

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200225



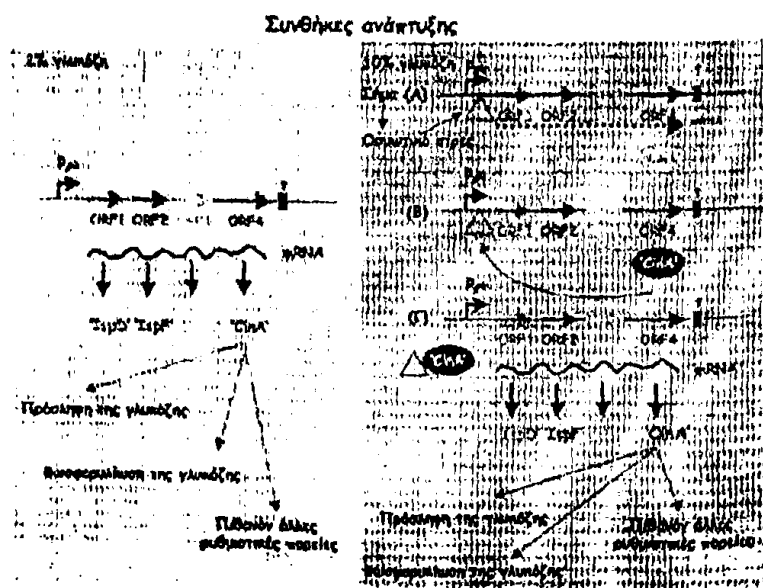
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

456

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ Δ. ΧΡΙΣΤΟΓΙΑΝΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
ZYMO MONAS MOBILIS ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
ΓΛΥΚΟΖΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

A

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ Δ. ΧΡΙΣΤΟΓΙΑΝΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *ZYMO MONAS*
MOBILIS ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Κωνσταντίνος Δραΐνας- Επιβλέπων Καθηγητής
Καθηγητής Διονύσιος Δραΐνας- Μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Επ. Καθηγήτρια Άννα-Ειρήνη Κούκκου- Μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Μιλτιάδης Τύπας- Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Καθηγητής Νικόλαος Πανόπουλος- Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Αν. Καθηγητής Ευστάθιος Χατζηλουκάς- Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Λέκτορας Αμαλία-Σοφία Αφένδρα- Μέλος της εξεταστικής επιτροπής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



7

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ
ΧΡΙΣΤΟΓΙΑΝΝΗ,
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίσθηκε σύμφωνα με το άρθρο 13 του Ν. 2083/92 και την υπ' αριθμ. 558^Α/21-5-2004 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 κ. Αναστασίας Χριστογιάννη, συνήλθε σε συνεδρίαση σήμερα στις 15-6-2004 και ώρα 12:00 στην αίθουσα Χ3-230 του Τμήματος Χημείας, και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψήφιας με τίτλο:

"Μοριακή ανάλυση παραγόντων προσαρμοστικότητας του βακτηρίου *Zyotomonas mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης "

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

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

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

Μετά από αυτά απεφάσισε ομόφωνα μεταξύ των παρόντων να απονεμίσει τη διατριβή με το βαθμό "άριστα".

Ιωάννινα, 15-6-2004

Η Επιτροπή

1. Δραϊνας Κωνσταντίνος, Καθηγητής
2. Δραϊνας Διονύσιος, Καθηγητής
3. Κούκκου Άννα -Ειρήνη, Επίκουρος Καθηγήτρια
4. Πανόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής
5. Τύπας Μιλτιάδης, Καθηγητής
6. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής
7. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Λέκτορας





**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΙΣΤΟΠΟΙΕΙ ΟΤΙ :**

**Η ΧΡΙΣΤΟΓΙΑΝΝΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ
ΕΞ ΑΡΤΗΣ ΟΡΜΩΜΕΝΗ
ΠΕΡΙ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΝ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΝ ΤΩ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΩ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΥΠΟΣΤΑΣΑΣΑ
ΤΗΝ ΝΕΝΟΜΙΣΜΕΝΗΝ ΕΠΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΝ
ΤΗΝ 15Η ΙΟΥΝΙΟΥ 2004
ΑΞΙΩΘΕΙΣΑ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ
'ΑΡΙΣΤΑ'**

**ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΑΝΗΓΟΡΕΥΘΗ
ΕΤΕΙ ΤΕΤΑΡΤΩΙ ΚΑΙ ΔΙΣΧΙΛΙΟΣΤΩΙ**

**ΜΗΝΟΣ ΙΟΥΝΙΟΥ 18Η (Γ.Σ.Ε.Σ 563Α/18-06-2004)
ΕΓΕΝΕΤΟ ΤΟΔΕ ΜΗΝΟΣ ΙΟΥΝΙΟΥ 18Η ΕΤΕΙ 2004**

Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΥΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ


ΣΟΦΙΑ ΒΑΜΒΕΤΣΟΥ



Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημικής-Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 1999.

ΤΕΛΕΙΩΣΑ!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Από τα 18 μου χρόνια κίόλας ήξερα τι ήθελα να κάνω στη ζωή μου. Είχα βάλει στόχο να περάσω στο Χημικό Ιωαννίνων (αναγκαστικά!!) και να κάνω μεταπτυχιακά στη Βιοχημεία, στο εργαστήριο του κ. Δραΐνα. Την αγάπη μου αυτή για την Βιοχημεία μου την ενέπνευσε ο κ. Γεώργιος Βαρθολομάτος καθηγητής μου στο ιδιαίτερο Οργανικής Χημείας. Σ' ευχαριστώ λοιπόν κ. Γιώργο τόσο γιατί με έκανες να αγαπήσω από εκείνα τα άγουρα χρόνια μου την επιστήμη αυτή, όσο και για το μετέπειτα ενδιαφέρον σου.

Την ευκαιρία όμως να πραγματοποιήσω το όνειρό μου, μου την έδωσε ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνος Δραΐνας και θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά γι' αυτό. Η ενθάρρυνση και η καθοδήγηση που μου παρείχε ως επιβλέπων της διατριβής μου όλα αυτά τα χρόνια καθώς και οι πολύτιμες συμβουλές του και ιδέες του σε όλες τις φάσεις της δουλειάς μου αποδείχθηκαν πολύτιμες και ανεκτίμητες.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου. Η υπομονή της, το συνεχές της ενδιαφέρον και η καθοδήγησή της αλλά και οι εύστοχες ιδέες και παρατηρήσεις της έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτή της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Διονύσιο Δραΐνα για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του και συμβουλές τόσο κατά την εκπόνηση όσο και κατά την συγγραφή της διατριβής.



Ένα ιδιαίτερα μεγάλο και ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά για τον πολύτιμο χρόνο που απλόχερα μου αφιέρωσε. Η γνώση που μου μετέδωσε καθώς και οι συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής ήταν ανεκτίμητες.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Άγγελο Περυσινάκη γιατί όποτε τον είχα ανάγκη ποτέ δεν μου αρνήθηκε την βοήθειά του η οποία ήταν πάντα ουσιαστική, καθώς και την Λέκτορα του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αμαλία Αφένδρα τόσο για την βοήθεια και συμπαράστασή της κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής όσο και για πολλά άλλα!!

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μιλτιάδη Τύπα τόσο για την φιλοξενία που μου παρείχε στο εργαστήριό του για ένα χρόνο αλλά και για την βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριό του. Πολλά πολλά ευχαριστώ χρωστάω στα παιδιά των δύο εργαστηρίων του Τμήματος Βιολογίας, στα μυκητάκια Μαλένα Πάντου, Δημήτρη Γκίκα, Απόστολο Τσιάπο και Βασίλη Κουβέλη και στα βακτηριάκια Εύη Κουτσοσπύρου, Βαγγέλη Μπελετσιώτη και Αντώνη Κριμιτζά. "Παιδιά μου" σας ευχαριστώ για την θερμή με την οποία με αγκαλιάσατε και για την άποψη συνεργασία μας. Αν και θα θυμώσει ο κ. Τύπας όταν το διαβάσει αυτό, οι «ελάχιστες» ώρες γέλιου που περάσαμε μαζί (γιατί τις περισσότερες εργαζόμασταν σκληρά) θα μου μείνουν αξέχαστες. Μαλενάκι: «Πολύ καλά περνάμε αρχίζω και φοβάμαι!!!!!!!!!!!!!!».

Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Ν. Πανόπουλο, μέλος της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής, τόσο για τις εύστοχες παρατηρήσεις και ερωτήσεις του κατά τη διάρκεια της εξέτασης όσο και για τα καλά του λόγια μετά το πέρας αυτής. Για τον τελευταίο λόγο, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής και ιδιαίτερα τους κ.κ. Δ. Δραΐνα, Μ. Τύπα και Ν. Πανόπουλο που έκαναν τον κόπο να με τιμήσουν με την παρουσία τους ερχόμενοι από μακριά.



Ευχαριστώ θερμά την λέκτορα του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων κ. Α. Λουκατζίκου καθώς και τον επ. καθηγητή του ίδιου Τομέα κ. Δ. Πετράκη για τη διευκόλυνση που μου παρείχαν στη χρησιμοποίηση του φθορισμομέτρου του Τομέα τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την άδεια που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω κάποια από τα όργανα του εργαστηρίου τους συντελώντας έτσι ουσιαστικά στον καθαρισμό των πρωτεϊνών.

Για την άψογη συνεργασία μας και τις συμβουλές τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε μεταξύ μας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας κ.κ. Ταμπάκη Αφροδίτη, Μήτσιο Ιωάννη, Τσιρώνη Λουκά, Λουριδα Ευαγγελία, Αρώνη Παντελή και Ανδρουλάκη Νίκο, καθώς επίσης και τις κ.κ. Χατζηδάκη Ελεάνα και Χατζηαντωνίου Ευαγγελία για την άψογη συνεννόησή μας σχετικά με τη χρήση του φθορισμομέτρου.

Όσο για τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ίσως ένα ευχαριστώ να είναι πολύ λίγο. Θα ήθελα να τους ζητήσω συγχώρεση και άφεση αμαρτιών για τη «στραβωμένη» μου συμπεριφορά τα δύο τελευταία χρόνια και να ευχαριστήσω θερμότατα τους κ.κ. Βαρσάκη Αθανασία, Χιουρέα Γεώργιο, Zhang Haimou, Παραπούλη Μαρία, Καραμπίκα Ευγενία, Χάϊδου Ελένη, Δήμου Δήμητρα και Li Yuedan για την υποστήριξη και την βοήθειά τους. Στους κ.κ. Καλλιμάνη Αριστείδη και Δούκα Ευγενία δεν ξέρω πώς να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για ότι κάνανε για μένα. Απλά τους ευχαριστώ θερμότατα για την πολύπλευρη υποστήριξή τους.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους υπαλλήλους της Γραμματείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ.κ Βαμβέτσου Σοφία, Βράκα Νικόλαο, Λιανό Κωνσταντίνο και Λιόντου Μαίρη για την υποστήριξη που μου παρείχαν και συνετέλεσαν και αυτοί με τον τρόπο τους στην



επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, καθώς επίσης και τον Διοικητικό Υπάλληλο του Παν/μίου μας κ. Γ. Ζουμπούλη.

Για την οικογένειά μου τα λόγια είναι πολύ φτωχά στο να τους εκφράσω αυτά που νιώθω. Απλά τους ευχαριστώ που ήταν πάντα δίπλα μου αρωγοί και συμπαραστάτες στις εύκολες αλλά κυρίως στις δύσκολες στιγμές!

Τέλος, κλείνοντας αυτό το μακροσκελές «ευχαριστιολόγιο» θα ήταν παράλειψή μου ίσως να μην ευχαριστήσω όλους εκείνους που μας πεισμώνουν και μας κάνουν πιο δυνατούς χωρίς να το ξέρουν!!!!!! Σε σας λοιπόν!!!

Ιωάννινα 2004



Στους γονείς μου
Δημήτρη και Σία
για την υπομονή τους
& την αγάπη τους
Στην αδελφή μου
Τιτίκα
για ΟΛΑ!!



*Good timber does not grow with ease.
The stronger the wind the stronger the tree.*



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΠΙΝΑΚΕΣ.....	IX
ΣΧΗΜΑΤΑ.....	XI
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	XVI
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	XIX
ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.....	XXI

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

Το βακτήριο <i>Zygomonas mobilis</i>	2
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.2 Μορφολογία και άλλες ιδιότητες του <i>Z. mobilis</i>	3
1.3 Ζύμωση υδατανθράκων στο <i>Z. mobilis</i>	5
1.4 Η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης στο <i>Z. mobilis</i>	13
Μεταφορά μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης.....	14
Μεταφορά μέσω του συστήματος PTS.....	16
Το σύστημα ενεργής μεταφοράς της γλυκόζης.....	19
1.5 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του <i>Z. mobilis</i>	19
1.6 Το γονιδίωμα του <i>Z. mobilis</i>	21
1.6.1 Εύρεση και χαρακτηρισμός οπερονίων στο χρωμόσωμα του <i>Z. mobilis</i>	25
1.6.1.1 Το οπερόνιο <i>gluEMP</i> (οπερόνιο μεταφοράς γλουταμινικού οξέος)	26



1.6.1.2 Το οπερόνιο <i>leu</i>	27
1.6.1.3 Το οπερόνιο <i>groESL</i>	28
1.6.1.4 Το οπερόνιο <i>gap</i>	29
1.6.1.5 Το οπερόνιο <i>glf</i>	31
1.7 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του <i>Z. mobilis</i>	31
1.8 Μεταλλαξιγένεση στο <i>Z. mobilis</i>	33
1.9 Έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο <i>Z. mobilis</i>	34
1.10 Η επίδραση της αιθανόλης στο <i>Z. mobilis</i>	39
1.11 Η ανθεκτικότητα του <i>Z. mobilis</i> σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

Τα ισοπρενοειδή και η βιοσύνθεσή τους	42
2.1 Τα ισοπρενοειδή.....	43
2.2 Η βιοσύνθεση του IPP.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

Το μεταλλαγμένο στέλεχος του <i>Zymomonas mobilis</i> CU1Rif2.....	47
3.1 Το μεταλλαγμένο στέλεχος του <i>Zymomonas mobilis</i> CU1Rif2.....	47
3.2 Η ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	49
3.3 Η επίδραση της σορβιτόλης στην ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2.....	50

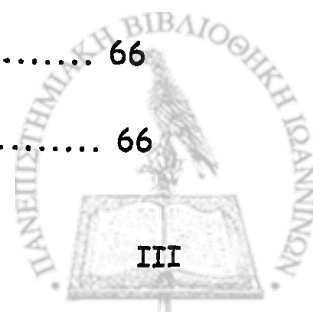


3.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2.....	51
3.5 Ένζυμα τα οποία θεωρούνται σημεία ρύθμισης στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff στο βακτήριο <i>Z. mobilis</i>	52
3.6 Η πρόσληψη της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2.....	53
3.7 Ανάπτυξη κυττάρων CU1Rif2 διαφόρων φάσεων σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.....	55
3.8 Απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ενός τμήματος DNA το οποίο αναπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.....	57
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	58

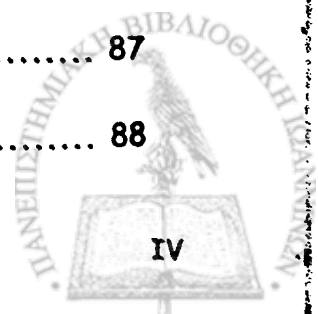
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

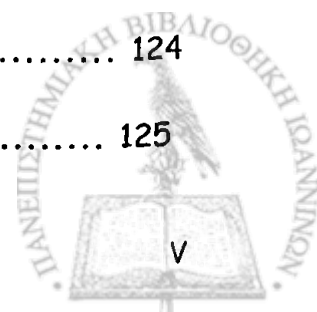
Υλικά και Μέθοδοι.....	61
4.1 Χημικά και όργανα.....	61
4.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	63
4.3 Θρεπτικά υλικά.....	65
4.3.1 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το <i>E. coli</i>	65
4.3.2 Πλήρες θρεπτικό υλικό για το <i>Z. mobilis</i>	65
4.3.3 Χημικά καθορισμένο θρεπτικό υλικό για το <i>Z. mobilis</i>	65
4.3.4 Στερεά θρεπτικά υλικά.....	66
4.4 Ανάπτυξη καλλιιεργειών.....	66
4.5 Διατήρηση στελεχών.....	66
4.6 Αντιβιοτικά.....	66



4.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	68
4.8 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κύτταρα του <i>Z. mobilis</i>	69
4.8.1 Κατεργασία των κυττάρων πριν από τον ενζυμικό προσδιορισμό.....	69
4.8.2 Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της γλυκοκινάσης.....	70
4.9 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	71
4.9.1 Kushner <i>et al.</i> , 1978.....	71
4.9.2. Chung and Miller, 1988.....	73
4.10 Επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη μεταξύ <i>E. coli</i> (δότης) και <i>Z. mobilis</i> (δέκτης) (Afendra and Drainas, 1978).....	74
4.11 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσεως κυττάρων.....	76
4.11.1 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μεγάλη κλίμακα με τη μέθοδο Jetstar (Maxi 20, Genomed).....	76
4.11.2 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	78
4.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>Z. mobilis</i>	79
4.13 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το <i>Z. mobilis</i> (Byun <i>et al.</i> , 1986).....	81
4.14 Απομόνωση ολικού RNA.....	82
Γενικές παρατηρήσεις για τον χειρισμό του RNA	
(α) Χειρισμός του RNA.....	82
(β) Γενικές οδηγίες.....	83
(γ) Μίας χρήσεως πλαστικός εξοπλισμός.....	83
(δ) Επαναχρησιμοποιούμενος πλαστικός εξοπλισμός.....	83
(ε) Γυαλικά.....	84
(στ) Συσκευές ηλεκτροφόρησης.....	84
(ζ) Διαλύματα.....	84
4.14.1 Μέθοδος RNeasy mini για την απομόνωση ολικού RNA από βακτήρια..	85
4.15 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	87
4.15.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	88



4.15.2 Πέψεις του χρωμοσωμικού DNA.....	88
4.16 Ηλεκτροφόρηση του DNA.....	89
4.17 Ηλεκτροφόρηση του RNA.....	92
4.18 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	93
4.19 Ηλεκτροφόρηση PAGE 4-20% υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	97
4.20 Χρώση πηγματος από SDS-PAGE με νιτρικό άργυρο	101
4.21 Υπερέκφραση πρωτεϊνών σύμφωνα με το σύστημα pET.....	103
4.22 Προσδιορισμός της διαλυτότητας πρωτεϊνών.....	105
4.23 Καθαρισμός πρωτεϊνών.....	107
4.23.1 Παρασκευαστικός καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni^{2+} -NTA αгарόζης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	107
4.23.2 Παρασκευαστικός καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni^{2+} -NTA αгарόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	110
4.23.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης μοριακής διήθησης.....	113
4.24 Απομόνωση DNA από πηγμα αгарόζης με τη μέθοδο GEANCLEAN II BIO 101.....	116
4.25 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	117
4.26 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA.....	118
4.26.α. Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA με PCR.....	120
4.27 Μεταφορά DNA από πηγμα αгарόζης σε νάιλον φίλτρο.....	120
4.27.1 Αποτύπωση του DNA κατά Southern (Southern blotting)..	120
4.28. Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε νάιλον φίλτρο για υβριδισμό in situ.....	122
4.29 Υβριδισμός DNA-DNA.....	124
4.29.1 Μη ραδιενεργός υβριδισμός.....	125



4.29.2 Μη ραδιενεργός υβριδισμός <i>in situ</i>	127
4.30. Εμφάνιση των φίλτρων μετά τον μη ραδιενεργό υβριδισμό ή τον υβριδισμό <i>in situ</i>	128
A. Εμφάνιση με χρώση.....	128
B. Εμφάνιση με αυτοραδιογραφία.....	129
4.31 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια.....	130
4.32 Προσδιορισμός παγώματος σταγόνας (Freezing Droplet Test)	135
4.33 Ανάλυση αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών.....	135
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	136

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

Χαρακτηρισμός του συμπλέγματος των τεσσάρων γονιδίων.....	137
5.1 Απόδειξη της ύπαρξης του προαγωγού.....	138
5.2 Μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού του κλώνου.....	142
5.3 Οι τέσσερις κωδικεύουσες περιοχές του κλώνου συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο.....	153
5.4 Υποκλωνοποίηση των ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4 σε φορέα υπερέκφρασης και εύρεση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχία.....	160
5.5 Υποκλωνοποίηση των 5 πιθανών ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του προαγωγού P_{pdc}	172
5.6 Μέτρηση της δραστικότητας της γλυκοκινάσης στα στελέχη CU1Rif2/pLAFR5: P_{pdc} -ORF4s.....	182
5.7 Μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού P_{gic} στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παρουσία του ORF4.....	184
5.8 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τις τέσσερις θεωρητικές	



κωδικεύουσες περιοχές.....	187
5.9 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1.....	190
5.10 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.....	205
5.11 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF3.....	220
5.12 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4.....	223
5.13 Μετασχηματισμός στο 10988.....	236
5.14 Απομόνωση και καθαρισμός των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2.....	241
5.15 Εντοπισμός της μετάλλαξης στο CU1Rif2.....	253
5.16 Απομόνωση του οπερονίου <i>glc</i> από το μεταλλαγμένο στέλεχος του <i>Z. mobilis</i> CU1Rif2.....	266

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....273

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

Συζήτηση.....	274
6.1 Πλήρης μοριακή ανάλυση του οπερονίου που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του <i>Z. mobilis</i> σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.....	275
6.2 Η νέα οργάνωση του οπερονίου <i>glc</i>	278
6.3 Θεωρητική μελέτη των προϊόντων των ORFs του οπερονίου <i>glc</i>	282
6.3.1 Τα προϊόντα των ORF1 και ORF2.....	282
6.3.2 Τα προϊόντα των ORF3 και ORF4.....	289
6.4 Προτεινόμενος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα του <i>Z. mobilis</i> σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	296



Συμπεράσματα.....	302
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	305
SUMMARY.....	308
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	311
Βιβλιογραφία.....	312



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.1: Φυσικά πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 του βακτηρίου <i>Z. mobilis</i>	24
Πίνακας 1.2: Φορείς κλωνοποίησης, κατάλληλοι για έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο <i>Z. mobilis</i>	35
Πίνακας 4.1: Βακτηριακά στελέχη.....	63
Πίνακας 4.2: Πλασμίδια.....	64
Πίνακας 4.3: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών.....	67
Πίνακας 4.4: Τρόπος δράσης αντιβιοτικών-μηχανισμός ανθεκτικότητας.....	67
Πίνακας 4.5: Σύσταση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου για SDS-PAGE.....	97
Πίνακας 4.6: Σύσταση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου για PAGE 4%-20%.....	98
Πίνακας 4.7: Χρόνοι διόγκωσης διαφόρων τύπων πηγμάτων Sephadex στους 20°C και 90°C	115
Πίνακας 5.1: Αλληλουχίες προαγωγών του βακτηρίου <i>Z. mobilis</i>	141
Πίνακας 5.2: Φθορισμός κυττάρων <i>Z. mobilis</i> CP4Rif ^r που εκφράζουν το γονίδιο <i>gfp</i> υπό τον έλεγχο διαφορετικών προαγωγών.....	144
Πίνακας 5.3: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CP4Rif ^r σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	147
Πίνακας 5.4: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CU1Rif2 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	149
Πίνακας 5.5: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα 11163/74 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων άλατος.....	152
Πίνακας 5.6: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.....	154
Πίνακας 5.7: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.....	161
Πίνακας 5.8: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.....	180
Πίνακας 5.9: Δραστηκότητες γλυκοκινάσης σε διάφορα στελέχη <i>Z. mobilis</i>	182

Πίνακας 5.10: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CU1Rif2 παρουσία του ORF4 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	184
Πίνακας 5.11: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.....	187
Πίνακας 5.12: Οπτικές απορροφήσεις καλλιιεργειών.....	238
Πίνακας 6.1: Αριθμοί πρόσβασης των γονιδίων <i>ispD</i> και <i>ispF</i> από διάφορους μικροοργανισμούς (Herz <i>et al.</i> , 2000)	288



ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1.1: Ο μεταβολισμός της σακχαρόζης στο βακτήριο <i>Z. mobilis</i>	8
Σχήμα 1.2: Η πρόσληψη της γλυκόζης μέσω του συστήματος PTS, στο βακτήριο <i>B. subtilis</i>	18
Σχήμα 1.3: Τα οπανοειδή του <i>Z. mobilis</i>	21
Σχήμα 1.4: Πλήρης κυκλικός φυσικός και γενετικός χάρτης του στελέχους ZM4 του <i>Z. mobilis</i>	23
Σχήμα 1.5: Γενετική οργάνωση του οπερονίου <i>gluEMP</i>	26
Σχήμα 1.6: Γενετική οργάνωση του οπερονίου <i>leu</i>	27
Σχήμα 1.7: Γενετική οργάνωση του οπερονίου <i>groESL</i>	28
Σχήμα 1.8: Γενετική οργάνωση του οπερονίου <i>gap</i>	29
Σχήμα 1.9: Γενετική οργάνωση του οπερονίου <i>glf</i>	31
Σχήμα 2.1: Η πορεία βιοσύνθεσης του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP) μέσω της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (πορεία DOXP).....	46
Σχήμα 3.1: Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο (πλήρες ή χημικά καθορισμένο) που περιέχει 2%, 5% και 10% γλυκόζη.....	48
Σχήμα 3.2: Γενετικός χάρτης του κλώνου των 4,5 kb.....	57
Σχήμα 4.1: Τμήμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE...	95
Σχήμα 4.2: Διάταξη δημιουργίας πυκνοτήτων βαθμίδωσης.....	99
Σχήμα 4.3: Η αρχή λειτουργίας του συστήματος pET (Κατάλογος της εταιρείας NOVAGEN).....	104
Σχήμα 4.4: Διαγραμματική παράσταση των όγκων V_e , V_0 και V_t	113
Σχήμα 4.5: Διάταξη διαχωρισμού πρωτεϊνών μέσω στήλης μοριακής διήθησης....	114
Σχήμα 5.1: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pH5119.....	138

Σχήμα 5.2: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pH5119-pr1.....	139
Σχήμα 5.3: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pH5119-pr2.	140
Σχήμα 5.4: Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAE1	142
Σχήμα 5.5: Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAEG1....	143
Σχήμα 5.6: Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAEPG....	144
Σχήμα 5.7: Παρακολούθηση του εκλυόμενου φθορισμού σε στελέχη <i>Z. mobilis</i> CP4Rif ^r τα οποία αναπτύσσονται παρουσία 2% ή 10% γλυκόζης.	145
Σχήμα 5.8: Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif ^r παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	148
Σχήμα 5.9: Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CU1Rif2 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.	150
Σχήμα 5.10: Συγκριτική απεικόνιση των % ποσοστών αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif ^r και CU1Rif2 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	151
Σχήμα 5.11: Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα 11163/74 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος.....	152
Σχήμα 5.12: Γενετικός χάρτης του κλώνου που αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης με τις ενδείξεις των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις RT-PCR.....	153
Σχήμα 5.13: Περιοριστικός χάρτης του φορέα υπερέκφρασης pET29c(+).	161
Σχήμα 5.14: Περιοριστικοί χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET29c(+):ORF1 και pET29c(+):ORF2.....	163
Σχήμα 5.15: Περιοριστικοί χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET29c(+):ORF3 και pET29c(+):ORF4.....	164
Σχήμα 5.16: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ORF3 (Query) με αυτήν που έχει κατατεθεί στην τράπεζα της EMBL (Sbjct)	167

Σχήμα 5.17: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ORF4 (Query) με αυτήν που έχει κατατεθεί στην τράπεζα της EMBL (Sbjct)	168
Σχήμα 5.18: Νέα αλληλουχία νουκλεοτιδίων του οπερονίου <i>g/c</i> (4.493 bp) και η προβλεπόμενη αλληλουχία των αμινοξέων.....	171
Σχήμα 5.19: Η οργάνωση του οπερονίου <i>g/c</i> (4.493 bp) υπεύθυνου για την ανάπτυξη κυττάρων <i>Z. mobilis</i> σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	172
Σχήμα 5.20: Συγκριτική αντιστοίχιση των 5 πιθανών περιοχών που αντιστοιχούν στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 4 (ORF4).....	173
Σχήμα 5.21: Υποκλωνοποίηση των πέντε πιθανών ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pdc}	174
Σχήμα 5.22: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR5- P_{pdc} -ORF4a σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) που περιέχει 2 και 10% γλυκόζη.....	178
Σχήμα 5.23: Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών CU1Rif2/pLAFR5- P_{pdc} -ORF4b, CU1Rif2/pLAFR5- P_{pdc} -ORF4c, CU1Rif2/pLAFR5- P_{pdc} -ORF4d και CU1Rif2/pLAFR5- P_{pdc} -ORF4e σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) που περιέχει 10% γλυκόζη.....	181
Σχήμα 5.24: Δραστικότητα nmol NADH/min mg σε διάφορα στελέχη του <i>Z. mobilis</i>	183
Σχήμα 5.25: Απεικόνιση του ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CU1Rif2/pLAFR5: P_{pdc} -ORF4a παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.	185
Σχήμα 5.26: Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif ^r , CU1Rif2 καθώς και CU1Rif2/pLAFR5: P_{pdc} -ORF4a παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.....	186
Σχήμα 5.27: Συγκριτική αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF1 με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες IspD.....	199
Σχήμα 5.28: Δενδρόγραμμα όλων των γνωστών πρωτεϊνών IspD και του ORF1.....	200
Σχήμα 5.29: Συγκριτική αντιστοίχιση των πρωτεϊνών IspD που ανήκουν σε συγγενικά είδη.....	202

Σχήμα 5.30: Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1.203	
Σχήμα 5.31: Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1.....	204
Σχήμα 5.32: Συγκριτική αντιστοίχηση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF2 με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες IspF.....	213
Σχήμα 5.33: Δενδρόγραμμα όλων των γνωστών πρωτεϊνών IspF και του ORF2..	214
Σχήμα 5.34: Συγκριτική αντιστοίχηση των πρωτεϊνών IspF που ανήκουν σε συγγενικά είδη.....	217
Σχήμα 5.35: Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.	218
Σχήμα 5.36: Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.....	219
Σχήμα 5.37: Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF3.	222
Σχήμα 5.38: Συγκριτική αντιστοίχηση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF4a με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες CinA....	231
Σχήμα 5.39: Δενδρόγραμμα όλων των γνωστών πρωτεϊνών CinA και του ORF4a.	232
Σχήμα 5.40: Συγκριτική αντιστοίχηση των πρωτεϊνών CinA που ανήκουν σε συγγενικά είδη.....	234
Σχήμα 5.41: Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4a	235
Σχήμα 5.42: Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή του ORF4a.....	236
Σχήμα 5.43: Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBZIP1.....	236
Σχήμα 5.44: Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης των πρότυπων πρωτεϊνών από τη στήλη μοριακής διήθησης.....	247
Σχήμα 5.45: Γραφική παράσταση της παραμέτρου V_e/V_0 συναρτήσεϊ των μοριακών βαρών των πρότυπων πρωτεϊνών.....	248
Σχήμα 5.46: Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1 από τη στήλη μοριακής διήθησης. Στην εσωτερική εικόνα φαίνεται το πήγμα μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο της PAGE 4-20%.....	249

Σχήμα 5.47: Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 από τη στήλη μοριακής διήθησης. Στην εσωτερική εικόνα φαίνεται το πήγμα μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο της PAGE 4-20%..... 250

Σχήμα 5.48: Σχεδιασμός αντίδρασης PCR με τις ενδείξεις των χρησιμοποιούμενων πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR.....253

Σχήμα 5.49: Σχεδιασμός κατάλληλων αντιδράσεων PCR. Τα βελάκια δείχνουν τα εκάστοτε ζεύγη πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν και ανάμεσά τους φαίνονται τα αναμενόμενα προϊόντα PCR..... 254

Σχήμα 5.50: Νουκλεοτιδική αλληλουχία ένθεσης..... 257

Σχήμα 5.51: Εντοπισμός ένθεσης 848 bp στην περιοχή του ORF4 του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2..... 257

Σχήμα 5.52: Οργάνωση του οπερονίου *g/c* (μεγέθους 5.341 bp) στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2..... 258

Σχήμα 5.53: Αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικεύεται μετά την εύρεση του ενθέματος στην περιοχή του ORF4 στο CU1Rif2. Με μικρά γράμματα απεικονίζεται η αλληλουχία του ORF4 ενώ με κεφαλαία η αλληλουχία του ενθέματος..... 260

Σχήμα 5.54: Συγκριτική αντιστοίχιση της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4α με την πρωτεΐνη ClnA από το *Streptococcus pneumoniae*..... 261

Σχήμα 6.1: Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspD..... 283

Σχήμα 6.2: Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspF..... 284

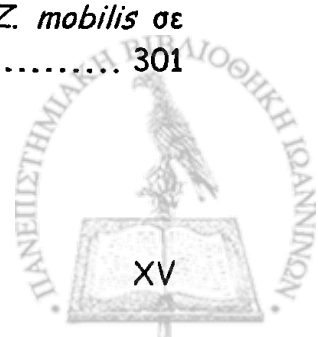
Σχήμα 6.3: Μοριακή οργάνωση της περιοχής του γονιδίου *dxr* στο *Z. mobilis*... 287

Σχήμα 6.4: Γενετική οργάνωση του οπερονίου *cln* από το *S. pneumoniae*.....291

Σχήμα 6.5:Οργάνωση του φοσμιδίου 43D2 από το στο στέλεχος ZM4 του *Z. mobilis* 296

Σχήμα 6.6: Προτεινόμενος μηχανισμός για την αυτορύθμιση του οπερονίου *rhoPQ* 298

Σχήμα 6.7: Προτεινόμενος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης..... 301



ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 1.1: Κύτταρα του βακτηρίου *Z. mobilis* στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση 100X) .4
- Εικόνα 5.1: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 1,2% των ανασυνδυασμένων pHS119:prs.....140
- Εικόνα 5.2: (Α) Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντων RT-PCR, της συμμεταγραφής των ORF1/ORF2 και ORF1/ORF3, (Β) Αποτύπωση κατά Southern..... 155
- Εικόνα 5.3: (Α) Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντων RT-PCR, της συμμεταγραφής των ORF2/ORF3, (Β) Αποτύπωση κατά Southern..... 156
- Εικόνα 5.4: (Α). Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντων RT-PCR, της συμμεταγραφής των ORF3/ORF4, (Β) Αποτύπωση κατά Southern..... 157
- Εικόνα 5.5: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR χρησιμοποιώντας 1 µg ολικού RNA από τα στελέχη του *Z. mobilis*, ATCC 10988 και CU1Rif2 κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν 2 και 10% γλυκόζη και χρησιμοποιώντας τα πριμοδοτικά μόρια F2 και R3 (Β και Γ) και κατάλληλα πριμοδοτικά μόρια για την περιοχή του 16 rRNA στο βακτήριο αυτό..... 158
- Εικόνα 5.6: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των προϊόντων PCR των ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4. 162
- Εικόνα 5.7: Ηλεκτροφόρηση των ανασυνδυασμένων pET29c(+):ORFs μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *MluI* και *XhoI*.....162
- Εικόνα 5.8: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης περιοριστικών πέψεων 175
- Εικόνα 5.9: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) του προϊόντος PCR..... 176
- Εικόνα 5.10: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) 176
- Εικόνα 5.11: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) του ανασυνδυασμένου pLAFR5-P_{pdC}-ORF4a..... 176
- Εικόνα 5.12: Ανάπτυξη μετασυζευγμένων αποικιών CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4a σε στερεό πλήρες θρεπτικό μέσο (Zymo Agar) που περιέχει 10% γλυκόζη.....177
- Εικόνα 5.13: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των πιθανών ανασυνδυασμένων pLAFR5-P_{pdC}-ORF4s που έχουν υποστεί πέψη με *EcoRI*-*PstI*...179

Εικόνα 5.14: Ανάπτυξη μετασυζευγμένων αποικιών CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4b, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4c, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4d και CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4e σε στερεό πλήρες θρεπτικό μέσο (Zymo Agar) που περιέχει 10% γλυκόζη.....180

Εικόνα 5.15: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των ανασυνδυασμένων pET29c(+):ORF4s που έχουν υποστεί πέψη με *Bam*HI.....188

Εικόνα 5.16: Υπερέκφραση των pET29c(+):ORF1, pET29c(+):ORF2 και pET29c(+):ORF3.....189

Εικόνα 5.17: Υπερέκφραση των 4 πιθανών κωδικευουσών περιοχών που αντιστοιχούν στο ORF4.....189

Εικόνα 5.18: Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδιακών και χρωμοσωμικών DNA μετά από τον χημικό μετασχηματισμό στο ATCC 10988. Από κάτω παρατίθενται τα φίλτρα του υβριδισμού με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc.....239

Εικόνα 5.19: Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA από τον μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5α με το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από το 10988. Δίπλα από το πήγμα της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc. Με βελάκια φαίνονται οι ζώνες του *inaZ* και των 6,5 kb.....240

Εικόνα 5.20: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κλασμάτων από την απομόνωση της πρωτεΐνης του ORF1.....241

Εικόνα 5.21: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κλασμάτων από την απομόνωση της πρωτεΐνης του ORF2.....242

Εικόνα 5.22: SDS-PAGE των πρωτεϊνικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από τη στήλη βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.....244

Εικόνα 5.23: SDS-PAGE των πρωτεϊνικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από τη στήλη βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.....245

Εικόνα 5.24: Απομόνωση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2 υπό αποδιατακτικές συνθήκες από στήλη κατακράτησης ιστιδινών.....251

Εικόνα 5.25: Ηλεκτροφόρηση αραιωμένων 1:3 δειγμάτων.....252

Εικόνα 5.26: Προϊόντα PCR με πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια τα ORF1sense και ORF4antisense.....254

Εικόνα 5.27: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των προϊόντων PCR. ...	255
Εικόνα 5.28: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (0,7%) των προϊόντων PCR...	256
Εικόνα 5.29: Περιοριστική ανάλυση της περιοχής του ORF4 από το CU1Rif2...	258
Εικόνα 5.30: (Α) Πέψεις χρωσωμικών DNA, (Β) Υβριδισμός 42 °C, Πλύσεις 68 °C, (Γ) Υβριδισμός 68 °C, Πλύσεις 68 °C.....	263
Εικόνα 5.31: (Α) Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA από διάφορα στελέχη <i>Z. mobilis</i> , (Β) Υβριδισμός κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο την ένθεση των 848 bp.....	264
Εικόνα 5.32: Προϊόντα αντιδράσεων PCR σε χρωσωμικά DNA από τα 10988, CU1Rif2, CU1, CP4 και <i>Halomonas meridiana</i> με πριμοδοτικά μόρια τους εκκινητές της ενθέσεως.....	265
Εικόνα 5.33: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 0,7% χρωσωμικού DNA CU1Rif2 το οποίο υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα <i>Bam</i> HI και <i>Sal</i> I (Α) και απομόνωση της ζώνης που αντιστοιχεί στα 5,5 kb.....	267
Εικόνα 5.34: Υβριδισμός in-situ με ανιχνευτικό μόριο το οπερόνιο <i>glc</i>	268
Εικόνα 5.35: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 27 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία έχουν υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο <i>Hind</i> III, η οποία είναι και η πιο χαρακτηριστική πέψη του οπερονίου <i>glc</i> . Δίπλα από την εικόνα του πηγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πηγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο <i>glc</i>	269
Εικόνα 5.36: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία έχουν υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα <i>Bam</i> HI και <i>Sal</i> I (πάνω πήγμα) και <i>Bam</i> HI (κάτω πήγμα). Δίπλα από την εικόνα του πηγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πηγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο <i>glc</i>	270
Εικόνα 5.37: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου Νο 18 το οποίο έχει υποστεί πέψη με διάφορα περιοριστικά ένζυμα. Δίπλα από την εικόνα του πηγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πηγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο <i>glc</i>	271

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ap: Αμπικιλίνη

ATCC: American Type Collection

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

bp: Ζεύγη βάσεων

BSA: Αλβουμίνη ορού βοός

Cm: Χλωραμφαινικόλη

Da: Daltons

DTT: διθειοτρεϊτόλη

d.s.H₂O: Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

DMSO: Διμεθυλοσουλφοξείδιο

DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DOXP: φωσφορική δεοξυ-ξυλουλόζη

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EtBr: Βρωμιούχο αιθίδιο

et. al. : Και συνεργάτες

h: ώρες

IPTG: Isopropylthio-β-D-galactoside

IspD: συνθάση της 4-διφωσφοκυτιδύλο-2-C-μεθυλοερυθριτόλης

IspF: συνθάση της 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλ-2,4-κυκλοκυτιδύλο

kb: Χιλιάδα βάσεων (κιλοβάσεις)

κεφ. : Κεφάλαιο

Km: Καναμυκίνη

min: λεπτά

MOPS : Μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ

NAD: Νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NADH: Νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

NBT: Nitroblue tetrazolium chloride

O.D.: Οπτική πυκνότητα



ORF: Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

Παρ. : Παράγραφος

PMSF: Phenylmethyl sulfonyl fluoride

Rif: Ριφαμπικίνη

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

rpm: Στροφές ανά λεπτό

SDS: Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο

Tc: Τετρακυκλίνη

Tris: Τρις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο

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

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



Πίνακας αμινοξέων

Αμινοξύ	Σύμβολο τριών γραμμάτων	Σύμβολο
Αλανίνη	Ala	A
Αργινίνη	Arg	R
Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαρτικό οξύ	Asp	D
Κυστεΐνη	Cys	C
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλυκίνη	Gly	G
Ιστιδίνη	His	H
Ισολευκίνη	Ile	I
Λευκίνη	Leu	L
Λυσίνη	Lys	K
Μεθειονίνη	Met	M
Φαινυλαναίνη	Phe	F
Προλίνη	Pro	P
Σερίνη	Ser	S
Θρεονίνη	Thr	T
Τρυπτοφάνη	Trp	W
Τυροσίνη	Tyr	Y
Βαλίνη	Val	V

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Εισαγωγή



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis*

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το βακτήριο *Zymomonas 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 Α. Αργότερα, τα έτη 1945 και 1948 ο Barker απομόνωσε άλλα δύο στελέχη, το Β και το C. Το 1950 ο Millis (Millis 1951) απομόνωσε από μηλίτες και αχλαδίτες άλλα 33 στελέχη : τα 27 έμοιαζαν με το στέλεχος Β του Barker και τα υπόλοιπα 6 με το στέλεχος C. Η ασθένεια του μηλίτη οίνου οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάπτυξη 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 ακεταλδεϋδης η οποία αλλοιώνει τη γεύση του μηλίτη.

Οι Barker και 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 ακεταλδεϋδης που παράγει.

Το έτος 1972 ο Goncalves 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).

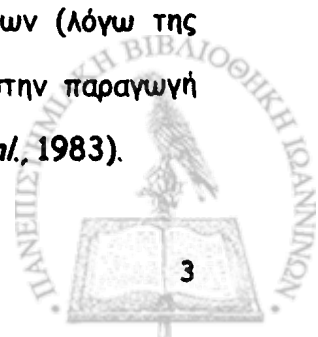
Οι Swings and Delay (1977) εντόπισαν το βακτήριο σε χυμό φοινικόδεντρου ο οποίος έχει υποστεί ζύμωση.

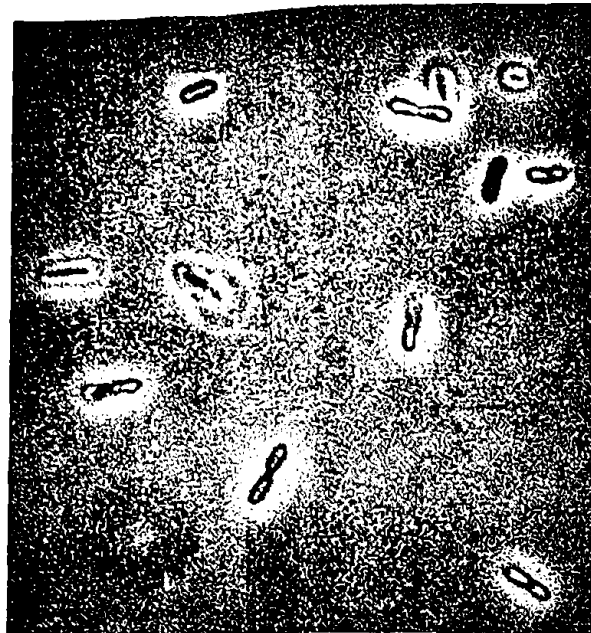
Έχει αναφερθεί ότι στο παρελθόν το *Z. mobilis* χρησιμοποιήθηκε για θεραπευτικούς σκοπούς (Goncalves de Lima 1972, Swings and Delay 1977). Σήμερα το βακτήριο *Z. mobilis* παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης του παραγωγικότητας σε αιθανόλη σε σχέση με αυτή του παραδοσιακού ζυμομύκητα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

1.2 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 (Εικόνα 1). 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 της παραγωγής CO_2) και από μία φρουτώδη οσμή η οποία οφείλεται στην παραγωγή πολυμερών φρουκτόζης (λεβάνης) (Swings and Delay 1977, Park *et al.*, 1983).





Εικόνα 1.1. Κύτταρα του βακτηρίου *Z. mobilis* στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση 100X)

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

1.3 Ζύμωση υδατανθράκων στο *Z. mobilis*

Το βακτήριο *Z. mobilis* καταβολίζει μόνο γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη, και παράγει αιθανόλη και CO_2 χρησιμοποιώντας τη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff (KDGP, Σχήμα 1.1) (Conway 1992). Η γλυκολυτική αυτή πορεία είναι τόσο αποτελεσματική, που 1 mole γλυκόζης μετατρέπεται σε 2 mole αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα με παράλληλη παραγωγή ενός μόνο mole ATP (Algar and Scores 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 1 (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 (InnB ή SacC), η οποία καταλύει την παραγωγή γλυκόζης και φρουκτόζης (Park *et al.*, 1983, Viikari 1984, Preziosi *et al.*, 1990, Preziosi *et al.*, 1990, Yanasse *et al.*, 1992), και μία ενδοκυτταρική ινβερτάση (InnA ή SacA), της οποίας ο ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί. Το γονίδιο που κωδικεύει αυτή την ινβερτάση (*SacA*) έχει κλωνοποιηθεί και έχει εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli*, αναπληρώνοντας τη δραστικότητα της ενδοκυτταρικής ινβερτάσης (Gunasekaran *et al.*, 1990). Παραμένει όμως ασαφές αν μία ενδοκυτταρική ινβερτάση είναι απαραίτητη στο *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 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 τη φρουκτόζη μέσω του ενζύμου οξειδοορεδοκτάση 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 οξειδοορεδοκτάσης (*gfo*) έχει απομονωθεί (Kanagasundaram *et al.*, 1992).

Σχήμα 1.1: 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-γλυκεριναλεϋδης

GDH: αφυδρογονάση της γλυκόζης

GFOR: οξειδοοδουκτάση 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 (Kanagasundaram *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 οξειδοοδουκτάση της γλυκόζης-φρουκτόζης, μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ μέσω του περιπλασμικού ένζυμου γλυκονολακτονάση, της οποίας το γονίδιο έχει απομονωθεί (Kanagasundaran and Scores 1992). Το γλυκονικό οξύ εισχωρεί στο κύτταρο μέσω ενός μεταφορέα που δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω και αποικοδομείται σε αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα (ως συν-υπόστρωμα). Παρόλα 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 γλυκονογένεσης.

Η σορβιτόλη που παράγεται κατά την δράση της οξειδοοδουκτάσης 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 mRNA 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 τη 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 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 τη 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 ισοενζύμων, 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 (*adhI*, *adhII*), 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 παραγωγικότητά 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).

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 NADH 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 ακεταλδεΐδης) και έχει αναφερθεί ότι είναι ένα κυτοπλασματικό ένζυμο (Doelle *et al.*, 1993).

Όσον αφορά τις αναβολικές διαδικασίες στο *Z. mobilis*, η πορεία των φωσφορικών πεντοζών είναι μη συμπληρωμένη 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-γλυκεριναλδεΐδη 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 όμως απομονώθηκε 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 είναι μη συμπληρωμένος, 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). Έτσι λοιπόν, για το *Z. mobilis* βρέθηκε ότι τα γονίδια *pgk* και *gap* επί παραδείγματι, τα οποία κωδικεύουν την φωσφογλυκερινική κινάση και την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης αντίστοιχα, σχηματίζουν ένα οπερόνιο. Παρ' όλα αυτά, η πρωτεΐνη GAP βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από την ΡGΚ και αυτή η αφθονία της φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα του μικρότερου

ρυθμού αποικοδόμησης του 3' *gar* τμήματος του mRNA σε σχέση με το ρυθμό αποικοδόμησης του ολικού μεταγραφήματος (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 δραστικότητα τους, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η υπόθεση ότι η γλυκολυτική ροή ρυθμίζεται από τη μέγιστη δραστικότητα 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 al.* 1995, Snoer *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). 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).

1.4 Η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης στο *Z. mobilis*

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τον τρόπο της πρόσληψης της γλυκόζης από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Η πρόσληψη αυτή μπορεί να γίνει μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης, 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 μεταφορείς MFS (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 τη 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 οينوποιία 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. 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).

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 προσλαμβάνεται 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).

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).

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 ($K_m = 2 \text{ mM}$) από αυτή που προσλαμβάνει την γλυκόζη ($K_m = 15 \text{ mM}$). Παρόλα 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).

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 *E. coli* (Schweizer *et al.*, 1997) και το σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης στο βακτήριο *Z. 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 πρόσληψη της γλυκόζης όμως στο βακτήριο αυτό γίνεται κυρίως μέσω ενός συστήματος PTS (βλέπε παρακάτω).

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).

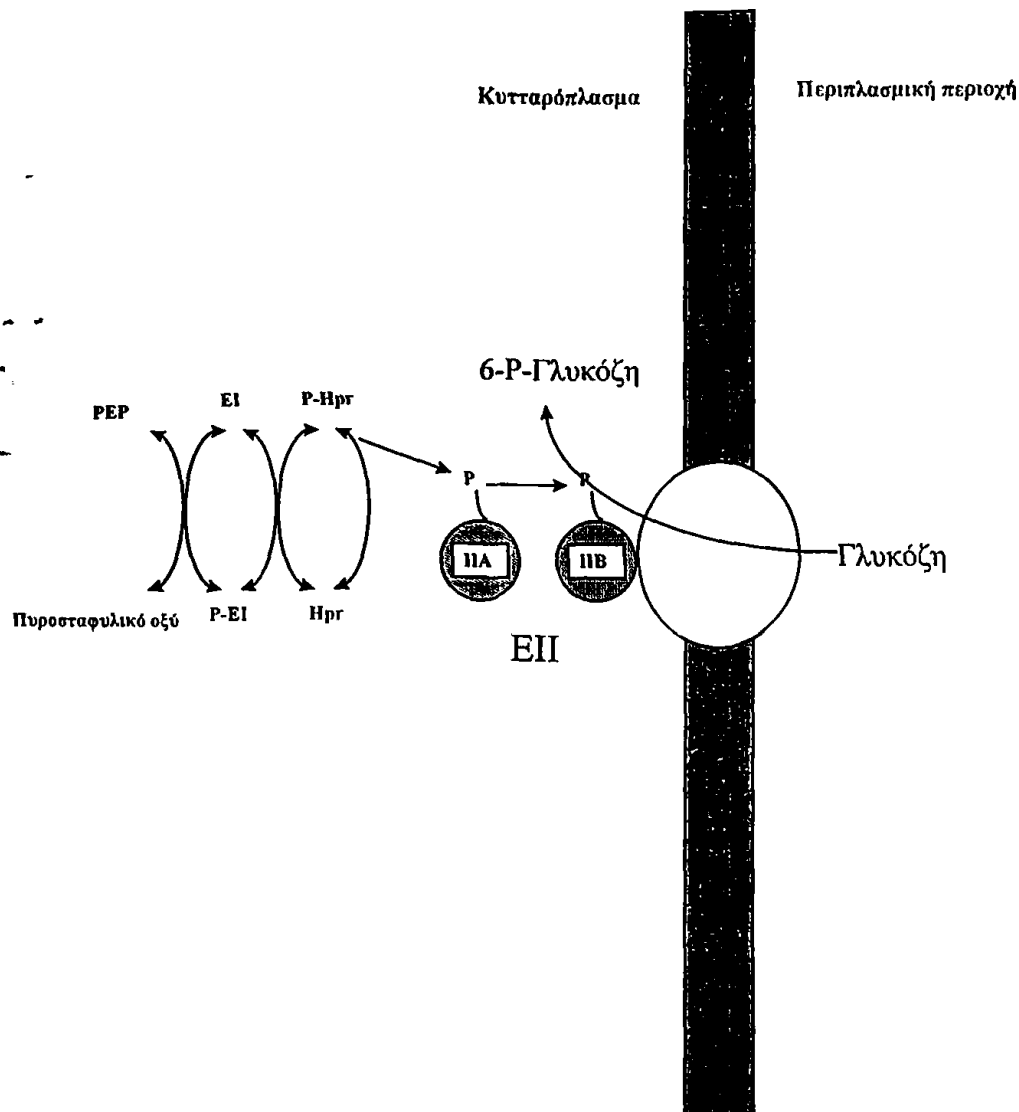
Ανεξάρτητα από τον οργανισμό και την πηγή άνθρακα, όλα τα συστήματα PTS που έχουν χαρακτηριστεί καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP) στον υδρογονάνθρακα που προσλαμβάνεται. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται συγχρόνως με την μετατόπιση του υδρογονάνθρακα κατά 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 1.2, το σύστημα PTS για την πρόσληψη της γλυκόζης στο βακτήριο *B. subtilis* περιέχει δύο στοιχεία: το ένζυμο I (EI) και τη θερμοανθεκτική πρωτεΐνη Hpr, τα οποία κωδικοούνται από τα γονίδια *ptsI* και *ptsH*, αντίστοιχα, σχηματίζοντας ένα οπερόνιο (Paulsen *et al.*, 1998). Όταν η πρωτεΐνη Hpr είναι φωσφορυλιωμένη δίνει τη 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 IIA^{Glc} και IIB^{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 περμεακών 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 IIA^{Glc} και την IIBC^{Glc}. Η πρωτεΐνη IIA^{Glc} είναι υδρόφιλη και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η πρωτεΐνη IIBC^{Glc} είναι μεμβρανική και χωρίζεται σε δύο υπομονάδες: την IIB^{Glc} (καρβοξυτελικό άκρο) και την IIC^{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 IIA^{Glc} στην His 90 και την IIB^{Glc} στην Cys 421 (Meadow and Roseman 1996).



Σχήμα 1.2: 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 (*gk*) 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 (Kemner *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* έχει την 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 αποτελεσματικά και τη γλυκόζη (Ma *et al.*, 1998).

1.5 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 εκχυλίσμα λιπίδια είναι κατά 96.8% πολικά και κατά 3.2% μη πολικά. Έχει αναφερθεί από τον Tornabene και τους συνεργάτες του το έτος 1982, ότι τα ουδέτερα λιπίδια περιέχουν σκουαλένιο, 21 πεντακυκλικούς υδρογονάνθρακες, ελεύθερα λιπαρά οξέα,

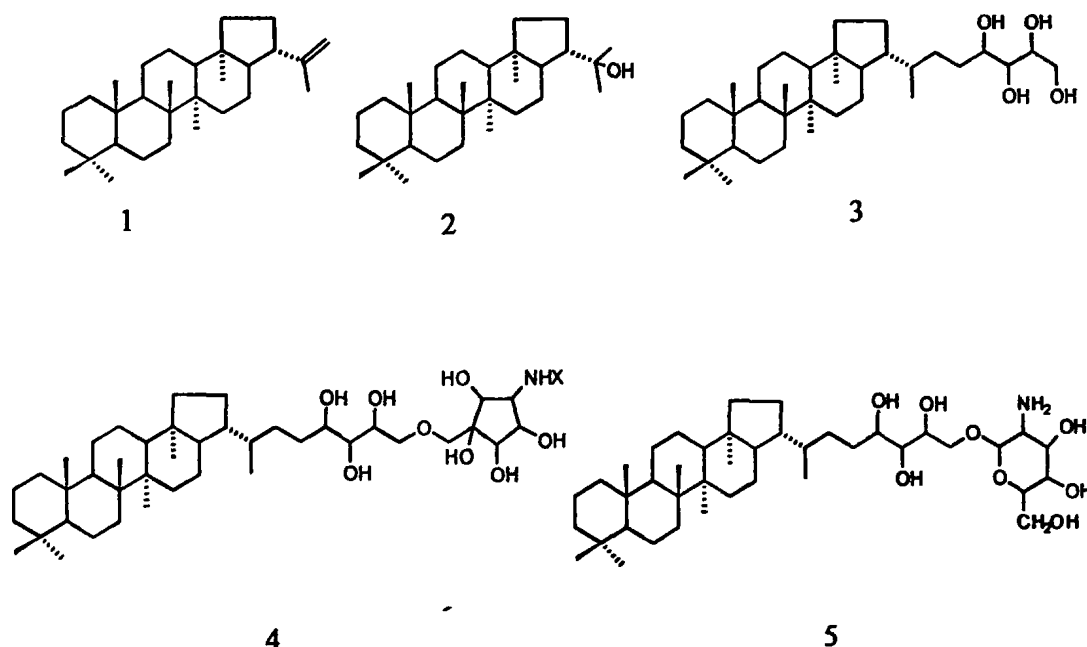
τρι- δι- και μονογλυκερίδια, λιποαμινικές ενώσεις και χρωστικές. Στο κλάσμα των πολικών λιπιδίων περιέχονται κυρίως φωσfolιπίδια αλλά και γλυκολιποπρωτεΐνες (Tornabene *et al.*, 1982).

Το κύριο φωσfolιπίδιο 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 (2%) 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, 1989, 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 1.3).

Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι στη μεμβράνη του *Z. mobilis*, περιέχεται μια διαλκυλοκυκλοεξαδιενκαρβινόλη (Koukkou *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-ισο-νταμμάρα-20(21),24-διένιο, ένα 17-ισο-νταμμάρα-20,24-διένιο, ένα νταμμάρα-20(21),24-διένιο, ένα έφα-7,24-διένιο και ένα νεοοπ-13(18)-ένιο (Δουκα *et al.*, 2001).



Σχήμα 1.3: Τα σπανοειδή του *Z. mobilis*. 1: Διπλοπτένιο, 2: Διπλοπτερόλη, 3: Βακτηριοσπανοτετρόλη, 4: Αιθέρας της βακτηριοσπανοτετρόλης, 5: Γλυκοζαμίτης της βακτηριοσπανοτετρόλης.

1.6 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*

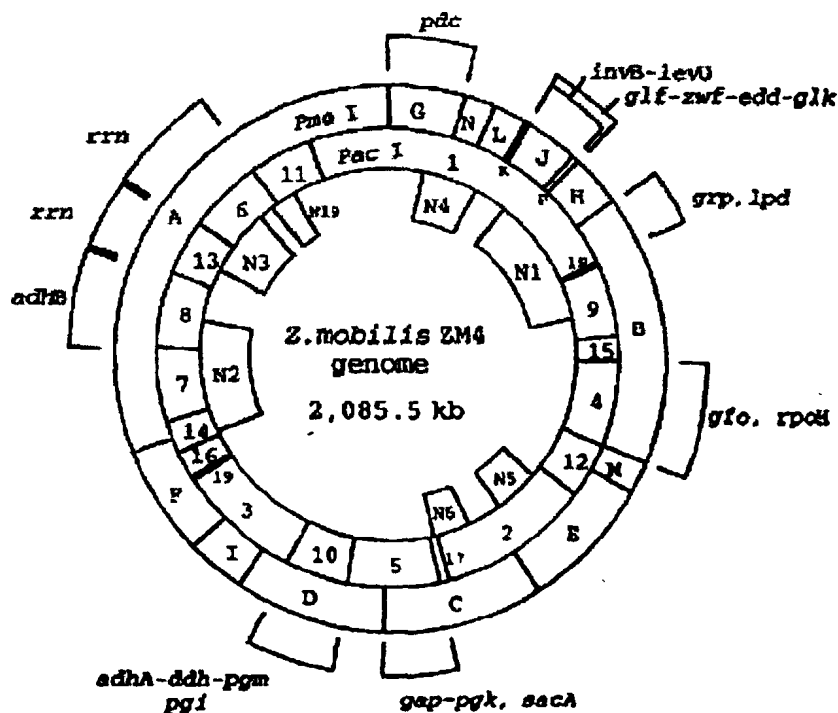
παρουσιάζει ομολογία 95% (Swings and Delay 1977). Ακόμα, η αναλογία G+C στο σύνολο του γονιδιώματος του είναι 48.5 ± 1 (Swings and Delay 1977). Πρόσφατα, το μέγεθος του γονιδιώματος του *Z. mobilis* υπολογίστηκε με χρησιμοποίηση διάφορων περιοριστικών ενζύμων, και βρέθηκε να είναι 2085.5 kb (Kang and Kang 1998).

Το είδος *Z. mobilis* μπορεί να διακριθεί σε δύο υποείδη: 1) το *Zygomonas mobilis* subsp. *mobili*, 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).

Διάφορες ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο έχουν βρει την αλληλουχία πάνω από 30 γονιδίων και πέντε οπερονίων του βακτηρίου αυτού. Η πλειοψηφία των γονιδίων αυτών κωδικεύουν κάποια ένζυμα "κλειδιά" της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudorof, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Εκτός από τα γονίδια του μεταβολισμού σακχάρων, 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 DNA λιγάση (Shark and Conway 1992), το γονίδιο *trp*, το οποίο εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της τρυπτοφάνης (Eddy *et al.*, 1988), γονίδια του μεταβολισμού της σακχαρόζης (Gunasekaran *et al.*, 1990, Kanagasundaram and Scopes 1992b, Song *et al.*, 1993, 1994), 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 την αλκοολική

αφυδρογονάση και φαίνεται να έχει και δράση ενδο-β-γλυκανάσης (Yoon *et al.*, 1995). 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 (Perzi *et al.*, 1998). Τέλος απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το γονίδιο *dxr* το οποίο συμμετέχει στην πορεία της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (Grolle *et al.*, 2000).

Οι Kang *et al.*, (1998) κατασκεύασαν ένα κυκλικό χάρτη του γονιδιώματος του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* στον οποίο φαίνονται πάνω από 20 γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί στο βακτήριο αυτό (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4. Πλήρης κυκλικός φυσικός και γενετικός χάρτης του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis*.

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 συστατικοί. 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, Arvanitis *et al.*, 1995).

Το στέλεχος ATCC 10988 περιέχει 6 πλασμίδια των οποίων τα μεγέθη φαίνονται στον Πίνακα 1.1. Τα δύο μικρότερα πλασμίδια παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας (Scordaki and Drainas 1987, Arvanitis *et al.*, 1995). Το τρίτο μικρότερο σε μέγεθος πλασμίδιο (2.7 kb) αναλύθηκε ως προς την αλληλουχία των βάσεων (Misawa and Nakamura 1989) και βρέθηκαν λειτουργίες κινητοποίησης (Arvanitis *et al.*, 1995, Afendra *et al.*, 1999).

Σε πήγμα αναρόζης πραγματοποιείται συµμετανόστευση 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).

Πίνακας 1.1: Φυσικά πλασμίδια του στελέχους ATCC 10988 του βακτηρίου *Z. mobilis*

Φυσικό πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)
pZMO1	1.7
pZMO2	1.8
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 γενταμικίνη, την καναμικίνη και τη στρεπτομικίνη (Walia *et al.*, 1984) και η ανθεκτικότητα του στελέχους ATCC 10988 στα ιόντα υδραργύρου (Ogale and Deobagkar 1988, Kanurakatan and Gunasekaran 1991), χωρίς όμως αυτό να έχει πλήρως επιβεβαιωθεί. Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η σταθερότητα του πλασμιδίου pZMO2 του στελέχους ATCC 10988 επηρεάζεται από μία θεωρητική *recA* λειτουργία (Vartholomatos *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 της περιοχής έναρξης μεταφορικής αντιγραφής DNA, *oriT* (Afendra *et al.*, 1999).

1.6.1 Εύρεση και χαρακτηρισμός οπερονίων στο χρωμόσωμα του *Z. mobilis*

Μέχρι σήμερα, τα οπερόνια που έχουν βρεθεί και χαρακτηρισθεί στο χρωμόσωμα του *Z. mobilis* είναι τα ακόλουθα:

1.6.1.1 Το οπερόνιο *gluEMP* (οπερόνιο μεταφοράς γλουταμινικού οξέος)



Σχήμα 1.5. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *gluEMP*.

Αναγνωρίστηκε ένα σύμπλεγμα γονιδίων καθοδικά του γονιδίου *grp*, το *gluEMP* (Peekhaus *et al.*, 1996). Από την ετερόλογη μελέτη των γονιδίων αυτών στο *E. coli* αποκαλύφθηκε ότι τα τρία γονίδια *gluE*, *gluM* και *gluP*, κωδικεύουν ένα υψηλής συγγένειας σύστημα μεταφοράς το οποίο είναι εξειδικευμένο για το ασπαραγινικό και γλουταμινικό οξύ και παρουσιάζει λειτουργικές και δομικές ομοιότητες με τα συστήματα τα οποία εξαρτώνται από την πρόσδεση πρωτεϊνών.

Για τα γονίδια *grp*, *gluE*, *gluM* και *gluP* ως κωδικόνιο έναρξής τους χρησιμοποιείται το ATG ενώ οι χρησιμοποιούμενες αλληλουχίες Shine-Dalgarno για κάθε ένα από αυτά είναι οι παρακάτω:

gluE: GCAGG

gluM: GAGAA

gluP: GAGG

grp: GGGAA

Το γονίδιο *gluE* κωδικεύει μια περιπλασμική προσδένουσα πρωτεΐνη, το *gluM* κωδικεύει μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη ενώ τέλος το *gluP* κωδικεύει μια ATP- προσδένουσα πρωτεΐνη.

Για το οπερόνιο αυτό δεν έχει βρεθεί αλληλουχία τερματισμού γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν είναι κομμάτι ενός μεγαλύτερου οπερονίου.

Η πρωτεΐνη Grp χαρακτηρίστηκε μετά από μελέτες ως μια μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη η έκφραση της οποίας στο *E. coli* επάγει την πρόσληψη του γλουταμινικού οξέος ενώ στο *Z. mobilis* την καταστέλλει. Συνεπώς, η ιδιότητά της να καταστέλλει το σύστημα δευτερογενούς μεταφοράς του γλουταμινικού οξέος την

καθιστά εξαιρετικά σημαντική και ως εκ τούτου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση του οπερονίου *gluEMP* στο *Z. mobilis*.

1.6.1.2 Το οπερόνιο *leuW*



Σχήμα 1.6. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *leuW*.

Υπάρχουν μια σειρά από συστήματα χρησιμοποίησης σακχαρόζης τόσο σε ευκαρυωτικά όσο και σε προκαρυωτικά κύτταρα. Δύο τέτοια συστήματα απαντούν στους μικροοργανισμούς όπως έχει προαναφερθεί: τα ενδοκυτταρικά και τα εξωκυτταρικά. Το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι η πρόσληψη της σακχαρόζης μέσα στο κύτταρο. Η σακχαρόζη μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ή το περίπλασμα του κυττάρου μέσω του συστήματος PTS και στη συνέχεια διασπάται από μια ενδοκυτταρική υδρολάση της φωσφορικής σακχαρόζης. Το σύστημα αυτό είναι πολύ καλά μελετημένο στο *B. subtilis*. Η άλλη περίπτωση υδρόλυσης της σακχαρόζης λαμβάνει χώρα εξωκυτταρικά. Σ' αυτή την περίπτωση η σακχαρόζη υδρολύεται αρχικά εξωκυτταρικά και εν συνεχεία μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Τέτοιο σύστημα υπάρχει σε μερικά βακτήρια, από τα οποία απουσιάζει το σύστημα PTS, όπως το *Z. mobilis*.

Στο *Z. mobilis* έχουν αναγνωρισθεί έως σήμερα τρία σακχαρολυτικά ένζυμα (Ki-Bang Song *et al.*, 1999): μια ενδοκυτταρική σακχαράση (η λειτουργία της οποίας παραμένει άγνωστη έως σήμερα), και δύο εξωκυτταρικές, η ινβερτάση και η λεβανσακχαράση. Η σακχαρόζη υδρολύεται από τα εξωκυτταρικά ένζυμα προς γλυκόζη και φρουκτόζη οι οποίες στη συνέχεια εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω ενός συστήματος διευκολυνόμενης διάχυσης, και χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα από την κεντρική γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff. Αυτά τα εξωκυτταρικά σακχαρολυτικά ένζυμα αποτελούν ένα πρωτογενές μεταβολικό

μονοπάτι το οποίο επιτρέπει στο *Z. mobilis* να χρησιμοποιήσει τη σακχαρόζη ως πηγή ενέργειας.

Το τμήμα των 4,5 kb από το χρωμόσωμα του *Z. mobilis* που φαίνεται στο Σχήμα 1.6, κωδικεύει πέντε θεωρητικές περιοχές εκ των οποίων:

το ORF1 κωδικεύει μια εξωκυτταρική λεβανσακχαράση, *leuW*

το ORF2 κωδικεύει μια εξωκυτταρική ινβερτάση, *inlB*

το ORF3 κωδικεύει μια μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομολογία με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη Lrp,

το ORF4 κωδικεύει μια ρακεμάση της ασπαρτάμης και τέλος

το ORF5 παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με το γονίδιο *glk* το οποίο ανήκει στο οπερόνιο *glf* του *Z. mobilis* και το οποίο κωδικεύει τέσσερα γλυκολυτικά ένζυμα. Φαίνεται λοιπόν ότι το οπερόνιο *leuW-inlB* βρίσκεται πολύ κοντά στην περιοχή του οπερονίου *glf*.

Τόσο το γονίδιο *leuW* όσο και το *inlB* χρησιμοποιούν ως κωδικόνιο έναρξης το ATG. Ανοδικά του *leuW* αναγνωρίστηκε αλληλουχία Shine-Dalgarno τυπική για το *Z. mobilis* καθώς και περιοχή προαγωγού. Αντίθετα, ανοδικά του κωδικωνίου έναρξης του *inlB* δεν βρέθηκε αλληλουχία Shine-Dalgarno και τελικά αποδείχθηκε ότι τα γονίδια *leuW* και *inlB* αποτελούν ένα οπερόνιο, βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του ίδιου προαγωγού και συμμεταγράφονται.

1.6.1.3 Το οπερόνιο *groESL*



Σχήμα 1.7. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *groESL*.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του *Z. mobilis* είναι η ιδιότητά του να παράγει αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, όπως επίσης και οι αυξημένες θερμοκρασίες, αποτελούν μικροβιακό στρες και έχουν ως αποτέλεσμα την καθολική επαγωγή πρωτεϊνών του στρες. Για το *Z. mobilis* η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης αποτελεί ένα φυσικό στρες.

Τα πιο γνωστά γονίδια του στρες για το *Z. mobilis* τα *groES* και *groEL* (Σχήμα 1.7) κλωνοποιήθηκαν και βρέθηκε ότι κωδικεύουν δύο πρωτεΐνες 10,29 και 58,428 kDa αντίστοιχα (Barbosa *et al.*, 1994). Ανοδικά του *groES* βρέθηκε αλληλουχία Shine-Dalgarno GGTG ενώ η αντίστοιχη για το *groEL* ήταν η GGAG. Βρέθηκε επίσης και μία αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής η GCCCCTGCAGTGCAGGGGCT. Τέλος βρέθηκε ότι τα δύο αυτά γονίδια αποτελούν ένα οπερόνιο και συµμεταγράφονται.

1.6.1.4 Το οπερόνιο *gap*



Σχήμα 1.8. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *gap*.

Η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAP) καθώς και η φωσφογλυκερική κινάση (PGK) καταλύουν τη σύνθεση ενός φωσφορικού δεσμού υψηλής ενέργειας και τη μεταφορά του στο ADP κατά τη γλυκόλυση. Το ενζυμικό αυτό σύστημα μαζί με αυτό της πυροσταφυλικής κινάσης αποτελούν τις κύριες πορείες σύνθεσης του ATP στο *Z. mobilis*. Τα γονίδια που κωδικεύουν τις πρωτεΐνες GAP και PGK έχουν κλωνοποιηθεί σε γνωστούς φορείς κλωνοποίησης και έχει βρεθεί η νουκλεοτιδιακή τους αλληλουχία. Τα γονίδια αυτά έχει βρεθεί ότι βρίσκονται παρακείμενα σε διάφορους ανεξάρτητους κλώνους από βιβλιοθήκες του βακτηρίου αυτού διαχωριζόμενα συνήθως από 221 ζεύγη βάσεων. Η ανάλυση με προέκταση πριμοδότη (primer extention) αποκάλυψε την ύπαρξη περιοχών προαγωγών διατεταγμένων στη σειρά ανοδικά του γονιδίου *gap* (Σχήμα 1.8) ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύθηκε καμία περιοχή προαγωγού ανοδικά του γονιδίου *pgk*. Τα δύο αυτά γονίδια βρέθηκε ότι σχηματίζουν ένα πολυκιστρονικό οπερόνιο (Eddy *et al.*, 1989 και 1991), αρχίζουν με ATG ως κωδικόνιο έναρξης και ανοδικά τους αναγνωρίστηκαν τυπικές για το *Z. mobilis* αλληλουχίες Shine-Dalgarno. Βρέθηκε ότι του γονιδίου *pgk* έπεται μια ασυνήθιστη αλληλουχία 7 νουκλεοτιδίων (CCTGCA) η

οποία επαναλαμβάνεται 52 φορές και πιθανόν να παίζει το ρόλο του τερματισμού της μεταγραφής.

Οι πρωτεΐνες GAP και PGK είναι ακριβώς όμοιες σε μέγεθος, καταλύουν διαδοχικές αντιδράσεις στη γλυκόλυση και απαιτείται ακριβώς η ίδια δραστηριότητα. Η κινητική παράμετρος K_{cat} της πρωτεΐνης PGK είναι τετραπλάσια αυτής της GAP και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χαμηλότερων επιπέδων της PGK σε σχέση με την πρωτεΐνη GAP. Σε άλλους μικροοργανισμούς τα γονίδια *gap* και *pgk* μεταγράφονται ξεχωριστά επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό τον αναξάρτητο έλεγχο της έκφρασής τους. Στο *Z. mobilis* όμως, η οργάνωση των γονιδίων αυτών ως οπερόνιο φαίνεται ότι συμπεριλαμβάνει επιπρόσθετα ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία είναι υπεύθυνα για την μείωση των επιπέδων παραγωγής της πρωτεΐνης PGK. Αυτή η ρυθμιστική πληροφορία φαίνεται ότι εμπεριέχεται εντός του οπερονίου. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός του ότι παρατηρήθηκε όμοια διαφοροποίηση στην έκφραση μεταξύ ανασυνδυασμένων κυττάρων τα οποία περιείχαν μονά χρωμοσωμικά αντίγραφα των γονιδίων *gap* και *pgk* και κυττάρων που περιείχαν πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων αυτών. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης GAP είναι 6 με 9 φορές μεγαλύτερη από αυτή της PGK. Συνήθως αναμένεται μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεΐνης η οποία κωδικεύεται από γονίδιο που βρίσκεται πιο κοντά στην περιοχή του προαγωγού, όμως τα επίπεδα της πρωτεΐνης PGK είναι ασυνήθιστα χαμηλά.

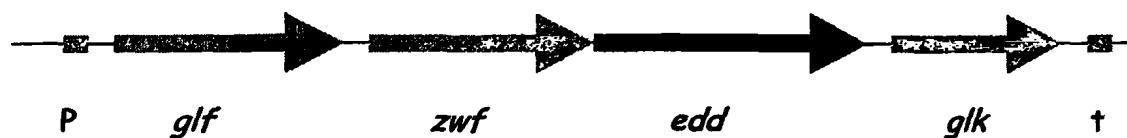
Η διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων *gap* και *pgk* φαίνεται ότι ελέγχεται στο επίπεδο του mRNA. Παρά το γεγονός του ότι το οπερόνιο *gap* υπάρχει σε ένα αντίγραφο στο χρωμόσωμα του *Z. mobilis*, μετά από πειράματα αποτύπωσης κατά Northern παρατηρήθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών mRNAs τα οποία κωδικεύουν το γονίδιο *gap*. Η αναλογία του μηνύματος που προέρχεται από το γονίδιο *gap* σε σχέση με αυτό που προέρχεται από το *pgk* υπολογίζεται στα 5:1.

Τα μέχρι στιγμής δεδομένα είναι σύμφωνα με την ύπαρξη δύο πιθανών μηχανισμών για την εξήγηση της διαφοροποίησης της έκφρασης των γονιδίων *gap* και *pgk* στο *Z. mobilis*.

(α) εξασθένηση της μεταγραφής ή

(β) αποικοδόμηση του 3' τμήματος του mRNA του γονιδίου *pgk* με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με το ρυθμό αποικοδόμησης του ολικού μεταγραφήματος, με πιο πιθανό τον τελευταίο (Meija *et al.*, 1992).

1.6.1.5 Το οπερόνιο *glf*



Σχήμα 1.9. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *glf*.

Όπως έχει προαναφερθεί το βακτήριο *Z. mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram αιθανολοπαραγωγό βακτήριο, το οποίο αποκτά την μεταβολική του ενέργεια αναερόβια μέσω της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff (Σχήμα 1.1).

Η γλυκόζη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενός συστήματος διευκολυνόμενης διάχυσης υψηλής ταχύτητας και χαμηλής συγγένειας. Το γονίδιο που κωδικεύει τον μεταφορέα της γλυκόζης, *glf*, απομονώθηκε και βρέθηκε ότι βρίσκεται σε ένα οπερόνιο με τρία άλλα γονίδια που κωδικεύουν τα εξής ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff (Barnell *et al.*, 1990, 1992): την αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (*zwf*), την δεϋδρατάση του φωσφογλυκονικού οξέος (*edd*) και την γλυκοκινάση (*glk*) (Σχήμα 1.9).

1.7 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, Pahla *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* οξειδοορεδοουκτάση 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.

1.8 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, 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 (NaCl) 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 δραστηριότητες 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, Typas and Galani 1992) και ανθεκτικά σε υψηλές

συγκεντρώσεις οξικού οξέος (Joachimstahl *et al.*, 1998). Όσον αφορά την τρασποζονιακή μετάλλαξη οι Galani και Typas το 1989, απομόνωσαν με αυτό τον τρόπο στελέχη αυξότροφα και στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Επίσης τα Tn5, Tn501 και ο φάγος mini Mu (πλασμίδιο pULB113=RP4::mini Mu) έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία σε αυτόν τον τομέα. Ο φάγος mini Mu αποδείχθηκε ότι ενσωματώνεται με ιδιαίτερη σταθερότητα και με μη ειδικό τρόπο στο γονιδίωμα του *Z. mobilis* (Pappas *et al.*, 1997).

1.9 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 μέθοδος ρουτίνας με μεγάλη επιτυχία.

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 μετασυσζευγμένα στελέχη παρουσιάζουν μεγάλη αστάθεια (Stokes *et al.*, 1982, Carey *et al.*, 1983, Montenecourt 1985, Typas 1986, Afendra *et al.*, 1987, 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 ή 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.*, 1988, Varsaki *et al.*, 1998). Οι φορείς κλωνοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*, φαίνονται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2: Φορείς κλωνοποίησης, κατάλληλοι για έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*

Πλασμίδιο	Μέγεθος (kb)	Δείκτες	Αναφορά
pLOI102	13.5	Ap	Byun <i>et al.</i> , 1986
pZA31	7.9	Tc	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA32	7.9	Cm	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA33	7.9	Cm	Tonomura <i>et al.</i> , 1986
pZA22	6.7	Tc, Cm	Misawa <i>et al.</i> , 1986
pZL1	13.8	Cm	Yanase <i>et al.</i> , 1986
pLOI193	13.4	Tc	Conway <i>et al.</i> , 1987
pLOI194	13.4	Tc	Conway <i>et al.</i> , 1987
pDS212	7.8	Tc, Ap	Scordaki and Drainas 1987
pOK2	19.7	Ap, Cm	Cho <i>et al.</i> , 1989
pPTZ1,2,3	6.9	Tc, Ppdc	Reynen <i>et al.</i> , 1988
pDS3154	7.44	Cm, Ap	Scordaki and Drainas 1990
pZMOCPI	7.2	Ap	Delgado <i>et al.</i> , 1995
pZY507	10.53	Cm	Weisser <i>et al.</i> , 1995
pBZIP1		Tc	Varsaki <i>et al.</i> , 1998

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-γαλακτοζιδάση και την περμεάση της λακτόζης του *E. coli* (Carey *et al.*, 1983, Goodman 1984, Byun *et al.*, 1986, Yanase *et al.*, 1990, 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-γαλακτοζιδάσης 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-γαλακτοζιδάση 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 δραστικότητα όμως της αμυλάσης στα ανασυνδυσασμένα 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 δραστικότητες της γλυκανάσης ήταν πολύ μικρές.

Το γονίδιο που κωδικεύει την β-γλυκοζιδάση 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 δραστικότητες 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* μπροστά 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_{pdc} στο *Z. mobilis* οδήγησε στην κατασκευή μετασυσζευγμένων 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, αποτελεί και πρόδρομη ένωση της βιοσυνθετικής πορείας των σπανοειδών (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.

δ) Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη: Το γονίδιο *gfp* του *Aequorea victoria* το οποίο κωδικεύει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, εκφράστηκε στο *Z. mobilis* (Douka *et al.*, 2001) με αποτέλεσμα την κατασκευή κυττάρων τα οποία είχαν την ικανότητα να παράγουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και ως εκ τούτου να φθορίζουν. Έτσι λοιπόν, με την επιτυχή έκφραση ενός επιπλέον γονιδίου αναφοράς στο *Z. mobilis* ανοίγονται νέες προοπτικές για την διεξοδική γενετική μελέτη του βακτηρίου αυτού.

1.10 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 περιεκτικότητα σε παραγόμενη αιθανόλη είναι 15% (v/v) (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 περιεκτικότητά της σε σπανοειδή και βαξενικό οξύ (Carey and Ingram 1983, Bringer *et al.*, 1985, Schmidt *et al.*, 1986, Bucholz *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 σπανοειδών 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 σπανοειδή 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 κωδικοεύουν δύο από τις πιο συνηθισμένες πρωτεΐνες αιθανολικού στρες τα οποία βρίσκονται σε ένα οπερόνιο (de F.S. Barbosa *et al.*, 1994).

1.11 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, όπως έχει ήδη προαναφερθεί 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 οξειδοοδουκτάση 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 Μ (20%) γλυκόζη και υπάρχουν στελέχη που αναπτύσσονται σε 2.22 Μ (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).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης παραμένει αδιευκρίνιστος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Τα Ισοπρενοειδή και η βιοσύνθεσή τους

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα (παράγραφος 1.5), τα σπανοειδή, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των ισοπρενοειδών, αποτελούν το κύριο συστατικό της λιπιδιακής μεμβράνης του *Z. mobilis* σε ποσό που φθάνει έως και τα 30 mg ανά γραμμάριο ξηρού βάρους κυττάρων ανεξαρτήτως συνθηκών ανάπτυξης, γεγονός που αποτελεί την μεγαλύτερη αναφερθείσα τιμή για βακτήρια. Τα μόρια αυτά επικουρούν στην ενδυνάμωση της κυτταρικής μεμβράνης σε ένα ασταθές περιβάλλον υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης (Bringer *et al.*, 1985, Schmidt *et al.*, 1986). Έχει αποδειχθεί ότι τα σπανοειδή ενισχύουν τις δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των μορίων των λιπιδίων εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη διείσδυση στο εσωτερικό του κυττάρου μικρών μορίων, όπως της αιθανόλης επί παραδείγματι (Poralla *et al.*, 1980, Kannenberg *et al.*, 1985). Τα σταθερά υψηλά επίπεδα των σπανοειδών στη μεμβράνη του βακτηρίου αυτού είναι πολύ πιθανό να του προσδίδουν σταθερότητα έναντι ενός μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων αιθανόλης (Hermans *et al.*, 1991).

2.1 Τα ισοπρενοειδή

Τα ισοπρενοειδή είναι ενώσεις ευρέως διαδεδομένες σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, τόσο ως πρωτογενείς όσο και ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Αποτελούν μια οικογένεια φυσικών ενώσεων οι οποίες συντίθενται από ομάδες ισοπρενίου (C_5) (Wallach, 1887). Ταξινομούνται σε ημι-(C_5), μονο-(C_{10}) και σεσκιτερπένια (C_{15}), καθώς επίσης και ως δι-(C_{20}), τρι-(C_{30}), τετρατερπένια (C_{40}) και πολυτερπένια. Μέσω των αντιδράσεων συμπύκνωσης των ισοπρενικών ομάδων, κυκλοποίησης, μεταφοράς και οξειδωσης που συμβαίνουν στη συνέχεια, έχει παραχθεί μια πληθώρα τέτοιων γνωστών ενώσεων. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά περισσότερα από 30.000 ισοπρενοειδή (Conolly and Hill, 1992) στα οποία συγκαταλέγονται σημαντικές ενώσεις όπως βιταμίνες, ορμόνες καθώς και κυτοστατικοί παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα στα ισοπρενοειδή ανήκουν ενώσεις οι οποίες μετέχουν σε πλήθος βιοχημικών λειτουργιών όπως: (α) οι κινόνες, συμμετέχουν στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, (β) τα πρενυλιωμένα λιπίδια στα αρχαιοβακτήρια και οι στερόλες στα ευβακτήρια και στα ευκαρυωτικά αποτελούν συστατικά των μεμβρανών, (γ) οι πρενυλιωμένες πρωτεΐνες συμμετέχουν στην κυτταρική στόχευση και ρύθμιση, (δ) τα οπανοειδή σε βακτήρια αποτελούν συστατικό της μεμβράνης και δρουν ως σταθεροποιητές αυτής, (ε) τα καροτένια και οι πλευρικές αλυσίδες της χλωροφύλλης είναι φωτοσυνθετικές χρωστικές, (στ) οι γιβερελίνες και τα οιστρογόνα δρουν ως ορμόνες και συμμετέχουν σε διάφορα ενδοκυτταρικά σήματα καθώς και στην ρύθμιση της ανάπτυξης, και (ζ) τα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια μετέχουν στην άμυνα των φυτών.

Στα βακτήρια, τα ισοπρενοειδή είναι απαραίτητα κυρίως για 3 λειτουργίες: (α) για την τροποποίηση του tRNA, (β) για τον σχηματισμό των δολιχολών και (γ) για την παραγωγή των κινονών του αναπνευστικού. Είναι όμως πολύ πιθανό τα ισοπρενοειδή να έχουν πλήθος άλλων λειτουργιών στη φυσιολογία των βακτηρίων οι οποίες παραμένουν άγνωστες μέχρι σήμερα (Campbell *et al.*, 2002).

Η κύρια πρόδρομη ένωση όλων των ισοπρενοειδών είναι το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) το οποίο καλείται και βιολογική ισοπρενική μονάδα (Ruzicka *et al.*, 1953).

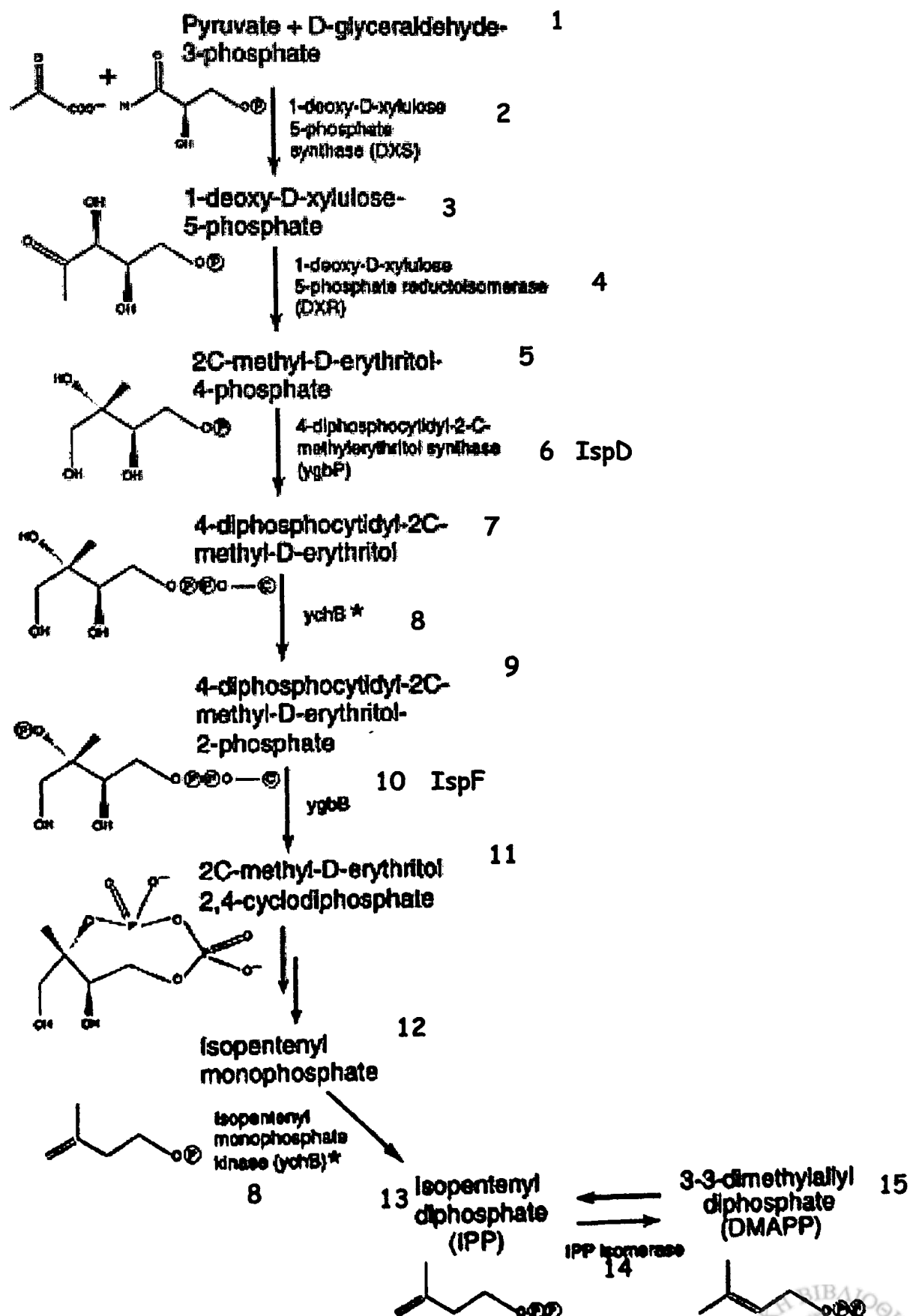
2.2 Η βιοσύνθεση του IPP

Μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό ότι το IPP παράγεται από το μεβαλονικό οξύ. Τελευταία ανακαλύφθηκε μια δεύτερη βιοχημική πορεία για το σχηματισμό του IPP (Rohmer *et al.*, 1993, 1998) στην οποία δε συμμετέχει το μεβαλονικό οξύ. Η πορεία αυτή βρέθηκε ότι απαντάται ευρέως στη φύση. Αποτελεί τη μοναδική πορεία βιοσύνθεσης ισοπρενοειδών στα προκαρυωτικά και απαντάται παράλληλα με τη πορεία μέσω του μεβαλονικού οξέος στα ανώτερα φυτά.

Σύμφωνα με τη νέα αυτή πορεία, ο ανθρακικός C_5 σκελετός των ισοπρενικών μονάδων, όπως αυτός αντιπροσωπεύεται επί παραδείγματι από το IPP, είναι αποτέλεσμα μιας αλληλουχίας κυρίως δύο βημάτων:

- (1) συμπύκνωση μιας C_2 μονάδας η οποία προέρχεται από πυροσταφυλική αποκαρβοξυλίωση, στην καρβονυλική ομάδα της 3-φωσφορικής-γλυκερυναλδεΐδης (GAP) και
- (2) ένα στάδιο μετάθεσης το οποίο ως αποτέλεσμα έχει τελικά τον σχηματισμό του διακλαδισμένου καρβοξυ-σκελετού του IPP.

Η νέα αυτή πορεία φαίνεται στο Σχήμα 2.1 που ακολουθεί και καλείται πορεία της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (πορεία DOXP).



Σχήμα 2.1. Η πορεία βιοσύνθεσης του IPP μέσω της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (πορεία DOXP).

- 1: πυροσταφυλικό οξύ + 3-φωσφορική-D-γλυκεριναλδεΐδη
- 2: συνθάση της 5-φωσφορικής 1-δεόξυ-D-ξυλουλόζης (*dxs*)
- 3: 5-φωσφορική 1-δεόξυ-D-ξυλουλόζη
- 4: ρεδουκτοϊσομεράση της 5-φωσφορικής 1-δεόξυ-D-ξυλουλόζης (*dxr*)
- 5: 4-φωσφορική-2C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη
- 6: συνθάση της 4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μεθυλοερυθριτόλης (*yg6P* ή *ispD*)
- 7: 4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη
- 8: Κίνηση του μονοφωσφορικού ισοπεντενυλίου (*ydhB*)
- 9: 2-φωσφορικό-4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη
- 10: Συνθάση του 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλ 2,4-κυκλοκυτιδύλο (*yg6B* ή *ispF*)
- 11: 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλ 2,4-κυκλοδιφωσφορικό
- 12: Μονοφωσφορικό ισοπεντενύλιο
- 13: Διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP)
- 14: Ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου
- 15: 3-3-διμεθυλαλαλ-διφωσφορικό οξύ (DMAPP)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Το μεταλλαγμένο στέλεχος του *Z. mobilis* CU1Rif2

3.1 Το μεταλλαγμένο στέλεχος του *Z. mobilis* CU1Rif2

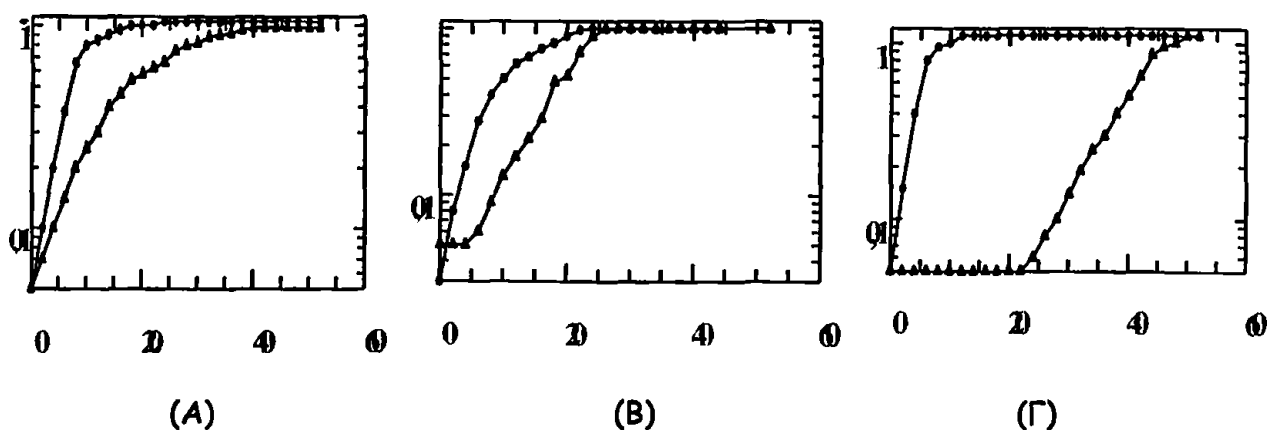
Το στέλεχος CU1 απομονώθηκε από τους Drainas *et al.* το 1984 μετά από μεταλλαξιγόνο επίδραση του φυσικού τύπου ATCC 10988 με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1 έχει τα εξής κύρια χαρακτηριστικά: α) είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, β) παρουσιάζει μειωμένη παραγωγικότητα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

Για τη 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 (20 µg/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 3.1. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται σχεδόν κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη 2%. 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. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες ο φυσικός τύπος αναπτύσσεται χωρίς περίοδο εφησυχασμού. Οι ιδιότητες ανάπτυξης του CU1Rif2 είναι οι ίδιες τόσο σε πλήρες όσο και σε χημικά καθορισμένο 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.



Σχήμα 3.1: 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. Στον άξονα των ψ φαίνονται οι απορροφήσεις στα 600 nm ενώ στον άξονα των χ ο χρόνος σε ώρες (h).

3.2 Η ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Η μελέτη της ανθεκτικότητας του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη (σάκχαρο που δεν προσλαμβάνεται, ούτε καταβολίζεται από το βακτήριο *Z. mobilis*) ή 6.6% ξυλόζη (προσλαμβάνεται αλλά δεν καταβολίζεται περαιτέρω), αποκάλυψε ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 16% μαλτόζη ή 6.6% ξυλόζη, γεγονός που δείχνει ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 δεν είναι ευαίσθητο σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις αλλά ειδικά στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Douka *et al.*, 1999).

Επιπρόσθετα, παρουσία 10% φρουκτόζης, ενός σακχάρου το οποίο προσλαμβάνεται και καταβολίζεται από το βακτήριο *Z. mobilis*, βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται κανονικά, υποδεικνύοντας ότι το CU1Rif2 δεν είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων γενικά αλλά ειδικά στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Επίσης βρέθηκε ότι, παρουσία 2% γλυκόζης και 8% 2-δεοξυγλυκόζης (ένα μη μεταβολίσιμο ανάλογο της γλυκόζης) το CU1Rif2 έχει μια περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών περίπου όπως ακριβώς στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου που περιέχει 10% γλυκόζη, ενώ ο φυσικός τύπος αναπτύσσεται κανονικά. Έτσι λοιπόν, η παρουσία στο θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης ενός μη μεταβολίσιμου αναλόγου της γλυκόζης, προκαλεί την ίδια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του CU1Rif2, όπως ακριβώς η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης.

Τέλος παρατηρήθηκε ότι, κύτταρα του CU1Rif2 που είχαν επωαστεί για 22 h σε θρεπτικό μέσο 10% σε γλυκόζη ή 2-δεοξυ-γλυκόζη, όταν μεταφερθούν σε νέο θρεπτικό μέσο γλυκόζης 10% αναπτύσσονται αμέσως. Θεωρείται πιθανόν ότι κάτω από αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης αυτό οφείλεται στην ύπαρξη κάποιου παράγοντα υπεύθυνου για την έναρξη της ανάπτυξης ο οποίος ενώ στον άγριο τύπο παράγεται κατευθείαν στο μεταλλαγμένο στέλεχος απαιτούνται 22 h τουλάχιστον για τη δημιουργία του.

