. C. 2008. Aromatic degradative pathways in *Acinetobacter baylyi* underlie carbon catabolite repression. *Microbiol.* 154:3095-3103.
92. Friemann, R., Ivkovic-Jensen, M. M., Lessner, D. J., Yu, C. L., Gibson, D. T., Parales, R. E., Eklund, H. and Ramaswamy, S. Structural insight into the dioxygenation of nitroarene compounds: the crystal structure of nitrobenzene dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 348:1139-1151.
93. Fu, F., Cheng, V. W. T., Wu, Y., Tang, Y., Weiner, J. H. and Li, L. 2013. Comparative proteomic and metabolomic analysis of *Staphylococcus warneri* SG1 cultured in the presence or absence of butanol. *J. Proteome Res.* 12:4478-4489.
94. Fujita, Y., Matsuoka, H. and Hirooka, K. 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol. Microbiol.* 66(4):829-839.
95. Furusawa, Y., Nagarajan, V., Tanokura, M., Masai, E., Fukuda, M. and Senda, T. 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl

- dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J. Mol. Biol. 342(3):1041-1052.
96. Gakhar, L., Malik, Z. A., Allen, C. C. R., Lipscomb, D. A., Larkin, M. J. and Ramaswamy, S. 2005. Structure and increased thermostability of *Rhodococcus* sp. naphthalene 1,2-dioxygenase. J. Bacteriol. 187(21):7222-7231.
 97. Gerischer, U., Segura, A. and Ornston, L.N. 1998. PcaU transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. J. Bacteriol. 180(6):1512-1524.
 98. Gevers, D., Vandepoele, K., Simillon, C. and Van de Peer, Y. 2004. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. Trends Microbiol. 12:148-154.
 99. Gibson, D. T. and Parales, R. E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11:236-243.
 100. Goffin, C. and Ghuysen, J. M. 1998. Mutlimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(4):1079-1093.
 101. Gosh, D. K. and Mishra, A. K. 1983. Oxidation of phenanthrene by a strain of *Micrococcus*: evidence of protocatechuate pathway. Curr. Microbiol. 9:219-224.
 102. Goyal, A. K. and Zylstra, G. J. 1997. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19:401-407.
 103. Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A. and Thomas, C. M. 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. 4(12):856-871.
 104. Grifoll, M. M., Casellas, J. M., Bayona, J. M. and Solanas, A. M. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58:2910-2917.
 105. Grifoll, M. S., Selifonov, S. and Chapman, P. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorine by *Pseudomonas* sp. strain F274. Appl. Environ. Microbiol. 60:2438-2449.
 106. Grifoll, M. S., Selifonov, S. and Chapman, P. 1995b. Transformation of substituted fluorenes and fluorine analogs by *Pseudomonas* sp. strain F274. Appl. Environ. Microbiol. 61:3490-3493.

107. Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V. and Chapman, P. J. 1995a. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3711-3723.
108. Grinsted, J. and Bennett, P. M. 1988. Preparational electrophoresis of plasmid DNA. *Meth. Microbiol.* 21:129-142.
109. Guerin, W. F. and Jones, G. E. 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:937-944.
110. Gupta, P., Reddy, G. S. N., Delille, D. and Shivaji, S. 2004. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2375-2378.
111. Guzik, U., Hupert-Kocurek, K. and Wojcieszynska, D. 2013. Intradiol dioxygenases- the key enzymes in xenobiotics degradation. In: *Biodegradation of Hazardous and special products* (Editors: Chammy, O. and Rosenkranz, F.). pp.129-153.
112. Haak, B., Fretzner, S. and Lingens, F. 1995. Cloning, nucleotide sequence and expression of the plasmid-encoded genes for two-component 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Bacteriol.* 177(3):667-675.
113. Habe, H., Ashikawa, Y., Saiki, Y., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. 2002. *Sphingomonas* sp strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-p-dioxins in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 211(1):43-49.
114. Habe, H., Chung, J.-S., Ishida, A., Kasuga, K., Ide, K., Takemura, T., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2005. The fluorene catabolic linear plasmid in *Terrabacter* sp. strain DBF63 carries the β -ketoadipate pathway genes, *pcaRHGBDCFIJ*, also found in proteobacteria. *Microbiology.* 151:3713-3722.
115. Habe, H., Chung, J.-S., Kato, H., Ayabe, Y., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2004. Characterization of the upper pathway genes for fluorene metabolism in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *J. Bacteriol.* 186(17):5938-5944.
116. Habe, H., Miyakoshi, ., Chung, J.-S., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. 2003. Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:44-54.

117. Haddad, S., Eby, D. M. and Neidle, E. L. 2001. Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6):2507-2514.
118. Hamlin, J. N. R., Bloodworth, R. A. M. and Cardona, S. T. 2009. Regulation of phenylacetic acid degradation genes of *Burkholderia cenocepacia* K56-2. *BMC Microbiol.* 9:222.
119. Han, S., Eltis, L. D., Timmis, K. N., Muchmore, S. W. and Bolin, J. T. 1995. Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from PCB-degrading pseudomonad. *Science.* 270:976-980.
120. Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology.* 166:4895-4901.
121. Hara, H., Steward, G. R. and Mohn, W. W. 2010. Involvement of a novel ABC transporter and monoalkyl phthalate ester hydrolase in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(5):1516-1523.
122. Harayama, S., Kok, M. and Neidle, E. L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:565-601.
123. Harayama, S., Rekik, M., Wasserfallen, A. and Bairoch, A. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes pWW0 and NAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 210:241-247.
124. Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs: a review. *J. Hazard. Mater.* 169:1-15.
125. Harpel, M. R. and Lipscomb, J. D. 1990. Gentisate 1,2-dioxygenase from pseudomonas. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas acidovorans*. *J. Biol. Chem.* 265:6301-6311.
126. Harvey, R. G. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Wiley-VCH, New York, N. Y.
127. Harwood, C. S. and Parales, R. E. 1996. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbio.* 50:553-590.
128. Harwood, C. S., Nichols, N. N., Kim, M.-K., Diitty, J. L. and Parales, R. E. 1994. Identification of the pcaRKF gene cluster from *Pseudomonas putida*: Involvement in chemotaxis, biodegradation and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* 176(21):6479-6488.

