

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

508

ΕΥΓΕΝΙΑΣ ΔΟΥΚΑ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Zymomonas mobilis* ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Δραΐνας Κωνσταντίνος-Επιβλέπων Καθηγητής
Λέκτορας Κούγκου Άννα-Ειρήνη-Μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Λέκτορας Περυσινάκης Άγγελος-Μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Κυριακίδης Δημήτριος-Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Καθηγητής Μαρσέλλος Μάριος-Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Καθηγητής Πανόπουλος Νικόλαος-Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Καθηγητής Τσίγγανος Κωνσταντίνος-Μέλος της εξεταστικής επιτροπής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1999.



ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ
Ευγενίας Δούκα

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή, που διορίστηκε σύμφωνα με το άρθρο 13 του Ν. 2083/92 και την υπ' αριθμ. 392^Α/05-05-99 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης με την ειδική σύνθεση του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας Ευγενίας Δούκα, συνήλθε σήμερα στις 10-06-1999 και ώρα 17:00 στην αίθουσα Χ3-230 του Τμήματος Χημείας και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψηφίας με τίτλο:

«Ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Zygomonas mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης: βιοχημικός και γενετικός χαρακτηρισμός»

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλλαν ερωτήσεις προς την υποψηφία τόσο γενικού περιεχομένου όσο και σχετικές με το θέμα της διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και της υποψηφίας 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 κας Ευγενίας Δούκα παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, η δε υποψηφία απέκτησε τόσο τις γνώσεις όσο και την τεχνική κατάρτιση ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού της πεδίου.

Μετά από αυτά αποφάσισε ομόφωνα να απονεμίσει τον βαθμό άριστα

Ιωάννινα 10-06-1999

Η Επταμελής Επιτροπή

1. Δραΐνας Κωνσταντίνος, Καθηγητής
2. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Λέκτορας
3. Κυριακίδης Δημήτριος, Καθηγητής
4. Μαρσέλλος Μάριος, Καθηγητής
5. Πανόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής
6. Περυσινάκης Άγγελος, Λέκτορας
7. Τσίγγανος Κωνσταντίνος, Καθηγητής



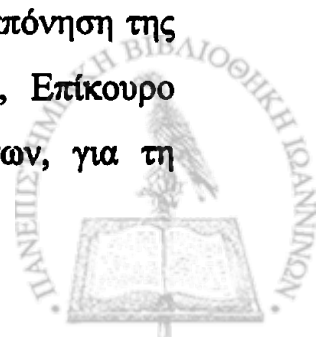
Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημικής-Μοριακής Γενετικής) του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια των ερευνητικών προγραμμάτων: BIOTECH 1993, ΠΕΝΕΔ 1996 και PLATON 1997.

Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνος Δραΐνας, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθώς και για τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές του κατά την εκπόνηση και τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ενεργή, συνεχή και ανεκτίμητη συμμετοχή της, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της διατριβής καθώς και για το έντονο ενδιαφέρον της το οποίο αναβάθμισε και διευκόλυνε την παρούσα εργασία. Επίσης, ευχαριστώ το μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής κ. Άγγελο Περυσινάκη, Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του σε όλες τις φάσεις διεξαγωγής αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Διδάκτορα κ. Γιώργο Βαρθολομάτο για την ενεργή και ουσιαστική συμμετοχή του σε αυτή την εργασία καθώς και για την συνεχή ενθάρρυνση που μου παρείχε. Επίσης, ευχαριστώ τον Διδάκτορα κ. Στάθη Φριλλίγγο για την συμβολή του στην ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων που έγινε στην παρούσα εργασία καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την ολοκλήρωση της.

Τις ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω στη Διδάκτορα κ. Αμαλία Αφένδρα για την σημαντική βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, καθώς και στο κ. Μανώλη Παπαμιχαήλ, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη



βοήθεια του στην κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης και της πρόσληψης γλυκόζης που έγινε στην εργασία αυτή.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Michel Rohmer και τους συνεργάτες του για την φιλοξενία και τη βοήθεια τους κατά την διαμονή μου στο Στρασβούργο όπου εκτελέστηκε μέρος της εργασίας αυτής (Laboratoire de Chimie et Biochimie des Microorganismes, Universite Louis Pasteur, Institut Le Bel).

Τέλος, θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες προς του συναδέλφους του εργαστηρίου κ.κ. Νίκο Αρβανίτη, Γιώργο Τέγο, Νατάσα Χριστογιάννη, Αριστεΐδη Καλλιμάνη, Αθανασία Βαρσάκη και Χριστίνα Γιανούλη για την πολύπλευρη συμπαράσταση τους.

Ιωάννινα 1999



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στους γονείς μου

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	XI
ΣΧΗΜΑΤΑ.....	XIII
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	XIX

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΩΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΙ ΩΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	2
---	---

1.1 Η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης στους μικροοργανισμούς.....	3
--	---

1.2 Η ρύθμιση της πρόσληψης και του καταβολισμού της γλυκόζης στους μικροοργανισμούς.....	19
---	----

1.3 Το σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη.....	30
---	----

1.4 Η ανθεκτικότητα μικροοργανισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	37
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Zymomonas mobilis</i>	44
--	----

2.1 Ιστορική αναδρομή.....	44
----------------------------	----

2.2 Μορφολογία και άλλες ιδιότητες του <i>Z. mobilis</i>	45
--	----

2.3 Ζύμωση υδατανθράκων στο <i>Z. mobilis</i>	46
---	----

2.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του <i>Z. mobilis</i>	54
---	----

2.5 Το γονιδίωμα του <i>Z. mobilis</i>	57
--	----

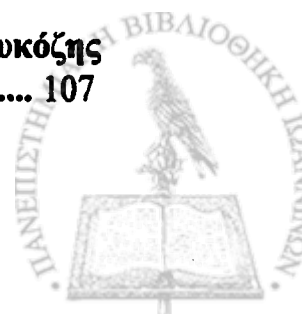


2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του <i>Z. mobilis</i>	60
2.7 Μεταλλαξιγένεση στο <i>Z. mobilis</i>	61
2.8 Έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο <i>Z. mobilis</i>	62
2.9 Η επίδραση της αιθανόλης στο <i>Z. mobilis</i>	67
2.10 Η ανθεκτικότητα του <i>Z. mobilis</i> σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	68
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	71
 ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	74
3.1 Χημικά και όργανα.....	74
3.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	75
3.3 Θρεπτικά υλικά.....	78
3.3.1 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το <i>E. coli</i>	78
3.3.2 Ελάχιστο θρεπτικό υλικό για το <i>E. coli</i>	78
3.3.3 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το <i>Z. mobilis</i>	79
3.3.4 Στερεά θρεπτικά υλικά.....	79
3.4 Ανάπτυξη καλλιεργειών.....	79
3.5 Διατήρηση στελεχών.....	80
3.6 Μέθοδος αντιγραφικής μεταφοράς αποικιών	80
3.7 Αντιβιοτικά.....	80
3.8 Εκχύλιση ολικών λιπιδίων.....	83



3.8.1 Μέθοδος Rohmer.....	83
3.8.2 Μέθοδος Bligh and Dyer.....	83
3.9 Διαχωρισμός λιπιδίων.....	84
3.10 Εμφάνιση χρωματογραφήματος.....	85
3.10.1 Ατμοί ιωδίου.....	85
3.10.2 Αντιδραστήριο μπερμπερίνης.....	85
3.10.3 Αντιδραστήριο νινυδρίνης.....	85
3.11 Εκχύλιση των λιπιδίων από την TLC.....	85
3.11.1 Μέθοδος δύο φάσεων.....	85
3.11.2 Μέθοδος Rohmer.....	86
3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων.....	86
3.12.1 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου.....	86
3.12.2 Διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων.....	88
3.12.3 Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC.....	88
3.13 Ποσοτικός προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων.....	88
3.13.1 Απομόνωση ουδετέρων λιπιδίων.....	88
3.13.2 Διαχωρισμός και προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων... ..	89
3.14 Ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων.....	90
3.14.1 Παρασκευή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.....	90
3.14.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων με αέρια χρωματογραφία.....	91
3.15 Ποσοτικός προσδιορισμός των οπανοειδών.....	92

3.15.1 Οξείδωση, αναγωγή και ακετυλίωση των οπανοειδών.....	92
A. Οξείδωση και αναγωγή των ολικών λιπιδίων.....	93
B. Διαχωρισμός και ακετυλίωση των οπανοειδών.....	94
3.15.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των ακετυλιωμένων οπανοειδών με αέρια χρωματογραφία.....	94
3.16 Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	96
3.17 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων.....	97
3.18 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κύτταρα του <i>Z.mobilis</i>	98
3.18.1 Κατεργασία των κυττάρων πριν από τον ενζυμικό προσδιορισμό.....	98
3.18.2 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας της γλυκοκινάσης.....	99
3.18.3 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης.....	100
3.18.4 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης.....	102
3.18.5 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας της αλκοολικής αφυδρογονάσης.....	103
3.18.6 Υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηρότητας....	104
3.19 Κινητική μελέτη του ενζύμου γλυκοκινάση στο βακτήριο <i>Z. mobilis</i>	105
3.19.1 Υπολογισμός της K_m και V_{max}	105
3.19.2 Υπολογισμός της κινητικής παραμέτρου k_{cat} στην αντίδραση της γλυκοκινάσης.....	106
3.20 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης από τα κύτταρα <i>Z. mobilis</i> και <i>E. coli</i>	107



3.21 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο βακτήριο <i>Z. mobilis</i>	110
3.22 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	110
3.23 Επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη μεταξύ <i>E. coli</i> (δότης) και <i>Z. mobilis</i> (δέκτης).....	112
3.24 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσεως κυττάρων.....	114
3.24.1 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μεγάλη κλίμακα.....	115
Α. Καθαρισμός με βαθμίδωση πυκνότητας CsCl.....	115
Β. Απομόνωση του DNA με τη μέθοδο Jetstar.....	119
3.24.2 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα.....	121
3.24.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Z. mobilis</i>	123
3.25 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το <i>Z. mobilis</i>	126
3.26 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	128
3.26.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA.....	129
3.26.2 Πέψεις του χρωμοσωμικού DNA.....	130
3.27 Ηλεκτροφόρηση του DNA.....	131
3.28 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης.....	134
3.28.1 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με τη μέθοδο GEANCLEAN Π BIO 101.....	134
3.28.2 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με τη μέθοδο NUCLEON GX (Amersham).....	136
3.29 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA.....	137



3.30 Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε ναύλον φίλτρο.....	139
3.30.1 Αποτύπωση του DNA κατά Southern.....	139
3.30.2 Αποτύπωση του DNA με τη μέθοδο Trans-Blot® SD DNA/RNA Blotting kit.....	142
3.31 Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε ναύλον φίλτρο για υβριδισμό in situ.....	143
3.32 Υβριδισμός DNA-DNA.....	145
3.32.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός.....	147
3.32.2 Μη ραδιενεργός υβριδισμός in situ.....	148
3.32.3 Εμφάνιση των φίλτρων μετά τον μη ραδιενεργό υβριδισμό ή τον υβριδισμό in situ.....	149
A. Εμφάνιση με χρώση.....	149
B. Εμφάνιση με αυτοραδιογραφία.....	151
3.33 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια.....	153
3.34 Ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA.....	159
3.35 Κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης χρωμοσωμικού DNA των στελεχών <i>Z. mobilis</i>.....	161

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>Zyotomonas mobilis</i>, ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΥ ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	165
--	------------

4.1 Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.....	165
--	------------

4.2 Ανθεκτικότητα του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	168
--	------------



4.3 Η επίδραση της σορβιτόλης στην ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2.....	171
4.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2.....	174
4.4.1. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων.....	174
4.4.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων.....	175
4.4.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων.....	180
4.4.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2.....	182
4.5 Μελέτη της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2.....	186
4.5.1 Μέτρηση της δραστηρότητας της γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	186
4.5.2 Κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	189
4.6 Μελέτη της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης του στελέχους CU1Rif2.....	193
4.7 Μελέτη της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης του στελέχους CU1Rif2.....	195
4.8 Μελέτη της αλκοολικής αφυδρογονάσης του στελέχους CU1Rif2.....	197
4.9 Μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2.....	199
4.9.1 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	199
4.9.2 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	202

4.10 Μεταφορά του γονιδίου <i>glf</i> στο μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2.....	204
4.11 Ανάπτυξη κυττάρων CUIRif2 διαφόρων φάσεων σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.....	206
4.12 Μελέτη της ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988	209
4.13 Μέτρηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 μετά από ανάπτυξη ή επώαση σε θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988.....	212
4.14 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 μετά από επώαση σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988.....	214

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΑΝΑΠΛΗΡΩΝΕΙ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ CUIRif2 ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	216
---	------------

5.1 Κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA από το γονιδίωμα του <i>Z. mobilis</i> CP ₄ το οποίο αναπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2.....	216
---	-----

5.2 Περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων pLAFR554 και pLAFR557.....	219
--	-----

5.3 Υποκλωνοποίηση ενός μικρότερου λειτουργικού τμήματος μεγέθους 9.5 kb από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR557.....	222
--	-----

5.4 Φυσική χαρτογράφηση του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.	226
--	-----

5.5 Υποκλωνοποίηση μικρότερων περιοριστικών τμημάτων του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.....	230
---	-----



5.6 Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη.....	237
5.7 Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	239
5.8 Μελέτη της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545.....	240
5.8.1 Μέτρηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	240
5.8.2 Κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	242
5.9 Μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	244
5.9.1 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2 /pLAFR545.....	244
5.9.2 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFRR545.....	246
5.10 Απομόνωση του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης από το γονιδίωμα του στελέχους ATCC 10988.....	247
5.11 Ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του κλώνου των 4.5 kb που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	250
5.12 Κλωνοποίηση του συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs και έλεγχος της λειτουργικότητάς τους στο στέλεχος CU1Rif2.....	255
5.13 Έλεγχος αναπλήρωσης κυττάρων <i>E. coli</i> μεταλλαγμένων ως προς το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης.....	259

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	264
6.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2.....	266
6.2 Απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός κλώνου DNA ο οποίος αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	274
6.3 Μερικός χαρακτηρισμός του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	277
6.4 Συμπεράσματα.....	282
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	284
SUMMARY.....	286

ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	288
-------------------	-----



ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Φυσικά πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 του βακτηρίου <i>Z. mobilis</i>	59
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Φορείς κλωνοποίησης, κατάλληλοι για έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο <i>Z. mobilis</i>	64
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Βακτηριακά στελέχη.....	76
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Πλασμίδια.....	77
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών.....	81
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Τρόπος δράσης αντιβιοτικών-μηχανισμός ανθεκτικότητας.....	82
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των φωσφολιπιδίων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2.....	175
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των ουδετέρων λιπιδίων στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	177
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2.....	181
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2.....	181
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Ποσοστιαία περιεκτικότητα (% των ολικών λιπιδίων) των ακετυλιωμένων οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2.....	182
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Δραστικότητα γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2.....	186
ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Κινητικές παράμετροι της γλυκοκινάσης.....	193
ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Δραστικότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης.....	194



ΠΙΝΑΚΑΣ 15:	Δραστικότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης.....	196
ΠΙΝΑΚΑΣ 16:	Δραστικότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης.....	198
ΠΙΝΑΚΑΣ 17:	Κινητικές παράμετροι της πρόσληψης γλυκόζης.....	204
ΠΙΝΑΚΑΣ 18:	Προσδιορισμός γλυκόζης πριν και μετά την επώαση του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη.....	212
ΠΙΝΑΚΑΣ 19:	Δραστικότητα της γλυκοκινάσης κυττάρων CU1Rif2 που έχουν αναπτυχθεί σε προεπωασμένο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης	213
ΠΙΝΑΚΑΣ 20:	Υπολογισμός μεγέθους ενθέματος στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pLAFR557 και pLAFR554.....	221
ΠΙΝΑΚΑΣ 21:	Υπολογισμός μεγέθους ενθέματος στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR595.....	225
ΠΙΝΑΚΑΣ 22:	Περιοριστική ανάλυση του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.....	229
ΠΙΝΑΚΑΣ 23:	Ποσοστιαία περιεκτικότητα φωσφολιπιδίων (% των ολικών) του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545.....	239
ΠΙΝΑΚΑΣ 24:	Δραστικότητα γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	240
ΠΙΝΑΚΑΣ 25:	Κινητικές παράμετροι της γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.....	244
ΠΙΝΑΚΑΣ 26:	Κινητικές παράμετροι της πρόσληψης γλυκόζης σε κύτταρα CU1Rif2/pLAFR545.....	247



ΣΧΗΜΑΤΑ

ΣΧΗΜΑ 1: Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω του συστήματος PTS, στο βακτήριο *B. subtilis*..... 13

ΣΧΗΜΑ 2: Εναλλακτικές περιφερικές πορείες του καταβολισμού της γλυκόζης στο βακτήριο *P. aeruginosa*..... 18

ΣΧΗΜΑ 3: Η ρύθμιση των μεταφορέων της γλυκόζης HXT1 και HXT2 σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης από τα ρυθμιστικά γονίδια *snf3* και *rgt2* στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae*..... 21

ΣΧΗΜΑ 4: Η παραγωγή της γλυκερόλης από τη γλυκόζη στο *S. cerevisiae*..... 39

ΣΧΗΜΑ 5: Η σηματοδοτική πορεία της οσμωρύθμισης στο *S. cerevisiae*..... 41

ΣΧΗΜΑ 6: Ο μεταβολισμός της σακχαρόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*..... 48

ΣΧΗΜΑ 7: Τα οπανοειδή του *Z. mobilis*..... 56

ΣΧΗΜΑ 8: Οξειδωση, αναγωγή και ακετυλίωση της βακτηριοοπανοτετρόλης..... 92

ΣΧΗΜΑ 9: Κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης χρωμοσωμικού DNA του *Z. mobilis* στο πλασμίδιο pLAFR5..... 163

ΣΧΗΜΑ 10: Καμπόλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) που περιέχει 2%, 5% και 10% γλυκόζη..... 167

ΣΧΗΜΑ 11: Καμπόλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη ή 6.6% ξυλόζη, 10% φρουκτόζη και 2% γλυκόζη και 8% 2-δεόξυ γλυκόζη..... 170

ΣΧΗΜΑ 12: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη..... 172



- ΣΧΗΜΑ 13:** Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 25% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη..... 173
- ΣΧΗΜΑ 14:** Τα φωσφολιπίδια των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2, όπως διαχωρίζονται σε πλάκα πυριτικού οξέος με σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-NH}_3$ (65: 35: 5: 2).. 178
- ΣΧΗΜΑ 15:** Τα ουδέτερα λιπίδια των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2, όπως διαχωρίζονται σε πλάκα πυριτικού οξέος σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:αιθέρας (70:30)..... 179
- ΣΧΗΜΑ 16:** Αέρια χρωματογραφήματα των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2..... 184
- ΣΧΗΜΑ 17:** Αέρια χρωματογραφήματα των ακετυλιωμένων οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2..... 185
- ΣΧΗΜΑ 18:** Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2%, 5% και 10% γλυκόζη..... 188
- ΣΧΗΜΑ 19:** Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2%, 5% και 10% γλυκόζη..... 189
- ΣΧΗΜΑ 20:** Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους ATCC 10988 μετά από ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 190
- ΣΧΗΜΑ 21:** Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2, μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 191
- ΣΧΗΜΑ 22:** Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 6-P-γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 195



ΣΧΗΜΑ 23: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αλκοολικής αφυδρογονάσης και ως υπόστρωμα πυροσταφυλικό οξύ), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 197

ΣΧΗΜΑ 24: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακεταλδεΰδη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 199

ΣΧΗΜΑ 25: Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 200

ΣΧΗΜΑ 26: Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 201

ΣΧΗΜΑ 27: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 202

ΣΧΗΜΑ 28: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 203

ΣΧΗΜΑ 29: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pUC18-*glf* και pLAFR5-*glf*..... 205

ΣΧΗΜΑ 30: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pLAFR5-*glf*..... 205

ΣΧΗΜΑ 31: Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης κυττάρων του στελέχους CU1Rif2, τα οποία έχουν προεπωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη..... 207

ΣΧΗΜΑ 32: Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 τα οποία έχουν προεπωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% 2-δεόξυγλυκόζη..... 208



- ΣΧΗΜΑ 33:** Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988..... 210
- ΣΧΗΜΑ 34:** Ανάπτυξη κυττάρων CU1Rif2 σε αραιωμένο θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988..... 211
- ΣΧΗΜΑ 35:** Πρόσληψη γλυκόζης από κύτταρα CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988..... 215
- ΣΧΗΜΑ 36:** Ανάπτυξη των στελεχών του βακτηρίου *Z. mobilis* σε Zymo Agar που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 218
- ΣΧΗΜΑ 37:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pLAFR557 και pLAFR554..... 220
- ΣΧΗΜΑ 38:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR557 με *Bgl*II..... 223
- ΣΧΗΜΑ 39:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης με *Hind*III και υβριδισμός κατά Southern με dig-11-dUTP-υποκλώνο μεγέθους 9.5 kb..... 224
- ΣΧΗΜΑ 40:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιέχουν τα περιοριστικά τμήματα *Hind*III μετά από περιοριστική πέψη με *Hind*III... 226
- ΣΧΗΜΑ 41:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR595..... 227
- ΣΧΗΜΑ 42:** Υβριδισμός κατά Southern περιοριστικής πέψης του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο τον dig-11-dUTP σημασμένο υποκλώνο... 228
- ΣΧΗΜΑ 43:** Περιοριστικός χάρτης του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb..... 229



- ΣΧΗΜΑ 44:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC1851, pLAFR551 και pLAFR589..... 231
- ΣΧΗΜΑ 45:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pUC1831, pUC1820, pLAFR531 και pLAFR520..... 232
- ΣΧΗΜΑ 46:** Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC1845 και pLAFR545..... 233
- ΣΧΗΜΑ 47:** Διαδικασία υποκλωνοποιήσεων μικρότερων περιοριστικών τμημάτων του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.... 235
- ΣΧΗΜΑ 48:** Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 237
- ΣΧΗΜΑ 49:** Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 2% γλυκόζη + 8% 2-δεόξυγλυκόζη..... 238
- ΣΧΗΜΑ 50:** Αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), σε κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2%, 5% και 10% γλυκόζη..... 242
- ΣΧΗΜΑ 51:** Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 243
- ΣΧΗΜΑ 52:** Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο, κυττάρων του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 10% γλυκόζη..... 245
- ΣΧΗΜΑ 53:** Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης (nmol γλυκόζης/sec X mg πρωτεΐνης) κυττάρων CU1Rif2/pLAFR545 μετά από ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη..... 246



ΣΧΗΜΑ 54: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC18145 και pLAFR5145..... 248

ΣΧΗΜΑ 55: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και υβριδισμός κατά Southern με τον κλώνο των 4.5 kb σημασμένο με dig-11-dUTP, περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pUC18145..... 249

ΣΧΗΜΑ 56: Στρατηγική ανάλυσης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και γενετικός χάρτης του κλώνου των 4.5 kb που αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης..... 250

ΣΧΗΜΑ 57: Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κλώνου των 4.5 kb του pUC1845 και η προβλεπόμενη αλληλουχία των αμινοξέων..... 254

ΣΧΗΜΑ 58: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης της περιοριστικής πέψης BamHI-μερική HindIII του πλασμιδίου pUC1845..... 256

ΣΧΗΜΑ 59: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pLAFR533..... 256

ΣΧΗΜΑ 60: Οι υποκλωνοποιήσεις του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης..... 257

ΣΧΗΜΑ 61: Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR533..... 259

ΣΧΗΜΑ 62: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pZY50733..... 260

ΣΧΗΜΑ 63: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pZY50733..... 261

ΣΧΗΜΑ 64: Πρόσληψη της δεόξυ-D-[U-¹⁴C]-γλυκόζης από το στέλεχος *E. coli* ZSCL11Δpts..... 261

ΣΧΗΜΑ 65: Προτεινόμενο μοντέλο του μηχανισμού ανθεκτικότητας κυττάρων *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης..... 281



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ap: Αμπικιλίνη

ATCC: American Type Collection

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

bp: Ζεύγη βάσεων

BSA: Αλβουμίνη ορού βοός

cAMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

Cm: Χλωραμφαινικόλη

Da: Daltons

d.s. H₂O: Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

DMSO: Διμεθυλοσουλφοξείδιο

DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EtBr: Βρωμιούχο αιθίδιο

et al. : Και συνεργάτες

IPTG: Isopropylthio-β-D-galactoside

kb: Χιλιάδα βάσεων (κiloβάσεις)

K_{cat}: Καταλυτική σταθερά

κεφ. : Κεφάλαιο

Km: Καναμυκίνη

K_m: Σταθερά Michaelis-Menten

lyso-PE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη



MNNG: N-μέθυλο-N-νίτρο-N-νιτροζογουανιδίνη

MOPS : Μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ

NAD: Νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο

NADH: Νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

NBT: Nitroblue tetrazolium chloride

O.D. : Οπτική πυκνότητα

ORF: Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

Παρ. : Παράγραφος

PC: Φωσφατιδυλοχοληστερόλη

PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

PG: Φωσφατιδυλογλυκερόλη

Rif: Ριφαμπικίνη

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

rpm: Στροφές ανά λεπτό

SDS: Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο

Tc: Τετρακυκλίνη

TLC: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Tris: Τρις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο

Vmax: Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

X-Phosphate: 5-Bromo-4-chloro-3-indol-phosphate



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Εισαγωγή



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ο ρόλος της γλυκόζης ως θρεπτικό συστατικό και ως σηματοδοτικό μόριο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Η γλυκόζη είναι συνήθως η προτιμώμενη πηγή άνθρακα των μικροοργανισμών αλλά και των κυττάρων των ανώτερων οργανισμών. Σε πολλούς μικροοργανισμούς έχει αναφερθεί ότι η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης είναι τα πιο πιθανά σημεία ρύθμισης του μεταβολισμού της, γι' αυτό η μελέτη τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Εκτός από τη χρησιμότητά της ως ένα πλούσιο θρεπτικό συστατικό, η γλυκόζη προκαλεί και ένα πλήθος σηματοδοτικών μηχανισμών όταν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών.



1.1 Η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης στους μικροοργανισμούς

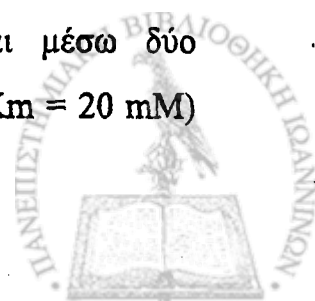
Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τον τρόπο της πρόσληψης της γλυκόζης από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Η πρόσληψη αυτή μπορεί να γίνει μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης (μεταφοράς), μέσω του συστήματος PTS, είτε μέσω ενεργού μεταφοράς.

Μεταφορά μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης

Η διευκολυνόμενη διάχυση λαμβάνει χώρα χωρίς να απαιτείται η κατανάλωση ATP, μέσω ειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών που ονομάζονται MFS μεταφορείς (major facilitator superfamily, υπεροικογένεια κύριων διευκολυντών) (Pao et al. 1998). Οι μεταφορείς αυτοί μπορούν να μεταφέρουν μόνο μικρά μόρια και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1) στους απλούς μεταφορείς, οι οποίοι μεταφέρουν ουσίες χρησιμοποιώντας μόνο τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών, 2) στους συμμεταφορείς, οι οποίοι μεταφέρουν ουσίες ενώ συγχρόνως μεταφέρουν και ιόντα (κυρίως H^+) και 3) στους αντιμεταφορείς, οι οποίοι μεταφέρουν ουσίες ενώ συγχρόνως μεταφέρουν ιόντα, αλλά αντίθετα από την φορά μεταφοράς των ουσιών αυτών (Pao et al. 1998).

Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης, έχει αναφερθεί σε πολλούς μικροοργανισμούς. Ένας από αυτούς είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, ένας οργανισμός που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στις βιομηχανικές αλκοολικές ζυμώσεις, και κυρίως στην οινοποίηση και στην παραγωγή άρτου (Rose and Harrison 1987).

Η γλυκόζη είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα για τον *S. cerevisiae*, ο οποίος την προσλαμβάνει με ταχύτατους ρυθμούς. Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης στον *S. cerevisiae* γίνεται μέσω δύο συστημάτων: το ένα έχει χαμηλή συγγένεια με το υπόστρωμα ($K_m = 20 \text{ mM}$)



και το άλλο υψηλή ($K_m = 2 \text{ mM}$) (Bisson and Fraenkel 1982, Bisson and Fraenkel 1983, Bisson and Fraenkel 1984, Bisson 1988, Reinhardt et al. 1997). Τα συστήματα πρόσληψης της γλυκόζης χαμηλής και υψηλής συγγένειας είναι ανεξάρτητα συστήματα με επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Bisson and Fraenkel 1987). Έχει αναφερθεί ότι μέσω του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης, προσλαμβάνονται από τον *S. cerevisiae* η φρουκτόζη και η μαννόζη (Bisson 1988).

Στη διαδικασία της πρόσληψης της γλυκόζης από τον *S. cerevisiae* είναι γνωστό μέχρι σήμερα ότι συμμετέχουν 20 διαφορετικά γονίδια από τα οποία τα περισσότερα έχουν χαρακτηριστεί γενετικά (Kruckeberg 1996).

Τα γονίδια που κωδικεύουν μεταφορείς της γλυκόζης στον *S. cerevisiae* λέγονται γονίδια *HXT* (hexose transporters, μεταφορείς εξοζών). Επιπρόσθετα, έχουν απομονωθεί και τρία γονίδια (το *snf3*, το *rgt1* και το *rgt2*) τα οποία παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης.

Από τα γονίδια *HXT* έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί διεξοδικά τα γονίδια *HXT1*, *HXT2*, *HXT3* και *HXT4*, ενώ έχει αναφερθεί και η μελέτη των γονιδίων *HXT5*, *HXT6*, *HXT7*, *HXT9* και *HXT11*. Ακόμα, πολύ διεξοδικά έχει μελετηθεί το γονίδιο *snf3* και τα γονίδια *rgt1* και *rgt2*.

Το γονίδιο *snf3* απομονώθηκε από τους Bisson and Fraenkel (1987) με αναπλήρωση μεταλλαγμένων στελεχών τα οποία εμφανίζουν αδυναμία ανάπτυξης σε σακχαρόζη (*snf⁻* στελέχη). Τα στελέχη αυτά δεν περιέχουν το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης και δεν αναπτύσσονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης ή φρουκτόζης. Το γονίδιο *snf3* που αναπληρώνει το χαρακτήρα αυτών των μεταλλαγμένων στελεχών αναπληρώνει επίσης και το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης (σύστημα το οποίο λειτουργεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης) αποδεικνύοντας έτσι ότι το γονίδιο *snf3* είναι απαραίτητο για το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης. Επίσης, μετά από ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του γονιδίου *snf3* βρέθηκε ότι αυτό έχει ομολογία με γονίδια που κωδικεύουν άλλους μεταφορείς της γλυκόζης (Celenza et al. 1988).



Το γονίδιο *HXT1* απομονώθηκε από τους Lewis and Bisson (1991) με αναπλήρωση των στελεχών *snf⁻*, και βρέθηκε ότι είναι απαραίτητο για το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης.

Το γονίδιο *HXT2* απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων από τον Kruckeberg (1990). Βρέθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με γονίδια που κωδικεύουν άλλους μεταφορείς γλυκόζης και ότι είναι απαραίτητο για το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης.

Το γονίδιο *HXT3* απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων από τον Ko και του συνεργάτες του (1993). Επίσης, βρέθηκε ότι το *HXT3* παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με τα γονίδια *HXT1*, *HXT2* και *snf3*.

Ο Marshall-Carlson και οι συνεργάτες του το 1991 χρησιμοποιώντας στελέχη *snf⁻* απομόνωσαν δύο γονίδια, τα οποία ονόμασαν *rgt1* και *rgt2* (restores glucose transport). Βρέθηκε ότι τα γονίδια αυτά αναπλήρωναν το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης και θεωρήθηκε ότι κωδικεύουν ή ρυθμίζουν μεταφορείς της γλυκόζης.

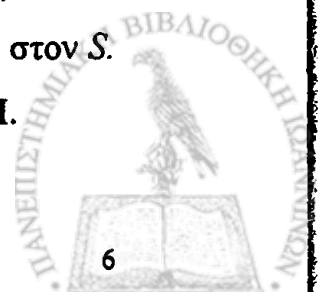
Τέλος, ο Reifenberg και οι συνεργάτες του το 1995 απομόνωσαν τα γονίδια *HXT5*, *HXT6* και *HXT7*, και απέδειξαν ότι οι μεταφορείς που κωδικεύονται από τα γονίδια *HXT6* και *HXT7* χρειάζονται για την ανάπτυξη του *S. cerevisiae* σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Έχει αναφερθεί, ότι το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης υψηλής συγγένειας στον *S. cerevisiae* εξαρτάται από την δράση των εξοκινασών. Ο *S. cerevisiae* περιέχει τρεις διαφορετικές κινάσες: την εξοκινάση PI η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *HXK1*, την εξοκινάση PII η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *HXK2* και τη γλυκοκινάση η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *GLK1* (Randez-Gil et al. 1998). Οι δύο εξοκινάσες μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τη φρουκτόζη ως υπόστρωμα (Bisson and Fraenkel 1982). Τα γονίδια *HXK1* και *HXK2* έχουν απομονωθεί και δείχνουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους (Entian et al. 1984).



Μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* τα οποία δεν περιέχουν τις δύο εξοκινάσες αλλά περιέχουν τη γλυκοκινάση, δεν μπορούν να φωσφορυλιώσουν φρουκτόζη. Εντούτοις, είναι σε θέση να προσλαμβάνουν φρουκτόζη με χαμηλή συγγένεια ενώ φωσφορυλιώνουν και προσλαμβάνουν γλυκόζη με χαμηλή και με υψηλή συγγένεια (Bisson and Fraenkel 1982). Μεταλλαγμένα όμως στελέχη που δεν περιέχουν και τις τρεις κινάσες, προσλαμβάνουν γλυκόζη και φρουκτόζη μόνο με χαμηλή συγγένεια (Bisson and Fraenkel 1982, Lang and Cirillo 1988). Επιπλέον, οι Bisson και Fraenkel το 1983 χρησιμοποίησαν 6-δεοξυγλυκόζη, ένα ανάλογο της γλυκόζης το οποίο προσλαμβάνεται αλλά δεν φωσφορυλιώνεται από τον *S. cerevisiae* (και επομένως δεν μεταβολίζεται), για να δείξουν αν το σύστημα πρόσληψης γλυκόζης υψηλής συγγένειας, εξαρτάται από τη φωσφορυλιωμένη γλυκόζη ή αν οι κινάσες χρειάζονται για την φωσφορυλίωση κάποιου άλλου μορίου που επηρεάζει την πρόσληψη της γλυκόζης. Τελικά απέδειξαν ότι η εξάρτηση του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης υψηλής συγγένειας από τις κινάσες δεν είναι αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης ή του μεταβολισμού του υποστρώματος, άλλα κάποιου άλλου ρόλου των κινασών στην πρόσληψη της γλυκόζης (Bisson and Fraenkel 1983).

Επιπρόσθετα, οι McClellan και Bisson το 1988 απομόνωσαν μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία περιέχουν κάθε φορά μία λειτουργική κινάση καθώς και ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που δεν περιέχει καμία λειτουργική κινάση. Το στέλεχος αυτό όπως και τα προηγούμενα δεν προσλάμβανε τη γλυκόζη με υψηλή συγγένεια. Το στέλεχος που περιέχει μόνο τη γλυκοκινάση εμφανίζει μόνο το σύστημα υψηλής συγγένειας πρόσληψης γλυκόζης. Τα στελέχη που περιέχουν μόνο τη γλυκοκινάση ή την εξοκινάση P I έχουν ένα συνεχές σύστημα πρόσληψης υψηλής συγγένειας. Τέλος, το στέλεχος που περιέχει μόνο την εξοκινάση P II έχει ένα σύστημα πρόσληψης υψηλής συγγένειας το οποίο αναστέλλεται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο όπως συμβαίνει στον φυσικό τύπο. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το σύστημα πρόσληψης υψηλής συγγένειας στον *S. cerevisiae* εξαρτάται από τη φωσφορυλιωτική δράση της εξοκινάσης P II.



Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης έχει επίσης αναφερθεί στο ζυμομύκητα *Kluyveromyces lactis*. Ο *K. lactis* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα κυρίως τη λακτόζη. Ουσιαστικά είναι ένας αερόβιος οργανισμός, αλλά μπορεί να επιβιώσει και απουσία οξυγόνου ανάλογα με την συγκέντρωση του σακχάρου στο θρεπτικό μέσο (Saliola and Falcone 1995). Το 1976 οι Royt και MacQuillan δημοσίευσαν την ύπαρξη ενός επαγόμενου συστήματος πρόσληψης γλυκόζης. Η ύπαρξη του συστήματος αυτού, επιβεβαιώθηκε από την Wesolowski-Louvel και τους συνεργάτες της το 1992. Επιπλέον, από τους ίδιους ερευνητές, βρέθηκε ότι η γλυκόζη προλαμβάνεται μέσω αυτού του συστήματος με χαμηλή συγγένεια ($K_m = 20-50 \text{ mM}$) ενώ επιπρόσθετα ανέφεραν την ύπαρξη ενός δεύτερου συστήματος στον *K. lactis*, μέσω του οποίου η γλυκόζη προσλαμβάνεται με υψηλή συγγένεια ($K_m = 1 \text{ mM}$) και το οποίο εκφράζεται συνεχώς (Wesolowski-Louvel et al. 1992).

Ο μεταφορέας του συστήματος χαμηλής συγγένειας πρόσληψης της γλυκόζης στον *K. lactis* κωδικεύεται από το γονίδιο *RAG1* (Goffrini et al. 1989, Wesolowski-Louvel et al. 1992), ενώ ο μεταφορέας του συστήματος υψηλής συγγένειας κωδικεύεται από το γονίδιο *HXT1* (Billiard et al. 1996).

Μέσω ενός συστήματος διευκολυνόμενης διάχυσης προσλαμβάνεται η γλυκόζη και από τον σχιζοσακχαρομύκητα *Schizosaccharomyces pombe*. Ο *S. pombe* καταβολίζει σάκχαρα με έντονο ρυθμό κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε αντίθεση με την πλειονότητα των γνωστών ζυμομυκήτων, οι οποίοι είτε δεν καταβολίζουν είτε καταβολίζουν εξόζες με αργό ρυθμό (Rose and Harrison 1987). Σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae* και άλλους ζυμομύκητες (οι οποίοι διαιρούνται με εκβλάστηση) ο *S. pombe* διαιρείται αποκλειστικά με κυτταρική σχάση (δηλαδή το διαιρούμενο κύτταρο χωρίζεται σε δύο ίσα νέα κύτταρα) κατά την αφυλετική αναπαραγωγή του (απλοειδής κύκλος ζωής), χαρακτηριστικό το οποίο αποτελεί το κύριο γνώρισμα του γένους των σχιζοσακχαρομυκήτων (Gutz et al. 1977, Rose and Harrison 1987).



Αντίθετα με τα συστήματα πρόσληψης των σακχάρων που έχουν περιγραφεί σε άλλους ζυμομύκητες (υψηλής και χαμηλής συγγένειας) και τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη περιπλοκότητα, το σύστημα πρόσληψης των σακχάρων στο *S. pombe* είναι εξαιρετικά απλό.

Η γλυκόζη μεταφέρεται στον *S. pombe* μέσω ενός μοναδικού συστήματος συμμεταφοράς πρωτονίων και γλυκόζης. Η μεταφορά αυτή καταλύεται από τον συμμεταφορέα της γλυκόζης τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης (Hofer et al. 1987). Επιπλέον, κατά την πρόσληψη φαίνεται να υπάρχει ενεργειακή σύζευξη μεταξύ των μεμβρανικών H^+ -ATP-ασών και του συμμεταφορέα πρωτονίων και γλυκόζης (Hofer et al. 1987). Μέσω του συμμεταφορέα της γλυκόζης μπορεί να μεταφερθεί και η φρουκτόζη καθώς και ανάλογα της γλυκόζης που δεν μεταβολίζονται όπως η 2-δεοξυγλυκόζη ή η γλυκοζαμίνη. Ο συμμεταφορέας της γλυκόζης στον *S. pombe* προσλαμβάνει την 2-δεοξυγλυκόζη με μεγαλύτερη συγγένεια ($K_m = 2$ mM) από αυτή που προσλαμβάνει την γλυκόζη ($K_m = 15$ mM). Παρ' όλα αυτά η ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης από τον *S. pombe* είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή της πρόσληψης της 2-δεοξυγλυκόζης (Hofer et al. 1987).

Το 1994 οι Milbrandt και Hofer απομόνωσαν 2 μεταλλαγμένα στελέχη *S. pombe*, τα οποία δεν ήταν ικανά να αναπτυχθούν όταν η μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο ήταν η γλυκόζη ή η φρουκτόζη. Τα δύο αυτά στελέχη δεν προσλάμβαναν γλυκόζη ή φρουκτόζη και επιπλέον δεν ήταν σε θέση να συσσωρεύσουν 2-δεοξυγλυκόζη. Επιπρόσθετα το ένα στέλεχος (YGS-4) ήταν ανθεκτικό στη 2-δεοξυγλυκόζη, ενώ το άλλο (YGS-5) ήταν ευαίσθητο (Milbrandt and Hofer 1994). Οι ίδιοι ερευνητές χρησιμοποιώντας τα παραπάνω μεταλλαγμένα στελέχη, απομόνωσαν από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού τύπου έναν κλώνο που αναπλήρωνε τα εξής χαρακτηριστικά: την ανάπτυξη στη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, την πρόσληψη της γλυκόζης και της φρουκτόζης και τη συσσώρευση της 2-δεοξυγλυκόζης στο στέλεχος YGS-5 (Milbrandt and Hofer 1994).



Ο κλώνος αυτός ονομάστηκε *GHT1* και αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του (Lichtenberg-Frate et al. 1997). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το γονίδιο *GHT1* κωδικεύει μία πρωτεΐνη 565 αμινοξέων η οποία έχει δομή μεταφορέα. Ακόμα, η πρωτεΐνη αυτή έδειξε ομολογία με τους μεταφορείς της γλυκόζης *HXT* του *S. cerevisiae* καθώς και με άλλους γνωστούς μεταφορείς. Το γονίδιο *GHT1* εκφράστηκε ετερόλογα σε μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* ανάκανα να μεταφέρουν γλυκόζη και βρέθηκε ότι αναπληρώνει την πρόσληψη της γλυκόζης, αποδεικνύοντας έτσι ότι το γονίδιο *GHT1* κωδικεύει τον μεταφορέα της γλυκόζης στον *S. pombe*.

Αντίθετα με την περίπτωση του *S. cerevisiae*, στον *S. pombe* δεν έχει αναφερθεί εξάρτηση του συστήματος πρόσληψης από τις εξοκινάσες. Στον *S. pombe* υπάρχουν δύο εξοκινάσες: η εξοκινάση 1 η οποία έχει χαμηλή συγγένεια με τη γλυκόζη και η εξοκινάση 2 η οποία έχει υψηλή. Τα γονίδια που κωδικεύουν τις δύο αυτές εξοκινάσες (*hxt1* και *hxt2* αντίστοιχα) έχουν απομονωθεί και αναλυθεί ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους (Petit et al. 1996). Μεταλλαγμένα στελέχη που δεν περιέχουν την εξοκινάση 1 δεν παρουσιάζουν πρόβλημα ανάπτυξης, ενώ μεταλλαγμένα στελέχη που δεν περιέχουν την εξοκινάση 2 παρουσιάζουν διπλάσιο χρόνο αναδιπλασιασμού όταν αναπτύσσονται σε γλυκόζη (Petit et al. 1998). Μεταλλαγμένα στελέχη που δεν περιέχουν και τις δύο εξοκινάσες δεν αναπτύσσονται σε γλυκόζη ή φρουκτόζη. Η έκφραση του γονιδίου *hxt2* επάγεται από τη γλυκερόλη και τη φρουκτόζη, ενώ η έκφραση του γονιδίου *hxt1* είναι η υψηλότερη δυνατή παρουσία γλυκερόλης. Επιπλέον, η 6-P-τρεχαλόζη δεν καταστέλλει τις εξοκινάσες του *S. pombe* ούτε επηρεάζει γενικότερα τη γλυκόλυση όπως συμβαίνει στον *S. cerevisiae* (Blanquez et al. 1994).

Ανάμεσα στα συστήματα πρόσληψης που περιέχονται στα βακτήρια, η διευκολυνόμενη διάχυση είναι το λιγότερο διαδεδομένο. Μέχρι πρόσφατα, τα μόνα συστήματα διευκολυνόμενης διάχυσης που έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε βακτήρια είναι το σύστημα πρόσληψης της γλυκερόλης στο βακτήριο *Escherichia coli* (Schweizer et al. 1997) και το σύστημα πρόσληψης της



γλυκόζης στο βακτήριο *Zymomonas mobilis* (Parker et al. 1995, Weisser et al. 1995).

Μέσω ενός συστήματος διευκολυνόμενης διάχυσης μεταφέρεται εναλλακτικά η γλυκόζη και στο βακτήριο *Bacillus subtilis* (Paulsen et al. 1998), η οποία σε αυτή την περίπτωση προσλαμβάνεται κυρίως μέσω ενός συστήματος PTS (βλέπε παρακάτω). Το σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης στο βακτήριο αυτό, λειτουργεί μέσω ενός συµμεταφορέα πρωτονίων της γλυκόζης/μαννόζης (GlcP). Ο συµμεταφορέας αυτός μπορεί να μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα του *B. subtilis* γλυκόζη, μαννόζη και μη μεταβολίσιμα ανάλογα της γλυκόζης. Το γονίδιο που κωδικεύει το συµμεταφορέα πρωτονίων και γλυκόζης στο *B. subtilis* (*glcP*) έχει απομονωθεί και έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ομολογία με το συµμεταφορέα πρωτονίων και φρουκτόζης στο βακτήριο *E. coli*, και με το συµμεταφορέα πρωτονίων και γλυκόζης/γαλακτόζης στο *Brucella abortus*. Το γονίδιο βρίσκεται σε ένα σύμπλεγμα με τρία άλλα γονίδια, δύο από τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες με άγνωστη λειτουργία, ενώ το τρίτο πιθανότατα κωδικεύει μία οξειδάση η οποία ίσως συμμετέχει μαζί με το γονίδιο *glcP* στην πρόσληψη της γλυκόζης (Paulsen et al. 1998).

Μεταφορά μέσω του συστήματος PTS

Εκτός από το σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης, η γλυκόζη μπορεί να προσληφθεί από τους μικροοργανισμούς μέσω ενός συστήματος φωσφοτρανσφεράσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος και των σακχάρων (phosphoenolopyruvate:sugar phosphotransferase system, PTS). Το σύστημα PTS εμπλέκεται στην πρόσληψη και στη φωσφορυλίωση διαφόρων υδρογονανθράκων από τους μικροοργανισμούς αλλά συγχρόνως συμμετέχει και στη ρύθμιση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολικών οδών (Postma et al. 1993).

Ανεξάρτητα από τον οργανισμό και την πηγή άνθρακα, όλα τα συστήματα PTS που έχουν χαρακτηριστεί καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP) στον υδρογονάνθρακα που προσλαμβάνεται. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται συγχρόνως με την μετατόπιση του υδρογονάνθρακα κατά μήκος της μεμβράνης χρησιμοποιώντας την ενέργεια του PEP.

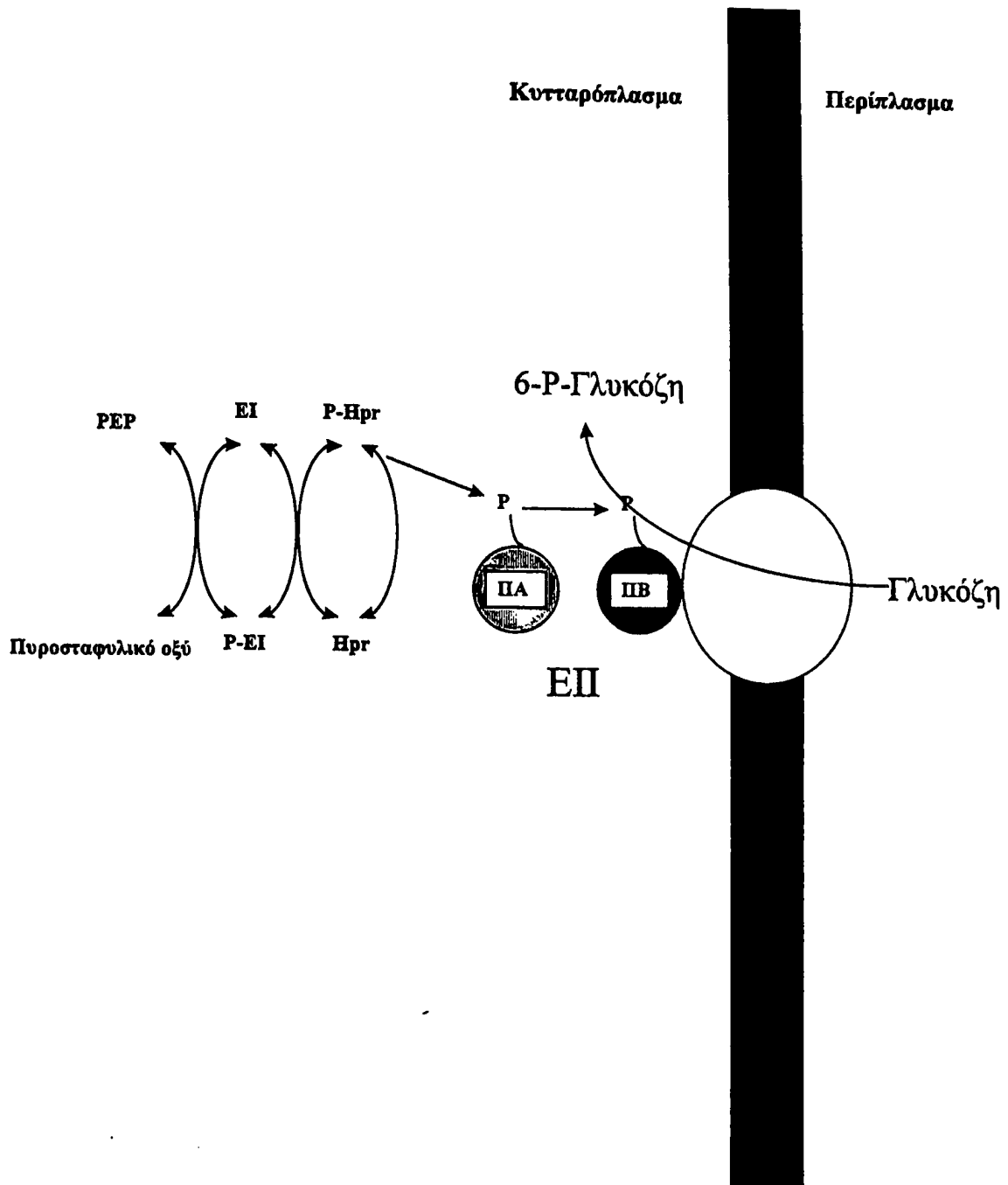
Ένα από τα πιο μελετημένα συστήματα PTS για τη μεταφορά της γλυκόζης διαθέτει το βακτήριο *B. subtilis*, ένα θετικό κατά gram βακτήριο του εδάφους το οποίο προτιμά να καταβολίζει γλυκόζη παρά άλλες πηγές άνθρακα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1, το σύστημα PTS για την πρόσληψη της γλυκόζης στο βακτήριο *B. subtilis* περιέχει δύο στοιχεία: το ένζυμο I (EI) και την θερμοανθεκτική πρωτεΐνη Hpr, τα οποία κωδικεύονται από τα γονίδια *ptsI* και *ptsH* αντίστοιχα που σχηματίζουν ένα οπερόνιο (Paulsen et al. 1998). Όταν η πρωτεΐνη Hpr είναι φωσφορυλιωμένη δίνει την φωσφορική της ομάδα σε μία ειδική πρωτεΐνη, την EII, μέσω της οποίας μεταφέρεται το σάκχαρο. Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια περμεάση. Στο *B. subtilis*, η γλυκόζη μεταφέρεται μέσω της πρωτεΐνης EII^{Glc} που ονομάζεται περμεάση της γλυκόζης. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις ΠΑ^{Glc} και ΠΒ^{Glc}. Και οι δύο υπομονάδες πρέπει απαραίτητα να φωσφορυλιωθούν για να είναι δυνατή η μεταφορά της γλυκόζης μέσω της περμεάσης EII^{Glc} (Bachem et al. 1997).

Το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη EII^{Glc} στο βακτήριο *B. subtilis* έχει απομονωθεί και αναλυθεί ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και βρέθηκε ότι ανήκει στην οικογένεια των περμεασών της γλυκόζης και της σακχαρόζης (Zagorec and Postma 1992). Το γονίδιο αυτό ονομάζεται *ptsG* και δεν βρίσκεται στο ίδιο οπερόνιο με τα γονίδια *ptsI* και *ptsH* (Paulsen et al. 1998).

Όπως στο *B. subtilis* έτσι και στο βακτήριο *E. coli* η γλυκόζη μεταφέρεται κυρίως μέσω ενός συστήματος μεταφοράς PTS. Στο σύστημα PTS του *E. coli* συμμετέχουν το ένζυμο EI, η πρωτεΐνη HPr και η περμεάση της γλυκόζης (EII^{Glc}) η οποία αποτελείται από δύο πρωτεΐνες: την ΠΑ^{Glc} και την



ΠBC^{Glc} . Η πρωτεΐνη ΠA^{Glc} είναι υδρόφιλη και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η πρωτεΐνη ΠBC^{Glc} είναι μεμβρανική και χωρίζεται σε δύο υπομονάδες: την ΠB^{Glc} (καρβοξυτελικό άκρο) και την ΠC^{Glc} (αμινοτελικό άκρο) (Postma et al. 1993). Η μεταφορά της γλυκόζης, είναι μία διαδικασία διαδοχικών φωσφορυλιώσεων: Το PEP φωσφορυλιώνει το EI στην His 191, το οποίο στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη HPr στην His 15, η οποία φωσφορυλιώνει την ΠA^{Glc} στην His 90 και την ΠB^{Glc} στην Cys 421 (Meadow and Roseman 1996).



ΣΧΗΜΑ 1: Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω του συστήματος PTS στο βακτήριο *B. subtilis*.



Τα γονίδια που κωδικεύουν τις πρωτεΐνες EI (*ptsH*), Hpr (*ptsI*) και IIA^{Glc} (*crr*) βρίσκονται σε οπερόνιο το οποίο ονομάζεται *pts* (Postma et al. 1993). Το γονίδιο *ptsG*, μετά από απομόνωση του και ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του, βρέθηκε ότι κωδικεύει την πρωτεΐνη IIBC^{Glc} (Postma et al. 1993). -

Η γλυκόζη μπορεί να μεταφερθεί και μη ειδικά στο εσωτερικό των κυττάρων του βακτηρίου *E. coli*. Η ελεύθερη (μη φωσφορυλιωμένη) ενδοκυττάρια γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από την γλυκοκινάση, της οποίας το γονίδιο (*glk*) έχει απομονωθεί και αναλυθεί ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του (Begley et al. 1995).

Το σύστημα ενεργής μεταφοράς της γλυκόζης

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης, το σύστημα ενεργής μεταφοράς σακχάρων τύπου ABC (ATP-binding cassette). Το σύστημα ABC χρησιμοποιεί την ενέργεια της υδρόλυσης του ATP για να μεταφέρει κατά μήκος της μεμβράνης των μικροοργανισμών ουσίες σε μικρή κυρίως συγκέντρωση (Kemper et al. 1997). Αποτελείται από τρία στοιχεία: μία περιπλασμική πρωτεΐνη πρόσδεσης η οποία προσδένει την ουσία που πρόκειται να μεταφερθεί, μία μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς η οποία αντιδρά με την περιπλασμική πρωτεΐνη και τον προσδέτη της, και μία πρωτεΐνη πρόσδεσης του ATP η υδρόλυση του οποίου προσφέρει την ενέργεια για να γίνει η μεταφορά της ουσίας.

Η γλυκόζη, έχει αναφερθεί ότι είναι πολύ πιθανό να μεταφέρεται μέσω ενός ABC συστήματος μεταφοράς από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* (Wylie and Worobec 1995). Το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι ένας αρνητικός κατά gram βάκιλος ο οποίος είναι παθογόνος και προσβάλλει συνήθως ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση ή ασθενείς που έχουν υποστεί χημειοθεραπεία (Ma et al. 1998).



Το *P. aeruginosa* διαθέτει αξιοσημείωτη ικανότητα να χρησιμοποιεί ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα για την ανάπτυξη του κάτω από μία μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Αν και το βακτήριο αυτό προτιμά να χρησιμοποιεί ως πηγές άνθρακα τα ενδιάμεσα οξέα του κύκλου του Krebs όπως το ηλεκτρικό οξύ, καταβολίζει πρόθυμα και τη γλυκόζη (Ma et. al 1998).

Το βακτήριο *P. aeruginosa* δεν καταβολίζει τη γλυκόζη μέσω της πορείας Embden-Meyerhof-Parnas, γιατί δεν διαθέτει την φωσφοφρουκτοκινάση (Ma et. al 1998), αλλά την μετατρέπει σε 6-P-γλυκονικό οξύ το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 3-P-γλυκεριναλδεύδη και πυροσταφυλικό οξύ μέσω των ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff: δεϋδρατάση του 6-P-γλυκονικού οξέος (EDD) και την αλδολάση του 2-κετο-3-δεοξυ-6-P-γλυκονικού οξέος (EDA) (Cuskey et al. 1985, Σχήμα 2). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2, η γλυκόζη μπορεί να μετατραπεί σε 6-P-γλυκονικό οξύ μέσω δύο εναλλακτικών πορειών (Hunt and Phibbs 1983). Η οξειδωτική πορεία περιλαμβάνει τη διαδοχική οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ και στη συνέχεια σε 2-κετογλυκονικό οξύ μέσω των μεμβρανικών ενζύμων αφυδρογονάση της γλυκόζης και αφυδρογονάση του γλυκονικού οξέος. Οι παραπάνω αντιδράσεις γίνονται στην περιπλασματική περιοχή του κυττάρου. Τα αντίστοιχα προϊόντα των δύο ενζύμων μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και μετατρέπονται σε 6-P-γλυκονικό οξύ (Σχήμα 2). Η μεταφορά αυτή έχει αναφερθεί ότι γίνεται μέσω ενός συστήματος πρόσληψης χαμηλής συγγένειας ($K_m = 2 \text{ mM}$), το οποίο θεωρείται εναλλακτικό σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης (Wylie and Worobec 1995).

Στη φωσφορυλιωτική πορεία η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται εντός των κυττάρων από τη γλυκοκινάση (GLK) και η 6-P-γλυκόζη που παράγεται, οξειδώνεται από την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (ZWF) (Σχήμα 2). Η πρόσληψη της γλυκόζης γίνεται μέσω ενός συστήματος μεταφοράς υψηλής συγγένειας ($K_m = 8 \mu\text{M}$) το οποίο επάγεται από το ίδιο το μόριο της γλυκόζης (Saravolac et al. 1991). Σε αυτό το σύστημα πρόσληψης συμμετέχει μία περιπλαστική πρωτεΐνη πρόσδεσης της γλυκόζης (glucose binding protein



GBP) η οποία θεωρείται ότι ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων ABC (ATP-κασσέτα) (Wylie and Worobec 1995). Η γλυκόζη προσλαμβάνεται από την εξωτερική μεμβράνη του *P. aeruginosa* μέσω μίας πορίνης, της OprB, η οποία επάγεται από την παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Η OprB μεταφέρει τη γλυκόζη με ένα σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης μέσω λιποσωμάτων και περιέχει μια θέση πρόσδεσης της γλυκόζης (Wylie et al. 1993). Η πρωτεΐνη OprB δρα ως μια μη ειδική πορίνη η οποία εκτός από τη γλυκόζη, μπορεί να μεταφέρει και άλλους υδατάνθρακες όπως μαννιτόλη, φρουκτόζη και γλυκερόλη (Wylie et al. 1995). Το γονίδιο που κωδικεύει την πορίνη OprB απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του (Wylie and Worobec 1994).

Όσον αφορά την πρωτεΐνη πρόσδεσης της γλυκόζης (GBP), έχει απομονωθεί και καθαριστεί και αναπληρώνει το χαρακτήρα μεταλλαγμένων στελεχών *P. aeruginosa* τα οποία είναι ανίκανα να μεταφέρουν γλυκόζη (στελέχη *glkB*) (Sly et al. 1993). Ακόμα, έχει απομονωθεί μία περιοχή από το χρωμόσωμα του *P. aeruginosa* μεγέθους 1.1 kb, η οποία αναπληρώνει επίσης τα μεταλλαγμένα στελέχη *glkB* (Cuskey and Phibbs 1985, Cuskey et al. 1985) αλλά δεν περιέχει το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη πρόσδεσης της γλυκόζης (Sage et al. 1996).

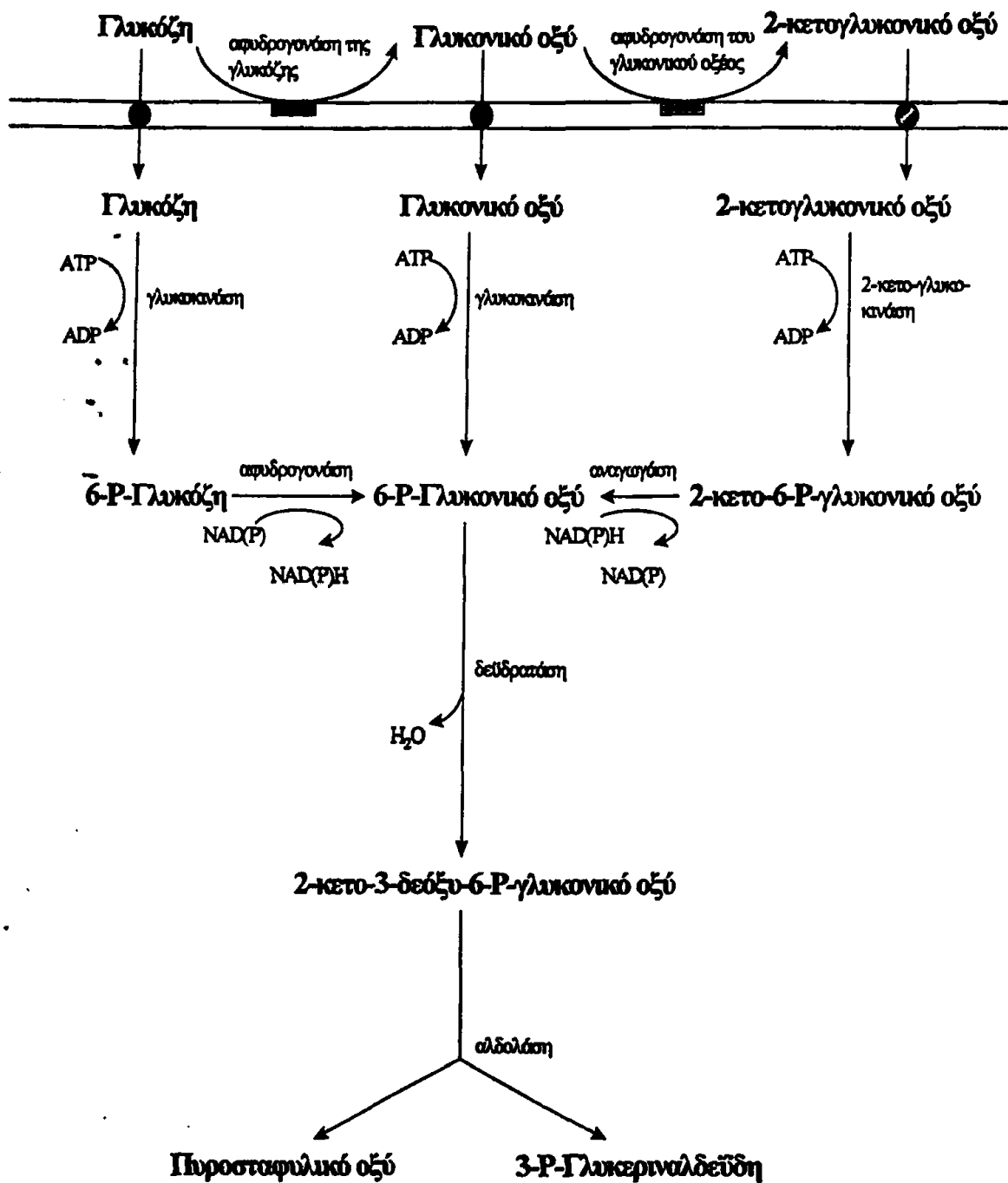
Έχει αναφερθεί (Roehl et al. 1983), ότι τα γονίδια *zwf*, *edd* και *eda* που κωδικεύουν την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, τη δεϋδρατάση και την αλδολάση αντίστοιχα, απαντούν σε ένα σύμπλεγμα εντός του χρωμοσώματος του *P. aeruginosa*. Το 1985 ο Cuskey και οι συνεργάτες του απομόνωσαν μία περιοχή από το χρωμόσωμα του βακτηρίου *P. aeruginosa* μεγέθους 6 kb, την οποία κλωνοποίησαν σε κατάλληλο φορέα και χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένα στελέχη βρήκαν ότι περιέχει τα γονίδια *edd* και *glk* (το οποίο κωδικεύει τη γλυκονινάση). Ακόμα, οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι στο ίδιο σύμπλεγμα με τα γονίδια *zwf*, *edd* και *eda* βρίσκεται και το γονίδιο *glk* καθώς και μία περιοχή που περιέχει ρυθμιστικά γονίδια (Cuskey et al. 1985). Τα γονίδια *zwf* και *eda* απομονώθηκαν το 1990 από την Temple και τους συνεργάτες της σε μια

περιοχή του χρωμοσώματος του *P. aeruginosa* μεγέθους 11 kb (Temple et al. 1990).

Πρόσφατα, απομονώθηκε ξεχωριστά και αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, το γονίδιο *zwf* που κωδικεύει την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (Ma et al. 1998).

Η αλληλουχία του γονιδίου *zwf* είναι 1100 νουκλεοτιδίων (3636 βάσεις) και κωδικεύει ένα πρωτεΐνη που αποτελείται από 1208 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, η οποία μετατρέπει την 6-P-γλυκόζη σε 6-P-υδροξυγλυκόζη. Η αλληλουχία του γονιδίου *zwf* είναι 1100 νουκλεοτιδίων (3636 βάσεις) και κωδικεύει ένα πρωτεΐνη που αποτελείται από 1208 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, η οποία μετατρέπει την 6-P-γλυκόζη σε 6-P-υδροξυγλυκόζη. Η αλληλουχία του γονιδίου *zwf* είναι 1100 νουκλεοτιδίων (3636 βάσεις) και κωδικεύει ένα πρωτεΐνη που αποτελείται από 1208 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, η οποία μετατρέπει την 6-P-γλυκόζη σε 6-P-υδροξυγλυκόζη.





ΣΧΗΜΑ 2: Εναλλακτικές περιφερικές πορείες του καταβολισμού της γλυκόζης στο βακτήριο *P. aeruginosa*.

1.2 Η ρύθμιση της πρόσληψης και του καταβολισμού της γλυκόζης στους μικροοργανισμούς

Η μελέτη του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης έχει μεγάλο ενδιαφέρον γιατί θεωρείται ένα πιθανό σημείο ρύθμισης του μεταβολισμού, ενώ επιπλέον θεωρείται ότι οι μεταφορείς της γλυκόζης και οι εξοκινάσες παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς στους οποίους το σήμα είναι το ίδιο το μόριο της γλυκόζης (Rose et al. 1991, Ozcan et al. 1993, Bisson et al. 1993, Ozcan and Johnston 1995, Thevelein and Hohmann 1995).

Έχει βρεθεί ότι το σύστημα πρόσληψης υψηλής συγγένειας στον *S. cerevisiae* καταστέλλεται από την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης ή φρουκτόζης (Bisson and Fraenkel 1984). Αυτή η καταστολή είναι ειδική για τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη και δεν παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλλων σακχάρων όπως γαλακτόζης, λακτόζης, σορβόζης ή σορβιτόλης (Bisson 1988).

Η μεταγραφή πολλών γονιδίων που κωδικεύουν μεταφορείς της γλυκόζης στον *S. cerevisiae* επάγεται από τη γλυκόζη (Bisson et al. 1993, Kruckeberg 1996, Boles and Hollenberg 1997) ενώ κανένα από αυτά δεν μεταγράφεται απουσία γλυκόζης (Ozcan and Johnston 1995). Αυτοί οι μεταφορείς παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια με τη γλυκόζη ενώ η μεταγραφή τους επάγεται ή καταστέλλεται από τις διάφορες συγκεντρώσεις της γλυκόζης: η έκφραση του μεταφορέα HXT1 επάγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και καταστέλλεται σε χαμηλές (Ozcan and Johnston 1995, Ozcan and Johnston 1996), ενώ η έκφραση των μεταφορέων HXT2, HXT4 και HTX6 επάγεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και καταστέλλεται σε υψηλές (Wendell and Bisson 1994, Ozcan and Johnston 1995, Ozcan and Johnston 1996, Liang and Gaber 1996).

Δύο άλλα γονίδια αυτής της οικογένειας, τα *snf3* και *rgt2*, κωδικεύουν πρωτεΐνες που διεγείρονται από την γλυκόζη και δημιουργούν ένα ενδοκυτταρικό σήμα που επάγει την μεταγραφή των γονιδίων HXT: οι



πρωτεΐνες Snf3 και Rgt2, διεγείρονται από χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης αντίστοιχα. (Ko et al. 1993, Walsh et al. 1994, Ozcan et al. 1996b, Walsh et al. 1996, Liang and Gaber 1996).

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες Snf3 και Rgt2 έχουν μακριά καρβοξυτελικά άκρα, τα οποία εκτείνονται στο κυτταρόπλασμα και είναι απαραίτητα για τη δημιουργία του ενδοκυτταρικού σήματος της γλυκόζης (Coons et al. 1997, Ozcan et al. 1998). Επιπρόσθετα, το καρβοξυτελικό άκρο του Snf3 μπορεί μερικά να δράσει όταν εκφράζεται μόνο του ανεξάρτητα από την υπόλοιπη περιοχή της πρωτεΐνης Snf3 ή όταν συνδέεται με ένα μεταφορέα HXT (Ozcan et al. 1998). Μια επανάληψη 23 αμινοξέων που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Snf3 και είναι συντηρημένη στην πρωτεΐνη Rgt2 φαίνεται να εμπλέκεται στον παραπάνω σηματοδοτικό μηχανισμό (Ozcan et al. 1998). Όμως για την πλήρη λειτουργία αυτού του σηματοδοτικού μηχανισμού χρειάζονται και άλλες περιοχές των πρωτεϊνών Snf3 και Rgt2 γιατί μεταλλάξεις στα διαμεμβρανικά τους στοιχεία προκαλούν επαγωγή των μεταφορέων HXT απουσία γλυκόζης (Ozcan et al. 1996b).

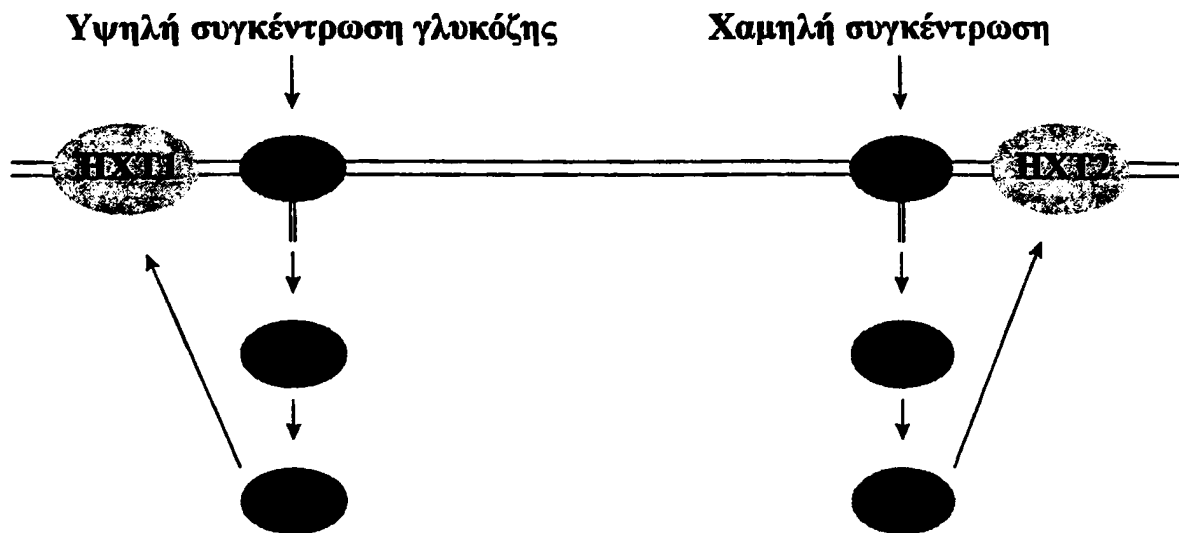
Ένας στόχος της παραπάνω σηματοδοτικής πορείας είναι ο καταστολέας Rgt1, ο οποίος απουσία γλυκόζης είναι συνδεδεμένος με τους προαγωγούς των γονιδίων *HXT* εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή τους. Η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων *HXT* από τη γλυκόζη εμπλέκει την αναστολή της λειτουργίας του καταστολέα Rgt1 (Marshall-Carlson 1991, Erickson and Johnston 1994, Ozcan and Johnston 1995, Ozcan and Johnston 1996). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο καταστολέας Rgt1 μετατρέπεται σε ενεργοποιητής όταν η συγκεντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή (Ozcan et al. 1996a, Ozcan and Johnston 1996).

Η αναστολή της δράσης του καταστολέα Rgt1 από τη γλυκόζη απαιτεί και την εμπλοκή ενός άλλου παράγοντα, του *ggr1* που κωδικεύεται από το γονίδιο *grr1* (Flick and Johnston 1991, Vallier et al. 1994).

Ο μηχανισμός της ρύθμισης από τους παράγοντες Rgt2 και Snf3 των μεταφορέων HXT1 (επάγεται από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης) και HXT2

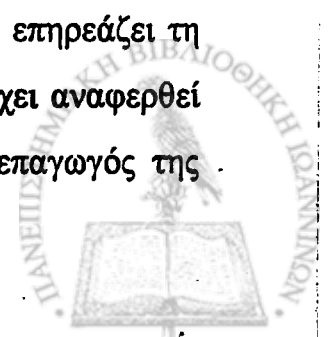


(επάγεται από χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης) αντίστοιχα, φαίνεται στο Σχήμα 3.



ΣΧΗΜΑ 3: Η ρύθμιση των μεταφορέων της γλυκόζης HXT1 και HXT2 σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης από τα ρυθμιστικά γονίδια *snf3* και *rgt2* στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae*.

Η παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, επηρεάζει τη δραστηριότητα των γλυκολυτικών ενζύμων στον *S. cerevisiae*. Έχει αναφερθεί (Baker 1986) ότι το γονίδιο *gcr1* (glycolysis regulator) είναι επαγωγός της



μεταγραφής των γονιδίων που κωδικεύουν τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας.

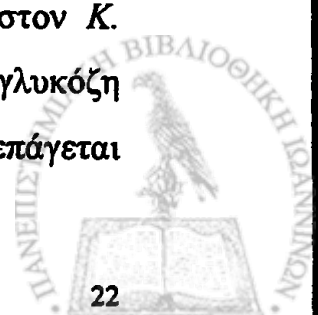
Το γονίδιο *gcr1* απομονώθηκε με αναπλήρωση του φαινοτύπου μεταλλαγμένων στελεχών των οποίων τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα (Clifton et al. 1978). Η δραστικότητα των γλυκολυτικών ενζύμων των μεταλλαγμένων αυτών στελεχών είναι 5% μειωμένη σε σχέση με τον φυσικό τύπο όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει γλυκόζη. Αντίθετα, όταν τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη, η δραστικότητα των γλυκολυτικών τους ενζύμων είναι 20% έως 50% μειωμένη σε σχέση με αυτή του φυσικού τύπου (Clifton and Fraenkel 1981).

Έχει αποδειχθεί ότι η ρύθμιση της γλυκόλυσης του *S. cerevisiae* από το γονίδιο *gcr1* γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων που τα κωδικεύουν (Clifton and Fraenkel 1981, Rodicio et al. 1993). Επιπρόσθετα, έχουν βρεθεί χαρακτηριστικές περιοχές πρόσδεσης σε προαγωγούς έξι γονιδίων που κωδικεύουν γλυκολυτικά ένζυμα στον *S. cerevisiae*, οι οποίες αναγνωρίζονται από το προϊόν του γονιδίου *gcr1* (CT-boxes, Willet et al. 1993, Scott and Baker 1993).

Η μελέτη του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης στο ζυμομύκητα *K. lactis* παρουσιάζει επίσης μεγάλο ενδιαφέρον γιατί έχει αναφερθεί ότι είναι ρυθμιζόμενο (Chen et al. 1992).

Έχει βρεθεί ότι το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης χαμηλής συγγένειας στο ζυμομύκητα *K. lactis* εκφράζεται μόνο παρουσία γλυκόζης. Επιπλέον, η έκφραση του συστήματος αυτού είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των στελεχών του *K. lactis* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (Goffrini et al. 1989, Wesolowski-Louvel et al. 1992, Weirich et al. 1997).

Το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης χαμηλής συγγένειας στον *K. lactis* ρυθμίζεται, τουλάχιστον μερικώς, από την επαγόμενη από τη γλυκόζη έκφραση του γονιδίου *RAG1*. Η μεταγραφή του γονιδίου *RAG1* δεν επάγεται



μόνο από τα υποστρώματα του (γλυκόζη και φρουκτόζη) αλλά και από άλλα σάκχαρα (Chen et al. 1992). Από το παραπάνω γεγονός μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το σήμα για την ρύθμιση του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης χαμηλής συγγένειας είναι ένας κοινός ενδοκυττάριος μεταβολίτης του μεταβολισμού των σακχάρων. Παρ' όλα αυτά, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη η γλυκόλυση για την επαγωγή του γονιδίου *RAG1* (Goffrini et al. 1991, Wesolowski-Louvel et al. 1988). Επιπλέον, ο Royt το 1981 έδειξε ότι η 2-δεοξυγλυκόζη επάγει την πρόσληψη της γλυκόζης, γεγονός που δείχνει ότι η ρύθμιση πρέπει να γίνεται από τα σάκχαρα, πριν ακόμα φωσφορυλιωθούν.

Το 1992 ο Chen και οι συνεργάτες του ανέλυσαν ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων την περιοχή ανοδικά του γονιδίου *RAG1* και βρήκαν μια πιθανή αλληλουχία η οποία υπέθεσαν ότι κωδικεύει ένα στοιχείο το οποίο είναι ουσιαστικό για την επαγωγή του προαγωγού του γονιδίου *RAG1*. Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν τη σημαντικά μειωμένη μεταγραφή του γονιδίου *RAG1* σε μεταλλαγμένα στελέχη *rag4*, *rag5* και *rag8*. Η επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στο γονίδιο *RAG1* γίνεται μέσω της ρυθμιστικής περιοχής που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου *RAG1*. Έκφραση του γονιδίου *RAG1* σε αυτά τα μεταλλαγμένα στελέχη έδειξε μερική αναπλήρωση στα στελέχη *rag4* και *rag8*, ενώ στο στέλεχος *rag5* όχι. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα τους, οι παραπάνω ερευνητές πρότειναν ότι τα γονίδια *RAG4* και *RAG8* ενεργοποιούν την μεταγραφή του γονιδίου *RAG1*, είτε με απευθείας αλληλεπίδραση με τον προαγωγό του, είτε έμμεσα με μεταφορά των σημάτων που επάγονται από τη γλυκόζη. Το γονίδιο *RAG5* είναι πιθανό να έχει μια πιο γενική λειτουργία ρυθμίζοντας άλλα γονίδια που συμμετέχουν στη ζύμωση των σακχάρων στον *K. lactis*.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του γονιδίου *RAG5* έδειξε ότι αυτό κωδικεύει μία πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με τις εξοκινάσες του *S. cerevisiae*. Επιπλέον, τα μεταλλαγμένα στελέχη *K. lactis rag5* δεν παρουσιάζουν ανιχνεύσιμη δραστηριότητα εξοκινάσης ή γλυκοκινάσης, γεγονός που δείχνει ότι το γονίδιο *RAG5* κωδικεύει μία



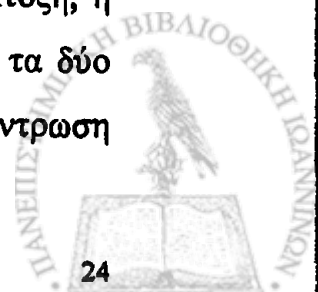
εξοκινάση η οποία είναι το μοναδικό ένζυμο που φωσφορυλιώνει τη γλυκόζη (Prior et al. 1993).

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του γονιδίου *RAG8* έδειξε ότι αυτό κωδικεύει μία πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με τις κινάσες της καζεΐνης του *S. cerevisiae*. Επιπλέον, έκφραση του σε μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* τα οποία δεν περιείχαν τις κινάσες της καζεΐνης, έδειξε αναπλήρωση. Άρα το γονίδιο *RAG8* κωδικεύει μία κινάση της καζεΐνης και επιπρόσθετα η μεταγραφή του επάγεται από τη γλυκόζη (Blaisonneau et al. 1997).