Από τα παραπάνω 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.

3.3 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 ότι όταν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης προστεθεί εξωτερικά σορβιτόλη, τότε τα κύτταρα του *Z. mobilis* αναπτύσσονται καλύτερα (Loos *et al.*, 1994). Δηλαδή η σορβιτόλη προστατεύει οσμωτικά τα κύτταρα *Z. mobilis*, ακόμα και όταν προστίθεται εξωτερικά.

Η μελέτη της ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και σορβιτόλη αποκάλυψε, ότι το στέλεχος CU1Rif2 παρουσιάζει την ίδια περίοδο εφησυχασμού 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.

Φαίνεται λοιπόν ότι το στέλεχος CU1Rif2 δεν έχει πρόβλημα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη λόγω της αυξημένης οσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος θρεπτικού μέσου αλλά για κάποιον άλλο λόγο.

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 κατά τον ίδιο τρόπο και στο μεταλλαγμένο στελέχος όπως και στο στελέχος φυσικού τύπου.

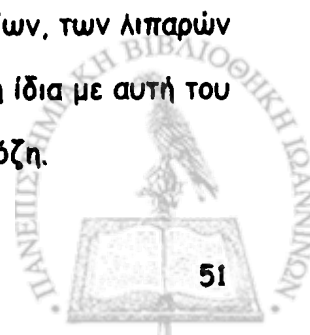
3.4 Η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2

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 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 (Moreau *et al.*, 1995).

Η εύρεση της ποσοστιαίας αναλογίας φωσφολιπιδίων και των δύο στελεχών παρουσία 2% και 10% γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης έδειξε ότι η μοναδική διαφορά μεταξύ φυσικού και μεταλλαγμένου στελέχους έγκειται στη μειωμένη περιεκτικότητα φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) στο CU1Rif2, σε σχέση με το στελέχος ATCC 10988. Η διαφορά όμως αυτή δεν είναι τόσο σημαντική, ώστε να μπορεί να εξηγήσει την ευαισθησία του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Επιπρόσθετα ο ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη του στελέχους CU1, έδειξε ακριβώς την ίδια ποσοστιαία περιεκτικότητα φωσφολιπιδίων με το στελέχος CU1Rif2.

Επίσης η ποσοστιαία περιεκτικότητα των ουδετέρων λιπιδίων, των λιπαρών οξέων και των οπανοειδών του στελέχους CU1Rif2, είναι σχεδόν η ίδια με αυτή του πατρικού στελέχους ATCC 10988 τόσο σε 2% όσο και σε 10% γλυκόζη.



Από τα παραπάνω λοιπόν φαίνεται ότι η ευαισθησία του στελέχους CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν οφείλεται σε αλλαγές της λιπιδιακής σύστασης της μεμβράνης του.

3.5 Ένζυμα τα οποία θεωρούνται σημεία ρύθμισης στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff στο βακτήριο *Zymomonas mobilis*.

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

Η μέτρηση της δραστηριότητας γλυκοκινάσης σε κύτταρα του στελέχους ATCC 10988 και του στελέχους CUIRif2 μετά από ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2%, 5% και 10% γλυκόζη αντίστοιχα έδειξε 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 συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκόζης, έχει αναφερθεί στο παρελθόν από τους Zachariou και Scopes (1986). Το φαινόμενο αυτό 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%.

Από την κινητική μελέτη της γλυκοκινάσης σε κύτταρα των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% και 5% γλυκόζη, αντίστοιχα, βρέθηκε ότι η γλυκοκινάση ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten και στις δύο περιπτώσεις. Ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} , της γλυκοκινάσης των στελεχών ATCC 10988 και CUIRif2 έδειξε 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. Επιπρόσθετα, είναι πιθανό ότι το βακτήριο *Z. 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.

Εκτός από τη γλυκοκινάση, μελετήθηκαν και άλλα ένζυμα τα οποία θεωρούνται πιθανά σημεία ρύθμισης στη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff:

- (α) η αφυδρογονάση της 6-Ρ-γλυκόζης
- (β) η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεύδη και διοξειδίο του άνθρακα.
- (γ) η αλκοολική αφυδρογονάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή της ακεταλδεύδης σε αιθανόλη.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ της δραστηριότητας των ενζύμων τόσο στο φυσικό όσο και στο μεταλλαγμένο στέλεχος.

3.6 Η πρόσληψη της γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2

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).

Με τον υπολογισμό της αρχικής ταχύτητας 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 αποκαλύφθηκε 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%. 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 CU1Rif2.

Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης κάποιας μετάλλαξης στο σύστημα πρόσληψης της γλυκόζης του CU1Rif2 μεταφέρθηκε σε κύτταρα του τελευταίου το γονίδιο *glf*. 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).

Το *glf* υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pLAFR5 και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR5-*glf* μεταφέρθηκε στο στέλεχος CU1Rif2. Κύτταρα CU1Rif2/pLAFR5-*glf* παρουσίαζαν τις ίδιες ιδιότητες ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης με εκείνες του CU1Rif2. 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.

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

Κύτταρα CU1Rif2 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. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι κατά τη διάρκεια της περιόδου εφησυχασμού τα κύτταρα του CU1Rif2 δημιουργούν κάποιον παράγοντα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξής 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 CU1Rif2 αναπτύσσονται αμέσως χωρίς περίοδο εφησυχασμού όταν μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης το οποίο έχει προεπωαστεί με κύτταρα του φυσικού στελέχους ATCC 10988. 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 CU1Rif2 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%.

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 δραστηρότητας γλυκοκινάσης ή στη διατήρηση της αρχικής ταχύτητας πρόσληψης γλυκόζης στο στέλεχος CU1Rif2. Με άλλα λόγια, ο παράγοντας που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ATCC 10988 και αποκαθιστά την ανάπτυξη του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν αποκαθιστά την ρύθμιση στην πρόσληψη και τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης, υποδεικνύοντας 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.

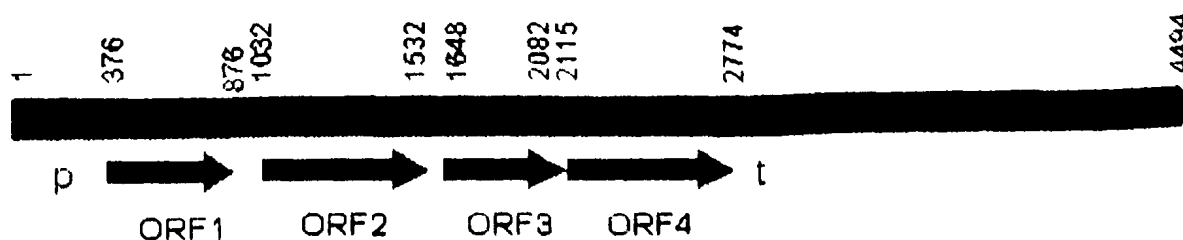
Το σηματοδοτικό μόριο για την ενεργοποίηση του παραπάνω θεωρητικού ρυθμιστικού μηχανισμού είναι η ίδια η γλυκόζη, και όχι κάποιος από τους μεταβολίτες της, καθώς όταν κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους επωαστούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% 2-δεοξυγλυκόζη (ένα προσλαμβανόμενο αλλά μη μεταβολίσιμο ανάλογο της γλυκόζης) για 22 ώρες και στη συνέχεια μεταφερθούν σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης, αναπτύσσονται αμέσως χωρίς περίοδο εφησυχασμού. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αδυναμία άμεσης ανάπτυξης των κυττάρων του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% γλυκόζη και 8% 2-δεοξυγλυκόζη, 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.

Πιθανολογείται ότι στο βακτήριο *Z. mobilis* υπάρχει μια 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 τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.

3.8 Απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ενός τμήματος DNA το οποίο αναπληρώνει το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2

Από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού στελέχους του *Z. mobilis*, CP4, απομονώθηκε ένα τμήμα DNA, μεγέθους 4,5 kb, το οποίο όταν εκφραστεί στα κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 αναπληρώνει την ανθεκτικότητά τους τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, και αποκαθιστά την σωστή λειτουργία της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης (Douka *et al.*, 1999). Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο τμήμα αυτό, (Σχήμα 3.2) έδειξε την ύπαρξη ενός συμπλέγματος αποτελούμενο από 4 θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές οι οποίες πιθανότατα συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Οι τέσσερις αυτές περιοχές κωδικεύουν τέσσερις θεωρητικές πρωτείνες 167, 167, 145 και 220 αμινοξέων, αντίστοιχα (Douka *et al.*, 1999).

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 πρωτείνες 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 στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.



Σχήμα 3.2. Γενετικός χάρτης του κλώνου των 4,5 kb.

p: Προαγωγός

t: τερματισμός της μεταγραφής

ORF: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε το βακτήριο *Z. mobilis*, είναι ένα αρνητικό κατά Gram, αιθανολοπαραγωγό βακτήριο, το οποίο αποκτά την μεταβολική του ενέργεια αναερόβια μέσω της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff.

Όπως είδαμε αναλυτικά στην εισαγωγή, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου αυτού είναι η ανθεκτικότητά του σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, προφανώς μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος παραμένει αδιευκρίνιστος, γεγονός που το καθιστά έναν ιδανικό οργανισμό για τη μελέτη του γλυκολυτικού ρυθμού ροής σε συνδυασμό με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Στο εργαστήριό μας διαθέτουμε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος το CU1Rif2, το οποίο παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά: (α) δεν αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει περισσότερο από 10% γλυκόζη, ενώ αναπτύσσεται μετά από μια φάση εφησυχασμού 10-20 ωρών περίπου σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη και αυτό δε συμβαίνει λόγω εσφαλμένης λειτουργίας της οσμωρύθμισης, (β) στο στέλεχος αυτό δεν λειτουργεί σωστά η πρόσληψη και η φωσφορυλίωση της γλυκόζης.

Από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού του φυσικού στελέχους του *Z. mobilis*, CP4, απομονώθηκε ένα τμήμα DNA μεγέθους 4.5 kb, το οποίο όταν εκφραστεί στα κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 αναπληρώνει την ανθεκτικότητά τους τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη.

καθώς και τη σωστή λειτουργία της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης.

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η αποσαφήνιση του αδιευκρίνιστου μέχρι σήμερα μηχανισμού ανάπτυξης των κυττάρων του *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 σε συνδυασμό με τον κλώνο των 4.5 kb που αναπληρώνει τον ελαττωματικό φαινότυπο του CU1Rif2, αποδεικνύονται εξαιρετικά εργαλεία στην προσπάθεια αυτή. Η διερεύνηση της φύσεως και της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοούνται από τα τέσσερα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης του κλώνου, πιθανόν να διαφωτίσουν τον μηχανισμό ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, θεωρώντας ότι οι τέσσερις αυτές πρωτεΐνες συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με το φαινόμενο αυτό.

Επιπλέον, ένα ακόμα σημείο το οποίο θα προσπαθήσει να πραγματευτεί η διατριβή αυτή είναι τα σημαντικά ερωτηματικά που εγείρονται σχετικά με τη σχέση που πιθανόν να υπάρχει μεταξύ του συστήματος ανθεκτικότητας του βακτηρίου αυτού στη γλυκόζη και στο σύστημα κυτταρικής διαίρεσης.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Υλικά και Μέθοδοι



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Χημικά και όργανα

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

Τα θρεπτικά υλικά ήταν της Oxoid και της LAB M. Οι διαλύτες ήταν της Merck (pro analysis). Οι ραδιενεργά σημασμένες ουσίες ήταν της Amersham. Τα ένζυμα για τους ενζυμικούς προσδιορισμούς ήταν της Sigma. Τα περιοριστικά ένζυμα ήταν της Amersham και της TAKARA, η T4 DNA λιγάση της HT Biotechnologies και η Taq DNA πολυμεράση της Promega και της Roche. Οι ιχνηθετήσεις έγιναν με προϊόντα της Roche.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν:

1. Πιπέτες: Gilson (P2, P10, P20, P200, P1000, P5000).
2. Φυγόκεντροι: - MIKRO 12-24 (Hettich Zentrifyngen), Hettich UNIVERSAL,
- SIGMA 2K 15, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed
Centrifuge Dupont Instruments (κεφαλές GS-3 και SS-34),
- BECKMAN L7-65 Ultracentrifuge (κεφαλή NVT65).
3. Φωτόμετρα: - SPECTRONIC 20 (BAUSCH and LOMB),
- Spectronic 21 (Milton Roy Company). SHIMATZU

4. Ανακινούμενοι επωαστήρες: - ORBITAL SHAKER Forma Scientific,
- New Brunswick Scientific Gyrotory Water
Bath Shaker MODEL 676.
5. Λυοφιλοποιητές: SAVANT Speed Vac SC100 Refrigerated Condensation Trap
RT-100,
- Heto Cool Line PLFD-1.0-110.
6. Υπερκαταψύκτης: FORMA Scientific -80°C FREEZER.
7. Φούρνος υβριδισμού: SHEL LAB 1004 Hybridization oven
8. Laminar Flow: Microflow Safety Cabinet Class II, Series 'SE' Model
51424/2
9. Cross-Linker: CL-100 Ultraviolet Crosslinker UVP
10. Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA: Consort
11. Συσκευές sequencing: -GIBCO BRL
- BIORAD
12. Κλίβανος αποστείρωσης: Tuttnauer 3870 E
13. DNA Thermal Cycler: PERKIN ELMER
14. pH μετρο: Corning pH meter 440
15. Συσκευές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών: - Mini-PROTEAN® II
Electrophoresis Cell, BIORAD
- Protean™ II Slab Cell
16. Σύστημα φωτογράφισης: - BIO GENE V97 Software FOR WINDOWS
95, BIO-PROFIL IMAGE ANALYSIS SOFTWARE
- KODAK ds 1D Digital Science
17. Τροφοδοτικά: BIORAD
LKB
18. Υδατόλουτρα: UNITEK HB-130 DRY BLOCK HEAT BATH
19. Περισταλτική αντλία: Minipuls 3, Gilson
20. Κλασματοσυλλέκτης: Fraction Collector RediFrac, Pharmacia
21. Στήλες χρωματογραφίας: LKB και Pharmacia
22. Gradient former: BIORAD MODEL 385 GRADIENT FORMER



4.2 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη του *Zyotomonas mobilis* και του *Echerichia coli* καθώς και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, φαίνονται στους Πίνακες 4.1 και 4.2, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.1: Βακτηριακά στελέχη

Στελέχος	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφία
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM 15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r ⁻ m ⁻), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169.	Hanahan 1983
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r ⁻ m ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen
<u><i>Z. mobilis</i></u>		
CU1Rif2	Μετάλλαγμα του φυσικού στελέχους ATCC 10988, ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (20 µg/ml)	Drainas <i>et al.</i> , 1984, Afendra and Drainas 1987
ATCC 10988	Φυσικός τύπος	Swings and Deley 1977
CP4	Φυσικός τύπος	Yablonsky <i>et al.</i> , 1988
NCIB 11163/74	Μετάλλαγμα του φυσικού στελέχους NCIB 11163, ανθεκτικό σε NaCl έως και 250 Mm	Αδημοσίευτα αποτελέσματα
CP4Rif ^r	Μετάλλαγμα του φυσικού στελέχους CP4, ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (20 µg/ml)	Pappas <i>et al.</i> , 1997

Πίνακας 4.2: Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	Τμήμα από το DNA που αποκαθιστά το φαινότυπο του στελέχους CU1Rif2 (kb)	Βιβλιογραφία
pUC18	Ap ^r	-	Boehringer Mannheim
pUC1845	Ap ^r	4.5	Douka <i>et al.</i> , 1999
pLAFR5	Tc ^r	-	Keen <i>et al.</i> , 1988
pLAFR545	Tc ^r	4.5	Douka <i>et al.</i> , 1999
pET29c(+)	Km ^r	-	Novagen
pET29c(+):ORF1	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF2	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF3	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF4a	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF4b	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF4c	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pET29c(+):ORF4d	Km ^r	-	Αυτή η εργασία
pUC18:P _{pdc} -ORF4a	Ap ^r	0.587	Αυτή η εργασία
pUC18:P _{pdc} -ORF4b	Ap ^r	0.676	Αυτή η εργασία
pUC18:P _{pdc} -ORF4c	Ap ^r	0.546	Αυτή η εργασία
pUC18:P _{pdc} -ORF4d	Ap ^r	0.403	Αυτή η εργασία
pUC18:P _{pdc} -ORF4e	Ap ^r	0.253	Αυτή η εργασία
pLAFR5:P _{pdc} -ORF4a	Tc ^r	0.587	Αυτή η εργασία
pLAFR5:P _{pdc} -ORF4b	Tc ^r	0.676	Αυτή η εργασία
pLAFR5:P _{pdc} -ORF4c	Tc ^r	0.546	Αυτή η εργασία
pLAFR5:P _{pdc} -ORF4d	Tc ^r	0.403	Αυτή η εργασία
pLAFR5:P _{pdc} -ORF4e	Tc ^r	0.253	Αυτή η εργασία
pRK2013	Km ^r	-	Figurksi and Helinski 1983
pHS119	Tc ^r	-	Διδ. διατριβή Γ. Τέγου
pHS119-pr1	Tc ^r	-	Αυτή η εργασία
pHS119-pr2	Tc ^r	-	Αυτή η εργασία
pAE1	Cm ^r	-	Douka <i>et al.</i> , 2001
pAEG1	Cm ^r	-	Douka <i>et al.</i> , 2001
pAEPG	Cm ^r	-	Αυτή η εργασία

4.3 Θρεπτικά υλικά

4.3.1 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

4.3.2 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.

4.3.3 Χημικά καθορισμένο θρεπτικό υλικό για το *Z. mobilis*

0,1 % (w / v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,1 % (w / v) KH_2PO_4

0,1 % (w / v) K_2HPO_4

0,05 % NaCl

Στο παραπάνω διάλυμα και μετά την αποστείρωση προστίθενται ανά 100 ml: 500 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (10 %, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,45 μm) και 50 ml Ca-rantothenate (10 %, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,45 μm). Επίσης προστίθεται η κατάλληλη πηγή άνθρακα, στην επιθυμητή ποσότητα.

4.3.4 Στερεά Θρεπτικά υλικά

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

4.4 Ανάπτυξη καλλιιεργειών

Οι καλλιέργειες του *E. coli* επωάζονται 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.

4.5 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.

4.6 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3.

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 4.4.

Πίνακας 4.3: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό / διαλύτης	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό (μg/ml)	
	<i>Z. mobilis</i>	<i>E. coli</i>
Αμπικικιλίνη (Ap) / dsH ₂ O	-	100
Χλωραμφαινικόλη (Cm) / αιθανόλη	100	25
Τερακυκλίνη (Tc) / αιθανόλη	40	20
Καναμυκίνη (Km) / dsH ₂ O	50	50
ΡΙφαμπικίνη (Rif) / αιθανόλη	20	20

Πίνακας 4.4: Τρόπος δράσης αντιβιοτικών-μηχανισμός ανθεκτικότητας

Αντιβιοτικό	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός ανθεκτικότητας
Ap	Εμποδίζει τη σύνθεση γειτονικών μονάδων πεπτιδογλυκανών, αναστέλλοντας τη δράση της τρانشεπτιδάσης. Έτσι προκαλείται ο τερματισμός της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.	Το γονίδιο <i>bla</i> κωδικεύει το ένζυμο β-λακταμάση το οποίο διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού.
Cm	Αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με πρόσδεση του στην 50 S υπομονάδα του ριβοσώματος και αναστολή της δράσης της πεπτιδυλοτρανσφεράσης	Το γονίδιο <i>cat</i> κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο, την ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης, 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 <i>tet</i> κωδικεύει ένα ειδικό ένζυμο το οποίο τροποποιεί την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και εμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου.
Km	Προσδένεται στο 70 S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA).	Το γονίδιο <i>kat</i> κωδικεύει 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.

4.7 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.

4.8 Ενζυμικοί προσδιορισμοί στα κύτταρα του *Z. mobilis*

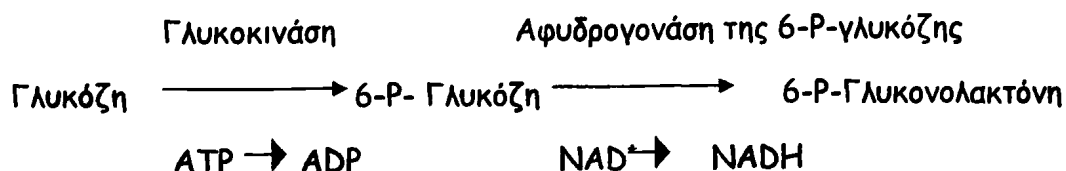
4.8.1 Κατεργασία των κυττάρων πριν από τον ενζυμικό προσδιορισμό

Όγκος καλλιέργειας κυττάρων *Z. mobilis* (250 ml) που βρίσκονται στη 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 0.1μl/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.

4.8.2 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 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.

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

4.9.1 (Kushner *et al.*, 1978)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας *E. coli*, σε 20 ml Luria Broth, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.) στα 600 nm: ~ 0.2.
2. 1.5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια αυτή τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο eredorff και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 1 min.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος πλύσεως (Δ1) και φυγοκέντρωση τους στις 12.000 rpm για 1 min.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2) και επωάζεται για 30 min σε υγρό πάγο (0 °C).
5. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 1 min.
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2 ml διαλύματος ασβεστίου (Δ2).

7. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 3 μl DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), γίνεται ήπια ανάδευση και ακολουθεί η προσθήκη 3-15 μl πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Προαιρετικά).
8. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε υγρό πάγο (0°C) για 30 min.
9. Ακολουθεί θερμικό πλήγμα με τοποθέτηση του σωληναρίου eppendorf σε υδατόλουτρο των 43.5°C για 1 min.
10. Το κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάζεται σε 3 ml L.B. και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για 1 h, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να δοθεί ο χρόνος στο πλαμιδιακό DNA να αντιγραφεί και να εκφρασθεί.
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, φυγοκεντρούνται στις 6.000 rpm για 10 min. 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 ($\Delta 1$): 10 mM RbCl

10mM MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ)

pH= 7.0

2. Διάλυμα ασβεστίου ($\Delta 2$): 10 mM RbCl

50 mM CaCl_2

100 mM MOPS

pH= 6.5

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

4.9.2 (Chung and Miller, 1988)

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας *E. coli* BL21 (DE3), σε 20 ml Luria Broth, μέχρι οπτικής πυκνότητας (O.D.) στα 600 nm: 0.3-0.6.
2. 1.0 ml από την παραπάνω καλλιέργεια αυτή τοποθετείται σε σωληνάριο errendorf και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 1 min.
3. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων με 100 μl διαλύματος TSB.
4. Επώαση για 10 min σε υγρό πάγο (0 °C).
5. Προστίθεται πλασμιδιακό DNA.
6. Επώαση για 5-30 min σε υγρό πάγο (0 °C).
7. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 500 μl TSB + 20 mM glucose.
8. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση για 1 h, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί ο χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
9. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων, γίνεται εμβολιασμός 0.1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε τρυβλίο που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

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

4.10 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. Το πλασμίδιο αυτό είναι συζευκτικό και κωδικεύει όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για να σχηματιστεί η κυτταροπλασματική γέφυρα μεταξύ δύο διαφορετικών κυττάρων (δότη-δέκτη). Επιπρόσθετα 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 από το κύτταρο-δότη κατά τη διάρκεια ειδικής αντιγραφής 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 *bon* 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 ($O.D._{600\text{ nm}}$) περίπου 0.3. Συγχρόνως αναπτύσσεται και η καλλιέργεια των κυττάρων-δέκτης *Z. mobilis* μέχρι να αποκτήσει οπτική πυκνότητα ($O.D._{600\text{ nm}}$) περίπου 0.4.

2. Τα δύο στελέχη DH5α, τα οποία αποτελούν τους δότες, αναμινύονται 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 $10^8/\text{ml}$. 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$), είτε με υπεριώδη 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.

4.11 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.

4.11.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* σε μεγάλη κλίμακα 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 min.
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 min.
4. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 10 ml διαλύματος E3. Ακολουθεί άμεση ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 min.
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 έκπλυση της στήλης με 60 ml διαλύματος E5.
7. Στη συνέχεια το DNA εκλούεται 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 min. 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
Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.	10mM EDTA pH=8.0
	100 µg/ml Rnase
E2 (διάλυμα λύσης κυττάρων):	200 mM NaOH
	1% SDS
E3 (διάλυμα ουδετεροποίησης):	3,1 M CH ₃ COOK pH=5.5
E4 (διάλυμα εξισορρόπησης στήλης):	600 mM NaCl
	100 mM CH ₃ COONa pH=5.0
	0.15% TritonX-100
E5 (διάλυμα έκπλυσης στήλης):	800 mM NaCl
	100 mM CH ₃ COONa pH=5.0
E6 (διάλυμα έκλουσης):	1250 mM NaCl
	100 mM Tris pH=7.5

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

Η μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα (βλέπε 4.11.1) 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 min.
2. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 ml διαλύματος I και το εναιώρημα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
3. Στη συνέχεια προστίθενται στο παραπάνω εναιώρημα 200 ml διαλύματος II και το μίγμα επωάζεται σε υγρό πάγο (0°C) για 10 min.
4. Ακολουθεί η προσθήκη 150 ml διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε υγρό πάγο (0°C) για 5 min.
5. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 min, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Στη συνέχεια συλλέγονται 400 ml από το υπερκείμενο σε άλλο σωληνάριο στο οποίο προστίθενται 320 ml παγωμένης (-20 °C) ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min.
7. Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 min, στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
8. Ακολουθεί συλλογή του ιζήματος, ξήρανση και επαναιώρηση σε 300 ml TE.
9. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 30 ml CH₃COONa 3M pH=5.5 και 800 ml παγωμένης (-20 °C) αιθανόλης και το μίγμα επωάζεται στους -80 °C για 30 min.
10. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm, για 10 min στους 4 °C, το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται και επαναιωρείται στον κατάλληλο όγκο νερού ή διαλύματος TE.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Διάλυμα I:** 50 mM γλυκόζης
 25 mM Tris (τρεις-υδρόξυ-αμινομεθάνιο)-HCl pH= 8
 10 mM EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
 5 mg/ml λυσοζύμης
- Διάλυμα II:** 0.2 N NaOH
 1% SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)

Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα III: 3 M CH_3COOK pH= 4.8

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

4.12 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 /4 °C/10 min.
2. Το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται 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 min.
4. Στο παραπάνω εναιώρημα προστίθενται 2.5 ml διαλύματος λύσεως και ακολουθεί ανάδευση για 1 min. Γίνεται επώαση στους 37 °C για 40 min.
5. Στη συνέχεια προστίθενται 0.4 ml διαλύματος 2 M Tris pH=7.0 και ακολουθεί ανάδευση για 1 min.

6. Η κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA γίνεται με προσθήκη 0.27 ml 5 M NaCl, ανάδευση για 1 min και τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό πάγο (0 °C) για 2 h.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm στους 4 °C για 30 min για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και το χρωμοσωμικό DNA.
8. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα, που περιέχει 32 μl διαλύματος ενεργοποιημένης RNase, και το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 min.
9. Ακολουθούν δύο εκχυλίσσεις με 2.5 ml δις-απεσταγμένης φαινόλης, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες. Το μίγμα αναδεύεται γρήγορα για 10 sec και στη συνέχεια ήπια για 1 min. Οι φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στις 3800 rpm για 5 min.
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 min 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

TE ₅₀ :	50 mM Tris
	5 mM EDTA pH=8.0
Διάλυμα λυσοζύμης:	40 mg λυσοζύμης/ ml TE ₅₀



Διάλυμα λύσεως: 1% SDS σε TE₅₀

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

Διάλυμα Ρηασης: 2 mg RNaσης /ml νερού

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

Φαινόλη

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

1. Κύτταρα από καλλιέργεια 100 ml στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης φυγοκεντρούνται στις 8.000 rpm στους 4 °C για 10 min. 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 h τουλάχιστον.
4. Ακολουθεί προσθήκη υδατικού διαλύματος πρωτεάσης-K σε τελική συγκέντρωση 200 μg / ml και το διάλυμα αφήνεται να επωαστεί στους 50°C για άλλες 12 h.
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 h).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα I:	50 mM Tris-HCl
	100 mM EDTA pH=8.0
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 μ g δίκλωνου DNA / ml διαλύματος. Το διάλυμα του DNA είναι καθαρό όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1.8.

4.14 Απομόνωση ολικού RNA

Γενικές παρατηρήσεις για τον χειρισμό του RNA

(α) Χειρισμός του RNA

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

περιβάλλον ελεύθερο RNAσών, θα πρέπει να ληφθούν μια σειρά από προληπτικά μέτρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, τα οποία παραθέτονται ακολούθως.

(β) Γενικές οδηγίες

Κατά τον χειρισμό του RNA θα πρέπει να ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές. Τα χέρια καθώς και η σκόνη είναι πιθανοί φορείς βακτηρίων και μούχλας και είναι οι πιο διαδεδομένες πηγές μόλυνσεων με ριβονουκλεάσες. Η χρήση γαντιών κατά το χειρισμό διαλυμάτων και των δειγμάτων RNA είναι επιβεβλημένη προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση με ριβονουκλεάσες οι οποίες πιθανόν να προέρχονται είτε από το δέρμα είτε από σκονισμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Τα γάντια θα πρέπει να αλλάζονται συχνά και τα μπουκαλάκια θα πρέπει να είναι με τα καπάκια κλειστά όταν δεν χρησιμοποιούνται. Το RNA που απομονώνεται θα πρέπει να διατηρείται στον πάγο.

(γ) Μιας χρήσεως πλαστικός εξοπλισμός

Συνιστάται η χρήση αποστειρωμένου μιας χρήσεως πλαστικού εξοπλισμού (ependorfs, tips κ.λ.π.). Αυτά τα χρειώδη είναι συνήθως ελεύθερα RNAσών και δεν απαιτούν καμιά διαδικασία απομάκρυνσης των ριβονουκλεασών.

(δ) Επαναχρησιμοποιούμενος πλαστικός εξοπλισμός

Αυτός ο εξοπλισμός θα πρέπει επίσης να υποστεί μια επεξεργασία πριν τη χρήση του προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι θα είναι ελεύθερος RNAσών. Όλα τα πλαστικά λοιπόν θα πρέπει να πλυθούν με 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA και ακολούθως με νερό ελεύθερο RNAσών. Εναλλακτικά τα πλαστικά τα οποία είναι ανθεκτικά στο χλωροφόρμιο θα μπορούσαν να πλυθούν με χλωροφόρμιο προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι ριβονουκλεάσες.

(ε) Γυαλικά

Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την επεξεργασία των γυαλικών προκειμένου να καταστούν ελεύθερα RNασών.

1. Πλύσιμο με απορρυπαντικό, σχολαστικό ξέπλυμα με νερό και τοποθέτηση σε φούρνο στους 240 °C για πολλές ώρες (overnight αν είναι δυνατό). Δεν συνιστάται απλή αποστείρωση μιας και δεν θα απενεργοποιηθούν όλες οι ριβονουκλεάσες.

2. Εναλλακτικά, τα γυαλικά μπορούν να επεξεργαστούν με DEPC* (diethyl pyrocarbonate). Τα γυαλικά γεμίζονται με 0.1 % DEPC σε νερό, αφήνονται στους 37 °C για 12 ώρες και στη συνέχεια αποστειρώνονται προκειμένου να απομακρυνθεί τυχόν εναπομένον DEPC.

* Το DEPC είναι πιθανόν καρκινογόνο, γι' αυτό θα πρέπει ο χειρισμός του να γίνεται πάντα με γάντια και μάσκα και πάντα μέσα σε απαγωγό.

(στ) Συσκευές ηλεκτροφόρησης

Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης πριν τη χρήση τους θα πρέπει να πλυθούν με απορρυπαντικό (ή με 0,5 % SDS), να ξεπλυθούν σχολαστικά με νερό και να αφεθούν να στεγνώσουν.

(ζ) Διαλύματα

Τα διαλύματα (νερό και άλλα διαλύματα) θα πρέπει να υποστούν επεξεργασία με DEPC. Το DEPC είναι ένας ισχυρός αλλά όχι καθολικός αναστολέας των ριβονουκλεασών. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 0,1 % προκειμένου να αδρανοποιήσει τις ριβονουκλεάσες στα πλαστικά, στα γυαλικά, στο νερό και στα διάφορα διαλύματα. Σε 100 ml του διαλύματος που πρόκειται να επεξεργαστεί προστίθεται 0.1 ml DEPC και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση έως ότου το διάλυμα ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 12 ώρες και στη συνέχεια αποστείρωση για 15 min προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη του DEPC. Το

DEPC αρχικά αντιδρά με τις αμίνες και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία των Tris buffers. Το DEPC είναι πάρα πολύ ασταθές παρουσία των Tris buffers και αποικοδομείται πολύ γρήγορα σε EtOH και CO₂. Ειδικά για τα Tris buffers, θα πρέπει πρώτα να επεξεργάζεται με DEPC το νερό και στη συνέχεια να διαλύεται το Tris. Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να αποστειρώνονται για 15 min προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη DEPC.

4.14.1 Μέθοδος RNeasy mini για την απομόνωση ολικού RNA από βακτήρια

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

- ❖ Η ικανότητα πρόσδεσης του RNA στην στήλη RNeasy (100 µg RNA).
- ❖ Ο όγκος του RLT buffer που απαιτείται για επαρκή λύση. Ο μέγιστος όγκος του RLT buffer που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την πειραματική διαδικασία περιορίζει την αρχική ποσότητα κυττάρων στο αυστηρό μέγιστο των 1×10^9 .

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

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

1. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 5000 g / 5 min / 4 °C. (Δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν παραπάνω από 1×10^9 κύτταρα). Προσεκτική απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού γιατί πιθανόν να δημιουργήσει προβλήματα στα παρακάτω στάδια της διαδικασίας.

2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 µl διαλύματος ΤΕ το οποίο περιέχει λυσοζύμη σε συγκέντρωση 400 µg / ml και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 min.
3. Προσθήκη 350 µl buffer RLT (ΠΡΟΣΟΧΗ: στο buffer πριν τη χρήση θα πρέπει να έχει διαλυθεί η β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME)). Προσεκτική ομογενοποίηση με ανάδευση. Αν στο διάλυμα είναι ορατά κάποια αδιάλυτα στοιχεία, τότε πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 min σε μέγιστη ταχύτητα και φυλάσσεται το υπερκείμενο για τα επόμενα στάδια.
4. Προσθήκη στο υπερκείμενο 250 µl αιθανόλης (96-100 %). Ομογενοποίηση με τη χρήση πιπέτας. Στο στάδιο αυτό είναι πιθανός ο σχηματισμός ιζήματος, η παρουσία του οποίου όμως δεν επηρεάζει τη διαδικασία.
5. Μεταφορά του διαλύματος (συνήθως 700 µl) μαζί με το ίζημα που πιθανόν να έχει σχηματιστεί σε μια στήλη RNeasy. Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s/10.000 rpm. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υγρό που συλλέγεται στο σωληνάκι μέσα στο οποίο είναι η στήλη RNeasy.
6. Προσθήκη 700 µl buffer RW1 στη στήλη RNeasy. Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s/10.000 rpm. Απόρριψη τόσο του υγρού όσο και του συλλεκτικού σωλήνα.
7. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο συλλεκτικό σωλήνα. Προσθήκη 500 µl buffer RPE (ΠΡΟΣΟΧΗ: στο buffer πριν τη χρήση θα πρέπει να έχει προστεθεί αιθανόλη). Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s/10.000 rpm.
8. Προσθήκη επιπλέον 500 µl buffer RPE. Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min / 10.000 rpm προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη από τη στήλη. Ακολουθεί το στάδιο 9 ή προκειμένου να απομακρυνθεί τελείως η αιθανόλη γίνεται το στάδιο 8α.
- 8α. Μεταφορά της στήλης RNeasy σε νέο eppendorf (DEPC-treated) και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1 min.
9. Προκειμένου να γίνει η έκλουση η στήλη RNeasy μεταφέρεται σε eppendorf και προστίθενται 30-50 µl RNase-free νερού. Κλείνεται το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min/10.000 rpm.

10. Αν η αναμενόμενη απόδοση του RNA είναι $> 30 \mu\text{g}$, τότε επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκλουσης και μάλιστα για καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιείται η πρώτη ποσότητα που απομονώθηκε και όχι επιπλέον ποσότητα νερού.

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του RNA 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 RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι: $OD_{260} = 1$ αντιστοιχεί σε $40 \mu\text{g RNA} / \text{ml}$ διαλύματος. Το διάλυμα του RNA είναι καθαρό όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1.8.

4.15 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στις κλωνοποιήσεις DNA είναι βακτηριακά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA (συνήθως 4 έως 6), και διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων του DNA που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, με τις αποστάσεις προτύπων ζωνών DNA γνωστού 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 $\text{unit}/\mu\text{l}$, όπου 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη $1 \mu\text{g}$ DNA του φάγου λ σε 1 h, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου.

4.15.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook et al. 2001)

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

1. Κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού ($\text{ds H}_2\text{O}$), 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 επάζεται στους 30 °C ή στους 37°C (ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου) για 1-2 h.

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.

4.15.2 Πέψεις χρωσωμικού DNA

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

1. Η κατάλληλη ποσότητα $\text{ds H}_2\text{O}$, 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 εκχυλίσσεις 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 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 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 min και το ίζημα επαναιωρείται σε 30 μl TE

4.16 Ηλεκτροφόρηση του DNA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

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

Η συγκέντρωση της αгарόζης. Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αгарόζης 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 αгарόζης.

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)

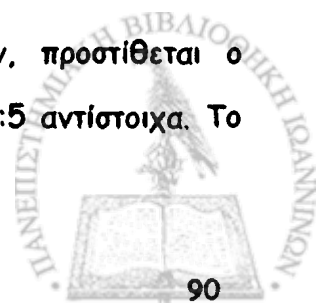
β) Κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια τα οποία έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα).

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 (χαλαρωμένο DNA (relaxed)), ευθύγραμμο μόριο και μόριο κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου (υπερσπειρωμένο DNA, covalently closed) (Grinsted and Benett 1988).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Sambrook *et al.*, 1989)

1. Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0.7- 2 g αгарόζης (ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηγματος). Στην φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος ΤΑΕ και τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί τελείως η αгарόζη.
2. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της αгарόζης 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 αгарόζης 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 πήγματος γίνεται με το σύστημα KODAK ds 1D Digital Science.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

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

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

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 0.25% κυανό της βρωμοφαινόλης
0.25% κυανολικό ξυλένιο
30% γλυκερόλη

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

4.17 Ηλεκτροφόρηση RNA

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. 1,5 gr αγαρόζης διαλύονται σε 72 ml νερού (φούρνος μικροκυμάτων). Όταν η θερμοκρασία φτάσει κοντά στους 60 °C, στο διάλυμα προστίθενται 10 ml διαλύματος 10 X ρυθμιστικού διαλύματος MOPS, 18 ml διαλύματος φορμαλδεΐδης 12.3 M (τελική συγκέντρωση 2.2 M).
2. Παρασκευάζεται το πήγμα (μέσα σε απαγωγό και με ιδιαίτερη προσοχή γιατί οι ατμοί της φορμαλδεΐδης είναι τοξικοί) και καλύπτεται στη συνέχεια με 1 X διαλύματος ηλεκτροφόρησης MOPS.
3. Τα δείγματα του RNA προετοιμάζονται ως εξής:

2 μl RNA (μέχρι 20 μg)

2 μl 10 X διαλύματος ηλεκτροφόρησης MOPS

4 μl φορμαλδεΐδη 12.3 M

10 μl φορμαμίδιο

1 μl EtBr (200 μg/ml)

Ανάδευση και spin. Επώαση για 60 min στους 55 °C (ή επώαση για 10 min στους 85 °C). Μεταφορά στον πάγο για 10 min.

4. Προστίθενται 2 μl 10 X διαλύματος φορτώσεως με φορμαλδεΐδη, spin και φορτώνονται σε δύο φρεάτια (το ένα για να βαφτεί). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 5 V / cm μέχρις ότου η χρωστική διατρέξει τα 2/3 του πηγματος.
5. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα τοποθετείται σε λεκάνη με απεσταγμένο νερό (DEPC-treated) για 30 min για να φύγει η φορμαλδεΐδη και φωτογραφίζεται με έκθεση του πηγματος σε υπεριώδη ακτινοβολία

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

10 X διάλυμα ηλεκτροφόρησης MOPS: 0,2 M MOPS, pH =7
 20 mM CH_3COONa
 10 mM EDTA

10 X διάλυμα φορτώσεως πηγματος με φορμαλδεΰδη:

50% γλυκερόλη (σε DEPC-treated νερό)

10 mM EDTA (pH 8.0)

0,25% κυανού της βρωμοφαινόλης

0,25% ξυλινοκυανόλη FF

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) : 200 $\mu\text{g/ml}$ (σε DEPC-treated νερό)

Φορμαλδεΰδη

Φορμαμίδιο

4.18 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

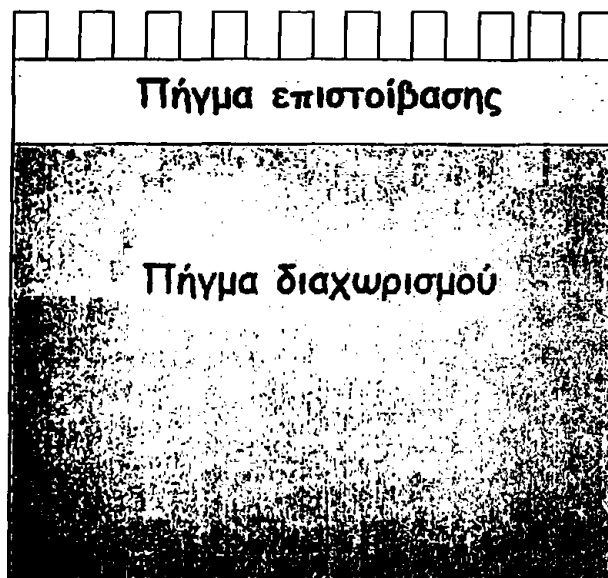
Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πηγματα πολυακρυλαμιδίου. Είναι χαρακτηριστικό ότι όσοι χρησιμοποιούν τη μέθοδο αυτή πολλές φορές αγνοούν την ύπαρξη άλλων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήγμα. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών

δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται στο SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και ανεξάρτητη από την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS- πολυπεπτιδίου μετακινούνται στο πήγμα πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορεί να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως π.χ. N- ή O-γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διακοπόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήγμα. Τα συμπλέγματα SDS- πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τα κάτω όταν περάσει ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω του πήγματος επιστοίβασης (stacking gel) το οποίο έχει μεγάλο πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού (separating gel) (Σχήμα 4.1).

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στο πήγμα επιστοίβασης σχηματίζουν ένα προπορευόμενο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπτίδια στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH του πήγματος ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στο πήγμα διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, τα συμπλέγματα SDS- πολυπεπτιδίων μετακινούνται στο πήγμα διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Τα πηγματα πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED κατά την παρασκευή των πηγμάτων επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το υπερθειικό αμμώνιο (APS, ammonium persulfate). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στο πήγμα (Πίνακας 4.5).



Σχήμα 4.1. Πήγμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE.

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

1. Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
2. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 l περίπου 1 x SDS-PAGE διαλύματος ηλεκτροφόρησης, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από την επιφάνεια των πηγμάτων.
3. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρησή τους σε 1 x διαλύματος φορτώσεως και φόρτωσή τους στο πήγμα.

4. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη τρέχει περίπου στα 120 Volt μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος το πήγμα.
5. Το πήγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο υπάρχει διάλυμα χρώσης (staining solution) και βάφεται για 1 h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
6. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηγματος με την εμφύσησή του σε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) 1 x 15 min, 1 x O/N, υπό ανάδευση.
7. Τέλος ακολουθεί ξήρανση του πηγματος στους 80° C για 30-45 min.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1 x διάλυμα φορτώσεως:	50 mM Tris pH 6.8 2 % SDS 0.1 % κυανού της βρωμοφαινόλης 10 % γλυκερόλη 2-μερκαπτοαιθανόλη
10 x διάλυμα ηλεκτροφόρησης:	144 gr γλυκίνη (250 mM pH 8.3) 20 gr Tris base (25 mM) 50 ml SDS 10 % (0.1 %)
Διάλυμα χρώσης (για 100 ml):	0,1 gr Coomassie Brilliant Blue 40 ml dsH ₂ O 50 ml μεθανόλη 10 ml οξικό οξύ
Διάλυμα αποχρωματισμού:	10 % μεθανόλη ή αιθανόλη 10 % οξικό οξύ

Πίνακας 4.5: Σύσταση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Πήγμα διαχωρισμού	8 %	10 %	12 %	15 %	Πήγμα επιστοίβασης
Acryl:bis (29:1)	2.69 ml	3.33 ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
D.W.	4.75 ml	4 ml	3.44 ml	2.44 ml	2.8 ml
10 % SDS	10 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l
10 % APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	20 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	5 μ l

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

4.19 Ηλεκτροφόρηση PAGE 4-20 % υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Οι πρωτεΐνες μπορούν να κατεργαστούν με ηλεκτροφόρηση η οποία πραγματοποιείται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να προσδιοριστούν μια σειρά από χαρακτηριστικά με πιο χαρακτηριστικά τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των ομογενών πρωτεϊνών και για μη ομογενείς πρωτεΐνες διαφορές στα φορτία καθώς επίσης και προσδιορισμός των μοριακών βαρών διαφόρων ισομερών.

Η πειραματική διαδικασία είναι πανομοιότυπη με την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Οι κύριες διαφορές είναι η απουσία του SDS από τα διαλύματα, η μεγαλύτερη διάσταση του πηγματος, η απουσία του διαλύματος επιστοίβασης και η μη κατεργασία των δειγμάτων με βρασμό.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες είναι η ακόλουθη:

Προετοιμασία της συσκευής

Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 16X20 και 18,3X20 οι οποίες καθαρίζονται σχολαστικά με νερό και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μία πάνω στην άλλη και στις δύο πλάγιες άκρες τοποθετούνται διαχωριστές πάχους 1,5 mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα από καουτσούκ που εξασφαλίζουν τη στεγανότητα της διάταξης. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηγμάτων 4% και 20%

Σε δύο ποτηράκια τοποθετούνται οι ποσότητες των διαλυμάτων του Πίνακα 4.6:

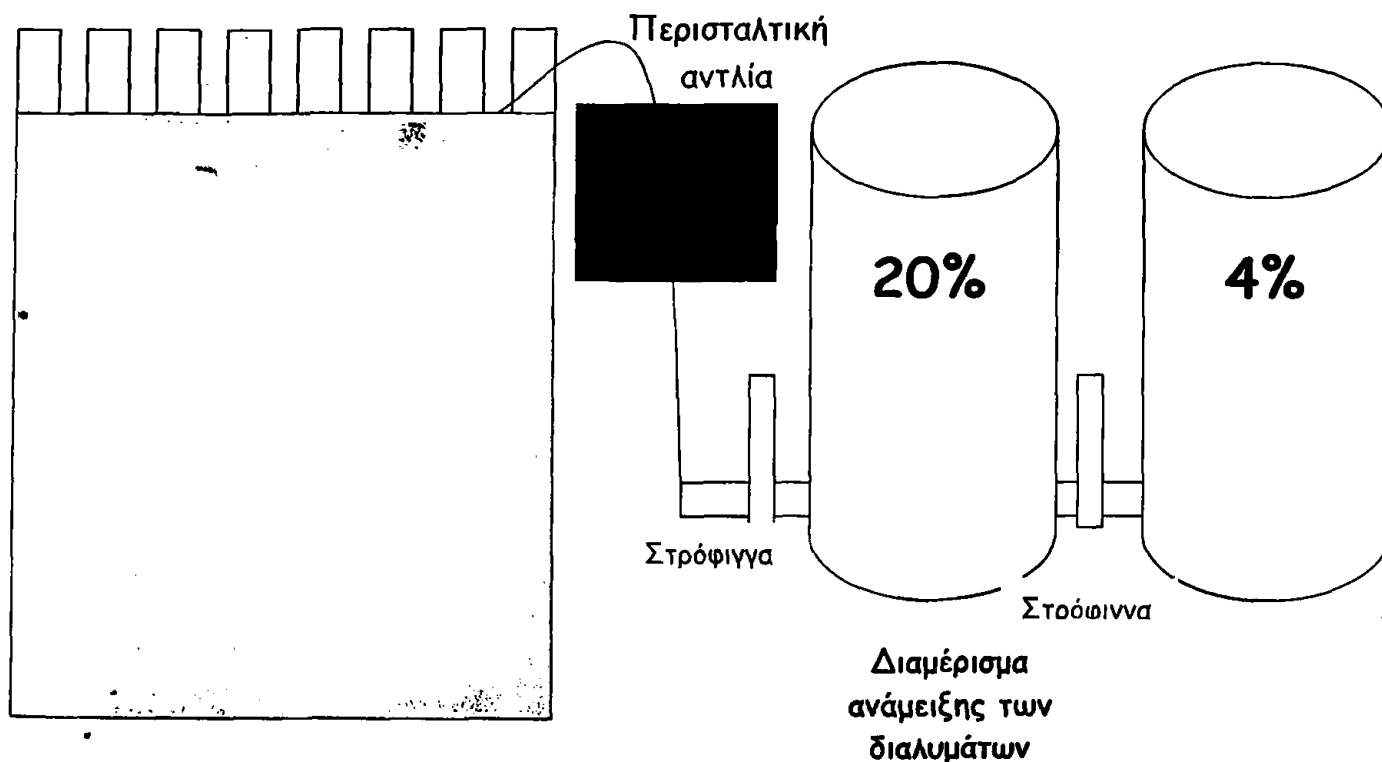
Πίνακας 4.6: Σύσταση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση PAGE 4%-20%.

Πήγμα διαχωρισμού	4 %	20 %
Acryl:bis (29:1)	2,92 ml	13,9 ml
1.5 M Tris pH 8.8	5,78 ml	5,49 ml
D.W.	13,16 ml	2,51 ml
10 % APS*	122 μl	122 μl
TEMED*	12,2 μl	12,2 μl

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

Μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργήσει την βαθμίδωση πυκνοτήτων (gradient former). Στο διαμέρισμα ανάμειξης των διαλυμάτων της συσκευής δημιουργίας βαθμίδωσης τοποθετείται το διάλυμα 20% που είναι και η τελευταία πυκνότητα της βαθμίδωσης.

ενώ το διάλυμα 4% διατηρείται στο άλλο διαμέρισμα, απ' όπου σε μικρές ποσότητες διοχετεύεται αυτόματα στο διαμέρισμα ανάμειξης, ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πυκνότητες της βαθμίδωσης (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2. Διάταξη δημιουργίας πυκνοτήτων βαθμίδωσης.

Αρχικά τα δύο διαμερίσματα δεν επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτό διασφαλίζεται με την προσθήκη ίχνους χρωστικής, κυανού της βρωμοφαινόλης, στο διάλυμα 20%. Αν δεν υπάρχει στεγανότητα η χρωστική βάφει και το 4%. Η συσκευή δημιουργίας βαθμίδωσης συνδέεται με περισταλτική αντλία η οποία μεταφέρει και επιστοιβάζει τα διαλύματα στο χώρο σχηματισμού του πηγματος.

Όταν όλα είναι έτοιμα αρχίζει η παροχή από την συσκευή και σχηματίζονται οι διάφορες πυκνότητες ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Κατά την επιστοίβαση πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν το πήγμα ασυνεχές και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό του. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση των διαλυμάτων, μεταξύ των δύο πλακών τοποθετείται χτένι πάχους

1,5 mm ώστε μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πήγματος να έχουν δημιουργηθεί οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.

Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων στη συσκευή

Ποσότητα δείγματος που περιέχει ≥ 10 μg πρωτεΐνης αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης.

Αφαιρείται το χτένι από το πήγμα και το σύστημα των πλακών αποσυνδέεται από τη βάση στήριξής του και τοποθετείται στη θέση του μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου σταθεροποιείται πάλι με σφιγκτήρες. Το διαμέρισμα της ηλεκτροφόρησης γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης όπως επίσης και το εσωτερικό διαμέρισμα μεταξύ των πλακών μέχρι να καλυφθεί η εσωτερική διαχωριστική γέφυρα. Στη συνέχεια στα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί από το χτένι τοποθετούνται τα δείγματα. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό ψύξη, από την συνεχή παροχή νερού μέσω ειδικών δοχείων που βρίσκονται μέσα στη συσκευή μεταξύ των πλακών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 20 mA για περίπου 24 h.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα είτε υπόκειται σε χρώση με Coomassie είτε σε χρώση με νιτρικό άργυρο όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης:	Για 5 lt
	54,5 g (0,09 M) Tris base
	24,7 g (0,08 M) βορικό οξύ
	5,6 g (0,003 M) EDTA

Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι κοντά στο 8,4 αλλά δεν ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα φόρτωσης: 50% γλυκόζη σε d H₂O

μικρή ποσότητα κυανού της βρωμοφαινόλης



4.20 Χρώση πηγματος από SDS-PAGE με νιτρικό άργυρο

Η χρώση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου (μετά από SDS-PAGE) με νιτρικό άργυρο είναι γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε σύγκριση με τη χρώση με Coomassie Blue η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι 30-50 φορές πιο ευαίσθητη και έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει έως και ποσότητες ης πρωτεϊνών.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αναγωγή του νιτρικού αργύρου σε μεταλλικό άργυρο από τον πεπτιδικό δεσμό των πρωτεϊνών, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεσή του σε αυτές.

Η πειραματική διαδικασία μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

Σταθεροποίηση

Το πηγμα τοποθετείται σε λεκάνη παρουσία του διαλύματος σταθεροποίησης για 30 min υπό ανάδευση. Κατόπιν απομακρύνεται το διάλυμα σταθεροποίησης και ακολουθούν δύο εκπλύσεις των 20 min η κάθε μία με νερό.

Χρώση και ανάπτυξη χρώματος

Μετά τις εκπλύσεις, προστίθεται το διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης χρώματος υπό ανάδευση. Η επώαση γίνεται έως ότου εμφανιστούν σε ικανοποιητικό βαθμό οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Τερματισμός της ανάπτυξης χρώματος

Το πηγμα τοποθετείται σε 100 ml διαλύματος 5 % οξικού οξέος για τουλάχιστον 15 min με σκοπό να τερματιστεί η περαιτέρω ανάπτυξη του χρώματος

και ακολούθως σε νερό πριν την επεξεργασία του (φωτογράφηση ή ξήρανση στους 80° C για 30-45 min).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Όλα τα διαλύματα τοποθετούνται σε γυαλικά τα οποία έχουν επεξεργαστεί με νιτρικό οξύ 50 %. Την ίδια επεξεργασία υφίσταται και η λεκάνη στην οποία τοποθετείται το πηγάδι για τη χρώση.

Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Solution) 100 ml/πήγμα

50 ml μεθανόλη

10 ml οξικό οξύ

10 ml συμπυκνωμένου διαλύματος σταθεροποίησης

30 ml dH₂O

Διάλυμα επιτάχυνσης της ανάπτυξης (Development Accelerator Solution)

5 gr Developer Accelerator Reagent/100 ml dH₂O

Το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί έως και 3 μήνες στους 4 °C. Χρησιμοποιείται πάντα σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης (Staining and Developing Solution)

5 min πριν από τη χρώση αναμιγνύονται σε ένα καλά προστατευμένο από το φως γυάλινο ποτήρι των 50 ml τα παρακάτω:

2,5 ml Διάλυμα συμπλόκου αργύρου (Silver Complex Solution)

2,5 ml Τροποποιητής αντίδρασης (Reduction Moderator)

2,5 ml Αντιδραστήριο ανάπτυξης εικόνας (Image Development Reagent)

17,5 ml dH₂O

25 ml Αντιδραστήριο επιτάχυνσης της ανάπτυξης (Development Accelerator Solution, προσοχή το αντιδραστήριο αυτό προστίθεται μόλις 3 min πριν από τη χρώση).

4.21 Υπερέκφραση πρωτεϊνών σύμφωνα με το σύστημα pET.

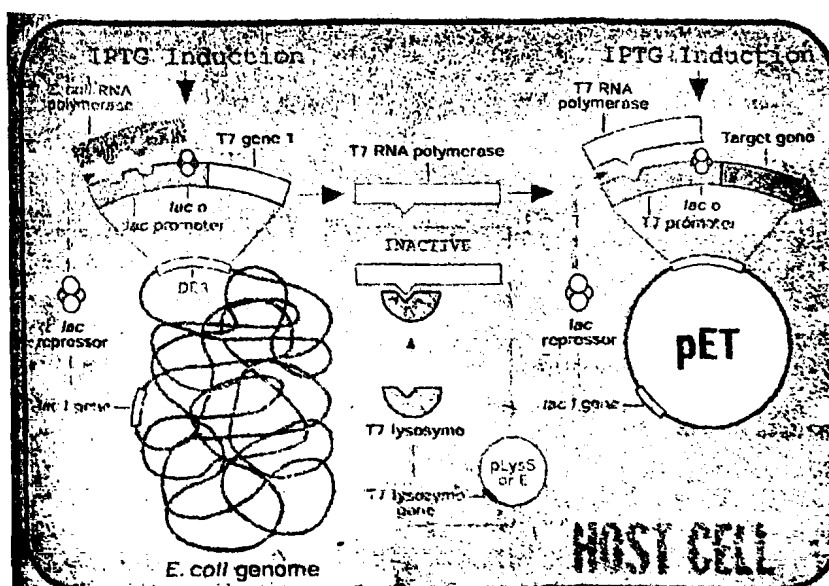
Το σύστημα pET είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *E. coli*. Τα στοχευόμενα γονίδια κλωνοποιούνται στους φορείς pET κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού του T7 βακτηριοφάγου. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη πηγής T7 RNA πολυμεράσης στα κύτταρα του ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και δραστική που σχεδόν όλη η ενέργεια του κυττάρου χρησιμοποιείται τελικά για την έκφραση του στοχευόμενου γονιδίου. Είναι ενδεικτικό ότι λίγη ώρα μετά την επαγωγή παράγεται σχεδόν το 50 % της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ικανότητα να διατηρεί τα στοχευόμενα γονίδια ουσιαστικά μη αντιγραφόμενα σε μη-επαγόμενη κατάσταση. Τα υπό έκφραση γονίδια μεταφέρονται αρχικά σε ξενιστές οι οποίοι δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, μειώνοντας έτσι την πλασμιδιακή αστάθεια που οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες πιθανόν να είναι τοξικές για τα κύτταρα του ξενιστή. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε ξενιστές έκφρασης οι οποίοι περιέχουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του *lacUV5* προαγωγού και η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG (Σχήμα 4.3).

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

Μία προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση φορέων οι οποίοι περιέχουν τον καλούμενο προαγωγό T7/*lac*. Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν μια αλληλουχία του ρυθμιστή *lac* καθοδικά του προαγωγού T7. Περιέχουν επίσης τον φυσικό προαγωγό και την κωδικεύουσα περιοχή του καταστολέα *lac* (*lacI*), προσανατολισμένο έτσι ώστε οι προαγωγείς T7/*lac* και *lacI* να έχουν διαφορετική κατεύθυνση. Όταν

χρησιμοποιούνται αυτού του είδους οι φορείς στους DE3 ξενιστές για την έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων, ο καταστολέας *lac* δρα:

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



Σχήμα 4.3. Η αρχή λειτουργίας του συστήματος pET. (Κατάλογος της εταιρείας NOVAGEN).

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την υπερέκφραση των πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη:

1. Κλωνοποίηση γονιδίων στον κατάλληλο φορέα υπερέκφρασης. Στην εργασία αυτή ο φορέας που επιλέχθηκε ήταν ο pET29c(+).
2. Μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε ξενιστές BL21 (DE3).
3. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5-6 ml L.B. με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37 °C.
4. Εμβολιασμός κατάλληλης ποσότητας (1 : 20) σε 20 ml θρεπτικού υλικού και επώαση μέχρι οπτικής πυκνότητας ($OD_{600nm} = 0.4 - 0.6$).
5. Προσθήκη IPTG (τελική συγκέντρωση 0.5 mM).
6. Λαμβάνονται δείγματα του 1 ml σε χρόνους: 0 min, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h.

7. Φυγοκέντρωση.
8. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 X διαλύματος φορτώσεως ανάλογα με την οπτική πυκνότητα του δείγματος (100 μ l / 0.1 OD₆₀₀).
9. Αποθήκευση στους - 20 °C ή πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης αφού τα δείγματα επωαστούν στους 95 °C για 5 min και φυγοκεντρηθούν.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- 1 x διάλυμα φορτώσεως:
- 50 mM Tris pH 6.8
 - 2 % SDS
 - 0,1 % κυανού της βρωμοφαινόλης
 - 10 % γλυκερόλη και
 - 2-μερκαπτοαιθανόλη

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 μ m. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

4.22 Προσδιορισμός της διαλυτότητας πρωτεϊνών

(Α) Επαγωγή της υπερέκφρασης

1. Επώαση προκαλλιέργειας 10 ml /37°C/ Overnight.
2. Εμβολιασμός σε 400 ml θρεπτικού υλικού και επώαση στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου τα 0,6 (2,5-3 h).
3. Προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM και επώαση στους 37°C για 3-4 h επιπλέον.
4. Φυγοκέντρωση στις 8000 rpm/10 min.
5. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 8 ml διαλύματος TES.
6. Στο στάδιο αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί κατευθείαν η λύση, ή το ιζημα να αποθηκευθεί στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

(B) Λύση

(Αν τα δείγματα είναι παγωμένα αφήνονται να λιώσουν στους 37°C)

7. Για κάθε ml TES προστίθενται:

50 μ l λυσοζύμη 10 mg/ml (τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml)

50 μ l βενζαμιδίνη 100 mM (>> 5 mM)

50 μ l PMSF 10 mM/EtOH (>> 0,5 mM)

8. Επώαση 30-45 min / 0°C.

9. Προσθήκη ίσου όγκου:

Triton X-100 0,5% (v/v) 1 ml

Tris 50 mM pH 7,6 10 ml Tris 1 M

EDTA 0,1 mM 50 μ l EDTA 0,4 M

DTT 1 mM 200 μ l DTT 1 M

NaCl 0,4 M

10. Υπερφυγοκέντρωση στις 45000 rpm/4°C/30 min.

11. Επαναιώρηση του υπερκείμενου με ίση ποσότητα 1 X διαλύματος φορτώσεως και SDS-PAGE. Αν η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει είναι διαλυτή θα πρέπει να υπάρχει στο υπερκείμενο.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

TES :

Tris 50 mM pH 7,6

EDTA 10 mM

Σουκρόζη 10%

Λυσοζύμη:

10 mg/ml dsH₂O

PMSF:

10 mM/EtOH

Βενζαμιδίνη:

100 mM/ dsH₂O

DTT:

1 M/10 mM CH₃COONa pH 5,2

1 X διάλυμα φορτώσεως:

50 mM Tris pH 6,8

2% SDS

0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης

10% γλυκερόλη

β -μερκαπτοαιθανόλη

4.23 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τις τέσσερις θεωρητικές κωδικεύουσες του οπερονίου χρησιμοποιήθηκε μια πορεία που περιελάμβανε δύο βήματα χρωματογραφίας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

4.23.1 Παρασκευαστικός καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγχιστείας Ni^{2+} -NTA αγαρόζης, υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η στήλη Ni^{2+} -NTA ανήκει σε μια ειδική κατηγορία στηλών χρωματογραφίας αγχιστείας που ονομάζεται IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Το νιτρίλο-τριοξικό οξύ (NTA) έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ιόν του νικελίου πολύ καλύτερα από άλλες χηλικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, οι στήλες νικελίου με το NTA δεσμεύουν 100-1000 φορές περισσότερο από ότι ανάλογες στήλες με ιμινοδιοξικό οξύ (IDA, η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε για τέτοιου είδους χρωματογραφίες).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών μέσω της συγκεκριμένης στήλης αγχιστείας υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες (native) έχει ως ακολούθως:

(Α) Επαγωγή της καλλιέργειας

1. Επώση 20 ml προκαλλιέργειας στους 37 °C/overnight.

2. Εμβολιασμός 1:50 σε 1000 ml θρεπτικού υλικού και επώαση στους 37 °C υπό γρήγορη ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm φτάσει περίπου 0,6.
3. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (το δείγμα αυτό είναι ο μη-επαγώμενος μάρτυρας, φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 50 μl 5 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE). Το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
4. Επαγωγή της καλλιέργειας με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
5. Επώαση της καλλιέργειας για επιπλέον 4-5 h.
6. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml. Το δείγμα αυτό είναι ο επαγώμενος μάρτυρας, φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 100 μl 5 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE). Το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
7. Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας στα 4000 g/20 min.

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

(B) Λύση των κυττάρων

8. Αν τα κύτταρα βρίσκονται στους -20 °C αφήνονται να ξεπαγώσουν στον πάγο για 15 min περίπου και στη συνέχεια επαναιωρούνται σε διάλυμα λύσης, 2-5 ml ανά γραμμάριο βάρους.
9. Προσθήκη λυσοζύμης σε συγκέντρωση 1 mg/ml και επώαση στον πάγο για 30 min.
10. Ακολουθεί λύση της μεμβράνης με υπερήχους (sonication) στον πάγο. Χρησιμοποιούνται 8 παλμοί των 10 sec στα 200-300 W με περίοδο ψύξης 10 sec μεταξύ των παλμών.
11. Προαιρετικά, στην περίπτωση που το διάλυμα είναι κολλώδες, προστίθενται RNase A (10 μg/ml) και DNase I (5 μg/ml) και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10-15 min.

12. Φυγοκέντρωση στις 15.000 rpm / 20-30 min / 4°C και φύλαξη του υπερκείμενου. Σε 5 μl από το υπερκείμενο προστίθενται 5 μl 2 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE και φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Ακολουθεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες.

(Γ) Απομόνωση πρωτεΐνης

13. Προσθήκη 1 ml διαλύματος 50% Ni-NTA σε 4 ml καθαρού υπερκείμενου και ήπια ανάδευση στις 200 rpm/4°C/60 min.

14. Το μίγμα φορτώνεται σε στήλη έχοντας το καπάκι της εξόδου κλειστό.

15. Το καπάκι απομακρύνεται και συλλέγεται το έκλουσμα. Φυλάσσεται για SDS-PAGE ανάλυση.

16. Ακολουθεί πλύση της στήλης δύο φορές με 4 ml διαλύματος πλύσης και συλλογή των κλασμάτων. Φύλαξη των κλασμάτων για SDS-PAGE ανάλυση.

17. Έκλουση της πρωτεΐνης 4 φορές με 0,5 ml διαλύματος έκλουσης. Συλλογή των κλασμάτων και φύλαξη για SDS-PAGE ανάλυση.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

5 X διάλυμα φορτώσεως SDS-PAGE:	0,225 M Tris.Cl pH 6,8
	50% γλυκερόλη
	5% SDS
	0.05% κυανού της βρωμοφαινόλης
	0,25 M DTT
2 X διάλυμα φορτώσεως SDS-PAGE:	0,09 M Tris.Cl pH 6,8
	20% γλυκερόλη
	2% SDS
	0.02% κυανού της βρωμοφαινόλης
	0,1 M DTT

Διάλυμα λύσης:	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	10 mM ιμιδαζόλιο
	ρύθμιση του pH 8
Διάλυμα πλύσης:	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	20 έως 50 mM ιμιδαζόλιο
	ρύθμιση του pH 8
Διάλυμα έκλουσης:	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	250 mM ιμιδαζόλιο
	ρύθμιση του pH 8

4.23.2 Παρασκευαστικός καθαρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης αγκιστείας Ni^{2+} -NTA αгарόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες

(Α) Επαγωγή της καλλιέργειας

1. Επώαση 20 ml προκαλλιέργειας στους 37 °C/overnight.
2. Εμβολιασμός 1:50 σε 1000 ml θρεπτικού υλικού και επώαση στους 37 °C υπό γρήγορη ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm φτάσει περίπου 0,6.
3. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml (το δείγμα αυτό είναι ο μη-επαγώμενος μάρτυρας, φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 50 μl 5 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE). Το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
4. Επαγωγή της καλλιέργειας με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
5. Επώαση της καλλιέργειας για επιπλέον 4-5 h.

6. Λαμβάνεται δείγμα 1 ml. Το δείγμα αυτό είναι ο επαγόμενος μάρτυρας, φυγοκεντρείται και επαναιωρείται σε 100 μl 5 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE). Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.
7. Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας στα 4000 g/20 min.

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

(B) Λύση των κυττάρων

8. Αν τα κύτταρα βρίσκονται στους -20°C αφήνονται να ξεπαγώσουν στον πάγο για 15 min περίπου και στη συνέχεια επαναιωρούνται σε διάλυμα λύσης, 5 ml ανά γραμμάριο βάρους.
9. Ανάδευση για 15-60 min σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτευχθεί η λύση ή εναλλακτικά ήπια ανάδευση (vortex) με προσοχή για να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων.
10. Φυγοκέντρωση για 20-30 min /15.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Φύλαξη του υπερκείμενου για τα επόμενα στάδια. Σε 5 ml από το υπερκείμενο προστίθενται 5 ml 2 X διαλύματος φορτώσεως SDS-PAGE και φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Ακολουθεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.

(Γ) Απομόνωση της πρωτεΐνης

11. Προσθήκη 1 ml διαλύματος 50% Ni-NTA σε 4 ml καθαρού υπερκείμενου και ήπια ανάδευση στις 200 rpm/15-60 min σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Το μίγμα φορτώνεται σε στήλη έχοντας το καπάκι της εξόδου κλειστό.
13. Το καπάκι απομακρύνεται και συλλέγεται το έκλουσμα. Φυλάσσεται για SDS-PAGE ανάλυση.
14. Ακολουθεί πλύση δύο φορές με 4 ml διαλύματος C.

15. Γίνεται έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης 4 φορές με 0,5 ml διαλύματος D ακολουθούμενη από 4 φορές με 0,5 ml διαλύματος E. Τα κλάσματα συλλέγονται και υπόκεινται σε SDS-PAGE ανάλυση.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

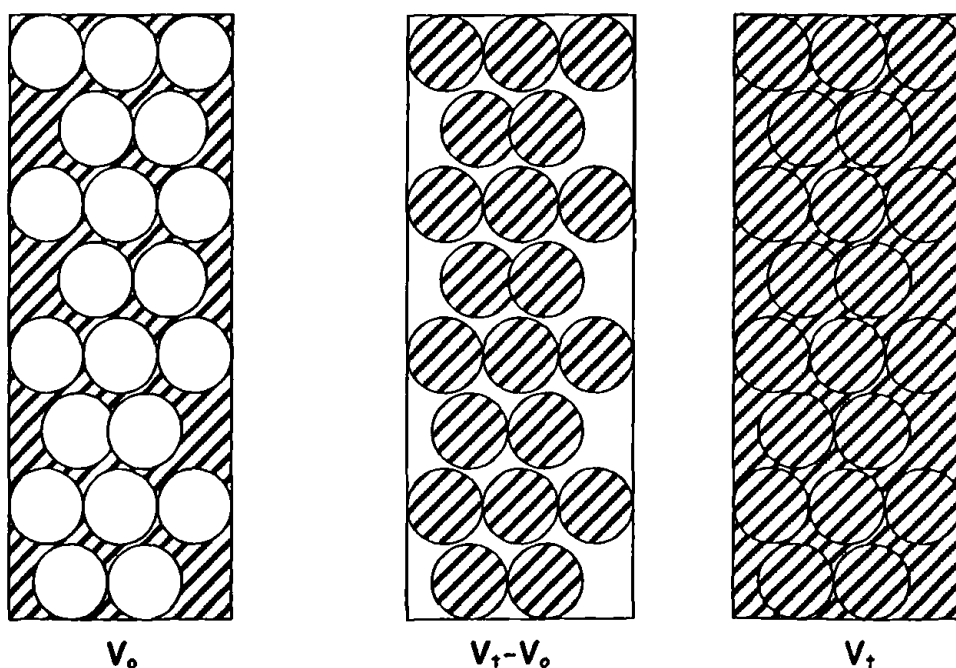
5 X διάλυμα φορτώσεως SDS-PAGE:	0,225 M Tris.Cl pH 6,8 50% γλυκερόλη 5% SDS 0.05% κυανού της βρωμοφαινόλης 0,25 M DTT
2 X διάλυμα φορτώσεως SDS-PAGE:	0,09 M Tris.Cl pH 6,8 20% γλυκερόλη 2% SDS 0.02% κυανού της βρωμοφαινόλης 0,1 M DTT
Διάλυμα λύσης:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris.Cl 8 M ουρία Ρύθμιση του pH στα 8
Διάλυμα πλύσεως C:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris.Cl 8 M ουρία Ρύθμιση του pH στα 6,3
Διάλυμα έκλυσης D:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris.Cl 8 M ουρία Ρύθμιση του pH στα 5,9
Διάλυμα έκλυσης E:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris.Cl 8 M ουρία Ρύθμιση του pH στα 4,5

4.23.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω στήλης μοριακής διήθησης

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος της χρωματογραφίας διήθησης επί πηγματος χρησιμοποιείται προκειμένου να υπολογισθεί το μέγεθος και το μοριακό βάρος διάφορων πρωτεϊνών. Η κλασμάτωση βασίζεται στη διαφορετική διάχυση διάφορων μορίων μέσα από τους πόρους του πηγματος. Πρωτεΐνες οι οποίες έχουν μεγάλα μοριακά βάρη δεν εισέρχονται μέσα στους πόρους του πηγματος αλλά περνάνε μέσω του ρευστού όγκου της στήλης και εκκλύονται πιο γρήγορα συγκρινόμενα με τις πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Με τον τρόπο αυτό λοιπόν οι πρωτεΐνες εκκλύονται από τη στήλη με βάση τα μοριακά τους βάρη.

Η εκτίμηση των μοριακών βαρών άγνωστων πρωτεϊνών γίνεται με σύγκριση του λόγου V_e/V_o της εκάστοτε πρωτεΐνης με τον λόγο V_e/V_o πρότυπων πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη (V_e είναι ο όγκος της έκλουσης ενώ V_o είναι ο «νεκρός» όγκος όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.4).

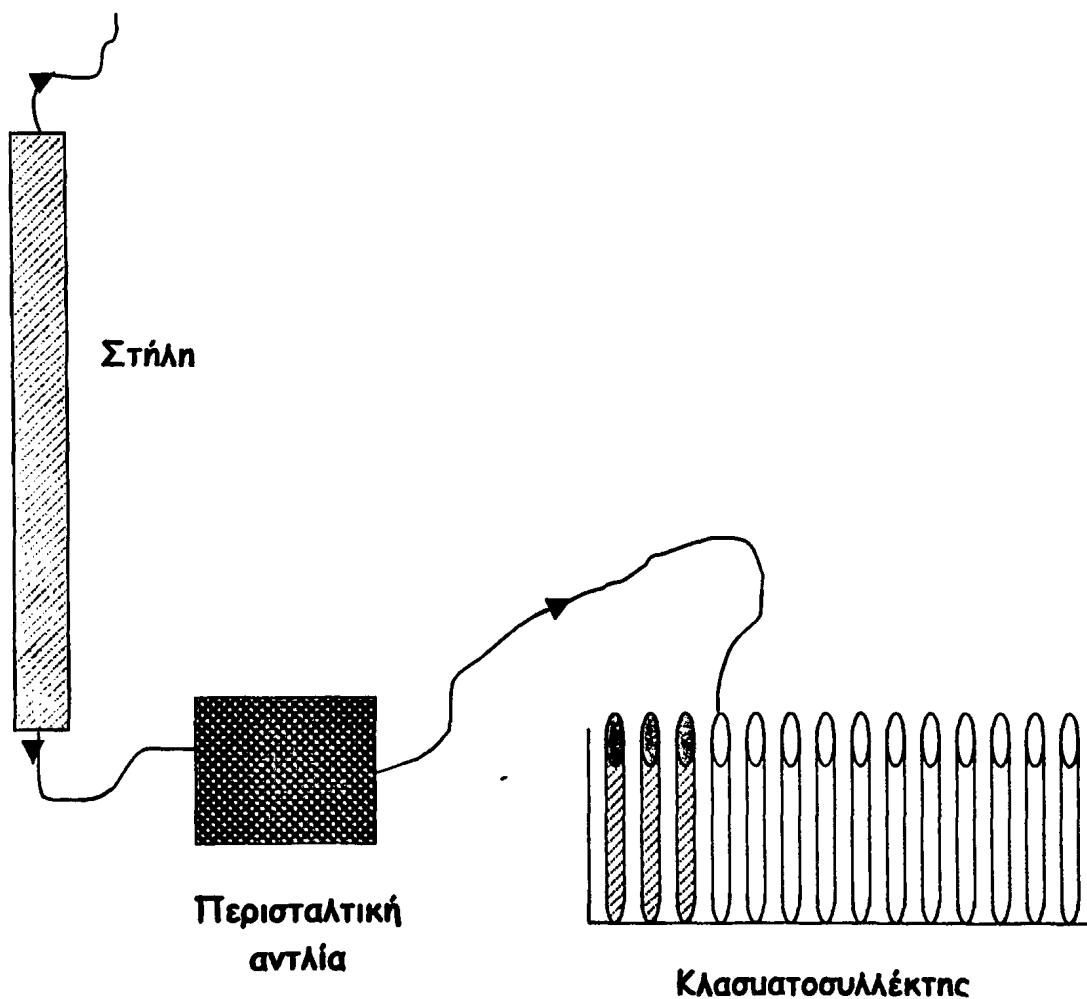


Σχήμα 4.4. Διαγραμματική παράσταση των όγκων V_e , V_o και V_t .

V_o = "νεκρός" όγκος, V_e = όγκος έκλουσης, V_t = συνολικός όγκος

Για τις μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες ισχύει ότι $V_o = V_e$, ενώ για τις μικρού μοριακού βάρους ισχύει ότι $V_e \approx V_t$.

Στην προκειμένη περίπτωση η στήλη μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να διαχωριστούν πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών τα οποία όμως διέφεραν πολύ μεταξύ τους. Η διάταξη φαίνεται στο Σχήμα 4.5 και η διαδικασία έχει ως εξής:



Σχήμα 4.5. Διάταξη διαχωρισμού πρωτεϊνών μέσω στήλης μοριακής διήθησης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Προστίθενται 4 gr κατάλληλου τύπου Sephadex (ανάλογα με τα μοριακά βάρη που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε) σε 200 ml περίπου d_5H_2O και το διάλυμα αφήνεται να διογκωθεί με επώαση στους 20 °C ή στους 90 °C για την ενδεικνυόμενη ώρα ανάλογα με τον τύπο του χρησιμοποιούμενου υλικού Sephadex (Πίνακας 4.7).

2. Ακολουθεί συναρμολόγηση της στήλης και "πακετάρισμα" αυτής με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας, διαδικασία που θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων καθώς και ανομοιόμορφων περιοχών.
3. Μετά το πακετάρισμα, αφήνεται να περάσει από τη στήλη διάλυμα Tris 50 mM ($\text{pH} \approx 7$) - NaCl 150 mM, μειώνοντας τη ροή.
4. Πριν εφαρμοσθούν στη στήλη τα εκάστοτε δείγματα, περνάνε καταρχήν τα πρότυπα (μεταξύ των οποίων και το Blue Dextran 2000 με το οποίο υπολογίζεται ο "νεκρός" όγκος της στήλης).
5. Τα δείγματα συλλέγονται με τη βοήθεια κλασματοσυλλέκτη και φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 280 nm.

Πίνακας 4.7: Χρόνοι διόγκωσης διαφόρων τύπων πηγμάτων Sephadex στους 20 °C και 90 °C.

Τύπος πηγματος	Χρόνος διόγκωσης (h)	
	20 °C	90 °C
Sephadex G-10	3	1
Sephadex G-15	3	1
Sephadex G-25	3	1
Sephadex G-50	3	1
Sephadex G-75	24	3
Sephadex G-100	72	5
Sephadex G-150	72	5
Sephadex G-150 SF	72	5
Sephadex G-200	72	5
Sephadex G-200 SF	72	5

4.24 Απομόνωση DNA από πηγμα αγαρόζης με τη μέθοδο GENECLAN 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 πηγμα 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 min, 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 min και στη συνέχεια στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min, ενώ το μίγμα αναδεύεται κάθε 2-3 min.
6. Η καταβύθιση του Glassmilk γίνεται με φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 30 sec. Εάν έχουμε μεγάλους όγκους, η φυγοκέντρηση γίνεται για 5 min.
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 min, στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 30 sec και το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωληνάριο erpendorf. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές. Τα υπερκείμενα από τις τρεις εκλούσεις συλλέγονται στο ίδιο σωληνάριο erpendorf, το νερό εξατμίζεται σε περιστροφικό εξαχνωτήρα (Speed Vac) και το ίζημα επαναιωρείται στον επιθυμητό όγκο ds H₂O.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

• 6M NaI

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

4.25 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις γίνονται σε τελικό όγκο 50 ή 100 μl και οι συνθήκες επιλέγονται κάθε φορά ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τόσο η Taq DNA Πολυμεράση (Promega) και η Πολυμεράση Expand High Fidelity (Roche). Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH ₂ O	55 μl
10 X ρυθμιστικού διαλ/τος	10 μl
MgCl ₂	8 μl
dNTPs (10 mM)	10 μl
Πριμοδοτικό μόριο 1	3 μl
Πριμοδοτικό μόριο 2	3 μl
Εκμαγείο DNA	10 μl
Taq DNA Πολυμεράση	1 μl
Τελικός όγκος	100 μl

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Perkin Elmer με τις ακόλουθες συνθήκες:

- Μετουσίωση για 5 min στους 94 °C ακολουθούμενη από 30 κύκλους με το εξής προφίλ:
 - Μετουσίωση για 1 min στους 94 °C
 - Αναδιάταξη για 2 min σε θερμοκρασία κατάλληλη για τα εκάστοτε χρησιμοποιούμενα πριμοδοτικά μόρια.
 - Επιμήκυνση για 3 min στους 72 °C (για Expand High Fidelity) ή στους 74 °C (για Taq DNA Πολυμεράση)
- Τελική επιμήκυνση για 1 κύκλο και για 3 min στους 72 °C (για Expand High Fidelity) ή στους 74 °C (για Taq DNA Πολυμεράση).

Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια αποκτήθηκαν από την MWG-Biotech AG, Germany

4.26 Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος της μη ραδιενεργού σήμανσης βασίζεται στη δράση του θραύσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I, το οποίο έχει μόνο δράση πολυμερισμού. Δίκλωνα γραμμικά μόρια DNA μετουσιώνονται και γίνονται μονόκλωνα. 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 αντιδιγοξινείνης 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 H_2O , 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) 1 μl ένζυμο Klenow 2U/ μl

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

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 min.

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

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

4.26.α. Σήμανση ανιχνευτικού μορίου με PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
dsH ₂ O	55 μl
Ρυθμιστικό διάλ/μα PCR	10 μl
MgCl ₂	8 μl
μίγμα ιχνηθέτησης PCR DIG	10 μl
Πριμοδοτικό μόριο 1	3 μl
Πριμοδοτικό μόριο 2	3 μl
Εκμαγείο DNA	10 μl
Taq DNA Πολυμεράση	1 μl
Τελικός όγκος	100 μl

Προσθήκη 30 μl λαδιού και πραγματοποίηση αντίδρασης PCR στις επιθυμητές συνθήκες.

Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος και επαναιώρησή του σε διάλυμα υβριδισμού.

4.27 Μεταφορά DNA από πηγμα αγαρόζης σε νάilon φίλτρο

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

4.27.1 Αποτύπωση του DNA κατά Southern (Southern Blotting) (Sambrook *et al.*, 2001)ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στη μεταφορά του DNA σε νάilon 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 cm^2) διαλύματος μετουσίωσης και αφήνεται να αναδεύεται ήπια στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 45 min.
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 min.
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 πηγματος, 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 πηγματος τοποθετείται ένα φύλλο νάιλον φίλτρου και δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM μεγαλύτερα κατά 1 cm^2 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 h περίπου. Κατά την αφαίρεση του πηγματος σημειώνονται οι θέσεις των φρεατίων πάνω στο νάιλον 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 min. Στη συνέχεια τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί μέχρι να στεγνώσει πλήρως και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) για 3-5 min, 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

4.28 Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε νάilon φίλτρο για υβριδισμό in situ (Sambrook *et al.*, 2001)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Αποικίες κυττάρων είναι δυνατό να μεταφερθούν ή να αναπτυχθούν πάνω στην επιφάνεια νάilon 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 h στους 4 °C, έτσι ώστε να περιέχουν αρκετή υγρασία.
2. Για τη μεταφορά χρησιμοποιούνται κυκλικά νάιλον 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 min.
5. Το φίλτρο μεταφέρεται για άλλα 7 min 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 min, το φίλτρο τοποθετείται για 3 min 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 min.

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

4.29 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 h.
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 5 min και σύντομη ψύξη σε υγρό πάγο (0°C) για 3 min. Η διάρκεια του υβριδισμού είναι 18-20 h.
3. Ακολουθούν πλύσεις του φίλτρου για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ή ασθενώς δεσμευμένων μορίων DNA.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.29.1 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 3 h τουλάχιστον.

2. Στη 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 h 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 2 X SSC, 0.1% SDS (για φίλτρο διαστάσεων 100 cm²) με ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min.
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 min.
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% άλας νατρίου N-λαυρικής σαρκοσίνης
	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.

4.29.2 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 2 h.
3. Ακολουθεί ο προϋβριδισμός των φίλτρων, με προσθήκη 100-200 ml διαλύματος προϋβριδισμού και ήπια ανακίνηση για 4 h 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 h 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 min ενώ η τέταρτη διαρκεί μία νύχτα.
16. 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

4.30 Εμφάνιση των φίλτρων μετά τον μη ραδιενεργό υβριδισμό

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 min σε 100 ml διαλύματος II.
 3. Έκπλυση του φίλτρου με 100 ml διαλύματος I.
 4. Το φίλτρο επωάζεται για 30 min σε 30 ml διαλύματος I που περιέχει 150 μU/ml μίγματος αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης.
 5. Ακολουθεί έκπλυση δύο φορές για 15 min για να απομακρυνθεί το μη ενσωματωμένο μίγμα αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης.
1. Γίνεται εξισορρόπηση του φίλτρου με 50 ml διαλύματος III για 3 min.
 2. 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 MgCl ₂

Διάλυμα IV:	10 mM Tris pH=8.0
	1 mM EDTA
Διάλυμα χρώσης	45 μ l NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium chloride)
	35 μ l X-Phosphate (5-Bromo-4-chloro-3-indol-phosphate)
	10 ml διαλύματος III

Β) 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 1 X διαλύματος αντίδρασης για 3 min.
3. Τέλος γίνεται μια πλύση για 5 min με CPD-Star. Ακολουθεί αυτοραδιογραφία.
4. Το φίλτρο τοποθετείται σε θήκη αυτοραδιογραφίας, η οποία φέρει ειδικές πινακίδες για την ενίσχυση του σήματος. Το φίλτρο καλύπτεται με φιλμ (X-Omat KODAK) και τοποθετείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 h έως μία νύχτα.
5. Η εμφάνιση του φιλμ, γίνεται με τον εμβαπτισμό του σε 500 ml διαλύματος ανάπτυξης (Kodak X-Ray developer) για 5 min.
6. Η αντίδραση της ανάπτυξης σταματά ξεπλένοντας το φιλμ με 300 ml νερό για 2 min.
7. Η στερέωση επιτυγχάνεται βυθίζοντας το φιλμ σε 500 ml διαλύματος στερέωσης (Kodak X-Ray rapid fixer) για 5 min.
8. Ακολουθεί πολύ καλή πλύση του φιλμ υπό συνεχή ροή νερού για 20 min. Το φιλμ στεγνώνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, κατάλληλα τοποθετημένο ώστε να μην εφάπτεται σε καμία επιφάνεια.

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

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα αντίδρασης 1 X: 100 mM Tris pH=9.5

100 mM NaCl

CPD-Star: 25 μ l CPD-Star σε 250 ml 1X Reaction buffer

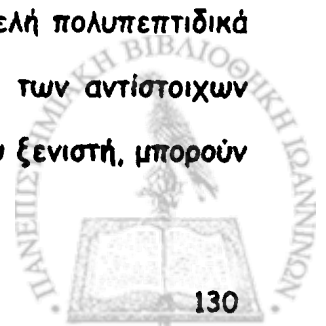
Διάλυμα ανάπτυξης: Το υγρό εμφάνισης Kodak X-ray developer αραιώνεται 1:5.

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

4.31 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 -γαλακτοζιδάσης. 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 -γαλακτοζιδάσης 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-γαλακτοζιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης.

Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β-γαλακτοζιδάσης 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-γαλακτοζιδάσης, 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 επανακυκλοποίησής του.

Η επίδραση με αλκαλική φωσφατάση γίνεται ως εξής:

1. Μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA γίνεται καταβύθιση του και επαναιώρηση του σε 100 μl Tris pH=7.5. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 11 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl αλκαλικής φωσφατάσης.
2. Το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h.
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 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Η πάνω φάση (υδατική), μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο errendorf και προστίθενται 2 όγκοι ψυχρής αιθανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους -80 °C για 30 min.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 10 min στους 0 °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 H₂O.

Αν η πέψη του πλασμιδιακού φορέα ή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί δημιουργεί απότομα άκρα τότε η κλωνοποίηση δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο στην περίπτωση των κολλώδων άκρων.

Σε περίπτωση που η πέψη του ενός τμήματος DNA δημιουργεί απότομα άκρα και του άλλου κολλώδη, μπορούν να δημιουργηθούν απότομα άκρα στο τμήμα του DNA που έχει κολλώδη άκρα χρησιμοποιώντας την T₄ DNA πολυμεράση.

Η T₄ DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για να γεμίσει τα 5' ή 3' προεξέχοντα άκρα με σημασμένα ή μη σημασμένα νουκλεοτίδια (dNTPs).

Το γέμισμα με T₄ DNA πολυμεράση ακολουθεί την εξής διαδικασία:

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

γ) 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της T_4 DNA πολυμεράσης.

δ) 1 μl από κάθε ένα από τα τέσσερα dNTPs συγκέντρωσης 10 mM.

ε) 1 μl DNA T_4 DNA πολυμεράση.

2. Το παραπάνω μίγμα τοποθετείται στους 37 °C για 1 h.

3. Η αντίδραση της πολυμεράσης σταματάει με την προσθήκη 1 μl EDTA 0.5 M και 50 μl TE.

Γίνεται καταβύθιση του DNA και έκπλυση του με 70% αιθανόλη.

4. Το DNA επαναιωρείται σε 15 μl ds H_2O .

• 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 erppendorf 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 T_4 DNA λιγάση (10 U/μl).

ε) Ο απαιτούμενος όγκος ds H_2O 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 διάρκεια τουλάχιστον 18 h.

Στάδιο τρίτο

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των ανασυνδρασμένων πλασμιδίων. Στην παρούσα εργασία η επιλογή των ανασυνδρασμένων πλασμιδίων έγινε με την ανίχνευση της δραστικότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης απουσία του οποίου οι μετασυνεργμένες 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 τοποθετούνται στους 37 °C για 1 h ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.
4. Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με τα ανασυνδρασμένα 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 h, ώστε να γίνει πιο έντονο το μπλε χρώμα των μη ανασυνδρασμένων αποικιών.
6. Στη συνέχεια επιλέγονται οι λευκές αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδρασμένα 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: 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.



4.32 Προσδιορισμός παγώματος σταγόνας (Freezing Droplet Test)

Η δραστικότητα παγοπυρήνωσης προσδιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά ως εξής: υγρές καλλιέργειες σε Zymo Broth 2% γλυκόζης από *Z. mobilis* επωάζονται στους 24 °C για 20 ώρες και ακολουθούν αραιώσεις (έως της 10^{-8}) σε Z. B. 2% γλυκόζης. Στη συνέχεια 20 σταγόνες όγκου 10 μl από την κάθε αραιώση τοποθετούνται στην επιφάνεια αλουμινόχαρτου το οποίο επιπλέει σε ψυχόμενο λουτρό πολυαιθυλενογλυκόλης ρυθμισμένο στους $-9,2 \pm 0,1$ °C. Το αλουμινόχαρτο έχει προηγουμένως ψεκάσει με 2% διάλυμα παραφίνης σε ξυλένιο και εν συνεχεία θερμανθεί για την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη. Η δραστικότητα παγοπυρήνωσης υπολογίζεται από την εξίσωση Vali με τη χρήση υπολογιστικού προγράμματος και εκφράζεται ως ο λογάριθμος του αριθμού παγοπυρήνων ανά κύτταρο για τις ολικές καλλιέργειες [$\log(\text{ice nuclei/cell})$].

4.33 Ανάλυση αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών

Για την σύγκριση των αλληλουχιών (alignment) του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST, ενώ για την σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα CLUSTALW και Vector NT. Για την εύρεση ομολογιών μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων οι αλληλουχίες των οποίων είναι κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι BLAST2 και PSI-BLAST.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Αποτελέσματα



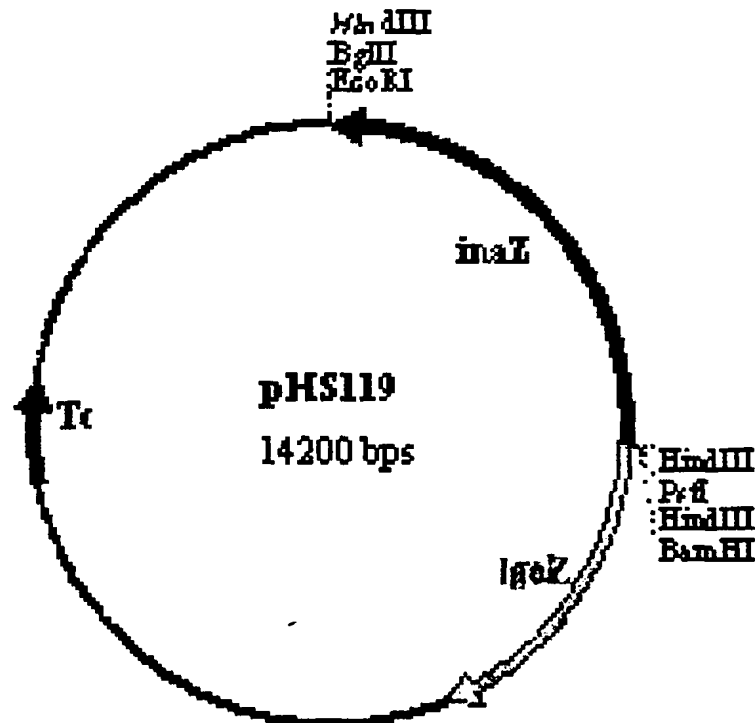
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Χαρακτηρισμός Του Συμπλέγματος Των Τεσσάρων Γονιδίων

Όπως αναφέρθηκε εκτενέστατα στην εισαγωγή, από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού στελέχους του *Z. mobilis*, CP4, απομονώθηκε ένα τμήμα DNA, το οποίο όταν εκφραστεί στα κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 αναπληρώνει την ανθεκτικότητά τους τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, και αποκαθιστά επίσης τη 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. Ως πρώτο βήμα λοιπόν, κρίθηκε σκόπιμο να χαρακτηριστεί πλήρως το σύμπλεγμα των τεσσάρων γονιδίων αποδεικνύοντας αρχικά την ύπαρξη ή όχι της θεωρητικής περιοχής του προαγωγού και εν συνεχεία την οργάνωση των τεσσάρων κωδικευουσών περιοχών ως ένα αυτόνομο οπερόνιο.

5.1 Απόδειξη της ύπαρξης του προαγωγού

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι η υποθετική περιοχή του προαγωγού έχει ανιχνεύσιμη δραστικότητα, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pHS119 (Σχήμα 5.1) το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες εργασίες για τον σκοπό αυτό.

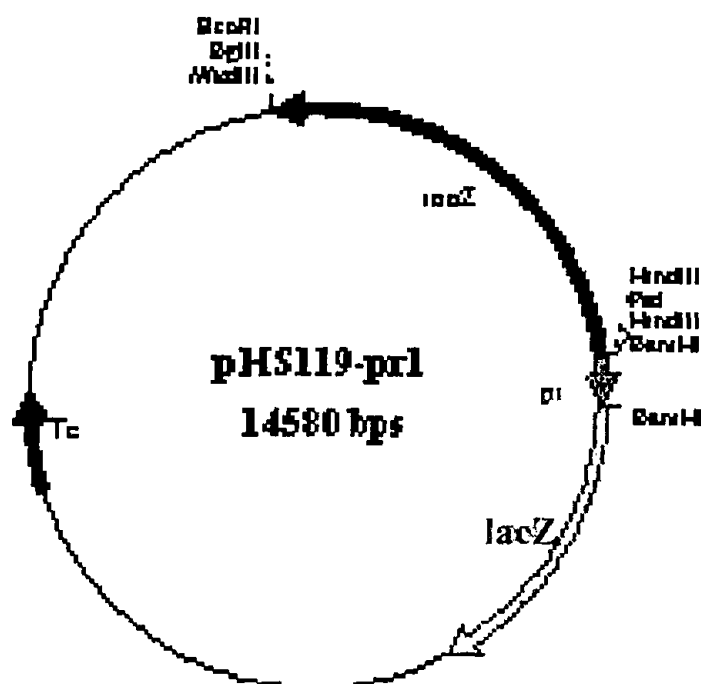


Σχήμα 5.1. Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pHS119.

