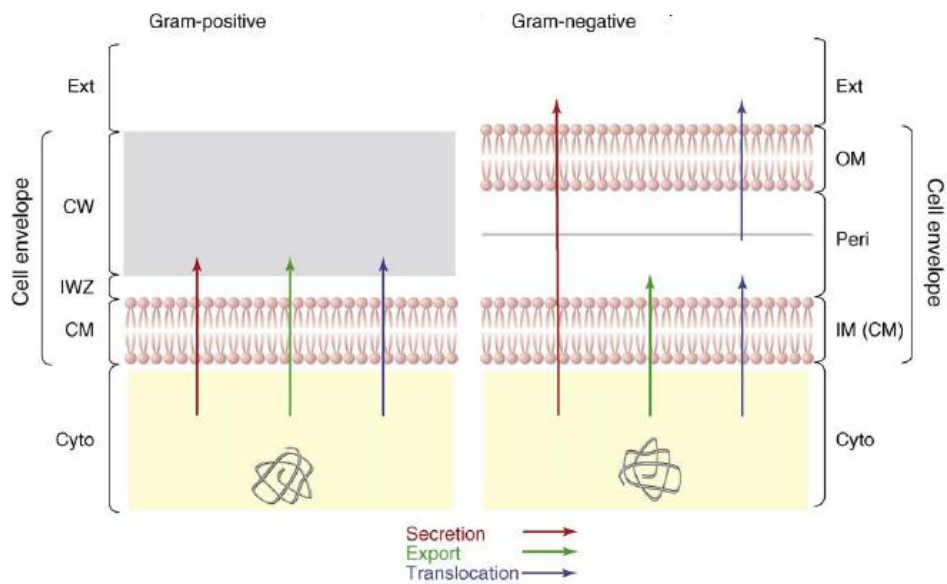


« Εκκρινόμενες πρωτεΐνες βακτηρίων του γένους *Azotobacter* »



Ερευνητική μελέτη στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ερευνητική μελέτη στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης

Πενταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων: Ι. Χατζηπαυλίδης (Λέκτορας)
Μέλος: Π. Κατινάκης (Καθηγητής)
Μέλος: Δ. Γεωργακόπουλος (Επικ. Καθηγητής)
Μέλος: Δ. Μηλιώνη (Επικ. Καθηγήτρια)
Μέλος: Α. Ταμπακάκη (Λέκτορας)

Αθήνα 2010

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και κατά την διεξαγωγή και συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, τον Λέκτορα κ. Ι. Χατζηπαυλίδη που μου εμπιστεύτηκε το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής και για την πολύτιμη συνεργασία του όλο αυτό το διάστημα, καθώς επίσης και τον Καθηγητή κ. Π. Κατινάκη, για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω, την Λέκτορα κ. Α. Ταμπακάκη, που χάρη στο υψηλό γνωστικό της επίπεδο, συνέβαλλε ουσιαστικά στην διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Γεωργακόπουλο και Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Δ. Μηλιώνη, για τη συμμετοχή τους στην πενταμελή επιτροπή και για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση της μεταπτυχιακής διατριβής

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά, τα μέλη του εργαστηρίου γενικής και γεωργικής μικροβιολογίας κ.κ. Κ. Παπαμελετίου και Η. Κεφαλλογιάννη, καθώς επίσης και τα μέλη του εργαστηρίου βιοχημείας κ.κ. Ε. Βεζύρη και Μ. Δήμου, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη, τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου γενικής και γεωργικής μικροβιολογίας Γ. Κρεμμύδα, για την βοήθεια που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές του, όλο αυτό το διάστημα που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο γενικής και γεωργικής μικροβιολογίας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον άνθρωπο που βοήθησε τα μέγιστα στην παρούσα διατριβή, τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου γενικής και γεωργικής μικροβιολογίας Χ. Φωτιάδη, χωρίς την πολύτιμη συμβολή του οποίου, η παρούσα εργασία δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί. Οι συμβουλές και οι γνώσεις του ήταν καθοριστικές. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για όλο όσα έκανε για μένα, καθώς και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και του εύχομαι κάθε επιτυχία.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Abstract.....	3
Εισαγωγή.....	5
1.1 Εκκρινόμενες πρωτεΐνες και τελική υποκυτταρική τοποθέτηση.....	6
1.2 Βακτηριακά πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα.....	11
1.2.1 Μονοπάτια γενικής έκκρισης (Sec) και δυο-αργινινών (Tat).....	17
1.2.2 Εκκριτικό σύστημα τύπου I.....	19
1.2.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου II.....	21
1.2.4 Εκκριτικό σύστημα τύπου III.....	22
1.2.5 Εκκριτικό σύστημα τύπου IV.....	24
1.2.6 Εκκριτικό σύστημα τύπου V.....	25
1.2.7 Εκκριτικό σύστημα τύπου VI.....	26
1.2.8 Εκκριτικό σύστημα τύπου VII.....	28
2 Βιοπληροφορική.....	29
2.1 Γενικά.....	30
2.2 Πεπτίδιο οδηγός και εργαλεία βιοπληροφορικής.....	33
3 Αζωτοδέσμευση και <i>Azotobacter vinelandii</i>	34
3.1 Η αζωτοδέσμευση.....	35
3.2 Βιολογική αζωτοδέσμευση και μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης.....	36
3.3 Το γένος <i>Azotobacter</i>	39
3.4 Χρήση των βακτηρίων του γένους <i>Azotobacter</i> στη γεωργία.....	40
3.5 <i>Azotobacter vinelandii</i> στέλεχος	44
3.6 Γενετικά χαρακτηριστικά.....	46
3.7 Βιολογική αζωτοδέσμευση και <i>Azotobacter vinelandii</i>	48
3.8 Η κινητική της αύξησης του <i>Azotobacter Vinelandii</i>	49
3.8.1 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών.....	49
3.8.2 Η καμπύλη ανάπτυξης.....	49
3.8.3 Τα μαθηματικά της ανάπτυξης.....	52
Σκοπός Μελέτης.....	53
4 Υλικά και Μέθοδοι.....	54
4.1 Το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο <i>Azotobacter vinelandii</i>	55