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του γονιδίου *RAG4* έδειξε ότι αυτό έχει ισχυρή ομολογία με τα γονίδια *snf3* και *rgt2* του *S. cerevisiae*. Επιπλέον, βρέθηκε ότι περιέχει μακριά καρβοξυτελικά άκρα όπως τα γονίδια αυτά. Άρα, είναι πιθανό το προϊόν του γονιδίου *RAG4* να είναι δέκτης του σήματος της γλυκόζης και να ρυθμίζει την-επαγομένη από τη γλυκόζη-έκφραση του γονιδίου *RAG1* (Ozcan et al. 1998).

Όσον αφορά το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης υψηλής συγγένειας στον *K. lactis*, έχει αναφερθεί (Billard et al. 1996) ότι το γονίδιο *HTG1* εκφράζεται συνεχώς αλλά η έκφραση του βρίσκεται κάτω από ρύθμιση από γονίδια που ρυθμίζουν και την έκφραση του γονιδίου *RAG1*. Το γονίδιο *RAG5* είναι απαραίτητο για την έκφραση του *HTG1*, ενώ το γονίδιο *RAG4* έχει αρνητική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου *HTG1*.

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι και το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης στον *S. pombe* βρίσκεται κάτω από ρύθμιση: ο Mehta και οι συνεργάτες του απομόνωσαν δύο μεταλλαγμένα στελέχη *S. pombe* τα οποία είναι ανίκανα να μεταφέρουν σάκχαρα (στελέχη *sds1* : sugar transport deficient) και τα οποία διαφέρουν από τα προηγουμένως απομονωμένα μεταλλαγμένα στελέχη *YGS-4* και *YGS-5*. Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη δεν αναπτύσσονται όταν στο θρεπτικό μέσο ως μόνη πηγή άνθρακα περιέχεται η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μαννόζη, η σακχαρόζη ή η μαλτόζη (Mehta et al. 1997). Το ένα από τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη όμως είναι ικανό να αναπτύσσεται όταν η συγκέντρωση



της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο είναι υψηλή μετά από μία περίοδο εφουσησυχασμού 12 έως 20 ωρών η οποία αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, ενώ δεν αναπτύσσεται καθόλου όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο είναι χαμηλή. Παρ' όλα αυτά όταν κύτταρα του στελέχους αυτού, τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και βρίσκονται στην εκθετική φάση (και όχι στη στατική φάση), μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αναπτύσσονται κανονικά, ενώ εάν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης δεν αναπτύσσονται καθόλου. Επιπλέον, κατά την περίοδο εφουσησυχασμού το μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος δεν δείχνει να προσλαμβάνει γλυκόζη. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχει ανάγκη επαγωγής από τη γλυκόζη κάποιου παράγοντα ή παραγόντων για την ανάπτυξη του στελέχους αυτού σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και πιθανότατα αυτή η επαγωγή να γίνεται στο στάδιο της πρόσληψής της με ρύθμιση του συμμεταφορέα της γλυκόζης σε γενετικό επίπεδο.

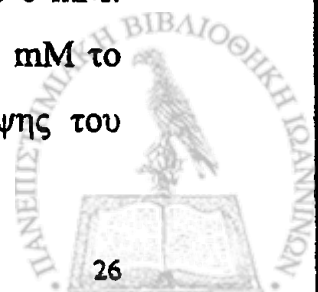
Όσον αφορά τη ρύθμιση στην πρόσληψη της γλυκόζης στο βακτήριο *B. subtilis*, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση του γονιδίου *glcP* επάγεται από τη γλυκόζη γιατί όταν τα κύτταρα του *B. subtilis* αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο το οποίο δεν περιέχει γλυκόζη, δεν παρατηρείται δραστηριότητα του συστήματος συμμεταφοράς πρωτονίων και γλυκόζης/μαννόζης (Paulsen et al. 1998). Επιπλέον, η έκφραση του *glcP* εξαρτάται και από τη δράση του γονιδίου *PtsG* του συστήματος PTS πρόσληψης της γλυκόζης γιατί μεταλλαγμένα στελέχη *B. subtilis*, τα οποία δεν περιέχουν το γονίδιο *PtsG* και αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη, δεν έχουν δραστηριότητα του συστήματος συμμεταφοράς πρωτονίων και γλυκόζης/μαννόζης (Paulsen et al. 1998). Είναι πιθανό το γονίδιο *PtsG* να προωθεί την έκφραση του γονιδίου *glcP* προκαλώντας συσσώρευση τη 6-P-γλυκόζης, η οποία είναι ένας επαγωγός του γονιδίου *glcP* (Paulsen et al. 1998).



Τέλος, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η πρόσληψη και ο καταβολισμός της γλυκόζης στο βακτήριο *P. aeruginosa* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον γιατί τόσο οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης με υψηλή συγγένεια, όσο και τα ένζυμα του καταβολισμού που συμμετέχουν στη φωσφορυλιωτική καταβολική πορεία είναι επαγωγίμα και η έκφραση τους επάγεται κυρίως από την παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Η ρύθμιση όμως στη δραστηριότητα των ενζύμων του καταβολισμού και στο σύστημα πρόσληψης θα πρέπει να είναι ανεξάρτητη γιατί όταν το *P. aeruginosa* αναπτύσσεται σε γλυκερόλη ή γλυκερινικό οξύ πολλά ένζυμα της γλυκόλυσης επάγονται, ενώ αντίθετα η πρόσληψη της γλυκόζης δεν επηρεάζεται. Επιπρόσθετα, σε κύτταρα *P. aeruginosa* που αναπτύσσονται σε πυροσταφυλικό οξύ, μεθυλογλυκοζίτη ή 2-δεοξυγλυκόζη, τα ένζυμα της γλυκόλυσης δεν επάγονται αλλά επάγεται η πρόσληψη της γλυκόζης (Hylemon and Phibbs 1972).

Ποια εναλλακτική πορεία (οξειδωτική ή φωσφορυλιωτική) θα χρησιμοποιήσει το βακτήριο *P. aeruginosa* για να καταβολίσει τη γλυκόζη εξαρτάται από την παρουσία της αλλά και τη συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο (Whiting et al. 1976a). Όταν υπάρχει έλλειψη γλυκόζης ο οργανισμός αποκρίνεται αλλάζοντας το μεταβολισμό του από την άμεση εξωκυτταρική οξειδωτική πορεία στην εσωτερική φωσφορυλιωτική πορεία. Αυτή η αλλαγή επιτυγχάνεται με καταστολή του συστήματος μεταφοράς του γλυκονικού οξέος και του 2-κετογλυκονικού οξέος, καθώς και των ενζύμων του μεταβολισμού του 2-κετογλυκονικού οξέος και την κινάση του γλυκονικού οξέος. Παράλληλα, αυξάνονται τα επίπεδα της πρόσληψης της γλυκόζης, της εξοκινάσης και της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης.

Επιπρόσθετα, όταν το *P. aeruginosa* αναπτύσσεται σε 30 mM κιτρικού οξέος, για να επαχθεί το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης χρειάζεται η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης σε συγκέντρωση 6-8 mM. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο υπερβεί τα 20 mM το σύστημα πρόσληψης της καταστέλλεται, ενώ το σύστημα πρόσληψης του



γλυκονικού οξέος και του 2-κετογλυκονικού οξέος επάγονται. Τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας δεν καταστέλλονται από την αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης. Παρουσία 30 mM κιτρικού οξέος και διάφορες συγκεντρώσεις προστιθέμενης γλυκόζης ή γλυκονικού οξέος η καταστολή του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση του γλυκονικού οξέος που παράγεται από την εξωκυτταρική αφυδρογονάση της γλυκόζης. Την παραπάνω άποψη στηρίζουν και τα έξης αποτελέσματα: Σε μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν περιέχουν την αφυδρογονάση της γλυκόζης δεν καταστέλλεται το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης με προσθήκη γλυκόζης αλλά μόνο με προσθήκη γλυκονικού οξέος. Επιπλέον, η γλυκόζη και το γλυκονικό οξύ επάγουν τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff, αλλά για την επαγωγή του συστήματος πρόσληψης του γλυκονικού οξέος πρέπει πρώτα η γλυκόζη να μετατραπεί σε γλυκονικό οξύ (Whiting et al. 1976a).

Εκτός από την παρουσία και τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, στην ρύθμιση των εναλλακτικών πορειών παίζει ρόλο και η ανάπτυξη του *P. aeruginosa* παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Όλα τα συστήματα μεταφοράς και τα ένζυμα που φαίνονται στο Σχήμα 2 επάγονται σε αερόβιες συνθήκες σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη (Hylemon and Phibbs 1972, Whiting et al. 1976a, Whiting et al. 1976b). Μελέτες με μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν περιέχουν την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης ή την αφυδρογονάση της γλυκόζης (Whiting et al. 1976b) έδειξαν ότι η αερόβια ανάπτυξη των κυττάρων του *P. aeruginosa* γίνεται και στις δύο περιπτώσεις όπου είτε η οξειδωτική, είτε η φωσφορυλιωτική πορεία δεν λειτουργούν.

Η γλυκόζη καταβολίζεται πρώτα μέσω της οξειδωτικής πορείας όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (Whiting et al. 1976a, Whiting et al. 1976b). Η γλυκόζη καταβολίζεται μέσω της φωσφορυλιωτικής πορείας όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο είναι χαμηλή, ενώ όταν είναι



υψηλή το γλυκονικό οξύ που παράγεται από αυτή καταστέλλει το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης. Όταν το βακτήριο *P. aeruginosa* αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες και το νιτρικό οξύ είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων, δεν ανιχνεύεται δραστηριότητα της μεμβρανικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης, άρα η οξειδωτική πορεία δεν φαίνεται να παίζει κανένα ρόλο στην αναερόβια ανάπτυξη (Hunt and Phibbs 1983). Επιπλέον, σε συνθήκες μείωσης του οξυγόνου παρατηρείται μείωση στην έκφραση των ενζύμων της οξειδωτικής πορείας (Mitchell and Dawes 1982) ενώ κατά την ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες η αφυδρογονάση της γλυκόζης επάγεται σε μεγάλο βαθμό. Η λειτουργία της φωσφορυλιωτικής πορείας είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη σε αναερόβιες συνθήκες γιατί μεταλλαγμένα στελέχη *P. aeruginosa*, τα οποία δεν περιέχουν αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, δεν είναι ικανά να χρησιμοποιούν τη γλυκόζη σε αναερόβιες συνθήκες ενώ παρουσία οξυγόνου την χρησιμοποιούν μέσω της οξειδωτικής πορείας (Hunt and Phibbs 1983, Ma et al. 1998). Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη χρησιμοποιούν γλυκονικό οξύ σε αερόβιες αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Το γλυκονικό οξύ επάγει το σύστημα πρόσληψής του, την γλυκονινάση και την αφυδρογονάση της γλυκόζης. Το 6-P-γλυκονικό οξύ είναι πιθανά ο επαγωγός της γλυκονινάσης, της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης, και των ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff, δηλαδή της δεϋδρατάσης και της αλδολάσης (Hunt and Phibbs 1983).

Είναι γνωστό ότι τα ένζυμα ZWF, EDA, GLK, και EDD επάγονται συγχρόνως από την παρουσία της γλυκόζης, της μαννιτόλης, του γλυκονικού οξέος, της φρουκτόζης της γλυκερόλης και της 3-P-γλυκερόλης. Τα γονίδια που κωδικεύουν τα ένζυμα αυτά, ενώ είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε σύμπλεγμα γονιδίων (Roehl et al. 1983), εκφράζονται από διαφορετικούς προαγωγούς (Temple et al. 1990).

Τα τέσσερα αυτά γονίδια μπορεί να μη συνιστούν ένα οπερόνιο αλλά ρυθμίζονται από δύο κοινές περιοχές. Οι δύο αυτές περιοχές βρίσκονται στο χρωμοσωμικό τμήμα μεγέθους 6 kb που απομόνωσαν το 1985 ο Cuskey και οι

συνεργάτες του (Cuskey et al. 1985), λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση των γονιδίων που κωδικεύουν τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας και ονομάζονται *hexR* και *hexC* αντίστοιχα.

Η περιοχή *hexR* βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο *edd* και αναπληρώνει μεταλλαγμένα στελέχη των οποίων τα γονίδια *glk*, *zwf*, *edd* και *eda*, δεν είναι επαγωγίμα (Cuskey et al. 1985, Roehl et al. 1983, Temple et al. 1990). Η περιοχή *hexC* βρίσκεται ανάμεσα στο γονίδιο *edd* και το γονίδιο *gap* (κωδικεύει την αφυδρογονάση της 3-P-γλυκεριναλδεϋδης) (Temple et al. 1994) και όταν εκφραστεί στο φυσικό τύπο του *P. aeruginosa* οι δραστηριότητες των ενζύμων GLK, ZWF, EDD και EDA εννιαπλασιάζονται χωρίς την παρουσία επαγωγού στο θρεπτικό μέσο. Το γονίδιο αυτό είναι πιθανό να κωδικεύει μια θέση πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης η οποία ρυθμίζει αρνητικά και καταστέλλει τη δράση των ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας.

Όσον αφορά τη ρύθμιση του συστήματος πρόσληψης υψηλής συγγένειας, έχει αναφερθεί ότι τόσο η πρωτεΐνη πρόσδεσης της γλυκόζης (GBP), όσο και η πορίνη μεταφοράς της γλυκόζης OmpB που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου *P. aeruginosa* επάγονται από την παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο (Saravolac et al. 1991).

Επιπλέον, ο Sage και οι συνεργάτες του το 1996 (Sage et al. 1996) ανέλυσαν ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων το τμήμα του χρωμοσώματος του *P. aeruginosa* μεγέθους 1.1 kb, το οποίο αναπληρώνει το φαινότυπο των μεταλλαγμένων στελεχών *glitR* (στελέχη που δεν προσλαμβάνουν γλυκόζη), και βρήκαν ότι δεν κωδικεύει την πρωτεΐνη πρόσδεσης της γλυκόζης (GBP) αλλά μία πρωτεΐνη η οποία έχει ομολογία με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη OmpR του βακτηρίου *E. coli*. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *glitR* και βρέθηκε ότι είναι απαραίτητο για τη μεταφορά της γλυκόζης μέσω του επαγωγίμου συστήματος υψηλής συγγένειας και ότι ρυθμίζει το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη GPB, το οποίο δεν έχει ακόμα απομονωθεί.



1.3 Το σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γλυκόζη είναι η προτιμώμενη πηγή άνθρακα για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Η προσθήκη γλυκόζης ή μη μεταβολίσιμων αναλόγων της στο θρεπτικό μέσο προκαλεί ένα πλήθος σηματοδοτικών μηχανισμών με στόχο την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση πολλών ενζύμων του μεταβολισμού. Ο ρυθμιστικοί μηχανισμοί όπου το σηματοδοτικό μόριο είναι οι ίδια η γλυκόζη λαμβάνουν χώρα κυρίως σε επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων και ονομάζονται σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη. Τα γονίδια που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη είναι τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης, του κύκλου του Krebs, της αναπνοής, της μιτοχονδριακής ανάπτυξης και αυτά που χρησιμοποιούν άλλες πηγές άνθρακα εκτός της γλυκόζης (Entian et al. 1984, Meijer et al. 1998).

Στον *S. cerevisiae* μερικοί παράγοντες που θεωρείται ότι παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη, είναι αυτοί που παίζουν ρόλο και στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης και κυρίως ο παράγοντας *grr1* (Bailey and Woodward 1984, Bisson 1988, Flick and Johnston 1991, Ozcan et al. 1993, Erickson and Johnston 1994, Ozcan and Johnston 1995, Teusink et al. 1997). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα γονίδια *snf3* και *rgt2* παίζουν ρόλο στο σηματοδοτικό μηχανισμό του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη (Ozcan and Johnston 1996, Ozcan et al. 1997, Ozcan et al. 1998). Όμως έχει αποδειχθεί ότι για τη λειτουργία του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη δεν χρειάζεται η πρόσληψή της (Liang and Gaber 1996, Reifenberg et al. 1997). Επιπλέον, αν και πιστευόταν ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου είναι το σήμα για τη λειτουργία του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη (Teusink et al. 1997), πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι είτε η εξωτερική είτε η εσωτερική γλυκόζη είναι το σήμα για τη λειτουργία του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη (Meijer et al. 1998).

Ακόμα, έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές ότι η εξοκινάση PII παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη. Ο Entian το 1980 μελέτησε μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν περιέχουν εξοκινάση PII και έδειξε ότι δεν διαθέτουν το σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη. Ο ίδιος ερευνητής το 1984 απέδειξε ότι η εξοκινάση PII είναι απαραίτητη για το σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη και όχι η εξοκινάση PI, άποψη η οποία ενισχύθηκε από τον Ma και τους συνεργάτες του το 1989.

Έχει αναφερθεί (Entian and Frohlich 1984) ότι η εξοκινάση PII συμμετέχει στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη ανεξάρτητα από την φωσφορυλιωτική της δράση. Έχει δηλαδή δύο ανεξάρτητες λειτουργίες. O Rose και οι συνεργάτες του όμως το 1990 απέδειξαν ότι η μείωση της δραστηριότητας της εξοκινάσης PII, με έλλειμμα στον προαγωγό του γονιδίου που την κωδικεύει, οδηγεί σε μείωση της καταστολής από τη γλυκόζη της μαλτάσης και της ινβερτάσης. Το γεγονός αυτό δεν στηρίζει την υπόθεση ότι υπάρχει ένα ειδικό ρυθμιστικό τμήμα στην εξοκινάση PII ανεξάρτητο από το καταλυτικό κέντρο. Επίσης, όταν οι δύο εξοκινάσες (PI, PII) δεν είναι δραστικές φαίνεται μια επιπλέον μείωση του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη. Αυτό σημαίνει ότι η εξοκινάση PI έχει επίσης κάποια λειτουργία στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η συνθάση της 6-P-τρεχαλόζης ρυθμίζει αρνητικά την πρόσληψη της γλυκόζης και κατ'επέκταση τη γλυκολυτική πορεία και το σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη (Thevelin and Hohmann 1995).

Ένας παράγοντας που παίζει σημαντικότερο ρόλο στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη στον *S. cerevisiae*, είναι ο καταστολέας *miG1* (multicopy inhibitor) της έκφρασης των γονιδίων *GAL* (Klein et al. 1998, Carlson 1998). Ο καταστολέας *miG1* συνδέεται στους προαγωγούς των γονιδίων *SUC2* (Nehlin et al. 1990), *GAL* (Nehlin et al. 1991) αλλά και πολλών άλλων γονιδίων του κεντρικού (γλυκόλυση, κύκλος του Krebs) και του περιφερικού μεταβολισμού (Klein et al. 1998) και παρεμποδίζει την μεταγραφή τους. Πρόσφατα, έχει απομονωθεί ένας δεύτερος καταστολέας, ο *miG2*, ο



οποίος πιστεύεται ότι συμμετέχει στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη και δείχνει 71% ομολογία με τον καταστολέα *mig1* (Lutfiyya and Johnston 1996). Ο καταστολέας *mig2* προσδέεται σε αρκετές από τις θέσεις πρόσδεσης του καταστολέα *mig1* αλλά η δράση του δεν φαίνεται να ρυθμίζεται από τη γλυκόζη, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του *mig1* (Lutfiyya et al. 1998).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η δράση του καταστολέα *mig1* αναστέλλεται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνικών κινασών (*Snf1* protein kinase complex) το οποίο συμμετέχει στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη (Carlson 1998). Το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλεγμα είναι απαραίτητο για την μεταγραφή των γονιδίων που καταστέλλονται από τη γλυκόζη και εκφράζεται απουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο.

Εκτός από τη σηματοδοτική πορεία στην οποία συμμετέχει το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα *Snf1*, έχει βρεθεί ότι στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς του συστήματος καταστολής από τη γλυκόζη σημαντικό ρόλο παίζει και η σηματοδοτική πορεία *Ras*.

Δύο *Ras* πρωτεΐνες, η *Ras1p* και η *Ras2p*, είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στη σηματοδοτική πορεία *Ras* στον *S. cerevisiae*, της οποίας τα στοιχεία έχουν προσδιοριστεί πλήρως αλλά η λειτουργία τους δεν είναι ακόμα πλήρως ξεκαθαρισμένη (Jiang et al. 1998).

Όπως και σε άλλους οργανισμούς, οι πρωτεΐνες *Ras* του *S. cerevisiae*, μεταδίδουν ένα ρυθμιστικό σήμα όταν μετατρέπονται από την ανενεργή (συνδεδεμένες με GDP) στην ενεργή τους μορφή (συνδεδεμένες με GTP). Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες *Ras* διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση, η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *CYR1*, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) στο εσωτερικό του κυττάρου (Toda et al. 1985, De Venditis et al. 1986, Field et al. 1988). Το κυκλικό AMP ελευθερώνει την c-AMP-εξαρτώμενη κινάση A (PKA) από ένα ρυθμιστικό αναστολέα ο οποίος κωδικεύεται από το γονίδιο *BCY1* (Matsumoto et al. 1987, Toda et al. 1987). Η c-AMP-εξαρτώμενη κινάση A κωδικεύεται από τα γονίδια *TK1*, *TK2* και *TK3*.

Η ενεργή PKA φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεταγραφή του DNA, στην κυτταρική διαίρεση και στην συσσώρευση γλυκογόνου και τρεχαλόζης στο εσωτερικό των κυττάρων του *S. cerevisiae* (Jiang et al. 1998).

Η γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων του *S. cerevisiae* σε πλούσια θρεπτικά μέσα συνδέεται με την αυξημένη δραστηριότητα της σηματοδοτικής πορείας Ras. Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του cAMP είναι μεγαλύτερη σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν γλυκόζη (πλούσια) παρά σε αυτά που δεν περιέχουν (φτωχά) (Russell et al. 1993). Οι πρωτεΐνες Ras τροποποιούν τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP ανάλογα με την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών του περιβάλλοντος.

Η προσθήκη της γλυκόζης σε ένα φτωχό θρεπτικό μέσο προκαλεί γρήγορη αύξηση των επιπέδων του cAMP στο εσωτερικό των κυττάρων. Η αύξηση αυτή επιτυγχάνεται με διέγερση από τη γλυκόζη ενός παράγοντα (Cdc25p) ο οποίος μετατρέπει τη πρωτεΐνη Ras από την ανενεργή, στην ενεργή της μορφή με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση (Broek et al. 1987). Μεταλλαγμένα στελέχη Ras περιέχουν φυσιολογικά επίπεδα ενδοκυτταρικού cAMP άλλα δεν μπορούν να τα αυξήσουν όταν προστίθεται γλυκόζη σε ένα φτωχό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά όταν αναπτύσσονται σε ένα φτωχό θρεπτικό μέσο και μεταφερθούν σε ένα πλούσιο δεν αναπτύσσονται αμέσως. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι για την γρήγορη προσαρμογή και άμεση ανάπτυξη των κυττάρων του *S. cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη (όταν έχουν αναπτυχθεί σε ένα θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει γλυκόζη), είναι απαραίτητη η μεταφορά ρυθμιστικών σημάτων μέσω της σηματοδοτικής πορείας Ras.

Η γλυκόζη είναι η προτιμώμενη πηγή άνθρακα και για το βακτήριο *B. subtilis*. Όταν η γλυκόζη είναι παρούσα στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, η χρησιμοποίηση άλλων υποστρωμάτων καταστέλλεται. Αυτό επιτυγχάνεται με καταστολή των προαγωγών των οπερονίων που περιέχουν γονίδια τα οποία κωδικεύουν ένζυμα για την χρησιμοποίηση άλλων πηγών άνθρακα εκτός της γλυκόζης (Chauvaux et al. 1998).



Στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη του βακτηρίου *B. subtilis*, συμμετέχουν τα εξής στοιχεία:

- 1) Τα οπερόνια *amyE*, *glgR*, *xylA*, *nutA*, *acsA* και *acuA*, τα οποία είναι απαραίτητα για την χρησιμοποίηση υποστρωμάτων από το *B. subtilis* όπως αμυλόζη, γλυκονικό οξύ, ξυλάνη, ιστιδίνη, οξικό οξύ και ακετοΐνη αντίστοιχα, περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (αλληλουχίες *cre*) οι οποίες έχουν *cis* επίδραση στους προαγωγούς των οπερονίων αυτών, καταστέλλοντας έτσι την μεταγραφή τους (Chauvaux et al. 1998).
- 2) Η πρωτεΐνη Hpr του συστήματος PTS του *B. subtilis* συμμετέχει στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη (Bachem et al. 1997, Chauvaux et al. 1998, Reizer et al. 1998).
- 3) Η πρωτεΐνη CspA έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην καταστολή πάνω από 12 οπερονίων στο *B. subtilis*. Η πρωτεΐνη CspA είτε από μόνη της είτε συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη HPr, συνδέεται στις αλληλουχίες *cre* και τις προστατεύει από τη δράση της DNAσης I (Chauvaux et al. 1998).
- 4) Η πρωτεΐνη CspB συμμετέχει παράλληλα ή εναλλακτικά με την πρωτεΐνη CspA χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό. Η ανάμιξη της πρωτεΐνης CspB παρατηρείται μόνο σε κύτταρα του *B. subtilis* τα οποία αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό ή σε υγρό θρεπτικό υλικό υπό πολύ ήπια ανακίνηση (Chauvaux et al. 1998).
- 5) Ο συμμεταφορέας πρωτονίων γλυκόζης/μαννόζης (GlcP, δεύτερο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης στο *B. subtilis*) έχει αναφερθεί (Paulsen et al. 1998) ότι πιθανά εμπλέκεται στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη.

Όσον αφορά την ανάμιξη της πρωτεΐνης Hpr στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη έχει αναφερθεί ότι αυτή μπορεί να δράσει με δύο τρόπους (Chauvaux et al. 1998):

1) Όταν η πρωτεΐνη Hpr φωσφορυλιώνεται στην His-15, μια αντίδραση η οποία εξαρτάται από την πρωτεΐνη EI και το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP), συμμετέχει στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης PTS στο *B. subtilis*.

2) Όταν η πρωτεΐνη Hpr φωσφορυλιώνεται στην Ser-46, μια αντίδραση η οποία εξαρτάται από μία ATP-εξαρτημένη κινάση (PtsK), συμμετέχει στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη. Η κινάση PtsK είναι απαραίτητη στο σύστημα καταστολής από τη γλυκόζη γιατί μεταλλαγμένα στελέχη *B. subtilis* τα οποία δεν την περιέχουν δεν παρουσιάζουν καταστολή των οπερονίων τους από τη γλυκόζη (Reizer et al. 1998). Ακόμα, έχει αναφερθεί (Reizer et al. 1998) ότι η πρωτεΐνη PtsK ενεργοποιείται αλλοστερικά από διάφορους μεταβολίτες όπως το 1,6-διφωσφορικό οξύ.

Το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη PtsK (*ptsK*) έχει απομονωθεί και έχει βρεθεί ότι βρίσκεται σε οπερόνιο με άλλα 4 γονίδια, τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες με άγνωστη λειτουργία (Reizer et al. 1998).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το βακτήριο *P. aeruginosa* προτιμάει να καταβολίζει κάποιο τρικαρβοξυλικό οξύ, ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs, παρά τη γλυκόζη. Όπως οι οργανισμοί που προτιμούν να καταβολίζουν γλυκόζη, έτσι και το βακτήριο *P. aeruginosa* εμφανίζει σύστημα καταστολής όπου ο καταστολέας είναι όχι η γλυκόζη αλλά τα τρικαρβοξυλικά οξέα. Το σύστημα αυτό επιτρέπει στο *P. aeruginosa* να καταβολίζει κατά προτίμηση τα τρικαρβοξυλικά οξέα από ότι τους υδρογονάνθρακες.

Όταν το βακτήριο *P. aeruginosa* αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει κάποιο σάκχαρο και ένα τρικαρβοξυλικό οξύ ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs, τότε το σύστημα πρόσληψης των σακχάρων και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό τους καταστέλλονται ισχυρά (Hylemon et al.



1972, Wolff et al. 1991). Στην περίπτωση όμως που στο θρεπτικό μέσο περιέχεται μια μικρή ποσότητα τρικαρβοξυλικού οξέος και πολύ μεγάλη ποσότητα σακχάρου παρατηρείται διαυξητική ανάπτυξη του *P. aeruginosa* (Wolff et al. 1991).

Τα οξέα που καταστέλλουν το σύστημα πρόσληψης και του μεταβολισμού των σακχάρων είναι: το ηλεκτρικό, το οξαλοξικό, το κιτρικό, το α-κετογλουταρικό, το φουμαρικό και το μηλικό οξύ, ενώ δεν καταστέλλονται από το γλουταμινικό, το πυροσταφυλικό και το γαλακτικό οξύ (Hylemon and Phibbs 1972, Wolff et al. 1991)

Ο Wolf και οι συνεργάτες του το 1991 (Wolff et al. 1991) απομόνωσαν μεταλλαγμένα στελέχη *P. aeruginosa* τα οποία δεν διαθέτουν το σύστημα καταστολής από τα τρικαρβοξυλικά οξέα. Τα ένζυμα του καταβολισμού των σακχάρων καθώς και τα συστήματα μεταφοράς στα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη δεν καταστέλλονται από την παρουσία του ηλεκτρικού οξέος, αλλά παρ'όλα αυτά η δράση τους παραμένει επαγωγίμη από τη γλυκόζη και δεν είναι συνεχής όπως ακριβώς συμβαίνει και στον φυσικό τύπο. Άρα, η επαγωγή από τη γλυκόζη των μεταφορέων της και των ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας είναι μια ανεξάρτητη ρυθμιστική διαδικασία και δεν εξαρτάται από την καταστολή τους από τα τρικαρβοξυλικά οξέα.

Οι ίδιοι ερευνητές απομόνωσαν το ρυθμιστικό γονίδιο *crc* το οποίο όταν εκφράζεται στα παραπάνω μεταλλαγμένα στελέχη αναπληρώνει το σύστημα καταστολής από τα τρικαρβοξυλικά οξέα. Το γονίδιο αυτό είναι ανεξάρτητο από τα άλλα ρυθμιστικά γονίδια που συμμετέχουν στην επαγωγή από την γλυκόζη του συστήματος πρόσληψης και καταβολισμού της.

Επιπρόσθετα, στα παραπάνω μεταλλαγμένα στελέχη δεν φαίνεται να έχει καταστραφεί το διαυξητικό φαινόμενο, άρα το φαινόμενο αυτό πρέπει να είναι πιο πολύπλοκο και να εμπλέκει και άλλους παράγοντες εκτός από την καταστολή της μεταφοράς και καταβολισμού σακχάρων από τα τρικαρβοξυλικά οξέα.

1.4 Η ανθεκτικότητα μικροοργανισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης

Η έκθεση των μικροοργανισμών σε υπεροσμωτικά μέσα οδηγεί αρχικά σε μία μεγάλη εκροή νερού στο θρεπτικό μέσο. Η εκροή αυτή οφείλεται στις διαφορετικές ενεργότητες νερού στο εσωτερικό και στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου.

Ένας γενικός μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για να αντισταθούν στην εκροή νερού όταν αναπτύσσονται σε αυξημένες οσμωτικές πιέσεις, είναι η συσσώρευση στο εσωτερικό τους ουσιών που δημιουργούν υπεροσμωτικά διαλύματα. Αυτές οι ουσίες ονομάζονται συμβατές διαλυμένες ουσίες και μπορούν να συσσωρευτούν στο εσωτερικό του κυττάρου χωρίς να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των ενζύμων του μεταβολισμού (Nevoigt and Stahl 1997). Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συμβατές διαλυμένες ουσίες είναι: α) ιόντα β) αμινοξέα και γ) πολυϋδροξυλικές ενώσεις (Meikle et al. 1991, Garcia et al. 1997).

Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* είναι ο μόνος οργανισμός στον οποίο έχει μελετηθεί η ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η ανθεκτικότητα αυτή έχει συνδεθεί με την ανθεκτικότητα του *S. cerevisiae* σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις γενικά και έχει αναφερθεί ότι επιτυγχάνεται, ως επί το πλείστον, μέσω μηχανισμών οσμωρύθμισης.

Η γλυκερόλη είναι η πιο συνηθισμένη συμβατή διαλυμένη ουσία στον *S. cerevisiae* (Reed et al. 1987, Meikle 1991).

Η γλυκερόλη παράγεται με αναγωγή της φωσφορικής διϋδροξυκετόνης σε 3-P-γλυκερόλη μέσω του κυττοσολικού ενζύμου αφυδρογονάση της 3-P-γλυκερόλης (ctGPP), η οποία ακολουθείται από την αποφωσφορυλίωση της 3-P-γλυκερόλης μέσω μίας ειδικής φωσφατάσης (GPP) (Gancedo et al. 1968, Σχήμα 4).

Το ένζυμο ctGPP βρίσκεται με τη μορφή δύο ισοενζύμων στον *S. cerevisiae*. Το ένα ισοένζυμο κωδικεύεται από το γονίδιο *GPD1* (Albertyn et



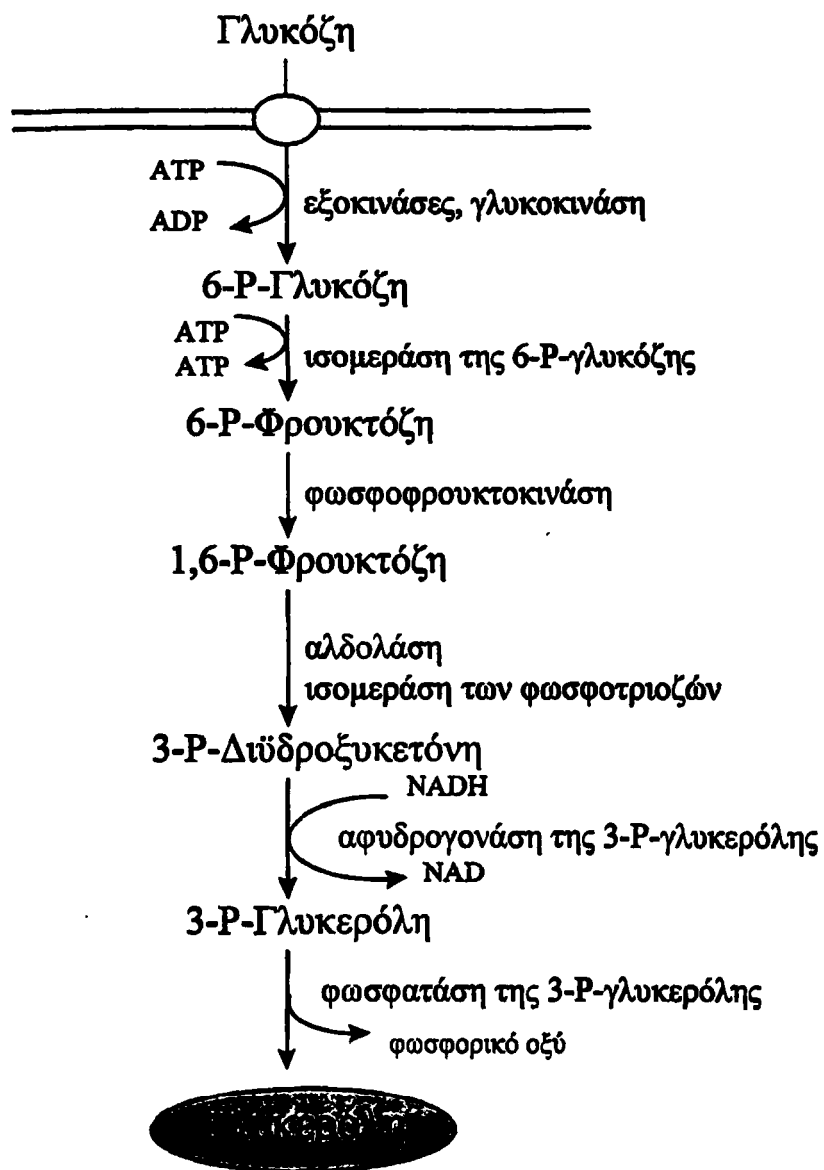
al. 1994a) και το άλλο από το γονίδιο *GPD2* (Eriksson et al. 1995). Το ένζυμο GPP βρίσκεται επίσης με τη μορφή δύο ισοενζύμων στον *S. cerevisiae* που κωδικοούνται από τα γονίδια *GPP1* και *GPP2* (Norbeck et al. 1996).

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή της γλυκερόλης είναι υψηλότερη όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει γλυκόζη (Andre et al. 1991). Παρ'όλα αυτά, τα ένζυμα ctGPP και GPP ρυθμίζονται διαφορετικά από τη γλυκόζη. Το ένζυμο GPP επάγεται από τη γλυκόζη, γεγονός το οποίο συμφωνεί με την αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης παρουσία γλυκόζης (Gancedo et al. 1968, Blomberg et al. 1989). Παραδόξως, το ένζυμο ctGPP καταστέλλεται από τη γλυκόζη (Andre et al. 1991, Albertyn et al. 1994a). Η καταστολή αυτή γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου *GPD1*, ενώ η μεταγραφή του γονιδίου *GPD2* δεν καταστέλλεται από τη γλυκόζη (Albertyn et al. 1994a, Albertyn et al. 1994b, Eriksson et al. 1995).

Ο ρόλος της γλυκερόλης ως συμβατή διαλυμένη ουσία σε υπεροσμωτικό θρεπτικό μέσο που περιέχει άλλες πηγές άνθρακα εκτός της γλυκόζης δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένος. Σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν αιθανόλη (Andre et al. 1991) ή γαλακτόζη (Garcia et al. 1997) η εσωτερική συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι 30% μικρότερη, συγκρινόμενη με αυτή που περιέχεται σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε γλυκόζη. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε γαλακτόζη και υψηλή συγκέντρωση αλάτων συσσωρεύεται τρεχαλόζη (Garcia et al. 1997). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η τρεχαλόζη δρα και αυτή ως συμβατή διαλυμένη ουσία στον *S. cerevisiae*. Επιπρόσθετα, σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε γλυκόζη και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και βρίσκονται στη στατική φάση, η εσωτερική συγκέντρωση της γλυκερόλης μειώνεται σημαντικά (Meikle et al. 1991). Αντίθετα, σε αυτές τις συνθήκες η εσωτερική συγκέντρωση της τρεχαλόζης αυξάνεται (Nevoigt and Stahl 1997).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η συσσώρευση της γλυκερόλης δεν είναι ο μόνος τρόπος επιβίωσης των κυττάρων σε υπεροσμωτικά μέσα αλλά είναι

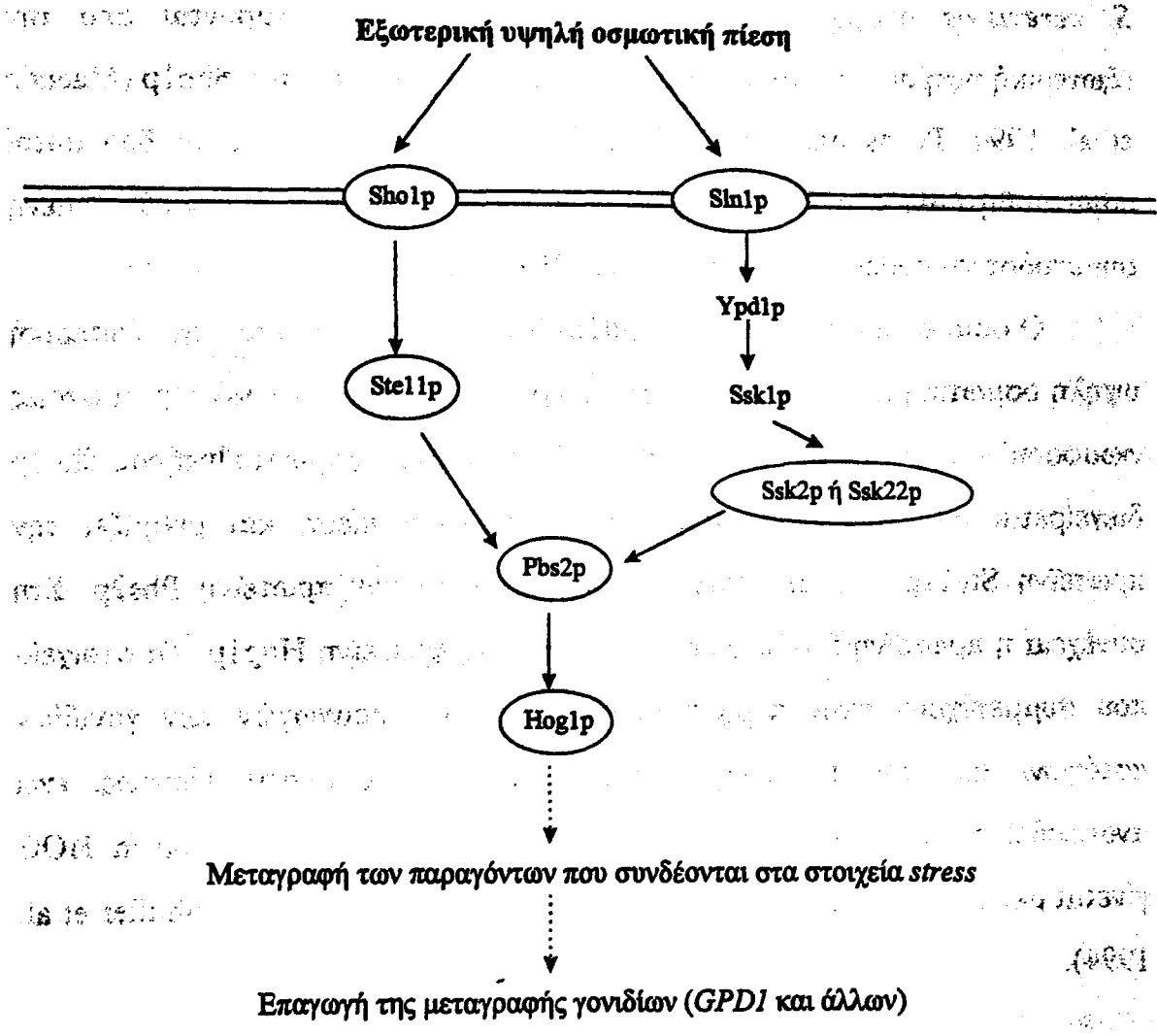
ουσιαστική στη διατήρηση των βιολογικών δραστηριοτήτων του κυττάρου κατά τη διάρκεια της οσμωρύθμισης.



ΣΧΗΜΑ 4: Η παραγωγή της γλυκερόλης από τη γλυκόζη στον *S. cerevisiae*.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα κατά την οσμωρύθμιση στον *S. cerevisiae*. Στη μεμβράνη του *S. cerevisiae* υπάρχουν δύο οσμωαισθητήρες που διεγείρονται από την εξωτερική υψηλή οσμωτική πίεση, ο Sln1p-Ypd1p-Ssk1p και ο Sho1p (Maenda et al. 1994, Posas and Saito 1997, Σχήμα 5). Στη συνέχεια οι δύο αυτοί οσμωαισθητήρες αλληλεπιδρούν με μία ειδική οσμωρυθμιζόμενη σηματοδοτική πορεία: την πορεία HOG (Brewster et al. 1993, Σχήμα 5).

Ο οσμωαισθητήρας Sln1p-Ypd1p-Ssk1p διεγείρεται από την εξωτερική υψηλή οσμωτική πίεση και ρυθμίζει τις πρωτεΐνες Ssk1p και Ssk22p οι οποίες φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Pbs2p. Αντίστοιχα, ο οσμωαισθητήρας Sho1p διεγείρεται από την εξωτερική υψηλή οσμωτική πίεση και ρυθμίζει την πρωτεΐνη Ste11p η οποία επίσης φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Pbs2p. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη Pbs2p φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Hog1p. Τα στοιχεία που συμμετέχουν στην περαιτέρω ρύθμιση των προαγωγών των γονιδίων «στόχων» από την πρωτεΐνη Hog1p είναι ακόμα άγνωστα. Πάντως, έχει αναφερθεί ότι η οσμω-επαγωγή των γονιδίων «στόχων» στην πορεία HOG γίνεται μέσω ειδικών στοιχείων που ονομάζονται στοιχεία *stress* (Shuller et al. 1994).



ΣΧΗΜΑ 5: Η σηματοδοτική πορεία της οσμωρύθμισης στον *S. cerevisiae*.



Η παραπάνω σηματοδοτική πορεία θεωρείται ότι είναι μία πορεία κινασών MAP (mitogen activated protein) (Brewster et al. 1993).

Οι κινάσες MAP είναι σημαντικοί μεσολαβητές κυρίως των ρυθμιστικών σημάτων που μεταφέρονται από την επιφάνεια του κυττάρου στο πυρήνα του, αν και σε ανθρώπινα κύτταρα έχει χαρακτηριστεί μία εξωκυτταρική σηματοδοτική πορεία όπου συμμετέχουν κινάσες MAP (Davis 1994).

Η ρύθμιση από τις κινάσες MAP γίνεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Στον *S. cerevisiae*, εκτός από τη σηματοδοτική πορεία HOG, έχουν βρεθεί και άλλες σηματοδοτικές πορείες όπου συμμετέχουν κινάσες MAP (Davis 1994).

Οι κινάσες MAP ενεργοποιούνται με διπλή φωσφορυλίωση στην θρεονίνη και την τυροσίνη του καταλυτικού τους κέντρου. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται από τις κινάσες των κινασών MAP (MKK), οι οποίες ενεργοποιούνται όταν φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες των κινασών των κινασών MAP (MKKK) (Whitmarsh and Davis 1998).

Οι κινάσες MAP που συμμετέχουν σε διαφορετικές σηματοδοτικές πορείες ενεργοποιούνται από διαφορετικά διακριτά σήματα. Στον *S. cerevisiae*, παρότι χρησιμοποιούνται οι ίδιες κινάσες MAP, σε διαφορετικές σηματοδοτικές πορείες έχουν διαφορετική λειτουργία (Whitmarsh and Davis 1998).

Ένας σημαντικός μηχανισμός που ρυθμίζει την μεταφορά των σημάτων, είναι η δημιουργία συμπλόκων μεταξύ στοιχείων που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες σηματοδοτικές πορείες, ή μεταξύ σηματοδοτικών μορίων και πρωτεϊνών πρόσδεσης ή δομικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης τοποθετούν τα στοιχεία που προσδέονται σε αυτές σε ειδικά υποκυτταρικά διαμερίσματα ή ειδικά υποστρώματα ενώ οι δομικές πρωτεΐνες συνδέουν τα σηματοδοτικά μόρια και δημιουργούν πολυενζυμικά σύμπλοκα. Τέτοιες δομικές πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη σηματοδοτική πορεία HOG στον *S. cerevisiae* (Whitmarsh and Davis 1998).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Το βακτήριο *Zygomonas mobilis*

2.1 Ιστορική αναδρομή

Το βακτήριο *Z. mobilis* απομονώθηκε αρχικά το έτος 1911 από τους Barker και Hillier, οι οποίοι απέδωσαν σε αυτό την «ασθένεια του μηλίτη οίνου» (cider sickness). Το στέλεχος που απομονώθηκε ονομάστηκε στέλεχος A. Αργότερα, τα έτη 1945 και 1948 ο Barker απομόνωσε άλλα δύο στελέχη, το B και το C. Το 1950 ο Millis (Millis 1951) απομόνωσε από μηλίτες και αχλαδίτες άλλα 33 στελέχη : τα 27 έμοιαζαν με το στέλεχος B του Barker και τα υπόλοιπα 6 με το στέλεχος C. Η ασθένεια του μηλίτη οίνου οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάπτυξή του βακτηρίου *Z. mobilis* ευνοείται από την υψηλή θερμοκρασία που απαιτείται για την αποθήκευση του μηλίτη οίνου και από τα σάκχαρα που έχουν παραμείνει. Κατά την ανάπτυξη όμως του βακτηρίου παράγονται μεγάλες ποσότητες ακεταλδεύδης η οποία αλλοιώνει τη γεύση του μηλίτη.

Οι Barker and Hillier δεν έδωσαν λατινικό όνομα στο βακτήριο που απομόνωσαν. Γι' αυτό η ανακάλυψη του βακτηρίου *Z. mobilis* αποδίδεται στον



Lindner, ο οποίος το απομόνωσε από το μεξικάνικο ποτό pulque (4-6% αιθανόλη, παράγεται από τη ζύμωση του κακτοειδούς φυτού *Agave atrovirens*) και το μελέτησε διεξοδικά (Lindner 1928). Ο Lindner ονόμασε το βακτήριο που απομόνωσε *Termobacterium mobile*.

Το έτος 1950 ο Shimwell απομόνωσε από το ζύθο το βακτήριο *Z. mobilis* και το θεώρησε ως επιμολυντή γιατί έδινε δυσάρεστη γεύση και άρωμα, λόγω της ακεταλδεύδης που παράγει.

Το έτος 1972 ο Gonzales de Lima και οι συνεργάτες του απομόνωσαν το βακτήριο από χυμό σακχαροκάλαμου που είχε υποστεί ζύμωση. Επίσης, αναφέρεται η απομόνωση του βακτηρίου από μέλι ή από μέλισσες (Ruiz-Argueso and Rodrigued-Navarro 1975).

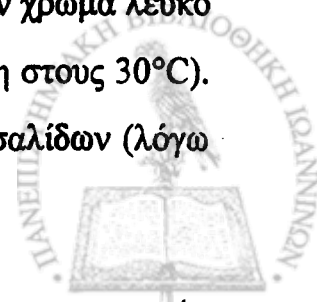
Οι Swings and Delay (1977) εντόπισαν το βακτήριο σε χυμό φοινικόδεντρου ο οποίος έχει υποστεί ζύμωση.

Έχει αναφερθεί ότι στο παρελθόν το *Z. mobilis* χρησιμοποιήθηκε για θεραπευτικούς σκοπούς (Gonzales de Lima 1972, Swings and Delay 1977). Σήμερα το βακτήριο *Z. mobilis* παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης του παραγωγικότητας σε αιθανόλη σε σχέση με αυτή του παραδοσιακού ζυμομύκητα *S. cerevisiae* (5 φορές μεγαλύτερη), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική πηγή ενέργειας.

2.2 Μορφολογία και άλλες ιδιότητες του *Z. mobilis*

Το βακτήριο *Z. mobilis* είναι αρνητικό κατά Gram και προαιρετικά αναερόβιο. Τα κύτταρα του έχουν μήκος 1-6 μm και πλάτος 1-1.4 μm και σχηματίζουν συνήθως ζευγάρια. Τα κύτταρα ενός μικρού ποσοστού των στελεχών έχουν 1-4 πολικά μαστίγια στα οποία οφείλουν την κίνηση τους.

Οι αποικίες που σχηματίζει το *Z. mobilis* σε τρυβλία έχουν χρώμα λευκό ή υπόλευκο και διάμετρο 1-2 mm (μετά από δύο μέρες ανάπτυξη στους 30°C). Η ανάπτυξη του βακτηρίου συνοδεύεται από την παραγωγή φυσαλίδων (λόγω



παραγωγή πολυμερών φρουκτόζης (λεβάνης) (Swings and Delay 1977, Park et al. 1983).

Ακόμα, το *Z. mobilis* παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικινίλη, πενικιλίνη, γκενταμυκίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη και νεομυκίνη (Swings and Delay 1977).

2.3 Ζύμωση υδατανθράκων στο *Z. mobilis*

Το βακτήριο *Z. mobilis* καταβολίζει μόνο γλυκόζη, φρουκτόζη ή σακχαρόζη, και παράγει αιθανόλη και CO₂ χρησιμοποιώντας τη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff (KDGP) (Conway 1992). Η γλυκολυτική αυτή πορεία είναι τόσο αποτελεσματική, που 1 mole γλυκόζης μετατρέπεται σε 2 mole αιθανόλης και 2 mole διοξειδίου του άνθρακα με παράλληλη παραγωγή ενός μόνο mole ATP (Algar and Scopes 1985). Άλλες πηγές άνθρακα όπως: άμυλο, δεξτρίνη, ραφινόζη, D-τρεχαλόζη, μαλτόζη, λακτόζη, D-κελοβιόζη, D-γαλακτόζη, D-μαννόζη, D-σορβόζη, L-ραμνόζη, D και L-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ριβόζη, D-σορβιτόλη, δουλσιτόλη, D-μανιτόλη, αδονιτόλη, ερυθριτόλη, γλυκερόλη, αιθανόλη, D-γαλακτουρονικό νάτριο, DL-μηλικό νάτριο, ηλεκτρικό νάτριο, DL-γαλακτικό νάτριο, πυροσταφυλικό νάτριο, ταρταρικό νάτριο και κιτρικό νάτριο, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το *Z. mobilis*.

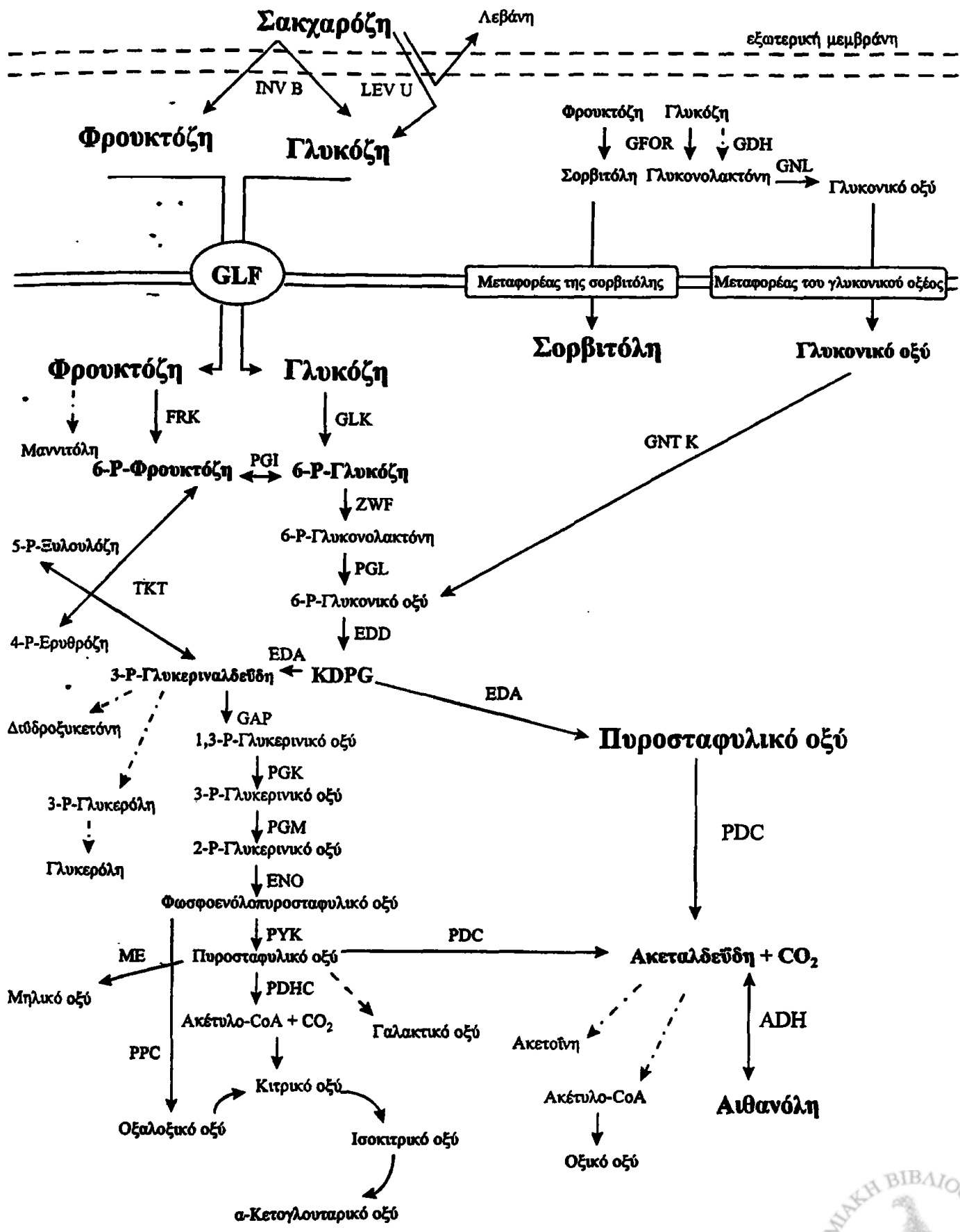
Η ζύμωση της σακχαρόζης από το *Z. mobilis*, φαίνεται στο Σχήμα 6 (Bringer-Meyer and Sahm 1987, Sprenger 1993, Sprenger 1996). Όταν το *Z. mobilis* αναπτύσσεται σε σακχαρόζη, μετατρέπει το δισακχαρίτη σε γλυκόζη και φρουκτόζη χρησιμοποιώντας τρία ένζυμα: μία εξωκυτταρική λεβανσακχαράση (LevU ή SacB) η οποία καταλύει την παραγωγή λεβάνης (πολυμερή φρουκτόζης) και γλυκόζης, μία εξωκυτταρική ινβερτάση (InvB ή SacC), η οποία καταλύει την παραγωγή γλυκόζης και φρουκτόζης (Park et al. 1983, Viikari 1984, Preziosi et al. 1990, Preziosi et al. 1990, Yoshinori et al. 1990, Yanasse et al. 1992), και μία δεύτερη ενδοκυτταρική ινβερτάση (InvA ή

1990, Yanasse et al. 1992), και μία δεύτερη ενδοκυτταρική ινβερτάση (InnA ή SacA), της οποίας ο ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί. Το γονίδιο που κωδικεύει τη δεύτερη αυτή ινβερτάση (*SacA*) έχει κλωνοποιηθεί και έχει εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli*, αναπληρώνοντας την δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής ινβερτάσης (Gunasekaran et al. 1990). Παραμένει όμως ασαφές αν μία ενδοκυτταρική ινβερτάση είναι απαραίτητη για το *Z. mobilis*, γιατί η σακχαρόζη δεν φαίνεται να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Τα ένζυμα LevU και InnB παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και τα γονίδια που κωδικεύουν τα ένζυμα αυτά έχουν απομονωθεί ως σύμπλεγμα (Song et al. 1993, Gunasekaran 1995, Kyono 1995). Και τα δύο ένζυμα δεν διαθέτουν σηματοδοτικά πεπτίδια τα οποία είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε πρωτεΐνες που εκκρίνονται. Έχουν βρεθεί όμως δύο γονίδια τα οποία θεωρείται ότι συμμετέχουν στο ειδικό σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών (Oda et al. 1994, Kondo et al. 1994).

Εκτός από τη λεβάνη, ένα από τα κύρια παραπροϊόντα που παράγονται κατά την ανάπτυξη του *Z. mobilis* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει σακχαρόζη ή μίγματα φρουκτόζης και γλυκόζης είναι η σορβιτόλη. Η σορβιτόλη παράγεται σε ποσοστά πάνω από 11% της αρχικής ποσότητας της σακχαρόζης (Barrow et al. 1984, Viikari 1984, Viikari 1984, Bringer-Meyer 1985). Όταν η πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο είναι μόνο η γλυκόζη ή η φρουκτόζη τότε παράγεται σορβιτόλη, αλλά σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες (Barrow et al. 1984, Viikari et al. 1984).

Η σορβιτόλη παράγεται από την φρουκτόζη μέσω του ενζύμου οξειδοορεδουκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης (GFOR, Zachariou and Scopes 1986). Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονολακτόνη και της φρουκτόζης σε σορβιτόλη και εντοπίζεται στο περίπλασμα (Loos et al. 1991, Aldrich et al. 1992). Το γονίδιο που κωδικεύει το ένζυμο της οξειδοορεδουκτάσης (*gfo*) έχει απομονωθεί (Kamagasundaram et al. 1992).





ΣΧΗΜΑ 6: Ο μεταβολισμός της σακχαρόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*.

ADH: αλκοολική αφυδρογονάση I και II

EDA: αλδολάση του 2-κετο-3-δεοξυ-6-P-γλυκονικού οξέος (KDPG)

EDD: δεϋδρατάση του 6-P-γλυκονικού οξέος

ENO: ενολάση

FRK: φρουκτοκινάση

GAP: αφυδρογονάση της 3-P-γλυκεριναλεύδης

GDH: αφυδρογονάση της γλυκόζης

GFOR: οξειδοορεδουκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης

GLF: μεταφορέας της γλυκόζης

GLK: γλυκοκινάση

GNL: γλυκονολακτονάση

GNT K: κινάση του γλυκονικού οξέος

INV B: ινβερτάση B (εξωκυτταρική)

LEV U: λεβανσακχαράση

ME: μηλικό ένζυμο

PDC: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση

PDHC: Σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος

PGI: ισομεράση της 6-P-γλυκόζης

PGK: κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος

PGL: φωσφογλυκονολακτονάση

PGM: φωσφογλυκερική μουτάση

PPC: φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυλάση

PYK: πυροσταφυλική κινάση

TKT: τρανσκετολάση

ZWF: αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης

Η GFOR σχηματίζεται ως μία προ-πρωτεΐνη που περιέχει ένα ασυνήθιστα μεγάλο σηματοδοτικό πεπτίδιο 52 αμινοξέων (Kamagasundaram et al. 1992) το οποίο μάλλον δεν παίζει σημαντικό ρόλο γιατί η GFOR μπορεί να εκκριθεί χρησιμοποιώντας άλλα σηματοδοτικά πεπτίδια (Wiegert et al. 1996). Όταν το γονίδιο *gfo* εκφράζεται στο βακτήριο *E. coli* παράγεται μια προ-GFOR στο κυτοσόλιο του βακτηρίου (Wiegert et al. 1997).

Η γλυκονολακτόνη που παράγεται από την οξειδοορεδουκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης, μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ μέσω του



περιπλασμικού ένζυμου γλυκονολακτονάση, της οποίας το γονίδιο έχει απομονωθεί (Kanagasundaran and Scopes 1992). Το γλυκονικό οξύ εισχωρεί στο κύτταρο μέσω ενός μεταφορέα που δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω και αποικοδομείται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (ως συν-υπόστρωμα). Παρ' όλα αυτά, το γλυκονικό οξύ, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μόνη πηγή άνθρακα από το *Z. mobilis* (Strohdeicher et al. 1988), ίσως γιατί δεν μπορούν να σχηματιστούν από αυτό η 6-P-φρουκτόζη και άλλοι μεταβολίτες της γλυκονεογέννεσης.

Η σορβιτόλη που παράγεται κατά την δράση της οξειδοορεδοκτάσης της γλυκόζης-φρουκτόζης, μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενός συστήματος ενεργού μεταφοράς (Loos et al. 1994) και δεν μεταβολίζεται περαιτέρω.

Η γλυκόζη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενός συστήματος διευκολυνόμενης διάχυσης υψηλής ταχύτητας και χαμηλής συγγένειας (DiMarko and Romano 1985). Το γονίδιο που κωδικεύει τον μεταφορέα της γλυκόζης (*glf*) έχει απομονωθεί και βρίσκεται σε ένα οπερόνιο με τρία άλλα γονίδια που κωδικεύουν τα εξής ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff: την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (*zwf*), την δεϋδρατάση του φωσφογλυκονικού οξέος (*edd*) και την γλυκοκινάση (*glk*) (Barnell et al. 1990). Το οπερόνιο αυτό μεταγράφεται σε ένα m-RNA μεγέθους 6.14 kb (Barnell et al. 1992). Όταν το γονίδιο *glf* εκφράζεται σε μεταλλαγμένα στελέχη *E. coli* τα οποία δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη, τα αναπληρώνει, αποδεικνύοντας έτσι ότι το *glf* κωδικεύει ένα πραγματικό μεταφορέα διευκολυνόμενης διάχυσης (Snoep et al. 1994, Weisser et al. 1995, Parker et al. 1995).

Εκτός από την γλυκόζη, μέσω του μεταφορέα GLF μπορεί να μεταφερθεί και η φρουκτόζη αλλά ο μεταφορέας δείχνει μια σαφή προτίμηση για τη γλυκόζη (DiMarko and Romano 1985, Parker 1997). Ακόμα, μέσω του μεταφορέα GLF μπορούν να μεταφερθούν τα εξής σάκχαρα (τα οποία δεν μεταβολίζονται από το *Z. mobilis*): η μαννόζη, η ξυλόζη και το ανάλογο της

γλυκόζης, η 2-δεοξυγλυκόζη (DiMarko and Romano 1985, Weisser et al. 1996).

Όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudorof έχουν απομονωθεί και καθαριστεί (An et al. 1991, Scopes et al. 1985, Scopes 1985, Rodriguez 1996, Neveling 1998).

Ένα από τα πολύ σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας που λαμβάνει χώρα στο βακτήριο *Z. mobilis*, είναι η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση η οποία είναι υπεύθυνη για την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη. Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση έχει απομονωθεί και αποτελεί το 3-4% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης του κυττάρου (Hoppner et al. 1983, Bringer-Meyer et al. 1986). Η δομή και η λειτουργία του ένζυμου έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Diefenbach et al. 1991, Dobritzsch et al. 1998, Candy et al. 1998). Το γονίδιο που κωδικεύει την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση έχει απομονωθεί, έχει αναλυθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του και έχει εκφραστεί στο βακτήριο *E. coli* (Neale et al. 1987, Conway et al. 1987).

Ένα άλλο από τα πολύ σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας που λαμβάνει χώρα στο βακτήριο *Z. mobilis*, είναι η αλκοολική αφυδρογονάση η οποία απαντά με τη μορφή δύο ισοένζυμων, ADHI και ADHII, που καταλύουν τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο το NADH. Τα δύο ισοένζυμα της αλκοολικής αφυδρογονάσης έχουν απομονωθεί (Kinoshita et al. 1985) και έχουν μελετηθεί (An et al. 1991, O' Mullan et al. 1995). Τα γονίδια που κωδικεύουν την ADHI (Keshav et al. 1990) και την ADHII (Conway et al. 1987) έχουν απομονωθεί και έχει αναλυθεί η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.

Εκτός από την απομόνωση των γονιδίων που κωδικεύουν το μεταφορέα της γλυκόζης (*glf*), την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (*zwf*), τη δεϋδρατάση του φωσφογλυκονικού οξέος (*edd*), τη γλυκοκινάση (*glk*), την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (*pdc*) και τα δύο ισοένζυμα της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*aldI*, *aldII*), έχει αναφερθεί και η απομόνωση σχεδόν όλων των υπόλοιπων



γονιδίων της γλυκολυτικής πορείας στο *Z. mobilis* (Conway et al. 1987, Conway and Ingram 1988, Conway et al. 1991, Hesman et al. 1991, Zembruski et al. 1992, Yomano et al. 1993, Sprenger et al. 1993). Πρόσφατα, απομονώθηκε το γονίδιο που κωδικεύει την πυροσταφυλική κινάση (Steiner et al. 1998).

Εκτός από τη λεβάνη και τη σορβιτόλη τα οποία είναι τα κύρια παραπροϊόντα που παράγονται από σακχαρόζη στο *Z. mobilis*, κατά τη ζύμωση της γλυκόζης σε αναερόβιες συνθήκες παράγονται τα εξής παραπροϊόντα σε ασήμαντες ποσότητες: ακετοΐνη, γλυκερόλη, οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ (Viikari 1984). Κατά την ανάπτυξη του *Z. mobilis* σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν φρουκτόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, παράγονται τα εξής παραπροϊόντα: μαννιτόλη, διϋδροξυκετόνη και γλυκερόλη (Viikari and Korhola 1986).

Κατά την ανάπτυξη του *Z. mobilis* σε αερόβιες συνθήκες η παραγωγικότητα του σε αιθανόλη μειώνεται σημαντικά (Bringer et al. 1984, Bringer and Sahm 1987). Επιπλέον, η ικανότητα του να αναπτύσσεται παρουσία οξυγόνου δεν συνοδεύεται από μεγαλύτερη κυτταρική απόδοση και από μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τις αναερόβιες συνθήκες. Αντίθετα η αύξηση του αερισμού και της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα οδηγεί στη σαφή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης (Bringer et al. 1984, Bringer and Sahm 1987). Πρόσφατα όμως έχει αναφερθεί η αύξηση της μοριακής απόδοσης στο *Z. mobilis*, όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία οξυγόνου (Zikmanis et al. 1997).

Έχει αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της αερόβιας ανάπτυξης στο *Z. mobilis*, δύο ένζυμα τα οποία είναι συνδεδεμένα με τη μεμβράνη λειτουργούν χρησιμοποιώντας το οξυγόνο: η NAD(P)H αφυδρογονάση και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (Bringer et al. 1984, Bringer and Sahm 1987, Doelle et al. 1993). Τα δύο αυτά ένζυμα οδηγούν στην αναγωγή του οξυγόνου σε νερό με την παράλληλη οξείδωση της γλυκόζης (Strohdeicher et al. 1990) ή του NAD(P)H (Bringer et al. 1984). Στο βακτήριο *Z. mobilis* λαμβάνει χώρα

οξειδωτική φωσφορυλίωση και φαίνεται ότι τα δύο παραπάνω ένζυμα συμμετέχουν σε αυτή (Strohdeicher et al. 1990, Doelle et al. 1993, Kalneniens et al. 1993). Επιπρόσθετα, το *Z. mobilis* φαίνεται να έχει κυτοχρώματα τύπου a, b και c (Swings and Delay 1977, Doelle et al. 1993) και η ουβικινόνη-10 φαίνεται να είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση του NAD(P) ή της γλυκόζης (Strohdeicher et al. 1990).

Ακόμα, η παραγωγή οξικού οξέος αυξάνεται παρουσία οξυγόνου (Bringer et al. 1984, Doelle et al. 1993). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του οξικού οξέος, έχει απομονωθεί (NADP⁺-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της ακεταλδεϋδης) και έχει αναφερθεί ότι είναι ένα κυτοπλασμικό ένζυμο (Doelle et al. 1993).

Όσον αφορά τις αναβολικές διαδικασίες στο *Z. mobilis*, η πορεία των φωσφορικών πεντοζών δεν είναι πλήρης και δεν μπορεί να ανιχνευτεί δράση τρανσαλδολάσης (Feldman et al. 1992, Zhang et al. 1995). Το κύτταρο μπορεί να κατασκευάσει τα δομικά του στοιχεία από τη 6-P-φρουκτόζη και τη 3-P-γλυκεριναλδεϋδη με τη δράση της τρανσκετολάσης, της ισομεράσης της 5-P-ριβόζης και της επιμεράσης της 5-P-ριβουλόζης (Feldmann 1992). Επιπλέον, αναβολικές διαδικασίες οι οποίες χρησιμοποιούν το πυροσταφυλικό οξύ και το PEP είναι δύσκολο να ανιχνευτούν. Το 1993 απομονώθηκε όμως το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, το οποίο δρα σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες και χρειάζεται τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (Bringer-Meyer and Sahm 1993). Πρόσφατα απομονώθηκαν τα γονίδια που κωδικεύουν το σύμπλεγμα ενζύμων της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Neveling et al. 1997). Τέλος, ο κύκλος του Krebs δεν είναι πλήρης, υπάρχουν μόνο τα ένζυμα για τη μετατροπή του κιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ. Επιπρόσθετα, έχουν βρεθεί η PEP καρβοξυλάση και το μηλικό ένζυμο το οποίο έχει δράση αφυδρογονάσης και καρβοξυλάσης (Bringer-Meyer and Sahm 1989).

Όσον αφορά τη ρύθμιση του μεταβολισμού στο *Z. mobilis*, δεν φαίνεται να γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ενζυμικής δραστηριότητας, άλλα



μάλλον γίνεται μέσω της διαφορετικής σταθερότητας των πολυκιστρονικών mRNAs (Meija et al. 1992).

Το βακτήριο *Z. mobilis* δεν διαθέτει τα αλλοστερικά ένζυμα πυροσταφυλική κινάση και φωσφοφρουκτοκινάση τα οποία είναι τυπικά για στην γλυκολυτική πορεία Embden-Meyerhof-Parnas (Barrow et al. 1984, Algar and Scopes 1985). Επιπρόσθετα, τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας φαίνεται να λειτουργούν κοντά στη μέγιστη δραστηριότητα τους, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η υπόθεση ότι η γλυκολυτική ροή ρυθμίζεται από την μέγιστη δραστηριότητα τους (Barnell et al. 1990). Η πρόσληψη της γλυκόζης, η δράση της γλυκοκινάσης και η δράση της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης φαίνεται να είναι τα πιο πιθανά σημεία της ρύθμισης (Barrow et al. 1984, Algar and Scopes 1985, Scopes et Bannon 1995, Snoep et al. 1996). Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι η αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης ρυθμίζεται αλλοστερικά από το PEP (Scopes 1997). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη του *glf* και του *glk* στο ίδιο οπερόνιο, κάνει πιθανή την υπόθεση ότι η μεταφορά της γλυκόζης μέσω του μεταφορέα GLF απαιτεί τη δράση της γλυκοκινάσης (Parker et al. 1995). Ακόμα, είναι γνωστό ότι η μεταφορά της γλυκόζης στον *S. cerevisiae* απαιτεί τη δράση της γλυκοκινάσης (Bisson and Fraenkel 1984). Παρ'όλα αυτά όμως, φαίνεται ότι η μεταφορά της γλυκόζης στο *Z. mobilis* είναι ανεξάρτητη από τη δράση της γλυκοκινάσης (Parker et al. 1995).

2.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του *Z. mobilis*

Τα κύτταρα του *Z. mobilis* περιέχουν 6.3% (ανά ξηρό βάρος κυττάρων) λιπίδια που είναι δυνατό να εκχυλιστούν και 1.5% δεσμευμένα λιπίδια. Τα εκχυλίσσιμα λιπίδια είναι κατά 96.8% πολικά και κατά 3.2% μη πολικά. Έχει αναφερθεί από τον Tomabene και τους συνεργάτες του το έτος 1982, ότι τα ουδέτερα λιπίδια περιέχουν σκουαλένιο, 21 πεντακυκλικούς υδρογονάνθρακες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, τρι- δι- και μονογλυκερίδια, λιποαμινικές ενώσεις και

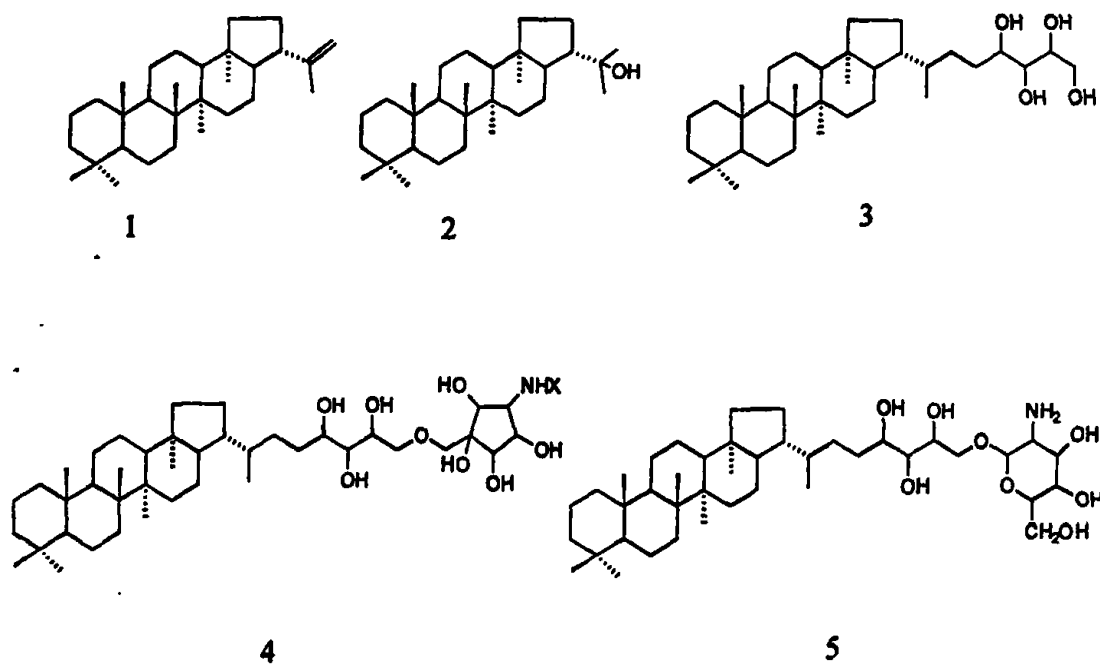
χρωστικές. Στο κλάσμα των πολικών λιπιδίων περιέχονται κυρίως φωσφολιπίδια αλλά και γλυκολιποπρωτεΐνες (Tornabene et al. 1982).

Το κύριο φωσφολιπίδιο της μεμβράνης του *Z. mobilis* είναι η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 60% των ολικών λιπιδίων ενώ σε μικρότερη αναλογία έχουν βρεθεί η φωσφατιδυλοχολίνη (20%), η λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη (4%), η φωσφατιδυλογλυκερόλη (13%), η καρδιολιπίνη και το φωσφατιδικό οξύ (2%) (Tornabene 1982, Barrow et al. 1983, Carey and Ingram 1983). Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα, το βαξενικό οξύ (18:1) είναι το κύριο λιπαρό οξύ (69% των ολικών λιπαρών οξέων) που απαντά στη μεμβράνη του *Z. mobilis*. Σε μικρότερη αναλογία βρίσκονται το μυριστικό οξύ (14:0, 11%), το παλμιτικό οξύ (16:0, 12%), το παλμιτολεϊκό οξύ (16:1, 7%) και το στεατικό οξύ (18:0, 1%) (Tornabene 1982, Barrow et al. 1983, Carey and Ingram 1983, Bringer et al. 1985).

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του *Z. mobilis* είναι η μεγάλη ποσότητα οπανοειδών τα οποία περιέχονται στη μεμβράνη του (30 mg ανά γραμμάριο ξηρού βάρους κυττάρων) (Carey and Ingram 1983, Rohmer et al., 1984, Flesch and Rohmer 1988, Sahm et al. 1993). Τα οπανοειδή είναι πεντακυκλικές ενώσεις που βρίσκονται στη μεμβράνη των προκαρυωτικών μικροοργανισμών και έχουν χαρακτηριστεί ως αντίστοιχες των στερολών τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Τα οπανοειδή δρουν ως μεμβρανικοί σταθεροποιητές και κυρίως σταθεροποιούν τη μεμβράνη των κυττάρων που αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (Rohmer et al. 1979). Η βιοσύνθεση των οπανοειδών, αντίθετα από αυτή των στερολών, δεν απαιτεί οξυγόνο (Poralla 1982). Τα οπανοειδή της μεμβράνης του *Z. mobilis* είναι τα εξής: διπλοπτένιο, διπλοπτερόλη (Barrow et al. 1983), βακτηριοπανοτετρόλη (Bringer et al. 1985), καθώς επίσης και ο γλυκοζαμίτης και ο αιθέρας της βακτηριοπανοτετρόλης (Renoux and Rohmer 1985, Schulenberg-Schell et al. 1989) (Σχήμα 7).



Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι στη μεμβράνη του *Z. mobilis*, περιέχεται μια διαλκυλοκυκλοεξαδιενκαρβινόλη (Κουκκου et al. 1998), ένωση η οποία δεν έχει ξαναβρεθεί σε βακτήριο, και μια ένωση με δύο μακριές αλυσίδες της οποίας η ακριβής δομή είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Κουκκου et al., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Ακόμα, έχουν βρεθεί και πέντε νέοι υδρογονάνθρακες: ένα 17-ίσο-νταμμάρα-20(21),24-διένιο, ένα 17-ίσο-νταμμάρα-20,24-διένιο, ένα νταμμάρα-20(21),24-διένιο, ένα έφα-7,24-διένιο και ένα νεοοπ-13(18)-ένιο (Douka et al., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).



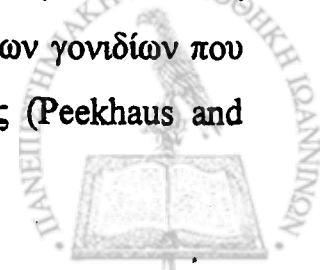
ΣΧΗΜΑ 7: Τα οπανοειδή του *Z. mobilis*. 1: Διπλοπτένιο, 2: Διπλοπτερόλη, 3: Βακτηριοπανοτετρόλη, 4: Αιθέρας της βακτηριοπανοτετρόλης, 5: Γλυκοζαμίτης της βακτηριοπανοτετρόλης.

2.5 Το γονιδίωμα του *Z. mobilis*

Το μέγεθος του γονιδιώματος όλων των στελεχών του *Z. mobilis* είναι 1.53×10^9 Daltons (Swings and Delay 1977), μέγεθος σαφώς μικρότερο από αυτό των άλλων βακτηρίων. Συγκεκριμένα, αποτελεί το 56% του γονιδιώματος του βακτηρίου *E. coli*. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το γονιδίωμα 40 στελεχών του *Z. mobilis* παρουσιάζει ομολογία 95% (Swings and Delay 1977). Ακόμα, η αναλογία G+C στο σύνολο του γονιδιώματος του είναι 48.5 ± 1 (Swings and Delay 1977). Πρόσφατα, το μέγεθος του γονιδιώματος του *Z. mobilis* μετρήθηκε με χρησιμοποίηση διάφορων περιοριστικών ενζύμων, και βρέθηκε να είναι 2085.5 kb (Kang and Kang 1998).