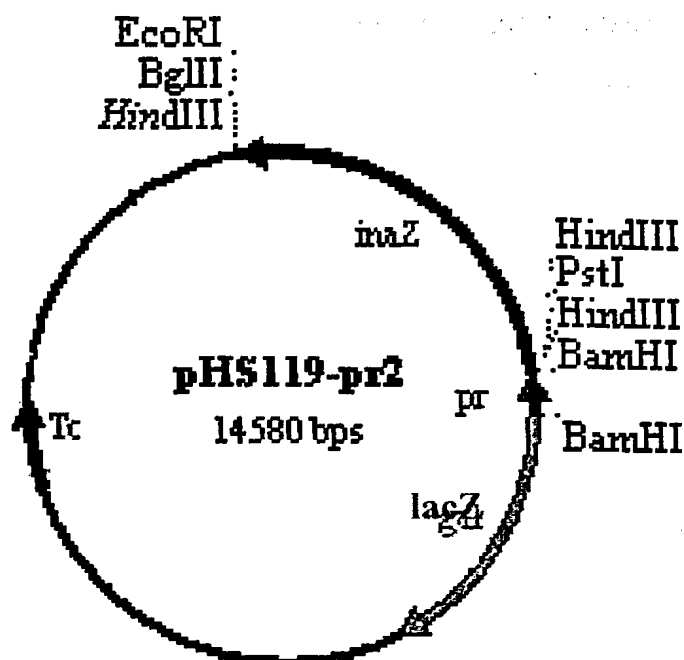
Το πλασμίδιο pHS119, το οποίο προέρχεται από τον ολιγοαντιγραφικό φορέα pMP220 (Spraink *et al.*, 1987), περιέχει τα γονίδια αναφοράς *lacZ* (β-γαλακτοζιδάσης) και *inaZ* (παγοπυρήνωσης), τα οποία έχουν κοινή αρχή μεν αλλά διαφορετικούς προσανατολισμούς, γεγονός που επιτρέπει τον παράλληλο έλεγχο ενθεμάτων τόσο για δραστικότητα παγοπυρήνωσης όσο και για την παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης. Επιπρόσθετα, ως ολιγοαντιγραφικός φορέας δεν εμφανίζει αξιοσημείωτη δραστικότητα β-γαλακτοζιδάσης ή παγοπυρήνωσης. Κύτταρα *E. coli* τα οποία φέρουν το γονίδιο *inaZ* (άνευ προαγωγού) συνδεδεμένο σε έναν πλασμιδιακό φορέα μεγάλου αριθμού αντιγράφων

εμφανίζουν σχετικά υψηλές τιμές δρασικότητας παγοπυρήνωσης. Η δρασικότητα παγοπυρήνωσης για το pH5119 σε *E. coli* είναι $-8,09 \pm 0,48$ παγοπυρήνων/κύτταρο. Επίσης, η αλληλουχία η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στο σύστημα γονιδίων αναφοράς περιλαμβάνει μόνο τέσσερις θέσεις περιοριστικών ενζύμων με αποτέλεσμα τον περιορισμό της πιθανότητας σχηματισμού τεχνητών δρασικών αλληλουχιών προαγωγών στις θέσεις σύνδεσης.

Ο υποθετικός προαγωγός του συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs, υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pH5119 ως ένα περιοριστικό τμήμα *Bam*HI-*Bam*HI μεγέθους 0.37 kb ανοδικά του γονιδίου *lacZ* (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pH5119-pr1, Σχήμα 5.2, Εικόνα 5.1) και του γονιδίου *inaZ* (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pH5119-pr2, Σχήμα 5.3, Εικόνα 5.1).



Σχήμα 5.2. Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pH5119-pr1.



Σχήμα 5.3. Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pHS119-pr2.



Εικόνα 5.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 1,2% των ανασυνδυασμένων pHS119:prs

Διαδρομές: 1,3: λDNA

2: pHS119-pr1

4: pHS119-pr2

Με την υποκλωνοποίηση του τμήματος του υποθετικού προαγωγού ανοδικά του γονιδίου *lacZ* και μετασχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pH5119-pr1 στο στέλεχος DH5α του *E. coli* παρατηρούνται μπλε αποικίες στα τρυβλία επιλογής, ένδειξη ότι το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης εκφράζεται. Επιπλέον, με την υποκλωνοποίηση του τμήματος του υποθετικού προαγωγού ανοδικά του γονιδίου *inaZ* και μετασχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pH5119-pr2 στο *E. coli* παρατηρείται δραστικότητα παγοπυρήνωσης της τάξεως των -6,56 παγοπυρήνων/κύτταρο (τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή του μάρτυρα), επίσης ένδειξη ότι το γονίδιο της παγοπυρήνωσης εκφράζεται.

Έτσι λοιπόν από την ετερόλογη μελέτη του υποθετικού προαγωγού αποδείχθηκε ότι η περιοχή του προαγωγού έχει πράγματι ανιχνεύσιμη δραστικότητα. Ο προαγωγός αυτός εφ' εξής θα καλείται P_{glc} .

Στη συνέχεια έγινε συγκριτική αντιστοίχιση της αλληλουχίας του προαγωγού P_{glc} με άλλες αλληλουχίες γνωστών προαγωγών του *Z. mobilis* (Sprenger *et al.*, 1993) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.1. Οι περιοχές -35' και -10' των προαγωγών του βακτηρίου αυτού δεν παρουσιάζουν ομοιότητες με τους προαγωγούς του *E. coli* και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλή έκφραση γονιδίων του *E. coli* στο *Z. mobilis* εκτός και αν χρησιμοποιηθούν προαγωγοί του τελευταίου.

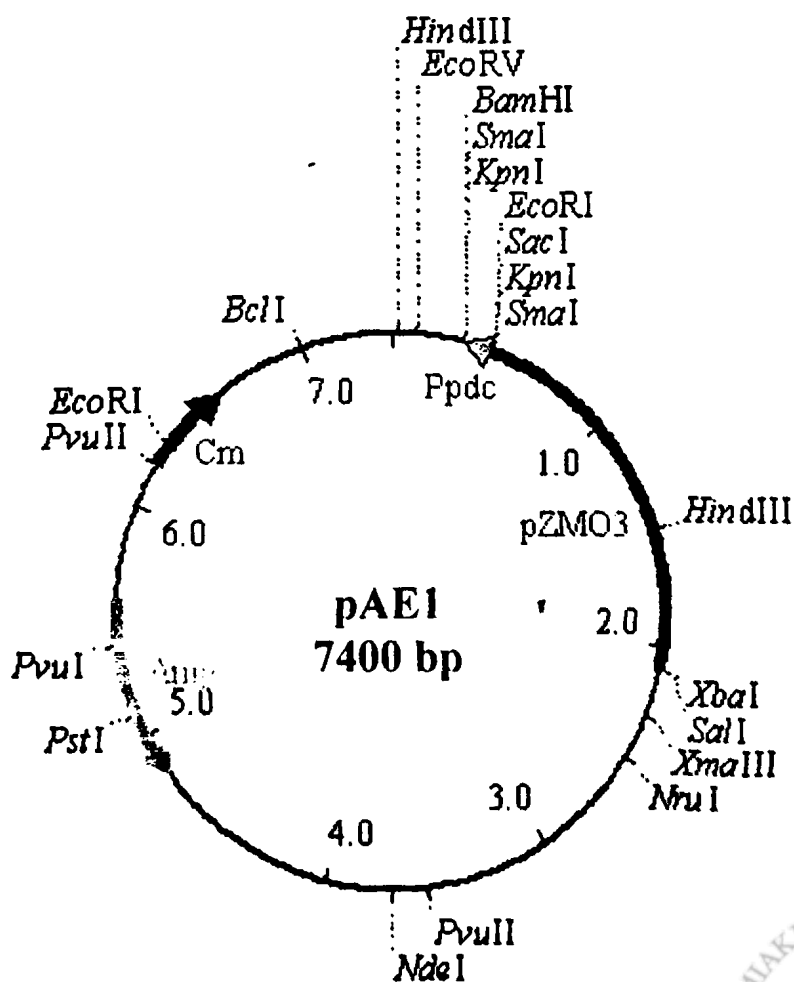
Πίνακας 5.1: Αλληλουχίες προαγωγών του βακτηρίου *Z. mobilis*

Προαγωγός	-35'	Ενδιάμεση αλληλουχία	-10'	Αναφορά
P_{glc}	GCTTTCCTTGGCT	24 bp	TATTGCATA	Douka <i>et al.</i> , 1999
P_{eda}	AAAAAACTTGATT	15 bp	TAGATGCAA	Conway <i>et al.</i> , 1991
$P2_{(gap)}$	GGTATACTGGAAT	18 bp	TATTGATGT	Conway <i>et al.</i> , 1987a
$P1_{(gap)}$	ACGACAATTGGCT	10 bp	TACTGGAAT	"
P_{pdc}	AATGCCTATAGCT	18 bp	TAGAGGTTT	Conway <i>et al.</i> , 1987b
$P1_{(adhB)}$	AGCAGCCTTGCTC	17 bp	TAGAAAAAT	Conway <i>et al.</i> , 1987c
$P2_{(adhB)}$	GAACCCCTTGATC	18 bp	TATTGCTTT	"
P_{phoC}	ATTGTCTTATTAT	18 bp	TATTACAAT	Pond <i>et al.</i> , 1989
Συντηρημένη αλληλουχία <i>Z. mobilis</i>	A-----CTTG--- G A G		TA-T----T A A	Conway <i>et al.</i> , 1991

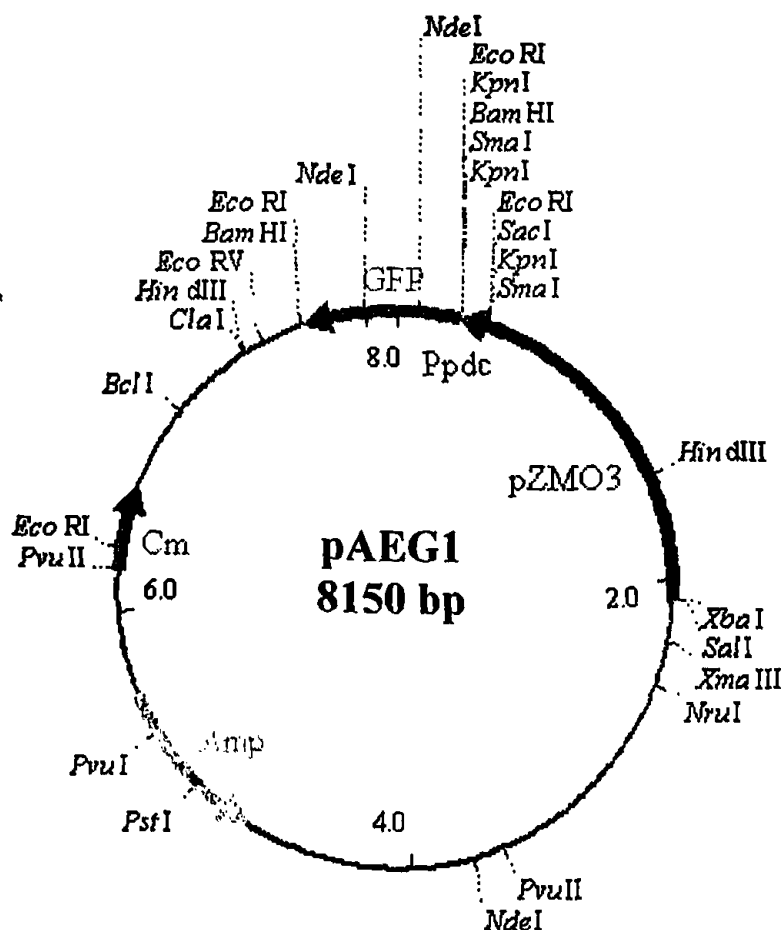
5.2 Μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού του κλώνου

Επιχειρήθηκε ομόλογη μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού P_{gfc} του κλώνου ο οποίος αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Σχήμα 3.2), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς *gfp*, το οποίο κωδικεύει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Chalfie *et al.*, 1994, Cormack *et al.*, 1996). Τα πειράματα ρύθμισης έγιναν σε κύτταρα *Z. mobilis* CP4Rif^r ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη (20 $\mu\text{g/ml}$) (Parras *et al.*, 1997).

Αρχικά μελετήθηκε κατά πόσο το γονίδιο *gfp* μπορεί να εκφραστεί σε κύτταρα του *Z. mobilis*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pAE1, το οποίο δεν φέρει το γονίδιο *gfp* (Σχήμα 5.4) και pAEG1 το οποίο φέρει το γονίδιο *gfp* υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης του *Z. mobilis*, P_{pdc} (Douka *et al.*, 2001, Σχήμα 5.5).



Σχήμα 5.4. Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAE1.



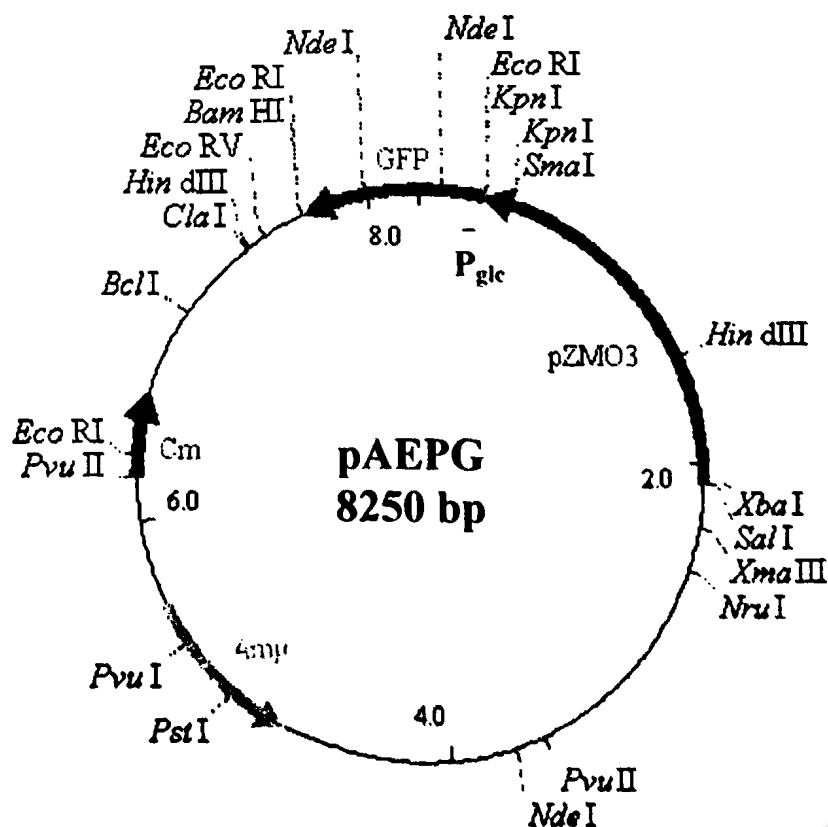
Σχήμα 5.5. Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAEG1.

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pAE1 και pAEG1 μεταφέρθηκαν σε κύτταρα του στελέχους *Z. mobilis* CP4Rif^r με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη και στα μετασυζευγμένα κύτταρα μετρήθηκε ο φθορισμός ως εξής: κύτταρα από 30 ml καλλιέργεια παραλήφθηκαν με φυγοκέντρηση (6000xg, 10 min), ξεπλύθηκαν με 30 ml διαλύματος 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 600 mM NaCl, επαναιωρήθηκαν σε 3 ml του ίδιου διαλύματος και ο φθορισμός τους μετρήθηκε άμεσα χρησιμοποιώντας φθορισμόμετρο Perkin-Elmer LS-3. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.2 και δείχνουν ότι το γονίδιο *gfp* μπορεί να εκφραστεί στα κύτταρα του *Z. mobilis* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς για ποσοτικές μετρήσεις (Douka *et al.*, 2001).

Πίνακας 5.2: Φθορισμός κυττάρων *Z. mobilis* CP4Rif^r που εκφράζουν το γονίδιο *gfp* υπό τον έλεγχο διαφόρων προαγωγών.

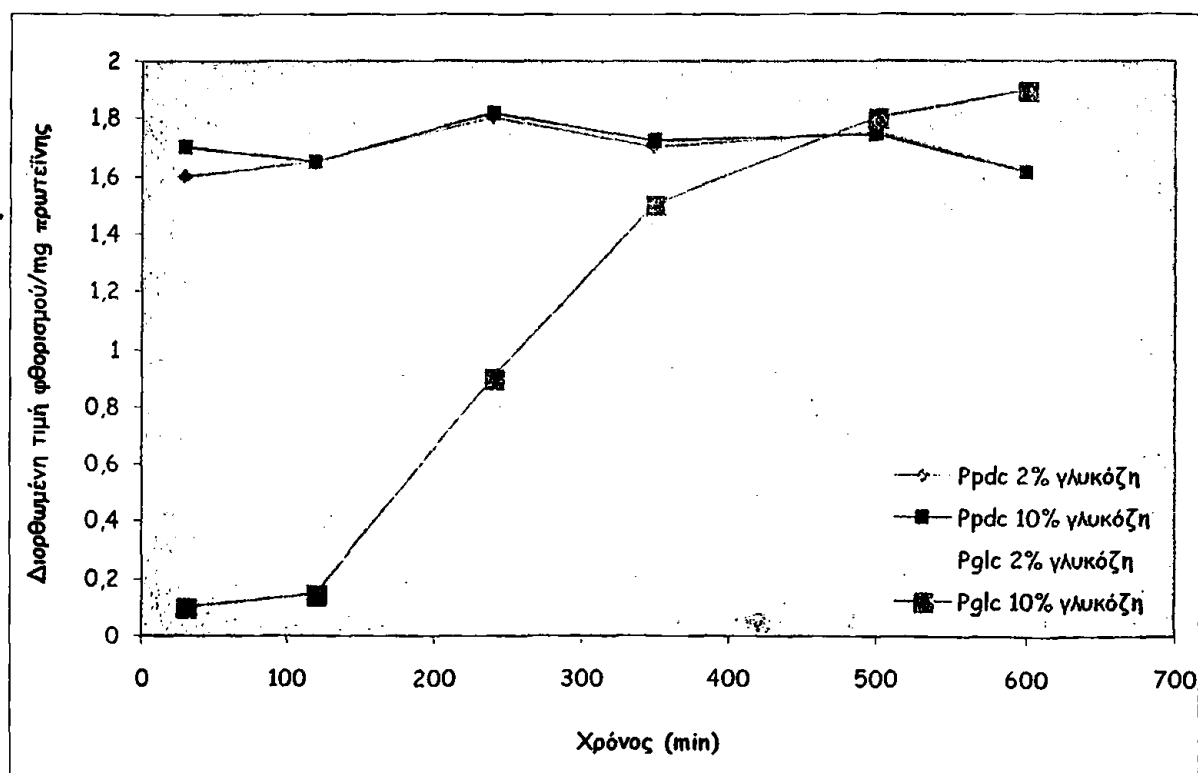
Στέλεχος	Προαγωγός	Ολικός φθορισμός/mg πρωτεΐνης	Διορθωμένος φθορισμός/mg πρωτεΐνης
CP4Rif ^r /pAE1	-	0.24 ± 0.01	0.00
CP4Rif ^r /pAEG1	P _{pd} c	1.92 ± 0.10	1.68
CP4Rif ^r /pAEPG	P _{glc}	0.88 ± 0.10	0.64

Προκειμένου να μελετηθεί ο προαγωγός του κλώνου, χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pAEPG (Σχήμα 5.6) το οποίο φέρει το γονίδιο *gfp* υπό τον έλεγχο του προς μελέτη προαγωγού. Το πλασμίδιο pAEPG μεταφέρθηκε στα κύτταρα του στελέχους *Z. mobilis* CP4Rif^r με βακτηριακή σύζευξη και στα μετασυζευγμένα κύτταρα μετρήθηκε ο φθορισμός όπως παραπάνω. Τα αποτελέσματα φαίνονται επίσης στον Πίνακα 5.2 και επιβεβαιώνουν την ύπαρξη προαγωγού στη συγκεκριμένη περιοχή του κλώνου. Από τον Πίνακα φαίνεται επίσης ότι ο προς μελέτη προαγωγός P_{glc} είναι πιο ασθενής από τον ισχυρό προαγωγό του *Z. mobilis* P_{pd}c.



Σχήμα 5.6. Περιοριστικός χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pAEPG.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το παραπάνω σύστημα, μελετήθηκε κατά πόσο η δραστικότητα του προαγωγού και κατ' επέκταση και του κλώνου που αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του στελέχους *CU1Rif^r* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, επηρεάζεται από την παρουσία της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Έτσι, κύτταρα του στελέχους *CP4Rif^r /pAEPG* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 2% και 10% γλυκόζης αντίστοιχα, συλλέχθηκαν σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξής τους και μετρήθηκε η ποσότητα του φθορισμού τους όπως αναφέρεται παραπάνω. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *CP4Rif^r /pAE1*, αφαιρώντας σε κάθε περίπτωση την τιμή του φθορισμού του από την τιμή του φθορισμού του στελέχους *CP4Rif^r /pAEPG*. Για να ελεγχθεί κατά πόσο η συγκέντρωση γλυκόζης επηρεάζει την ποσότητα του φθορισμού, το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε και σε κύτταρα *CP4Rif^r /pAEG1*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.7.



Σχήμα 5.7. Παρακολούθηση του εκλυόμενου φθορισμού σε στελέχη *Z. mobilis* *CP4Rif^r* τα οποία αναπτύσσονται παρουσία 2% ή 10% γλυκόζης.

Τα συμπεράσματα που εξαγονται από το Σχήμα 4.7 είναι τα εξής:

(α) Η τιμή φθορισμού κυττάρων CP4Rif^r όπου το γονίδιο *gfp* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pdc} παραμένει στα ίδια υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης, τόσο παρουσία 2% όσο και 10% γλυκόζης. Αυτό δείχνει τη συστατική έκφραση του P_{pdc} , γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Ingram *et al.*, 1989, Hesman *et al.*, 1991, An *et al.*, 1991).

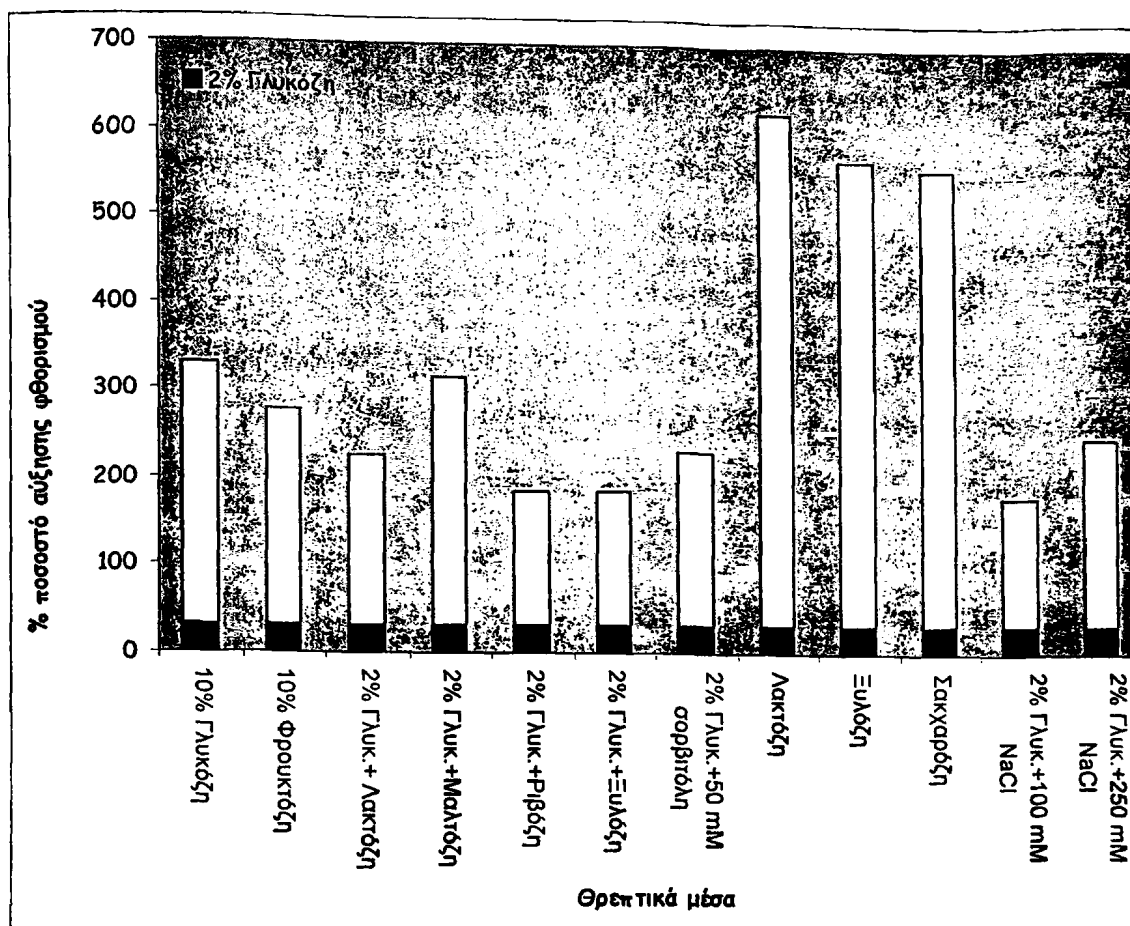
(β) αντίθετα στα κύτταρα CP4Rif^r στα οποία το γονίδιο *gfp* βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγού P_{glc} , η τιμή φθορισμού εμφανίζει χαμηλότερα αλλά σταθερά επίπεδα σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης ενώ αντίθετα σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης μετά από μια περίοδο 2 h περίπου δείχνει σημαντικά επίπεδα αύξησης. Η χρονική περίοδος των 2 h συμπίπτει με την περίοδο εφesusχασμού των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν επαγωγή του προαγωγού P_{glc} .

Φαίνεται επομένως ότι η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επάγει την δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} . Το ερώτημα που τίθεται είναι αν η επαγωγή του προαγωγού είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά και μόνο της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης ή αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων γενικά. Προκειμένου να διερευνηθεί το παραπάνω ερώτημα μετρήθηκε η ποσότητα του φθορισμού που εκλύεται από κύτταρα CP4Rif^r/pAEP6 τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν (α) 10% γλυκόζη, (β) 10% φρουκτόζη (δύο σάκχαρα τα οποία όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα προσλαμβάνονται και καταβολίζονται από το *Z. mobilis*), (γ) 2% γλυκόζη και 0,44 M μαλτόζη (δεν προσλαμβάνεται και δεν καταβολίζεται από το *Z. mobilis*), (δ) 2% γλυκόζη και 0,44 M λακτόζη, (ε) 2% γλυκόζη και 0,44 M ξυλόζη (προσλαμβάνεται αλλά δεν καταβολίζεται περαιτέρω από το *Z. mobilis*), (στ) 2% γλυκόζη και 0,44 M ριβόζη, (ζ) 2% γλυκόζη και 50 mM σορβιτόλη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν η εξής: κύτταρα από προκαλλιέργεια 2% γλυκόζης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και εμβολιάστηκαν σε ίσο όγκο του εκάστοτε θρεπτικού μέσου. Ο φθορισμός μετρήθηκε 0,5 h, 1 h, 1,5 h και 3 h από τον εμβολιασμό. Επιπρόσθετα, με τον ίδιο τρόπο μετρήθηκε η ποσότητα του

φθορισμού που εκλύεται από κύτταρα CP4Rif^r/pAEPG τα οποία μεταφέρθηκαν σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν ως μοναδική πηγή άνθρακα 0,55 M ξυλόζη, 0,55 M μαλτόζη καθώς και 0,55 M σακχαρόζη. Οι συγκεντρώσεις των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση ήταν ισομοριακές ως προς το 10% γλυκόζη (0,55 M). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος CP4Rif^r/pAE1 ως ανωτέρω. Από τα αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 5.3 και στο Σχήμα 5.8, προκύπτει ότι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων στο θρεπτικό μέσο επάγει την δραστικότητα του προαγωγού p_{glc} . Προκειμένου να διερευνηθεί αν ο προαγωγός P_{glc} είναι γενικά οσμωρυθμιζόμενος, το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με την προσθήκη αλάτος στο θρεπτικό μέσο σε συγκεντρώσεις 100 mM και 250 mM NaCl (Σχήμα 5.8). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.8, ο φθορισμός αυξάνει παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτος γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επαγωγή του προαγωγού είναι επακόλουθο της μεγάλης οσμωτικής πίεσης που δημιουργείται λόγω της παρουσίας είτε αυξημένων συγκεντρώσεων σακχάρων είτε αλάτος στο θρεπτικό μέσο. Επομένως φαίνεται ότι ο προαγωγός P_{glc} είναι οσμωρυθμιζόμενος.

Πίνακας 5.3: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CP4Rif^r σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και αλάτος.

Θρεπτικό μέσο	% ποσοστό αύξησης
2% γλυκόζη (0,11 M)	31
10% γλυκόζη (0,55 M)	297,6
10% φρουκτόζη (0,55 M)	246,5
2% γλυκόζη + λακτόζη (0,44 M)	194,3
2% γλυκόζη + μαλτόζη (0,44 M)	283,5
2% γλυκόζη + ριβόζη (0,44 M)	154,4
2% γλυκόζη + ξυλόζη (0,44 M)	153,3
2% γλυκόζη + 50 mM σορβιτόλη	200
Σακχαρόζη (0,55 M)	529,6
Λακτόζη (0,55 M)	592,2
Μαλτόζη (0,55 M)	539,3
2% γλυκόζη + 100 mM NaCl	149
2% γλυκόζη + 250 mM NaCl	216,5

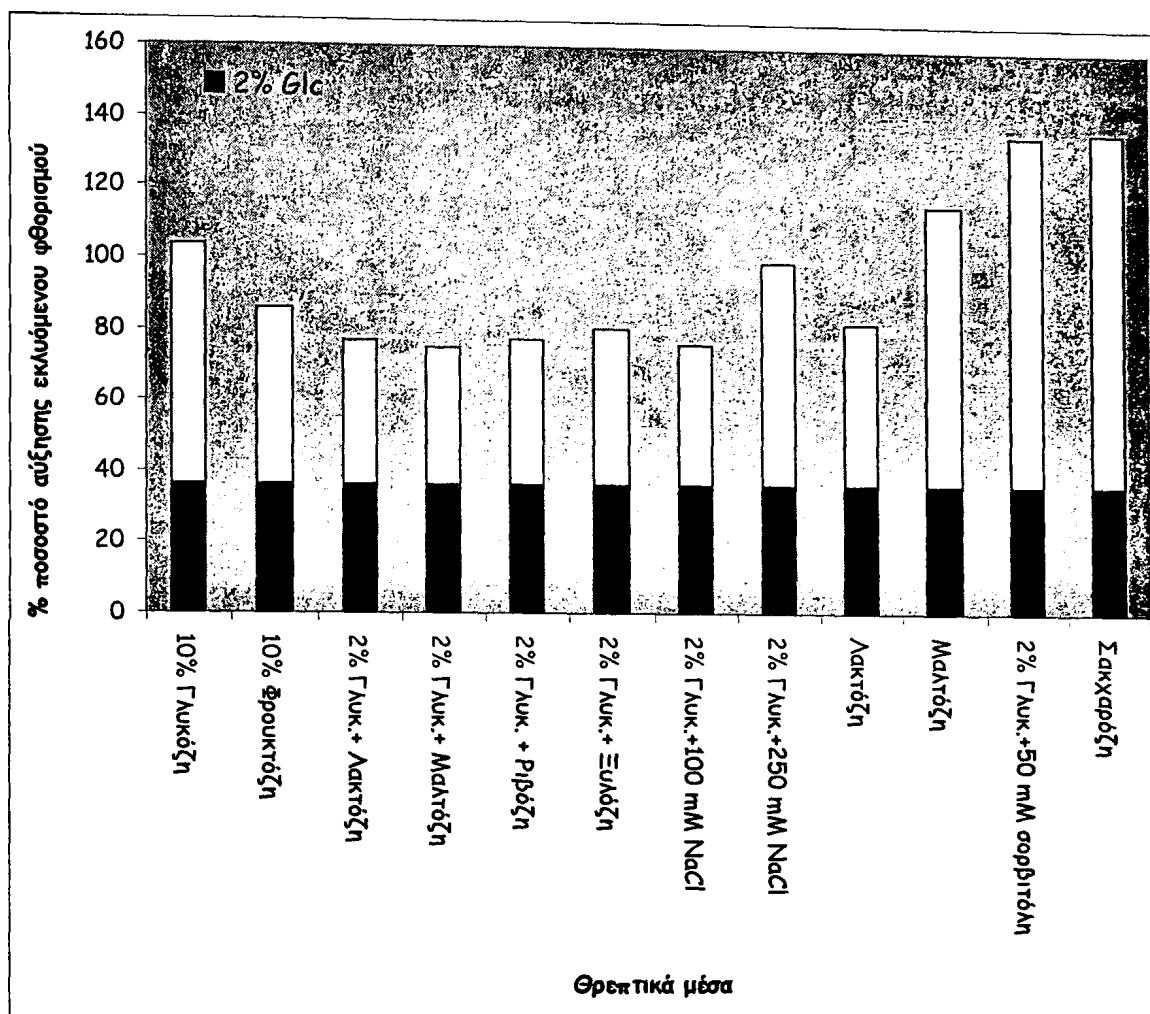


Σχήμα 5.8. Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλούμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif^r παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

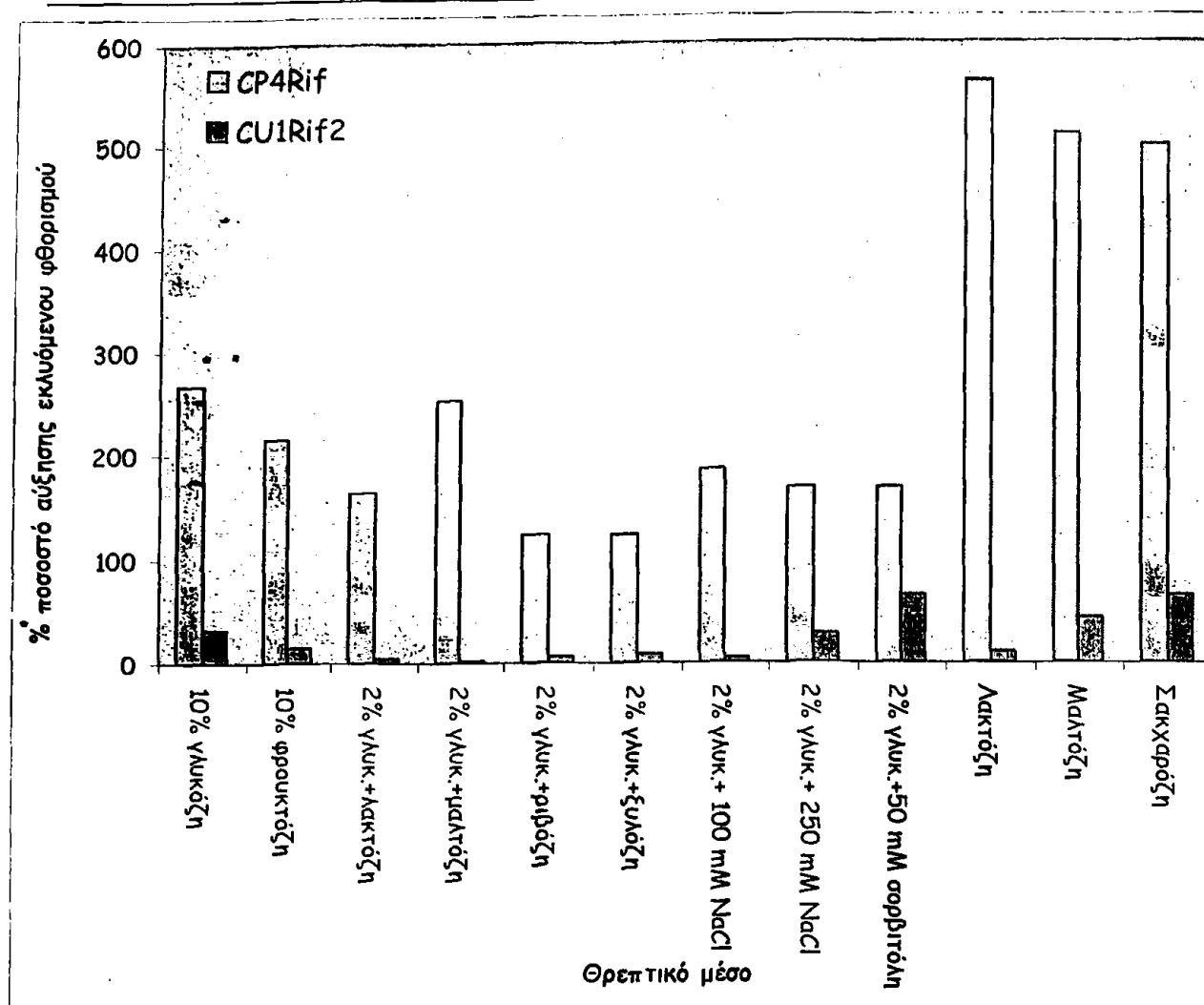
Το φαινόμενο μελετήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως περιγράφηκε προηγουμένως και σε κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2. Τα αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 5.4 και στο Σχήμα 5.9, δείχνουν ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρων ή άλατος προκαλεί μικρή μόνο αύξηση του φθορισμού στα κύτταρα του CU1Rif2. Αυτό φαίνεται καλύτερα στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 5.10 στο οποίο απεικονίζονται τα καθαρά επί τοις εκατό ποσοστά αύξησης του φθορισμού (έχει αφαιρεθεί ο φθορισμός στο 2% γλυκόζη) στο φυσικό και μεταλλαγμένο στέλεχος.

Πίνακας 5.4: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CU1Rif2 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

Θρεπτικό μέσο	% ποσοστό αύξησης
2% γλυκόζη (0,11 M)	36
10% γλυκόζη (0,55 M)	67,35
10% φρουκτόζη (0,55 M)	50,13
2% γλυκόζη + λακτόζη (0,44 M)	40,88
2% γλυκόζη + μαλτόζη (0,44 M)	38,9
2% γλυκόζη + ριβόζη (0,44 M)	41,5
2% γλυκόζη + ξυλόζη (0,44 M)	44,1
2% γλυκόζη + 50 mM σορβιτόλη	99,98
Λακτόζη (0,55 M)	46
Μαλτόζη (0,55 M)	79,76
Σακχαρόζη (0,55 M)	101,5
2% γλυκόζη + 100 mM NaCl	40
2% γλυκόζη + 250 mM NaCl	63,46



Σχήμα 5.9. Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CU1Rif2 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

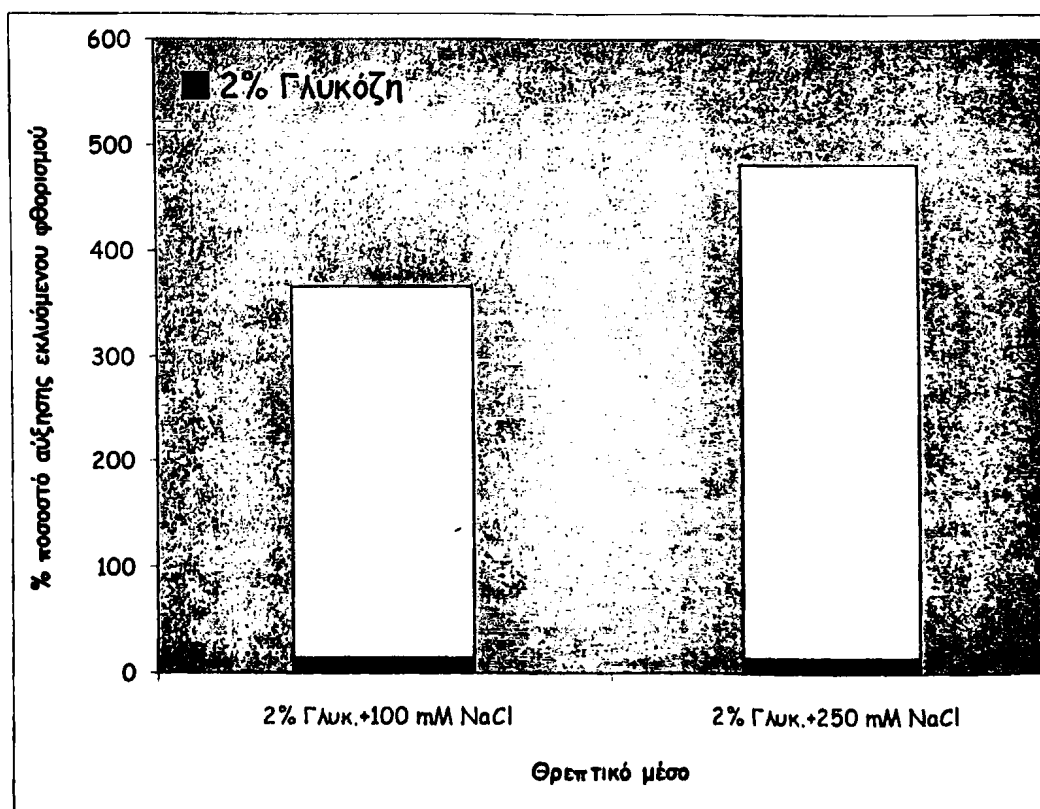


Σχήμα 5.10. Συγκριτική απεικόνιση των % ποσοστών αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif^r και CU1Rif2 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δραστηριότητα του προαγωγού P_{glc} στο φυσικό μετάλλαγμα 11163/74 του στελέχους του *Z. mobilis* 11163, το οποίο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις άλατος έως και 250 mM. Στον Πίνακα 5.5 φαίνονται τα επί τοις εκατό ποσοστά αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε 100 και 250 mM NaCl. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 5.11 και δείχνουν ότι και στο στέλεχος αυτό ο P_{glc} επάγεται από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος στο θρεπτικό μέσο.

Πίνακας 5.5. % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα 11163/74 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων άλατος.

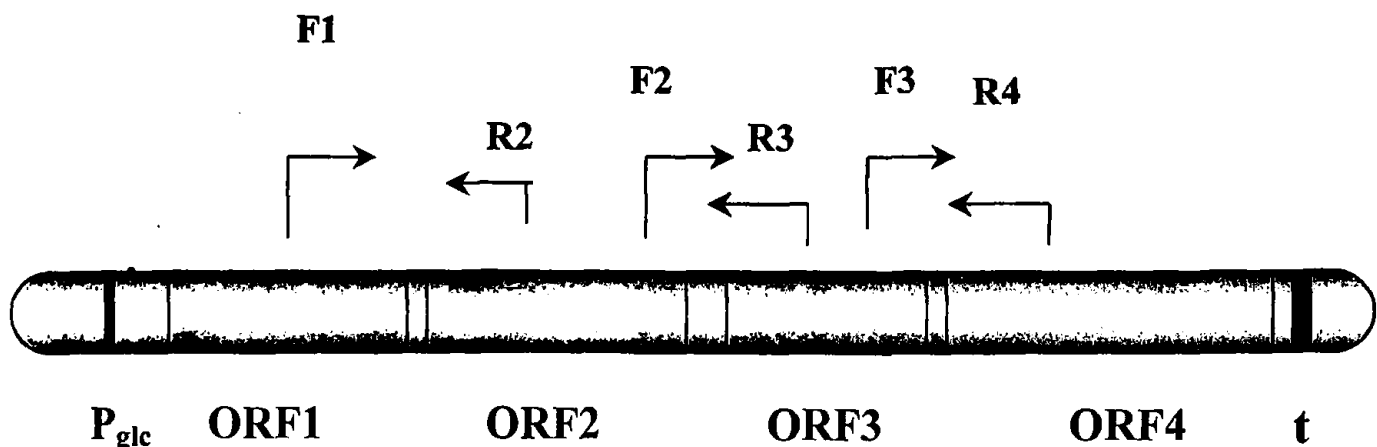
Θρεπτικό μέσο	% ποσοστό αύξησης
2% γλυκόζη (0,11 M)	14,7
2% γλυκόζη + 100 mM NaCl	350
2% γλυκόζη + 250 mM NaCl	466,7



Σχήμα 5.11. Απεικόνιση του % ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα 11163/74 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος.

5.3 Οι τέσσερις κωδικεύουσες περιοχές του κλώνου συµµεταγράφονται ως ένα αυτόνοµο σπερόνιο

Προκειµένου ν' αποδειχθεί ότι οι τέσσερις κωδικεύουσες περιοχές του κλώνου συµµεταγράφονται χρησιµοποιήθηκε η µέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυµεράσης αντίστροφης µεταγραφάσης (RT-PCR). Σχεδιάστηκαν κατάλληλα πριµοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (Πίνακας 5.6) όπως φαίνεται στο Σχήµα 5.12. Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων σχεδιάστηκαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ανήκουν σε διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης προκειµένου να αποδειχθεί µε τον τρόπο αυτό η συµµεταγραφή του πολυκιστρονικού mRNA.



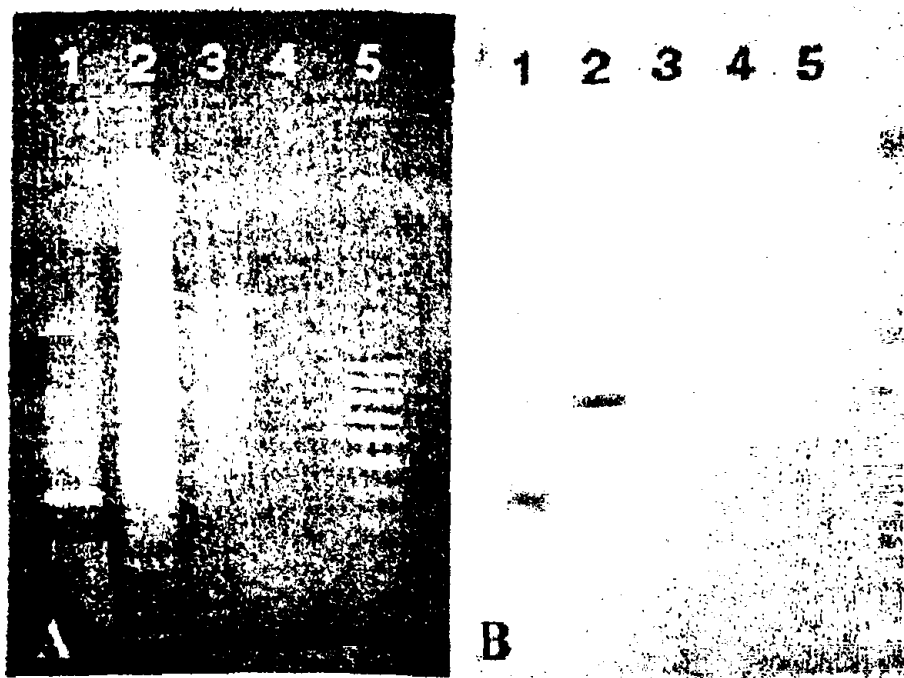
Σχήµα 5.12. Γενετικός χάρτης του κλώνου που αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε αυξηµένες συγκεντρώσεις γλυκόζης µε τις ενδείξεις των πριµοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιµοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις RT-PCR.

Πίνακας 5.6: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία
F1	5'- TTG AGA CCG TGA TCG CTG GA -3'
R2	5'- AGG AAT TGG GTC GAA TTT GC -3'
F2	5'- CAG GCC GCA AAG AAG GGA TC -3'
R3	5'- ATC AAA GCC TGC GCT TCG GC -3'
F3	5'- AAT CGG GGA TGT TTC TG -3'
R4	5'- GCA ACG GCA ATA CGC TG-3'

Απομονώθηκε ολικό RNA από το στέλεχος CUIRif2/pLAFR545 το οποίο και χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο στα πειράματα RT-PCR (1 µg σε κάθε περίπτωση). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR545 προήλθε από την υποκλωνοποίηση του κλώνου των 4,5 kb στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 (Douka *et al.*, 1999). Η πιθανή επιμόλυνση του mRNA με DNA ελέγχθηκε πραγματοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με την προσθήκη Taq DNA πολυμεράσης και όχι αντίστροφης μεταγραφάσης.

Η συμμεταγραφή των ORF1 και ORF2 ελέγχθηκε με τους εκκινητές F1 και R2, ενώ η συμμεταγραφή των ORF1 και ORF3 ελέγχθηκε με τους εκκινητές F1 και R3. Το μέγεθος των αναμενόμενων προϊόντων PCR ήταν 400 και 800 bp αντίστοιχα. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση και υβριδισμό κατά Southern χρησιμοποιώντας ανιχνευτικό μόριο τον κλώνο των 4,5 kb (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2. Α. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντων RT-PCR, της συμμεταγραφής των ORF1/ORF2 και ORF1/ORF3.

Διαδρομές: 1: Προϊόν συμμεταγραφής ORF1/ORF2

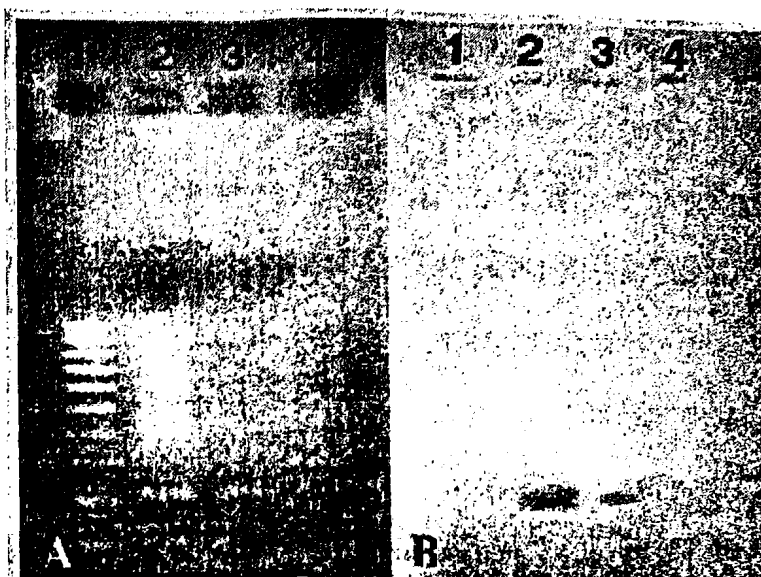
2: Προϊόν συμμεταγραφής ORF1/ORF3

3: Δείγμα μάρτυρας

5: Πρότυπο 100 bp DNA ladder

Β. Αποτύπωση κατά Southern

Στην δεύτερη αντίδραση RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F2 και R3 προκειμένου να αποδειχθεί ότι τα ORF2 και ORF3 συμμεταγράφονται. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος PCR ήταν 210 bp, το οποίο και επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση και αποτύπωση κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο τον κλώνο των 4,5 kb (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3. Α. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντος RT-PCR, της συμμεταγραφής των ORF2/ORF3.

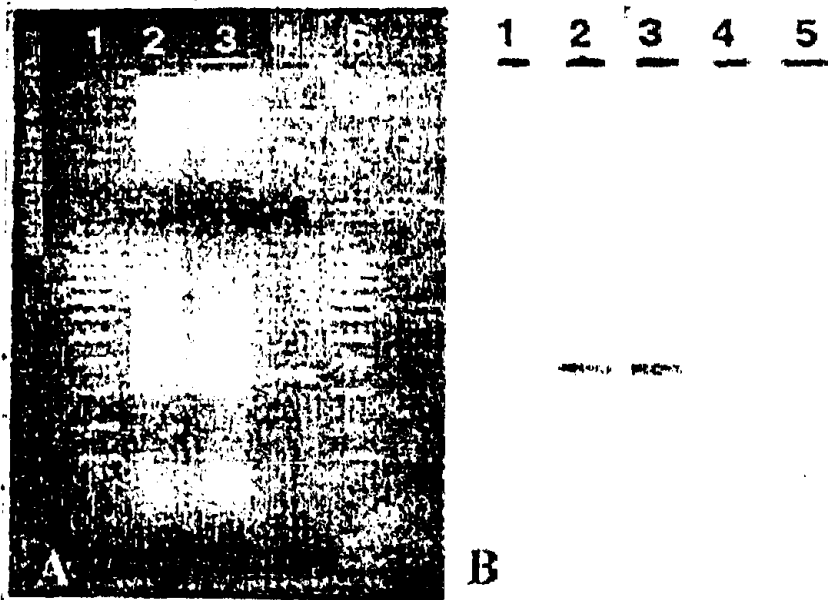
Διαδρομές: 1: Πρότυπο 100 bp DNA ladder

2,3: Προϊόν συμμεταγραφής ORF2/ORF3

4: Δείγμα μάρτυρας

Β. Αποτύπωση κατά Southern

Στην τρίτη αντίδραση RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F3 και R4 προκειμένου να αποδειχθεί ότι και τα ORF3 και ORF4 συμμεταγράφονται. Το μέγεθος του αναμενόμενου PCR προϊόντος ήταν 350 bp, το οποίο και επιβεβαιώθηκε όπως προηγουμένως με ηλεκτροφόρηση και αποτύπωση κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτικό μόριο τον κλώνο των 4,5 kb (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4. Α. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης προϊόντος RT-PCR της συμμεταγραφής των ORF3/ORF4.

Διαδρομές: 1,5: Πρότυπο 100 bp DNA ladder

2,3: Προϊόν συμμεταγραφής ORF3/ORF4

4: Δείγμα μάρτυρας

Β. Αποτύπωση κατά Southern

Αποδείχθηκε λοιπόν ότι το εξεταζόμενο τμήμα DNA των τεσσάρων θεωρητικών κωδικευουσών περιοχών συμμεταγράφεται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Το οπερόνιο αυτό εφεξής θα καλείται οπερόνιο *glc*.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταγραφή του κλώνου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης με τη μέθοδο της ημιποσοτικής RT-PCR (Sieg *et al.*, 1997, Ludeking *et al.*, 1998, Ponser *et al.*, 1999, Lundberg *et al.*, 1999).

Έτσι, η αντίδραση της RT-PCR έγινε σε ολικό RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του φυσικού τύπου ATCC 10988 και του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 τα οποία αφού αναπτύχθηκαν σε προκαλλιέργεια 2% σε γλυκόζη μεταφέρονταν σε θρεπτικά μέσα 2 και 10% σε γλυκόζη και η συλλογή τους γινόταν σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξής τους. Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα F2 και R3 (αναμενόμενο μέγεθος 210 bp). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η συστατική έκφραση του 16S rRNA του *Z. mobilis* χρησιμοποιώντας τα παρακάτω πριμοδοτικά

ολιγονουκλεοτίδια για την αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA (Lee and Kang 1999, αναμενόμενο μέγεθος 550 bps): 16SF: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' και 16SR: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Η έκφραση του οπερονίου αποδείχθηκε συστατική καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των κυττάρων των ATCC 10988 και CU1Rif2 σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης (Εικόνα 4.5B διαδρομές 1-6, Εικόνα 5.5Γ διαδρομές 1-6). Όταν όμως τα κύτταρα του ATCC 10988 μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης η έκφραση του οπερονίου αρχικά καταστέλλεται για 2 h περίπου όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.5B, διαδρομές 7-8. Στις ίδιες συνθήκες η έκφραση του οπερονίου σε κύτταρα του CU1Rif2 καταστέλλεται για 24 h (Εικόνα 5.5Γ, διαδρομές 7-8). Αντίθετα, η έκφραση του 16S rRNA βρέθηκε συστατική καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των κυττάρων των ATCC 10988 και CU1Rif2 τόσο σε 2 όσο και σε 10% γλυκόζη (Εικόνα 5.5A).



Εικόνα 5.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης των προϊόντων της αντίδρασης RT-PCR χρησιμοποιώντας 1 μg ολικού RNA από τα στελέχη του *Z. mobilis*, ATCC 10988 και CU1Rif2 κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικά μέσα που περιείχαν 2 και 10% γλυκόζη και

χρησιμοποιώντας τα πριμοδοτικά μόρια F2 και R3 (Β και Γ) και κατάλληλα πριμοδοτικά μόρια για την περιοχή του 16 rRNA στο βακτήριο αυτό (Α).

Α: Ενίσχυση προϊόντος από την περιοχή του 16S rRNA στο *Z. mobilis* χρησιμοποιώντας ολικό RNA από κύτταρα ATCC 10988 και CU1Rif2, Β: Ενίσχυση προϊόντος από την περιοχή του οπερονίου *glc* στο *Z. mobilis* χρησιμοποιώντας τα πριμοδοτικά μόρια F2 και R3 και ολικό RNA από κύτταρα ATCC 10988, Γ: Ενίσχυση προϊόντος από την περιοχή του οπερονίου *glc* στο *Z. mobilis* χρησιμοποιώντας τα πριμοδοτικά μόρια F2 και R3 και ολικό RNA από κύτταρα CU1Rif2.

Διαδρομές: _

1, 2, 3, 4, 5, 6: ATCC 10988 ή CU1Rif2 μετά από 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h και 10 h αντίστοιχα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης.

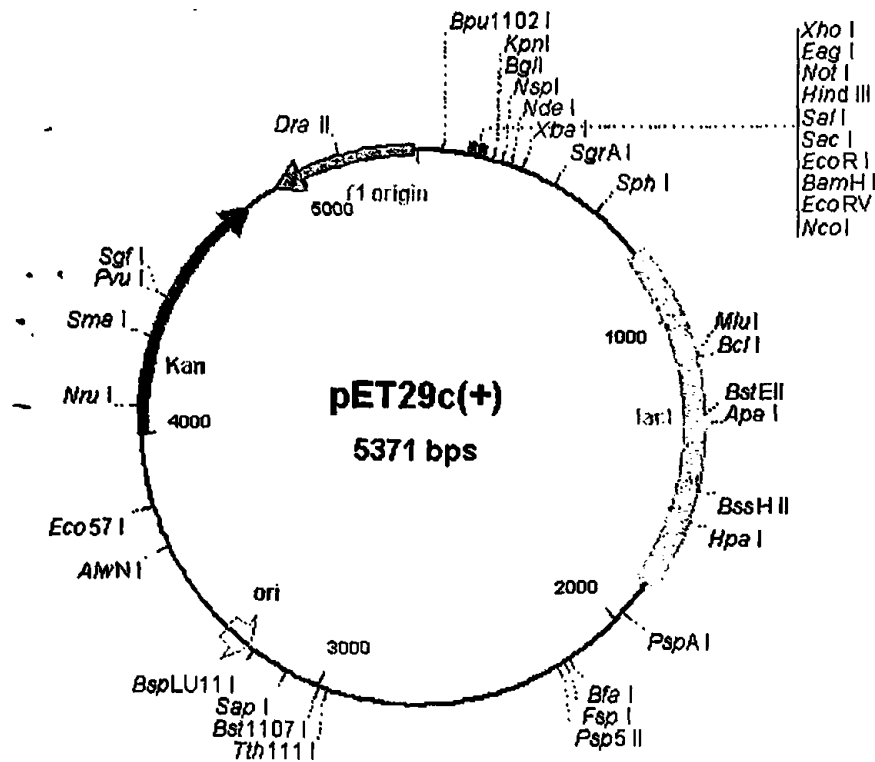
7, 8, 9, 10, 11, 12: ATCC 10988 μετά από 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h και 10 h αντίστοιχα ή CU1Rif2 μετά από 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h και 32 h αντίστοιχα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Φαίνεται επομένως ότι, όταν κύτταρα *Z. mobilis* μεταφερθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης η μεταγραφή του οπερονίου *glc* καταστέλλεται στην αρχή της ανάπτυξης (τις πρώτες 2 h περίπου για τον φυσικό τύπο και τις 24 πρώτες h για το μεταλλαγμένο στέλεχος) και στη συνέχεια επάγεται. Αντίθετα, η μεταγραφή του οπερονίου *glc* σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι συστατική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των πειραμάτων μελέτης της ρύθμισης του προαγωγού *p_{glc}* που περιγράφηκαν παραπάνω (παράγραφος 5.2) και δείχνουν ότι η έκφραση του οπερονίου *glc* που είναι υπεύθυνο για την αναπλήρωση του φαινοτύπου του στελέχους CU1Rif2 ρυθμίζεται από την συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και μάλιστα η ρύθμιση αυτή γίνεται στο μεταγραφικό επίπεδο.

5.4 Υποκλωνοποίηση των ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4 σε φορέα υπερέκφρασης και εύρεση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο μηχανισμός της λειτουργίας του οπερονίου *glc* του φυσικού τύπου, το οποίο αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, κρίθηκε σκόπιμο να υποκλωνοποιηθούν κάθε μία από τις τέσσερις θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές σε φορέα υπερέκφρασης και να απομονωθούν τα παραγόμενα πρωτεϊνικά μόρια. Από τους πολλούς φορείς υπερέκφρασης που είναι διαθέσιμοι επιλέχθηκε ο pET29c(+) (Σχήμα 5.13). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), έχοντας ως εκμαγείο τον φορέα pUC1845 και χρησιμοποιώντας κατάλληλα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (Πίνακας 5.7). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUC1845 προήλθε από την υποκλωνοποίηση του οπερονίου *glc* στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 (Douka *et al.*, 1999). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η High Fidelity DNA Polymerase της Roche.

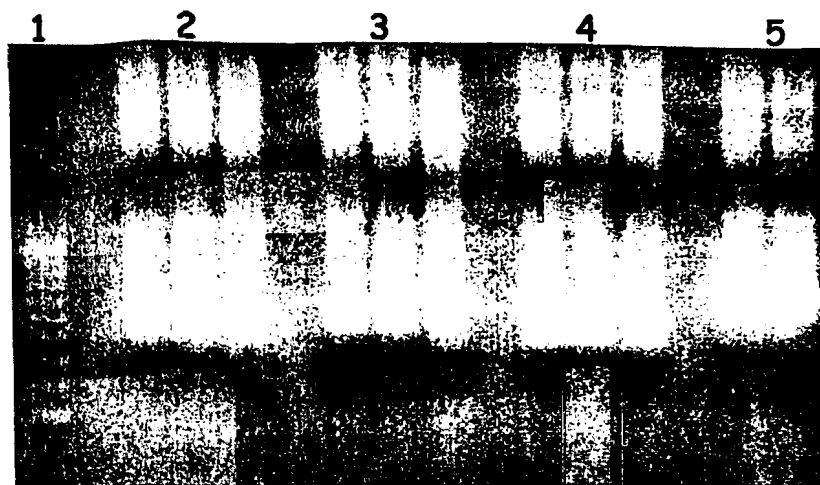
Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% απομονώθηκαν οι ζώνες του DNA που αντιστοιχούν στις τέσσερις θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές (Εικόνα 5.6), καθάριστηκαν, υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Nde*I και υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pET29c(+) ο οποίος επίσης υπέστη πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pET29c(+):ORF1, pET29c(+):ORF2, pET29c(+):ORF3 και pET29c(+):ORF4 (Σχήματα 5.14 και 5.15, Εικόνα 5.7).



Σχήμα 5.13. Περιοριστικός χάρτης του φορέα υπερέκφρασης pET29c(+).

Πίνακας 5.7: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία
ORF1sense	5'-GGC TCG GCG GCA TAT GAT GAA A-3'
ORF1antisense	5'-GCG GTC AAC GGA TCC GAT TCT TG-3'
ORF2sense	5'-AGC CGA GGC TCA TAT GAC TGA AA-3'
ORF2antisense	5'-AGC GAA TAC TGG GAT CCG GTT-3'
ORF3sense	5'-CAG ATC AAC ATA TGA CTC ATG CC-3'
ORF3antisense	5'-CAA AAT ACG TGG ATC CTT GCC-3'
ORF4sense	5'-GGA CAA TAA CCA GAC ATA TGG CCT GTC-3'
ORF4antisense	5'-GAG AGA TCG ACG GAT CCG GCA TTA-3'



Εικόνα 5.6. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των προϊόντων PCR των ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4.

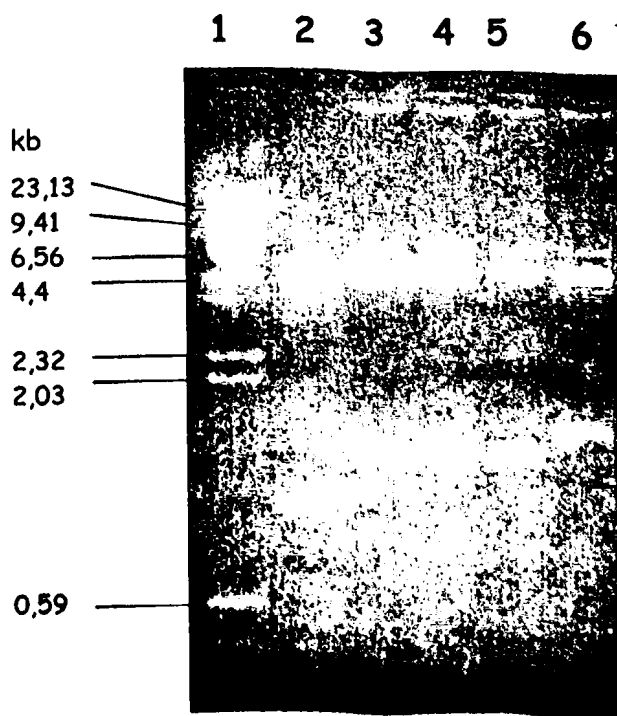
Διαδρομές: 1: 100 bps DNA Ladder (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 900, 1000 bp)

2: Προϊόν PCR ORF1 (440 bp)

3: Προϊόν PCR ORF2 (470 bp)

4: Προϊόν PCR ORF3 (390 bp)

5: Προϊόν PCR ORF4 (640 bp)



Εικόνα 5.7. Ηλεκτροφόρηση των ανασυνδυασμένων pET29c(+):ORFs μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Mlu*I και *Xho*I.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

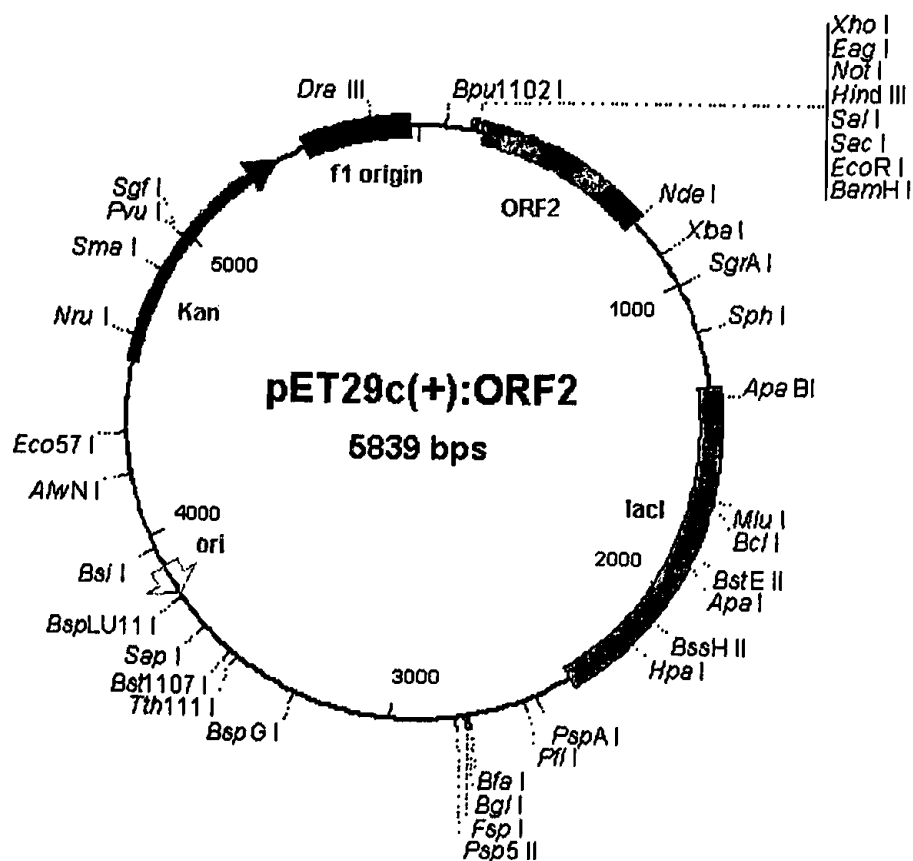
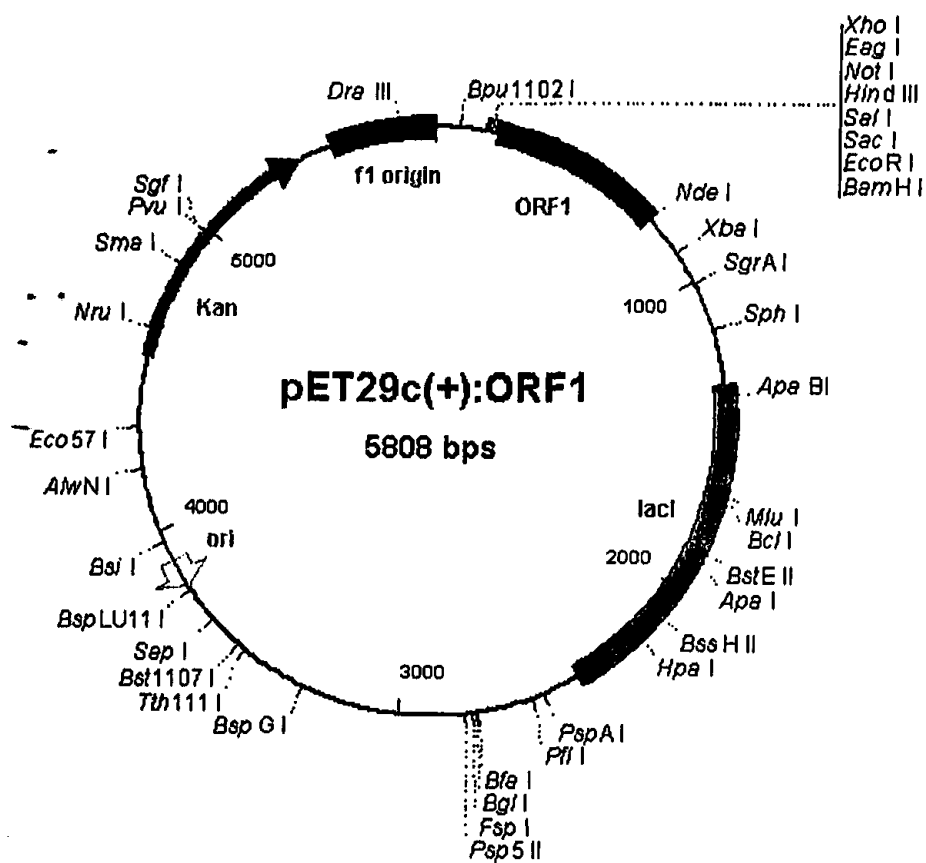
2: pET29c(+)

3: pET29c(+): ORF1

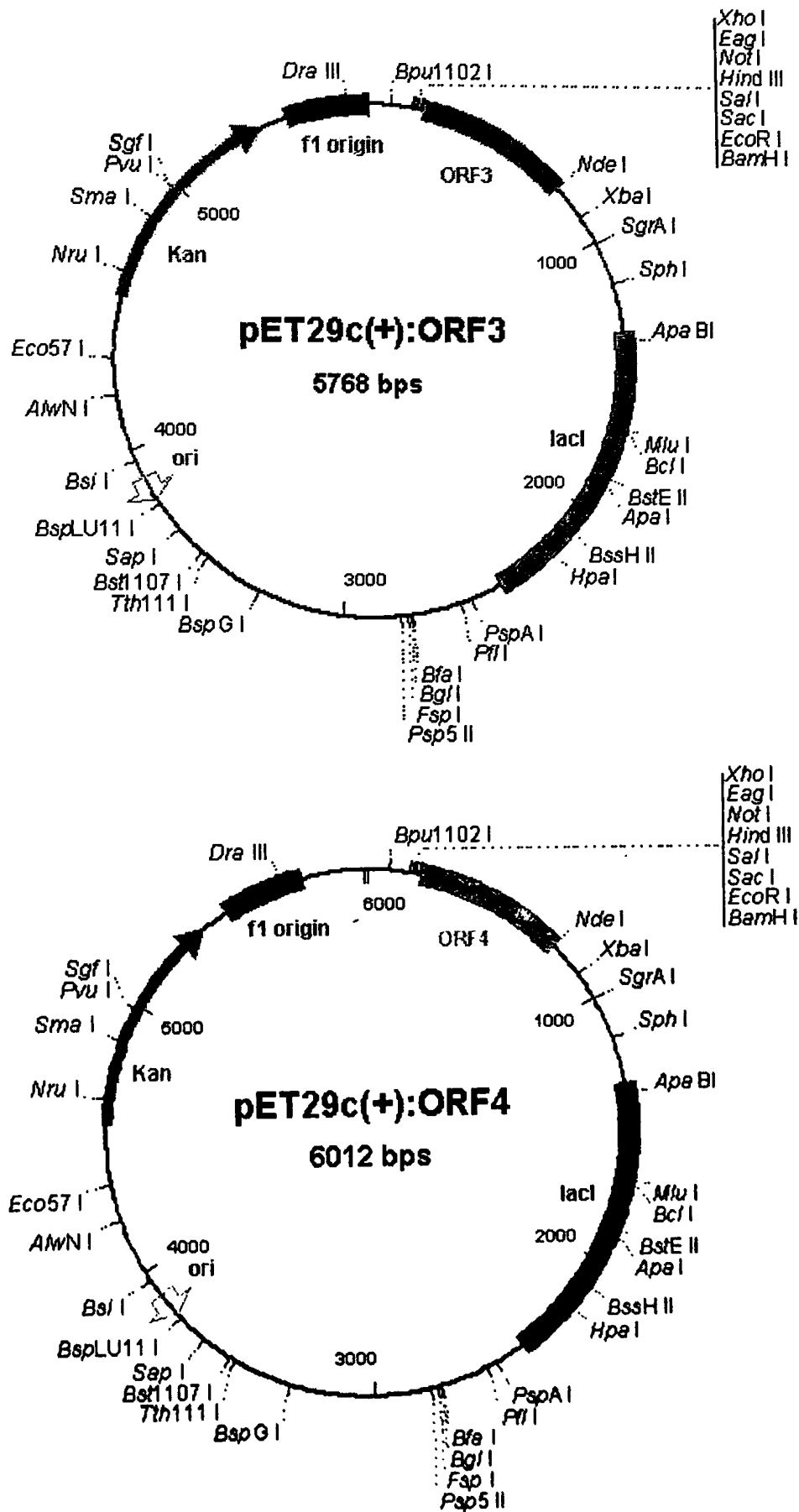
4: pET29c(+): ORF2

5: pET29c(+): ORF3

6: pET29c(+): ORF4



Σχήμα 5.14. Περιοριστικοί χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET29c(+):ORF1 και pET29c(+):ORF2.



Σχήμα 5.15. Περιοριστικοί χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET29c(+):ORF3 και pET29c(+):ORF4.

Η ορθότητα των κλωνοποιημένων προϊόντων PCR ελέγχθηκε με ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια T7 promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' και T7 terminator: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία των ORF1 και ORF2 παρουσιάζει 100 % ομολογία με αυτή που έχει κατατεθεί στην τράπεζα της EMBL (αριθμός πρόσβασης (accession number) AJ009974, Douka *et al.*, 1999).

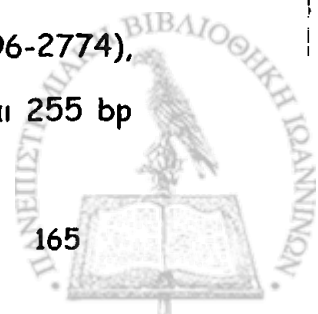
Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ORF3 αποκάλυψε την αντικατάσταση της θυμίνης (T) στη θέση 1779 από γουανίνη (G) (Σχήμα 5.16).

- Προκειμένου να εξακριβωθεί αν η διαφορά αυτή οφείλεται σε λάθος της αντίδρασης PCR, έγινε εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε έναν επιπλέον κλώνο από διαφορετική αντίδραση PCR καθώς και στο ίδιο το pUC1845. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα ήταν ταυτόσημο γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στη θέση 1779 υπάρχει γουανίνη (G) αντί θυμίνης (T) όπως θεωρούνταν έως σήμερα. Η διαφορά αυτή έχει ως αποτέλεσμα το αμινοξύ που κωδικεύεται στην περιοχή αυτή να είναι λυσίνη (Lys) αντί της ασπαραγίνης (Asn).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ORF4 αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει η αδερίνη (A) της θέσης 2271 (Σχήμα 5.17). Προκειμένου να διερευνηθεί η διαφορά αυτή, εξετάσθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία δέκα επιπλέον κλώνων από διαφορετικές αντιδράσεις PCR, του φορέα pUC1845 καθώς και του φορέα pLAFR545. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα έδειξαν τελικά ότι το νουκλεοτίδιο στη θέση 2271 δεν υπάρχει.

Με βάση τα νέα αυτά δεδομένα, η έλλειψη του νουκλεοτιδίου 2271 δημιουργεί 15 νουκλεοτίδια καθοδικά ένα κωδικόνιο τερματισμού (TAA) (Σχήμα 5.17).

Η εκ νέου ανάλυση με το πρόγραμμα PC/GENE® (Release 6.6, IntelliGenetics, Inc.) της νέας αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων επιβεβαίωσε την ύπαρξη των τριών κωδικευουσών περιοχών ORF1, ORF2 και ORF3, ενώ για την τέταρτη κωδικεύουσα περιοχή, ORF4, προτείνονται 5 πιθανές περιοχές έναρξης και μία τερματισμού (Σχήμα 5.18), οι εξής: 684 bp (νουκλεοτίδια 2090-2774), 678 bp (νουκλεοτίδια 2096-2774), 546 bp (νουκλεοτίδια 2228-2774), 405 bp (νουκλεοτίδια 2369-2774), και 255 bp



(νουκλεοτίδια 2519-2774). Η πιθανότητα για τα δύο πρώτα "ORF4" υπολογίζεται στο 100 % ενώ για τα τρία τελευταία στο 98 %. Ανοδικά από κάθε ORF υπάρχουν συντηρημένες περιοχές Shine-Dalgarno. Όλα τα προβλεπόμενα ORFs αρχίζουν με ένα ATG (τυπικό κωδικόνιο έναρξης στο *Z. mobilis*) και χρησιμοποιούν το TAA ως κωδικόνιο τερματισμού, που είναι το πιο συνηθισμένο στο *Z. mobilis*. Εξαιρέση αποτελεί το ORF1, το οποίο τελειώνει με TGA (Σχήμα 5.18).

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 5.18). Ακόμα στα νουκλεοτίδια 2819-2851 (Σχήμα 5.18), βρίσκεται μία θεωρητική αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής. Η νέα οργάνωση του οπερονίου των 4.493 bp (αντί των 4.494 bp) φαίνεται στο Σχήμα 5.19.

5690064|emb|AJ009974.1|ZMO009974 Zymomonas mobilis genomic DNA clone encoding ORF1

Length = 4494

Core = 781 bits (394), Expect = 0.0, Identities = 397/398 (99%), Strand = Plus / Plus

```

ery: 46   tatgactcatgccgaagcgcaggctttgatggaaacagctttaccgggcttgctgcaagg 105
          |||||..|||||
jct: 1647 tatgactcatgccgaagcgcaggctttgatggaaacagctttaccgggcttgctgcaagg 1706

```

```

ery: 106  cgcaaaacagcaatgttcttcagtgtgtagcgattcctatttgctgaagcaggaagc 165
          |||
jct: 1707  cgcaaaacagcaatgttcttcagtgtgtagcgattcctatttgctgaagcaggaagc 1766

```

```

ery: 166  gacccttagcaagcgctttcgtcaggaaagtgaaaccgactggcctaaggcaaaagccgc 225
          |||
ict: 1767 gacccttagcaatcgctttcgtcaggaaagtgaaaccgactggcctaaggcaaaagccgc 1826

```

```

ary: 226  ttttgaacggctgggcgggtcggctgtggccgatatgggagatgcggggcaaaagagctgc 285
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ct: 1827  ttttgaacggctgggcgggtcggctgtggccgatatgggagatgcggggcaaaagagctgc 1886

```

```

ry: 286  gattgaaaccatggtttccgatatcgtcagccaaaagatgaagccgcaatcctgtgaaat 345
          |||
ct: 1887 gattgaaaccatggtttccgatatcgtcagccaaaagatgaagccgcaatcctgtgaaat 1946

```

```

ry: 346  cgtaaatggcctttttgccatttgtagcagaacaacccgccaataaaatcggggatgtttc 405
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ct: 1947 cgtaaatggcctttttgccatttgtagcagaacaacccgccaataaaatcggggatgtttc 2006

```

```

ry: 406  tgtttccacattcgcttgattaagaaaattggcaagg  443
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ct: 2007  tgtttccacattcgcttgattaagaaaattggcaagg  2044

```

Σχήμα 5.16. Σύγκριση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του ORF3 (Query) με αυτήν που έχει κατατεθεί στην τράπεζα της EMBL (Sbjct).

gi|5690064|emb|AJ009974.1|ZMO009974 Zymomonas mobilis genomic DNA clone encoding ORF1 to 4, Length = 4494, Score = 1257 bits (634), Expect = 0.0
Identities = 641/642 (99%), Gaps = 1/642 (0%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      atggcctgtcctcgcagccttctgataccgagaaagaagcgcttcagcaaaaggcagaac 60
              |||
Sbjct: 2115   atggcctgtcctcgcagccttctgataccgagaaagaagcgcttcagcaaaaggcagaac 2174

Query: 61     agcaggatatttctgccaggatagtgaagaattacaaaaaactatccaaatattggaag 120
              |||
Sbjct: 2175   agcaggatatttctgccaggatagtgaagaattacaaaaaactatccaaatattggaag 2234

Query: 121     aaaaccagccgcaggaaaatgtccattataatttac-cgaatgaattggtaaaccgcgcc 179
              |||
Sbjct: 2235   aaaaccagccgcaggaaaatgtccattataatttacacgaatgaattggtaaaccgcgcc 2294

Query: 180     agcttggtgatcgatgccaatcgtgcagccggtcagcgtattgccgttgagaaagctgc 239
              |||
Sbjct: 2295   agcttggtgatcgatgccaatcgtgcagccggtcagcgtattgccgttgagaaagctgc 2354

Query: 240     accggtggtttggtaatggcggccttgaccgaggttcgggggcttctgatgtctttgat 299
              |||
Sbjct: 2355   accggtggtttggtaatggcggccttgaccgaggttcgggggcttctgatgtctttgat 2414

Query: 300     gccggatttgtgacctatgccaatcaggcaaaaatagaccttctgaatattagtcaggac 359
              |||
Sbjct: 2415   gccggatttgtgacctatgccaatcaggcaaaaatagaccttctgaatattagtcaggac 2474

Query: 360     gtcacgaaacctttggctctgtttctttggcggttgcttgggcaatggcacggaatgcc 419
              |||
Sbjct: 2475   gtcacgaaacctttggctctgtttctttggcggttgcttgggcaatggcacggaatgcc 2534

Query: 420     gttgaaaaaagcgatgctgatattgcggttgcgattacaggtattgcggggcccgaccggc 479
              |||
Sbjct: 2535   gttgaaaaaagcgatgctgatattgcggttgcgattacaggtattgcggggcccgaccggc 2594

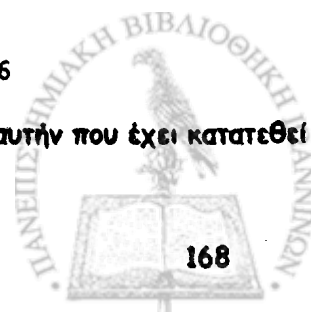
Query: 480     ggcgatgaaagaaaaccggttgccaccgttggttttgcacgggcaagacgggatgctgat 539
              |||
Sbjct: 2595   ggcgatgaaagaaaaccggttgccaccgttggttttgcacgggcaagacgggatgctgat 2654

Query: 540     ccgaatgaagtcggttgcggaacagaaatctttcggagatttagggcggttcgggtatccgt 599
              |||
Sbjct: 2655   ccgaatgaagtcggttgcggaacagaaatctttcggagatttagggcggttcgggtatccgt 2714