4.2	Εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας.....	56
4.3	Μέτρηση μικροοργανισμών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων στην επιφάνεια ή τη μάζα στερεού υποστρώματος όταν το δείγμα έχει υψηλή συγκέντρωση κυττάρων.....	56
4.4	Μέτρηση μικροοργανισμών με τη μέθοδο της απορρόφησης ακτινοβολίας.....	59
4.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεσαία κλίμακα.....	59
4.6	Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από <i>E.coli</i> με αλκαλική λύση	60
4.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	60
4.8	Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού.....	62
4.9	Ηλεκτροφόρηση DNA.....	62
4.10	Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτική αгарόζης.....	63
4.11	Αντίδραση λιγάσης.....	63
4.12	Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων.....	63
4.13	Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων.....	64
4.14	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων.....	64
4.15	Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση.....	65
4.16	Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	65
4.17	Απομόνωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο των υπέρηχων.....	65
4.18	Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης κατά Laemmli.....	66
4.19	Χρώση με μπλε του Coomassie.....	67
4.20	Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a (+).....	68
5	Αποτελέσματα.....	69
5.1	Αζωτοδεσμευτική ικανότητα και κινητική της αύξησης του <i>Azotobacter Vinelandii</i>	70
5.2	Έκκριση πρωτεϊνών του <i>Azotobacter vinelandii</i>	72
5.3	Πρωτεΐνη Avin_12170.....	90
5.4	Επαγωγή πρωτεΐνης.....	94
	Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	97
	Παραρτήματα.....	102
I)	PhoD-U (NcoI) και PhoD-L (HindIII).....	103
II)	Pet28a.....	106
III)	Κινητική της αύξησης του <i>Azotobacter Vinelandii</i>	107
	Βιβλιογραφία.....	110

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.	Πρωτεϊνική μεταφορά, εξαγωγή και έκκριση στα βακτήρια.....	7
Εικόνα 2.	Σχηματική αναπαράσταση των τελικών υποκυτταρικών τοποθετήσεων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα μονοδερμή (Gram-θετικά) βακτήρια, συσχετιζόμενες με τα συστήματα μεταφοράς που μετέχουν στη διαδικασία ...	9
Εικόνα 3.	Σχηματική αναπαράσταση των τελικών υποκυτταρικών τοποθετήσεων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα διδερμή (Gram-αρνητικά) βακτήρια, συσχετιζόμενες με τα συστήματα μεταφοράς που μετέχουν στη διαδικασία .	10
Εικόνα 4.	Τα γνωστά βακτηριακά εκκριτικά συστήματα.....	12
Εικόνα 5.	Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της νιτρογενάσης κατά την πραγματοποίηση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης	37
Εικόνα 6.	Απεικόνιση βλαστικών κυττάρων του στελέχους <i>Azotobacter vinelandii</i>	44
Εικόνα 7.	Απεικόνιση κυττάρων του <i>Azotobacter vinelandii</i> με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία διακρίνονται τα μαστίγια που φέρει	44
Εικόνα 8.	Απεικόνιση κύστης του <i>Azotobacter</i> με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.....	45
Εικόνα 9.	Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	50
Εικόνα 10.	Σχηματική παράσταση της τεχνικής των διαδοχικών αραιώσεων.....	57
Εικόνα 11.	Κινητική αύξηση του βακτηρίου αναπτυσσόμενο σε θρεπτικό Rennie χωρίς προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου σε αυτό (R).....	70
Εικόνα 12.	Κινητική αύξηση του βακτηρίου αναπτυσσόμενο σε θρεπτικό Rennie με προσθήκη πηγής αζώτου σε αυτό (R).....	71
Εικόνα 13.	Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR του γενωματικού DNA του <i>Azotobacter vinelandii</i>	94
Εικόνα 14.	Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w/v των προϊόντων της διαγνωστικής PCR	95
Εικόνα 15.	Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w/v του κλώνου 2.....	95
Εικόνα 16.	Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 20%, της πρωτεϊνης, των μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pET28a (+), κυττάρων <i>E.coli</i> BL21.....	96
Εικόνα 17.	Γραφική παράσταση η οποία συνδέει τον λογάριθμο του μέσου όρου των αριθμών των κυττάρων του βακτηρίου σε θρεπτικό R (άξονας Y) με την οπτική πυκνότητα (άξονας X).	108
Εικόνα 18.	Γραφική παράσταση η οποία συνδέει τον λογάριθμο του μέσου όρου των αριθμών των κυττάρων του βακτηρίου σε θρεπτικό N (άξονας Y) με την οπτική πυκνότητα (άξονας X).....	108