129. Hatta, T., Murkerjee-Dhar, G., Damborsky, J., Kiyohara, H. and Kimbara, K. 2003. Characterization of a novel thermostable Mn(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a PCB and naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8. J. Biol. Chem. 278:21483-21492.
130. Haußmann, U. and Poetsch, A. 2012. Global proteome survey of protocatechuate- and glucose-grown cells *Corynebacterium glutamicum* reveals multiple physiological differences. J. Prot. 75:2649-2659.
131. Haußmann, U., Qi, S.-W., Wolters, D., Rögner, M., Liu, S.-J. and Poetsch, A. 2009. Physiological adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to benzoate as alternative carbon source- a membrane proteome-centric view. Proteomics. 9:3635-3651.
132. Henne, K. L., Turse, J. E., Nicora, C. D., Lipton, M. S., Tollaksen, S. L., Lindberg, C., Babnigg, G., Giometti, C. S., Nakatsu, C. H., Thompson, D. K. and Kanopka, A. E. 2009. Global proteomic analysis of the chromate response in *Arthrobacter* sp. strain FB24. J. Prot. Res. 8:1704-1716.
133. Hennessee, C.T. and Li, Q. X. 2010. Micrococccineae: *Arthrobacter* and relatives. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Ed: Timmis, K. N.). pp.1854-1864. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
134. Herz, S., Wungshintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. and Rohdich, F. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. PNAS USA. 97(6):2486-2490.
135. Hiessl, S., Schuldes, J., Thurmer, A., Halbsguth, T., Broker, D., Angelov, A., Liebl, W., Daniel, R. and Steinbuchel, A. 2012. Involvement of two latex-clearing proteins during rubber degradation and insights into the subsequent degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. Appl. Environ. Microbiol. 78(8):2874-2887.
136. Hirano, S., Morikawa, M., Takano, K., Imanaka, T. and Kanaya, S. 2007. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:192-199.
137. Hoepfel, R. E. and Hinchee, R. E. 1994. Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and ground water. Environ. Sci. Pollut. Control Ser. 6:311-431.

138. Holder, J. W., Ulrich, J. C., DeBono, A. C., Godfrey, P. A., Desjardins, C. A., Zucker, J., Zeng, Q., Leach, A. L., Ghiviriga, I., Dancel, C., Abeel, T., Gevers, D., Kodira, C. D., Desany, B., Affourtit, J. P., Birren, B. W. and Sinskey, A. J. 2011. Comparative and functional genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for biofuels development. PLoS Genet. 7(9):e1002219.
139. Horton, R. N., Apel, W. A., Thompson, V. S. and Sheridan, P. P. 2006. Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*. BMC Microbiol. 6:5.
140. Huang, X. and Miller, W. 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. Adv. Appl. Math. 12:373-381.
141. Hwa, K. S., Jeong, K. H., Jin-cchul, A., Hoon, J. J. and Seung-Yeol, S. L. 2005. Characterization of phenanthrene degradation by *Sphingomonas* sp. HS 362. Korean J. Microbiol. 41:201-207.
142. Iida, T., Mukouzaka, Y., Nakamura, K. and Kudo, T. 2002a. Plasmid-borne genes code for an angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3. Appl. Environ. Microbiol. 68(8):3716-3723.
143. Iida, t., Mukouzaka, Y., Nakamura, K., Yamaguchi, I. and Kudo, T. 2002b. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading actinomycetes: analysis of multiple extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* species. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(7):1462-1472.
144. Iida, T., Nakamura, K., Izumi, A., Mukouzaka, Y. and Kudo, T. 2006. Isolation and characterization of a gene cluster for dibenzofuran degradation in a new dibenzofuran-utilizing bacterium, *Paenibacillus* sp. strain YK5. Arch. Microbiol. 184(5):305-315.
145. Inoue, K., Ashikawa, Y., Usami, Y., Noguchi, H., Fujimoto, Z., Yamane, H. and Nojiri, H. 2006a. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase from *Nocardioides aromaticivorans* IC177. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 62(12):1212-1214.
146. Inoue, K., Habe, H., Yamane, H. and Nojiri, H. 2006b. Characterization of novel carbazole catabolism genes from gram-positive carbazole degrader *Nocardioides aromaticivorans* IC177. Appl. Environ. Microbiol. 72(5):3321-3329.

147. Ionata, E., de Blasio, P. and La Cara, F. 2005. Microbial degradation of pentane by immobilized cells of *Arthrobacter* sp. *Biodegradation*. 16(1):1-9.
148. Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefevre, M. and Grimont, A. D. 2005. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:457-462.
149. Iwabuchi, T. and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. *J. Bacteriol.* 179(20):6488-6494.
150. Iwabuchi, T. and Harayama, S. 1998a. Biochemical and genetic characterization of *trans*-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioides* strain. *J. Bacteriol.* 180(4):945-949.
151. Iwabuchi, T. and Harayama, S. 1998b. Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J. Biol. Chem.* 273(14):8332-8336.
152. Iwabuchi, T., Yamauchi-Inomata, Y., Katsuta, A. and Harayama, S. 1998c. Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42 °C. *J. Mar. Biotechnol.* 6:86-90.
153. Iwagami, S. G., Yang, K. and Davies, J. 2000. Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4):1499-1508.
154. Iwasaki, T., Miyauchi, K., Masai, E. and Fukunda, M. 2006. Multiple-subunit genes of the aromatic ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8):5396-5402.
155. Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C. and Stojanoff, V. 2007. The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS Journal.* 274:2470-2481.
156. Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W. and Madsen, E. L. 2006. The naphthalene catabolic (nag) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:10861095.

157. Jerke, K., Nakatsu, C. H., Beasley, F. and Konopka, A. 2008. Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid*. 59:73-85.
158. Jiang, H., Parales, R. E., Lynch, N. A. and Gibson, D. T. 1996. Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* 178:3133-3139.
159. Johnsen, A. R., Wick, L. Y. and Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133(1):71-84.
160. Johnson, M. R., Wang, K., Smith, J. B., Heslin, M. J. and Diasio, R. B. 2000. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 278:175-184.
161. Jones, D. and Keddie, R. M. 2006. The genus *Arthrobacter*. In: *Prokaryotes* 3. pp.945-960.
162. Jouanneau, Y., Martin, F., Krivobok, S. and Willison, J. C. 2011. Ring-hydroxylating dioxygenases involved in PAH degradation: structure, function and biodiversity. In: *Microbial bioremediation of Non-metals* (Editor: Koukkou, A.I). Unit 7, pp.149-175. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
163. Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V. and Gaillard, J. 2006. Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry*. 45:12380-12391.
164. Joynt, J., Bischoff, M., Turco, R., Konopka, A. and Nakatsu, C. H. 2006. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microb. Ecol.* 51(2):209-219.
165. Juhasz, A. L. and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[α]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 45:57-88.
166. Juhasz, A. L. and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[α]pyrene. *Int. J. Biodeter. Biodegrad.* 45:57-88.
167. Juhasz, A. L., Stanley, G. A. and Britz, M. L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:396-401.