Το είδος *Z. mobilis* μπορεί να διακριθεί σε δύο υποείδη: 1) το *Zygomonas mobilis* subsp. *mobilis*, στο οποίο ανήκουν όλα τα υπάρχοντα είδη με αντιπροσωπευτικό τύπο αναφοράς το ATCC 10988 = NCIB 8938, και 2) το *Zygomonas mobilis* subsp. *romaceae*, με αντιπροσωπευτικό τύπο αναφοράς το ATCC 29192 = NCIB 11200. Με βάση την ομολογία του DNA η πρώτη ομάδα αποτελείται από δύο υποομάδες, τα στελέχη των οποίων παρουσιάζουν ομολογία: α) μεταξύ τους κατά μέσο όρο 95%, β) μεταξύ στελεχών διαφορετικής υποομάδας κατά 82%. Αντίθετα το στέλεχος ATCC 29192 της δεύτερης ομάδας έχει σαφώς διαφορετικό γονιδίωμα παρουσιάζοντας λιγότερο από 32% ομολογία με τα στελέχη της πρώτης ομάδας (Swings and Delay 1997).

Εκτός από τα γονίδια του μεταβολισμού σακχάρων που αναφέρθηκαν στο παραπάνω κεφάλαιο, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί τα εξής γονίδια του *Z. mobilis*: το γονίδιο που κωδικεύει την αλκαλική φωσφατάση (*pho C*⁺) (Pond et al. 1988), το γονίδιο που κωδικεύει μια πρωτεΐνη του θερμικού στρες (*dna K*) (Michel 1993), το γονίδιο που κωδικεύει τη φωσφορική αμινοτρανσφεράση (Gu et al. 1995), το γονίδιο που κωδικεύει τη σκουαλενική κυκλάση (*shc*) (Reipen et al. 1995) και ένα οπερόνιο τεσσάρων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη του γλουταμινικού οξέος (Peekhaus and



Kramer 1996). Ακόμα, έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί, μία περιοχή που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου που κωδικεύει τη αλκοολική αφυδρογονάση και φαίνεται να έχει δράση ενδο-β-γλυκανάσης (Yoon et al. 1995). Τέλος, πρόσφατα απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν γονίδια που βρίσκονται δίπλα στο γονίδιο που κωδικεύει τη σκουαλενική κυκλάση και κωδικεύουν πρωτεΐνες που έχουν σχέση με τη βιοσύνθεση των οπανοειδών (Perzl et al. 1998).

Τα στοιχεία -10 και -35 προαγωγών που έχουν βρεθεί στα γονίδια του *Z. mobilis* δεν έχουν μεγάλη ομοιότητα με τις συντηρημένες αλληλουχίες προαγωγών που έχουν αναφερθεί για το *E. coli*. Έχει βρεθεί, ότι το βακτήριο αυτό έχει δικές του συντηρημένες αλληλουχίες προαγωγών οι οποίες έχουν προταθεί από αρκετούς ερευνητές (Pond et al. 1989, Conway et al. 1991, Sprenger et al. 1993). Μέχρι στιγμής κανένας από τους προαγωγούς που έχουν απομονωθεί από το *Z. mobilis* δεν έχει βρεθεί να είναι επαγόμενος αλλά αντίθετα όλοι είναι συνεχείς. Τέλος, όσον αφορά τις περιοχές Shine Dalgarno στα γονίδια του *Z. mobilis*, αυτές αποτελούνται από έξι πουρίνες με κεντρικά νουκλεοτίδια τα GAG (Pond et al. 1989, Conway et al. 1991, Sprenger et al. 1993).

Εκτός από το χρωμοσωμικό DNA το *Z. mobilis* περιέχει και πλασμίδια. Τα πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Tonomura et al. 1982, Drainas et al. 1983, Skonticki et al. 1984, Scordaki and Drainas 1987, 1990, Misawa et al. 1985, 1986).

Το στέλεχος ATCC 10988 περιέχει 6 πλασμίδια των οποίων τα μεγέθη φαίνονται στον Πίνακα 1. Τα δύο μικρότερα πλασμίδια παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας (Scordaki and Drainas 1987). Το τρίτο μικρότερο σε μέγεθος πλασμίδιο (2.7 Kb) αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των βάσεων (Misawa and Nakamura 1989).

Σε πήγμα αγαρόζης πραγματοποιείται συµμετανάστευση των μικρών πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 που παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες στη πρωτοταγή δομή τους. Το pZMO3 δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα από τα άλλα πλασμίδια, σε αντίθεση με το pZMO5 το οποίο είναι ένα τετραμερές

(4X4.25 kb) και δείχνει μερική ομολογία με τα pZMO1 και pZMO2. Αντίθετα με το στέλεχος ATCC 10988 ο ακριβής αριθμός και το μέγεθος των πλασμιδίων που περιέχονται στο στέλεχος CP4 δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί (Yablonsky et al. 1988).

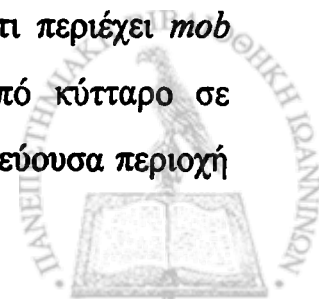
ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

Φυσικά πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 του βακτηρίου *Z. mobilis*

Φυσικό πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)
pZMO1	1.6
pZMO2	1.9
pZMO3	2.7
pZMO4	7.3
pZMO5	16.7
pZMO6	31.9

Όσον αφορά την λειτουργία των πλασμιδίων στο *Z. mobilis*, έχει αναφερθεί ότι στην ύπαρξη τους οφείλεται η ανθεκτικότητα του CP4 στη γενταμυκίνη, την καναμυκίνη και τη στρεπτομυκίνη (Walia et al. 1984) και η ανθεκτικότητα του στελέχους ATCC 10988 στα ιόντα υδραργύρου (Ogale and Deobagkar 1988, Kanurakatan and Gunasekaran 1991). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η σταθερότητα του πλασμιδίου pZMO2 του στελέχους ATCC 10988 επηρεάζεται από μία θεωρητική *recA* λειτουργία (Varthlomatos et al. 1993).

Πρόσφατα έγινε η ανάλυση αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των πλασμιδίων pZMO1 και pZMO2 του στελέχους ATCC 10988 (Arvanitis et al., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα) και βρέθηκε ότι περιείχαν από μία κωδικεύουσα περιοχή (ORF) η οποία παρουσιάζει ομολογία με Rep πρωτεΐνες. Όσον αφορά το πλασμίδιο pZMO3 του στελέχους ATCC 10988, βρέθηκε ότι περιέχει 2 κωδικεύουσες περιοχές (ORFs) (Misawa and Nakamura 1989) και είναι κινητοποιήσιμο (Arvanitis et al. 1995). Αποδείχθηκε ότι περιέχει *mob* αλληλουχίες με αποτέλεσμα να μπορεί να μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο κατά τη διάρκεια της βακτηριακής σύζευξης. Η κωδικεύουσα περιοχή



ORF1 βρέθηκε ότι έχει ομολογίες με πρωτεΐνες κινητοποίησης (Mob). Πρόσφατα, μελετήθηκε ο μηχανισμός κινητοποίησης του πλασμιδίου pZMO3 και βρέθηκε η πιθανή θέση του *oriT* του (Afendra et al. 1999).

2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του *Z. mobilis*

Τα τελευταία χρόνια το βακτήριο *Z. mobilis* παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της αυξημένης παραγωγικότητάς του σε αιθανόλη έναντι των παραδοσιακών ζυμομυκήτων (3-5 φορές μεγαλύτερη) (Rogers et al. 1982, Bringer et al. 1984, Lawford and Ruggiero 1990, Garro et al. 1995). Ακόμα, το *Z. mobilis* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρες συνεχούς ζύμωσης με αποδόσεις μετατροπής 97% της θεωρητικής τιμής και συγκεντρώσεις αιθανόλης μέχρι 12% (Doelle et al. 1993). Ένα άλλο πλεονέκτημα του *Z. mobilis* έναντι των ζυμομυκήτων, είναι η παραγωγή λιγότερης βιομάζας και η μη απαίτηση οξυγόνου κατά την ανάπτυξή του (Buchholz et al. 1987).

Για την παραγωγή αιθανόλης έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ακινητοποιημένα κύτταρα *Z. mobilis* σε εργαστηριακό και πιλοτικό επίπεδο βιοαντιδραστήρων (Koutinas et al. 1986, Castellar et al. 1989, Doelle et al. 1993). Ακόμα, ενδιαφέρον έχει η ιδιότητα ορισμένων στελεχών του *Z. mobilis* να παρουσιάζουν κροκίδωση (flocculation). Η κροκίδωση των κυττάρων θεωρείται μεγάλο πλεονέκτημα για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης γιατί αποφεύγεται το δαπανηρό στάδιο της φυγοκέντρωσης για το διαχωρισμό τους από το υπερκείμενο (Rogers et al. 1982, Pahl et al. 1997).

Εκτός από την παραγωγή αιθανόλης το *Z. mobilis* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή οπανοειδών γιατί, όπως έχει προαναφερθεί, περιέχει μεγάλο ποσοστό αυτών των ενώσεων στη μεμβράνη του. Τα οπανοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες ενώσεις στην παρασκευή φαρμάκων. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι κατά την ανάπτυξή του *Z.*

mobilis σε χυμούς αγροτικών προϊόντων παράγονται χημικές ουσίες υψηλής αξίας (Kolios et al. 1989). Πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί τα ένζυμα του *Z. mobilis* οξειδοοξειδοκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης και γλυκονολακτονάση, για τη συνεχή παραγωγή γλυκονικού οξέος και σορβιτόλης (Ro and Kim 1991, Kim and Kim 1991, Nidetzky et al. 1997, Wisbeck et al. 1997).

Τα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για ζύμωση από το *Z. mobilis* με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης περιλαμβάνουν σακχαρούχα (Shahita et al. 1981, Doelle et al. 1991) και αμυλούχα υποστρώματα (Doelle et al. 1989, Sun et al. 1998). Όμως το κύριο μειονέκτημα του *Z. mobilis*, το περιορισμένο εύρος δηλαδή υδατανθράκων που ζυμώνει, αφήνει ανεκμετάλλευτες αρκετές πρώτες ύλες οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή αιθανόλης. Τέτοιες πρώτες ύλες περιλαμβάνουν βιομηχανικά απόβλητα όπως λακτόζη, μελάσες, σταφίδες, σακχαρότευτλα, υποβαθμισμένα φρούτα, άχυρα κ.λ.π. Το παραπάνω πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση της γενετικής μηχανικής είτε με μεταλλαξιγένεση είτε με έκφραση ετερόλογων γονιδίων, κατασκευάζοντας έτσι στελέχη *Z. mobilis* ικανά να καταναλώσουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων.

2.7 Μεταλλαξιγένεση στο *Z. mobilis*

Για τη μεταλλαξιγένεση στο βακτήριο *Z. mobilis* έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο η υπεριώδης ακτινοβολία και τα αλκυλιωτικά μέσα όπως το MNNG (Skotnicki et al. 1980-1982, Stokes et al. 1982-1983, Eveleigh et al. 1983, Ingram et al. 1984, Montenecourt 1985, Typas et al. 1986). Έχει αναφερθεί, ότι το βακτήριο *Z. mobilis* είναι ανθεκτικότερο από άλλα βακτήρια στα μεταλλαξιγόνα και ειδικότερα στα αλκυλιωτικά μέσα (Sprenger et al. 1993). Επίσης, τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν φαινοτυπική αστάθεια.



Μεταλλαγμένα στελέχη του *Z. mobilis* τα οποία είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη έχουν απομονωθεί από πάρα πολλούς ερευνητές, αλλά όλα σχεδόν παρουσιάζουν μεγάλη φαινοτυπική αστάθεια. Η μόνη επιτυχημένη προσπάθεια έχει γίνει από τους Osman and Ingram το 1987. Άλλα μεταλλαγμένα στελέχη που έχουν απομονωθεί είναι ανθεκτικά στη αλλυλική αλκοόλη (Wecker and Zall 1987), θερμοανθεκτικά (Bertelin et al. 1985, Sreekumar and Basappa 1991), ανθεκτικά στο αλάτι και στο χαμηλό pH (Ingram 1984), ικανά να χρησιμοποιήσουν μαννιτόλη (Buchholz et al. 1988), μεταλλάγματα κροκίδωσης (Lawford et al. 1983, Doelle and Greenfield 1985), αρνητικά στις δραστηρότητες της γλυκοκινάσης και της φρουκτοκινάσης (Dimarko and Romano 1985, Bringer-Meyer et al. 1985), ανίκανα να χρησιμοποιήσουν σακχαρόζη, φρουκτόζη ή γλυκόζη ως πηγές άνθρακα (Yanase et al. 1985, Suntinanalert et al. 1986, Ait-Abdelkaler and Baratti 1995, Ait-Abdelkaler et al. 1995), ευαίσθητα σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Drainas et al. 1984), ευαίσθητα στην υπεριώδη ακτινοβολία και το MMS (Vartholomatos et al. 1990, Tyras and Galani 1992) και ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος (Joachimstahl et al. 1998). Όσον αφορά την τρασποζονιακή μετάλλαξη, η μόνη αναφορά έχει γίνει από τους Galani και Tyras το 1989, οι οποίοι απομόνωσαν με αυτό τον τρόπο στελέχη αυξότροφα και στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

2.8 Έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για τη μεταφορά ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* είναι η βακτηριακή σύζευξη γιατί ο μετασχηματισμός του, που έχει δοκιμαστεί στο παρελθόν από διάφορους ερευνητές (Browne et al. 1984, Goodman et al. 1984, Yanasse et al. 1986, Su and Goodman 1987, Su et al. 1988, Buchholz and Eveleigh 1990, Okamoto and Nakamura 1991, Lam et al.



1993), δεν έχει μεγάλη συχνότητα και ούτε έχει γίνει ακόμα με μεγάλη επιτυχία μέθοδος ρουτίνας.

Η μεταφορά γενετικής πληροφορίας στο *Z. mobilis* μέσω βακτηριακής σύζευξης έγινε για πρώτη φορά από την Skotnicki και τους συνεργάτες της το 1980. Από τότε, πλασμίδια από διάφορες ομάδες ασυμβατότητας έχουν μεταφερθεί στο *Z. mobilis* αλλά τα μετασυζευγμένα στελέχη παρουσιάζουν μεγάλη αστάθεια (Stokes et al. 1982, Carey et al. 1983, Montenecourt 1985, Tyras 1986, Ingram et al. 1987-1989, Buchholz et al. 1988).

Για τη έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* χρειάζεται η κλωνοποίηση των γονιδίων αυτών σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι θα πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: α) περιέχουν περιοχές κινητοποίησης ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά τους μέσω βακτηριακής σύζευξης, β) περιέχουν δείκτες ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κατάλληλα για το *Z. mobilis*, γ) δεν παρουσιάζουν ασυμβατότητα με τα φυσικά πλασμίδια του *Z. mobilis*.

Εντούτοις, πλασμίδια που έχουν κατασκευαστεί σύμφωνα με τα παραπάνω παρουσίαζαν μεγάλη αστάθεια εντός των κυττάρων του *Z. mobilis* (Skotnicki et al. 1980, Strzelecki et al. 1987). Το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίστηκε χρησιμοποιώντας περιοχές έναρξης της αντιγραφής ή και ολόκληρων φυσικών πλασμιδίων του *Z. mobilis* σε γνωστούς πλασμιδιακούς φορείς (Scordaki and Drainas 1990). Ακόμα, για μεγαλύτερη έκφραση των ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* κατασκευάστηκαν φορείς κλωνοποίησης οι οποίοι περιέχουν ισχυρούς φυσικούς προαγωγούς του *Z. mobilis* (Mackenzie et al. 1989, Reynen et al. 1990, Varsaki et al. 1998). Οι φορείς κλωνοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*, φαίνονται στον Πίνακα 2.



ΠΙΝΑΚΑΣ 2:

Φορείς κλωνοποίησης, κατάλληλοι για έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Δείκτες	Αναφορά
pLOI102	13.5	Ap	Byun et al. 1986
pZA31	7.9	Tc	Tonomura et al. 1986
pZA32	7.9	Cm	Tonomura et al. 1986
pZA33	7.9	Cm	Tonomura et al. 1986
pZA22	6.7	Tc, Cm	Misawa et al. 1986
pZL1	13.8	Cm	Yanase et al. 1986
pLOI193	13.4	Tc	Conway et al. 1987
pLOI194	13.4	Tc	Conway et al. 1987
pDS212	7.8	Tc, Ap	Scordaki and Drainas 1987
pOK2	19.7	Ap, Cm	Cho et al. 1989
pPTZ1,2,3	6.9	Tc, Ppdc	Reynen et al. 1990
pDS3154	7.44	Cm, Ap	Scordaki and Drainas 1990
pZMOCP1	7.2	Ap	Delgado et al. 1995
pZY507	10.53	Cm	Weisser et al. 1995

Η έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* εξυπηρετεί αφενός τη χρησιμοποίηση νέων υποστρωμάτων και αφετέρου την παραγωγή νέων προϊόντων.

1) Χρησιμοποίηση νέων υποστρωμάτων από το *Z. mobilis*

α) Λακτόζη: Με σκοπό την κατανάλωση της λακτόζης από μετασυζευγμένα στελέχη *Z. mobilis* εκφράστηκαν στο βακτήριο αυτό τα γονίδια που κωδικεύουν την β-γαλακτοσιδάση και την περμεάση της λακτόζης του *E. coli* (Carey et al. 1983, Goodman 1984, Chun and Rogers 1986, Byun et al. 1986, Yanase et al. 1988, Buchholz et al. 1989). Κανείς όμως από τους παραπάνω ερευνητές δεν μπόρεσε να κατασκευάσει ένα αποδοτικό μετασυζευγμένο στέλεχος *Z. mobilis* ικανό να καταβολίζει λακτόζη.

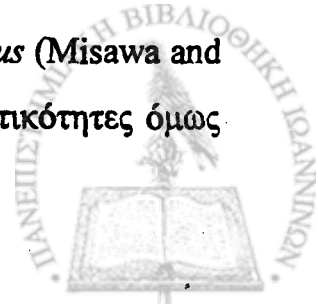
β) Γαλακτόζη: Με σκοπό την κατανάλωση της γαλακτόζης από μετασυζευγμένα στελέχη *Z. mobilis*, εκφράστηκαν τα τρία γονίδια από το οπερόνιο της β-γαλακτοσιδάσης του *E. coli* (*gal ETK*) χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο φορέα έκφρασης αλλά τα κύτταρα του *Z. mobilis* δεν αναπτύσσονταν σε γαλακτόζη (Yanase et al. 1991). Επίσης, μια άλλη ομάδα ερευνητών (Buchholz et al. 1989) εξέφρασε τα γονίδια του *gal ETK* μαζί με τα γονίδια του οπερονίου *lac* στο *Z. mobilis* αλλά και πάλι τα μετασυζευγμένα κύτταρα δεν αναπτύσσονταν σε γαλακτόζη.

γ) Μελλοβιόζη: Είναι γνωστό ότι η ραφινόζη και η μελλοβιόζη μπορούν να μεταφερθούν μέσω της περμεάσης της λακτόζης του *E. coli* (Sandermann 1977). Η συνέκφραση δύο διαφορετικών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (το ένα περιέχει την περμεάση της λακτόζης και το άλλο την α-γαλακτοσιδάση του οπερονίου της ραφινόζης καθοδικά ενός προαγωγού του *Z. mobilis*), οδήγησε την κατασκευή ενός στελέχους *Z. mobilis* το οποίο κατανάλωνε μελλοβιόζη και παρήγαγε αιθανόλη (Yanase et al. 1990).

δ) Άμυλο και άλλοι πολυσακχαρίτες: Το γονίδιο της α-αμυλάσης από το *Bacillus licheniformis* μεταφέρθηκε στο στέλεχος *Z. mobilis* ZM4. Η δραστηριότητα όμως της αμυλάσης στα ανασυνδυασμένα στελέχη ήταν αρκετά μικρή αλλά αυξανόταν ύστερα από παράταση της ανάπτυξης των κυττάρων (Brestic-Goachet et al. 1990).

Το γονίδιο που κωδικεύει την ενδο-β-γλυκανάση *Z* από το *Erwinia chrysanthemi* (Brestic-Goachet et al. 1989), από το *B. subtilis* (Yoon et al. 1988) και από το *Pseudomonas fluorescens* var. *Cellulosa* (Lejeune et al. 1988), εκφράστηκε στο *Z. mobilis* αλλά οι δραστηριότητες της γλυκανάσης ήταν πολύ μικρές.

Το γονίδιο που κωδικεύει την β-γλυκοσιδάση από το *Xanthomonas albilineans* XA-1 (Su et al. 1989) και από το *Ruminococcus albus* (Misawa and Nakamura 1989) μεταφέρθηκε επίσης στο *Z. mobilis*. Οι δραστηριότητες όμως



της γλυκοζιδάσης ήταν και σε αυτή την περίπτωση πολύ μικρές και τα μετασυζευγμένα κύτταρα του *Z. mobilis* δεν αναπτύσσονταν σε κελλοβιόζη.

ε) Ξυλόζη, μαννόζη και αραβινόζη: Είναι γνωστό ότι η ξυλόζη και η μαννόζη μπορούν να μεταφερθούν στο *Z. mobilis* μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης (Weisser et al. 1996). Η έκφραση των γονιδίων που κωδικεύουν την τρανσκετολάση, την ισομεράση της ξυλόζης και την ξυλιλοκινάση (Fedmann et al. 1992, Zhang et al. 1995) οδήγησε σε μετασυζευγμένα κύτταρα *Z. mobilis* που καταβολίζουν ξυλόζη. Η έκφραση του γονιδίου της ισομεράσης της φωσφομαννόζης (*pmi*) από το *E. coli*, οδήγησε σε μετασυζευγμένα κύτταρα *Z. mobilis* που καταβολίζουν μαννόζη (Weisser et al. 1996). Τα γονίδια που κωδικεύουν την ισομεράση της L-αραβινόζης (*araA*), την L-ριβουλοκινάση (*araB*), την επιμεράση της 5-P-L-ριβουλόζης (*araD*), την τρανσαλδολάση (*tal B*), και την τρανσκετολάση (*tkt A*) του *E. coli* εκφράστηκαν στο *Z. mobilis* πίσω από κατάλληλους προαγωγούς οι οποίοι λειτουργούν και παρουσία γλυκόζης. Τα μετασυζευγμένα κύτταρα που προέκυψαν ήταν ικανά να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως μόνη πηγή άνθρακα την L-αραβινόζη (Deanda et al. 1996). Πρόσφατα, δύο μετασυζευγμένα στελέχη *Z. mobilis* (το ένα καταβολίζει ξυλόζη και το άλλο αραβινόζη) χρησιμοποιήθηκαν για τη ζύμωση μίγματος γλυκόζης, ξυλόζης και αραβινόζης (το οποίο περιέχεται σε λιγνινοκυτταρινική βιομάζα) και παρήγαγαν αιθανόλη με απόδοση 72.5% της θεωρητικής (Mohagheghi et al. 1998).

2) Παραγωγή νέων προϊόντων από το *Z. mobilis*

α) L-αλανίνη: Η έκφραση του γονιδίου της αφυδρογονάσης της L-αλανίνης του *B. sphaericus* υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού *P_{prdc}* στο *Z. mobilis* οδήγησε στην κατασκευή μετασυζευγμένων κυττάρων τα οποία παρήγαγαν L-αλανίνη από το πυροσταφυλικό οξύ (Uhlenbusch et al. 1991).

β) β-καροτένια: Τα β-καροτένια είναι χρωστικές που προστατεύουν κάποια φυτά και βακτήρια από την φωτο-οξειδωση (Misawa et al. 1991). Το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) το πρώτο υπόστρωμα των ενζύμων που κωδικεύουν τα γονίδια του οπερονίου *crt* που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των β-καροτενίων, είναι υπόστρωμα και της βιοσυνθετικής πορείας των οπανοειδών (τα οποία περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στο *Z. mobilis*). Τα τέσσερα γονίδια του οπερονίου *crt* (*crt B*, *crt E*, *crt I*, and *crt Y*) του *Erwinia uredonora* 20D3 εκφράστηκαν στο *Z. mobilis* με αποτέλεσμα την κατασκευή κίτρινων αποικιών οι οποίες παρήγαγαν τρανς-β,β-καροτένιο (Misawa et al. 1991).

γ) Πρωτεΐνη παγοπυρήνωσης: Το γονίδιο *inaZ* του *Pseudomonas syringae* το οποίο κωδικεύει την πρωτεΐνη της παγοπυρήνωσης, εκφράστηκε στο *Z. mobilis* (Drainas et al. 1995, Varsaki et al. 1998) με αποτέλεσμα την κατασκευή κυττάρων που παράγουν παγοπυρήνες. Το γεγονός αυτό από τη μία ανοίγει νέα προοπτική βιοτεχνολογικών εφαρμογών του *Z. mobilis*, και από την άλλη διευκολύνει τη γενετική μελέτη του βακτηρίου αυτού με τη χρήση του γονιδίου *inaZ* ως γονιδίου αναφοράς.

2.9 Η επίδραση της αιθανόλης στο *Z. mobilis*

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Z. mobilis* είναι η ανθεκτικότητα του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (πάνω από 13% w/v) (Rogers et al. 1982). Από έρευνες που έχουν γίνει σε εκχύλισμα κυττάρων *Z. mobilis*, έχει βρεθεί ότι η παραγόμενη αιθανόλη είναι 15% (Scopes and Griffiths-Smith 1986) γεγονός που δείχνει ότι τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας είναι πιο ανθεκτικά στην αιθανόλη από ότι το ίδιο το κύτταρο του *Z. mobilis*.

Η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* στην αιθανόλη έχει συσχετιστεί με τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του και κυρίως με τη μεγάλη περιεκτικότητα



της σε οπανοειδή και βαξενικό οξύ (Carey and Ingram 1983, Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986, Buchloz et al. 1987, Hermans et al. 1991, Moreau et al. 1995).

Έχει αναφερθεί, ότι η περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων και των λιπαρών οξέων δεν επηρεάζεται από την παρουσία αιθανόλης στο θρεπτικό μέσο του *Z. mobilis* (Carey and Ingram 1983) ενώ αντίθετα η περιεκτικότητα των οπανοειδών επηρεάζεται (Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986, Hermans et al. 1991), αν και πρόσφατα αναφέρθηκε ότι οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Moreau et al. 1997).

Είναι γνωστό ότι η αιθανόλη επηρεάζει τη ρευστότητα της μεμβράνης των κυττάρων εισερχόμενη στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα (Osman and Ingram 1986, Ingram 1986). Τα οπανοειδή δρουν ως σταθεροποιητές της μεμβράνης (Rohmer et al. 1979) ισχυροποιώντας τις δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των λιπιδίων (Bringer et al. 1985), μειώνοντας έτσι την διαπερατότητα της μεμβράνης σε μικρά μόρια.

Όσον αφορά την επίδραση της αιθανόλης στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης του *Z. mobilis*, έχει αναφερθεί ότι είναι η ίδια με την επίδραση της θερμοκρασίας (Michel et al. 1985, Michel and Starka 1986). Συγκεκριμένα, η σύνθεση κάποιων πολυπεπτιδίων επάγεται από την επίδραση αιθανόλης ή θερμοκρασίας. Παρ' όλα αυτά ο ρόλος των πρωτεϊνών οι οποίες επάγονται από την αιθανόλη ή τη θερμοκρασία δεν έχει διευκρινιστεί. Πρόσφατα, έχουν κλωνοποιηθεί τα γονίδια που κωδικεύουν δύο από τις πιο συνηθισμένες πρωτεΐνες αιθανολικού στρες τα οποία βρίσκονται σε ένα οπερόνιο (Barbosa et al. 1994).

2.10 Η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων

Είναι γνωστό ότι το βακτήριο *Z. mobilis* είναι ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Swings and Delay 1977, Sprenger 1996) ενώ



αντίθετα δεν είναι καθόλου ανθεκτικό σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις που προέρχονται από τα άλατα (Swings and Delay 1977).

Η ικανότητα του *Z. mobilis* να αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης ή μιγμάτων γλυκόζης και φρουκτόζης οφείλεται στη συσσώρευση σορβιτόλης η οποία παράγεται από τη φρουκτόζη και δρα ως συμβατή διαλυμένη ουσία στο εσωτερικό των κυττάρων. Η συσσώρευση της σορβιτόλης δημιουργεί μεγάλη εσωτερική οσμωτική πίεση αντισταθμίζοντας έτσι την εξωτερική (Leigh et al. 1984, Loos et al. 1994). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή σορβιτόλης είναι η οξειδορεδοκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης (Zachariou and Scopes 1986). Το ένζυμο αυτό απαιτεί μεγάλες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης και την παρουσία και των δύο σακχάρων για να δράσει. Μεγάλες ποσότητες γλυκόζης παρεμποδίζουν τη δράση της φρουκτοκινάσης (Doelle 1982) με αποτέλεσμα η φρουκτόζη να μετατρέπεται σε σορβιτόλη.

Παρ' όλα αυτά, όταν το *Z. mobilis* αναπτύσσεται σε γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα η σορβιτόλη παράγεται σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες (Viikari 1984) και μη ικανές να δημιουργήσουν υψηλή εσωτερική οσμωτική πίεση για να αντισταθμίσουν την εξωτερική. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι καμία άλλη γνωστή συμβατή διαλυμένη ουσία δεν παράγεται σε σημαντικές ποσότητες στο *Z. mobilis* (Loos et al. 1994). Από την άλλη, όλα τα στελέχη του *Z. mobilis* μπορούν να αναπτυχθούν σε 1.11 M (20%) γλυκόζη και υπάρχουν στελέχη που αναπτύσσονται σε 2.22 M (40%) γλυκόζη αφού περάσουν μια μεγάλη φάση εφησυχασμού (4-20 ημέρες) (Swings and Delay 1977).

Έχει αναφερθεί ότι η ικανότητα του *Z. mobilis* να αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης οφείλεται στη γρήγορη εξισορρόπηση της εξωτερικής οσμωτικής πίεσης με την εσωτερική μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης, ο οποίος μεταφέρει γλυκόζη με πολύ υψηλές ταχύτητες (DiMarco and Romano 1985, Struch et al. 1991). Παρ' όλα αυτά, από *in vivo* πειράματα που έγιναν βρέθηκε ότι η εσωτερική συγκέντρωση γλυκόζης στα κύτταρα ήταν πολύ χαμηλότερη από την εξωτερική (Hermans 1992).



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το βακτήριο *Z. mobilis* είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή, ο μηχανισμός αυτής της ανθεκτικότητας είναι ακόμα εντελώς αδιευκρίνιστος και δεν μπορεί να συνδεθεί με τον μηχανισμό της ανθεκτικότητας του βακτηρίου αυτού σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης ή με μηχανισμούς γενικής οσμωρύθμισης όπως συμβαίνει ως ένα βαθμό στην περίπτωση του *S. cerevisiae*. Είναι πιθανό λοιπόν, ο μηχανισμός αυτός να είναι ειδικός για τη γλυκόζη. Μηχανισμοί ειδικοί για τη γλυκόζη οι οποίοι ρυθμίζονται από την παρουσία ή τη συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο, έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε άλλους οργανισμούς. Τέτοιοι μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση των αναβολικών και καταβολικών διεργασιών των κυττάρων καθώς και στην έναρξη της ανάπτυξης τους σε πλούσια θρεπτικά μέσα και η μελέτη τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Για την πλήρη διευκρίνιση αυτών των μηχανισμών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη κατάλληλων μεταλλαγμένων στελεχών.

Το εργαστήριο μας διαθέτει το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1 το οποίο είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και μπορεί να φανεί ένα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια εξήγησης του μηχανισμού ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1 (Drainas et al. 1984) αναπτύσσεται κανονικά σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη. Αντίθετα, δεν αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης ενώ σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης εμφανίζει περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών. Επιπλέον, παρουσιάζει μειωμένη παραγωγικότητα στην αιθανόλη σε σχέση με το πατρικό του στέλεχος ATCC 10988. Για την διευκόλυνση των βακτηριακών συζεύξεων έχει απομονωθεί ένα μετάλλαγμα του στελέχους CU1, το στέλεχος CU1Rif^r, (Afendra and Drainas 1987) το οποίο παρουσιάζει ακριβώς τα ίδια



χαρακτηριστικά με το στέλεχος CU1, και επιπλέον είναι ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (20 µg/ml).

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού ο οποίος καθιστά τα κύτταρα του *Z. mobilis* ικανά να αναπτύσσονται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η διευκρίνιση του μηχανισμού αυτού αναμένεται αφενός να διαλευκάνει ένα σημαντικό επιστημονικό πρόβλημα που αναφέρεται γενικότερα στην ικανότητα της προσαρμογής των κυττάρων σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και αφετέρου να χρησιμεύσει σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές αξιοποίησης υδατανθρακούχων πηγών. Για το σκοπό αυτό στην παρούσα διατριβή έγινε βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους CU1Rif2 και απομονώθηκε ένας κλώνος DNA από τις γονιδιακές βιβλιοθήκες των φυσικών τύπων ATCC 10988 και CP4, ο οποίος όταν μεταφέρεται στο στέλεχος CU1Rif2 αποκαθιστά την κανονική ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη. Ο κλώνος αυτός αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και χαρακτηρίστηκε μερικώς.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Υλικά και Μέθοδοι



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Χημικά και όργανα

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν αναλυτικής καθαρότητας, της Merck, Ferak, Serva, Sigma και της Fluka.

Τα θρεπτικά υλικά ήταν της Oxoid και της LAB M. Οι διαλύτες ήταν της Merck (pro analysi). Τα πρότυπα των λιπιδίων ήταν της Sigma, ενώ των μεθυλεστέρων της Poly Science Corporation. Οι ραδιενεργά σημασμένες ουσίες της Amersham. Τα ένζυμα για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς ήταν της Sigma. Τα περιοριστικά ένζυμα ήταν της Amersham, ενώ η λιγάση της New england Biolabs.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν:

1. Πιπέτες: Gilson (p20, p200, p1000, p5000).



2. Φυγόκεντροι: ΜΙΚΡΟ 12-24 (Hettich Zentrifugen), Hettich UNIVERSAL, SIGMA 2K 15, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge Dupont Instruments (κεφαλές GS-3 και SS-34), BECKMAN L7-65 Ultracentrifuge (κεφαλή NVT65).
3. Φωτόμετρα: SPECTRONIC 20 (BAUSCH and LOMB), Spectronic 21 (Milton Roy Company).
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.

3.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη του *Zyotomonas mobilis* και του *Echerichia coli* καθώς και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, φαίνονται στους Πίνακες 3 και 4, αντίστοιχα.



ΠΙΝΑΚΑΣ 3:
Βακτηριακά στελέχη

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφία
<i>E. coli</i> DH5α	F, φ80dlacZΔM 15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r ⁻ m ⁻), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169.	Hanahan 1983
ZSC112L Δpts	ptsG ⁻ , ptsM ⁻ , glk ⁻ , Δ(pts HI crr)	Weisser et al. 1995
<i>Z. mobilis</i> CU1Rif2	Μετάλλαγμα του φυσικού στελέχους ATCC 10988, ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, ανθεκτικό στην ριφαμπικίνη (20μg/ml)	Drainas et al. 1984, Afendra and Drainas 1987
ATCC10988 CP ₄	Wild type Wild type	Swings and Deley 1977 Yablonsky et al. 1988

ΠΙΝΑΚΑΣ 4:
Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	Τμήμα από το DNA που αποκαθιστά το φαινότυπο του στελέχους CU1Rif ² (kb)	Βιβλιογραφία
pUC18	Ap ^r	-	Boehinger Mannheim
pUC1851	Ap ^r	5.1	Αυτή η εργασία
pUC1845	Ap ^r	4.5	Αυτή η εργασία
pUC1831	Ap ^r	3.1	Αυτή η εργασία
pUC1820	Ap ^r	2.0	Αυτή η εργασία
pUC18 <i>glf</i>	Ap ^r	-	Προσωπική επικοινωνία με G. Sprenger
pLAFR5	Tc ^r	-	Keen et al. 1988
pLAFR554	Tc ^r	~25	Αυτή η εργασία
pLAFR557	Tc ^r	~25	Αυτή η εργασία
pLAFR595	Tc ^r	9.5	Αυτή η εργασία
pLAFR551	Tc ^r	5.1	Αυτή η εργασία
pLAFR509	Tc ^r	0.9	Αυτή η εργασία
pLAFR512	Tc ^r	1.2	Αυτή η εργασία
pLAFR518	Tc ^r	1.8	Αυτή η εργασία
pLAFR508	Tc ^r	0.8	Αυτή η εργασία
pLAFR516	Tc ^r	1.6	Αυτή η εργασία
pLAFR531	Tc ^r	3.1	Αυτή η εργασία
pLAFR520	Tc ^r	2.0	Αυτή η εργασία
pLAFR589	Tc ^r	8.9	Αυτή η εργασία
pLAFR545	Tc ^r	4.5	Αυτή η εργασία
pLAFR533	Tc ^r	3.3	Αυτή η εργασία
pLAFR5 <i>glf</i>	Tc ^r	-	Αυτή η εργασία
pRK2013	Km ^r	-	Figurski and Helinski 1983
pZY507	Cm ^r	-	Weisser et al. 1995
pZY507 <i>glf</i>	Cm ^r	-	Weisser et al. 1995
pZY50733	Cm ^r	3.3	Αυτή η εργασία



3.3 Θρεπτικά υλικά

3.3.1 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το *E. coli* (Luria Broth, L.B., Luria and Delbruck 1943).

1% (w / v) NaCl

1% (w / v) τρυπτόνη

0.5% (w / v) Εκχύλισμα ζύμης

pH= 7.5 με 1N NaOH

• 3.3.2 Ελάχιστο θρεπτικό υλικό για το *E. coli* (M9, Sambrook et al. 1989)

Για την παρασκευή 100 ml θρεπτικού υλικού προστίθενται τα εξής:

80 ml αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό

10 ml διαλύματος M9AX10

0.1 ml MgSO₄ 1M

0.2 ml CaCl₂ 1M

Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται η κατάλληλη πηγή άνθρακα, στην επιθυμητή ποσότητα, και τα κατάλληλα αμινοξέα.

Διάλυμα M9AX10

6% (w / v) Na₃PO₄

3% (w / v) KH₂PO₄

1% (w / v) NH₄Cl

0.5% (w / v) NaCl

3.3.3 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το *Z. mobilis* (Zymo Broth, Z.B., Afendra and Drainas 1987).

0.5% (w / v) εκχύλισμα ζύμης

0.1% (w / v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1% (w / v) KH_2PO_4

0.05% (w / v) MgSO_4

Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται η κατάλληλη πηγή άνθρακα, στην επιθυμητή ποσότητα.

3.3.4 Στερεά θρεπτικά υλικά

Παρασκευάζονται με προσθήκη 2% άγαρ στα παραπάνω υγρά θρεπτικά υλικά.

3.4 Ανάπτυξη καλλιέργειών

Οι καλλιέργειες του *E. coli* επωάστηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Καλλιέργειες κυττάρων, που φέρουν το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013, επωάζονται χωρίς ανακίνηση.

Οι καλλιέργειες του *Z. mobilis* επωάζονται στους 30°C χωρίς ανακίνηση. Μονές αποικίες γίνονται ορατές σε στερεό θρεπτικό υλικό μετά από 3-6 ημέρες από τη μέρα του εμβολιασμού των κυττάρων. Οι καμπύλες ανάπτυξης έγιναν σε καλλιέργειες *Z. mobilis* των 250 ml με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) στα 600 nm και απεικόνιση της αύξησης της οπτικής πυκνότητας σε σχέση με το χρόνο (ώρες) σε ημιλογαριθμικό χαρτί.



3.5 Διατήρηση στελεχών

Οι στερεές καλλιέργειες του *E. coli* διατηρούνται στους 4°C για τρεις μήνες, ενώ του *Z. mobilis* για ένα μήνα. Για διατήρηση μεγαλύτερης διάρκειας, ακολουθείται η εξής διαδικασία: 1 ml καλλιέργειας στο τέλος της εκθετικής φάσης αναμιγνύεται με 1 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%. Το μείγμα φυλάσσεται στους -80°C.

3.6 Μέθοδος αντιγραφικής μεταφοράς αποικιών (Velvet replication)

Με τη μέθοδο αυτή αποικίες κυττάρων μπορούν να μεταφερθούν από ένα τρυβλίο σε ένα άλλο ως εξής:

Το τρυβλίο-μήτρα σημειώνεται κατάλληλα και οι αποικίες μεταφέρονται πάνω σε βελούδο που είναι τοποθετημένο σε ειδική βάση. Πρώτα πιέζεται η επιφάνεια του τρυβλίου-μήτρα σε αποστειρωμένο βελούδο για να αφήσει ένα αποτύπωμα από κάθε αποικία. Στη συνέχεια το νέο τρυβλίο πιέζεται ελαφρά πάνω στην επιφάνεια του βελούδου, έτσι ώστε να μεταφερθούν μερικά κύτταρα από τις αποτυπωμένες αποικίες επί του βελούδου στην επιφάνεια του νέου τρυβλίου.

3.7 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων αποθήκευσης έγινε με διήθηση μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 0.45 μm. Τα διαλύματα αποθήκευσης φυλάσσονται στους -20°C. Ο τρόπος δράσης των αντιβιοτικών και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αυτά φαίνονται στον Πίνακα 6.



ΠΙΝΑΚΑΣ 5:
Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό / διαλύτης	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Z. mobilis</i>	<i>E. coli</i>
Αμπικιλίνη (Ap) / d.H ₂ O	-	100
Χλωραμφαινικόλη (Cm) / αιθανόλη	100	25
Τερακυκλίνη (Tc) / αιθανόλη	40	20
Καναμυκίνη (Km) / d.H ₂ O	50	50
ΡΙφαμπικίνη (Rif) / αιθανόλη	20	20



ΠΙΝΑΚΑΣ 6:**Τρόπος δράσης αντιβιοτικών-μηχανισμός ανθεκτικότητας**

Αντιβιοτικό	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός ανθεκτικότητας
Ap	Εμποδίζει τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών, αναστέλλοντας τη δράση της τρανσπεπτιδάσης. Έτσι προκαλείται ο τερματισμός της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.	Το γονίδιο bla κωδικοποιεί το ένζυμο β-λακταμάση το οποίο διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού.
Cm	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με πρόσδεση του στην 50 S υπομονάδα του ριβοσώματος και αναστολή της δράσης της πεπτιδυλοτρανσφεράσης	Το γονίδιο cat κωδικοποιεί ένα ειδικό ένζυμο, την χλωραμφαινικολική ακετυλοτρανσφεράση, η οποία αδρανοποιεί το αντιβιοτικό.
Tc	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με πρόσδεση του στην 30 S υπομονάδα του ριβοσώματος, και παρεμπόδιση της σύνδεσης του αμινοακυλο-tRNA.	Το γονίδιο tet κωδικοποιεί ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και εμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου.
Km	Προσδέεται στο 70 S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA).	Το γονίδιο kam κωδικοποιεί ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με το ριβόσωμα.
Rif	Δεσμεύεται στην β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση του RNA.	Τροποποιημένη β-υπομονάδα της RNA-πολυμεράσης.

3.8 Εκχύλιση ολικών λιπιδίων

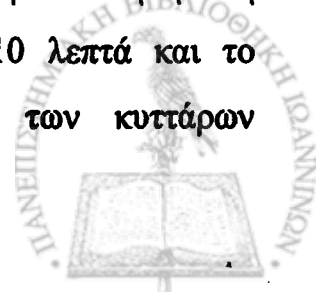
Κύτταρα που βρίσκονται στο τέλος της εκθετικής φάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά. Τα κύτταρα εκπλένονται και λυοφιλοποιούνται. Τα λιπίδια από τα λυοφιλοποιημένα κύτταρα εκχυλίζονται με τις εξής μεθόδους:

3.8.1 Μέθοδος Rohmer (Rohmer et al. 1984)

Συγκεκριμένη ποσότητα λυοφιλοποιημένων κυττάρων (0.1-1 g) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με κάθετο ψυκτήρα όπου προστίθενται 50 ml $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2:1). Η φιάλη τοποθετείται στους 50°C για 1 ώρα σε συνθήκες βρασμού με επαναρροή. Το παραπάνω μίγμα διηθείται σε γυάλινο ηθμό N^ο 4 και συλλέγεται το υπερκείμενο. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές. Τα υπερκείμενα συλλέγονται, ενώνονται και εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το δείγμα των ξηρών λιπιδίων φυλάσσεται στους -20°C. Όταν το δείγμα των λιπιδίων προορίζεται για ποσοτικό προσδιορισμό φωσφολιπιδίων, τότε μετράται η ποσότητα ολικού φωσφόρου λιπιδίων (βλέπε παρακάτω). Όταν όμως προορίζεται για ποσοτικό προσδιορισμό ουδετέρων λιπιδίων, τότε ζυγίζεται η ποσότητα των ολικών λιπιδίων σε αναλυτικό ζυγό χρησιμοποιώντας προζυγισμένο φιαλίδιο.

3.8.2 Μέθοδος Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1969)

100 mg λυοφιλοποιημένων κυττάρων τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης των 30 ml και επαναιωρούνται σε 2 ml H_2O . Στο σωλήνα προστίθενται 7.5 ml $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:2). Το παραπάνω μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά, υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωλήνα. Στο ίζημα των κυττάρων



επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία. Τα υπερκείμενα ενώνονται και σε αυτά προστίθενται 5 ml CHCl_3 και 5 ml H_2O . Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση (κάτω) η οποία εκπλένεται με 20 ml $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (10:9) δύο φορές. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το δείγμα των ξηρών λιπιδίων φυλάσσεται στους -20°C . Η μέθοδος αυτή, ως πιο ήπια μέθοδος, χρησιμοποιείται στη περίπτωση που το δείγμα προορίζεται για ανάλυση λιπαρών οξέων. Η απόδοση όμως σε ποσότητα φωσφόρου ανά mg κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* είναι σαφώς χαμηλότερη (0.5 $\mu\text{g P}$ / mg κυττάρων) από την απόδοση που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο Rohmer (1.5 $\mu\text{g P}$ / mg κυττάρων).

3.9 Διαχωρισμός λιπιδίων

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων γίνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Οι πλάκες TLC που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, πάχους 0.25 mm (αναλυτικές) και 0.5 mm (ημιπαρασκευαστικές). Οι πλάκες TLC χωρίζονται σε παράλληλες κάθετες λωρίδες πλάτους ανάλογου της ποσότητας του λιπιδίου που τοποθετείται. Στις ακραίες λωρίδες τοποθετούνται τα πρότυπα λιπίδια και στις άλλες τα δείγματα. Η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων γίνεται σε γυάλινους θαλάμους (25 X 10 X 25 cm), που περιέχουν 100 ml του κατάλληλου μίγματος διαλυτών.

3.10 Εμφάνιση χρωματογραφήματος

3.10.1 Ατμοί ιωδίου

Η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό γυάλινο θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου, και εμφανίζονται όλα τα λιπίδια παροδικά.



3.10.2 Αντιδραστήριο μπερ

Η πλάκα ψεκάζεται με
λιπίδια εμφανίζονται σε υπερ-
Το αντιδραστήριο της μπερ-
μπερμπερίνης διαλύονται σε

3.10.3 Αντιδραστήριο νινυδ

Η πλάκα ψεκάζεται με
στους 100°C για 10 λεπτά
εμφανίζονται με κόκκινο
παρασκευάζεται ως εξής: 0.3
Στο διάλυμα προστίθενται 3

3.11 Εκχύλιση των λιπιδ

3.11.1 Μέθοδος δύο φάσεων

Οι περιοχές που περι-
μεταφέρονται σε σωλήνες φυ-
 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH- H}_2\text{O}$ (1: 2: 0.1)
και στη συνέχεια φυγοκεντρο-
μεταφέρεται σε δοκιμαστικό
υπερκείμενα προστίθενται 1 ml
μίγματος να μετατραπεί από
διφασικό. Οι χλωροφορμικές
δοκιμαστικούς σωλήνες, εξά-
λιπίδια επαναδιαλύονται σε με-



3.11.2 Μέθοδος Rohmer (Rohmer et al. 1984)

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την εκχύλιση μη πολικών λιπιδίων από την πλάκα TLC:

Οι περιοχές που περιέχουν τις κηλίδες των λιπιδίων αποξύνονται και μεταφέρονται σε κωνικές φιάλες των 25 ml. Στη φιάλη προστίθενται 10 ml CH_2Cl_2 . Ακολουθεί καλή ανάδευση της φιάλης και παραμονή στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα της φιάλης διηθείται σε γυάλινο ηθμό, το διήθημα συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο CH_2Cl_2 .

3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων

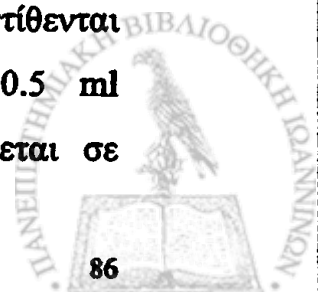
3.12.1 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου (Bartlett 1959, Marinetti 1962)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με τη μέθοδο αυτή ο ανόργανος φώσφορος που σχηματίζεται με την καύση των φωσφολιπιδίων με υπερχλωρικό οξύ, αντιδρά με το μολυβδαινικό αμμώνιο και με το αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ και μετατρέπεται σε έγχρωμο σύμπλοκο.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Δείγμα λιπιδίου περιεκτικότητας σε φώσφορο 1-5 μg φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα Pyrex και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 0.5 ml HClO_4 72% και το δείγμα θερμαίνεται στους 170-180°C για 5 ώρες. Στη συνέχεια ψύχεται στη θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται 1 ml H_2O , 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA με συνεχή ανάδευση. Το δείγμα θερμαίνεται σε



υδατόλουτρο 100°C για 10 λεπτά. Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί φωτομετρείται στα 820 nm. Ταυτόχρονα γίνεται και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα περιεκτικότητας από 1.0 ως 4.0 µg/ml.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Πρότυπο διάλυμα 4 µg φωσφόρου / ml:

Διαλύονται 1.7575 mg KH_2PO_4 σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

2. Υπερχλωρικό οξύ 72% (12N).

3. Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4%:

Διαλύονται 2.125 g ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml.

4. Διάλυμα αμινοναφθολοσουλφονικού οξέος (ANSA):

Διαλύονται 30 g NaHSO_3 ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ και 6 g Na_2SO_3 σε 250 ml απιονισμένου νερού. Στο διάλυμα που προκύπτει, διαλύονται 0.5 g 1,2,4-αμινοναφθολοσουλφονικού οξέος. Αν μετά από τρεις ώρες σχηματιστεί ίζημα, το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται στους 4°C για δύο μήνες.

5. Αντιδραστήριο ANSA:

Προκύπτει από την ανάμιξη του διαλύματος ANSA με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.



3.12.2 Διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων

Δείγμα ολικών λιπιδίων γνωστής περιεκτικότητας σε φωσφόρο τοποθετείται σε πλάκα TLC. Η πλάκα αναπτύσσεται σε γυάλινο θάλαμο που περιέχει το μίγμα διαλυτών: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH- H}_2\text{O-NH}_3$ (65: 35: 5: 2) ή $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH- H}_2\text{O}$ (65: 35: 5). Η εμφάνιση των λιπιδίων γίνεται με ατμούς ιωδίου, ενώ των λιπιδίων που περιέχουν ελεύθερη αμινομάδα με το αντιδραστήριο της νινυδρίνης.

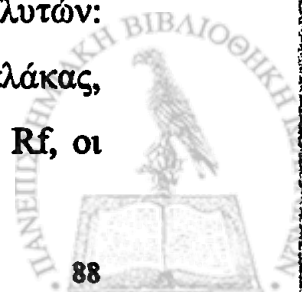
3.12.3 Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC (Bartlett 1959, Marinetti 1962)

Οι περιοχές που περιέχουν τα φωσφολιπίδια αποξύνονται ποσοτικά και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Παράλληλα αποξύνονται τμήματα ανάλογου μεγέθους που χρησιμοποιούνται για μάρτυρες. Ακολουθεί η παραπάνω διαδικασία προσδιορισμού του φωσφόρου, και το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί εκχυλίζεται ποσοτικά με 5 ml οξικού αιθυλεστέρα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Το εκχυλισμένο χρώμα φωτομετρείται στα 780 nm. Από την ποσότητα φωσφόρου κάθε κηλίδας φωσφολιπιδίου, μπορεί να βρεθεί η ποσοστιαία αναλογία του στο σύνολο των ολικών φωσφολιπιδίων.

3.13 Ποσοτικός προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων (Koukkou et al. 1990, Koukkou et al. 1998)

3.13.1 Απομόνωση ουδετέρων λιπιδίων

Δείγμα ολικών λιπιδίων γνωστού βάρους, τοποθετείται σε πλάκα TLC. Η πλάκα αναπτύσσεται σε γυάλινο θάλαμο που περιέχει το μίγμα διαλυτών: εξάνιο-αιθέρας (70:30). Τα πολικά λιπίδια παραμένουν στη βάση της πλάκας, ενώ τα ουδέτερα λιπίδια διαχωρίζονται σε έξι κηλίδες με διαφορετικό R_f , οι



οποίες εμφανίζονται αρχικά με αντιδραστήριο μπερμπερίνης και στη συνέχεια με ατμούς ιωδίου. Η κηλίδα των πολικών λιπιδίων αποξύνεται, εκχυλίζεται με τη μέθοδο Rohmer, χρησιμοποιώντας όμως $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2:1) αντί για CH_2Cl_2 , και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό χρησιμοποιώντας προζυγισμένο φιαλίδιο. Οι κηλίδες των ουδετέρων λιπιδίων αποξύνονται όλες μαζί, εκχυλίζονται με τη μέθοδο Rohmer και ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό χρησιμοποιώντας προζυγισμένο φιαλίδιο.

3.13.2 Διαχωρισμός και προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων

Το παραπάνω δείγμα των ουδετέρων λιπιδίων τοποθετείται σε πλάκα TLC. Η πλάκα αναπτύσσεται σε γυάλινο θάλαμο που περιέχει το μίγμα διαλυτών: εξάνιο-αιθέρας (70:30). Κάθε κηλίδα ουδέτερου λιπιδίου με διαφορετικό R_f αποξύνεται και εκχυλίζεται με τη μέθοδο Rohmer. Μετά την επαναιώρηση σε μικρό όγκο CH_2Cl_2 , έαθε κηλίδα τοποθετείται σε προζυγισμένο φιαλίδιο. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων). Η διαφορά βάρους αποτελεί την ποσότητα του λιπιδίου. Με την εύρεση του βάρους κάθε ουδέτερου λιπιδίου μπορεί να βρεθεί η ποσοστιαία αναλογία του στην συνολική ποσότητα των ουδετέρων λιπιδίων, καθώς και η ποσοστιαία αναλογία του στην συνολική ποσότητα των λιπιδίων.

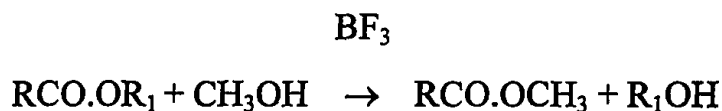


3.14 Ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων

3.14.1 Παρασκευή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Morrison and Smith 1964)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με τη μέθοδο αυτή διασπώνται τα εστεροποιημένα σε γλυκερίδια λιπαρά οξέα με ταυτόχρονο μετασχηματισμό τους σε μεθυλεστέρες:



ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ

Δείγμα λιπιδίων που περιέχει 50 μg φωσφόρου, φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου. Στο σωλήνα προστίθενται 2 ml μίγματος που περιέχει 35% $\text{BF}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 30% βενζολίου και 35% μεθανόλης. Ο σωλήνας πωματίζεται και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο 100°C, για 90 λεπτά.

Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 2 ml νερού και οι μεθυλεστέρες εκχυλίζονται με 4 ml πετρελαϊκού αιθέρα δύο φορές. Τα ενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται τρεις φορές με 2 ml νερού, για πλήρη απομάκρυνση του οξέος που ελέγχεται με pH- μετρικό χαρτί. Στη συνέχεια ξηραίνονται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και μετά από διήθηση και έκπλυση του ηθμού με πετρελαϊκό αιθέρα ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου. Οι μεθυλεστέρες επαναδιαλύονται σε 50 μl εξανίου.

3.14.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων με αέρια χρωματογραφία (Kates 1972, Koukkou et al. 1990)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Αέριος χρωματογράφος Varian 3700

Ανιχνευτής: φλόγας ιονισμού

Καταγραφέας: Varian 9176

Στήλη: Ηλεκτρικός εστέρας της διαιθυλενογλυκόλης (DEGS) 15% (PHASE-SEP)

Μικροσύριγγες: Hamilton, 5 μl.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Θερμοκρασία στήλης: 175°C

Θερμοκρασία ανιχνευτή: 270°C

Θερμοκρασία θαλάμου εξαέρωσης: 240°C

Αδρανές αέριο: Άζωτο

Ενέσεις: 1μl

ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται συγκρίνοντας το χρόνο κατακράτησης τους με το χρόνο κατακράτησης προτύπων μεθυλεστέρων. Η ποσοστιαία αναλογία των λιπαρών οξέων προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας το χρόνο κατακράτησης με το ύψος της κάθε κορυφής.

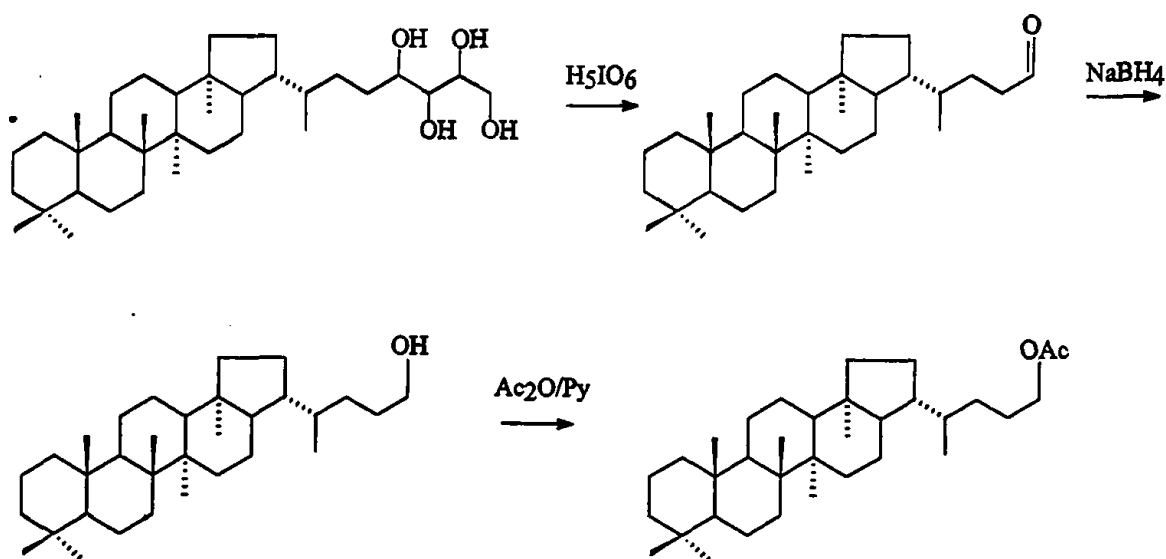


3.15 Ποσοτικός προσδιορισμός των οπανοειδών (Rohmer et al. 1984)

3.15.1 Οξείδωση, αναγωγή και ακετυλίωση των οπανοειδών

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην οξείδωση της παράπλευρης αλυσίδας των οπανοειδών σε $-C=O$, την αναγωγή της σε $-OH$ και τέλος την ακετυλίωση της. Τα οπανοειδή του *Z. mobilis*, δηλαδή η βακτηριοοπανοτετρόλη, ο αιθέρας της και ο γλυκοζαμίτης της, οξειδώνονται, ανάγονται και ακετυλιώνονται δίνοντας το ίδιο τελικό προϊόν με αποτέλεσμα να προσδιορίζονται ως σύνολο ακετυλιωμένων οπανοειδών. Στο Σχήμα 8 φαίνεται η οξείδωση, αναγωγή και ακετυλίωση της βακτηριοοπανοτετρόλης.



ΣΧΗΜΑ 8: Οξείδωση, αναγωγή και ακετυλίωση της βακτηριοοπανοτετρόλης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Οξείδωση και αναγωγή των ολικών λιπιδίων

Ένα γραμμάριο λυοφιλοποιημένων κυττάρων εκχυλίζεται με τη μέθοδο Rohmer. Τα λιπίδια που προκύπτουν τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 50 ml και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Στην κωνική φιάλη προστίθενται 2 ml διαλύματος υπεριοδικών και το μίγμα αφήνεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από μία ώρα προστίθενται 10 ml νερού. Το παραπάνω μίγμα εκχυλίζεται τρεις φορές με 5 ml εξανίου. Οι εξανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται με την προσθήκη Na_2SO_4 . Μετά από διήθηση του παραπάνω διαλύματος μέσω πτυχωτού ηθμού, το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Στη φιάλη προστίθενται 2 ml διαλύματος βοροϋδριδίου του νατρίου και αφήνεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα και 30 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα KH_2PO_4 0.5 N με σκοπό την εξουδετέρωση της περίσσειας του αναγωγικού NaBH_4 . Όταν το μίγμα σταματήσει να αφρίζει, διακόπτεται η προσθήκη του διαλύματος KH_2PO_4 γιατί η εξουδετέρωση έχει επιτευχθεί. Το μίγμα εκχυλίζεται με εξάνιο, όπως προηγουμένως, οι εξανικές φάσεις ενώνονται και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι μικρού όγκου.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Διάλυμα υπεριοδικών

Παρασκευάζεται με διάλυση 0.2 g υπεριοδικού οξέος σε 2 ml τετραϋδροφουρανίου / νερού (8:2).



2. Διάλυμα βοροϋδριδίου του νατρίου

Παρασκευάζεται με διάλυση 0.12 g NaBH_4 σε 2 ml αιθανόλης (98%).

B. Διαχωρισμός και ακετυλίωση των οπανοειδών

Τα οπανοειδή διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα λιπίδια με χρωματογραφία στήλης ως εξής:

Κατασκευάζεται μικροστήλη χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur, υαλοβάμβακα και κατάλληλη ποσότητα Silica gel ώστε η στήλη να έχει ύψος 5 cm. Η στήλη πακετάρεται με CH_2Cl_2 . Το παραπάνω οξειδωμένο και ανηγμένο δείγμα των ολικών λιπιδίων, προστίθεται στην μικροστήλη αφήνεται να περάσει από αυτή και συλλέγεται σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθενται 10 ml CH_2Cl_2 , αφήνονται να περάσουν από τη μικροστήλη, και συλλέγονται στην ίδια κωνική φιάλη. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι μικρού όγκου και το δείγμα μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και στο γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται 50 μl πυριδίνης, 50 μl οξικού ανυδρίτη και 100 μl τολουολίου. Το φιαλίδιο αφήνεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Ακολουθεί εξάτμιση της πυριδίνης, του οξικού ανυδρίτη και του τολουολίου και το δείγμα επαναιωρείται σε 100 μl CHCl_3 .

3.15.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των ακετυλιωμένων οπανοειδών με αέρια χρωματογραφία

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Αέριος χρωματογράφος: FISIONS Instruments, GC 8000 series

Καταγραφέας: Servotrace Sefram Paris Type PE No 9134



Στήλη: DB1

Μικροσύριγγες: Hamilton, 10 μ l.

Ολοκληρωτής: Shimadzu C-R3A

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η ένεση στον αέριο χρωματογράφο είναι ποσότητας 0.2 μ l, το φέρον αέριο είναι το υδρογόνο, ενώ το πρόγραμμα αύξησης της θερμοκρασίας που ακολουθείται είναι το εξής:



ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα ακετυλιωμένα οπανοειδή χαρακτηρίζονται συγκρίνοντας το χρόνο κατακράτησης τους με το χρόνο κατακράτησης προτύπων ακετυλιωμένων οπανοειδών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ακετυλιωμένων οπανοειδών γίνεται με τη βοήθεια ολοκληρωτή χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο διτριαντακοντάνιο γνωστής ποσότητας. Η μέθοδος αυτή δεν δίνει σωστά αποτελέσματα όσον αφορά την απόλυτη τιμή της ποσότητας των οπανοειδών ανά γραμμάριο κυττάρων. Είναι όμως κατάλληλη για τη σύγκριση της ποσότητας των οπανοειδών στη μεμβράνη διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου *Z. mobilis*.



3.16 Προσδιορισμός πρωτεϊνών (Lowry 1951)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στις εξής αντιδράσεις:

α. Το σχηματισμό συμπλόκου Cu^{2+} - πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας).

β. Την αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού και του φωσφορομολυβδαινικού άλατος, που περιέχονται στο αντιδραστήριο του Folin-Ciocalteus (Folin and Ciocalteus 1927), από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο προς το κυανό του βολφραμίου και το κυανό του μολυβδαινίου αντίστοιχα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

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 έως 1.0 ml με 0.5 N NaOH. Στη συνέχεια προστίθενται 5.0 ml διαλύματος 3, αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προστίθεται 0.5 ml διαλύματος 4, αναδεύεται αμέσως και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το σχηματιζόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 720 nm. Η περιεχόμενη πρωτεΐνη προσδιορίζεται με αναφορά πρότυπη καμπύλη BSA (0-200 μg).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. 2% κ.β. Na_2CO_3 σε απιονισμένο νερό.



2. 0.5% κ.β. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου.

3. Ανάμιξη των διαλυμάτων 1 και 2, σε αναλογία 50:1, πριν τη χρήση.

4. Αντιδραστήριο φαινόλης:

Αναμιγνύεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus με απιονισμένο νερό, σε αναλογία 1:1, πριν τη χρήση.

5. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA):

0.2 mg/ml σε 0.5 N NaOH.

6. Διάλυμα 1N NaOH.

3.17 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων (Bruner 1964)

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων έγινε με την μέθοδο της αντίδρασης του 3,5 - δινιτρο-σαλικυλικού οξέος ως εξής:

1. 2 ml από το αντιδραστήριο του 3,5-δινιτρο-σαλικυλικού οξέος τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα και το δείγμα ψύχεται σε υγρό πάγο (0 °C) για 5 λεπτά.

2. Το προς ανάλυση δείγμα προστίθεται στο σωλήνα σε ποσότητα όχι μεγαλύτερη από 2 ml και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 4 ml. Το δείγμα τοποθετείται σε υγρό πάγο (0 °C) για 5 λεπτά.



3. Οι σωλήνες θερμαίνονται στους 100 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε υγρό πάγο (0 °C) για άλλα 5 λεπτά.

4. Τέλος, σε κάθε σωλήνα προστίθενται 4 ml νερό και το χρώμα φωτομετρείται στα 540 nm. Παράλληλα γίνεται και πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας διαλύματα γλυκόζης ποσότητας 0.5 -14 μmol .

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα 3,5 - δινιτρο-σαλικυλικού οξέος

20 gr 3,5 - δινιτρο-σαλικυλικού οξέος διαλύονται σε 700 ml 1 N NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το ένα λίτρο. Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε πλαστικές φιάλες.

3.18 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κύτταρα του *Z.mobilis*

3.18.1 Κατεργασία των κυττάρων πριν από τον ενζυμικό προσδιορισμό

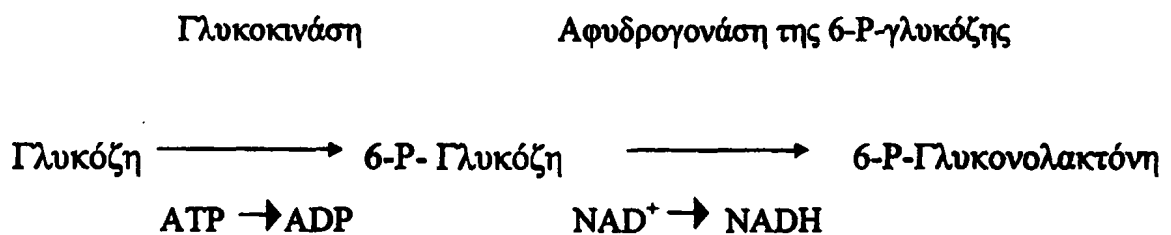
Όγκος καλλιέργειας κυττάρων *Z. mobilis* (250 ml) που βρίσκονται στην μέση της εκθετικής φάσης (O.D. 600 nm = 0.35-0.45), συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά. Τα κύτταρα εκπλένονται με 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, στο οποίο έχει προστεθεί 0.1ml/ml μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.6 ml του παραπάνω διαλύματος και τοποθετείται σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια (χωρητικότητας 2 ml), εντός των οποίων έχουν προστεθεί γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.1 mm προεμποτισμένα με 0.4 ml του παραπάνω διαλύματος, σε ποσότητα που καλύπτει το μισό του όγκου του φιαλιδίου. Τα φιαλίδια τοποθετούνται εναλλάξ σε συσκευή δόνησης (Mini-Beadbeater, model 3110 BX, Biospec products, Bartlesville Oklahoma

USA) και σε πάγο οκτώ φορές για χρονικό διάστημα 50 δευτερολέπτων κάθε φορά. Μετά από φυγοκέντρηση ενός λεπτού σε μικροφυγόκεντρο (12.000 rpm), το υπερκείμενο (όγκου ενός ml περίπου) τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για πέντε λεπτά. Το υπερκείμενο χρησιμοποιείται ως το ενζυμικό παρασκεύασμα για τους προσδιορισμούς ενζυμικών δραστηριοτήτων και πρωτεϊνών.

3.18.2 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας γλυκοκινάσης (Scopes et al. 1985)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στις εξής συζευγμένες αντιδράσεις, οι οποίες αποτελούν τα δύο πρώτα στάδια της γλυκολυτικής πορείας που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Z. mobilis* (πορεία Entner-Doudoroff):



Η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης μετράται ως η αύξηση του NADH ανά μονάδα χρόνου, χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως υπόστρωμα και προσθέτοντας σε περίσσεια αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης.



ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η αντίδραση της γλυκοκινάσης πραγματοποιείται μέσα σε κυψελίδα όγκου 3 ml, η οποία περιέχει τα εξής:

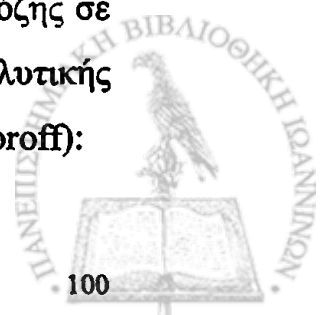
- 1 mM NAD⁺
- 10 mM γλυκόζη
- 1 mM ATP
- 5 mM MgCl₂
- 13 μονάδες αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης

Τα παραπάνω αντιδραστήρια, διαλύονται σε 20 mM KH₂PO₄ pH=7.5, σε τελικό όγκο 2.5 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 10-20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος και αναδεύεται για μερικά δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια μετράται η αύξηση της απορρόφησης του δείγματος στα 340 nm (αύξηση της ποσότητας του παραγόμενου NADH) σε φωτόμετρο Perkin-Elmer Lamda-15 για συνολικό χρόνο τέσσερα λεπτά. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20°C και ως μάρτυρας χρησιμοποιείται το παραπάνω διάλυμα χωρίς να έχει προστεθεί σε αυτό το υπόστρωμα.

3.18.3 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης (Scopes et al. 1985)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση μετατροπής της 6-P-γλυκόζης σε 6-P-γλυκονολακτόνη η οποία αποτελεί το δεύτερο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Z. molibis* (πορεία Entner-Doudoroff):



Αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης



Με βάση τα παραπάνω, για να μετρηθεί η δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης σε εκχύλισμα κυττάρων *Z. mobilis* χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η 6-P-γλυκόζη, και μετράται η αύξηση του NADH φωτομετρικά (340 nm) ανά μονάδα χρόνου.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η αντίδραση της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης πραγματοποιείται σε κυψελίδα όγκου 3 ml, η οποία περιέχει τα εξής:

- 1 mM NAD⁺
- 1 mM 6-P-γλυκόζης
- 2 mM Mg₂SO₄

Τα παραπάνω αντιδραστήρια, διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει: 30mM Tris-HCl, pH=7.5 και 30 mM KCl, σε τελικό όγκο 2.5 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 10-20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος, αναδεύεται για μερικά δευτερόλεπτα και μετράται η αύξηση της απορρόφησης του δείγματος στα 340nm (αύξηση της ποσότητας του παραγόμενου NADH) σε φωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda-15 για συνολικό χρόνο 4 λεπτά. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20°C και ως μάρτυρας χρησιμοποιείται το παραπάνω διάλυμα χωρίς να έχει προστεθεί σε αυτό το υπόστρωμα.



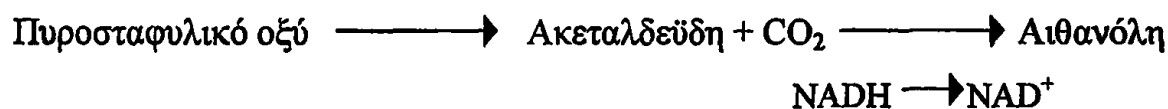
3.18.4 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (Neale et al. 1987, Diefenbach and Duggleby 1991)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στις εξής συζευγμένες αντιδράσεις, οι οποίες αποτελούν το έκτο και το έβδομο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff:

Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση

Αλκοολική αφυδρογονάση



Με βάση τα παραπάνω, για να μετρηθεί η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης σε εκχύλισμα κυττάρων *Z. mobilis*, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα πυροσταφυλικό οξύ, προστίθεται σε περίσσεια αλκοολική αφυδρογονάση, και μετράται η μείωση του NADH στα 340 nm ανά μονάδα χρόνου.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η αντίδραση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης πραγματοποιείται μέσα σε κυψελίδα όγκου 3 ml, η οποία περιέχει τα εξής:

0.15 mM NADH



5 mM πυροσταφυλικό οξύ

5 mM MgCl₂

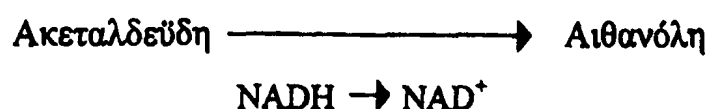
10 units αλκοολικής αφυδρογονάσης

Τα παραπάνω αντιδραστήρια, διαλύονται σε 20 mM KH₂PO₄ pH=7.5 σε τελικό όγκο 2.5 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 4 μl κυτταρικού εκχυλίσματος και αναδεύεται για μερικά δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια μετράται η μείωση της απορρόφησης του δείγματος στα 340 nm (μείωση της ποσότητας του NADH) σε φωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda-15 για συνολικό χρόνο ένα λεπτό και 24 δευτερόλεπτα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20°C και ως μάρτυρας χρησιμοποιείται το παραπάνω διάλυμα χωρίς να έχει προστεθεί σε αυτό το υπόστρωμα.

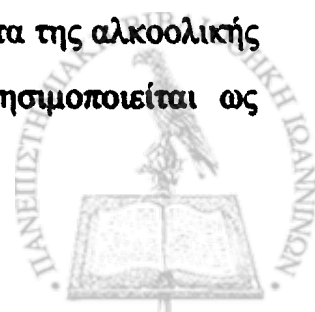
3.18.5 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας αλκοολικής αφυδρογονάσης (Conway et al. 1987, Keshav 1990)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση μετατροπής της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη, η οποία αποτελεί το έβδομο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff:

Αλκοολική αφυδρογονάση



Με βάση τα παραπάνω, για να μετρηθεί η δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης στο εκχύλισμα κυττάρων *Z. mobilis*, χρησιμοποιείται ως



υπόστρωμα η ακεταλδεϋδη και μετράται η μείωση του NADH στα 340 nm ανά μονάδα χρόνου.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η αντίδραση της αλκοολικής αφυδρογονάσης πραγματοποιείται σε κυψελίδα όγκου 3 ml, η οποία περιέχει τα εξής:

0.15 mM NADH

5 mM ακεταλδεϋδη

• 5 mM MgCl₂

Τα παραπάνω αντιδραστήρια διαλύονται σε 20 mM KH₂PO₄ pH=7.5 σε τελικό όγκο 2.5 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 4 μl κυτταρικού εκχυλίσματος και αναδεύεται για μερικά δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια μετράται η μείωση της απορρόφησης του δείγματος στα 340 nm (μείωση της ποσότητας του NADH) σε φωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda-15 για συνολικό χρόνο 2 λεπτά. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20°C και ως μάρτυρας χρησιμοποιείται το παραπάνω διάλυμα χωρίς να έχει προστεθεί σε αυτό το υπόστρωμα.

3.18.6 Υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας

Σε όλες τις παραπάνω μετρήσεις των δραστηριοτήτων μετράται η ταχύτητα μεταβολής της απορρόφησης του NADH στα 340 nm. Έτσι είναι δυνατόν να υπολογιστεί η κλίση ($\Delta \text{abs} / \Delta t$) της ευθείας που σχηματίζεται, αν σε χιλιοστομετρικό χαρτί τοποθετηθεί στον άξονα των X ο χρόνος και στον άξονα των Y η απορρόφηση. Η δραστηριότητα του ενζύμου (nmole NADH / min x mg πρωτεΐνης) μπορεί να υπολογιστεί με βάση αυτή την κλίση, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο (Beaucamp et al. 1974, Bergmeyer et al. 1974):



$$\text{Δραστικότητα} = \text{κλίση} \times 2.5 \times 10^3 / 6.22 \times \text{mg πρωτεΐνης}$$

όπου:

2.5= ο συνολικός όγκος της αντίδρασης (cm^3)

6.22= συντελεστής εξασθένισης του NADH ($\text{cm}^2/\mu\text{mole}$) x διαδρομή της φωτεινής δέσμης (1 cm).

Οι πρωτεΐνες προσδιορίζονται με τη μέθοδο Lowry (βλέπε παραπάνω).

3.19 Κινητική μελέτη του ενζύμου γλυκοκινάση στο βακτήριο *Z. mobilis*

3.19.1 Υπολογισμός των τιμών K_m και V_{max}

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} έγινε η μέτρηση της δραστικότητας της γλυκοκινάσης σε κύτταρα *Z. mobilis* όπως ακριβώς αναφέρεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας όμως ποικίλες συγκεντρώσεις γλυκόζης (από 0.01 mM μέχρι 10 mM). Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} γίνεται με επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991).



3.19.2 Υπολογισμός της κινητικής παραμέτρου k_{cat} στην αντίδραση της γλυκοκινάσης

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (NC-JUB 1983, Παπαμιχαήλ 1997)

Σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι ενζυμικές αντιδράσεις εμφανίζουν κινητική πρώτης τάξεως σύμφωνα με την αντίδραση:



όπου E: το ένζυμο, S: το υπόστρωμα, ES: το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος και P: το προϊόν.

Η ταχύτητα της αντίδρασης πρώτης τάξης είναι $v = k_0 [E]_0$ (1), επειδή η [S] παραμένει ουσιαστικά αναλλοίωτη, όπου $k_0 = k_{cat}$ (2) είναι η φαινόμενη σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης, γνωστή και ως καταλυτική σταθερά.

Σε αυτές τις συνθήκες όπου ισχύει $[S] \gg [E]$ και $[S] \gg [K_m]$, η εξίσωση Michaelis-Menten μετατρέπεται στη σχέση: $v = V_{max} [S] / [S] = V_{max}$ (3).

Από (1), (2), (3), προκύπτει η σχέση: $V_{max} = k_{cat} [E]_0$ (4).