Query: 600     ttacaggcagctttatgcgccctcagcctgttaatgccggat 641
              |||
Sbjct: 2715   ttacaggcagctttatgcgccctcagcctgttaatgccggat 2756

```

Σχήμα 5.17. Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ORF4 (Query) με αυτήν που έχει κατατεθεί στην τράπεζα της EMBL (Sbjct).



catgtcgatttttgaacgattggcgcggtttcccgaaatcatcgctgactggcaatcatt-60

tccgtcacattcaatcccgaaccataacggcggaacaatccgacgaaaaggcaaatccgta-120

acgcctgtcatcggagctagaataaccggattatcaattcggacagagcctatctgaata-180

ggcgaaatcagattatgggtaggattatgttcagggctgttcattgcggttatggtagct-240

-35

tgctttcaaaaatcagacaaGCTTTCCTTGGCTgaaaaggctttataaaaggccaacTAT-300

-10

TGCATAaaagacggcaattcaaggaagcgataactctattgcaagcattcacaaaaggctt-360

SD

AAGGctcggcgg 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 cgctgcacatcaggcatgga-900
Ala Phe Lys Pro Arg Lys Pro Leu Ile Leu Arg Pro ---

caggcagcgatgaaccaacagatgatgcgcagggtgtccgcgcttttggtaaaaaaattg-960

ccttggttaacaggcgatagactactcgagaaactgacctatcctgctgatttttctgtag-1020

SD

ccGAGGctcaa ATG ACT GAA AAA ATG ATT TCT GTT TGC GGT TCA GGT TTC GAT GTT CAT-1079
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-1139
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-1199
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-1259
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-1319
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-143
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-149
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 **ttagttattccatgaatccggttat-1560**
Val Thr Ser Ile Arg Leu Pro Asp Ile Leu Cys ---

tcgtcactcgatagcgcttgttgccctgcatgtttgggacgggcgctatggctgctgccac-1620

SD

cgaggccgcagGAGccagatcaatgt 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-173
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 AAG CGC TTT CGT CAG GAA AGT-179
Ser Asp Ser Tyr Leu Leu Lys Gln Glu Ala Thr Leu Ser Lys 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-185
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-191
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-197
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-203
Gln Pro Ala Asn Lys Ile Gly Asp Val Ser Val Ser Thr Phe Ala Leu Ile Lys Lys Ile

SD

GGC AAG GTT GGA CGT ATT TTG CCT TTT GAT ATT TGT TCG **GGA GAT TAA accg** ATG ACT -2095
Gly Lys Val Gly Arg Ile Leu Pro Phe Asp Ile Cys Ser Gly Asp --- **ORF4a**Met Thr

ATG GAC AAT AAC CAG ACG GAT GGC CTG TCC TCG CAG CCT TCT GAT ACC GAG AAA GAA GCG -2
Met Asp Asn Asn Gln Thr Asp Gly Leu Ser Ser Gln Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Ala

ORF4b

CTT CAG CAA AAG GCA GAA CAG CAG GAT ATT TCT GCC CAG GAT AGT GAA GAA TTA CAA AAA -2
Leu Gln Gln Lys Ala Glu Gln Gln Asp Ile Ser Ala Gln Asp Ser Glu Glu Leu Gln Lys

ACT ATC CAA AAT ATG GAA GAA AAC CAG CCG CAG GAA AAT GTC CAT TAT AAT TTA CCG AAT-22
Thr Ile Gln Asn Met Glu Glu Asn Gln Pro Gln Glu Asn Val His Tyr Asn Leu Pro Asn

ORF4c

GAA TTG GTA ACC CGC GCC AGC TTG GTG ATC GAT GCC AAT CGT GCA GCC GGT CAG CGT ATT-23
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 GCG-23
Ala Val Ala Glu Ser Cys Thr Gly Gly Leu Val Met Ala Ala Leu Thr Glu Val Pro Gly

ORF4d

GCT TCT GAT GTC TTT GAT GCC GGA TTT GTG ACC **TAT** GCC AAT CAG GCA AAA ATA GAC CTT-24
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-25
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-25
Ala Met Ala Arg Asn Ala Val Glu Lys Ser Asp Ala Asp Ile Ala Val Ala Ile Thr Gly

ORF4e

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 aaactgacggccatttggctggcgaataattggaaagta-2816
Ala Ser Ile Ser Gln Gly ---

aggttg TCT TTC TTC GTT TTT AGA AGC GAA GAA AGA ccagacctaggctcaggactcattcttt-2879
gagatagaagatgaaacttgctgcatatggattgctgacatgaatgtgtgagcgcaccg-2939
gtcgtatcgtgttgccgacacgcgcagctctttgagctttgcaacatatttctgatgag-3299
gtgacgctttttatcacagatgccagtcgtaaggcggctttgatttccgttcttcttaggc-3059
ggaatacaggcgggtgatattccgggtctgagagagactgtctgattttattactgtcgtat-3119
ccccgggtccccgagaatttctgtgtttcttccggcagatttgcagcagaacatccgcg-3179
cctttgaagtcactgacctgacctgaggctcagatgcagccggacagggcgccctgacta-3239
tcgcatacagcgtgaagctttgagttcagtcgcctttctgtgctccgatatggcgggga-3299
aaagcccccttttgagcagggaggccgctgtccgggtgtgctttcagatgtgttgcatcga-3359
tcatcagacgcttcgaacggcctgacctgctccgtcagggcgacgaagatccgggtcaadaga-3419
caccagggcggtccaccggataaaccgggtgtataaagctttgtgcgggccatacgttt-3479
tcggggcgctcttccactgaaggccgttgcggtcacgtaaacgatcccgctcaggacac-3539
gacggtcacgcagacacgcggcacaccatgcgccagtggaacaaacggcttaatccgttcca-3599
tctggtgctcagacagcaaaaaacagctcactcacagcttcacctccatcggtaaacctgt-3659
gaatcacaaacagcccgtcaactcaagaaattaacagggtcctgagcctaaaaagataac-3719
cttcttatcaaggacagaatagattttccctatttttataggatgtaattctgccttttt-3779
ctaaaggcgccatttatctaaaaaacggctaggcatcggtataaaccgtaaagattattcg-3839
ccctttcttcaaaggcttgagtcattttttgcacggctcgatcaaagaattgtccggcaa-3899
gtgcctcgaataattctcgaccggaaagaaaaatcgaccataaaatctaatacggtttttc-3959
cctcttcttcttctgtgaaatgccattcattatgaagatgggataatggcccgctcgatat-4019
attcaaccgataccgaatgggggtgaatccaagttacttttgacgtaaagctttcccgaaa-4079
agccttgaagcccacaatcaaatcagccgtcatcctgttttcttcacgagaccgaatccg-4139
aacggcgattaccatggcaaaaaattcaggataacggctgatatccgcgaccagatcaaa-4199
aagttgctgtggcgtatagggaatatttttgattctgtataatgcggcattaggcacc-4259
ttcccgtatattttggcggctatttttccaacttcttttggcgggcttcttttaaacgc-4319
gcaaaatcagcaccggcataatagctggaacgcgttaaaggagaggatgccaccattgaa-4379
aaacccttggctctagctgtcgccgcataggccttgaagctgtcaggtgtaacaaactct-4439
tctaccggaacatggcgcggttaggttgcaaatattgccctaagggttaagaaa -4493

Σχήμα 5.18: Νέα αλληλουχία νουκλεοτιδίων του οπερονίου *g/c* (4.493 bp) και η προβλεπόμενη αλληλουχία των αμινοξέων.

-10 και -35: στοιχεία θεωρητικού προαγωγού

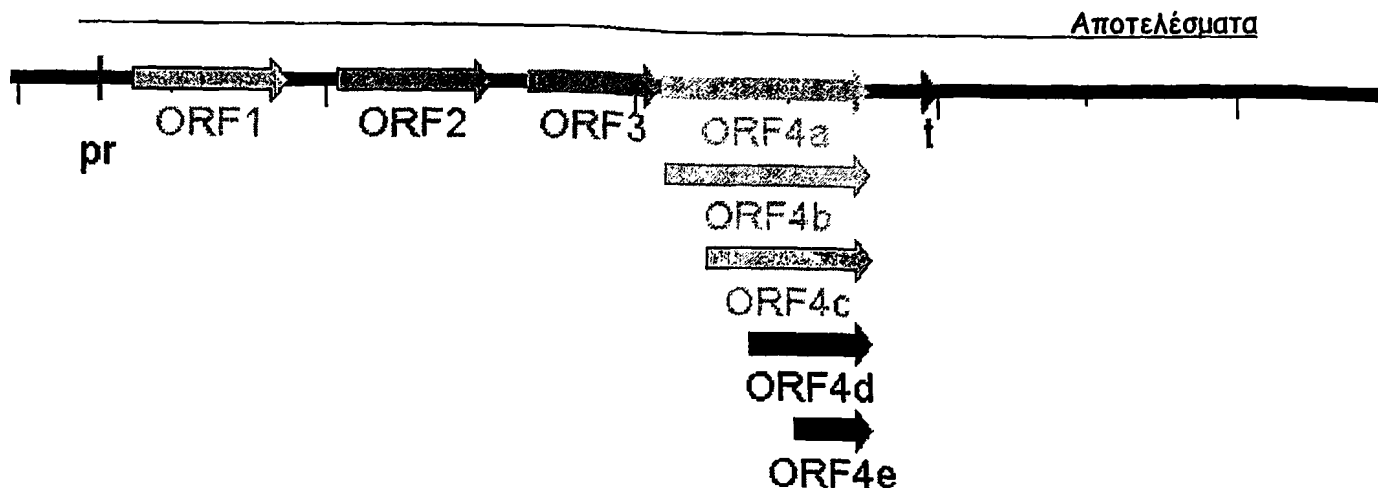
SD: αλληλουχίες Shine-Dalgarno

ORF1-4: κωδικόνια έναρξης

- - - -: κωδικόνια τερματισμού

αντίθετα βέλη: σήμα τερματισμού μεταγραφής.





Σχήμα 5.19. Η οργάνωση του οπερονίου *g/lc* (4.493 bp) υπεύθυνου για την ανάπτυξη κυττάρων *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

5.5 Υποκλωνοποίηση των 5 πιθανών ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του προαγωγού p_{pdc} .

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η εκ νέου ανάλυση με το πρόγραμμα PC/GENE® (Release 6.6, IntelliGenetics, Inc.) της αλληλουχίας του οπερονίου *g/lc* των 4.493 bp επιβεβαίωσε την ύπαρξη των τριών πιθανών κωδικευουσών περιοχών ORF1, ORF2 και ORF3, ενώ για την τέταρτη κωδικεύουσα περιοχή, ORF4, προτείνονται από το πρόγραμμα 5 πιθανές περιοχές έναρξης και μία τερματισμού (Σχήμα 5.19). Τα προϊόντα και των πέντε πιθανών κωδικευουσών περιοχών βρίσκονται όλα στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5.20 της συγκριτικής αντιστοίχησης τους. Με άλλα λόγια κωδικεύουν όλα την ίδια πρωτεΐνη με το ίδιο καρβόξυ-τελικό άκρο αλλά διαφορετικό κάθε φορά άμινο-τελικό άκρο.

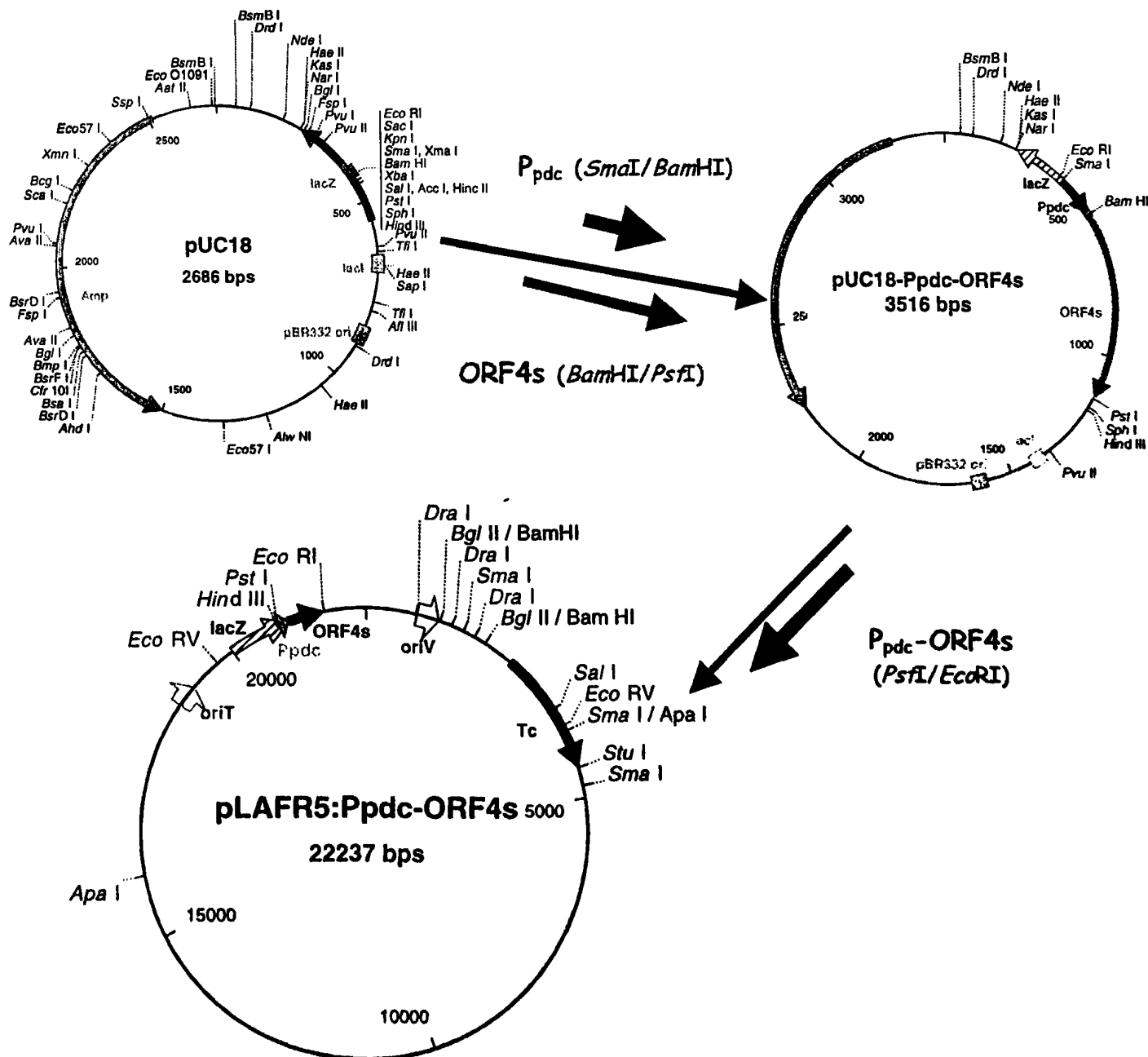
	(1)	1	10	20	30	40	50	60	78
ORF4a	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ORF4b	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ORF4c	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ORF4d	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ORF4e	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Zyomonas mobilis</i> (OnA)	(1)	MFLFFHSFCLRLKLARLIVFCLLIFVREIKEMT	MINNCTIGLSSQFSC	IEKEALQCKAEQCCISACISEN	IKTIQNM				
Consensus	(1)		MINNCTIGLSSQFSC	EKEALQCKAEQCCISACISE	LQTIQNM				

	(79)	79	90	100	110	120	130	140	156
ORF4a	(49)	ENCFQENVHYNLFNELVTRASLVILANRAAGCRIAVAESCIGGLVMAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
ORF4b	(47)	ENCFQENVHYNLFNELVTRASLVILANRAAGCRIAVAESCIGGLVMAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
ORF4c	(3)	ENCFQENVHYNLFNELVTRASLVILANRAAGCRIAVAESCIGGLVMAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
ORF4d	(1)	-----MAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
ORF4e	(1)	-----							
<i>Zymomonas mobilis</i> (ClnA)	(79)	ENCFQENVHYNLFNELVTRASLVILANRAAGCRIAVAESCIGGLVMAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
Consensus	(79)	ENCFQENVHYNLFNELVTRASLVILANRAAGCRIAVAESCIGGLVMAALTEVFGASLVFLAGFVTYANÇAKICLLNIS							
	(157)	157	170	180	190	200	210	220	234
ORF4a	(127)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
ORF4b	(125)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
ORF4c	(81)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
ORF4d	(34)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
ORF4e	(1)	-----MARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
<i>Zymomonas mobilis</i> (ClnA)	(157)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
Consensus	(157)	QLVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSLALIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGR							
	(181)	181	190	200	210	220	230	240	258
ORF4a	(151)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
ORF4b	(149)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
ORF4c	(105)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
ORF4d	(58)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
ORF4e	(8)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
<i>Zymomonas mobilis</i> (ClnA)	(181)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							
Consensus	(181)	KSLADIAVAITGIAAGFTGGDERKFVGTVVVFARARRLALFNEVVAEQKSFGLLGRSGIRLQAALCALSLIMFLASISQG							

Σχήμα 5.20. Συγκριτική αντιστοίχιση των 5 πιθανών περιοχών που αντιστοιχούν στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 4 (ORF4).

Από τα 5 αυτά πιθανά ORF4 την μεγαλύτερη πιθανότητα έχουν τα α και β (100% πιθανότητα με βάση το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα). Προκειμένου να εξακριβωθεί το φυσιολογικό ORF4 και λαμβάνοντας υπ' όψη μας ότι, τμήμα του οπερονίου *glc* από το οποίο έλειπε το πλήρες ORF4 (τμήμα μεγέθους 3.1 kb) δεν έχει την ικανότητα να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CUIRif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Douka *et al.*, 1999), μας ώθησε στο να υποκλωνοποιήσουμε κάθε ένα από τα 5 πιθανά ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pdc} προκειμένου να ελέγξουμε ποια από αυτά έχουν την ικανότητα να αναπληρώνουν τον

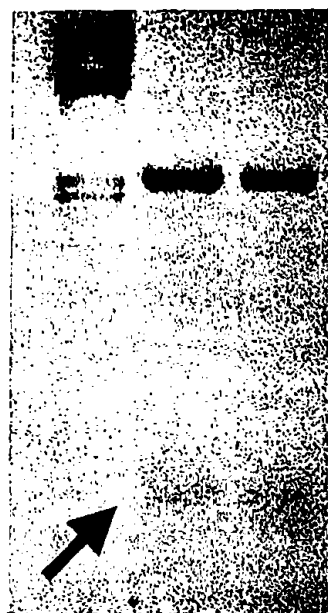
ελαττωματικό φαινότυπο του στελέχους CU1Rif2. Στο Σχήμα 5.21 που ακολουθεί φαίνεται η πορεία που ακολουθήθηκε για τις υποκλωνοποιήσεις.



Σχήμα 5.21. Υποκλωνοποίηση των πέντε πιθανών ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού p_{pdc}

Αρχικά έγινε υποκλωνοποίηση μόνο του μεγαλύτερου ORF4a. Έτσι λοιπόν, με περιοριστική πέψη *Sma*I-*Bam*HI του πλασμιδίου pAEG απομονώθηκε ο ισχυρός προαγωγός P_{pdc} ως ένα τμήμα 130 bp περίπου από πήγμα αγαρόζης και μετά τον καθαρισμό του υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pUC18 σε θέση *Sma*I-*Bam*HI (Εικόνα 5.8).

1 2 3



Εικόνα 5.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης περιοριστικών πέψεων:

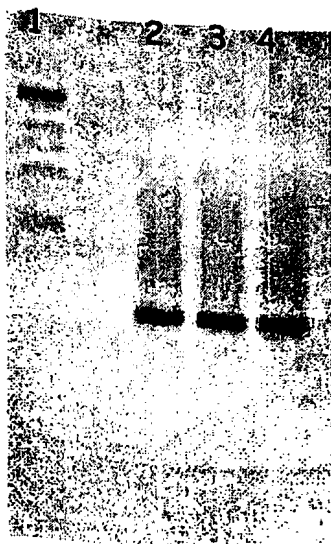
Διαδρομές:

1: λDNA/*Hind* III

2-3: ανασυνδυασμένα πλασμίδια pUC18- P_{pdc} που έχουν υποστεί πέψη με *Sma*I-*Bam*HI

Ακολούθως, σχεδιάστηκαν κατάλληλα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια για τη δημιουργία των περιοριστικών θέσεων *Bam*HI και *Pst*I στα άκρα του ORF4a οι εξής:

ORF4aF: 5'-GCCTTTGGATCCTTGTTCG-3' και ORF4aR: 5'-CAAATGGCCTGCAGTTTTTAAC-3'. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUC1845 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η High Fidelity DNA Polymerase της Roche. Το προϊόν PCR υπέστη ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης (Εικόνα 5.9) και μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του από το πήγμα υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI-*Pst*I. Τέλος, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης στον ανασυνδυασμένο φορέα pUC18- P_{pdc} σε θέση *Bam*HI-*Pst*I (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.9. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) του προϊόντος PCR.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

2,3,4: ORF4a (590 bp)



Εικόνα 5.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης (1,2%).

Διαδρομές:

1: λDNA/*Hind* III

2: pUC18/*Bam*HI-*Pst*I

3,4: ανασυνδυασμένο pUC18-P_{pd}c-ORF4a που έχει υποστεί πέψη με *Bam*HI-*Pst*I

Τέλος, η ζώνη που αντιστοιχεί στο P_{pd}c-ORF4a απομονώθηκε από το πήγμα, καθαρίστηκε, υπέστη πέψη με *Eco*RI-*Pst*I και υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 σε θέση *Eco*RI-*Pst*I (Εικόνα 5.11).



Εικόνα 5.11. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης (1,2%) του ανασυνδυασμένου pLAFR5-P_{pd}c-ORF4a.

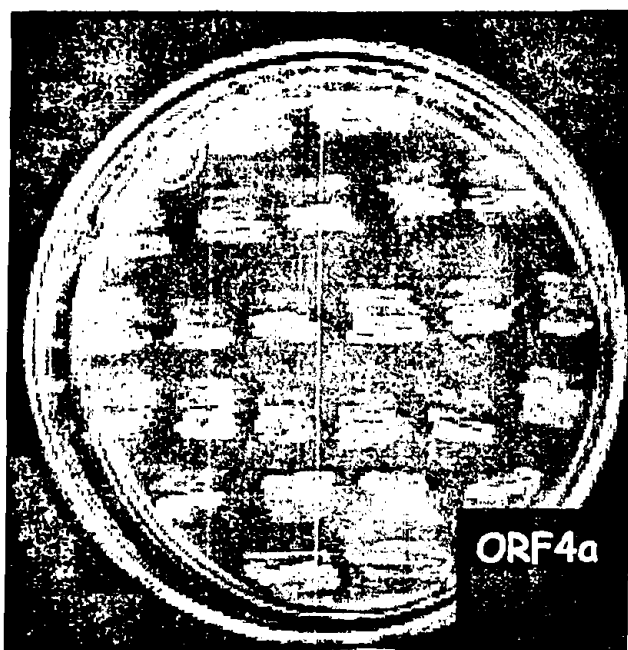
Διαδρομές:

1: λDNA/*Hind* III

2: προϊόν PCR ORF4a

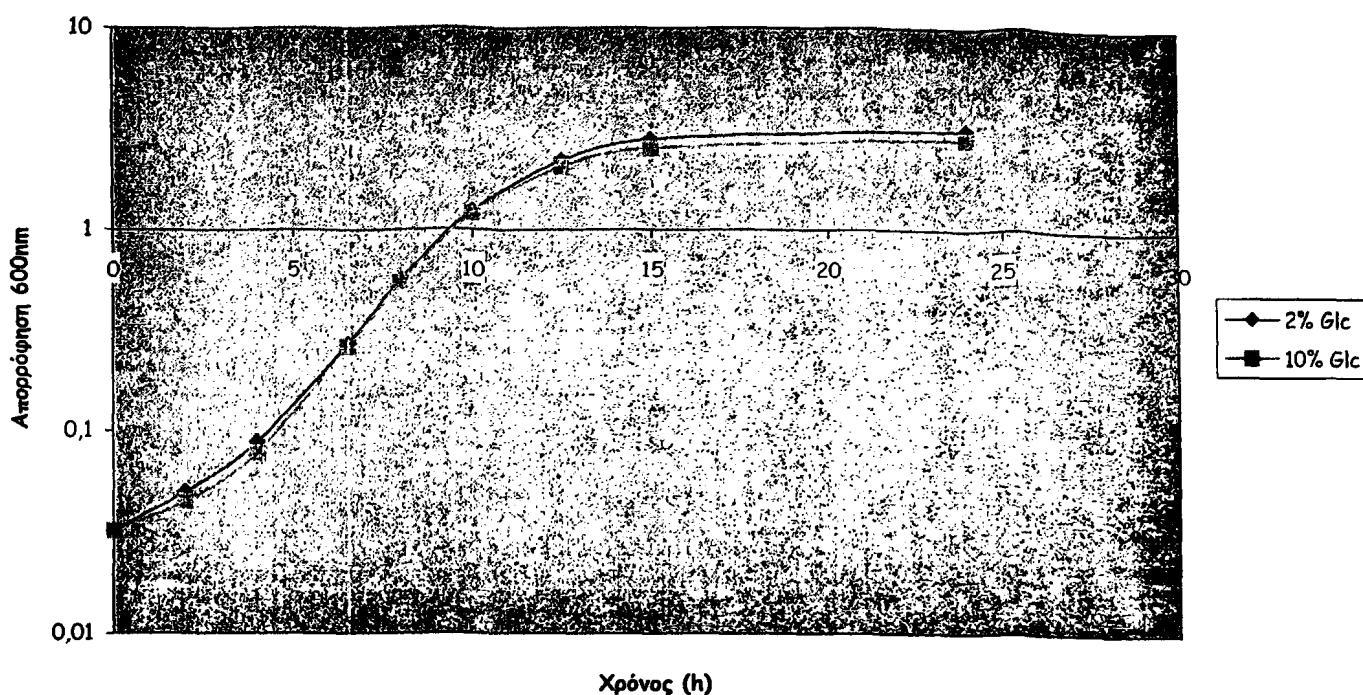
3: ανασυνδυασμένο pLAFR5-P_{pd}c-ORF4a που έχει υποστεί πέψη με *Eco*RI-*Pst*I

Ακολούθως, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR5-P_{pdC}-ORF4a μεταφέρθηκε σε κύτταρα CU1Rif2 μέσω επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλογής που περιείχαν 2% γλυκόζη, 25 μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο που περιείχε 10% γλυκόζη. Όλες οι αποικίες είχαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό 10% σε γλυκόζη όπως φαίνεται και από την Εικόνα 5.12.



Εικόνα 5.12. Ανάπτυξη μετασυσζευγμένων αποικιών CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4a σε στερεό πλήρες θρεπτικό μέσο (Zymo Agar) που περιέχει 10% γλυκόζη.

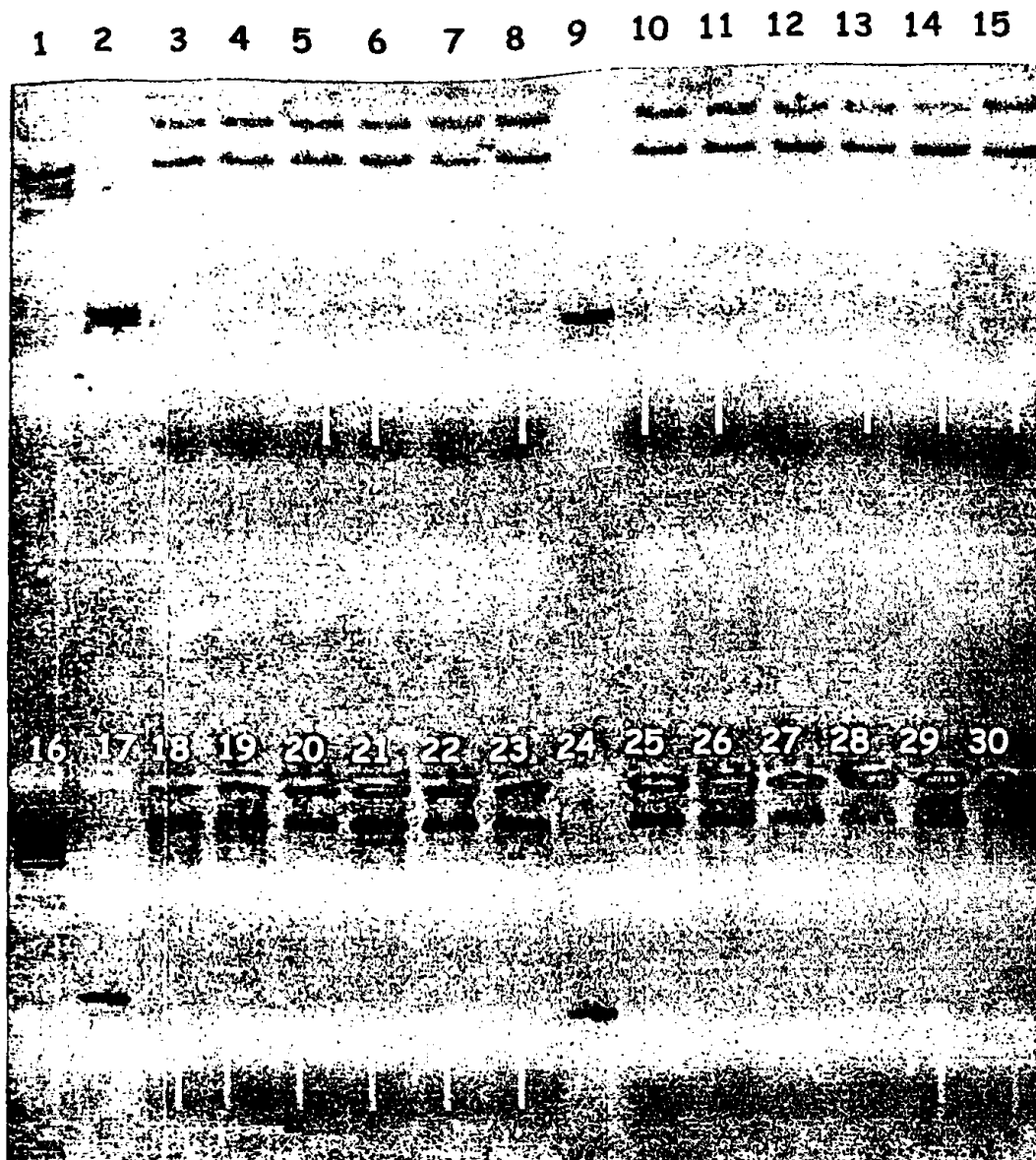
Ακολούθησε καμπύλη ανάπτυξης σε υγρό χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) το οποίο περιείχε 2% ή 10% γλυκόζη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.22.

CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4a

Σχήμα 5.22. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CU1Rif2/pLAFR5-p_{pd}c-ORF4a σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) που περιέχει 2% ή 10% γλυκόζη.

Φαίνεται λοιπόν ότι το ORF4a έχει την ικανότητα να αναπληρώνει από μόνο του την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 τόσο σε υγρό όσο και σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Με την ίδια μεθοδολογία υποκλωνοποιήθηκαν και τα υπόλοιπα ORF4 στον πλασμιδιακό φορέα pLAFR5 υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pd}c (Εικόνα 5.13). Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 5.8.



Εικόνα 5.13. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των πιθανών ανασυνδυασμένων $pLAFR5-P_{pdc}$ -ORF4s που έχουν υποστεί πέψη με *EcoRI-PstI*.

Διαδρομές:

1, 16: λ DNA/*Hind* III

2, 9, 17 και 24: προϊόντα PCR ORF4b, ORF4c, ORF4d και ORF4e αντίστοιχα.

3, 4, 5, 6, 7, 8: πιθανά ανασυνδυασμένα $pLAFR5-P_{pdc}$ -ORF4b

10, 11, 12, 13, 14, 15: πιθανά ανασυνδυασμένα $pLAFR5-P_{pdc}$ -ORF4c

18, 19, 20, 21, 22, 23: πιθανά ανασυνδυασμένα $pLAFR5-P_{pdc}$ -ORF4d

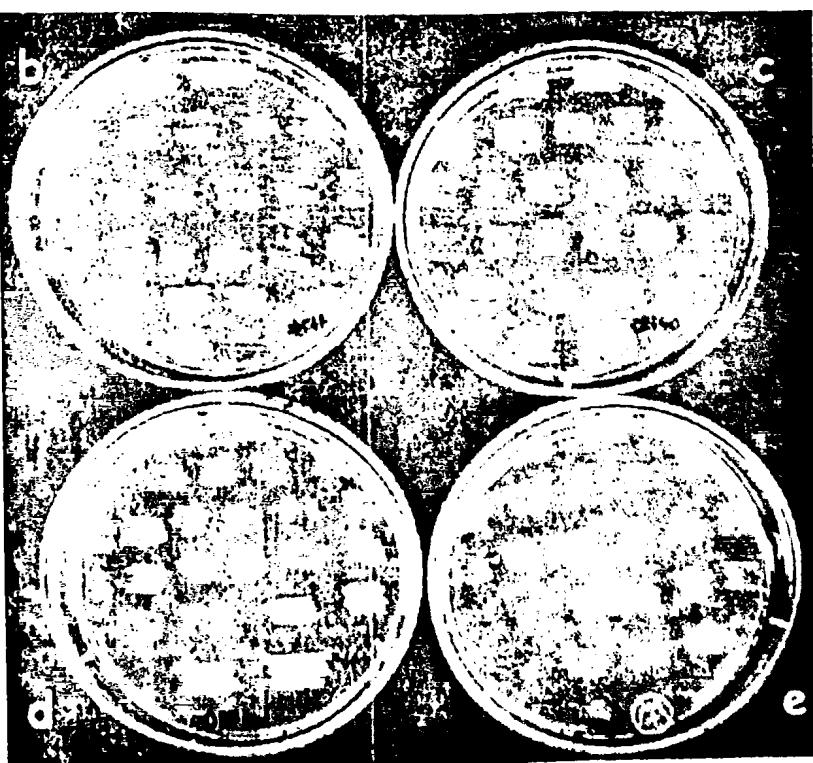
24, 26, 27, 28, 29, 30: πιθανά ανασυνδυασμένα $pLAFR5-P_{pdc}$ -ORF4e

Με βέλη σημειώνονται οι εκάστοτε ενθέσεις.

Πίνακας 5.8: Αλληλουχίες πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο (Θερμοκρασία αναδιάταξης)	Αλληλουχία
ORF4bF, 61° C	5'-TTG GAT CCT TGT TCG GGA GAT TAA ACC GG-3'
ORF4bR, 61° C	5'-CCA AAT GGC CTG CAG TTT TTA ACC-3'
ORF4cF, 56° C	5'-GCA GGA TCC TTC TGC CCA G-3'
ORF4cR, 56° C	5'-CAA ATG GCC TGC AGT TTT TAA C-3'
ORF4dF, 56° C	5'-GCG GAT CCC CGT TGC AG-3'
ORF4dR, 56° C	5'-CAA ATG GCC TGC AGT TTT TAA C-3'
ORF4eF, 56° C	5'-GCG GAT CCG GCA AAA ATA G-3'
ORF4eR, 56° C	5'-CAA ATG GCC TGC AGT TTT TAA C-3'

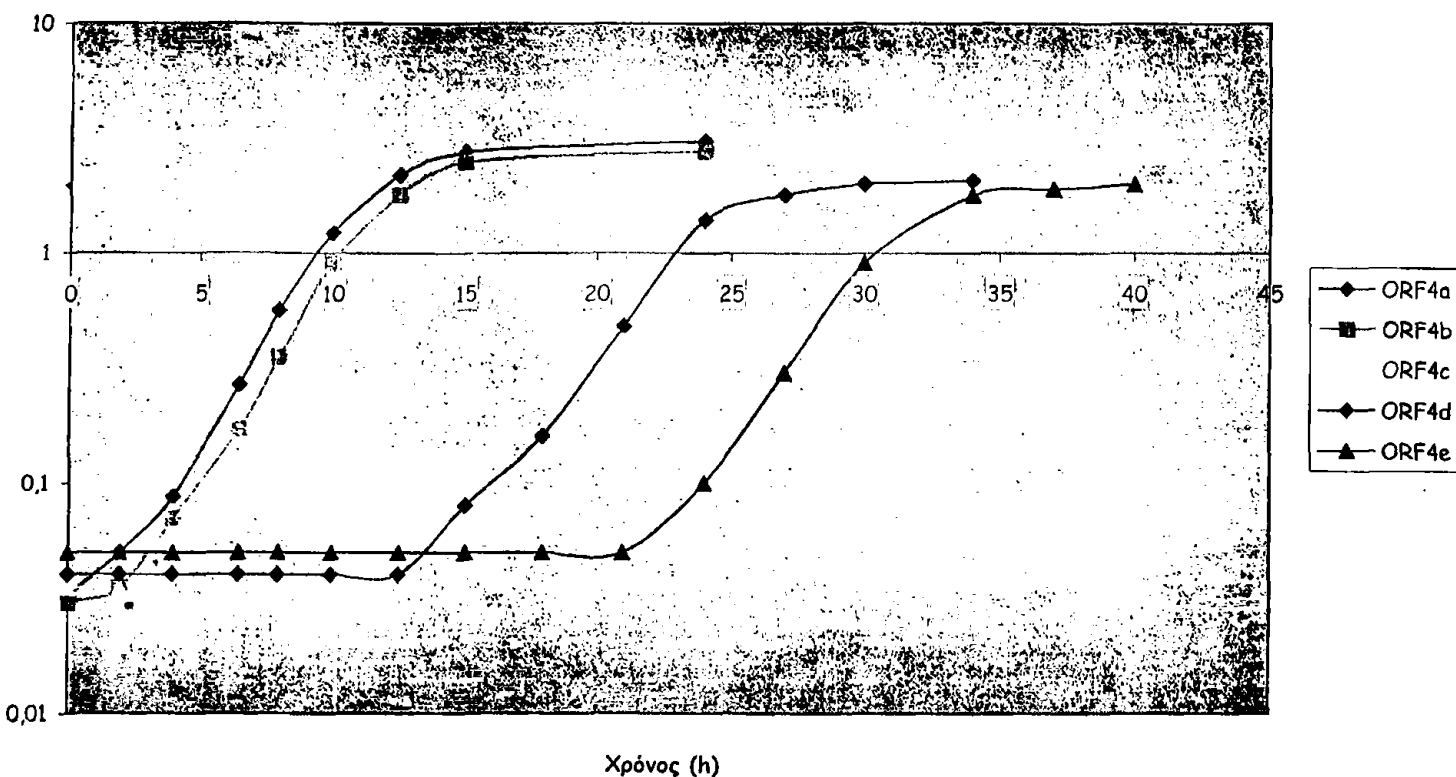
Τα ανασυνδυασμένα pLAFR5-P_{pd}c-ORF4b, pLAFR5-P_{pd}c-ORF4c, pLAFR5-P_{pd}c-ORF4d και pLAFR5-P_{pd}c-ORF4e μεταφέρθηκαν σε κύτταρα CU1Rif2 μέσω επιβοηθούμενης βακτηριακής σύζευξης. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλογής που περιείχαν 2% γλυκόζη, 25 μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 10% γλυκόζης. Παρατηρήθηκε ότι, όλες οι ανασυνδυασμένες αποικίες του στελέχους CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4b είχαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Με τη μείωση του μεγέθους του ORF4 η ικανότητα αυτή σταδιακά χάνεται, ενώ το ORF4e δεν αναπληρώνει καθόλου καθώς το στέλεχος CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4e δεν αναπτύσσεται σε 10% γλυκόζη (Εικόνα 5.14).



Εικόνα 5.14. Ανάπτυξη μετασυσζευγμένων αποικιών CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4b, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4c, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4d και CU1Rif2/pLAFR5-P_{pd}c-ORF4e σε στερεό πλήρες θρεπτικό μέσο (Zymo Agar) που περιέχει 10% γλυκόζη.

Ακολούθησε καμπύλη ανάπτυξης σε υγρό χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) το οποίο περιείχε 10% γλυκόζη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.23.

CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4s



Σχήμα 5.23. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4b, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4c, CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4d και CU1Rif2/pLAFR5-P_{pdC}-ORF4e σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο (Minimal Medium) 10% γλυκόζης.

Φαίνεται επομένως, ότι το ORF4 έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης και μάλιστα όσο το μέγεθός του μικραίνει τόσο χάνει την ικανότητα αυτή, με το μικρότερο από τα ORF4 να την έχει χάσει εντελώς. Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4 βρίσκεται πλησίον του αμινοτελικού της άκρου.

5.6 Μέτρηση της δραστικότητας της γλυκοκινάσης στα στελέχη CU1Rif2/pLAFR5:p_{pd}c-ORF4s

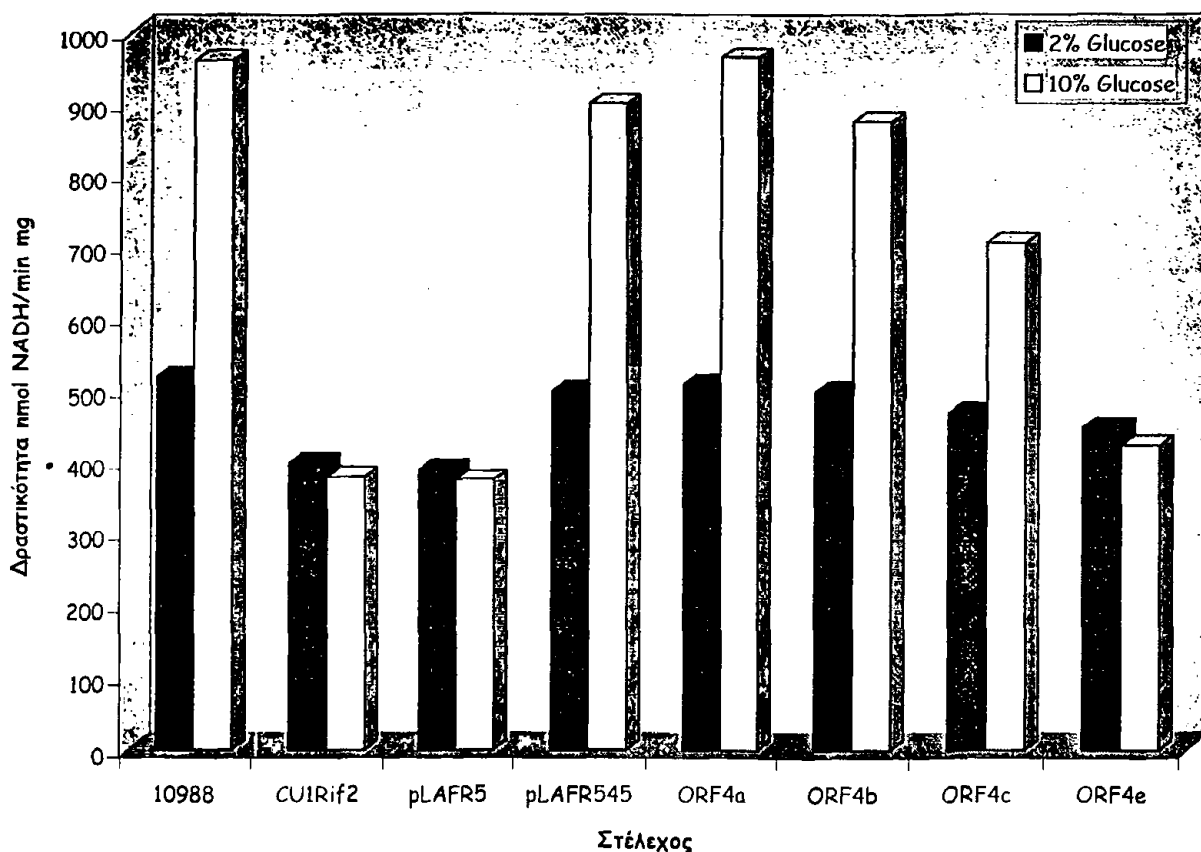
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (παρ. 3.5, σελ. 52) η δραστικότητα της γλυκοκινάσης στο στέλεχος ATCC 10988 αυξάνεται, όταν αυξηθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος όμως έχει χάσει αυτή την ιδιότητα. Το λειτουργικό οπερόνιο *glc* εκτός του ότι αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, έχει την ικανότητα να αποκαθιστά επιπλέον και τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης (Douka *et al.*, 1999).

Δεδομένου ότι το ORF4 από μόνο του είχε την ικανότητα να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2, μετρήθηκε η δραστικότητα της γλυκοκινάσης των στελεχών CU1Rif2/pLAFR5:P_{pd}c-ORF4a, ORF4b, ORF4c και ORF4e, σε κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο 2% ή 10% γλυκόζης αντίστοιχα. Ακόμα μετρήθηκε η δραστικότητα της γλυκοκινάσης σε κύτταρα των στελεχών ATCC 10988, CU1Rif2, CU1Rif2/pLAFR5 και CU1Rif2/pLAFR545, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% ή 10% γλυκόζης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.9.

Πίνακας 5.9: Δραστικότητα γλυκοκινάσης σε διάφορα στελέχη *Z. mobilis*

Στέλεχος συγκέντρωση γλυκόζης	Δραστικότητα (nmole NADH λ min mg πρωτεΐνης)
10988 2%	520
10988 10%	962
CU1Rif2 2%	400
CU1Rif2 10%	380
CU1Rif2/pLAFR5 2%	390
CU1Rif2/pLAFR5 10%	375
CU1Rif2/pLAFR545 2%	500
CU1Rif2/pLAFR545 10%	900
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4a 2%	510
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4a 10%	965
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4b 2%	500
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4b 10%	875
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4c 2%	470
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4c 10%	705
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4e 2%	450
CU1Rif2/pLAFR5:P _{pd} c-ORF4e 10%	425

Από τον Πίνακα 5.9, φαίνεται ότι η δραστικότητα της γλυκοκινάσης των στελεχών CU1Rif2/pLAFR5:P_{pd}c-ORF4a και CU1Rif2/pLAFR5:P_{pd}c-ORF4b αυξάνεται όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί σε 10% (στο δεύτερο η αύξηση είναι μικρότερη). Το στέλεχος CU1Rif2/pLAFR5:P_{pd}c-ORF4a, δηλαδή συμπεριφέρεται όπως ο φυσικός τύπος ATCC 10988. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται πιο παραστατικά στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 5.24 που ακολουθεί.



Σχήμα 5.24. Δραστικότητα γλυκοκινάσης (nmol NADH/min mg) διαφόρων στελεχών του *Z. mobilis*.

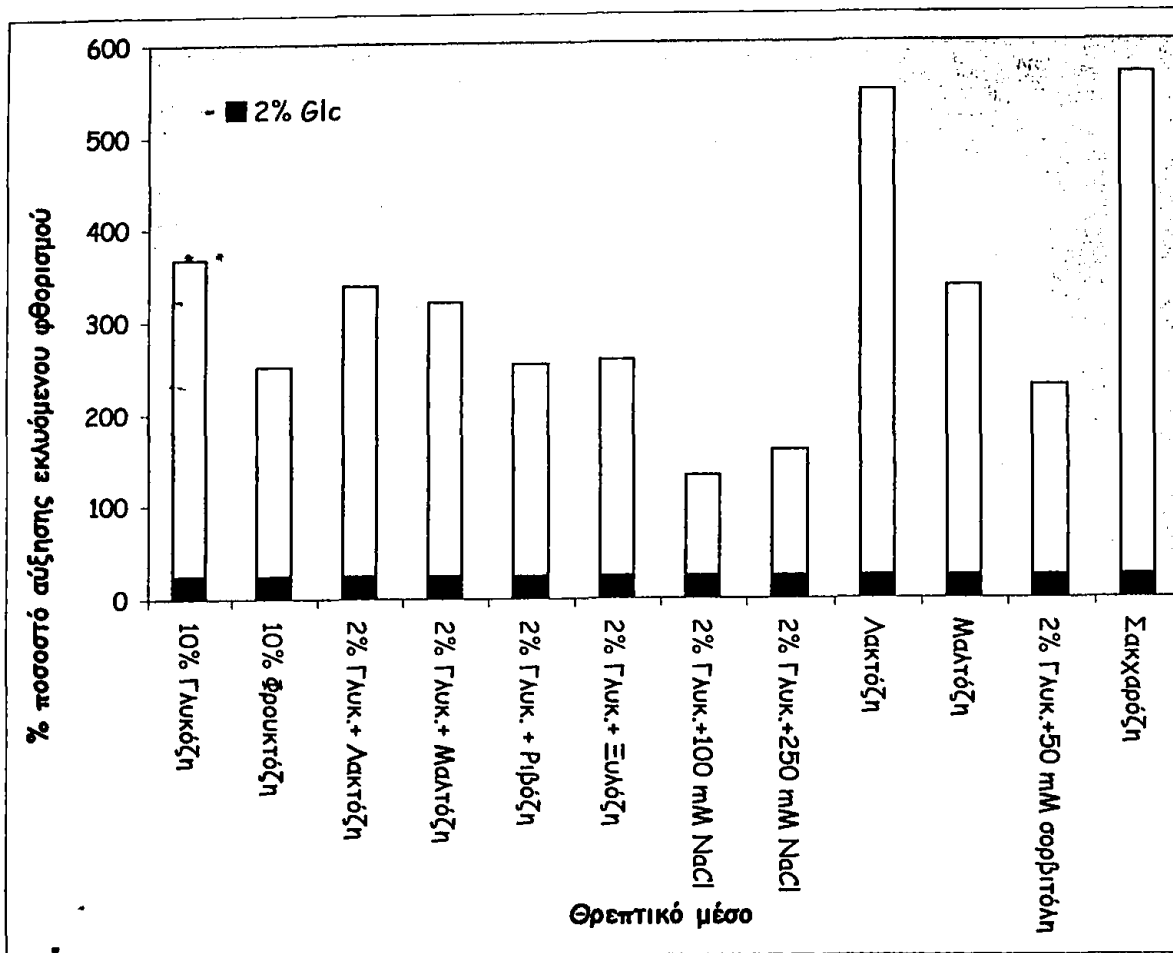
Το ORF4 που αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του στελέχους CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, αποκαθιστά επίσης και τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης. Η αποκατάσταση της δραστικότητας μειώνεται ανάλογα με τη μείωση του μεγέθους του ORF4.

5.7 Μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού P_{glc} στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παρουσία του ORF4

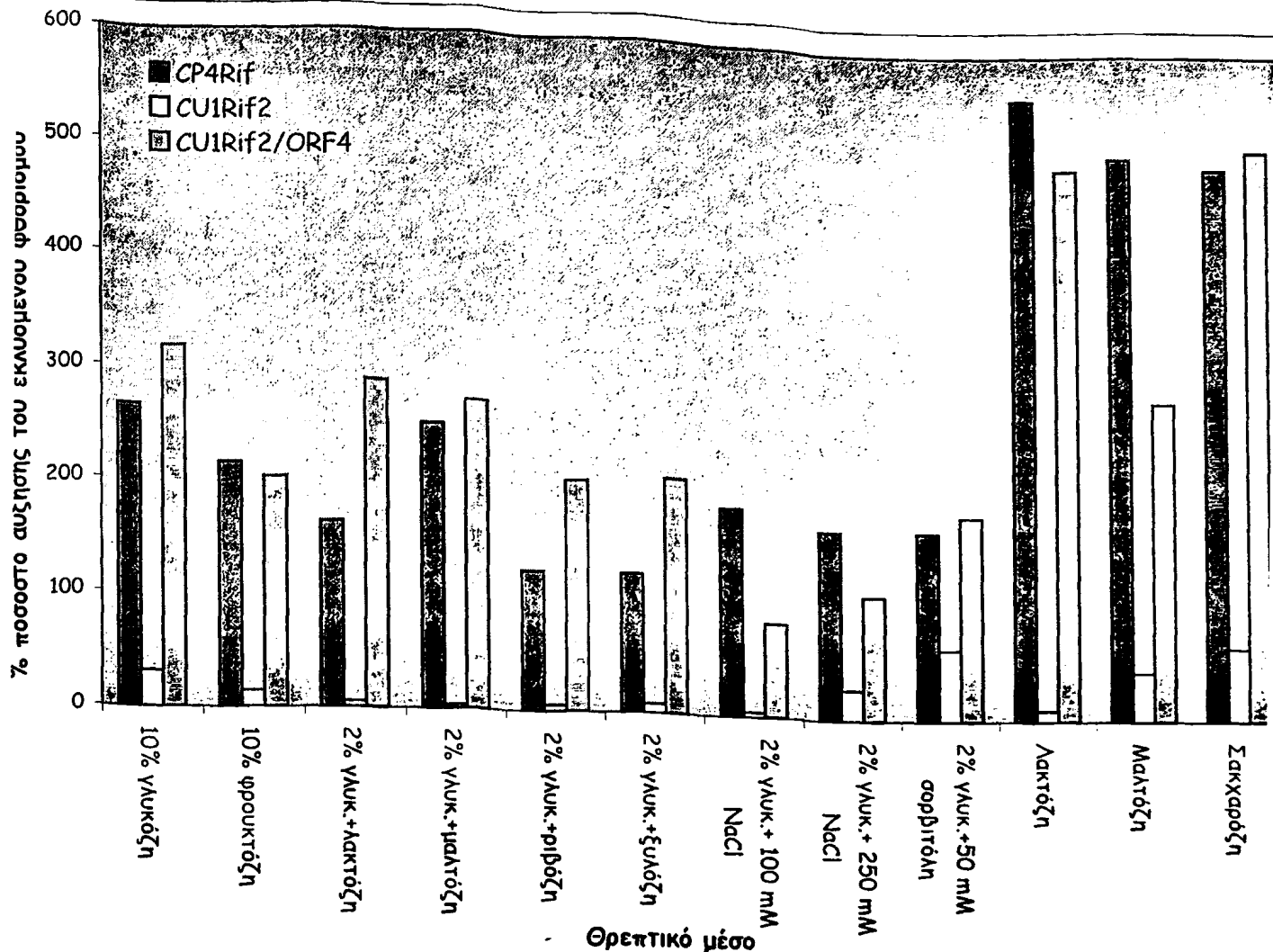
Όπως περιγράφηκε και νωρίτερα (παρ. 5.5 και 5.6), βρέθηκε ότι το ORF4 έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει τόσο τον ελαττωματικό φαινότυπο του μεταλλαγμένου στελέχους όσο και το σωστό τρόπο φωσφορυλίωσης της γλυκόζης. Επομένως, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παρουσία του ORF4a. Για το σκοπό αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLAFR5: P_{pdc} -ORF4a μεταφέρθηκε με επιβοηθούμενη βακτηριακή σύζευξη στο στέλεχος CU1Rif2/pAEPG και πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα φθορισμομετρίας όπως αυτά περιγράφονται στη παράγραφο 5.2, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης διαφόρων σακχάρων καθώς και NaCl. Στον Πίνακα 5.10 φαίνονται τα επί τοις εκατό ποσοστά αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού παρουσία των διαφόρων σακχάρων καθώς και του NaCl τα οποία και απεικονίζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 5.25. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι στο CU1Rif2 παρουσία του ORF4a ο προαγωγός P_{glc} επάγεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και NaCl όπως ακριβώς και στο φυσικό στέλεχος CP4. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται καλύτερα στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 5.26.

Πίνακας 5.10: % ποσοστό αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού από κύτταρα CU1Rif2 παρουσία του ORF4 σε θρεπτικά μέσα υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

Θρεπτικό μέσο	% ποσοστό αύξησης
2% γλυκόζη (0,11 M)	24
10% γλυκόζη (0,55 M)	342,5
10% φρουκτόζη (0,55 M)	202,9
2% γλυκόζη + λακτόζη (0,44 M)	289,5
2% γλυκόζη + μαλτόζη (0,44 M)	273
2% γλυκόζη + ριβόζη (0,44 M)	204,7
2% γλυκόζη + ξυλόζη (0,44 M)	209
2% γλυκόζη + 50 mM σορβιτόλη	183
Λακτόζη (0,55 M)	497,4
Μαλτόζη (0,55 M)	287
Σακχαρόζη (0,55 M)	515,5
2% γλυκόζη + 100 mM NaCl	83,52
2% γλυκόζη + 250 mM NaCl	110,83



Σχήμα 5.25. Απεικόνιση του ποσοστού αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CU1Rif2/pLAFR5:P_{pdc}-ORF4a παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.



Σχήμα 5.26. Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών αύξησης του εκλυόμενου φθορισμού σε κύτταρα CP4Rif^r, CU1Rif2 καθώς και CU1Rif2/pLAFR5:P_{glic}-ORF4a παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων και άλατος.

Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο προαγωγός του οπερονίου *glic*, P_{glic}, αλληλεπιδρά έμμεσα ή άμεσα με το προϊόν του ORF4. Επίσης θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι είναι πολύ πιθανό η μετάλλαξη στο CU1Rif2 να βρίσκεται στην ευρύτερη περιοχή του ORF4, προκαλώντας αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και ουσιαστικά απενεργοποιώντας το, δεδομένου ότι το ORF4 έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, να αποκαθιστά τη σωστή λειτουργία της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης καθώς και τη σωστή λειτουργία του προαγωγού P_{glic}. Η τελευταία αυτή υπόθεση θα διερευνηθεί διεξοδικά παρακάτω.

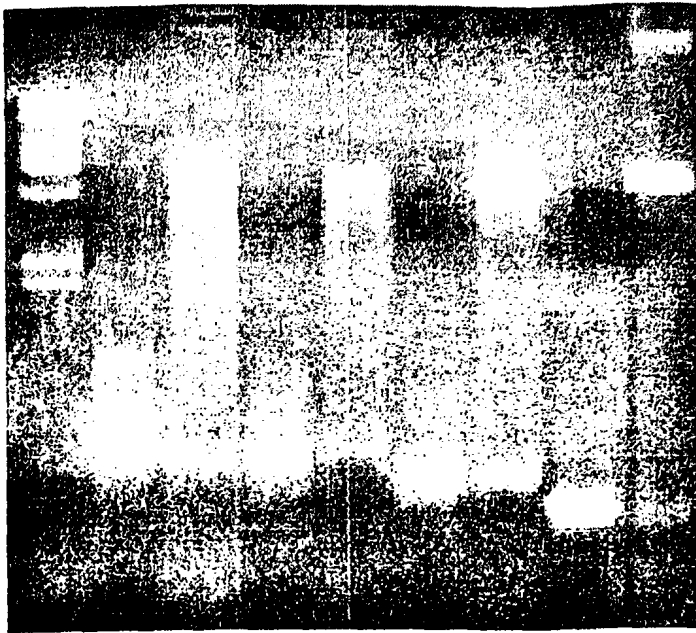
5.8 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τις τέσσερις θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές

Μετά την εύρεση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας των pET29c(+):ORF1, pET29c(+):ORF2, pET29c(+):ORF3 και pET29c(+):ORF4 και της νέας οργάνωσης του οπερονίου *glc* ακολούθησε κατ' αρχήν υποκλωνοποίηση των τεσσάρων πιθανών ORF4 (πλην του μικρότερου ORF4e, το οποίο βρέθηκε ότι δεν αναπληρώνει τον φαινότυπο του CU1Rif2) στον φορέα pET29c(+) και στη συνέχεια υπερέκφραση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από αυτά. Η υποκλωνοποίηση των ORF4s έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε νωρίτερα (παρ. 5.4) και τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτησή τους φαίνονται στον Πίνακα 5.11. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια φαίνονται στην Εικόνα 5.15.

Πίνακας 5.11: Αλληλουχία πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων

Πριμοδοτικό ολιγονουκλεοτίδιο Θερμοκρασία αναδιάταξης 55°C	Αλληλουχία
ORF4aFor	5'-CGG GAG ATT AAA CAT ATG ACT ATG G-3'
ORF4aRev	5'-TTC ATT CGG ATC CGC ATC-3'
ORF4bFor	5'-CCG ATG CAT ATG GAC AAT AAC CA-3'
ORF4bRev	5'-ATC GAC GGA TCC GGC ATT AAC-3'
ORF4cFor	5'-CTA TCC AAC ATA TGG AAG AAA ACC AG-3'
ORF4cRev	5'-ATC GAC GGA TCC GGC ATT AAC-3'
ORF4dFor	5'-GGT TTG CAT ATG GCG GCC T-3'
ORF4dRev	5'-ATC GAC GGA TCC GGC ATT AAC-3'

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Εικόνα 5.15. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης (1,2%) των ανασυνδυασμένων pET29c(+):ORF4s που έχουν υποστεί πέψη με *Bam*HI-*Nde*I.

Διαδρομές:

1: λDNA/*Hind* III

2, 4, 6, 8: Προϊόντα PCR των ORF4b (676 bp), ORF4a (587 bp), ORF4c (546 bp) και ORF4d (403 bp)

αντίστοιχα

3: pET29c(+):ORF4a

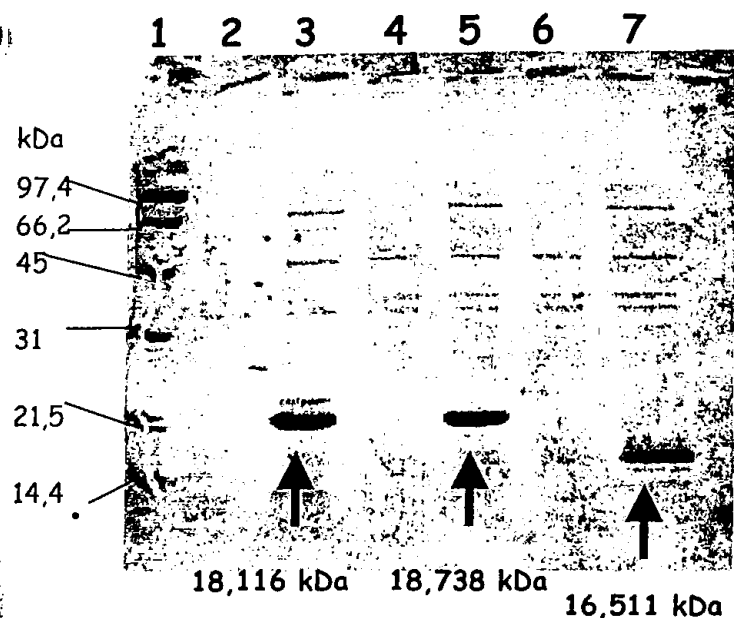
5: pET29c(+):ORF4b

7: pET29c(+):ORF4c

9: pET29c(+):ORF4d

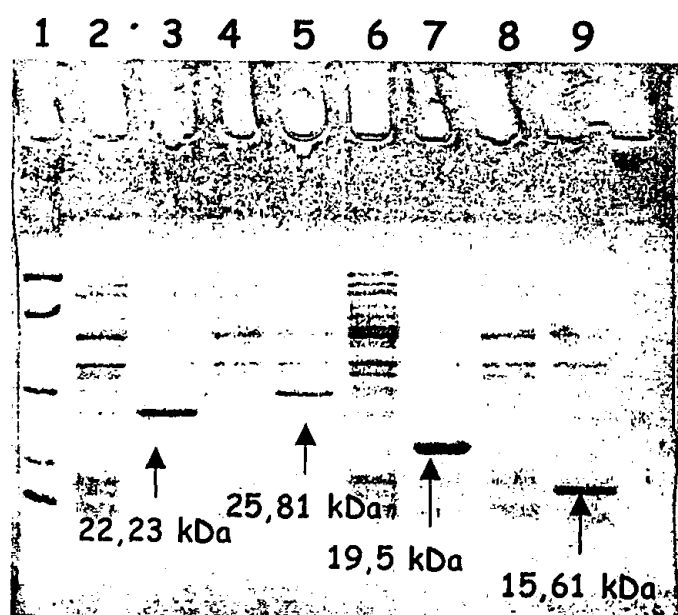
Η υποκλωνοποίηση των ORFs στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) έγινε κατά τέτοιο τρόπο ώστε στο C-τελικό άκρο να δημιουργηθεί μια ουρά αποτελούμενη από 6 ιστιδίνες προκειμένου να απομονωθούν στη συνέχεια οι παραγόμενες πρωτεΐνες μέσω στηλών κατακράτησης ιστιδίνης. Για την υπερέκφραση των προϊόντων των ORFs όλα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μεταφέρθηκαν στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3).

Όπως φαίνεται από τις Εικόνες 5.16 και 5.17, υπερέκφραση βλέπουμε για τις πρωτεΐνες που κωδικοούνται από όλες τις θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές



Εικόνα 5.16. Υπερέκφραση των pET29c(+):ORF1, pET29c(+):ORF2 και pET29c(+):ORF3.

- 1: Πρότυπο
- 2: pET29c(+):ORF1/0 h
- 3: pET29c(+):ORF1/4 h
- 4: pET29c(+):ORF2/0 h
- 5: pET29c(+):ORF2/4 h
- 6: pET29c(+):ORF3/0 h
- 7: pET29c(+):ORF3/4 h



Εικόνα 5.17. Υπερέκφραση των 4 πιθανών κωδικευουσών περιοχών που αντιστοιχούν στο ORF4.

- 1: Πρότυπο
- 2: pET29c(+):ORF4a/0 h
- 3: pET29c(+):ORF4a/4 h
- 4: pET29c(+):ORF4b/0 h
- 5: pET29c(+):ORF4b/4 h
- 6: pET29c(+):ORF4c/0 h
- 7: pET29c(+):ORF4c/4 h
- 8: pET29c(+):ORF4d/0 h
- 9: pET29c(+):ORF4d/4 h

5.9 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1.

Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1 παρατίθεται παρακάτω:

MMKRTDNIALIVAAGQGKRAGEGLPKQYRQIAGKAILAHA
IDNLLAHPEIDTVQVVIADGHQALYQEAVGDRDLPQPVIG
GVFRRDSVINGLKA AHDRGYKRVLIHDAARPFLPKTVIDRLL
DALKSSKAAIPVLPVVDTLVNQESKPLTAICSI AFKPRKPLI
LRP Stop

Με την χρήση του προγράμματος ProtParam που παρέχεται από τον διακομιστή Μοριακής Βιολογίας ExPASy (Expert Protein Analysis System) υπολογίστηκαν διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1 και οι οποίες παρατίθενται ακολούθως:

Αριθμός αμινοξέων: 167

Μοριακό Βάρος: 18140,2 Da

Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο, pI: 9.83

% Σύσταση αμινοξέων:	Ala (A) 21	12.6%
	Arg (R) 12	7.2%
	Asn (N) 4	2.4%
	Asp (D) 12	7.2%
	Cys (C) 1	0.6%
	Gln (Q) 8	4.8%
	Glu (E) 4	2.4%
	Gly (G) 11	6.6%
	His (H) 5	3.0%
	Ile (I) 15	9.0%
	Leu (L) 18	10.8%

Lys (K)	12	7.2%
Met (M)	2	1.2%
Phe (F)	3	1.8%
Pro (P)	12	7.2%
Ser (S)	5	3.0%
Thr (T)	5	3.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	3	1.8%
Val (V)	14	8.4%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Συνολικός αριθμός αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων (Asp + Glu): 16

Συνολικός αριθμός θετικά φορτισμένων αμινοξέων (Arg + Lys): 24

Ατομική σύσταση:	Άνθρακας	C	813
	Υδρογόνο	H	1349
	Άζωτο	N	237
	Οξυγόνο	O	225
	Θείο	S	3

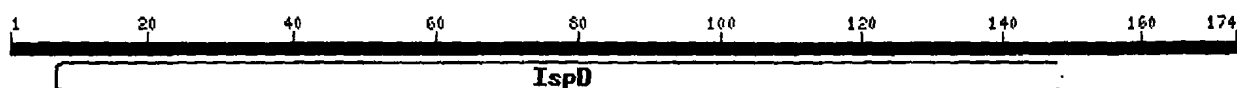
Μοριακός τύπος: $C_{813}H_{1349}N_{237}O_{225}S_3$

Συνολικός αριθμός ατόμων: 2627

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση, σε επίπεδο αμινοξέων, της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1 με άλλες πρωτεΐνες, οι αλληλουχίες των οποίων είναι κατατεθειμένες σε γνωστές τράπεζες δεδομένων (χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους BLASTP 2 και PSI-BLAST). Τα αποτελέσματα δείχνουν ισχυρή ομολογία της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1 με την πρωτεΐνη IsrD (συνθάση της 4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase) (Rohdich *et al.*, 2000, Rohdich *et al.*, 1999, Eisenreich *et al.*, 1998) από διάφορους

οργανισμούς σε ποσοστό που κυμαίνεται από 48% έως 62% (ενδεικτικά παρατίθενται μερικά από τα αποτελέσματα της εύρεσης ομολογιών). Η πρωτεΐνη IspD εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ισοπρενοειδών μέσω της εναλλακτικής οδού του μεβαλονικού οξέος (πορεία της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης) και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της 4-φωσφορικής 2C-μέθυλο-D-ερυθριτόλης (2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) σε 4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μέθυλο-D-ερυθριτόλη (4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol).

ORF1



IspD, συνθάση της 4-διφωσφοκυτιδύλο-2C-μέθυλο-D-ερυθριτόλης [μεταβολισμός λιπιδίων]

Query: 7 KRTDNIALIVAAGQGKRAGEGLPKQYRQIAGKAILAHAIIDNLLAHPEIDTVQVVIADGHQ 66
 Sbjct: 1 MRMMVSAVILAAGFGSRMGNPVPKQYLELGGRPLLEHTLEAFLESPAIDEIVVVSPEDD 60

Query: 67 ALYQEAVGDRDLP--QPVIGGVFRRDSVINGLKAHHRGYKRVLIHDAARFPLPKTVIDR 124
 Sbjct: 61 PYFEKLPKLSADKRVEVVKGGATRQESVYNGQLQALSKYDSDWVLVHDAARFPLTPKLIK 120

Query: 125 LLDALKSSKAAIPVLPVVDTLVNQE 149
 Sbjct: 121 LIELADKYGAAILALPVTDTLKRVD 145

IspD, μη χαρακτηρισμένη πρωτεϊνική οικογένεια UPF0007

Query: 12 IALIVAAGQGKRAGEGLPKQYRQIAGKAILAHAIIDNLLAHPEIDTVQVVIADGHQALYQE 71
 Sbjct: 2 VAVIPAAGSGKRMGAGVPKQFLQLLGQPLLEHTVDAFLASPVVDRIVVAVSPDDTPEFRQ 61

Query: 72 AVGDRDLPQPVIGGVFRRDSVINGLKAHHRGYKRVLIHDAARFPLPKTVIDRLLDALKS 131
 Sbjct: 62 LLGDPSI-QLVAGGDTRQDSVLNGLKALSG-TAKFVLVHDGARFCLPHADLARLLAALET 119

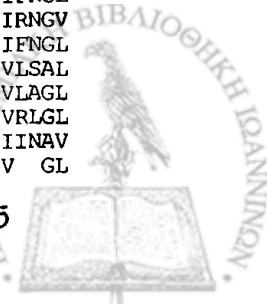
Query: 132 SK-AAIPVLPVVDTL 145
 Sbjct: 120 GTQGAILALPVTDTI 134



Από τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων αποκτήθηκαν οι αλληλουχίες όλων των γνωστών ή πιθανών πρωτεϊνών IspD και ακολούθησε συγκριτική αντιστοίχσή τους (alignment) με αυτή που κωδικοεύεται από το ORF1 χρησιμοποιώντας τα προγράμματα CLUSTALW και Vector NTI 6. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη ισχυρά συντηρημένων περιοχών στην αλληλουχία των πρωτεϊνών (Σχήμα 5.27). Η συντηρημένη αλληλουχία που αποκαλύφθηκε μεταξύ των πρωτεϊνών IspD παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 0,2% και παρόμοια σε ποσοστό 23%. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα κατασκευάστηκε το δένδρόγραμμα όλων των πρωτεϊνών IspD (Σχήμα 5.28).

	(59)	59	70	80	90	100	116
<i>Yersinia pestis</i>	(1)	-----	MSNFAVSLPEVIAVLPAAGIGSRMLVDC	-----	PKQYLTVGKKTIEHAIF		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	(1)	-----	MSVSSRPGRRRFALIPSACTGTRAGGDL	-----	PKQYQPLAGRPMWLHTVQ		
ORF1	(1)	-----	MMKRTDNIALIVAAGQKRAAGEGLP	-----	KQYRQIAGKAILAHAD		
<i>Mesorhizobium loti</i>	(1)	-----	MTEASENASATGGVAVVIVAAGRGRARAGQAN	-----	GPKQYQNIIGRAVIAHTLE		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	(1)	-----	MYSSNSEIKKKVTFILAAAGQKRMNLNS	-----	PKQFLDYRGEPLFYSSLK		
<i>Escherichia coli</i>	(1)	-----	MATTHLDVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNQITILEHSVH		
<i>E. coli</i> O157:H7	(1)	-----	MATTHLDVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNQITILEHSVY		
<i>Deinococcus radiodurans</i>	(1)	-----	MSAPHTSSPRTAALI PAAGSGTRIGLGP	-----	KAFVEVGRSVLLARSVA		
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	(1)	-----	MSSTRIPVIALLAAGRGTRLGPI	-----	PKAFVTLRERTLLERSLQ		
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	(1)	-----	MNCAIIMAAGRGSRMKVVK	-----	NKQFILIQKGPILAYTID		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	(1)	-----	MIKSSLILLSGGQGTFRGSKI	-----	PKQYLPNGTPLVLHSLK		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	(1)	-----	MNLSLSLVLLGGGGRGERFNSLQ	-----	PKQYTHLCGEPLILHALH		
<i>Caulobacter vibrioides</i>	(1)	-----	MTFSVVIVAAGSGTRAGPGQ	-----	AKQWRVLAGRVPVLRWSVE		
<i>Campylobacter jejuni</i>	(1)	-----	MSEMSLIMLAAGNSTRENTKVK	-----	KQFLRLGNDPLWLYATK		
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	(1)	-----	MILVNLFEPKIIAIVPAAGIGSRMKIDV	-----	PKQYIKIQNRTILEHTLT		
<i>Brucella melitensis</i>	(1)	-----	MAAGRGERAGQSAEGPKQYRLIGAEVLAHTLR	-----			
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	(1)	-----	MSYDVVIPAAGQKRMKAGR	-----	NKLFIELKGDPIIHTLR		
<i>Bacillus halodurans</i>	(1)	-----	MEYSVVIPAAGQKRMKAGR	-----	NKQFIELGKGPILAHILA		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	(1)	-----	MQESTMKFGIVIVAAGRGERAGSPPEGPKQYRPIGGRAVIEHTLA	-----			
<i>Haemophilus influenzae</i>	(1)	-----	MARSIIAIVLPAAGVGSRMQADK	-----	PKQYTLILGKTRILEHTLD		
<i>Helicobacter pylori</i>	(16)	ESLEEDPFETKETLETETLIKQTSVLLAAGESRRFSQTI	-----	KKQWLRSNHTPLWLSVYE			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	(1)	-----	MKRTLNIGIVLCENFLSDQNAVDSTQVYEDVRMEFGLKLFQ	-----			
<i>Mycobacterium leprae</i>	(1)	-----	MAVATGTVVAVVPAAGAGKRLAAGI	-----	PKAFCELDGRTLVERAVV		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	(1)	-----	MQRTLVNGVILCESFISNAQNPVNSYIKIYENVRMEFAHLIQ	-----			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(1)	-----	MVREAGEVVAIVPAAGSGERLAVGV	-----	PKAFYQLDQGLTIERAVD		
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	(1)	-----	MKRKNIALIPAAGIGARFGADK	-----	PKQYVEIGSKTVLEHTIG		
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B	(1)	-----	MKRKNIALIPAAGIGARFGADK	-----	PKQYVEIGSKTVLEHTIG		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(1)	-----	MTTSDLPFAFWTIVPAAGVGSRMADR	-----	PKQYLDLAGRTVLEHTLD		
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	(1)	-----	MVTLLLAGSGSTRASLNL	-----	PKQYRIEEKMVIEVTE		
<i>Pasteurella multocida</i>	(1)	-----	MTTPIAKSTRRIIVAVVPAAGIGSRMOMDK	-----	PKQYLHIHGKTILEHTLS		
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315	(1)	-----	MIYAGILAGGIGSRMGNVPL	-----	PKQFLDIDNKPILHTIE		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	(13)	GEYWRMRDHQKMQGEEQFSCGVVIVAAGRGERAGQSAEGPKQYRTIGDRFVIAHTLD	-----				
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	(1)	-----	MIYAGILAGGTGTRMGISNL	-----	PKQFLELGDRPILHTIE		
<i>Salmonella typhimurium</i>	(1)	-----	MAATLLDVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNKTILEHSVH		
<i>Thermotoga maritima</i>	(1)	-----	MNVAILLAGKGERMSENV	-----	PKQFLEIEGRMLFEYPLS		
<i>Treponema pallidum</i>	(1)	-----	MRRGACVQKKEYLPLTSRQPGVCLLSEILVRALEARSFF	-----			
<i>Vibrio cholerae</i>	(1)	-----	MNMNTAIVPAAGVGSRMQADR	-----	PKQYTLTLLDKTVLEHTVE		
<i>Xylella fastidiosa</i>	(1)	-----	MSVGWAVIPAAGRGVRFSGPV	-----	PKQYLPVVGRLIVVTE		
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	(1)	-----	MYLLIPAAGVGKRMGCDR	-----	NKLLLEVRSPQIIAHTLL		
<i>Aquifex aeolicus</i>	(1)	-----	MYTAIILAAGGRSRIGFRK	-----	QFATLCGKPLFMHSL		
<i>Helicobacter pylori</i> J 99	(19)	EEDPFETKETLETETLIKQTSVLLAAGESRRFSRAI	-----	KKQWLRSHHTPLWLSVYE			
<i>Listeria innocua</i>	(1)	-----	MNYELIFLAGQKRMNAEK	-----	NKMWLDLVGEPIFIHALR		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	(1)	-----	MHLII PAAGSGKRMGSGH	-----	NKLLNLVGLGQPLLSWTVQ		
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(1)	-----	MTVAIVIVAAGRGRTRAGEGL	-----	PKQWRDLAGRVPVLAQTV		
<i>Bacillus subtilis</i>	(1)	-----	MSYDVVIPAAGQKRMKAGR	-----	NKLFIELKGDPIIHTLR		
<i>Caulobacter crescentus</i>	(1)	-----	MTFSVVIVAAGSGTRAGPGQ	-----	AKQWRVLAGRVPVLRWSVE		
<i>Zyrromonas mobilis</i>	(1)	-----	MMKRTDNIALIVAAGQVNVQVKAL	-----	QKQYRKTAGKANLAHAID		
<i>Rhizobium loti</i>	(1)	-----	MTEASENASATGGVAVVIVAAGRGRARAGQAN	-----	GPKQYQNIIGRAVIAHTLE		
<i>Brucella suis</i>	(37)	RKALFGLQAQSLAEVTIVISKAAAVIVAAGRGERAGQSAEGPKQYRLIGAEVLAHTLR	-----				
<i>Rhizobium meliloti</i>	(13)	GEYWRMRDHQKMQGEEQFSCGVVIVAAGRGERAGQSAEGPKQYRTIGDRFVIAHTLD	-----				
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	(1)	-----	MTGSIWAIVPAAGRGTRFGGGL	-----	PKQYLQAGGQFILMAYTLA		
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>)	(1)	-----	MTGSIWAIVPAAGRGTRFGGAV	-----	PKQYLHAAGQFILMAYTLA		
<i>Klebsiella aerogenes</i>	(1)	-----	MAATFPGVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNKTILEHAVA		
<i>E. coli</i> O9	(1)	-----	ATTHLDVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNQITILEHSVH		
<i>Shewanella oneidensis</i>	(6)	EATSQTETQVAVQLEPLSSNVVAIVPAAGIGSRMGAGK	-----	PKQYLPLLGQSILAHITLD			
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>brevipalpis</i>	(1)	-----	MINHPEIIVIFPAAGIGKRMGYKY	-----	PKQYIKIKNKTILEHS		
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)#2	(1)	-----	MILVNLFEPKIIAIVPAAGIGSRMKIDV	-----	PKQYIKIKNKTILEHTLT		
<i>Chlamydia muridarum</i>	(1)	-----	MNLSLSLVLLGGGGRGERFNSPQ	-----	PKQYTPLCGEPLILHALH		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	(59)	IKCSSSTGFDSNVVVEKSVSVILLAGGQKRMKMSM	-----	PKQYI PLLGQPIALYSFF			
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar group)	(12)	PPASAPTHPPPLSPSPFNLA RLRLRTGGSCAVAPRRHARKWGS AVCAAKADGACDSF	-----				
<i>Listeria monocytogenes</i>	(1)	-----	MNYELVFLAAGQKRMNAEK	-----	NKMWLDLVGEPIFIHALR		
<i>Clostridium perfringens</i>	(1)	-----	MKVVSIVILAGGKGRMGAEV	-----	SKQFIEINGKPIIYITLK		
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i>	(1)	-----	MNVSAVIVAAGRSTRMKNKSL	-----	NKVYLSIAGKFLVLYSIK		
<i>Chlorobium tequilense</i>	(1)	-----	MKTVVIIAAGSGVGRMKLGGGRSKQMLEIGGQTVIWHIMK	-----			
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120)	(1)	-----	MYLLIPAAGVGKRMGCDR	-----	NKLLLEVRSPQIIAHTLL		
<i>Synechococcus elongatus</i>	(1)	-----	MHILI PAAGMKRMKASH	-----	NKLRQLLCKPILAHILA		
<i>Corynebacterium efficiens</i>	(1)	-----	MSRLPVVALLAAGRGTRLGPI	-----	PKAFVTLRGRSLVENSRL		
<i>Bifidobacterium longum</i>	(11)	ETPTVQPAQAQAKPAQTVVAVVIAAGGCTREFTPDN	-----	PKQIVSVGKPIVWCSID			
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MW2)	(1)	-----	MIYAGILAGGIGSRMGNVPL	-----	PKQFLDIDNKPILHTIE		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(1)	-----	MIYAGILAGGIGSRMGNVPL	-----	PKQFLDIDNKPILHTIE		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Strain ATCC BAA 255/RQ)	(1)	-----	MIYAGILAGGIGSRMGNVPL	-----	PKQFLDIDNKPILHTIE		
<i>Leptospira interrogans</i>	(1)	-----	MKSFLSEKITYYLIAGGTSGRMGSKI	-----	PKQFLELNGFPILHSLK		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype V)	(1)	-----	MNNGVIFAGGVGRMNTKCK	-----	PKQFLEVHGKPIIVHTID		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype III)	(1)	-----	MNNGVIFAGGVGRMNTKCK	-----	PKQFLEVHGKPIIVHTID		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	(1)	-----	MANIAVIAAGSGSRMGNVPL	-----	PKQFLEVHGKPIIVHTID		
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	(25)	AFPEPISVAGAEPCNRRTVAAVIPAGGGRMGVHT	-----	PKQFLEVHGKPIIVHTID			
<i>Vibrio vulnificus</i>	(1)	-----	MARSMTSLVAVVPAAGVGRMADR	-----	PKQYICHTKTIILEHTIE		
<i>Salmonella typhi</i>	(1)	-----	MAATLLDVCAVVPAAAGFGRRMQTEC	-----	PKQYLSIGNKTILEHSVH		
<i>Streptomyces coelicolor</i>	(14)	ATTFAETSAETSAAGRS PARTAAVIPAAGRGVRIAGPA	-----	PKALRAIGGTMILTHAVR			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	(1)	-----	MKNNOVYATIIAAGSGSRVNSNI	-----	PKQYIPLACPLFIFYSLA		
Consensus	(59)		V AVI AAG G RRG		PKQYL I GNPIL HTL		

	(117)	117	130	140	150	160	174
<i>Yersinia pestis</i>	(47)	SLLHPRIQRVIVVHP----	QDTQFSRLS----	VAQDPRISTVYGGDQRANSVMAGL			
<i>Ralstonia solanacearum</i>	(47)	AFLASAAIDRVVVVTPGAPALAAFPGLG----	FDAARLVEVDCGGDSRHASVTNGL				
ORF1	(43)	NLLAHPIDTVQVVIADGHQALYQEAUGDR-----	DLPQPVIGGVFRDSDVINGL				
<i>Mesorhizobium loti</i>	(51)	IFLAHPRTDRIVVAIHAD-DHELFROAAG-----	SQAERVTAIIGGPTRQESVRLGL				
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	(48)	LAFENKNDIIIIITNKENLNFVVKYQCNK----	NLFSKVYIIVEGGSERQYSIYNAI				
<i>Escherichia coli</i>	(44)	ALLAHPRVKRVVIAISP-----	GDSRFAQLP-----	LANHPQITVVDGGERADSVLAGL			
<i>E. coli</i> O157:H7	(44)	ALLAHPRVKRVVIAISP-----	GDSRFAQLP-----	LANHPQITVVDGGERADSVLAGL			
<i>Deinococcus radiodurans</i>	(46)	ALAP--FVDEVVVALPAG-----	MD-----	LPAGVPAIAIVGGETRQGSVRRLL			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	(44)	AMLTSESVDIIILVSPDMETIYARDLLRKRGLNDPEGVRVRLVHGGGERADSVWAGL					
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	(38)	KFORSPLIDEIIIVAAESEINFQMIEIVYK----	YKFNKVKNIVSGGSERQGSVMNGL				
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	(40)	ILSSLPQIAEVIVVCDP-----	SYQE-----	TFQEPVPSFAIPGERRQDSVFSGL			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	(41)	AYQRLPFVQEVVVVCEE-----	QYRE-----	LFLPYSVKFASPGTLRQDSVFSGL			
<i>Caulobacter vibrioides</i>	(39)	AFLAAGAAEVVVVTTADG-EAFLPRMLEG-----	LQGWSTLGGATRALSVQAGL				
<i>Campylobacter jejuni</i>	(40)	NLSSFYFPFKKIVVTSN-----	ITYMK-----	KFTKNYEFIEGGDTRAESLKKAL			
<i>Buchnera aphidicola</i> (Acyrtosiphon pisum)	(47)	TLLLHPNIVQIIVSLNK-----	KDNYFHKLS-----	ISSNFRIISVVGGEKRINSVLSGL			
<i>Brucella melitensis</i>	(34)	AFTDCPLIGTIAVVIHPD-DHALYRRAPV-----	EKHENVILVTGGPTRQESTRLGL				
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	(39)	VFDShRQCDKIILVINEQER-EHFQQLSD-----	YPFQTSIELVAGGDERQHSVKGL				
<i>Bacillus halodurans</i>	(39)	VFEQDDWCTNVVIVANEQEI-EEMGELANR-----	YQISKAKKIVAGGRERQESVFAGL				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	(46)	TFLRWNDACPIVVVSHAD-DAALLSPILAR-----	LDAGERITTTVGGATROQSVLAGL				
<i>Haemophilus influenzae</i>	(71)	VMLSYPVSKIIILAVSKD-----	DPYIST-----	L-----	SLDPKIQLEGGTTRAESVNLGL		
<i>Helicobacter pylori</i>	(72)	SFKEALDFEKIILVSE-----	L-DYIYIK-----	RHYPEIKLVKGGASRQESVRNAL			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	(45)	SLPFNIQETLIFCNAEQHKIVDKAAKKYKNTTVFFSRDTPVANVYAKVFIQEKYKLT					
<i>Mycobacterium leprae</i>	(44)	GLLESGVVDHVAVPADRIAQTQWVLSQRLA--	NSAGQATVAVAGGADRTKSVCCQAL				
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	(45)	ESRINFQKILLYVLEEQIPLVEKVVAKYENCWFRSKHNEVEDIYKAGFIEDKYKIG					
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(44)	GLDLSGVVDTVVAVPADRTDEARQILGHR-----	AMIVAGGSNRDTPVNAL				
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	(41)	IFERHEAVDLTVVVPSPEDT FADKVQTAFF-----	QVRVWKNGGQTRAETVRNGV				
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B	(41)	IFERHEAVDLTVVVPSPEDT FADKVQTAFF-----	QVRVWKNGGQTRAETVRNGV				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(45)	CFLHPLMLRGLVCLAEDDPYWPGLDCAAS-----	RHVQRAAGGAERAGSVNLGL				
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	(38)	NVSRVKGVDNIIIVSNPRFMDTALELKESF-----	PKIKDVAKGGRTNESIYNGF				
<i>Pasteurella multocida</i>	(48)	VILGYPLIEKIIILAVANDPYISTCPLLTH-----	PKIQLEGGSSRADSVNLGL				
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315	(39)	KFILVSEFNEIIATPAQWISHTQDILKKY----	NITDQRVKVVAGGTDNRNETIMNII				
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	(71)	IFATWPGAGPVVVVHPDDEELFAAARKRM-----	AGALELTVVHGGATROQSVLAGL				
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	(39)	KFVLEPSIEKIVGVHGDVWVSHAEDLVDKYL---	PLYKERIIITKGGADRNTSIKNI				
<i>Salmonella typhimurium</i>	(44)	ALLAHPRVTRVVIASPGDHRFAQLPLANH-----	PQITVVDGGERADSVLAGL				
<i>Thermotoga maritima</i>	(38)	TFLKSEADIGVIVTRREWFVEVKEKRVFHE-----	KVLGIVEGGDTRSQSRSAL				
<i>Treponema pallidum</i>	(41)	LVVVTVPAGEVAYAESQVACDSRLSAFPSR-----	TRPVILYVGAHTRASASVRAGL				
<i>Vibrio cholerae</i>	(40)	HLLEHPLIEHVAVASADDPYFANLPLAHH-----	PRVIRVDGGERADSVLSAL				
<i>Xylella fastidiosa</i>	(41)	ALAAHPAVCGMLMVVAEGDLAWSSWTEVAG-----	KPLLTCSGGVTRAASVLSGL				
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	(37)	AAQAASEISWIGIISQPTDWPDKSILANL-----	QLTKPVEFILLGGSTRQESVYNGL				
<i>Aquifex aeolicus</i>	(36)	KVLD--IFEVILVLPEDFL-DKVKVH-----	PKVKVAGGPERQDSVFNAL				
<i>Helicobacter pylori</i> J 99	(75)	SFKEALDFEKIILVSELDYVYIQRHY-----	PKIKLVKGGASRQESVRNAL				
<i>Listeria innocua</i>	(37)	PFLADNRCSKVIIVCQETERKHVRKLMQOL---	DVAEDRVEVVKGGSERQYSVAAGL				
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	(39)	AALASQSIIEWIGIMQPDYPAFEALLTPL-----	HSPKPVQLIVGGDTRQGSVFNGL				
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(39)	AFAG---LGRILVVLHPDDMGLGMDLLGGS-----	VVLVAGGSTRSESVKNAL				
<i>Bacillus subtilis</i>	(39)	VFDShRQCDKIILVINEQDREHFQQLSDY-----	PFQTSIELVAGGDERQHSVKGL				
<i>Caulobacter crescentus</i>	(39)	AFLAAGAAEVVVVTTADGEAFLPRMLEGLQ-----	GWRSTLGGATRALSVQAGL				
<i>Zymomonas mobilis</i>	(43)	NLLAHPIDTVQVVIADGHQALYQEAUGDR-----	DLPQPVIGGVFRDSDVINGL				
<i>Rhizobium loti</i>	(51)	IFLAHPRTDRIVVAIHADDHELFROAAGSQ-----	AERVTAIIGGPTRQESVRLGL				
<i>Brucella suis</i>	(95)	AFTDCPLIGTIAVVIHPDDHALYRRAPVEK-----	HENVILVTGGPTRQESTRLGL				
<i>Rhizobium meliloti</i>	(71)	IFATWPGAGPVVVVHPDDEELFAAARKRM-----	AGALELTVVHGGATROQSVLAGL				
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	(41)	ALAAHPALAGIMVIAIAPGDADWPGWTAQVS-----	KPVLTCIGGATRAASVLSGL				
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>)	(41)	ALAAHPAVAGIVVIAIAPGDADWPGWTAQVS-----	KPVLTCIGGATRAASVLAGL				
<i>Klebsiella aerogenes</i>	(44)	ALLADARVQRVVIASPGDRRFSQLPLAQH-----	PQITVVDGGAERADSVLAGL				
<i>E. coli</i> O9	(43)	ALLAHPRVKRVVIAISPGRSFAQLPLANH-----	PRITVVDGGEERADSVLAGL				
<i>Shewanella oneidensis</i>	(62)	KLLSHPLISQVIALHPEDADFYALPQAKH-----	PKLKTIVGGSERANSVLAAL				
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>brevipalpis</i>	(43)	LFIDKIVYKIKILIAINKDYFNKLSILKN-----	KKINIVIGGKSRTESVISAL				
<i>Buchnera aphidicola</i> (Acyrtosiphon pisum) #2	(47)	TLLLHPNIVQIIVSLNKNDNYFHKLSISSN-----	FRIISVVGGEKRINSVLSGL				
<i>Chlamydia muridarum</i>	(41)	SYQSLPFIQEIIVVCEEH--YQELFS--PY-----	SVKFASPGALRQDSVFSGL				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	(115)	TFSRMPEVKEIIVVCDPFFRDI FEEYEESI-----	DVLDLRFAPGKERQDSVYSGL				
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar group)	(70)	ILQCDSDMGLHCIVQFDILSAEGSKRSCSGSIENVQIPKIFALPGKERQDSVYNGL					
<i>Listeria monocytogenes</i>	(39)	PFLADNRCSKVIIVCQEEERKHVKELMSQL-----	NVAEHRIEIVKGGSERQYSVAAGL				
<i>Clostridium perfringens</i>	(40)	AFEECKGIDEIILVLPKDEIDYFKRETEPR-----	FDFKISKIEGGKERQDSVYNAL				
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i>	(39)	AFDEIEWIKEIIVVTSPEETEYQCNVLEK----	FYWNKPFKIVKGGEEERQYSVYNGI				
<i>Chlorobium tepidum</i>	(41)	AFQEAFTVESVYIATLPDSIPVKEIAKAN-----	GFTKITAIIEGGKERQDSIGNCM				
<i>Arabidopsis</i> sp. (strain PCC 7120)	(37)	AAQAASEISWIGIISQPTDWPDKSILANL-----	QLTKPVEFILLGGSTRQESVYNGL				
<i>Synechococcus elongatus</i>	(37)	AVAAAEAEIIEWIGVIGQPEDFPIWEALLEDL-----	NLRQPVHLITGGETRQASVFHGL				
<i>Corynebacterium efficiens</i>	(42)	AMLTSEVVDEVIILVSPDMEDYARELLTRRGLNDPEGVRVRLVHGGGERADSVWAGL					
<i>Bifidobacterium longum</i>	(67)	AFEHCDRVSDIIVVVPKVRGEVETLVGEM----	GYTKVRVIIDGGDERVDSTATAL				
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MW2)	(39)	KFILVSEFNEIIATPAQWISHTQDILKKY----	NITDQRVKVVAGGTDNRNETIMNII				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(39)	KFLMYKDFDEIIATPAQWISHTQDILKKY----	QLDDKKIKVIQGGDDNRHSIMNII				
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Strain ATCC BAA-255/R6)	(39)	KFVLEPSIEKIVGVHGDVWVSHAEDLVDKYL---	PLYKERIIITKGGADRNTSIKNI				
<i>Leptospira interrogans</i>	(46)	RFQNWGQKQKRIVLVSHFESIPKIESICASY-----	LENEDRIVQGGENRHSSMLCGL				
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype V)	(40)	IFQNTAIDAVVVVCSVDWLDYMNNLVERF-----	NLTQVAVVAGGETQMSIFKGL				
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype III)	(39)	IFQNTAIDAVVVVCSVDWLDYMNNLVERF-----	NLTQVAVVAGGETQMSIFKGL				
<i>Streptococcus thermophilus</i>	(39)	SFQKHPIQDAIEVVCIDGWHDIVWAYAKQF-----	NIDKLKWIISGGSTQGESIRNGV				
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	(81)	AMERVCIWKIDIVVTGTGENMEAMRSIIQRY-----	G-HKRISLAEAGATRHRSIFNGL				
<i>Vibrio vulnificus</i>	(44)	RLLSHPAITQVVAVSEDDPYVSELAIAQH-----	PDIVRVAGGERADSVLSAL				
<i>Salmonella typhi</i>	(44)	ALLAHPRVTRVVIASPGDHRFAQLPLANH-----	PQITVVDGGERADSVLAGL				
<i>Streptomyces coelicolor</i>	(70)	AMAASRAVSLVVVAPPDGAAGEVKSLLDAHA---	LPERTDFVVVPGGETRQESVRLGL				
<i>Mycoplasma penetrans</i>	(42)	TFANFDLIDKVVVLVNHYSKYDVESLIKYY-----	EWKNKVFIVNGGDRHLSIINAV				
Consensus	(117)	F	I	I	V	V	V

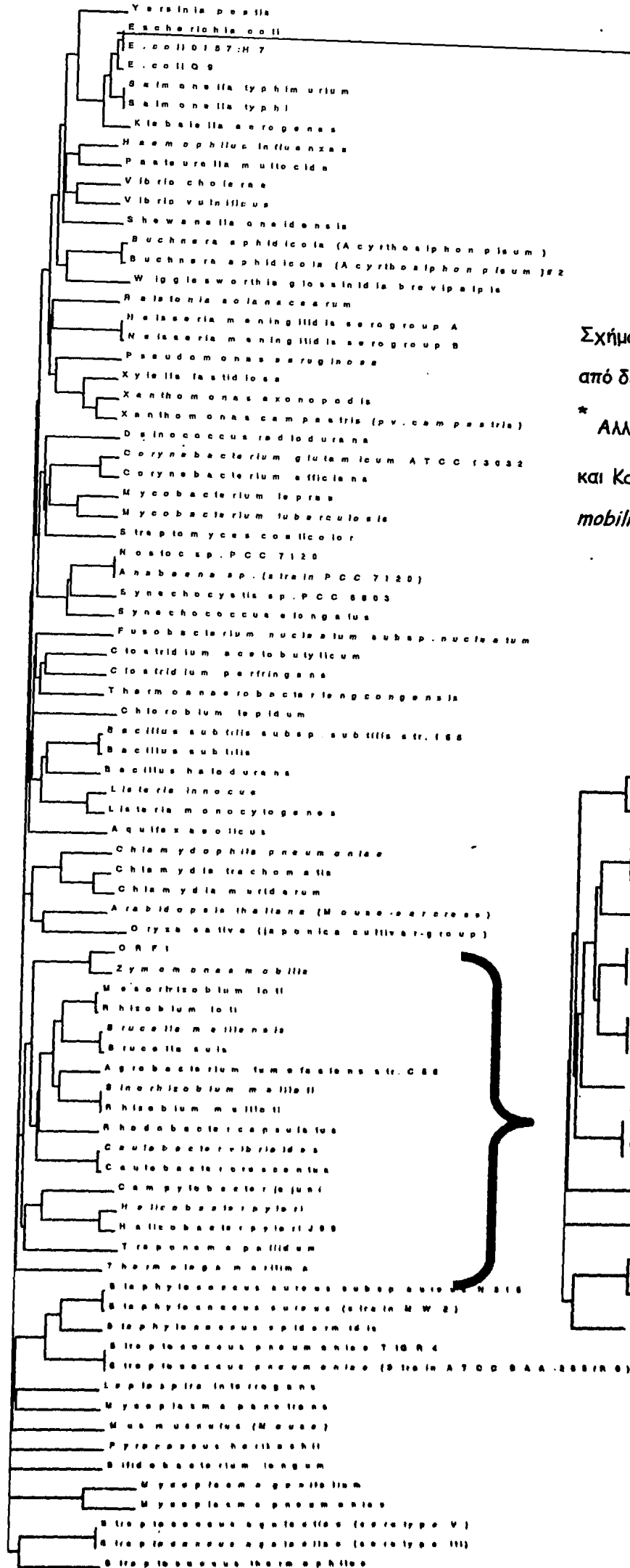


	(176)	176	190	200	210	220	233	
<i>Yersinia pestis</i> (98)	LAG	-----	QAEWVLVHDAAP	PCLHLLDLSRLLSITECS	-----	QVGGILAAPVRDT		
<i>Ralstonia solanacearum</i> (102)	ALRGLGA	-----	HEDDWVLVHDAAP	PGLTPALIALRVGAVEADGGQAVGGILALPVADT				
ORF1 (94)	AAHDR	-----	GKRVLIHDAAP	PFLPKTVIDRLLDALKSSK	-----	AAIPVLPVVDT		
<i>Mesorhizobium loti</i> (103)	ALKEH	-----	APGQVLIHDAAP	PFVDADLIDRTISAIGENEG	-----	ALPALPVADT		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (103)	KIK	-----	DTDIVIIQDAAP	PFLKDKYIEESLKIINDDCDG	-----	AIIGVKCKDT		
<i>Escherichia coli</i> (95)	AAG	-----	DAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLARLLALSETS	-----	RTGGILAAPVRDT		
<i>E. coli</i> O157:H7 (95)	AAG	-----	DAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLARLLALSETS	-----	RTGGILAAPVRDT		
<i>Deinococcus radiodurans</i> (89)	ATEAG	-----	TVLIH-DAAP	PFVPPVILALLDLAIAATG	-----	AATVALPVADT		
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (103)	AISLDDA	-----	TPDAIVLIHDSAPALT	PPGMIA RVVRKVHEG	-----	ATAVIVLPVSDT		
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (93)	AVK	-----	SANIVLIHDGAP	PFVDNKI IENGIKYAEKYG	-----	G-AACGVQPKDT		
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (86)	QVS	-----	YPVVI IHDGAP	PFYIPEIHDLETAEKIG	-----	A-TALASPIPYT		
<i>Chlamydia trachomatis</i> (87)	QVS	-----	TPWVCIHGDFV	PFVYADEVIEVCSAARKTG	-----	A-AALASPATYT		
<i>Caulobacter vibrioides</i> (89)	ALSERP	-----	GAEPVMIHDAAP	PFVSRNVILALLGALSADL	-----	ALPALAVADT		
<i>Campylobacter jejuni</i> (86)	LID	-----	SEFVMVSDVAF	VLVSKNLFDRLLIENLDKAD	-----	CITPALKVADT		
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>) (98)	VVK	-----	NVDWVIVHDAAP	PCLSYKDLKLSI I IKN	-----	PVGAILARPVS		
<i>Brucella melitensis</i> (86)	ALKDE	-----	APQYVLIHDGV	PFIGQDLLEI IANLTPDNG	-----	VLPALAVADT		
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 (93)	AVK	-----	QEKIVLVHDGAP	PFIKHEQIDELIAEAEQTG	-----	A-AI LAMPVADT		
<i>Bacillus halodurans</i> (93)	ALS	-----	QDGLVLIHDGAP	PFVTEKEIHSILVETAAKTH	-----	A-AVLAVPVADT		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (100)	ALSSH	-----	GLTHVMIHDAAP	PFVAA DMLERIAALHRAGAGG	-----	VLPALPVDT		
<i>Haemophilus influenzae</i> (90)	AIAEK	-----	NAWVLVHDAAP	PCLQHADIDKLLAIEDKQ	-----	AI LAMPVDT		
<i>Helicobacter pylori</i> (120)	IID	-----	SAYTLTSDVAF	GLANIEALKSLF LTLOQTSH	-----	YCIAPYLPCTDT		
<i>Mycoplasma genitalium</i> (104)	DYKKRGVS	-----	SYDSCCFILLEAN	PLTAIKTVKSVEKALIEK	-----	AAI LAMPVNGT		
<i>Mycobacterium leprae</i> (101)	TL PAPS	-----	R--VGAEFFLVHDAAP	FALT PARLIVRVVDALRAGH	-----	TAVVPALPLSDT		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (104)	KSSKNQAS	-----	SYDNCCFVLEACF	PLTSKKVVKVVEKAMIDG	-----	AAVAVLPFERQ		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (93)	VLSGTA	-----	-----	EPEFVLVHDAAP	FALT PPALVARVVEALRDGY	-----	AAVVPVLPVSDT	
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (92)	KLLETGL	-----	AAETDNILVHDAAP	CCLPSEALTRIEQAGNAAE	-----	GGILAI PVADT		
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (92)	KLLETGL	-----	AAETDNILVHDAAP	CCLPSEALTRIEQAGNAAE	-----	GGILAIPIADT		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (96)	RLEELGA	-----	QADDWVLVHDAAP	PNLTRGDRLLEELAEADPV	-----	GGLLAVPARDT		
<i>Pyrococcus horikoshii</i> (90)	KVPQK	-----	ESKILVHDAAP	PFTRPWFVRI I SLDERDV	-----	ITTVNPITGN		
<i>Pasteurella multocida</i> (99)	AVKSAVQ	-----	NSEDFVVMVHDAAP	PCLTHQDLDKLVQVEDQNG	-----	AI LAMPATDT		
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (94)	HIRNVNG	-----	INNDVIVTHDAAP	PFLTORI I KENIEVAARYGA	-----	VDTVIEAIDT		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (125)	AVAAT	-----	GVEYVMIHDAAP	PFEDHTLLDRCGAALRDGAQ	-----	ALLPAIADT		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 (95)	AIDAYRP	-----	LTPEDIVVTHDSV	PFITLRIQDNIQLAQNHA	-----	VDTVVEAVDT		
<i>Salmonella typhimurium</i> (95)	AVA	-----	KAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLARLLAISNSRV	-----	GGILASPVADT		
<i>Thermotoga maritima</i> (89)	FLEKF	-----	SPSYVLVHDSAP	PFLRKKHVSEVLRARETGA	-----	ATLALKNSDA		
<i>Treponema pallidum</i> (94)	AMATH	-----	APDVVLVHDGAP	PFVSVALIHSVLEATCRYGA	-----	AVPVIEATDT		
<i>Vibrio cholerae</i> (91)	YVCQHRL	-----	SEWVLVHDAAP	PCVTHADITQLITTAHPI	-----	GAILASPVADT		
<i>Xylella fastidiosa</i> (92)	ALPQVH	-----	ADDFVLVHDAAP	PVALSDELRLLEAGCAHPV	-----	GAILAVPVADT		
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (91)	ALPTA	-----	AEQVLIHDGAP	CLATPNLLNSCAQAIRHCSG	-----	LIAAVPVKDT		
<i>Aquifex aeolicus</i> (81)	QAT	-----	GDIVVLIHDAAP	PLATKMFLEVAQLGDYHGK	-----	VVASPARCT		
<i>Helicobacter pylori</i> J99 (123)	VID	-----	STYITSDVAF	GLANMEALKSLF LTLOQTSH	-----	YCIAPYLPCTDT		
<i>Listeria innocua</i> (94)	CCG	-----	LESVVLVHDAAP	PFVTLDI I DRLLGVKQNK	-----	AICAVQVKT		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (91)	ALPPG	-----	AKFVLIHDGAP	CLATPDLFDRCTEALQHCQG	-----	LIAAMPVKT		
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (85)	ALEGS	-----	DVTRVLIHDGAP	PLVPASVTAAVLALETTPG	-----	AAPALAVTDA		
<i>Bacillus subtilis</i> (93)	AVK	-----	QEKIVLVHDGAP	PFIKHEQIDELIAEAEQTG	-----	AI LAMPVADT		
<i>Caulobacter crescentus</i> (89)	ALSERP	-----	GAEPVMIHDAAP	PFVSRNVILALLGALSADL	-----	ALPALAVADT		
<i>Zyrrononas mobilis</i> (94)	AAHDR	-----	GKRVLIHDAAP	PFLPKTVI DRLLDALKSSKA	-----	AI P'LPVDT		
<i>Rhizobium loti</i> (103)	ALKEH	-----	APGQVLIHDAAP	PFVDADLIDRTISAIGENEG	-----	ALPALPVADT		
<i>Brucella suis</i> (147)	ALKDE	-----	APQYVLIHDGV	PFIGQDLLEI IANLTPDNG	-----	VLPALVPADT		
<i>Rhizobium meliloti</i> (125)	AVAAT	-----	GVEYVMIHDAAP	PFEDHTLLDRCGAALRDGAQ	-----	ALLPAIADT		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (92)	ALPESVR	-----	ADDFVLVHDAAP	PNLALADLDRLEIGRGDPV	-----	GAILAAPVRCT		
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (92)	ALPDGVR	-----	ADDFVLVHDAAP	PNLALADLDRLEIGRGDPV	-----	GAILAAPVRCT		
<i>Klebsiella aerogenes</i> (95)	ALP	-----	EAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLRLSLCETSRVGGI	-----	-----		
<i>E. coli</i> O9 (94)	AAG	-----	DAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLARLLALSETS	-----	GGILAAPVRCT		
<i>Shewanella oneidensis</i> (113)	KAP	-----	DNSWVLVHDAAP	PCLMASDIKLLTSRVQFPQ	-----	GAILAMPVRCT		
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>brevipalpis</i> (94)	FVS	-----	KVDVVLVHDAAP	PCLHKNDLKLKVNISPF	-----	GAILAAPVDT		
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>) #2 (98)	VVK	-----	NVDWVIVHDAAP	PCLSYKDLKLSI I IKNPV	-----	GAILARPVS		
<i>Chlamydia muridarum</i> (87)	QVS	-----	LPWVCVHDAAP	PFVYANEVSEVCSAALKTGA	-----	AALATSATYT		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress) (167)	EIDVN	-----	SELVCIHDSAP	PLVNTEDVKEVLKDGSAVGA	-----	AVLGVPKAT		
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar group) (129)	ETDGD	-----	SELVCVHDSAP	PLVSSDVKKVLEDAIVHGA	-----	AVLGVPKAT		
<i>Listeria monocytogenes</i> (94)	RCG	-----	TGRVVLVHDAAP	PFITLDI I DRLLIGVEQSKA	-----	AICAVKVKCT		
<i>Clostridium perfringens</i> (94)	SIG	-----	DCDIVLIHDGAP	AFVSNKI I EGIKYSREFGA	-----	AAFGVMPKCT		
<i>Thermomicrobacter tengcongensis</i> (94)	VVDKD	-----	CEIVAIHDGAP	PLVTKEL I MEAIKAYLYKA	-----	AAVGVPKCT		
<i>Chlorobium thiosulfatum</i> (95)	IEQEIEN	-----	SGVMPDAILVHDAAP	PFIQPEIDFIALISATHGA	-----	CVPAKPKCT		
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (91)	ALPTA	-----	AEQVLIHDGAP	CLATPNLLNSCAQAIRHCSG	-----	LIAAVPVKCT		
<i>Synechococcus elongatus</i> (91)	ALPKT	-----	AEQVLIHDGAP	CLATPNLLNSCAQALSTYAG	-----	LIAAVPVKCT		
<i>Corynebacterium efficiens</i> (101)	AI DHD	-----	DAIVLIHDSAP	ALTPKMIARVARMVADGAP	-----	AVIPVVPADT		
<i>Bifidobacterium longum</i> (121)	MIATAGI	-----	PDDAKI I HDGAP	PFVEQSAI I GSI DALQFTA	-----	ATVAYASTDT		
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MW2) (94)	YIRNVNG	-----	INNDVIVTHDAAP	PFLTORI I KENIEVAARYGA	-----	VDTVIEAIDT		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (94)	SI EQHKK	-----	LNVEDI I VTHDAAP	PFLTNRI I RENVEYASQYGA	-----	VDTVNAVDT		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Strain ATCC BAA 255/RG) (95)	AIDAYRP	-----	LTPEDIVVTHDSV	PFITLRIQDNIQLAQNHA	-----	VDTVVEAVDT		
<i>Leptospira interrogans</i> (99)	VLDFK	-----	DEDI I I VHPRAAP	PFVIADELISLCEKVSDDGI	-----	ATLASRTSET		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype V) (94)	AAEQIAT	-----	DAVVL I HDGAP	PLINEEVINANI KSVKETS	-----	AVTSVRKCT		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype III) (94)	AAEQIAT	-----	DAVVL I HDGAP	PLINEEVINANI KSVKETS	-----	AVTSVRKCT		
<i>Streptococcus thermophilus</i> (93)	NLEKGVN	-----	PDDTVI I HDGAP	PLVPSVLTIV I SKCHQYGN	-----	AVTSMPVNDQ		
<i>Mus musculus</i> (Mouse) (134)	ALAEI QPDK	-----	KLTKFEVVI I HDGAP	PFVEEDILRVVLAANKHGA	-----	AGAIRPLVST		
<i>Vibrio vulnificus</i> (95)	ELSTQQ	-----	KADWVLVHDAAP	PCLVHQDDLALIERCSSHET	-----	GGILATPVRT		
<i>Salmonella typhi</i> (95)	AVA	-----	KAQWVLVHDAAP	PCLHQDDLARLLAISNSRV	-----	GGILASPVADT		
<i>Streptomyces coelicolor</i> (126)	ALPPE	-----	YGI VLVHDAAP	PLVPVDTVDAVIDAVREGAF	-----	AVTVAVFLACT		
<i>Mycoplasma penetrans</i> (96)	FLKSIKIN	-----	SDIVLIHDGAP	PFVSTDI I KNNI DYINSSRC	-----	DAVSTGIVPECT		
Consensus (176) AL			D VLVHDAAP	V I I RLL		AI AVPV DT		

	(234)	234	240	250	260	270	280	291				
<i>Yersinia pestis</i> (144)	MKRA-E----	PGIQAI	AHTVDRQDL	WHALTPQLF	PFLLELKL	CLSRAL	REG----	VAVTD				
<i>Ralstonia solanacearum</i> (150)	LKRA-D----	AG-OHIAET	VPRGGLWQA	QTPQMF	PLGLLQ	RALSEAL	TAQ----	RIVTD				
ORF1 (141)	LVNQ-----	ESKPLTAICS	IAFKPRKPL	ILRP-----								
<i>Mesorhizobium loti</i> (150)	LKRES-----	AAGVVAET	VSRSGLHAA	QTPQGF	PPYGPI	LAHDKA	FQLGR----	LDFTD				
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (149)	IKIID-----	ENGIVLET	PNRDNLMV	HTPQT	FKFEIL	LKKAHQ	MAEENK----	ILATD				
<i>Escherichia coli</i> (141)	MKRA-E----	PGKNAIAHT	VDRNGLWHA	LTPQFF	PPELLH	DCLTRAL	NEG----	ATITD				
<i>E. coli</i> O157:H7 (141)	MKRA-E----	PGKNAIAHT	VDRNGLWHA	LTPQFF	PPELLH	DCLTRAL	NEG----	AAITD				
<i>Deinococcus radiodurans</i> (133)	LVRAE-----	GQSWGQLV	PREGLWAV	QTPQGF	RRELL	LQAHARA	EAEQ----	YAATD				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (154)	IKRVS-----	PDGGVVVD	PNRAELRA	VQTPQGF	LLSELVA	ANEKFF	ADPNPGFI	PTD				
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (138)	IKIK-----	SEDGFSEKT	IDRSKLF	CVQTPQ	CFKYDS	ILKAHINA	EKEG----	ILATD				
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (130)	IKQ-----	RN-----	PVRTLDR	DNLA	IHTPQ	CIKTEIL	REGLALAKE	KQ----	LTLVD			
<i>Chlamydia trachomatis</i> (131)	IKS-----	CA-----	PVRTLDR	DALAVI	HTPQ	CLDTEV	LREGLLLAR	AMD----	FSLSD			
<i>Caulobacter vibrioides</i> (137)	LKRQ-----	PTGEAAQ	TVSREHL	WRAQTP	QAARRD	TLIAA	YAAWTHG----	EPTD				
<i>Campylobacter jejuni</i> (130)	TLFDN-----	EALQRE	IKLIQTP	QISKT	KLKKA	LQDN	LEFT----	DDST				
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acythosiphon pisum</i>) (144)	IKYS-N----	LKQKKA	VYTVYRK	NLWHA	LTPQL	FQVELL	KNCKKIK	KDQ----	ISVTD			
<i>Brucella melitensis</i> (133)	LKRAA-----	ADGMVETT	ISRTGL	FAAQTP	QAF	FPYAPIL	DAHEKAF	AINR----	TDFTD			
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 (138)	IKR-----	VQDLQVSE	TIERSSL	WAVQTP	QAFRL	SLLMKA	HAEEAERK	G----	FLGTD			
<i>Bacillus halodurans</i> (138)	IKR-----	VEGEAVLE	TMPEEL	WAVQTP	QAFDL	LALIKQ	AHQKAENE	Q----	MLGTD			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (148)	LKRG-----	LEDRVVET	VSROGL	YAAQTP	QSFYS	SDILD	AHRAAAA	SGK----	TDFTD			
<i>Haemophilus influenzae</i> (135)	IKRAD-----	NQOCIVK	TEDRSQ	LWQAMP	QFPF	VDILR	DALSTGI	QOQ----	ANITD			
<i>Helicobacter pylori</i> (166)	AIYYN-----	EALDREA	IKLIQTP	QLSHT	KALQ	SALN	QOQDFK----	DESS				
<i>Mycoplasma genitalium</i> (157)	LMNGNN----	DVVFSL	HQDKNR	FNYWK	QSKAYE	VQYQ	PQAYTLN	KNLQF	SKQOFLRARS			
<i>Mycobacterium leprae</i> (153)	IKAVD-----	ANGMVL	GT	PARVGL	RAVQTP	QGFAT	ELLWCAY	ORGPLH	DA----	VDFTD		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (157)	LVCQDN----	TKAVRQ	LKDKGN	MNYW	QSSST	WELQ	FPQAYTL	NKNLQ	YHKNLF	FMKARN		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (142)	IKAVD-----	ANGVLT	GT	PERAGL	RAVQTP	QGF	TDLL	LRSYQ	RGSLLD	LP----	AAEYTD	
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (144)	LKCAD-----	GGNISAT	VERTSL	WQAQTP	QQLFR	AGLLH	RALAAEN	LDG----	ITD			
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (144)	LKCAD-----	GGNISAT	VERTSL	WQAQTP	QQLFR	AGLLH	RALAAEN	LDG----	ITD			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (147)	LKRS-----	RDGRVSE	TIDRSV	WLA	YTPQ	MFRLG	ALHRA	LADAL	VA-----	VAITD		
<i>Pyrococcus horikoshii</i> (136)	LIELD-----	NGKVKRI	YDRSK	FAIGE	APTGY	RYGALK	KTLEV	AVSNG	T-----	LINEIP		
<i>Pasteurella multocida</i> (149)	IKRAL-----	HNQOIHY	TEDRSQ	LWLA	QTPQ	FFPIAT	LQAQ	LEQA	LAQ-----	LQVTD		
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (145)	IVMSK-----	DKQNIHS	I	PVRNEM	YQGT	QSFN	IKLQD	SYRAL	SSEOK----	EILS		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (173)	LKRTK-----	AAGLVA	ETVPR	TDLYAA	QTPQ	CFRLEP	ILSAH	RRAA	ASGR----	SDFTD		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 (146)	IVEST-----	NGQFIT	DI	PNRAH	LYQGT	QPTFR	CKDF	MDLYG	SLSD	DEEK----	EILT	
<i>Salmonella typhimurium</i> (141)	MKRGE-----	PGKNAIA	HTVERAD	LWHA	LTPQ	FFPREL	LYDCL	TRAL	NEG----	ATITD		
<i>Thermotoga maritima</i> (136)	LVRVE-----	NDRIEY	I	PRKGVY	RLT	PQAF	SYEIL	KKAH	ENGGE	WA-----	D	
<i>Treponema pallidum</i> (141)	PKGVA-----	ADGSIETH	LIRSRV	LAQTP	QGF	CYASL	CAAH	HRAAT	DG----	EQYT		
<i>Vibrio cholerae</i> (140)	MKRGD-----	HLQQIV	HTVDR	TALWHA	LTPQ	MFRAQ	SLRER	LFAAL	QOQ----	VTITD		
<i>Xylella fastidiosa</i> (142)	LKRAG-----	ADGSID	GT	EPRE	RLWRA	FTPQL	FRRS	QLVR	GLQV	AAADG----	IEITD	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (137)	IKVVD-----	EDGIIQ	NT	PDRNL	WAAQTP	QGF	ENVELL	KQCH	AEGV	RQGW----	EVTD	
<i>Aquifex aeolicus</i> (124)	LKEVV-----	E-GKVI	KTLN	RS	LIWHA	QTPQ	AFRR	DILLE	CHMRA	KAE-----	FVGTD	
<i>Helicobacter pylori</i> J99 (169)	AIYYN-----	EALDREA	IKLIQTP	QLSHT	KALQ	SALN	QOQDFK----	DESS				
<i>Listeria innocua</i> (139)	VKRVI-----	HVVKET	VDRDN	LWQI	QTPQ	AFELH	ILQKA	HLAK	KDQ----	FLGTD		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (137)	IKIVN-----	ADGWIT	DT	PDRGL	WGAQTP	QGF	DVALL	KACH	DKGQ	EGW----	EVTD	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (132)	LWRGE-----	AGLVAG	TQDREG	LYRAQTP	QGF	FRPE	ILAAH	RAHP	GGG----	AD		
<i>Bacillus subtilis</i> (138)	IKRVQ-----	DLQVSE	TIERSSL	WAVQTP	QAFRL	SLLMKA	HAEEAERK	G----	FLGTD			
<i>Caulobacter crescentus</i> (137)	LKRQP-----	TGEAAQ	TVSREHL	WRAQTP	QAARRD	TLIAA	YAAWTH	GE-----	PTD			
<i>Zyrrononas mobilis</i> (141)	LVNQ-----	VEAVDR	NLFHR	VQTPQ	AFDLET	VIAAH	QAWT	GSD----	EPTD			
<i>Rhizobium loti</i> (150)	LKRES-----	AAGVVAET	VSRSGLHAA	QTPQGF	PPYGPI	LAHDKA	FQLGR----	LDFTD				
<i>Brucella suis</i> (194)	LKRAA-----	ADGMVETT	ISRTGL	FAAQTP	QAF	FPYAPIL	DAHEKAF	AINR----	TDFTD			
<i>Rhizobium meliloti</i> (173)	LKRTK-----	AAGLVA	ETVPR	TDLYAA	QTPQ	CFRLEP	ILSAH	RRAA	ASGR----	SDFTD		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (142)	LKRAG-----	DDGGID	GT	EPRE	RLWRA	LTPQL	FRHQL	IRGL	TEASA	AAG----	VEVTD	
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (142)	LKRAG-----	DDGGID	GT	EPRE	RLWRA	LTPQL	FRHQL	IRGL	TEASA	AAG----	VDVTD	
<i>Klebsiella aerogenes</i> (133)												
<i>E. coli</i> O9 (140)	MKRAE-----	PGKNAIA	HTVDRN	GLWHA	LTPQ	FFPREL	LYDCL	TRAL	NEGA----	TITD		
<i>Shewanella oneidensis</i> (159)	MKRAN-----	SLGEIN	STVCR	DNLWHA	LTPQL	FPTSL	RLHL	QALN	NAGA----	VVTD		
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>brevipalpis</i> (140)	VKKS-----	GNFISHT	IKRNL	WRAL	TPQL	FNKL	ILINCL	KIITS	SKGE----	IITD		
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acythosiphon pisum</i>) #2 (144)	IKYSN-----	LKQKKA	VYTVYRK	NLWHA	LTPQL	FQVELL	KNCKKIK	KDQ----	SVTD			
<i>Chlamydia muridarum</i> (131)	IKSRT-----	PVRTLDR	DAVA	VIHTP	QCINTE	ILKEG	LLAN	MMDF----	TLSD			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress) (213)	IKEVN-----	SDSLV	VKTLD	RKTL	WEMQTP	QVI	KEP	LLKKG	FELV	KSEG----	LEVTD	