168. Juhasz, A. L., Stanley, G. A. and Britz, M. L. 2002. Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and benz[a,h]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28:88-96.
169. Kabisch, M. and Fortnagel, P. 1990. Nucleotide sequence of metapyrocatechase I (catechol 2,3-dioxygenase I) gene *mpcl* from *Alcaligenes eutrophus* JMP222. Nucleic Acids Res. 18:3405-3406.
170. Kallimanis, A., Frillingos, S., Drainas, S. and Koukkou, A. I. 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:709-714.
171. Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C. and Koukkou, A. I. 2009. *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(2):275-279.
172. Kallimanis, A., LaButti, K. M., Lapidus, A., Clum, A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Pagani, I., Liolios, K., Ivanova, N., Goodwin, L., Pitluck, S., Chen, A., Palaniappan, K., Markowitz, V., Bristow, J., Velentzas, A. D., Perisynakis, A., Ouzounis, C. C., Kyrpides, N. C., Koukkou, A.-I. and Drainas, C. 2011. Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). Stand. Genomic Sci. 4:123-130.
173. Kamimura, N. and Masai, E. 2014. The protocatechuate 4,5-cleavage pathway: overview and new findings. In: Biodegradative bacteria: how bacteria degrade, survive, adapt and evolve (Editors: Nojiri, H. et al.). pp. 207-226. Springer. Japan.
174. Kamimura, N., Aoyama, T., Yoshida, R., Tkahashi, K., Kasai, D., Abe, T., Mase, K., Katayama, Y., Fikunda, M. and Masai, E. 2010b. Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene. Appl. Environ. Microbiol. 76(24):8093-8101.
175. Kamimura, N., Takamura, K., Hara, H., Kasai, D., Natsume, R., Senda, T., Katayama, Y., Fukunda, M. and Masai, E. 2010a. Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. J. Bacteriol. 192(13):3394-3405.
176. Kanaly, R. A. and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol. 182(8): 2059-2067.

177. Kanaly, R. A. and Harayama, S. 2010. Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microb. Biotechnol.* 3(2):136-164.
178. Kaneda, T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55(2):288-302.
179. Kang, H., Hwang, S. Y., Kim, Y. M., Kim, E., Kim, Y. S. and Kim, S. K. 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* sp. strain. *Can. J. Microbiol.* 49:139-144.
180. Kar, S., Swaminathan, T. and Badarajan, A. 1996. Studies on biodegradation of a mixture of toxic and nontoxic pollutant using *Arthrobacter* species. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 15(4):195-199.
181. Kar, S., Swaminathan, T. and Badarajan, A. 1997. Biodegradation of phenol and cresol isomer mixtures by *Arthrobacter*. *World J. Microb. Biot.* 13:659-663.
182. Karigar, C., Mahesh, A., Nagenahalli, M. and Yun, D. J. 2006. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation.* 17:47-55.
183. Kasai, D., Fujinami, T., Abe, T., Mase, K., Katayama, Y., Fukuda, M. and Masai, E. 2009. Uncovering protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes. *J. Bacteriol.* 191(21):6758-6768.
184. Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S. and Misawa, N. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6688-6697.
185. Kasuga, K., Habe, H., Chung, J.-S., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2001. Isolation and characterization of the genes encoding a novel oxygenase component of angular dioxygenase from the gram-positive dibenzofuran degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283(1):195-204.
186. Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H. and Ramaswamy, S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure.* 6:571-586.
187. Kelley, I. and Cerniglia, C. E. 1995. Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *J. Soil Contam.* 4(1):77-91.

188. Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. E. 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*. 4:363-371.
189. Khan, A. A., Wang, R.-F., Cao, W.-W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D. and Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8):3577-3585.
190. Khara, P., Roy, M., Chakraborty, J., Ghosal, D. and Dutta, T. K. 2014. Functional characterization of diverse ring-hydroxylating oxygenases and induction of complex aromatic catabolic gene clusters in *Sphingobium* sp. PNB. *FEBS Open Bio*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2014.03.01>. In press.
191. Khomenkov, V., Shelev, A., Zhukov, V., Zagystina, N., Bezbodorov, A. and Popov, V. 2008. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44:117-135.
192. Khuri, S., Baker, F. T. and Dunwell, J. M. 2001. Phylogeny, function and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol. Biol. Evol.* 18(4):593-605.
193. Kim, K. K., Lee, K. C., Oh, H. M., Kim, M. J., Eom, M. K. and Lee, J. S. 2008b. *Arthrobacter defluvii* sp. nov., 4-chlorophenol degrading bacteria isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1916-1921.
194. Kim, S. I., Choi, J.-S. and Kahng, H.-Y. 2007. A proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways. *OMICS*. 11(3):280-294.
195. Kim, S. J., Kweon, O., Freeman, J. P., Jones, R. C., Adjei, M. D., Jhoo, J. W., Edmondson, R. D. and Cerniglia, C. E. 2006. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high- molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2):1045-1054.
196. Kim, S.-J., Jones, R. C., Cha, C.-J., Kweon, O., Edmondson, R. D. and Cerniglia, C. E. 2004. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and *de novo* sequencing methods. *Proteomics*. 4:3899-3908.

197. Kim, S.-J., Kweon, O. and Cerniglia, C. E. 2009. Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:301-309.
198. Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D. and Cerniglia, C. E. 2008a. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation.* 19:859-881.
199. Kim, S.-J., Song, J., Kweon, O., Holland, R. D., Kim, D.-W., Kim, J.-N., Yu, L.-R. and Cerniglia, C. E. 2012. Functional robustness of a polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network examined in a *nidA* aromatic ring hydroxylating oxygenase mutant of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(10):3715-3723.
200. Kim, T. J., Lee, E. Y., Kim, Y. J., Cho, K. S. and Ryu, H. W. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:411-417.
201. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F. U. 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 82:323-355.
202. Kim, Y. H. and Freeman, J. P. 2005. Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:275-285.
203. Kimura, N., Kitagawa, W., Mori, T., Nakashima, N., Tamura, T. and Kamagata, Y. 2006. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:474-484.
204. Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M. and Miki, K. 1999. An archetypal extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure.* 7:25-34.
205. Kitagawa, W., Miyauchi, K., Masai, E. and Fukuda, M. 2001. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.* 183(22):6598-6606.