Πίνακες

- Πίνακας 1.** Πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από BLAST του NCBI, οι οποίες περιέχουν ένα ή περισσότερα από τα συγκεκριμένα μοτίβα72
- Πίνακας 2.** Ανάλυση πρωτεϊνών που προέκυψαν μετά από BLAST.....79
- Πίνακας 3.** Πρωτεΐνες που σύμφωνα με το SignalP 3.0 και το TATFIND περιέχουν πιθανόν Tat πεπτιδίο οδηγό. (Με κίτρινο είναι οι πρωτεΐνες που δεν συμφωνούν με το TaP 1.0 και/ή το img).....89
- Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά της επιλεγόμενης πρωτεΐνης.....90
- Πίνακας 5.** Αριθμός κυττάρων τριών διαφορετικών καλλιεργειών του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* σε θρεπτικό Rennie χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ο μέσος όρος και ο λογάριθμος του μέσου όρου αυτών και οι αντίστοιχες τιμές μέτρησης της οπτικής πυκνότητας τους.....107
- Πίνακας 6.** Αριθμός κυττάρων τριών διαφορετικών καλλιεργειών του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* σε θρεπτικό Rennie με προσθήκη πηγής αζώτου με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ο μέσος όρος και ο λογάριθμος του μέσου όρου αυτών και οι αντίστοιχες τιμές μέτρησης της οπτικής πυκνότητας τους.....107
- Πίνακας 7.** Αποτελέσματα μετρήσεων οπτικής πυκνότητας109
- Πίνακας 8.** Αποτελέσματα εξισώσεων κινητικής αύξησης του βακτηρίου για R και N αντίστοιχα.....109

Περίληψη

Ιστορικά, η πρωτεϊνική έκκριση έχει ερευνηθεί πιο διεξοδικά στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Μέχρι τώρα, έχουν ανακαλυφθεί έξι μεγάλα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα και έχουν χαρακτηριστεί, ως εκκριτικό σύστημα τύπου I (T1SS), τύπου II (T2SS), τύπου III (T3SS), τύπου IV (T4SS), τύπου V (T5SS) και τύπου VI (T6SS) αντίστοιχα. Τα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα, χαρακτηριζόμενα μέχρι σήμερα στα Gram-θετικά βακτήρια, περιλαμβάνουν τα μονοπάτια Sec, Tat, FEA, FPE, holing και Wss. Μερικά από αυτά τα συστήματα, υπάρχουν ήδη στα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως για παράδειγμα το Sec, τα οποία διευκολύνουν την εξαγωγή των πρωτεϊνών στο περιπλασματικό χώρο. Έτσι, παρόλο που αυτά τα συστήματα επιτρέπουν την έκκριση πρωτεϊνών στα Gram-θετικά βακτήρια, δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα εκκριτικά συστήματα στα Gram-αρνητικά βακτήρια.

Και για τους δυο τύπους βακτηρίων, όταν μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη μεταφερθεί κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, τότε αυτή, μπορεί να παραμείνει προσκολλημένη στην μεμβράνη, να συνδεθεί ομοιοπολικά ή μη με στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram-θετικά βακτήρια ή με στοιχεία της εξωτερικής μεμβράνης στα Gram-αρνητικά βακτήρια, να δημιουργήσει μακρομοριακές δομές (μαστίγια και τριχίδια) στην κυτταρική επιφάνεια, να εισχωρήσει μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή, ή να απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο.

Στα Gram-θετικά βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες συνήθως μεταφέρονται κατά μήκος της μεμβράνης από το Sec μονοπάτι ή το μονοπάτι δυο-αργινινών (Tat). Όμως, σε ορισμένα είδη Gram-θετικών βακτηρίων, όπως στα μυκοβακτήρια, τα οποία έχουν ένα υδροφοβικό σχεδόν αδιαπέραστο κυτταρικό τοίχωμα, καλούμενο μυκομεμβράνη, ένα εξειδικευμένο εκκριτικό σύστημα τύπου VII, μεταφέρει τις πρωτεΐνες κατά μήκος και της μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος.

Ο μηχανισμός του Sec μονοπατιού, αναγνωρίζει στις πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση μια υδροφοβική N-τελική σηματοδοτική αλληλουχία και μεταφέρει τις πρωτεΐνες σε μια ανοικτή κατάσταση (μη διπλωμένη), χρησιμοποιώντας υδρόλυση του ATP και μια διαβάθμιση πρωτονίου για ενέργεια.

Το μονοπάτι μεταφοράς Tat, έχει να κάνει με την μεταφορά πρωτεϊνών σε διπλωμένη κατάσταση, κατά μήκος των μεμβρανών στα αρχαία και βακτήρια. Η μεταφορά κατά μήκος των μεμβρανών, ξεκινάει από την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου οδηγού με τον Tat μηχανισμό. Η άμινο-τελική (N-) περιοχή εμπεριέχει το

Tat αποδεκτό μοτίβο (S/T)RRXFLK, το οποίο περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό δυο αργινινών διπεπτίδιο.