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) (175)	IKEAD-----	SNSFV	VKTLD	RKTL	WEMQTP	QGW						
<i>Listeria monocytogenes</i> (139)	VKRVN-----	NGVQET	VDRNL	WQVQTP	QAFEL	PILR	KAHQA	LAKE	QF----	LGTD		
<i>Clostridium perfringens</i> (139)	IKVKN-----	LEGFS	VDTPNR	ASLVAV	QTPQ	CFKN	ILIKG	HNK	VKNEKI----	QVTD		
<i>Thermoplasma volcanium</i> (140)	IKVAD-----	EDNFIL	DT	PDRYL	WAIQTP	QVF	EKELI	VKAH	RKALE	EGF----	LGTD	
<i>Chlorobium tepidum</i> (148)	IKYVG-----	CNPEI	FGET	LDRS	RLQVQTP	QGF	APAKL	IEAHR	LAGE	EQW----	YATD	
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (137)	IKVVD-----	EDGIIQ	NT	PDRNL	WAAQTP	QGF	ENVELL	KQCH	AEGV	RQGW----	EVTD	
<i>Synechococcus elongatus</i> (137)	IKIVN-----	REGVVQ	T	PERDS	LWAAQTP	QGF	FRVEP	LRIA	HEMA	VAKGW----	EVTD	
<i>Corynebacterium efficiens</i> (148)	IKRVD-----	GSTVVD	TPNR	ADLRA	VQTPQ	GFLLS	RLRA	ANEK	FFAT	PDPGFI	PTD	
<i>Bifidobacterium longum</i> (172)	LLTEDL----	GDLKVV	KSV	PDRNT	FRAQTP	QSF	REAT	IRHAY	D	LAADPD----	FHPTD	
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MW2) (145)	IVMSK-----	DKQNIHS	I	PVRNEM	YQGT	QSFN	IKLQD	SYRAL	SSEAK	-----	EILS	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (145)	IISNN-----	DAQFIS	GIP	IRSEMY	QGT	QPTFK	IKEL	KDSY	LSLT	QSOK----	EILT	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Strain ATCC BAA-255/R6) (146)	IVEST-----	NGQFIT	DI	PNRAH	LYQGT	QPTFR	CKDF	MDLYG	SLSD	DEEK----	EILT	
<i>Leptospira interrogans</i> (146)	VLEEL-----	NGKTVS	FLDREH	VFMKTP	QGI	RGDV	LKELL	TFSV	DSIP----	TD		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype V) (143)	VVLVN-----	DSSKISE	VVDRTSR	FIAPQ	SFYLS	DILS	VERDA	ISKGI----	TD			
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype III) (142)	VVLVN-----	DSSKISE	VVDRTSR	FIAPQ	SFYLS	DILS	VERDA	ISKGI----	TD			
<i>Streptococcus thermophilus</i> (142)	IFVVDK----	EDEATT	QYI	PRETL	RRVSTP	QAYK	FOLL	DRKY	HEAF	EKEIGI	YGSSY	
<i>Mus musculus</i> (Mouse) (188)	VISPS-----	ADGHL	DHSL	DRAKH	RASEMP	QAF	LDV	YI	EAYQ	QCSDF	LD----	EFGT
<i>Vibrio vulnificus</i> (145)	MKRAN-----	AQOMI	DHTVDR	NALWHA	LTPQ	MFKA	EVILT	DALS	DALAG	QV-----	ATTD	
<i>Salmonella typhi</i> (141)	MKRGE-----	PGKNAIA	HTVERAD	LWHA	LTPQ	FFPREL	LYDCL	TRAL	NEGA----	TITD		
<i>Streptomyces coelicolor</i> (173)	VKQVE	PAAAPGE	PEPV	VAT	FERAR	LRAVQTP	QGF	DRAT	LVRAG	TVTDDV----	TD	
<i>Mycoplasma penetrans</i> (148)	IGITD-----	NSNLEK	ILN	RQKL	FI	EQTP	QSAKY	KIFEE	VYFG	SNLSD	KTLET	STD
Consensus (234)	IK	I	TVDR	LW	AQTPQ	F	LL	AH	A			TD

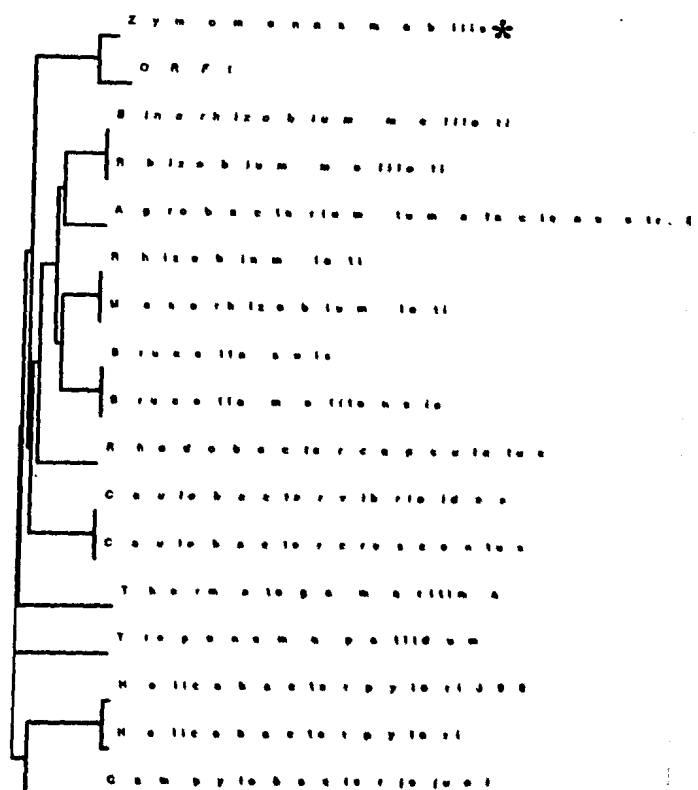
	(292)	292	300	310	320	330	349
<i>Yersinia pestis</i> (194)	EASALEHC	---	GYHPILVTRGRSDNIKVTREPDLALAEFYLTQRQ	---	---	---	SLNDSI
<i>Ralstonia solanacearum</i> (205)	EASAIEAA	---	GHRPLLAVAGALRNFKVTPDDFALAEAILAGAA	---	---	---	PTQEDSQA
ORF1 (168)	---	---	---	---	---	---	---
<i>Mesorhizobium loti</i> (200)	DAAIAEWA	---	HIPVKLVPGSPDNVKTWARDIAMAHQRLSSER	---	---	---	THFPDIRT
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (198)	DASLVEMI	---	SGKIKIITYGDYDNKITVQEDLKFLE	---	---	---	---
<i>Escherichia coli</i> (191)	EASALEYC	---	GFHPQLVEGRADNIKVTREPDLALAEFYLTTRI	---	---	---	HQENT
<i>E. coli</i> O157:H7 (191)	EASALEYC	---	GFHPQLVEGRADNIKVTREPDLALAEFYLTTRI	---	---	---	HQENT
<i>Deinococcus radiodurans</i> (181)	DAGLLARL	---	GVQVRLVPGDARLFKVTTPGDALAEALTGHD	---	---	---	GGWLTVEG
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (207)	DASIMEWY	---	GADVVCVQGDPMFAKVTTPIDMLAQRTDEAE	---	---	---	PTIFEVPG
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (187)	DTMIFEMS	---	GNKVLYDGSYENLKITTPDDLYAAETLLKNS	---	---	---	IQ
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (175)	DIEAAEII	---	GKPSQLVFNKHPQIKISYPEDLTLAQALL	---	---	---	---
<i>Chlamydia trachomatis</i> (176)	DTEAAELL	---	GIEPTLVFSNRVQIKVTYPEDLLFAETLLSKSS	---	---	---	TYK
<i>Caulobacter vibrioides</i> (183)	DAQVVEAA	---	GGRIALTAGDPLLTCLTYPEDFAMAEHLAG	---	---	---	VAR-VTRV
<i>Campylobacter jejuni</i> (172)	AIAAMGGK	---	IWFVEGEENARKLTFKEDLKLDELTPS	---	---	---	FEIFT
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acythosiphon pisum</i>) (194)	EASALEYC	---	GYNPLLVGSCRNIKITWPEDLVLANFYLLKNI	---	---	---	IDK
<i>Brucella melitensis</i> (183)	DAAIAEWQ	---	EIAVRIIEGSADNTKLTWAKDIEMADKRLRQDH	---	---	---	AVFPDIRT
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 (186)	DASLVEQME	---	GGSVRVVEGSYTNIKLTPDDLTSAEAIMESSES	---	---	---	GNKHV
<i>Bacillus halodurans</i> (186)	DASLMEWL	---	GYSVAVVQGSYFNKLTTPEDLLFAEAILAEKE	---	---	---	RR
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (197)	DASIAEWT	---	GLTPTLVTEGSDNVNKLTKLRDIAMAEKLS	---	---	---	HALPDVRT
<i>Haemophilus influenzae</i> (184)	EASAIELA	---	GFRPHLVAGRSNKLKVTREPDLALAEFYLTNRK	---	---	---	L
<i>Helicobacter pylori</i> (207)	AILQAFPD	---	RVSYTEGSKDLHLKLTSGDLKHFTLFENPA	---	---	---	K-DTFI
<i>Mycoplasma genitalium</i> (211)	MLDLMKISN	---	KSPLSIVDGSAYAFRVVNTLDFEILLGILKNG	---	---	---	---
<i>Mycobacterium leprae</i> (203)	DASLVEHL	---	GGQVQVVGDPDLAFKITTQDLDLAKKILRR	---	---	---	---
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (211)	MLDLMNISA	---	KNPLSIVDGSAYSFRVVTSLDFEILLGILRNG	---	---	---	---
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (193)	DASLVEHI	---	GGQVQVVGDPDLAFKITTQDLDLAKKILRR	---	---	---	---
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (190)	EASAVEKL	---	GIRPLLQGDARNLKLTPQDAYIVRLLDV	---	---	---	---
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (190)	EASAVEKL	---	GVRPLLQGDARNLKLTPQDAYIVRLLDV	---	---	---	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (196)	EASAMEWA	---	GYAPKLVEGRADNLKITTPEDLRLQRSFPH	---	---	---	---
<i>Pyrococcus horikoshii</i> (185)	HDIVLAMNA	---	GFDVYVLPNCNENLKITFKEDIETARTLIKMLE	---	---	---	ERE
<i>Pasteurella multocida</i> (198)	EASAMEFA	---	GFRPHLVAGRSNKLKVTREPDLALAEFYLSRTK	---	---	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (194)	DACKIIVES	---	GHAVKLVRGSELYNIKVTTPYDLKVAENAIQGD	---	---	---	ADD
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (223)	DASIAEWA	---	GIPVLLVEGAVDNFKLTLRRLDSMADEKLTR	---	---	---	MAIPDVRT
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 (195)	DACKIFVIK	---	GKDVALAKGEYSNLKITVTDLKIAKSMIEKD	---	---	---	---
<i>Salmonella typhimurium</i> (191)	EASALEYC	---	GFHPALVEGRADNIKVTREPDLALAEFYLTTRI	---	---	---	HQEKA
<i>Thermotoga maritima</i> (179)	DTEPVQKL	---	GVKIALVEGDPLCFKVTFKEDLELARIAREWE	---	---	---	RIP
<i>Treponema pallidum</i> (189)	DDSELYARY	---	GGTVHVCAGERSNVKITYPEDLEQRASEPALTRGISVLPCTEEGALRV	---	---	---	---
<i>Vibrio cholerae</i> (189)	EASAFWR	---	GEKPALVAGRADNLKITQPEDLALAEFYLSRNKEKS	---	---	---	---
<i>Xylella fastidiosa</i> (191)	EAMVMERQ	---	GLRPLLVECAESNFKITTPDDLVRFEFELARV	---	---	---	---
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (186)	DAALFEKC	---	GIEVQIVGEETNLKVTTPDDLVAFILNSRNS	---	---	---	---
<i>Aquifexaerophilus</i> (172)	DASLLERY	---	GYSVGVVEGSYWNVKITYPEDEMVKIMGEED	---	---	---	---
<i>Helicobacter pylori</i> J99 (207)	ESSAILQAF	---	PNSVSYIEGSKDLHLKLTSGDLKFTFPFNPAK	---	---	---	DTFI
<i>Listeria innocua</i> (187)	EASLVERI	---	PYPVAIVQGSYNNIKLTPEDMPLAKAILGELGGKVND	---	---	---	---
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (186)	DAALLEKC	---	GQPVKIVPGEDTNLKITTPVDLAIAEFILQRSKSA	---	---	---	---
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (177)	DVEVARHA	---	GLSVAIVPGHEDNLKITYPADFAEAILREK	---	---	---	GLTMDVRL
<i>Bacillus subtilis</i> (186)	DASLVEQME	---	GGSVRVVEGSYTNIKLTPDDLTSAEAIMESSES	---	---	---	GNKHV
<i>Caulobacter crescentus</i> (183)	DAQVVEAA	---	GGRIALTAGDPLLTCLTYPEDFAMAEHLAGVAR	---	---	---	VTRV
<i>Zymomonas mobilis</i> (184)	DAQVVRFA	---	GKKIALVTGDRLEKLTYPADFSAEAMQTEKM	---	---	---	ISVC
<i>Rhizobium loti</i> (200)	DAAIAEWA	---	HIPVKLVPGSPDNVKTWARDIAMAHQRLSSER	---	---	---	THFPDIRT
<i>Brucella suis</i> (244)	DAAIAEWQ	---	EIAVRIIEGSADNTKLTWAKDIEMADKRLRQDH	---	---	---	AVFPDIRT
<i>Rhizobium meliloti</i> (223)	DASIAEWA	---	GIPVLLVEGAVDNFKLTLRRLDSMADEKLTRMA	---	---	---	IPDVRT
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (191)	EAMAMERI	---	GLRPLLVEGAEDNFVTTPADLARFEFELANRDGCGPTRDPESAHPQS	---	---	---	---
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (191)	EAMATERL	---	GLRPLLVEGAEDNFVTTPADLARFEFELANRDGCGASREASAMP	---	---	---	---
<i>Klebsiella aerogenes</i> (133)	---	---	---	---	---	---	---
<i>E. coli</i> O9 (190)	EASALEYC	---	GFHPQLVEGRADNIKVTREPDLALAEFYLTTRI	---	---	---	HQENT
<i>Shewanella oneidensis</i> (208)	EASAMEWA	---	GISPLVAGRADNIKVTREPDLALAEFILMRAK	---	---	---	---
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>brevipalpis</i> (188)	ESSALEKC	---	GILNLVHGRSDNIKITYPEDLNFAEFNNINKE	---	---	---	---
<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acythosiphon pisum</i>) #2 (194)	EASALEYC	---	GYNPLLVGSCRNIKITWPEDLVLANFYLLKNI	---	---	---	IDK
<i>Chlamydia muridarum</i> (176)	DSEAAELL	---	GIEPTLVFSNRVQMKITYPEDLLFAEALLSKAHIR	---	---	---	---
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse ear cress) (262)	DVSIVEYL	---	KHPVYVSGSYTNIKVTTPDDLLLAERILSEDS	---	---	---	---
<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> <i>cultivar</i> group) (204)	---	---	---	---	---	---	---
<i>Listeria monocytogenes</i> (187)	EASLVERI	---	ICPVAVVQGSYNNIKLTPEDMPLAKAILGELGGIAND	---	---	---	---
<i>Clostridium perfringens</i> (188)	DTMIVELL	---	GEKVYLVEGDYKNIKVTTPEDLILAEHFVK	---	---	---	---
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i> (189)	DSVLVERM	---	GFKVLVEGDYKNIKITTPEDLVVAELFLRK	---	---	---	---
<i>Chlorobium tepidum</i> (198)	DAALVERY	---	FFQQAIRIYETGYNNIKITTPEDVFIGEAILAGLKARKSKN	---	---	---	---
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (186)	DAALFEKC	---	GIEVQIVGEETNLKVTTPVDLAIAEFILNSRNS	---	---	---	---
<i>Synechococcus elongatus</i> (186)	DAALFERI	---	GYAVHIVLGEETNLKITTPEDLPLAERILQHRREQDITIG	---	---	---	---
<i>Corynebacterium efficiens</i> (193)	DASIMEWY	---	GVEVTVQGDIMAFKVTTPIDMLAQRTDEAEPTIFEVPGD	---	---	---	---
<i>Bifidobacterium longum</i> (224)	DTRVVVDYL	---	PDEPVAVVSGAETNLKITTPEDIPAKRAEFLGRDPKEARARMAL	---	---	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MW2) (194)	DACKIIVES	---	GHPVKLVRGELYNIKVTTPYDLKVAENAIQGD	---	---	---	ADD
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (194)	DACKIIVES	---	GHPVKLVRGELYNIKVTTPYDLKVAENAIQGD	---	---	---	ADD
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Strain ATCC BAA 255/RG) (195)	DACKIIVES	---	GKDVALAKGEYSNLKITVTDLKIAKSMIEKD	---	---	---	---
<i>Leptospira interrogans</i> (192)	IASWALTF	---	GKTSIVENFLNLKITRNPDLAEVSSIFOKISSDI	---	---	---	---
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype V) (193)	ESTIMGMY	---	NRELITVEGYPYENIKITTPDDYMFKALYDARENEQTYGM	---	---	---	---
<i>Streptococcus agalactiae</i> (serotype III) (193)	ESTIMGMY	---	NRELITVEGYPYENIKITTPDDYMFKALYDARENEQTYGM	---	---	---	---
<i>Streptococcus thermophilus</i> (193)	TNTMMVEL	---	GRIYFAAGSDKNIKLTKDDFMFKAYLAKDKIWLK	---	---	---	---
<i>Mus musculus</i> (Mouse) (237)	EALQAL	---	KYCHKAKLVGFPALWKVTKQDCAAFAMINEKISQETICVMMTKDEES	---	---	---	---
<i>Vibrio vulnificus</i> (18)	EASALEWR	---	GELPALVQGSNNIKVTOPEDLALAEFYLSREKDRK	---	---	---	---
<i>Salmonella typhi</i> (191)	EASALEYC	---	GFHPALVEGRADNIKVTREPDLALAEFYLTTRI	---	---	---	HQEKA
<i>Streptomyces coelicolor</i> (225)	DASMEQL	---	GLAVVVVPGHEAFKVTREPDLVLAEAVLARRRLNDGF	---	---	---	---
<i>Mycoplasma paritum</i> (199)	ESLALIC	---	NKDVKCVGNKFNKVTDFULVVAKEIKKKQL	---	---	---	---
<i>Comesrus</i> (292)	DASLVE	---	G V L V G NIKVT PEDL LAE IL	---	---	---	---

Σχήμα 5.27. Συγκριτική αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF1 με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες IspD. Τα μαύρα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν ανόμοια αμινοξέα, τα μπλε γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα, τα μαύρα γράμματα σε μπλε φόντο δηλώνουν όμοια αμινοξέα, τα κόκκινα γράμματα σε κίτρινο φόντο δηλώνουν πανομοιότυπα αμινοξέα ενώ τέλος τα πράσινα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν τα ασθενώς όμοια αμινοξέα.



Σχήμα 5.28. Δενδρόγραμμα όλων των πρωτεϊνών Isr από διάφορους μικροοργανισμούς.

* Αλληλουχία η οποία έχει κατατεθεί από τους Lee H. και Kang H.S. και αναφέρεται στο στέλεχος ZM4 του *mobilis*. (αριθμός πρόσβασης AF176314).



Στη συνέχεια έγινε συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών οι οποίες με βάση το παραπάνω δένδrogramma ανήκουν σε συγγενικά είδη, (βρίσκονται στην ίδια διακλάδωση όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.28) και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.29. Σε αυτή την περίπτωση η συντηρημένη αλληλουχία παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 1,5% και παρόμοια σε ποσοστό 55,7%.

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	72
<i>Zygononas mobilis</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	MMKR-----	TCNIALIVAAGQV	
<i>Treponema pallidum</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MRRCGACVQKKEY	
<i>Thermotoga maritima</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MNVAILLAAGKG	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	(1)	-----	-----	MAGHGRTFAVHHGEFYWRMRDHIQKMCGEEQ-----	-----	-----	-----	FSCGVVIVAAGRG	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MTVAVIIIVAAGRG	
<i>Rhizobium meliloti</i>	(1)	-----	-----	MAGHGRTFAVHHGEFYWRMRDHIQKMCGEEQ-----	-----	-----	-----	FSCGVVIVAAGRG	
<i>Rhizobium loti</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	MTEASENASAT-----	-----	GGVAVVIVAAGRG	
ORF1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	MMKR-----	TCNIALIVAAGQV	
<i>Mesorhizobium loti</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	MTEASENASAT-----	-----	GGVAVVIVAAGRG	
<i>Helicobacter pylori</i> J99	(1)	-----	-----	-----	MSLIRVNGEAFKLSLESLEEDPFETKETLETLETILIKQTSWVLLAAGES	-----	-----		
<i>Helicobacter pylori</i>	(1)	-----	-----	-----	MSLIRVNGEAFKLSLESLEEDPFETKETLET-----	-----	-----	LIKQTSWVLLAAGES	
<i>Caulobacter vibrioides</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MTFSVVIVAAGSG	
<i>Caulobacter crescentus</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MTFSVVIVAAGSG	
<i>Campylobacter jejuni</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MSEMSLIMLAAGNS	
<i>Brucella suis</i>	(1)	MICIMKSAYSILITPLSERKEKQPFERTINQIFSGICRRKALFGLCAQSLAEVTVI-----	-----	-----	-----	-----	-----	SKAAAVIVAAGRG	
<i>Brucella melitensis</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MAAGRG	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MCESTMKFCIVIVAAGRG	
Consensus	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	SVVIVAAGRG	

	(73)	73	80	90	100	110	120	130	144
<i>Zygononas mobilis</i>	(18)	NVCVKAL--CKQYRKTAGKANLAHAIDNLLAHFEIDTVQVVIADGHCTLYCEAVG---DRLCFQFVIGGVFR							
<i>Treponema pallidum</i>	(14)	LFLTSRQPGVCLLSEILVRALEARSEFLVWVTVPAGEVAYAESQVACDSRLSAFPS-RTRPVILYVPGAHTR							
<i>Thermotoga maritima</i>	(13)	ERMSENVE--KQFLEIEGRMLFEYFLSTELKSEAIDGVVIVIRREWFVVEKRVFH---EKVLGIVEGGDTR							
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	(44)	ERAGCSAEGFKQYRTIGI RFVIAHTLIEFATWPGAGFVVVVIHFDDEFLFAAARKRMAGALELTVVHGATR							
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	(14)	TRAGEGL--FKQWRDLAGREVLAQTVAAEFAG---LGRILVVLHPDDMGLGMDLIG----GSVVLVAGGSTR							
<i>Rhizobium meliloti</i>	(44)	ERAGCSAEGFKQYRTIGI RFVIAHTLIEFATWPGAGFVVVVIHFDDEFLFAAARKRMAGALELTVVHGATR							
<i>Rhizobium loti</i>	(25)	ARAGCAN-GFKQYCNIGGRAVIAHTLIEFLAHERTDRIVVAIHADCHELFRCAAG--SQAERTVTAIIGGPTR							
ORF1	(18)	KRAGEGL--FKQYRQIAGKAILAHAIENLLAHFEIDTVQVVIADGHCTLYCEAVG---DRLCFQFVIGGVFR							
<i>Mesorhizobium loti</i>	(25)	ARAGCAN-GFKQYCNIGGRAVIAHTLIEFLAHERTDRIVVAIHADCHELFRCAAG--SQAERTVTAIIGGPTR							
<i>Helicobacter pylori</i> J99	(50)	KRESRAIK--KQWLRSHHTFLWLSVYESFEKALDFKEVILVVSSELDYVYICRHYP-----KIKLVKGGASR							
<i>Helicobacter pylori</i>	(47)	RRESCTIK--KQWLRSHHTFLWLSVYESFEKALDFKEVILVVSSELDYIYIKRHYP-----EIKLVKGGASR							
<i>Caulobacter vibrioides</i>	(14)	TRAGEGQ--AKQWRVLAGREVLRWSVEAFLAAGAAEVVVVITADGEAFLPRMLEG----IQGWRSTLGGATR							
<i>Caulobacter crescentus</i>	(14)	TRAGEGQ--AKQWRVLAGREVLRWSVEAFLAAGAAEVVVVITADGEAFLPRMLEG----IQGWRSTLGGATR							
<i>Campylobacter jejuni</i>	(15)	TREHTKVK--KQFLRLGILFLWLYATNLSSFYFFKKIVVTSSNITYMKKETKNY-----EFIEGGDTR							
<i>Brucella suis</i>	(68)	ERAGCSAEGFKQYRLIGAEAVLAETLPAFIDCEPLIGTIAVVIHFDCHALYRRAVF--EKHENVILVTGGPTR							
<i>Brucella melitensis</i>	(7)	ERAGCSAEGFKQYRLIGAEAVLAETLPAFIDCEPLIGTIAVVIHFDCHALYRRAVF--EKHENVILVTGGPTR							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	(19)	ERAGSFEEGFKQYRFIGGRAVIEHTLATFLRWNLACPIVVVSHACCAALLSPILARLCAGERITTVTGGATR							
Consensus	(73)	RAG EKQYR IGGR VLAHTLE FL VVVVI DD I A V V GG TR							

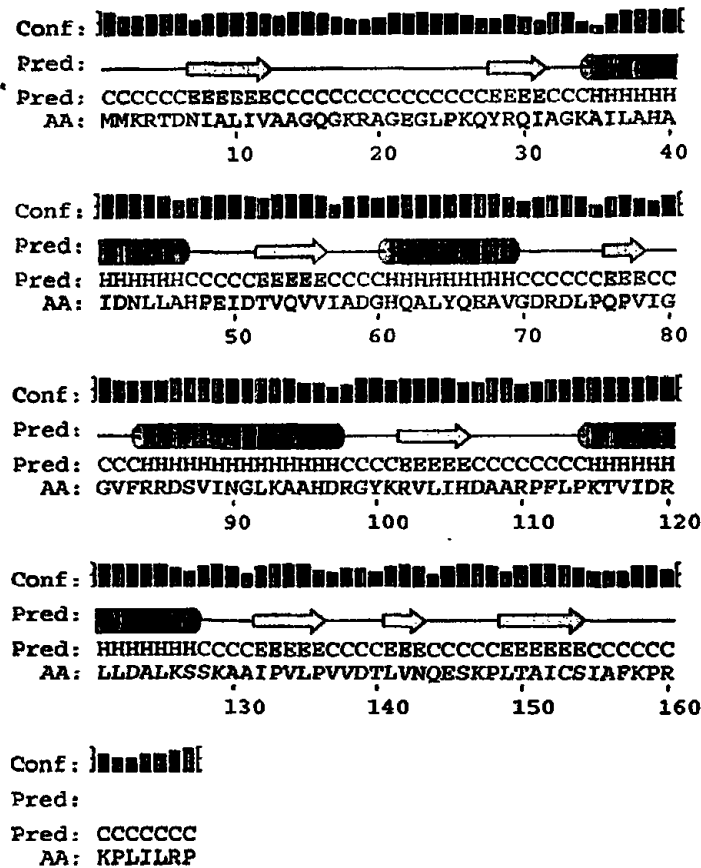


	(145)	145	150	160	170	180	190	200	216
<i>Zygonomonas mobilis</i> (85)	PDSVINGLKAAHCR	-GYKRVLIHDAARFFLEKTV	IDRLILALKS	--SKAAIFVLFVVETLVNQ	----	EVEA			
<i>Treponema pallidum</i> (85)	SASVRAGLDAMATH	-APCVVLVHIGARFFVSVALIHSVLEATCR	--YGAAVFVIEATLTFKGVAA	DGSIETH					
<i>Thermotoga maritima</i> (80)	SCSVRSALFELEKE	-SPSYVLVHLSARFFLRKKHVSEVLRARET	--GAATLALKNSALVRVEN	--DRIEY					
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (116)	QLSVLAGLEAVAAT	-GVEYVMIHDAVPEFFDHTLLDRCGAALRDG	-AÇALLFAI	AVADTLKRTKAAGLVAET					
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (76)	SESVKNALFALEGS	-LVTRVLIHIGARPLVEASVTA	AVLALET	--TEGAAPALAVILALWRG	-EAGLVAET				
<i>Rhizobium meliloti</i> (116)	QLSVLAGLEAVAAT	-GVEYVMIHDAVPEFFDHTLLDRCGAALRDG	-AÇALLFAI	AVADTLKRTKAAGLVAET					
<i>Rhizobium loti</i> (94)	QESVRLGLLALKEH	-APGQVLIHDAVPEFFVDADLI	IDRTISAIGE	--NEGALFALFVADTLKRESAAGVVAET					
ORF1 (85)	PDSVINGLKAAHCR	-GYKRVLIHDAARFFLEKTV	IDRLILALKS	--SKAAIFVLFVVETLVNQ	----	ESKE			
<i>Mesorhizobium loti</i> (94)	QESVRLGLLALKEH	-APGQVLIHDAVPEFFVDADLI	IDRTISAIGE	--NEGALFALFVADTLKRESAAGVVAET					
<i>Helicobacter pylori</i> J 99 (114)	QESVRNALKVIIDST	----	YTTTSDVAPGLANMEALKSL	FLITLQCTSHYCIAPYLCYDTAIYIN	----	EA			
<i>Helicobacter pylori</i> (111)	QESVRNALKIIDSA	----	YTTTSDVAPGLANIEALKSL	FLITLQCTSHYCIAPYLCYDTAIYIN	----	EA			
<i>Caulobacter vibrioides</i> (80)	ALSVÇAGLAALSERFGAEFVMIHDAAPFFVSRNVILALIGALSD	--ADLALFALAVADTLKRÇ	-PTGEAÇT						
<i>Caulobacter crescentus</i> (80)	ALSVÇAGLAALSERFGAEFVMIHDAAPFFVSRNVILALIGALSD	--ADLALFALAVADTLKRÇ	-PTGEAÇT						
<i>Campylobacter jejuni</i> (77)	AESLKKALEIIDSE	----	FVMVSLVAPVILVSKNIFDLRIENLCK	--ADCTEALKVAETTLFDN	----	EA			
<i>Brucella suis</i> (138)	QESTRLGLLALKDE	-APQVLIHIGVPEFFIGQDLIERIIANLTP	--DNGVLFALAVADTLKRAAADGMVETT						
<i>Brucella melitensis</i> (77)	QESTRLGLLALKDE	-APQVLIHIGVPEFFIGQDLIERIIANLTP	--DNGVLFALAVADTLKRAAADGMVETT						
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (91)	QCSVLAGEALSSH	-GLTHVMIHDAVPEFFVAALMLERIAALHRAG	-AGGVLFALFVETTLKRGLED	-RVVET					
Consensus (145)	QESVR GL AL	G	VLIHDAARFFV	LIDRLI AL	AALFAL VADTLKR	G V ET			

	(217)	217	230	240	250	260	270	288
<i>Zygonomonas mobilis</i> (149)	VDRNLFHRVÇTFÇAFDLET	VIAAHÇAWTGS	--DEPTDCAÇVVFAGKKIALVTGE	RLLEKLTYPADF	SVAEA			
<i>Treponema pallidum</i> (154)	LIRSRVRLAÇTFÇGFCYASL	CAAHHRAATDG	-EQYTDESELYARYGGTVHVCAGER	SNVKITYPEDLEÇRAS				
<i>Thermotoga maritima</i> (147)	IPRKGVYRIITÇAFSYEILK	KAHENGGE	----	WDDTEFPVÇKLGVKIALVEG	FLCFKVIKEDLELASI			
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (186)	VERTELYAAÇTFÇCFRLEP	ILSAHRRAAASGRSDFTDCA	IAEWAGIFVLLVEGAVENFKLT	RRDLSVADE				
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (144)	ÇDREGLYRAÇTFÇGFRFPE	ILAAHRAHEG	----	GAÇDVEVAFHAGLSVAIVEGHE	ENLKITYAFDFARAEA			
<i>Rhizobium meliloti</i> (186)	VERTELYAAÇTFÇCFRLEP	ILSAHRRAAASGRSDFTDCA	IAEWAGIFVLLVEGAVENFKLT	RRDLSVADE				
<i>Rhizobium loti</i> (163)	VSRSGLIHAAÇTFÇGFFYGF	ILAAHCKAFÇLGR	LDFTDCAAIAEWAHIFVKI	VFGSFDNVKLTWARDIAVAÇ				
ORF1 (149)	ITAICSIAFKERKELILRF	----						
<i>Mesorhizobium loti</i> (163)	VSRSGLIHAAÇTFÇGFFYGF	ILAAHCKAFÇLGR	LDFTDCAAIAEWAHIFVKI	VFGSFDNVKLTWARDIAVAÇ				
<i>Helicobacter pylori</i> J 99 (176)	LDREAIKLIÇTFÇLSHTKT	LSALNÇGGFK	----	DESAILÇAFFNSVSYIEGSKELHKL	TTSGDLNFTF			
<i>Helicobacter pylori</i> (173)	LDREAIKLIÇTFÇLSHTKAI	LSALNÇGDFK	----	DESAILÇAFFDRVSYIEGSKELHKL	TTSGDLNFTL			
<i>Caulobacter vibrioides</i> (149)	VSREHLWRAÇTFÇAARRCT	ILAAAYAATHG	----	EPTDCAVVEAAGGRIAL	AGFLITKLTYPEDTAVAEH			
<i>Caulobacter crescentus</i> (149)	VSREHLWRAÇTFÇAARRCT	ILAAAYAATHG	----	EPTDCAVVEAAGGRIAL	AGFLITKLTYPEDTAVAEH			
<i>Campylobacter jejuni</i> (137)	LÇREKIKLIÇTFÇISKTKL	KKALDÇNLEF	----	TCDSTAIAMCGKIWFEGEE	ARKLTFKEDLAKLIL			
<i>Brucella suis</i> (207)	ISRTGLFAAÇTFÇAFFYAFIL	AHEKAFAINRTDFTDCAAIAEWÇE	I	AVRIIEGSAENKLTWAKDIEYACK				
<i>Brucella melitensis</i> (146)	ISRTGLFAAÇTFÇAFFYAFIL	AHEKAFAINRTDFTDCAAIAEWÇE	I	AVRIIEGSAENKLTWAKDIEYACK				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (160)	VSRQGLYAAÇTFÇSEFSYSCIL	FAHRAAAASGKTCDFTDCA	IAEWGILTVLITFGSVENKLT	KRCIAVADE				
Consensus (217)	V R GLY AÇTFÇAF	ILAAH A	CDFTDCAAI E	GI V IVEGS DN KLTYP	CLAMAC			

Σχήμα 5.29. Συγκριτική αντιστοίχιση των πρωτεϊνών IspD που ανήκουν σε συγγενικά είδη.

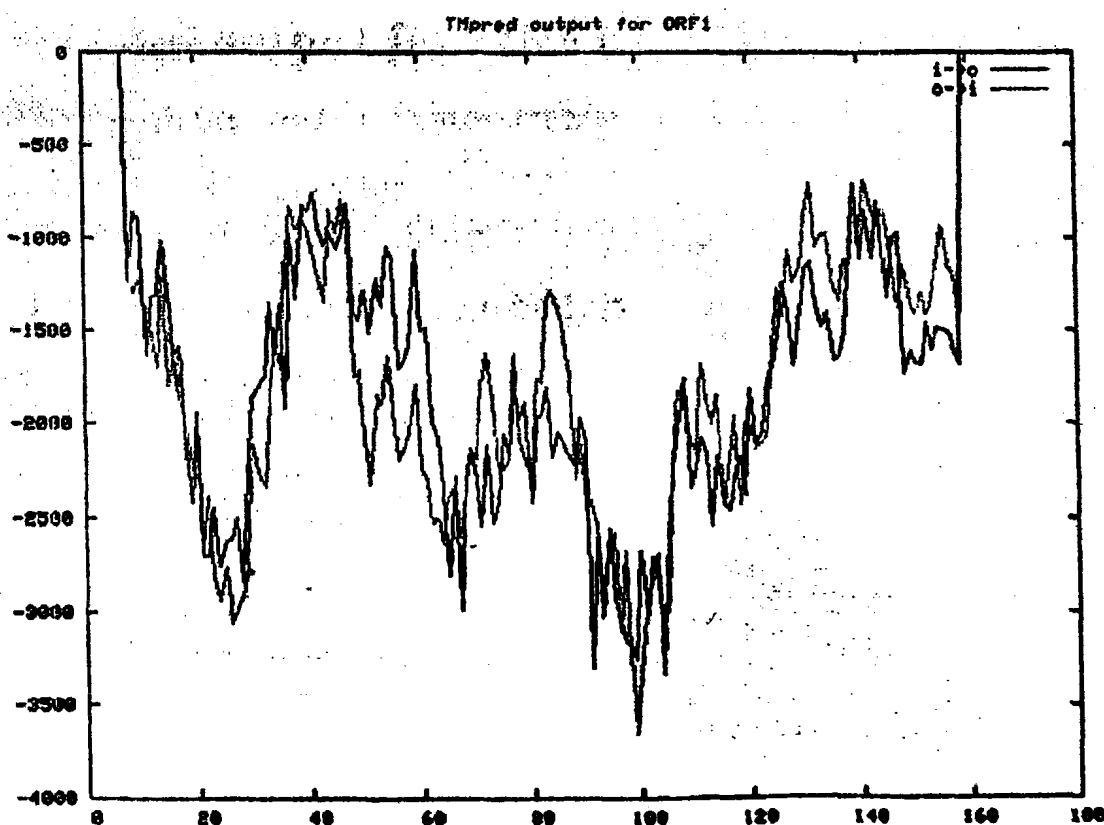
Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1 υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED της SWISS-PROT και η δομή της φαίνεται στο Σχήμα 5.30.



Σχήμα 5.30. Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1.



Τέλος, με τη χρήση του προγράμματος Vector NCI 6, υπολογίστηκαν οι παράμετροι για την εύρεση διαμεμβρανικών ελικών στη δομή της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1 του *Z. mobilis* και τα αποτελέσματα έδειξαν τελικά ότι δεν υπάρχουν τέτοιου είδους έλικες στη δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, καθώς δεν υπολογίστηκε καμία τιμή μεγαλύτερη του 500 που θεωρητικά αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης τέτοιου είδους ελικών (Σχήμα 5.31).



Σχήμα 5.31. Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1.

5.10 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.

Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 παρατίθεται παρακάτω:

MTEKMISVCGSGFDVHCFEAGDHIMLGGIKIPHDHGLAGH
SDADVALHALTDALLGAIADGDIGTHFPPSDPQWKGANST
QFLEYAVALAKKAGAIIDHADVTVICEAPKVGPRPAMRKH
IAQILGLPEQRVSIKATTTEKLGFTGRKEGIAAQAVTSIRL
*PDILCStop

Όπως και ανωτέρω (σελ. 190) με τη χρήση του ίδιου προγράμματος, υπολογίστηκαν διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 και οι οποίες παρατίθενται ακολούθως:

Αριθμός αμινοξέων: 167

Μοριακό βάρος: 17629,2 Da

Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο, pI: 6.10

% Σύσταση αμινοξέων:	Ala (A) 22	13.2%
	Arg (R) 5	3.0%
	Asn (N) 1	0.6%
	Asp (D) 12	7.2%
	Cys (C) 4	2.4%
	Gln (Q) 5	3.0%
	Glu (E) 7	4.2%
	Gly (G) 17	10.2%
	His (H) 9	5.4%
	Ile (I) 15	9.0%
	Leu (L) 13	7.8%
	Lys (K) 10	6.0%

Met (M)	4	2.4%
Phe (F)	5	3.0%
Pro (P)	9	5.4%
Ser (S)	7	4.2%
Thr (T)	10	6.0%
Trp (W)	1	0.6%
Tyr (Y)	2	1.2%
Val (V)	9	5.4%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Συνολικός αριθμός αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων (Asp + Glu): 19

Συνολικός αριθμός θετικά φορτισμένων αμινοξέων (Arg + Lys): 15

Ατομική σύσταση:	Άνθρακας	C	781
	Υδρογόνο	H	1247
	Άζωτο	N	217
	Οξυγόνο	O	231
	Θείο	S	8

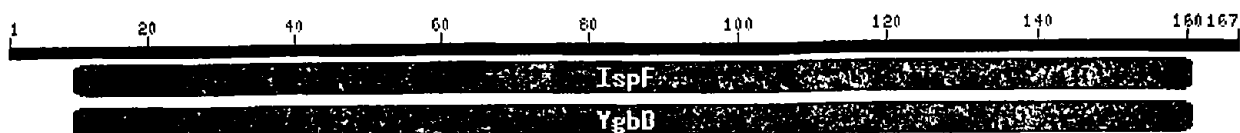
Μοριακός τύπος: $C_{781}H_{1247}N_{217}O_{231}S_8$

Συνολικός αριθμός ατόμων: 2484

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση, σε επίπεδο αμινοξέων, της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF2 με άλλες πρωτεΐνες, οι αλληλουχίες των οποίων είναι κατατεθειμένες σε γνωστές τράπεζες δεδομένων (χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους BLASTP 2 και PSI-BLAST). Τα αποτελέσματα δείχνουν ισχυρή ομολογία της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF2 με την πρωτεΐνη IspF (συνθάση της 2,4 κυκλοδιφωσφορικής 2C-μέθυλο-D-ερυθριτόλης, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase) (Veau, *et al.*, 2000, Herz *et al.*, 2000) από διάφορους οργανισμούς σε ποσοστό που κυμαίνεται από 28% έως και 61% (ενδεικτικά παρατίθενται μερικά από τα αποτελέσματα της εύρεσης ομολογιών). Η πρωτεΐνη IspF επίσης

εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ισοπρενοειδών μέσω της εναλλακτικής οδού του μεβαλονικού οξέος (πορεία της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης) και είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της 2-φωσφορικής 4-διφωσφοκυτιδυλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphate) σε 2,4 κυκλοδιφωσφορική 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate).

ORF2



IspF, συνθάση της 2,4 κυκλοδιφωσφορικής 2C-μέθυλο-D-ερυθριτόλης [μεταβολισμός λιπιδίων]

Query:10 GSGFDVHCFEAGDHIMLGGIKIPHDHGLAGHSDADVALHALTDALLGAIADGDIGTHFPP 69
Sbjct:4 GLGFDVHRFGEGRPLILGGVEIPHEKGLLGHSDDGVLLHALTDALLGAAGLGDIGKHFPD 63

Query:70 SDPQWKGANSTQFLEYAVALAKKAGAIIDHADVTVICEAPKVGYPYRPAMRKHIAQILGLP 129
Sbjct:64 TDPRWKGADSRILLKEAVELVREKGYRIGNVDITIIAQRPKLGPYREAMRANIAELLGIP 123

Query: 130 EQRVSIKATTTEKLGFTGRKEGIAAQAVTSIR 161
Sbjct: 124 VDRINVKATTTEKLGFTGRGEGIACQAVVLLV 155

YgbB, οικογένεια YgbB. Η πρωτεΐνη YgbB είναι ένα υποθετικό ένζυμο της πορείας της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (βιοσύνθεση τερπενοειδών).

Query:10 GSGFDVHCFEAGDHIMLGGIKIPHDHGLAGHSDADVALHALTDALLGAIADGDIGTHFPP 69
Sbjct:4 GLGFDVHRFGEGRPLILGGVEIPHEKGLLGHSDDGVLLHALTDALLGAAGLGDIGKHFPD 63

Query:70 SDPQWKGANSTQFLEYAVALAKKAGAIIDHADVTVICEAPKVGYPYRPAMRKHIAQILGLP 129
Sbjct:64 TDPRWKGADSRILLKEAVELVREKGYRIGNVDITIIAQRPKLGPYREAMRANIAELLGIP 123

Query: 130 EQRVSIKATTTEKLGFTGRKEGIAAQAVTSIR 161
Sbjct: 124 KDTINLKATTTEGLGFTGRGEGIACQAVVLLV 155

Με τη χρήση των προγραμμάτων CLUSTALW και Vector NTI 6 έγινε συγκριτική αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF2 με όλες τις γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες IspF, οι αλληλουχίες των οποίων αποκτήθηκαν από τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη ισχυρά συντηρημένων περιοχών στην αλληλουχία των πρωτεϊνών οι οποίες και φαίνονται στο Σχήμα 5.32. Η συντηρημένη αλληλουχία που αποκαλύφθηκε μεταξύ των πρωτεϊνών IspF παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 0,2% και παρόμοια σε ποσοστό 22,9%. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα κατασκευάστηκε το δένδrogramma όλων των πρωτεϊνών IspF (Σχήμα 5.33).

209

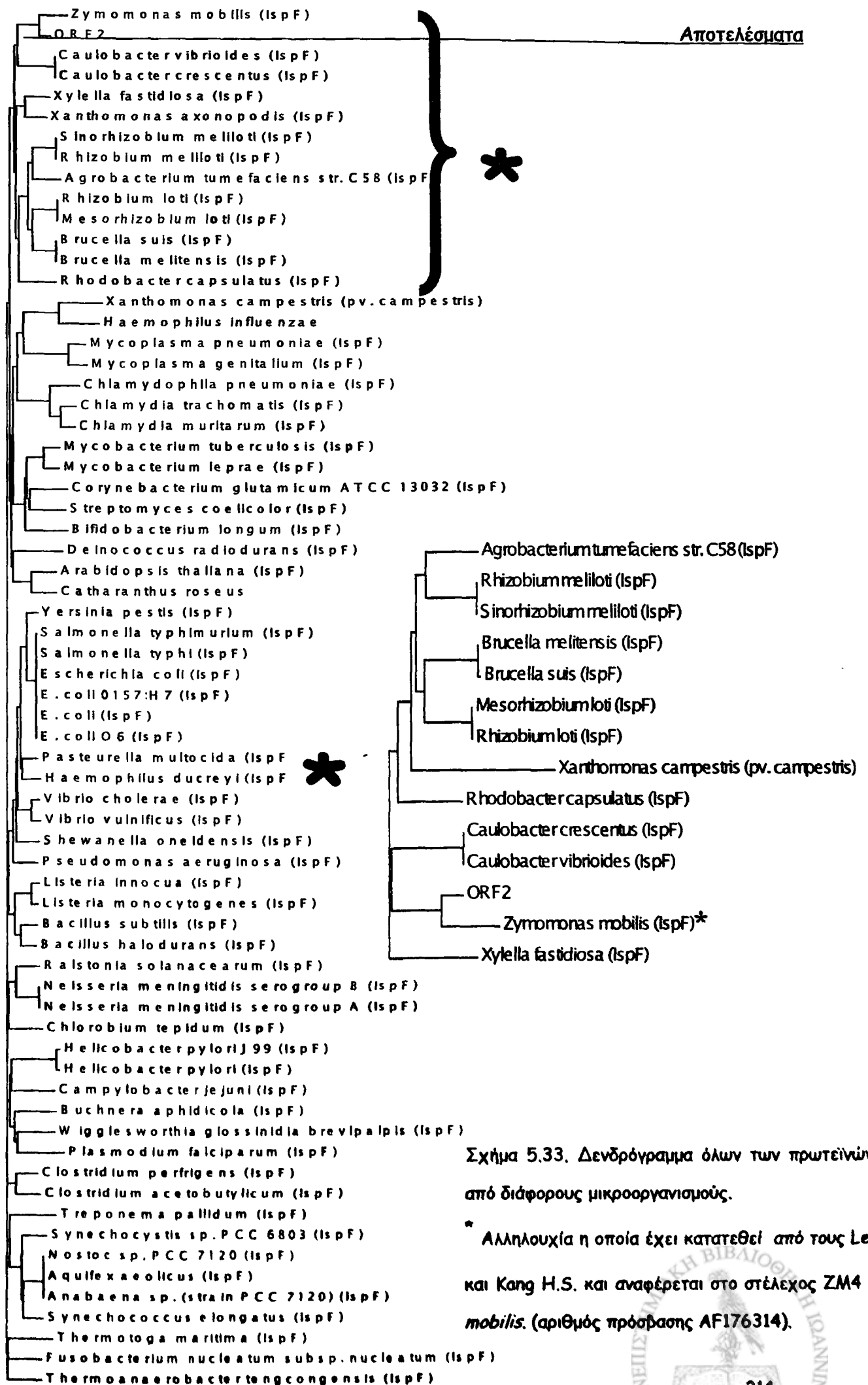
	(306)	306	320	330	340	350	366
<i>Zygonomonas mobilis</i> (IsP) (232)		EDVHCFEA		GDHIMLGGIKIFHD		HGLAHGSDA	
<i>Yersinia pestis</i> (IsP) (7)		EDVHKEGEN		GSGPLIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Xylella fastidiosa</i> (IsP) (21)		YCVHAFEG		GLHVMIGGVVRVPHR		CGVLAHSDG	
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (85)		SVLAGLIALP		DGVRAEDCFVLVHCAA		RPNLALACL	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (IsP) (11)		YCVHAFEG		GLHVMIGGVVRAHS		HGVLAHSDG	
<i>Vibrio cholerae</i> (IsP) (8)		EDVHREG		GEGPIIIGGVKIFYE		CGLIAHSDG	
<i>Treponema pallidum</i> (IsP) (249)		TCMHALCA		GRPLIILAGIHFPSK		KCAQGHSDA	
<i>Thermotoga maritima</i> (IsP) (12)		YDRHPLVE		GRRLVLAGVEIDAP		LGLIGHSDG	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (IsP) (10)		YDIHRLVG		LRPLIILGGVTIAHH		LGLDGHSDA	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (IsP) (273)		YCVHQLVC		GLGVTLGGVFIFHC		RKLSGHSDA	
<i>Salmonella typhimurium</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (IsP) (229)		YCVHAFCE		GLHVVLCGVKVEHV		KALIGHSDA	
<i>Rhizobium meliloti</i> (IsP) (273)		YCVHQLVC		GLGVTLGGVFIFHC		RKLSGHSDA	
<i>Rhizobium loti</i> (IsP) (252)		YCVHAFEP		GDHVTLCGVAFPHD		KKLSGHSDA	
<i>Ralstonia solanacearum</i> (IsP) (12)		YCVHAI VE		GRKLIILGGVEIFHT		RGLIGHSDA	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IsP) (7)		YCVHREG		EGDFITIGGVRIPHK		HGLVAHSDG	
<i>Pasteurella multocida</i> (IsP) (8)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
ORF2 (13)		EDVHCFEA		GDHIMLGGIKIFHD		HGLIGHSDA	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (IsP) (11)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (IsP) (10)		YCVHQLTE		GRKLIILGGVEIFPE		KGLIGHSDA	
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (IsP) (10)		YCVHQLTE		GRKLIILGGVEIFPE		KGLIGHSDA	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (IsP) (9)		KFKYRIKRAE		CKKFWIGGVVEIDSKYT		YCHDSDEAS	
<i>Mycoplasma genitalium</i> (IsP) (9)		SKKYHIKLRKE		SKKKEWLGGVDFENSKYT		YDIENSDEVS	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (IsP) (11)		TCVHPLEP		GRPCWLVLGLIFESA		DGCCHSDG	
<i>Mycobacterium leprae</i> (IsP) (11)		EDVHVFEF		GRPCWLVLGLIFEN		DGCCHSDG	
<i>Mesorhizobium loti</i> (IsP) (252)		YCVHAFEP		GDHVTLCGVAFPHD		KKLSGHSDA	
<i>Listeria innocua</i> (IsP) (8)		YCVHKL DY		LRPLIILGGIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>Helicobacter pylori</i> J 99 (IsP) (256)		EDTHAFI		KCKPMVLGGVLDCE		FGLKAHSDG	
<i>Helicobacter pylori</i> (IsP) (253)		EDTHAFI		KCKPMVLGGVLDCE		FGLKAHSDG	
<i>Haemophilus influenzae</i> (83)		SVLGINAIA		EKN---AWLVHCAA		RPCLQHADI	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (IsP) (8)		YCVHKLVE		GRKMLGGVEVFEHT		KGVIGHSDG	
<i>Escherichia coli</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>E. coli</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Deinococcus radiodurans</i> (IsP) (12)		EDVHRIAP		GLPLVLGGVAFI PHA		ELGAVAHSDG	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (IsP) (13)		TDVHQL EA		GKPCWIACLIFEGV		DGCCHSDG	
<i>Clostridium perfringens</i> (IsP) (7)		YCVHKL VE		LRPLIILGGVRIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (IsP) (7)		YCVHKL VE		LRPLIILGGVRIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (IsP) (22)		QDSHRELFEES		STKPCIILGGIIFDHC		PGFQAHSDG	
<i>Chlamydia trachomatis</i> (IsP) (23)		QDSHRELFEES		STKPCIILGGIIFDHC		PGFQAHSDG	
<i>Caulobacter vibrioides</i> (IsP) (231)		EDVHREG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Caulobacter crescentus</i> (IsP) (231)		EDVHREG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Campylobacter jejuni</i> (IsP) (216)		EDVHEFG		GRPLIILGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Buchnera aphidicola</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Brucella suis</i> (IsP) (296)		YCVHSFEP		GDHVTLCGVKIFHE		AKLNGHSDA	
<i>Brucella melitensis</i> (IsP) (235)		YCVHSFEP		GDHVTLCGVKIFHE		AKLNGHSDA	
<i>Bacillus subtilis</i> (IsP) (8)		EDVHQLVE		GRPLIILGGIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>Bacillus halodurans</i> (IsP) (8)		EDVHQLFAE		GRPLIILGGIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>Aquifex caelicus</i> (IsP) (11)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (IsP) (246)		YCVHQL EA		GRPLIILGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Chlorobium tepidum</i> (IsP) (7)		EDVHQLFAE		GRPLIILGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Listeria monocytogenes</i> (IsP) (8)		YCVHKL AY		LRPLIILGGVRIIFYE		KGLIGHSDA	
<i>E. coli</i> O6 (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Salmonella typhi</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>E. coli</i> O157:H7 (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Haemophilus ducreyi</i> (IsP) (8)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Vibrio vulnificus</i> (IsP) (8)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Shewanella oneidensis</i> (IsP) (9)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Thermotoga bacteroides</i> (IsP) (10)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Synechococcus elongatus</i> (IsP) (10)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (IsP) (11)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Anaerobaculum thurmanii</i> (IsP) (81)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Cathartus roseus</i> (86)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> (IsP) (7)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Streptomyces coelicolor</i> (IsP) (21)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Bifidobacterium longum</i> (IsP) (12)		EDVHAFEG		GEGPIIIGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	
<i>Plasmodium falciparum</i> (IsP) (70)		YDIHRLVS		LRALIILGGVHIPHE		LGLIGHSDA	
<i>Chlamydia muridarum</i> (IsP) (23)		QDSHRELFEES		STKPCIILGGIIFDHC		PGFQAHSDG	
<i>Citrus</i> (306) (11) VII F				GRPLIILGGVRIIFYE		KGLIAHSDG	

	367	380	390	400	410	427
<i>Zymomonas mobilis</i> (Isf) (263)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGANSTQ----	FLFYAVALLAKKAGATIDHA				
<i>Yersinia pestis</i> (Isf) (40)	EVVHALTEALIGAAALGDIGKLFPTDPAFKGADSRE----	LI REAYRRILAKGYKLGNI				
<i>Xylella fastidiosa</i> (Isf) (52)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FVRH HLLIRERIR WCVGNV				
<i>Xanthomonas campestris</i> (p. campestris) (119)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	ERLWRALTEQLFRHQLIFG				
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (Isf) (42)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLQH DGLIRERGWVGNV				
<i>Vibrio cholerae</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LIKCVYRRVKA GYVLGNA				
<i>Treponema pallidum</i> (Isf) (280)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RHIVQLVRAACWRLVNI				
<i>Thermotoga maritima</i> (Isf) (43)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LIKETVKILEERGFVSINV				
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Isf) (41)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LIACVHQLILERGWRIINL				
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Isf) (304)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Salmonella typhimurium</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI REAWRRIQAKGYTLGNV				
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (Isf) (260)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Rhizobium meliloti</i> (Isf) (304)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Rhizobium loti</i> (Isf) (283)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Isf) (43)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
<i>Pasteurella multocida</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLHHAARTVREERGTVINA				
ORF2	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	FLFYAVALLAKKAGATIDHA				
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (Isf) (42)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI SCVNELIRT GWRIGNI				
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (Isf) (41)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (Isf) (41)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Isf) (48)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Mycoplasma genitalium</i> (Isf) (48)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Isf) (42)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Mycobacterium leprae</i> (Isf) (42)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Mesorhizobium loti</i> (Isf) (283)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Listeria innocua</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Helicobacter pylori</i> 99 (Isf) (287)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Helicobacter pylori</i> (Isf) (284)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Haemophilus influenzae</i> (114)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. nucleatum (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Escherichia coli</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>E. coli</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Deinococcus radiodurans</i> (Isf) (44)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (Isf) (44)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Ostiodium perfringens</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (Isf) (56)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Isf) (57)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Caulobacter vibrioides</i> (Isf) (262)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Caulobacter crescentus</i> (Isf) (262)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Campylobacter jejuni</i> (Isf) (247)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Buchnera aphidicola</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Brucella suis</i> (Isf) (327)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Brucella melitensis</i> (Isf) (266)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Bacillus subtilis</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Bacillus halodurans</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Aquifex aedificus</i> (Isf) (42)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Isf) (277)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Chlorobium tepidum</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Listeria monocytogenes</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>E. coli</i> O6 (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Salmonella typhi</i> (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>E. coli</i> O157:H7 (Isf) (38)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Haemophilus ducreyi</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Vibrio vulnificus</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Shewanella oneidensis</i> (Isf) (40)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Thermotoga bacteriengensis</i> (Isf) (41)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Synechococcus elongatus</i> (Isf) (41)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Isf) (112)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Catharanthus roseus</i> (117)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Wigglesworthia glossinidia brevipalpis</i> (Isf) (39)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Streptomyces coelicolor</i> (Isf) (53)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Bifidobacterium longum</i> (Isf) (57)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Plasmodium falciparum</i> (Isf) (119)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
<i>Chlamydia muridarum</i> (Isf) (57)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				
Consensus (367)	EVVHALTEALIGALGAGDGTGTHFFPSCDQWKGADSGV----	LI RAAYCSVQACGWQAVNV				

	(428)	428	440	450	460	470	488
<i>Zymomonas mobilis</i> (Isf) (320)	DVTVIC	-EAPKVG	FPYFAMRKILPRFWG	FLNKGSGASKQCRCLKSVL	CAAKK	GSLFKRLPVE	
<i>Yersinia pestis</i> (Isf) (97)	DITIIA	-CAPKMA	PHIPQMRVNLAEDLC	QMMDLNKATTE	CLGFTGR	GEGIAEAVVLI	
<i>Xylella fastidiosa</i> (Isf) (109)	DATAIC	-ESPKIA	FPYVAMREGIARLLEVQ	PECVEVKATTSEGL	FGTGR	GEGIAA	VVLI
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (178)	LTEASA	-AGVLV	TDEPMATERILGRPL	IVEGAEVNEKVT	TPALLAREFE	ELANRE	RGASR
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (Isf) (99)	DITVIC	-ERPKVG	PHAVAMRERLADLLATEL	DAVSVKATTSE	CLGFTGR	GEGIAA	CAVLI
<i>Vibrio cholerae</i> (Isf) (96)	DVTIIA	-CAPKMA	PHYICAMCAIAECL	LEILGNINVKAT	TTEKLGFTGR	KEGIAE	AVVLI
<i>Treponema pallidum</i> (Isf) (337)	DAVVCI	-EQEAL	HEFREAMRASLA	CAIDTHVTRV	FVKAPTAERL	GFVGS	GAAVTAQAVVLI
<i>Thermotoga maritima</i> (Isf) (99)	DATVVA	-STVKLS	SPYREKIVENLKS	ALET--SRVNV	KFGSG	HLGFE	GEFISAYAVCI
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Isf) (98)	DNVIVA	-EQPKL	PHIQAMKENLAKV	LITDFELIGIKAT	TNERL	GFTGR	EGGIAAYSVALI
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Isf) (361)	DISLIA	-EAPKVG	EHRCQMRNLAAIL	GISLDRCSIKAT	TNEKLG	FVGRNE	GIAAIAATV
<i>Salmonella typhimurium</i> (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (Isf) (317)	DVTLIC	-ERPKVG	PHAVAMAELAR	IMEIEFSRV	SVKATTSE	RLGFTGR	EGGIAIAATVLI
<i>Rhizobium meliloti</i> (Isf) (361)	DISLIA	-EAPKVG	EHRCQMRNLAAIL	GISLDRCSIKAT	TNEKLG	FVGRNE	GIAAIAATV
<i>Rhizobium loti</i> (Isf) (340)	DITLIC	-EAPRV	GEHREMTAALSR	MLGISADRI	SIKATTNE	KLG	FVGRGEGIAAIAATV
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Isf) (100)	DATVIA	-CKEKL	APHVFGVAVANLA	ADLGIAEGR	CNVKATNE	KLG	FEGRDGIACA-VLI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Isf) (95)	DATIVA	-CAPKMA	PHIEITMRGLAED	LGVADVQVNV	KATTT	ERL	GLFTGREGGIAEAVALL
<i>Pasteurella multocida</i> (Isf) (96)	DVTIIA	-CAPKMR	PHIDAMRAAIAE	CLACIEQVNV	KATTSE	RLGFTGR	GEGIAEAVALL
ORF2 (101)	DVTVIC	-EAPKVG	FPYFAMRKHIA	CIILGLEQ	RVSIKATTTE	KLGFTGR	KEGIAA
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (Isf) (99)	DSVVA	-EREKL	KEHIKIMREKLAD	ILCLEPNC	IGVKATTNE	KLG	FVGRGEGIAEAVALL
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (Isf) (98)	DITVIA	-CKEKL	APHIPQMRANIA	ADLGIDIS	CVNIKGTNE	KLG	GYLGRMEGIEACA-VLI
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A (Isf) (98)	DITVIA	-CKEKL	APHIPQMRANIA	ADLGIDIS	CVNIKGTNE	KLG	GYLGRMEGIESCA-VLI
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Isf) (109)	DITLIE	FSQCKM	DYKHAIFECIT	LRITELTNL	KREPLIE	ISCL	MAVIL
<i>Mycoplasma genitalium</i> (Isf) (109)	DISLEI	PQEQK	VDCYKHAIFA	FAFICSIR	ISELT	TNL	KREPLIS
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Isf) (99)	VVCVIG	-NREKIG	WRLEACAVLS	RLLNAP---	VSV	SATTTD	GLGLTGR
<i>Mycobacterium leprae</i> (Isf) (99)	SVQVIG	-NREKIG	WRLEACAVLS	RLLNAP---	VSV	AATTTD	GLGLTGR
<i>Mesorhizobium loti</i> (Isf) (340)	DITLIC	-EAPRV	GEHREMTAALSR	MLGISADRI	SIKATTNE	KLG	FVGRGEGIAAIAATV
<i>Listeria innocua</i> (Isf) (96)	DATIIA	-EKPKMA	PHYVEIMKRIAEL	LHEPSCVNV	KATTTE	KLGFTGR	GEGIASLAVLI
<i>Helicobacter pylori</i> 99 (Isf) (344)	GAITFS	-EIPKIP	YKPAILENLS	QLLGLEK	SCISIKATTME	KMG	FGIKQCEGLI
<i>Helicobacter pylori</i> (Isf) (341)	GAITFS	-EIPKIP	YKPAILENLS	QLLGLEK	SCISIKATTME	KMG	FGIKQCEGLI
<i>Haemophilus influenzae</i> (171)	LSTGIC	-QGANIT	DEASAEIAG	FRPHLVAGR	SDNLKTR	FEALAE	FYLTRNI
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (Isf) (96)	DSITVM	-CKEKL	RPYIDSIR	ENIAKILEIN	SELINVK	ATEKLG	FTGVKSY-VLI
<i>Escherichia coli</i> (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>E. coli</i> (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>Deinococcus radiodurans</i> (Isf) (101)	ALVTL	-DREKL	GPLRADIASVA	ELIGPAGEV	VSFTSE	GLAE	EHVQTRVLI
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (Isf) (101)	A-CLVG	-CTFK	GFREEA	CVISEILGP---	C	L	SATTTD
<i>Clostridium perfringens</i> (Isf) (95)	DATIIA	-CKEKL	APHIPMRENI	AK-LNICLD	QINV	KATTE	GLFTGSGEGISS
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (Isf) (95)	DSITIA	-CKEKL	ISPYIEDIKKSL	NVL	DIDIS	INIKAT	TEGLFTGR
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (Isf) (112)	AITIEG	-SREK	LCISAL	RCNIAQVM	NITPTDI	SI	ATSGEGL
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Isf) (113)	AITIEG	-KREKL	LEFSMR	KRIAELHI	PLDSINI	TATSGE	GLTAMG
<i>Caulobacter vibrioides</i> (Isf) (319)	DVTIIA	-EREKL	PHRCAMRERLAE	ILSIFVDR	VKATTTE	KMGFTGR	GEGIAASAVV
<i>Caulobacter crescentus</i> (Isf) (319)	DVTIIA	-EREKL	PHRCAMRERLAE	ILSIFVDR	VKATTTE	KMGFTGR	GEGIAASAVV
<i>Campylobacter jejuni</i> (Isf) (304)	DICVMA	-CSFKL	KDKQAM	SNIAH	LDLDEF	RINV	KATTEKLG
<i>Buchnera aphidicola</i> (Isf) (95)	DITIIA	-EYFKM	LPYIFMRS	NLSLCLN	EIDNI	IKSTTS	KGCIG
<i>Brucella suis</i> (Isf) (384)	DVTILS	-EAPKIG	PHRAAMTQAL	DMIGIA	ADRV	IKATTNE	KLG
<i>Brucella melitensis</i> (Isf) (323)	DVTILS	-EAPKIG	PHRAAMTQAL	DMIGIA	ADRV	IKATTNE	KLG
<i>Bacillus subtilis</i> (Isf) (96)	DCTIIA	-CKEKL	PHYIEDMKRIA	EGLIEPSCVNV	KATTTE	KLGFTGR	AGEGIAA
<i>Bacillus halodurans</i> (Isf) (96)	DCTIIA	-CKEKL	PHYIEDMKRIA	EGLIEPSCVNV	KATTTE	KLGFTGR	AGEGIAA
<i>Aquifex aeolicus</i> (Isf) (99)	DSVVA	-EREKL	KEHIKIMREKLAD	ILCLEPNC	IGVKATTNE	KLG	FVGRGEGIAEAVALL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Isf) (334)	LVSLIA	-EAPRIG	PHRCAMREAL	SDMLGIA	LERC	VKATTNE	IGFVGR
<i>Chlorobium tepidum</i> (Isf) (95)	DIMLLI	-EKEKIA	PHYIDQMRN	LAICLGLE	INAV	VKATTNE	KLG
<i>Listeria monocytogenes</i> (Isf) (96)	DATIIA	-EKPKMA	PHYVEIMKRIAEL	LHDSACVNV	KATTTE	KLGFTGR	EGGIAASLAVLI
<i>E. coli</i> O6 (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>Salmonella typhi</i> (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>E. coli</i> O157:H7 (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLGFTGR	GEGIAE	AVALL
<i>Haemophilus ducreyi</i> (Isf) (96)	DITIIA	-CAPKMR	PHIHINMR	CLIANIN	CTINIKAT	TTERL	GFTGR
<i>Vibrio vulnificus</i> (Isf) (96)	DVTIIA	-CAPKMA	PHYIDAMRAAIA	HELELIRNIN	KATTTER	ERL	GFTGR
<i>Shewanella oneidensis</i> (Isf) (97)	DVTIIA	-CAPKMA	PHIEITMR	CVLAADIN	PVADIN	KATTTE	KLGFTGR
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i> (Isf) (97)	DCIVV	-EREKL	SPYKIRI	RTSLAELL	GVSKFR	VNKA	TEGLGFTGR
<i>Synechococcus elongatus</i> (Isf) (98)	DSVVA	-EREKL	KEHIKIMREKLAD	ILCLEPNC	IGVKATTNE	KLG	FVGRGEGIAEAVALL
<i>Arabidopsis</i> sp. (strain PCC 7120) (Isf) (99)	DSVVA	-EREKL	KEHIKIMREKLAD	ILCLEPNC	IGVKATTNE	KLG	FVGRGEGIAEAVALL
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Isf) (109)	DITIIA	-CKEKL	SPYKIRI	RTSLAELL	GVSKFR	VNKA	TEGLGFTGR
<i>Catharanthus roseus</i> (174)	DITIIA	-CKEKL	SPYKIRI	RTSLAELL	GVSKFR	VNKA	TEGLGFTGR
<i>Wigglesworthia glossinidia</i> (brevipalpis) (Isf) (95)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLG	FTGR	GEGIAEAVALL
<i>Streptomyces coelicolor</i> (Isf) (110)	AVCVVG	-ARFKIG	KREEA	AVLSA	VG	F---	V
<i>Bifidobacterium longum</i> (Isf) (115)	V	IIIG	NRIKIG	RAFA	AALSA	WCF---	V
<i>Plasmodium falciparum</i> (Isf) (176)	DTVIA	-CVFKIS	NIRKNI	IKNIST	VINIES	QIVKG	THEKLG
<i>Chlamydia muridarum</i> (Isf) (113)	AITIEG	-KREKL	LEFSMR	KRIAELHI	PLDSINI	TATSGE	GLTAMG
Consensus (428)	DVTIIA	-CAPKML	PHIPQMRVFAEDLC	GHMDEVNKA	TTEKLG	FTGR	GEGIAEAVALL

Σχήμα 5.32. Συγκριτική αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF2 με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες IspF. Τα μαύρα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν ανόμοια αμινοξέα, τα μπλε γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα, τα μαύρα γράμματα σε μπλε φόντο δηλώνουν όμοια αμινοξέα, τα κόκκινα γράμματα σε κίτρινο φόντο δηλώνουν πανομοιότυπα αμινοξέα ενώ τέλος τα πράσινα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν τα ασθενώς όμοια αμινοξέα.





Σχήμα 5.33. Δενδρόγραμμα όλων των πρωτεϊνών από διάφορους μικροοργανισμούς.

* Αλληλουχία η οποία έχει κατατεθεί από τους Lee και Kang H.S. και αναφέρεται στο στέλεχος ZM4 το *mobilis*. (αριθμός πρόσβασης AF176314).

Στη συνέχεια έγινε συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών οι οποίες με βάση το παραπάνω δένδρογραμμα ανήκουν σε συγγενικά είδη, (βρίσκονται στην ίδια διακλάδωση, Σχήμα 5.33) και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.34. Σ' αυτήν την περίπτωση η συντηρημένη αλληλουχία παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 0,5 και παρόμοια σε ποσοστό 65,6%.

	(1)	1	10	20	30	40	50	68
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MCESTMKFGIVIVAAGRGE
<i>Brucella melitensis</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MAAGRGE
<i>Brucella suis</i> (IspF)	(1)	MICIMKSAYS	SLITFL	SERKEKQ	FERTINQ	LFSGICRRKAL	FGLQAC	SLAEVTVISKAAVIVAAGRGE
<i>Caulobacter crescentus</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTFSVVIVAAGSGT
<i>Caulobacter vibrioides</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTFSVVIVAAGSGT
<i>Mesorhizobium loti</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTEASENASATGGVAVVIVAAGRGA
ORF2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rhizobium loti</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTEASENASATGGVAVVIVAAGRGA
<i>Rhizobium meliloti</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MAGHGRTFAVHHGEYWRMRDHIQKMQGEEQFSCGVVIVAAGRGE
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTVAVIIVAAGRGT
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MAGHGRTFAVHHGEYWRMRDHIQKMQGEEQFSCGVVIVAAGRGE
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTGSVVAIVFAAGRGT
<i>Xylella fastidiosa</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Zymomonas mobilis</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MMKRTDNIALIVAAGQVN
Consensus	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AVVIVAAGRGE

	(69)	69	80	90	100	110	120	136	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (IspF)	(20)	RAGSFE	EFGPKQYR	PIGGRA	VIETLAT	FLRWNC	ACPTVV	VSHADDAALISFILARL	LAGERITTVTGG
<i>Brucella melitensis</i> (IspF)	(8)	RAGCSA	EFGPKQYR	LIGAEAV	LARTLPA	FTICPL	IGTLAV	VIHPDDHALY	RRAVF--EKHENVILVTGG
<i>Brucella suis</i> (IspF)	(69)	RAGCSA	EFGPKQYR	LIGAEAV	LARTLPA	FTICPL	IGTLAV	VIHPDDHALY	RRAVF--EKHENVILVTGG
<i>Caulobacter crescentus</i> (IspF)	(15)	RAGEPC	--AKQWR	VLAGE	RVLRWS	VEAFLA	AGAAEV	VVVTTADGE	AEFLPRMLEG----IQGWRSTLGG
<i>Caulobacter vibrioides</i> (IspF)	(15)	RAGEPC	--AKQWR	VLAGE	RVLRWS	VEAFLA	AGAAEV	VVVTTADGE	AEFLPRMLEG----IQGWRSTLGG
<i>Mesorhizobium loti</i> (IspF)	(26)	RAGCAN	--GFKQY	QNI	GGRAVIA	HTLEIF	LAHPT	CDRI	VVAIHADCHELFRQAAG--SQAERTVTAIIGG
ORF2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rhizobium loti</i> (IspF)	(26)	RAGCAN	--GFKQY	QNI	GGRAVIA	HTLEIF	LAHPT	CDRI	VVAIHADCHELFRQAAG--SQAERTVTAIIGG
<i>Rhizobium meliloti</i> (IspF)	(45)	RAGCSA	EFGPKQYR	TIGL	RE	VIAHTL	DI	FATW	EGAGFVVVVIHPDDEELFAAARKRMAGALELTVVHGG
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (IspF)	(15)	RAGEPC	--FKQWR	CLAGE	RVLA	TVAA	FAAG--	IGRI	LVVLIHPDCLMGLMCLIGG----SVVLVAGG
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (IspF)	(45)	RAGCSA	EFGPKQYR	TIGL	RE	VIAHTL	DI	FATW	EGAGFVVVVIHPDDEELFAAARKRMAGALELTVVHGG
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>)	(17)	REGGAV	--FKQYL	HAAG	CL	IMAYT	LAAIA	AHFA	VAGITVAIAPDCLWEGWIAVH--AKFVITCVGG
<i>Xylella fastidiosa</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Zymomonas mobilis</i> (IspF)	(19)	VQVKAL	--CKQYR	KTAG	KANLA	HAIDN	L	LAH	FEIDTVQVVIADGHCTLYQCEAVGDR--CLPCFVIGG
Consensus	(69)	RAG A	GFKQYR	IGGR	VIAHTLE	F A P	IVVVIH	DE	IF A G V V GG

	(137)	137	150	160	170	180	190	204			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (IspF)	(88)	ATRQCS	SVLAGLE	ALSSH--	GLTHVM	IHD	AVRPF	FVAADM	LERIAALHRAGAGGVLEALFVITCTIKRG-I		
<i>Brucella melitensis</i> (IspF)	(74)	TRQEST	IRIGLL	LALKDE--	APQYVL	IHD	GVRPF	IGQCL	LERIIANLTF-DNGVLEALAVSDTLKRAAA		
<i>Brucella suis</i> (IspF)	(135)	TRQEST	IRIGLL	LALKDE--	APQYVL	IHD	GVRPF	IGQCL	LERIIANLTF-DNGVLEALAVSDTLKRAAA		
<i>Caulobacter crescentus</i> (IspF)	(77)	ATRAL	SVQAGLA	ALSERP	--GA	EFVMIH	CAAR	PFVSR	NVILALICALSC-ADLALFALAVACTIKRC-P		
<i>Caulobacter vibrioides</i> (IspF)	(77)	ATRAL	SVQAGLA	ALSERP	--GA	EFVMIH	CAAR	PFVSR	NVILALICALSC-ADLALFALAVACTIKRC-P		
<i>Mesorhizobium loti</i> (IspF)	(91)	TRQES	VRIGLL	LALKEH--	APGQVL	IHD	AVRPF	VDA	CLIDRTISAIGE-NEGALFALFVACTIKRESA		
ORF2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
<i>Rhizobium loti</i> (IspF)	(91)	TRQES	VRIGLL	LALKEH--	APGQVL	IHD	AVRPF	VDA	CLIDRTISAIGE-NEGALFALFVACTIKRESA		
<i>Rhizobium meliloti</i> (IspF)	(113)	ATRCL	SVLAGLE	AVAAAT--	GVEYVM	IHD	AVRPF	FCHT	LLDRCGAALRDGAQALLFALAVACTIKRTKA		
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (IspF)	(73)	STR	ESVKN	ALEALE	S--	VTRVL	IHDG	REL	VPASVTA	AVLALET-TFGAAEFALAVTDAIWRG-E	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (IspF)	(113)	ATRCL	SVLAGLE	AVAAAT--	GVEYVM	IHD	AVRPF	FCHT	LLDRCGAALRDGAQALLFALAVACTIKRTKA		
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>)	(80)	ATRA	ASVLAG	LAL	PDGVR	ADDF	VLVH	CA--	RNLALACLRLIEIGRGDFVGAILAAAFVRCITLKRAGE		
<i>Xylella fastidiosa</i> (IspF)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
<i>Zymomonas mobilis</i> (IspF)	(82)	VFRP	DSVING	LKAAH	DR--	GYKRV	L	IHD	AARFLEKTVICRLILALKS-SKAAIFVLVCTLVN--		
Consensus	(137)	ATRQ	SV	GL	AL	D	G	VLIH	CAVRPFV	LLCRLLAAL	GALFALAVACTIKR

	(205)	205	210	220	230	240	250	260	272	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (153)	ELRVVETVSRQGL	YAACTPQSF	SYSDIL	LAHRAAAASGKT	DFTDCA	IAEW	GLTV	TL	IEGSV	ENVKL
<i>Brucella melitensis</i> (139)	DGMVET	TI	SRTGL	FAAQT	PCAF	FPYAP	IL	LAHEKA	FAINRT	DFTDCA
<i>Brucella suis</i> (200)	DGMVET	TI	SRTGL	FAAQT	PCAF	FPYAP	IL	LAHEKA	FAINRT	DFTDCA
<i>Caulobacter crescentus</i> (142)	TGE/	ACTVS	REHL	WRACT	PCARR	CTIL	AA	YAAW	THG---	EPTDCA
<i>Caulobacter vibrioides</i> (142)	TGE/	ACTVS	REHL	WRACT	PCARR	CTIL	AA	YAAW	THG---	EPTDCA
<i>Mesorhizobium loti</i> (156)	AGVVAET	VS	SRSG	LHAACT	PCGF	FYGF	IL	AAHCKA	FQIG	RLDFTDCA
ORF2 (1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rhizobium loti</i> (156)	AGVVAET	VS	SRSG	LHAACT	PCGF	FYGF	IL	AAHCKA	FQIG	RLDFTDCA
<i>Rhizobium meliloti</i> (179)	AGLVAET	VE	RTDLY	AACT	TPQC	FRLE	PIL	SAHRR	AAASGR	SDFDCA
<i>Rhizobium meliloti</i> (137)	AGLVAET	VE	RTDLY	AACT	TPQC	FRLE	PIL	SAHRR	AAASGR	SDFDCA
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (179)	AGLVAET	VE	RTDLY	AACT	TPQC	FRLE	PIL	SAHRR	AAASGR	SDFDCA
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. campestris) (148)	DGGIDG	TEP	FRER	LWRAL	TFQL	FRH	QL	IRGL	TEA	SAAG-
<i>Xylella fastidiosa</i> (151)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Zymomonas mobilis</i> (144)	---	CEVEA	VRNL	FHRV	CTP	CAF	CL	ETV	IAAH	CAW
Consensus (205)	GLVA	TVSR	LYAA	CTP	CAF	ILAAH	A A R	DFTDCA	IAEW	AGI V IV GS EN KI

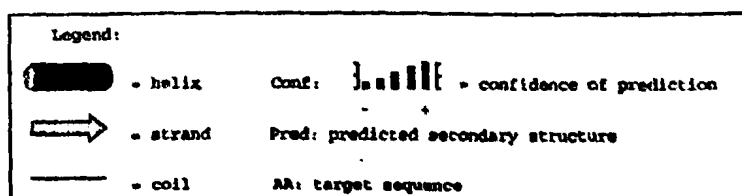
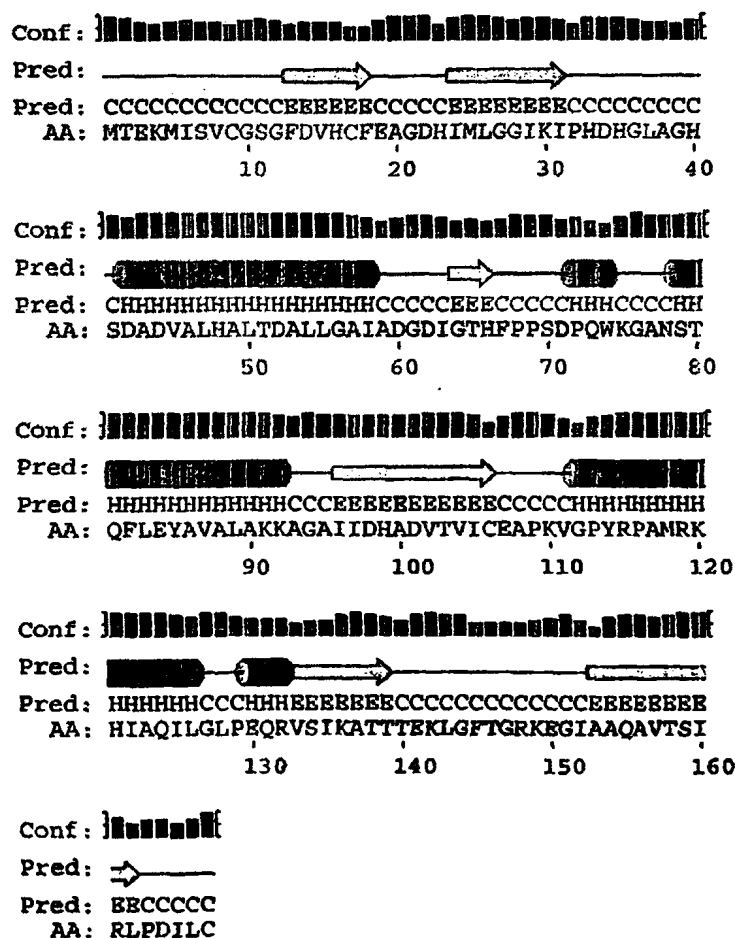
	(273)	273	280	290	300	310	320	330	340	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (221)	TLKRC	IAMADE	KL---	HAL	PDVRT	GN	YCVH	QLEAG	DGVT	LCGIF
<i>Brucella melitensis</i> (207)	TWAKC	IE	MADE	KRLR	QCHAVE	PD	IRTGN	YCVH	SFEP	GDHVT
<i>Brucella suis</i> (268)	TWAKC	IE	MADE	KRLR	QCHAVE	PD	IRTGN	YCVH	SFEP	GDHVT
<i>Caulobacter crescentus</i> (207)	TYPED	FAMAE	HLA	---	VAR	VR	GGCF	DA	HRWG	PGEE
<i>Caulobacter vibrioides</i> (207)	TYPED	FAMAE	HLA	---	VAR	VR	GGCF	DA	HRWG	PGEE
<i>Mesorhizobium loti</i> (224)	TWARD	IAMA	HQRL	SSERT	HE	PD	IRTGN	YCVH	A	FE
ORF2 (1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rhizobium loti</i> (224)	TWARD	IAMA	HQRL	SSERT	HE	PD	IRTGN	YCVH	A	FE
<i>Rhizobium meliloti</i> (247)	TLRRD	LSMA	DEKL	TR---	MAI	PDVRT	GN	YCVH	Q	LDG
<i>Rhizobium meliloti</i> (201)	TYAPD	FA	RAEA	ILLR	ERK	GLT	MD	VR	IGN	YCVH
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (247)	TLRRD	LSMA	DEKL	TR---	MAI	PDVRT	GN	YCVH	Q	LDG
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. campestris) (215)	TTPAD	LA	RFEE	ELAN	---	RR	CCA	RF	AE	S
<i>Xylella fastidiosa</i> (151)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Zymomonas mobilis</i> (208)	TYFAC	S---	VAE	QM	TE	KMIS	SV	CG	S	GF
Consensus (273)	TW	RC	IAMA	DE	KL	PDVRT	GN	YCVH	A	FE

	(341)	341	350	360	370	380	390	408
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (286)	ALLAT	CGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW
<i>Brucella melitensis</i> (275)	ALLAT	RGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW
<i>Brucella suis</i> (336)	ALLAT	RGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW
<i>Caulobacter crescentus</i> (271)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Caulobacter vibrioides</i> (271)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Mesorhizobium loti</i> (292)	ALLAT	CGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW
ORF2 (53)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Rhizobium loti</i> (292)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Rhizobium meliloti</i> (313)	ALLAT	CGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW
<i>Rhizobium meliloti</i> (269)	AIYG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (313)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. campestris) (269)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Xylella fastidiosa</i> (151)	AMIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
<i>Zymomonas mobilis</i> (272)	AIIG	IG	EG	DIG	HE	FP	TE	F
Consensus (341)	ALLAT	CGAG	DIG	HE	FP	SE	CF	QW

	(395)	395	400	410	420	430	440	450	462
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (IspF) (340)	EAPRIGPHRCAMREALSDMLGIALERCSVKATTNETIGFVGRREGIAAIATATVVYQGRPI-----								
<i>Brucella melitensis</i> (IspF) (329)	EAPKIGPHRAAMTQALCDMLGIAADRVSIAKATTNEKIGFVGRREGIAAIATATVIYPGEVPE-----								
<i>Brucella suis</i> (IspF) (390)	EAPKIGPHRAAMTQALCDMLGIAADRVSIAKATTNEKIGFVGRREGIAAIATATVIYPGEVPE-----								
<i>Caulobacter crescentus</i> (IspF) (325)	ERPKIKPHRCAMRERLAEILSIFVDRVSVKATTTEKMGFTGRGEGIAASAVVAVETPA-----								
<i>Caulobacter vibrioides</i> (IspF) (325)	ERPKIKPHRCAMRERLAEILSIFVDRVSVKATTTEKMGFTGRGEGIAASAVVAVETPA-----								
<i>Mesorhizobium loti</i> (IspF) (346)	EAEVVGPHREAMTAALSRLGISADRSIAKATTNEKIGFVGRREGIAAIATASVVFPGEVPE-----								
GRF2(107)	EAEKVGPFYRFAMRKHIAQILGLFEQVRSIAKATTTEKIGFTGRKEGLAAQAVTSIRLPDILC-----								
<i>Rhizobium loti</i> (IspF) (346)	EAEVVGPHREAMTAALSRLGISADRSIAKATTNEKIGFVGRREGIAAIATASVVFPGEVPE-----								
<i>Rhizobium meliloti</i> (IspF) (367)	EAEKVGPHRQCMRENLAAILGISLDRCSIAKATTNEKIGFVGRNEGIAAIATATVVYASRSKPEVDDRY								
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (IspF) (323)	ERFKVGPHAVAMAAELARIMEIEPSRVSVKATTSERLGFGRGEGIASIATVTLIGA-----								
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (IspF) (367)	EAEKVGPHRQCMRENLAAILGISLDRCSIAKATTNEKIGFVGRNEGIAAIATATVVYASRSKPEVDDRY								
<i>Xanthomonas campestris</i> (pv. <i>campestris</i>) (266)	-----								
<i>Xylella fastidiosa</i> (IspF) (115)	ESFKIAPYVNAMREGIARLLEVQFEQVSVKATTSEGLGFGRGEGIAAQVVVLLYRLNGVVV-----								
<i>Zymomonas mobilis</i> (IspF) (326)	EAEKVGPFYRFAMRKILPRFWGFLNKGSAKQCRQLKSLVLQAARKGSLPKRLPVEACRIFCAN-----								
Consensus (395)	EAPKVGPHR AMR LA ILGIS DRVSIKATTNEKIGFVGR EGIAAIATATVVYPG								

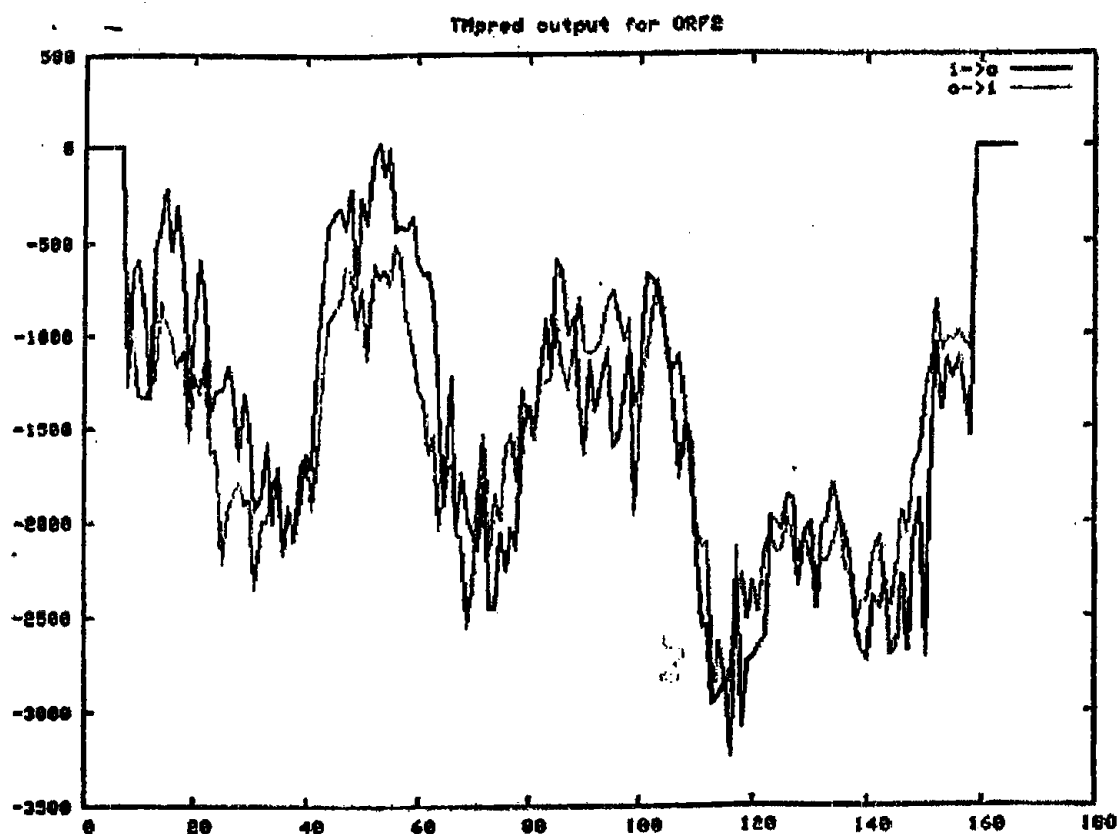
Σχήμα 5.34. Συγκριτική αντιστοίχιση των πρωτεϊνών IspF που ανήκουν σε συγγενικά είδη.

Όπως και στη περίπτωση του ORF1, η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED της SWISS-PROT και η δομή της φαίνεται στο Σχήμα 5.35.



Σχήμα 5.35. Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.

Τέλος, με τη χρήση του προγράμματος Vector NCI 6, υπολογίστηκαν οι παράμετροι για την εύρεση διαμεμβρανικών ελικών στη δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 και τα αποτελέσματα έδειξαν τελικά ότι δεν υπάρχουν τέτοιου είδους έλικες στη δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (Σχήμα 5.36).



Σχήμα 5.36. Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2.

5.11 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF3.

Η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF3 παρατίθεται παρακάτω:

M T H A E A Q A L M E T A L P G L L Q G A K Q Q C S S V L D S D S Y L L K Q E A T L S K
R F R Q E S E T D W P K A K A A F E R L G G S A V A D M G D A G K R A A I E T M V S D I
V S Q K M K P Q S C E I V N G F L P F V A E Q P A N K I G D V S V S T F A L I K K I G K V
G R I L P F D I C S G D Stop

Υπολογίστηκαν όπως και παραπάνω διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF3 και οι οποίες παρατίθενται ακολούθως:

Αριθμός αμινοξέων: 145

Μοριακό βάρος: 15563,8 Da

Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο, pI: 5.87

% Σύσταση αμινοξέων:	Ala (A) 17	11.7%
	Arg (R) 5	3.4%
	Asn (N) 2	1.4%
	Asp (D) 9	6.2%
	Cys (C) 3	2.1%
	Gln (Q) 9	6.2%
	Glu (E) 9	6.2%
	Gly (G) 11	7.6%
	His (H) 1	0.7%
	Ile (I) 8	5.5%
	Leu (L) 12	8.3%
	Lys (K) 12	8.3%
	Met (M) 5	3.4%
	Phe (F) 6	4.1%
	Pro (P) 6	4.1%

Ser (S)	13	9.0%
Thr (T)	6	4.1%
Trp (W)	1	0.7%
Tyr (Y)	1	0.7%
Val (V)	9	6.2%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Συνολικός αριθμός αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων (Asp + Glu): 18

Συνολικός αριθμός θετικά φορτισμένων αμινοξέων (Arg + Lys): 17

Ατομική σύσταση:	Άνθρακας	C	681
	Υδρογόνο	H	1106
	Άζωτο	N	186
	Οξυγόνο	O	213
	Θείο	S	8

Μοριακός τύπος: $C_{681}H_{1106}N_{186}O_{213}S_8$

Συνολικός αριθμός ατόμων: 2194

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση, σε επίπεδο αμινοξέων, της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF3 με άλλες πρωτεΐνες, οι αλληλουχίες των οποίων είναι κατατεθειμένες σε γνωστές τράπεζες δεδομένων (χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους BLASTP 2 και PSI-BLAST). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει ομολογία με καμία γνωστή πρωτεΐνη. Η μοναδική σημαντική ομολογία που βρέθηκε ήταν της τάξεως των 33% με μία κυστεϊνύλο-tRNA-συνθετάση (cysteinyl-tRNA synthetase) από το *Shewanella oneidensis* MR-1, όπου η σύγκριση έγινε σε μόνο 79 από τα 145 αμινοξέα του ORF3. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το ORF3 είναι μια εντελώς νέα πρωτεΐνη η αποκωδικοποίηση της οποίας ίσως διαφωτίσει το ρόλο της ως τμήμα του σπερονίου *g/c*.



5.12 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το ORF4 εμφανίζεται ως μια περιοχή που μπορεί να κωδικεύει πέντε επικαλυπτόμενες πρωτεΐνες με εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης αλλά το ίδιο C-τελικό άκρο (Σχήματα 5.19 και 5.20). Παρακάτω παρατίθεται η αμινοξική αλληλουχία της μεγαλύτερης και της πιο πιθανής τελικά πρωτεΐνης μεταξύ των πιθανών πρωτεϊνικών προϊόντων, που κωδικεύεται από το ORF4a, για το οποίο βρέθηκε ότι:

- (α) έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (παρ. 5.5),
- (β) αποκαθιστά τη σωστή λειτουργία της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης (παρ. 5.6) και
- (γ) αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τον προαγωγό p_{glc} (παρ. 5.7):

M T M D N N Q T D G L S S Q P S D T E K E A L Q Q K A E Q Q D I S A Q D S E
E L Q K T I Q N M E E N Q P Q E N V H Y N L P N E L V T R A S L V I D A N R A A
G Q R I A V A E S C T G G L V M A A L T E V P G A S D V F D A G F V T Y A N Q A
K I D L L N I S Q D V I E T F G S V S L A V A W A M A R N A V E K S D A D I A V
A I T G I A G P T G G D E R K P V G T V V F A R A R R D A D P N E V V A E Q K S F
G D L G R S G I R L Q A A L C A L S L L M P D A S I S Q G Stop

Ακολουθώς παρατίθενται διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι του πρωτεϊνικού προϊόντος που κωδικεύεται από το ORF4a οι οποίες υπολογίστηκαν όπως αναφέρθηκε νωρίτερα.

Αριθμός αμινοξέων: 228

Μοριακό βάρος: 24149,8 Da

Θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο, pI: 4.33

% σύσταση αμινοξέων:	Ala (A) 32	14.0%
	Arg (R) 10	4.4%

Asn (N) 12	5.3%
Asp (D) 17	7.5%
Cys (C) 2	0.9%
Gln (Q) 17	7.5%
Glu (E) 16	7.0%
Gly (G) 16	7.0%
His (H) 1	0.4%
Ile (I) 12	5.3%
Leu (L) 17	7.5%
Lys (K) 7	3.1%
Met (M) 6	2.6%
Phe (F) 5	2.2%
Pro (P) 8	3.5%
Ser (S) 17	7.5%
Thr (T) 12	5.3%
Trp (W) 1	0.4%
Tyr (Y) 2	0.9%
Val (V) 18	7.9%
Asx (B) 0	0.0%
Glx (Z) 0	0.0%
Xaa (X) 0	0.0%

Συνολικός αριθμός αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων (Asp + Glu): 33

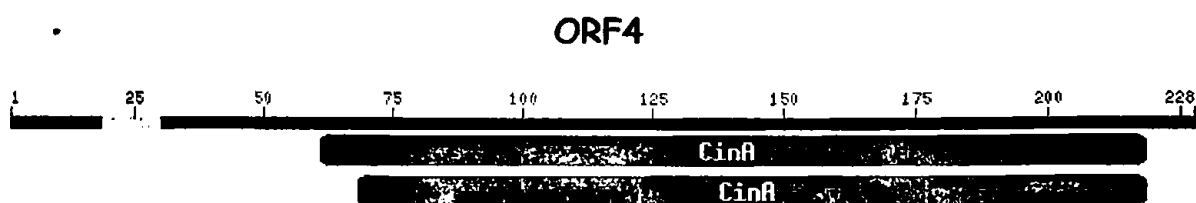
Συνολικός αριθμός θετικά φορτισμένων αμινοξέων (Arg + Lys): 17

Ατομική σύσταση:	Άνθρακας C	1030
	Υδρογόνο H	1669
	Άζωτο N	297
	Οξυγόνο O	355
	Θείο S	8

Μοριακός Τύπος: $C_{1030}H_{1669}N_{297}O_{355}S_8$

Συνολικός αριθμός ατόμων: 3359

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση, σε επίπεδο αμινοξέων, της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF4a με άλλες πρωτεΐνες, οι αλληλουχίες των οποίων είναι κατατεθειμένες σε γνωστές τράπεζες δεδομένων (χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους BLASTP 2 και PSI-BLAST). Τα αποτελέσματα δείχνουν ισχυρή ομολογία της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF4a με την πρωτεΐνη CinA η οποία επάγεται κατά τη διάρκεια επιδεκτικότητας των κυττάρων κατά τον μετασχηματισμό (Competence-damaged protein) (Martin *et al.*, 1995) από διάφορους οργανισμούς σε ποσοστό που κυμαίνεται από 42% έως 62% (ενδεικτικά παρατίθενται μερικά από τα αποτελέσματα της εύρεσης ομολογιών). Η πρωτεΐνη CinA είναι η πρώτη που κωδικοεύεται από το οπερόνιο *cin* (οπερόνιο το οποίο επάγεται κατά τη διάρκεια της επιδεκτικότητας, competence-inducible operon) και θεωρείται ότι απαιτείται σε κάποια φάση κατά την διάρκεια του μετασχηματισμού ορισμένων βακτηρίων όπως *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* και *Deinococcus radiodurans*.



CinA, μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη (επαγόμενη από τον μετασχηματισμό καθώς και από την μιτομυκίνη) [μέχρι στιγμής έχει προβλεφθεί μόνο γενική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής]

Query: 61 PNELVTRASLVIDANRAAGQRIAVAESCTGGLVMAALTEVPGASDVFDAGFVITYANQAKI 120
 Sbjct: 3 YDDLESIAEAVGELLKERGLTLATAESCTGGLLAAALTDIPGASAVFEGGFVITYSNEAKA 62

Query: 121 DLLNISQDVIEFTGSLVAVAWAMARNAVEKSDADIAVAITGIAGPTGGDERKPVGTVVF 180
 Sbjct: 63 KLLGVSPETLEEHGAVSEEVAREMARGAKERAGADIAIAITGIAGPDGGSEGKPVGTVYI 122

Query: 181 ARARRDADPNEVVAEQKSFGLGRSGIRLQAALCALSL 219
 Sbjct: 123 GLAIG----GEAITIRVNFEGG-DREQVRERAVRAALELL 156

CinA, Competence-damaged protein. Το γονίδιο *cinA* είναι το πρώτο στη σειρά στο οπερόνιο competence-inducible (*cin*), και πιστεύεται ότι η δράση του απαιτείται εξειδικευμένα σε κάποιο στάδιο κατά το φαινόμενο του μετασχηματισμού. Η οικογένεια πρωτεϊνών Pfam αποτελείται από θεωρητικές πρωτεΐνες competence-damaged από το οπερόνιο *cin*.