Η καταλυτική σταθερά k_{cat} είναι μέτρο του καταλυτικού δυναμικού του ενζύμου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η μέτρηση της k_{cat} γίνεται σύμφωνα με τους Kezdy and Kaizer 1970 και τον Knight 1995, με τιτλοδότηση των ενεργών κέντρων του ενζύμου γλυκοκινάση μετρώντας τη δραστηριότητα όπως παραπάνω σε χαμηλή θερμοκρασία (3°C) όπου η αντίδραση είναι πολύ αργή, χρησιμοποιώντας ως τιτλοδότη το ίδιο το υπόστρωμα, το οποίο στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πολύ ειδικό. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε το $[E]_0$ σύμφωνα με τον τύπο:



$$[E]_0 = [(1000 + V_e) / V_e] \times (\pi / \epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}})$$

όπου:

V_e = ο όγκος του προστιθέμενου ενζύμου (μl, σε 1000 μl τελικού όγκου αντίδρασης)

π = ένας αριθμός που υπολογίζεται γραφικά και αντιστοιχεί στην απορρόφηση στο χρόνο μηδέν

$\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}}$ = ο συντελεστής εξασθένισης του NADH (6220 μl/μmol)

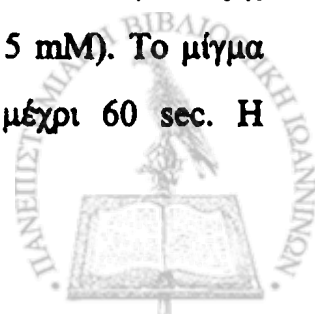
Παράλληλα γίνεται και η μέτρηση της τιμής V_{max} (βλέπε παραπάνω), η οποία υπολογίζεται ως $\Delta \text{abs} / \text{min} \times \epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}}$, και η k_{cat} μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο (Knight 1995):

$$k_{\text{cat}} = \Delta \text{abs} / \text{min} \times [E]_0 \times \epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}}$$

3.20 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης από κύτταρα *Z. mobilis* και *E. coli* (Walsh et al. 1996, Weisser et al. 1995)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Καλλιέργεια κυττάρων *Z. mobilis* (O.D.= 0.3-0.4) όγκου 500 ml (σε Zymo Broth), φυγοκεντρείται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM φωσφορικών pH= 7.5 και επαναιωρούνται σε 1 ml του παραπάνω διαλύματος. Εναιώρημα κυττάρων 50 μl αναμιγνύονται με 12.5 μl μίγματος γλυκόζης και ¹⁴C-γλυκόζης (Amersham, England, 291 mCi/mmol, τελική συγκέντρωση 5 mM). Το μίγμα επωάζεται στους 20°C για χρονικά διαστήματα από 0 μέχρι 60 sec. Η



αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 10 ml διαλύματος διακοπής της πρόσληψης της γλυκόζης. Τα κύτταρα διηθούνται αμέσως και εκπλένονται με 10 ml του παραπάνω διαλύματος. Τα φίλτρα μεταφέρονται σε ειδικά φιαλίδια, στα οποία προστίθεται 6 ml υγρού σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

Β. Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* (O.D.= 0.2), όγκου 50 ml (σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9) παρουσία 1 mM IPTG αναπτύσσεται μέχρι να αποκτήσει οπτική πυκνότητα 0.7 (τέλος εκθετικής φάσης). Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Τα ίζημα των κυττάρων εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM φωσφορικών pH= 7.5. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml του παραπάνω διαλύματος. Εναιώρημα κυττάρων 50 μl αναμιγνύονται με 2 μl μίγματος 2-δεοξυγλυκόζης και ¹⁴C-2-δεοξυγλυκόζης (Amersham, England, 308 mCi/mmol, τελική συγκέντρωση 5mM). Το μίγμα επωάζεται στους 10 °C για χρονικά διαστήματα από 0 μέχρι 60 sec. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 10 ml διαλύματος διακοπής της πρόσληψης της γλυκόζης. Τα κύτταρα διηθούνται αμέσως και εκπλένονται με 10 ml του παραπάνω διαλύματος. Τα φίλτρα μεταφέρονται σε ειδικά φιαλίδια στα οποία προστίθεται 6 ml υγρού σπινθηρισμού και μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή β-ακτινιβολίας.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η συγκέντρωση της γλυκόζης που έχει προσληφθεί από τα κύτταρα υπολογίζεται με βάση το ποσοστό ραδιενέργειας των διηθημένων κυττάρων σε σχέση με την ποσότητα του αρχικά προστιθέμενου ραδιοϊσοτόπου η οποία αντιστοιχεί σε γνωστή συγκέντρωση γλυκόζης. Η αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης από τα κύτταρα υπολογίζεται ως εξής:



Αρχικά υπολογίζεται ο λόγος της προσληφθείσας συγκέντρωσης της γλυκόζης (nmol γλυκόζης) ανά mg ολικής πρωτεΐνης, η οποία υπολογίζεται με τη μέθοδο Lowry (βλέπε παραπάνω). Ο λόγος αυτός απεικονίζεται σε χιλιοστομετρικό χαρτί σε σχέση με το χρόνο (ανά sec). Η κλίση της ευθείας αυτής αποτελεί την αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης από τα κύτταρα (nmol γλυκόζης \times sec⁻¹ \times mg⁻¹ πρωτεΐνης).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:

100 mM KH₂PO₄ pH= 7.5. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1N.

2. Διάλυμα διακοπής της πρόσληψης της γλυκόζης:

500 mM γλυκόζης σε 100 mM διαλύματος φωσφορικών pH=7.5. Το διάλυμα αυτό πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία - 2.5°C, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

3. Διάλυμα υγρού σπινθηρισμού:

Σε 666 ml τολουολίου προστίθενται : 4 gr 2,5 diphenyloxazol και 0.04 gr 1,4-bis[2-(5-phenyl)-oxazolyl] benzol, και το μίγμα αναδεύεται πολύ καλά για αρκετή ώρα μέχρι να γίνει διαυγές. Στο παραπάνω μίγμα προστίθενται 333 ml Triton.



3.21 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} έγινε η μέτρηση της πρόσληψης της γλυκόζης στα κύτταρα του *Z. mobilis*, όπως ακριβώς αναφέρεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας όμως ποικίλες συγκεντρώσεις γλυκόζης (από 0.25 mM μέχρι 50 mM). Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} , γίνεται με επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991).

3.22 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E. coli* με πλασμιδιακό DNA (Kushner et al. 1978)

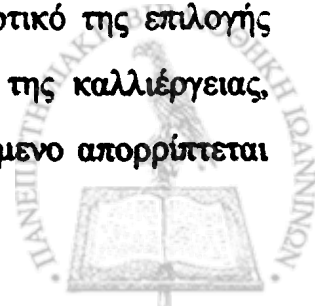
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην κατασκευή επιδεκτικών κυττάρων, δηλαδή κυττάρων τα οποία μπορούν να προσλάβουν DNA, με την επίδραση ιόντων ασβεστίου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας *E. coli*, σε 20 ml Luria Broth, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.) στα 600 nm: 0.1-0.2.
2. 1.5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια αυτή τοποθετείται σε σωληνάριο Eppendorf και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.

3. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος πλύσεως ($\Delta 1$) και φυγοκέντρηση τους στις 12.000 rpm για ένα λεπτό.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος ασβεστίου ($\Delta 2$) και επωάζεται για 30 λεπτά σε υγρό πάγο (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 ($\Delta 2$).
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 υγρό πάγο (0°C) για 30 λεπτά.
9. Ακολουθεί θερμικό πλήγμα με τοποθέτηση του σωληναρίου Epedorff 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, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί ο χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
11. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε τρυβλίο που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα υπόλοιπα 2.8 ml της καλλιέργειας, φυγοκεντρώνται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται



και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2 ml Luria Broth και εμβολιάζεται σε τρυβλίο που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Διάλυμα πλύσεως (Δ1)

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

2. Διάλυμα ασβεστίου (Δ2)

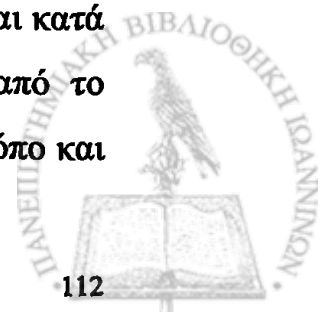
10 mM RbCl, 100 mM MOPS pH= 6.5, 50 mM CaCl₂

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

3.23 Επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη μεταξύ *E. coli* (δότης) και *Z. mobilis* (δέκτης) (Afendra and Drainas 1987).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη επιτυγχάνεται μέσω του βοηθητικού πλασμιδίου pRK2013. Αυτό είναι ένα συζευκτικό πλασμίδιο το οποίο κωδικεύει όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για να σχηματιστεί η κυτταροπλασματική γέφυρα μεταξύ δύο διαφορετικών κυττάρων (δότη-δέκτη) και περιέχει αλληλουχίες για την κωδίκευση της πρωτεΐνης Mob (Figurski and Helinski 1979). Μέσω της κυτταροπλασματικής γέφυρας μεταφέρεται μια αλυσίδα συζευκτικού πλασμιδίου στο κύτταρο δέκτη, η οποία εκτοπίζεται κατά τη διάρκεια ειδικής μεταγραφής DNA κυλιόμενου κύκλου. Εκτός από το συζευκτικό πλασμίδιο, είναι δυνατό να συμμεταφερθεί κατά τον ίδιο τρόπο και



άλλο πλασμίδιο που υπάρχει στο κύτταρο δότη, αρκεί αυτό να έχει ειδικές αλληλουχίες κινητοποίησης που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Mob του συζευκτικού πλασμιδίου ή την πρωτεΐνη Mob που κωδικεύεται από το ίδιο το πλασμίδιο, όπως περιοχές έναρξης μεταφορικής αντιγραφής του DNA *bom* ή *OriT*.

Τα κύτταρα δότες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν τα στελέχη *E. coli* DH5α που έφεραν το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013 (Km^r) και το κινητοποιήσιμο πλασμίδιο αντίστοιχα.

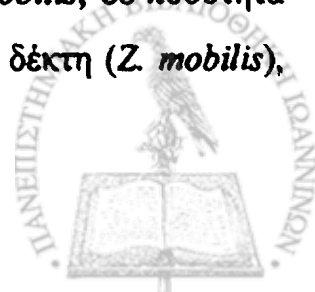
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καλλιέργειες των κυττάρων-δότης *E. coli* DH5α/pRK2013 και DH5α/κινητοποιήσιμο πλασμίδιο αναπτύσσονται μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα (O.D. 600 nm) περίπου 0.3. Συγχρόνως αναπτύσσεται και η καλλιέργεια των κυττάρων-δέκτης *Z. mobilis* μέχρι να αποκτήσει οπτική πυκνότητα (O.D. 600 nm) περίπου 0.4.

2. Τα δύο στελέχη DH5α τα οποία αποτελούν τους δότες, αναμιγνύονται σε αναλογία 1:2 (DH5α/pRK2013: DH5α/κινητοποιήσιμο πλασμίδιο). Ο αριθμός κυττάρων δότη είναι περίπου 10^7 κύτταρα.

3. Το μίγμα των κυττάρων διηθείται υπό κενό από φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0.45 μm, και το φίλτρο τοποθετείται σε τρυβλίο Luria Agar στους 37°C, για μία ώρα. Κατά το διάστημα αυτό δημιουργούνται κύτταρα-δότες που περιέχουν και τα δύο πλασμίδια.

4. Μετά από μία ώρα το φίλτρο τοποθετείται σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο που περιέχει την καλλιέργεια των κυττάρων *Z. mobilis*, σε ποσότητα τέτοια ώστε η αναλογία δότη (DH5α/δύο πλασμίδια) προς δέκτη (*Z. mobilis*),



να είναι 1:4. Ο αριθμός των κυττάρων του δέκτη είναι 10^8 /ml. Η επαναιώρηση των κυττάρων του φίλτρου στην καλλιέργεια του *Z. mobilis* γίνεται πολύ ήπια.

5. Το παραπάνω μίγμα διηθείται όπως παραπάνω και τοποθετείται σε τρυβλίο Zymo Agar στους 30°C για 5 ώρες.

6. Μετά από 5 ώρες το φίλτρο τοποθετείται σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο που περιέχει 1 ml Zymo Broth και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.

7. Ακολουθεί εμβολιασμός των κυττάρων του παραπάνω μίγματος σε τρυβλία Zymo Agar που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής μετασυζευγμένων κυττάρων.

Ο αποκλεισμός των κυττάρων δοτών επιτυγχάνεται είτε με την προσθήκη στο μέσο επιλογής ριφαμπικίνης (20 μ g/ml), είτε με υπερϊώδη ακτινοβολία, επιδράσεις στις οποίες τα κύτταρα *E. coli* είναι ευαίσθητα ενώ τα κύτταρα *Z. mobilis* είναι ανθεκτικά.

Ο έλεγχος των μετασυζευγμένων αποικιών γίνεται ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία: εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA, επαναμετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με το πλασμιδιακό εκχύλισμα (back transformation), απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις επαναμετασχηματισμένες αποικίες *E. coli* (back-transformants) περιοριστική ανάλυση και υβριδισμός DNA-DNA για έλεγχο της δομής του πλασμιδίου.

3.24 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσεως 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, διευκολύνοντας έτσι την εκλεκτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

3.24.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μεγάλη κλίμακα

A. Καθαρισμός με βαθμίδωση πυκνότητας CsCl

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού DNA από τις πρωτεΐνες, το RNA και το χρωμοσωμικό DNA γίνεται με την επίδραση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Αυτό εισβάλλει μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA με αποτέλεσμα το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας και κατ' επέκταση την επιμήκυνση του μορίου και την ελάττωση της πυκνότητας επίπλευσης του. Η επίδραση του EtBr δεν επιφέρει τις ίδιες αλλοιώσεις σε μόρια πλασμιδιακού DNA, τα οποία είναι κυκλικά και ομοιοπολικά κλειστά, ιδιότητα που παρεμποδίζει τη διείσδυση του EtBr εντός των αλυσίδων DNA. Άρα, εξισορροπημένη βαθμίδωση πυκνότητας CsCl που επιτυγχάνεται με πολύωρη υπερφυγοκέντρηση, διευκολύνει το διαχωρισμό συμπλόκων του πλασμιδιακού DNA-EtBr (λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητας επίπλευσης τους) από τα υπόλοιπα σύμπλοκα DNA-EtBr. Το σύμπλοκο του πλασμιδιακού DNA-EtBr, σχηματίζει μια ζώνη που βρίσκεται πλησιέστερα στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα (Hardy 1981).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σε καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* (600 ml) οπτικής πυκνότητας (O.D.) 0.8, προστίθενται αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης (χλωραμφαινικόλη ή στρεπτομυκίνη) σε ποσότητα 200 µg/ml, έτσι ώστε να ενισχυθεί ο αριθμός των



πλασμιδιακών αντιγράφων στα κύτταρα (amplification). Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για 10-12 ώρες.

2. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων από την καλλιέργεια με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και έκπλυσή τους με 50 ml διαλύματος 25 mM Tris-HCl pH= 8.

3. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται όπως προηγουμένως και επαναιωρούνται σε 50 ml διαλύματος I. Κατόπιν προστίθενται 250 mg λυσοζύμης και το εναιώρημα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά.

4. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 100 ml φρέσκου διαλύματος II. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να γίνει διαυγές και τοποθετείται σε υγρό πάγο (0°C) για 5 λεπτά.

5. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 75 ml διαλύματος III, ανάδευση και παραμονή για 15 λεπτά σε υγρό πάγο (0°C).

6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά, και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη μέσω αποστειρωμένης γάζας.

7. Στο διάλυμα προστίθενται 180 ml ψυχρής ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm στους 0°C για 10 λεπτά.

8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει καλά και στη συνέχεια διαλύεται σε 9.2 ml TE pH= 8.

9. Το παραπάνω διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη στην οποία έχουν προστεθεί 10 g CsCl και 0.96 ml EtBr (3mg/ml). Το μίγμα αυτό μεταφέρεται σε

σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης, ο οποίος υπερπληρώνεται με παραφινέλαιο. Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες ζυγοσταθμίζονται με ακρίβεια 0.01g.

10. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση του δείγματος στις 40.000 rpm στους 20°C για 18-24 ώρες. (υπερφυγόκεντρος Beckman 75, με κεφαλή NVT65 σταθερής γωνίας).

11. Μετά την υπερφυγοκέντρωση αφαιρείται το στρώμα του παραφινέλαιου και η ζώνη του πλασμιδιακού DNA τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 10 ml. Η ζώνη του πλασμιδιακού DNA μπορεί να διακριθεί λόγω της παρουσίας του EtBr είτε δια γυμνού οφθαλμού είτε με φθορισμό στο υπεριώδες φως.

12. Το βρωμιούχο αιθίδιο απομακρύνεται από το διάλυμα με διαδοχικές εκχυλίσεις με 1-βουτανόλη. Οι εκχυλίσεις σταματούν όταν χαθεί το κόκκινο χρώμα (συνήθως μετά από 3-4 εκχυλίσεις). Ο διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση διευκολύνεται με φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 5 λεπτά.

13. Το CsCl απομακρύνεται από το διάλυμα με διαπίδυση εντός κατάλληλα κατεργασμένων μεμβρανικών σωλήνων. Η διαπίδυση γίνεται σε ένα λίτρο διαλύματος TE, όπου εμβαπτίζονται οι μεμβράνες κλεισμένες με ειδικά κλείστρα. Το διάλυμα της διαπίδυσης αναδεύεται ήπια στους 4°C και αντικαθίσταται τρεις φορές ανά δύο ώρες.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Διάλυμα I

50 mM γλυκόζης

25 mM Tris (τρεις-υδροξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH= 8



10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

2. Διάλυμα II

0.2 N NaOH

1% SDS (δώδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

3. Διάλυμα III

10 mM CH₃COOK pH= 4.8

4. Διάλυμα TE

10 mM Tris-HCl

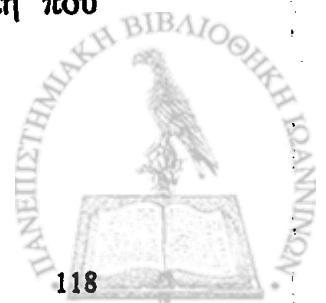
1 mM EDTA pH= 8

ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ (Sambrook et al. 1989)

1. Ρολό μεμβρανικού σωλήνα διαπίδυσης (Visking dialysis tubing, SERVA 20/32 No44110) τεμαχίζεται σε τμήματα μήκους 10-15 cm τα οποία βυθίζονται σε δοχείο ζέσεως που περιέχει δύο λίτρα διαλύματος 10 mM EDTA pH= 8. Το διάλυμα αφήνεται να βράσει για 10 λεπτά.

2. Το διάλυμα απορρίπτεται και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται με δύο λίτρα νερού.

3. Οι ενεργοποιημένες μεμβράνες αποστειρώνονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200 ml νερού και φυλάσσονται στους 4°C.



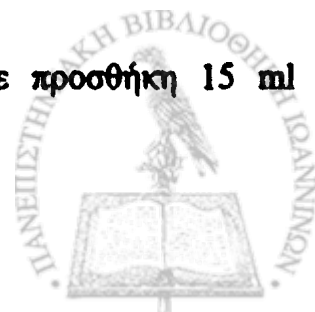
B. Απομόνωση με τη μέθοδο Jetstar (Maxi 20, Genomed)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική δέσμευση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας στήλη εφοδιασμένη με το κατάλληλο υλικό και στη συνέχεια έκλυση του DNA από τη στήλη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Από καλλιέργεια 300-500 ml *E. coli*, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά.
2. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος E1.
3. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με την προσθήκη 10 ml διαλύματος E2 και επώαση του εναιωρήματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά.
4. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 10 ml διαλύματος E3. Ακολουθεί άμεση ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά.
5. Το υπερκείμενο τοποθετείται στην ειδική στήλη και αφήνεται να εκρεύσει μέσω της βαρύτητας. Η στήλη έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 30 ml διαλύματος E4.
6. Ακολουθεί έκλυση της στήλης με 60 ml διαλύματος E5.
7. Στη συνέχεια το DNA εκλύεται από τη στήλη με προσθήκη 15 ml διαλύματος E6.



8. Τέλος γίνεται καταβύθιση του DNA με 10.5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 15.000 στους 4°C για 30 λεπτά. Το DNA εκπλένεται με 70% αιθανόλη, φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως, το ίζημα ξηραίνεται με παραμονή στους 37°C και επαναιωρείται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

E1: διάλυμα επαναιώρησης κυττάρων

• 50 mM Tris

10mM EDTA pH=8.0

100 μg/ml Rnase

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

E2: διάλυμα λύσης κυττάρων

200 mM NaOH

1% SDS

E3: διάλυμα ουδετεροποίησης

3.1 M CH₃COOK pH=5.5

E4: διάλυμα εξισορρόπησης στήλης

600 mM NaCl

100 mM CH₃COONa pH=5.0

0.15% TritonX-100

E5: διάλυμα έκπλυσης στήλης

800 mM NaCl

100 mM CH₃COONa pH=5.0

E6: διάλυμα έκλουσης

1250 mM NaCl

100 mM Tris pH=7.5

3.24.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Η μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα (βλέπε 3.24.1.A) 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 επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στο παραπάνω εναιώρημα 200 μl διαλύματος II και το μίγμα επωάζεται σε υγρό πάγο (0°C) για 10 λεπτά.
4. Ακολουθεί η προσθήκη 150 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε υγρό πάγο (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 άλλο σωληνάριο στο οποίο προστίθενται 320 μl παγωμένης (-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 παγωμένης (-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.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Διάλυμα I

50 mM γλυκόζης

25 mM Tris (τρις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH= 8

10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

5 mg/ml λυσοζύμης

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.



2. Διάλυμα II

0.2 N NaOH

1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

Το διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν την χρήση του.

3. Διάλυμα III

3 M CH₃COOK pH= 4.8

4. Διάλυμα TE

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA pH= 8

3.24.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *Z. mobilis* (Scordaki and Drainas 1987)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων και ακολουθεί την εξής πειραματική διαδικασία:

1. Από 50 ml καλλιέργεια *Z. mobilis*, η οποία βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής φάσης, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά.

2. Το κυτταρικό ίζημα εκκλίνεται με 5 ml διαλύματος 50 mM Tris pH=8.0.



3. Στη συνέχεια γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων με 200 μl διαλύματος TE₅₀ και ακολουθεί η προσθήκη 100 μl διαλύματος λυσοζύμης (5mg/ml) και επώαση στους 37 °C για 40 λεπτά.
4. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 2.5 ml διαλύματος λύσεως και ακολουθεί ανάδευση για ένα λεπτό. Γίνεται επώαση στους 37 °C για 40 λεπτά.
5. Στη συνέχεια προστίθενται 0.4 ml διαλύματος 2 M Tris pH=7.0 και ακολουθεί ανάδευση για ένα λεπτό.
6. Η κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA γίνεται με προσθήκη 0.27 ml 5 M NaCl, ανάδευση για ένα λεπτό και τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό πάγο (0 °C) για 2 ώρες.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm στους 4 °C για 30 λεπτά για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και το χρωμοσωμικό DNA.
8. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα, που περιέχει 32 μl διαλύματος ενεργοποιημένης RNασης, και το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά.
9. Ακολουθούν δύο εκχυλίσεις με 2.5 ml δις-απεσταγμένης φαινόλης, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες. Το μίγμα αναδεύεται γρήγορα για 10 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ήπια για ένα λεπτό. Οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στις 3800 rpm για πέντε λεπτά.
10. Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση με 2,5 ml χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της φαινόλης. Η ανάμιξη και ο διαχωρισμός των φάσεων γίνεται όπως προηγουμένως.

11. Στην υδατική φάση προστίθενται ποσότητα 3 M CH₃COONa ίση με το 1/6 του όγκου της και παγωμένη (-20 °C) αιθανόλη σε όγκο διπλάσιο ή τριπλάσιο από αυτόν της υδατικής φάσης. Το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C για μία νύχτα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση του πλασμιδιακού DNA.

12. Το παραπάνω δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm σε 0 °C για 20 λεπτά και λαμβάνεται το ίζημα, το οποίο αποτελεί το πλασμιδιακό DNA.

13. Το πλασμιδιακό DNA εκπλένεται με 2 ml 70% αιθανόλης, ξηραίνεται και επαναιωρείται σε 100-200 μl TE. Το διάλυμα του πλασμιδιακού DNA φυλάσσεται στους 4 °C.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. TE₅₀

50 mM Tris

5 mM EDTA pH=8.0

2. Διάλυμα λυσοζύμης

40 mg λυσοζύμης/ ml TE₅₀

3. Διάλυμα λύσεως

1% SDS σε TE₅₀

Πριν από τη χρήση το pH ρυθμίζεται σε 12.45 με διάλυμα NaOH 12 N.



4. Διάλυμα RNaσης

2 mg RNaσης /ml νερού

Το διάλυμα βράζεται στους 95 °C για 10 λεπτά και φυλάσσεται στους -20 °C.

5. Φαινόλη

Η φαινόλη αποστάζεται δύο φορές στους 160 °C, για να απομακρυνθούν οι διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες, οι οποίοι καταστρέφουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των νουκλεϊνικών οξέων. Στην απεσταγμένη φαινόλη προστίθεται υδροξυκινολίνη, σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται ως δείκτης οξείδωσης (αλλαγή χρώματος). Η φαινόλη επίσης εξισορροπείται με διάλυμα 3% NaCl ή με 2M Tris-HCl, ώστε το pH της φαινόλης να γίνει μεγαλύτερο από 7.8.

3.25 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το *Z. mobilis* (Byun et al, 1986)

1. Κύτταρα από καλλιέργεια 100 ml στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης φυγοκεντρώνται στις 8.000 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση με 5 ml διαλύματος I.
2. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml διαλύματος II.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 10 mg λυσοζύμης και το κυτταρικό αιώρημα επωάζεται στους 37°C για 12 ώρες τουλάχιστον.

4. Ακολουθεί προσθήκη υδατικού διαλύματος πρωτεάσης-K σε τελική συγκέντρωση 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ και το διάλυμα αφήνεται να επωαστεί στους 50°C για άλλες 12 ώρες.
5. Μετά την προσθήκη 1 ml διαλύματος 10% λαυρικής σαρκοσίνης, ακολουθεί επώαση όπως το προηγούμενο βήμα.
6. Στη συνέχεια προστίθενται 20 ml αιθανόλης και το DNA συλλέγεται με μια γυάλινη ράβδο η οποία περιστρέφεται εντός του διαλύματος κατά τη διάρκεια της προσθήκης της αιθανόλης.
7. Ακολουθεί έκπλυση του DNA με τον εμβαπτισμό της ράβδου σε 70% αιθανόλη δύο φορές.
8. Το DNA αφήνεται να στεγνώσει στους 37 °C και επαναδιαλύεται σε 4 ml T.E (για την επαναδιάλυση του απαιτείται χρόνος περισσότερος των 18 ωρών).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. Διάλυμα I

50 mM Tris-HCl

100 mM EDTA pH=8.0

2. Διάλυμα II

25 mM Tris-HCl

100 mM EDTA pH=8.0

10% γλυκερόλη



Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα μετά την απομόνωση μετράται ως εξής:

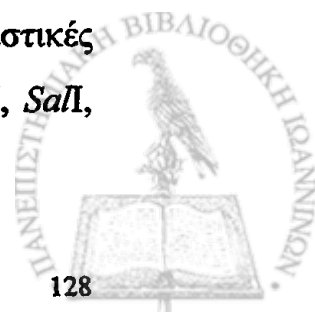
Μετά από κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνεται μία μέτρηση στα 260 nm και μία στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: $OD_{260} = 1$ αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA / ml διαλύματος. Το διάλυμα του DNA είναι καθαρό όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1.8.

3.26 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στις κλωνοποιήσεις DNA είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6), και διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων 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 μοριακού βάρους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις κατασκευαστικές εταιρίες. Η συγκέντρωση των περισσοτέρων 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.

Στη παρούσα εργασία, για την χαρτογράφηση των γονιδίων, την υποκλωνοποίηση τους και γενικά τις αναλύσεις των πλασμιδιακών και χρωμοσωμικών DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εξής περιοριστικές ενδονουκλεάσες: *ApaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*,



*Sma*I, *Xba*I και *Xho*I. Ως πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ που είχε υποστεί πέψη με *Hind*III.

3.26.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook et al. 1989)

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20 μl, σε σωληνάριο Eppendorf 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.



3.26.2 Πέψεις χρωμοσωμικού DNA

Οι πέψεις γίνονται σε τελικό όγκο 1ml, σε αποστειρωμένους σωλήνες των 3 ml στους οποίους τοποθετούνται τα εξής:

1. Η κατάλληλη ποσότητα ds H₂O, για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.

2. 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος

3. 10 μl διαλύματος σπερμιδίνης 100 mM

4. 20-30 μg χρωμοσωμικού DNA

5. Κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ώστε να αντιστοιχούν 5 Unit / μg DNA

Το παραπάνω μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 30°C ή στους 37°C για 1-2 μέρες. Ο έλεγχος της πλήρους πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας δείγματος.

Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, η μείωση του όγκου της αντίδρασης επιτυγχάνεται με διαδοχικές εκχυλίσεις με 2-βουτανόλη. Όταν ο όγκος μειωθεί στα 100 μl, τότε η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε σωλήνα Eppendorf και γίνεται καταβύθιση του DNA προσθέτοντας 50 μl διαλύματος CH₃COONH₄ 7.5 M και 300 μl αιθανόλης, και τοποθέτηση του δείγματος στους -20°C για τη διάρκεια μιας νύχτας.

Μετά την καταβύθιση του DNA, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 4 °C για 20 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε 30 μl T.E.

3.27 Ηλεκτροφόρηση του DNA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού 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 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 ιικό 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 Bennett 1988).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Sambrook et al. 1989)

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0.7- 2 g αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πήγματος). Στην φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος TAE και τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη.

2. Όταν η θερμοκρασία της παραπάνω φιάλης φθάσει 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 αποχύνεται 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 1:5 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 πήγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική για το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

5. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια του πήγματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε

θερμοκρασία περιβάλλοντος.

6. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA-βρωμιούχου αιθιδίου τα οποία παρουσιάζουν ζώνες ρόδινου χρώματος. Η φωτογράφιση του πηγματος γίνεται με μηχανή Polaroid με φιλμ Polaroid 667 (3000 ASA) και έχοντας προσαρμοσμένα στο φακό δύο φίλτρα (πορτοκαλί και κίτρινο).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

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.



3.28 Απομόνωση DNA από πύγμα αγαρόζης

Η απομόνωση DNA από πύγμα αγαρόζης μπορεί να γίνει με τις εξής δύο μεθόδους:

3.28.1 Απομόνωση DNA από πύγμα αγαρόζης με τη μέθοδο GEANCLEAN II BIO 101

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το Geneclean II περιέχει ειδικά διαμορφωμένα σφαιρίδια οξειδίου του πυριτίου (Glassmilk), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προσδένουν το μονόκλωνο και δίκλωνο DNA, χωρίς να προσδένουν άλλα συστατικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το πύγμα αγαρόζης, ζυγίζεται (1 g = 1 ml) και τοποθετείται σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα.
2. Προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος 6 M NaI, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 4.5 M.
3. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο 45-55 °C και αναδεύεται ανά 2-3 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μίγμα.
4. Ακολουθεί η προσθήκη ανάλογης ποσότητας Glassmilk, τηρούμενης της αναλογίας 5 μl Glassmilk ανά 5 μg DNA.
5. Μετά από ισχυρή ανάδευση, το εναιώρημα τοποθετείται σε υγρό πάγο (0 °C)

για 20 λεπτά και στη συνέχεια στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ενώ το μίγμα αναδεύεται κάθε 2-3 λεπτά.

6. Η καταβύθιση του Glassmilk γίνεται με φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα. Εάν έχουμε μεγάλους όγκους, η φυγοκέντρηση γίνεται για 5 λεπτά.

7. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο δοκιμαστικό αποστειρωμένο σωλήνα, ώστε μετά το πέρας της πρώτης - κατά την οποία δεσμεύεται το 80% του DNA - να ακολουθήσει και δεύτερη δέσμευση.

8. Το ίζημα πλένεται τρεις φορές με 10-50 όγκους (200-700 μl) παγωμένου διαλύματος NEW WASH.

9. Ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος στους 37 °C και επαναιώρηση του σε 30 μl ds H₂O. Ο σωλήνας τοποθετείται στους 55 °C για 3 λεπτά, στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωληνάριο Eppendorf. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές. Τα υπερκείμενα από τις τρεις εκλούσεις συλλέγονται στο ίδιο σωληνάριο Eppendorf, το νερό εξατμίζεται σε περιστροφικό εξαχνωτήρα (Speed Vac) και το ίζημα επαναιωρείται στον επιθυμητό όγκο ds H₂O.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

6M NaI

NEW WASH. 14 ml concentrate NEW WASH αραιώνονται σε 280 ml ds H₂O. Στη συνέχεια προστίθενται 310 ml αιθανόλης. Το παραπάνω διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.



3.28.2 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με τη μέθοδο NUCLEON GX (Amersham)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος περιλαμβάνει την δέσμευση του DNA σε μια ειδική ρητίνη, μετά την τήξη του πηγματος, χρησιμοποιώντας ένα χαοτροπικό άλας σε υψηλή συγκέντρωση. Η μέθοδος αυτή-σε αντίθεση με την προηγούμενη- μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση τμημάτων DNA μικρού μεγέθους (< 0.5 kb).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σε προζυγισμένο αποστειρωμένο σωλήνα, τοποθετείται η ζώνη του DNA, η οποία έχει προηγουμένως αποκοπεί από το πήγμα αγαρόζης (1 g = 1 ml).
2. Στο σωλήνα προστίθενται 4.5 όγκοι άλατος (υπερχλωρικό νάτριο για τα μικρά τμήματα DNA ≤ 0.5 kb και ιωδιούχο νάτριο για τα υπόλοιπα) και το δείγμα επιάζεται στους 55 °C μέχρι να διαλυθεί τελείως το πήγμα (ο σωλήνας ανακινείται περιοδικά).
3. Στο δείγμα προστίθενται καλά επαναιωρημένη ρητίνη, σε ποσότητα 10 ml ανά 2-3 μ g DNA.
4. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό με συχνές ανακινήσεις και στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 12.000 rpm.
5. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1 ml 1X Wash buffer και το δείγμα φυγοκεντρείται όπως παραπάνω.
6. Το διάλυμα Wash buffer απορρίπτεται προσεκτικά (πρέπει να αποδιωχθεί



εξ' ολοκλήρου) και το ίζημα αφήνεται να ξηραθεί στους 55 °C για 1 λεπτό.

7. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 10 μl ds H₂O, προκειμένου να παραληφθεί το DNA, φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για ένα λεπτό και συλλογή του υπερκειμένου σε σωληνάριο Eppendorf. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά, προκειμένου να παραληφθεί και το υπόλοιπο 10% του DNA.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

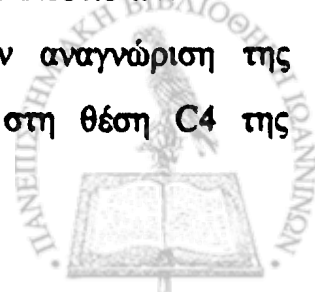
1X Wash buffer. Το 2X Wash buffer αραιώνεται (1:1) με αιθανόλη. Το παραπάνω διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

3.29 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος της μη ραδιενεργού σήμανσης βασίζεται στη δράση του τμήματος Klenow της DNA πολυμεράσης I, το οποίο έχει μόνο δράση πολυμερισμού. Δίκλινα γραμμικά μόρια DNA μετουσιώνονται και γίνονται μονόκλινα. Στη συνέχεια γίνεται πριμοδότηση από μικρές τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random priming), οι οποίες συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων DNA. Η πολυμεράση του Klenow αναγνωρίζει αυτές τις δίκλωνες περιοχές ως σημεία έναρξης του πολυμερισμού και αρχίζει να συνθέτει τη νέα αλυσίδα, ενσωματώνοντας και το σημασμένο Dig-11-dUTP που περιέχεται στο μίγμα των νουκλεοτιδίων.

Η ανίχνευση του Dig-11-dUTP, βασίζεται στην αναγνώριση της διγοξιγενίνης, που περιέχεται στο μόριο (δεσμευμένη στη θέση C4 της



θυμίνης), από ένα σύμπλοκο αντισώματος αντιδιγοξιγενίνης και αλκαλικής φωσφατάσης. Αυτό το σύμπλοκο γίνεται ορατό με κατάλληλη ενζυμική αντίδραση από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης που δίνει έγχρωμο προϊόν.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σε σωληνάριο Eppendorf προστίθενται τα εξής:

α) Η κατάλληλη ποσότητα ds H₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 19 μl.

β) 10 ng έως 3 μg ευθύγραμμου και μετουσιωμένου DNA.

γ) 2 μl μίγματος εξανουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως πριμοδοτικά μόρια αντιγραφής (primers).

δ) 2 μl dNTP μίγμα σήμανσης που αποτελείται από :

dATP 1.00 mmol/l

dCTP 1.00 mmol/l

dGTP 1.00 mmol/l

dTTP 0.65 mmol/l

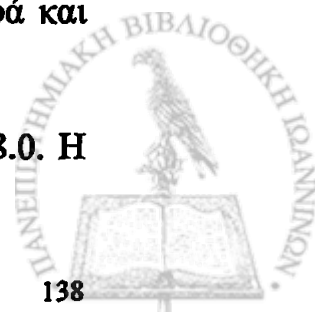
Dig-dUTP 0.35 mmol/l

pH= 6.5

ε) 1μl ένζυμο Klenow 2U/μl

2. Το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρείται γρήγορα, αναδεύεται ελαφρά και τοποθετείται στους 37 °C για 20 ώρες.

3. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2 μl 0.2 M EDTA pH=8.0. Η



καταβύθιση του DNA γίνεται με την προσθήκη 2,5 μl 4M LiCl και 75 μl παγωμένης (-20 °C) αιθανόλης στους -80 °C για 30 λεπτά.

4. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος με 50 μl 70% αιθανόλης και στη συνέχεια φυγοκέντρωση όπως στο προηγούμενο βήμα.

5. Το ίζημα ξηραίνεται και επαναδιαλύεται σε 50 μl T.E.

3.30 Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε νάυλον φίλτρο

Μονόκλωνο DNA είναι δυνατόν να προσδεθεί μόνιμα σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης ή νάυλον με σταυροδεσμούς, οι οποίοι δημιουργούνται μετά την έκθεση του φίλτρου σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 3-5 λεπτά. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε νάυλον φίλτρο (Amersham hybond-N).

3.30.1 Αποτύπωση του DNA κατά Southern (Southern Blotting) (Sambrook et al. 1989)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην μεταφορά του DNA σε νάυλον φίλτρο μέσω τριχοειδούς ροής διαλύματος στο οποίο είναι εμβαπτισμένο το πήγμα αγαρόζης και το φίλτρο.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Μετά τη φωτογράφιση το πήγμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει 300 ml (για πήγμα μεγέθους 100 cm²) διαλύματος μετουσίωσης και αφήνεται να αναδεύεται ήπια στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 45 λεπτά.

2. Στη συνέχεια το διάλυμα μετουσίωσης αποχύνεται και αντικαθίσταται από 300 ml διαλύματος εξουδετέρωσης και το δοχείο αφήνεται να αναδεύεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 45 λεπτά.

3. Σε δοχείο με κατάλληλες διαστάσεις τοποθετείται γυάλινη πλάκα η οποία φέρει τοποθετημένα στην επιφάνεια της τρία φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM σε σχήμα γέφυρας ανάλογο με τις διαστάσεις του πήγματος, έτσι ώστε οι δύο άκρες να εφάπτονται της βάσης του δοχείου.

4. Στο δοχείο τοποθετείται αρκετή ποσότητα διαλύματος 10X SSC. Τα φύλλα του διηθητικού χαρτιού εμποτίζονται με το διάλυμα 10X SSC και οι φυσαλίδες αέρος απομακρύνονται με γυάλινη ράβδο.

5. Το πήγμα της αγαρόζης τοποθετείται πάνω στα φύλλα ανεστραμμένο και οι φυσαλίδες απομακρύνονται όπως προηγουμένως.

6. Στην επιφάνεια του πήγματος τοποθετείται ένα φύλλο νάυλον φίλτρου και δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM μεγαλύτερα κατά 1 cm² από το πήγμα, τα οποία προηγουμένως έχουν διαβραχεί με διάλυμα 6X SSC, και οι φυσαλίδες απομακρύνονται εκ νέου.

7. Στην επιφάνεια των φύλλων Whatman 3MM τοποθετείται ένα μεγάλο στρώμα απορροφητικού χαρτιού. Στην κορυφή τοποθετείται μια γυάλινη πλάκα



και ένα αντικείμενο βάρους 0.5 kg περίπου.

8. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 20 ώρες περίπου. Κατά την αφαίρεση του πύργου σημειώνονται οι θέσεις των φρεατίων πάνω στο νάυλον φίλτρο με μολύβι, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση της θέσης των δειγμάτων του DNA κατά τον υβριδισμό.

9. Το φίλτρο αναδεύεται ήπια σε διάλυμα 6X SSC στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί μέχρι να στεγνώσει πλήρως και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 3-5 λεπτά, ώστε να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του DNA στο φίλτρο με τη δημιουργία σταυροδεσμών.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα 20X SSC

0.3 M κιτρικό νάτριο

3 M NaCl pH=7.0

Διάλυμα μετουσίωσης

0.5 N NaOH

1.5 M NaCl

Διάλυμα εξουδετέρωσης

1 M Tris pH=8.0

1.5 M NaCl



3.30.2 Αποτύπωση του DNA με τη μέθοδο Trans-Blot® SD DNA/RNA Blotting kit

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στη μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε νάυλον φίλτρο μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος σε κατάλληλη συσκευή. Για να μεταφερθεί το DNA σε φίλτρο με αυτή τη μέθοδο, πρέπει το πήγμα αγαρόζης να είναι πυκνότητας 0.7% και πάχους 6 mm. Σε αντίθετη περίπτωση η μεταφορά δεν είναι αποδοτική.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Μετά τη φωτογράφιση το πήγμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.5X TBE για 30-60 λεπτά προκειμένου να εξισορροπηθεί.
2. Δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Extra Thick Blot Paper και ένα φύλλο νάυλον φίλτρου μεγαλύτερο κατά 1 cm σε κάθε διάσταση του πηγματος εμβαπτίζονται σε 0.5X TBE για 10 λεπτά τουλάχιστον.
3. Πάνω στην πλατινένια άνοδο τοποθετείται το ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού και στην επιφάνεια του τοποθετείται το νάυλον φίλτρο. Στην επιφάνεια του νάυλον φίλτρου τοποθετείται το πήγμα αγαρόζης και ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού. Σε κάθε στάδιο τοποθέτησης οι φυσαλίδες που τυχόν υπάρχουν απομακρύνονται με μια γυάλινη ράβδο.
4. Ακολουθεί διαπότιση με 15 ml 0.5X TBE και σύνδεση του ηλεκτροδίου της καθόδου.
5. Η μεταφορά επιτυγχάνεται μετά από 10 λεπτά με εφαρμογή ρεύματος (3.55

mA για κάθε cm² πηγματος αγαρόζης).

6. Μετά το πέρας της μεταφοράς, το φίλτρο εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2X SSC και μεταφέρεται για πέντε λεπτά σε ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με 0.4 N NaOH.

7. Ακολουθεί έκπλυση του φίλτρου με 2X SSC και ξήρανση του στους 80 °C για 30 λεπτά.

3.31 Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε νάυλον φίλτρο για υβριδισμό in situ (Sambrook et al. 1989)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Αποικίες κυττάρων είναι δυνατό να μεταφερθούν ή να αναπτυχθούν πάνω στην επιφάνεια νάυλον φίλτρων ή φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης τα οποία είναι τοποθετημένα πάνω στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού. Μετά από λύση των κυττάρων αυτών, το DNA τους απελευθερώνεται και μπορεί να προσδεθεί επί του φίλτρου στη θέση κάθε αποικίας.

Με την μέθοδο αυτή μπορεί να αναλυθεί άμεσα το DNA που περιέχεται σε μία αποικία κυττάρου, ανιχνεύοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA με τη μέθοδο του υβριδισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Τα τρυβλία που περιέχουν τις προς λύση αποικίες, τοποθετούνται για 1-2 ώρες στους 4 °C, έτσι ώστε να περιέχουν αρκετή υγρασία.



2. Για τη μεταφορά χρησιμοποιούνται κυκλικά νάυλον φίλτρα (κομμένα σε διαστάσεις τρυβλίου). Τα τρυβλία και τα φίλτρα σημειώνονται κατάλληλα ώστε να αναγνωρίζεται ο προσανατολισμός τους.
3. Κύτταρα των αποικιών μεταφέρονται αντιγραφικά στα κυκλικά φίλτρα καθώς και σε νέα τρυβλία που περιέχουν το ίδιο θρεπτικό υλικό (ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως τρυβλία αναφοράς).
4. Στη συνέχεια το φίλτρο μεταφέρεται στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM κορεσμένο με διάλυμα 10% SDS για 7 λεπτά.
5. Το φίλτρο μεταφέρεται για άλλα 7 λεπτά σε διηθητικό χαρτί Whatman 3MM κορεσμένο με διάλυμα μετουσίωσης και στη συνέχεια σε ένα άλλο διηθητικό χαρτί Whatman 3MM κορεσμένο με διάλυμα εξουδετέρωσης.
6. Μετά τη εξουδετέρωση η οποία ολοκληρώνεται σε 7 λεπτά, το φίλτρο τοποθετείται για 3 λεπτά σε διηθητικό χαρτί Whatman 3MM κορεσμένο με διάλυμα 6X SSC.
7. Τέλος, τα φίλτρα στεγνώνουν πάνω σε διηθητικό χαρτί και το DNA προσδένεται επί του φίλτρου μετά από έκθεση του στην υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 3-5 λεπτά.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα μετουσίωσης

0.5 N NaOH

1.5 M NaCl



Διάλυμα εξουδετέρωσης

0.5 M Tris pH=8.0

1.5 M NaCl

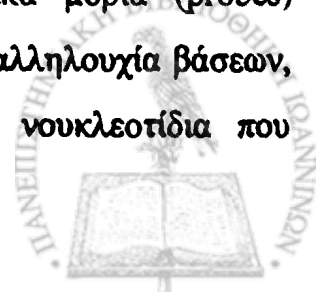
1 mM EDTA

3.32 Υβριδισμός DNA-DNA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα μονόκλωνων μορίων DNA να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των αλυσίδων τους που περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων σχηματίζοντας ένα δίκλωνο μόριο. Οι μονόκλωνες αλυσίδες DNA μπορεί να προέρχονται από κύτταρα διαφορετικών στελεχών ή οργανισμών. Κατά συνέπεια μπορεί να ελεγχθεί εάν τμήματα DNA διαφορετικής προέλευσης έχουν ή όχι ομόλογες περιοχές. Η έκταση της ομολογίας μεταξύ δύο διαφορετικών μορίων DNA μπορεί να ελεγχθεί τροποποιώντας τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται ο υβριδισμός. Χαμηλή θερμοκρασία (42 °C) και υψηλή συγκέντρωση αλάτων (ήπιες συνθήκες) επιτρέπουν υβριδισμό μεταξύ μορίων DNA περιορισμένης ομολογίας. Αύξηση της θερμοκρασίας (68 °C) και μείωση της συγκέντρωσης των αλάτων (αυστηρές συνθήκες) επιτρέπει υβριδισμό μόνο μεταξύ μορίων DNA εκτεταμένης ομολογίας.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών αλληλουχιών βάσεων σε άγνωστα δείγματα DNA ή σε ανασυνδυασμένα μόρια DNA κατά την κλωνοποίηση γονιδίων. Ως ανιχνευτικά μόρια (probes) χρησιμοποιούνται μικρά μόρια DNA που φέρουν γνωστή αλληλουχία βάσεων, σημασμένα κατάλληλα με ραδιενεργά νουκλεοτίδια ή νουκλεοτίδια που



περιέχουν εύκολα ανιχνεύσιμα στοιχεία (π.χ. διγοξιγενίνη). Στην παρούσα εργασία για σήμανση χρησιμοποιήθηκαν νουκλεοτίδια που περιέχουν διγοξιγενίνη.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Το προς διερεύνηση δείγμα του DNA, αφού μετουσιωθεί, προσδένεται πάνω σε φίλτρο όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το φίλτρο που φέρει το DNA εμβαπτίζεται σε διάλυμα υβριδισμού, στο οποίο προστίθεται το ανιχνευτικό μόριο DNA μετουσιωμένο. Εάν το προς ανάλυση DNA περιέχει μια περιοχή με συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων ως προς το ανιχνευτικό μόριο DNA αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών και δημιουργείται ένα δίκλωνο τμήμα DNA.

- Το ανιχνευτικό μόριο δεσμεύεται έτσι στη συγκεκριμένη θέση του φίλτρου, η οποία αναγνωρίζεται αυτοραδιογραφικά ανάλογα με τη σήμανση του ανιχνευτικού μορίου.

Τα στάδια του υβριδισμού είναι τα ακόλουθα:

1. Προϋβριδισμός του φίλτρου με κατάλληλο διάλυμα, το οποίο περιέχει ένα μονόκλωνο DNA διαφορετικό από το DNA που έχει προσδεθεί στο φίλτρο. Συνήθως χρησιμοποιείται DNA σπέρματος σολομού για ραδιενεργούς και το αντιδραστήριο Blocking για μη ραδιενεργούς υβριδισμούς. Με τον τρόπο αυτό γίνεται κορεσμός όλης της επιφάνειας του φίλτρου, ώστε να αποφευχθεί στο επόμενο στάδιο η ανεπιθύμητη μη εξειδικευμένη πρόσδεση του μονόκλωνου ανιχνευτικού μορίου DNA. Ο προϋβριδισμός γίνεται σε θερμοκρασία 68 °C (αυστηρές συνθήκες) ή 42 °C (ήπιες συνθήκες), υπό ήπια ανακίνηση για τουλάχιστον 3 ώρες.

2. Ο υβριδισμός του φίλτρου γίνεται στις ίδιες συνθήκες αντικαθιστώντας το διάλυμα με ίσο όγκο ίδιου διαλύματος, το οποίο περιέχει το ανιχνευτικό μόριο του DNA μετουσιωμένο. Η μετουσίωση του ανιχνευτικού μορίου επιτυγχάνεται με βρασμό για πέντε λεπτά και σύντομη ψύξη σε υγρό πάγο (0°C) για τρία λεπτά. Η διάρκεια του υβριδισμού είναι 18-20 ώρες.

3. Ακολουθούν πλύσεις του φίλτρου για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ή ασθενώς δεσμευμένων μορίων DNA.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.32.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός (Boehringer Mannheim Cat.No.1093657)

1. Το φίλτρο στο οποίο έχει μεταφερθεί το DNA, διαβρέχεται με διάλυμα προϋβριδισμού και τοποθετείται σε φιάλη υβριδισμού με 20 ml διαλύματος προϋβριδισμού (για φίλτρο διαστάσεων 100 cm²). Ακολουθεί ήπια ανακίνηση στους 68 °C για τρεις ώρες τουλάχιστον.

2. Στην συνέχεια προστίθενται 20 ml (για φίλτρο διαστάσεων 100 cm²) διαλύματος υβριδισμού που περιέχει το μετουσιωμένο ανιχνευτικό μόριο DNA-σε ποσότητα 50 ng/ml - το οποίο είναι επισημασμένο με dig-11-dUTP.

3. Γίνεται επώαση όπως προηγουμένως για 20 ώρες τουλάχιστον. Μετά το πέρας του υβριδισμού, το διάλυμα που περιέχει το ανιχνευτικό μόριο DNA φυλάσσεται στους -20 °C (είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον πέντε φορές).

4. Το φίλτρο ξεπλένεται δύο φορές με 50 ml διαλύματος 2X SSC, 0.1% SDS (για φίλτρο διαστάσεων 100 cm²) με ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για πέντε λεπτά.

5. Ακολουθούν δύο πλύσεις με 50 ml διαλύματος (για φίλτρο διαστάσεων 100 cm²) 0.1X SSC, 0.1% SDS με ήπια ανακίνηση στους 68 °C για 20 λεπτά.

6. Το φίλτρο μπορεί να εμφανιστεί αμέσως ή να στεγνώσει και η εμφάνιση του



να γίνει αργότερα.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα προϋβριδισμού/ υβριδισμού

5X SSC

0.1% N-laurosarcosine Na-salt

0.02% SDS

1% αντιδραστήριο Blocking

Το διάλυμα παρασκευάζεται με θέρμανση στους 50-70 °C για μία ώρα, μέχρι να διαλυθεί τελείως το αντιδραστήριο Blocking.

3.32.2 Μη ραδιενεργός υβριδισμός in situ (Boehringer Mannheim Cat.No.1093657)

1. Τα φίλτρα στα οποία έχει μεταφερθεί το DNA των αποικιών με την in situ λύση διαβρέχονται με διάλυμα 6X SSC.
2. Στη συνέχεια τα φίλτρα μεταφέρονται σε δοχείο το οποίο περιέχει 300 ml διαλύματος πρόπλυσης προθερμασμένο στους 42 °C και σφραγίζονται. Το δοχείο ανακινείται ήπια στους 42 °C για δύο ώρες.
3. Ακολουθεί ο προϋβριδισμός των φίλτρων, με προσθήκη 100-200 ml διαλύματος προϋβριδισμού και ήπια ανακίνηση για 4 ώρες στους 65 °C.
4. Το διάλυμα προϋβριδισμού αντικαθίσταται με διάλυμα υβριδισμού το οποίο περιέχει το ανιχνευτικό μόριο σημασμένο με dig-11-dUTP και ακολουθεί ήπια ανακίνηση για 18-20 ώρες στους 65 °C.



5. Μετά τον υβριδισμό τα φίλτρα εκπλένονται τέσσερις φορές με 400 ml διαλύματος πλύσεως, προθερμασμένου στους 55 °C, με ήπια ανακίνηση στους 55 °C. Οι τρεις πρώτες πλύσεις είναι διάρκειας 10 λεπτών ενώ η τέταρτη διαρκεί μία νύχτα.

6. Τέλος τα φίλτρα αφήνονται να στεγνώσουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί η εμφάνιση τους.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα πρόπλυσης

50 mM Tris, pH=8.0

1 mM NaCl

1 mM EDTA

0.1% SDS

Διάλυμα πλύσης

0.1X SSC

0.005% SDS

3.32.3 Εμφάνιση των φίλτρων μετά τον μη ραδιενεργό υβριδισμό ή τον υβριδισμό *in situ*

A. Εμφάνιση με χρώση

Όλες οι αντιδράσεις γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με



ήπια ανακίνηση, εκτός από την αντίδραση της χρώσης που γίνεται στο σκοτάδι χωρίς ανακίνηση. Οι παρακάτω όγκοι διαλυμάτων αντιστοιχούν σε φίλτρο διαστάσεων 100 cm².

1. Γίνεται μια γρήγορη έκπλυση (1 min) του φίλτρου με 100 ml διαλύματος I.
2. Ακολουθεί επώαση του φίλτρου για 30 λεπτά σε 100 ml διαλύματος II.
3. Έκπλυση του φίλτρου με 100 ml διαλύματος I.
4. Το φίλτρο επωάζεται για 30 λεπτά σε 30 ml διαλύματος I που περιέχει 150 μU/ml μίγματος αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης.
5. Ακολουθεί έκπλυση δύο φορές για 15 λεπτά για να απομακρυνθεί το μη ενσωματωμένο μίγμα αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης.
6. Γίνεται εξισορρόπηση του φίλτρου με 50 ml διαλύματος III για τρία λεπτά.
7. Το φίλτρο επωάζεται στο σκοτάδι με 10 ml διαλύματος χρώσης, σε πλαστικό σάκο και η εμφάνιση του χρώματος παρακολουθείται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν η χρώση προχωρήσει σε επιθυμητά επίπεδα, η αντίδραση σταματά, απομακρύνοντας το διάλυμα χρώσης και ξεπλένοντας το φίλτρο με 50 ml διαλύματος IV.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα I

100 mM Tris, pH=7.5

150 mM NaCl



Διάλυμα II

0.5% αντιδραστήριο Blocking σε διάλυμα I

Διάλυμα III

100 mM Tris, pH=9.0

150 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Διάλυμα IV

10 mM Tris pH=8.0

1 mM EDTA

Διάλυμα χρώσης

45 μl NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium chloride)

35 μl X-Phosphate (5-Bromo-4-chloro-3-indol-phosphate)

10 ml διαλύματος III

B. Εμφάνιση με αυτοραδιογραφία

Όλες οι αντιδράσεις για την εμφάνιση του φίλτρου γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με ήπια ανακίνηση.

1. Τα στάδια 1-5 της προηγούμενης μεθόδου εμφάνισης ακολουθούνται και σε αυτή τη μέθοδο.

2. Ακολουθεί πλύση με 50 ml διαλύματος 1X reaction buffer για τρία λεπτά.



3. Τέλος γίνεται μια πλύση για πέντε λεπτά με CPD-Star. Ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

Το φίλτρο τοποθετείται σε θήκη αυτοραδιογραφίας, η οποία φέρει ειδικές πινακίδες για την ενίσχυση του σήματος. Το φίλτρο καλύπτεται με φιλμ (X-Omatt KODAK) και τοποθετείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα έως μία νύχτα.

5. Η εμφάνιση του φιλμ, γίνεται με τον εμβαπτισμό του σε 500 ml διαλύματος ανάπτυξης (Kodak X-Ray developer) για πέντε λεπτά.

6. Η αντίδραση της ανάπτυξης σταματά ξεπλένοντας το φιλμ με 300 ml νερό για δύο λεπτά.

7. Η στερέωση επιτυγχάνεται βυθίζοντας το φιλμ σε 500 ml διαλύματος στερέωσης (Kodak X-Ray rapid fixer) για πέντε λεπτά.

8. Ακολουθεί πολύ καλή πλύση του φιλμ υπό συνεχή ροή νερού για 20 λεπτά. Το φιλμ στεγνώνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατάλληλα τοποθετημένο ώστε να μην εφάπτεται σε καμία επιφάνεια.

9. Όλες οι διαδικασίες της αυτοραδιογραφίας γίνονται σε σκοτεινό θάλαμο απουσία φωτός ή παρουσία κόκκινης λυχνίας.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα 1X Reaction buffer

100 mM Tris pH=9.5

100 mM NaCl



CPD-Star

25 μl CPD-Star σε 250 ml 1X Reaction buffer

Διάλυμα ανάπτυξης

Το υγρό εμφάνισης Kodak X- ray developer αραιώνεται 1:5.

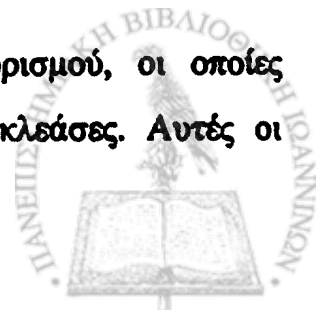
Διάλυμα στερέωσης

Το υγρό εμφάνισης Kodak X- Ray rapid fixer αραιώνεται 1:5.

3.33 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια

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

- α) Φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο, το οποίο διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (συνήθως κωδικεύει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό).
- β) Μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους (μετασχηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).
- γ) Είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες.
- δ) 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 κωδικοποιούν 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 *lacZ*, το οποίο κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο του αμινο-τελικού άκρου του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Ως κύτταρα δέκτες χρησιμοποιούνται στελέχη *E. coli* που περιέχουν το υπόλοιπο τμήμα του ενζύμου από το καρβοξυτελικό άκρο. Τα δύο αυτά ατελή πολυπεπτιδικά μόρια της β-γαλακτοσιδάσης 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. Εντός της αλληλουχίας του τμήματος *lacZ* του πλασμιδίου έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα μια περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης. 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-γαλακτοσιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης.

Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β-γαλακτοσιδάσης και επομένως η διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδίων γίνεται με τη χρησιμοποίηση δύο ουσιών, της X-gal και του ισοπροπυλοθειο-β-D-γαλακτοζίτη (IPTG). Η πρώτη αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοσιδάσης, 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 τρυβλία επιλογής ως μπλε ή λευκές αποικίες.

ε) 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.

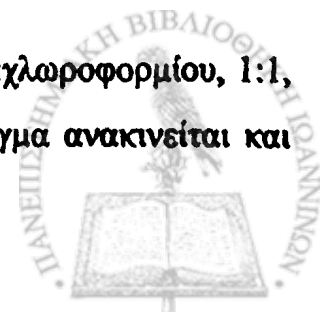
Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

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 επανακυκλοποίηση του. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδιακού φορέα, αποφωσφορυλιώνοντας 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), δεν χρειάζεται η κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση γιατί δεν υπάρχει κίνδυνος επανακυκλοποίησης 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, 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 σωληνάριο Eppendorf και προστίθενται 2 όγκοι ψυχρής αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά.

5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. 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 H_2O .

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 T_4 DNA πολυμεράση.

Η T_4 DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για να γεμίσει τα $5'$ ή $3'$ προεξέχοντα άκρα με σημασμένα ή μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs).

Το γέμισμα με T_4 DNA πολυμεράση ακολουθεί την εξής διαδικασία:

1. Σε σωληνάριο Eppendorf προστίθενται τα εξής:

α) Το γραμμικό DNA το οποίο είναι επαναιωρημένο σε 35 μl ds H_2O .

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 έκπλυση 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' φωσφορικά άκρα του τμήματος στόχου και των 3' άκρων του φορέα.

Η αντίδραση της λιγάσης γίνεται ως εξής:

1. Σε σωληνάρια Eppendorf 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 την 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 δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης απουσία του οποίου οι μετασυζευγμένες αποικίες παραμένουν λευκές.

1. Ετοιμάζονται τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

2. Επιστρώνεται όλη η επιφάνεια των τρυβλίων με 20 μl διαλύματος X-gal και 8 μl διαλύματος IPTG.

3. Τα τρυβλία τοθετούνται στους 37 °C για μία ώρα ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.

4. Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και εμβολιασμός τους στα τρυβλία επιλογής από κατάλληλη αραιώση ώστε να προκύψουν 150-200 αποικίες ανά τρυβλίο. Τα τρυβλία

επωάζονται στους 37 °C για μία νύχτα.

5. Την επομένη τα τρυβλία 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.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

100 mg/ml σε διμεθυλοφορμαμίδιο.

Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινά φιαλίδια στους -20 °C.

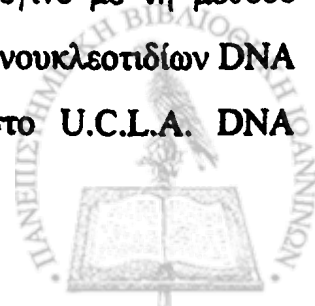
IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)

Διαλύονται 2 gr IPTG σε 10 ml τελικό όγκο ds H₂O και το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm.

Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

3.34 Ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του DNA

Στην παρούσα εργασία η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του 4.5 kb τμήματος DNA του βακτηρίου *Z. mobilis*, έγινε με τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας νουκλεοτιδίων DNA (Applied Biosystems ABI Prism, model vers. 211) στο U.C.L.A. DNA



Sequencing Facility (Dr. Erik Avaniss-Aghajani).

Η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (Sanger et al. το 1977) περιλαμβάνει τη σύνθεση μιας αλυσίδας DNA με τη δράση μιας DNA πολυμεράσης *in vitro*, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μονόκλωνη αλυσίδα DNA. Η σύνθεση αρχίζει μόνο από μια θέση όπου ένα πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται πάνω σε ένα μετουσιωμένο εκμαγείο.

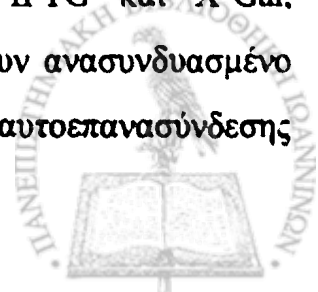
Η αντίδραση της σύνθεσης τερματίζεται με την ενσωμάτωση ενός ανάλογου νουκλεοτιδίου, το οποίο δεν επιτρέπει να συνεχιστεί η επιμήκυνση του DNA. Το ανάλογο νουκλεοτίδιο είναι ένα 5'-τριφωσφορικό 2' 3'-διδεοξυνουκλεοτίδιο (ddNTP). Αυτά τα νουκλεοτίδια δεν έχουν τις 3'-OH τελικές ομάδες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Όταν χρησιμοποιείται το κατάλληλο μίγμα των ddNTPs, η ενζυμική αντίδραση που καταλύει τον πολυμερισμό τερματίζεται με την ενσωμάτωση σε κάθε πλευρά ενός ddNTP. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα κλάσμα ενός συνόλου από τις αλυσίδες, οι οποίες τερματίζονται με την είσοδο κάθε φορά του ddNTP. Τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις κάθε μια με διαφορετικά ddNTP δίνουν την πληροφορία για την αλληλουχία του DNA-εκμαγείου.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη μέθοδος με φθορισμομετρία όπως περιγράφεται από τους Smith et al. 1986, με τη διαφορά ότι τα ddNTP και όχι τα πριμοδοτικά μόρια είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Η αλληλουχία βάσεων DNA που προέκυψε, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα IntelliGenetics PC/Gene software (Oxford Molecular). Η ανεύρεση τυχόν ομολογιών με γνωστές αλληλουχίες κατατεθειμένες σε τράπεζα δεδομένων (EMBL-Heidelberg), έγινε με το πρόγραμμα BLAST2 της τράπεζας δεδομένων EMBL-Heidelberg.

3.35 Κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης χρωμοσωμικού DNA των στελεχών *Z. mobilis*

Οι γονιδιακές βιβλιοθήκες των στελεχών *Z. mobilis* CP₄ (Dr. G. Sprenger, Forschungszentrum KFA, Julich, Germany) και ATCC 10988 (Καθηγητής Κ. Δραΐνας) που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάστηκαν ως εξής: Το κοσμίδιο pLAFR5 υπέστη διπλή περιοριστική πέψη με τα ένζυμα *Bam*HI και *Sca*I. Το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο αναμίχθηκε με περιοριστικά τμήματα *Sau*3A χρωμοσωμικού DNA του *Z. mobilis*, μεγέθους όχι μικρότερου από 25 kb. Η σύνδεση των τμημάτων του DNA έγινε με τη βοήθεια λιγάσης (η όλη διαδικασία φαίνεται στο Σχήμα 9). Η διπλή πέψη *Bam*HI-*Sca*I ελαχιστοποιεί την πιθανότητα αυτοεπανασύνδεσης του πλασμιδιακού DNA, ευνοώντας τη σύνδεση περιοριστικών τμημάτων χρωμοσωμικού DNA με δύο ευθυγραμμισμένα τμήματα πλασμιδιακού DNA εκατέρωθεν. Το πλασμίδιο pLAFR5 λειτουργεί ταυτόχρονα και ως κοσμίδιο λόγω των περιοχών *cos* που περιέχει, έτσι τα ευθυγραμμισμένα μόρια που περιέχουν δύο θέσεις *cos* οι οποίες απέχουν 65 kb (πράγμα που εξασφαλίζει τη σύνδεση χρωμοσωμικού DNA μεγέθους πάνω από 25 kb), αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για εγκλεισμό *in vitro* σε φαγικές κάψες και αποτελεσματική μόλυνση των κυττάρων *E. coli*. Εντός των μολυσμένων κυττάρων, το ευθύγραμμο DNA κυκλοποιείται δίνοντας ένα ομοιοπολικά κλειστό κύκλο αποτελούμενο από την περιοχή *Bam*HI-*Sca*I (των 21kb) του κοσμιδίου και του ενθέματος (*insert*) του χρωμοσωμικού DNA. Το μόριο αυτό αναπαράγεται πλέον ως πλασμίδιο. Στη συνέχεια μπορούν να επιλέγουν οι αποικίες *E. coli* DH5α που είναι ανθεκτικές στην τετρακυκλίνη (δείκτης του pLAFR5) και επιπλέον οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο DNA, επιλέγονται με βάση την ασυμληρωματικότητα της β-γαλακτοσιδάσης παρουσία IPTG και X-Gal, διακρινόμενες ως λευκές έναντι εκείνων που δεν περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (διακρινόμενες ως μπλε). Προς αποφυγή της αυτοεπανασύνδεσης



των τεμαχίων του χρωμοσωμικού DNA τα τμήματα *Sau3A* αποφωσφορυλιώνονται. Μετά την ανάλυση του μεγέθους αρκετών τμημάτων χρωμοσωμικού DNA στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια κατασκευάστηκε γονιδιακή βιβλιοθήκη από 500 ανασυνδυασμένες αποικίες σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης 98 φρεατίων. Ο υπολογισμός του αριθμού των αποικιών έγινε σύμφωνα με τους Sambrook et al. 1989 με βάση τον τύπο:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

N = απαιτούμενος αριθμός ανασυνδυασμένων αποικιών

f = μέγεθος ενθέματος DNA σε bp / συνολικό γονιδίωμα σε bp

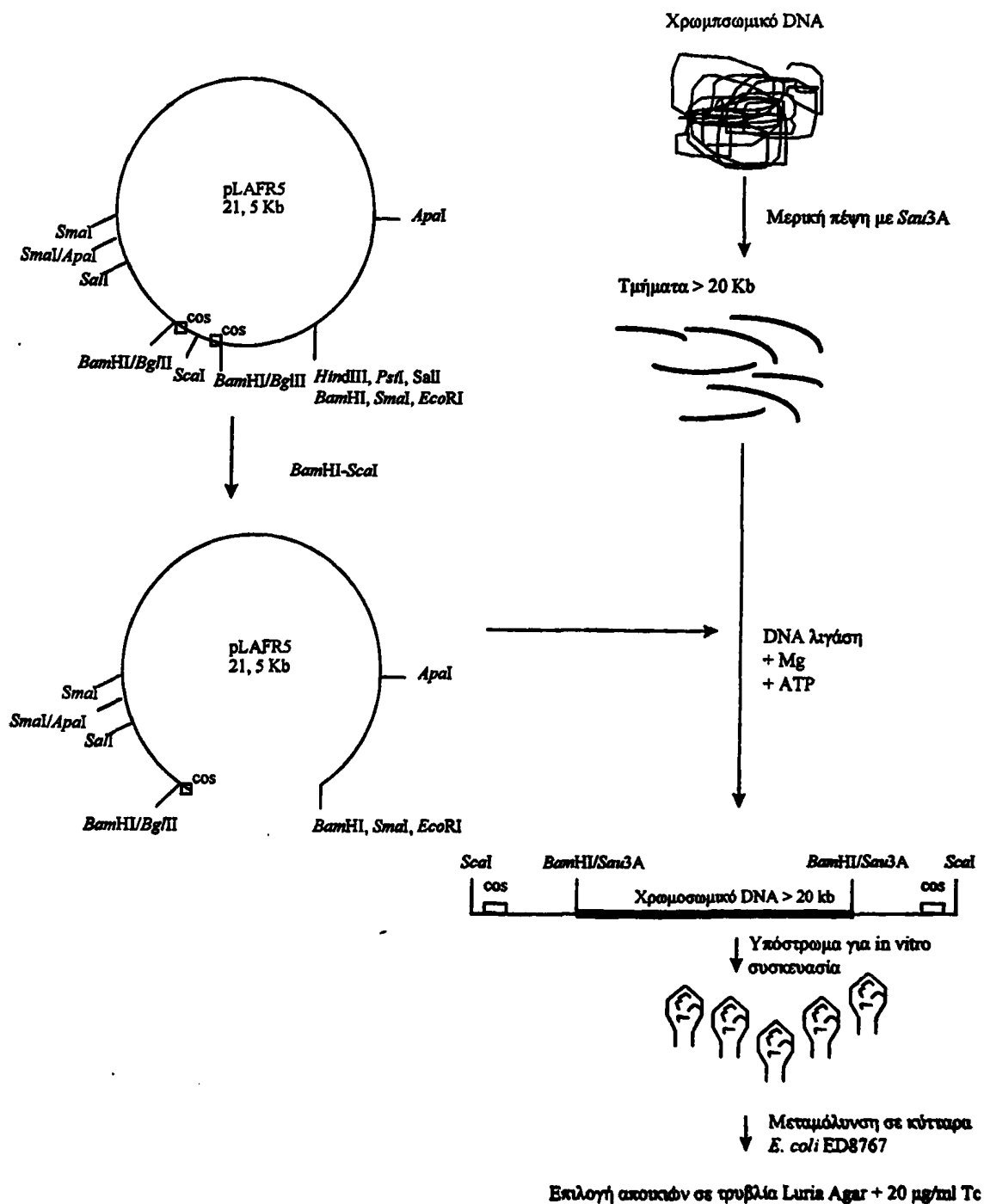
P = επιθυμητή πιθανότητα κάλυψης του γονιδιώματος

Για τη συγκεκριμένη γονιδιακή βιβλιοθήκη είναι:

Μέγεθος ενθέματος DNA = ≈ 25 kb (2.5×10^4 bp)

Συνολικό γονιδίωμα *Z. mobilis* = 2.25×10^6 bp

$P = 0.99$



ΣΧΗΜΑ 9: Κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης χρωμοσωμικού DNA του *Z. mobilis* στο πλασμίδιο pLAFR5.



ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Αποτελέσματα



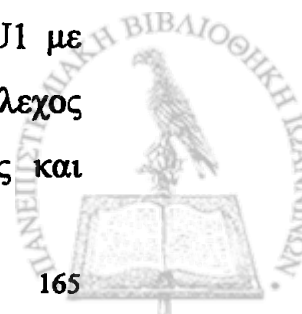
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Βιοχημικός χαρακτηρισμός ενός μεταλλαγμένου στελέχους του βακτηρίου *Zygomonas mobilis*, ευαίσθητου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης

4.1 Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2

Το στέλεχος CU1 απομονώθηκε από τους Drainas et al. το 1984 μετά από μεταλλαξιγόνο επίδραση του φυσικού τύπου ATCC 10988 με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1 έχει τα εξής κύρια χαρακτηριστικά: α) είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, β) παρουσιάζει μειωμένη παραγωγικότητα αιθανόλης, και γ) φαίνεται πως έχει χάσει ένα εκ των πλασμιδίων του φυσικού τύπου (Drainas et al. 1984).

Για την διευκόλυνση των βακτηριακών συζεύξεων απομονώθηκε το στέλεχος CU1Rif2, μετά από δεύτερη μεταλλαξιγόνο επίδραση του CU1 με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (Afendra and Drainas 1987). Το στέλεχος CU1Rif2 διατηρεί τα κύρια χαρακτηριστικά του πατρικού στελέχους και

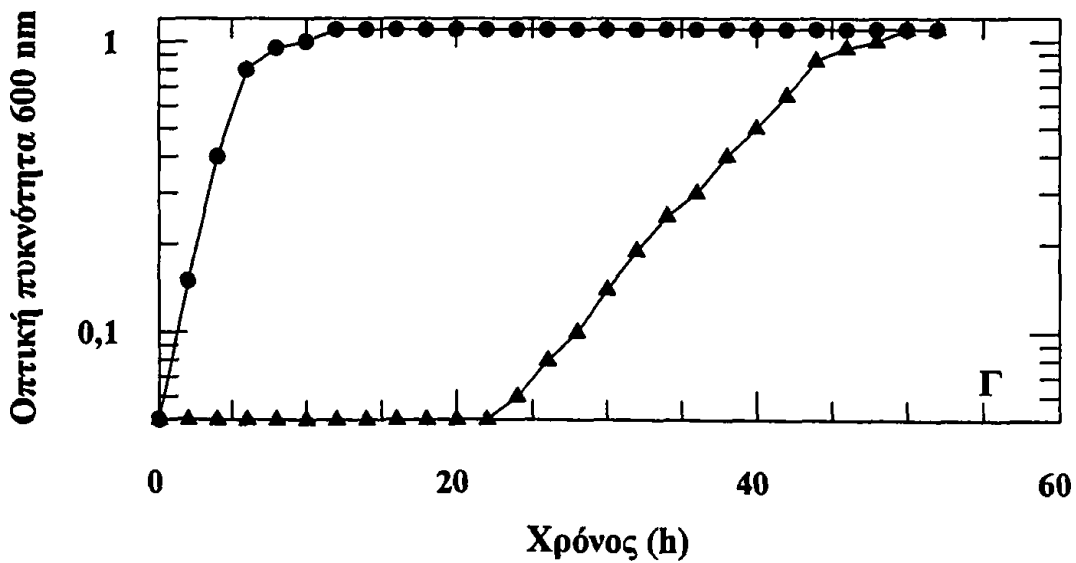
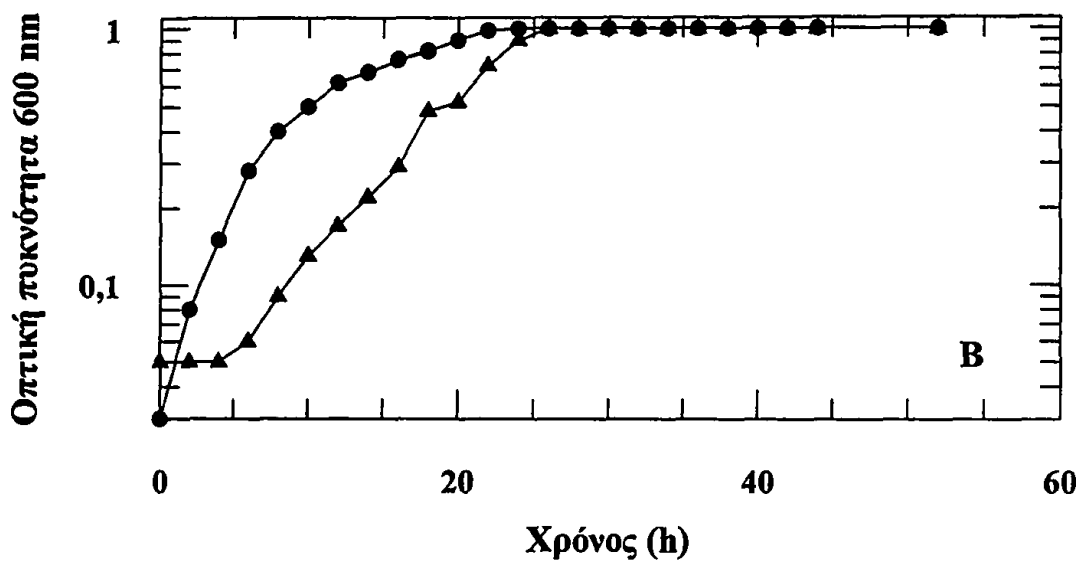
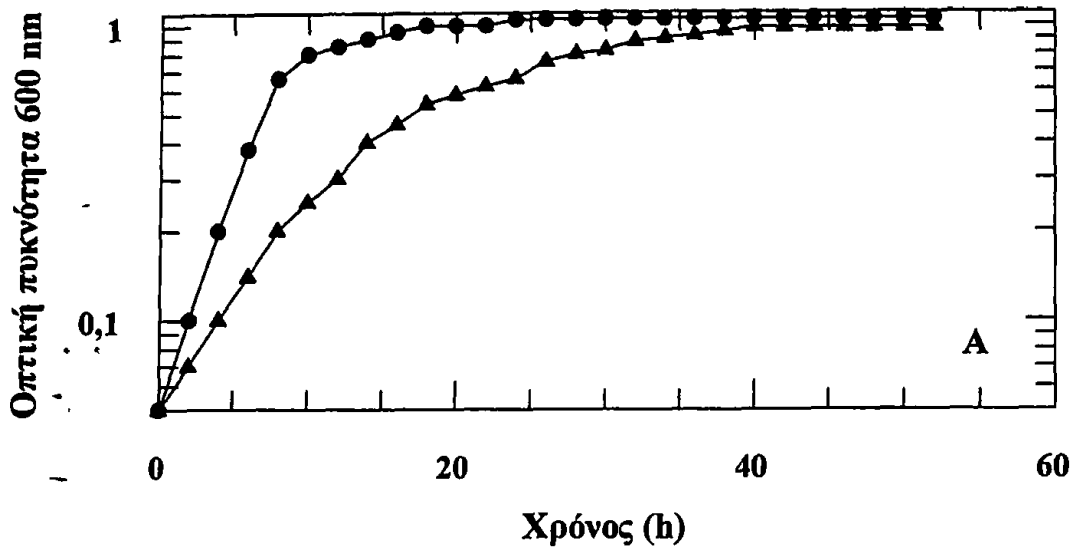


επιπρόσθετα είναι ανθεκτικό στην ριφαμπικίνη (10 $\mu\text{g/ml}$). Το αντιβιοτικό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στις βακτηριακές συζεύξεις ως δείκτης αποκλεισμού των κυττάρων δότη του βακτηρίου *E. coli*. Το *E. coli* παρουσιάζει ευαισθησία στην ριφαμπικίνη χωρίς να έχει αναφερθεί μείωση της συζευκτικής ικανότητας (Afendra and Drainas 1987).

Η ταχύτητα ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2 σε σύγκριση με αυτή του πατρικού του στελέχους ATCC 10988 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλυκόζης φαίνεται στο Σχήμα 10. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται σχεδόν κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη. Αντίθετα, σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης το μεταλλαγμένο στέλεχος εμφανίζει αυξημένη περίοδο εφησυχασμού συγκριτικά με τον φυσικό τύπο, η οποία είναι μεγαλύτερη ανάλογα με τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκεντρώσεις 5% γλυκόζης η περίοδος εφησυχασμού ανέρχεται στις 6 ώρες περίπου ενώ σε συγκεντρώσεις 10% γλυκόζης η περίοδος εφησυχασμού αυξάνει στις 22 ώρες περίπου. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες ο φυσικός τύπος αναπτύσσεται χωρίς να διέρθει περίοδο εφησυχασμού. Οι ιδιότητες ανάπτυξης του CU1Rif2 είναι οι ίδιες τόσο σε πλήρες όσο και σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Με βάση αυτή την ιδιότητα, φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την διερεύνηση της ικανότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* να αναπτύσσεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.





ΣΧΗΜΑ 10: Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) που περιέχει 2% (Α), 5% (Β) και 10% (Γ) γλυκόζη.