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν τα πιθανά Tat πεπτίδια οδηγούς του *Azotobacter vinelandii*. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια της βιοπληροφορικής, ανιχνεύθηκαν όλες οι πρωτεΐνες του *Azotobacter vinelandii* AvOP, οι οποίες παρουσιάζουν κάποιο από τα συγκεκριμένα Tat μοτίβα και στην συνέχεια αναλύθηκαν οι αλληλουχίες τους για την ύπαρξη πιθανόν πεπτιδίου οδηγού. Τέλος επιλέχθηκε μια από αυτές και πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αναλύσεις, βιοπληροφορικά και πειραματικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του SignalP, το γωνιδίωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP, κωδικοποιεί 53 πρωτεΐνες που πιθανόν περιέχουν Tat πεπτίδιο οδηγό. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σχεδόν διπλάσιες στον αριθμό, από αυτές που ανιχνεύτηκαν στο *Escherichia coli*, στο οποίο βρέθηκαν 29 πρωτεΐνες που πιθανόν έχουν Tat πεπτίδιο οδηγό. Από τις 53 αυτές πρωτεΐνες, μονό 22 συμφωνούν με τα στοιχεία των υπόλοιπων εργαλείων βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν.

Τέλος, επιλέχθηκε μια πρωτεΐνη, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εργαλείων βιοπληροφορικής, πιθανόν να έχει Tat πεπτίδιο οδηγό και αναλύθηκε πιο διεξοδικά.

Abstract

Historically, protein secretion has been more thoroughly investigated in Gram-negative bacteria. So far, six major protein secretion systems have been discovered and named as type I (T1SS), type II (T2SS), type III (T3SS), type IV (T4SS), type V (T5SS) and type VI (T6SS) respectively. The protein secretion systems characterized to date in Gram-positive bacteria include the Sec, Tat, FEA, FPE, holin and Wss pathways. Some of these systems, also exist in Gram-negative bacteria, such as Sec, where they mediate export of proteins into the periplasm.. Thus, although these systems permit protein secretion in Gram-positive bacteria, they cannot be considered as reliable secretion systems in Gram-negative bacteria.

For both types of bacteria, once a secreted protein translocates across the outer membrane, then it can remain anchored to the membrane, associate covalently or non-covalently with cell-wall components in Gram-positive bacteria or with outer membrane components in Gram-negative bacteria, assemble into macromolecular structures on the cell surface (e.g. flagella and pili), be injected into a host cell, or be released in the extracellular area.

In Gram-positive bacteria, secreted proteins are commonly translocated across the single membrane by the Sec pathway or the two-arginine (Tat) pathway. However, in some types of Gram-positive bacteria such as mycobacteria that have a hydrophobic, nearly impermeable cell wall, called mycomembrane, a specialized type VII secretion system translocates proteins across both the membrane and the cell wall.

The machinery of the Sec pathway, recognizes on proteins destined for secretion, a hydrophobic N-terminal leader sequence and translocates them in an unfolded state, using ATP hydrolysis and a proton gradient for energy.

The Tat pathway, transports folded proteins across membranes in archaea and bacteria. Translocation across the membrane is initiated by the interaction of the signal peptide with the Tat machinery. The amino-terminal (N-) region contains the Tat consensus motif (S/T)RRXFLK, which includes the signature twin arginine dipeptide.

In this study we analyze the putative signal peptides of *Azotobacter vinelandii*. Using bioinformatic tools, we detect all the proteins of *Azotobacter vinelandii* AvOP, which seems to have a specific Tat motif and then analyze their sequences for putative signal peptide. In the end, we chose one and we analyzes it furthermore.

According to the SignalP results, *Azotobacter vinelandii* AvOP genome encodes 53 putative Tat signal peptide proteins. Those proteins, are almost double in number of those found in *Escherichia coli*, which are 29. Of those 53 proteins only 22 are in agreement with the other bioinformatics tools we used.

In the end, we chose a protein, which according to bioinformatic tools is a putative Tat signal peptide protein and we analyzed it even more.

Εισαγωγή

Τα βακτήρια, σχηματίζουν ένα μεγάλο εύρος βιοτικών σχέσεων, με πολλούς ξενιστές, που κυμαίνεται από βιοφίλμ έως συμβιωτικές ή παθογόνες σχέσεις. Η πρωτεϊνική έκκριση, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση όλων αυτών των αλληλεπιδράσεων. Εξαιτίας της γρήγορης συσσώρευσης των βακτηριακών γωνιδιωματικών αλληλουχιών, οι γνώσεις πάνω στα βακτηριακά πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα έχουν διευρυνθεί (Tseng et. al., 2009). Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπου η έκκριση έχει να κάνει με μεταφορά κατά μήκος της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, υπάρχουν πλέον έξι γνωστές γενικές κατηγορίες των πρωτεϊνικών εκκριτικών συστημάτων, κάθε μια από τις οποίες παρουσιάζει αξιόλογη ποικιλομορφία (Tseng et. al., 2009).

Τα Gram-θετικά βακτήρια, “μοιράζονται” μερικά από τα ίδια εκκριτικά συστήματα των Gram-αρνητικών βακτηρίων και επίσης, υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο σύστημα, το σύστημα τύπου VII (Tseng et. al., 2009). Πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από παθογόνα και άλλους συμβιωτές, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, να επηρεάζουν την φυσιολογία του και να προάγουν τον αποικισμό (τοξίνες και πρωτεΐνες-τελεστές). Πολλά εξειδικευμένα εκκριτικά συστήματα έχουν εξελιχθεί στα Gram-αρνητικά βακτήρια για να διευκολύνουν αυτήν την διαδικασία, ενώ σε πολλά ενδοκυττάρια βακτήρια, τα οποία στερούνται εξωτερικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος (πχ. mollicutes) και τα Gram-θετικά βακτήρια *Listeria monocytogenes* και *Rhodococcus equi*, η έκκριση επιτυγχάνεται απλά, μέσω γενικών εκκριτικών μονοπατιών (Tseng et. al., 2009).

Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, για παράδειγμα διασπώμενα ένζυμα στα σαπροφυτικά βακτήρια ή μολυσματικοί παράγοντες στα παθογόνα βακτήρια (Henderson et. al., 2004), είναι τα κύρια εργαλεία τα οποία χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να αλληλεπιδράσουν με το περιβάλλον τους. Λόγω αυτών των λειτουργικών ρόλων, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες προσφέρουν φαρμακευτικά οφέλη και πιθανώς να έχουν εμπορική αξία (Desvaux et. al., 2009). Στο παρελθόν, θέματα ονοματολογίας, είχαν σαν αποτέλεσμα την σύγχυση, στο πεδίο των εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών. Σαν παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν, η χρήση του όρου “τύπος IV εκκριτικό σύστημα” (T4ASS) για να χαρακτηριστούν δυο εντελώς διαφορετικά συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών (Henderson et. al., 2000), η σύγχυση που προκαλείτο μεταξύ του γενικού εκκριτικού μονοπατιού (GSP) και του τύπου II

εκκριτικού συστήματος (T2SS) (Desvaux et. al., 2004b), καθώς επίσης και η χρήση του “τύπου III εκκριτικού συστήματος” (T3SS) στα Gram-Θετικά βακτήρια όσον αφορά στην μεταφορά πρωτεϊνών μέσω κυτταρόλυσης (Desvaux et. al., 2006; Economidou et. al., 2006).

Είναι επίσης ξεκάθαρο ότι, τα προηγούμενα χρόνια, όσον αφορά τις πρωτεΐνες, ο όρος “εκκρινόμενη”, προκάλεσε σύγχυση στην επιστημονική βιβλιογραφία (Desvaux et. al., 2009). Γι αυτό είναι σημαντικό, να τονιστούν και να υπενθυμιστούν μερικοί βασικοί ορισμοί οι οποίοι σχετίζονται με την έκκριση, τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και τη δομή του βακτηριακού κυτταρικού φακέλου, με αναφορές στις πρόσφατες εξελίξεις στον γρήγορα αναπτυσσόμενο τομέα των συστημάτων έκκρισης των βακτηριακών πρωτεϊνών.

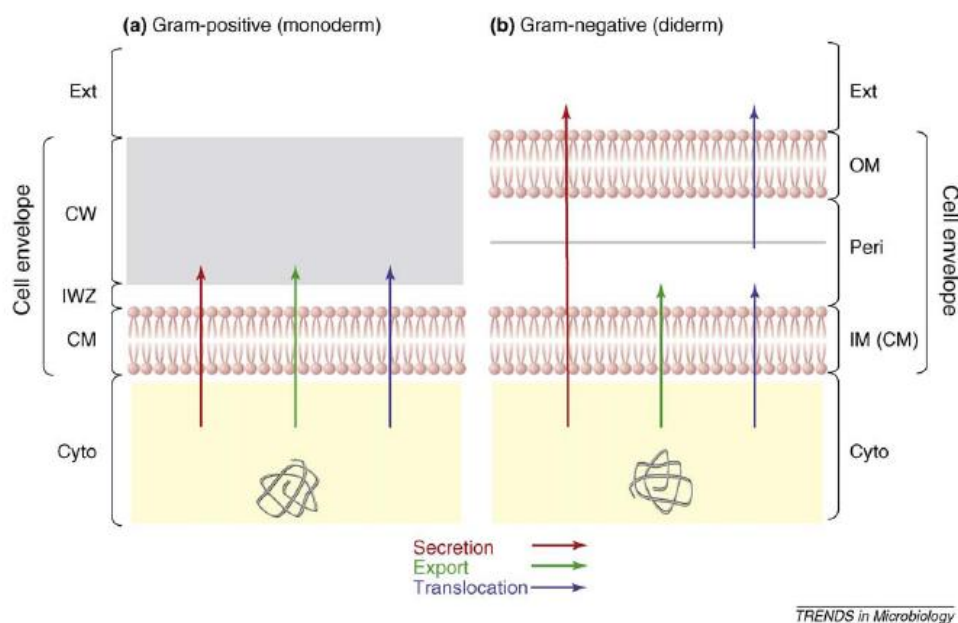
1.1. Εκκρινόμενες πρωτεΐνες και τελική υποκυτταρική τοποθέτηση

Όσον αφορά το πεδίο της μεταφοράς πρωτεϊνών, ο όρος «μεταφορά» γενικά αναφέρεται στην κίνηση μιας πρωτεΐνης κατά μήκος μιας λιπιδιακής στοιβάδας (Desvaux et. al., 2009). Σε αντίθεση, η «πρωτεϊνική έκκριση», αναφέρεται συγκεκριμένα, στην ενεργό μεταφορά μιας πρωτεΐνης, από ένα εσωτερικό τμήμα του κυττάρου, στον εξωκυττάριο χώρο (Desvaux et. al., 2009). Συνέπεια αυτής της ενεργούς διαδικασίας είναι ότι, η εκκρινόμενη πρωτεΐνη βρίσκεται ολοκληρωτικά έξω από την εξωτερική λιπιδιακή στοιβάδα και μπορεί να είναι διαλυτή, προσκολλημένη στην επιφάνεια ή τμήμα υποομάδας μιας επιφανειακής απόφυσης (Desvaux et. al., 2006a).