```

Query:  68  ASLVIDANRAAGQRIAVAESCTGGLVMAALTEVPGASDVFDAGFVTYANQAKIDLLNISQ  127
Sbjct:   5  AEALGELLKERGLTIATAESCTGGLLAAALTDVPGSSKYFAGGFVTYSNEAKRKLGVSE   64

Query:  128  DVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSDADIAVAITGIAGPTGGDERKPVGTVVVFARARRDA  187
Sbjct:  65  ETLEQHGA VSEEVAQEMALGAKKATGADFGIAITGVAGPDGGTEGKPVGTVFIGIA--DK  122

Query:  188  DPNEVVAEQKSFGLGRSGIRLQAALCALSL  219
Sbjct:  123  DGQELTIRVQFAGD--REAIRRLSVQHALNLL  152

```

Στο Σχήμα 5.38 παρουσιάζεται η συγκριτική αντιστοίχιση (που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των προγραμμάτων CLUSTALW και Vector NTI 6) μεταξύ της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4a και όλων των γνωστών ή πιθανών πρωτεϊνών CinA. Με βάση τα αποτελέσματα, βρέθηκαν ισχυρά συντηρημένες περιοχές στην αλληλουχία των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτά η συντηρημένη αλληλουχία που αποκαλύφθηκε μεταξύ των πρωτεϊνών CinA παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 0,5% και παρόμοια σε ποσοστό 20,1%. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα κατασκευάστηκε το δένδrogramma όλων των πρωτεϊνών CinA (Σχήμα 5.39).

	(291)	291	300	310	320	330	348
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA)	(91)	--PNEIVTRASILVICANRA--	AGQRI	IAVAESCTGGIVMAALTEVPGASCVF	DAGFVTY		
<i>Yersinia pestis</i> C092	(3)	--EGCIRQLSIAVGHKLE--	HGAWVT	CAESCTGCVWVAALTDIAGSSAYF	DRGFVTY		
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	(4)	--DQCIRNLSITLGGKLCM--	TRERLV	TAESCTGCVWIAFAITDVGSSAWF	ECGIVAY		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (CinA)	(8)	--ESELQQLAEALGQCLLA--	ARERLV	TAESCTGCVWIAFAITDVGSSAWF	ECGMAAY		
<i>Vibrio vulnificus</i> (CinA)	(1)	--MCSLIQSLSECLGERLIC--	QGEVL	ATAESCTGGVVAIVTEVAGSSAWF	EDRAFVTY		
<i>Vibrio cholerae</i> (CinA)	(1)	--MKTILHSLSECLGGILLAN--	QQCIL	SAESCTGGGVAYWVTEVAGSSAWF	EDRSFVTY		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	(1)	-----MNVALELINLIK--	RRIRLS	VCFESASCCALSSSIGEVAGASSV	FAGGFISY		
<i>Thermotoga nautica</i> (CinA)	(247)	-----VNDEKMEVVVRLLK--	RKKT	LAVAESCTGCMSSLVVIVPGASEV	IGGVVAY		
<i>Thermotoga nautica</i> (CinA)	(248)	YAVDCE-EMEIVIKLIK--	RGFT	LATAESCTGGLLAKKITDVGASKV	ENLGVVY		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (CinA)	(254)	---QDECTIASVVGALLRE--	RGET	VAVAESCTGGGLTALLTDQPGSSDY	FWGGVIAI		
<i>Synechococcus elongatus</i> (267)	---	ADECTLAGVVARLIQE--	RQCT	VAVAESCTGGGLGEMLTFLPGSSLY	FKGGVIAI		
<i>Streptomyces coelicolor</i> (CinA)	(1)	-----MSSTAACVVRLLTVR--	GETL	VAESLTGCMVAATLTAVPGASKA	FRGSVTAY		
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS (257)		YGYGEDNSLAREIFELLVK--	YDKT	ITTAESLTAGLFCSTLASFPASQV	ENGGFVTY		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA)	(256)	YGYGEETSLASIVVEELKR--	QGKT	IAAASLTAGLFCATVANFSGVSSIF	KGGFVTY		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (CinA)	(3)	--TTCTEEKARAIICDFTS--	RGLK	LATAESCTGGILAGALTGAGSSV	VDGRFVTY		
<i>Shewanella oneidensis</i> (CinA)	(252)	---K--ATLAEIHFRLIN--	SGLT	LSAESCTGGMITSCIVDFPGSSYL	QHGLVTY		
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	(14)	--AESVDSLTKKGLDLVN--	CKLR	LTAAESCTGCKLASALCAAEET	ESFYGVGYTF		
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA)	(4)	--SRALQALAEVGTDLHK--	RSIM	VATAESCTAGLVCAAITDIPGASAW	FERGFVTY		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	(1)	MEELQLADEASRLVAYLRS--	ADLS	ITAESCTAGCISAEISAVAGSCK	VMEGGFVY		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ORF4	(61)	--PNEIVTRASILVICANRA--	AGQRI	IAVAESCTGCVMAALTEVPGASCVF	DAGFVTY		
<i>Oceanobacillus thersites</i> (255)		FGENEE-SIEDIVVQQLQD--	IGYS	ISAAESITGGMFSRLSVITGASN	VFAGSFITY		
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (CinA)	(254)	---VNNESLASVVGELLRS--	SGET	LSVAESCTGGLLGCMLTEISGSSDY	FWGGVISY		
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	(1)	-----MDALHTIARNLT--	KRQTV	SCAESCTGGLMAAFTSVAGSSQW	DFQSFVTY		
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	(1)	-----MDALHTIARNLT--	KRQTV	SCAESCTGGLMAAFTSVAGSSQW	DFQSFVTY		
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	(1)	-----MKFCSVESFTGGLFASKIV	CRPGASKY	FAGSIVAY			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (CinA)	(1)	-----MYARIIAEKILN--	HKLT	IAAESVTGGLSSSLTDIAGASRF	FKGAIVAY		
<i>Mycoplasma genitalium</i> (CinA)	(1)	-----MFANLIAEKILK--	ILSV	ATAESVTGGLLAHCLTSDGASNY	FNGGVIAI		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA)	(265)	--VYSEDGASVDEIVAKLI--	TGRR	IAAESCTAGLLAARLTDRPGSSKY	VAGAVVAY		
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA)	(262)	--LYSEDGARVDDLIHLL--	AGRR	IAAESCTAGLLAARLTDRPGSSKY	VAGAVVAY		
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA)	(1)	---MSNAELANSLLIACQC--	RGIM	LATAESCTGGLITAAITDIAGSSA	VVDRGFITY		
<i>Listeria innocua</i> (CinA)	(253)	YGYGEV-SLFELVTAMLE--	KNIT	ISAAESFTAGLFCAEIARFPGISK	IFKGGMVY		
<i>Leptospira interrogans</i> (CinA)	(257)	---KSTLDVFEELPKLIE--	KRIT	VTAESCTGGLISKIFTCKPGSSY	FYGGVISY		
<i>Lactobacillus plantarum</i> (253)		YGYGEDNSLVTVINQMA--	AKLS	ITAAESLTAGLFCSTIGSVGSA	IFPGGFVTY		
<i>Helicobacter pylori</i> 99 (CinA)	(60)	--LDCNKKSANAVIERLKS--	IGLM	VAESCSGGLLSHAFTSISGASAV	FMGGVVCY		
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	(60)	--LDCNKKSANALIERLKS--	IGLM	VAESCSGGLLSHAFTSISGASAV	FMGGVVCY		
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	(2)	DDSDPDPPIQLSLGDLRC--	AGHT	VATAESCTGGLICSLTDEVPASAY	FERSYVTY		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (243)		---EDDDRIENTIYECLNLGEKPLT	ISTA	ESCTGCMVASKLIEVPGISENF	IESIVSY		
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 (CinA)	(14)	--TETIENLTALSQRLIA--	DCLR	LTAAESCTGCKLASALCAAEET	FKFYGAGFVTF		
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(3)	--EKRLHELVEIGAALKA--	KGWW	VTAESCTGGLIAFAITDIAGSSAW	FERGFVTY		
<i>E. coli</i> 0157:H7 EDL933	(14)	--TETIENLTALSQRLIA--	DCLR	LTAAESCTGCKLASALCAAEET	FKFYGAGFVTF		
<i>E. coli</i> (CinA)	(14)	--TETIENLTALSQRLIA--	DCLR	LTAAESCTGCKLASALCAAEET	FKFYGAGFVTF		
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA)	(255)	---EDGCTLAGAVGQCLAG--	RTL	GVIFAGSAGALSLLADEP--	AHLAAVT		
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (CinA)	(1)	---MSENLAGRVVELLKS--	RGET	LAFCESLTAGLASATIAETPGASV	VLKGLIVTY		
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (CinA)	(249)	VYGVGDTSLFVLGAMLE--	KKLT	IAAESCTGGLSRLINYPGISEV	MEGAVTY		
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA)	(254)	VYATSEVTLFVVVNLLIE--	RKLT	VAVAESCTGGLSRLTEVPGSSG	CFLGLVTY		
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	(3)	--FLEIQTLSRLIDEARA--	RSRL	VTAESCTGGLVAFACISISGAS	CVFERGFVTY		
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 (195)		FGQKVFLGKLFIFHISSKLEKKL	KISFA	ESCTGGLCASTLTAKISGVSEIF	EGSIVSY		
<i>Brucella melitensis</i> 16M	(3)	--HIIAGQKALAVLACRK--	AGIM	IAAESCTGGLIAAALTDIPGSSD	VVDRGFVTY		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	(3)	--GSLARALSPSLDLCRM--	RKLT	IAAESCTGGLVAFALTEIPGSSD	VTERGFVTY		
<i>Bifidobacterium longum</i> (CinA)	(1)	--MRELCDSLAAGILKICEAN--	NTKIA	VAESLTGGLLALAFVRIPGASN	VLLGSVAY		
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (229)		---EEDIPLEVIVGELIKK--	KNLT	VSTAESCTGGLSIAARLTGAGS	SEYFNGGVVAY		
<i>Bacillus subtilis</i> (CinA)	(256)	YGYDDT-SLVKELSIACKE--	KGIT	ISAESFTGGLFSLWLDHSGASK	LFAGGVVCY		
<i>Bacillus halodurans</i> (CinA)	(251)	YGYDET-SLMEKLVSCITK--	TGLS	LSAASLTGGLFCARITNIPGAS	ACFLAITY		
<i>Aquifexaerolus</i> VF5	(71)	--TDRPESLEETLGRILKE--	KGFT	LSAESCTAGMLSSRIWIVPGS	SEYFVGGFVY		
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (CinA)	(254)	---VNNESLASVVGELLRS--	SGET	LSVAESCTGGLLGCMLTEISGSSDY	FWGGVISY		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	(5)	---PGDIEELARRIITDFTF--	IGLM	VSTAESCTGGLIACALTEIAGS	SAVVDRGFVTY		
Consensus (291)		IA V I	ITLATAESCTGGLIAA	ITDI GSS F GG VTY			



	(349)	349	360	370	380	390	406
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA) (145)	ANQAKICLINISQCVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSD					ADIAVAITGIGAGE	
<i>Yersinia pestis</i> C092 (57)	SNAAKQCLIGVSETTLARYGAVSEAVVREMGALIKQAN					ADFAVVISGIGAGE	
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c (58)	SYEAKQALLGVPRPETLEIHGAVSRETIVEMVSGALVQSG					ASIAIAVITGIGAGE	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (CinA) (62)	SYEAKQALLGVPRPETLEIHGAVSRETIVEMVSGALVNSG					ASIAIAVITGIGAGE	
<i>Vibrio vulnificus</i> (CinA) (55)	SNEAKQEMLGVAEKTIADEFGAVSEAVVKEMVLGTLAHSN					ATIAVAISGIGAGE	
<i>Vibrio cholerae</i> (CinA) (55)	SNEAKQEMLGVRQATLCCQFGAVSECTVEEMALGALLHSA					ATIAVAISGIGAGE	
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (51)	SNEVKIKLVGVSEKTIKFKYGAVERSECTAKEMCLQINCKFN					TDIAISITGIGAGE	
<i>Thermotoga maritima</i> (CinA) (300)	SNDLKKHILGVRECTLKKGAVSEECVQEMTEGLKKLTG					ADICVVISGIGAGE	
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i> (CinA) (303)	SNEAKEKVLGVKKSTLDAGAVSPETAKEMAENRVLAK					SDIGLSTGIGAGE	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (CinA) (307)	YNQVKIKLVGVDPETIEYCGAVSEATAEAMALGVKERLG					TDWGIATGIGAGE	
<i>Synechococcus elongatus</i> (320)	ANEIKVTLLGVNPEELERE GAVSAAVAAQMALGVKTRLA					SDWGVSTGIGAGE	
<i>Streptomyces coelicolor</i> (CinA) (52)	ATELKRELLGVDEGLLAAFGAVDAQVAAQMAAGVKTALG					ADWGIATGIGAGE	
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS (313)	SMEEKAKMLGLELEELKSHGVSAITAEQMAEQARLLTG					ADIGVSLTIGAGE	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA) (312)	SLEEKSRMLDIPAKNLEEHLVSEFTAQMAEQARSKTQ					SDFGISLTIGAGE	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CinA) (57)	SNEAKVEMLGVPATLAAHGAVSRETAMEMARGAVLRSA					ADIAIAVITGIGAGE	
<i>Shewanella oneidensis</i> (CinA) (303)	SNEKSVRVLGVPATLDDHGAVSIPTVEEMAKGARATLD					SDALATSGIGAGE	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (68)	TDEAKAKILRVQRHSLAEHTAVSEAVVTEMAQGAQDQAE					VNISIAISGYGGE	
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA) (58)	SNEAKSQMLGVFATLIREHGAVSEPVAAHMAEGAVINSR					AQVALAVITGIGAGE	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (57)	SPAAKLALIGLDPNWLERFHLT SVEVAEAMARAALQRSE					ASALAVITGLIGE	
ORF4 (115)	ANQAKICLINISQCVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSD					ADIAVAITGIGAGE	
<i>Oceanobacillus ihayensis</i> (310)	QSFRIKEEVLEVESEIIHSGVSRACSLAMASNVTRKIC					TDIGISTGIGAGE	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (CinA) (307)	INSVKAGLLGVNSEDLEKLGAVSCTVAEQMAMGKTRLS					TDWGLSTGIGAGE	
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 (51)	SNEAKEDRLGVLPETLLEHGAVSRQTYEMARGAKAVAQ					ADYAVGISGIGAGE	
<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8 (51)	SNEAKEDRLGVLPETLLEHGAVSRQTYEMARGAKAVAQ					ADYAVGISGIGAGE	
<i>Mycoplasma pulmonis</i> (36)	SNVVKELGIDTISK-----GLIENVALEMAKKGKAFEE					ADLCESTGIGAGE	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (CinA) (50)	SNEIKKSLILNVKQSTIINHGAVSRYCIREMAGLMQKLN					TDIAVACSGVAGE	
<i>Mycoplasma genitalium</i> (CinA) (50)	INSVKINLLNVQSSSTIANHGAVSSFCAREMAGVKQKEQ					ADVGIACSGVAGE	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA) (319)	SNEAKAQLLGVPALIEAHGAVSEPVAAQMAAGALQGEF					ADTAIAITGIGAGE	
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA) (316)	SNEAKVTLLGVDPALIAEHGEVSEPVAAQMAAGALQREF					ADTAIAISGIGAGE	
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA) (54)	SNEAKMDMLGVAAKTLDAHGAVSRETLEMAAGALAHSR					ASISLAVITGIGAGE	
<i>Listeria innocua</i> (CinA) (308)	SEEJQCSILEVSPQTFINEGVVSECAKEMAKNSRLCN					TDIGISTGIGAGE	
<i>Leptospira interrogans</i> (CinA) (310)	INSVKELGILGVKNTLKEFGAVSMETAKEMAEGALVALG					TDYSISVTGIGAGE	
<i>Lactobacillus plantarum</i> (309)	ANEAKHQLVNVFQATLDAEGVSEATAKAMASGAQKQIN					TDVGISTGIGAGE	
<i>Helicobacter pylori</i> J99 (CinA) (114)	SEELKRELLKVNATTLNVFGVYSEECVKEMLSGFLNEK					TDIALAISGVAGE	
<i>Helicobacter pylori</i> 26695 (114)	SEELKRELLKVNATTLNVFGVYSEECVKEMLSGFLNEK					TDIALAISGVAGE	
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 (58)	SYDAK-LDHGVSREHLDEHGAVSEPVARMARGRDQAG					TWGLIATGIGAGE	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (298)	SNEAKIKRLKVKKETLEKYGAVSEEVAREMLAGLK					TDIGISTGIGAGE	
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 (CinA) (68)	TDLAKMKILVVSQCSLERYAVSEKVAEMATGAIERAD					ADVSLAITGYGGE	
<i>Enterobacter agglomerans</i> (57)	SNAAKHELIGVSESTLECYGAVSEQVHEMAGLHAAG					ADVAVSVSGIGAGE	
<i>E. coli</i> 0157:H7 EDL933 (68)	TDLAKMKILVVSQCSLERYAVSEKVAEMATGAIERAD					ADVSLAITGYGGE	
<i>E. coli</i> (CinA) (68)	TDLAKMKILVVSQCSLERYAVSEKVAEMATGAIERAD					ADVSLAITGYGGE	
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA) (301)	TDLAKMKILVVSQCSLERYAVSEKVAEMATGAIERAD					ADVSLAITGYGGE	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (CinA) (53)	ADLAKVALAGVQELIDAHGVSPQCARAMATGAHRCQ					ADWAVSLTIGAGE	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (CinA) (305)	SNEAKMNRILGVKKETLESYGAVSSETAAEMAKGIATAG					TDIGVSTGIGAGE	
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA) (310)	SNLAKVRLIGVDPATIEAHGAVSEPVAKEMARGLERSG					ADICVSTGIGAGE	
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (57)	TNLAKESEMIGVAGCLADYGAVSFPVARAMAEGALRESN					GVAVAVITGIGAGE	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 (253)	SNLAKHFWLGISESTENGFYSERCVFMLKGIETAN					FDALATSGVAGE	
<i>Brucella melitensis</i> 16M (57)	SNEAKNFMIATIMEI IAHGAVSKEVAIAMAEGALVHSR					AVIAVITGIGAGE	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (57)	SNDAKRAMIGVFGATLANI GAVSKETATAMATGAIERAG					TDIAVAITGIGAGE	
<i>Bifidobacterium longum</i> (CinA) (56)	TDLAKASTIHVTKALIERGAVHFEVARMAVGARLYSCFEYGERIIGLS					TGAVITGIGAGE	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (282)	SNEAKMNLHVSPETIEVYGAVSECTIEMKGAALK					TDCAVASGIGAGE	
<i>Bacillus subtilis</i> (CinA) (311)	TNDLAKNVILGVKKETIDRGAVSKEXASELAKGQKLTG					SDIGISTGIGAGE	
<i>Bacillus halodurans</i> (CinA) (306)	TNDLAKNVILGVKKETIDRGAVSKEXASELAKGQKLTG					ADVIAISVTGIGAGE	
<i>Aquifexaerophilus</i> VF5 (125)	SNDLKVYKLVSEPTLTKYGAWSQCTIEMVGLKSNIG					TDGLIATGIGAGE	
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (CinA) (307)	INSVKAGLLGVNSEDLEKLGAVSCTVAEQMAMGKTRLS					TDWGLSTGIGAGE	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon) (59)	TNDLAKRMIGVGTETITL GAVSRCTALMAHGALYRSR					ADVAVAVITGIGAGE	
Consensus (349)	SNEAK IIGV TIE HGAVS A EMA GA					ADIAIAITGIGAGE	



	(407)	407	420	430	440	450	464				
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA) (197)	TGGT	ERKPVGT	VVFARARRLAD	FNEVVAE	CKSFGL	-----	GRSGIRLQAALCA				
<i>Yersinia pestis</i> CO92 (109)	DGGS	ADKPVGT	VWEGFISREGF	-----	ISARKKH	FSG-----	DRCSVRLQAAVFA				
<i>Xylella fastidiosa</i> 9aSc (110)	EGGST	GKPIGS	WIFWNRGGY	-----	ANFQFF	KFDG-----	DRCAVRRETIVLTA				
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (CinA) (114)	GGGSE	CKPVGT	VWIGWNRGGY	-----	ATAQL	FCFNG-----	DRCAVRRQIVAAA				
<i>Vibrio vulnificus</i> (CinA) (107)	SGGSA	EKPVGT	VCFGFADKHGW	-----	IRCET	CYFAG-----	DRAKVRIQAI EYS				
<i>Vibrio cholerae</i> (CinA) (107)	GGGSA	EKPVGT	VCFGFASVQGW	-----	LKVET	CHFTG-----	DRQVVRQCAIAHV				
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (103)	QGS	EN-KEV	GLFYIG	IAIKDFA	IVKKV	TLSNERTF	-----	NRFSTIAWEAISYL			
<i>Thermotoga maritima</i> (CinA) (352)	SGGT	PKEPVGT	VFIIIFEHEHIT	-----	MRYN	FTG-----	DRNMIRTRSAMMA				
<i>Thermoaerobacter tengcongensis</i> (CinA) (355)	SGGS	EKPVGL	VYVGFATPEKT	-----	YVKKL	MLSG-----	NRERIRTRSMLHA				
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (CinA) (359)	GGT	EEKPIGT	VYVGLADPHGCASH	ILICFG	ERRG-----	R-----	EWIRYLSACQA				
<i>Synechococcus elongatus</i> (372)	GGAT	LKPVGL	VYIGVALFNGE	VISREF	FSG	QRG-----	R-----	DWVRYLSIMNA			
<i>Streptomyces coelicolor</i> (CinA) (104)	DE-CDG	-PVGT	VFAVI	GFFRAE	QGCAD	GGKVEAL	RLNG-----	DRAEIRMESVQS			
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS (365)	DM-LEE	-PAG	TVFIG	LATCNK	VE-----	SIKVL	ISGR-----	SRLDVRYIATLHA			
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA) (364)	DS-LEG	HPVGT	VFIGL	ACDQ	GTE-----	VIKVN	IGGR-----	SRADVRIAMVHA			
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CinA) (109)	GGGSA	EKPVGL	VHLAA	AARDGA	-----	MIHRE	MRYGDI-----	GREAVRLATVHTA			
<i>Shewanella oneidensis</i> (CinA) (355)	DGGT	EKPVGT	VAILALAT	TRSGV	YSQMI	KLPR-----	-----	SRLVRSLSAAVA			
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (120)	EGGED	GT	PAGT	VFWF	AWNIN	NTIT-----	FTSR	QHENG-----	DCCEVLEKCVREFA		
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA) (110)	TGGT	PDKPVGM	VCFGWS	NRLCT	-----	RVETR	HFEG-----	DRKQIRLQAEEHA			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (109)	EAK	EG-IP	FGTVCF	AWAER	LFA	LALFS	RRERF	HG-----	DFARMREARWA		
ORF4 (167)	TGGT	ERKPVGT	VVFARARRLAD	FNEVVAE	CKSFGL	-----	GRSGIRLQAALCA				
<i>Oceanobacillus theyensis</i> (362)	DE-CEG	KPVGT	VYISTAD	GEV-----	VSKCF	NFTG-----	NRNHIR	DRACLKG			
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (CinA) (359)	DGGT	EKPVGL	VYIGLAG	FGDEV	SSFKY	NFGTMR	VGLR-----	PTVGRSFI RHLSACTA			
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 (103)	GGGSE	SKPVGT	VWEGFA	FFPG-----	SCEAM	RRFDG-----	-----	NRESVRAQAVAF			
<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8 (103)	GGGSE	SKPVGT	VWEGFA	FFPG-----	SCEAM	RRFDG-----	-----	NRESVRAQAVAF			
<i>Mycoplasma pulmonis</i> (83)	DAW	EN-KEV	GLVYIG	INDQVY	-----	EFKL	KG-----	SREQICNQACDFA			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (CinA) (102)	DALE	N-CAV	GS	LF	FCVIV	ANKAY	DFETKL	PAGSRNE-----	LRCLFVCKILQTV		
<i>Mycoplasma genitalium</i> (CinA) (102)	KAVEN	-KA	IGL	FFCII	IGNKAY	DFEFEM	QNNRKC	-----	NIELFTNKILESE		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA) (371)	SGGT	EKPVGT	VCFVLL	DDG-----	RTTTR	TVRLE	G-----	NRSDIRERSTIVA			
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA) (368)	GGGT	AEP	IGT	VCFV	MLADG	-----	PTLT	RTLRLG-----	NRSDIRERSTIVA		
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA) (106)	SGGS	ADKPVGL	VWGLALAG	CF-----	VVAER	QLFGHK	-----	GREFIRHEIVRHA			
<i>Listeria innocua</i> (CinA) (360)	DS-LEG	HPAG	TWIG	LHVAG	FET-----	EAYC	FVYGR-----	DRNHNRRAVKQG			
<i>Leptospira interrogans</i> (CinA) (362)	GGGT	EKKVGL	VYFGL	CKNEK	-----	TETHE	HYFFFP-----	RSSFREFAAHTG			
<i>Lactobacillus plantarum</i> (361)	GT-LGG	-PAG	TWIG	LAYR	DRPV-----	KAKQY	HFAG-----	NRQDIRERSVMAG			
<i>Helicobacter pylori</i> J99 (CinA) (166)	NGGS	-----	KAN	FVGT	ITYIGA	QRLG	SCAF	IDRC	FFEG-----	DRESICNKSVEHA	
<i>Helicobacter pylori</i> 26695 (166)	NGG	H-----	KAN	FVGT	ITYIGA	QKLGS	QAL	IDRC	FFEG-----	NRESICNKSVEHA	
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 (109)	DGGT	EKPVGT	AYIG	VAYAG	LWG	TATSAT	TVVR	REFD	G-----	DRCAVKAQIARAA	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (346)	GGGT	KDKPVGL	VYIGIK	VKNEV	-----	VFKRE	LKG-----	-----	CRNKIRQRAMMHA		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CinA) (120)	EGGED	GT	PAGT	VFWFA	WHIKG	QN-----	YTAV	MHFAG-----	DCETVLALAVREA		
<i>Enterobacter agglomerans</i> (109)	DGGSA	EKPVGT	VWEGFA	AGK	DGR-----	VITAK	QCFSG-----	DRCAVRIQAVES			
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL983 (120)	EGGED	GT	PAGT	VFWFA	WHIKG	QN-----	YTAV	MHFAG-----	DCETVLALAVREA		
<i>E. coli</i> (CinA) (120)	EGGED	GT	PAGT	VFWFA	WHIKG	QN-----	YTAV	MHFAG-----	DCETVLALAVREA		
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA) (353)	ER-----	-AG	QAY	AA	LTGT	LQ-----	KTVT	VNWEG-----	DFEQVRERA		
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (CinA) (105)	SK-CDG	HPVGE	VWIGVAG	PAHFG	ASGT	ILAY	RAF	EE	EQCVILAE	ILGRHHIRESAVQCS	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (CinA) (357)	GGGT	EKPVGL	VYVGL	CINGK	-----	VKTR	KL	NMPG-----	DRCTVRNRVVMNAV		
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA) (362)	GGGT	EKPVGT	VCVGI	ASKL	FDG	AVR	VEA	ARF	VMHG-----	DRHQNKIRFSEAA	
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (109)	GGGT	EMKPVGT	VHF	AVAR	ANRS-----	VAHR	HER	FDG-----	TREAVCLA		
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 (305)	KIEC	-KIK	SGT	ITYIG	MFRD	G-----	TFI	QET	LYLDG-----	DREFMEQAVLAT	
<i>Brucella melitensis</i> 16M (109)	GGGSA	EKPVGL	VHIAS	ARTG	CA-----	TLHRE	CR	FG	GEK-----	TRTEIRHAIVLAA	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (109)	GGAT	EGKPVGL	VHIAA	AARDGR	-----	TLHRE	HR	FG	AI-----	GRTAVRQCRSVVEA	
<i>Bifidobacterium longum</i> (CinA) (114)	GP-F	GDKP	-GLVY	GLR	IFAS	LT	ED	CHAE	VLKAVEL	HLDG-----	MREEVRLIVFHV
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (334)	GGGT	EKPVGT	VWIAA	QYKNEIR	-----	TYR	QET	NRG-----	-----	RAMNTERAGNNA	
<i>Bacillus subtilis</i> (CinA) (363)	DA-CEG	-EP	GHV	FIG	ISANG	KE-----	EVHE	F	HFAG-----	SRTGIRKRGKYG	
<i>Bacillus halodurans</i> (CinA) (358)	SP-SEG	K	EP	GT	VFIG	L	FRD	DEF-----	EAT	TLCLSG-----	SREQIRERTIKHG
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5 (177)	GGT	LT-KP	QGL	ITYIG	IFVK	DKL	TVIK	RIF	KGS	-RNE-----	NRELSTQTAIFYL
<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7120) (CinA) (359)	DGGT	EKPVGL	VYIGLAG	FGDEV	SSFKY	NFGTMR	VGLR-----	PTVGR	SFI	RHLSACTA	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon) (111)	GGGSA	EKPVGL	VILAT	FR	ARNG	-----	VLHHE	MRYGDI	-----	GRTEIRLATVRTA	
Consensus (407)	GGT	KPVGT	VYIGLA								



	(455)	455	460	470	480	490	500	512
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA) (236)	GIRIQAALCALSLIMPCASISQG							
<i>Yersinia pestis</i> C092 (144)	SVRIQAAYEALQTLFDDFI							
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c (145)	AVRRETVLTAIIGLSTLI							
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (CinA) (149)	AVRRQTVAAALRGLSALI							
<i>Vibrio vulnificus</i> (CinA) (142)	KVRIQAIEYSLKVLCDALLKNGSERQ							
<i>Vibrio cholerae</i> (CinA) (142)	QVRQCAIAH/IQSLIEHLAADQVCNVN							
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (141)	SIWEAISYLIELIKK							
<i>Thermotoga maritima</i> (CinA) (385)	MIRTRSAMMALENLRKYLKGRERV							
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> (CinA) (389)	RIRTRSMLEHAFDMVRRYLEGRQID							
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6808 (CinA) (396)	WIRYLSACQALDHLRRRLQSS							
<i>Synechococcus elongatus</i> (409)	WVRYLSIMNALDLRRQLIVNF							
<i>Streptomyces coelicolor</i> (CinA) (145)	EIRMESVQSVALILIRELASECTGNERAQTTERNGGF							
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS (399)	CVRYIATLHAENMVRKTLIKLENLL							
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA) (398)	DVRHIAVMHAFNLVRKALLSC							
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CinA) (145)	AVRLATVHTALLCLVAELAHAF							
<i>Shewanella oneidensis</i> (CinA) (390)	LVRSLSPAVAYDMLRRELLSEAVIVDYQSIGRESK							
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (154)	EVLEKCVRFALAEILFLLTKKA							
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA) (144)	QIRLQAPEHALRGLIDFLCAES							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (146)	RMRREATRWALRRLPEFHQRALRGERALRRPTERKEP							
ORF4 (206)	GIRIQAALCALSLIMPCASISQG							
<i>Oceanobacillus thersensis</i> (396)	HIDRACLKGFELTYQYLKSKS							
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (CinA) (404)	FIRHLSCTALDLRRRLITR							
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 (137)	SVRAQAVAFALERLAGLIENGGLAV							
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58 (137)	SVRAQAVAFALERLAGLIENGGLAV							
<i>Mycoplasma pulmonis</i> (112)	QILNQACDFALEKLDQLLEKQI							
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (CinA) (140)	LEVCKIILQTEHILSEIS							
<i>Mycoplasma genitalium</i> (CinA) (140)	LETNKILESFFHYLLTKLA							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA) (406)	DIRERSITVAMHLRRTLSGIFGSP							
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA) (404)	DIRERSITVAMHLRHALSDTESVP							
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA) (142)	FIRHETVRHALQFGLRALQQTLSRPR							
<i>Listeria innocua</i> (CinA) (394)	HNRBRRAVKQGFCLIKQFLITNK							
<i>Leptospira interrogans</i> (CinA) (397)	SREFEAFHTGIYLLYNRLKRLA							
<i>Lactobacillus plantarum</i> (395)	QIRERSVMAGLELLRHALNECTLKK							
<i>Helicobacter pylori</i> J 99 (CinA) (201)	SI NKSVEHALNMLARMI							
<i>Helicobacter pylori</i> 26695 (201)	SI NKSVEHALNMLARMI							
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 (150)	AVKAQILRAALTVALAAELEKVT							
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 (380)	KIRCRAMHLYNLKILSKVR							
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (CinA) (154)	TVIALAVRFALAQLIQLLI							
<i>Enterobacter agglomerans</i> (144)	AVRIQA VESLQIALREFIKN							
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933 (154)	TVIALAVRFALAQLIQLLI							
<i>E. coli</i> (CinA) (154)	TVIALAVRFALAQLIQLLI							
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA) (381)	CVRERA VAAI GLAF RALAAGGEG							
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (CinA) (152)	HIRESAVQCSRLIDHTIESQ							
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (CinA) (391)	TVRNR VNA IDWIRREIINI							
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA) (401)	CNKITRESEAAI RGLI VRLKEMEF							
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (145)	AV JAAVLTAIEMI REAVA							
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 (339)	FM EQAVIATFCLILKIKFIEFEI							
<i>Brucella melitensis</i> 16M (145)	EIRHAI VLAALCLVLCAI HRA							
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (145)	AVRCRSVVEAIRMLMELARGEQVTAKPCRAAASRLRPRVTRSFRRHAAKRRRFERSFEG							
<i>Bifidobacterium longum</i> (CinA) (155)	EVRRILVFH I QNLSI FTASEKE							
<i>Bacteroides thuraulta</i> (1368)	MNIERAGNNAI I IIRLILK							
<i>Bacillus subtilis</i> (CinA) (390)	GTRKR KYGCHILILKLEQK							
<i>Bacillus halodurans</i> (CinA) (392)	QIRERIIKHGCCQIINRIKRWNERSNCKV							
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5 (214)	ISTCTAIFYILKLIK							
<i>Arabidopsis</i> sp. (strain PCC 7120) (CinA) (404)	FIRHLSCTALDLRRRLITR							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon) (147)	EIRLAVRTAIFMLIALNQAGSV							
Consensus (455)	IR AV AI IL L							

Σχήμα 5.38. Συγκριτική αντιστοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του προϊόντος του ORF4a με γνωστές ή πιθανές πρωτεΐνες ClnA. Τα μαύρα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν ανόμοια αμινοξέα, τα μπλε γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα, τα μαύρα γράμματα σε μπλε φόντο δηλώνουν όμοια αμινοξέα, τα κόκκινα γράμματα σε κίτρινο φόντο δηλώνουν πανομοιότυπα αμινοξέα ενώ τέλος τα πράσινα γράμματα σε άσπρο φόντο δηλώνουν τα ασθενώς όμοια αμινοξέα.





* Αλληλουχία η οποία έχει κατατεθεί από τους Lee H.J. και Kang H.S. και αναφέρεται στο στέλεχος ZM4 του *Z. mobilis*. (ισοιθυός πρόσβασης AF176314).

Στη συνέχεια έγινε συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών οι οποίες με βάση το παραπάνω δενδρόγραμμα ανήκουν σε συγγενικά είδη και επιπλέον των πρωτεϊνών από τα *Deinococcus radiodurans* και *Streptococcus pneumoniae*, δύο βακτήρια στα οποία έχουν γίνει κάποιες μελέτες σχετικά με το οπερόνιο *cin* (Σχήμα 5.39). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 5.40. Σ' αυτήν την περίπτωση η συντηρημένη-αλληλουχία παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 2,1% και παρόμοια σε ποσοστό 24,9%.

	(196)	196	210	220	230	240	250	260
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CnA)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Brucella melitensis</i> 16M	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Chlorobium tepidum</i> (CnA)	(187)	TMGIGETQLADMIVEVECSLPSGTTLAYLPHAAGVSLMVSTSGARREDVCAENRRVVEAIVAKAG						
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CnA)	(188)	QGIG-----ESNVAEILGELTRCANPSVATYFRKTGVCEVRVAASACTEAEARALLAPVLCCVRGK						
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mesorhizobium loti</i> (CnA)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mycobacterium leprae</i> (CnA)	(193)	CTLRMEGLSESGLAETLRCAQASIPGFDALEITTCRRGEIEMVTRYEPVVNVYVELTCLLRCDR						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CnA)	(196)	ETIRIFGLPESSLAETLRCAEAAIPGFDLVEITTCRRGEIEMVTRFEPNAAQVYTQLARLLRCR						
ORF4	(1)	-----MTMCNNCTDGLSSQPSDEKEALQCKAECCDISAQLSEELCKTIQNMEENQPCENV						
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CnA)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CnA)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CnA)	(189)	QLVTILADLIDNCTIDPTLAPYAKTGCVTLRLSTKASSQEEANQALDILENQLDCCFTFEGISLRD						
<i>Zymomonas mobilis</i> (CnA)	(22)	LIFVREIKPMTMCNNCTDGLSSQPSDIEKEALQCKAECCDISAQLSEKLCKTIQNMEENQPCENV						
Consensus	(196)							

	(261)	261	270	280	290	300	310	325
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	(1)	MSLFPGDIEELARRIITI	FTFLGLMVSTAESCTGGLIAGALTEIAGSSAVVDRGFVITYTNEAKRC					
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CnA)	(1)	----MKELVGIAEQVA	AKLIARKQTLAVAESSTGGLISAGLLAVPGASAYFLGGAVVYTPCARRV					
<i>Brucella melitensis</i> 16M	(1)	---MSHIIAGCKAIAVLE	CACRKAGIMIAEASCTGGLIAAALTCTIPGSSCVVDRGFVITYSNEAKNE					
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	(1)	---MEPLEICTLSRLIL	LEARARLRLVTAFSCTGGLVAGATCSISGASCVFERGFVITYTNEAKSE					
<i>Chlorobium tepidum</i> (CnA)	(252)	RFVYATSEVTILEEVVN	LLERKLTVAVAESCTGGLIGSRLTEVPSSGCFLEGI.VTYSN.AKVR					
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CnA)	(248)	LARWTWGEDGCTLAG	AVGQCLAGRTLGVIEAGSAGALSLLADEP-----AFHIAAVTQDHRRLI					
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	(1)	---MELSCPDPPIEC	SLGCALRDAGHTVATAESCTGGLIGSLLTEVPASAYFDRSYVTYSYDAKLD					
<i>Mesorhizobium loti</i> (CnA)	(1)	-----MSNAELANS	LLACQCRGIMLATAESCTGGLIAAALTCTIAGSSAVVDRGFITYSNEAKME					
<i>Mycobacterium leprae</i> (CnA)	(258)	HGHCLYSEDGARVCD	LIAHLLAGRRILATAESCTAGLLAARLTERPGSSCYVAGALVAYSNEAKVT					
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CnA)	(261)	HGHCVYSEDGASVDE	LVAKLITGRRILATAESCTAGLLAARLTERPGSSKYVAGAVVAYSNEAKAQ					
ORF4	(57)	HYNLPNELVTRASLV	ICANRAAGQRIAAVAESCTGGLVMAALTEVPASCVFDFAGFVITYAN.AKID					
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CnA)	(1)	---MAESRALAQLAEL	VGEILHKRLMVATAESCTAGLVGAATCTIPGASAWFERGFVITYSNEAKSC					
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CnA)	(1)	---MWTTEEEKARAI	IQFTSRGLKLATAESCTGGLIAGALTCTIAGSSSVDRGFVITYSNEAKVE					
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CnA)	(254)	FCYGYGEETSLASIV	VEELKRQCKTIAAAESLTAGLECAIVANFSGVSSIIFGGFVITYSLEEKSR					
<i>Zymomonas mobilis</i> (CnA)	(87)	HYNLPNELVTRASLV	ICANRAAGQRIAAVAESCTGGLVMAALTEVPASCVFDFAGFVITYAN.AKID					
Consensus	(261)		LA VI A G IATAESCTGGLIAAALTCTIPGSS VED GFVITYSNEAKVD					

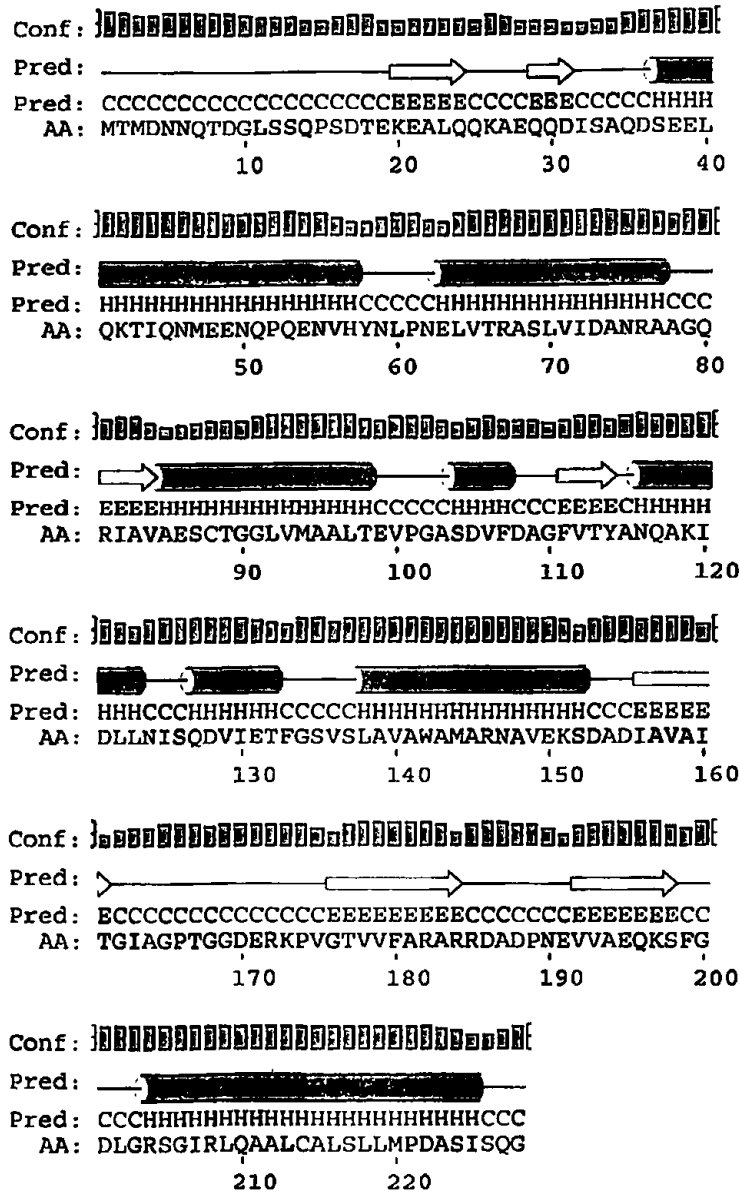


	(326)	326	340	350	360	370	380	390
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	(66)	MLGVGTETLTTFGAVSPQTAIQMAHGALYRSRANFAVAVTG-IAGPGGSAEKPVGVLVHLATKAR						
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CinA)	(62)	LMCLISDEGMKGFRRSSSEPYAKLLAEQMRSENCDWGLSETG-AAGPTGIRYGLAAGHSCMAVAGP						
<i>Brucella melitensis</i> 16M	(64)	MLAIPMELIAHLGAVSKEVAIAMAEGALVHSRAQVSIATVG-IAGPGGSAEKPVGVLVHLASART						
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	(64)	MLGVAGELLADYGAVSEPVARAMEGALRESNGHVAVAITG-VAGPGGGTPEKPVGTVEFAVARA						
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA)	(317)	LLGVDPATIEAHGAVSEPVAKEMARGCLERSGADISVSTTG-IAGPGGGTPEKPVGTVCVGIASK						
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA)	(308)	TLGLTPVILKEAGLVSEQFARELAAGAREHLASDVGLSVVVGVI GERAGQAYAALETGTLCKTIVT						
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	(65)	HG-VSREHLEEHGAVSEPVARQMARQVRDQAGITWGIATTG-IAGPDGGTPEKPVGTAYIGVAYA						
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA)	(61)	MLGVAAKTLDAHGAVSPETVLEMAAGALAHSRASLSLAVTG-IAGPSGGSAKPVGVLVWFGALALA						
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA)	(323)	LLGVDPALIAEHGEVSEPVFEAMPAAGALCRFDVDTAFATISG-IAGPGGGTAEKPIGTVCFTVMLA						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA)	(326)	LLGVDPALIEAHGAVSEPVAQAMAGALQGFAGDTATATTG-IAGPSGGTPEKPVGTVCFTVLLC						
ORF4(122)		LLNISQCVIETFGSVSLAVAWAMARI AVEKSDALIAVAITG-IAGPTGGLEFKPVGTVVFAARR						
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA)	(66)	MLGVPAATLIREHGAVSEPVAHAMAEAGAVINSRAQVALAVTG-VAGPTGGTPEKPVGMVCEGWSNR						
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CinA)	(64)	MLGVNPATLAAGAVSPETAMEMRGAVLRSAACIAIAVTG-IAGPGGSAEKPVGVLVHLA-AAR						
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA)	(319)	MLLIPAKNLEEHGVVSEFTACKMAEQARSKTQSCDFGISLTG-VAGPDSLEG-HPVGTVEFIGLAQC						
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA)	(152)	LLNISQCVIETFGSVSLAVAWAMARI AVEKSDALIAVAITG-IAGPTGGLEFKPVGTVVFAARR						
Consensus(326)		MLGV I HGAVSE VA MA GAL RS ALIAVAITG IAGP GGT EKPVGTV IAVA						

	(374)	374	380	390	400	410	420	438
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	(113)	GSAEKPVGVLVHLATKARNGN-----VLHHEMRYGDI GRTEIRLA VRTALEMLIALNQAQSV---						
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CinA)	(109)	NRYGLAAGHSCMAVAGPAAE-----VITLETGGNERLANMCVFATTALKLLRLKLS---						
<i>Brucella melitensis</i> 16M(111)		GSAEKPVGVLVHLASARTGCA-----TLHRECRFGEKTRTEIRHATVLAFLCLVLDALHRA---						
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15(111)		GTPEKPVGTVEFAVARANRS-----VAHRHERF LGCTREAV LAAVLTALEMLREAVA---						
<i>Chlorobium tepidum</i> (CinA)	(364)	GTPEKPVGTVCVGIASKLPDG--AVRVEAARFVMHGRHQNKIRESEA-LRGLLVRLKEMEF---						
<i>Deinococcus radiodurans</i> (CinA)	(356)	GAYAALETGTLCKIVTVN-----WPGDPEQVRRERAABA-LGLAFRALAAGGEG---						
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1(111)		GTPEKPVGTAYIGVAYAGTGTATSATTVVRREFDGRCAVKAQIARA-LTVLAAELEKVT---						
<i>Mesorhizobium loti</i> (CinA)	(108)	GSAEKPVGVLVWFGALAGQP-----VVAERCLFGHKGREFIRHEIVRH-LQFGLRALGQGTCSPR						
<i>Mycobacterium leprae</i> (CinA)	(370)	GTAEKPIGTVCFTVMLADGG-----PTLTRTLRLPGNRSDIRERSTTV MHLRLHALSETLSVP-						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CinA)	(373)	GTPEKPVGTVCFTVLLDGG-----RTTTRTVRLPGNRSDIRERSTTV MHLRLRLSGITPGSP-						
ORF4(169)		GLEEFKPVGTVVFAARRADE--NEVVAEQKSFGLGRSGIRLQAALC-LSLIMPDAISISQG---						
<i>Ralstonia solanacearum</i> (CinA)	(112)	GTPEKPVGMVCEGWSNRLQT-----RVETRHFKGGRKQIRLQAAEH-LRGLLCFLDAES---						
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (CinA)	(111)	GSAEKPVGVLVHLA-AARDGA-----MIHREMRYGDI GRPAVRLA VHT-LCLVAELAHAF---						
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CinA)	(366)	LEG-HPVGTVEFIGLAQCQG-----TEVIKVNIGGRSRAEVRHIAVMHAFNLVRKALLSC---						
<i>Zymomonas mobilis</i> (CinA)	(199)	GLEEFKPVGTVVFAARRADE--NEVVAEQKSFGLGRSGIRLQAALC-LSLIMPDAISISQG---						
Consensus(374)		GT EKPVGTV IAVA G G R IR A AL LLL L						

Σχήμα 5.40. Συγκριτική αντιστοίχιση των πρωτεϊνών CinA που ανήκουν σε συγγενικά είδη καθώς και από τα *Deinococcus radiodurans* και *Streptococcus pneumoniae*.

Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ORF4a υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED της SWISS-PROT και η δομή της φαίνεται στο Σχήμα 5.41.



Legend:

• helix

→ strand

~~CONFIDENTIAL~~ coll

Conf: } **CONF** - confidence of prediction

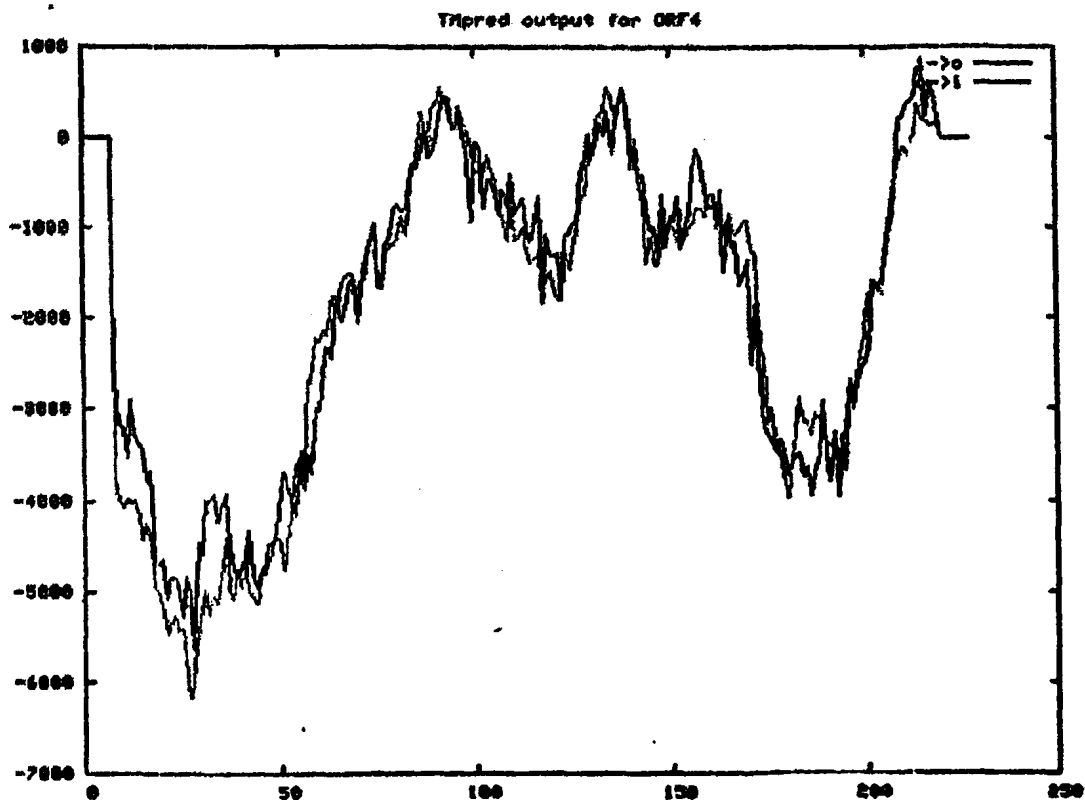
Pred: predicted secondary structure

Λ: target sequence

Σχήμα 5.41. Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF4a.



Τέλος, με τη χρήση του προγράμματος Vector NCI 6, υπολογίστηκαν οι παράμετροι για την εύρεση διαμεμβρανικών ελικών στη δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4a του *Z. mobilis* και τα αποτελέσματα έδειξαν τελικά ότι υπάρχουν 3 τέτοιου είδους έλικες στη δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα στα αμινοξέα 84-102, 130-148 και 206-224 (Σχήμα 5.42).

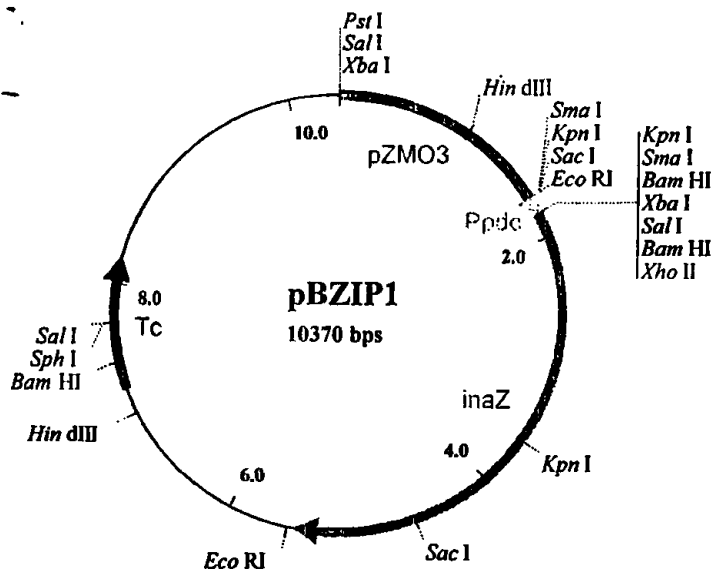


Σχήμα 5.42. Διάγραμμα υπολογισμού διαμεμβρανικών ελικών στην δομή της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4a.

5.13 Μετασχηματισμός στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988.

Μετά την εύρεση της ομολογίας του ORF4 με την πρωτεΐνη CinA, που όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα απαιτείται σε κάποια φάση του μετασχηματισμού, επιχειρήθηκε η μεταφορά του πλασμιδίου pBZIP1 (Σχήμα 5.43, Varsaki *et al.*, 1998)

στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988 με χημικό μετασχηματισμό. Η μεταφορά γενετικού υλικού με γενετικό μετασχηματισμό στο *Z. mobilis* έχει αναφερθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες αλλά η διαδικασία δεν είναι ακόμα αξιόπιστη και με επαναλήψιμα αποτελέσματα (Yanase *et al.*, 1986, Su and Goodman, 1987, Okamoto and Nakamura, 1992, Liang and Lee, 1998).



Σχήμα 5.43. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBZIP1.

Στην παρούσα εργασία ο χημικός μετασχηματισμός με τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων τα οποία αναπτύσσονταν σε πλήρες θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης δεν έδωσε αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία, προκαλλιέργεια κυττάρων ATCC 10988 τα οποία αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης μεταφέρθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης και επωάστηκαν για επιπλέον 4 ώρες στους 30 °C. Ο χημικός μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε κανονικά όπως αυτός περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4, παρ. 4.9.1, σε 6 ml καλλιέργειας 0, 1, 2, 3 και 4 h μετά τη μεταφορά των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης. Στον Πίνακα 5.12 που ακολουθεί φαίνονται οι οπτικές απορροφήσεις των αντίστοιχων καλλιεργειών. Η ανάρρωση των κυττάρων διήρκεσε 6 h σε πλήρες θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης, στους 30 °C, ενώ η επίστρωση των κυττάρων

πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Zymo Agar 2% γλυκόζης τα οποία περιείχαν Tc (τελική συγκέντρωση 40 µg/ml).

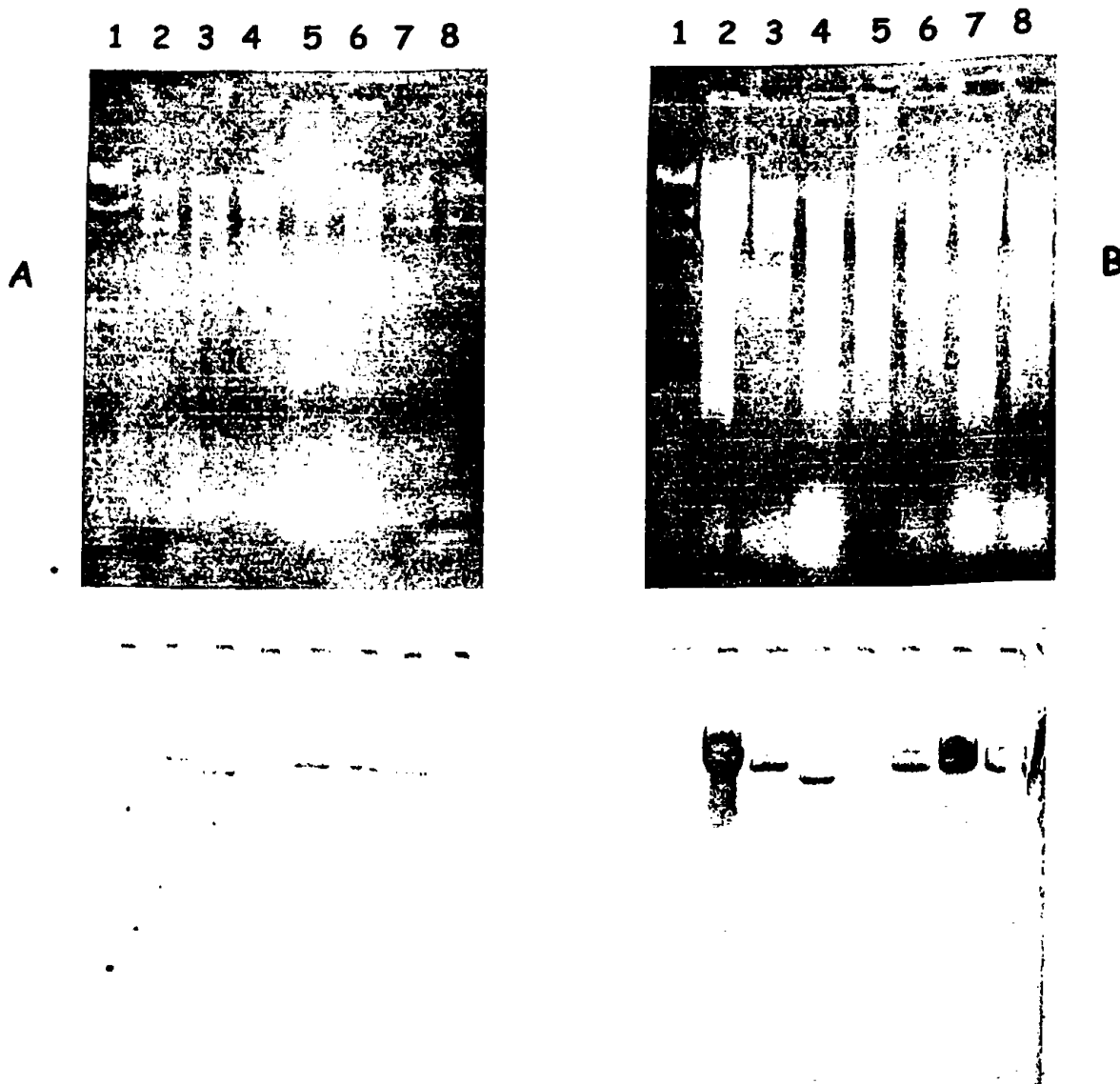
Πίνακας 5.12. Οπτικές απορροφήσεις καλλιεργειών.

Χρόνος λήψης δείγματος μετά τη μεταφορά των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης	Οπτική απορρόφηση στα 600 nm	Αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων στα τρυβλία επιλογής
0 h	0,07	0
1 h	0,089	16
2 h	0,104	6
3 h	0,144	8
4 h	0,195	3

Μετά την πάροδο 4 ημερών επώασης στους 30 °C αναπτύχθηκαν αποικίες στα τρυβλία επιλογής (Πίνακας 5.12). Κύτταρα των αποικιών αυτών ελέγχθηκαν για την παρουσία του μετασχηματισμένου πλασμιδίου με υβριδισμό DNA-DNA in-situ, κατάλληλη περιοριστική ανάλυση και υβριδισμό κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc. Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε και ποιοτικό πείραμα παγοπυρήνωσης καθ' όσον το πλασμίδιο pBZIP1 φέρει το γονίδιο παγοπυρήνωσης *inaZ* υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pdc} . Δεν ανιχνεύθηκε αξιοσημείωτη δραστικότητα παγοπυρήνωσης, ενδεικτικά αναφέρεται ότι από τις 20 σταγόνες που επιστρώθηκαν σε αλουμινόχαρτο στην καλύτερη των περιπτώσεων πάγνωναν οι 5.

Από τις αποικίες που έδωσαν επιπρόσθετα θετικό σήμα στον υβριδισμό in-situ επιλέχθηκαν 5 για περαιτέρω ανάλυση.

Έτσι, από αυτές απομονώθηκε τόσο πλασμιδιακό όσο και χρωμοσωμικό DNA, πραγματοποιήθηκε περιοριστική πέψη με *EcoRI* και εν συνεχεία υβριδισμός κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc (Εικόνα 5.18).



Εικόνα 5.18. Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδιακών και χρωμοσωμικών DNA μετά από τον χημικό μετασχηματισμό στο ATCC 10988. Από κάτω παρατίθενται τα φίλτρα του υβριδισμού με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

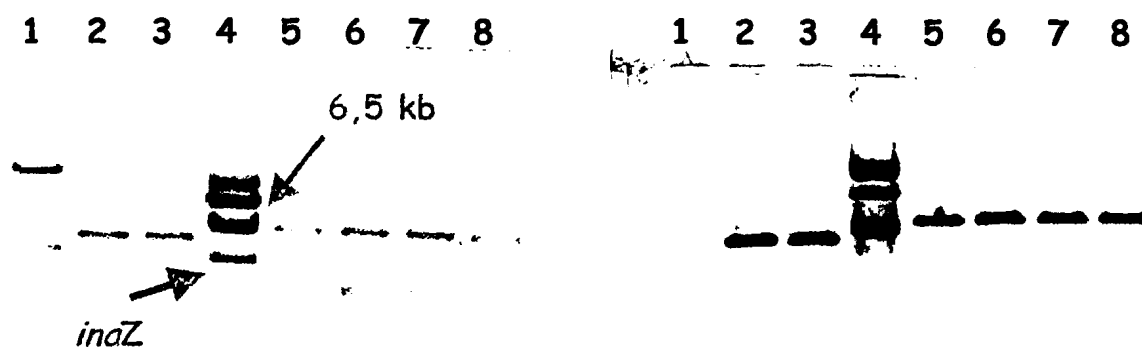
2,3,6,7,8: πλασμιδιακό DNA/*Eco*RI (A) και χρωμοσωμικό/*Eco*RI (B)

4: θετικός μάρτυρας

5: αρνητικός μάρτυρας

Από την παραπάνω Εικόνα και έχοντας ως δεδομένο ότι με την πέψη με *Eco*RI αναμένονται δύο ζώνες μοριακών βαρών 3,7 kb (το τμήμα του γονιδίου *inaZ*) και 6,5 kb το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι επετεύχθη μεταφορά γενετικού υλικού με γενετικό μετασχηματισμό στο στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988, το μεταφερόμενο

όμως πλασμιδίο παρουσιάζει κάποιες δομικές αλλοιώσεις στο νέο ξενιστή. Από την Εικόνα 5.18 φαίνεται ότι απουσιάζει τμήμα του γονιδίου *inaZ* και ίσως γι' αυτόν τον λόγο ανιχνεύθηκε σχεδόν μηδαμινή δραστικότητα παγοπυρήνωσης. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι αντίγραφο του πλασμιδίου έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του ATCC 10988. Η μεταφορά του πλασμιδίου pBZIP1 στο ATCC 10988 πιστοποιήθηκε περαιτέρω με επαναμετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5α με το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από το ATCC 10988, πέψη με *EcoRI* και υβριδισμό κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc (Εικόνα 5.19).



Εικόνα 5.19 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA από τον μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5α με το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από το ATCC 10988. Δίπλα από το πηγάδι της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το γονίδιο της Tc. Με βελόκια φαίνονται οι ζώνες του *inaZ* και των 6,5 kb.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

2,3: Θετικοί μάρτυρες

4: pBZIP1/*EcoRI*

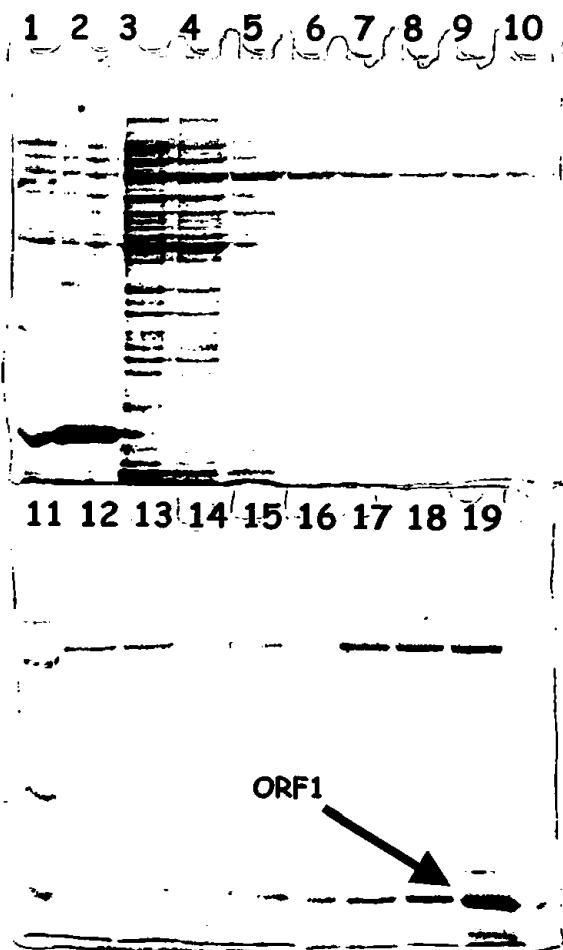
5,6,7,8: πλασμιδιακού DNA/*EcoRI*

Και από την παραπάνω Εικόνα το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι μεταφέρθηκε το pBZIP1 στο ATCC 10988, όμως το πλασμίδιο υπέστη δομικές αλλοιώσεις. Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης του φαινομένου του μετασχηματισμού στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988 δεν κατέστη δυνατή

η επανάληψη των παραπάνω αποτελεσμάτων. Αν και οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν για τον μετασχηματισμό ήταν ταυτόσημες και επιπλέον επιχειρήθηκαν νέες προσεγγίσεις σε καμία περίπτωση δεν έγινε δυνατή η μεταφορά πλασμιδιακών φορέων στο στέλεχος αυτό.

5.14 Απομόνωση και καθαρισμός των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2.

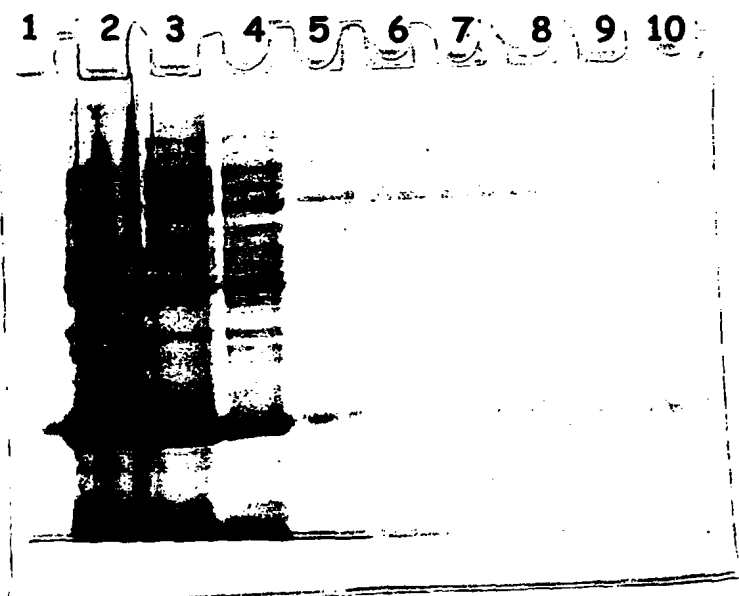
Για τα pET29c(+):ORF1 και pET29c(+):ORF2 έγινε υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα προκειμένου να απομονωθούν οι πρωτεΐνες που κωδικεύονται από τα αντίστοιχα ORFs μέσω στηλών κατακράτησης ιστιδίνης. Η απομόνωση έγινε υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιώντας αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση των πρωτεϊνικών πηγμάτων με Coomassie Brilliant R-250. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 5.20 και 5.21.



Εικόνα 5.20. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κλασμάτων από την απομόνωση της πρωτεΐνης του ORF1.

- Διαδρομές: 1,11: Πρότυπο
 2: Υπερέκφραση ORF1/5 h
 3: Flow through
 4: Πλύση 1 (20 mM ιμιδαζόλιο)
 5: Πλύση 2 (30 mM ιμιδαζόλιο)
 6: Πλύση 3 (30 mM ιμιδαζόλιο)
 7: Πλύση 4 (40 mM ιμιδαζόλιο)
 8: Πλύση 5 (40 mM ιμιδαζόλιο)
 9: Έκλουση 1 (80 mM ιμιδαζόλιο)
 10: Έκλουση 2 (80 mM ιμιδαζόλιο)
 12: Έκλουση 3 (160 mM ιμιδαζόλιο)
 13: Έκλουση 4 (160 mM ιμιδαζόλιο)
 14: Έκλουση 5 (250 mM ιμιδαζόλιο)
 15: Έκλουση 6 (250 mM ιμιδαζόλιο)
 16: Έκλουση 7 (250 mM ιμιδαζόλιο)
 17: Έκλουση 8 (250 mM ιμιδαζόλιο)
 18: Έκλουση 9 (250 mM ιμιδαζόλιο)
 19: Έκλουση 10 (250 mM ιμιδαζόλιο)

Στα εκλούσματα 9 και 10 η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε ήταν 0,99 και 1,51 mg/ml αντίστοιχα.



Εικόνα 5.21. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κλασμάτων από την απομόνωση της πρωτεΐνης του ORF2.

Διαδρομές:

1,11: Πρότυπο

2: Υπερέκφραση ORF1/5 h

3: Flow through

4: Πλύση 1 (20 mM ιμιδαζόλιο)

5: Πλύση 2 (30 mM ιμιδαζόλιο)

6: Πλύση 3 (30 mM ιμιδαζόλιο)

7: Πλύση 4 (40 mM ιμιδαζόλιο)

8: Πλύση 5 (40 mM ιμιδαζόλιο)

9: Έκλουση 1 (80 mM ιμιδαζόλιο)

10: Έκλουση 2 (80 mM ιμιδαζόλιο)

12: Έκλουση 3 (160 mM ιμιδαζόλιο)

13: Έκλουση 4 (160 mM ιμιδαζόλιο)

14: Έκλουση 5 (250 mM ιμιδαζόλιο)

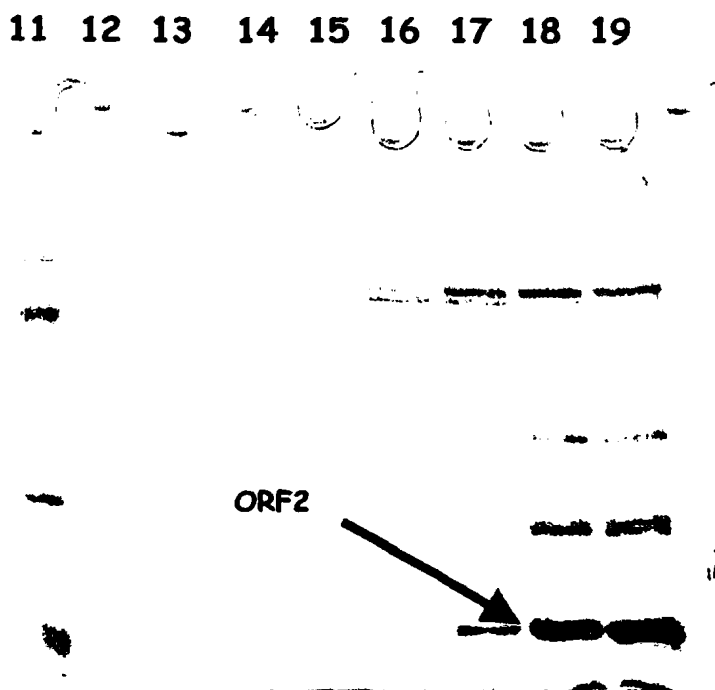
15: Έκλουση 6 (250 mM ιμιδαζόλιο)

16: Έκλουση 7 (250 mM ιμιδαζόλιο)

17: Έκλουση 8 (250 mM ιμιδαζόλιο)

18: Έκλουση 9 (250 mM ιμιδαζόλιο)

19: Έκλουση 10 (250 mM ιμιδαζόλιο)



Στα εκλούσματα 9 και 10 η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε ήταν 1,333 και 1,548 mg/ml αντίστοιχα.

Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος καθαρισμός, επιλέχθηκε μια διαφορετική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε σε δύο βήματα με διάλυμα βαθμίδωσης ιμιδαζολίου (Rohdich *et al.*, 2001, Herz *et al.*, 2000).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα κύτταρα από την υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 100 mM Tris.HCl pH 8,0. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε 5 ml/gr διαλύματος Α.

Διάλυμα Α: 100 mM Tris.HCl pH 8,0

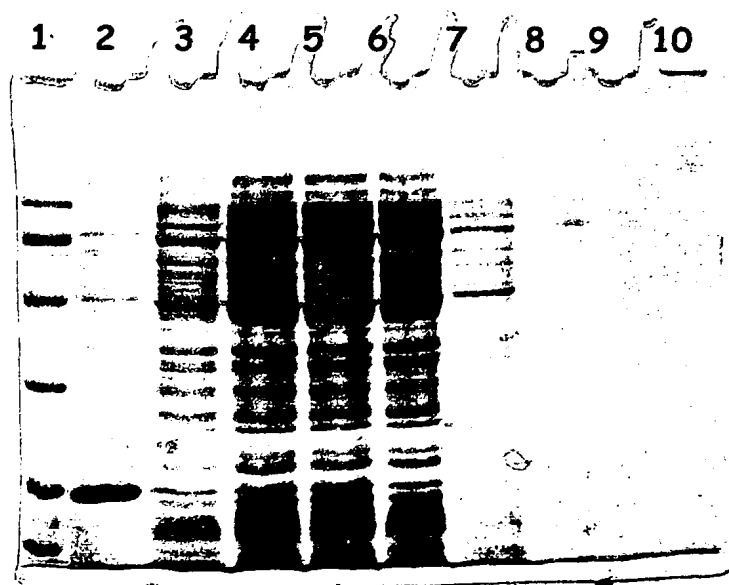
500 mM NaCl

20 mM ιμιδαζόλιο

Ακολούθησε θραύση των κυττάρων με υπερήχους και φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm/30 min.

Το υπερκείμενο εφαρμόστηκε σε στήλη Ni-NTA η οποία νωρίτερα είχε υποστεί εξισορρόπηση με διάλυμα Α και ροή 2 ml/min. Ακολούθησε πλύσιμο της στήλης με 50 ml διαλύματος Α. Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 20 ml διαλύματος Β (100 mM Tris.HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM-100 mM ιμιδαζόλιο) ακολουθούμενη από 120 ml διαλύματος Γ (100 mM Tris.HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 100 mM-500 mM ιμιδαζόλιο).

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που συλλέχθηκαν υπέστησαν ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και τα πρωτεϊνικά πηγμένα χρώση με Coomassie Brilliant R-250. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 5.22 και 5.23 για τις πρωτεΐνες που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2 αντίστοιχα.



Εικόνα 5.22. SDS-PAGE των πρωτεϊνικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από τη στήλη βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.

Διαδρομές:

1: Πρότυπο

2: Δείγμα 1 ml μετά από 5 h υπερέκφραση το pET29c(+):ORF1

3: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

4: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

5: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

6: Πλύση με διάλυμα A

7: Πλύση με διάλυμα A

8: Πλύση με διάλυμα A

9: Πλύση με διάλυμα A

10: Πλύση με διάλυμα A

11: Πλύση με διάλυμα A

12: Πλύση με διάλυμα A

13: Πλύση με διάλυμα A

14: Πλύση με διάλυμα A

15: Πλύση με διάλυμα A

16: Πλύση με διάλυμα A

17: Πλύση με διάλυμα A

18: Έκλουση με διάλυμα B

19: Έκλουση με διάλυμα B

20: Δείγμα 1 ml μετά από 5 h υπερέκφραση pET29c(+):ORF1

21: Κλάσμα διαδρομής 4

22: Έκλουση με διάλυμα B

23: Έκλουση με διάλυμα B

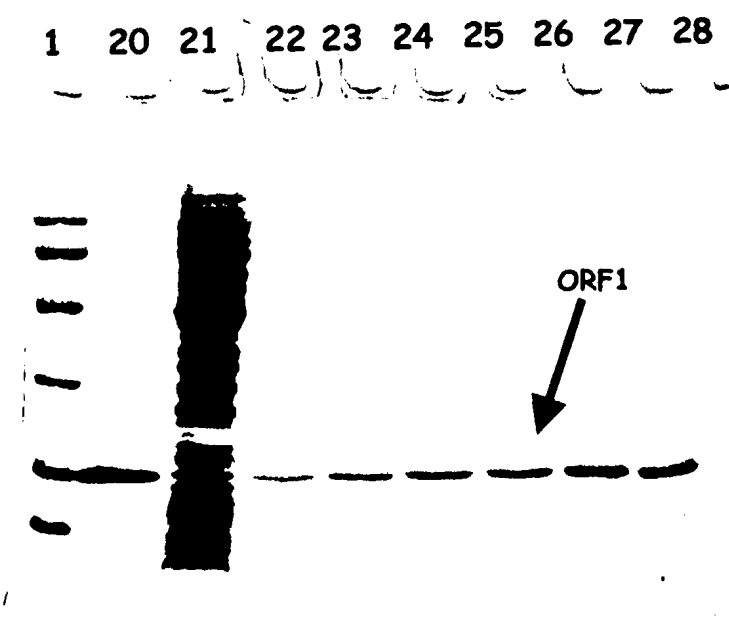
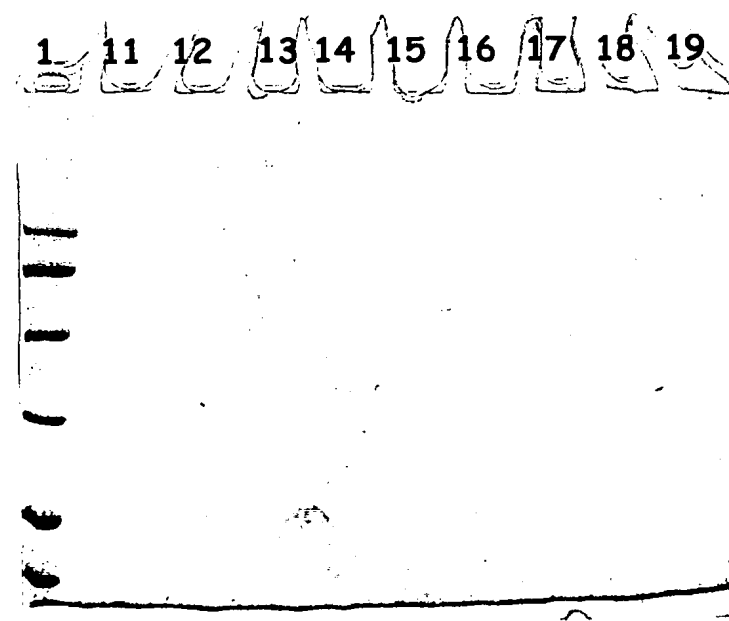
24: Έκλουση με διάλυμα B

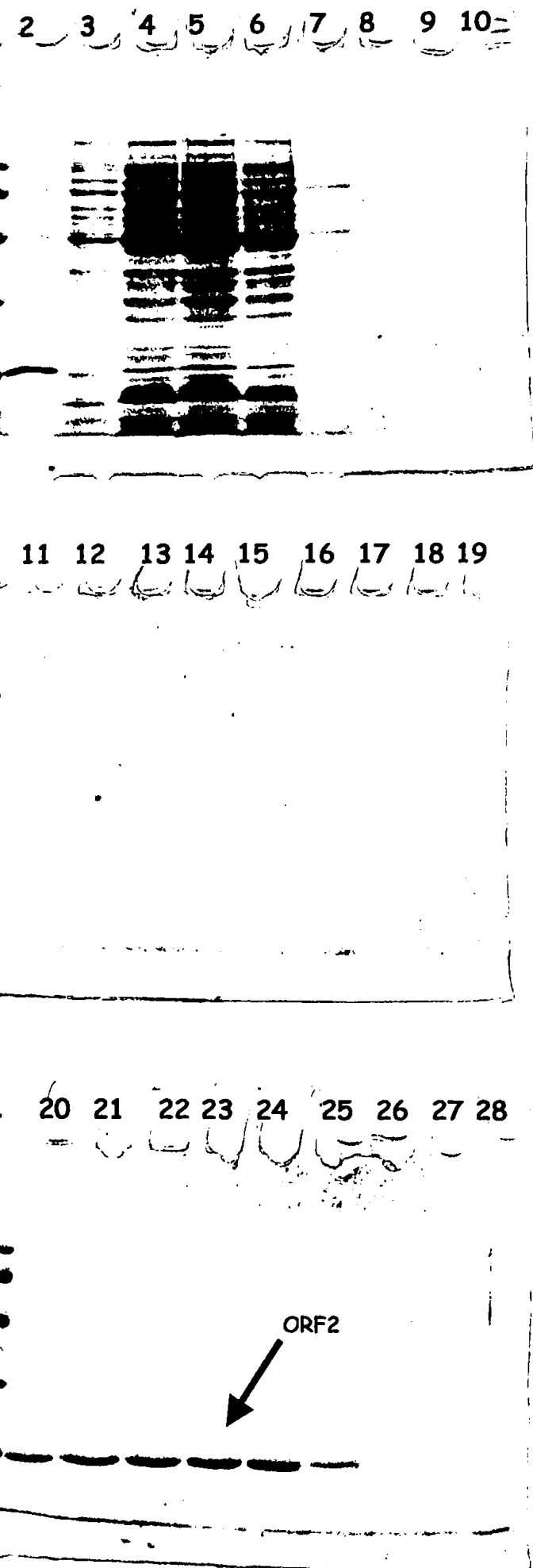
25: Έκλουση με διάλυμα Γ

26: Έκλουση με διάλυμα Γ

27: Έκλουση με διάλυμα Γ

28: Έκλουση με διάλυμα Γ





Εικόνα 5.23. SDS-PAGE των πρωτεϊνικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από τη στήλη βαθμίδωσης ιμιδαζολίου.

Διαδρομές:

1: Πρότυπο

2: Δείγμα 1 ml μετά από 5 h υπερέκφραση του pET29c(+):ORF2

3: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

4: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

5: Απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών

6: Πλύση με διάλυμα A

7: Πλύση με διάλυμα A

8: Πλύση με διάλυμα A

9: Πλύση με διάλυμα A

10: Πλύση με διάλυμα A

11: Πλύση με διάλυμα A

12: Πλύση με διάλυμα A

13: Πλύση με διάλυμα A

14: Πλύση με διάλυμα A

15: Πλύση με διάλυμα A

16: Πλύση με διάλυμα A

17: Πλύση με διάλυμα A

18: Έκλουση με διάλυμα B

19: Έκλουση με διάλυμα B

20: Έκλουση με διάλυμα B

21: Έκλουση με διάλυμα B

22: Έκλουση με διάλυμα B

23: Έκλουση με διάλυμα B

24: Έκλουση με διάλυμα B

25: Έκλουση με διάλυμα Γ

26: Έκλουση με διάλυμα Γ

27: Έκλουση με διάλυμα Γ

28: Έκλουση με διάλυμα Γ

Ακολούθησε συλλογή των κλασμάτων που περιείχαν τις επιθυμητές πρωτεΐνες (για το ORF1 κλάσματα διαδρομών 22 έως 28, Εικόνα 5.22, ενώ για το ORF2 κλάσματα διαδρομών 20 έως 25, Εικόνα 5.23) και πραγματοποιήθηκε ολονύχτια διαπίδυση σε διάλυμα 100 mM Tris.HCl pH 8 και ακολούθως συμπύκνωση με τη χρησιμοποίηση στερεής πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 6000).

Στο συμπυκνωμένο κλάσμα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του ORF1 ήταν 2,1 mg/ml (ποσότητα ίση με 14,714 mg συνολικά) ενώ του ORF2 2,7 mg/ml (ποσότητα ίση με 13,5 mg συνολικά). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία διήθησης επί πηγματος προκειμένου να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών.

Αρχικά ως υλικό επιλέχθηκε το Sephadex G-100 (Sigma), επειδή όμως ο διαχωρισμός που επετεύχθη δεν κρίθηκε ικανοποιητικός επιλέχθηκε ως υλικό το Sephacryl S-200 HR (High Resolution, Pharmacia) το οποίο από τις προδιαγραφές του φαίνεται ότι έχει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και είναι πιο εύκολο στο χειρισμό.

Για το πακετάρισμα της στήλης χρησιμοποιήθηκαν 105 ml υλικού, εξισορροπημένο σε θερμοκρασία δωματίου και 35 ml διαλύματος Α.

Το πακετάρισμα έγινε ως εξής: ροή ~ 1 ml/min για 2 h περίπου ακολουθούμενη από ροή ~ 1,8 ml/min για 1 h. Μετά το πέρας του πακεταρίσματος ακολούθησε ολονύχτια εξισορρόπηση της στήλης με διάλυμα Α και με ροή πολύ μικρότερη από αυτή του πακεταρίσματος. Οι διαστάσεις της στήλης ήταν ~ 72 cm X 1.6 cm.

Πριν την εφαρμογή των δειγμάτων στη στήλη προηγήθηκε η διαβίβαση πρότυπων δειγμάτων. Αυτά ήταν τα παρακάτω:

Κυανούν της δεξτράνης (10 mg/ml), M.B. 2.000.000 kDa

β-αμυλάση (4 mg/ml), M.B. 200 kDa

Αλκοολική αφυδρογονάση (5 mg/ml), M.B. 150 kDa

Αλβουμίνη (10 mg/ml), M.B. 66 kDa

Καρβονική ανυδράση (3 mg/ml), M.B. 29 kDa

Κυτόχρωμα C (2 mg/ml), M.B. 12.4 kDa

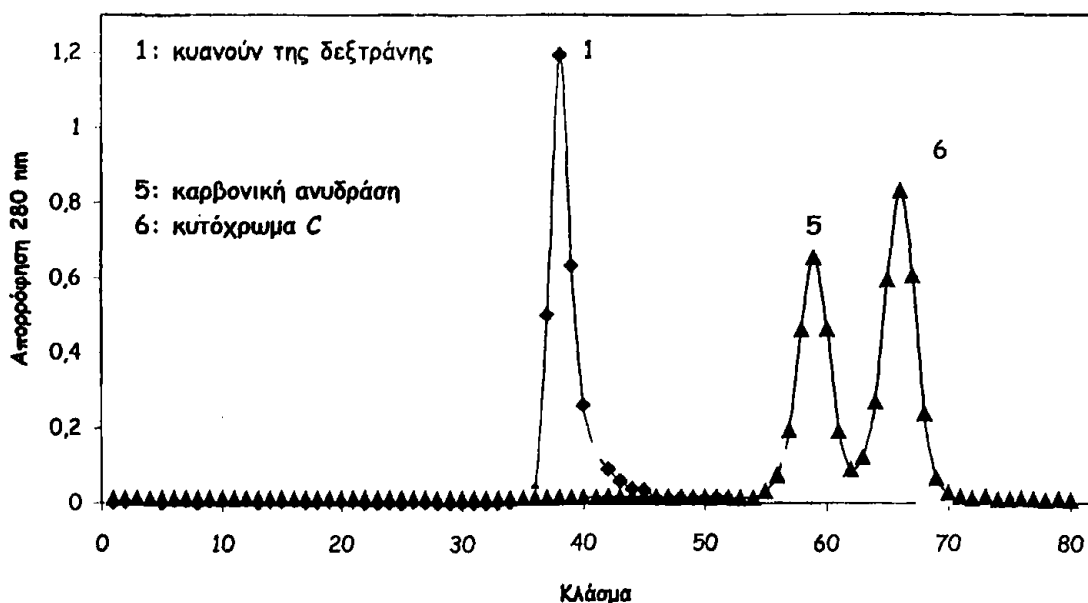
Διάλυμα Α: 50 mM Tris.HCl
150 mM NaCl
pH 7,0

Το διάλυμα Α παρασκευάζεται πάντα με υπερκάθαρο νερό και πριν τη χρήση του φιλτράρεται μέσω φίλτρων διαμέτρου πόρων 0,45 μm .

Αρχικά εκλούστηκε από τη στήλη το κυανούν της δεξτράνης (όγκος δείγματος 2 ml, συγκέντρωση 1 mg/ml, Σχήμα 5.44) προκειμένου να υπολογισθεί ο νεκρός όγκος της στήλης (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος 4.23.3). Τα συλλεγόμενα κλάσματα φωτομετρήθηκαν στα 280 nm.

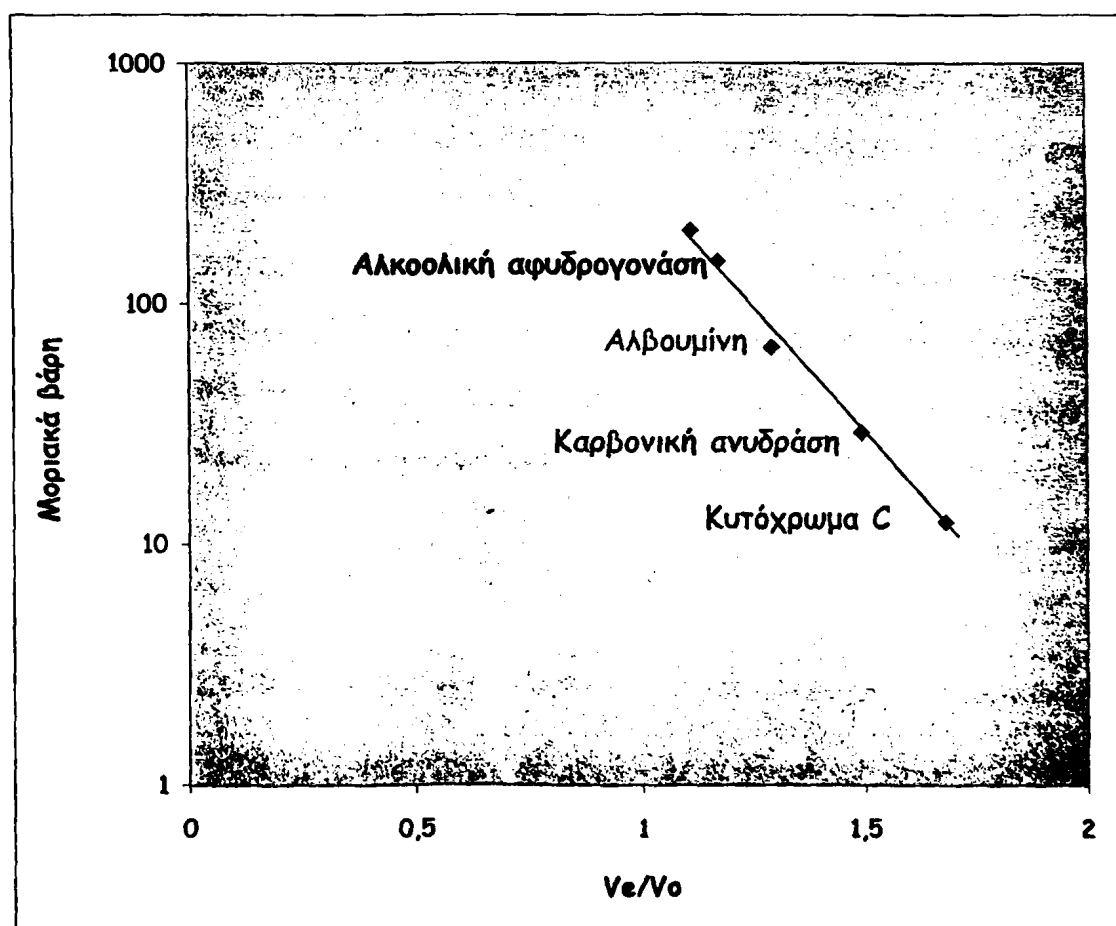
Ακολούθως, εκλούστηκε από τη στήλη μίγμα των εξής πρωτεϊνικών προτύπων: αλβουμίνη, β -αμυλάση, αλκοολική αφυδρογονάση (όγκος δείγματος 2 ml, συγκέντρωση 1 mg/ml έκαστη, Σχήμα 5.44). Τα συλλεγόμενα κλάσματα φωτομετρήθηκαν στα 280 nm και υπολογίστηκε ο όγκος έκλουσης κάθε μίας από τις τρεις πρωτεΐνες του μίγματος.

Τέλος από τη στήλη εκλούστηκε μίγμα καρβονικής ανυδράσης και κυτοχρώματος C (όγκος δείγματος 1 ml, συγκέντρωση 1 mg/ml έκαστη, Σχήμα 5.44). Τα συλλεγόμενα κλάσματα φωτομετρήθηκαν στα 280 nm και υπολογίστηκε ο όγκος έκλουσης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες του μίγματος.



Σχήμα 5.44. Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης των πρότυπων πρωτεϊνών από τη στήλη μοριακής διήθησης.

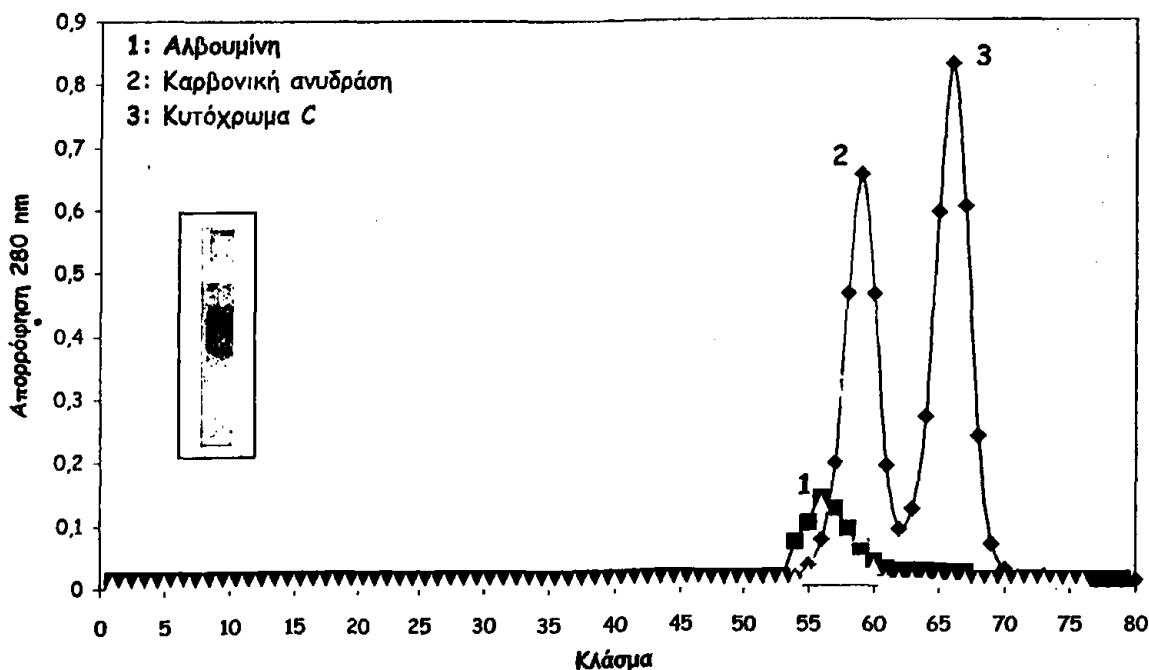
Με βάση τους όγκους έκλουσης των πρωτεϊνικών προτύπων (V_e), το νεκρό όγκο της στήλης (V_0), που όπως αναφέρθηκε νωρίτερα αντιστοιχεί στον όγκο έκλουσης του κυανού της δεξτράνης και τα μοριακά βάρη των πρότυπων πρωτεϊνών κατασκευάστηκε το διάγραμμα του Σχήματος 4.45 από το οποίο θα βρεθούν τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που κωδικοούνται από τα ORF1 και ORF2, αφού πρώτα υπολογιστεί ο όγκος έκλουσής τους από τη στήλη.



Σχήμα 5.45. Γραφική παράσταση της παραμέτρου V_e/V_0 συναρτήσει των μοριακών βαρών των πρότυπων πρωτεϊνών.

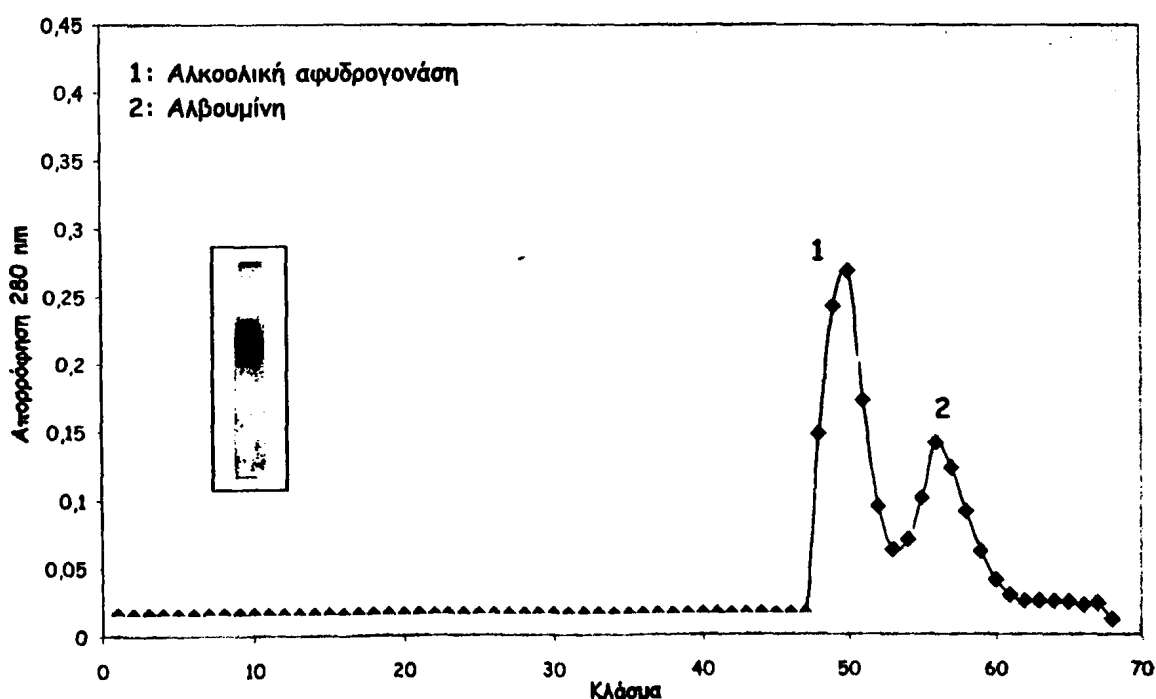
Για την έκλουση των ORF1 και ORF2 από τη στήλη μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε όγκος 2 ml (ίδιος με αυτόν των προτύπων) και συγκέντρωση 2 mg/ml.

Το ORF1 εκλούστηκε στο 57^ο κλάσμα. Ο όγκος έκλουσής του υπολογίστηκε στα 89,21 ml. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.46 το ORF1 εκλύεται μεταξύ της αλβουμίνης (μοριακό βάρος 66 kDa) και της καρβονικής ανυδράσης (μοριακό βάρος 29 kDa). Με βάση τον όγκο έκλουσης και με τη βοήθεια του διαγράμματος του Σχήματος 5.45 το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το ORF1 υπολογίζεται στα 37 kDa περίπου. Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος του μονομερούς της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι 18,116 kDa το συμπέρασμα που εξαγεται είναι ότι το ORF1 είναι μια διμερής πρωτεΐνη.



Σχήμα 5.46 Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF1 από τη στήλη μοριακής διήθησης. Στην εσωτερική εικόνα φαίνεται το πήγμα μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο της PAGE 4-20%.

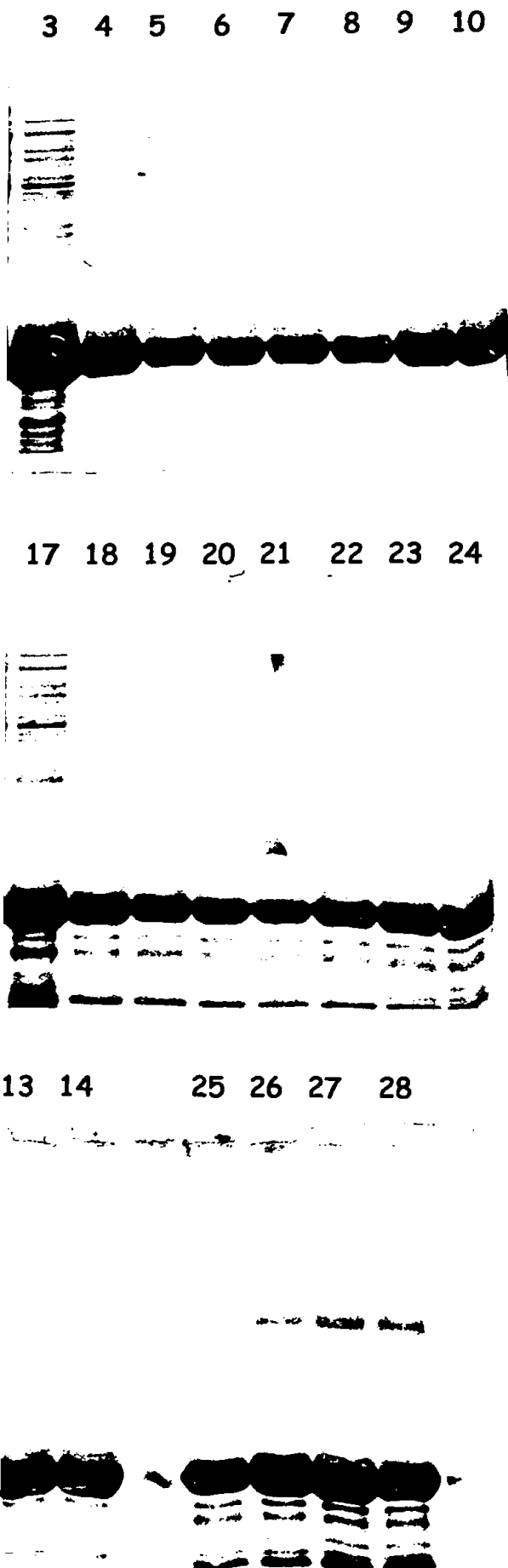
Το ORF2 εκλούστηκε στο 52^ο κλάσμα. Ο όγκος έκλουσής του υπολογίστηκε στα 81,4 ml. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.47 το ORF2 εκλύεται μεταξύ της αλκοολικής αφυδρογονάσης (μοριακό βάρος 150 kDa) και της αλβουμίνης (μοριακό βάρος 66 kDa). Με βάση τον όγκο έκλουσης και με τη βοήθεια του διαγράμματος του Σχήματος 5.45 το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το ORF2 υπολογίζεται στα 120 kDa περίπου. Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος του μονομερούς της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι περίπου 18,74 kDa το συμπέρασμα που εξαγεται είναι ότι το ORF2 είναι μια εξαμερής πρωτεΐνη. Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί και από την πραγματοποίηση PAGE με βαθμίδωση πυκνότητας 4-20%, διότι στο πήγμα ανιχνεύθηκε μία κηλίδα (Σχήμα 5.45). Η χρώση του πήγματος έγινε με νιτρικό άργυρο.



Σχήμα 5.47 Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF2 από τη στήλη μοριακής διήθησης. Στην εσωτερική εικόνα φαίνεται το πήγμα μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο της PAGE 4-20%.

Τέλος, με σκοπό την απομόνωση των φυσικών πρωτεϊνών από το *Z. mobilis*, κρίθηκε σκόπιμη η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των προϊόντων των τεσσάρων ORFs.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες υπό αποδιατακτικές συνθήκες από στήλη κατακράτησης ιστιδίνης (Εικόνα 5.24).

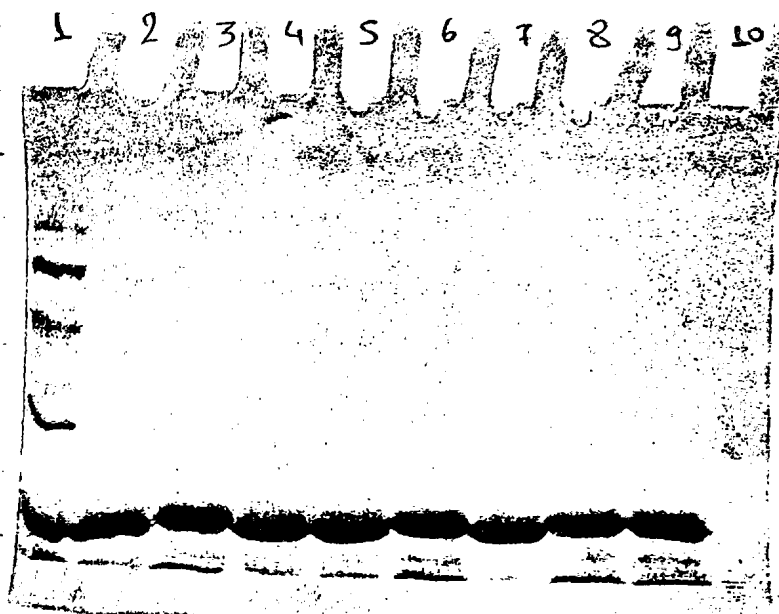


Εικόνα 5.24. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση κλασμάτων από την απομόνωση των ORF1 και ORF2 υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Διαδρομές:

- 1, 15: Lysate ORF1 και ORF2 αντίστοιχα
- 2, 16: Flow through ORF1 και ORF2 αντίστοιχα
- 3, 17: Πλύση C1 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 6,3)
- 4, 18: Πλύση C2 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 6,3)
- 5, 19: Έκλουση D1 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 5,9)
- 6, 20: Έκλουση D2 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 5,9)
- 7, 21: Έκλουση D3 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 5,9)
- 8, 22: Έκλουση D4 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 5,9)
- 9, 23: Έκλουση E1 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)
- 10, 24: Έκλουση E2 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)
- 11, 25: Έκλουση E3 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)
- 12, 26: Έκλουση E4 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)
- 13, 27: Έκλουση E5 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)
- 14, 28: Έκλουση E6 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα (pH 4,5)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η καθαρότητα των ζωνών που αντιστοιχούν στις επιθυμητές πρωτεΐνες, τα δείγματα αραιώθηκαν 1:3 και υπέστησαν εκ νέου ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικόνα 5.25).



Εικόνα 5.25. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αραιωμένων 1:3.

Διαδρομές: 1: Πρότυπο

2, 6: Έκλουση D1 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα

3, 7: Έκλουση D2 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα

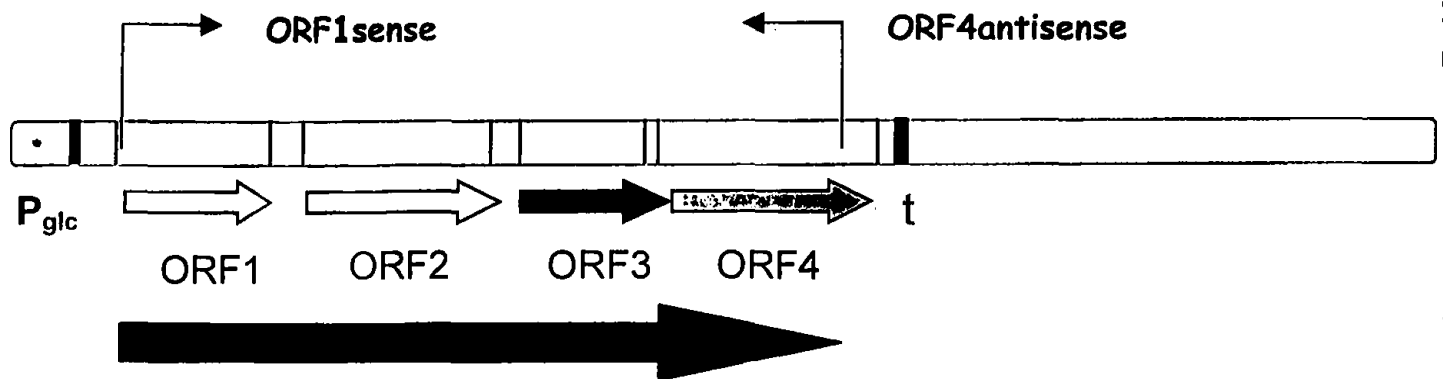
4, 8: Έκλουση D3 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα

5, 9: Έκλουση D4 ORF1 και ORF2 αντίστοιχα

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στις επιθυμητές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το πηγάδι της ηλεκτροφόρησης και εστάλησαν για την παρασκευή αντισωμάτων. Το πολυακρυλαμίδιο δεν παρεμποδίζει την ανοσοποίηση επειδή δεν έχει αντιγονικές ιδιότητες, αντίθετα βοηθάει στη διαδικασία της ανοσοποίησης αφού επιβραδύνει τη διαδικασία της απορρόφησης και της διάσπασης της πρωτεΐνης (Harlow and Lane 1988, Panagiotidis *et. al.*, 1994).

5.15 Εντοπισμός της μετάλλαξης του οπερονίου *glc* του στελέχους CU1Rif2

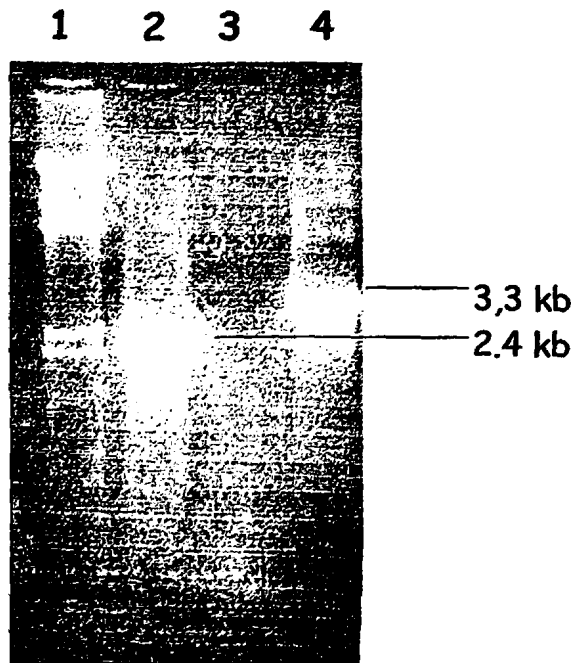
Πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε πλασμιδιακό DNA pUC1845 (ως μάρτυρα) και χρωμοσωμικό CU1Rif2, χρησιμοποιώντας ως πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια τα ORF1sense και ORF4antisense (Πίνακας 5.7) όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.48.



Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR 2.380 bp

Σχήμα 5.48. Σχεδιασμός αντίδρασης PCR με τις ενδείξεις των χρησιμοποιούμενων πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR.

Απροσδόκητα παρατηρήθηκε ότι ενώ το προϊόν PCR που προήλθε από το pUC1845 ως εκμαγείο έχει το αναμενόμενο μέγεθος, το αντίστοιχο από το CU1Rif2 παρουσιάζεται κατά 900 bp περίπου μεγαλύτερο (Εικόνα 5.26). Το αποτέλεσμα αυτό επαναλήφθηκε όσες φορές πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR, υποδεικνύοντας ότι η μετάλλαξη του CU1Rif2 οφείλεται σε ευρύτερη χρωμοσωμική ανακατάταξη ή ένθεση.



Εικόνα 5.26. Προϊόντα PCR με πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια τα ORF1sense και ORF4antisense.

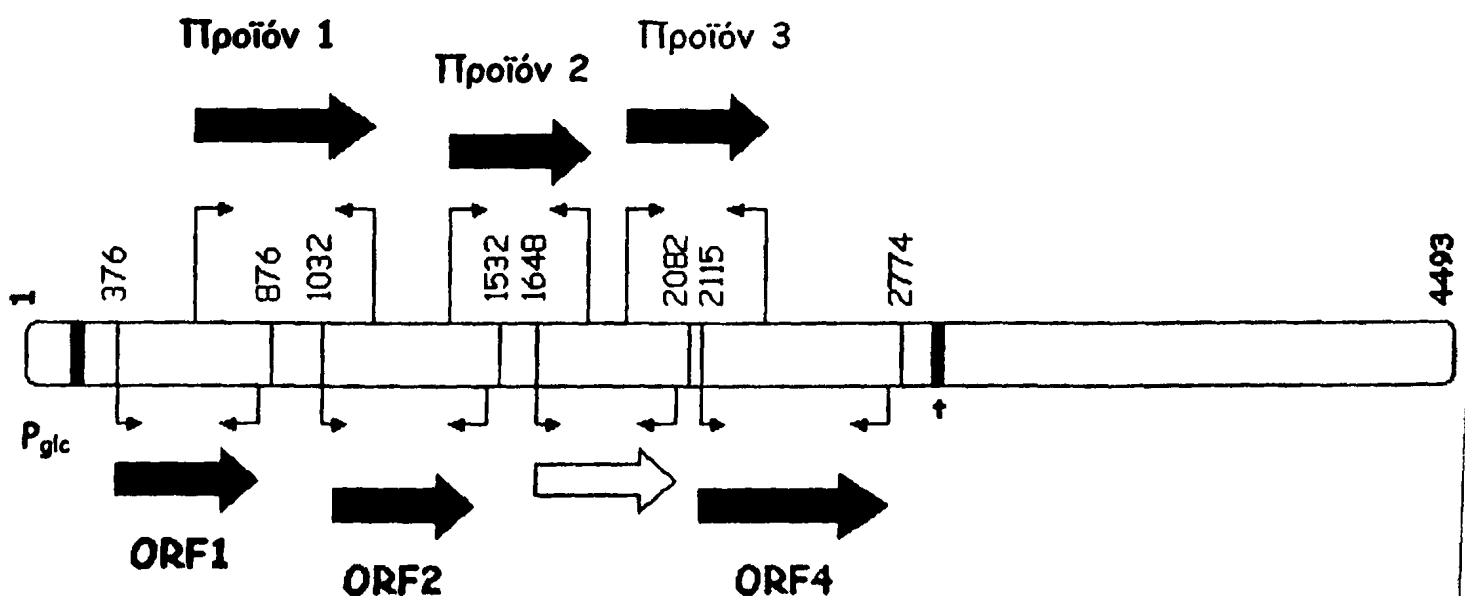
Διαδρομές: 1: Πρότυπο λDNA/*Hind*III

2: PCR προϊόν με εκμαγείο το pUC1845

3: PCR αντίδραση χωρίς DNA (μάρτυρας)

4: PCR προϊόν με εκμαγείο το CU1Rif2

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η πιθανότητα, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR σε πλασμιδιακό DNA pUC1845 (ως μάρτυρα) και χρωμοσωμικό CU1Rif2 και ATCC 10988 χρησιμοποιώντας κατάλληλα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια ώστε να απομονωθούν τα τμήματα των ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4 καθώς και των μεταξύ τους περιοχών (Σχήμα 5.49, Εικόνα 5.27).

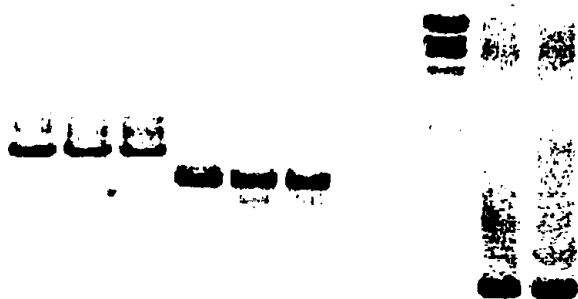


Σχήμα 5.49. Σχεδιασμός κατάλληλων αντιδράσεων PCR. Τα βελάκια δείχνουν τα εκάστοτε ζεύγη πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν και ανάμεσά τους φαίνονται τα αναμενόμενα προϊόντα PCR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

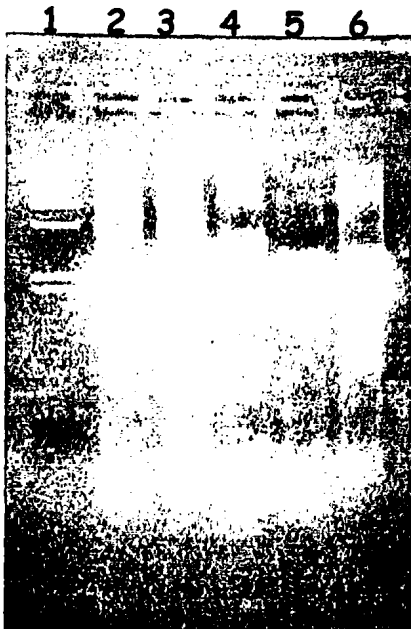


Εικόνα 5.27. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα
αγαρόζης (1,2%) των προϊόντων PCR.

Διαδρομές:

- 1,14,21: Πρότυπο λDNA/*Hind* III
- 2: pUC1845/ORF1
- 3: CU1Rif2/ ORF1
- 4: ATCC 10988/ ORF1
- 5: pUC1845/ ORF2
- 6: CU1Rif2/ ORF2
- 7: ATCC 10988/ ORF2
- 8: pUC1845/ ORF3
- 9: CU1Rif2/ ORF3
- 10: ATCC 10988/ ORF3
- 11: pUC1845/ ORF4
- 12: CU1Rif2/ ORF4
- 13: ATCC 10988/ ORF4
- 15: pUC1845/ ORF1-ORF2
- 16: CU1Rif2/ ORF1-ORF2
- 17: ATCC 10988/ ORF1-ORF2
- 18: pUC1845/ ORF2-ORF3
- 19: CU1Rif2/ ORF2-ORF3
- 20: ATCC 10988/ ORF2-ORF3
- 22: ATCC 10988/ORF3-ORF4
- 23: CU1Rif2/ ORF3-ORF4

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 5.27, οι περιοχές των ORF1, ORF2, ORF3 καθώς και οι μεταξύ των ORFs περιοχές είναι ταυτόσημες τόσο στο CU1Rif2 όσο και στα pUC1845 και ATCC 10988. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ του CU1Rif2 και του φυσικού τύπου εντοπίζεται στο τμήμα του ORF4, το οποίο εμφανίζεται στο μεταλλαγμένο στέλεχος μεγαλύτερο κατά 900 bp περίπου. Ανάλυση με αντίδραση PCR χρωμοσωμικού DNA από το στέλεχος CU1 (προγονικό στέλεχος του CU1Rif2, Drainas *et al.*, 1984) και τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια ORF1sense και ORF4antisense έδειξε ακριβώς την ίδια αύξηση του μεγέθους του τμήματος που αντιστοιχεί στο ORF4 (Εικόνα 5.28).



Εικόνα 5.28. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αναρόζης (0,7%) των προϊόντων PCR.

Διαδρομές:

- 1: Πρότυπο λDNA/*Hind*III
- 2: Προϊόν PCR από το ATCC 10988
- 3: Προϊόν PCR από το CU1Rif2
- 4: Προϊόν PCR από το CU1
- 5: Προϊόν PCR από το CP4
- 6: Προϊόν PCR από το pUC1845

Το τμήμα του "ORF4" από το CU1Rif2 υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pET29c(+) και αναλύθηκε η νουκλεοτιδική του αλληλουχία προκειμένου να διευκρινιστεί η ταυτότητα της ένθεσης που φαίνεται ότι έχει εισαχθεί στην περιοχή αυτή τόσο του CU1 όσο και του CU1Rif2. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στα ORF1, ORF2, ORF3 καθώς και στην περιοχή του προαγωγού από το CU1Rif2 (πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια prF: 5'-GTT TCC CGA ATT CTC GCC TG-3' και prR: 5'-CCA CGG TCA TAT GCG GCC TT-3'), υποκλωνοποιήθηκαν απευθείας σε γνωστό πλασμιδιακό φορέα (pCR2.1, Invitrogen) και βρέθηκε η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.

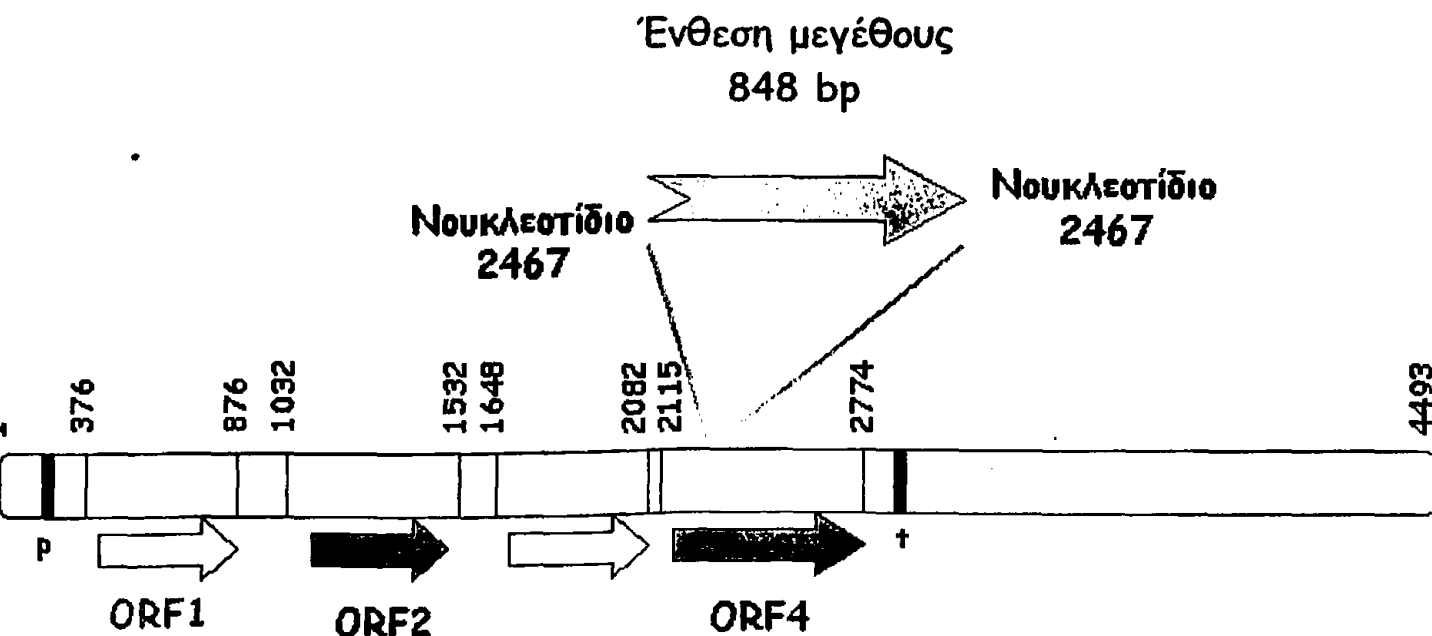
Καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε στα ORF1, ORF2, ORF3 καθώς και στην περιοχή του προαγωγού μεταξύ του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 και του φυσικού τύπου. Η αλληλουχία της ένθεσης στην περιοχή του ORF4 στα CU1Rif2 και CU1 παρατίθεται παρακάτω (Σχήμα 5.50). Το μέγεθός της υπολογίζεται στα 848 bp και φαίνεται ότι έχει εισαχθεί στη θέση 2467 του οπερονίου *g/c* και βρίσκεται εντός του ORF4 (Σχήμα 5.51). Η εύρεση ομολογιών μεταξύ γνωστών αλληλουχιών DNA και της ένθεσης αποκάλυψε την ομολογία της τελευταίας με δύο τμήματα του πλασμιδίου 1 του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* (αρ. πρόσβασης AY057845) σε ποσοστό 93% και 88% αντίστοιχα καθώς επίσης και με δύο τμήματα ενός υποθετικού γονιδίου *unrD* του στελέχους CP4 του *Z. mobilis* (αρ. πρόσβασης AY083904) σε ποσοστό 88% και με τα δύο τμήματα.