206. Kiyohara, H. and Nagao, K. 1977. Enzymatic conversion of 1-hydroxy-2-naphthoate in phenanthrene-grown *Aeromonas* sp. S45P1. *Agric. Biol. Chem.* 41:705.
207. Kiyohara, H., Nagao, K., Kouno, K. and Yano, K. 1982. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:458-462.
208. Kiyohara, H., Takizawa, N., Data, H., Torigoe, S. and Yano, K. 1990. Characterization of a phenanthrene degradation plasmid from *Alcaligenes faecalis* AFK2. *J. Ferment. Bioeng.* 69:54-56.
209. Koukkou, A. I. and Vandera, E. 2011. Hydrocarbon degrading soil bacteria. In: *Microbial bioremediation of Non-metals* (Editor: Koukkou, A.I). Unit5, pp.93-117. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
210. Kovárová-Kovar, K. and Egli, T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):646-666.
211. Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C. and Jouanneau, Y. 2003. Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases. *J. Bacteriol.* 185: 3828-3841.
212. Kulakov, L. A., Chen, S., Allen, C. C. R. and Larkin, M. 2005. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):1754-1764.
213. Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D. and Dhewa, T. 2011. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *Int. J. Environ. Sci.* 1(6):1079-1093.
214. Kurbatov, L., Albrecht, D., Herrmann, H., Petruschka, L. 2006. Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy. *Environ. Microbiol.* 8(3):466-478.
215. Kurkela, S., Lehtvaslaiho, H., Palva, E. T. and Teeri, T. H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene.* 73(2):355-362.
216. Kushner, S. R., Sheperd, J., Edwards, G. and Maples, V. F. 1978. *uvrD*, *uvrE* and *recL* represent a single gene. In "DNA repair mechanisms" .Hanawalt, P. C., Friedberg, E. C. and Fox, C. F. (Eds). Academic Press, N.Y. pp.251-254.

217. Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M. D., Baek, D.-H., Kim, Y.-C. and Cerniglia, C. E. 2008. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*. 9:11.
218. Kweon, O., Kim, S.-J., Freeman, J. P., Song, J., Baek, S. and Cerniglia, C. E. 2010. Substrate specificity and structural characteristics of the novel Rieske nonheme iron aromatic ring hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Mol. Biol.* 1(2):e00135.
219. Kweon, O., Kim, S.-J., Jones, R. C., Freeman, J. P., Adjei, M. D., Edmondson, R. D. and Cerniglia, C. E. 2007. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J. Bacteriol.* 189(13):4635-4647.
220. Lacerda, C. M. R. and Reardon, K. F. 2009. Environmental proteomics: applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 8(1):75-87.
221. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
222. Larkin, M. J., Allen, C. C., Kulakov, L. A. and Lipscomp, D. A. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *J. Bacteriol.* 181(19):6200-6204.
223. Laurie, A. D. and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J. Bacteriol.* 181:531-540.
224. Lee, K., Friemann, R., Parales, J. V., Gibson, D. T. and Ramaswamy, S. 2005. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the three components of the toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr. F. Struct. Bio. Cryst. Commun.* 61:669-672.
225. Lee, S. E., Seo, J. S., Keum, Y. S., Lee, K. J. and Li, Q. X. 2007. Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14. *Proteomics.* 7:2059-2069.
226. Lessner, D. J., Johnson, G. R., Parales, R. E., Spain, J. C. and Gibson, D. T. 2002. Molecular characterization and substrate specificity of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2):634-641.

227. Li, Q., Li, Y., Zhu, X. and Cai, B. 2008. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *J. Environ. Sci.* 20:1226-1230.
228. Li, Y., Wu, J., Wang, W., Ding, P. and Feng, L. 2012. Proteomics analysis of aromatic catabolic pathways in thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *J. Prot.* 75:1201-1210.
229. Lin, J.-E. and Wang, H. Y. 1991. Degradation of pentachlorophenol by non-immobilized, immobilized and co-immobilized *Arthrobacter* cells. *J. Ferment. Bioenerg.* 72:311-314.
230. López, Z., Vila, J., Ortega-Calvo, J.-J. and Grifoll, M. 2008. Simultaneous biodegradation of creosote-polycyclic aromatic hydrocarbons by a pyrene-degrading *Mycobacterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:165-172.
231. Loveland-Curtze, J., Sheridan, P. P., Gutshall, K. R. and Brenchley, J. E. 1999. Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the *Arthrobacter* subgroup and description of *Arthrobacter psychrolactophilus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 171:355-363.
232. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
233. MacLean, A. M., Anstey, M. I. and Finan, T. M. 2008. Binding site determinants for the LysR-type transcriptional regulator PcaQ in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 190(4):1237-1246.
234. MacLean, A. M., Hearty, W., Golding, G. B. and Finan, T. M. 2011. The LysR-type PcaQ protein regulates expression of a protocatechuate-inducible ABC transport system in *Shinorhizobium meliloti*. *Microbiol.* 157:2522-2533.
235. MacLean, A. M., MacPherson, G., Aneja, P. and Finan, T. M. 2006. Characterization of the β -keto adipate pathway in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5403-5413.
236. Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326(1):21-33.
237. Mallick, S., Chatterjee, S. and Dutta, T. K. 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-

- cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(29-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. *Microbiol.* 153:2104-2115.
238. Mampel, J., Providenti, M. A. and Cook, A. M. 2005. Protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Comamonas testosteroni* T-2: biochemical and molecular properties of a new subgroup within class III of extradiol dioxygenases. *Arch. Microbiol.* 183:130-139.
239. Mandel, M. and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159-162.
240. Marchler-Bauer, J., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. and Bryant, S. H. 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35:D237-D240.
241. Margesin, R., Bergauer, P. and Gander, S. 2004b. Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles.* 8(3):201-207.
242. Margesin, R., Schumann, P., Spröer, C. and Gounot, A.-M. 2004a. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov. isolated from an alpine ice cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2067-2072.
243. Marks, T. S., Smith, A. R. W. and Quirk, A. V. 1984. Degradation of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1020-1025.
244. Martin, V. J. J. and Mohn, W. W. 1999. A novel aromatic ring hydroxylating dioxygenase from diterpenoid-degrading bacterium *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *J. Bacteriol.* 181:2675-2682.
245. Martins, B. M., Svetlitchnaia, T. and Dobbek, H. 2005. 2-oxoquinoline 8-monoxygenase oxygenase component: active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* 13:817-824.
246. Maruyama, K., Shibayama, T., Ichikawa, A., Sakou, Y., Yamada, S. and Sugisaki, H. 2004. Cloning and characterization of the genes encoding enzymes for the protocatechuate meta-degradation pathway of *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(7):1434-1441.