●: ATCC 10988, ▲: CU1Rif2



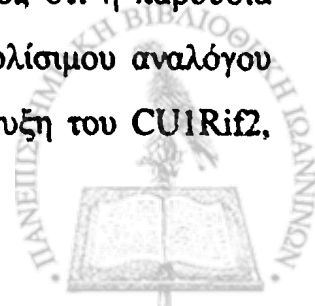
4.2 Ανθεκτικότητα του στελέχους CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων

Αρχικά, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα του στελέχους CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη ή 6.6% ξυλόζη, διαλύματα ισομοριακά με το θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη (0.55 M). Η μαλτόζη είναι ένα σάκχαρο που δεν προσλαμβάνεται, ούτε καταβολίζεται από το βακτήριο *Z. mobilis*, ενώ η ξυλόζη προσλαμβάνεται αλλά δεν καταβολίζεται περαιτέρω. Η γλυκόζη (2%) προστίθεται στο θρεπτικό μέσο ως πηγή άνθρακα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11 το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2 αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη ή 6.6% ξυλόζη. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2 δεν είναι ευαίσθητο σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις αλλά ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Στο ίδιο Σχήμα φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης του CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% φρουκτόζη, ενός σακχάρου το οποίο προσλαμβάνεται και καταβολίζεται από το βακτήριο *Z. mobilis*. Από το Σχήμα φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2 αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% φρουκτόζη. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το CUIRif2 δεν είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων γενικά αλλά ειδικά στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

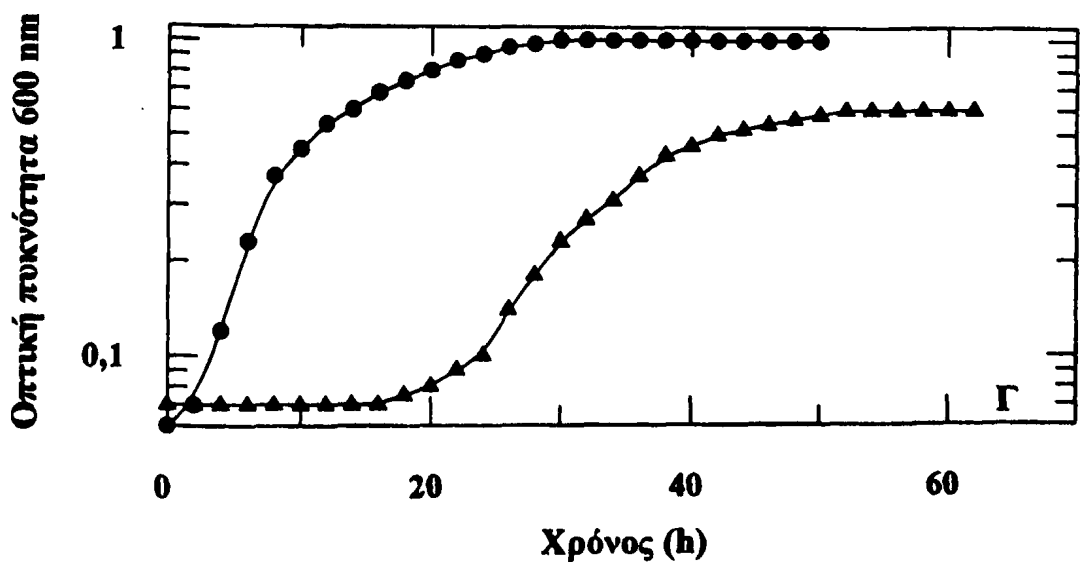
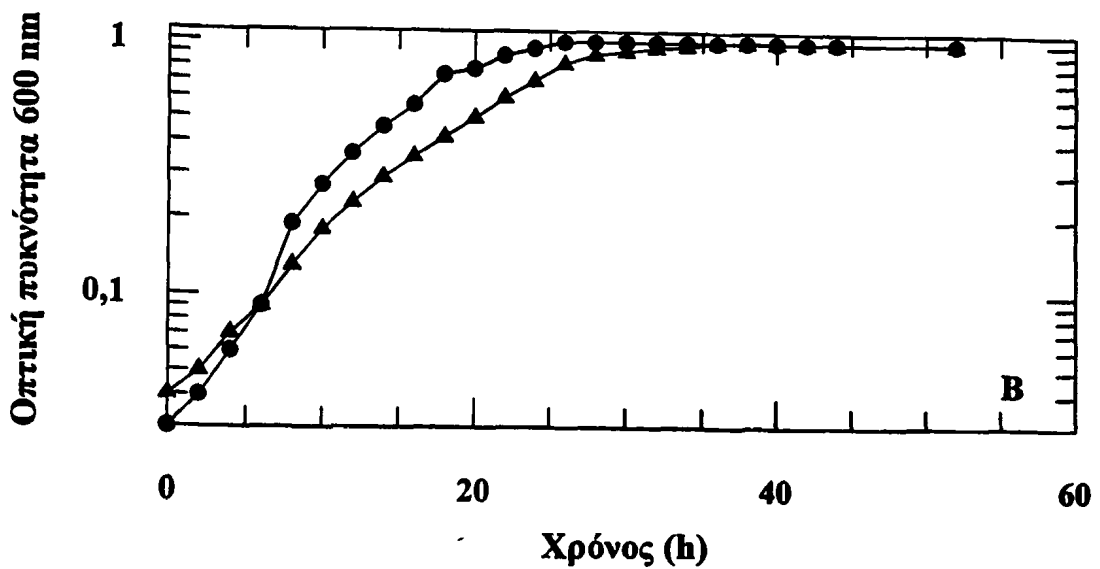
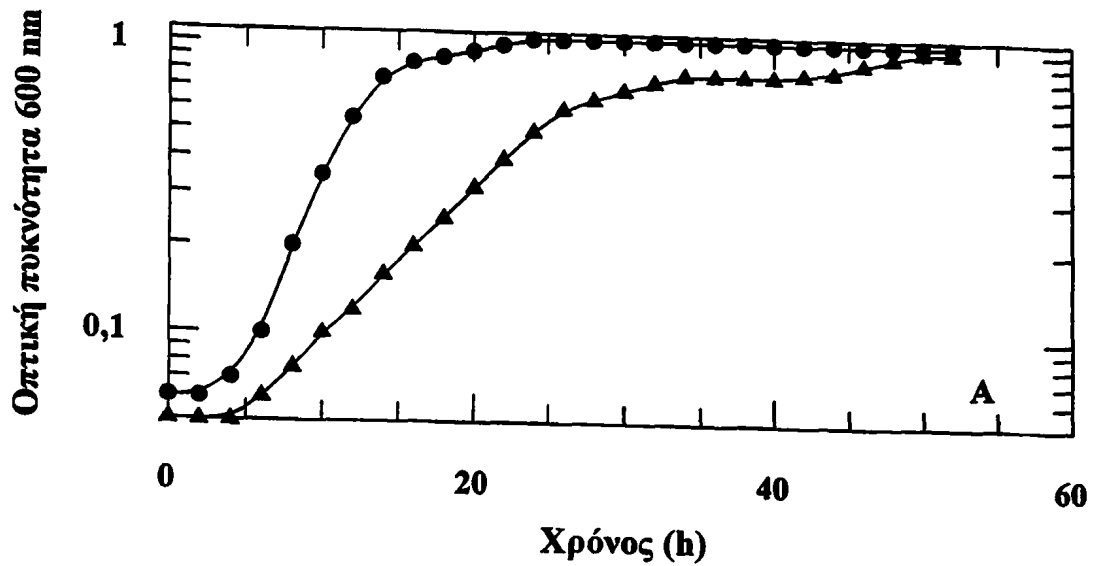
Στο Σχήμα 11 φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 8% 2-δεοξυγλυκόζη, ένα μη μεταβολίσιμο ανάλογο της γλυκόζης. Από το Σχήμα φαίνεται ότι το CUIRif2 έχει μια περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών περίπου όπως ακριβώς στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου που περιέχει 10% γλυκόζη, ενώ ο φυσικός τύπος αναπτύσσεται κανονικά. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει, ότι η παρουσία στο θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης ενός μη μεταβολίσιμου αναλόγου της γλυκόζης, προκαλεί την ίδια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του CUIRif2,



όπως ακριβώς η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι ειδικός και ανεξάρτητος από κάποιους μηχανισμούς οσμωρύθμισης και ανθεκτικότητας σε άλλα σάκχαρα που πιθανόν να υπάρχουν στο βακτήριο αυτό.





ΣΧΗΜΑ 11: Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη ή 6.6% ξυλόζη (A), 10% φρουκτόζη (B) και 2% γλυκόζη και 8% 2-δεοξυγλυκόζη (Γ). ●: ATCC 10988, ▲: CUIRif2

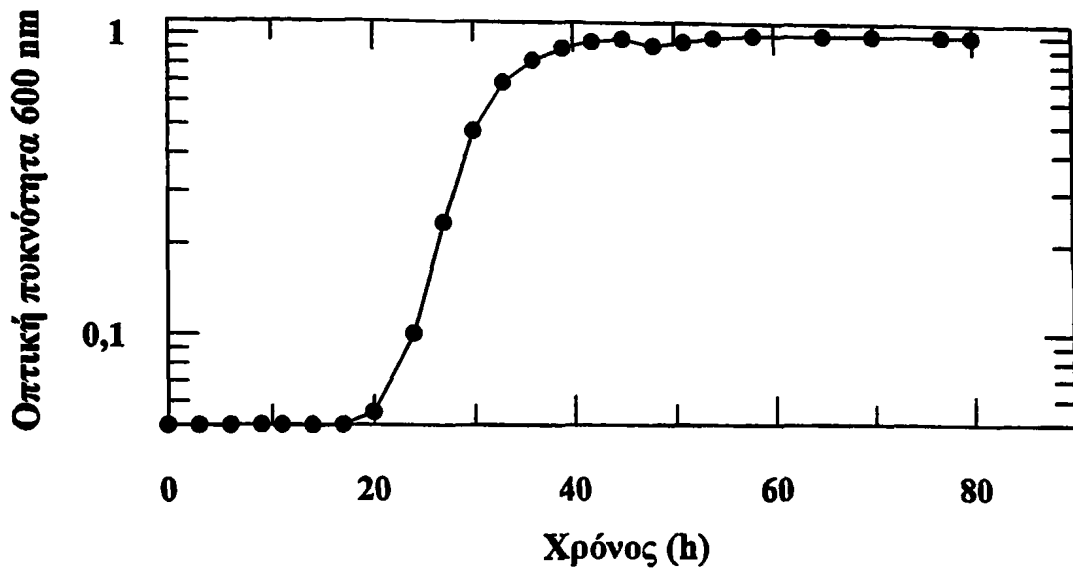


4.3 Η επίδραση της σορβιτόλης στην ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. mobilis* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης, ως κύριο παραπροϊόν παράγεται σορβιτόλη, η οποία συσσωρεύεται και δρα ως συμβατή διαλυμένη ουσία, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από την υψηλή εξωτερική οσμωτική πίεση. Ακόμα έχει αναφερθεί (Loos et al. 1994) ότι όταν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης προστεθεί εξωτερικά σορβιτόλη, τότε τα κύτταρα του *Z. mobilis* αναπτύσσονται καλύτερα. Δηλαδή η σορβιτόλη προστατεύει οσμωτικά τα κύτταρα *Z. mobilis*, ακόμα και όταν προστίθεται εξωτερικά.

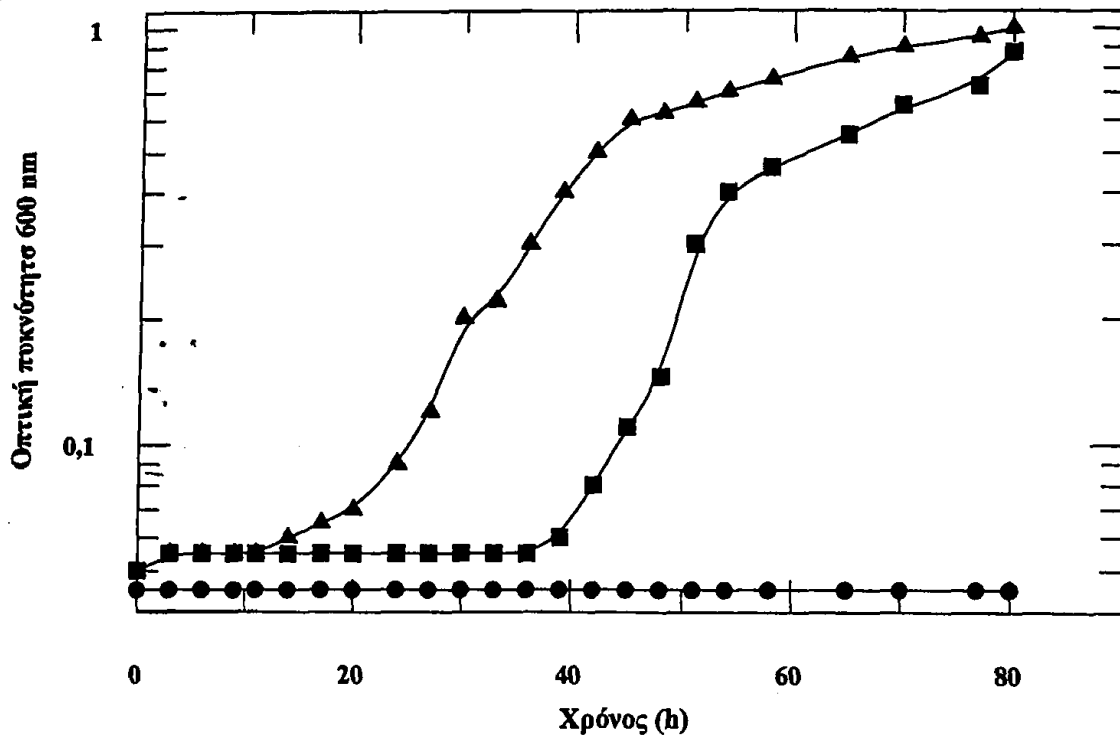
Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και σορβιτόλη, για να ελεγχθεί εάν η προσθήκη της σορβιτόλης έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου της περιόδου εφησυχασμού του στελέχους αυτού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12, το στέλεχος CU1Rif2 όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και σορβιτόλη, παρουσιάζει μια περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών περίπου, ακριβώς όπως και όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη. Επομένως, η σορβιτόλη δεν βοηθάει το στέλεχος CU1Rif2 να ξεπεράσει την περίοδο εφησυχασμού.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το στέλεχος CU1Rif2 δεν έχει πρόβλημα οσμωρύθμισης, άρα η ευαισθησία του σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης οφείλεται σε κάποιον άλλο λόγο.



ΣΧΗΜΑ 12: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη.

Αντίθετα, σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 25% γλυκόζη, εντός του οποίου τόσο το μεταλλαγμένο όσο και το πατρικό στέλεχος δεν αναπτύσσονται, η παρουσία σορβιτόλης βοηθάει την ανάπτυξη και των δύο γεγονός που δείχνει ότι η σορβιτόλη προσλαμβάνεται και δρα με τον ίδιο τρόπο όπως στο μεταλλαγμένο στέλεχος όπως και στο πατρικό (Σχήμα 13).



ΣΧΗΜΑ 13: Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 25% γλυκόζη (●).
 ▲: ATCC 10988 σε 25% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη
 ■: CU1Rif2 σε 25% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη

4.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2

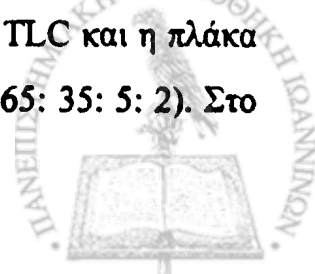
Είναι γνωστό ότι η ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης και γλυκόζης έχει συνδεθεί με την λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του. Ειδικότερα έχει αναφερθεί ότι η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, οφείλεται στην μεγάλη συγκέντρωση οπανοειδών (Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986, Hermans et al. 1991) και cis-βαξενικού οξέος (Carey and Ingram 1983) που περιέχονται στη μεμβράνη του. Ακόμα έχει αναφερθεί (Moreau et al. 1995) ότι η σύσταση των οπανοειδών αλλάζει σημαντικά στη μεμβράνη κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis*, τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη υπό αναερόβιες συνθήκες, σε σχέση με αυτή κύτταρων του *Z. mobilis*, τα οποία αναπτύσσονται σε 2% γλυκόζη υπό αερόβιες συνθήκες.

4.4.1. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων σε κύτταρα του *Z. mobilis* έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο μέθοδοι και υλικά.

Κύτταρα του CU1Rif2 και του ATCC 10988 από ένα λίτρο καλλιέργεια συλλέχθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν. Τα ξηρά κύτταρα εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Rohmer. Στα λιπίδια που προέκυψαν έγινε προσδιορισμός φωσφόρου. Βρέθηκε ότι και τα δύο στελέχη περιείχαν την ίδια περίπου ποσότητα φωσφολιπιδίων, εφόσον κύτταρα ATCC 10988 περιείχαν 1.5 μg φωσφόρου ανά mg κυττάρων και κύτταρα CU1Rif2 περιείχαν 1.4 μg φωσφόρου ανά mg κυττάρων.

Στη συνέχεια, εκχύλισμα λιπιδίων και από τα δύο στελέχη, περιεκτικότητας 20 μg φωσφόρου, τοποθετήθηκαν σε πλάκα TLC και η πλάκα αναπτύχθηκε σε μίγμα διαλυτών $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH- H}_2\text{O-NH}_3$ (65: 35: 5: 2). Στο



Σχήμα 14 φαίνεται ότι τα φωσφολιπίδια του CU1Rif2 δεν διαφέρουν ποιοτικά από αυτά του πατρικού του στελέχους ATCC 10988.

Μετά από τον προσδιορισμό της ποσότητας φωσφόρου κάθε κηλίδας βρέθηκε η ποσοστιαία αναλογία φωσφολιπιδίων και των δύο στελεχών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7:

ΠΙΝΑΚΑΣ 7:

Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των φωσφολιπιδίων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2

	ATCC 10988	CU1Rif2
πολικά-φωσφολιπίδια (κηλίδες 1,2,3,4)	18.4 ± 3.8	25.3 ± 3.4
φωσφατιδυλοσερίνη (PS) + λυσο-φωσφατιδυλο- αιθανολαμίνη (lyso-PE) (κηλίδα 5)	2.4 ± 0.8	3.6 ± 0.4
φωσφατιδυλοχολίνη (PC) (κηλίδα 6)	7.8 ± 1.2	9.4 ± 2.5
φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (κηλίδα 7)	57.3 ± 2.4	43.1 ± 2.2
φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) (8)	13.8 ± 2.2	17.0 ± 5.6
ολικός φώσφορος / mg κυττάρων	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

Ακόμα, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη του στελέχους CU1 και βρέθηκε να έχει ακριβώς την ίδια ποσοστιαία περιεκτικότητα φωσφολιπιδίων με το στέλεχος CU1Rif2.

Φαίνεται ότι το στέλεχος CU1Rif2 έχει μειωμένη περιεκτικότητα φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), σε σχέση με το στέλεχος ATCC 10988. Η διαφορά όμως αυτή δεν είναι και τόσο σημαντική, ώστε να μπορεί να εξηγήσει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

4.4.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ουδετέρων λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό των ουδετέρων λιπιδίων, συλλέχθηκαν και



λυοφιλοποιήθηκαν κύτταρα του CUIRif2 και του ATCC 10988 από 20 λίτρα καλλιέργειας αντίστοιχα. Τα κύτταρα εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Rohmer και τα λιπίδια που προέκυψαν από την εκχύλιση ζυγίστηκαν σε προζυγισμένο φιαλίδιο. Στο στέλεχος CUIRif2 βρέθηκε ότι περιέχονται 408 mg ολικών λιπιδίων, ενώ στο στέλεχος ATCC 10988 400 mg ολικών λιπιδίων.

Για τον προσδιορισμό των ουδετέρων λιπιδίων, 400 mg ολικών λιπιδίων και των δύο στελεχών τοποθετήθηκαν σε ημιπαρασκευαστικές πλάκες TLC, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:αιθέρας (70:30). Η κηλίδα της βάσης της πλάκας (η οποία περιέχει τα πολικά λιπίδια) και οι κηλίδες της υπόλοιπης πλάκας αποξύθηκαν ξεχωριστά και ζυγίστηκαν. Από τα αποτελέσματα υπολογίστηκε η ποσοστιαία περιεκτικότητα ουδετέρων λιπιδίων στα ολικά λιπίδια η οποία βρέθηκε παρόμοια και στα δύο στελέχη ($\cong 4\%$).

Στη συνέχεια τα ουδέτερα λιπίδια και των δύο στελεχών τοποθετήθηκαν σε πλάκα TLC η οποία αναπτύχθηκε στο ίδιο σύστημα ως ανωτέρω. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 15 τα ουδέτερα λιπίδια του στελέχους CUIRif2, δεν διαφέρουν ποιοτικά από εκείνα του φυσικού τύπου.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουδετέρων λιπιδίων, κάθε κηλίδα που φαίνεται στο Σχήμα 15 αποξύθηκε, εκχυλίστηκε και ζυγίστηκε. Έτσι υπολογίστηκε η ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε κηλίδας ουδέτερου λιπιδίου στη συνολική ποσότητα των ουδετέρων λιπιδίων και των δύο στελεχών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8:



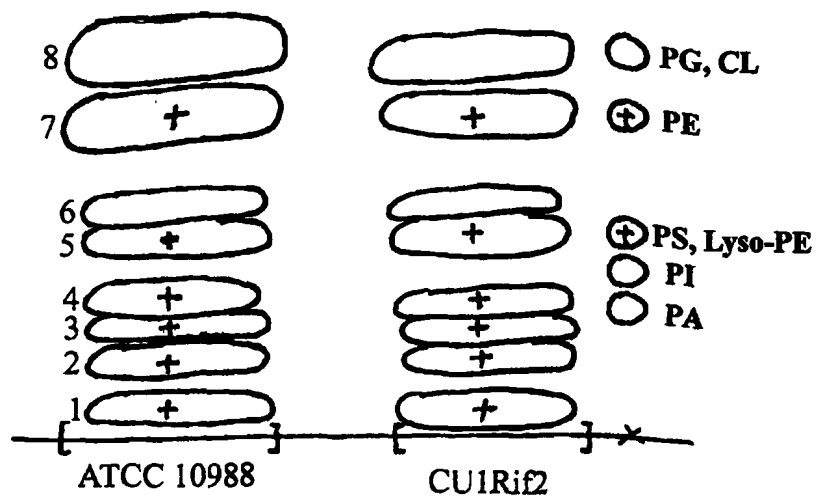
ΠΙΝΑΚΑΣ 8:

Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των ουδετέρων λιπιδίων στα στελέχη ATCC 10988 και CUIRif2

	ATCC 10988	CUIRif2
Άγνωστο (κηλίδα 1)	3.8 ± 0.7	4.4 ± 0.6
Διπλοπτερόλη (κηλίδα 2)	17.5 ± 2.1	15.9 ± 3.0
2-μέθυλ-4,5-διτριδεκυλ-1,4-κυκλοεξαδιενυλ-μεθανόλη (κηλίδα 3)	21.3 ± 3.2	19.9 ± 2.5
Ουβικινόνη Q10 (κηλίδα 4)	10.6 ± 1.6	11.0 ± 1.3
Άγνωστο (κηλίδα 5)	21.7 ± 2.3	22.1 ± 2.6
Υδρογονάνθρακες Σκουαλένιο Διπλοπτένιο (κηλίδα 6)	24.0 ± 2.5	26.5 ± 3.1

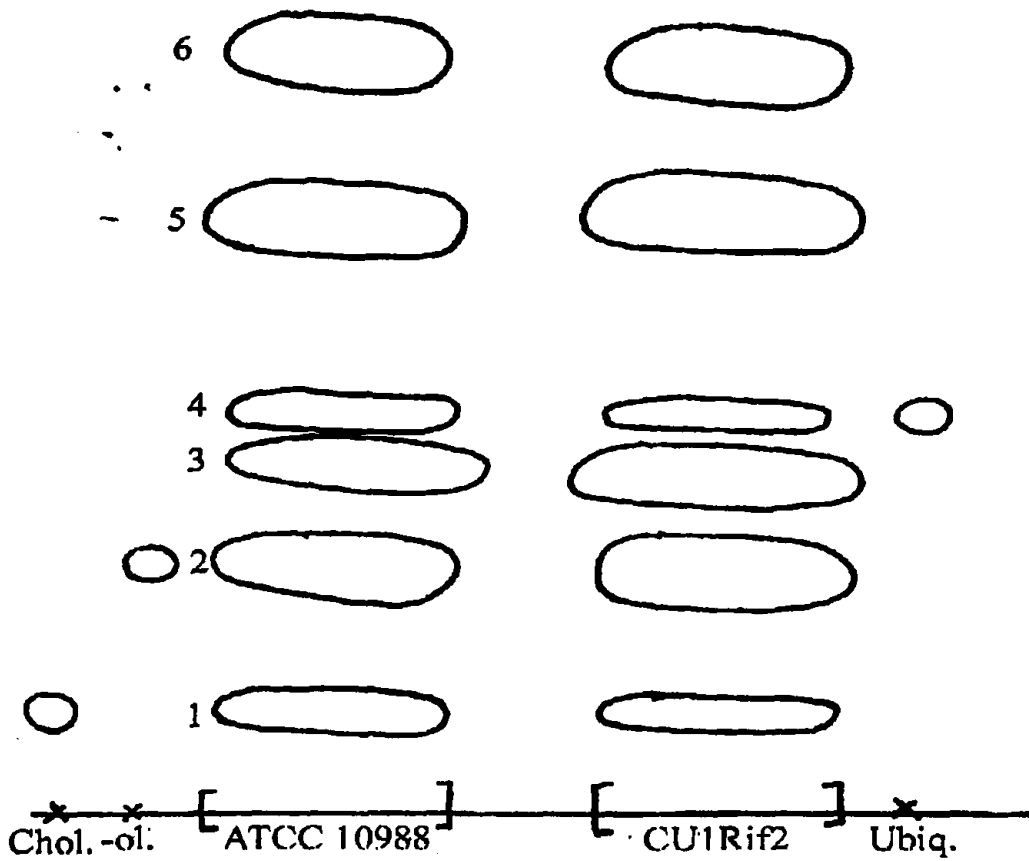
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

Από τον παραπάνω Πίνακα φαίνεται ότι η ποσοστιαία περιεκτικότητα των ουδετέρων λιπιδίων του στελέχους CUIRif2, είναι σχεδόν η ίδια με αυτή του πατρικού στελέχους ATCC 10988.



ΣΧΗΜΑ 14: Τα φωσφολιπίδια των στελεχών ATCC 10988 και CU1Ri2, όπως διαχωρίζονται σε πλάκα πυριτικού οξέος με σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-NH}_3$ (65: 35: 5: 2). CL: καρδιολιπίνη, PA: φωσφατιδικό οξύ, PI: φωσφατιδυλοινωσίνη, PS : φωσφατιδυλοσερίνη, PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη, + : κόκκινος χρωματισμός μετά από ψεκασμό με διάλυμα νινυδρίνης.





ΣΧΗΜΑ 15: Τα ουδέτερα λιπίδια των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2, όπως διαχωρίζονται σε πλάκα πυριτικού οξέος σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:αιθέρας (70:30). Chol. :χοληστερόλη, -ol. : διπλοτερόλη, Ubiq: ουβικινόνη.

4.4.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2, έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο μέθοδοι και υλικά ως εξής:

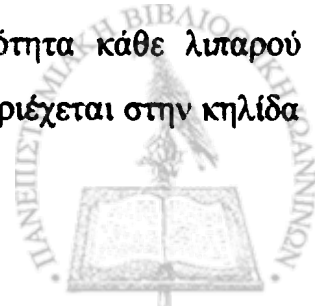
Ποσότητα 300 mg λυοφιλοποιημένων κυττάρων από το κάθε στέλεχος, εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Στα λιπίδια που προέκυψαν έγινε προσδιορισμός φωσφόρου και βρέθηκε ότι το ATCC 10988 έχει 0.6 μg φωσφόρου ανά mg κυττάρων, ενώ το CUIRif2 έχει 0.5 μg φωσφόρου ανά mg κυττάρων.

Σε λιπίδια περιεκτικότητας 50 μg φωσφόρου έγινε εστεροποίηση και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο. Στο Σχήμα 16 φαίνονται τα χρωματογραφήματα του ATCC 10988 και του CUIRif2. Όπως φαίνεται δεν υπάρχει καμία ποιοτική διαφορά ανάμεσα στα λιπαρά οξέα των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2.

Από τα χρωματογραφήματα υπολογίστηκε και η ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε λιπαρού οξέος στη συνολική ποσότητα των λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 9.

Στη συνέχεια, λιπίδια περιεκτικότητας 100 μg φωσφόρου και των δύο στελεχών τοποθετήθηκαν σε πλάκα TLC, η οποία αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:αιθέρας (70:30). Η βάση της πλάκας (πολικά λιπίδια) αποξύθηκε, εκχυλίστηκε και εστεροποιήθηκε. Μετά από ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο βρέθηκε η ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε λιπαρού οξέος στη συνολική ποσότητα των λιπαρών οξέων, που περιέχεται στο κλάσμα των πολικών λιπιδίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 10.

Τέλος, λιπίδια περιεκτικότητας 200 μg φωσφόρου και των δύο στελεχών τοποθετήθηκαν σε πλάκα TLC η οποία αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών CHCl₃-CH₃OH-H₂O (65: 35: 5), η κηλίδα της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) αποξύθηκε, εκχυλίστηκε και εστεροποιήθηκε. Μετά από ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο βρέθηκε η ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε λιπαρού οξέος στη συνολική ποσότητα των λιπαρών οξέων, που περιέχεται στην κηλίδα



της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 10.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9:

Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2

Λιπαρό οξύ	ATCC 10988	Cu1Rif2
Μυριστικό οξύ (14:0)	11.0 ± 1.5	9.8 ± 1.3
Παλμιτικό οξύ (16:0)	12.3 ± 1.8	12.5 ± 1.0
Παλμιτολεϊκό οξύ (16:1)	6.2 ± 0.9	6.0 ± 0.5
Βαξενικό οξύ (18:1)	69.6 ± 2.1	69.2 ± 3.2

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

ΠΙΝΑΚΑΣ 10:

Ποσοστιαία σύσταση (% των ολικών) των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2

Λιπαρό οξύ	ATCC 10988		CU1Rif2	
	πολικά λιπίδια	PE	πολικά λιπίδια	PE
Μυριστικό οξύ (14:0)	11.1 ± 1.2	9.0 ± 1.6	10.8 ± 0.9	9.1 ± 1.4
Παλμιτικό οξύ (16:0)	15.9 ± 2.5	11.3 ± 2.8	13.5 ± 2.1	11.8 ± 2.5
Παλμιτολεϊκό οξύ (16:1)	7.1 ± 0.8	6.1 ± 1.0	5.1 ± 0.9	5.6 ± 1.0
Βαξενικό οξύ (18:1)	64.3 ± 5.5	73.6 ± 5.1	74.0 ± 5.3	75.9 ± 5.1

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα λιπαρά οξέα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2, δεν διαφέρουν ούτε ποιοτικά ούτε ποσοτικά από αυτά του φυσικού τύπου.

4.4.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2

Ο προσδιορισμός των οπανοειδών έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι ως εξής:

Ποσότητα 100 mg κυττάρων εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Rohmer και στη συνέχεια υπέστησαν οξείδωση, αναγωγή και ακετυλίωση. Η ανάλυση τους σε αέριο χρωματογράφο (Σχήμα 17), έδειξε ότι δεν υπάρχει καμιά ποιοτική διαφορά ανάμεσα στα οπανοειδή του στελέχους CU1Rif2 και του φυσικού τύπου.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός (η % περιεκτικότητα τους στα ολικά λιπίδια) των οπανοειδών και των δύο στελεχών έγινε σε ολοκληρωτή χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο διτριακοντάνιο γνωστής ποσότητας. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού φαίνονται στον Πίνακα 11.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11:

Ποσοστιαία περιεκτικότητα (% των ολικών λιπιδίων) των ακετυλιωμένων οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2

ATCC 10988	Cu1Rif2
0.77 ± 0.08	0.73 ± 0.10

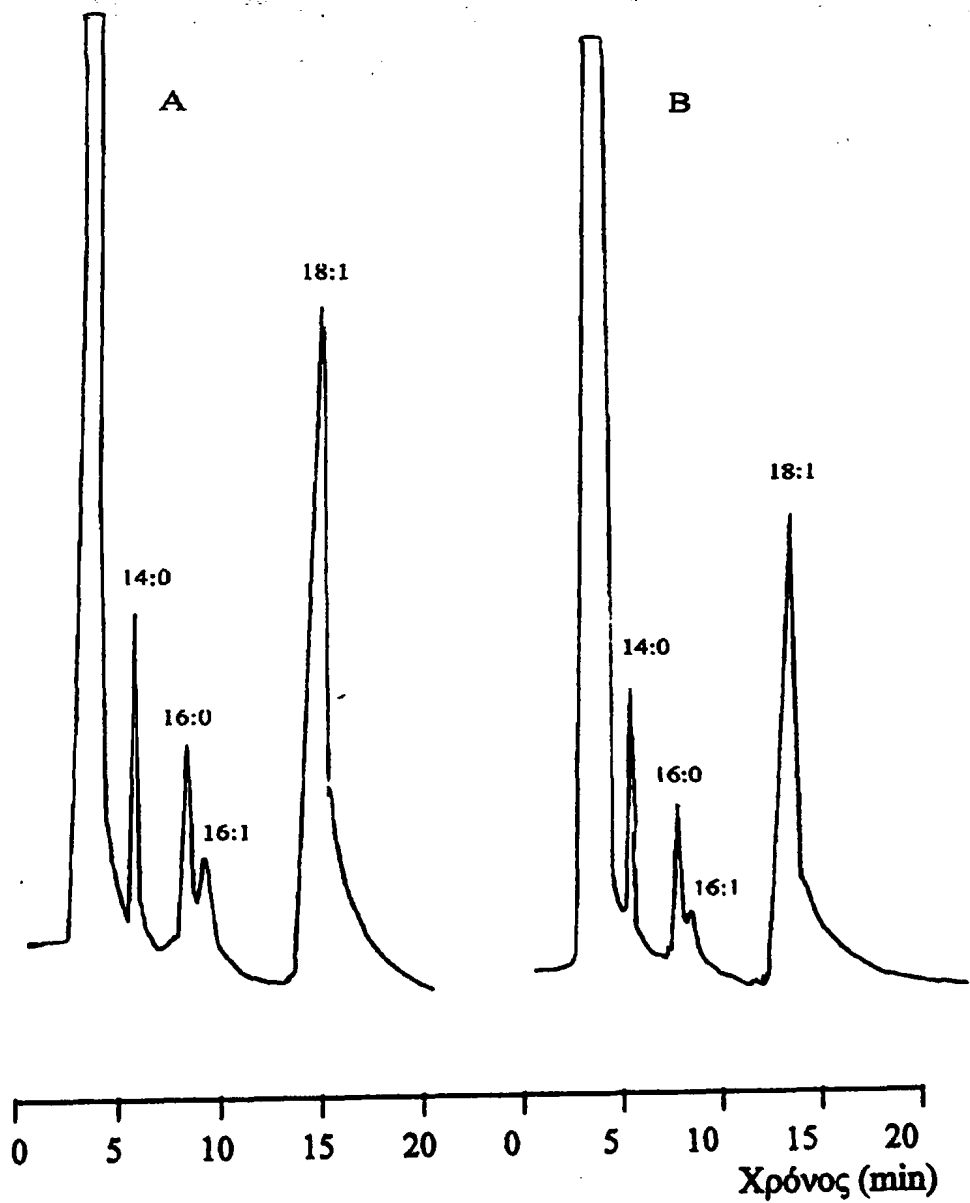
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται, ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 περιέχει τα ίδια οπανοειδή και στην ίδια αναλογία με τον φυσικό τύπο.

Η μελέτη της λιπιδιακής σύστασης της μεμβράνης του στελέχους CU1Rif2 σε σύγκριση με αυτή του ATCC 10988, έγινε και σε κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% γλυκόζη. Τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν διαφορές συγκριτικά με εκείνα των κυττάρων που αναπτύσσονται παρουσία 2% γλυκόζης.

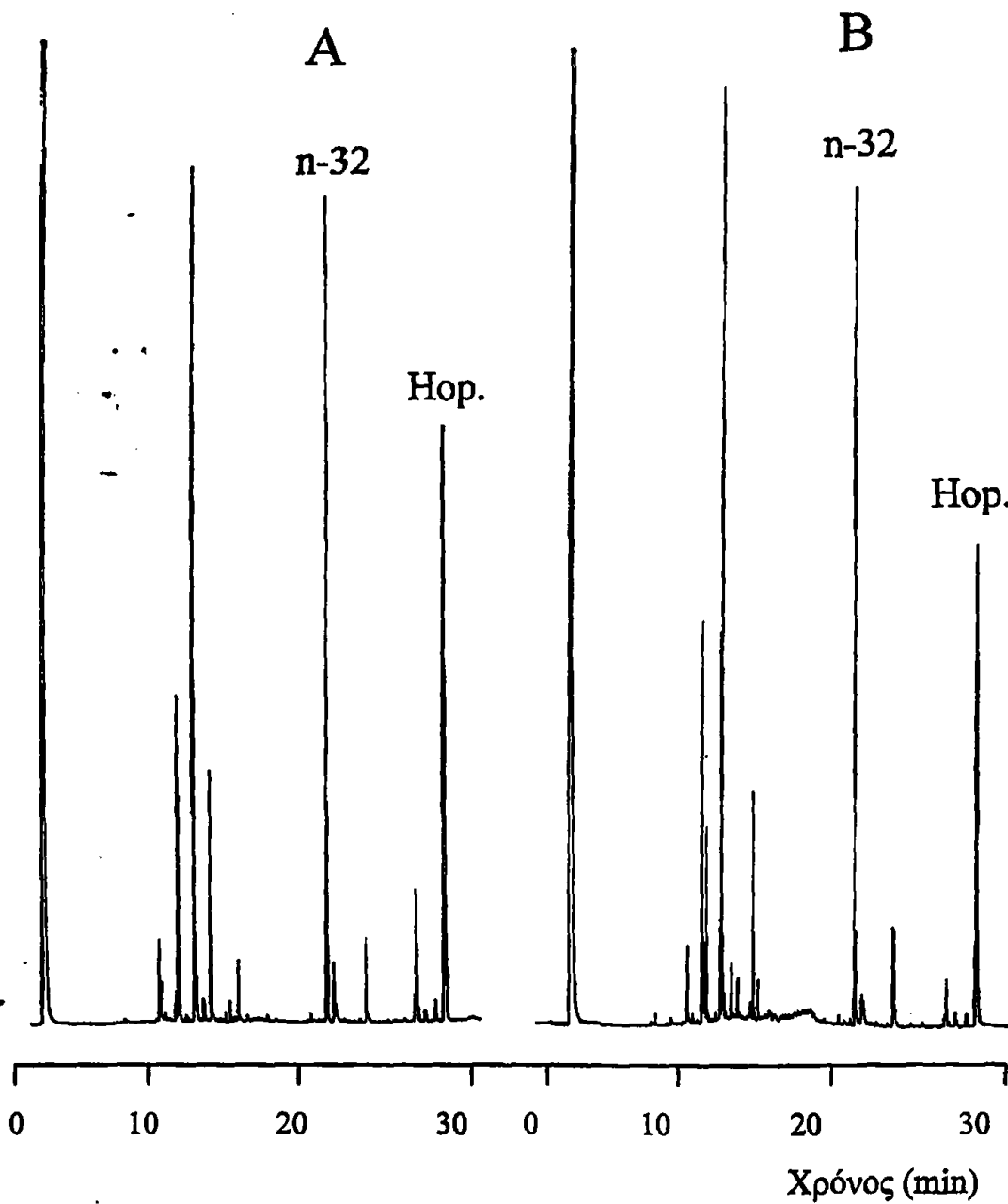


Μετά από τη λιπιδιακή ανάλυση της μεμβράνης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 φαίνεται ότι η σύσταση των λιπιδίων του δεν διαφέρει, με εξαίρεση το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), από αυτή του φυσικού τύπου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν οφείλεται σε αλλαγές της λιπιδιακής σύστασης της μεμβράνης του. Στη συνέχεια λοιπόν, ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους CUIRif2 στράφηκε στην μελέτη της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 16: Αέρια χρωματογραφήματα των λιπαρών οξέων των στελεχών ATCC 10988 (A) και CU1Rif2 (B).





ΣΧΗΜΑ 17: Αέρια χρωματογραφήματα των ακετυλιωμένων οπανοειδών των στελεχών ATCC 10988 (A) και CU1Rif2 (B). n-32: διτριακοντάνιο γνωστής συγκέντρωσης, hop. : σύνολο ακετυλιωμένων οπανοειδών.

4.5 Μελέτη της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2

4.5.1 Μέτρηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2

Η γλυκοκινάση, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, είναι το πρώτο ένζυμο το οποίο θεωρείται σημείο ρύθμισης στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff στο βακτήριο *Z. mobilis*.

Η μέτρηση της δραστηριότητας γλυκοκινάσης έγινε σε κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 και του στελέχους CU1Rif2 μετά από ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2%, 5% και 10% γλυκόζη αντίστοιχα. Ακόμα μετρήθηκε η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης σε κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 και CU1Rif2 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% γλυκόζη και στην συνέχεια είχαν μεταφερθεί για 3 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% γλυκόζη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12:

Δραστηριότητα γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2

Γλυκόζη %	Δραστηριότητα της γλυκοκινάσης (nmol NADH/min mg πρωτεΐνης)	
	ATCC 10988	CU1Rif2
2	550 ± 18	420 ± 20
5	770 ± 15	370 ± 20
10	1050 ± 70	400 ± 15

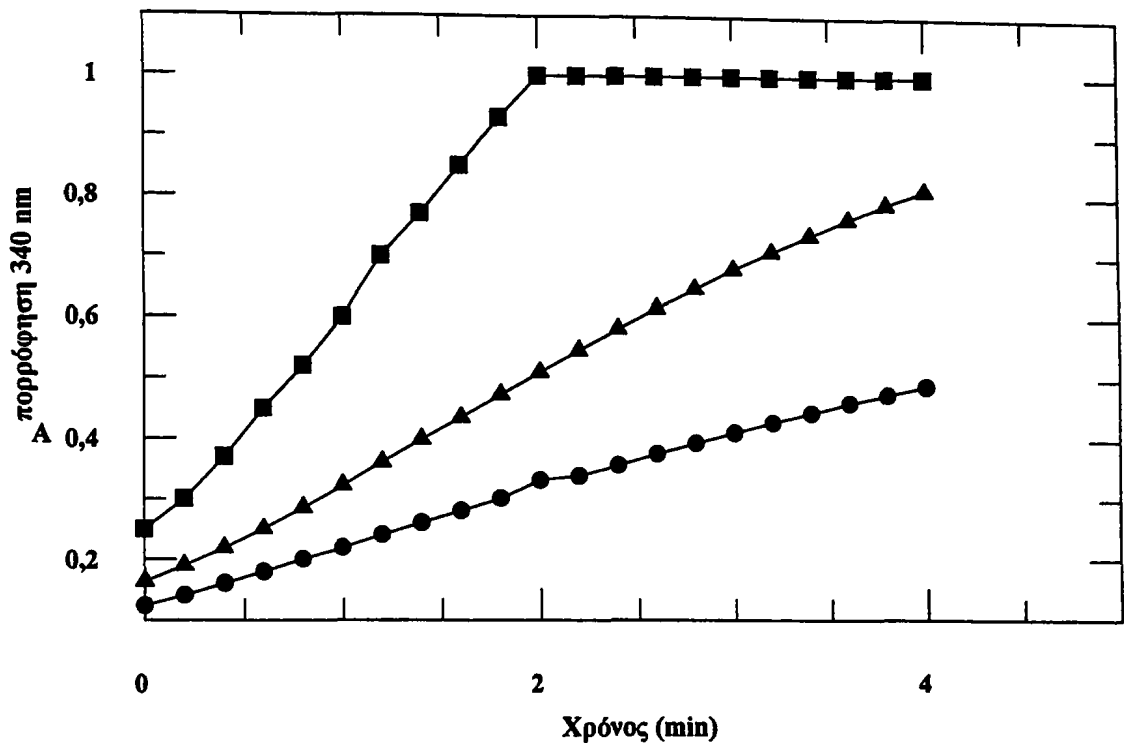
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

* Ανάπτυξη ή επώαση των κυττάρων για 3 ώρες

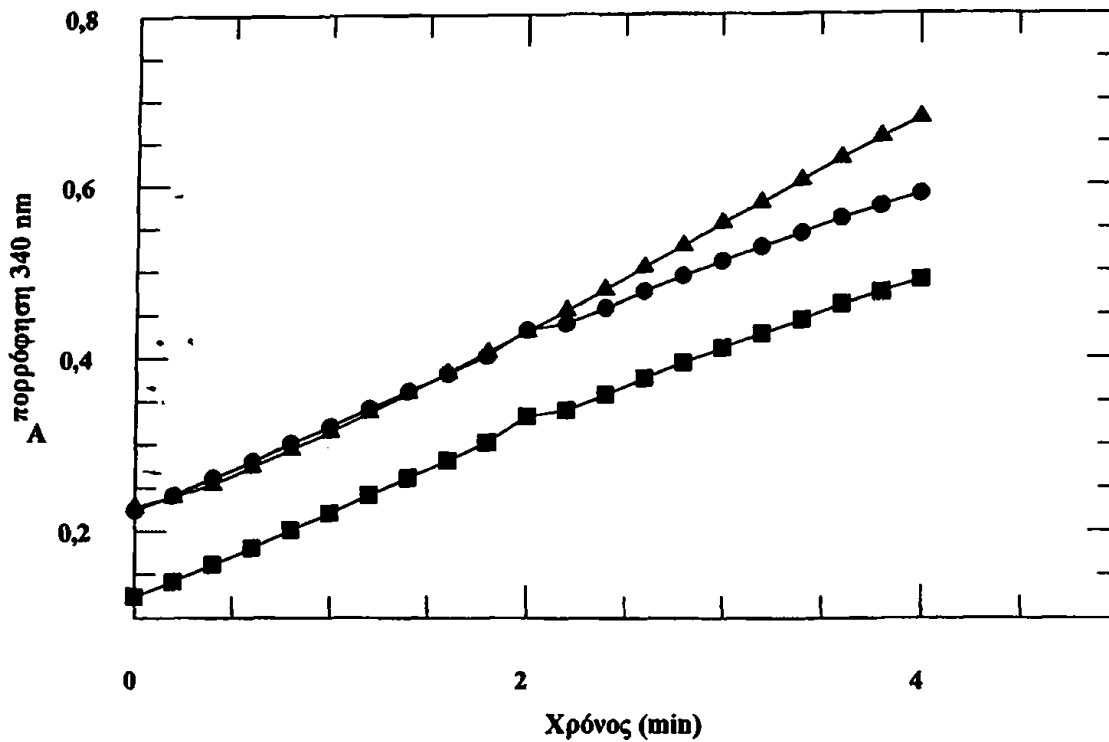


Από τον παραπάνω Πίνακα, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης του στελέχους ATCC 10988 αυξάνεται 1.5 και 2 φορές, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί σε 5% ή 10% αντίστοιχα. Η αύξηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης συναρτῆσει της συγκέντρωσης της γλυκόζης έχει αναφερθεί στο παρελθόν από τους Zachariou και Scores (1986). Το φαινόμενο αυτό, όπως φαίνεται στον παραπάνω Πίνακα, δεν ισχύει στο μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2, στο οποίο η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης παραμένει σταθερή όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί σε 5% ή σε 10%.

Στο Σχήμα 18 φαίνονται οι καμπύλες της απορρόφησης στα 340 nm (αύξηση της ποσότητας του NADH, χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη) σε σχέση με το χρόνο, εκχυλίσματος κυττάρων ATCC 10988 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2%, 5% και 10% γλυκόζη. Στο Σχήμα 19 φαίνονται οι αντίστοιχες καμπύλες για το στέλεχος CUIRif2.



ΣΧΗΜΑ 18: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●), 5% (▲) και 10% (■) γλυκόζη.



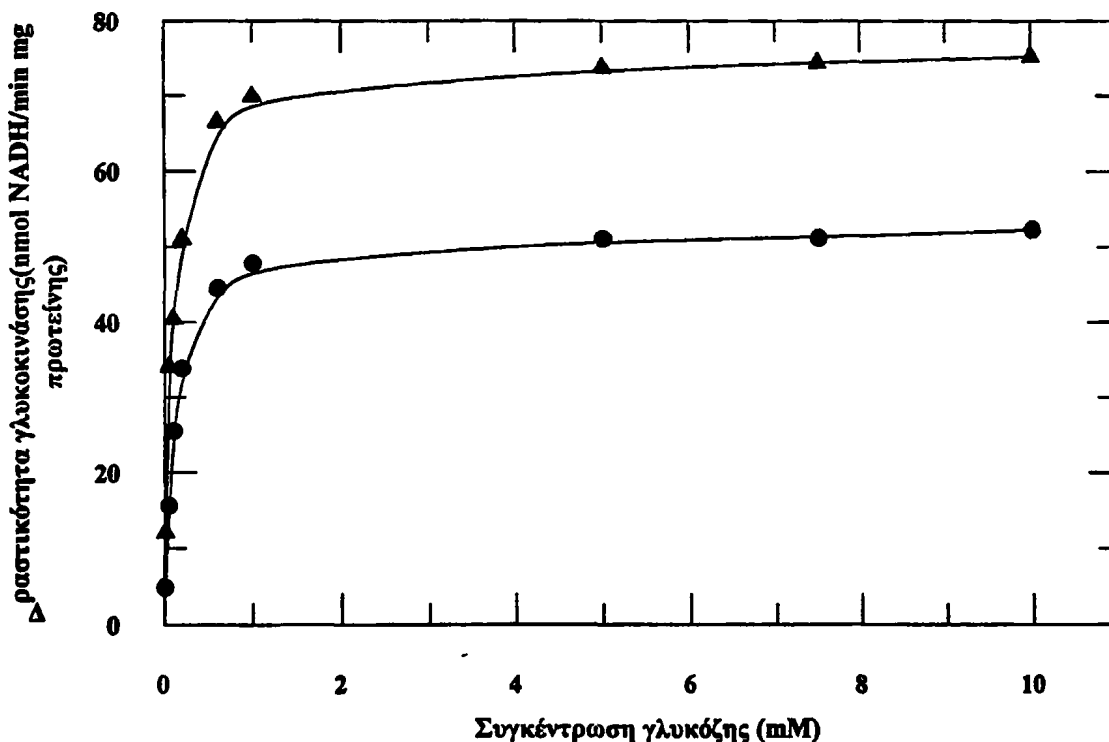
ΣΧΗΜΑ 19: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●), 5% (▲) και 10% (■) γλυκόζη.

4.5.2 Κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2

Η κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης έγινε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, σε κύτταρα των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 20 φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στη δραστικότητα της γλυκοκινάσης του στελέχους ATCC 10988, μετά από ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα. Από το Σχήμα φαίνεται ότι η γλυκοκινάση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις, με τη διαφορά

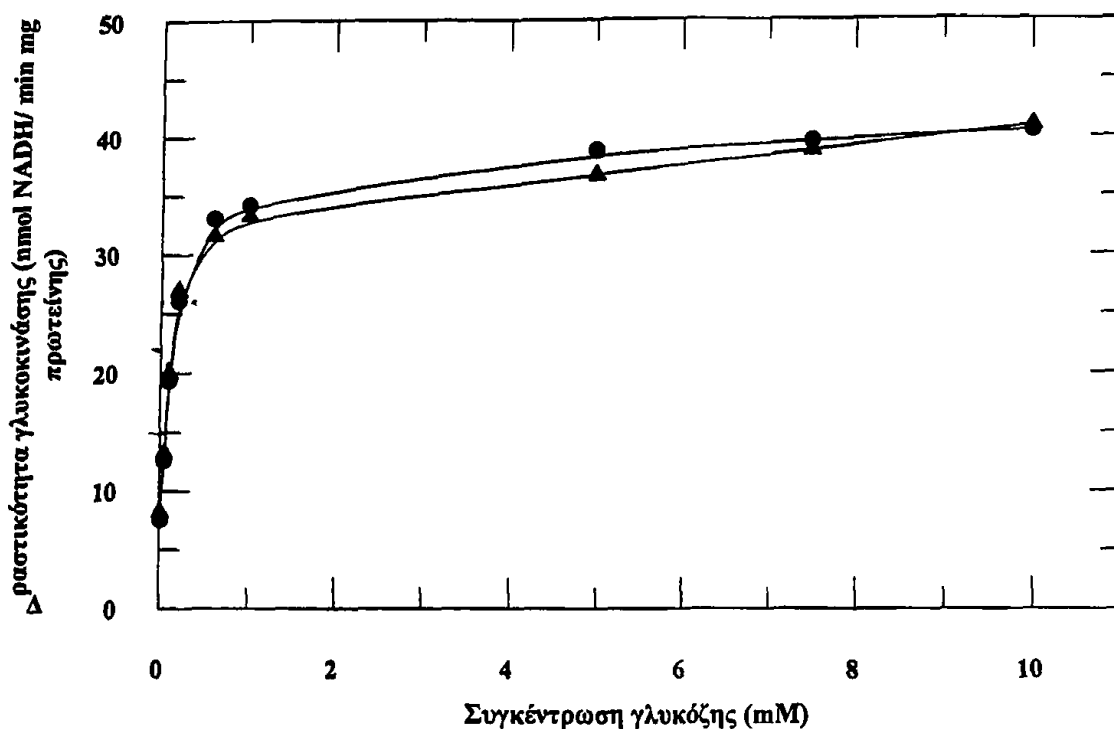
ότι στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5% γλυκόζη-όπως ήταν αναμενόμενο-οι δραστηριότητες της γλυκοκινάσης είναι μεγαλύτερες από αυτές των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη.



ΣΧΗΜΑ 20: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους ATCC 10988, μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.

Στο Σχήμα 21 φαίνεται η επίδραση υποστρώματος στη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους CUIRif2, μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα. Από το Σχήμα φαίνεται ότι η γλυκοκινάση του CUIRif2 ακολουθεί επίσης κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις.





ΣΧΗΜΑ 21: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστικότητα γλυκοκινάσης του στελέχους Cu1Rif2, μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.

Μετά από επεξεργασία σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, εφοδιασμένο με το κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991), υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι K_m και V_{max} της γλυκοκινάσης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 13.

Από τον Πίνακα φαίνεται ότι η τιμή K_m είναι ίδια και στα δύο στελέχη, ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα (Doelle 1982, Scopes et al. 1985, Scopes and Bannon 1995).

Φαίνεται λοιπόν, ότι η γλυκοκινάση του φυσικού τύπου ATCC 10988 δεν αλλάζει κινητικά αλλά ποσοτικά όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο μεταβληθεί. Ακόμα, φαίνεται ότι η γλυκοκινάση του στελέχους CU1Rif2 δεν έχει μεταλλαχθεί, εφόσον η κινητική παράμετρος K_m παραμένει η ίδια. Η αδυναμία αύξησης της δραστικότητας γλυκοκινάσης του CU1Rif2 όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο μπορεί να

οφείλεται σε δύο λόγους:

1) Η γλυκοκινάση του φυσικού τύπου γίνεται πιο δραστική (φωσφορυλιώνει μεγαλύτερη ποσότητα υποστρώματος ανά μονάδα χρόνου) όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, ενώ η γλυκοκινάση του μεταλλαγμένου στελέχους έχει χάσει αυτή την ικανότητα. Η ικανότητα αυτή εκφράζεται με τη κινητική παράμετρο k_{cat} .

2) Η ποσότητα της γλυκοκινάσης του φυσικού τύπου αυξάνεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και το μεταλλαγμένο στέλεχος έχει χάσει την αυτή ικανότητα.

Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, υπολογίστηκε η κινητική παράμετρος k_{cat} στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% ή 5% γλυκόζη.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 13 και δείχνουν ότι η τιμή της κινητικής παραμέτρου k_{cat} , η οποία συμφωνεί με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα (Scores and Bannon 1995), δεν διαφέρει σημαντικά και στα δύο στελέχη και στις δύο συνθήκες ανάπτυξης. Άρα η τιμή της κινητικής παραμέτρου k_{cat} δεν φαίνεται να μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, αλλά ούτε και φαίνεται να είναι διαφορετική στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.



ΠΙΝΑΚΑΣ 13:

Κινητικές παράμετροι της γλυκοκινάσης

	K_m (mM γλυκόζης)	V_{max}	k_{cat} (s^{-1})
ATCC 10988 σε 2% γλυκόζη	0.117 ± 0.011	580 ± 36	352
Cu1Rif2 σε 2% γλυκόζη	0.110 ± 0.006	480 ± 55	274
ATCC 10988 σε 5% γλυκόζη	0.110 ± 0.008	830 ± 50	257
Cu1Rif2 σε 5% γλυκόζη	0.090 ± 0.005	420 ± 26	233

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το βακτήριο *Zyotomonas mobilis* διαθέτει κάποιο ρυθμιστικό μηχανισμό, μέσω του οποίου η ποσότητα της γλυκοκινάσης αυξάνεται όταν αυξηθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Ο μηχανισμός αυτός δεν φαίνεται να λειτουργεί στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.

4.6 Μελέτη της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης του στελέχους CU1Rif2

Εκτός από τη γλυκοκινάση, η αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, θεωρείται επίσης ένα από τα πιο πιθανά σημεία ρύθμισης στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff.

Έτσι, μετρήθηκε η δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης σε κύτταρα των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης, και σε κύτταρα των δύο στελεχών τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και στη συνέχεια επωαστεί για 3 ώρες σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 14.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14:**Δραστικότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης**

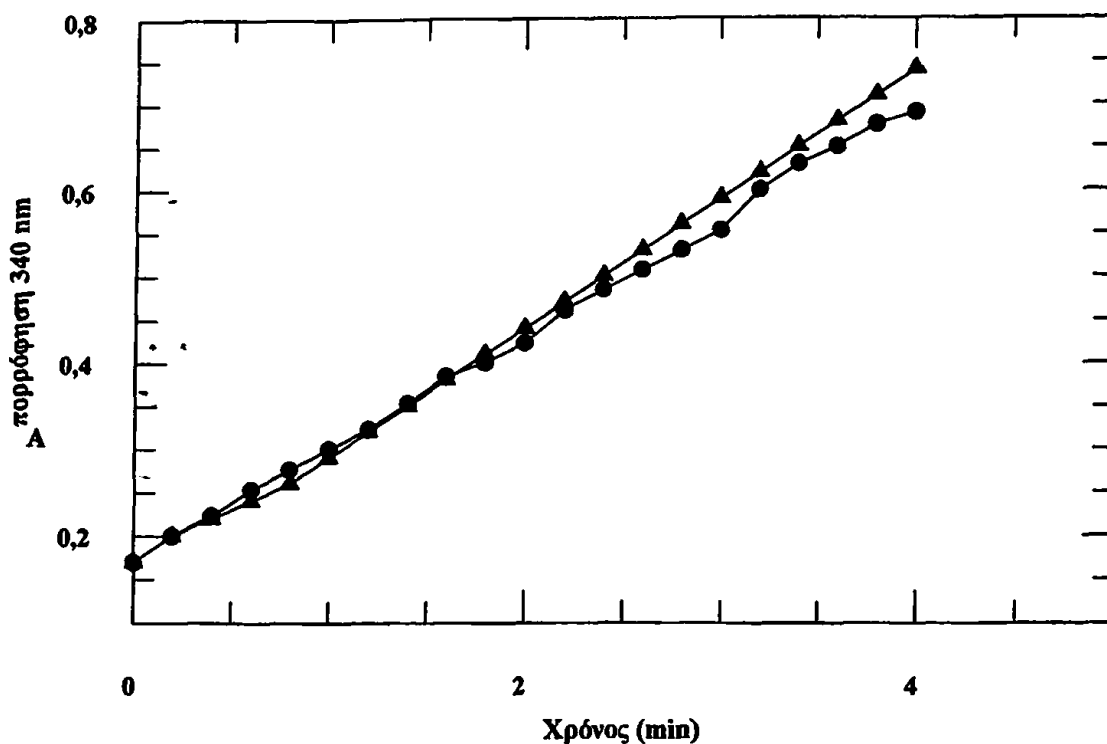
	Δραστικότητα (nmole NADH \min mg πρωτεΐνης)
ATCC 10988 σε 2% γλυκόζη	160 ± 28
Cu1Rif2 σε 2% γλυκόζη	145 ± 07
ATCC 10988 σε 10% γλυκόζη	150 ± 14
Cu1Rif2 σε 10% γλυκόζη	170 ± 18

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

Από τον παραπάνω Πίνακα φαίνεται ότι η δραστικότητα αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης παραμένει στα ίδια επίπεδα, τόσο στον φυσικό τύπο όσο και στο στελέχος CU1Rif2, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης. Ακόμα, φαίνεται ότι η δραστικότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης του στελέχους CU1Rif2, δεν διαφέρει σε σχέση με αυτή του πατρικού στελέχους.

Οι καμπύλες αύξησης απορρόφησης στα 340 nm (αύξηση της ποσότητας του NADH, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την 6-P-γλυκόζη) σε σχέση με το χρόνο, φαίνονται στο Σχήμα 22.





ΣΧΗΜΑ 22: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 6-P-γλυκόζη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

4.7 Μελέτη της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης του στελέχους CU1Rif2

Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει ένα από τα πιο βασικά στάδια της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff: την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεύδη και διοξείδιο του άνθρακα.

Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου μετρήθηκε σε κύτταρα του φυσικού τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης ή είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και στη συνέχεια μεταφερθεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης για 3 ώρες.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 15 και δείχνουν ότι η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης παραμένει στα ίδια επίπεδα, τόσο στο φυσικό τύπο όσο και στο στέλεχος CU1Rif2. Ακόμα, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης του στελέχους CU1Rif2, δεν διαφέρει από αυτή του πατρικού στελέχους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15:

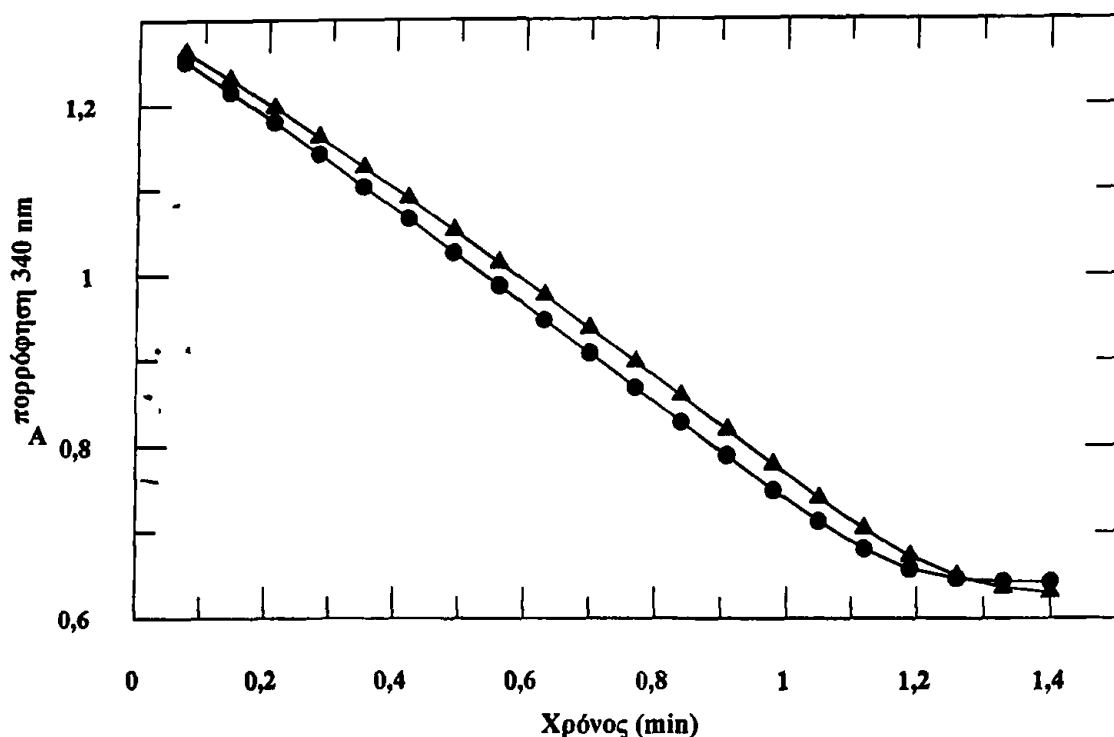
Δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης

	Δραστηριότητα (nmole NADH \min mg πρωτεΐνης)
ATCC 10988 σε 2% γλυκόζη	2135 ± 289
Cu1Rif2 σε 2% γλυκόζη	2335 ± 106
ATCC 10988 σε 10% γλυκόζη	2425 ± 210
Cu1Rif2 σε 10% γλυκόζη	2155 ± 346

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

Οι καμπύλες της απορρόφησης στα 340 nm (μείωση της ποσότητας του NADH, χρησιμοποιώντας περίσσεια αλκοολικής αφυδρογονάσης και ως υπόστρωμα το πυροσταφυλικό οξύ) σε σχέση με το χρόνο, φαίνονται στο Σχήμα 23.





ΣΧΗΜΑ 23: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αλκοολικής αφυδρογονάσης και ως υπόστρωμα πυροσταφυλικό οξύ), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

4.8 Μελέτη της αλκοολικής αφυδρογονάσης του στελέχους CU1Rif2

Η αλκοολική αφυδρογονάση είναι επίσης ένα ένζυμο που καταλύει ένα από τα πιο βασικά στάδια της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff: την αναγωγή της ακεταλδεύδης σε αιθανόλη.

Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου μετρήθηκε σε κύτταρα του φυσικού τύπου ATCC 10988 και του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης ή είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και στη συνέχεια επωαστεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης για 3 ώρες.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 16 και δείχνουν ότι η δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης παραμένει στα ίδια επίπεδα, τόσο στο φυσικό τύπο όσο και στο στελέχος CUIRif2. Ακόμα, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης του στελέχους CUIRif2, δεν διαφέρει από αυτή του πατρικού στελέχους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16:

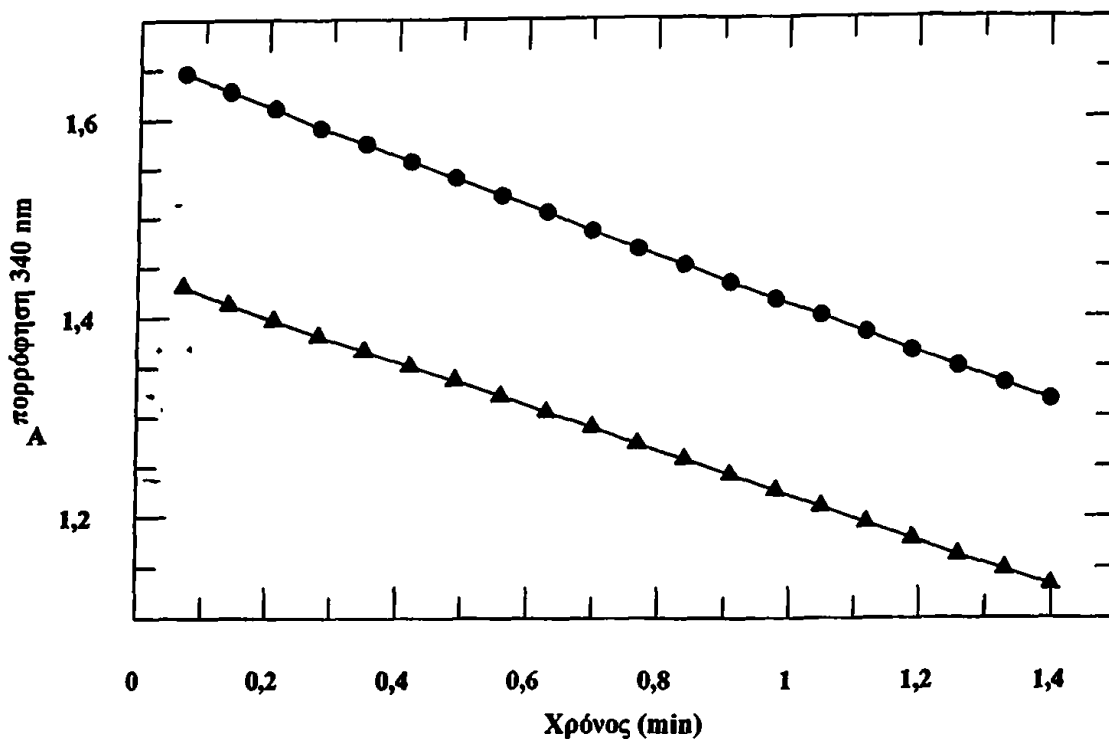
Δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης

	Δραστηριότητα (nmole NADH \min mg πρωτεΐνης)
ATCC 10988 σε 2% γλυκόζη	775 ± 35
Cu1Rif2 σε 2% γλυκόζη	790 ± 98
ATCC 10988 σε 10% γλυκόζη	800 ± 113
Cu1Rif2 σε 10% γλυκόζη	790 ± 98

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

Οι καμπύλες της απορρόφησης στα 340 nm (μείωση της ποσότητας του NADH, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακεταλδεϋδη) σε σχέση με το χρόνο, φαίνονται στο Σχήμα 24.





ΣΧΗΜΑ 24: Καμπύλη της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακεταλδεΰδη), εκχυλίσματος κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 ή CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

4.9 Μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2

4.9.1 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2

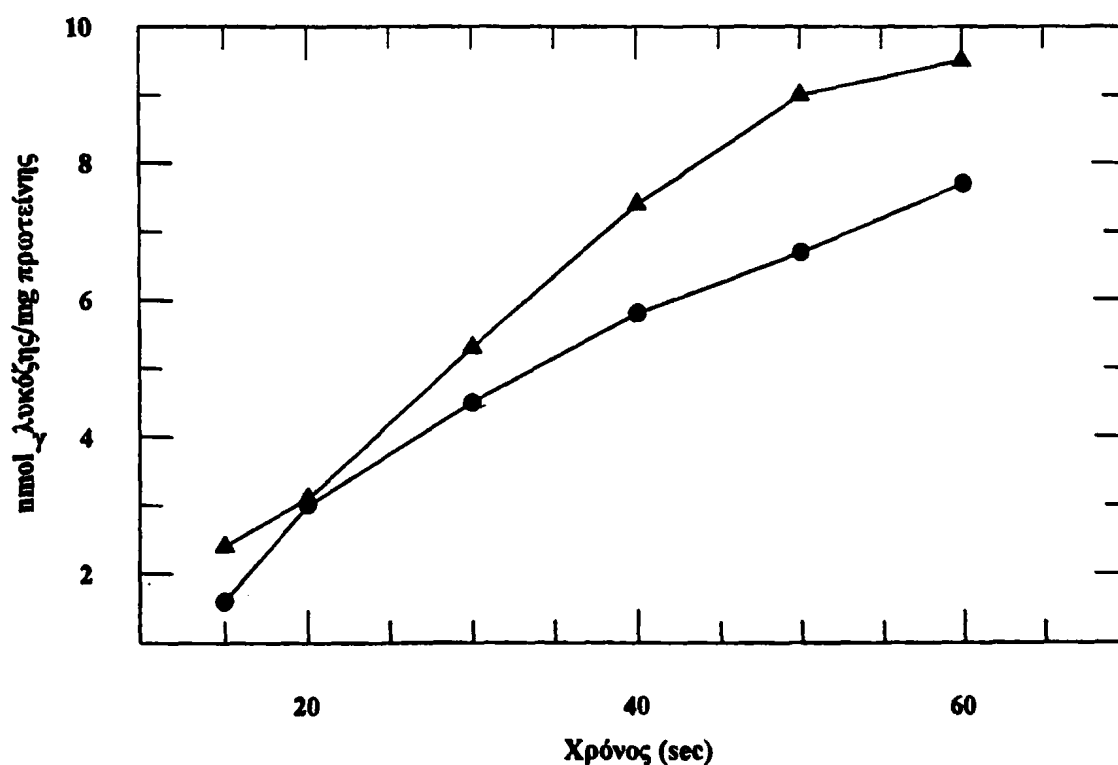
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα από τα πιθανά σημεία ρύθμισης του μεταβολισμού της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*, είναι η πρόσληψή της από το εξωτερικό περιβάλλον. Είναι γνωστό ότι η πρόσληψη της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*, γίνεται μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης (DiMarco and Romano 1985).

Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης σε κύτταρα των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2, τα οποία είχαν

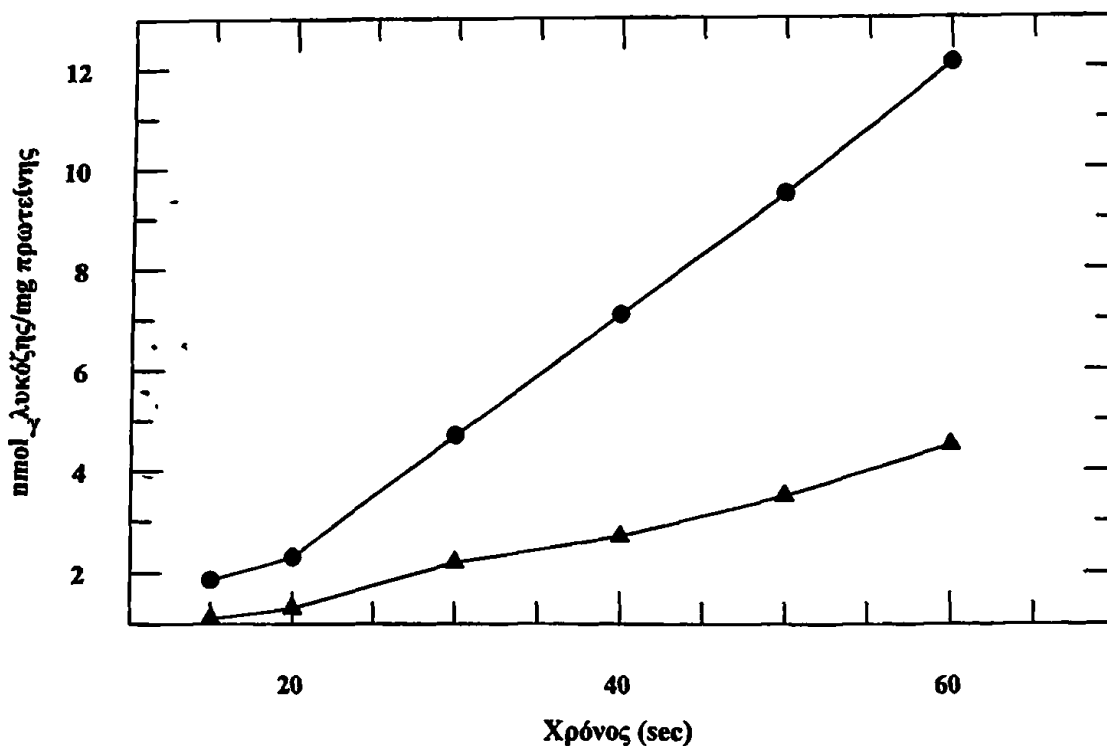
αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και σε κύτταρα και των δύο στελεχών τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και στη συνέχεια μεταφερθεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης για 3 ώρες.

Οι καμπύλες που φαίνονται στο Σχήμα 25 απεικονίζουν την προσληφθείσα γλυκόζη ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο σε κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης ή μεταφερθεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Στο Σχήμα 26 φαίνονται οι αντίστοιχες καμπύλες για το στέλεχος CU1Rif2.



ΣΧΗΜΑ 25: Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο, κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.



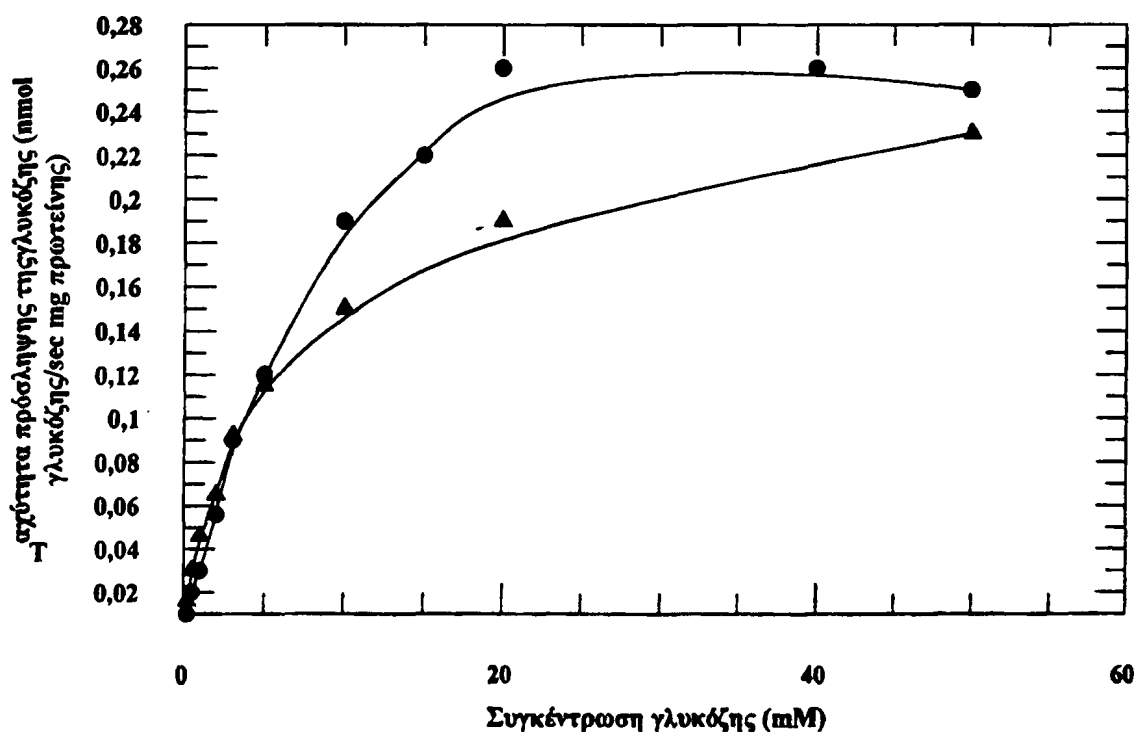
ΣΧΗΜΑ 26: Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο, κυττάρων του στελέχους CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

Από τα Σχήματα φαίνεται ότι η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης (η οποία αντιπροσωπεύεται από την κλίση της καμπύλης) του στελέχους ATCC 10988 παραμένει σταθερή (ή αυξάνεται λίγο) όταν τα κύτταρα επωαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη. Αντίθετα, η αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2, μειώνεται σημαντικά όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί από 2% σε 10%. Είναι δυνατό να υπάρχει ένας ρυθμιστικός μηχανισμός μέσω του οποίου το βακτήριο *Z. mobilis* διατηρεί την αρχική πρόσληψη της γλυκόζης σταθερή όταν η συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί από 2% σε 10%. Αυτός ο μηχανισμός δεν φαίνεται να ισχύει στο μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2.

4.9.2 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2

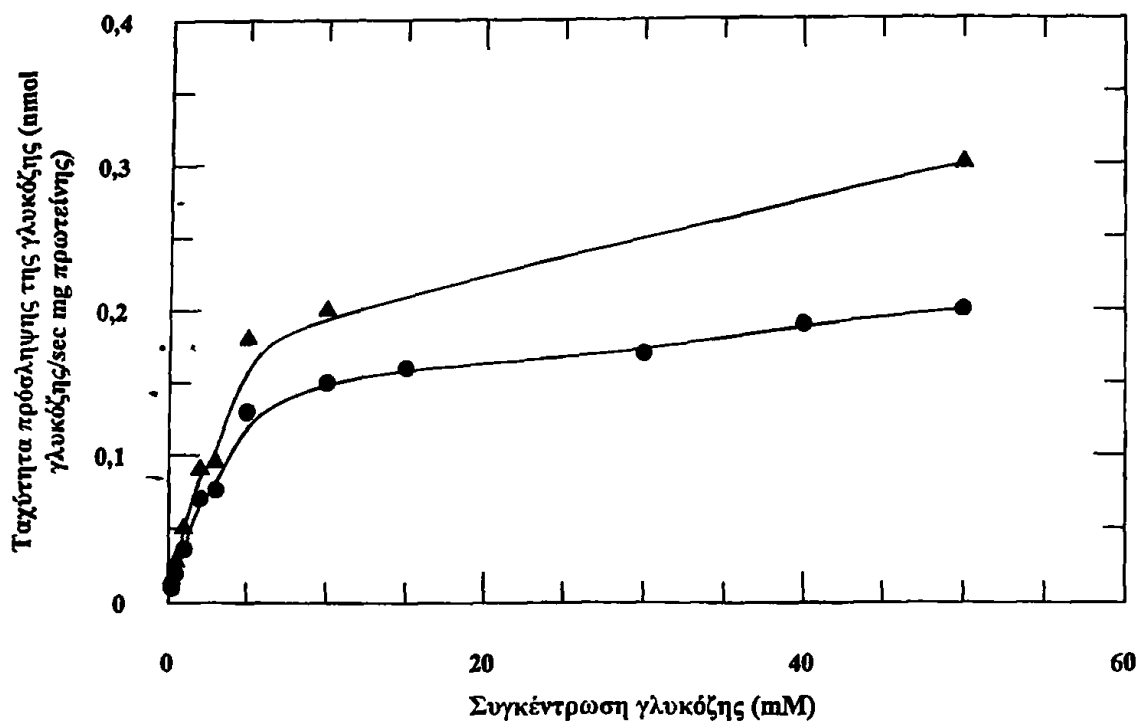
Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max}) της πρόσληψης της γλυκόζης, έγινε στα στελέχη ATCC 10988 και CU1Rif2 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% ή 5% γλυκόζη αντίστοιχα.

Οι καμπύλες της ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης (nmol γλυκόζης / (mg πρωτεΐνης X sec)) σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος (γλυκόζη), σε κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 φαίνονται στο Σχήμα 27. Στο Σχήμα 28 φαίνονται οι αντίστοιχες καμπύλες για το στέλεχος CU1Rif2. Φαίνεται ότι η πρόσληψη της γλυκόζης ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις.



ΣΧΗΜΑ 27: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης (nmol γλυκόζης / sec X mg πρωτεΐνης) κυττάρων του στελέχους ATCC 10988 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.





ΣΧΗΜΑ 28: Επίδραση συγκέντρωσης υποστρώματος στην πρόσληψη της γλυκόζης (nmol γλυκόζης / sec X mg πρωτεΐνης) κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.

Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με το κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991), υπολογίστηκαν οι τιμές K_m και V_{max} και για τα δύο στελέχη και στις δύο συνθήκες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 17 και δείχνουν ότι οι τιμές K_m και V_{max} των δύο στελεχών και στις δύο συνθήκες ανάπτυξης δεν διαφέρουν τόσο, ώστε να μπορεί να ισχυριστεί κανείς ότι ο μεταφορέας της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2 έχει υποστεί κάποια μετάλλαξη. Επίσης, οι διαφορές αυτές δεν μπορούν να θεωρηθούν σημαντικές λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων στις τιμές K_m ανάμεσα στα διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν, ότι πιθανά στο στέλεχος CU1Rif2 έχει χαθεί ή μεταλλαχθεί κάποιος παράγοντας που ρυθμίζει έμμεσα ή άμεσα την μεταφορά της γλυκόζης. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων K_m συμφωνούν με αυτές της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (DiMarco and Romano 1984). Στις τιμές της ταχύτητας

πρόσληψης της γλυκόζης όμως, συμπεριλαμβάνεται και η φωσφορυλίωση της, λόγω της αδυναμίας μετρήσεων σε μικρότερα χρονικά διαστήματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17:

Κινητικές παράμετροι της πρόσληψης γλυκόζης

	K_m (mM γλυκόζης)	V_{max} (nmole γλυκόζης/sec mg πρωτεΐνης)
ATCC 10988 σε 2% γλυκόζη	2.8 ± 0.53	0.28 ± 0.00
Cu1Rif2 σε 2% γλυκόζη	3.7 ± 0.50	0.38 ± 0.19
ATCC 10988 σε 5% γλυκόζη	9.2 ± 3.40	0.23 ± 0.11
Cu1Rif2 σε 5% γλυκόζη	4.8 ± 0.46	0.30 ± 0.03

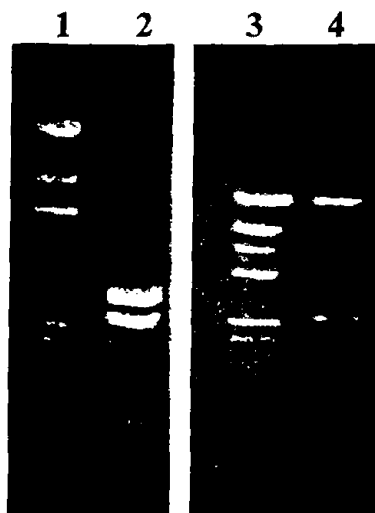
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

4.10 Μεταφορά του γονιδίου *glf* στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2

Η συμμετοχή του συστήματος πρόσληψης της γλυκόζης στην καθυστερημένη ανάπτυξη του CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης εξετάστηκε με μεταφορά του γονιδίου *glf* σε κύτταρα CU1Rif2. Το γονίδιο *glf* του *Z. mobilis* το οποίο κωδικεύει την πρωτεΐνη-μεταφορέα της γλυκόζης, έχει κλωνοποιηθεί και βρίσκεται σε ένα σύμπλεγμα με τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα: αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (*zwf*), δεϋδρατάση του 6-P-γλυκονικού οξέος (*edd*) και γλυκοκινάση (*glk*) (Barnell et al. 1990).

Στην παρούσα εργασία το *glf* υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pLAFR5, από το πλασμίδιο pUC18-*glf* (Πίνακας 4) μετά από περιοριστική πέψη με *HindIII*. Έτσι, κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR5-*glf* (Σχήμα 29 και Σχήμα 30) το οποίο μεταφέρθηκε στο στέλεχος CU1Rif2. Κύτταρα CU1Rif2/pLAFR5-*glf* παρουσίαζαν τις ίδιες ιδιότητες ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης με εκείνες του CU1Rif2 (Σχήμα 36). Το

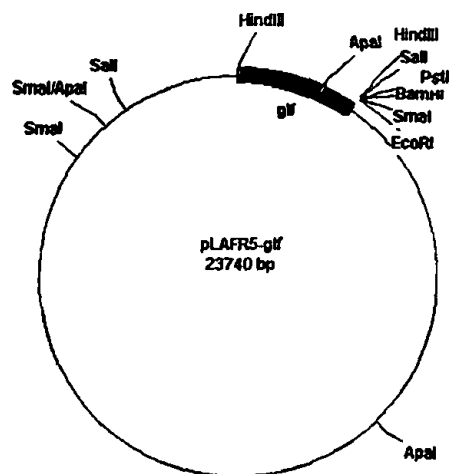
αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η μειωμένη αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης, δεν οφείλεται σε πιθανή μετάλλαξη του γονιδίου *glf*, αλλά μάλλον στη μη λειτουργία ή δυσλειτουργία κάποιου ρυθμιστικού μηχανισμού που επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα την πρόσληψη της γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 29: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pUC18-*glf* και pLAFR5-*glf*.

Διαδρομές:

1. λ- DNA / *Hind*III
2. pUC18-*glf* / *Hind*III
3. λ- DNA / *Hind*III
4. pLAFR5-*glf* / *Hind*III



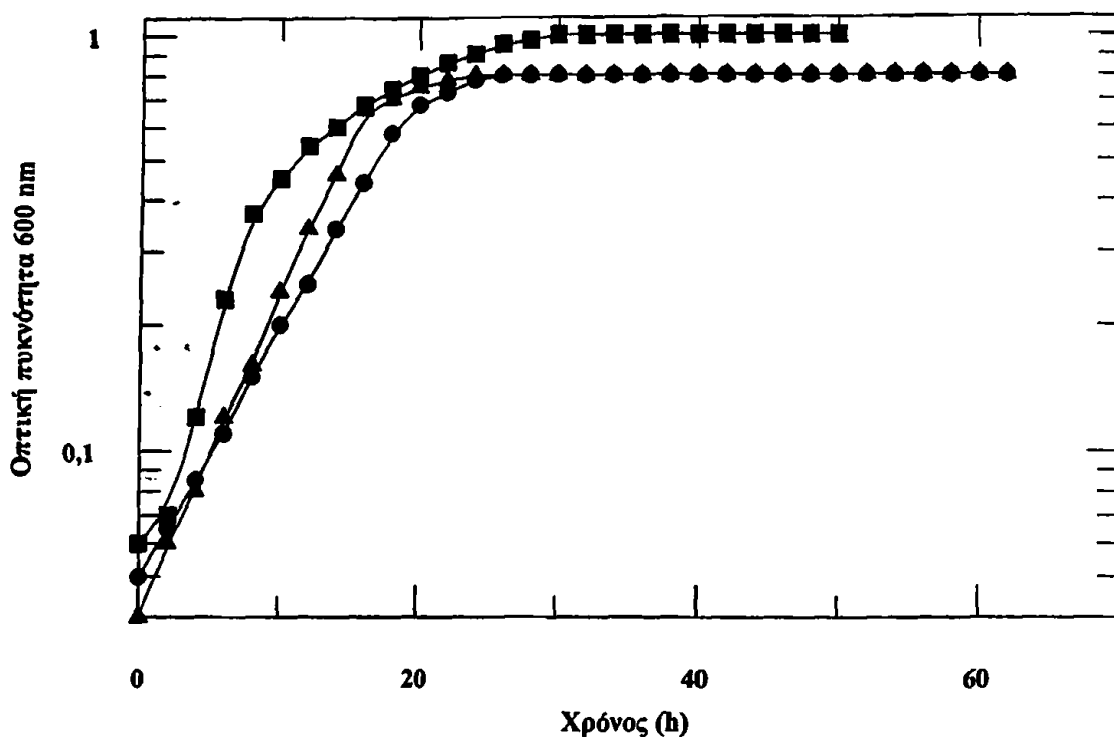
ΣΧΗΜΑ 30: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pLAFR5-*glf*.

4.11 Ανάπτυξη κυττάρων CU1Rif2 διαφόρων φάσεων σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παραμένει στη φάση εφησυχασμού για 22 ώρες περίπου σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα ανάπτυξης του σε διάφορες φάσεις, κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 τα οποία είχαν επωαστεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης μεταφέρθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης από τρεις διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης: 1) Ακριβώς μετά από τις 22 ώρες εφησυχασμού, μόλις δηλαδή είχαν αρχίσει να αναπτύσσονται, 2) Κατά την εκθετική τους ανάπτυξη (O.D.= 0.3) και 3) κατά την στατική φάση (O.D.=0.8). Η ανάπτυξη τους μετρήθηκε φωτομετρικά (αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm) ανά μονάδα χρόνου και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 31.



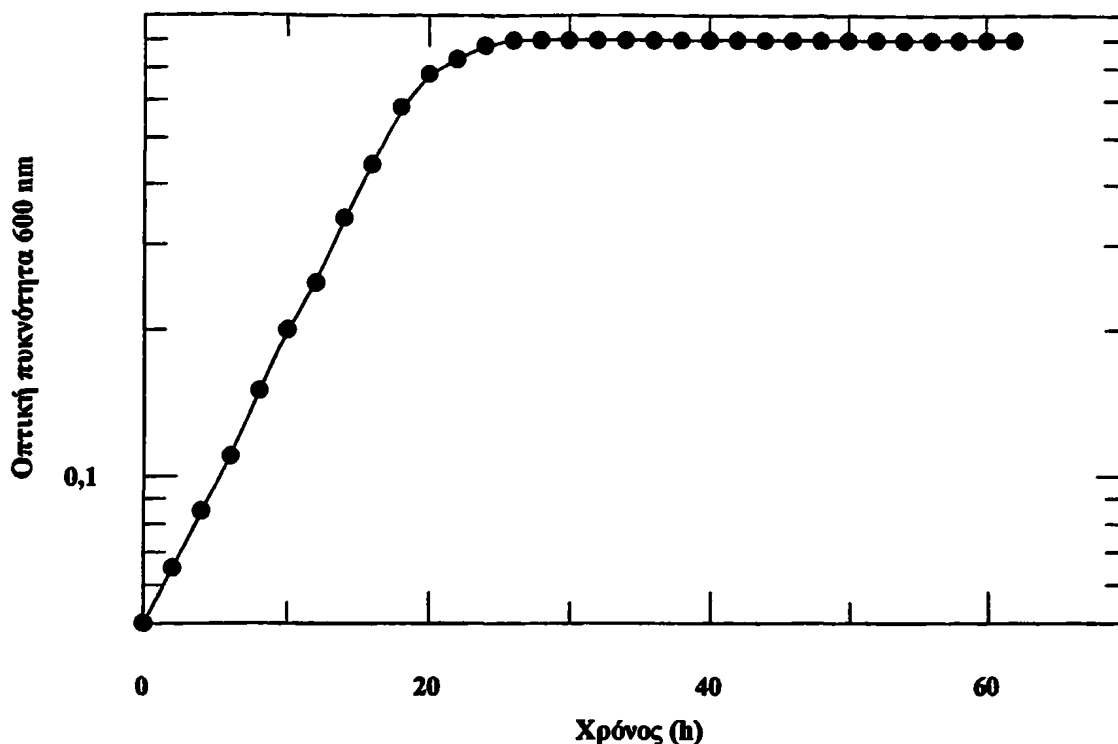


ΣΧΗΜΑ 31: Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 τα οποία έχουν προεπωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και έχουν συλλεχθεί: 1) μετά από 22 ώρες (●), 2) κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής (▲) και 3) κατά τη στατική φάση (■).

Φαίνεται ότι κύτταρα του CU1Rif2 που έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, όταν μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, αναπτύσσονται αμέσως χωρίς να διέρχονται περίοδο εφησυχασμού. Ίσως για την ανάπτυξη κυττάρων του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, απαιτούνται τουλάχιστον 22 ώρες για τη δημιουργία κάποιου παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης. Αντίθετα, στον φυσικό τύπο ο παράγοντας αυτός θα πρέπει να δημιουργείται αμέσως. Ακόμα, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ο παράγοντας αυτός συνεχίζει να υπάρχει και όταν τα κύτταρα έχουν φτάσει στη στατική φάση.

Είναι πολύ πιθανό το ίδιο το μόριο της γλυκόζης να είναι το σήμα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας. Για να διαπιστωθεί αυτό, έγινε μελέτη της ανάπτυξης σε 10% γλυκόζη κυττάρων του στελέχους CU1Rif2 τα οποία είχαν προεπωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% 2-

δεοξυγλυκόζης για 22 ώρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 32.



ΣΧΗΜΑ 32: Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης κυττάρων του στελέχους CUIRif2, τα οποία έχουν προεπωαστεί για 22 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% 2-δεοξυγλυκόζη.

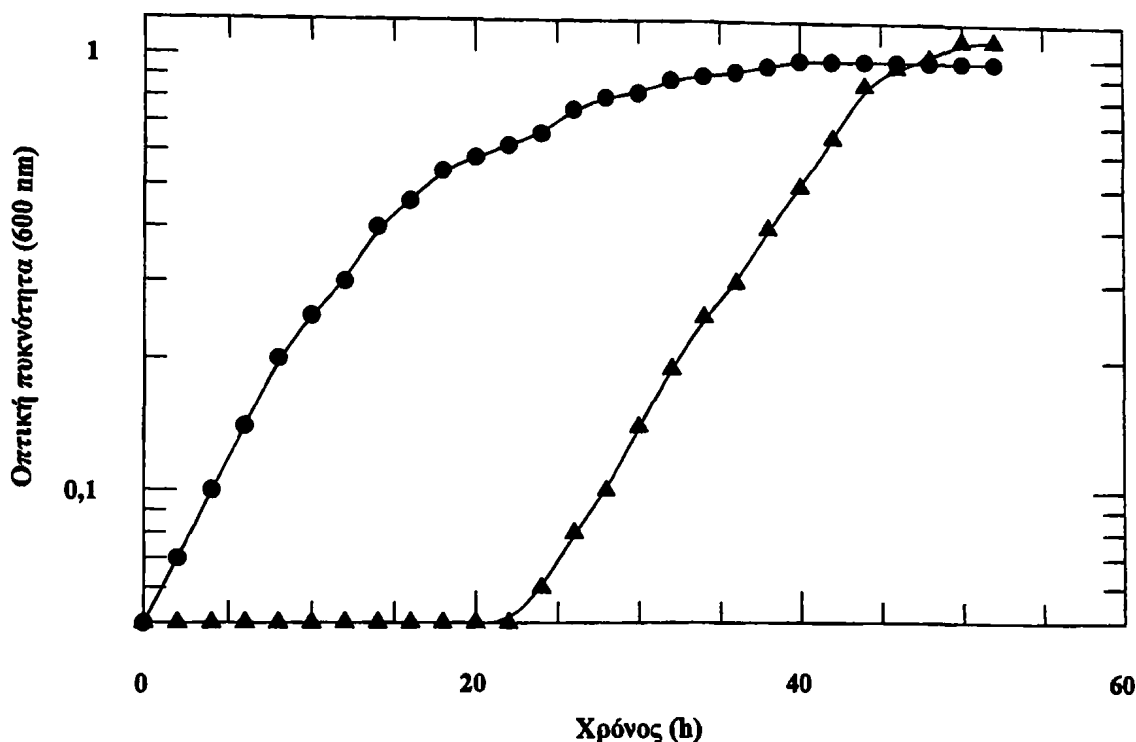
Από το παραπάνω Σχήμα φαίνεται ότι όταν κύτταρα CUIRif2 προεπωαστούν για 22 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% 2-δεοξυγλυκόζη, αναπτύσσονται αμέσως σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη. Άρα η 2-δεοξυγλυκόζη δίνει το ίδιο σήμα με την γλυκόζη, το σήμα δηλαδή της ενεργοποίησης του μηχανισμού ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Ο μηχανισμός αυτός στο στέλεχος CUIRif2 χρειάζεται τουλάχιστον 22 επώασης σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης ή του μη μεταβολίσιμου ανάλογου της για να ενεργοποιηθεί, πιθανότατα λόγω έλλειψης ή δυσλειτουργίας κάποιου ρυθμιστικού συστήματος που τον ενεργοποιεί.

4.12 Μελέτη της ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988

Στα πλαίσια της προσπάθειας ανίχνευσης του τρόπου με τον οποίο μπορεί να αποκατασταθεί ο φαινότυπος του φυσικού στελέχους (ATCC 10988) στο στέλεχος CU1Rif2, έγινε μελέτη της ανάπτυξης κύτταρων του μεταλλαγμένου στελέχους σε θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988.

Η ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 μελετήθηκε σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του φυσικού τύπου για 3 ώρες. Τα κύτταρα του φυσικού τύπου απομακρύνονται με φυγοκέντρηση, μετά την οποία το προεπωασμένο θρεπτικό μέσο διηθείται μέσω ηθμού διαμέτρου πόρων 0.2 μm. Το θρεπτικό αυτό μέσο επωάζεται στους 30°C για να ελεγχθεί εάν έχουν παραμείνει κύτταρα του φυσικού τύπου.

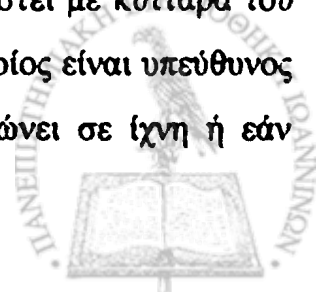
Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 33. Το στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται χωρίς περίοδο εφησυχασμού σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988.



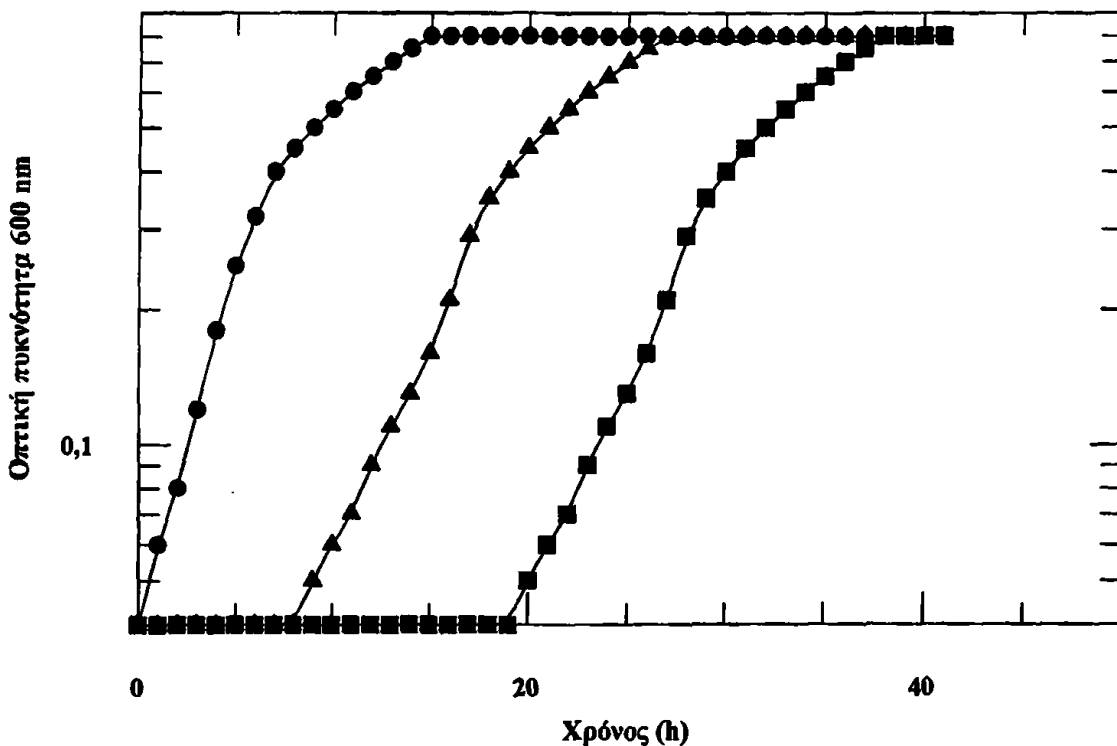
ΣΧΗΜΑ 33: Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 (●), ▲: αρνητικοί μάρτυρες: 1) Καλλιέργεια του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης 2) Καλλιέργεια του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988, στο οποίο έχει προστεθεί 8% γλυκόζη 3) Καλλιέργεια του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του στελέχους CU1Rif2.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα του φυσικού τύπου σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο. Ο παράγοντας αυτός δεν πρέπει να παράγεται σε καλλιέργεια κυττάρων του φυσικού τύπου που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης αλλά μόνο σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Επομένως, η σύνθεση ή η έκκριση του άγνωστου αυτού παράγοντα επάγεται από την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αραιωμένο θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του φυσικού τύπου, για να διαπιστωθεί εάν ο παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα στη γλυκόζη μπορεί να αναπληρώνει σε ίχνη ή εάν



υπάρχει κάποια κρίσιμη συγκέντρωση κάτω από την οποία η αναπλήρωση δεν είναι δυνατή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 34 και δείχνουν ότι, όταν το θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του φυσικού τύπου αραιωθεί 100 φορές, τα κύτταρα του CUIrif2 παραμένουν σε φάση εφησυχασμού για 22 ώρες. Άρα, ο παράγοντας αυτός μπορεί να αναπληρώσει όταν η συγκέντρωση του στο θρεπτικό μέσο ξεπερνά μια κρίσιμη τιμή.



ΣΧΗΜΑ 34: Ανάπτυξη κυττάρων του στελέχους CUIrif2 σε αραιωμένο θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988. Το θρεπτικό μέσο συμπληρώνεται με νέο, ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση γλυκόζης να είναι 10%
Αραιώσεις: 1:2 (●), 1:10 (▲) και 1:100 (■).

Τα επίπεδα της γλυκόζης στα προεπωασμένα θρεπτικά μέσα ελέγχονται με προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων πριν και μετά την επώαση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 18, τα επίπεδα της γλυκόζης μετά την προεπώαση παραμένουν στο 10%.

ΠΙΝΑΚΑΣ 18:

Προσδιορισμός γλυκόζης πριν και μετά την επώαση του στελέχους ATCC 10988 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη

Χρόνος επώασης (ώρες)	Συγκέντρωση γλυκόζης (%)
0	10.1 ± 0.2
3	10.1 ± 0.1
4	9.9 ± 0.2

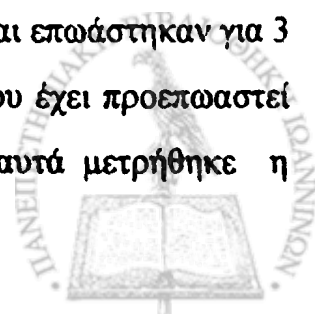
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα του στελέχους CUIRif2 δεν αναπτύσσονται στο προεπωασμένο μέσο λόγω μειωμένης συγκέντρωσης γλυκόζης, αλλά πιθανότατα λόγω κάποιας ουσίας η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα του φυσικού τύπου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα του CUIRif2.

4.13 Μέτρηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 μετά από ανάπτυξη ή επώαση σε θρεπτικό μέσο που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988

Για διερευνηθεί κατά πόσο το προεπωασμένο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης αναπληρώνει τη δραστηριότητα γλυκοκινάσης του στελέχους CUIRif2, έγινε το εξής πείραμα:

Κύτταρα CUIRif2 που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης, συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης (O.D.=0.35) και επώαστηκαν για 3 ώρες ή αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης που έχει προεπωαστεί με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988. Στα κύτταρα αυτά μετρήθηκε η



δραστικότητα γλυκοκινάσης.

Συγκριτικά, μετρήθηκε η δραστικότητα γλυκοκινάσης σε κύτταρα CU1Rif2, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης (O.D.= 0.35). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 19.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19:

Δραστικότητα της γλυκοκινάσης κυττάρων CU1Rif2 που έχουν αναπτυχθεί σε προεπωασμένο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης

	Δραστικότητα γλυκοκινάσης (nmol NADH/min mg πρωτεΐνης)
Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης	420 ± 20
Επώαση (3 ώρες) σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα ATCC 10988	490 ± 26
Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένου με κύτταρα ATCC 10988	490 ± 18

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων

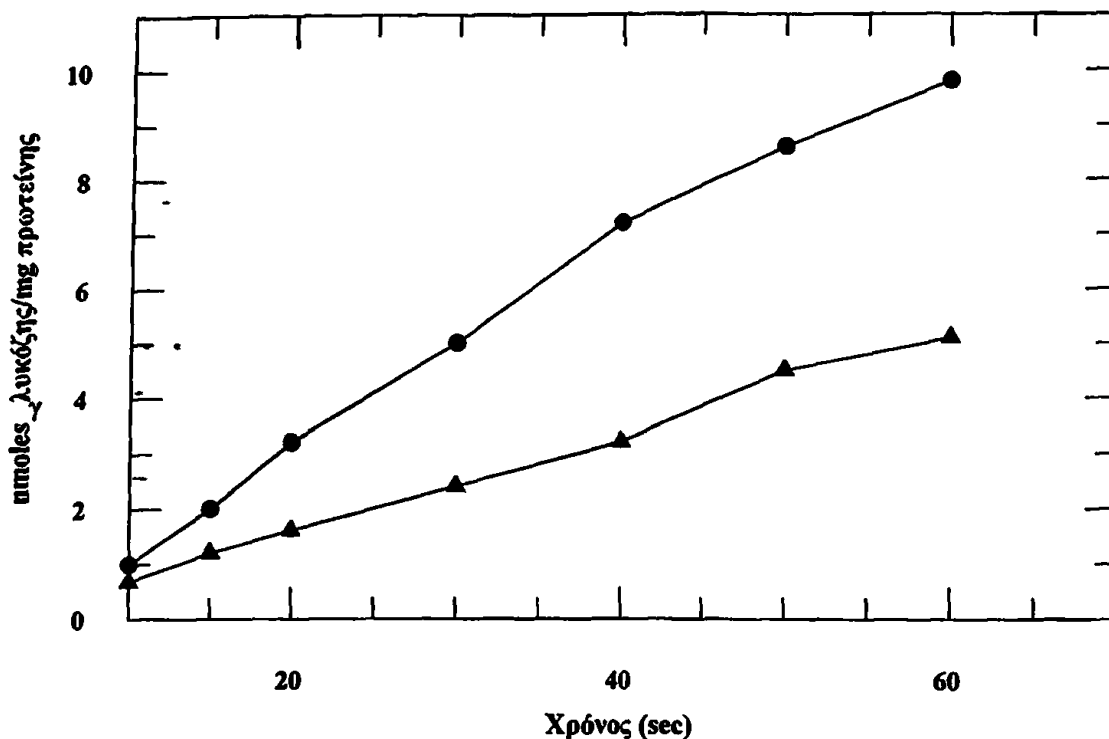
Όπως φαίνεται, η δραστικότητα γλυκοκινάσης δεν αναπληρώνεται όταν το στέλεχος CU1Rif2 επωαστεί ή αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα φυσικού τύπου. Η δραστικότητα γλυκοκινάσης παραμένει σταθερή όπως ακριβώς και στις περιπτώσεις ανάπτυξης ή επώασης κυττάρων CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Άρα, ο παράγοντας που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης καλλιέργειας κυττάρων φυσικού τύπου, ο οποίος είναι σε θέση να αναπληρώσει την ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν φαίνεται να αναπληρώνει τη δραστικότητα γλυκοκινάσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες

4.14 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 μετά από επώαση σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του στελέχους ATCC 10988

Για να διερευνηθεί κατά πόσο το προεπωασμένο μέσο 10% γλυκόζης αναπληρώνει την αρχική ταχύτητα πρόσληψης γλυκόζης στο CUIRif2, έγινε το εξής πείραμα:

Κύτταρα CUIRif2 που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης, συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης (O.D.=0.35), επώαστηκαν για 3 ώρες σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα ATCC 10988 και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης. Συγκριτικά, μετρήθηκε η αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης σε κύτταρα CUIRif2, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και συλλέχθηκαν στο μέσο της εκθετικής φάσης (O.D.= 0.35). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 35.





ΣΧΗΜΑ 35: Πρόσληψη γλυκόζης από κύτταρα CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης (●) και σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα ATCC 10988 (▲).

Από το Σχήμα φαίνεται ότι η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης κυττάρων CUIRif2 που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα ATCC 10988, μειώνεται σε σχέση με αυτή των κυττάρων του CUIRif2 ανεπτυγμένων σε θρεπτικό 2% γλυκόζης.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, όπως και την περίπτωση της γλυκοκινάσης, το προεπωασμένο με κύτταρα φυσικού τύπου θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης δεν αναπληρώνει την πρόσληψη της γλυκόζης κυττάρων CUIRif2 τα οποία είναι σε θέση να αναπτύσσονται εντός αυτού χωρίς να διέρχονται στην περίοδο εφησυχασμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενός τμήματος DNA το οποίο αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif² σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης

5.1 Κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA από το γονιδίωμα *Z. mobilis* CP₄ το οποίο αναπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif²

Η απομόνωση ενός τμήματος DNA από το γονιδίωμα του *Z. mobilis* CP₄ επιτεύχθηκε με τη μεταφορά γονιδιακής βιβλιοθήκης του CP₄ στο κοσμίδιο pLAFR5 σε κύτταρα του CU1Rif² και έλεγχο της ανάπτυξης τους σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κύτταρα του CU1Rif² παρουσιάζουν μια μεγάλη περίοδο εφησυχασμού όταν αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Τα ίδια κύτταρα δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη, για όσο χρονικό διάστημα και αν επωαστούν,

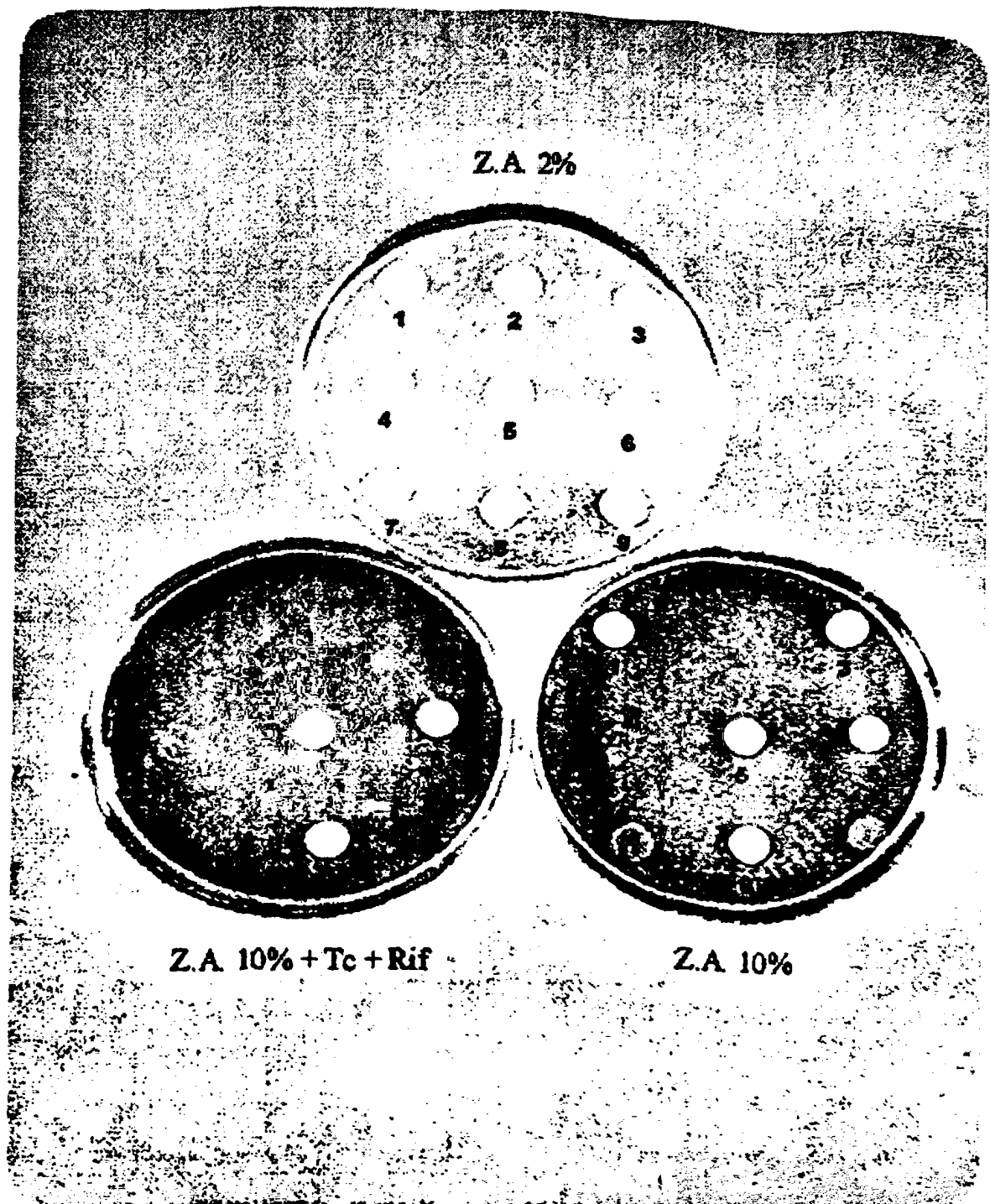


σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36).

Για την πραγματοποίηση της μεταφοράς της γονιδιακής βιβλιοθήκης έγιναν πειράματα επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης, ώστε να συγκεντρωθεί ο απαιτούμενος αριθμός μετασυζευγμένων αποικιών και να καλυφθεί αριθμητικά το μέγεθος του γονιδιώματος του βακτηρίου *Z. mobilis*, το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι 2250 kb (Swings and Delay 1977). Με δεδομένο το μέγεθος των ενθεμάτων του χρωμοσωμικού DNA της γονιδιακής βιβλιοθήκης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pLAFR5, όλο το γονιδίωμα του βακτηρίου *Z. mobilis* καλύπτεται με 500 κλώνους.

Η επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη πραγματοποιήθηκε μεταξύ κυττάρων ED8767 μετασηματισμένων με κλώνους από την γονιδιακή βιβλιοθήκη pLAFR5, τα οποία είχαν αναμιχθεί με κύτταρα ED876/pRK2013, και κύτταρων του στελέχους CUIRif2 του βακτηρίου *Z. mobilis*. Η επιλογή των μετασυζευγμένων αποικιών έγινε σε τρυβλία Zymo Agar στα οποία είχαν προστεθεί 40 μg/ml τετρακυκλίνης και 20μg/ml ριφαμπικίνης. Η ανάπτυξη των αποικιών γίνεται ορατή μετά από 5-7 μέρες. Η παραπάνω διαδικασία, οδήγησε τελικά στην απομόνωση 600 μετασυζευγμένων αποικιών ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη.

Οι 600 αυτές αποικίες μεταφέρθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης και δύο από αυτές παρουσίασαν ανάπτυξη. Οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν με διαδοχικές μεταφορές για απομόνωση ενός κυττάρου, και επανεξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξης τους σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 36: Ανάπτυξη των στελεχών του βακτηρίου *Z. mobilis* σε στερεές καλλιέργειες: 1. ATCC 10988, 2. CU1Rif2, 3. ATCC 10988/pLAFR5, 4. CU1Rif2/pLAFR5, 5. CU1Rif2/pLAFR551, 6. CU1Rif2/pLAFR545, 7. CU1Rif2/pLAFR531, 8. CU1Rif2/pLAFR533, 9. CU1Rif2/pLAFR5g1f (Πίνακας 4 στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι).

Z.A. 2% : Zymo Agar που περιέχει 2% γλυκόζη

Z.A. 10% : Zymo Agar που περιέχει 10% γλυκόζη

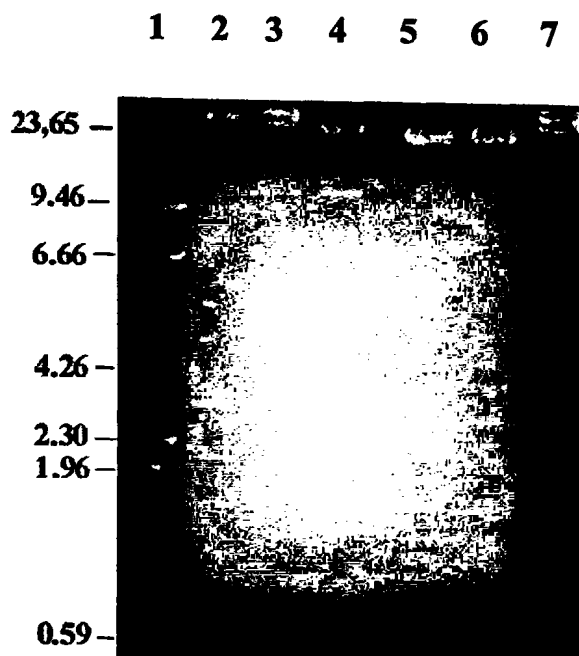
Z.A. 10% + Tc + Rif: Zymo Agar που περιέχει 10% γλυκόζη, τετρακυκλίνη (40 µg/ml) και ριφαμικίνη (20 µg/ml).



Στη συνέχεια από τις δύο ανθεκτικές σε 10% γλυκόζη μετασυζευγμένες αποικίες, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για επαναμετασχηματισμό του στελέχους *E. coli* DH5α. Οι επαναμετασχηματισμένες αυτές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν ως δότες σε νέα βακτηριακή σύζευξη με δέκτη το στέλεχος CUIRif2. Όλες οι μετασυζευγμένες αποικίες που απομονώθηκαν από τη δεύτερη βακτηριακή σύζευξη ήταν ανθεκτικές σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιείχε 10% γλυκόζη. Στη συνέχεια, κύτταρα από τις μετασυζευγμένες αποικίες CUIRif2 οι οποίες ήταν ανθεκτικές σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, αναπτύχθηκαν υπό μη επιλεκτικές συνθήκες για 100 περίπου κυτταρικές διαιρέσεις. Μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων σε τρυβλία Z.A. και αντιγραφική τους μεταφορά σε τρυβλία Z.A. + Tc (40 μg/ml), απομονώθηκαν κύτταρα τα οποία δεν ήταν πλέον ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη. Τα κύτταρα αυτά είχαν χάσει και την ιδιότητα ανθεκτικότητας σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι κλώνοι που απομονώθηκαν από την γονιδιακή βιβλιοθήκη του στελέχους CP₄, είναι υπεύθυνοι για την αποκατάσταση της ανθεκτικότητας του στελέχους CUIRif2 σε 10% γλυκόζη. Οι υποθετικοί κλώνοι απομονώθηκαν από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* και ονομάστηκαν pLAFR554 και pLAFR557.

5.2 Περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων pLAFR554 και pLAFR557

Η πρώτη προσέγγιση εύρεσης του μεγέθους και της ομολογίας των δύο κλώνων που αναπληρώνουν την ευαισθησία του CUIRif2 σε 10% γλυκόζη πραγματοποιήθηκε με περιοριστική ανάλυση που φαίνεται στο Σχήμα 37.



ΣΧΗΜΑ 37: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pLAFR557 και pLAFR554.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pLAFR557 / *Eco*RI
3. pLAFR554 / *Eco*RI
4. pLAFR557 / *Hind*III
5. pLAFR554 / *Hind*III
6. pLAFR557 / *Pst*I
7. pLAFR554 / *Pst*I

Η περιοριστική ανάλυση με τις ενδονουκλεάσες *Eco*RI, *Hind*III και *Pst*I, έδειξε ότι τα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια διαφέρουν μεταξύ τους αλλά η πέψη *Hind*III δίνει πέντε κοινές ζώνες.

Τα μεγέθη των δύο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων υπολογίστηκαν με βάση την περιοριστική ανάλυση *Hind*III (Σχήμα 37) και φαίνονται στον Πίνακα 20.

ΠΙΝΑΚΑΣ 20:

Υπολογισμός μεγέθους ενθέματος στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pLAFR557 και pLAFR554

ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	Μέγεθος περιοριστικών τμημάτων μετά από πέψη <i>Hind</i> III (kb)	Συνολικό μέγεθος (kb)	Μέγεθος ενθέματος (kb)
pLAFR557	25, 9.5, 3.7, 1.8, 1.6, 1.2, 0.9, 0.8	44.5	23.0
pLAFR554	23, 5.6, 3.4, 2.4, 1.8, 1.6, 1.2, 0.9, 0.8	40.7	19.2

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια απομόνωσης μικρότερων περιοριστικών τμημάτων τα οποία να αναπληρώνουν την ευαισθησία του CUIRif2 σε 10% γλυκόζη. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Πέψη των αρχικών κλώνων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
2. Υποκλωνοποίηση των τμημάτων της πέψης σε φορέα pLAFR5.
3. Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* DH5α με τα νέα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pLAFR5.
4. Μεταφορά των νέων πλασμιδίων σε κύτταρα CUIRif2 μέσω επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης.
5. Επιλογή μετασυζευγμένων αποικιών CUIRif2, οι οποίες είναι ανθεκτικές σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (δοκιμή λειτουργικότητας Σχήμα 36).
6. Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις μετασυζευγμένες αποικίες.
7. Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* DH5α με το νέο πλασμιδιακό DNA.

8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις νέες μετασχηματισμένες αποικίες *E. coli* DH5α.

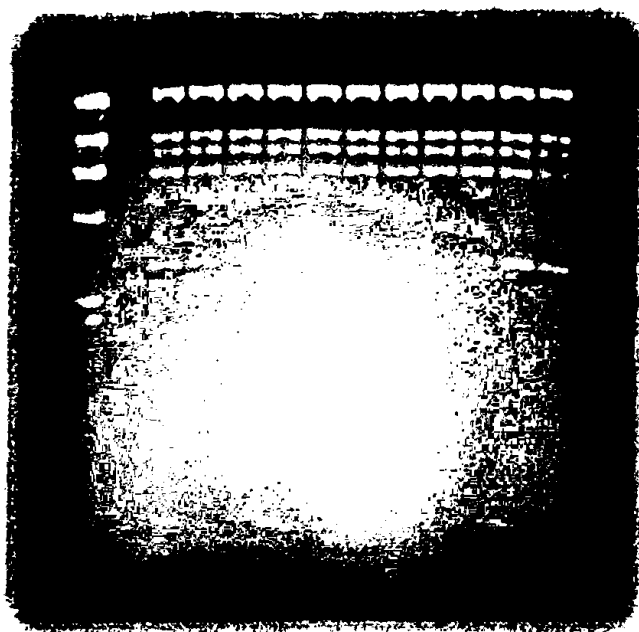
9. Πέψη του DNA και επιβεβαίωση του τμήματος που έχει υποκλωνοποιηθεί.

5.3 Υποκλωνοποίηση ενός μικρότερου λειτουργικού τμήματος μεγέθους 9.5 kb από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR557

Στην προσπάθεια απομόνωσης ενός μικρότερου σε μέγεθος τμήματος, που να αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, έγιναν διάφορες υποκλωνοποιήσεις περιοριστικών τμημάτων τα οποία προέρχονταν από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες: *Hind*III, *Eco*RI, *Pst*I και *Bg*II. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR557 υπέστη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bg*II, όπως φαίνεται στο Σχήμα 38. Η πρώτη ζώνη που φαίνεται στο πήγμα του Σχήματος 38, μεγέθους 31 kb (21.5 kb ο πλασμιδιακός φορέας pLAFR5 + 9.5 kb το ένθεμα του χρωμοσωμικού DNA), απομονώθηκε και στο DNA που προέκυψε έγινε επανακυκλοποίηση, χρησιμοποιώντας λιγάση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Το επανακυκλοποιημένο μόριο χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό στο βακτήριο *E. coli* και στη συνέχεια βακτηριακή σύζευξη στο βακτήριο *Z. mobilis*. Τα μετασυζευγμένα κύτταρα μπορούσαν να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

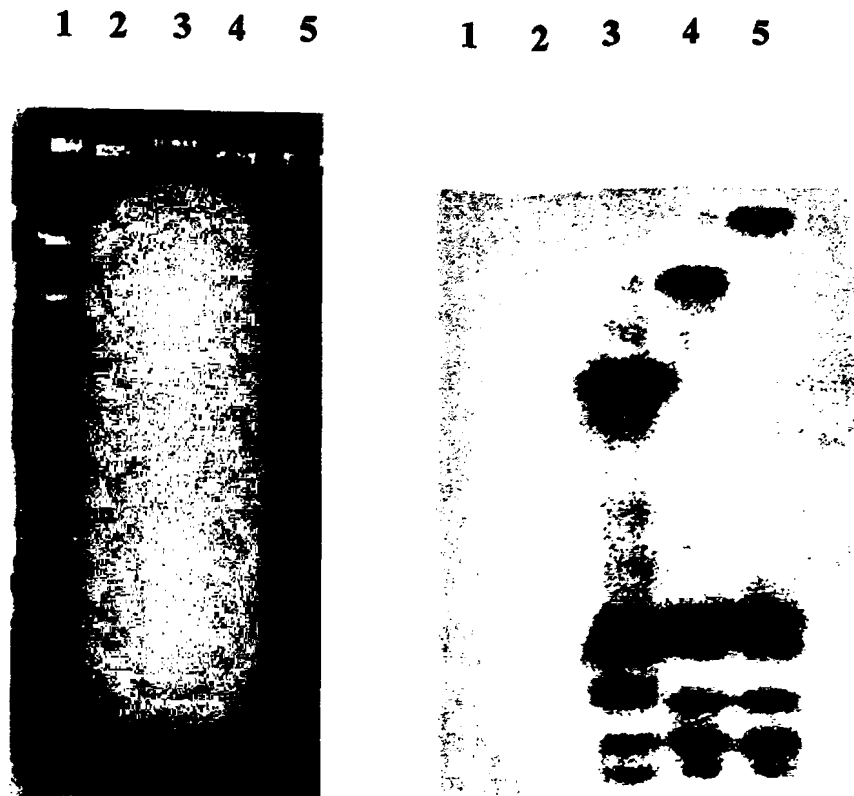
Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκε ένας υποκλώνος από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR557 ο οποίος βρέθηκε ότι αναπλήρωνε την ευαισθησία του CUIRif2 σε 10% γλυκόζη. Ο υποκλώνος αυτός ονομάστηκε pLAFR595.





ΣΧΗΜΑ 38: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR557 με *Bgl*III. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται το λ-DNA / *Hind*III.

Προκειμένου να υπολογιστεί το μέγεθος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR595, έγινε περιοριστική πέψη με *Hind*III και υβριδισμός κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο τον υποκλώνο μεγέθους 9.5 kb σημασμένο με dig-11-dUTP. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 39 και στον Πίνακα 21.



ΣΧΗΜΑ 39: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης με *Hind*III και υβριδισμός κατά Southern με dig-11-dUTP-υποκλώνο μεγέθους 9.5 kb των πλασμιδίων pLAFR554, pLAFR557 και pLAFR595.

Διαδρομές:

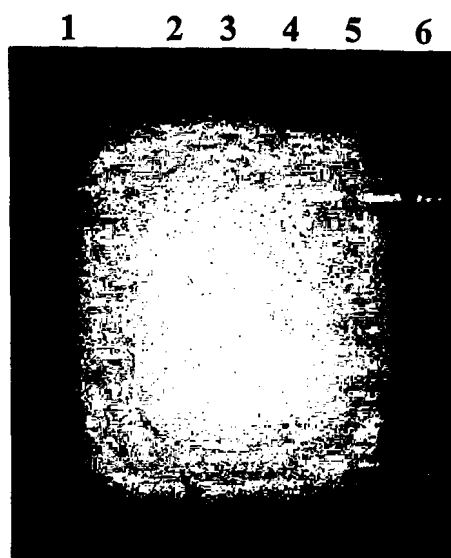
1. λ-DNA / *Hind*III
2. pLAFR5 / *Hind*III
3. pLAFR554 / *Hind*III
4. pLAFR557 / *Hind*III
5. pLAFR595 / *Hind*III

Από το παραπάνω Σχήμα φαίνεται ότι ο υποκλώνος μεγέθους 9.5 kb υβριδίζει με τους δύο αρχικά απομονωμένους κλώνους και μάλιστα περιέχει και τις πέντε κοινές *Hind*III ζώνες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 21:**Υπολογισμός μεγέθους ενθέματος στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR595**

ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	Μέγεθος περιοριστικών τμημάτων μετά από πέψη <i>Hind</i> III (kb)	Συνολικό μέγεθος (kb)	Μέγεθος ενθέματος (kb)
pLAFR595	24.7, 1.8, 1.6, 1.2, 0.9, 0.8	31	9.5

Στη συνέχεια από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR595 απομονώθηκαν και υποκλωνοποιήθηκαν χωριστά οι πέντε *Hind*III ζώνες στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 (Σχήμα 40). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν ονομάστηκαν pLAFR518 (περιέχει την *Hind*III ζώνη μεγέθους 1.8 kb), pLAFR516 (περιέχει την *Hind*III ζώνη μεγέθους 1.6 kb), pLAFR512 (περιέχει την *Hind*III ζώνη μεγέθους 1.2 kb), pLAFR509 (περιέχει την *Hind*III ζώνη μεγέθους 0.9 kb) και pLAFR508 (περιέχει την *Hind*III ζώνη μεγέθους 0.8 kb). Εξέταση των νέων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έδειξε ότι κανένα από αυτά δεν αναπλήρωνε την ευαισθησία του CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 40: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pLAFR5 που περιέχουν τμήματα *Hind*III μετά από περιοριστική πέψη με *Hind*III.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pLAFR518 / *Hind*III
3. pLAFR516 / *Hind*III
4. pLAFR512 / *Hind*III
5. pLAFR509 / *Hind*III
6. pLAFR508 / *Hind*III

5.4 Φυσική χαρτογράφηση του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb

Ο υποκλώνος μεγέθους 9.5 kb μπορεί να απομονωθεί από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR595 με διπλή περιοριστική πέψη *Pst*I-*Bgl*II, όπως φαίνεται στο Σχήμα 41.

Η ζώνη μεγέθους 9.5 kb του Σχήματος 41 απομονώθηκε και χαρτογραφήθηκε με περιοριστική ανάλυση απλών και διπλών πέψεων καθώς

και υβριδισμό κατά Southern. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 42, ενώ στον Πίνακα 22 δίνονται τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων που προκύπτουν και στο Σχήμα 43 φαίνεται ο περιοριστικός χάρτης του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.

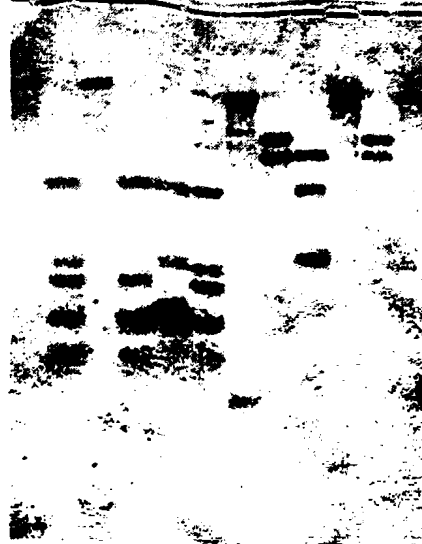


ΣΧΗΜΑ 41: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης περιοριστικής πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR595.

Διαδρομές:

1. pLAFR595 / *Bgl*III
2. pLAFR595 / *Pst*I-*Bgl*III
3. pLAFR595 / *Eco*RI
4. pLAFR595 / *Eco*RI-*Pst*I
5. pLAFR595 / *Pst*I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



ΣΧΗΜΑ 42: Υβριδισμός κατά Southern περιοριστικής πέψης του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο τον dig-11-dUTP σημασμένο υποκλώνο.

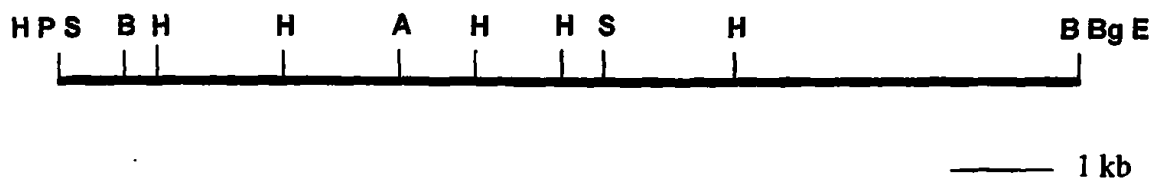
Διαδρομές:

- | | |
|--|---|
| 1. Υποκλώνος 9.5 kb / άκοπο | 7. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Bam</i> HI |
| 2. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III | 8. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Sal</i> I- <i>Bgl</i> II |
| 3. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Eco</i> RI | 9. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Sal</i> I- <i>Apa</i> I |
| 4. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Apa</i> I- <i>Hind</i> III | 10. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Apa</i> I |
| 5. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Hind</i> III- <i>Sal</i> I | 11. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Sal</i> I |
| 6. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Hind</i> III | 12. Υποκλώνος 9.5 kb / <i>Bgl</i> II |

ΠΙΝΑΚΑΣ 22:

Περιοριστική ανάλυση του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb

Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Μέγεθος περιοριστικών τμημάτων (kb)
Άκοπο	9.5
<i>Bam</i> HI	8.9, 0.6
<i>Bg</i> II	9.5
<i>Sal</i> II	5.1, 4.4
<i>Apa</i> I	6.3, 3.1
<i>Sal</i> II- <i>Apa</i> I	4.4, 3.1, 2.0
<i>Sal</i> II- <i>Bg</i> II	5.1, 4.4
<i>Hind</i> III	3.2, 1.8, 1.6, 1.2, 0.9, 0.8
<i>Sal</i> II- <i>Hind</i> III	3.2, 1.8, 1.2, 1.2, 0.9, 0.8, 0.4
<i>Apa</i> I- <i>Hind</i> III	3.2, 1.6, 1.2, 1.0, 0.9, 0.8, 0.8
<i>Eco</i> RI	9.5
<i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III	3.2, 1.8, 1.6, 1.2, 0.9, 0.8

**ΣΧΗΜΑ 43:** Περιοριστικός χάρτης του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.A: *Apa*I B: *Bam*HI Bg: *Bg*II H: *Hind*III P: *Pst*I S: *Sal*II

5.5 Υποκλωνοποίηση μικρότερων περιοριστικών τμημάτων του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb

Η υποκλωνοποίηση μικρότερων τμημάτων του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb έγινε ακολουθώντας τη μεθοδολογία που αναφέρεται παραπάνω (Σελ. 221). Η διαδικασία των υποκλωνοποιήσεων φαίνεται στο Σχήμα 47.

Αρχικά, υποκλωνοποιήθηκε το περιοριστικό τμήμα *Sa*I μεγέθους 5.1 kb στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5, χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα το πλασμίδιο pUC18 (pUC1851, Πίνακας 4, Σχήμα 47). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προέκυψε ονομάστηκε pLAFR551 (Πίνακας 4, Σχήμα 47) και βρέθηκε ότι αναπληρώνει την ευαισθησία του CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36).

Παράλληλα, υποκλωνοποιήθηκε το περιοριστικό τμήμα *Bam*HI μεγέθους 8.9 kb στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προέκυψε ονομάστηκε pLAFR589 (Πίνακας 4, Σχήμα 47) και βρέθηκε ότι αναπληρώνει την ευαισθησία του CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Στο Σχήμα 44 φαίνεται η περιοριστική πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC1851, pLAFR551 και pLAFR589.





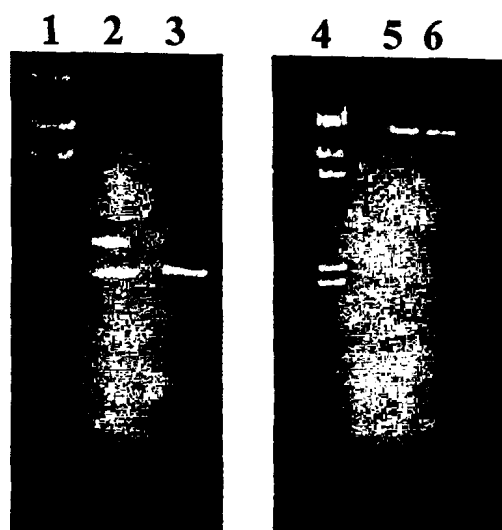
ΣΧΗΜΑ 44: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης περιοριστικής πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC1851, pLAFR551 και pLAFR589.

Διαδρομές

1. λ- DNA / *Hind*III
2. pLAFR551 / *Eco*RI-*Pst*I
3. pLAFR589 / *Bam*HI
4. pUC1851 / *Sal*I

Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν τα περιοριστικά τμήματα *Apa*I-*Sal*I μεγέθους 3.1 και 2.0 kb στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5, χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα το πλασμίδιο pUC18 (pUC1831 και pUC1820, Πίνακας 4, Σχήμα 47). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν ονομάστηκαν pLAFR531 και pLAFR520 αντίστοιχα (Πίνακας 4, Σχήμα 47) και βρέθηκε ότι δεν αναπλήρωναν την ευαισθησία του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36).

Η περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων pUC1831, pUC1820, pLAFR531 και pLAFR520, φαίνεται στο Σχήμα 45.

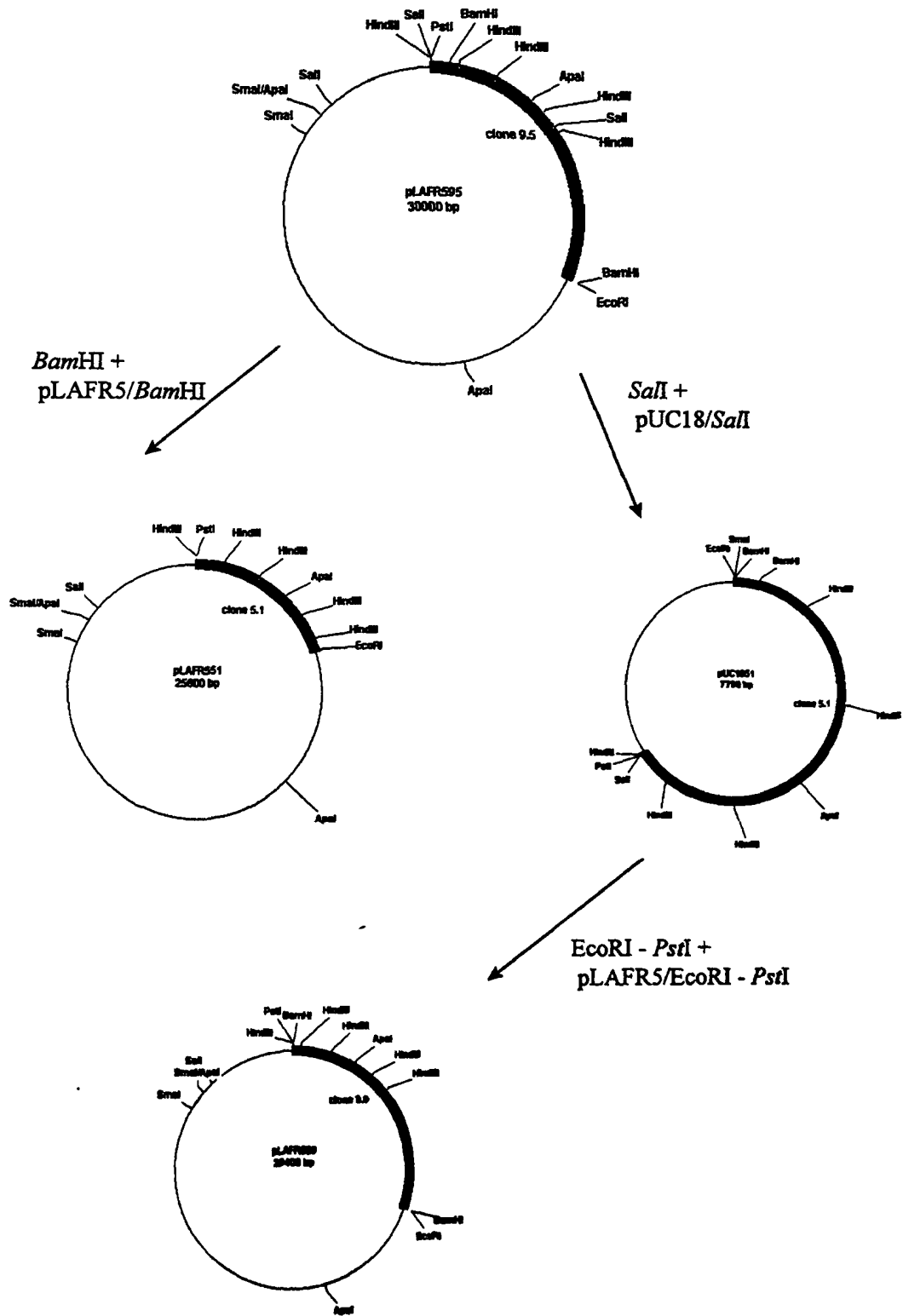


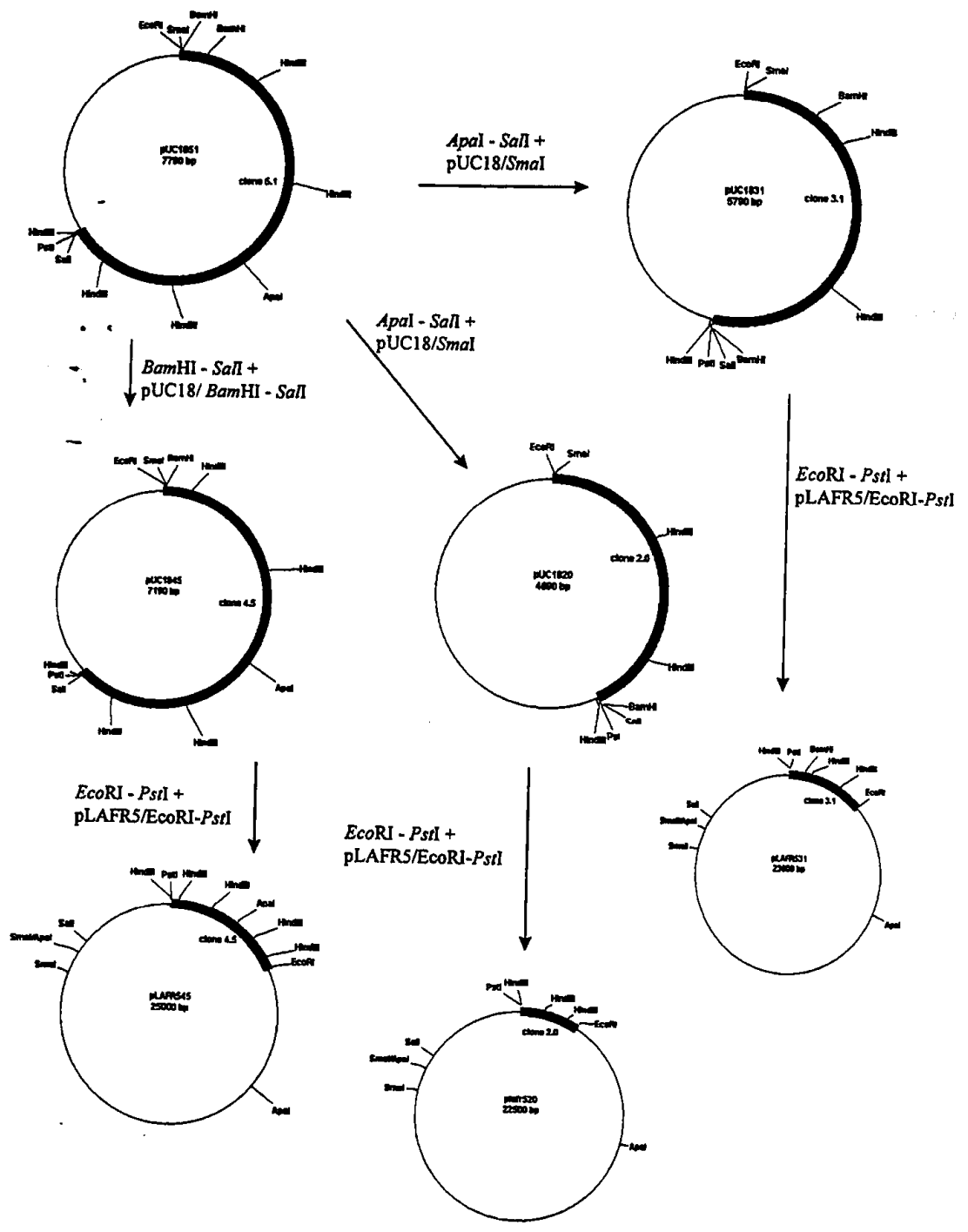
ΣΧΗΜΑ 45: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των πλασμιδίων pUC1831, pUC1820, pLAFR531 και pLAFR520.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pUC1831 / *Bam*HI-*Sal*I
3. pUC1820 / *Bam*HI-*Sal*I
4. λ-DNA / *Hind*III
5. pLAFR531 / *Eco*RI-*Pst*I
6. pLAFR520 / *Eco*RI-*Pst*I

Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε το περιοριστικό τμήμα *Bam*HI-*Sal*I, μεγέθους 4.5 kb, στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα το pUC18 (pUC1845, Πίνακας 4, Σχήμα 47). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προέκυψε ονομάστηκε pLAFR545 (Πίνακας 4, Σχήμα 47) και βρέθηκε ότι αναπληρώνει την ευαισθησία του CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 34). Η περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων pUC1845 και pLAFR545 φαίνεται στο Σχήμα 46.





ΣΧΗΜΑ 47: Διαδικασία υποκλωνοποιήσεων μικρότερων περιοριστικών τμημάτων του υποκλώνου μεγέθους 9.5 kb.

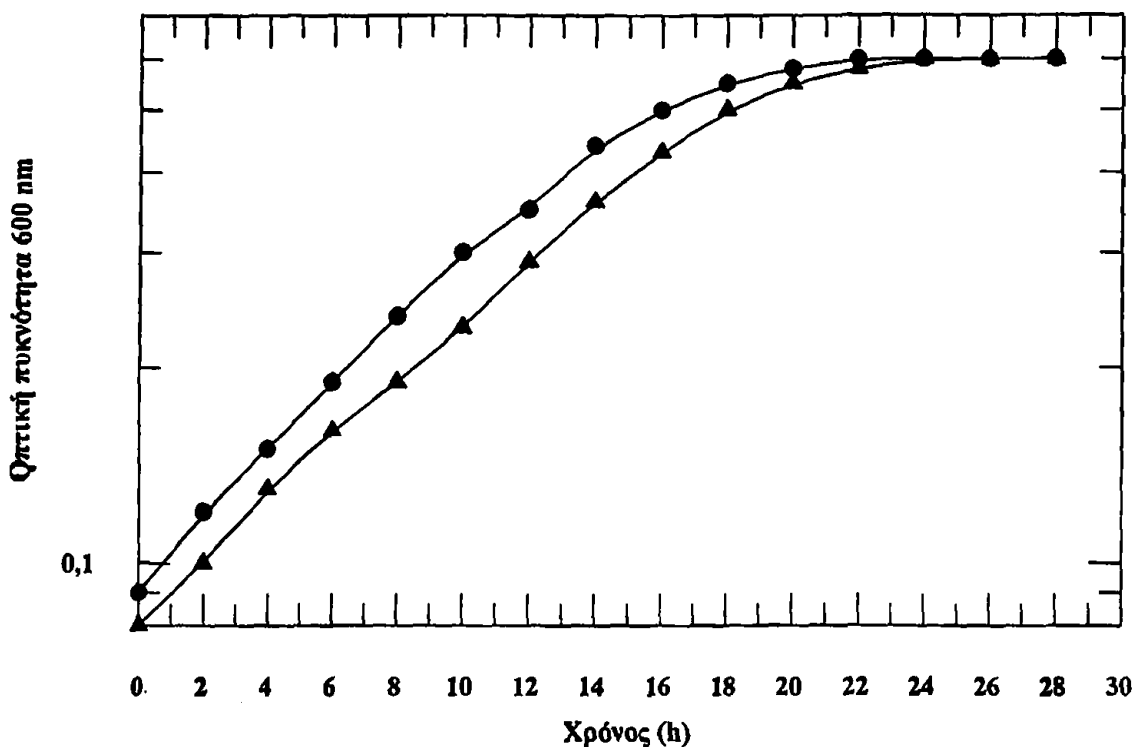


Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, το μικρότερο λειτουργικό τμήμα που ήταν δυνατό να υποκλωνοποιηθεί ήταν το τμήμα *Bam*HI-*Sal*I των 4.5 Kb. Έτσι στη συνέχεια το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Ακόμα, στο τμήμα των 4.5 kb έγινε ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων. Τέλος, έγινε προσπάθεια απομόνωσης του ίδιου κλώνου από μια γονιδιακή τράπεζα του στελέχους ATCC 10988, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο το λειτουργικό τμήμα των 4.5 kb σημασμένο με dig-11-dUTP.



5.6 Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 48 μετασυζευγμένα κύτταρα CU1Rif2/pLAFR545 αναπτύσσονται χωρίς περίοδο εφησυχασμού σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 48: Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

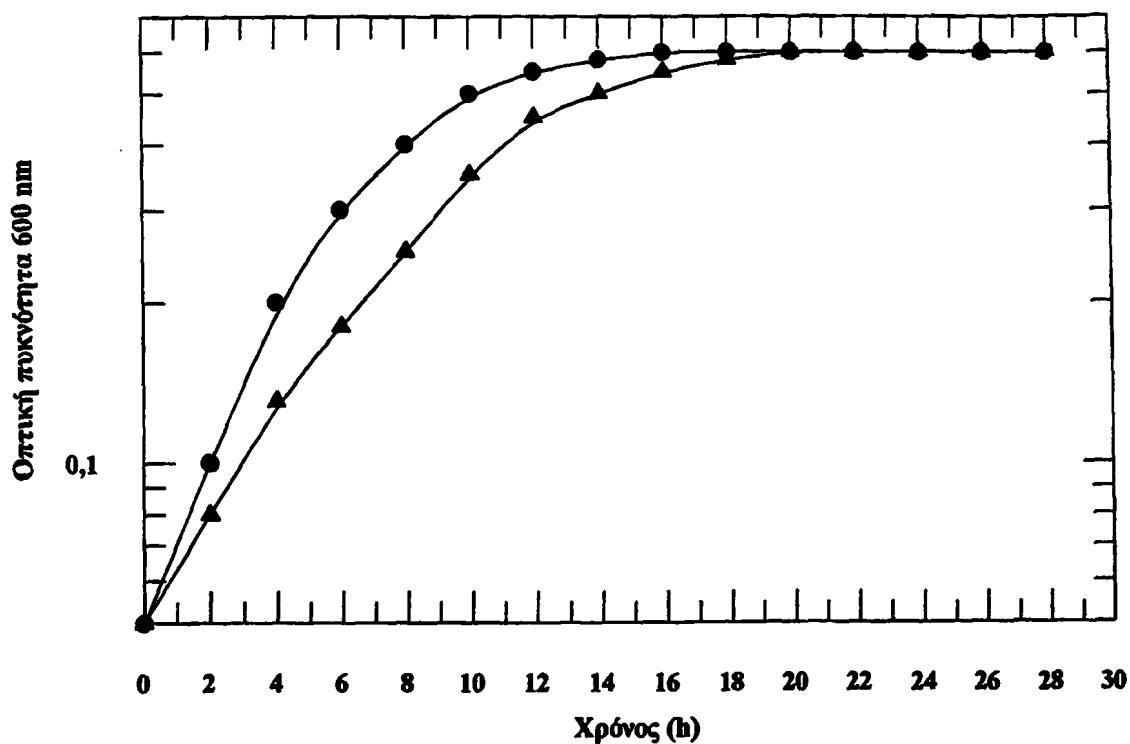
Το αποτέλεσμα αυτό επαναλήφθηκε και με τους υπόλοιπους λειτουργικούς κλώνους.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, αναπληρώνει επίσης και την άμεση ανάπτυξη του σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Ακόμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 49 το στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545



αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 8% 2-δεοξυγλυκόζη, όπως ακριβώς και το στέλεχος ATCC 10988.



ΣΧΗΜΑ 49: Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη (●) και 2% γλυκόζη + 8% 2-δεοξυγλυκόζη (▲).

5.7 Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

Όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.4.1 το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παρουσιάζει μειωμένο ποσοστό φωσφατιδύλοαιθανολαμίνης στη μεμβράνη του σε σχέση με το πατρικό του στέλεχος. Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η ποσοστιαία σύσταση φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545, ώστε να ελεγχθεί εάν ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αναπληρώνει και την μειωμένη περιεκτικότητα φωσφατιδύλοαιθανολαμίνης.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 23.

ΠΙΝΑΚΑΣ 23:

Ποσοστιαία περιεκτικότητα φωσφολιπιδίων (% των ολικών) του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545

	CU1Rif2/pLAFR545
Πολικά-φωσφολιπίδια (κηλίδες 1,2,3,4)	25.0 ± 2.7
φωσφατιδύλοσερίνη (PS) + λυσο-φωσφατιδύλο-αιθανολαμίνη (lyso-PE) (κηλίδα 5)	3.2 ± 0.2
φωσφατιδύλοχολίνη (PC) (κηλίδα 6)	8.2 ± 1.9
φωσφατιδύλοαιθανολαμίνη (PE) (κηλίδα 7)	46.2 ± 2.9
φωσφατιδύλογλυκερόλη (PG) (8)	16.9 ± 5.5
ολικός φώσφορος / mg κυττάρων	1.4 ± 0.1

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος δύο διαφορετικών μετρήσεων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω Πίνακα το ποσοστό της φωσφατιδύλοαιθανολαμίνης στη μεμβράνη του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 είναι το ίδιο περίπου με αυτό του στελέχους CU1Rif2 (βλέπε Πίνακα 7). Ο κλώνος δηλαδή που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν αναπληρώνει και το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδύλοαιθανολαμίνης. Η μείωση λοιπόν της

φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης του στελέχους CU1Rif2, δεν φαίνεται να σχετίζεται με την μειωμένη ανθεκτικότητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

5.8 Μελέτη της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545

5.8.1 Μέτρηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

Στο κεφάλαιο 4.5.1 αναφέρεται ότι η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης στο στέλεχος ATCC 10988 αυξάνεται όταν αυξηθεί η γλυκόζη στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος όμως έχει χάσει αυτή την ιδιότητα.. Στο παρόν κεφάλαιο, μετρήθηκε η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545, σε κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2%, 5% και 10% γλυκόζη αντίστοιχα. Ακόμα μετρήθηκε η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης σε κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό 2% γλυκόζης και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης 3 ώρες.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 24 και στο Σχήμα 50.

ΠΙΝΑΚΑΣ 24:

Δραστηριότητα γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

Γλυκόζη %	Δραστηριότητα (nmole NADH /min mg πρωτεΐνης)
2	520 ± 15
5	710 ± 14
10*	910 ± 14

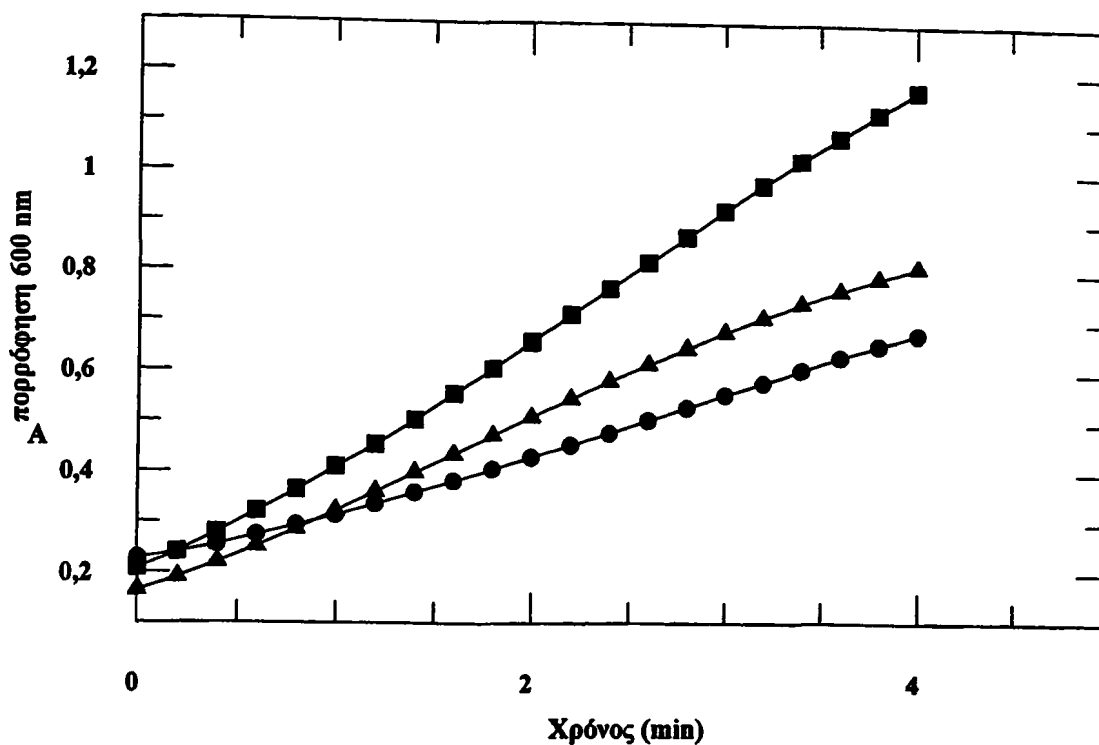
Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα

* Ανάπτυξη ή επώαση των κυττάρων για 3 ώρες.



Από τον παραπάνω Πίνακα, φαίνεται ότι η δραστικότητα της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 αυξάνεται 1.5 φορά περίπου όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί από σε 5% και γίνεται διπλάσια όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί σε 10%. Το στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545 δηλαδή συμπεριφέρεται όπως ο φυσικός τύπος ATCC 10988. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαναλήφθηκαν, χρησιμοποιώντας και όλους τους άλλους λειτουργικούς κλώνους.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αναπληρώνει και τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης του. Η αύξηση της δραστικότητας της γλυκοκινάσης του βακτηρίου *Z. mobilis* πρέπει να έχει τουλάχιστον έμμεση σχέση με την ανθεκτικότητα του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.



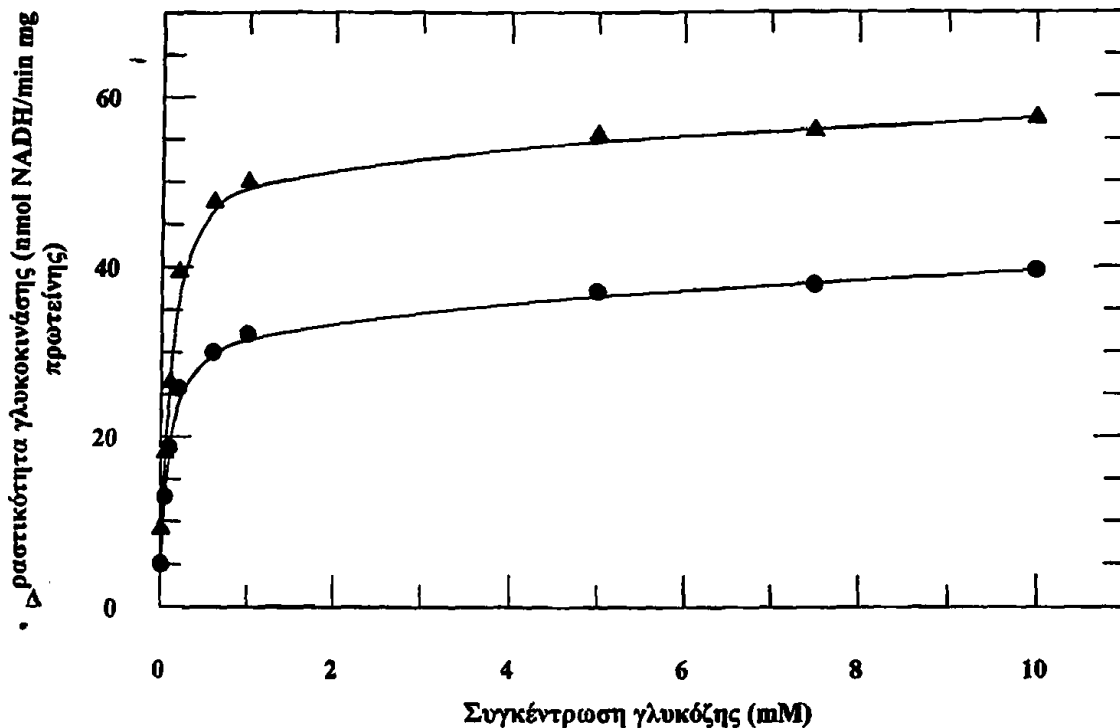
ΣΧΗΜΑ 50: Αύξηση της απορρόφησης στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο (χρησιμοποιώντας περίσσεια αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και ως υπόστρωμα γλυκόζη), σε κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●), 5% (▲) και 10% (■) γλυκόζη.

5.8.2 Κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

Η κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης έγινε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, σε κύτταρα CU1Rif2/pLAFR545 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα.

Η γλυκοκινάση του ανασυνδυασμένου στελέχους ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις (ανάπτυξη σε 2% και 5% γλυκόζη, Σχήμα 51), με τη διαφορά ότι στα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό

μέσο 5% γλυκόζης-όπως ήταν αναμενόμενο-οι δραστηρότητες της γλυκοκινάσης είναι μεγαλύτερες από αυτές των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης.



ΣΧΗΜΑ 51: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στη δραστηρότητα γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545, μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.

Μετά από επεξεργασία σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, εφοδιασμένο με το κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991), υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι K_m και V_{max} της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 25. Ακόμα στον Πίνακα 25 φαίνεται και η τιμή της κινητικής παραμέτρου k_{cat} για το στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545.

ΠΙΝΑΚΑΣ 25:

Κινητικές παράμετροι της γλυκοκινάσης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545

Γλυκόζη %	K_m (mM γλυκόζης)	V_{max}	k_{cat} (s^{-1})
2	0.107 ± 0.005	540 ± 28	261
5	0.116 ± 0.009	750 ± 35	263

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα

Όπως φαίνεται οι τιμές των κινητικών παραμέτρων K_m και k_{cat} είναι παρόμοιες με αυτές των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 και για τις δύο συγκεντρώσεις γλυκόζης (βλέπε Πίνακα 13).