```

1   GTTCTGTTGA CAAAGGGTAT AATTTAAGAT TTTTAGAGAT AACTTGAGAA CAAGTTTTGT
61  AGGGTAGATA GGATGCGAGG AGATCTGACG GACGCGGAGT GGGAGATAAT ACAGGGTCTT
121 CTTCCAAGCG AACGAGGCCG CTGCGCGCGT CCCGCCAAAA GTAATCGGT ATTCTCAAT
181 GGTATGCTTT ATGTGCTTCG AACAGGCTGC CCGTGGCGAG ATATGCATGA ACGTTATGGG
241 AAATGGAATT CGGTCTATGT TCGGTTTCGT AGGTGGGCAG AACAGGGTGT GTGGGACGCT
301 CTTCTTGAAA CTCTCGTTGA CCTTGGCCTG ACAGATGACT GGCAACATAT GATAGATAGT
361 ACGATTATTC GCGCCACAG CCAAGCGGCT GGCACAAAAG GGGGACGTAT AAGGAAGGCT
421 TTGGTCGCAG TCGCGGAGGC TTTACGAGCA AGATGCACGC CCGTTCCGAT GGTCAAGGCC
481 GCCCTCTAGC TTTGCACTA ACCGGTGGTG AGGTCTCTGA TTATTCTGGC GCTGATAGCT
541 TGATAGATAT CCCTGTCACA ACACCCCACT GTTTTCTCGC TGATAAAGGA TATGATAGCG
600 ATAGGTTACG CGAAAACTG CTTTTTCGAG GCATTCTTCC TGTATCCCG CCTCGTTCCA
661 ATCGAAAAAA GCCTATTCTT TATAATCTCC AGCACTACAA AGATCGTAAT CGTATTGAGC
721 GGATGTTTAA TAAGCTAAAG CAGTTCAGGC GCATTGCCAC ACGCTATGAC AAAACCAGAA
781 AATCTTTTCT CGCCTTCCTT CATCTCGCGG CCGTAAAATT GTGGTTACCT TCCTTTGTCA
841 * ACAAACC

```

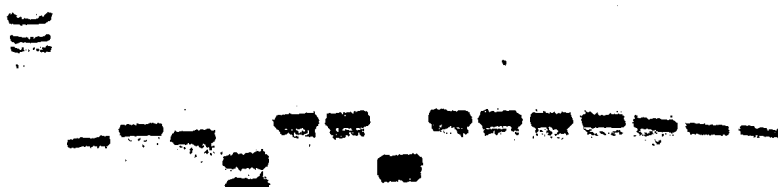
Σχήμα 5.50. Νουκλεοτιδική αλληλουχία ένθεσης.



Σχήμα 5.51. Εντοπισμός ένθεσης 848 bp στην περιοχή του ORF4 του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2.

Στην Εικόνα 5.29 φαίνεται η περιοριστική ανάλυση της περιοχής του ORF4 από το CU1Rif2 (προϊόν PCR Εικόνας 5.28) μετά από πέψεις με διάφορα ένζυμα, ενώ στο Σχήμα 5.52 απεικονίζεται η χαρτογράφηση του οπερονίου *glc* στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Εικόνα 5.29 Περιοριστική ανάλυση της περιοχής του ORF4 από το CU1Rif2.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

2: Πέψη με *Apa*I

3: Πέψη με *Bam*HI

4: Πέψη με *Cla*I

5: Πέψη με *Eco*RI

6: Πέψη με *Hind* III

7: Πέψη με *Kpn*I

8: Πέψη με *Nde*I

9: Πέψη με *Pst*I

10: Πέψη με *Rvu*II

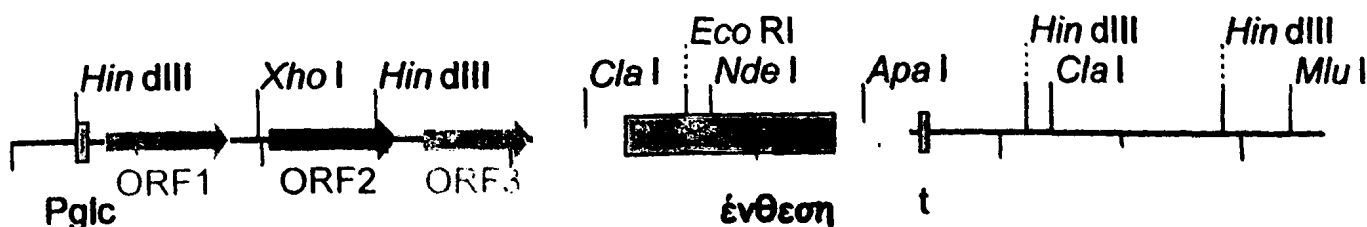
11: Πέψη με *Sa*I

12: Πέψη με *Sca*I

13: Πέψη με *Spe*I

14: Πέψη με *Xba*I

15: Πέψη με *Xho*I



Σχήμα 5.52 Οργάνωση του οπερονίου *glc* (μεγέθους 5.341 bp) στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.

Η εισαγωγή της ένθεσης στην περιοχή του ORF4 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κωδικονίου τερματισμού (TAA) 7 νουκλεοτίδια καθοδικά του σημείου εισαγωγής της ένθεσης, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.53. Η πρωτεΐνη που κωδικοεύεται μέχρι αυτού του σημείου αποτελείται από 128 αμινοξέα και έχει μέγεθος 14 kDa. Πέραν αυτής της πρωτεΐνης δεν αναγνωρίσθηκε καμία άλλη περιοχή που να κωδικοεύει πρωτεϊνικό μόριο.

atg act atg gac aat aac cag acg gat ggc ctg tcc tcg cag cct tct gat acc gag aaa gaa
Met T M D N N Q T D G L S S Q P S D T E K E

gcg ctt cag caa aag gca gaa cag cag gat att tct gcc cag gat agt gaa gaa tta caa aaa
A L Q Q K A E Q Q D I S A Q D S E E L Q K

act atc caa aat atg gaa gaa aac cag ccg cag gaa aat gtc cat tat aat tta ccg aat gaa
T I Q N M E E N Q P Q E N V H Y N L P N E

ttg gta acc cgc gcc agc ttg gtg atc gat gcc aat cgt gca gcc ggt cag cgt att gcc gtt
L V T R A S L V I D A N R A A G Q R T A V

gca gaa agc tgc acc ggt ggt ttg gta atg gcg gcc ttg acc gag gtt ccg ggg gct tct gat
A E S C T G G L V M A A L T E V P G A S D

gtc ttt gat gcc gga ttt gtg acc tat gcc aat cag gca aaa ata gac ctt ctg aat att agG
V R D A G F V T Y A N Q A K I D L L N I R

TTC TGT TGA CAAAGGGTATATGTAGGGTAGATAGGATGCGAGGAGATCTGACGG
F G Stop

ACGCGGAGTGGGAGATAATACAGGGTCTTCTTCCAAGCGAACGAGGCCGCTGCGCGCG
TCCCGCCAAAAGTAATCGGTTATTTCTCAATGGTATGCTTTATGTGCTTCGAACAGG
CTGCCCCGTGGCGAGATATGCATGAACGTTATGGGAAATGGAATTCGGTCTATGTTCG
GTTTCGTAGGTGGGCAGAACAGGGTGTGTGGGACGCTCTTCTTGAACTCTCGTTGAC
CTTGGCCTGACAGATGACTGGCAACATATGATAGATAGTACGATTATTCGCGCCAC
AGCCAAGCGGCTGGCGCAAAGGGGGACGTATAAGGAAGGCTTTGGTCGCAGTCGCG
GAGGCTTTACGAGCAAGATGCACGCCCGTTCCGATGGTCAAGGCCGCCCTCTAGCTTT
CGCACTAACCGGTGGTGAGGTCTCTGATTATTCTGGCGCTGATAGCTTGATAGATATC
CCTGTCACAACACCCCACTGTTTTCTCGCTGATAAAGGATATGATAGCGATAGGTTAC



GCGAAAACTGCTTTTTTCGAGGCATTCTTCCTGTTATCCCGCCTCGTTCCAATCGAAA
 AAAGCCTATTCTTATAATCTCCAGCACTACAAAGATCGTAATCGTATTGAGCGGAT
 GTTTAATAAGCTAAAGCAGTTTCAGGCGCATTGCCACACGCTATGACAAAACCAGAAA
 ATCTTTTCTCGCCTTCCTTCATCTCGCGGCCGTAAAATTGTGGTTACCTTCCTTTGTC
 AACAAAACCTcaggacgtcatcgaaacctttggctctgtttctttggcggttgcttgggcaatggcacggaatg
 ccgttgaaaaaagcgatgctgatattgcggttgcgattacaggtattgcgggcccgaaccggcggcgatgaaagaaa
 acccgttggcaccggttgTTTTgcacgggcaagacgggatgctgatccgaatgaagtgttgcggaacagaaatctt
 tcggagatttagggcggttccggtatccggttacaggcagctttatgcgccctcagcctgttaatgccggatgcgtcg
 atctctcaagggttaa

Σχήμα 5.53 Αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται μετά την εύρεση της ένθεσης στην περιοχή του ORF4 στο CU1Rif2. Με μικρά γράμματα απεικονίζεται η αλληλουχία του ORF4 ενώ με κεφαλαία η αλληλουχία της ένθεσης.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το ORF4 παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη CinA (Martin *et al.*, 1995). Μέχρι σήμερα λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την εν λόγω πρωτεΐνη. Η σύγκριτική αντιστοίχιση της πρωτεΐνης του ORF4 με την πρωτεΐνη CinA από το *S. pneumoniae*, στο οποίο έχει βρεθεί και μελετηθεί σε κάποιο βαθμό το οπερόνιο *cin* (Martin *et al.*, 1995), αποκάλυψε την ύπαρξη ισχυρά συντηρημένων περιοχών όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.54. Η συντηρημένη αλληλουχία παρουσιάζει ταυτόσημα αμινοξέα σε ποσοστό 22% και παρόμοια σε ποσοστό 14,1%.

	(197)	197		210		220		230		240		250
ORF4a	(1)	MTMDNNQTDGLSSQPSDTEKEALQKAEQQDISAQDSEELQKTIQNMEEENQ-PQ										
<i>S. pneumoniae</i> (CinA)	(197)	LIDNQIDPTLAPYAKTGEVTLRLSTKASSQEEANQALDILENQILDQCQTFEGIS										
Consensus (197)		L	N		S		L	KA	QD	A	Q	D L I

	(251)	251		260		270		280		290		304
ORF4a	(54)	ENVHYNLPNELVTRASLVIDANRAAQRIAVAESCTGGLVMAALTEVPRASDV										
<i>S. pneumoniae</i> (CinA)	(251)	LRDFCYGYGEETSLASIVVEELKRQKTIAAAESLTAQLFQATVANFSGVSSIF										
Consensus (251)		E	S	ASIVID	K	G	IA	AES	TAGL	A	L	G S IF



↓

	(305)	305	310	320	330	340	358
ORF4a (108)		DAGFVTYANQAKIDLLNISQDVIETFGSVSLAVAWAMARNAVEKSDADI	VAIT				
<i>S. pneumoniae</i> (ClnA) (305)		KGGFVTYSLEEKSRMLDIPAKNLEE	HGVVSEFTAQKMAEQARSKTQSD	FGISLT			
Consensus (305)		AGFVTYA	K LL I	IE G VS	A MA NA	KS AD	AIAIT

	(359)	359	370	380	390	400	412
ORF4a (162)		GIAGPTGGDERKPVGT	VVFARARRDADPNEVVAEQK	SFGDLGRSGIRLQAALCA			
<i>S. pneumoniae</i> (ClnA) (359)		GVAGPDSLEG-HPVGT	VFIGLAQDQGTEVIKVN----	IGGRSRADVRHIAVMHA			
Consensus (359)		GIAGP	D PVGT	V A A A	V	G RA IR	A L A

	(372)	372	380	390	400	410	425
ORF4a (175)		VGT	VVFARARRDADPNEVVAEQK	SFGDLGRSGIRLQAALCALSL	IMPDASISQ		
<i>S. pneumoniae</i> (ClnA) (371)		VGT	VFIGLAQDQGTEVIKVN----	IGGRSRADVRHIAVMHAFNL	VRKALLSD--		
Consensus (372)		VGT	V A A A	V	G RA IR	A L A	LL

Σχήμα 5.54 Συγκριτική αντιστοίχιση της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF4a με την πρωτεΐνη ClnA από το *Streptococcus pneumoniae*.

Από τη συγκριτική αντιστοίχιση των δύο ανωτέρω πρωτεϊνών με αυτή που κωδικοεύεται από το ORF4 του CU1Rif2, η αλληλουχία της οποίας φαίνεται στο Σχήμα 5.53, βρέθηκε ότι η εισαγωγή της ένθεσης και η διακοπή στο σημείο αυτό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του ORF4a (απεικονίζεται με βέλος στο Σχήμα 5.53) καταστρέφει αρκετά αμινοξέα της συντηρημένης περιοχής που πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο τρόπο δράσης της πρωτεΐνης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα που αποδεικνύουν την ύπαρξη ένθεσης στην περιοχή του ORF4 στο CU1Rif2 εξηγούν τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν νωρίτερα σύμφωνα με τα οποία:

(α) η δημιουργία ελλείμματος στο οπερόνιο *g/c* αποκλείοντας το ORF4, είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης του CU1 και των παραγώγων του σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% γλυκόζη,

(β) το ORF4 από μόνο του είναι ικανό να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1 τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης.

Είναι πολύ πιθανό επομένως ότι, η αδυναμία του CU1 και των παραγώγων του (CU1Rif2) να αναπτύσσονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης οφείλεται στην τροποποίηση της περιοχής του ORF4 με την εισαγωγή της ένθεσης των 848 bp που εντοπίστηκε.

Προκειμένου να διερευνηθεί πιο διεξοδικά η προέλευση της ένθεσης, πραγματοποιήθηκε ιχνηθέτησή της με τη μέθοδο της αντίδρασης PCR. Με την χρήση των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων insertF: 5'-GTTCTGTTGACAAAGGGT-3' και insertR: 5'-GGTTTTGTTGACAAAGG-3' αποκτήθηκε ανιχνευτικό μόριο το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε υβριδισμούς κατά Southern τόσο του χρωμοσωμικού όσο και του πλασμιδιακού DNA από τα: ATCC 10988, CP4 (φυσικά στελέχη του *Z. mobilis*), CU1 και CU1Rif2 (μεταλλαγμένα στελέχη του *Z. mobilis*). Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 5.30 και 5.31.

Εικόνα 5.30 (Α) Πέψεις χρωμοσωμικών DNA.

Διαδρομές:

1: λDNA/*Hind* III

2: Χρωμοσωμικό DNA CU1Rif2/Ακοπο

3: Χρωμοσωμικό DNA CU1Rif2/*Eco*RI

4: Χρωμοσωμικό DNA CU1/Ακοπο

5: Χρωμοσωμικό DNA CU1Rif2/*Eco*RI

6: Χρωμοσωμικό DNA ATCC 10988/Ακοπο

7: Χρωμοσωμικό DNA ATCC 10988/*Eco*RI

8: Χρωμοσωμικό DNA CP4/Ακοπο

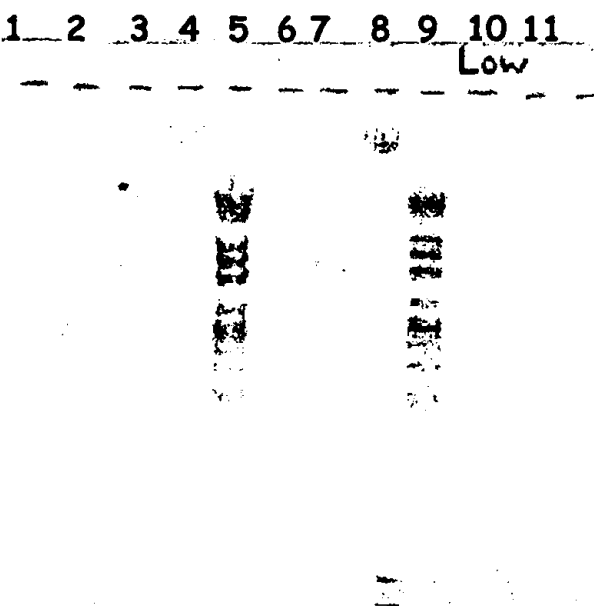
9: Χρωμοσωμικό DNA CP4/*Eco*RI

10: Χρωμοσωμικό DNA *H. meridiana*/Ακοπο

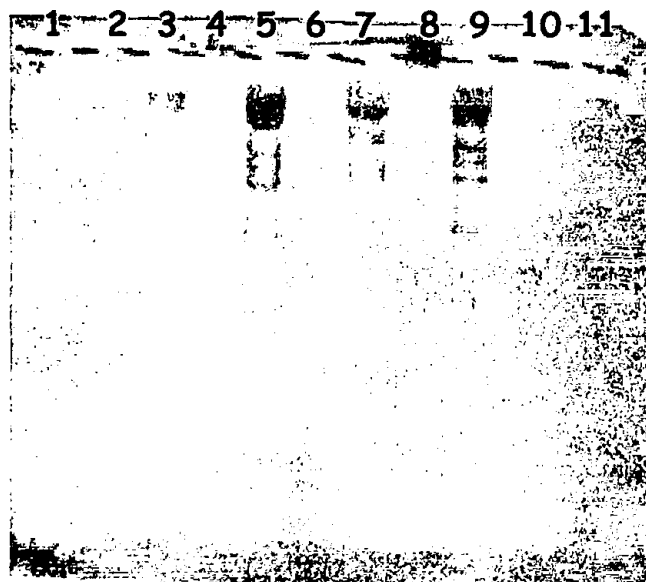
11: Χρωμοσωμικό DNA *H. meridiana*/*Eco*RI

(Β) & (Γ) Υβριδισμός κατά Southern με

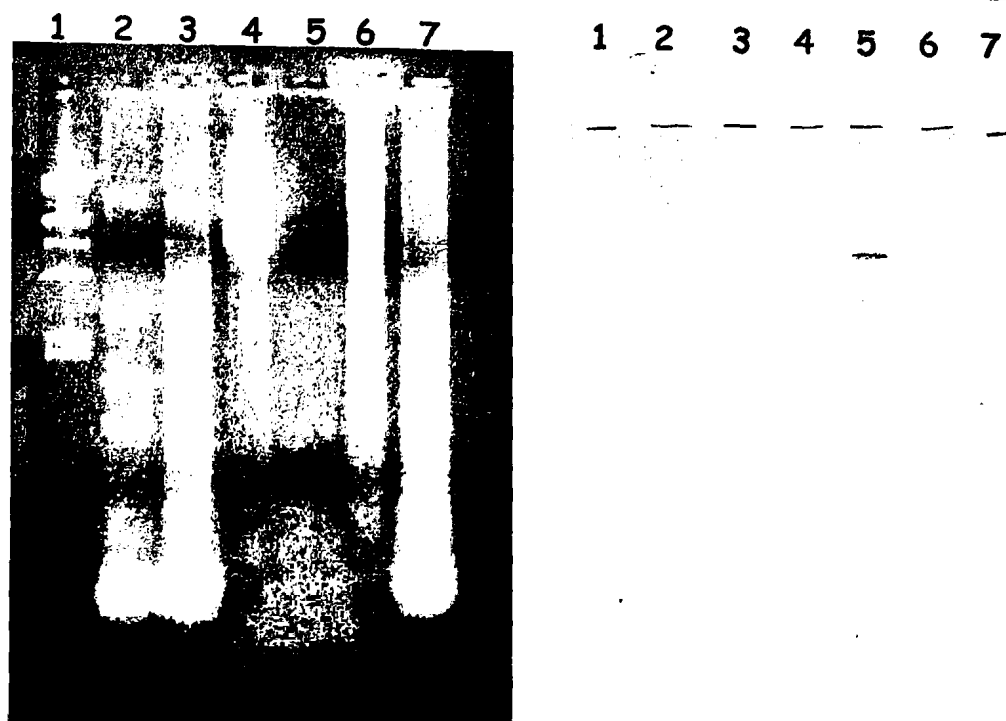
ανιχνευτικό μόριο την ένθεση των 848 bp.



(Β) Υβριδισμός 42 °C, Πλύσεις 65 °C



(Γ) Υβριδισμός 68 °C, Πλύσεις 68 °C



Εικόνα 5.31 (Α) Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA από διάφορα στελέχη *Z. mobilis*.

Διαδρομές: 1: λDNA/*Hind* III

2: πλασμιδιακό DNA από ATCC 10988

3: πλασμιδιακό DNA από CP4

4: πλασμιδιακό DNA από pBZIP (αρνητικός μάρτυρας)

5: πλασμιδιακό DNA από pET29c(+):ORF4(CU1Rif2) (θετικός μάρτυρας)

6: πλασμιδιακό DNA από 11163/74

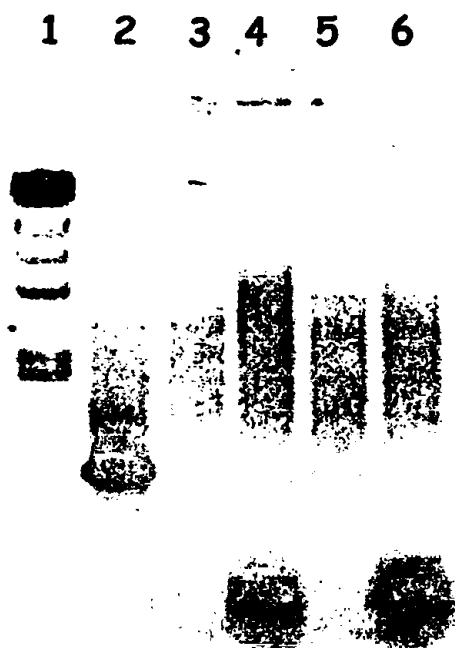
7: πλασμιδιακό DNA από CP4Rif

(Β) Υβριδισμός κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο την ένθεση των 848 bp

Από τις Εικόνες 5.30 και 5.31 φαίνεται ότι η ένθεση υβριδίζει με αρκετά τμήματα χρωμοσωμικού DNA από όλα τα στελέχη του *Z. mobilis*, τόσο σε αυστηρές όσο και σε ήπιες συνθήκες υβριδισμού, ενώ αντίθετα δεν υβριδίζει με κανένα από τα πλασμιδιακά DNA.

Επιπρόσθετα, έγιναν αντιδράσεις PCR σε χρωμοσωμικά DNA από τα ATCC 10988, CU1Rif2, CU1, CP4 και *Halomonas meridiana* (ως αρνητικός μάρτυρας) χρησιμοποιώντας ως πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια τους εκκινητές της ένθεσης που βρέθηκε στην περιοχή του ORF4 του CU1Rif2 (Εικόνα 5.32) προκειμένου να εντοπισθεί η ένθεση στο χρωμόσωμα των παραπάνω στελεχών. Από την Εικόνα 5.32 φαίνεται ότι η

ένθεση εντοπίζεται στην ίδια περιοχή στο χρωμόσωμα τόσο των φυσικών όσο και των μεταλλαγμένων στελεχών του *Z. mobilis*.



Εικόνα 5.32. Προϊόντα αντιδράσεων PCR σε χρωμοσωμικά DNA από τα ATCC 10988, CU1Rif2, CU1, CP4 και *Halomonas meridiana* με πριμοδοτικά μόρια τους εκκινητές της ένθεσης.

Διαδρομές:

- 1: λDNA/*Hind* III
- 2: Προϊόν PCR από το CU1Rif2
- 3: Προϊόν PCR από το CP4
- 4: Προϊόν PCR από το CU1
- 5: Προϊόν PCR από το ATCC 10988
- 6: Προϊόν PCR από το *H. meridiana*

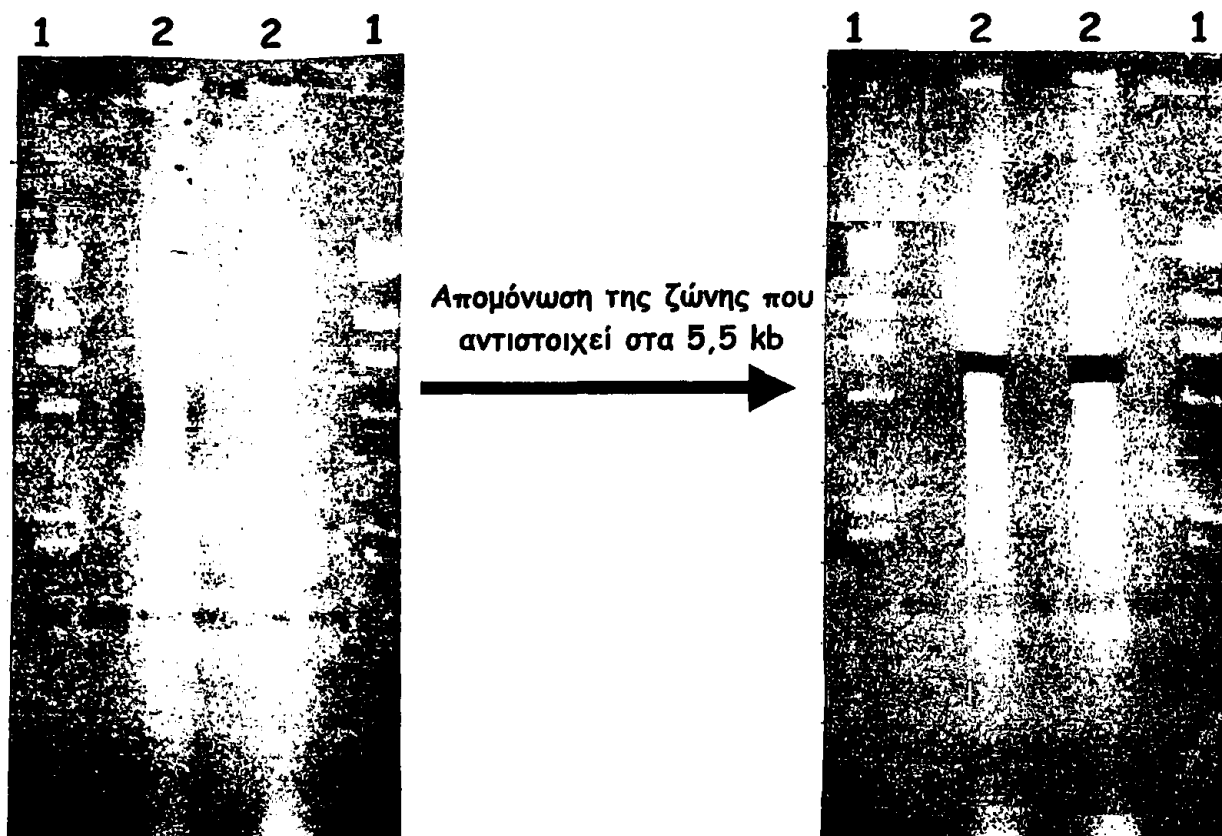
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ένθεση των 848 bp που εισήχθη στην περιοχή του ORF4 του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 προέρχεται από το χρωμόσωμα του *Z. mobilis* και πιθανόν να είναι αποτέλεσμα μιας γενικότερης χρωμοσωμικής ανακατάταξης που έλαβε χώρα στο προγονικό στέλεχος του CU1Rif2, το CU1.

5.16 Απομόνωση του οπερονίου *glc* από το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2

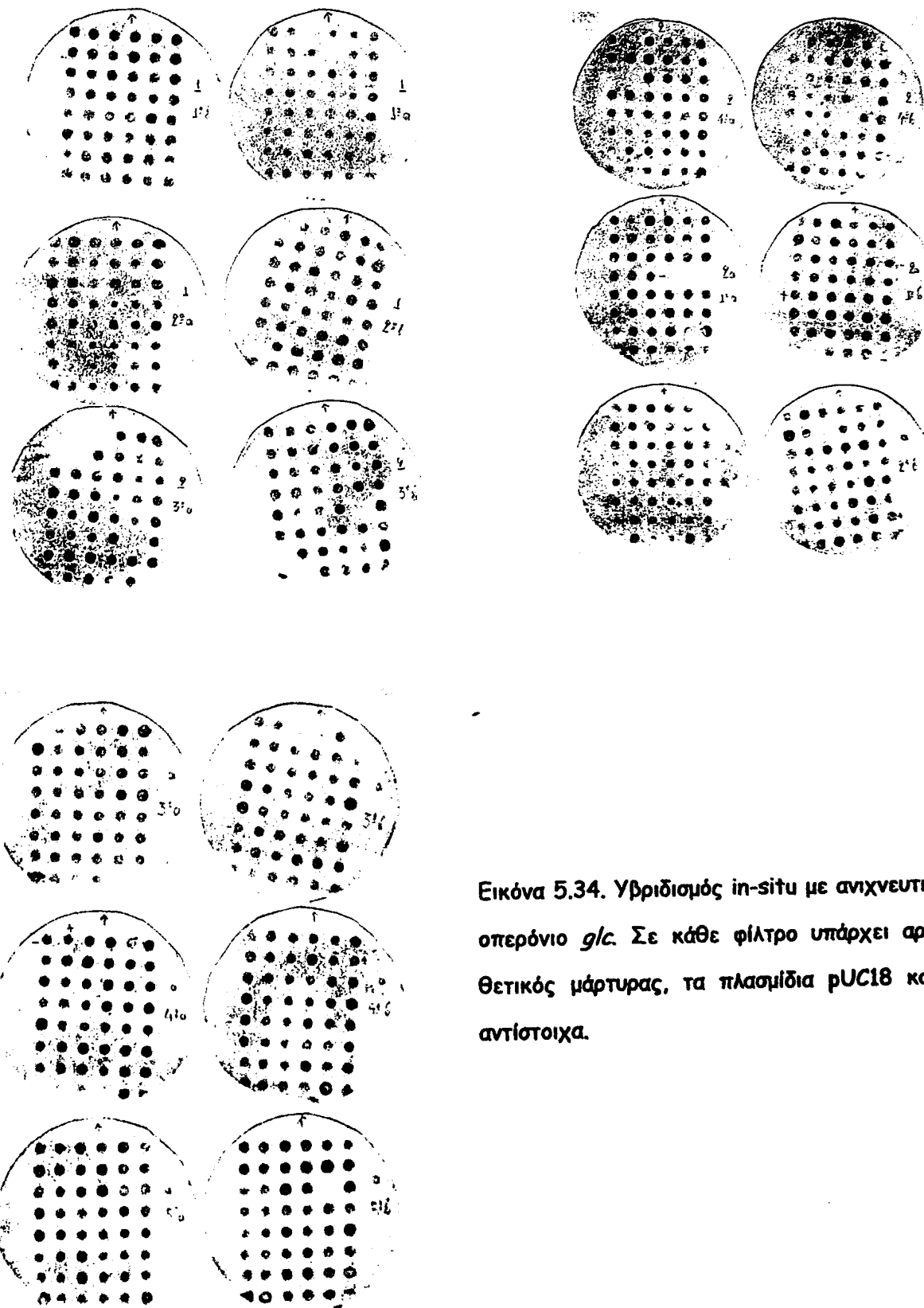
Μετά την εύρεση της αλληλουχίας της ένθεσης που εισήχθη στην περιοχή του ORF4 στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2, επιχειρήθηκε απομόνωση του ομόλογου οπερονίου *glc* από το στέλεχος αυτό. Έτσι κατασκευάστηκε mini τράπεζα του CU1Rif2 ως εξής:

Χρωμοσωμικό DNA CU1Rif2 υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Sal*I τα οποία δεν αναγνωρίζουν καμία θέση εντός του οπερονίου *glc*, που στην περίπτωση του μεταλλαγμένου στελέχους μετά την εισαγωγή της ένθεσης έχει μέγεθος περίπου 5,5 kb. Στη συνέχεια, το χρωμοσωμικό DNA υπέστη ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αναρόζης 0,7% από το οποίο απομονώθηκε και καθαρίστηκε η ζώνη που αντιστοιχεί σε μέγεθος 5,5 kb περίπου (Εικόνα 5.33). Μετά τον καθαρισμό πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης του τμήματος αυτού στον πλασμιδιακό φορέα pUC18 ο οποίος είχε επίσης υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Sal*I. Τέλος, μετά τον μετασχηματισμό των πιθανών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στο στέλεχος DH5α του *E. coli*, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των άσπρων αποικιών σε micro-titer plates και από εκεί, μεταφορά με τη βοήθεια σφραγίδων σε νάilon φίλτρα και πραγματοποίηση υβριδισμού in-situ με ανιχνευτικό μόριο το οπερόνιο *glc*.

Από την εικόνα των φίλτρων του υβριδισμού (Εικόνα 5.34) επιλέχθηκαν 30 αποικίες οι οποίες έδωσαν θετικό σήμα και αναλύθηκαν περαιτέρω με περιοριστικές πέψεις και υβριδισμούς.

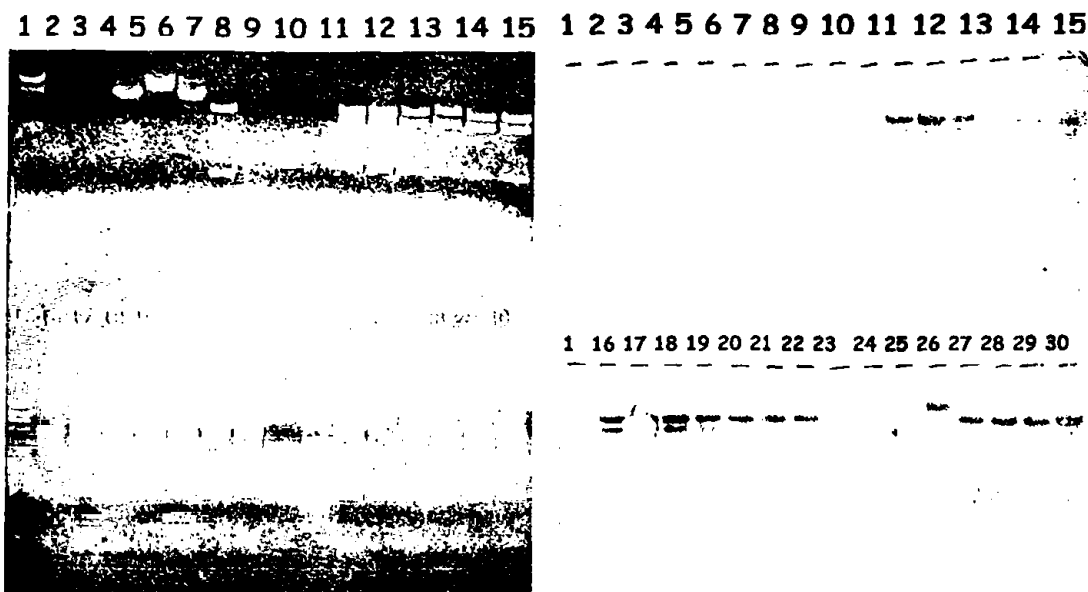


Εικόνα 5.33. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 0,7% χρωμοσωμικού DNA CU1Rif2 το οποίο υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*H_I και *Sa*I (A) και απομόνωση από το πήγμα της ζώνης που αντιστοιχεί στα 5,5 kb.



Εικόνα 5.34. Υβριδισμός in-situ με ανιχνευτικό μόριο το σπερόνιο *g/c*. Σε κάθε φίλτρο υπάρχει αρνητικός και θετικός μάρτυρας, τα πλασμίδια pUC18 και pUC1845 αντίστοιχα.

Για τις αποικίες που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA και εν συνεχεία έγιναν περιοριστικές πέψεις με διάφορα περιοριστικά ένζυμα. Οι Εικόνες των ηλεκτροφορήσεων παρατίθενται παρακάτω μαζί με τα φίλτρα των υβριδισμών κατά Southern.



Εικόνα 5.35. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 27 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία έχουν υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*, η οποία είναι και η πιο χαρακτηριστική πέψη του οπερονίου *glc*. Οι ζώνες που αναμένονται είναι 5 και τα μεγέθη τους έχουν τα εξής μοριακά βάρη: 2945, 2650, 1196, 812 και 421 bp. Αντίθετα, από την Εικόνα αυτή βλέπουμε ότι η πλειοψηφία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων δίνει 3 ζώνες μεγέθους, 4200, 2945 και 812 bp. Δίπλα από την εικόνα του πήγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πήγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο *glc*.

Διαδρομές:

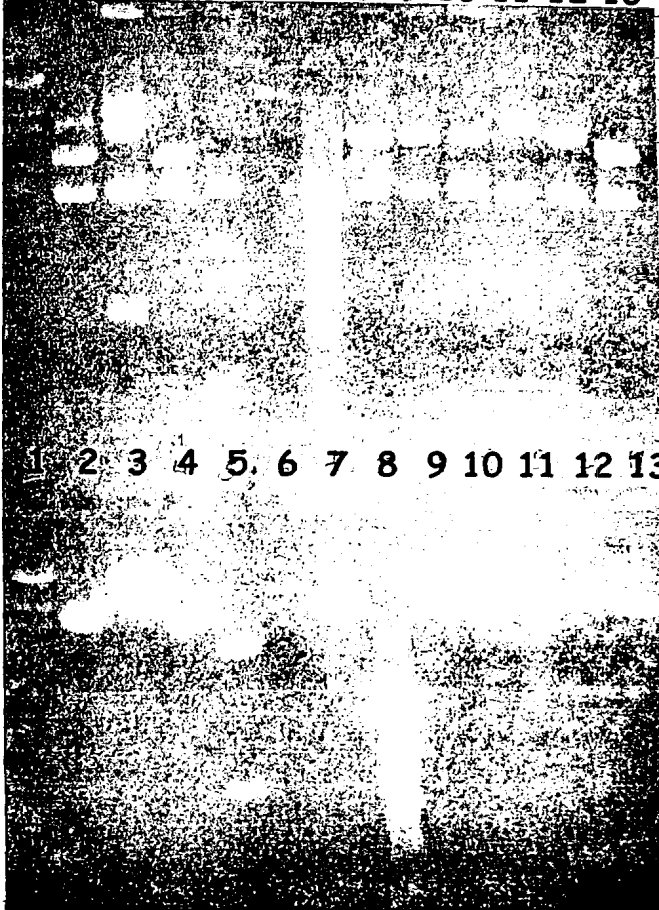
1: λDNA

10, 23: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845

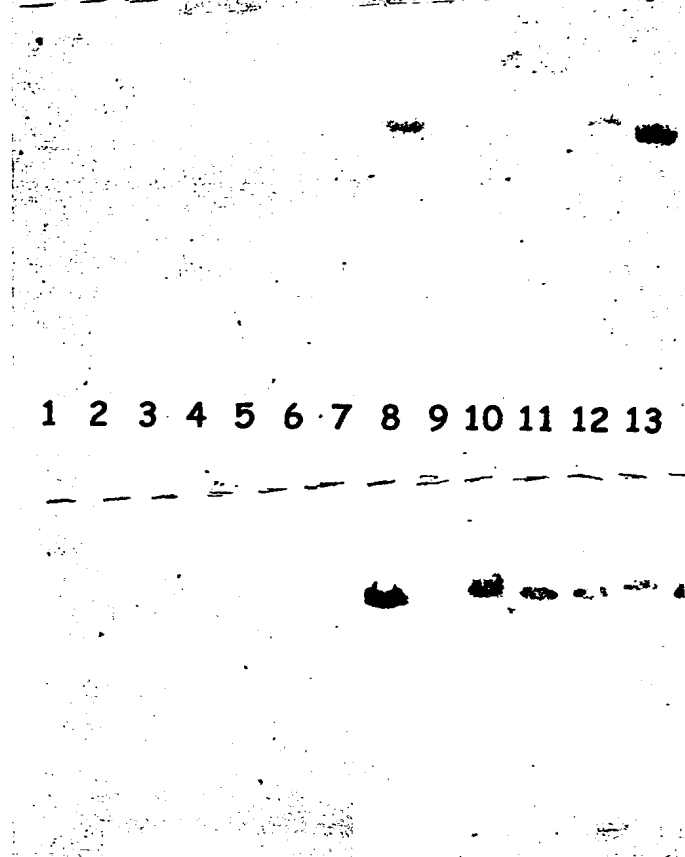
11: Αρνητικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC18

Οι υπόλοιπες διαδρομές είναι τα 27 πιθανά ανασυνδυασμένα πλασμίδια

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



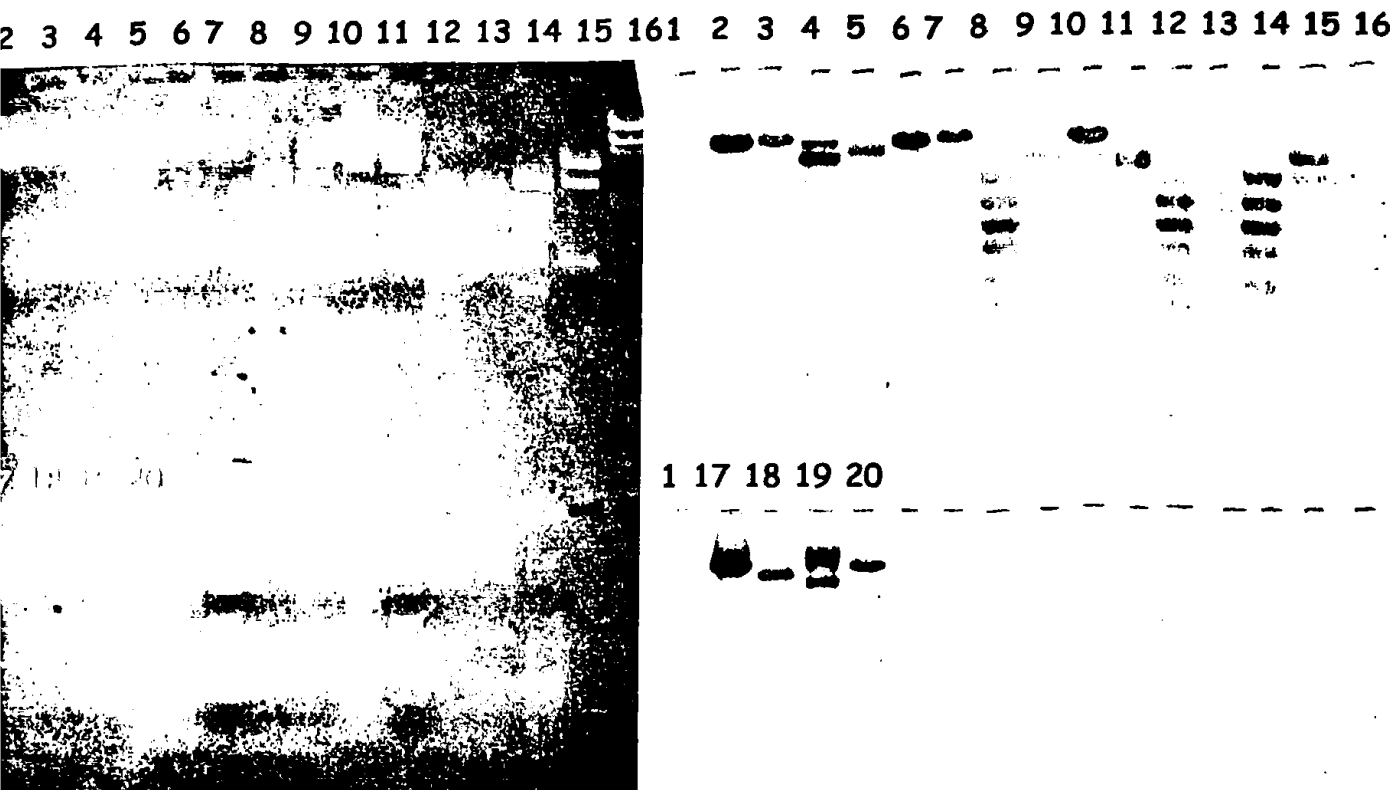
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Εικόνα 5.36. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 10 ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία έχουν υποστεί πέψη με τα περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI και *Sal*I (πάνω πήγμα) και *Bam*HI (κάτω πήγμα). Δίπλα από την εικόνα του πηγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πηγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο *glc*.

Διαδρομές και για τα δύο πηγματα:

- 1: λDNA
- 2: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 3
- 3: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 4
- 4: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 5
- 5: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 6
- 6: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 8
- 7: Αρνητικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC18
- 8: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 9
- 9: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18
- 10: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 19
- 11: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 23
- 12: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 24
- 13: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845



Εικόνα 5.37. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου Νο 18 το οποίο έχει υποστεί πέψη με διάφορα περιοριστικά ένζυμα. Δίπλα από την εικόνα του πηγματος της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται το φίλτρο της αποτύπωσης του πηγματος κατά Southern. Ως ανιχνευτικό μόριο χρησιμοποιήθηκε το οπερόνιο *g/c*.

Διαδρομές: 1: λDNA

- 2: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Bam*HI
- 3: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Bam*HI
- 4: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Bam*HI-*Sal*I
- 5: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Bam*HI-*Sal*I
- 6: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Sal*I
- 7: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Sal*I
- 8: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Hind*III
- 9: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Hind*III
- 10: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Eco*RI
- 11: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Eco*RI
- 12: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Eco*RI-*Hind*III
- 13: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Eco*RI-*Hind*III
- 14: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Sal*I-*Hind*III
- 15: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Sal*I-*Hind*III
- 16: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Sal*I-*Bgl*II
- 17: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Sal*I-*Bgl*II
- 18: Θετικός μάρτυρας, πλασμίδιο pUC1845/*Bgl*II
- 19: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Νο 18/*Bgl*II

Από τις παραπάνω Εικόνες φαίνεται ότι απομονώθηκε από το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 ένα τμήμα DNA 5,4 kb περίπου (όσο και το προβλεπόμενο μέγεθος του οπερονίου *glc* από το CU1Rif2, μετά την εύρεση της ένθεσης των 848 bp στην περιοχή του ORF4 του μεταλλαγμένου στελέχους) το οποίο υβριδίζει με τον κλώνο των 4,5 kb, πλην όμως το περιοριστικό του προφίλ δεν συνάδει με τα προβλεπόμενα τμήματα που θα ανέμενε κανείς με βάση την οργάνωση του οπερονίου *glc* από το CU1Rif2 (Σχήμα 5.52). Αυτό που αξίζει ίσως να σημειωθεί στο σημείο αυτό είναι ότι τα ίδια αποτελέσματα αποκτήθηκαν όσες φορές επιχειρήθηκε η απομόνωση του οπερονίου *glc* από το CU1Rif2.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

Συζήτηση



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, 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, παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας του *Z. mobilis* σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, όταν χρησιμοποιείται ως μόνη πηγή άνθρακα (Douka *et al.*, 1999).

Στην παρούσα εργασία ως "εργαλεία" στην προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 (Afendra and Drainas 1987) το οποίο είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα DNA, το οποίο αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, καθώς και τη σωστή λειτουργία της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης (Douka *et al.*, 1999). Το τμήμα αυτό αποτελείται από ένα σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων τα οποία πιθανότατα συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Τα τέσσερα αυτά

γονίδια κωδικοεύουν τέσσερις θεωρητικές πρωτεΐνες 167, 167, 145 και 220 αμινοξέων, αντίστοιχα. Το θεωρητικό σύμπλεγμα γονιδίων μπορεί να κωδικοεύει μια σειρά ρυθμιστικών πρωτεϊνών οι οποίες είναι πιθανό να συμμετέχουν σε μία σηματοδοτική πορεία με σηματοδοτικό μόριο τη γλυκόζη ενώ παράλληλα πιθανόν να ρυθμίζουν τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο αυξηθεί.

Στην παρούσα διατριβή, επιχειρήθηκε μία εμπειριστατωμένη μελέτη του κλώνου ο οποίος αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, στοχεύοντας παράλληλα και στη διαλεύκανση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

6.1 Πλήρης μοριακή ανάλυση του οπερονίου που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του *Zygomonas mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (παρ. 3.8), από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του *Z. mobilis* απομονώθηκε ένα τμήμα μεγέθους 4,5 kb το οποίο έχει την ικανότητα να αναπληρώνει τον φαινότυπο του CU1Rif2. Το τμήμα αυτό αποτελείται από τέσσερις θεωρητικές κωδικοεύουσες περιοχές (ORFs) και περιέχει θεωρητικά στοιχεία προαγωγού «-10» και «-35» τυπικά για το βακτήριο *Z. mobilis* στα νουκλεοτίδια 261-273 και 298-306 αντίστοιχα (Σχήμα 3.2) υποδεικνύοντας ότι τα τέσσερα ORFs ελέγχονται από κοινό προαγωγό (Douka *et al.*, 1999).

Στην παρούσα εργασία με την υποκλωνοποίηση της θεωρητικής περιοχής του προαγωγού ανοδικά των γονιδίων της β-γαλακτοζιδάσης (*lacZ*) και της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης (*inaZ*) (παρ. 5.1), αποδείχθηκε ότι πράγματι η περιοχή που περιέχει τα θεωρητικά στοιχεία προαγωγού «-10» και «-35» έχει ανιχνεύσιμη δραστηριότητα προαγωγού. Η συγκριτική αντιστοίχιση της αλληλουχίας του με άλλους γνωστούς

προαγωγούς του *Z. mobilis*, αποκάλυψε την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών (Πίνακας 5.1). Ο προαγωγός αυτός ονομάστηκε P_{glc} .

Προκειμένου να μελετηθεί η ρύθμιση της δραστικότητας του προαγωγού P_{glc} χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το γονίδιο αναφοράς *gfp* (γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης) υπό τον έλεγχο των προαγωγών P_{glc} και P_{pdc} (παρ. 5.2).

Το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης έχει ήδη εκφραστεί με επιτυχία σε κύτταρα CP4Rif^r του *Z. mobilis* υπό τον έλεγχο του προαγωγού P_{pdc} (Douka *et al.*, 2001). Στην παρούσα εργασία, αποδείχθηκε ότι ο προαγωγός P_{glc} είναι ασθενέστερος του P_{pdc} (Πίνακας 5.2).

Στη συνέχεια μετρήθηκε ο φθορισμός κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των κυττάρων τόσο σε χαμηλές (2%) όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (10%) και αποδείχθηκε ότι η δραστικότητα του ισχυρού προαγωγού P_{pdc} παραμένει στα ίδια υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης τόσο παρουσία 2% όσο και 10% γλυκόζης (Σχήμα 5.7). Αυτό δείχνει τη συστατική δραστικότητα του P_{pdc} , γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Ingram *et al.*, 1989, Hesman *et al.*, 1991, An *et al.*, 1991). Αντίθετα η δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} εμφανίζεται σταθερή σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης ενώ σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης μετά από μια αρχική καταστολή δείχνει σημαντικά επίπεδα αύξησης (Σχήμα 5.7). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης μετά από μια περίοδο καταστολής προκαλούν επαγωγή του προαγωγού P_{glc} .

Φαίνεται επομένως ότι η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επάγει την δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} . Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή μέχρι στιγμής κανένας από τους προαγωγούς που έχουν απομονωθεί από το *Z. mobilis* δεν έχει βρεθεί να είναι επαγόμενος αλλά αντίθετα όλοι είναι συστατικοί (παρ. 1.6). Αυτή είναι ίσως η πρώτη αναφορά για επαγόμενο προαγωγό στο βακτήριο αυτό.

Το ερώτημα που εγείρεται μετά το εύρημα αυτό είναι αν η επαγωγή του προαγωγού είναι αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης ειδικά της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ή αποτέλεσμα της υψηλής οσμωτικής πίεσης λόγω της παρουσίας

υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων. Απάντηση στο ερώτημα αυτό δόθηκε με την πραγματοποίηση πειραμάτων επαγωγής παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων καθώς και άλατος. Επιλέχθηκε ποικιλία σακχάρων, τα οποία είτε προσλαμβάνονται και καταβολίζονται από το *Z. mobilis*, είτε απλά προσλαμβάνονται χωρίς να καταβολίζονται και τέλος σάκχαρα τα οποία δεν προσλαμβάνονται και δεν καταβολίζονται από το βακτήριο αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο προαγωγός P_{glc} επάγεται σε όλες τις περιπτώσεις (Σχήμα 5.8).

Έτσι επομένως, συνοψίζοντας τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, βρέθηκε για πρώτη φορά στο *Z. mobilis* ένας οσμωρυθμιζόμενος προαγωγός, ο P_{glc} .

Αντίθετα με τον φυσικό τύπο, πολύ μικρή επαγωγή παρατηρήθηκε στην δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} σε κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 τα οποία αναπτύχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων σακχάρων και άλατος (Σχήματα 5.9 και 5.10).

Όσον αφορά την επαγωγή της δραστικότητας του προαγωγού P_{glc} παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl στο θρεπτικό μέσο, τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την διεξαγωγή πειραμάτων επαγωγής στο μετάλλαγμα του στελέχους 11163 του *Z. mobilis*, το 11163/74, το οποίο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις έως και 250 mM NaCl (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αυξανόμενη της συγκεντρώσεως του NaCl στο θρεπτικό μέσο παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων επαγωγής του P_{glc} (Σχήμα 5.11).

Επιπρόσθετα, ολοκληρώνοντας τη μοριακή ανάλυση του συμπλέγματος των 4 θεωρητικών κωδικευουσών περιοχών που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, αποδείχθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης, (RT-PCR) η συμμεταγραφή του πολυκιστρονικού mRNA (παρ. 5.3). Με τη χρήση κατάλληλων πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προέρχονται από διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, αποκτήθηκαν τα αναμενόμενα προϊόντα από τις αντιδράσεις PCR (Εικόνες 5.2, 5.3 και 5.4), αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό ότι το εξεταζόμενο τμήμα DNA των τεσσάρων θεωρητικών κωδικευουσών περιοχών συμμεταγράφεται

ως ένα αυτόνομο οπερόνιο (οπερόνιο *glc*), όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις των οπερονίων *glf-glk-edd-zwf* (μεταβολισμός της γλυκόζης, Barnell *et al.*, 1992), *gluEMP* (μεταφοράς του γλουταμινικού οξέος, Peekhaus and Kramer, 1996), *levU* (Ki-Bang Song *et al.*, 1999), *groESL* (Barbosa *et al.*, 1994) και *gap* (Eddy *et al.*, 1989 και 1991).

Έτσι λοιπόν, μετά την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των οπερονίων του βακτηρίου αυτού που περιγράφηκαν στην εισαγωγή (παρ. 1.6.1.1, 2, 3, 4, 5) στα χαρακτηρισμένα οπερόνια του *Z. mobilis* μπορεί πλέον να συγκαταλέγεται και αυτό που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, το οπερόνιο *glc* όπως ονομάστηκε.

Τέλος με τη μέθοδο της ημιποσοτικής RT-PCR αποδείχτηκε ότι, σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης η μεταγραφή του οπερονίου καταστέλλεται για κάποιο λόγο στην αρχή της ανάπτυξης των κυττάρων του *Z. mobilis* (τις πρώτες 2 h περίπου για τον φυσικό τύπο και τις 24 πρώτες h για το μεταλλαγμένο στέλεχος) και στη συνέχεια αποκαταστέλλεται και επάγεται (Εικόνα 5.5). Η μεταγραφή του κλώνου σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι συστατική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των πειραμάτων μελέτης της ρύθμισης του προαγωγού του οπερονίου που περιγράφηκαν παραπάνω (παρ. 5.2) και δείχνουν ότι η έκφραση του κλώνου που είναι υπεύθυνος για την αναπλήρωση του στελέχους CU1Rif2 ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και μάλιστα η ρύθμιση αυτή γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο.

6.2 Η νέα οργάνωση του οπερονίου *glc*

Με σκοπό την απομόνωση των πρωτεϊνικών μορίων που κωδικοούνται από τα τέσσερα ORFs του οπερονίου *glc*, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίησή τους στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) (παρ. 5.4, Εικόνα 5.7). Η ανάλυση της

νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων pET29c(+):ORF1, pET29c(+):ORF2, pET29c(+):ORF3 και pET29c(+):ORF4 (Σχήματα 5.14 και 5.15) αποκάλυψε τις εξής διαφορές: για το μεν ORF3 το νουκλεοτίδιο στη θέση 1779 είναι γουανίνη (G) αντί θυμίνης (T) (Σχήμα 5.16), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα το αμινοξύ που κωδικεύεται στην περιοχή αυτή να είναι λυσίνη (Lys) αντί ασπαραγίνης (Asn). Για το ORF4 βρέθηκε ότι απουσιάζει το νουκλεοτίδιο στη θέση 2271 (Σχήμα 5.17), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κωδικονίου τερματισμού (TAA) 15 νουκλεοτίδια καθοδικά.

Η εκ νέου ανάλυση της νουκλεοτιδιακής αλληλουχίας του οπερονίου *glc* των 4.493 bp, επιβεβαίωσε την ύπαρξη των ORF1, ORF2 και ORF3 ενώ για το ORF4 προτείνονται 5 πιθανές περιοχές έναρξης και μία τερματισμού (Σχήμα 5.19), με τα δύο πρώτα, ORF4a και ORF4b να εμφανίζουν πιθανότητα 100% (με βάση το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα). Τα προϊόντα και των πέντε πιθανών κωδικευουσών περιοχών βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, κωδικεύοντας με άλλα λόγια την ίδια πρωτεΐνη με το ίδιο C-τελικό άκρο αλλά διαφορετικό κάθε φορά N-τελικό άκρο (Σχήμα 5.20).

Στην προσπάθειά μας να εξακριβώσουμε πιο είναι το φυσιολογικό από τα πέντε πιθανά ORF4 πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναπλήρωσης του ελαττωματικού φαινοτύπου του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 με τη μεταφορά στο τελευταίο κάθε ενός από τα πέντε ORF4 υπό τον έλεγχο του ισχυρού προαγωγού P_{pdc} (παρ. 5.5). Με τον τρόπο αυτό, αποδείχθηκε ότι το ORF4 έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης και μάλιστα όσο το μέγεθός του μικραίνει τόσο χάνει την ικανότητα αυτή, με το μικρότερο από τα ORF4 να την έχει χάσει εντελώς (Εικόνες 5.12 και 5.14, Σχήμα 5.23). Από παλαιότερα ήταν γνωστό ότι τμήμα του οπερονίου *glc* από το οποίο έλειπε το πλήρες ORF4 (τμήμα 3.1 kb) δεν ήταν λειτουργικό, καθ' όσον δεν είχε την ικανότητα να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις (Douka *et al.*, 1999). Ως εκ τούτου θεωρούνταν ότι για την αναπλήρωση της ευαισθησίας του μεταλλαγμένου στελέχους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλου του

συμπλέγματος των τεσσάρων ORFs (Douka *et al.*, 1999). Τελικά όμως στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε ότι για την αναπλήρωση του φαινοτύπου του CU1Rif2 απαραίτητο είναι μόνο το ORF4.

Το εύρημα αυτό μας ώθησε στο να μελετήσουμε τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης στα μετασυσζευγμένα CU1Rif2/pLAFR5:P_{glc}-ORF4a, ORF4b, ORF4c και ORF4e (παρ. 5.6). Ως γνωστόν το λειτουργικό οπερόνιο *glc*, έχει την ικανότητα να αποκαθιστά επιπλέον και τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης στα κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικά μέσα 10% γλυκόζης και τα οποία από μόνα τους έχουν χάσει την ιδιότητα αυτή (Douka *et al.*, 1999). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ORF4 επίσης έχει την ικανότητα αποκατάστασης της δραστικότητας της γλυκοκινάσης στο CU1Rif2 (Σχήμα 5.24). Το μεγαλύτερο από τα ORF4, το ORF4a παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα δραστικότητας η οποία και μειώνεται ανάλογα με τη μείωση του μεγέθους του ORF4.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, κατά τη μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού P_{glc}, αποδείχθηκε ότι στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis*, CP4Rif^r, ο P_{glc} υπάγεται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων καθώς και NaCl, κάτι που δεν συμβαίνει στο μεταλλαγμένο στέλεχος καθώς παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα επαγωγής. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα ευρήματα σχετικά με το ORF4 μας οδήγησε στο να μελετήσουμε την επίδραση του ORF4 στη δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} σε κύτταρα του CU1Rif2 παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων σακχάρων καθώς και NaCl (παρ. 5.7). Το συμπέρασμα που εξήχθη είναι ότι μεταξύ του P_{glc} και του ORF4 πρέπει να υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση, άμεση ή έμμεση, από τη στιγμή που η εισαγωγή του ORF4 στο CU1Rif2 είχε ως αποτελέσματα την παρατήρηση υψηλών επιπέδων επαγωγής στη δραστικότητα του P_{glc} όπως ακριβώς συμβαίνει και στον φυσικό τύπο (Σχήματα 5.25 και 5.26).

Η μετάλλαξη του CU1 εντοπίστηκε ως μία ένθεση μεγέθους 848 bp στην περιοχή του ORF4 (παρ. 5.16, Εικόνες 5.26, 5.27 και 5.28). Η ένθεση των 848 bp είναι χρωμοσωμικής προελεύσεως (Εικόνες 5.30 και 5.31) και εντοπίζεται στο ίδιο σημείο στο χρωμόσωμα τόσο των φυσικών στελεχών (ATCC 10988 και CP4) όσο και

των μεταλλαγμένων (CU1Rif2 και CU1) (Εικόνα 5.32). Η ένθεση αυτή παρουσιάζει ισχυρή ομολογία, σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, με δύο τμήματα του πλασμιδίου 1 του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* (Seo *et al.*, 2001, αρ. πρόσβασης AY057845) σε ποσοστά 93% από το 97° έως το 310° νουκλεοτίδιο και 88% από το 382° έως το 467° νουκλεοτίδιο αντίστοιχα, καθώς επίσης και με δύο τμήματα του γονιδίου *uvrD* του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* (Beletsiotis *et al.*, 2002, αρ. πρόσβασης AY083904) σε ποσοστό 88% από το 88° έως το 310° νουκλεοτίδιο και 88% επίσης από το 382° έως το 488° νουκλεοτίδιο αντίστοιχα. Δεδομένου ότι δεν ανιχνεύθηκε ομολογία μεταξύ της ένθεσης και γνωστών μεταθετών στοιχείων, γεγονός που θα μπορούσε πιθανόν να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο εισήχθη το τμήμα DNA των 848 bp στην περιοχή του ORF4 στο στέλεχος CU1, καθώς και στο παράγωγό του, το συμπέρασμα που εμμέσως εξάγεται είναι ότι η ένθεση αυτή προήλθε ως αποτέλεσμα μιας γενικότερης χρωμοσωμικής ανακατάταξης η οποία έλαβε χώρα στο πατρικό μεταλλαγμένο στέλεχος CU1.

Η εισαγωγή του τμήματος των 848 bp, έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4 αλλοιώνοντας τελείως την αμινοξική της αλληλουχία καθοδικά του σημείου εισαγωγής. Δεδομένου ότι το ORF4 έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει μια σειρά από ευαισθησίες του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2, είναι πολύ πιθανό το ενεργό σημείο της πρωτεΐνης του ORF4 να εντοπίζεται τελικά στην περιοχή καθοδικά του σημείου εισαγωγής της ένθεσης (καθοδικά του 128^{ου} αμινοξέος).

Καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε στα ORF1, ORF2 και ORF3 καθώς και στην περιοχή του προαγωγού P_{glc} μεταξύ του φυσικού και του μεταλλαγμένου στελέχους. Η μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών εντοπίζεται στην περιοχή του ORF4.

Τέλος, απομονώθηκε από το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 το ομόλογο οπερόνιο *glc* (παρ. 5.17), που σ' αυτή την περίπτωση έχει μέγεθος 5.341 bp.

6.3 Θεωρητική μελέτη των προϊόντων των ORFs του οπερονίου *glc*

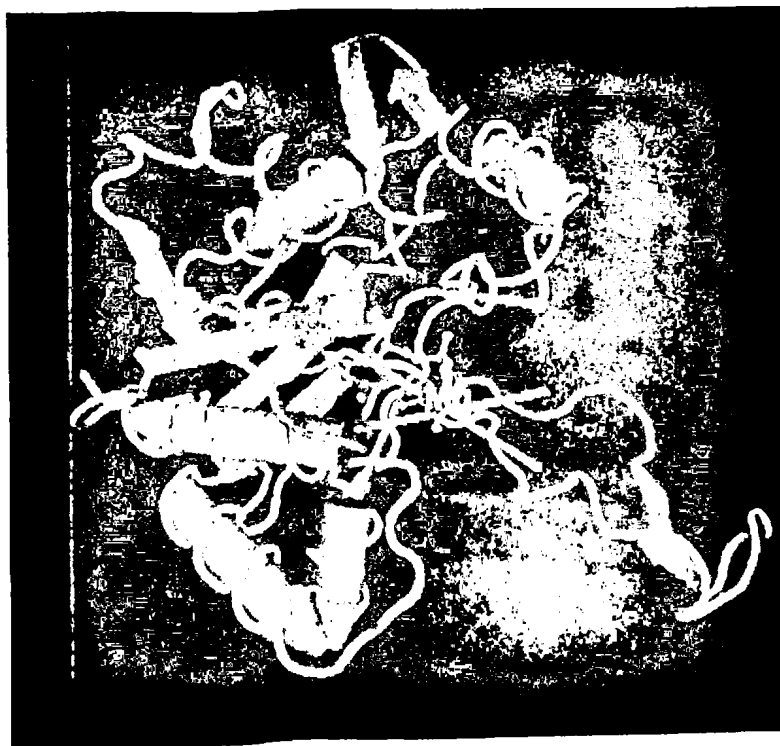
6.3.1 Τα προϊόντα των ORF1 και ORF2

Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα (παρ. 5.9 και 5.10), οι πρωτεΐνες που κωδικοούνται από τα ORF1 και ORF2 παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία με τις πρωτεΐνες IspD και IspF αντίστοιχα, οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών μέσω της πορείας της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (πορεία DOXP, Σχήμα 2.4). Πιο συγκεκριμένα, η IspD (συνθάση της 4-διφωσφοκυτιδυλο-2-C-μεθυλοερυθριτόλης) είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της 4-διφωσφοκυτιδυλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol) από την 4-φωσφορική 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) ενώ η IspF (συνθάση της 2,4-κυκλοκυτιδυλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης) για τον σχηματισμό της 2,4 κυκλοδιφωσφορικής-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate) από τη 2 φωσφορική 4-διφωσφοκυτιδυλο-2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphate). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος στη σύνθεση του διφωσφορικού ισοπεντυνυλίου (IPP), της πρόδρομης ένωσης των ισοπρενοειδών μέσω της πορείας DOXP.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, μέχρι πρόσφατα για το *Z. mobilis* η ύπαρξη των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών μέσω της πορείας DOXP είχε βρεθεί είτε μετά από μελέτες με ραδιενεργά σημασμένες ενώσεις (Rohmer *et al.*, 1993), είτε μετά από εύρεση της αλληλουχίας των γονιδίων αυτών στο συγκεκριμένο οργανισμό (αριθμοί πρόσβασης AJ009974 και AF176314). Μόλις πρόσφατα απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το δεύτερο γονίδιο της πορείας DOXP από το *Z. mobilis*, η ρεδοκτοϊσομεράση της 5-φωσφορικής 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζης, *dxr*, (Grolle *et al.*, 2000) που όπως φαίνεται από το Σχήμα 2.1 καταλύει τη σύνθεση της 4-φωσφορικής 2C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) από την 5-φωσφορική 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate).

Η απομόνωση μετά από ετερόλογη έκφρασή τους στο *E. coli* των πρωτεϊνών που κωδικοεύονται από τα ORF1 και ORF2, οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία με τις πρωτεΐνες IspD και IspF της πορείας DOXP, που έγινε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, πραγματοποιείται για πρώτη φορά στο *Z. mobilis*. Το μέγεθος της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF1 υπολογίστηκε στα 37 kDa και βρέθηκε ότι πρόκειται για ένα διμερές, ενώ το μέγεθος της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF2 υπολογίστηκε στα 120 kDa και βρέθηκε ότι πρόκειται για ένα εξαμερές.

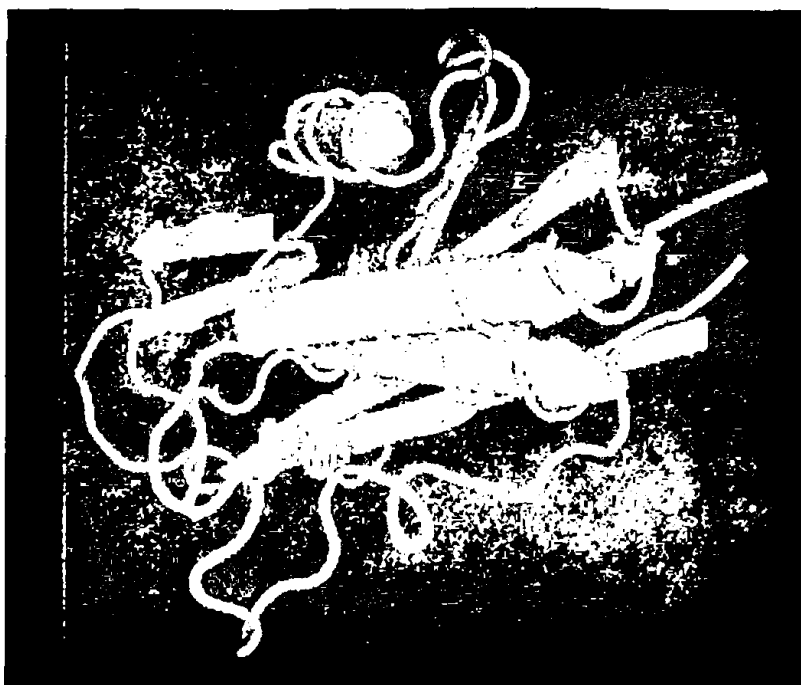
Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspD από το *E. coli*, η οποία παρατίθεται στο Σχήμα 6.1, βρέθηκε από τις ερευνητικές ομάδες των Richard *et al.*, 2001 και Kemp *et al.*, 2003. Και οι δύο ερευνητικές ομάδες προτείνουν, με βάση τα δεδομένα τους, ότι η πρωτεΐνη IspD οργανώνεται ως διμερές, γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 6.1. Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspD.

Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspF από τα *Thermus thermophilus coli*, και *Haemophilus influenzae*, η οποία παρατίθεται στο Σχήμα 6.2, μελετή από τις ερευνητικές ομάδες των Kishida *et al.*, 2003, Richard *et al.*, 2002, I *et al.*, 2002, Steinbacher *et al.*, 2002 και Lehmann *et al.*, 2003. Τα δεδομένα των ερευνητικών ομάδων συγκλίνουν στο ότι η πρωτεΐνη IspF οργανώνεται τριμερές. Στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη που κωδικεύεται το ORF2 εμφανίζεται ως εξαμερές. Είναι πολύ πιθανό η απουσία διθειοθρεΐ (DTT) από το διάλυμα απομόνωσης της πρωτεΐνης να ευνόησε τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και ως εκ τούτου τη δημιουργία τεχνητών συσσωματωμάτων.

Κάτι ανάλογο συμβαίνει και στην περίπτωση του δεύτερου γονιδίου πορείας DOXP, *dxr*, το οποίο κωδικεύει την ρεδοκτοϊσομεράση της 5-φωσφορ 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζης. Οι Takahashi *et al.* το 1998 αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη από το *E. coli* έχει δομή τετραμερούς. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το 2001 Grolle *et al.* ανέφεραν την απομόνωση της πρωτεΐνης αυτής από το *Z. mobilis*. Σύμφωνα με τα δεδομένα τους το πρωτεϊνικό μόριο από το *Z. mobilis* εμφανίζεται ως διμερές παρουσία DTT ενώ απουσία του εμφανίζεται ως εξαμερές και οκταμερές λόγω της δημιουργίας συσσωματωμάτων ως αποτέλεσμα της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών. Πιθανόν κάτι ανάλογο συμβαίνει και στη περίπτωση πρωτεΐνης IspF.



Σχήμα 6.2. Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης IspF.



Αυτό που απομένει για την πλήρη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που κωδικοεύονται από τα ORF1 και ORF2, είναι η διεξαγωγή εξειδικευμένων πειραμάτων με τα οποία θα αποδεικνύεται η ενζυμική δραστικότητα των IspD και IspF.

Οι πρωτεΐνες IspD και IspF έχουν απομονωθεί ή βρεθεί σε μια πληθώρα μικροοργανισμών όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα.

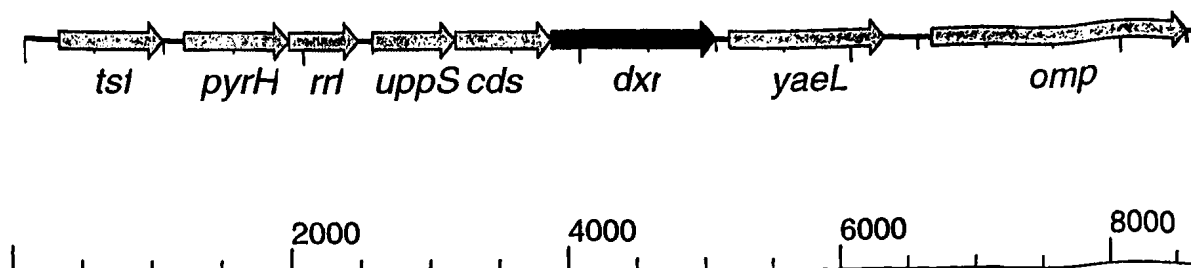
Οι Rohdich *et al.* το 2001 απέδειξαν την ύπαρξη της πρωτεΐνης IspF στο παθογόνο πρωτόζωο *Plasmodium falciparum* το οποίο προκαλεί την ελονοσία. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το γένος *Plasmodium* εκτιμάται ότι προκαλούν περίπου 3.000.000 θανάτους το χρόνο. Η ανθεκτικότητα των ελονοσιακών παραγόντων έναντι της πλειοψηφίας των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων φαρμάκων έχει δημιουργήσει την επιτακτική ανάγκη εύρεσης νέων εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η πρωτεΐνη IspF είναι ένας πιθανός στόχος φαρμάκων για το γένος *Plasmodium*, αλλά και γενικά τα ένζυμα της πορείας DOXP μπορεί να χρησιμεύσουν ως στόχοι για τη θεραπεία της ελονοσίας.

Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά αρχίζουν πλέον και γίνονται ολοένα και λιγότερο αποτελεσματικά όσον αφορά τη θεραπεία διαφόρων μολύνσεων μικροβιακής προελεύσεως, κι' αυτό λόγω του ότι πολλοί μικροοργανισμοί έχουν πλέον αποκτήσει ανθεκτικότητα σε μια πληθώρα αντιβιοτικών. Επιπρόσθετα, η πλειοψηφία των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών "στοχεύει" σ' ένα πολύ μικρό αριθμό ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες μεταξύ των άλλων περιλαμβάνονται το κυτταρικό τοίχωμα, τη σύνθεση DNA και RNA, καθώς και η πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ άλλες σημαντικές λειτουργίες όπως επί παραδείγματι η έκκριση, η κυτταρική διαίρεση καθώς και πολλές άλλες μεταβολικές λειτουργίες παραμένουν ανεκμετάλλευτες. Τα τελευταία χρόνια η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί στην πλήρη ανάλυση του γονιδιώματος πολλών μικροοργανισμών, έχει οδηγήσει στην αναγνώριση νέων μονοπατιών τα οποία τελικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νέων αντιβιοτικών. Μεταξύ αυτών των μονοπατιών συμπεριλαμβάνεται και το DOXP, η απουσία του οποίου από τα θηλαστικά ενισχύει την προσπάθεια δημιουργίας νέων φαρμάκων με αντιβακτηριακή, αντιελονοσιακή και ζιζανιοκτόνο δράση (Richard *et al.*, 2001, Kuzuyama, 2002,

Rohmer 1998, Kemp *et al.*, 2002 και 2003, Steinbacher *et al.*, 2002). Η σπουδαιότητα της πορείας DOXP ενισχύεται επίσης από το γεγονός του ότι η ακριβής γνώση του μηχανισμού και της ρυθμιστικής του πορείας μπορεί επίσης να χρησιμεύσει στη βιοτεχνολογική παραγωγή ισοπρενοειδών, τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν προσελκύσει εμπορικό ενδιαφέρον (Rohdich *et al.*, 2001, Barkovich *et al.*, 2001).

Σε μια προσπάθεια αποκωδικοποίησης του φυσιολογικού ρόλου των ενζύμων της πορείας DOXP στους διάφορους μικροοργανισμούς, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες παρατήρησαν την αναγκαιότητα της πρωτεΐνης IspF τόσο στο *E. coli* όσο και στο *B. subtilis*. Η δημιουργία ελλείμματος και τελικά η απάλειψη του γονιδίου *ispF* από το *E. coli* και το *B. subtilis* είχε σημαντικότερη επίδραση στη βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και τελικά οδηγούσε στο θάνατο του κυττάρου (Campbell *et al.*, 2002). Η βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης ήταν και εξακολουθεί να είναι ένας από τους σημαντικότερους στόχους στις αντιμικροβιακές θεραπείες κι' αυτό λόγω των καταστροφικών συνεπειών που έπονται από την πλήρη απώλεια του σχήματος και τελικά τη λύση του τοιχώματος κατά την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσής του. Με τη μελέτη αυτή αποδείχθηκε η αναγκαιότητα της πρωτεΐνης IspF για την ανάπτυξη των *E. coli* και *B. subtilis*. Η απάλειψή της από αυτούς τους μικροοργανισμούς οδηγεί τελικά σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και τροποποίηση της μορφολογίας των κυττάρων.

Το ερώτημα που εγείρεται και μένει να απαντηθεί, είναι για πιο λόγο δύο από τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών, τα *ispD* και *ispF* με άλλα λόγια τα ORF1 και ORF2, είναι τμήμα του οπερονίου *glc*, υπεύθυνου για την αναπλήρωση του φαινότυπου του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Κάτι παρόμοιο έχει αναφερθεί στο *Z. mobilis* σε ότι αφορά το δεύτερο γονίδιο της πορείας DOXP, τη ρεδουκτοϊσομεράση της 5-φωσφορικής 1-δεοξυ-D-ξυλουλόξης, *dxr*, (Grolle *et al.*, 2000). Το γονίδιο αυτό βρίσκεται σε μια περιοχή αποτελούμενη από γονίδια που καμία σχέση δεν έχουν με τη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών, ενώ η οργάνωσή τους υποδεικνύει ότι συμμεταγράφονται ως ένα οπερόνιο (Σχήμα 6.3).



Περιοχή γονιδίου *dxr* 8611 bps

Σχήμα 6.3. Μοριακή οργάνωση της περιοχής του γονιδίου *dxr* στο *Z. mobilis*.

tsf: Θεωρητικός παράγοντας επιμήκυνσης EF-TS

pyrH: Θεωρητική μονοφωσφορική κινάση της ουριδίνης

rrf: Θεωρητικός παράγοντας της ριβοσωμικής ανακύκλωσης

uppS: Θεωρητική συνθετάση του διφωσφορικού αντεκαπρενυλίου

cdsA: Θεωρητική φωσφατιδύλο κυτιδύλο τρανσφεράση

dxr: ρεδουκτοΐσομεράση της 5-φωσφορικής 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζης

yaeL: Θεωρητική πρωτεάση

omp: Θεωρητική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης

Παρόμοια μοριακή οργάνωση συναντάμε και στην περιοχή που εντοπίζεται το γονίδιο *dxr* και στο *E. coli* με τη μόνη διαφορά ότι σ' αυτή την περίπτωση το γονίδιο *dxr* εντοπίζεται μεταξύ των *rrf* και *uppS*.

Επιπρόσθετα, οι Herz *et al.* το 2000, στη μελέτη που έκαναν για το γονίδιο *ispF*, βρήκαν ότι αυτό συνδέεται στενά ή βρίσκεται συντηγμένο με το γονίδιο *ispD*. Τα δύο αυτά γονίδια είναι πολύ πιθανό ότι συμμεταγράφονται. Έχουν βρεθεί παρακείμενα στο χρωμόσωμα 21 βακτηρίων ενώ σε 6 βακτήρια έχουν βρεθεί γονίδια με δύο λειτουργίες, με το N-τελικό άκρο να παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη *IspD* και το C-τελικό άκρο να παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη *IspF* (Πίνακας 6.1). Στην περίπτωση του *Z. mobilis* τα γονίδια *ispD* (ORF1) και *ispF* (ORF2) όπως περιγράφηκε στην παρούσα διατριβή βρέθηκε ότι βρίσκονται παρακείμενα και συμμεταγράφονται (παρ. 5.3, Εικόνα 5.2).

Πίνακας 6.1: Αριθμοί πρόσβασης των γονιδίων *ispD* και *ispF* από διάφορους μικροοργανισμούς (Herz *et al.*, 2000).

Βακτήρια	Αριθμοί πρόσβασης	
Γονίδια με δύο λειτουργίες		
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cj.seq	
<i>Caulobacter crescentus</i>	gcc_1641, gcc_574	
<i>Helicobacter pylori</i>	gb AE001474	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	emb X72382	
<i>Treponema pallidum</i>	gb AE001227	
<i>Zymomonas mobilis</i>	gb AF176314	
Παρακείμενα γονίδια		
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Contig704	
<i>Bacillus subtilis</i>	emb Z99101	
<i>Bordetella pertussis</i>	Contig657	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AE001437	
<i>Clostridium difficile</i>	Contig392	
<i>E. coli</i>	gb AE000358	
<i>Haemophilus influenzae</i>	gb U32750	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Contig1719	
<i>Mycobacterium avium</i>	5759	
<i>Mycobacterium bovis</i>	Contig950	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	emb Z92774	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Contig181	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Contig3	
<i>Pasteurella multocida</i>	Contig556	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contig52	
<i>Salmonella paratyphi</i>	SPA.0.2916	
<i>Salmonella typhi</i>	Contig404	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Contig997	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	gsp_845	
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	949	
<i>Vibrio cholerae</i>	asm938	
<i>Yersinia pestis</i>	Contig730	
Σε άλλες περιοχές	<i>ispD</i>	<i>IspF</i>
<i>Aquifex aeolicus</i>	gb AE000734	gb AE000715
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	gb AE001642	gb AE001639
<i>Chlamydia trachomatis</i>	gb AE001320	gb AE001317
<i>Chlorobium tepidum</i>	gct_38	gct_41
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Contig519	Contig402
<i>Deinococcus radiodurans</i>	8896	8835
<i>Enterococcus faecalis</i>	gef_6311	gef_6177
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1209	1207
<i>Synecocystis sp.</i>	dbj D990914	dbj D90906
<i>Thermotoga matitima</i>	gb AE001792	gb AE001738
Ευκαρυωτικά		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	gb AC004136	
<i>Plasmodium falciparum</i>	1D_M9Fe7.plt	gb AE001394

6.3.2 Τα προϊόντα των ORF3 και ORF4

Η πρωτεΐνη που κωδικοεύεται από το ORF3 δεν παρουσιάζει ομολογία με καμία από τις γνωστές πρωτεΐνες (παρ. 5.11). Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται ότι πρόκειται για μια νέα πρωτεΐνη ο ρόλος της οποίας ως τμήμα του οπερονίου *glc* παραμένει αδιευκρίνιστος. Η δημιουργία μετάλλαξης στην αλληλουχία της εν λόγω πρωτεΐνης και η μελέτη του φαινότυπου που θα ανιχνευθεί πιθανόν να διαφωτίσει τόσο το ρόλο της όσο και τη φύση της. Επιπρόσθετα, η εύρεση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης που κωδικοεύεται από το ORF3 και η σύγκρισή της με τριτοταγείς δομές άλλων γνωστών πρωτεϊνών πιθανόν να δώσει απαντήσεις σχετικά με τον τρόπο δράσης της και τελικά να αποσαφηνίσει το ρόλο της.

Η πρωτεΐνη που κωδικοεύεται από το ORF4 παρουσιάζει ισχυρή ομολογία καθώς και συντηρημένες περιοχές με την πρωτεΐνη CinA (παρ. 5.12). Το γονίδιο *cinA* είναι το πρώτο στη σειρά εντός του οπερονίου *cin* (οπερόνιο επαγόμενο κατά την επιδεκτικότητα, *competence inducible*) του βακτηρίου *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1995), και θεωρείται ότι η δράση του απαιτείται εξειδικευμένα σε κάποιο στάδιο κατά το φαινόμενο του μετασχηματισμού.

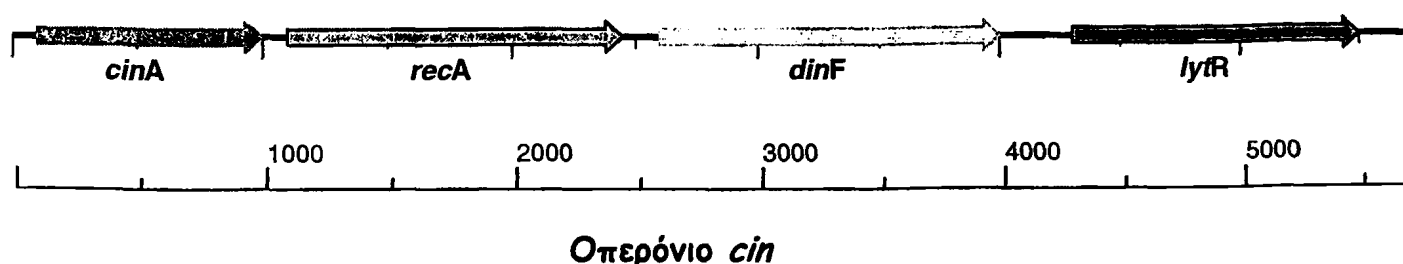
Ο γενετικός μετασχηματισμός πρωτοανακαλύφθηκε στο *S. pneumoniae*, ένα ανθρώπινο παθογόνο, το οποίο ευθύνεται για πλήθος ασθενειών. Ο μετασχηματισμός είναι ένας από τους πιο απλούς τρόπους ανταλλαγής γενετικής πληροφορίας και έχει να κάνει με την πρόσληψη εξωγενούς "γυμνού" DNA, η οποία διαδοχικά ακολουθείται από εισαγωγή του στο χρωμόσωμα του δέκτη. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ισχυρά συνδεδεμένος με την ύπαρξη της πρωτεΐνης RecA (Martin *et al.*, 1995). Στο *S. pneumoniae* ως επιδεκτικότητα στο μετασχηματισμό ορίζεται η ικανότητα του βακτηρίου να προσλαμβάνει μεγάλου μοριακού βάρους εξωγενές DNA και λαμβάνει χώρα κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης σε μια κρίσιμη οπτική πυκνότητα. Η όλη διαδικασία φαίνεται ότι συντονίζεται από την έκκριση ενός δεκαεπταπεπτιδίου, της φερομόνης CSP (*competence-stimulating peptide*, Håvarstein *et al.*, 1995) ή αλλιώς παράγοντας επιδεκτικότητας CF. Η CF είναι μια

μικρή βασική πρωτεΐνη που όταν προστίθεται σε μια αναπτυσσόμενη καλλιέργεια, επάγει την έκκριση περισσότερων CF καθώς και τη σύνθεση τουλάχιστον 14 πρωτεϊνών οι οποίες απουσιάζουν κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (Morrison and Baker, 1979). Μέχρι σήμερα έχει χαρακτηριστεί ένας μοναδικός γενετικός τόπος ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση της επαγωγής της επιδεκτικότητας, ο *comAB* (Chandler and Morrison, 1987). Οι μεταλλάξεις εντός αυτής της περιοχής είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια της αυθόρμητης επιδεκτικότητας η οποία όμως αναπληρωνόταν με την προσθήκη CF. Η ομοιότητα της πρωτεΐνης ComA με τις πρωτεΐνες έκκρισης τοξίνης υποδηλώνει ότι η περιοχή *comAB* πιθανόν να κωδικεύει ένα εξειδικευμένο CF σύστημα μεταφοράς (Hui and Morrison, 1991). Για να εκπληρώσει αυτό το ρόλο η περιοχή *comAB* θα πρέπει να εκφράζεται είτε συστατικά ή πολύ νωρίς κατά τη φάση της επιδεκτικότητας. Παράλληλα με την περιοχή *comAB* έχει μελετηθεί μια οικογένεια λιποπρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται σε ολιγοπεπτίδια και μαζί με την περμεάση του ολιγοπεπτιδίου Ami πιθανόν να παίζουν κάποιο ρόλο στο να αντιλαμβάνονται διαφορές στις συνθήκες ανάπτυξης, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές στο να πυροδοτούν την επιδεκτικότητα (Alloing *et al.*, 1994). Μέχρι στιγμής δεν έχει ανακαλυφθεί κάποιο από τα CF επαγόμενα γονίδια.

Ο προσδιορισμός ενός επαγόμενου γονιδίου CF θα βοηθούσε ουσιαστικά στη μελέτη της ρύθμισης της επιδεκτικότητας στο *S. pneumoniae*. Έτσι, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο γονίδιο *recA* το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μερικώς (Martin *et al.*, 1992). Η επιλογή βασίσθηκε καταρχήν στην παρατήρηση ότι το γονίδιο *recA* επάγεται κατά την επιδεκτικότητα (Martin *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 1995). Από πειράματα Western αποκαλύφθηκε ότι η επαγωγή αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης RecA κατά 3 έως 5 φορές. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο *B. subtilis* (Yasbin *et al.*, 1992). Σημαντικό ρόλο στην επιλογή του γονιδίου *recA* έπαιξε και το γεγονός του ότι η πρωτεΐνη RecA είναι μια ισχυρά συντηρημένη πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και στην επιδιόρθωση του DNA (Roca and

Cox, 1990). Στο *S. pneumoniae* το γονίδιο *recA* αποτελεί τμήμα ενός οπερονίου το οποίο αντιπροσωπεύει την πρώτη CF επαγόμενη περιοχή στον οργανισμό αυτό.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της χρωμοσωμικής περιοχής, μεγέθους 7,8 kb από το *S. pneumoniae* αποκάλυψε την τοποθέτηση του γονιδίου *recA* μεταξύ γονιδίων εξαιρετικού ενδιαφέροντος (Σχήμα 6.4).



Σχήμα 6.4. Γενετική οργάνωση του οπερονίου *cin* από το *S. pneumoniae*.

cinA: πρωτεΐνη επαγόμενη κατά την επιδεκτικότητα (competence inducible)

recA: πρωτεΐνη γενετικού ανασυνδυασμού

dinF: πρωτεΐνη επαγόμενη από βλάβη του DNA (damage inducible)

lytR: λυτικήση

Ακριβώς ανοδικά του *recA* υπάρχει το ORF που κωδικεύει την πρωτεΐνη CinA (Competence induced), η έκφραση της οποίας φαίνεται ότι επάγεται σε κάποια φάση της επιδεκτικότητας των κυττάρων. Η συγκριτική αντιστοίχιση της CinA με γνωστές πρωτεΐνες από βάσεις δεδομένων αποκάλυψε ισχυρή ομολογία με το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CinA τριών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, των *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* και *Yersinia pestis*. Αυτά τα CinA ομόλογα κωδικεύονται από γονίδια τα οποία βρίσκονται ανοδικά ομολόγων της πρωτεΐνης RecA, υποδηλώνοντας ότι η συνέκφραση αυτών των δύο γονιδίων πιθανόν να έχει συντηρηθεί ισχυρά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Martin *et al.*, 1994 και 1995, Mortier-Barrière *et al.*, 1998). Τα γονίδια *cin* θεωρούνται σήμερα από πολλούς και ως γονίδια *din* (επαγόμενα από βλάβη του DNA, damage-inducible)

από τη στιγμή που παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασής τους μετά από την προσθήκη μιτομυκίνης *C* και πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε κάποια φάση κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA και/ή κατά τον ανασυνδυασμό. Η υπόθεση αυτή έχει εφαρμογή και στα ομόλογα *cinA* τα οποία δεν συνδέονται με το γονίδιο *recA* (Martin *et al.*, 1995).

Το γονίδιο *lytR* παρουσιάζει ομολογία με το αντίστοιχο γονίδιο από το *B. subtilis*. Στον οργανισμό αυτό η πρωτεΐνη LyrR δρα ως εξασθεμιστής της έκφρασης του οπερονίου *lytABC* το οποίο κωδικεύει μια αμιδάση και τον τροποποιητή της. Τέλος το γονίδιο *dinF* παρουσιάζει ομολογία με το αντίστοιχο γονίδιο από το *E. coli* όπου το εν λόγω γονίδιο βρίσκεται καθοδικά του *lexA*. Η έκφραση του γονιδίου *dinF* διεγείρεται από παράγοντες που καταστρέφουν το DNA, εξού και το όνομα *din* από damage inducible. Δεν έχει αποδοθεί φαινότυπος στο γονίδιο αυτό. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία ισχυρού δεσμού μεταξύ του γονιδίου *dinF* και του *lexA* ή του *recA* σε φυλογενετικά μακρινούς οργανισμούς είναι αρκετά εντυπωσιακή και υποδηλώνει ότι η συνέκφραση αυτών των γονιδίων είναι λειτουργικά πολύ σημαντική (Martin *et al.*, 1995).

Οι Pearce *et al.*, το 1995 εντόπισαν μια περιοχή στο χρωμόσωμα του *S. pneumoniae* η οποία αποτελείται από δύο ORFs. Ένα από τα δύο ORFs αναγνωρίστηκε ως γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη RecA, ενώ ανοδικά της υπάρχει το γονίδιο *exp10* το οποίο αργότερα από άλλους ερευνητές αποκαλείται *cinA*. Κατά την ανάλυση του *exp10* αναγνωρίστηκε ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 46 KDa με μια θεωρητική σηματοδοτική αλληλουχία 22 αμινοξέων. Το διάγραμμα υδροφοβικότητας αποκάλυψε την ύπαρξη πολλών υδροφοβικών περιοχών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη πρέπει να βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η αναζήτηση ομολογιών με άλλες γνωστές πρωτεΐνες αποκάλυψε ομολογία του αμινοτελικού άκρου της Exp10 με γεφυρίνη καθώς και με την πρωτεΐνη MoeA, η οποία είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση μολυβδοπτερίνης στο *E. coli*. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα προέβλεψε ένα πιθανό ρόλο της Exp10 λόγω της ομοιότητάς της με την πρωτεΐνη γεφυρίνη, η οποία είναι μια μεμβρανosύνδετη πρωτεΐνη και θεωρείται ότι συνδέει συμπλέγματα υποδοχέων γλυκίνης στους μικροσωληνίσκους

των νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Αναλόγως, η Expr10 πιθανόν να διευκολύνει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης RecA, του εισαγόμενου μονόκλωνου DNA δότη και του χρωμοσωμικού δίκλωνου DNA στη κυτταρική μεμβράνη. Η υπόθεση αυτή δεν είναι εντελώς αβάσιμη. Ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων και την RecA εντοπίστηκε μαζί με το δότη DNA και το χρωμοσωμικό δίκλωνο DNA κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού στο *B. subtilis*.

Το 1998 οι Masure *et al.* πρότειναν ότι στους πνευμονοκόκκους η πρωτεΐνη RecA, η οποία αρχικά είχε περιγραφεί ως μια πρωτεΐνη που συσσωρεύεται στη μεμβράνη του *E. coli*, πιθανόν να στοχεύεται στη μεμβράνη και να δεσμεύει το νεοεισαγόμενο ssDNA. Επιπλέον, αναγνωρίσθηκε ότι πρέπει να υπάρχει ένας επιπλέον παράγοντας για τη μετατόπιση της RecA κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού. Στο *S. pneumoniae*, η επαγωγή της επιδεκτικότητας, που τελικά οδηγεί στον γενετικό μετασχηματισμό, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του οπερονίου *cin* (Martin *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 1995). Το οπερόνιο αυτό, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, αποτελείται και από δύο άλλα γονίδια τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες με άγνωστες λειτουργίες τις Expr10 ή CinA και RecA (Martin *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 1995). Η ανάλυση της πρωτεΐνης Expr10 ή CinA αποκάλυψε ομολογία του N-τελικού άκρου με γεφυρίνη ενώ το C-τελικό άκρο παρουσίαζε ομολογία με υποθετικές πρωτεΐνες που κωδικεύονται από γονίδια ανοδικά του *recA* στο *E. coli* (Ehlert *et al.*, 1995) και στο *Enterobacter agglomerans*. Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με κολιγκρίνη έχουν αναφερθεί στο *B. subtilis*, *Synechocystis* spp και *Saccharomyces cerevisiae*. Βασιζόμενοι στη διασπορά της πρωτεΐνης Expr10 ή CinA μεταξύ των διαφόρων ειδών, στη θεωρητική ιδιότητά της για συσσώρευση στη μεμβράνη (Pearce *et al.*, 1995) καθώς και στην πιθανότητα για τη συγκέντρωση και άλλων πρωτεϊνών στη μεμβράνη, είναι πολύ πιθανό η Expr10 να προσδένεται στην RecA και να διευκολύνει τη διάταξή της στην κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της γενετικής μεταφοράς και με τον τρόπο αυτό να προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ο Masure και οι συνεργάτες του προτείνουν τη μετονομασία της Expr10 ή CinA σε κολιγκρίνη από τη λατινική λέξη *colligo* που σημαίνει συγκεντρώνω ή συλλέγω. Ο εντοπισμός των

Exp10 και RecA στο κύτταρο κατά τον μετασχηματισμό εξαρτάται από τη φάση της επιδεκτικότητας. Κατά τη διάρκεια της επιδεκτικότητας, η μεγαλύτερη ποσότητα των Exp10 και RecA εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, σε μη επιδεκτικά κύτταρα η πλειοψηφία των Exp10 και RecA βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Masure *et al.*, 1998). Για πρώτη φορά υπάρχει ένδειξη ότι κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού η RecA δρα στη μεμβράνη του κυττάρου και η Exp10 απαιτείται για τη μεταφορά της πρώτης στο σημείο αυτό. Απουσία της Exp10, η RecA όχι μόνο δεν έχει την ικανότητα να μεταφέρεται στη μεμβράνη κατά τη διάρκεια της επιδεκτικότητας αλλά επιπρόσθετα δεν επιδεικνύει καμία συσσωμάτωση (Masure *et al.*, 1998). Φαίνεται λοιπόν ότι κατά τον μετασχηματισμό, η RecA μεταφέρεται στη μεμβράνη με κάποιο τρόπο που συνδέεται άμεσα με την Exp10 και είναι πολύ πιθανό αυτό να συμβαίνει σε συγκεκριμένα σημεία της μεμβράνης από τα οποία γίνεται η εισαγωγή του ssDNA. Συμπερασματικά, η κολιγκρίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία διευκολύνει τη στόχευση μορίων από το κυτόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη ως απάντηση σε συγκεκριμένο ερέθισμα. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να μεταφέρει και να συγκεντρώνει σε συσσωματώματα την RecA στην κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της γενετικής μεταφοράς. Ανήκει σε μια μεγαλύτερη κατηγορία πρωτεϊνών η δράση των οποίων είναι να συγκεντρώνουν μεγαλομόρια σε βιολογικές μεμβράνες ως απάντηση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων (Masure *et al.*, 1998).