247. Maruyama, T., Tshikura, M., Taki, H., Shindo, K., Kasai, H., Haga, M., Inomata, Y. and Misawa, N. 2005. Isolation and characterization of o-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12): 7705-7715.
248. Masai, E., Katayama, Y. and Fukuda, M. 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(1):1-15.
249. Masai, E., Yamada, A., Healy, J. M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M. and Yano, K. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6):2079-2085.
250. Mason, J. R. and Cammack, R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:277-305.
251. Mastral, A. M. and Callén, M. 2000. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol.* 34:3051-3057.
252. Matera, I., Ferraroni, M., Bürger, S., Scozzafava, A., Stolz, A. and Briganti, F. 2008. Salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudoaminobacter salicylatoxidans*: crystal structure of a peculiar ring-cleaving dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 380:856-868.
253. McLeod, M. P. et al. 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(42):15582-15587.
254. Microcal software. 1999. ORIGIN version 6. Microcal software, Northampton, MA.
255. Miller, T. R., Delcher, A. I., Salzberg, S. L., Saunders, E., Detter, J. C. and Halder, R.U. 2010. Genome sequence of the dioxin-mineralising bacterium *Sphingomonas wittchii* RW1. *J. Bacteriol.* 192(22):6106-6102.
256. Miyazawa, D., Murkerjee-Dhar, G., Shimura, M., Hatta, T. and Kimbara, K. 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. *Microbiol.* 150:93-1004.
257. Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E. and Sadowsky, M. J. 2006. Secrets Of soil survival

- revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. PLoS Genetics. 2(12):e214.
258. Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R. and Cerniglia, C. E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67:1476-1483.
259. Moody, J., Freeman, J. P., Fu, P. P and Cerniglia, C. E. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 70:340-345.
260. Morales, G., Linares, J. F., Beloso, A., Albar, J. P., Martínez, J. L. and Rojo, F. 2004. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. J. Bacteriol. 186(5):1337-1344.
261. Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M. J., Martínez-Pérez, O. and Santero, E. 2003. Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. J. Bacteriol. 185(6):2026-2030.
262. Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. and Labuzek, S. 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Polish J. Environ. Studies. 12(1):15-25.
263. Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O. and Pritchard, P. H. 1990. Isolation and characterization of a fluorethene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Appl. Environ. Microbo. 56(4):1079-1086.
264. Muñoz, B. and Albores, A. (2011). DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons: mechanisms and markers, , Selected topics in DNA repair, Prof. Clark Chen (Ed), ISBN:978-953-307-606-5.
265. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. and Chothia, C. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. J. Mol. Biol. 247(4):536-540.
266. Na, K. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H. and Kato, J. 2005. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. J. Biosci. Bioeng. 99(4):378-382.

267. Nakatsu, C. H. and Wyndham, R. C. 1993. Cloning and expression of the transposable chlorobenzoate 3,4-dioxygenase genes of *Alcaligenes* sp. strain BR60. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11):3625-3633.
268. Nakatsu, C. H., Barabote, R., Thompson, S., Bruce, D., Detter, C., Brettin, T., Han, C., Beasley, F., Chen, W., Konopka, A. and Xie, G. 2013. Complete genome sequence of *Arthrobacter* sp. strain FB24. *Stand. Genomic Sci.* 9:106-116.
269. Nam, J.-W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H. and Omori, T. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(2):254-263.
270. Navarro-Llorens, J. M., Drzyzga, O. and Perera, J. 2008. Genetic analysis of phenylacetic acid catabolism in *Arthrobacter oxydans* CECT386. *Arch. Microbiol.* 190:89-100.
271. Navarro-Llorens, J. M., Patrauchan, M. A., Steward, G. R., Davies, J. E., Eltis, L. D. and Mohn, W. W. 2005. Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 187(13):4497-4504.
272. Neidle, E. L., Hrtnett, C., Ornston, L. N., Bairoch, A., Rekik, M. and Harayama, S. 1991. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationship among multicomponent oxygenases. *J. Bacteriol.* 173(17):5385-5395.
273. Nelson, K. et al., 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4(12):799-808.
274. Ni Chadhain, S. M., Moritz, E. M., Kim, E. and Zylstra, G. J. 2007. Identification, cloning and characterization of a multicomponent biphenyl dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* strain B1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:605-613.
275. Niewerth, H., Schuldes, Jörg, Parschat, K., Kiefer, P., Vorholt, J. A., Daniel, R. and Fretzner, S. 2012. Complete genome sequence and metabolic potential of the quinaldine-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. Rue61a. *BMC Genomics.* 13:534.
276. Noda, Y., Nishikawa, S., Shiozuka, K., Kadokura, H., Nakajima, H., Yoda, K., Katayama, Y., Morohoshi, N., Haraguchi, T. and Yamasaki, M. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 172(5):2704-2709.

277. Nogales, J., Canales, A., Jimenez-Barbero, J., Garcia, J. L. and Diaz, E. 2005. Molecular characterization of the gallate dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.*280:35382-35390.
278. Nojiri, H., Ashikawa, Y., Noguchi, H., Nam, J.-W., Urata, M., Fujimoto, Z., Uchimura, H., Terada, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2005. Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1,9a-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 351:355-370.
279. Nojiri, H., Habe, H. and Omori, T. 2001. Bacterial degradation of aromatic compounds by angular dioxygenation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47:279-305.
280. Nojiri, H., Kamamura, M., Urata, M., Tanaka, T., Chung, J. S., Takemura, T., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2002. Dioxin catabolic genes are dispersed on the *Terrabacter* sp. DBF63 genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*296:233-240.
281. Nojiri, H., Nam, J.-W., Kosaka, M., Morii, K., Takemura, T., Furihata, K., Yamane, H. and Omori, T. 1999. Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 181:3102-3113.
282. Nomura, Y., Nakagawa, M., Ogawa, N., Harashima, S. and Oshima, Y. 1992. Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *J. Fermet. Bioeng.* 74:333-344.
283. Novotna, J. Honzatko, A., Bednar, P., Kopecky, J., Janata, J. and Spizek, J. 2004. L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 271:3678-3683.
284. Numa, S. and Tanabe, T. 1984. Acetyl-coenzyme A carboxylase and its regulation. *New comprehensive biochemistry*, vol. 7: Fatty acid metabolism and its regulation (Neuberger, A. and Van Deenen, L. L. M., editors). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc. p.1-27.
285. Obayori, O. S. and Salam, L. B. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. *Sci. Res. Essays.* 5(25):4093-4106.
286. Ohlendorf, D. H., Lipscomb, J. D. and Weber, P. C. 1988. Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature.* 366:403-405.
287. Ohlendorf, D. H., Orville, A. M. and Lipscomb, J. D. 1994. Structure of the protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 244:586-608.

288. Okoro, C. C., Amund, O. O. and Eliora, E. R. 2009. Plasmids of phenanthrene and dibenzothiophene degrading bacteria isolated from produced water samples of oil production operations. *Int. J. Chem. Biol. Sci.* 3(2):186-191.
289. Olivera, E. R., Miñambres, B., García, B., Muniz, C., Moreno, M. A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J. L. and Luengo, J. M. 1998. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6419-6424.
290. Ono, K., Nozaki, M. and Hayaishi, O. 1970. Purification and some properties of protocatechuate 4,5-dioxygenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 220:224-238.
291. Osorio, C. R., Barja, J. L., Hutson, R. A. and Collins, M. D. 1999. *Arthrobacter rhombi* sp. nov. isolated from Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1217-1220.
292. Pagnout, C., Franche, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J.-F. and Férand, J.-F. 2007. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Res. Microbiol.* 158(2):175-186.
293. Pagnout, C., Franche, G., Poupin, R., Maunit, B., Muller, J. F. and Ferrard, J. F. 2005. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155. *Res. Microbiol.* 158(2): 175-186.
294. Panda, G., Basak, T., Tanwer, P., Sengupta, S., Martins dos Santos, V. A. P. and Bhatnagar, R. 2014. Delineating the effect of host environmental signals on a fully virulent strain of *Bacillus anthracis* using an integrated transcriptomics and proteomics approach. *J. Prot.* In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prot.2013.12.018>.
295. Pandey, G., Paul, D. and Jain, R. K. 2003. Branching of o-nitrobenzoate degradation pathway in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100: identification of new intermediates. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:231-236.
296. Pao, S. S., Paulsen, I. T. and Saier, M. H. Jr. 1998. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1):1-34.
297. Parales, J. V., Kumar, A., Parales, R. E. and Gibson, D. T. 1996. Cloning and sequencing of the genes encoding 2-nitrotoluene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. JS42. *Gene.* 181(1-2):57-61.