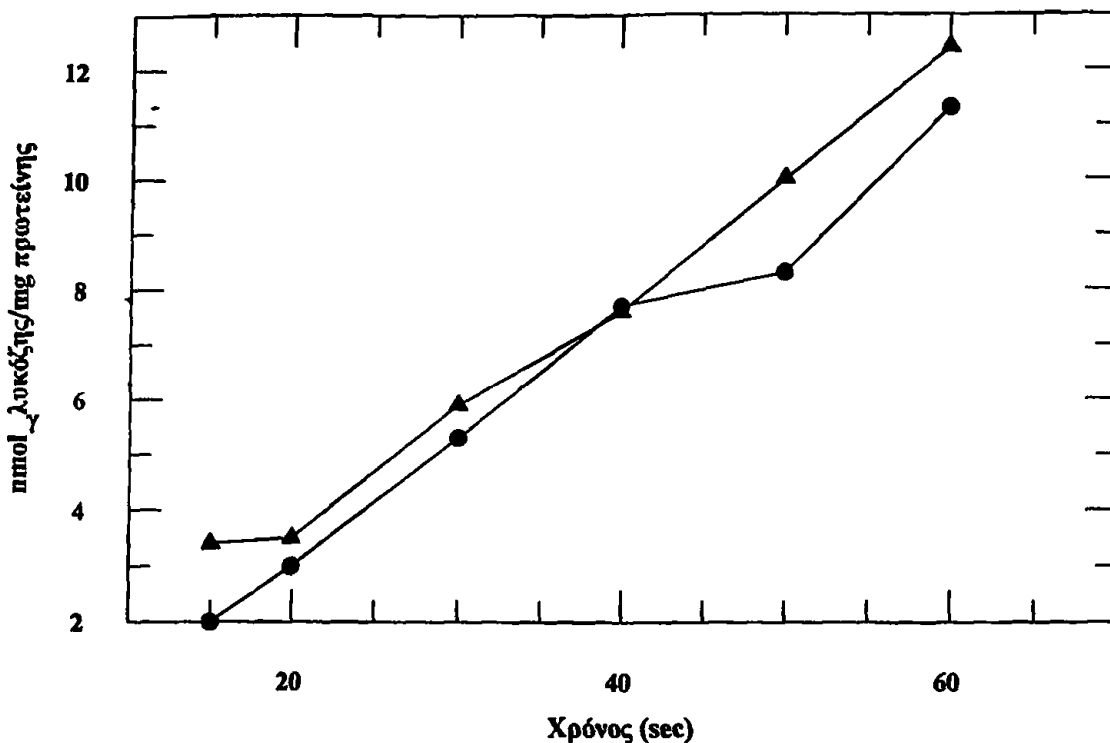
5.9 Μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

5.9.1 Μέτρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFR545

Στο κεφάλαιο 4.9.1 αναφέρθηκε ότι η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης του στελέχους ATCC 10988 παραμένει σταθερή (ή αυξάνεται λίγο) όταν τα κύτταρα επωαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη. Αντίθετα, η αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 μειώνεται σημαντικά όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί από 2% σε 10%.

Στο παρόν κεφάλαιο υπολογίστηκε η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης σε κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR545, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και σε κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης και στη συνέχεια μεταφερθεί σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης για 3 ώρες.





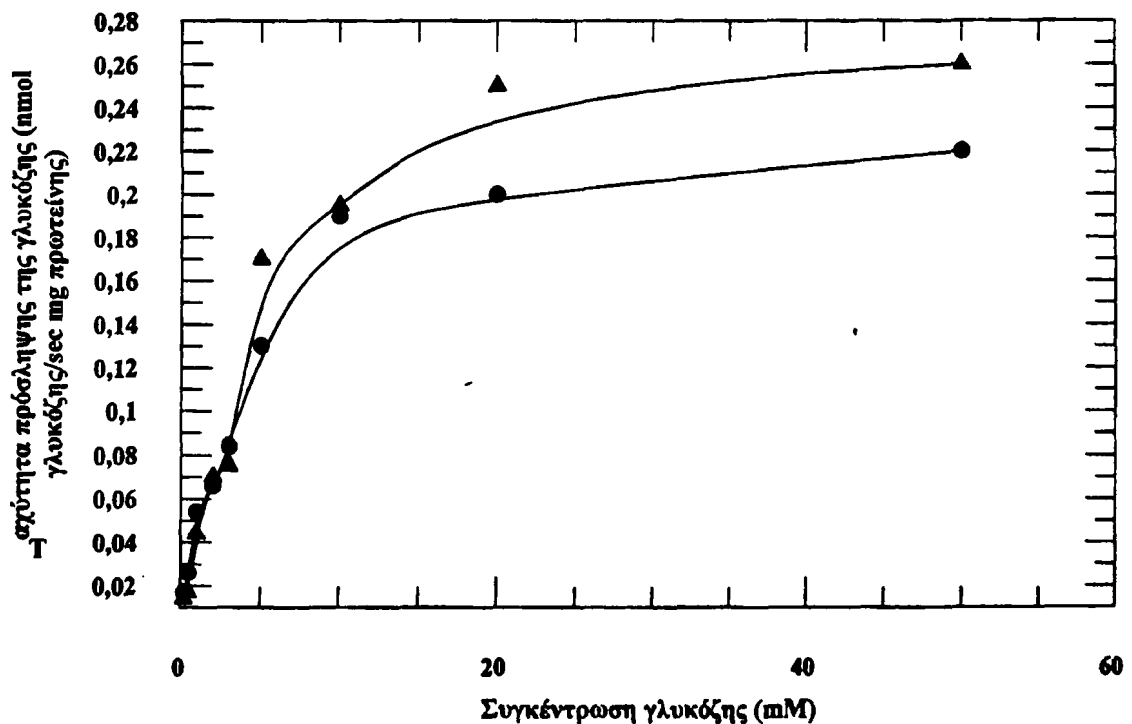
ΣΧΗΜΑ 52: Καμπύλη πρόσληψης γλυκόζης ανά mg πρωτεΐνης σε σχέση με το χρόνο, κυττάρων του στελέχους CUIRif2/pLAFR545 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 10% (▲) γλυκόζη.

Φαίνεται ότι η αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης του στελέχους CUIRif2/pLAFR545 παραμένει σταθερή όταν τα κύτταρα επωαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη (Σχήμα 52) όπως και στο φυσικό τύπο (βλέπε 4.9.1). Τα παραπάνω αποτελέσματα επαναλήφθηκαν χρησιμοποιώντας και τους υπόλοιπους λειτουργικούς κλώνους. Επομένως, ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αναπληρώνει και την ταχύτητα πρόσληψης της όταν η συγκέντρωση αυτής αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο. Η ιδιότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* να διατηρεί σταθερή την αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης πρέπει να έχει τουλάχιστον έμμεση σχέση με την ανθεκτικότητα του σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

5.9.2 Κινητική μελέτη της πρόσληψης της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFRR545

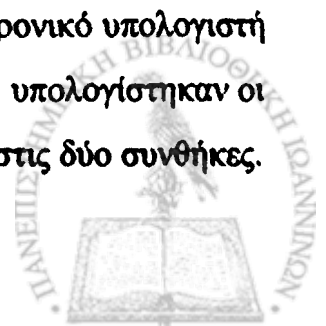
Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max}) της πρόσληψης της γλυκόζης, έγινε στο στέλεχος CU1Rif2/pLAFRR545 μετά από ανάπτυξη του σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα.

Φαίνεται ότι η πρόσληψη της γλυκόζης ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις ανάπτυξης (Σχήμα 53).



ΣΧΗΜΑ 53: Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στην πρόσληψη της γλυκόζης (nmol γλυκόζης / sec X mg πρωτεΐνης) κυττάρων CU1Rif2/pLAFRR545, μετά από ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% (●) και 5% (▲) γλυκόζη.

Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με το κατάλληλο πρόγραμμα (BIOSOFT 1991), υπολογίστηκαν οι τιμές K_m και V_{max} για το στέλεχος CU1Rif2/pLAFRR545 και στις δύο συνθήκες.



Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 26 και δείχνουν ότι οι τιμές K_m και V_{max} για το στελέχος CU1Rif2/pLAFR545 και στις δύο περιπτώσεις ανάπτυξης, κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με αυτές των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 (βλέπε Πίνακα 17).

ΠΙΝΑΚΑΣ 26:

Κινητικές παράμετροι της πρόσληψης γλυκόζης σε κύτταρα CU1Rif2/pLAFR545

Γλυκόζη %	K_m (mM γλυκόζης)	V_{max} (nmole γλυκόζης/sec mg πρωτεΐνης)
2	10.5 ± 3.5	0.40 ± 0.20
5	5.6 ± 0.55	0.33 ± 0.18

Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα

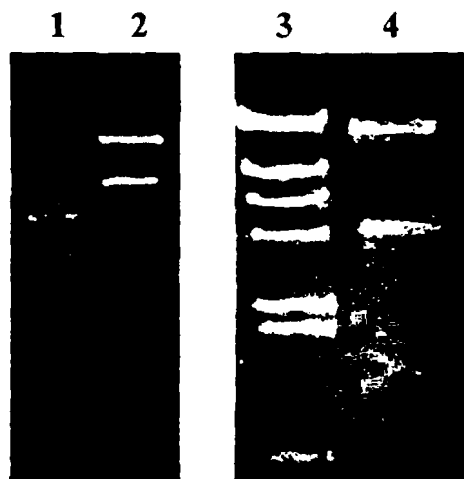
5.10 Απομόνωση του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, από το γονιδίωμα του στελέχους ATCC 10988

Ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, απομονώθηκε και από το γονιδίωμα του στελέχους ATCC 10988 ως εξής:

Από μια γονιδιακή βιβλιοθήκη του ATCC 10988 απομονώθηκαν δύο κλώνοι με υβριδισμό *in situ*, χρησιμοποιώντας τον κλώνο των 4.5 kb του στελέχους CP₄ σημασμένο με dig-11-dUTP ως ανιχνευτικό μόριο. Περιοριστική ανάλυση των νέων κλώνων απέδειξε ότι ήταν ταυτόσημοι. Ακόμα, οι δύο νέοι κλώνοι αναπλήρωναν πλήρως την ευαισθησία του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Περιοριστική πέψη των κλώνων αυτών με *Bam*HI-*Sa*II έδωσε μία ζώνη μεγέθους 4.5 kb, η οποία απομονώθηκε και

υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18, κατασκευάζοντας έτσι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUC18145 (Σχήμα 54). Από το πλασμίδιο pUC18145 απομονώθηκε με περιοριστική πέψη *EcoRI-PstI* το τμήμα των 4.5 kb το οποίο υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 με αποτέλεσμα την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pLAFR5145 (Σχήμα 54). Το πλασμίδιο αυτό μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 και βρέθηκε ότι αναπλήρωνε την ευαισθησία τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

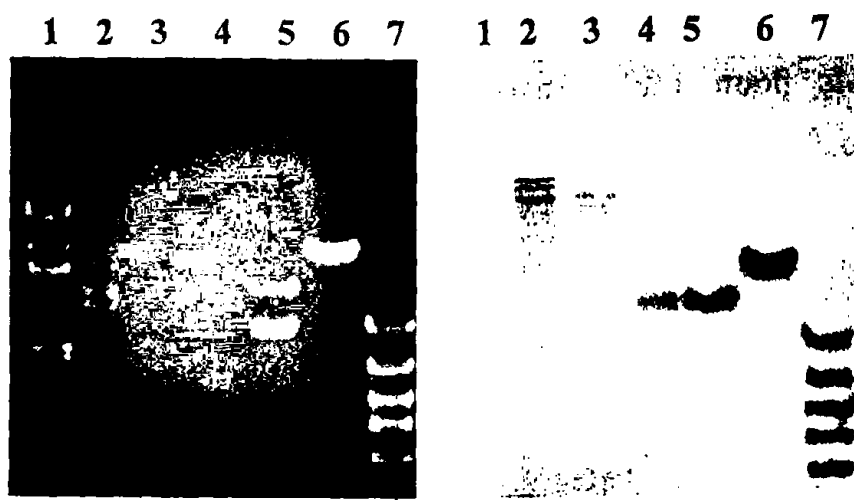
Περιοριστική ανάλυση του πλασμιδίου pUC18145 και υβριδισμός με τον κλώνο των 4.5 kb σημασμένο με dig-11-dUTP έδειξε ισχυρή ομολογία μεταξύ των δύο κλώνων (Σχήμα 55). Ο κλώνος αυτός επίσης υβριδίζει με το χρωμοσωμικό DNA του μεταλλαγμένου στελέχους (Σχήμα 55). Άρα το στέλεχος CU1Rif2 δεν περιέχει έλλειμμα, αλλά πιθανότατα σημειακή μετάλλαξη.



ΣΧΗΜΑ 54: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pUC18145 και pLAFR5145.

Διαδρομές:

1. λ- DNA / *HindIII*
2. pUC18145 / *BamHI-SaII*
3. λ- DNA / *HindIII*
4. pLAFR5145 / *EcoRI-PstI*



ΣΧΗΜΑ 55: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης και υβριδισμός κατά Southern με τον κλώνο των 4.5 kb σημασμένο με dig-11-dUTP, περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pUC18145.

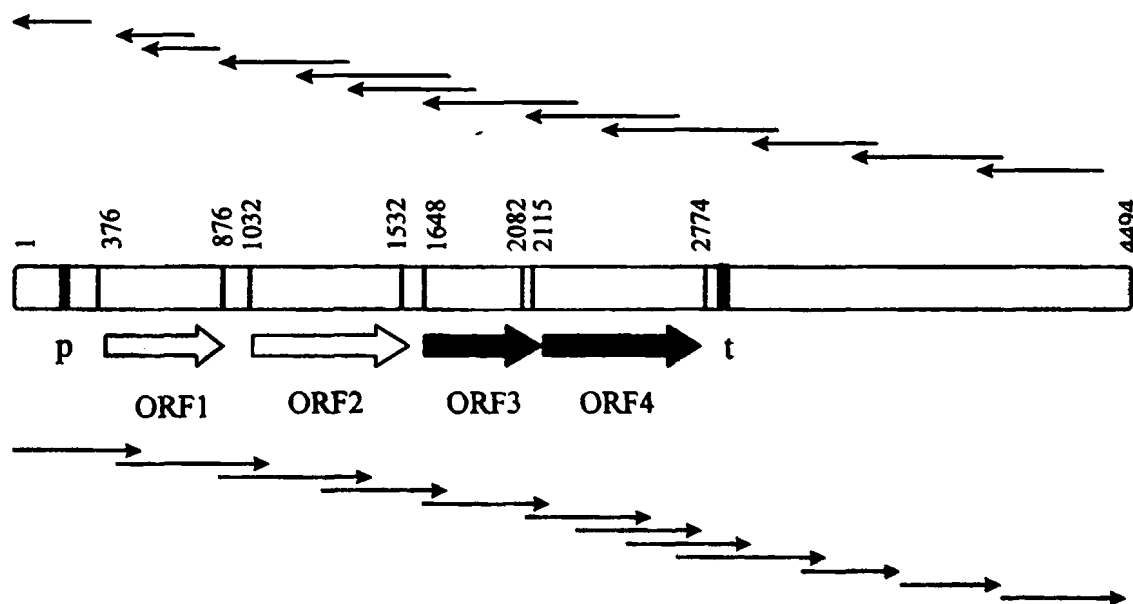
Διαδρομές:

1. λ- DNA / *Hind*III
2. χρωμοσωμικό DNA του στελέχους ATCC 10988 / *Eco*RI
3. χρωμοσωμικό DNA του στελέχους CU1Rif2 / *Eco*RI
4. pUC1845 / *Bam*HI-*Sal*I
5. pUC18145 / *Bam*HI-*Sal*I
6. pUC18145 / *Apa*I
7. pUC18145 / *Hind*III

5.11 Ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του κλώνου των 4.5 kb που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης

Η στρατηγική ανάλυσης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του κλώνου μεγέθους 4.5 kb φαίνεται στο Σχήμα 56. Η ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων έγινε και στις δύο αλυσίδες του δίκλωνου μορίου όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων, φαίνεται στο Σχήμα 57.

Με βάση την αλληλουχία νουκλεοτιδίων, προβλέπονται τέσσερις θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές (ORFs) οι οποίες αποτελούν ένα σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων, το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 56.



ΣΧΗΜΑ 56: Στρατηγική ανάλυσης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και γενετικός χάρτης του κλώνου των 4.5 kb που αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Τα βέλη δείχνουν τη φορά και το μήκος των βήμα-προς-βήμα τμημάτων αλληλουχίας. p: προαγωγός, t: τερματισμός, ORF: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης.



CAT GTC GAT TTT TGT AAC GAT TGG CGC GTT TCC CGA ATC ATC GCC TGA CTG GCA ATC ATT-60

TCC GTC ACA TTC AAT CCC GAA CCA TAA CGG CGG ACA ATC CGA CGA AAA GGC AAA TCC GTA-120

ACG CCT GTC ATC GGA GCT AGA ATA ACC GGA TTA TCA ATT CGG ACA GAG CCT ATC TGA ATA-180

GGC GAA ATC AGA TTA TGG GTA GGA TTA TGT TCA GGG CTG TTC ATG CGG TTA TGG TTA GCT-240

TGC TTT CAA AAA TCA GAC AAG CTT TCC TTG GCT GAA AAG GCT TTA TAA AAG GCC AAC TAT-300

TGC ATA AAA ACG GCA ATT CAA GGA AGC GAT AAC TCT ATT GCA AGC ATT CAC AAA AGG CTT-360

AAG GCT CGG CGG GTA ATG ATG AAA AGA ACA GAT AAT ATA GCG CTT ATT GTG GCG GCC GGT-420
ORF1 Met Met Lys Arg Thr Asp Asn Ile Ala Leu Ile Val Ala Ala Gly

CAG GGT AAA CGT GCA GGT GAA GGC CTG CCA AAG CAA TAT CGG CAG ATC GCT GGT AAA GCT-480
Gln Gly Lys Arg Ala Gly Glu Gly Leu Pro Lys Gln Tyr Arg Gln Ile Ala Gly Lys Ala

ATT CTG GCA CAT GCG ATT GAT AAC CTG CTC GCC CAT CCC GAA ATT GAT ACG GTA CAA GTC-540
Ile Leu Ala His Ala Ile Asp Asn Leu Leu Ala His Pro Glu Ile Asp Thr Val Gln Val

GTT ATC GCG GAC GGG CAT CAG GCG TTA TAT CAA GAG GCT GTC GGA GAC CGA GAT TTA CCG-600
Val Ile Ala Asp Gly His Gln Ala Leu Tyr Gln Glu Ala Val Gly Asp Arg Asp Leu Pro

CAG CCA GTG ATC GGT GGT GTT TTT CGG CGC GAT TCT GTG ATT AAT GGT TTG AAG GCC GCA-660
Gln Pro Val Ile Gly Gly Val Phe Arg Arg Asp Ser Val Ile Asn Gly Leu Lys Ala Ala

CAT GAC CGT GGT TAC AAA CGG GTT TTG ATT CAT GAT GCC GCC CGC CCT TTT TTA CCC AAA-720
His Asp Arg Gly Tyr Lys Arg Val Leu Ile His Asp Ala Ala Arg Pro Phe Leu Pro Lys

ACA GTG ATT GAT CGC CTA CTT GAC GCC TTG AAA TCG TCT AAG GCA GCG ATA CCC GTT TTG-780
Thr Val Ile Asp Arg Leu Leu Asp Ala Leu Lys Ser Ser Lys Ala Ala Ile Pro Val Leu

CCA GTT GTT GAT ACT CTT GTT AAT CAA GAA TCG AAG CCG TTG ACC GCA ATC TGT TCC ATC-840
Pro Val Val Asp Thr Leu Val Asn Gln Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala Ile Cys Ser Ile

GCG TTC AAA CCC CGC AAG CCT TTG ATC TTG AGA CCG TGA TCG CTG CAC ATC AGG CAT GGA-900
Ala Phe Lys Pro Arg Lys Pro Leu Ile Leu Arg Pro ---

CAG GCA GCG ATG AAC CAA CAG ATG ATG CGC AGG TTG TCC GCG CTT TTG GTA AAA AAA TTG-960

CCT TGG TAA CAG GCG ATA GAC TAC TCG AGA AAC TGA CCT ATC CTG CTG ATT TTT CTG TAG-1020

CCG AGG CTC AA ATG ACT GAA AAA ATG ATT TCT GTT TGC GGT TCA GGT TTC GAT GTT CAT-1070
ORF2 Met Thr Glu Lys Met Ile Ser Val Cys Gly Ser Gly Phe Asp Val His

TGT TTC GAA GCT GGT GAC CAT ATT ATG TTG GGT GGC ATC AAA ATT CCG CAT GAC CAT GGT-1130
Cys Phe Glu Ala Gly Asp His Ile Met Leu Gly Gly Ile Lys Ile Pro His Asp His Gly

CTT GCC GGT CAC TCC GAT GCC GAT GTC GCA CTC CAT GCT TTG ACA GAT GCT TTG CTG GGG-1190
Leu Ala Gly His Ser Asp Ala Asp Val Ala Leu His Ala Leu Thr Asp Ala Leu Leu Gly

GCG ATT GCT GAT GGC GAT ATC GGA ACC CAT TTT CCG CCA AGT GAT CCA CAA TGG AAG GGT-1250
Ala Ile Ala Asp Gly Asp Ile Gly Thr His Phe Pro Pro Ser Asp Pro Gln Trp Lys Gly

GCA AAT TCG ACC CAA TTC CTT GAA TAT GCT GTT GCG CTT GCC AAG AAA GCC GGA GCT ATC-1310
Ala Asn Ser Thr Gln Phe Leu Glu Tyr Ala Val Ala Leu Ala Lys Lys Ala Gly Ala Ile



ATT GAC CAT GCG GAT GTA ACG GTT ATC TGT GAA GCG CCG AAA GTG GGG CCT TAT CGA CCA-1379
Ile Asp His Ala Asp Val Thr Val Ile Cys Glu Ala Pro Lys Val Gly Pro Tyr Arg Pro

GCC ATG CGT AAG CAT ATT GCC CAG ATT CTG GGG CTT CCT GAA CAA AGG GTC AGC ATC AAA-1439
Ala Met Arg Lys His Ile Ala Gln Ile Leu Gly Leu Pro Glu Gln Arg Val Ser Ile Lys

GCA ACG ACA ACT GAA AAG CTT GGT TTT ACA GGC CGC AAA GAA GGG ATC GCT GCC CAA GCG-1499
Ala Thr Thr Thr Glu Lys Leu Gly Phe Thr Gly Arg Lys Glu Gly Ile Ala Ala Gln Ala

GTT ACC AGT ATT CGC TTG CCG GAT ATT TTG TGC TAA TTA GTT ATT CCA TGA ATC CGG TTA-1559
Val Thr Ser Ile Arg Leu Pro Asp Ile Leu Cys ---

TTC GTC ACT CGA TAG CGC TTG TTG CCT GCA TGT TTG GGA CGG GCG CTA TGG CTG CTG CCA-1619

CCG AGG CCG CAG SD
GGA GCC AGA TCA ATG T ATG ACT CAT GCC GAA GCG CAG GCT TTG ATG-1677
ORF3 Met Thr His Ala Glu Ala Gln Ala Leu Met

GAA ACA GCT TTA CCG GGC TTG CTG CAA GGC GCA AAA CAG CAA TGT TCT TCA GTG CTG GAT-1737
Glu Thr Ala Leu Pro Gly Leu Leu Gln Gly Ala Lys Gln Gln Cys Ser Ser Val Leu Asp

AGC GAT TCC TAT TTG CTG AAG CAG GAA GCG ACC CTT AGC AAT CGC TTT CGT CAG GAA AGT-1797
Ser Asp Ser Tyr Leu Leu Lys Gln Glu Ala Thr Leu Ser Asn Arg Phe Arg Gln Glu Ser

GAA ACC GAC TGG CCT AAG GCA AAA GCC GCT TTT GAA CGG CTG GGC GGG TCG GCT GTG GCC-1857
Glu Thr Asp Trp Pro Lys Ala Lys Ala Ala Phe Glu Arg Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala

GAT ATG GGA GAT GCG GGC AAA AGA GCT GCG ATT GAA ACC ATG GTT TCC GAT ATC GTC AGC-1917
Asp Met Gly Asp Ala Gly Lys Arg Ala Ala Ile Glu Thr Met Val Ser Asp Ile Val Ser

CAA AAG ATG AAG CCG CAA TCC TGT GAA ATC GTA AAT GGC TTT TTG CCA TTT GTA GCA GAA-1977
Gln Lys Met Lys Pro Gln Ser Cys Glu Ile Val Asn Gly Phe Leu Pro Phe Val Ala Glu

CAA CCC GCC AAT AAA ATC GGG GAT GTT TCT GTT TCC ACA TTC GCC TTG ATT AAG AAA ATT-2037
Gln Pro Ala Asn Lys Ile Gly Asp Val Ser Val Ser Thr Phe Ala Leu Ile Lys Lys Ile

GGC AAG GTT GGA CGT ATT TTG CCT TTT GAT ATT TGT TCG GGA GAT TAA ACC GAT GAC TAT-2097
Gly Lys Val Gly Arg Ile Leu Pro Phe Asp Ile Cys Ser Gly Asp ---

SD
GGA CAA TAA CCA GAC GG ATG GCC TGT CCT CGC AGC CTT CTG ATA CCG AGA AAG AAG CGC-2156
ORF4 Met Ala Cys Pro Arg Ser Leu Leu Ile Pro Arg Lys Lys Arg

TTC AGC AAA AGG CAG AAC AGC AGG ATA TTT CTG CCC AGG ATA GTG AAG AAT TAC AAA AAA-2216
Phe Ser Lys Arg Gln Asn Ser Arg Ile Phe Leu Pro Arg Ile Val Lys Asn Tyr Lys Lys

CTA TCC AAA ATA TGG AAG AAA ACC AGC CGC AGG AAA ATG TCC ATT ATA ATT TAC ACG AAT-2276
Leu Ser Lys Ile Trp Lys Lys Thr Ser Arg Arg Lys Met Ser Ile Ile Ile Tyr Thr Asn

GAA TTG GTA ACC CGC GCC AGC TTG GTG ATC GAT GCC AAT CGT GCA GCC GGT CAG CGT ATT-2336
Glu Leu Val Thr Arg Ala Ser Leu Val Ile Asp Ala Asn Arg Ala Ala Gly Gln Arg Ile

GCC GTT GCA GAA AGC TGC ACC GGT GGT TTG GTA ATG GCG GCC TTG ACC GAG GTT CCG GGG-2396
Ala Val Ala Glu Ser Cys Thr Gly Gly Leu Val Met Ala Ala Leu Thr Glu Val Pro Gly

GCT TCT GAT GTC TTT GAT GCC GGA TTT GTG ACC TAT GCC AAT CAG GCA AAA ATA GAC CTT-2456
Ala Ser Asp Val Phe Asp Ala Gly Phe Val Thr Tyr Ala Asn Gln Ala Lys Ile Asp Leu

CTG AAT ATT AGT CAG GAC GTC ATC GAA ACC TTT GGC TCT GTT TCT TTG GCG GTT GCT TGG-2516
Leu Asn Ile Ser Gln Asp Val Ile Glu Thr Phe Gly Ser Val Ser Leu Ala Val Ala Trp

GCA ATG GCA CGG AAT GCC GTT GAA AAA AGC GAT GCT GAT ATT GCG GTT GCG ATT ACA GGT-2576
Ala Met Ala Arg Asn Ala Val Glu Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ala Val Ala Ile Thr Gly



ATT GCG GGC CCG ACC GGC GGC GAT GAA AGA AAA CCC GTT GGC ACC GTT GTT TTT GCA CGG-2636
 Ile Ala Gly Pro Thr Gly Gly Asp Glu Arg Lys Pro Val Gly Thr Val Val Phe Ala Arg
 GCA AGA CGG GAT GCT GAT CCG AAT GAA GTC GTT GCG GAA CAG AAA TCT TTC GGA GAT TTA-2696
 Ala Arg Arg Asp Ala Asp Pro Asn Glu Val Val Ala Glu Gln Lys Ser Phe Gly Asp Leu
 GGG CGT TCC GGT ATC CGT TTA CAG GCA GCT TTA TGC GCC CTC AGC CTG TTA ATG CCG GAT-2756
 Gly Arg Ser Gly Ile Arg Leu Gln Ala Ala Leu Cys Ala Leu Ser Leu Leu Met Pro Asp
 GCG TCG ATC TCT CAA GGT TAA AAA CTG ACG GCC ATT TGG CTG GCG AAT AAT TGG AAA GTA-2816
 Ala Ser Ile Ser Gln Gly ---
 AGG TTG TCT TTC TTC GTT TTT → ← AGA AGC GAA GAA AGA CCA GAC CTA GGC TCA GGA CTC ATT-2876
 CTT TGA GAT AGA AGA TGA AAC TTG CTG CGA TAT GGA TTG CTG ACA TGA ATG TGT GAG CGC-2936
 ACC GGT CGT ATC GTG TTG CGA CAC GCC GCC AGT CTT TGA GCT TTG CGA ACA TAT TTT CGA-2996
 TGA GGT GAC GCT TTT TAT ACA GAT GCC AGT CGT AAG GCG GCT TTG ATT TCC GTT CTT CTT-3056
 AGG CGG AAT ACA GGC GGT GAT ATT CCG GTC TGC GAG AGA CTG TCT GAT TTT ATT ACT GTC-3116
 GTA TCC CCG GTC CCC GAG AAT TTC TTG TGT TTC TTC CGG CAG ATT TGC CAG CAG AAC ATC-3176
 CGC GCC TTT GAA GTC ACT GAC CTG ACC TGC GGT CAG ATG CAG CCG GAC AGG GCG GCC CTG-3236
 ACT ATC GCA TAC AGC GTG AAG CTT TGA GTT CAG TCC GCC TTT CGT GCG TCC GAT ATG GCG-3296
 GGG AAA AGC CCC TTT TTG AGC AGG GAG GCC GCT GTC CGG TGT GCT TTC AGA TGT GTT GCA-3356
 TCG ATC ATC AGA CGC TTC GAA CGG CCT GCC TGC TCC GTC AGG GCG ACG AAG ATC CGG TCA-3416
 AAG ACA CCC AGG CGG CTC CAC CGG ATA AAC CGG TTG TAT AAA GTC TTG TGC GGG CCA TAC-3476
 GCT TTC GGG GCG TCT TTC CAC TGA AGG CCG TTG CGG ATC ACG TAA ACG ATC CCG CTC AGG-3536
 ACA CGA CGG TCA TCG ACA CGC GGC ACA CCA TGC GCC AGT GGA ACA AAC GGC TTA ATC CGT-3596
 TCC ATC TGG TGC TCA GAC AGC AAA AAC ACG TCA CTC ACA GCT TCA CCT CCA TCG GTA AAC-3656
 CTG TGA ATC ACA ACA GCC CGC TCA ACT CAA GAA ATT AAC AGG TCC TGA GCC TAA AAA AGA-3716
 TAA CCT TCT TAT CAA GGA CAG AAT AGA TTT TCC CTA TTT TTT ATA GGA TGT AAT CTG CCT-3776
 TTT TCT AAA GGC GCC ATT TAT CTA AAA AAC CGC TAG GCA TCG GAT AAA CCG TAA AGA TTA-3836
 TTC GCC CTT TCT TCA AAG GCT TGA GTC ATT TTT TGC ACG GCT CGA TCA AAG AAT TGT CCG-3896
 GCA AGT GCC TCG AAA ATT CTC GAC CGG AAA GAA AAA TCG ACC ATA AAA TCT AAT CGG GTT-3956



TTT CCC TCT TCT TCT TCT GTG AAA TGC CAT TCA TTA TGA AGA TGG GAT AAT GGC CCG TCG-4016
 ATA TAT TCA ACC GAT ACC GAA TGG GGT GAA TCC AAG TTA CTT TTG ACG TAA AGC TTT CCC-4076
 GAA AAG CCT TGA AGC CCA CAA TCA AAT CAG CCG TCA TCC TGT TTT CTT CAC GAG ACC GAA-4136
 TCC GAA CGG CGA TTA CCC ATG GCA AAA ATT CAG GAT AAC GGC TGA TAT CCG CGA CCA GAT-4196
 CAA AAA GTT GCT GTG GCG TAT AGG GCA ATA TTT TTG ATT CTG TAT AAT GCG GCA TTA GGC-4256
 ACC CTT CCC GCT ATT TTT GGC GGC TAT TTT TTC CAA CTT CTT TTG GCG GGC TTC TTT TAA-4316
 ACG CGC AAA ATC AGC ACC GGC ATA ATA GCT GGA ACG CGT TAA AGG AGA GGA TGC CAC CAT-4376
 TGA AAA ACC CTT GGC TCT AGC TGT CGC CGC ATA GGC CTT GAA GCT GTC AGG TGT AAC AAA-4436
 CTC TTC TAC CCG AAC ATG GCG CGG CGT AGG TTG CAA ATA TTG CCC TAA GGT TAA GAA A -4494

ΣΧΗΜΑ 57: Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κλώνου των 4.5 kb και η προβλεπόμενη αλληλουχία των αμινοξέων.

-10 και -35: στοιχεία θεωρητικού προαγωγού

SD: αλληλουχίες Shine-Dalgarno

ORF1-4: κωδικόνια έναρξης

--- : κωδικόνια τερματισμού

αντίθετα βέλη: σήμα τερματισμού μεταγραφής.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων έδειξε την ύπαρξη τεσσάρων πιθανών κωδικεύουσων περιοχών (ORF1-4), οι οποίες αποτελούνται από 501 bp (νουκλεοτίδια 376-876), 501 bp (νουκλεοτίδια 1032-1532), 435 bp (νουκλεοτίδια 1648-2082) και 660 bp (νουκλεοτίδια 2115-2774) αντίστοιχα. Ανοδικά από κάθε ORF υπάρχουν συντηρημένες περιοχές Shine-Dalgarno (Σχήμα 57). Όλα τα προβλεπόμενα ORFs αρχίζουν με ένα ATG (τυπικό κωδικόνιο έναρξης στο *Z. mobilis*) και χρησιμοποιούν το TAA για κωδικόνιο τερματισμού, που είναι το πιο συνηθισμένο στο *Z. mobilis*. Εξαιρέση αποτελεί το ORF1, το οποίο τελειώνει με TGA. Στην περίπτωση του ORF2, μία εναλλακτική κωδικεύουσα περιοχή μπορεί να προβλεφθεί, η οποία αρχίζει από



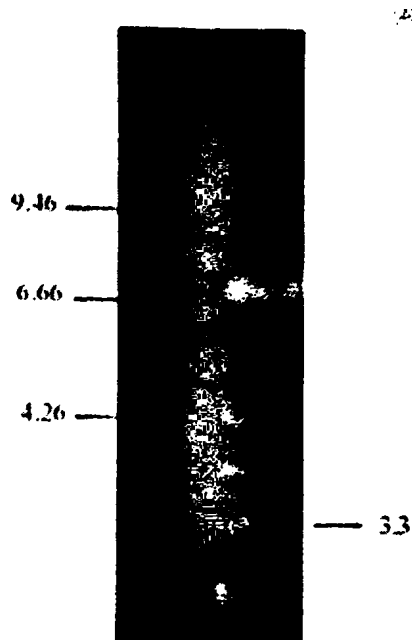
το νουκλεοτίδιο 876 και περιέχει 657 bp, αλλά αυτή η πιθανότητα αποκλείεται γιατί το βακτήριο *Z. mobilis* χρησιμοποιεί πολύ σπάνια GTG ως κωδικόνιο έναρξης (Zhao et al. 1993). Επιπλέον, δεν μπορεί να βρεθεί καμία συντηρημένη αλληλουχία Shine-Dalgarno ανοδικά από το νουκλεοτίδιο 876.

Η οργάνωση του συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs, υποδεικνύει ότι είναι πολύ πιθανό αυτά να συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο, όπως στις περιπτώσεις του οπερονίου *glf-glk-edd-zwf* (μεταβολισμός της γλυκόζης, Barnell et al. 1992) και του οπερονίου της μεταφοράς του γλουταμινικού οξέος, *gluEMP* (Peekhaus and Kramer, 1996).

Θεωρητικά στοιχεία προαγωγού «-10» και «-35» τυπικά για το βακτήριο *Z. mobilis* (Sprenger et al. 1993), βρίσκονται στα νουκλεοτίδια 261-273 και 298-306 αντίστοιχα (Σχήμα 57). Ακόμα στα νουκλεοτίδια, 2819-2851 (Σχήμα 57), βρίσκεται μία θεωρητική αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής.

5.12 Κλωνοποίηση του συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs και έλεγχος της λειτουργικότητάς τους στο στέλεχος CU1Rif2

Το τμήμα που περιέχει τα τέσσερα ORFs που κωδικεύουν τις τέσσερις θεωρητικές πρωτείνες (Σχήμα 56), κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 ως ένα τμήμα 3.3 kb. Το τμήμα αυτό απομονώθηκε από τον κλώνο μεγέθους 4.5 kb του πλασμιδίου pUC1845 με περιοριστική πέψη *Bam*HI-μερική *Hind*III (Σχήμα 58). Έτσι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR533 (Πίνακας 4), του οποίου η περιοριστική ανάλυση φαίνεται στο Σχήμα 59.



ΣΧΗΜΑ 58: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης *Bam*HI-μερική *Hind*III του πλασμιδίου pUC1845.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pUC1845 / μερική *Hind*III

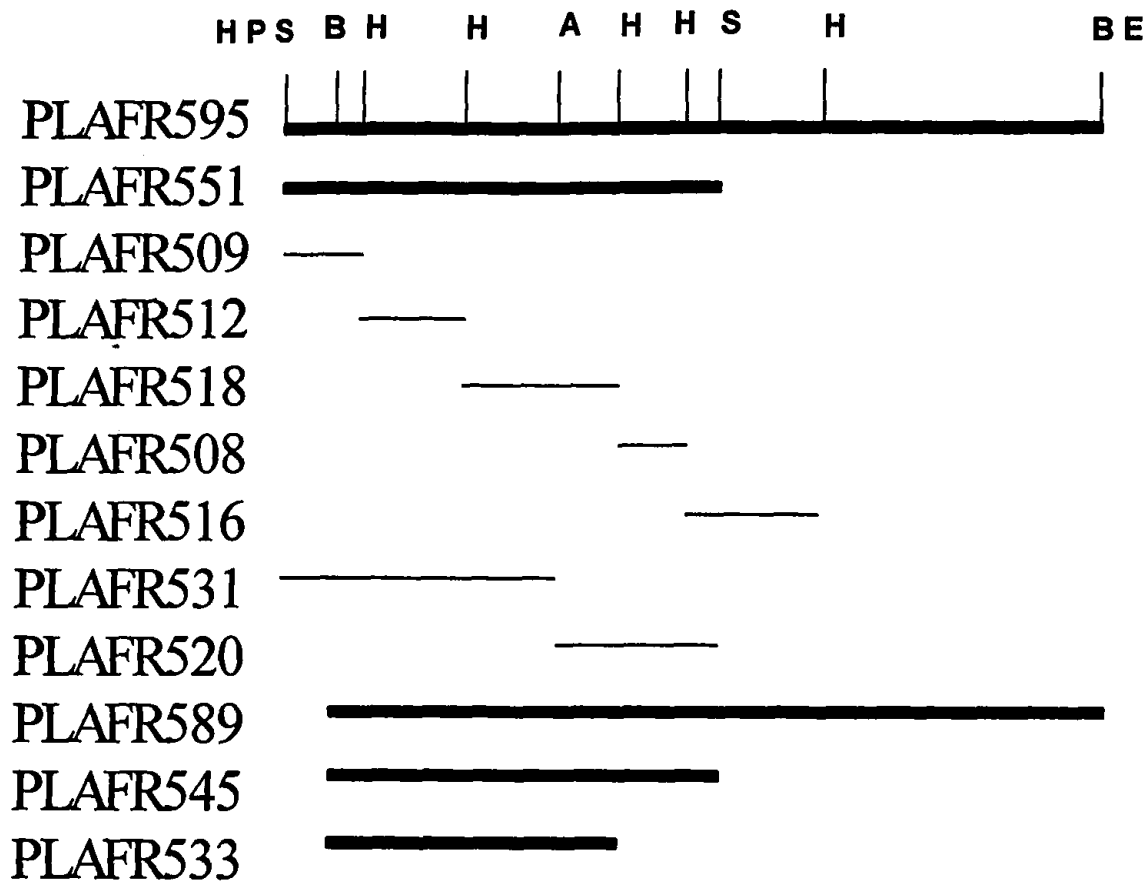


ΣΧΗΜΑ 59: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pLAFR533.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pLAFR533 / *Hind*III
3. pLAFR5 / *Hind*III

Η πορεία των υποκλωνοποιήσεων από τον κλώνο μεγέθους 9.5 kb μέχρι τον κλώνο μεγέθους 3.3 kb φαίνεται στο Σχήμα 60.



ΣΧΗΜΑ 60: Οι υποκλωνοποιήσεις του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

█ : Αναπλήρωση του CU1Rif2,

— : μη αναπλήρωση

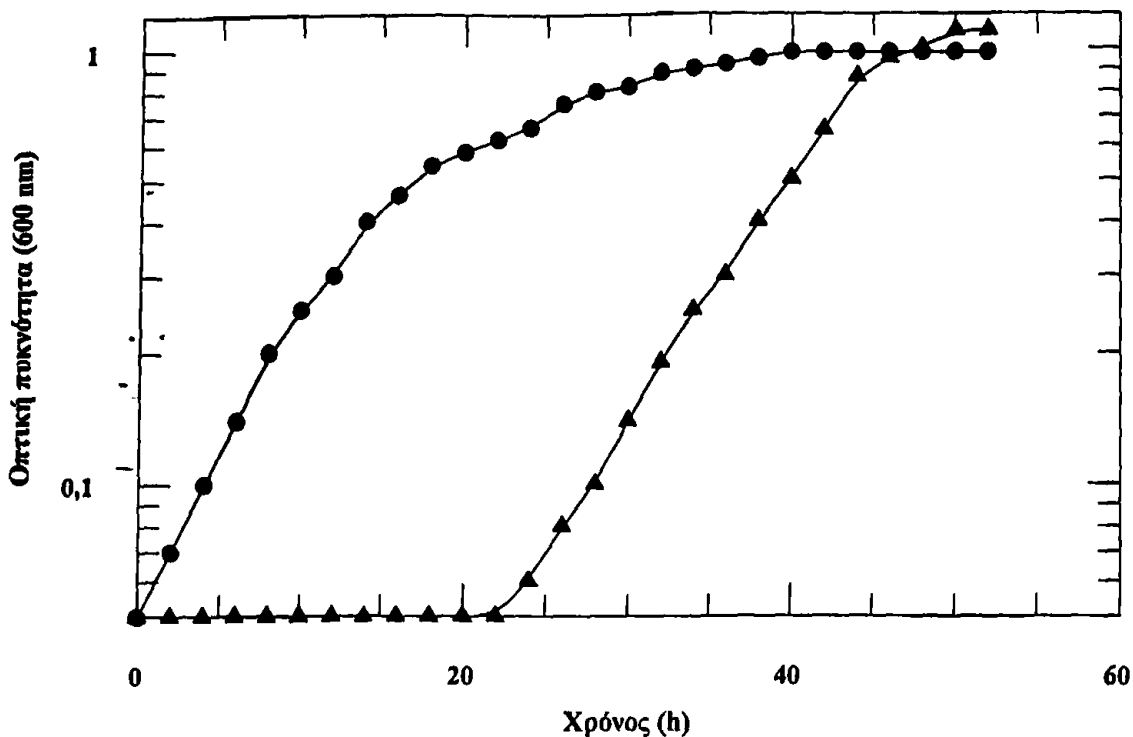
Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR533 μεταφέρθηκε στο μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2 και αποδείχθηκε ότι αποκαθιστούσε την ικανότητα ανάπτυξης του σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36).

Επίσης, το μετασυζευγμένο στέλεχος CUIRif2/pLAFR533 παρουσίασε δραστικότητα γλυκοκινάσης και ταχύτητα πρόσληψης γλυκόζης φυσικού τύπου σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Επομένως, φαίνεται ότι το τμήμα των 3.3 kb το οποίο περιέχει τα τέσσερα ORFs αναπληρώνει την ευαισθησία του CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, καθώς και τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά του (γλυκοκινάση και πρόσληψη της γλυκόζης). Ακόμα, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 5.5 το τμήμα *ApaI-SaII* των 3.1 kb δεν βρέθηκε λειτουργικό. Άρα για την αναπλήρωση της ευαισθησίας του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, είναι απαραίτητη η ύπαρξη και των τεσσάρων ORFs.

Επιπρόσθετα, τα κύτταρα του CUIRif2 αναπτύσσονται αμέσως σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του CUIRif2/pLAFR533 (Σχήμα 61). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει, ότι ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την άμεση ανάπτυξη του φυσικού τύπου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο (βλέπε παρ. 4.12), παράγεται και από το μετασυζευγμένο στέλεχος CUIRif2/pLAFR533.





ΣΧΗΜΑ 61: Ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή ελάχιστο) 10% γλυκόζης προεπωασμένο για 3 ώρες με κύτταρα του στελέχους CU1Rif2/pLAFR533 (●), ▲: Καλλιέργεια του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

5.13 Έλεγχος αναπλήρωσης κυττάρων *E. coli* μεταλλαγμένων ως προς το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το τμήμα DNA που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, έχει σχέση με κάποιο μηχανισμό πρόσληψης της γλυκόζης, ο κλώνος μεγέθους 3.3 kb υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pZY507 (Weisser et al. 1995) ο οποίος είναι κατάλληλος για έκφραση γονιδίων στο βακτήριο *E. coli*. Η υποκλωνοποίηση έγινε με περιοριστική πέψη BamHI-μερική HindIII του πλασμιδίου pUC1845 και υποκλωνοποίηση του τμήματος 3.3 kb (Σχήμα 58) στο φορέα pZY507, ο οποίος είχε ευθυγραμμισθεί με περιοριστική πέψη

*Bam*HI-*Hind*III. Έτσι, κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pZY50733, του οποίου η περιοριστική πέψη φαίνεται στο Σχήμα 62 και ο περιοριστικός χάρτης στο Σχήμα 63.

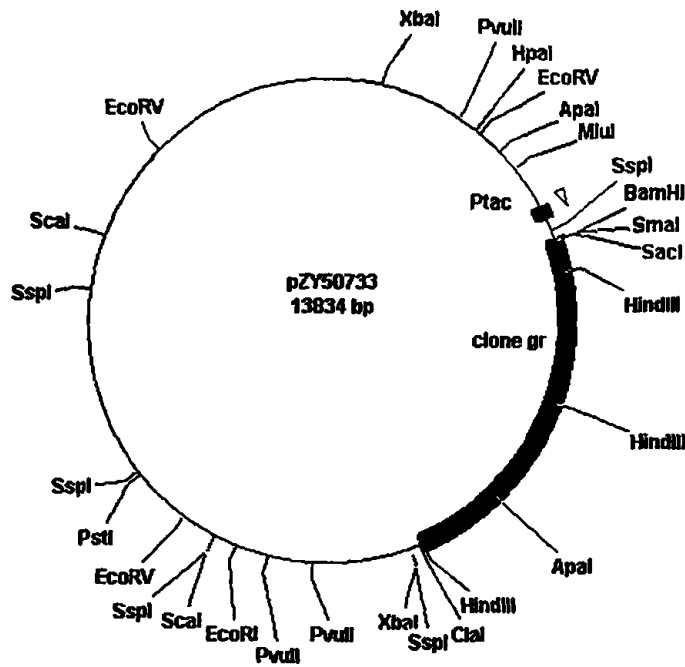
Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pZY50733 μεταφέρθηκε στο στέλεχος του βακτηρίου *E. coli*, ZSC112L δ(ptsHI-crr) (Weisser et al. 1995) το οποίο δεν μπορεί να προσλάβει γλυκόζη. Η αναπλήρωση της ικανότητας πρόσληψης γλυκόζης ελέγχθηκε στο στέλεχος ZSC112L δ(ptsHI-crr)/pZY50733 με πειράματα πρόσληψης γλυκόζης, χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα το στέλεχος ZSC112L δ(ptsHI-crr)/pZY507-*glf*. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pZY507-*glf* (Weisser et al. 1995), περιέχει το γονίδιο *glf* το οποίο κωδικεύει το μεταφορέα της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. mobilis* αλλά παρουσιάζει και ετερόλογη έκφραση στο βακτήριο *E. coli* (Weisser et al. 1995). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 64.



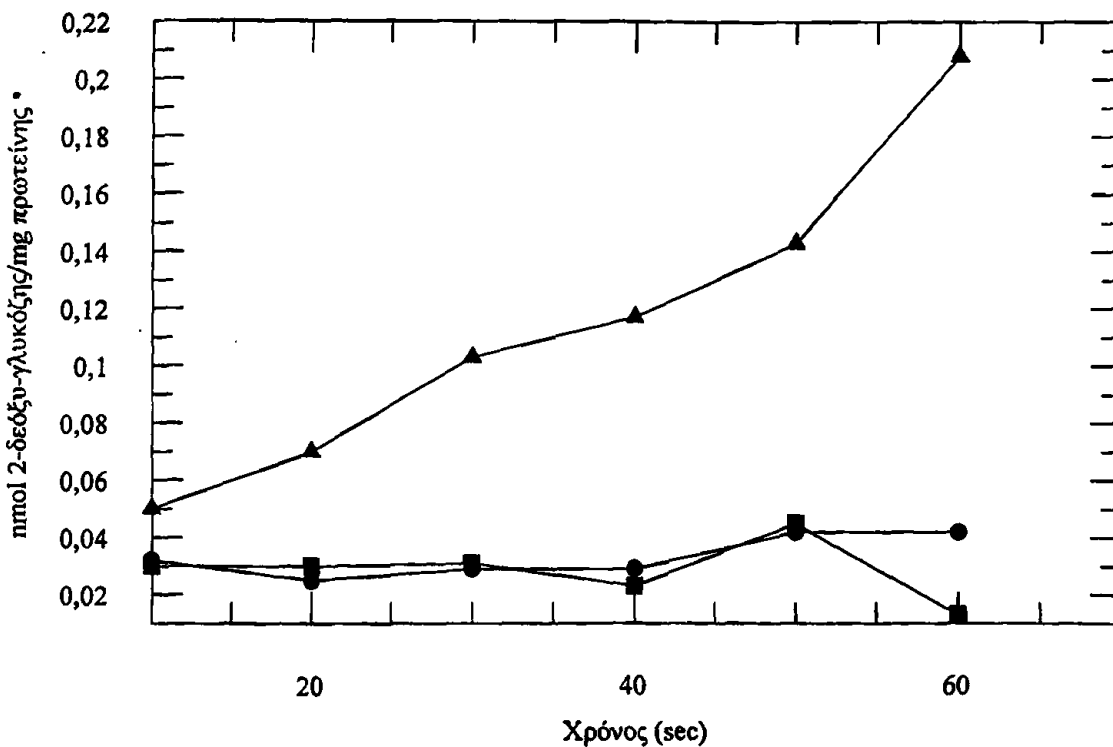
ΣΧΗΜΑ 62: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικής πέψης του πλασμιδίου pZY50733.

Διαδρομές:

1. λ-DNA / *Hind*III
2. pZY50733 / μερική *Hind*III



ΣΧΗΜΑ 63: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pZY50733.



ΣΧΗΜΑ 64: Πρόσληψη της δεοξυ-D-[U-¹⁴C]-γλυκόζης (τελική συγκέντρωση 5 mM) από το στέλεχος *E. coli* ZSCL11Δpts/pZY507 (●), ZSCL11Δpts/pZY507glf (▲), ZSCL11L/pZY50733 (■) στους 10°C. Τα κύτταρα *E. coli* αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν μπορεί να αναπληρώσει την πρόσληψη της γλυκόζης σε μεταλλαγμένα στελέχη *E. coli* τα οποία δεν προσλαμβάνουν γλυκόζη.

Φαίνεται λοιπόν, ότι ο κλώνος που είναι υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν κωδικεύει ένα μεταφορέα γλυκόζης που πιθανά να λειτουργεί μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Ενδεχομένως, ελέγχει ένα ρυθμιστικό σύστημα που επηρεάζει την πρόσληψη και φωσφορυλίωση της γλυκόζης, όταν η συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αυξηθεί.



ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

Συζήτηση



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (Παρ. 2.10), η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης ή μιγμάτων φρουκτόζης και γλυκόζης, έχει μελετηθεί διεξοδικά. Η ανθεκτικότητα αυτή, οφείλεται στη συσσώρευση μιας συμβατής διαλυμένης ουσίας, της σορβιτόλης, στο εσωτερικό των κυττάρων του *Z. mobilis*.

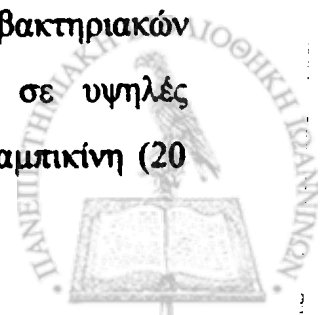
Όμως, η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (απουσία φρουκτόζης) δεν μπορεί να εξηγηθεί με τον παραπάνω τρόπο, γιατί όταν η γλυκόζη είναι η μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα του *Z. mobilis* παράγουν ελάχιστη ποσότητα σορβιτόλης (Viikari 1984). Ακόμα, μετά από ανάλυση ¹³C-NMR, δεν βρέθηκε καμία άλλη γνωστή συμβατή διαλυμένη ουσία που να βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση και να έχει τη δυνατότητα να συσσωρεύεται στο

εσωτερικό των κυττάρων του *Z. mobilis* (Loos et al. 1986). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την μεγάλη ταχύτητα με την οποία τα κύτταρα του *Z. mobilis* προσλαμβάνουν τη γλυκόζη από το εξωτερικό περιβάλλον, οδήγησε τον Struch και τους συνεργάτες του το 1991 στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, οφείλεται στη γρήγορη εξισορρόπηση της εξωτερικής με την εσωτερική οσμωτική πίεση, λόγω της άμεσης πρόσληψης της γλυκόζης από το κύτταρο (Struch et al. 1991). Παρ' όλα αυτά, από *in vivo* μελέτες βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων του *Z. mobilis* είναι σαφώς μικρότερη από αυτή που βρίσκεται στον εξωκυτταρικό χώρο (Hermans 1992).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης όταν αυτή χρησιμοποιείται ως μόνη πηγή άνθρακα.

Επιπλέον, όταν κύτταρα του *Z. mobilis* ανεπτυγμένα εκθετικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη, μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5% ή 10% γλυκόζη, εμφανίζουν μία φάση εφησυχασμού 10-30 λεπτών (Σχήμα 10, Παρ. 4.1), ενώ όταν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 20% γλυκόζη, η φάση εφησυχασμού φτάνει τις 25 ώρες περίπου. Αντίθετα, όταν κύτταρα του *Z. mobilis* ανεπτυγμένα εκθετικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 20% γλυκόζη, μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό μέσο που περιέχει 20% γλυκόζη, αναπτύσσονται χωρίς να περάσουν τη φάση εφησυχασμού. Το παραπάνω φαινόμενο δεν έχει μελετηθεί ως τώρα στο *Z. mobilis*.

Το εργαστήριο μας διαθέτει ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, το CU1, ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, το οποίο έχει απομονωθεί από το φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988 (Drainas et al. 1984). Επίσης, έχει απομονωθεί ένα μετάλλαγμα του στελέχους CU1, το στέλεχος CU1Rif2 (Afendra and Drainas 1987), για την διευκόλυνση των βακτηριακών συζεύξεων. Το στέλεχος CU1Rif2 είναι επίσης ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και επιπλέον είναι ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (20



μg/ml).

Το μεταλλαγμένο στελέχος CU1Rif2 αναπτύσσεται σχεδόν κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη. Όμως, όταν κύτταρα του CU1Rif2 που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και βρίσκονται στην εκθετική φάση μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5% γλυκόζη, τότε αυτά αναπτύσσονται αφού περάσουν μία φάση εφησυχασμού 6 ωρών περίπου, ενώ αν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη η φάση του εφησυχασμού αυξάνεται σε 22 ώρες περίπου (Σχήμα 10, Παρ. 4.1).

Από τα παραπάνω φαίνεται, ότι το μεταλλαγμένο στελέχος CU1Rif2 μπορεί να αποδειχθεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη του μηχανισμού μέσω του οποίου το βακτήριο *Z. mobilis* είναι ικανό να αναπτύσσεται σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Με σκοπό λοιπόν την διευκρίνιση του μηχανισμού αυτού, στην παρούσα διατριβή, επιχειρήθηκε μία εμπειριστατωμένη βιοχημική ανάλυση του CU1Rif2, καθώς και απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ενός κλώνου ο οποίος αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

6.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2

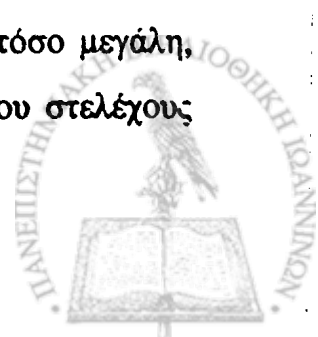
Για να μελετηθεί κατά πόσο η καθυστέρηση στην ανάπτυξη του CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη οφείλεται στην αυξημένη οσμωτική πίεση, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις άλλων σακχάρων, εκτός της γλυκόζης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο στελέχος CU1Rif2, με εξαίρεση τη γλυκόζη και το μεταβολίσιμο ανάλογό της 2-δεόξυγλυκόζη, αναπτύσσεται κανονικά σε υψηλές συγκεντρώσεις άλλων σακχάρων (Σχήμα 11, Παρ. 4.2).



Επιπρόσθετα, η προσθήκη σορβιτόλης, η οποία έχει αναφερθεί ότι βοηθάει τα κύτταρα του *Z. mobilis* να αναπτύσσονται αμέσως σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (οσμωπροστασία από τη σορβιτόλη, Loos et al. 1986), στο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, δεν μειώνει τη διάρκεια της φάσης εφησυχασμού (Σχήμα 12, Παρ. 4.3).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν, ότι η καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν οφείλεται σε πιθανή έλλειψη οσμωρύθμισης, αλλά ειδικά σε κάποιο μηχανισμό ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

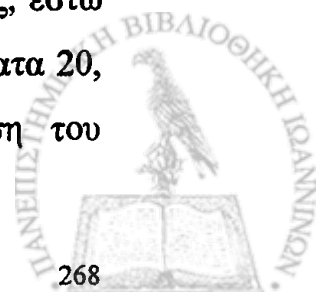
Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή (Παρ. 2.9), η ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* στην αιθανόλη έχει συνδεθεί με τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του και ειδικότερα με τη μεγάλη ποσότητα των οπανοειδών και του *cis*-βαξενικού οξέος που περιέχει (Carey and Ingram 1983, Bringer et al. 1985, Schmit et al. 1986, Buchloz et al. 1987, Hermans et al. 1991, Moreau et al. 1995). Επιπλέον, μερικοί ερευνητές έχουν συνδέσει την ανθεκτικότητα στη γλυκόζη με την ασυνήθιστη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του (Carey and Ingram 1983, Bringer et al. 1985). Για να μελετηθεί λοιπόν, η σχέση μεταξύ της λιπιδιακής σύστασης της μεμβράνης και της ανθεκτικότητας στη γλυκόζη στο βακτήριο *Z. mobilis*, έγινε ανάλυση των λιπιδίων του στελέχους CUIRif2 σε σχέση με αυτή του πατρικού του στελέχους ATCC 10988. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταξύ των λιπιδίων που περιέχονται στη μεμβράνη και των δύο στελεχών δεν υπήρχε καμία ποιοτική διαφορά (Σχήματα 14, 15, 16, 17, Παρ. 4.4). Επίσης, δεν υπάρχει καμία ποσοτική διαφορά στα ουδέτερα λιπίδια, τα λιπαρά οξέα και τα οπανοειδή που περιέχονται στη μεμβράνη και των δύο στελεχών (Πίνακες 8, 9, 10, 11, Παρ. 4.4). Η ποσοτική ανάλυση όμως των φωσφολιπιδίων, έδειξε ότι το στέλεχος CUIRif2 έχει μειωμένο ποσοστό φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης σε σχέση με το πατρικό του στέλεχος ATCC 10988 (Πίνακας 7, Παρ. 4.4). Η διαφορά αυτή όμως δεν είναι τόσο μεγάλη, ώστε να μπορεί να δικαιολογεί από μόνη της την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.



Φαίνεται λοιπόν, ότι το στελέχος CUIRif2 δεν είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης λόγω κάποιας αλλοίωσης στη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του ή τουλάχιστον όχι μόνο. Γι' αυτό στη συνέχεια ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους CUIRif2 στράφηκε στην μελέτη της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης.

Εκτός από την πρόσληψη της γλυκόζης, η οποία θεωρείται ένα πιθανό σημείο ρύθμισης του μεταβολισμού στο *Z. mobilis* αλλά και σε πολλούς άλλους οργανισμούς (βλέπε εισαγωγή Παρ. 1.2, 2.3), μελετήθηκαν τα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας γλυκοκινάση και αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης, τα οποία επίσης θεωρούνται πιθανά σημεία ρύθμισης του μεταβολισμού στο *Z. mobilis* (Barrow et al. 1984, Algar and Scopes 1985, Scopes and Bannon 1995, Snoep 1996, Sprenger 1996, Scopes 1997). Επιπλέον, μελετήθηκαν δύο άλλα πολύ σημαντικά ένζυμα του μεταβολισμού της γλυκόζης η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και η αλκοολική αφυδρογονάση.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, όταν τα κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5% γλυκόζη ή έπαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης τους αυξάνεται 1.5 και 2 φορές αντίστοιχα (Πίνακας 12, Σχήμα 18, Παρ. 4.5.1). Η αύξηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης, έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Zachariou and Scopes 1986). Το μεταλλαγμένο στελέχος όμως δεν φαίνεται να έχει την ίδια συμπεριφορά. Δεν αυξάνει δηλαδή την δραστηριότητα της γλυκοκινάσης του όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 12, Σχήμα 19, Παρ.4.5.1). Παρ' όλα αυτά, κινητικές μελέτες που έγιναν στην γλυκοκινάση κυττάρων του μεταλλαγμένου και του πατρικού στελέχους τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% και 5% γλυκόζη αντίστοιχα, έδειξαν ότι η γλυκοκινάση του στελέχους CUIRif2 δεν διαφέρει κινητικά από τη γλυκοκινάση του πατρικού του στελέχους, έστω και αν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο (Σχήματα 20, 21, Πίνακας 13, Παρ. 4.5.2). Αυτό σημαίνει, ότι η γλυκοκινάση του

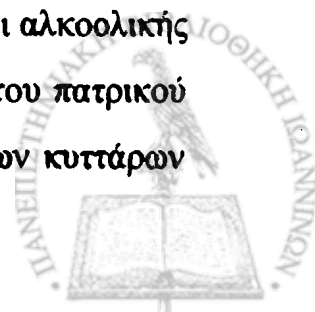


μεταλλαγμένου στελέχους είναι δομικά αναλοίωτη και ότι η μη αυξημένη δραστηριότητα της σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, πιθανά οφείλεται στην έλλειψη ή τη βλάβη κάποιου παράγοντα που ρυθμίζει (τουλάχιστον έμμεσα) την παραγωγή της.

Η άμεση ή η έμμεση αυτή ρύθμιση γίνεται στο πατρικό στέλεχος με αύξηση της ποσότητας της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί, και όχι με αύξηση της καταλυτικής ικανότητας της γλυκοκινάσης. Αυτό φαίνεται από τις τιμές της κινητικής παραμέτρου k_{cat} , οι οποίες είναι παρόμοιες στο πατρικό και στο μεταλλαγμένο στέλεχος, έστω και αν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί (Πίνακας 13 Παρ. 4.5.2). Επομένως, είναι πιθανό η ρύθμιση της αύξησης δραστηριότητας της γλυκοκινάσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, να γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής ή της μετάφρασης.

Αντίθετα με τη δραστηριότητα της γλυκοκινάσης, η δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης του στελέχους CUIRif2 δεν διαφέρει από αυτή του φυσικού τύπου, ακόμα και στην περίπτωση επώασης των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη (Σχήμα 22, Πίνακας 14, Παρ. 4.6). Αν και θα περίμενε κανείς, η αύξηση της δραστηριότητας γλυκοκινάσης από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης να συνοδεύεται και από αύξηση της αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης, εφόσον το γονίδιο που την κωδικεύει στο *Z. mobilis* βρίσκεται στο ίδιο οπερόνιο με το γονίδιο που κωδικεύει την γλυκοκινάση (Barnell et al. 1992), εντούτοις αυτό δεν συμβαίνει. Το γεγονός αυτό βέβαια δεν προκαλεί έκπληξη γιατί είναι γνωστό (Liu et al. 1992) ότι από το οπερόνιο του *Z. mobilis* *glf-zwf-edd-glk* προκύπτουν τέσσερα μικρότερα μεταγραφήματα μέσω μιας ενδονουκλεολυτικής πέψης στο μεταγράφημα των 6.14 kb. Η ρύθμιση λοιπόν της μετάφρασης κάθε μεταγραφήματος από αυτά, μπορεί να γίνεται στο επίπεδο της σταθερότητας του.

Η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και αλκοολικής αφυδρογονάσης του στελέχους CUIRif2 δεν διαφέρει από αυτή του πατρικού στελέχους ATCC 10988, ακόμα και στην περίπτωση επώασης των κυττάρων



σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη (Σχήματα 23, 24, Πίνακες 15, 16 Παρ. 4.7, 4.8). Αν και προηγουμένως έχει βρεθεί, ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CUI έχει μειωμένη δραστικότητα αλκοολικής αφυδρογονάσης (Drainas et al. 1984), φαίνεται ότι η ιδιότητα αυτή έχει αναστραφεί στο στέλεχος CUIrif2. Η δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και της αλκοολικής αφυδρογονάσης δεν είναι πιθανό να επηρεάζει την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, γιατί δεν φαίνεται να έχει ανάμιξη με τον φαινότυπο μεταλλαγμένου στελέχους CUIrif2.

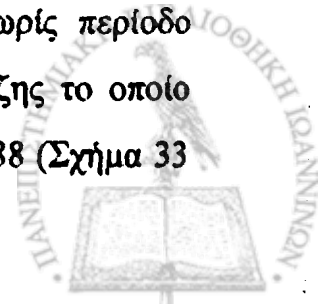
Διαπιστώθηκε, ότι κύτταρα CUIrif2 τα οποία έχουν μεταφερθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, προσλαμβάνουν τη γλυκόζη με σημαντικά χαμηλότερη ταχύτητα συγκριτικά με κύτταρα CUIrif2 τα οποία αναπτύσσονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, ενώ κύτταρα ATCC 10988 προσλαμβάνουν τη γλυκόζη με ίδια ταχύτητα είτε αναπτύσσονται σε χαμηλές είτε σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Σχήματα 25, 26, Παρ. 4.9.1). Φαίνεται λοιπόν, ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIrif2 παρουσιάζει κάποια αλλοίωση στο μηχανισμό της πρόσληψης της γλυκόζης όταν η συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί. Παρ' όλα αυτά, μετά από κινητικές μελέτες φάνηκε ότι η γλυκόζη προσλαμβάνεται στο στέλεχος CUIrif2 με τον ίδιο τρόπο (κινητική Michaelis-Menten) και με την ίδια συγγένεια (παρόμοιο K_m) με το πατρικό του στέλεχος, έστω και αν η συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί (Σχήματα 27, 28, Πίνακας 17, Παρ. 4.9.2). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν, ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος δεν περιέχει κάποια μετάλλαξη στο μεταφορέα της γλυκόζης. Είναι πιθανό το πατρικό στέλεχος να διαθέτει ένα μηχανισμό, μέσω του οποίου διατηρεί σταθερή την αρχική ταχύτητα πρόσληψης της γλυκόζης όταν η συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί. Ο μηχανισμός αυτός δεν φαίνεται να λειτουργεί στο μεταλλαγμένο στέλεχος.

Από τα παραπάνω φαίνεται, ότι είναι πιθανό το βακτήριο *Z. mobilis* να διαθέτει ένα σύστημα ρύθμισης της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης, το οποίο του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε αυξημένες

συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η ρύθμιση αυτή γίνεται με διατήρηση της ταχύτητας πρόσληψης της γλυκόζης και αύξηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί. Το σύστημα αυτό δεν φαίνεται να λειτουργεί στο μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2. Από την άλλη πλευρά υπάρχει και η πιθανότητα, η μειωμένη πρόσληψη και φωσφορυλίωση της γλυκόζης από το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2, να είναι απλώς αποτέλεσμα της μειωμένης ανάπτυξης του στελέχους αυτού σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Η ρύθμιση της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης έχει αναφερθεί σε πολλούς οργανισμούς (βλέπε εισαγωγή Παρ. 1.2). Στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχουν απομονωθεί πολλά γονίδια που ρυθμίζουν τη σύνθεση των μεταφορέων της γλυκόζης όπως και ένα γονίδιο που ρυθμίζει τη σύνθεση των γλυκολυτικών ενζύμων. Στο ζυμομύκητα *K. lactis*, έχει βρεθεί ότι η πρόσληψη της γλυκόζης ρυθμίζεται από τα γονίδια *RAG* (Billard et al. 1996). Στον *S. pombe* έχει απομονωθεί το γονίδιο *std1* το οποίο ρυθμίζει την πρόσληψη της γλυκόζης (Mehta et al. 1997), ενώ στο βακτήριο *P. aeruginosa*, έχουν απομονωθεί γονίδια που ρυθμίζουν την πρόσληψη και τον καταβολισμό της γλυκόζης.

Κύτταρα CUIRif2 τα οποία έχουν προεπωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη αναπτύσσονται αμέσως χωρίς περίοδο εφησυχασμού όταν μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει 10% γλυκόζη (Σχήμα 31, Παρ. 4.11). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι κατά την διάρκεια της περιόδου εφησυχασμού τα κύτταρα του CUIRif2 δημιουργούν κάποιον παράγοντα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Ο παράγοντας αυτός στο φυσικό στέλεχος παράγεται αμέσως, πιθανόν μέσω κάποιου ρυθμιστικού μηχανισμού ο οποίος ενεργοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επιπλέον, κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 αναπτύσσονται αμέσως χωρίς περίοδο εφησυχασμού όταν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης το οποίο έχει προεπωαστεί με κύτταρα του φυσικού στελέχους ATCC 10988 (Σχήμα 33



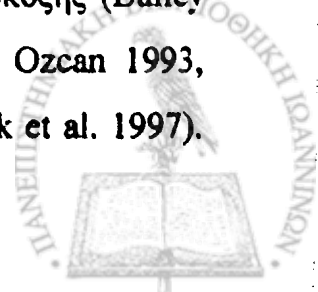
Παρ. 4.12). Φαίνεται λοιπόν ότι ο παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο. Το σήμα για την σύνθεση του παράγοντα αυτού δημιουργείται μόνο σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, γιατί κύτταρα CUIRif2 αναπτύσσονται με περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών όταν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης προεπωασμένου με κύτταρα του φυσικού στο οποίο η γλυκόζη έχει αυξηθεί σε 10% (Σχήμα 33, Παρ. 4.12). Ρυθμιστικοί μηχανισμοί οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις υψηλές συγκεντρώσεις οσμωλυτών στο θρεπτικό μέσο καθώς και εξωκυτταρικοί παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων έχουν αναφερθεί στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* (Brewster et al. 1993). Επίσης, είναι γνωστό (Jiang et al. 1998) ότι για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του *S. cerevisiae*, όταν αυτά μεταφέρονται από ένα φτωχό (δεν περιέχει γλυκόζη) σε ένα πλούσιο (περιέχει γλυκόζη) θρεπτικό μέσο, απαιτείται ενεργοποίηση της RAS σηματοδοτικής πορείας.

Ο υποθετικός παράγοντας ο οποίος εκκρίνεται από τα κύτταρα του φυσικού τύπου αμέσως μόλις μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζης δεν φαίνεται να συντελεί στην αύξηση της δραστηριότητας γλυκοκινάσης (Πίνακας 19, Παρ. 4.13) ή στη διατήρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης γλυκόζης (Σχήμα 35, Παρ. 4.14) στο στέλεχος CUIRif2. Με άλλα λόγια, ο παράγοντας που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ATCC 10988 και αποκαθιστά την ανάπτυξη του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν αποκαθιστά την ρύθμιση στην πρόσληψη και τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν επηρεάζει και δεν επηρεάζεται από τη ρύθμιση της σύνθεσης του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης, αλλά πιθανά ο ρυθμιστικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή του παράγοντα αυτού είναι ταυτόχρονα υπεύθυνος και για την ρύθμιση της



πρόσληψης και φωσφορυλίωσης υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης. Η ύπαρξη ρυθμιστικών μηχανισμών υπεύθυνων για τη ρύθμιση πολλών ανεξάρτητων λειτουργιών του κυττάρου, είναι συνηθισμένο φαινόμενο και έχει αναφερθεί για πολλούς οργανισμούς στο παρελθόν (βλέπε εισαγωγή Παρ. 1.3).

Το σηματοδοτικό μόριο για την ενεργοποίηση του παραπάνω θεωρητικού ρυθμιστικού μηχανισμού είναι η ίδια η γλυκόζη, και όχι κάποιος από τους μεταβολίτες της. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται από το γεγονός ότι κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους όταν επωαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% 2-δεοξυγλυκόζη (ένα προσλαμβανόμενο αλλά μη μεταβολίσιμο ανάλογο της γλυκόζης) για 22 ώρες και στη συνέχεια μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, αναπτύσσονται αμέσως χωρίς περίοδο εφησυχασμού (Σχήμα 32, Παρ. 4.11). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αδυναμία άμεσης ανάπτυξης των κυττάρων του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 8% 2-δεοξυγλυκόζη (Σχήμα 11, Παρ. 4.2), δείχνει ότι η 2-δεοξυγλυκόζη προκαλεί τα ίδια φαινόμενα στην ανάπτυξη. Η αυξημένη συγκέντρωση της 2-δεοξυγλυκόζης, προκαλεί το ίδιο σήμα με την αυξημένη συγκέντρωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ρυθμιστικού μηχανισμού μέσω του οποίου, αφενός παράγεται ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και αφετέρου ρυθμίζεται η σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί, που λειτουργούν μέσω σηματοδοτικών πορειών όπου το σηματοδοτικό μόριο είναι το ίδιο το μόριο της γλυκόζης και ρυθμίζουν τα ένζυμα του μεταβολισμού, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε πάρα πολλούς οργανισμούς (βλέπε εισαγωγή Παρ. 1.3). Επιπλέον, στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* αρκετά από τα γονίδια που συμμετέχουν στις σηματοδοτικές αυτές πορείες, συμμετέχουν και στη ρύθμιση της πρόσληψης της γλυκόζης (Bailey and Woodward 1984, Bisson 1988, Flick and Johnston 1991, Ozcan 1993, Erickson and Johnston 1994, Ozcan and Johnston 1993, Teusink et al. 1997).



Στο βακτήριο *B. subtilis*, η πρωτεΐνη Hpr η οποία συμμετέχει στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης PTS, παίζει σημαντικό ρόλο στις σηματοδοτικές πορείες που ενεργοποιούνται από τη γλυκόζη (Reizer et al. 1998).

Μία ανάλογη σηματοδοτική πορεία, είναι πιθανό να υπάρχει και στο βακτήριο *Z. mobilis*. Αυτή η θεωρητική σηματοδοτική πορεία η οποία ενεργοποιείται από αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, είναι υπεύθυνη για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων που μεταφέρονται από θρεπτικά μέσα χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα την σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.

6.2 Απομόνωση και ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός κλώνου DNA ο οποίος αναπληρώνει την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης

Για την περαιτέρω μελέτη της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, επιχειρήθηκε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός τμήματος DNA το οποίο όταν εκφράζεται στο μεταλλαγμένο στέλεχος, αναπληρώνει την ευαισθησία του σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Για τον σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητη η εύρεση των κατάλληλων επιλεκτικών συνθηκών διάκρισης μεταξύ ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους και του φυσικού τύπου. Μετά από δοκιμή διάφορων συγκεντρώσεων, βρέθηκε ότι τα κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, ενώ τα κύτταρα του ATCC 10988 αναπτύσσονται ανεμπόδιστα (Σχήμα 36, Παρ.5.1).

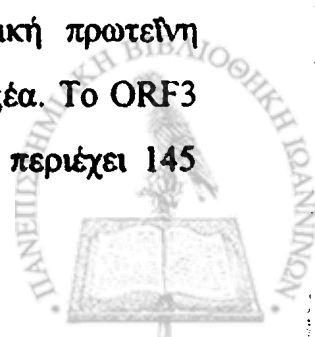
Με βάση αυτό το μέσο επιλογής, απομονώθηκαν μετά από συζευκτική μεταφορά κατάλληλης γονιδιακής βιβλιοθήκης δύο μετασυζευγμένες αποικίες CU1Rif2, οι οποίες εμφάνιζαν ανθεκτικότητα φυσικού τύπου σε στερεό

θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Από τις αποικίες αυτές απομονώθηκαν δύο διαφορετικοί κλώνοι με επικαλυπτόμενες περιοχές (Σχήμα 37, Παρ. 5.2). Ο ένας από τους δύο κλώνους χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για την υποκλωνοποίηση μικρότερων λειτουργικών τμημάτων που αναπληρώνουν την ευαισθησία του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης (Σχήμα 36, Παρ. 5.1). Έτσι, αρχικά απομονώθηκε ένα μικρότερο τμήμα του κλώνου μεγέθους 9.5 kb το οποίο αναπλήρωνε το στέλεχος CU1Rif2 (Παρ. 5.3). Το τμήμα αυτό χαρτογραφήθηκε με σκοπό την διευκόλυνση των περαιτέρω υποκλωνοποιήσεων (Σχήμα 43, Παρ. 5.4). Στη συνέχεια από το λειτουργικό τμήμα των 9.5 kb απομονώθηκαν τα λειτουργικά τμήματα μεγέθους 8.9, 5.1 και τελικά 4.5 kb (Παρ. 5.5).

Επιπλέον, απομονώθηκε ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη από τη γονιδιακή βιβλιοθήκη του πατρικού στελέχους ATCC 10988. Ο κλώνος αυτός ήταν γενετικά ο ίδιος με τον κλώνο από το γονιδίωμα του στελέχους CP₄ (Σχήμα 55, Παρ. 5.10). Επιπλέον, πειράματα υβριδισμού έδειξαν ότι οι δύο κλώνοι υβριδίζουν ισχυρά με χρωμοσωμικό DNA του στελέχους CU1Rif2 (Σχήμα 55, Παρ. 5.10), γεγονός που δείχνει ότι κάποια σημειακή μετάλλαξη στο CU1Rif2 έχει προκαλέσει την αδυναμία ανάπτυξης του σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω ο κλώνος που αναπληρώνει το CU1Rif2, το τμήμα των 4.5 kb, υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 και έγινε ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του (Σχήμα 57, Παρ. 5.11). Η ανάλυση αυτή έδειξε την ύπαρξη τεσσάρων κωδικεύουσων περιοχών (ORF1-4, Σχήμα 56, Παρ. 5.11) οι οποίες και είναι πολύ πιθανό να συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο.

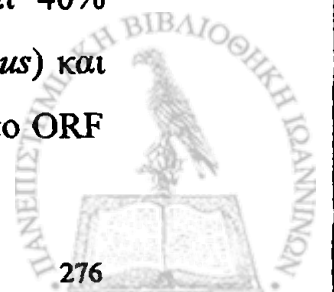
Το ORF1 κωδικεύει μία θεωρητική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 18140 Da, η οποία περιέχει 167 αμινοξέα. Το ORF2 μία θεωρητική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 17629 Da, η οποία περιέχει επίσης 167 αμινοξέα. Το ORF3 μία θεωρητική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 15590 Da, η οποία περιέχει 145



αμινοξέα. Το ORF4 μία θεωρητική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 23680 Da, η οποία περιέχει 220 αμινοξέα. Αυτές οι τέσσερις θεωρητικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα (17-25% μη φορτισμένες πολικές ομάδες και 24-27% φορτισμένες ομάδες). Ακόμα, μετά από ανάλυση της δευτεροταγούς δομής, βρέθηκε ότι το 30-45% των πρωτεϊνικών τμημάτων προβλέπεται ότι έχουν δομή α-έλικας. Καμία από τις τέσσερις πρωτεΐνες δεν μπορεί να θεωρηθεί μεμβρανική πρωτεΐνη σύμφωνα με τη δομή της. Η θεωρητική πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το ORF4, παρουσιάζει μία μικρή ομολογία με υδροφοβικές σηματοδοτικές αλληλουχίες με πιθανή θέση διάσπασης στο αμινοξύ 49.

Η περιοχή που περιέχει το σύμπλεγμα των τεσσάρων ORFs υποκλωνοποιήθηκε ως τμήμα μεγέθους 3.3 kb στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 (Σχήμα 59, Παρ. 5.12) και αποδείχθηκε ότι αναπλήρωνε την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36, Παρ. 5.1). Αντίθετα, το τμήμα μεγέθους των 3.1 kb (το οποίο περιέχει τα ORF1-3 και τμήμα του ORF4, Σχήμα 60, Παρ. 5.12) δεν την αναπλήρωνε (Σχήμα 36, Παρ. 5.1). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι για την αναπλήρωση της ευαισθησίας του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλου του συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs.