Η μεταφορά γενετικού υλικού με γενετικό μετασχηματισμό στο *Z. mobilis* έχει αναφερθεί από ερευνητικές ομάδες αλλά η διαδικασία δεν είναι ακόμα αξιόπιστη και δεν έχει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Οι Yanase *et al.* το 1986 και Su and Goodman το 1987 ανέφεραν υψηλά ποσοστά εισαγωγής πλασμιδίων με χημικό μετασχηματισμό, αποτελέσματα όμως τα οποία δεν μπόρεσαν να αναπαραχθούν με επιτυχία από άλλες ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο. Εντυπωσιακά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (Okamoto and Nakamura, 1992, Liang and Lee, 1998), και σε αυτή την περίπτωση όμως τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται αξιόπιστα καθώς δεν μπόρεσαν να αναπαραχθούν.

Μετά την εύρεση της ομολογίας του ORF4 με την πρωτεΐνη CinA έγινε προσπάθεια μετασχηματισμού του φυσικού στελέχους του *Z. mobilis* ATCC 10988,

χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορέα pBZIP1 (Varsaki *et al.*, 1998) (παρ. 5.13). Κατά την επιτυχημένη μεταφορά του pBZIP1 σε κύτταρα ATCC 10988 παρατηρήθηκε δομική αλλοίωση του πλασμιδίου στο νέο ξενιστή και υπήρξαν ενδείξεις ενσωμάτωσης αντιγράφου του πλασμιδίου στο χρωμόσωμα του ξενιστή (Εικόνες 5.18 και 5.19). Κάτι ανάλογο έχει αναφερθεί και από τη Δρ. Α.-Σ. Αφένδρα κατά την εκπόνηση της διδακτορικής της διατριβής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της, κατά τη μεταφορά του πλασμιδίου pDS212 στο μεταλλαγμένο στέλεχος του *Z. mobilis* CU1Rif2, προέκυψε μικρή συχνότητα μετασχηματισμένων κυττάρων, στα οποία το pDS212 δεν ανιχνεύθηκε στο πλασμιδιακό σύνολο αλλά στο χρωμόσωμα των ξενιστών.

Μια πιθανή εξήγηση της αδυναμίας του *Z. mobilis* να είναι επιδεκτικό σε μετασχηματισμό ίσως να είναι η απουσία του γονιδίου *recA* καθοδικά του ORF4. Σε όλα τα βακτήρια τα οποία είναι επιδεκτικά στον μετασχηματισμό όπως *S. pneumoniae* (Martin *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 1995, Masure *et al.*, 1998, Mortier-Barrière *et al.*, 1998, Novak *et al.*, 2000, Bergé *et al.*, 2001), *Deinococcus radiodurans* (Bonacossa *et al.*, 2002, Narumi *et al.*, 1999), *B. subtilis* (Yasbin *et al.*, 1992) και στα οποία έχει ανιχνευθεί και μελετηθεί σε κάποιο βαθμό το οπερόνιο *cin* υπάρχει μια ισχυρή συντήρηση της διάταξης των γονιδίων σ' αυτό, με το γονίδιο *recA* να εντοπίζεται καθοδικά του *cinA*. Στο *Z. mobilis* το γονίδιο *recA* έχει ανιχνευθεί από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες. Το 2002 οι Beletsiotis *et al.*, βρήκαν το γονίδιο *recA* από το στέλεχος CP4 του *Z. mobilis* (αρ. πρόσβασης AY101392), ενώ νωρίτερα το 1999 οι Lee *et al.*, εντόπισαν τη χρωμοσωμική περιοχή στην οποία εδράζεται το γονίδιο *recA* από το στέλεχος ZM4 του *Z. mobilis* και η οποία αποτελείται από 29 θεωρητικές κωδικεύουσες περιοχές (αρ. πρόσβασης AF124757) (Σχήμα 6.5). Το ενδιαφέρον στην τελευταία περίπτωση είναι ότι καθοδικά το *recA* εντοπίζεται ένα γονίδιο μετασχηματισμού, το *comF*, ενώ 8 ORFs καθοδικά εντοπίζεται με μικροδιαφορές η περιοχή του γονιδίου *dxr* (Σχήμα 6.3).



Σχήμα 6.5 Οργάνωση του φοσμιδίου 43D2 από το στέλεχος ZM4 του *Z. mobilis*.

5: γονίδιο γενετικού ανασυνδυασμού, *recA*

6: γονίδιο μετασχηματισμού, *comF*

15: θεωρητικός παράγοντας επιμήκυνσης EF-TS, *tsf*

16: θεωρητική μονοφωσφορική κινάση της ουριδίνης, *pyrH*

17: θεωρητικός παράγοντας της ριβοσωμικής ανακύκλωσης, *rrf*

18: θεωρητική undecaprenyl diphosphate synthetase, *uppS*

19: ρεδοκτοϊσομεράση της 5-φωσφορικής 1-δεόξυ-D-ξυλουλόζης, *dxr*

20: υποθετική zinc μεταλλοπρωτεάση

21: θεωρητική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, *omp*

6.4. Προτεινόμενος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν κατά την παρούσα διατριβή σχετικά με το ORF4 δεν φαίνονται να έχουν, προφανή τουλάχιστον, σχέση δεν με τις ιδιότητες που αποδίδονται στην πρωτεΐνη CinA από άλλους οργανισμούς. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά για το ORF4 αποδείχθηκε ότι:

(α) έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, επομένως θα πρέπει να συμμετέχει ενεργά στο μηχανισμό ανθεκτικότητας του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

(β) αποκαθιστά τη σωστή λειτουργία της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης στο CU1Rif2 όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αυξηθεί, γεγονός που πιθανόν να υποδεικνύει ότι σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, το

ίδιο το μόριο της γλυκόζης δίνει το σήμα για μια σειρά βημάτων μεταξύ των οποίων απαιτείται αλληλεπίδραση του ORF4 με το γονίδιο *glk* κατά το 1^ο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας Entner-Doudoroff ή ακόμα νωρίτερα με το μεταφορέα της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου το γονίδιο *glf*,

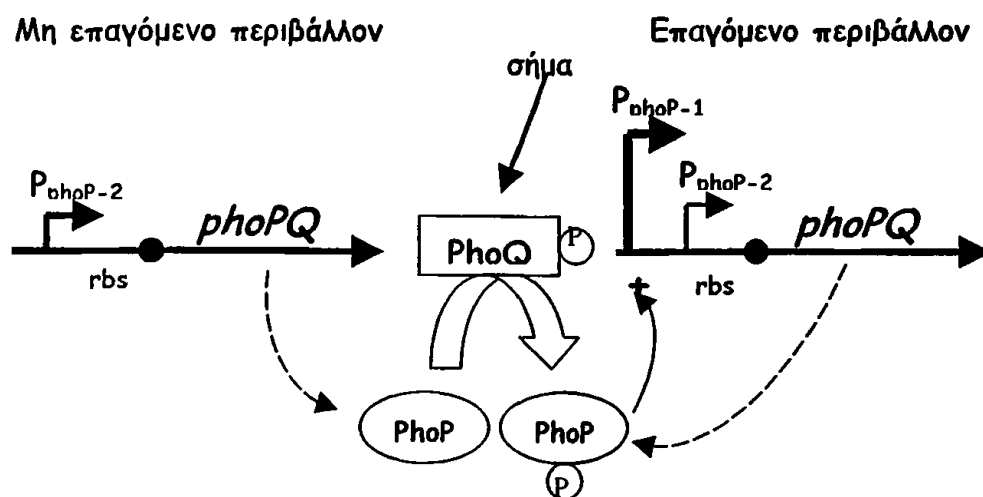
(γ) αλληλεπιδρά άμεσα με τον προαγωγό του οπερονίου *glc*, P_{glc} , δείχνοντας με τον τρόπο αυτό μια λειτουργία αυτορύθμισης.

Τα συστήματα δύο συστατικών (two-component systems) παρέχουν συντηρημένους μηχανισμούς για την ισοδύναμη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών σημάτων. Πορείες, όπως η κυτταρική διαίρεση, διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, η απόκριση σε διάφορους παράγοντες στρες, η καθήλωση του αζώτου, ο χημειοτακτισμός καθώς και η ιογένεια, ρυθμίζονται από συστήματα δύο συστατικών (Stock *et al.*, 1989). Στα βακτήρια έχουν αναγνωρισθεί εκατοντάδες τέτοιου είδους συστήματα στα οποία είναι απαραίτητα για πολλές προσαρμοστικές αποκρίσεις (Hoch and Silhavy, 1995). Έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλους τούς προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που έχουν μελετηθεί έως σήμερα και πρόσφατα έχουν αναγνωρισθεί και σε μερικούς ευκαρυωτικούς. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, ο ρυθμιστής της απόκρισης στο περιβαλλοντικό σήμα είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής. Ο πυρήνας του μηχανισμού των συστημάτων δύο συστατικών περιλαμβάνει την αυτοφωσφορυλίωση του αισθητήρα, η οποία λαμβάνει χώρα στην κυτοπλασμική περιοχή σε μια συντηρημένη περιοχή καταλοίπων ιστιδίνης, ακολουθούμενη από μεταφορά της φωσφορικής ομάδας σε μια συντηρημένη περιοχή καταλοίπων ασπαρτικού στον ρυθμιστή της απόκρισης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ρυθμιστή που τελικά καταλήγει στην κατάλληλη απόκριση (Parkinson & Kofoed, 1992).

Η αυτορύθμιση αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό σε πολλά συστήματα δύο συστατικών. Επιτρέπει την ενίσχυση της απόκρισης, βοηθώντας με τον τρόπο αυτό το κύτταρο να τροποποιεί ταχέως την εξειδικευμένη γονιδιακή έκφραση όταν αυτό έλθει σε επαφή με τα κατάλληλα σήματα.



Στο *Salmonella typhimurium* αναγνωρίστηκε το οπερόνιο *phoPQ* από το οποίο κωδικοεύεται μια ρυθμιστική μεταγραφική πρωτεΐνη, η PhoP καθώς επίσης και μια πιθανή φωσφορική κινάση, η PhoQ (Soncini *et al.*, 1995). Το οπερόνιο μεταγράφεται από δύο προαγωγούς, ένας εκ των οποίων αυτορυθμίζεται θετικά και από τις δύο πρωτεΐνες (Σχήμα 6.6). Η πρωτεΐνη PhoQ απαιτείται για την φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της PhoP, αποκρινόμενη σε διάφορες αλλαγές του περιβάλλοντος. Σε ένα μη επαγόμενο περιβάλλον, το οπερόνιο μεταγράφεται από τον προαγωγό P_{phoP-2} . Παρουσία του ενεργοποιού σήματος, η διαδοχική φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των PhoQ και PhoP λαμβάνει χώρα από πρωτεΐνες οι οποίες μεταφράζονται από το mRNA που προκύπτει από τον προαγωγό P_{phoP-2} . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωσφορυλιωμένης PhoP η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη μεταγραφή από τον προαγωγό P_{phoP-1} και σε μικρότερο βαθμό από από τον P_{phoP-2} .



Σχήμα 6.6. Προτεινόμενο μοντέλο για την αυτορύθμιση του οπερονίου *phoPQ*. Αλλαγές στο περιβάλλον επάγουν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης PhoQ και η διαδοχική φωσφορυλίωση της PhoP λαμβάνει χώρα από πρωτεΐνες οι οποίες μεταφράζονται από το mRNA που προκύπτει από τον προαγωγό P_{phoP-2} . Στη συνέχεια μια θετική ανάδραση βρόχου διεγείρει την μεταγραφή από τον προαγωγό P_{phoP-1} , που αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών PhoQ και PhoP καθώς και την επακόλουθη ενεργοποίηση άλλων PhoP-ενεργοποιούμενων γονιδίων. (αναπαραγωγή από το άρθρο των Soncini *et al.*, 1995, J. Bacteriol. 177: 4364-4371).

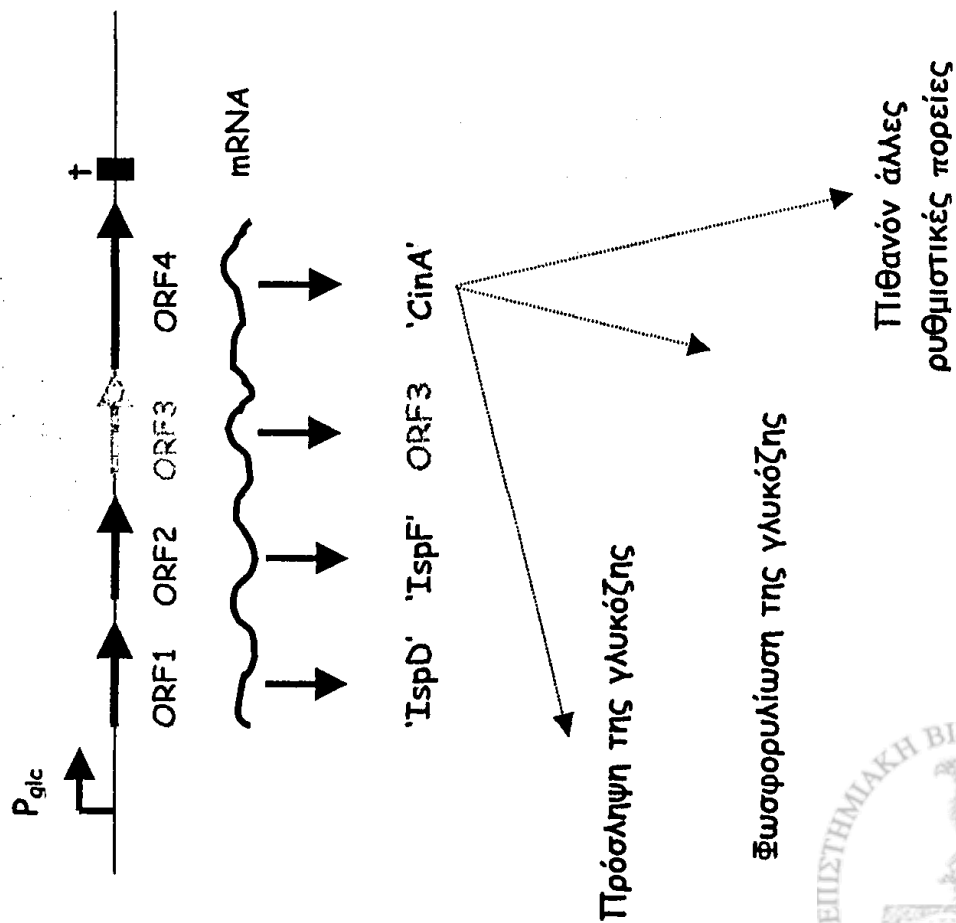
Φαίνεται επομένως, ότι τα κύτταρα προκειμένου να ανταποκριθούν και να επιβιώσουν σε πολύπλοκα περιβάλλοντα στη φύση, είναι ιδιαίτερα σημαντική η ανάπτυξη ρυθμιστικών δικτύων μεταξύ διαφορετικών συστημάτων δύο συστατικών. Κατά τη μελέτη των mRNAs μεταλλαγμένων στελεχών του *E. coli*, πραγματοποιήθηκε διαδοχική αφαίρεση από τα γένωμα του K-12 κάθε συστήματος δύο συστατικών (Oshima *et al.*, 2002). Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά καθώς σύμφωνα με αυτά αποδείχθηκε η ύπαρξη δικτύου λειτουργικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστημάτων δύο συστατικών καθώς επίσης και ότι πλήθος κυτταρικών λειτουργιών επηρεάζονται από πολλαπλά συστήματα.

Καταλήγοντας λοιπόν, τα μέχρι σήμερα δεδομένα αποδεικνύουν την ισχυρή αλληλεπίδραση και ρύθμιση μεταξύ διαφορετικών συστημάτων δύο συστατικών καθώς επίσης και το σημαντικότερο ρόλο που διαδραματίζει αυτή η αλληλεπίδραση στη φυσιολογία του κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια τα δίκτυα συστημάτων δύο συστατικών αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον και πιθανόν να είμαστε ακόμα στην αρχή της κατανόησης των μεταξύ τους ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων και των πολυσύνθετων αποτελεσμάτων που επιφέρουν στη ζωή του κυττάρου.

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να σχεδιαστεί ένα θεωρητικό μοντέλο του μηχανισμού ανθεκτικότητας των κυττάρων του βακτηρίου *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 6.7

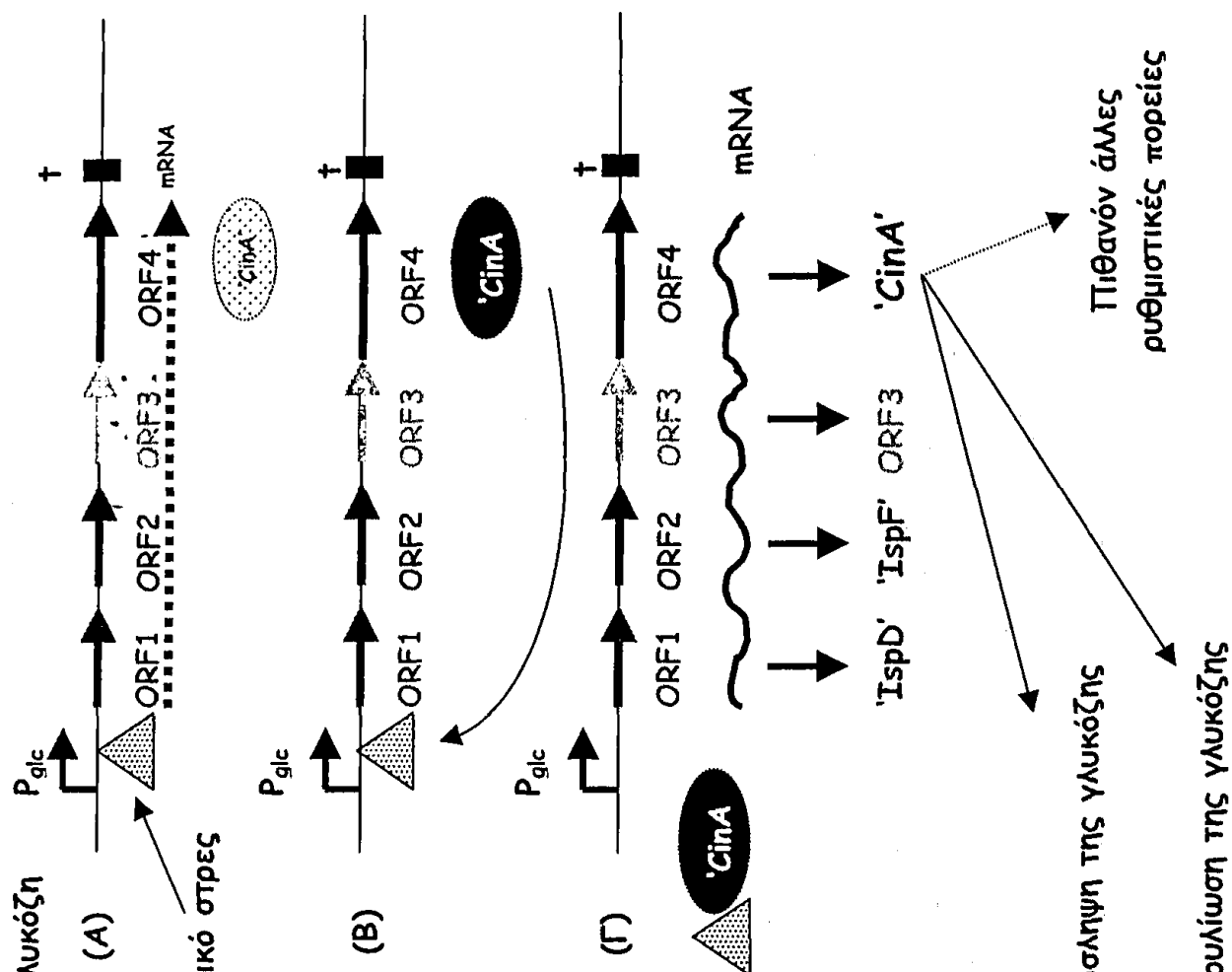
Συνθήκες ανάπτυξης

2% γλυκόζη



10% γλυκόζη

Σήμα (A)
Οσμωτικό στρες



Σχήμα 6.7. Προτεινόμενος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα κυττάρων του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης: Η μεταγραφή του οπερονίου είναι συστατική καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο 2% γλυκόζης.

Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχουν δεδομένα για την εμπλοκή του πρωτεϊνικού προϊόντος του ORF4 (πρωτεΐνη 'CinA') στο μηχανισμό της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης, καθώς επίσης και στην πιθανή αλληλεπίδραση αυτής με άλλες ρυθμιστικές πορείες.

Ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης:

(Α) Η αλλαγή του περιβάλλοντος από χαμηλές σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης πιθανόν να δημιουργεί μια κατάσταση οσμωτικού στρες για τα κύτταρα, αποτέλεσμα της οποίας είναι η απενεργοποίηση με κάποιο τρόπο της ευρύτερης περιοχής του προαγωγού P_{glc} . Σ' αυτές τις συνθήκες η μεταγραφή του οπερονίου γίνεται σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα και ως εκ τούτου υπάρχει ελάχιστη παραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοούνται από τα ORFs άρα και της πρωτεΐνης 'CinA'.

(Β) Μετά από τη συσσώρευση μιας ικανής ποσότητας πρωτεΐνης 'CinA', αυτή αποδεδειγμένα αποκαταστέλλει την υπάρχουσα καταστολή, αλληλεπιδρώντας άμεσα ή έμμεσα με την ευρύτερη περιοχή του προαγωγού P_{glc} . Μετά την αποκατάσταση της καταστολής η δραστικότητα του προαγωγού P_{glc} αυξάνεται σημαντικά πιθανόν είτε από την έκφραση αυτού κάθε αυτού του οπερονίου g/c , είτε η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης επάγει την έκφραση του P_{glc} και η μεταγραφή του οπερονίου g/c γίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε οπερόνια τα οποία υπόκεινται σε αυτορύθμιση έχει αναφερθεί ότι ως απόκριση στο εκάστοτε ερέθισμα η έκφρασή τους αυτοενισχύεται (Himpens *et al.*, 2000).

(Γ) Η πρωτεΐνη 'CinA' που παράγεται από τη μετάφραση του οπερονίου g/c συμμετέχει αποδεδειγμένα στο μηχανισμό της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης και δεν αποκλείεται η αλληλεπίδρασή της με άλλες ρυθμιστικές πορείες (ενδεχόμενο το οποίο θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω).

Συμπεράσματα

- 1) Από την ετερόλογη μελέτη του υποθετικού προαγωγού αποδείχθηκε ότι η περιοχή του προαγωγού έχει πράγματι ανιχνεύσιμη δραστικότητα. Ο προαγωγός ονομάστηκε *p_{glc}*.
- 2) Ο προαγωγός *p_{glc}* είναι οσμωρυθμιζόμενος καθώς η έκφρασή του επάγεται από υψηλές συγκεντρώσεις τόσο διαφόρων σακχάρων όσο και άλατος. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά για οσμωρυθμιζόμενο προαγωγό στο *Z. mobilis*.
- 3) Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης, RT-PCR, αποδείχθηκε ότι το εξεταζόμενο τμήμα DNA των τεσσάρων θεωρητικών κωδικευουσών περιοχών, το οποίο αναπληρώνει την ευαισθησία του *CU1Rif2* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, συμμεταγράφεται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Το οπερόνιο αυτό ονομάστηκε οπερόνιο *g/c*, και αποτελείται από 4.493 bp (μετά την εύρεση της απουσίας του νουκλεοτιδίου στη θέση 2271).
- 4) Η έκφραση του οπερονίου *g/c* ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και μάλιστα η ρύθμιση αυτή γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο.

- 5) Οι πρωτεΐνες που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2 παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία καθώς και εκτεταμένες συντηρημένες περιοχές με τις πρωτεΐνες IspD και IspF αντίστοιχα, οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών μέσω της πορείας της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόξης (πορεία DOXP). Απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με επιτυχία τα προϊόντα των ORF1 και ORF2. Η πρωτεΐνη του ORF1 υπολογίστηκε στα 37 kDa και εμφανίζεται ως διμερές, ενώ η πρωτεΐνη του ORF2 υπολογίστηκε στα 120 kDa και πιθανότατα αποτελεί εξαμερές. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά για απομόνωση των εν λόγω πρωτεϊνών του *Z. mobilis* από ετερόλογο σύστημα υπερέκφρασης. Δεν βρέθηκε ομολογία της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF3 με γνωστές πρωτεΐνες. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα φαίνεται ότι πρόκειται για μια νέα πρωτεΐνη. Αντίθετα, βρέθηκε ισχυρή ομολογία καθώς και εκτεταμένες συντηρημένες περιοχές μεταξύ της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4a και της πρωτεΐνης CinA (Competence-damaged protein). Η πρωτεΐνη CinA είναι η πρώτη που κωδικεύεται από το οπερόνιο *cin* (competence-inducible operon) και θεωρείται ότι απαιτείται σε κάποια φάση κατά την διάρκεια του μετασχηματισμού ορισμένων βακτηρίων όπως *S. pneumoniae*, *B. subtilis* και *D. radiodurans*.
- 6) Επετεύχθη μεταφορά του πλασμιδίου pBZIP1 στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988 με χημικό μετασχηματισμό, όμως το μεταφερόμενο πλασμίδιο παρουσίασε δομική αστάθεια στο νέο ξενιστή.
- 7) Εντοπίστηκε η μετάλλαξη στο οπερόνιο *glc* στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2. Ένθεση χρωμοσωμικής προελεύσεως, μεγέθους 848 bp, εισήχθη στην περιοχή του ORF4. Η ένθεση παρουσιάζει ισχυρή ομολογία, σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, με δύο τμήματα του πλασμιδίου 1 του στελέχους ZM4 του *Z. mobilis* καθώς επίσης και με δύο τμήματα του γονιδίου *unrD* του στελέχους CP4 του *Z. mobilis*.

- 8) Η εισαγωγή της ένθεσης και η διακοπή στο σημείο αυτό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του ORF4 εξαιρεί αρκετά αμινοξέα της συντηρημένης περιοχής που πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο τρόπο δράσης της πρωτεΐνης. Αυτό πιθανόν να εξηγεί την αδυναμία του CU1 και των παραγώγων του (CU1Rif2) να αναπτύσσονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης.
- 9) Με βάση τα δεδομένα της παρούσας διατριβής προτείνεται ένα θεωρητικό μοντέλο για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σύμφωνα με αυτό η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα ενός ρυθμιστικού συστήματος δύο συστατικών.

Περίληψη

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 CU1Rif2, 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, χωρίς να υπάρχει πρόβλημα οσμωρύθμισης. 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.

Από μία γονιδιακή βιβλιοθήκη του φυσικού τύπου απομονώθηκε ένα τμήμα DNA, το οποίο όταν εκφραστεί στα κύτταρα του στελέχους CU1Rif2 αναπληρώνει την ανθεκτικότητά τους σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% γλυκόζη, καθώς και την σωστή λειτουργία της πρόσληψης και της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης.

Στην παρούσα εργασία, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) βρέθηκε ότι το τμήμα αυτό το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων, τα ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4, συμμεταγράφεται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο, το οπερόνιο *glc* όπως ονομάστηκε και βρίσκεται υπό τον έλεγχο κοινού προαγωγού, του P_{glc} . Ο προαγωγός

P_{glc} βρέθηκε ότι είναι οσμωρυθμιζόμενος και αλληλεπιδρά με το προϊόν του ORF4 υποδεικνύοντας μια λειτουργία αυτορύθμισης. Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι η μεταγραφή του οπερονίου *glc* ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και μάλιστα η ρύθμιση αυτή γίνεται στο μεταγραφικό επίπεδο.

Τα τέσσερα ORFs υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) και υπερέκφράστηκαν με επιτυχία. Η ανάλυση της αλληλουχίας του ORF4 αποκάλυψε την απουσία του νουκλεοτιδίου στη θέση 2271 που ως αποτέλεσμα έχει τη δημιουργία ενός κωδικονίου τερματισμού (TAA) 15 νουκλεοτίδια καθοδικά. Με βάση την εκ νέου ανάλυση της αλληλουχίας του οπερονίου *glc*, προτείνονται 5 πιθανές περιοχές έναρξης και μία τερματισμού για το ORF4. Από τα δεδομένα της παρούσας διατριβής το φυσιολογικό ORF4 είναι το μεγαλύτερο από τα 5 προτεινόμενα, το ORF4a καθώς έχει την ικανότητα από μόνο του να αναπληρώνει την ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου στελέχους τόσο σε στερεό όσο και σε υγρό θρεπτικό μέσο 10% γλυκόζης και επιπρόσθετα αποκαθιστά και τη δραστικότητα της γλυκοκινάσης στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2.

Οι πρωτεΐνες που κωδικεύονται από τα ORF1 και ORF2 παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία καθώς και εκτεταμένες συντηρημένες περιοχές με τις πρωτεΐνες IspD και IspF αντίστοιχα, οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ισοπρενοειδών μέσω της πορείας της φωσφορικής δεοξυ-ξυλουλόζης (πορεία DOXP). Απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με επιτυχία τα προϊόντα των ORF1 και ORF2. Η πρωτεΐνη του ORF1 υπολογίστηκε στα 37 kDa και εμφανίζεται ως διμερές, ενώ η πρωτεΐνη του ORF2 υπολογίστηκε στα 120 kDa και πιθανότατα αποτελεί εξαμερές. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά για απομόνωση των εν λόγω πρωτεϊνών του *Z. mobilis* από ετερόλογο σύστημα υπερέκφρασης.

Δεν βρέθηκε ομολογία της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF3 με γνωστές πρωτεΐνες. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα φαίνεται ότι πρόκειται για μια νέα πρωτεΐνη. Αντίθετα, βρέθηκε ισχυρή ομολογία καθώς και εκτεταμένες συντηρημένες περιοχές μεταξύ της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το ORF4 και της πρωτεΐνης CinA (Competence-damaged protein). Η πρωτεΐνη CinA είναι η πρώτη που κωδικεύεται από το οπερόνιο *cin* (competence-inducible operon) και

Θεωρείται ότι απαιτείται σε κάποια φάση κατά την διάρκεια του μετασχηματισμού ορισμένων βακτηρίων όπως *S. pneumoniae*, *B. subtilis* και *D. radiodurans*.

Επετεύχθη μεταφορά του πλασμιδίου pBZIP1 στο φυσικό στέλεχος του *Z. mobilis* ATCC 10988 με χημικό μετασχηματισμό, όμως το μεταφερόμενο πλασμίδιο παρουσίασε δομική αστάθεια στο νέο ξενιστή.

Εντοπίστηκε η μετάλλαξη στο οπερόνιο *glc* στο μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2. Ένθεση χρωμοσωμικής προελεύσεως, μεγέθους 848 bp, εισήχθη στην περιοχή του ORF4. Το εύρημα αυτό πιθανόν να εξηγεί την αδυναμία του CU1 και των παραγώγων του (CU1Rif2) να αναπτύσσονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επιπρόσθετα, απομονώθηκε από το CU1Rif2 το οπερόνιο *glc* μεγέθους 5.341 bp.

Τέλος, με βάση τα δεδομένα της παρούσας διατριβής προτείνεται ένα θεωρητικό μοντέλο για την ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σύμφωνα με αυτό η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα ενός ρυθμιστικού συστήματος δύο συστατικών.

Summary

Zymomonas mobilis is a strictly fermentative gram-negative ethanologenic bacterium, which obtains its metabolic energy anaerobically via the Entner-Doudoroff pathway. *Z. mobilis* is an ideal organism for studying unclarified aspects of glycolytic flux in conjunction with sugar tolerance mechanisms.

Exponentially growing cells of *Z. mobilis* normally have a lag period up to 3 h when transferred from a 2% to a 10% glucose liquid medium. We have isolated a mutant of *Z. mobilis*, CU1Rif2, which exhibited (a) a lag period 10-20 h when transferred to 10% glucose liquid medium, not due to an osmoregulation deficiency and (b) reduced glucose uptake and glucokinase activity.

By using a wild type *Z. mobilis* genomic library we isolated a 4,5 kb fragment that complemented the phenotype of CU1Rif2. This fragment consists of four ORFs and contains -35 and -10 *Z. mobilis* promoter elements, indicating that the four ORFs are controlled by a common promoter, named P_{glc} . The putative promoter activity was verified by subcloning and subsequent expression of reporter genes. Furthermore, it was found that the P_{glc} promoter is subject to induction not specifically by increased sugar or salt concentrations, thus appearing as an osmoregulated promoter. Interestingly, it was proved that the product of ORF4 is interacting with the P_{glc} promoter, indicating a mechanism of osmoregulated expression.

RT-PCR analysis showed that the gene cluster produced a single transcript indicating the organization of an operon, named *glc* operon. Further

transcriptional analysis demonstrated that the operon expression is under the control of the concentration of glucose, hence supporting its direct involvement in the yet uncharacterized glucose tolerance mechanism of *Z. mobilis*.

The four ORFs were subcloned in the overexpression vector pET29c(+) by PCR cloning. Products of ORF1, ORF2, ORF3 and ORF4 were successfully overexpressed. The sequencing of the cloned ORF4 PCR fragment revealed the absence of a nucleotide at the position 2271 which created a stop codon 15 bases downstream. The new data slightly changed the genetic organization of the operon in the region of ORF4, as five ORF4s were predicted by the used program analysis. The five ORF4s code the same overlapping protein with identical C-terminal and alternative N-terminal region. The biggest of the five ORF4s, ORF4a, is the physiological one as it can restore all of the deficiencies of the mutant strain. Complementation experiments revealed that ORF4 alone could restore the defective phenotype of *CU1Rif2*. Furthermore, it was found that ORF4 could also restore the glucokinase activity in the mutant strain.

The products of ORF1 and ORF2 have been isolated and partially characterized. The protein encoded by ORF1 was found to be 37 kDa and likely to be organized as a dimer, whereas the protein encoded by ORF2 was rather an examer of 18,8 kDa monomers (120 kDa). ORF1 and ORF2 exhibit strong homology with IspD and IspF proteins respectively which are involved in the non-mevalonate DOXP pathway for the biosynthesis of isoprenoids. The product of ORF3 appears to be a novel protein as it showed no homology with any known sequences in all available databases; the product of ORF4 was found homologous with the CinA protein, which is part of the Competence Induced operon (*cin* operon), a protein which is thought to be specifically required at some stage in the process of transformation.

We've managed to transfer plasmid pBZIP1 in *Z. mobilis* wild type strain ATCC 10988 by chemical transformation, but the plasmid showed structural instability in the new host.



Interestingly, we discovered that the mutation of CU1Rif2 was due to an insertion of 848 bp within ORF4, which could explain its deficiency to grow on a 10% glucose medium. The *glc* operon from the mutant strain (5.341 bp) has been isolated.

Finally, we propose that the growth of *Z. mobilis* on elevated glucose concentrations takes place through a two-component regulatory system.

ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ

Βιβλιογραφία



Βιβλιογραφία

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Ait-Abdekader, N., and J. Baratti. 1995. Ethanol fermentation using a glucose negative mutant of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Techniques. 9:315-320.
5. 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.
6. 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.
7. Alloing, G., de Philip, P., and J.-P. Claverys. 1994. Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. J. Mol. Biol., 241: 44-58.

8. Alloing, G., B. Martin, C. Granadel and J.-P. Claverys. 1998. Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Molecular Microbiology*, 29: 75-83.
9. 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.
10. Arvanitis, N., A. S. Afendra, and C. Drainas. 1995. *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3 expresses mobilization functions in *Escherichia coli* JM83 and RR1. *Biotechnol. Lett.* 17:681-686.
11. 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.
12. Barbosa, M. de F.S., 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.
13. Barkovich, R. and J.C. Liao. 2001. Metabolic Engineering of Isoprenoids (Review). *Metabolic engineering* 3: 27-39
14. 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.
15. 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. 174:2816-2823.
16. 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.
17. 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.

18. Barrow, K. D., J. G. Collins, R. S. Norton, P. L. Rogers, and G. M. Smith. 1984. ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. J. Biol. Chem. 259:5711-5716.
19. 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.
20. Beletsiotis, E.A., I., Oikonomou and M.A., Typas. 2002. Isolation and characterization of the *uvrA*, *uvrB* and *uvrD* genes from the ethanol producing bacterium *Zymomonas mobilis* strain CP4. Unpublished. NCBI nucleotide data base (acc. number: AY083904).
21. Beletsiotis, E.A., K.M., Pappas and M.A. Typas. 2002. Isolation and characterization of the *recA* gene of the ethanol producing bacterium *Zymomonas mobilis* and construction of a *recA*⁻ strain. Unpublished. NCBI nucleotide data base (acc. number: AY101392).
22. Bergé, M., P. Garcia, F. Iannelli, M.F. Prère, C. Granadel, A. Polissi and J.-P. Claverys. 2001. The puzzle of *zmpB* and extensive chain formation, autolysis defect and non-translocation of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiology, 39: 1651-1660.
23. 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.
24. Bisson, L. B., and D. G. Fraenkel. 1984. Expression of kinase-dependent uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159:1013-1017.
25. Bisson, L. B. 1988. High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. J. Bacteriol. 170:4838-4845.
26. Bonacossa de Almeida, C., G. Coste, S. Sommer and A. Bailone. 2002. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. Mol. Genet. Genomics, 268: 28-41.
27. 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.

28. 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.
29. Bringer, S., H. Sahm, and W. Swyzen. 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. 14:311-319.
30. Bringer, S., R. K. Finn, and H. Sahm. 1984. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139:376-381.
31. Bringer, S., T. Hartner, K. Poralla, and H. Sahm. 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and fatty acid pattern in batch and continuous cultures. Arch. Microbiol. 140: 312-316.
32. Bringer-Meyer, S., M. Sclar, and H. Sahm. 1985. *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:134-139.
33. Bringer-Meyer, S., K. L. Schimz, and H. Sahm. 1986. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146:105-110.
34. Bringer-Meyer, S., and H. Sahm. 1987. Metabolic shifts in *Zymomonas mobilis* in response to growth conditions. FEMS Microbiol. Rev. 54:131-142.
35. Bringer-Meyer, S., and H. Sahm. 1989. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylate and malic enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:529-536.
36. Bringer-Meyer, S., and H. Sahm. 1993. Formation of acetyl-CoA in *Zymomonas mobilis* by pyruvate by a pyruvate dehydrogenase complex. Arch. Microbiol. 159:197-199.
37. 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.
38. Buchholz, S. E., M. M. Dooley, and D. E. Eveleigh. 1987. *Zymomonas*-an alcoholic enigma. Trends Biotechnol. 5:199-204.
39. Buchholz, S. E., P. O' Mullan, and D. E. Eveleigh. 1988. Growth of *Zymomonas* CP4 on mannitol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:275-281.

40. 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.
41. Buchholz, S. E., and D. E. Eveleigh. 1990. Genetic modification of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Advances 8:547-581.
42. 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.
43. Campbell, T.L. and Brown, E.D. 2002. Characterization of 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 184(20): 5609-5618
44. 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.
45. Carey, V. C., and L. O. Ingram. 1983. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. J. Bacteriol. 154:1291-1300.
46. 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.
47. 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.
48. Chalfie, M., Y., Tu, G., Euskirchen, W.W., Ward and D.C., Prasher. 1994. Green fluorescence protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.
49. Chandler, M.S. and Morrison D.A. 1987. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular cloning of *com*, a control competence locus. J. Bacteriol. 169: 2005-2011.
50. Cho, D.W., P.L. Rogers and S.F. Delaney. 1989. Construction of a shuttle cloning vector for *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 50-53

51. Chung C.T. and R.H. Miller. 1988. A rapid and convenient method for preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 3580.
52. Conolly, J.D. and Hill, R.A. 1992. *Dictionary of Terpenoids*, Chapman and Hall, New York
53. 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.
54. 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.
55. Conway, T., G. W. Sewell, and L. O. Ingram. 1987. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing and identification of a promoter region. *J. Bacteriol.* 169:5653-5662.
56. 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.
57. Conway, T., R. Fliege, D. Jones-Kilpatrick, 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.
58. Conway, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:1-28.
59. Cormack, B.P., R.H., Valdivia and S., Falkow. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173: 33-38.
60. 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.
61. 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.
62. Delgado, O. D., C. M. Abate, and F. Sineriz. 1995. Construction of an integrative shuttle for *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 132:1-26.

63. Di Marco, A. A., A. H. Romano. 1985. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environ Microbiol. 44:385-418.
64. Dobritsch, D., S. Koning, G. Schneider, and G. Lu. 1998. High resolution crystal of pyruvate decarboxylate from *Zymomonas mobilis*. J. Biol. Chem. 273:20196-20204.
65. Doelle, H. W. 1982. Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase of *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:241-246.
66. Doelle, H. W., and P. F. Greenfield. 1985. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:405-410.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Douka, E., Koukkou, A.I., Vartholomatos, G., Frillingos S., Papamichael, E. and Drainas, C. 1999. A *Zymomonas mobilis* mutant with delayed growth on high glucose concentrations. J. of Bacteriol. 181(15): 4598-4604.
71. Douka, E., Christogianni, A., Koukkou, A.I., Afendra, A. and Drainas C. 2001. Use of a green fluorescent protein as a reporter in *Zymomonas mobilis* and *Halomonas elongata*. FEMS Microbiol. Lett. 201: 221-227
72. Douka, E., Koukkou, A., Drainas, C., Grosdemange-Billiard, C. and Rohmer, M. 2001. Structural diversity of the triterpenic hydrocarbons from the bacterium *Zymomonas mobilis*: the signature of defective squalene cyclization by the squalene/hopene cyclase. FEMS Microbiol. Lett. 199: 245-51
73. 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.

74. 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.
75. 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.
76. Duvold, T. 1997. Thesis, University Louis Pasteur Strasbourg, France
77. Eddy, C.K., Smith, O.H. and Noel, K.D. 1988. Cosmid cloning of five *Zymomonas trp* genes by complementation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida trp* mutants. *J. Bacteriol.* 170: 3158-3163.
78. Eddy, C.K., Keshav, K.F., Haejung An, Utt, E.A., Mejia, J.P. and Ingram, L.O. 1991. Segmental message stabilization as a mechanism for differential expression from *Zymomonas mobilis gap* operon. *J. Bacteriol.* 173(1): 245-254.
79. Ehlert, K., J.V., Holtje and M.F., Templin. 1995. Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 761-768.
80. Eisenreich, W., M., Schwarz, A., Cartayrade, D., Arigoni, M.H., Zenk and A., Bacher. 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* 5: R221-23
81. 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.
82. 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. Nalt. Acad. Sci. USA.* 76:1648-1652.
83. Flesch, G., and M. Rohmer. 1989. Prokaryotic triterpenoids. A novel hopanoid from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.* 262:673-675.
84. Flesch, G. and Rohmer, M. 1988. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem.* 175(2):405-11.



85. Folin, O., and Ciocacteus, V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73:627-650.
86. 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.
87. 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.
88. Grinsted, J., and P. M. Bennett. 1988. Preparational electrophoresis of plasmid DNA. *Meth. Microbiol.* 21:129-142.
89. Grolle S., Bringer-Meyer S. and Sahm H. 2000. Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 131-137.
90. 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.
91. Goodman, A. E., A. T. Strzelecki, and P. L. Rogers. 1984. Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1:219-228.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:4895-4901.
96. Hardy, K. 1981. Bacterial plasmids. T. Nelson L T Ed., Hong Kong.



97. Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
98. Håvarstein, L.S., G. Coomaraswamy and D.A Morrison. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. PNAS USA, 92: 11140-11144.
99. 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.
100. Hermans, M. 1992. Ph.D. thesis. University of Dusseldorf, Dusseldorf, Federal Republic of Germany.
101. Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M.H., Bacher, A and Rohdich, F. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. PNAS USA 97(6): 2486-2490.
102. 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.
103. Himpens, S., C. Locht and P., Supply. 2000. Molecular characterization of the mycobacterial SenX3-RegX3 two-component system: evidence for autoregulation. Microbiol. 146: 3091-3098.
104. Hoch, J.A. and T.J., Silhavy (eds). 1995. "Two- component signal transduction" In American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
105. Hofer, M., and F.R. Nassar. 1987. Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Gen. Microbiol. 133:2163-2172.
106. Hoppner, T. C., and H. W. Doelle. 1983. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:152-157.
107. Hui, F.M., and Morrison, D.A. 1991. Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows *coma*, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. J. Bacteriol. 173: 372-381.

108. Ingram, 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.
109. Ingram, L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol.* February, 40-44.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. Kalnenieks, U., A. A. De Graaf, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1993. Oxidative phosphorylation in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 160:74-79.
114. 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.
115. Kanagasundaram, V., and R. K. Scopes. 1992b. Isolation and characterization of the gene encoding glucolactonase from *Zymomonas mobilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 198-200.
116. 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.
117. 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.
118. 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.

119. 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.
120. Kemp, L.E., C.S. Bond and W.N. Hunter. 2003. Structure of a tetragonal crystal form of *Escherichia coli* 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase. *Acta Cryst. D59*: 607-610.
121. Kemp, L.E., C.S. Bond and W.N. Hunter. 2002. Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for Isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *PNAS* 99: 6591-6596.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Kishida, H., T. Wada, S. Unzai, T. Kuzuyama, M. Takagi, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, J.R.H. Tame and S.-Y. Park. 2003. Structure and catalytic mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) synthase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Acta Cryst. D59* : 23-31.
126. 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.
127. 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.
128. 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.

129. Koukkou, A.-I., E. Douka, C. Drinas, 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.
130. Koutinas, A. A., M. Kanellaki, M. A. Typas, and C. Drinas. 1986. Raisin: a suitable raw material for ethanol production using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 8:517-520.
131. Kruckeberg, A. L. 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166:283-292.
- 132. 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.
133. Kuzuyama, T. 2002. Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for the biosynthesis of Isoprene Units (Review). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1619-1627.
- 134. 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.
135. Lam, C. K., P. O' Mullan, and D. E. Eveleigh. 1993. Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:305-308.
136. Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. and Croteau, R. 2000. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient pathways across genomes. *PNAS* 97: 13172-13177.
137. 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.
138. 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.
139. Lee, J. S. and Kang, H. S. 1999 Sequence analysis of a 44F11 fosmid clone of *Zymomonas mobilis*. Unpublished, NCBI nucleotide data base (acc. number: AF117351).

140. Lee, J. S. and Kang, H. S. 1999 Sequence analysis of a 42B11 fosmid clone of *Zymomonas mobilis*. Unpublished, NCBI nucleotide data base (acc. number: AF176314).
141. Lee, J. S. and Kang, H. S. 1999 Sequence analysis of a 43D2 fosmid clone of *Zymomonas mobilis*. Unpublished, NCBI nucleotide data base (acc. number: AF124757).
142. Lehmann, C., K., Lim, J., Toedt, W., Krajewski, A., Howard, E., Eisenstein and O., Herzberg. 2002. Structure of 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase from *Haemophilus influenzae*: Activation by Conformational Transition. *PROTEINS:Structure, Function and Genetics* 49: 135-138.
143. 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.
144. 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.
145. Liang, C.C. and Lee, W.C. 1998. Characteristics and transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid pKT230 by electroporation. *Biopr. Engineering* 19: 81-85
146. Lindner, P. 1928. Atlas der mikroskopischen Grundlagen der garungskunde, Tafel 68, 3rd ed. Berlin.
147. 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.
148. 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.
149. 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.



150. 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.
151. Ludeking, A., Fegert, P., Blin N. and Gott, P. 1998. Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett.* 439: 180-184.
152. Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., Gabain, A. and Baccarini, M. 1999. Growth Phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J. Bacteriol.* 181: 3433-3437.
153. Luria, S. E., and M. Delbruck. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics.* 28:491-511.
154. Ma, J.-F., P. W. Hager, M. L. Howell, P. V. Phibbs, and D. J. Hassett. 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.
155. Mackenzie, K.F., T., Conway, H.C., Aldrich and L.O. Ingram. 1989. Expression of *Zymomonas mobilis adhB* (encoding dehydrogenase II) and *adhB-lacZ* fusion in recombinant *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 171: 4577-4582.
156. Martin, B., Ruella, J.M., Angulo, J.F., Devoret, R., and Claverys, J.P. 1992. Identification of the *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.* 20: 6412.
157. 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.
158. 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 an SOS Regulon. Ferretti JJ, Gilmore MS, Klaenhammer TR, Brown F (eds): *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, 85: 293-300.
159. Masure, H.R., Pearce, B.J., Shio, H. and Spellerberg B. 1998. Membrane targeting of RecA during genetic transformation. *Mol. Microbiol.* 27: 845-852.

160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. Michel, G. F. P. 1993. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *dnaK* gene of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 175:3228-3231.
165. Millis, N. F. 1951. Some bacterial fermentations of cider. Ph.D. thesis, University of Bristol, Bristol, UK.
166. 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.
167. 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.
168. Misawa, N., and K. Nakamura. 1989. Nucleotide sequence of the 2.7 plasmid of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Biotechnol.* 12:63-70.
169. Misawa, N., and K. Nakamura. 1989. Expression and stability of a α -glucosidase gene of *Rumococcus albus* in *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* 53:723-727.
170. 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.
171. 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.

172. 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.

173. 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.

174. 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.

175. Morrison, D.A., and Baker, M. 1979. Competence for genetic transformation in pneumococcus depends on synthesis of a small set of proteins. Nature, 282: 215-217.

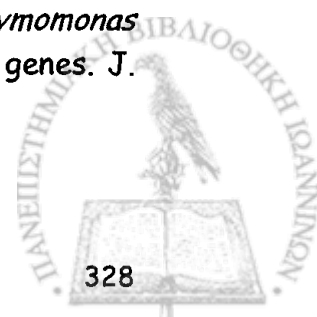
176. Mortier-Barrière, I., A. de Saizieu, J.-P. Claverys and B. Martin. 1998. Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Microbiology, 27: 159-170.

177. 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.

178. Narumi, I., K. Satoh, M. Kikuchi, T., Funayama, S. Kitayama, T. Yanagisawa, H. Watanabe and K. Yamamoto. 1999. Molecular analysis of the *Deinococcus radiodurans recA* locus and identification of a mutation site in a DNA repair-deficient mutant, *rec30*. Mut. Research, 435: 233-243.

179. 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.

180. 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.



181. 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.
182. Novak, R., E. Charpentier, J.S. Braun, E. Park, S. Murti, E. Tuomanen and R. Masure. 2000. Extracellular targeting of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* by zinc metalloprotease. *Mol. Microbiology*, 36: 366-376.
183. 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.
184. Okamoto, T., and K. Nakamura. 1992. Simple and highly efficient transformation method for *Zymomonas mobilis*: Electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:833.
185. 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.
186. Oshima T, Aiba H, Masuda Y, Kanaya S, Sugiura M, Wanner BL, Mori H, Mizuno T. 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 46:281-291.
187. Osman, Y. A., and L. O. Ingram. 1985. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bacteriol.* 164:173-180.
188. Osman, Y. A., and L. O. Ingram. 1987. *Zymomonas mobilis* mutants with an increased rate of alcohol production. *Appl. Environm. Microbiol.* 57: 1425-1432.
189. Ourisson, G., and M. Rohmer. 1992. Hopanoids. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Acc. Chem. Res.* 25: 403-407.
190. 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.
191. Panagiotidis, C.A. and Canellakis E.S. 1984. Comparison of the basic *Escherichia coli* antizyme 1 and antizyme 2 with the ribosomal proteins S20/L26 and L34. *J. Biol. Chem.* 259: 15025-15027.

192. Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1-34.
193. Pappas, K.-M., Galani, I. and Typas, M.A. 1997. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. *J. of Appl. Microbiol.* 82: 1-10.
194. 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.
195. 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.
196. 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.
197. Parkinson, J.S. & E.C., Kofoid. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26: 71-112.
198. 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.
199. Pearce, B.J., A.M. Naughton, E.A. Campbell and H.R. Masure. 1995. The *rec* locus, a competence induced operon in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 177: 86-93.
200. 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.
201. 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.
202. Pond, J. L., C. K. Eddy, K. F. Mackenzie, T. Conway, D. J. Borecky, and L. O. Ingram. 1988. Cloning, sequencing and characterization of

the principal acid phosphatase, the *phoC*⁺ product, from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 171:767-774.

203. Ponser, M., Kantorow, M. and Horwitz, J. 1999. Cloning, sequencing and differential expression of α B-crystallin in the zebrafish, *Danio rerio*. B.B.A. 1447: 271-277.

204. 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.

205. Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolopyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems in bacteria. Microbiol. Rev. 57:543-594.

206. Preziosi, L., G. P. F. Michel, J. Baratti. 1990. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*. Can. J. Microbiol. 36:159-163.

207. Preziosi, L., G. P. F. Michel, and J. Baratti. 1990. Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 153:181-186.

208. Raman, T.S., Sharma, B.V., Jayaraman, J. and Ramasarma, T. 1965. Biosynthesis of coenzyme Q in microorganisms. Arch Biochem Biophys. 110:75-84.

209. Ramasarma, T. and Ramakrishnan, T. 1961. Incorporation of [2-¹⁴C] mevalonic acid and [2-¹⁴C]acetic acid into lipids of mycobacteria. Biochem J. 81:303-8.

210. Reipen, I. G., K. Poralla, H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1995. *Zymomonas mobilis* squalene-hopene cyclase gene (*shc*): cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli*. Microbiol. 141:155-161.

211. 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.

212. Reynen, M. 1988. Construction of an expression vector for the Gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. PhD Thesis, KFA Julich GmbH.

213. Richard, S.B., J.-L. Ferrer, M.E. Bowman, A.M. Lillo, C.N. Tetzlaff, D.E. Cane and J.P. Noel. 2002. Structure and Mechanism of 2C-

Methyl-D-erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase. J. Biol. Chem. 277: 8667-8672.

214. Richard, S.B., M.E. Bowman, W. Kwiatkowski, I. Kang, C. Chow, A.M. Lillo, D.E. Cane and J.P. Noel. 2001. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthase involved in mevalonate-independent Isoprenoid biosynthesis. Nat. Struct. Biol. 8: 641-648.

215. 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.

216. Roca, A.I., and Cox, M.M. 1990. The RecA protein: structure and function. CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25: 415-456.

217. Rodriguez, M., A. G. Wedd, and R. K. Scopes. 1996. 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*: an iron-sulfurOmaganese enzyme. Biochem. Molecul. Biol. Int. 38:783-789.

218. 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.

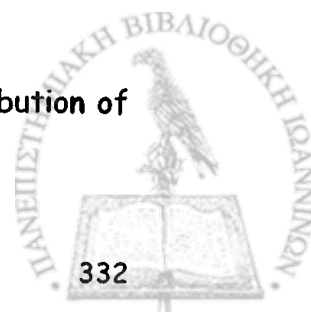
219. Rohdich F, J., Wungsintaweekul, M., Fellermeier, S., Sagner, S., Herz, K., Kis, W., Eisenreich, A., Bacher and M.H., Zenk.1999. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol PNAS 96: 11758-11763

220. Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A. and Bacher, A. 2001. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. Eur. J. Biochem. 268: 3190-3197.

221. Rohdich, F., J. Wungsintaweekul, W. Eisenreich, G. Richter, C.A. Schuhr, S. Hecht, M. H. Zenk and A. Bacher. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. PNAS 97: 6451-6456.

222. 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.

223. Rohmer, M., P. Bouvier-Nave, and G. Ourisson. 1984. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. Biochem. J. 130:1137-1150.



224. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahm, H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early Steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295: 517-524.
225. Rohmer, M. 1998. Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Progress in Drug Research*, 50: 137-154.
226. Rose, A. H., and J. S. Harrison. 1987. The yeasts. vol. 1 Biology of the yeasts. Second edition 1987. Academic press inc. (London) LTD.
227. Royt, P. W., and A. M. MacQuillan. 1976. Evidence for an inducible glucose transport system in *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 5:302-316.
228. Ruiz-Argueso, T., and Rodriguez-Navarro. 1975. Microbiology of ripening honey. *Appl. Microbiol.* 30:893-896.
229. Ruzicka, L., Eschenmoser, A. and Heusser, H. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10): 357-67.
230. 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.
231. Saliola, M., and C. Falcone. 1995. Two mitochondrial alcohol dehydrogenase activities of *Kluyvermyces lactis* are differently expressed during respiration and fermentation. *Mol. Gen. Genet.* 20:665-672.
232. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001, Third Edition. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
233. Sandermann, jr. M. 1977. β -D-galactosidase transport in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 108:507-515.
234. Schulenberg-Schell, H., B. Neuss, and H. Sahm. 1989. Quantantive determination of various hopanoids in microorganisms. *Anal. Biochem.* 181:120-124.
235. 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.

236. Scopes, R. K. 1985. 6-Phosphoglucolactonase from *Zymomonas mobilis*. An enzyme of high catalytic efficiency. FEBS Lett. 193:185-188.

237. 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.

238. Scopes, R. K., and K. Griffiths-Smith. 1986. Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glucolytic enzymes. Biothechnol. Lett. 164:653-656.

239. 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.

240. Scopes, R. K. 1997. Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucose-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpyruvate. 1997. Biochem. J. 326:731-735.

241. Scordaki, A., and C. Drainas. 1987. Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. J. Gen. Microbiol. 133:2547-2556.

242. Scordaki, A., and C. Drainas. 1990. Analysis of plasmid pZMO3 of *Zymomonas mobilis*. Plasmid. 23:59-66.

243. 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.

244. Seo, J., H., Park, H., Kim, K., Wang, K., Yoon, H., Rhee, J., Kang, C., Jung, M., Kim, C., Park, Y., An and E., Choi. 2001. *Zymomonas mobilis* strain ZM4 plasmid 1, complete sequence. Unpublished. NCBI nucleotide data base (acc. number: AY057845).

245. 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.

246. Shark, K.B. and Conway, T. 1992. Cloning and molecular characterization of the DNA ligase gene (*lig*) from *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 75: 19-26



247. 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.
248. Sieg, S., Smith, D., Yildirim, Z. and Kaplan, D. 1997. Fas ligand deficiency in HIV disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5860-5865.
249. Skotnicki, M. L., D. E. Tribe, P. L. Rogers. 1980. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. Appl. Environm. Microbiol. 40:7-12.
250. Skotnicki, M. L., A. E. Goodman, R. G. Warr, P. L. Rogers. 1984. Isolation and characterization of *Zymomonas mobilis* plasmids. Microbios. 40:53-61.
251. 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.
252. 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.
253. Snoep, J. L., N. Arfman, L. P. Yomano, H. V. Westerhoff, T. Conway, and L. O. Ingram. 1996. Control of glycolytic flux in *Zymomonas mobilis* by gene glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. Biotechnol. Bioeng. 51:190-197.
254. Soncini, F.C., E.G., Vesconi and E.A., Groisman. 1995. Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* *phoPQ* operon. J. Bacteriol. 177: 4364-4371.
255. Song, K. B., Joo, H. K. and Rhee, S. K. 1993. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). Biochim. Biophys. Acta. 1173:320-324.
256. Song, K. B., Lee, S.K., Joo, H. K. and Rhee, S. K. 1994. Nucleotide and derived amino acid sequences of an extracellular sucrase gene (*invB*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). Biochim. Biophys. Acta. 1219: 163-166.
257. Song, K. B., Seo, J.W. and Rhee, S. K. 1999. Transcriptional analysis of *levU* operon encoding saccharolytic enzymes and two apparent genes involved in amino acid biosynthesis in *Zymomonas mobilis*. Gene. 232: 107-114.

258. Spaink, H.P., R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol. Biol.* 9: 27-39
259. Sprenger, G. A., M. A. Typas, and C. Drinas. 1993. Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. *Wrd. J. Microbiol. Biothechn.* 9:17-24.
260. 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.
261. Sprenger, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic pathway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:301-307.
262. 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.
263. Steinbacher, S., J. Kaiser, J. Wungsintaweeikul, S. Hecht, W. Eisenreich, S. Gerhardt, A. Bacher and F. Rohdich. 2002. Structure of 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate Synthase Involved in Mevalonate-independent Biosynthesis of Isoprenoids. *J. Mol. Biol.* 316: 79-88.
264. 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.
265. Stock, J.B., A.J., Ninfa and Stock, A.M. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53: 450-490.
266. Strohdeicher, M., Schmitz, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1988. Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:378-382.
267. 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.
268. 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.

269. 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.

270. 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.

271. Strzelecki, A. T., A. E. Goodman, and P. L. Rogers. 1987. Behavior of the IncW plasmid Sa in *Zymomonas mobilis*. Plasmid. 18:46-53.

272. Su, P., and A. E. Goodman. 1987. High frequency transformation of *Zymomonas mobilis* by plasmid DNA, J. Biotechnol. 6:247-258.

273. Su P., S. F., Delaney, and P. L. Rogers. 1988. Kinetics of plasmid transformation of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 8:317-320.

274. 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.

275. 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.

276. 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.

277. Swings, J., and J. De Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 41:1-46.

278. Takahashi, S., T., Kuzuyama, H., Watanabe and H., Seto. 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. PNAS, 95: 9879-9884.

279. Tonomura, K., N. Kurose, S. Konishi and H. Kawasaki. 1982. Occurrence of plasmids in *Zymomonas mobilis*. Agr. Biol. Chem. 46:2851-2853.



280. Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui, and H. Yanase. 1986. Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**:805-808.
281. 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.
282. 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.
283. Typas, M.A. and I., Galani. 1992. Chemical and UV mutagenesis in *Zymomonas mobilis*. *Genetica*, **87**: 37-45.
284. Uhlenbusch, I., H. Sahm, 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.
285. 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.
286. 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.
287. Veau, B., M., Courtois, A., Oudin, J.C., Chenieux, M., Rideau and M., Clastre. 2000. Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochim Biophys Acta.* **1517**:159-63.
288. Viikari, L. 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**:252-255.
289. Viikari, L. 1984. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**:118-123.
290. Viikari, L., and M. Korhola. 1986. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**:471-476.
291. Wallach, O. 1887. *Justus Liebigs Ann. Chem.*

292. 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.
293. Wecker, M. S. A., and R. R. Zall. 1987. Production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 53:2815-2820.
294. Weigert, T., H. Sahm, and G. A. Sprenger. 1996. Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 166:32-41.
295. Weigert, T., H. Sahm, 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.
296. 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.
297. 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.
298. 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.
299. 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.
300. 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.
301. 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.

302. Yanase, H., M. Yasui, T. Miyasaki, and K. Tonomura. 1985. Fusion of spheroplasts and genetic recombination of *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 49:133-140.
303. Yanase, H., T. Kotani, and K. Tonomura. 1986. Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. Agric. Biol. Chem. 50:3139-3144.
304. Yanase, H., J. Kurii, and K. Tonomura. 1988. Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a lac⁺ recombinant plasmid. J. Ferment. Technol. 66: 409-415.
305. 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.
306. Yanase, H., T. Kotani, M. Yasuda, A. Matsuzawa, and K. Tonomura. 1991. Metabolism of galactose in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:364-368.
307. 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.
308. Yasbin, R.E., Cheo, D.L., and Bayles, K.W. 1992. Inducible DNA repair and differentiation in *Bacillus subtilis*: interactions between global regulons. Mol. Microbiol. 6: 1263-1270.
309. 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.
310. 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.
311. 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.
312. 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.

313. Zagorec, M., and P. W. Postma. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 234:325-328.
314. 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.
315. 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.
316. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία. 1992. "Μεταφορά και Έκφραση Πλασμιδιακού DNA στο Αιθανολοπαραγωγό Βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Μελέτη του συστήματος μετασχηματισμού". Διδακτορική Διατριβή.
317. Δούκα Ευγενία. 1999. "Ανθεκτικότητα του Βακτηρίου *Zymomonas mobilis* σε Αυξημένες Συγκεντρώσεις Γλυκόζης: Βιοχημικός και Γενετικός Χαρακτηρισμός". Διδακτορική Διατριβή
318. Τέγος Γεώργιος. 2000. "Ετερόλογος Έκφραση του Γονιδίου Παγοπυρήνωσης *ipaZ* σε Μέτρια Αλόφιλα Βακτήρια και Χρήση του ως Συστήματος Αναφοράς". Διδακτορική Διατριβή.
319. Ευθυμία Λιόλιου. 2003. "Ρύθμιση της Βιοσύνθεσης των Πολυαμινών και Μεταβολικός Έλεγχος του Συστήματος Μεταφοράς Σήματος Δύο Συστατικών". Διδακτορική Διατριβή.