298. Parales, R. E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:271-278.
299. Parales, R. E., Parales, J. V. and Gibson, D. 1999. Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. *J. Bacteriol.* 181(6):1831-1837.
300. Park, S. H., Oh, K. H., Kim, C. K. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatic and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* 43:176-181.
301. Parke, D. 1997. Acquisition, reorganization and merger of genes-novel management of the β -ketoacid pathway in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett.* 146:3-12.
302. Parke, D., D' Argenio, D. and Ornston, N. 2000. Bacteria are not what they eat: that is why they are so diverse. *J. Bacteriol.* 182(2):257-263.
303. Patrauchan, M. A., Florizone, C., Dosanjh, M., Mohn, W. W., Davies, J. and Eltis, L. D. 2005. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *J. Bacteriol.* 187(12):4050-4063.
304. Paul, D., Chauhan, A., Pandey, G. and Jain, R. K. 2004. Degradation of p-hydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkholderia cepacia* RKJ100. *Current Sci.* 87(9):1263-1268.
305. Peng, P., Yang, H., Jia, R. and Li, L. 2013. Biodegradation of dioxin by a newly isolated *Rhodococcus* sp. with the involvement of self-transmissible plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(12):5585-5595.
306. Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S. and Yao, Q.-H. 2010. A profile of ring-hydroxylating oxygenases that degrade aromatic pollutants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 206:65-94.
307. Peng, R.-H., A.-S. Xiong, Y. Xue, X.-Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y.-S. Tian, and Q.-H. Yao. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 927-955.
308. Pérez-Pantoja, D., Donoso, D., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H. and González, B. 2012. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ. Microbiol.* 14(5):1091-1117.
309. Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Junca, H., González, B. and Pieper, D. H. 2010b. Phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. In: *Handbook of*

- hydrocarbon and lipid microbiology. (Editor: Timmis, K. N.). pp.1355-1397. Springer. Berlin, Heidelberg.
310. Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D. H. 2010a. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. pp.799-837. Springer. Berlin, Heidelberg.
 311. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantitation in Real-time RT-PCR. Nucl. Acids. Res. 29(9):2002-2007.
 312. Phale, P. S., Bau, A., Majhi, P. D., Deveryshetty, J., Vamsee-Krishna, V. and Shrivastava, R. 2007. Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. OMICS. 11(3):252-279.
 313. Phillips, D. H. 1983. 50 years of benzo[a]pyrene. Nature. 303:468-472.
 314. Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiol. Lett. 238(2):297-305.
 315. Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinpanichkarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furlhata, K., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. FEMS Microbiol. Lett. 191:115-121.
 316. Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 301:350-357.
 317. Posey, J. E., Shinnick, T. M. and Quinn, F. D. 2006. Characterization of the twin-arginine translocation system of *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. 188(4):1332-1340.
 318. Prabhu, Y. and Phale, P. S. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:342-351.
 319. Principles of qPCR. Edita Press. FINNZYMES Oy, Espoo, Finland. Helsinki 2009.

320. Providenti, M. A., Mampel, J., MacSween, S., Cook, A. M. and Wyndham, R. C. 2001. *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locu for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology*. 147:2157-2167.
321. Qi, S.-W., Chaudhry, M. T., Zhang, Y., Meng, B., Huang, Y., Zhao, K.-X., Poetsch, A., Jiang, C.-Y., Liu, S. and Liu, S.-J. 2007. Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis *via* fructose-1,6-biphosphatase. *Proteomics*, 7:3775-3787.
322. Reddy, G. S. N., Aggarwal, R. K., Matsumoto, G. I. and Shivaii, S. 2000. *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1553-1561.
323. Reese, M. G. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26(1):51-56.
324. Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. and Schnoor, J. L. 2008. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environ. Pollut.* 151:669-677.
325. Resnick, S. M., Lee, K. and Gibson, D. T. 1996. Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17(5):438-457.
326. Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A. and Bacher, A. 2001. 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* 268:3190-3197.
327. Rojo, F. 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:658-684.
328. Roma-Rodrigues, C., Santos, P. M., Benndorf, D., Rapp, E. and Sá-Correia, I. 2010. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *J. Prot.* 73:1461-1478.
329. Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181:1585-1602.

330. Roper, D. I. and Cooper, R. A. 1990. Subcloning and nucleotide sequence of the 3,4-dihydroxyphenylacetate (homoprotocatechuate) 2,3-dioxygenase gene from *Escherichia coli* C. FEBS Lett. 275:53-57.
331. Rosche, B., Tshisuaka, B., Hauer, B., Lingens, F. and Fretzner, S. 1997. 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase: phylogenetic relationship to other multicomponent nonheme iron oxygenases. J. Bacteriol. 179(11):3549-3554.
332. Saito, A., Iwabuchi, T. and Harayama, S. 1999. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. Chemosphere. 38:1331-1337.
333. Saito, A., Iwabuchi, T. and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182(8):2134-2141.
334. Saito, A., Iwabuchi, T. and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182:2134-2141.
335. Samanta, S. K., Chakrabarti, A. K. and Jain, R. K. 1999. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:98-107.
336. Samanta, S. K., Singh, O. V. and Jain, R. K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol. 20:243-248.
337. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
338. Sandu, C., Chiribau, C.-B., Sachelaru, P. and Brandsch, R. 2005. Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. Appl. Environ. Microbiol. 71(12):8920-8924.
339. Sandu, C., Chiribau, C.-B., Sachelaru, P. and Brandsch, R. 2005. Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. Appl. Environ. Microbiol. 71(12):8920-8924.