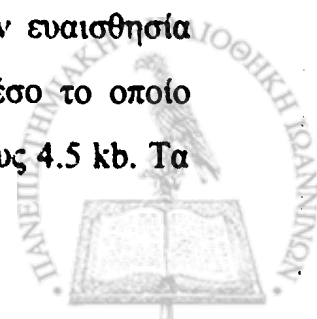
Μετά από αναζήτηση για ομολογίες αυτών των τεσσάρων πρωτεϊνικών μορίων με άλλες γνωστές πρωτεΐνες σε τράπεζα δεδομένων (EMBL-Heidelberg), βρέθηκαν ομοιότητες για τα ORF1, ORF2 και ORF4 μόνο με θεωρητικές πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργία δεν είναι γνωστή. Η περιοχή που περιέχει τις θεωρητικές πρωτεΐνες ORF1 και ORF2 παρουσιάζει πολύ ισχυρή ομολογία με ένα ORF του βακτηρίου *Rhodobacter capsulatus*, το οποίο βρίσκεται πριν από το γονίδιο *nifR3* που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της πρόσληψης αζώτου (Foster-Hartnett et al. 1993). Το ORF1 δείχνει 40% ομολογία στα 137 αμινοξέα (περιοχή 10-146 στο ORF του *R. capsulatus*) και το ORF2 δείχνει 59% ομολογία στα 160 αμινοξέα (περιοχή 226-376 στο ORF



του *R. capsulatus*). Επιπλέον, το ORF2 έχει 50-54% ομολογία με ένα σύνολο αλληλουχιών ομόλογων στο C-τελικό άκρο (περιοχή 226-376) του ORF του *R. capsulatus*. Μία από αυτές τις αλληλουχίες είναι ένα ORF του βακτηρίου *B. subtilis* το οποίο περιέχει 158 αμινοξέα και βρίσκεται ανοδικά από το γονίδιο *gluX* που κωδικεύει το ένζυμο γλουταμυλο-tRNA συνθετάση (Gagnon et al. 1994). Μια άλλη από αυτές τις αλληλουχίες είναι ένα ORF του βακτηρίου *E. coli* που βρίσκεται ανοδικά από ένα σύμπλεγμα γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην επιβίωση των κυττάρων στη στατική φάση (Li et al. 1994). Καμία σημαντική ομολογία δεν βρέθηκε για το ORF3. Τέλος, το ORF4 παρουσιάζει 40-46% ομολογία στη περιοχή των 150-170 τελευταίων αμινοξέων του, με ένα ORF του βακτηρίου *E. coli* (Ehlert et al. 1995), του βακτηρίου *Enterobacter agglomerans* και του βακτηρίου *Pseudomonas putida*, το οποίο περιέχει 160-165 αμινοξέα και εντοπίζεται ανοδικά από το γονίδιο *recA*. Ακόμα βρέθηκε ομολογία ανάμεσα στο ORF2 και ένα ORF του βακτηρίου *Thermotoga maritima*, το οποίο περιέχει 177 αμινοξέα και εντοπίζεται ανοδικά από τα γονίδια που κωδικεύουν χημειοτακτικούς παράγοντες (*cheA*, *cheW* και *cheY*, Swanson et al. 1996). Το γονίδιο *cheY*, βρίσκεται συνήθως πριν από ένα *recA* γονίδιο (Chen and Michel. 1998). Τέλος, το ORF2 δείχνει 33-35% ομολογία με την καρβοξυτελική περιοχή ενός ORF του βακτηρίου *Streptococcus pneumoniae* και του βακτηρίου *B. subtilis* το οποίο επίσης εντοπίζεται ανοδικά από ένα γονίδιο *recA* (Martin et. al 1995). Οι παραπάνω ομολογίες εκ πρώτης όψεως φαίνεται ότι δεν έχουν σχέση με το χαρακτήρα του CUIRif2.

6.3 Μερικός χαρακτηρισμός του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης

Για τον χαρακτηρισμό του κλώνου που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε στερεό θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει 10% γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο κλώνος μεγέθους 4.5 kb. Τα



αποτελέσματα όμως επαναλήφθηκαν και τους με μεγαλύτερους κλώνους καθώς και με τον κλώνο που περιέχει μόνο το σύμπλεγμα των τεσσάρων ORFs μεγέθους 3.3 kb.

Αρχικά μελετήθηκε αν το θεωρητικό σύμπλεγμα των τεσσάρων γονιδίων κωδικεύει ένα δεύτερο εναλλακτικό σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. mobilis*.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, καμία από τις τέσσερις θεωρητικές πρωτεΐνες που κωδικεύουν τα τέσσερα ORFs δεν προβλέπεται να έχουν δομή μεμβρανικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, το σύμπλεγμα των τεσσάρων γονιδίων δεν βρέθηκε να έχει ομολογία με κανένα από τους γνωστούς μεταφορείς.

Η παραπάνω θεωρητική υπόθεση επιβεβαιώθηκε και πειραματικά εφόσον το τμήμα των 3.3 kb δεν αναπλήρωνε μεταλλαγμένα στελέχη *E. coli* που είναι ελαττωματικά ως προς την πρόσληψη γλυκόζης (Σχήμα 64, Παρ. 5.13). Επιπλέον, το γονίδιο *glf* δεν αναπλήρωνε την ευαισθησία του CUIRif2 σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης (Σχήμα 36, Παρ. 5.1).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συναινούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλεγμα των τεσσάρων γονιδίων που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν κωδικεύει ένα δεύτερο εναλλακτικό σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης.

Κύτταρα CUIRif2 που περιείχαν τους λειτουργικούς κλώνους, αναπτύσσονται χωρίς περίοδο εφησυχασμού σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης ή 2-δεοξυγλυκόζης (Σχήματα 48, 49, Παρ. 5.6). Επιπλέον, κύτταρα CUIRif2 αναπτύσσονται χωρίς περίοδο εφησυχασμού σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα CUIRif2 που περιέχουν τους λειτουργικούς κλώνους (Σχήμα 61, Παρ. 5.12). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, είτε είναι προϊόν των γονιδίων του θεωρητικού συμπλέγματος, είτε το σύμπλεγμα αυτό ρυθμίζει την παραγωγή του ή κάποιες παραμέτρους της λειτουργίας του (έκκριση στο υπερκείμενο, σύνδεση με τα

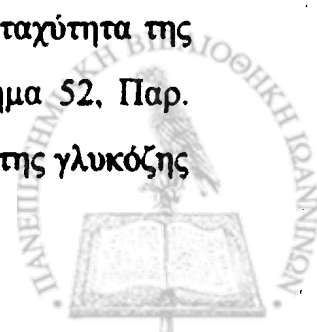


κύτταρα κ.λ.π). Επιπλέον, για ακόμα μία φορά αποδεικνύεται ότι το σηματοδοτικό μόριο για την έναρξη της λειτουργίας του μηχανισμού της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, είναι το ίδιο το μόριο της γλυκόζης. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει το θεωρητικό σύμπλεγμα των τεσσάρων γονιδίων, η έκφραση του οποίου πιθανά επάγεται ή επηρεάζεται από το ίδιο το μόριο της γλυκόζης.

Η σύσταση των φωσφολιπιδίων μετασυζευγμένων κύτταρων CUIRif2 που περιέχουν τους λειτουργικούς κλώνους, βρέθηκε ίδια με αυτή του CUIRif2. Τα μετασυζευγμένα κύτταρα παρουσίαζαν την ίδια μειωμένη περιεκτικότητα φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (Πίνακας 23, Παρ. 5.7). Φαίνεται λοιπόν, ότι ο κλώνος που αναπληρώνει την ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν αναπληρώνει το μειωμένο ποσοστό φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης του στελέχους αυτού. Άρα, η μείωση του ποσού της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης στη μεμβράνη του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 δεν είναι πιθανό να σχετίζεται με την μειωμένη ανθεκτικότητα σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Αντίθετα με τα λιπίδια, η δραστηριότητα της γλυκοκινάσης στα μετασυζευγμένα κύτταρα αυξανόταν σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης όπως ακριβώς και σε κύτταρα του φυσικού τύπου (Πίνακας 24, Σχήμα 50, Παρ. 5.8.1). Επιπλέον, στα μετασυζευγμένα αυτά κύτταρα η γλυκονινάση λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο (κινητική Michaelis-Menten), με την ίδια συγγένεια (ίδιο K_m) και την ίδια καταλυτική ικανότητα (παρόμοιο k_{cat}), με τις γλυκοκινάσες των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2 (Πίνακας 25, Σχήμα 51, Παρ. 5.8.2). Ο κλώνος λοιπόν που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αναπληρώνει και τη δραστηριότητα γλυκοκινάσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

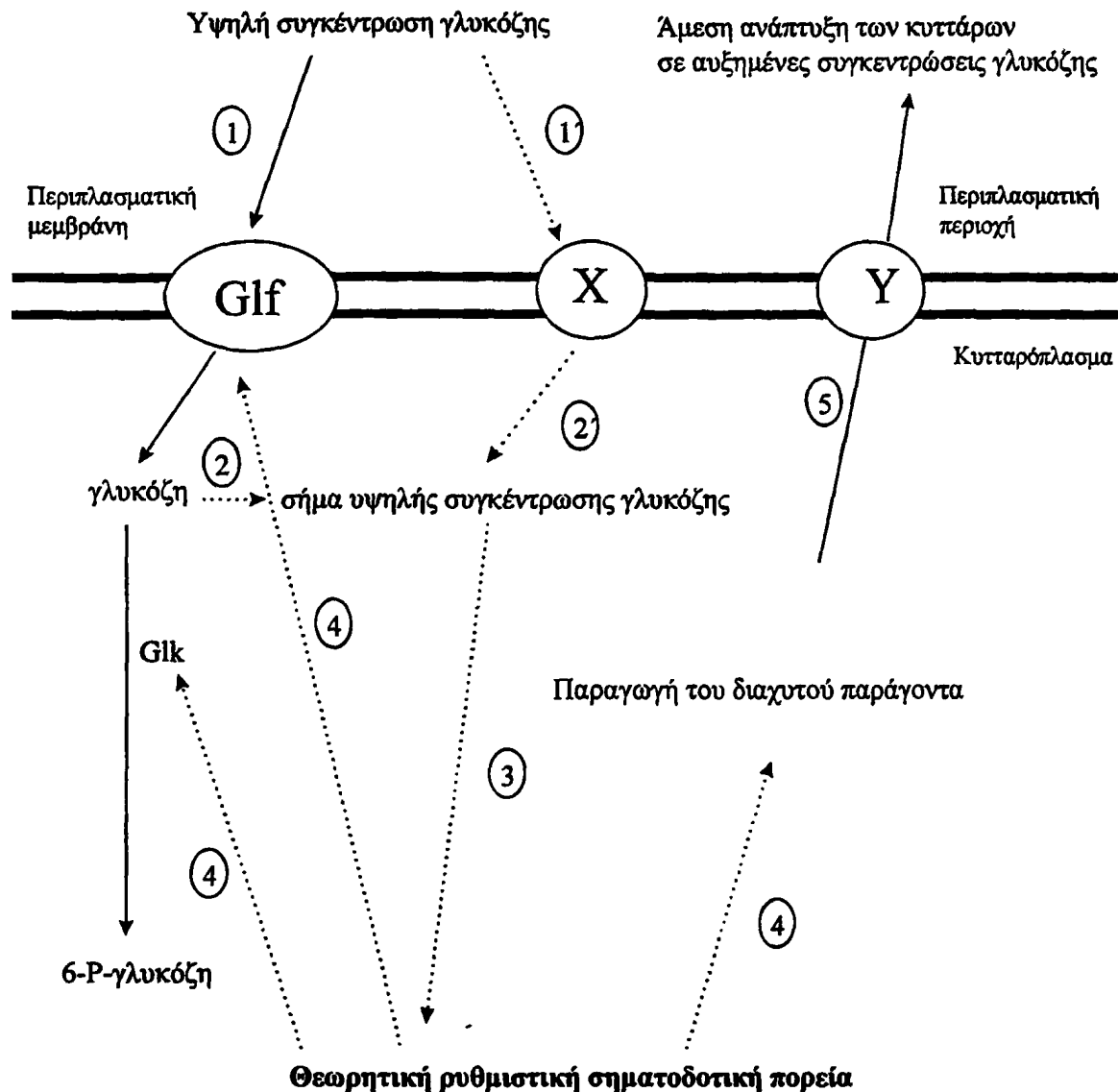
Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με την αρχική ταχύτητα της πρόσληψης της γλυκόζης από τα μετασυζευγμένα κύτταρα (Σχήμα 52, Παρ. 5.9.1). Η πρόσληψη γλυκόζης δεν μειώνεται όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης



αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο όπως συμβαίνει στην περίπτωση του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2. Επιπλέον, στα μετασυζευγμένα αυτά κύτταρα η πρόσληψη της γλυκόζης γίνεται με τον ίδιο τρόπο (κινητική Michaelis-Menten) και την ίδια συγγένεια (παρόμοιο K_m) όπως και στα στελέχη ATCC 10988 και CUIRif2 (Πίνακας 26, Σχήμα 53, Παρ. 5.9.2). Ο κλώνος λοιπόν, που αναπληρώνει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αναπληρώνει και τη ρύθμιση στην πρόσληψη της γλυκόζης όταν η συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.

Από τα παραπάνω φαίνεται, ότι ο κλώνος που αποκαθιστά το φαινότυπο του φυσικού τύπου στο στέλεχος CUIRif2 αποτελείται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων τα προϊόντα των οποίων πιθανότατα είναι ρυθμιστικά. Το ρυθμιστικό σύστημα στο οποίο συμμετέχουν τα γονίδια αυτά, ρυθμίζει την παραγωγή ή τη λειτουργία ενός παράγοντα που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο και είναι υπεύθυνος για τη έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* και παράλληλα ρυθμίζει την πρόσληψη και την φωσφορυλίωση της γλυκόζης όταν η συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να σχεδιαστεί ένα μοντέλο του μηχανισμού της ανθεκτικότητας των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 65.



ΣΧΗΜΑ 65: Προτεινόμενο μοντέλο του μηχανισμού ανθεκτικότητας των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

1: Πρόσληψη της γλυκόζης, 2: Δημιουργία ενδοκυτταρικού σήματος υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης

1': Διέγερση πιθανού μεμβρανικού υποδοχέα, 2': Δημιουργία ενδοκυτταρικού σήματος υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης

3: Ενεργοποίηση της θεωρητικής ρυθμιστικής σηματοδοτικής πορείας

4: Ρύθμιση της σύνθεσης του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης καθώς και της παραγωγής του διαχυτού παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης

5: Έκκριση του διαχυτού παράγοντα από έναν πιθανό μεταφορέα

X: Πιθανός μεμβρανικός υποδοχέας μεταβίβασης σήματος

Y: Πιθανός μεταφορέας διαχυτού παράγοντα

(.....): Ρύθμιση ή μεταφορά σήματος

(—): Μεταβολική πορεία



6.4 Συμπεράσματα

- 1) Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι ειδικός και ανεξάρτητος από γενικούς μηχανισμούς οσμωρύθμισης που πιθανόν να υπάρχουν στο βακτήριο αυτό.
- 2) Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* είναι μάλλον ανεξάρτητος από τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του.
- 3) Ο παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, εκκρίνεται από τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο.
- 4) Ο παράγοντας αυτός πιθανά είναι προϊόν ενός ρυθμιστικού συστήματος, το οποίο λειτουργεί μέσω μίας σηματοδοτικής πορείας όπου το σηματοδοτικό μόριο είναι η ίδια η γλυκόζη.
- 5) Το ρυθμιστικό αυτό σύστημα πιθανώς ρυθμίζει παράλληλα τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης.
- 6) Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αναπλήρωση του παραπάνω ρυθμιστικού συστήματος καθώς και για την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης βρίσκονται σε ένα σύμπλεγμα με πιθανή δομή οπερονίου.
- 7) Τα γονίδια αυτά πιθανά κωδικεύουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μία θεωρητική σηματοδοτική πορεία (με σηματοδοτικό μόριο τη γλυκόζη) και ρυθμίζουν τη παραγωγή ή τη λειτουργία του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε

αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης ενώ παράλληλα ρυθμίζουν και τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο.

8) Ο παραπάνω ρυθμιστικός μηχανισμός μπορεί να διευκρινιστεί περαιτέρω, με τον προσδιορισμό της χημικής φύσης του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης και με την απομόνωση και χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών που κωδικεύουν τα τέσσερα γονίδια του συμπλέγματος που αναπληρώνει την ευαισθησία του CUIRif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτήριο *Z. mobilis*, είναι ένα αρνητικό κατά Gram, αιθανολοπαραγωγό βακτήριο, το οποίο χρησιμοποιεί την γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου αυτού είναι η ανθεκτικότητά του σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια μελέτης του μηχανισμού αυτού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος CUIRif2, το οποίο δεν αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, ενώ σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, αναπτύσσεται μετά από μία φάση εφησυχασμού 22 ωρών περίπου.

Το στέλεχος CUIRif2 αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις άλλων σακχάρων, εκτός της γλυκόζης και 2-δεοξυγλυκόζης. Επιπλέον, τα κύτταρα του CUIRif2 αναπτύσσονται αμέσως σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη όταν έχουν προεπωαστεί για 22 ώρες σε ένα θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη ή 2-δεοξυγλυκόζη, καθώς επίσης σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης προεπωασμένο με κύτταρα του φυσικού τύπου. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι πιθανό τα κύτταρα *Z. mobilis*, όταν βρεθούν σε θρεπτικό μέσο υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζης, να παράγουν ένα παράγοντα ο οποίος εκκρίνεται από τα ίδια τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο και ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Επιπρόσθετα, η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης δεν φαίνεται να λειτουργεί σωστά στο μεταλλαγμένο στέλεχος όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί. Η σωστή λειτουργία τους όμως δεν φαίνεται να αποκαθίσταται σε κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους που επωάζονται με τον παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης τους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού τύπου απομονώθηκε ένα τμήμα DNA, το οποίο όταν εκφραστεί στα κύτταρα του στελέχους CUIRif2 αναπληρώνει την ευαισθησία τους σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, καθώς και την σωστή λειτουργία της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης. Το τμήμα αυτό αποτελείται από ένα σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων τα οποία πιθανότατα συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Τα τέσσερα αυτά γονίδια κωδικεύουν τέσσερις θεωρητικές πρωτεΐνες 167, 167, 145 και 220 αμινοξέων, αντίστοιχα.

Το θεωρητικό σύμπλεγμα γονιδίων μπορεί να κωδικεύει μια σειρά ρυθμιστικών πρωτεϊνών οι οποίες είναι πιθανό να συμμετέχουν σε μία σηματοδοτική πορεία με σηματοδοτικό μόριο τη γλυκόζη. Οι ρυθμιστικές αυτές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη σύνθεση ή τη λειτουργικότητα του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, ενώ παράλληλα ρυθμίζουν τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο.



SUMMARY

Exponentially growing cells of *Zymomonas mobilis* normally exhibit a lag period up to 3 h when transferred from a 2% to 10% glucose liquid medium. A mutant of *Z. mobilis* (CU1Rif2), fortuitously isolated, showed more than 20 h lag period when grown under the same conditions, whereas on a 10% glucose solid medium it failed to grow. The growth of CU1Rif2 on elevated concentrations of other fermentable (sucrose or fructose) or non-fermentable (maltose or xylose) sugars appeared to be normal. Furthermore, presence of sorbitol did not reduce the lag period of CU1Rif2 on 10% glucose medium, indicating that CU1Rif2 is not an osmoregulation deficient mutant. Additionally, CU1Rif2 had a similar phospholipid, fatty acid and hopanoid profile with the wild type. Biochemical analysis of glucose uptake and glycolytic enzymes revealed that glucose transport rate and glucokinase activity of CU1Rif2 cells grown on elevated glucose media were both impaired, whereas glucose-6P-dehydrogenase, pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase were unaffected. Surprisingly, CU1Rif2 cells grew normally without any delay on 10% glucose medium in which wild type cells had been incubated for 3 h and removed at the beginning of their exponential phase. This finding supports the idea that in *Z. mobilis* a diffusible factor triggers growth on 10% glucose medium.

By using a wild-type *Z. mobilis* genomic library a DNA fragment of 4.5 kb was isolated which restores the glucose-defective phenotype of CU1Rif2.



Complemented cells produced the diffusible factor mentioned above. Moreover, glucokinase activity and glucose uptake were also restored. Sequencing of the isolated DNA fragment from both strands revealed the presence of a gene cluster consisting of four putative coding regions, 167, 167, 145 and 220 amino acid-long respectively, with typical *Z. mobilis* codon usage, and individual Shine-Dalgarno consensus sites. The cluster is preceded by *Z. mobilis* consensus -35 and -10 promoter elements about 100 bp upstream of the start codon of the first coding region. However, strong homologies were not detected on Blast2 (EMBL-Heidelberg) computer search with known protein sequences. The putative gene cluster may encode a set of regulatory proteins affecting at least the rate of glucose uptake and glucokinase activity in *Z. mobilis*, and/or additionally producing a diffusible factor that triggers growth on elevated glucose concentrations.



Βιβλιογραφία

Afendra A. S., and C. Drainas. 1987. Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 133:27-134.

Afendra A. S., G. Vartholomatos, N. Arvanitis, and C. Drainas. 1999. Characterization of the mobilization region of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3. Plasmid. 41:73-77.

Ait-Abdekader, N., G. Pencreach, F. Joset, and J. Baratti. 1995. Isolation and properties of mutants of *Zymomonas mobilis*, deficient in sugar assimilation. Appl. Environm. Microbiol. 62:1096-1098.

Ait-Abdekader, N., and J. Baratti. 1995. Ethanol fermentation using a glucose negative mutant of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Techniques. 9:315-320.

Albertyn, J., S. Hohmann, J. M. Thevelein, B. A. Prior. 1994a. *GPDI* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high osmolarity glycerol response pathway. Mol. Cell. Biol. 14:4135-4144.

Albertyn, J., S. Hohmann, B. A. Prior. 1994b. Characterization of osmotic stress response in *S. cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol 3-phosphate dehydrogenase independently. Curr. Genet. 25:12-18.

Aldrich, H. C., L. McDowell, M. De FS. Barbosa, L. P. Yomano, R. K. Scopes, and L. O. Ingram. 1992. Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 174:4504-4508.

Algar, E.M., and R. K. Scopes. 1985. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 2:275-287.



An, H., R. K. Scopes, M. Rodriguez, K. F. Keshav, and L. O. Ingram. 1991. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. *173:5975-5982*.

Andre, L., A. Hemming, and L. Adler. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett. 286:13-17*.

Arvanitis, N., A. S. Afendra, and C. Dramas. 1995. *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3 expresses mobilization functions in *Escherichia coli* JM83 and RR1. *Biotechnol. Lett. 17:681-686*.

Bachem, S., N. Faires, and J. Stulke. 1997. Characterization of the phosphorylation sites of *Bacillus subtilis* glucose permease by site-directed mutagenesis: implication in glucose transport and catabolite repression. *FEMS Microbiol. Lett. 156:233-238*.

Bailey, R. B., and A. Woodward. Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. 193:507-512*.

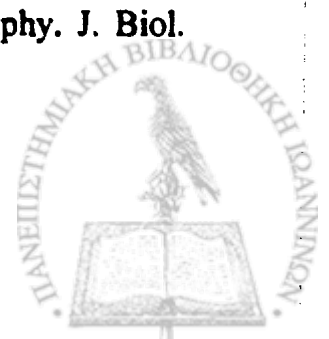
Baker, H. V. 1986. Glucolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence of GCR1, null mutants, and evidence for expression. *Mol. Cell Biol. 6:3774-3784*.

Barbosa, M. F., L. P. Yomano, and L. O. Ingram. 1994. Cloning, sequencing and expression of *stress* genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*: the groESL operon. *Gene. 148:51-57*.

Barnell, W., K. Cheol YI, and T. Conway. 1990. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J. Bacteriol. 172:7227-7240*.

Barnell, W. O., J. Liu, T. L. Hesman, M. C. O'Neill, and T. Conway. 1992. The *Zymomonas mobilis* *glf*, *zwf*, *edd* and *glk* genes form an operon: localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. *J. Bacteriol. 174:2816-2823*.

Bartlett, G. R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem. 234:466-468*.



Barrow, K. D., J. G. Collins, P. L. Rogers, and G. M. Smith. 1983. Lipid composition of an ethanol-tolerant strain of *Zymomonas mobilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **753**:324-330.

Barrow, K. D., J. G. Collins, D. A. Leigh, P. L. Rogers, and R. G. Warr. 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:225-232.

Barrow, K. D., J. G. Collins, R. S. Norton, P. L. Rogers, and G. M. Smith. 1984. ³¹P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **259**:5711-5716.

Beaucamp, K., H. U. Bergmeyer, and H. O. Beutler. 1974. Section B: Biochemical reagents. III Coenzymes, metabolites and other biochemical reagents. *Methods of enzymatic analysis*, vol. 1, pp 523-526. Ed: Hans Ulrich Bergmeyer. Acad. Press, Inc. N.Y. San Francisco, London.

Begley, G. S, K. A. Warner, J. C., Arents, P. W. Postma, and G. R. Jacobson. 1996. Isolation and characterization of a mutation that alters the substrate specificity of the *Escherichia coli* glucose permease. *J. Bacteriol.* **178**:940-942.

Bergmeyer, H. U., E. Bernt, M. Grassl, and G. Michal. 1974. III₃ Evaluation of experimental results. *Methods of enzymatic analysis*, vol. 1, pp 308-317. Ed: Hans Ulrich Bergmeyer. Acad. Press, Inc. N.Y. San Francisco, London.

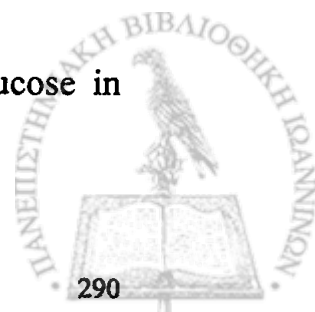
Berthelin, B., J. Zucca, J. F. Mescle. 1985. Selection et analyse de mutants thermotolerants de *Zymomonas mobilis* producteurs d' ethanol. *Can. J. Microbiol.* **31**:934-937.

Billard, P., S. Menart, J. Blaisonneau, M. Bolotin-Fukuhara, H. Fukuhara, and M. Wesolowski-Louvel. 1996. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.* **178**:5860-5866.

BIOSOFT 1991, in *Ultrfit*, The non-linear curve fitting package. pp. 5-58, Cambridge, U.K.

Bisson, L. B., and D. G. Fraenkel. 1982. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1730-1734.

Bisson, L. B., and D. G. Fraenkel. 1983. Transport of 6-Deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **155**:995-1000.



Bisson, L. B., and D. G. Fraenkel. 1984. Expression of kinase-dependent uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**:1013-1017.

Bisson, L. B., L. Neigeborn, M. Carlson, and D. G. Fraenkel. 1987. The *SNF3* gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**:1656-1662.

Bisson, L. B. 1988. High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. *J. Bacteriol.* **170**:4838-4845.

Bisson, L. B., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg, and D. A. Lewis. 1993. Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**:259-308.

Blaisonneau, J., H. Fukuhara, and M. Wesoloswki-Louvel. 1997. The *Kluyveromyces lactis* equivalent of casein kinase I is required for the transcription of the gene encoding the low-affinity glucose permease. *Mol. Gen. Genet.* **27**:469-477.

Blazquez, M. A., R. Stucka, H. Feldmann, and C. Gancedo. 1994. Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **176**:3895-3902.

Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.

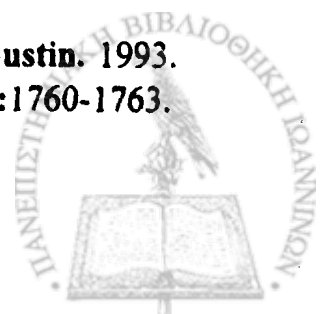
Bloberg, A., and L. Adler. 1989. Roles of glycerol and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**:1087-1092.

Boles, E., and C. P. Holleberg. 1997. The molecular genetics of the hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:85-111.

Brestic-Goachet, N., P. Gunasekaran, B. Cami, and J. Baratti. 1989. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:893-902.

Brestic-Goachet, N., P. Gunasekaran, B. Cami, and J. Baratti. 1990. Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **153**:219-225.

Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, N. C. Gustin. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* **259**:1760-1763.



Bringer, S., H. Sahn, and W. Swyzen. 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **14**:311-319.

Bringer, S., R. K. Finn, and H. Sahn. 1984. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **139**:376-381.

Bringer, S., T. Hartner, K. Poralla, and H. Sahn. 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and fatty acid pattern in batch and continuous cultures. *Arch. Microbiol.* **140**: 312-316.

Bringer-Meyer, S., M. Sclar, and H. Sahn. 1985. *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**:134-139.

Bringer-Meyer, S., K. L. Schimz, and H. Sahn. 1986. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146**:105-110.

Bringer-Meyer, S., and H. Sahn. 1987. Metabolic shifts in *Zymomonas mobilis* in response to growth conditions. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**:131-142.

Bringer-Meyer, S., and H. Sahn. 1989. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylate and malic enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:529-536.

Bringer-Meyer, S., and H. Sahn. 1993. Formation of acetyl-CoA in *Zymomonas mobilis* by pyruvate by a pyruvate dehydrogenase complex. *Arch. Microbiol.* **159**:197-199.

Broek, D., T. Toda, T. Michaeli, L. Levin, C. Birchmeier, M. Zoller, S. Powers, and M. Wingler. 1987. The *S. cerevisiae* CDC25 gene products regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell.* **13**:789-799.

Browne, G. M., M. L. Skotnicki, A. E. Goodman and P. L. Rogers. 1984. Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid.* **12**:211-214.

Bruner, R. 1964. Determination of reducing value. 3,5-dinitrosalicylic acid method. *Methods in carbohydrate chemistry.* Vol. IV, R.L. Whistler, Acad. Press Starch.

Buchholz, S. E., M. M. Dooley, and D. E. Eveleigh. 1987. *Zymomonas*-an alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.* **5**:199-204.



Buchholz, S. E., P. O' Mullan, and D. E. Eveleigh. 1988. Growth of *Zymomonas* CP4 on mannitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:275-281.

Buchholz, S. E., M. M. Dooley, and D. E. Eveleigh. 1989. Growth of *Zymomonas mobilis* on lactose: gene cloning in combination with mutagenesis. *J. Ind. Microbiol.* **4**:19-27.

Buchholz, S. E., and D. E. Eveleigh. 1990. Genetic modification of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Advances* **8**:547-581.

Byun, M. O-K., T. B. Kaper, and L. O. Ingram. 1986. Construction of a new vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol.* **1**:9-15.

Candy, J. M., and R. G. Duggleby. 1998. Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1385**:323-338.

Carey, V. C., and L. O. Ingram. 1983. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. *J. Bacteriol.* **154**:1291-1300.

Carey, V. C., S. K. Walia and L. O. Ingram. 1983. Expression of a lactose transposon in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **46**:1163-1168.

Carlson, M. 1998. Regulation of glucose utilization in yeast. *Cur. Op. Genet. Develop.* **8**:560-564.

Castellar, M. R., F. Borrego, M. Canovas, A. Manjon, and J. Iborra. 1989. Continuous ethanol production at high glucose concentrations by a passively immobilized *Zymomonas mobilis*. **31**:249-252.

Celenza J. L., L. Marshall-Carlson, and M. Carlson. 1988. The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2130-2134.

Chauvaux, S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier Jr. 1998. CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:491-497.

Chen, X. J., M. Wesolowski-Louvel, and H. Fukuhara. 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.* **233**:97-105.



Chen, I-P., and H. Michel. 1998. Cloning, sequencing and characterization of the *recA* gene from *Rhodospseudomonas viridis* and construction of a *recA* strain. *J. Bacteriol.* **180**:3227-3232

Clifton, D., S. B. Weinstock, and D. G. Fraeknel. 1978. Glycolysis mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet.* **88**:1-11.

Clifton, D., D. G. Fraenkel. 1981. The *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**:13074-13078.

Conway, T., Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffman, and L. O. Ingram. 1987. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* **169**:949-954.

Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman, and L. O. Ingram. 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **169**:2591-2597.

Conway, T., G. W. Sewell, and L. O. Ingram. 1987. Glyceralehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing and identification of a promoter region. *J. Bacteriol.* **169**:5653-5662.

Conway, T., and L. O. Ingram. 1988. Phosphoglycerate kinase from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing and localization within the *gap* operon. *J. Bacteriol.* **170**:1926-1933.

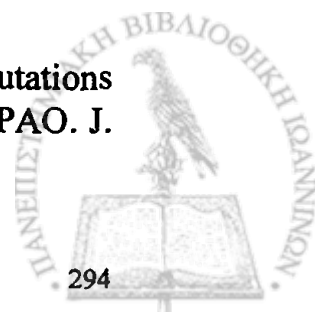
Conway, T., R. Fliege, D. Jones-Kilpatric, J. Liu, W. O. Barnell, and S. E. Egan. 1991. Cloning, characterization and expression of the *Zymomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Doudoroff pathway. *Mol. Microbiol.* **5**:2901-2911.

Conway, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**:1-28.

Coons, D. M., R. B. Boulton, and L. F. Bisson. Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:3251-3258.

Cuskey, S. M., J. A. Wolff, P. V. Phibbs, Jr, and R. H. Olsen. 1985. Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **162**:865-871.

Cuskey, S. M., and P. V. Phibbs. 1985. Chromosomal mapping of mutations affecting glycerol and glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **162**:872-880.



Davenport, K. R., M. Sohaskey, Y. Kamada, D. E. Levin, and M. C. Gustin. 1995. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**:30157-30161.

Davis, R. J. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *TIBS.* **19**:470-473.

Deanda, K., M. Zhang, C. Eddy, and S. Picataggio. 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**:4465-4470.

Diefenbach, R. J., and R. G. Duggleby. 1991. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Structure and re-activation of apoenzyme by the cofactors thiamin diphosphate and magnesium ion. *Biochem. J.* **276**:439-445.

Delgado, O. D., C. M. Abate, and F. Sineriz. 1995. Construction of an integrative shuttle for *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1321**:23-26.

De Vendittis, E., Vitelli, R. Zahn, and O. Fasano. 1986. Suppression of defective RAS1 and RAS2 functions in yeast by an adenylate cyclase activated by a single amino acid change. *EMBO J.* **20**:3657-3663.

Di Marco, A. A., A. H. Romano. 1985. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ Microbiol.* **44**:385-418.

Dobritzsch, D., S. Koning, G. Schneider, and G. Lu. 1998. High resolution crystal of pyruvate decarboxylate from *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **273**:20196-20204.

Doelle, H. W. 1982. Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase of *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**:241-246.

Doelle, H. W., and P. F. Greenfield. 1985. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**:405-410.

Doelle, M. B., R. J. Millichip, and H. W. Doelle. 1989. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. *Pr. Biochem.* **137**-140.

Doelle, H. W., L. D. Kennedy, and M. B. Doelle. 1991. Scale-up of ethanol production from sugarcane using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **13**:131-136.



Doelle, H. W., M. B. Doelle, L. Kirk, R. Critterden, and H. Toh. 1993. *Zymomonas mobilis*-Science and industrial application. *Crit. Rev. Biotechn.* **13**:57-98.

Drainas, C., A. A. Slater, L. Coggins, P. Montague, R. G. Costa, W. M. Ledingham, and J. R. Kinghorn. 1983. Electron microscopic analysis of *Zymomonas mobilis* strain ATCC 10988 plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.* **5**:405-408.

Drainas, C., M. A. Typas, and J. R. Kinghorn. 1984. A derivative of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 with impaired ethanol production. *Biothechnol. Lett.* **6**:37-42.

Drainas, C., G. Vartholomatos, and N. Panopoulos. 1995. The Ice nucleation gene from *Pseudomonas syringae* as sensitive gene reporter for promoter analysis in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **61**:273-277.

Ehlert, K., J. V. Hoeltje, and M. F. Templin. 1995. Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**:761-768.

Entian, K. D. 1980. Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **178**:633-637.

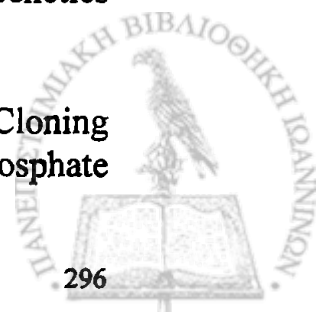
Entian, K. D., and K. U. Frohlich. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **158**:29-35.

Entian, K. D., K. U. Frohlich, and D. Mecke. 1984. Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrate metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **15**:181-186.

Entian, K. D., E. Kopetzki, K. U. Frohlich, and D. Mecke. 1984. Cloning of hexokinase isoenzyme PI from *Saccharomyces cerevisiae*: PI transformants confirm the unique role of hexokinase isoenzyme PII for glucose repression in yeasts. *Mol. Gen. Genet.* **198**:50-54.

Erickson, J. R., and M. Johnston. 1994. Suppressors reveal two classes of glucose repression genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **136**:1271-1278.

Eriksson, P., L. Andre, R. Ansell, A. Blomberg, and L. Adler. 1995. Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate



dehydrogenase (NAD⁺), and its comparison with *GPD1*. *Mol. Microbiol.* **17**:95-107.

Feldmann, S. D., H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1992. Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:354-361.

Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I. A. Wilson, R. A. Lerner, and M. Wigler. 1988. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of epitope addition method. *Mol. Cell Biol.* **8**:22159-2165.

Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1648-1652.

Flesch, G., and M. Rohmer. 1988. Prokaryotic triterpenoids. A novel hopanoid from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.* **262**:673-675.

Flick, J. S., and M. Johnston. 1991. *GGR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5101-5112.

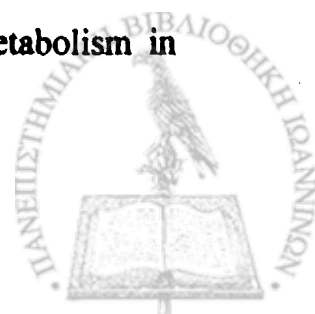
Folin, O., and V. Ciocactus. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**:627-650.

Foster-Hartnett, D., P. J. Cullen, K. K. Gabbert, and R. G. Kranz. 1993. Sequence, genetic, and *lacZ* fusion analyses of a *nifR3-ntrB-ntrC* operon in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* **8**:903-914.

Gagnon, Y., R. Breton, H. Putzer, M. Pelchat, M. Grunberg-Manago, and J. Lapointe. 1994. Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate used for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*

Galani, I., and M. A. Typas. 1989. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. In *Genetic Engineering of Industrial Microorganisms*, pp. 63-64. Salamanca, Spain: Commission of the European Communities.

Gancedo, C., J. M. Gancedo, and A. Sols. 1968. Glycerol metabolism in yeasts. *Eur. J. Biochem.* **13**:247-252.



- Garcia, M. J., G. Rios, R. Ali, J. M. Belles, and R. Seranno.** 1997. Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **143**:1125-1131.
- Garro, O. A., E. Rodriguez, R. Palacios Unda, and D. A. S. Callieri.** 1995. Mathematical modeling of the alcoholic fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **63**:367-373.
- Grinsted, J., and P. M. Bennett.** 1988. Preparational electrophoresis of plasmid DNA. *Meth. Microbiol.* **21**:129-142.
- Goffrini, P., A. A. Algeri, C. Donnini, M. Wesolowski-Louvel, and I. Ferrero.** 1989. *RAG1* and *RAG2*: nuclear genes involved in the dependence/independence on mitochondrial respiratory function for the growth of sugars. *Yeast*. **5**:99-106.
- Goffrini, P., M. Wesolowski-Louvel, I. Ferrero, and H. Fukuhara.** 1990. *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. *Nucleic acids Res.* **18**:5294.
- Goffrini, P., M. Wesolowski-Louvel, and I. Ferrero.** 1991. A phosphoglucose-isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* **228**:401-409.
- Goncales de Lima, O., I. E. Schumacher, and J. M. De Araujo.** 1972. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife.* **12**:57-69.
- Goodman, A. E., A. T. Strzelecki, and P. L. Rogers.** 1984. Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **1**:219-228.
- Gu, W., G. Zhao, C. Eddy, and R. A. Jensen.** 1995. Imidazole acetol phosphate aminotransferase in *Zymomonas mobilis*: molecular genetic, biochemical, and evolutionary analyses. 1995. *J. Bacteriol.* **177**:1576-1584.
- Gunasekaran, P., T. Karunakaran, B. Cami, A. G. Mukundan, L. Preziosi, and J. Baratti.** 1990. Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **172**:6727-6735.
- Gunasekaran, P., A. G. Mukundan, R. Kannan, S. Velmurugan, N. Ait-Abdelkader, E. Alvarez-Macarie, and J. Baratti.** 1995. The *sacB* and *sacC* genes encoding levansucrase and sucrase from a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **17**:635-642.

Gutz, H., H. Heslot, U. Leupold, and N. Loprieno. 1977. *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of genetics. Vol. 1 Chap. C. The fungi. pp. 395-446. Ed. R. C. King, Plenum London.

Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:4895-4901.

Hardy, K. 1981. Bacterial plasmids. T. Neelson L T Ed., Hong Kong.

Hermans, M.A.F., B. Neuss, and H. Sahm. 1991. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **173**: 5592-5595.

Hermans, M. 1992. Ph.D. thesis. University of Dusseldorf, Dusseldorf, Federal Republic of Germany.

Hesman, T. L., W. O. Barnell, and T. Conway. 1991. Cloning, characterization, and nucleotide sequence analysis of a *Zymomonas mobilis* phosphoglucose isomerase gene that is subject to carbon source-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **173**:3215-3223.

Hofer, M., and F. R. Nassar. 1987. Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2163-2172.

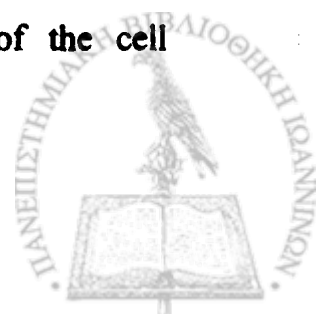
Hoppner, T. C. , and H. W. Doelle. 1983. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylate and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**:152-157.

Hunt, J. C., and P. V. Phibbs. 1983. Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **154**:793-802.

Hylemon, P. B. , and P. V. Phibbs. 1972. Independent regulation of hexose catabolizing enzymes and glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **48**:1041-1048.

Igram, L. O., V. C. Oarey, K. M. Dombeck, A. S. Holt, W. A. Holt, Y. A. Osman and S. K. Walia. 1984. Biochemical and genetic improvement of *Zymomonas mobilis*. *Biomass.* **6**:131-143.

Ingram, L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol.* February, 40-44.



Ingram, L. O., T. Conway, D. P. Clark, G. W. Sewell, and J. F. Preston. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.* **53**:2420-2425.

Ingram, L. O., C. Eddy, K. Mackenzie, T. Conway, and F. Alterthum. 1989. Genetics of *Zymomonas* and ethanol production. *Dev. Indust. Microbiol.* **30**:53-69.

Jiang, Y., C. Davis, and J. R. Broach. 1998. Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the RAS pathway. *EMBO J.* **17**:6942-6951.

Joachimstahl, E., K. D. Haggett, J. H. Jang, and P. L. Rogers. 1998. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnol. Lett.* **20**:137-142.

Kalnenieks, U., A. A. De Graaf, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1993. Oxidative phosphorylation in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **160**:74-79.

Kanagasundaram, V., and R. K. Scopes. 1992. Cloning, sequence analysis and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **174**:1439-1447.

Kanagasundaram, V., and R. K. Scopes. 1992. Isolation and characterization of the gene encoding glucolactonase from *Zymomonas mobilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 198-200.

Kang, H. L., H. S. Kang. 1998. A physical map of the genome of ethanol fermentative bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4, and localization of genes on the map. *Gene.* **206**:223-228.

Karunakaran, T., and P. Gunasekaran. 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of mercuric ion resistance coding genes from *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **19**: 287-300.

Kates, M., D. J. Kushner, and A. T. James. 1962. The lipid composition of *B.cereus* as influenced by the presence of alcohols in the culture medium. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**:83-94.

Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene.* **70**:191-197.



Kemner, J. M., X. Liang, and E. W. Nester. 1997. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. *J. Bacteriol.* **179**:2452-2458.

Kerstens, K., and J. Delay. 1968. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol.* **34**:393-408.

Keshav, K. F., P. Y. Lorraine, A. N. Haejung, and L. O. Ingram. 1990. Cloning of the *Zymomonas mobilis* structural gene encoding alcohol dehydrogenase I (*adhA*) : Sequence comparison and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:2491-2497.

Kezdy, F. J., and E. T. Kaizer. 1970. Principles of active titration of proteolytic enzymes. *Methods in enzymology.* **19**:3-27.

Kim, D. -M., and H. -S. Kim. 1989. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using *Zymomonas mobilis* and inulilase. *Biotechnol Bioeng.* **39**:336-342.

Kinishita, S., T. Kakizono, K. Kadota, K. Das, and H. Taguchi. 1985. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. **22**:249-254.

Klein, C. J. L., L. Olsson, and J. Nielsen. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology.* **144**:13-24.

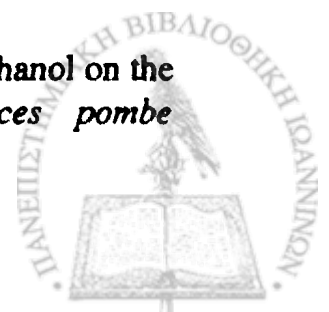
Knight, C. G. 1995. Active-site titration of peptidases. *Meth. Enzymol.* **248**:85-101.

Ko, C. H., H. Liang, and R. F. Gaber. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**:638-648.

Kolios, G., M. Lekka, M. Typas, and C. Drinas. 1989. Bioconversion of fruit and sugar beet extracts by *Zymomonas mobilis* to ethanol and other chemicals. *J. Ferm. Bioeng.* **67**:363-365.

Kondo, Y., A. Toyoda, H. Fukushi, H. Yanase, K. Tonomura, H. Kawasaki, T. Sakai. 1994. Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**:526-530.

Koukkou, A. I., D. Tsoukatos, and C. Drinas. 1990. Effect of ethanol on the phospholipid and fatty acid content of *Schizosaccharomyces pombe* membranes. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1271-1277.



Koukkou, A. I., E. Douka, C. Drainas, C. Pale-Grosdemagne, and M. Rohmer. 1998. A dialkylcyclohexadienecarbinol from the bacterium *Zymomonas mobilis*, a novel type of potential membrane lipid. *Tetrahedron Lett.* **39**:5193-5194.

Koutinas, A. A., M. Kanellaki, M. A. Typas, and C. Drainas. 1986. Raisin: a suitable raw material for ethanol production using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **8**:517-520.

Kruckeberg, A. L., and L. F. Bisson. 1990. The HTX2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* **10**:5903-5013.

Kruckeberg, A. L. 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **166**:283-292.

Kushner, S. R., J. Sheperd, G. Edwards, and V. F. Maples. 1978. *uvrD*, *uvrE*, and *recL* represent a single gene. In «DNA repair mechanisms» (P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg, and C. F. Fox, Eds.). pp. 251-254. Academic Press, New York.

Kyono, K. H. Yanase, K. Tonomura, H. Kawasaki, and T. Sakai. 1995. Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci.. Biotechnol. Biochem.* **59**:289-293.

Lam, C. K., P. O' Mullan, and D. E. Eveleigh. 1993. Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:305-308.

Lang, J. M., and V. P. Cirillo. 1987. Glucose transport in a kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Bacteriol.* **169**:2932-2937.

Lawford, G. R., B. H. Lavers, D. Good, R. Charley, J. Fein, H. G. Lawford. 1983. *Zymomonas* ethanol fermentations: biochemistry and bioengineering. In *Ethanol from Biomass*, eds Duckworth, H. E. and Tomson E. A. pp. 482-507. Ottawa: Royal Society of Canada.

Lawford, H. G., and A. Ruggiero. 1990. Production of fuel alcohol by *Zymomonas mobilis*: effect of pH on maintenance and growth-associated metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**:206-211.

Leigh, D., R. K. Scopes, and P. L. Rogers. 1984. A proposed pathway for sorbitol production in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:413-415.



Lejeune, A., Eveleigh, D. E., and C. Colson. 1988. Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *Cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 49:363-366.

Lewis, D. A., and L. F. Bisson. 1991. The HTX1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. Mol. Cell. Biol. 11:3804-3813.

Li, C., J. K. Ichikawa, J. J. Raveto, H.-C. Kuo, J. C. Fu, and S. Clarke. 1994. A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. J. Bacteriol. 176:6015-6022.

Liang, H., and R. F. Gaber. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by *Snf3*-regulated expression of HTX6. Mol. Biol. Cell. 7:1953-1966.

Lichtenberg-Frate, H., T. Naschen, S. Heiland, and M. Hofer. 1997. Properties and heterologous expression of the glucose transporter *GHT1* from *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast. 13:215-224.

Lindner, P. 1928. Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Garungskunde, Tafel 68, 3rd ed. Berlin.

Liu, J., W. O. Barnell, and T. Conway. 1992. The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis* *glf-zwf-edd-glk* operon is subject to complex transcript processing. J. Bacteriol. 174:2824-2833.

Loos, H., M. Voller, B. Rehr, Y. D. Stierhof, H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1991. Localization of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 84:211-216.

Loos, H., R. Kramer, H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1994. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentration of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. J. Bacteriol. 176:7688-7693.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Luria, S. E., and M. Delbruck. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics. 28:491-511.



Lutfiyya, L. L., and M. Johnston. 1996. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell Biol.* **16**:4790-4797.

Lutfiyya, L. L., Iyer, V. R., DeRisi, J., DeVit M. J., Brown P. O., and M. Johnston. 1998. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **150**:1377-1391.

Ma, H., L. M. Bloom, C. T. Walsh, and D. Bolstein. 1989. The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5643-5649.

Ma, P., T. Goncalves, A. Maretzek, M. C. Loureiro Dias, and J. M. Thevelein. 1997. The lag phase rather than the exponential-growth phase on glucose is associated with a higher cAMP level in wild-type and cAPK-attenuated strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**:3451-3459.

Ma, J.-F., P. W. Hager, M. L. Howell, P. V. Phibbs, and D. J. Hasset. 1998. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J. Bacteriol.* **180**:1741-1749.

McClellan, C. J., and L. F. Bisson. 1988. Glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* grown under aerobic conditions: effect of null mutations in the hexokinase and glucokinase structural genes. *J. Bacteriol.* **170**:5396-5400.

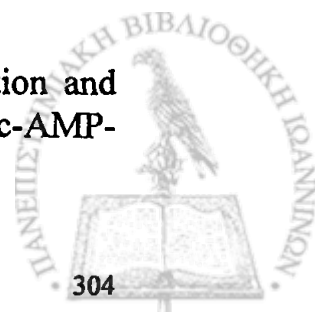
Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito. 1994. A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* **369**:242-245.

Marinetti, G. V. 1962. Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatides. *J. Lip. Res.* **3**:1-17.22

Marshal-Carlson, L., L. Neigeborn, D. Coons, L. Bisson, and M. Carlson. 1991. Dominant and recessive suppressors that restores glucose transport in a yeast *snf3* mutant. *Genetics.* **128**:505-512.

Martin, B., P. Garcia, M. P. Castanie, and J. P. Claverys. 1995. The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**:367-379.

Matsumoto, K., I. Uno, Y. Oshima, and T. Ishikawa. 1982. Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adanylate cyclase and c-AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:2355-2359.



Meadow, N. D., and S. Roseman. 1996. Rate and equilibrium constants for phosphoryltransfer between active site histidines of *Escherichia coli* HPr and the signal transducing protein III^{Glc}. *J. Biol. Chem.* **27**:334440-334445.

Mehta, S. V., V. B. Path, S. V. Velmurugan, Z. Lobo, and P. K. Maitra. 1997. *Sdt1*, a gene involved in glucose transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **180**:674-679.

Meija, J. P., M. E. Burnett, H. An, W. O. Barnell, K. F. Keshav, and L. O. Ingram. 1992. Coordination of expression of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: a simple hypothesis based on mRNA stability. *J. Bacteriol.* **174**:6438-6443.

Meijer, M. M. C., J. Boonstra, A. J. Verkleij, and C. T. Verrips. 1998. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J. Biol. Chem.* **273**:24102-24107.

Meikle, A. J., R. H. Reed, and G. M. Gadd. 1991. The osmotic response of *Saccharomyces cerevisiae* in K⁺ - dependent medium. *FEMS Microbiol.* **34**:605-612.

Meikle, A. J., J. A. Chudek, R. H. Reed, and G. M. Gadd. 1991. Natural abundance 13C-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress. *FEMS Microbiol.* **66**:163-167.

Michel, G. P. F., T. Azoulay, and J. Starka. 1985. Ethanol effect of the membrane protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *Annal. Inst. Pasteur/Microbiol.* **136A**:173-179.

Michel, G. P. F., and J. Starka. 1986. Effect of ethanol and heat stress on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**:1040-1042.

Michel, G. F. P. 1993. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *dnaK* gene of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **175**:3228-3231.

Milbrandt, B., and M. Hofer. 1994. Glucose-transport deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: phenotype, genetics and use for genetic complementation. *Microbiology.* **140**:2617-2623.

Millis, N. F. 1951. Some bacterial fermentations of cider. Ph.D. thesis. University of Bristol, Bristol, UK.



Misawa, N., K. Nakamura, and K. Kitamura. 1985. Three 1.7 kilobase pair plasmids in *Zymomonas mobilis* NRRL B-806. *Agr. Biol. Chem.* **49**:2769-2771.

Misawa, N., T. Okamoto, K. Nakamura, K. Kitamura, H. Yanase and K. Tonomura. 1986. Construction of a new shuttle vector *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**:3201-3203.

Misawa, N., and K. Nakamura. 1989. Nucleotide sequence of the 2.7 plasmid of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Biotechnol.* **12**:63-70.

Misawa, N., and K. Nakamura. 1989. Expression and stability of a β -glucosidase gene of *Rumonococcus albus* in *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **53**:723-727.

Misawa, N., S. Yamano, and H. Ikenaga. 1991. Production of β -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**:1847-1849.

Mitchell, C. G., and E. A. Dawes. 1982. The role of oxygen in the regulation of glucose metabolism, transport and tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:49-59.

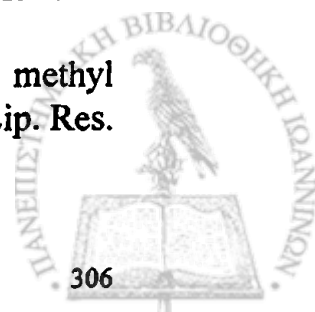
Mohagheghi, A., K. Evans, M. Finkelstein, and M. Zhang. 1998. Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by mixed cultures of two genetically engineered *Zymomonas mobilis* strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**:285-299.

Monetenecourt, B. S. 1985. *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In *Biology of Industrial Microorganisms*, eds Demain, A. L. and Solomon, N. A. pp. 161-181. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings.

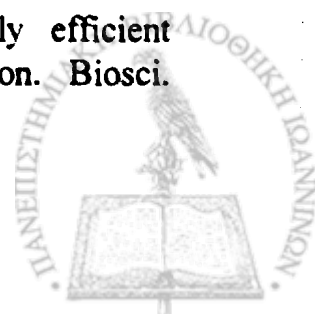
Moreau, R. A, M. J. Powell, S. F. Osman, B. D. Whitaker, W. F. Fett, L. Roth, and D. J. O' Brien. 1994. Analysis of intact hopanoids and other lipids from the bacterium *Zymomonas mobilis* by high-performance liquid chromatography. **224**:293-301.

Moreau, R. A, M. J. Powell, W. F. Fett , and B. D. Whitaker. 1997. The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. *Cur. Microbiol.* **35**:124-128.

Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boronfluoride-methanol. *J. Lip. Res.* **5**:600-608.



- Mullan, P. J., S. E., Buchholz, T. Chase Jr, and D. E. Eveleigh.** 1995. Roles of alcohols dehydrogenases of *Zymomonas mobilis* (ZADH): characterization of a ZADH-2-negative mutant. *43*:675-678.
- Neale, A. D., R. K. Scopes, R. E. H. Wettenhall, and N. J. Hoogenraad.** 1987. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:1024-1028.
- Nehlin, J. O., and H. Ronne.** 1990. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**:2891-2898.
- Nehlin, J. O., M. Carlberg, and H. Ronne.** 1991. Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* **10**:3373-3377.
- Neveling, U., R. Klasen, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm.** 1998. Purification of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Zymomonas mobilis* and identification and sequence analysis of the corresponding genes. *J. Bacteriol.* **180**:1540-1548.
- Nevoigt, E., and U. Stahl.** 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **21**:231-241.
- Nidetzky, B., M. Fulinger, D. Gollhofer, I. Haug, D. Haltrich, and D. Kulbe.** 1997. Simultaneous enzymatic synthesis of gluconic acid and sorbitol-production, purification, and application of glucose-fructose oxidoreductase and gluconolactonase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**:173-188.
- Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry.** 1983. Symbolism and terminology in enzymes kinetics, Recommendations 1981. *Biochem. J.* **213**:561-571.
- Norbeck, J., A. -K. Pahlman, N. Akhtar, A. Blomberg, and L. Adler.** 1996. Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**:13875-13881.
- Oda, Y., H. Yanase, N. Kato, K. Tonomura.** 1994. Liberation of sucrose-hydrolyzing enzymes from cells by the *zliS* gene product that mediates protein secretion in *Zymomonas mobilis*. *J. Ferm. Bioeng.* **77**:419-422.
- Okamoto, T., and K. Nakamura.** 1992. Simple and highly efficient transformation method for *Zymomonas mobilis*: Electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**:833.



Ogale, S. S., and D. N. Deobagkar. 1988. A high molecular weight plasmid of *Zymomonas mobilis* harbours genes for HgCl₂ resistance. *Biotechnol. Lett.* **10**:43-48.

Osman, Y. A., and L. O. Ingram. 1985. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bacteriol.* **164**:173-180.

Ourisson, G., and M. Rohmer. 1992. Hopanoids. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Acc. Chem. Res.* **25**: 403-407.

Ozcan, S., K. Freidel, A. Leuker, and M. Ciriacy. 1993. Glucose uptake and catabolite repression in dominant *HRT1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**:5520-5528.

Ozcan, S., and M. Johnston. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**:1564-1572.

Ozcan, S., and M. Johnston. 1996. Two different repressors collaborate restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HTX2* and *HTX4* to low levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **16**:5536-5545.

Ozcan, S., T. Leong, and M. Johnston. 1996a. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6419-6429.

Ozcan S., J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wolfl, and M. Johnston. 1996b. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:12428-12432.

Ozcan, S., L. G. Vallier, J. S. Flick, M. Carlson, and M. Johnston. 1997. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast.* **13**:127-137.

Ozcan, S., J. Dover, and M. Johnston. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **9**:2566-2573.

Palha, M. A. P. F., C. E. Lopes, and N. Pereira Jr. 1997. Ethanol stimulates the flocculation of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett.* **19**:499-501.

Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1-34.



Παπαμιχαήλ, Ε. Μ. 1997. Σημειώσεις κινητικής για το μάθημα της ενζυμολογίας, σελ. 6.

Park, Y. K., M. P. L. Mortatti, and H. H. Sato. 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Biotechn. Lett.* **5**:515-518.

Parker, C., W. O. Barnell, J. L. Snoep, L. O. Ingram, and T. Conway. 1995. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (glf) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol. Microbiol.* **15**:795-802.

Parker, C., N. Peekhaus, X. Zhangand, and T. Conway. 1997. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:3519-3525.

Paulsen, I. T., S. Chauvaux, P. Choi, and M. H. Saier Jr. 1998. Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J. Bacteriol.* **180**:498-504.

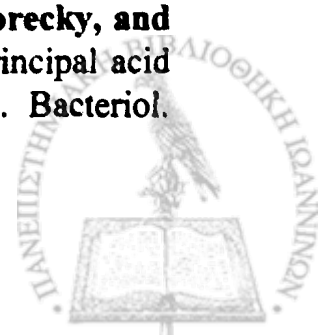
Peekhaus, N., and R. Kramer. 1996. The *gluEMP* operon from *Zymomonas mobilis* encodes a high affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems. *Arch. Microbiol.* **165**:325-332.

Perzl, M., I. G. Reipen, S. Schmitz, K. Poralla, H. Sahm, G. A. Sprenger, and E. L. Kanneberg. 1998. Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1393**:108-118.

Petit, T., M. A. Blanzquez, and C. Gancedo. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: Biochemical and molecular characterization of both hexokinases. *FEBS Lett.* **8**:185-189.

Petit, T., P. Herrero, and C. Gancedo. 1998. A mutation Ser213/Asn in the hexokinase 1 from *Schizosaccharomyces pombe* increases its affinity for glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**:714-719.

Pond, J. L., C. K. Eddy, K. F. Mackenzie, T. Conway, D. J. Borecky, and L. O. Ingram. Cloning, sequencing and characterization of the principal acid phosphatase, the *phoC*⁺ product, from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **171**:767-774.



- Poralla, K., E. Kannenberg, and A. Blume.** 1980. A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic thermophilus *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *FEBS Lett.* **113**:107-110.
- Posas, F., and H. Saito.** 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* **276**:1702-1705.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems in bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:543-594.
- Preziosi, L., G. P. F. Michel, J. Baratti.** 1990. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Can. J. Microbiol.* **36**:159-163.
- Preziosi, L., G. P. F. Michel, and J. Baratti.** 1990. Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **153**:181-186.
- Prior, C., P. Mamessier, H. Fukuhara, X. J. Chen, and M. Wesolowski-Louvel.** 1993. The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell Biol.* **13**:3882-3889.
- Randez-Gil, F., P. Sanz, K.-D. Entian, and J. A. Prieto.** 1998. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol. Cel. Biol.* **18**:2940-2949.
- Reed, R. H., J. A. Chudek, R. Foster, and G. M. Gadd.** 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2119-2123.
- Reifenberg, E., K. Freidel, and M. Citiary.** 1995. Identification of a novel *HTX* gene in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters in glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* **16**:157-167.
- Reifenberg, E., E. Boles, and M. Citiary.** 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **15**:324-333.
- Reinhardt, C., B. Volker, H. -J. Martin, J. Kneiseler, and G. F. Fuhrmann.** 1997. Different activation energies in glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* DFY1 suggest two transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **1325**:126-127.

Reipen, I. G., K. Poralla, H. Sahn, and G. A. Sprenger. 1995. *Zymomonas mobilis* squalene-hopene cyclase gene (*shc*): cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **141**:155-161.

Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivota, R. Rabus, J. Stulke, D. Karamata, M. H. Saier Jr, and W. Hillen. 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* **27**:1157-1169.

Renoux, J. -M., and M. Rohmer. 1985. Prokaryotic triterpenoids. New bacteriohopanetetrol cylitol ethers from the methylotrophic bacterium *Methylobacterium organophilum*. *Eur. J. Biochem.* **151**:405-410.

Ro, H. -S., and H. -S. Kim. 1991. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**:920-924.

Rodicio, R., J. J. Heinisch, and C. P. Hollenberg. 1993. Transcriptional control of yeast phosphoglycerate mutase-encoding gene. *Gene.* **125**:125-133.

Rodriguez, M., A. G. Wedd, and R. K. Scopes. 1996. 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*: an iron-sulfur/manganese enzyme. *Biochem. Molecul. Biol. Int.* **38**:783-789.

Roehl, R. A., T. W. Feary, and P. V. Phibbs. 1983. Clustering of mutations affecting central pathway enzymes of carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **156**:1123-1129.

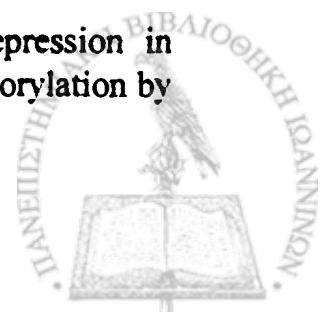
Rogers, P. L., K. J. Lee, M. L. Skonticki, and D. E. Tribe. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* **23**:37-84.

Rohmer, M., P. Bouvier, and G. Ourisson. 1979. Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents phylogenetic precursors of sterols. *Natl. Acad. Sci. USA* **76**:847-851.

Rohmer, M., P. Bouvier-Nave, and G. Ourisson. 1984. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Biochem. J.* **130**:1137-1150.

Rose, A. H., and J. S. Harrison. 1987. The yeasts. vol. 1 *Biology of the yeasts*. Second edition 1987. Academic press inc. (London) LTD.

Rose, M., W. Albig, and K. -D. Entian. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur. J. Biochem.* **199**:511-518.



- Royt, P. W., and A. M. MacQuillan.** 1976. Evidence for an inducible glucose transport system in *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **5**:302-316.
- Royt, P. W.** 1981. Facilitated diffusion of 2-deoxy-D-glucose by the oxidative yeast *Kluyveromyces lactis*. *Arch. Microbiol.* **130**:87-89.
- Ruiz-Argueso, T., and Rodriguez-Navarro.** 1975. Microbiology of ripening honey. *Appl. Microbiol.* **30**:893-896.
- Russell, M., D. Bradshaw-Rouse, D. Makwardt, and W. Heideman.** 1993/ Changes in gene expression in the RAS/adenylate cyclase system of *Saccharomyces cerevisiae*: correlation with cAMP levels and growth arrest. *Mol. Biol. Cell.* **4**:757-765.
- Sage, A. E., W. D. Proctor, and P. V. Phibbs.** 1996. A two-component response regulator, *gltR*, is required for glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **178**:6064-6066.
- Sahm, H., M. Rohmer, S. Bringer-Meyer, G. A. Sprenger, and R. Welle.** 1993. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**:247-273.
- Saliola, M., and C. Falcone.** 1995. Two mitochondrial alcohol dehydrogenase activities of *Kluyveromyces lactis* are differently expressed during respiration and fermentation. *Mol. Gen. Genet.* **20**:665-672.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandermann, jr. M.** 1977. β -D-galactosidase transport in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **108**:507-515.
- Sanger, F., S. Nickel, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
- Saravolac, E. G., N. F. Taylor, R. Benz, and R. E. W. Hancock.** 1991. Purification of glucose-inducible outer membrane protein OprB of *Pseudomonas putida* and reconstitution of glucose-specific pores. *J. Bacteriol.* **173**:4970-4976.
- Schulenberg-Schell, H., B. Neuss, and H. Sahm.** 1989. Quantitative determination of various hopanoids in microorganisms. *Anal. Biochem.* **181**:120-124.



Schweizer, H. P., R. Jump, and C. Po. 1997. Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion facilitator (*glpF*) and glycerol kinase (*glpk*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*.143:1287-1297.

Scopes, R. K. 1985. 6-Phosphoglucolactonase from *Zymomonas mobilis*. An enzyme of high catalytic efficiency. *FEBS Lett.* 193:185-188.

Scopes, R. K., V. Testolin, A. Stoter, K. Griffiths-Smith, and E. M. Algar. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.* 228:627-634.

Scopes, R. K., and K. Griffiths-Smith. 1986. Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glucolytic enzymes. *Biothechnol. Lett.* 164:653-656.

Scopes, R. K., and D. R. Bannon. 1995. Kinetic analysis of the activation of *Zymomonas mobilis* glucokinase by phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1249:173-179.

Scopes, R. K. 1997. Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucose-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpyruvate. 1997. *Biochem. J.* 326:731-735.

Scordaki, A., and C. Drainas. 1987. Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Gen. Microbiol.* 133:2547-2556.

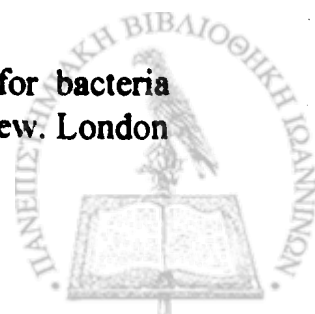
Scordaki, A., and C. Drainas. 1990. Analysis of plasmid pZMO3 of *Zymomonas mobilis*. *Plasmid.* 23:59-66.

Scott. E. W., and H. V. Baker. 1993. Concerted action of transcriptional activators REB1, RAP1 and GCR1 in the high-level expression of the glycolytic gene TPI. *Mol. Cell Biol.* 13:543-550.

Schmidt, A, S. Bringer-Meyer, K. Poralla, and H. Sahm. 1986. Effects of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:32-36.

Shalita, Z. P., M. D. White, M. Katz, M. Zur, and A. Mizrahi. 1981. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4 from sugar cane chips. *Biotechnol. Lett.* 3:729-733.

Shimwell, J. L. 1950. *Saccharomonas*, a proposed new genus for bacteria producing a quantitative alcoholic fermentation of glucose. *J. Inst. Brew. London* 56:170-182.



Shuller, C., J. L. Brewster, M. R. Alexander, M. C. Gustin, and H. Ruis. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress responsive element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* 13:4382-4389.

Skotnicki, M. L., D. E. Tribe, P. L. Rogers. 1984. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis* plasmids. *Microbios.* 40:53-61. *Appl. Environm. Microbiol.* 40:7-12.

Skotnicki, M. L., A. E. Goodman, R. G. Warr, P. L. Rogers. 1984. Isolation and characterization of *Zymomonas mobilis* plasmids. *Microbios.* 40:53-61.

Skotnicki, M. L., K. Lee, D. E. Tribe, P. L. Rogers. 1984. Genetic alterations of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Basic Life Sciences.* 19:271-290.

Sly, L. M., E. A. Worobec, R. E. Perkins, and P. V. Phibbs Jr. 1993. Reconstitution of glucose uptake and chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* glucose transport defective mutants. *Can J. Microbiol.* 39:1079-1083.

Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, and L. E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 321:674-679.

Snoep, J. L., N. Arfman, L. P. Yomano, R. K. Fliege, T. Conway, and L. O. Ingram. 1994. Reconstitution of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J. Bacteriol.* 176:2133-2135.

Snoep, J. L., N. Arfman, L. P. Yomano, H. V. Westerhoff, T. Conway, and L. O. Ingram. 1996. Control of glucolytic flux in *Zymomonas mobilis* by gene glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Biotechnol. Bioeng.* 51:190-197.

Song, K. B., H. K. Joo, S. K. Rhee. 1993. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). *Biochim. Biophys. Acta.* 1173:320-324.

Sprenger, G. A., M. A. Typas, and C. Drinas. 1993. Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. *Wrd. J. Microbiol. Biothechn.* 9:17-24.

Sprenger, G. A. 1993. Approaches to a broaden the substrate and product range of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* by genetic engineering. *J. Biotechn.* 27:225-237.



Sprenger, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic pathway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:301-307.

Sreekumat, O., and S. C. Basappa. 1991. Characterization of a superior thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. *Biotechnol. Lett.* **13**:365-370.

Steiner, P., M. Fussenegger, J. E. Bailey, and U. Sauer. 1998. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase in *Escherichia coli*. *Gene* **220**:31-38.

Strohdeicher, M., Schmitz, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1988. Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:378-382.

Strohdeicher, M., B. Neuss, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1990. Electron transport chain of *Zymomonas mobilis*. Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10. *Arch. Microbiol.* **154**:536-543.

Stokes, H. W., E. L. Dally, R. L. Williams, B. S. Montencourt, and D. E. Eveleigh. 1982. Ethanol biomass-development of a *Zymomonas* genetic system. In *Chemistry in energy production*, eds Keller D. L. and Wymer R. G. pp. 115-121. Oak Ridge, IN: Oak Ridge National Laboratory.

Stokes, H. W., E. L. Dally, M. D. Yablonsky, and D. E. Eveleigh. 1983. Comparison of plasmids in strains of *Zymomonas mobilis*. *Plasmid.* **9**:138-146.

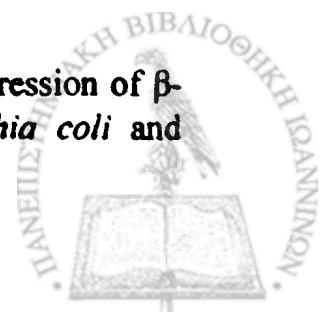
Struch, T., B. Neuss, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1991. Osmotic adjustment *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:518-523.

Strzelecki, A. T., A. E. Goodman, and P. L. Rogers. 1987. Behavior of the IncW plasmid Sa in *Zymomonas mobilis*. *Plasmid.* **18**:46-53.

Su, P., and A. E. Goodman. 1987. High frequency transformation of *Zymomonas mobilis* by plasmid DNA, *J. Biotechnol.* **6**:247-258.

Su P., S. F., Delaney, and P. L. Rogers. 1988. Kinetics of plasmid transformation of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **8**:317-320.

Su P., S. F., Delaney, and P. L. Rogers. 1989. Cloning and expression of β -galactosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **9**:139-152.



Sun, M. Y., N. P. Ngheim, B. H. Davison, O. F. Webb, and P. R. Bienkowski. 1998. Production of ethanol from starch by co-immobilized *Zymomonas mobilis*-glucoamylase in a fluidized-bed reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**:429-439.

Suntinanalert, P., J. P. Pemberton, and H. W. Doelle. 1986. The production of ethanol plus fructose sweetener using fructose utilization negative mutants of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **8**:351-356.

Swings, J., and J. De Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev.* **41**:1-46.

Temple, L., S. M. Cuskey, R. E. Perkins, R. C. Bass, N. M. Morales, G. E. Christie, R. H. Olsen, and P. V. Phibbs. 1990. Analysis of cloned structural and regulatory genes for carbohydrate utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **172**:6396-6402..

Temple, L., A. Sage, G. E. Christie, and P. V. Phibbs. 1994. Two genes for carbohydrate catabolism are divergently transcribed from a region of DNA containing the *hexC* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**:4700-4709.

Teusink, B., J. A. Diderich, H. V. Westerhoff, K. Van Dam, and M. C. Walsh. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* **180**:556-562.

Thevelein, J. M., and S. Hofmann. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast ? *Trends Biochem. Sci.* **20**:3-10.

Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler. 1985. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell.* **40**:27-36.

Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, and M. Wigler. 1987. Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell.* **50**:277-287.

Tonomura, K., N. Kurose, S. Konishi and H. Kawasaki. 1982. Occurrence of plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **46**:2851-2853.

Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui, and H. Yanase. 1986. Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**:805-808.



Tornabene, T. G., G. Holzer, A. S. Bittner and K. Grohmann. 1982. Characterization of the total extractable lipids of *Zymomonas mobilis* var. *mobilis*. *Can. J. Microbiol.* **28**:1107-1118.

Typas, M. A. 1986. Physiological and genetical study of the bacterium *Zymomonas mobilis* for increased ethanol production and/or SCP following the fermentation of low value agricultural products. In *Biomolecular Engineering Programme*, ed Magnien E. pp. 667-673. Commission of the european Communities.

Uhlenbusch, I., H. Sahn, and G. A. Sprenger. 1991. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**:1360-1366.

Vallier, L. G., D. Coons, L. F. Bisson, and M. Carlson. 1994. Altered regulatory responses to glucose are associated with a glucose transport defect in *grr1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **136**:1279-1285.

Varela, J. C. S., and W. H. Mager. 1996. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology.* **142**:721-731.

Vartholomatos, G., M. A. Typas, and C. Drinas. 1993. An ultraviolet-sensitive of *Zymomonas mobilis* affecting the stability of its natural plasmid pZMO2. *Plasmid.* **29**:10-18.

Varsaki, A., A. S. Afendra, G. Vartholomatos, G. Tegos, and C. Drinas. 1998. Production of ice nuclei from two recombinant *Zymomonas mobilis* strains employing the *inaZ* gene of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnol. Lett.* **20**:647-651.

Viikari, L. 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**:252-255.

Viikari, L. 1984. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:118-123.

Viikari, L., and M. Korhola. 1986. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**:471-476.

Walia, S. K., V. C. Carey, B. P. All III, and L. O. Ingram. 1983. Self-transmissible plasmid in *Zymomonas mobilis* carrying antibiotic resistance. *Appl. Environm. Microbiol.* **47**:198-200.

Walsh, M. C., H. P. Smits, M. Scholte, and K. VanDam. 1994. Affinity of



glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* **176**:953-958.

Walsh, M. C., M. Scholte, J. Valkier, H. P. Smits, and K. VanDam. 1996. Glucose sensing and signaling properties in *Saccharomyces cerevisiae* require at least two members of the glucose transporter family. *J. Bacteriol.* **178**:2593-2597.

Wecker, M. S. A., and R. R. Zall. 1987. Production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* **53**:2815-2820.

Weigert, T., H. Sahn, and G. A. Sprenger. 1996. Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **166**:32-41.

Weigert, T., H. Sahn, and G. A. Sprenger. 1997. Expression of the *Zymomonas mobilis gfo* gene for NADP-containing glucose fructose oxidoreductase (GFOR) in *Escherichia coli*. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into stable periplasmic protein. *Eur. J. Biochem.* **244**:107-112.

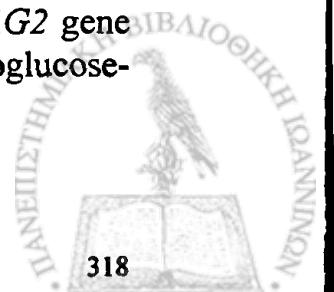
Weirich, J., P. Goffrini, P. Kuger, I. Ferrero, and K. D. Breuning. 1997. Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* **249**:248-257.

Weisser, P., R. Kramer, S. Hermann, G. A. Sprenger. 1995. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J. Bacteriol.* **177**:3351-3354.

Weisser, P., R. Kramer, G. A. Sprenger. 1996. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis* leads to utilization of mannose as novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**:4155-4161.

Wendell, D. L., and L. F. Bisson. 1994. Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* **176**:3730-3737.

Wesolowski-Louvel, M., P. Goffrini, and I. Ferrero. 1988. The *RAG2* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a putative phosphoglucose-isomerase. *Nucleic Acids Res.* **16**:8417.



Wesolowski-Louvel, M., P. Goffrini, I. Ferrero, and H. Fukuhara. 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol. Gen. Genet.* **233**:89-96.

Whiting, P. H., M. Midgley, and E. A. Dawes. 1976a. The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **92**:304-310.

Whiting, P. H., M. Midgley, and E. A. Dawes. 1976b. The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **15**:659-668.

Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis. 1998. Structural organization of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS.* **23**:481-485.

Willett, C. E., C. M. Gelfman, and M. J. Holland. 1993. A complex regulatory element from the yeast gene *ENO2* modulates *GCR1*-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **13**:2623-2633.

Wisbeck, E., M. M. Silveira, J. Ninow, and R. Jonas. 1997. Evaluation of flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *J. Basic Microbiol.* **36**:445-449.

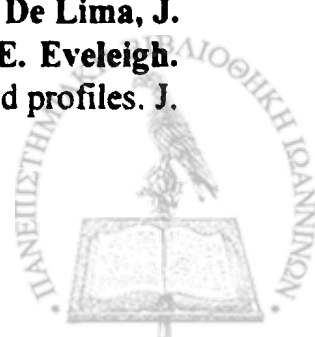
Wolff, J. A., C. H. McGregor, R. C. Eisenberg, and P. V. Phibbs. 1991. Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **173**:4700-4706.

Wylie, J. L., C. Bernegger-Egli, J. D. O'Neil, and E. A. Worobec. 1993. Biophysical characterization of OprB, a glucose-inducible porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:547-556.

Wylie, J. L., and E. A. Worobec. 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-selective OprB porin gene and distribution of OprB within the family *Pseudomonadaceae*. *Eur. J. Biochem.* **220**:505-512.

Wylie, J. L., and E. A. Worobec. 1995. The OprB plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**:3021-3026.

Yablonsky, M. D., A. E. Goodman, N. Stevnborg, O. Goncalves De Lima, J. O. Falcao De Morrais, H. G. Lawford, P. L. Rogers, and D. E. Eveleigh. 1988. *Zymomonas mobilis* CP₄ : a clarification of strains via plasmid profiles. *J. Biothechn.* **9**:71-80.



- Yanase, H., M. Yasui, T. Miyasaki, and K. Tonomura.** 1985. Fusion of spheroplasts and gene tic recombination of *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. **49**:133-140.
- Yanase, H., T. Kotani, and K. Tonomura.** 1986. Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. Agric. Biol. Chem. **50**:3139-3144.
- Yanase, H., M. Masuda, T. Tamaki, and K. Tonomura.** 1990. Expression of the *Escherichia coli* alpha-galactosidase and lactose permease genes in *Zymomonas mobilis* and raffinose fermentation. J. Ferment. Bioeng. **70**:1-6.
- Yanase, H., T. Kotani, M. Yasuda, A. Matsuzawa, and K. Tonomura.** 1991. Metabolism of galactose in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Botechnol. **35**:364-368.
- Yanase, H., M. Iwata, R. Nakahigashi, K. Kita, N. Kato, and K. Tonomura.** 1992. Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **56**:1335-1337.
- Yomano, L. P., R. K. Scopes, and L. O. Ingram.** 1993. Cloning, sequencing and expression of the *Zymomonas mobilis* phosphoglycerate mutase gene (*pgm*) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**:3926-3933.
- Yoon, K. -H., S. -H. Park, and M. Y. Pack.** 1988. Transfer of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase gene into *Zymomonas anaerobia*. Biotechnol. Lett. **10**: 213-216.
- Yoon, K. -H., S. -H. Park, K. -H. Jung, and M. Y. Pack.** 1995. Characterization of the 5'-flanking region upstream from the structural gene from *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase. J. Microbiol. **33**:126-127.
- Zachariou, M., and R. Scopes.** 1986. Glucose-Fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. **167**:863-869.
- Zagorec, M., and P. W. Postma.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. **234**:325-328.
- Zembruski, B., P. Chilco, X-L. Liu, J. Liu, T. Conway, and R. Scopes.** 1987. Cloning, sequencing and expression of the *Zymomonas mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. J. Bacteriol. **174**:3455-3460.



Zhang, M., C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein, and S. Picataggio. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolic pathway in ethanolgenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267:240-243.

Zhao, G. S., T. H. Xia, L. O. Ingram, and R. A. Jensen. 1993. An allosterically insensitive type of cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* 212:157-165.

Zikmanis, P., R. Kruce, and L. Auzina. 1997. An elevation of the molar growth yield of *Zymomonas mobilis* during aerobic growth. *Arch. Microbiol.* 167:167-171.