Για να μπορέσει κανείς να συσχετίσει αυτούς τους όρους, πρέπει να εκτιμήσει την βασική δομή του βακτηριακού κυττάρου και πιο συγκεκριμένα, την οργάνωση των βιολογικών μεμβρανών. Όσον αφορά την πρωτεϊνική μεταφορά, οι όροι «μονοδερμή βακτήρια» (μια λιπιδιακή στοιβάδα) και «διδερμή βακτήρια» (δυο λιπιδιακές στοιβάδες) είναι περισσότερο κατάλληλοι και λιγότερο διαφορούμενοι από τους ισοδύναμους όρους «Gram-Θετικά βακτήρια» και «Gram-Αρνητικά βακτήρια» αντίστοιχα (Desvaux et. al., 2006b; Desvaux and Hébraud, 2008).

Το ουσιώδες και παγκοσμίως διανεμημένο «Sec Translocon» είναι μια ιδανική περίπτωση μελέτης, για να διευκρινιστούν οι διαφορές μεταξύ της εξαγωγής και της έκκρισης πρωτεϊνών στα μονοδερμή και διδερμή βακτήρια (Desvaux et. al., 2009).

Στα μονοδερμή βακτήρια, το σύστημα Sec μπορεί να μεταφέρει μια πρωτεΐνη στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου και έτσι αποτελεί, έναν αξιόπιστο πρωτεϊνικό εκκριτικό μηχανισμό μεταξύ αυτών των οργανισμών (Εικόνα 1). Αντίθετα, στα διδερμή βακτήρια, το Sec Translocon από μόνο του δεν μπορεί να μεταφέρει μια πρωτεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο και αντί αυτού, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται στην περιπλαστική περιοχή μεταξύ της κυτοπλασματικής μεμβράνης και της εξωτερικής μεμβράνης. Στα διδερμή βακτήρια, αυτό το γεγονός αντιστοιχεί στην εξαγωγή (πχ. ενεργή μεταφορά από τον κυτοπλασματικό χώρο) ενώ στα μονοδερμή, η εξαγωγή είναι συνώνυμο με την έκκριση (Desvaux et. al., 2009).



Εικόνα 1. Πρωτεϊνική μεταφορά, εξαγωγή και έκκριση στα βακτήρια. (a) Gram-θετικά (μονοδερμή) βακτήρια. (b) Gram-αρνητικά (διδερμή) βακτήρια. Συντομογραφίες: Ext, εξωκυτταρικός χώρος; CW, κυτταρικό τοίχωμα; IWZ, εσωτερική κυτταρική ζώνη; CM, κυτοπλασματική μεμβράνη; Cyto, κυτοπλασματικός χώρος; OM, εξωτερική μεμβράνη; Peri, περιπλασματικός χώρος; IM, εσωτερική μεμβράνη.

Για να επιτευχθεί η έκκριση των πρωτεϊνών στόχων στα διδερμή βακτήρια, το Sec Translocon, απαιτεί και την βοήθεια επιπλέον πρωτεϊνικών συστημάτων, όπως το T2SS ή το εκκριτικό σύστημα τύπου V (T5SS) ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής στοιβάδας (Εικόνα 3) (Desvaux et. al., 2004b).