340. Sasoh, M., Masai, E., Ishibashi, S., Hara, H., Kamimura, N., Miyauchi, K. and Fukunda, M. 2006. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3):1825-1832.
341. Sato, S. I., Nam, J. W., Kauga, K., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 1997. Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 179:4850-4858.
342. Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W. and Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:13-19.
343. Scholtz, R., Messi, F., Leisinger, T. and Cook, A. M. 1988. Three dehalogenases and physiological restraints in the biodegradation of haloalkanes by *Arthrobacter* sp. strain HA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3034-3038.
344. Schuler, L., Jouanneau, Y., Ní Chadhain, S., Meyer, C., Pouli, M., Zylstra, G., Hols, P. and Agathos, S. 2009. Characterization of a ring-hydroxylating dioxygenase from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LH128 able to oxidize benz[a]anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:465-475.
345. Schuler, L., Ni Chadhain, S. M., Jouanneau, Y., Meyer, C., Zylstra, G. J., Hols, P. and Agathos, S. N. 2008. Characterization of a novel angular dioxygenase from fluorene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LB126. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4);1050-1057.
346. Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S. and Ramos, J.-L. 2005. Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J. Bacteriol.* 187(17):5937-5945.
347. Senda, T., Yamada, T., Sakurai, N., Kubota, M., Nishizaki, T., Masai, E., Fukunda, M. and Mitsuidagger, Y. 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 304:397-410.
348. Seo, J. S., Keum, Y. S., Hu, Y., Lee, S. E. and Li, Q. X. 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4- dioxygenation and *meta*- and *ortho*- cleavages of naphthalene 1,2-diol. *Biodegradation.* 18:123-131.
349. Seo, J.-S., Keum, Y.-S. and Li, Q. X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 6:278-309.

350. Seo, J.-S., Keum, Y.-S. and Li, Q. X. 2011. Comparative protein and metabolite profiling revealed a metabolic network in response to multiple environmental contaminants in *Mycobacterium aromaticovorans* JS19b1. *J. Agrc. Food Chem.* 59:2876-2882.
351. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Cho, I. K. and Li, Q. X. 2006a. Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P-1. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 58:36-43.
352. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Hu, Y., Lee, S.-E. and Li, Q. X. 2006b. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: initial 1,2- 3,4-and 9,10-dioxygenation, and *meta*- and *ortho*-cleavages of naphthalene 1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere.* 65:2388-2394.
353. Sharma, N. K., Pandey, J., Gupta, N. and Jain, R. K. 2007. Growth and physiological response of *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 toward higher concentrations of o-nitrobenzoate and p-hydroxybenzoate. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:65-70.
354. Shen, X. and Liu, S. 2005. Key enzymes of the protocatechuate branch of the β -keto adipate pathway for aromatic degradation in *Corynebacterium glutamicum*. *Sci. China C. Life Sci.* 48(3):241-249.
355. Shen, X. Y., Zhou, N. Y. and Liu, S. J. 2012. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential application for this bacterium? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:77-89.
356. Shintani, M., Urata, M., Inoue, K., Eto, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. and Nojiri, H. 2007. The *Sphingomonas* plasmid pCAR3 is involved in complete mineralization of carbazole. *J. Bacteriol.* 189(5):2007-2020.
357. Sho, M., Hamel, C. and Greer, C. W. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:209-220.
358. Shrivastava, R., Purohit, H. and Phale, P. S. 2011. Metabolism and preferential utilization of phenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid in *Pseudomonas putida* CSV86. *J. Bioremed. Biodegrad.* 2:120.

359. Shuttleworth, K. L. and Cerniglia, C. E. 1996. Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Microb. Ecol.* 31:305-317.
360. Singh, O. V. and Nagaraj, N. S. 2006. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 4(4):355-362.
361. Singleton, D. R., Hu, J. and Aitken, M. D. 2012. Heterologous expression of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes from a novel pyrene-degrading betaproteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(10):3552-3559.
362. Solovyev, V. and Salamov, A. 2011. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p. 61-78.
363. Spheperd, J. M. and Lloyd-Jones, G. 1998. Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3: sequence analysis, transcription and molecular ecology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247(1):129-135.
364. Stanislauskiene, R., Rudenkov, M., Karvelis, L., Gasparaviciute, R., Casaite, V. and Meskys, R. 2011. Analysis of phthalate degradation operon from *Arthrobacter* sp. 68b. *Biologija.* 57(3):45-54.
365. Stingley, R. L., Brezna, B., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 2004b. Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Microbiology.* 150:3749-3761.
366. Stingley, R. L., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 2004a. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:133-146.
367. Stover, C. K. et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406:959-964.
368. Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J. and Wackett, L. P. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-atrazine ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12):5973-5980.
369. Stryer, L. 1998. *Biochemistry*, 3rd edition. W. H. Freeman and Company. N. Y., USA.

370. Suen, W. C., Heigler, B. E. and Spain, J. C. 1996. 2,4-dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* 178(16):4926-4934.
371. Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M. and Mitsui, Y. 1999. Crystal structure of aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure.* 7:953-965.
372. Sylvestre, M., Sirois, M., Hurtubise, Y., Bergeron, J. Ahmad, D., Shareck, F., Barriault, D., Guillemette, I. and Juteau, J. M. 1996. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-3656-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenase. *Gene.* 174(2):195-202.
373. Tagaki, T., Habe, H., Yoshida, T., Yamane, H., Omori, T. and Nojiri, H. 2005. Characterization of [3Fe-4S] ferredoxin DbfA3, which functions in the angular dioxygenase system of *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:336-345.
374. Takeda, H., Shimodaira, J., Yukawa, K., Hara, N., Kasai, D., Miyauchi, K., Masai, E. and Fukuda, M. 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* 192(18):4741-4751.
375. Tamura, K., Dudley, J. Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
376. Teufel, R., Mascaraque, V., Ismail, W., Voss, M., Perera, J., Eisenreich, W., Haehnel, W. and Fuchs, G. 2010. Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *PNAS.* 107(32):14390-14395.
377. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
378. Tomás-Gallardo, L., Canosa, I., Santero, E., Camafeita, E., Calvo, E., López, J. A. and Floriano, B. 2006. Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Proteomics.* 6:S119-132.