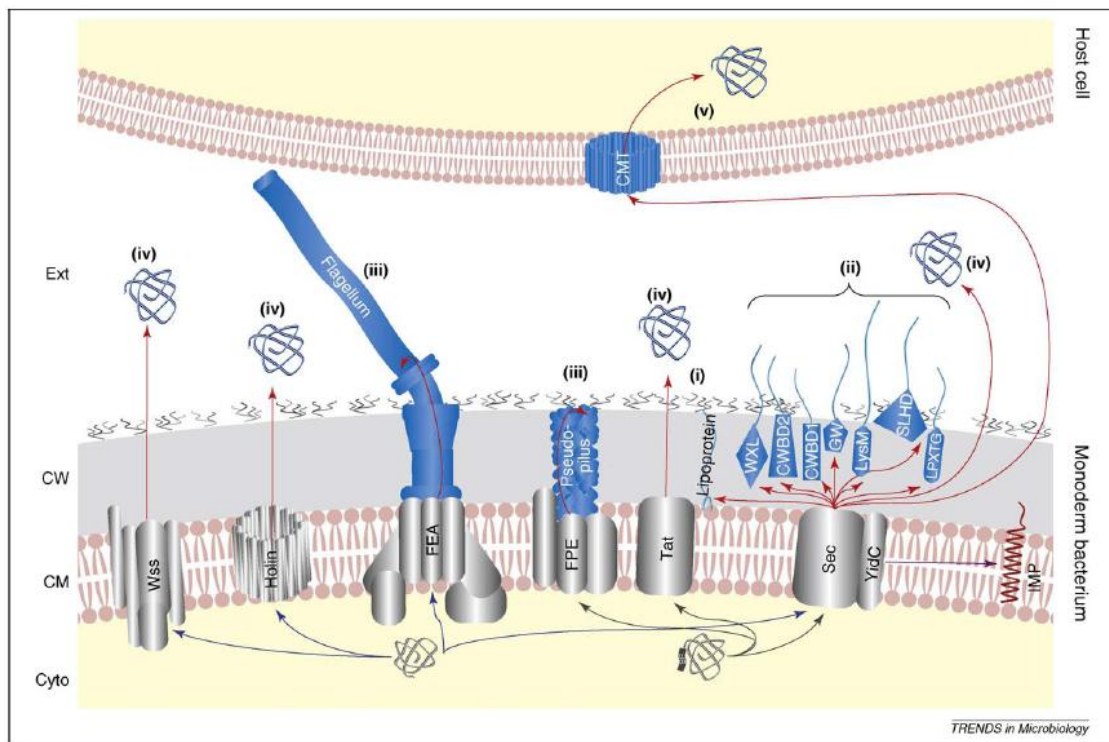
Κατά συνέπεια, η διαφορά μεταξύ πρωτεϊνικής έκκρισης και εξαγωγής παρουσιάζει ενδιαφέρον μόνο στα διδερμή βακτήρια. Η «πρωτεϊνική έκκριση», αναφέρεται συγκεκριμένα στην ενεργό μεταφορά μιας πρωτεΐνης υποστρώματος στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ η «πρωτεϊνική εξαγωγή», αναφέρεται συγκεκριμένα στην ενεργό μεταφορά της πρωτεΐνης στο περιπλασματικό χώρο (Desvaux et. al., 2009).

Επιπλέον, για να καθοριστούν οι όροι που σχετίζονται με την μεταφορά μιας πρωτεΐνης, επιβάλλεται να καθορισθεί ο όρος «εκκρινόμενη πρωτεΐνη». Η βιβλιογραφία και μερικές γονιδιωματικές και πρωτεομικές βάσεις δεδομένων, μπορεί να είναι πηγές που προκαλούν σύγχυση λόγω ότι οι συγγραφείς συχνά χρησιμοποιούν τον όρο «εκκρινόμενη» μόνο για διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο θρεπτικό μέσο (Desvaux et. al., 2009).

Πράγματι, πρέπει να σημειωθεί πάλι, τόσο για τα μονοδερμή όσο και για τα διδερμή, ότι εφόσον και μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη μεταφερθεί κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, τότε,

- μπορεί να παραμείνει προσκολλημένη στην μεμβράνη
- να συνδεθεί ομοιοπολικά ή μη με στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος στα μονοδερμή βακτήρια ή με στοιχεία της εξωτερικής μεμβράνης στα διδερμή βακτήρια
- να δημιουργήσει μακρομοριακές δομές (μαστίγια και τριχίδια) στην κυτταρική επιφάνεια
- να εισχωρήσει μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή, ή
- να απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 2, Εικόνα 3) (Henderson et. al., 2004; Desvaux et. al., 2006b).

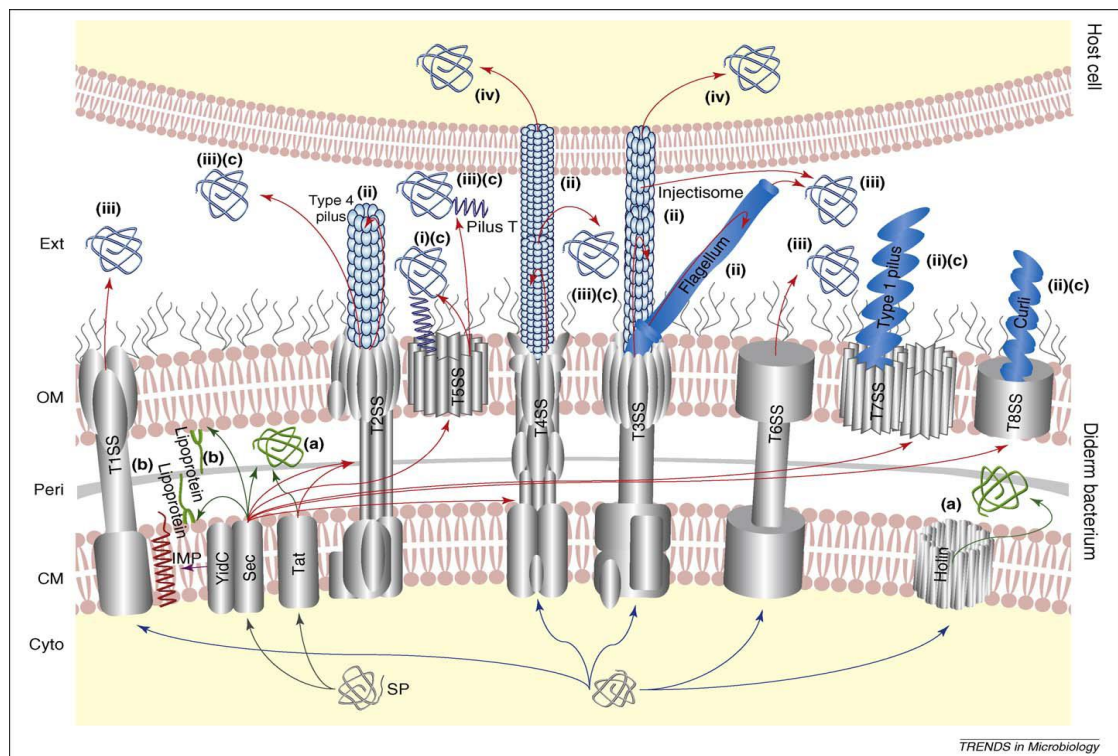
Για να γίνει πιο σαφές, προτάθηκε να οριστεί ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη, μια πρωτεΐνη που μεταφέρεται μέσω ενός εκκριτικού συστήματος, γι' αυτό και ο όρος «εκκρινόμενη πρωτεΐνη», δεν αναφέρεται αποκλειστικά σε αυτές τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο, αλλά περιλαμβάνει όλες αυτές που βρίσκονται εξωτερικά της εξωτερική λιπιδιακής στοιβάδας, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Desvaux et. al., 2009).