379. Tomás-Gallardo, L., Santero, E. and Floriano, B. 2012. Involvement of a putative cyclic AMP receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose mediated catabolite repression of *thn* genes in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15):5460-5462.
380. Toussaint, A., Merlin, C., Monchy, S., Benotmane, M. A., Leplae, R., Mergeay, M. and Springael, D. 2003. The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8):4837-4845.
381. Treadway, S. L., Yanagimachi, K. S., Lankenau, E., Lessard, P. A., Stephanopoulos, G. and Sinskey, A. J. 1999. Isoation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6):786-793.
382. Trenz, S. P., Engesser, K. H., Fischer, P. and Knackmuss, H. J. 1994. Degradation of fluorine by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361: a novel C-C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10dihydroxyfluoren-9-one. *J. Bacteriol.* 176:789-795.
383. Tsuda, M. and Iino, T. 1990. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. *Mol. Gen. Genet.* 223(1):33-39
384. Turnbull, G. A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E. and Morgan, J. A. W. 2001. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2270-2275.
385. Ullmann, A., Jacob, F. and Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24:339-
386. Unell, M., Abraham, P. E., Shah, M., Zhang, B., Rückert, C., VerBerkmoes, N. C. and Jansson, J. K. 2009. Impact of phenolic substrate and growth temperature on the *Arthrobacter chlorophenolicus* proteome. *J. Prot. Res.* 8(4):1953-64.
387. Unell, M., Kabelitz, N., Jansson, J. K. and Heipieper, H. J. 2007. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 266:138-143.
388. Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. 2004. Ring-cleavage dioxygenases. In: *Pseudomonas*, Vol. 3, Biosynthesis of macromolecules and molecular

- metabolism. (Editor: Ramos, J.-L.). pp.359-395. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.
389. Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. 2006. The Ins and Outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41:241-267.
 390. van Agteren, M. H., Keuning, S. and Janssen, D. B. 1998. Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds. Kluwer Academic Publishers.
 391. Van Herwijnen, R., P. Wattiau, L. Bastiaens, L. Daal, L. Jonker, D. Springael, H. A. J. Govers and J. R. Parsons. 2003. Elucidation of the metabolic pathway of fluorine and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Res. Microbiol.* 154: 199-206.
 392. Vandera, E., Kavakiotis, K., Kallimanis, A., Kyrpides, N. C., Drainas, C. and Koukkou, A.-I. 2012. Heterologous expression and characterization of two 1-hydroxy-2-naphtoic acid dioxygenases from *Arthrobacter phenanthrenivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(3):621-627.
 393. Vetting, M. W. and Ohlendorf, D. H. 2000. The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure.* 8:429-440.
 394. Vetting, M. W., Wackett, L. P., Que, L. Jr., Lipscomb, J. D. and Ohlendorf, D. H. 2004. Crystallographic comparison of manganese- and iron-dependent homoprotocatechuate 2,3-dioxygenases. *J. Bacteriol.* 186:1945-1958.
 395. Vidali, M. 2001. Bioremediation: an overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7):1163-1172.
 396. Wang, Q. and Xie, S. 2012. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *Int. Biodeter. Biodegr.* 71:61-66.
 397. Wang, Y. Z., Zhou, Y. and Zylstra, G. J. 1995. Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. *Environ. Health Perspect.* 10(suppl. 5):9-10.
 398. Wang, Y., Lau, P. C., and Button, D. K. 1996. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6):2169-2173.
 399. Wass, M. N., Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* 38:W469-473.

400. Wattiau, P., Bastiaens, L., van Herwijnen, R., Daal, L., Parsons, J. R., Renard, M. E., Springael, D. and Cornelis, G. R. 2001. Fluoranthene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Res. Microbiol.* 152(10):861-872.
401. Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M. and Delmee, M. 2000. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov. and *Arthrobacter albus* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38:2412-2415.
402. Werlen, C., Kohler, H. P. and van der Meer, J. R. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionary to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J. Biol. Chem.* 271(8):4009-4016.
403. Westerberg, K., Elväng, A. M., Stackebrandt, E. and Jansson, J. 2000. *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2083-2092.
404. Widehem, P., Aït-Aïssa, D., Tixier, C., Sancelme, M., Veschambre, H. and Truffaut, N. 2002. Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere.* 46(4):527-534.
405. Willecke, K. and Pardee, A. B. 1971. Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain α -keto acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 246(17):5264-5272.
406. Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution.* 81:229-249.
407. Wolgel, S. A., Dege, J. E., Perkins-Olson, P. E., Juarez-Garcia, C. H., Crawford, M. L., Münck, E. and Lipscomb, J. D. 1993. Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catecholic dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175:4414-4426.
408. Yang, Y., Chen, R. and Shiaris, M. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB9816. *J. Bacteriol.* 176:2158-2164.
409. Ye, D., Siddiqi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumar, S. and Sikka, H. C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30:136-142.

410. Yun, S.-H., Park, G. W., Kim, J. Y., Kwon, S. O., Choi, C.-W., Leem, S.-H., Kwon, K.-H., Yoo, J. S., Lee, C., Kim, S. and Kim, S. I. 2011. Proteomic characterization of the *Pseudomonas putida* KT2440 global response to a monocyclic aromatic compound by iTRAQ analysis and 1DE-MudPIT. *J. Prot.* 74:620-628.
411. Zao, B. and Poh, C. L. 2008. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics.* 8:874-881.
412. Zeinali, M., Vossoughiz, M. and Ardestani, S. K. 2007. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:622-62.
413. Zeinali, M., Vossoughiz, M. and Ardestani, S. K. 2008. Degradation of phenanthrene and anthracene by *Nocardia otitidiscavarum* strain TSH1, a moderately thermophilic bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 105:398-406.
414. Zhang, C. and Anderson, A. J. 2012. Multiplicity of genes for aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in *Mycobacterium* isolate KMS and their regulation. *Biodegradation.* 23:585-596.
415. Zhang, C. and Anderson, A. J. 2013a. The gluconeogenic pathway in a soil *Mycobacterium* isolate with bioremediation ability. *Curr. Microbiol.* 2013. 66(2):122-131.
416. Zhang, C. and Anderson, A. J. 2013b. Utilization of pyrene and benzoate in *Mycobacterium* isolate KMS is regulated differentially by catabolic repression. *J. Basic Microbiol.* 53(1):81-92.
417. Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H. and An, L. 2011. Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid pART2. *J. Microbiol. Meth.* 84:114-120.
418. Zhang, Y., Wu, J.-F., Zeyer, J., Meng, B., Liu, L., Jiang, C.-Y., Liu, S.-Q. and Liu, S.-J. 2009. Proteomic and molecular investigation on the physiological adaptation of *Comamonas* sp. strain CNB-1 growing on 4-chloronitrobenzene. *Biodegradation.* 20(1):55-66.
419. Zhou, H. W., Fuenmayor, S. L. and Williams, P. A. 2001. nag genes of *Rastolnia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* 183:700-708.

420. Zylstra, G. J. and Gibson, D. T. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264(25):14940-14946.
421. Zylstra, G. J., Olsen, H., Ballou, D. P. and Rani, M. 1989. Cloning, expression and regulation of *Pseudomonas cepacia* protocatechuate genes. J. Bacteriol. 171:79-89.
422. Καβακιώτης Κωνσταντίνος. Μ. Δ. Ε. 2007. «Απομόνωση και χαρακτηρισμός της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος από ένα νέο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Arthrobacter* sp. το οποίο αποδομεί φαινανθρένιο».
423. Κουρτίδου Έλενα. Μ. Δ. Ε. 2012. «Συμβολή στη διεκρίνηση της πορείας αποδόμησης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στο εδαφοβακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3».