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των τελικών υποκυτταρικών τοποθετήσεων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα μονοδερμή (Gram-θετικά) βακτήρια, συσχετιζόμενες με τα συστήματα μεταφοράς που μετέχουν στη διαδικασία. Στα μονοδερμή βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορεί να είναι:

- (i) Προσκολλημένες στην CM (πχ. λιποπρωτεΐνες)
- (ii) Συνδεδεμένες με το CW είτε ομοιοπολικά (πχ. LPXTG πρωτεΐνες) ή μη ομοιοπολικά (πχ. εκδηλώνοντας LysM, GW, CWBD1, CWBD2, SLHD ή WXL μοτίβα)
- (iii) Μέλη κυτταρικών-επιφανειακών αποφύσεων, όπως cellulosomes ή τριχίδια (υποομάδες που εκκρίνονται μέσω Sec), ικανά ψευδο-τριχίδια (συγκεντρωμένα μέσω FPE) ή μαστίγια (συγκεντρωμένα μέσω FEA)
- (iv) Απελευθερωμένες στον εξωκυττάριο χώρο μέσω Sec, Tat, holin ή Wss; ή
- (v) Εξαγόμενες σε ένα κύτταρο ξενιστή μετά από έκκριση μέσω Sec μιας χοληστερόλης-εξαρτώμενης κυτολυσίνης, η οποία αργότερα ενσωματώνεται μέσα στην πλασματική μεμβράνη ενός ξενιστή κυττάρου και στη συνέχεια επιτρέπει την μεταφορά εκκρινόμενων ρυθμιστών σε μια διαδικασία που καλείται cytolysin-mediated translocation (CMT).

Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις πορείες των πρωτεϊνών που έγιναν στόχοι στην CM εκδηλώνοντας ένα N-τελικό πεπτιδίο οδηγό, ενώ τα μπλε βέλη, πορείες που χρησιμοποιούνται από πρωτεΐνες που στερούνται αυτού του πεπτιδίου οδηγού. Τα κόκκινα βέλη έχουν να κάνουν με την έκκριση και τα βιολετή με την ένταση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (IMP). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι μπλε. Συντομογραφίες: Cyto, κυτόπλασμα; CM, κυτοπλασματική μεμβράνη; CW, κυτταρικό τοίχωμα; OM, εξωτερική μεμβράνη; Ext, εξωκυτταρικός χώρος.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των τελικών υποκυτταρικών τοποθετήσεων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα διδερμή (Gram-αρνητικά) βακτήρια, συσχετιζόμενες με τα συστήματα μεταφοράς που μετέχουν στη διαδικασία. Στα διδερμή βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορεί να είναι:

- (i) τοποθετημένες στην επιφάνεια του κυττάρου όταν προσκολλούνται στην OM μέσω του Omp85, συμπεριλαμβανόμενων μερικών αυτό-μεταφερόμενων πρωτεϊνών του T5SS
- (ii) μέλη επιφανειακών κυτταρικών αποφύσεων όπως μαστίγια (T3bSS) ή δομές που μοιάζουν με τριχίδια (τριχίδια τύπου 4 του T2SS,, injectisome του T3aSS, τριχίδια T του T4SS, τριχίδια τύπου 1 του T7SS ή curli μέσω μονοπατιού πυρηνικής καθίζησης [T8SS]);
- (iii) απελευθερωμένες στον εξωκυττάριο χώρο μέσω του T1SS έως T6SS ή
- (iv) κατευθείαν εγχέομενες μέσα σε ένα ευκαρυωτικό ή βακτηριακό κύτταρο ξενιστή, κυρίως μέσω του T3aSS ή T4SS.

Στα διδερμή βακτήρια, οι εξαγόμενες πρωτεΐνες από το κυτοπλασματικό χώρο μπορεί να είναι:

- (a) απελευθερωμένες στο περιπλασματικό χώρο μέσω πρωτεϊνικού συστήματος έκκρισης κατά μήκος της κυτοπλασματικής μεμβράνης (i.e. Sec, Tat ή holo);
- (b) λιποπρωτεΐνες προσκολλημένες είτε στην CM είτε στην OM στην περιπλασματικό χώρο μέσω του LolI συστήματος ή
- (c) υπόκεινται σε μια δεύτερη μετατόπιση κατά μήκος της OM μέσω του T2SS, T4SS, T5SS, T7SS ή T8SS.

Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις πορείες των πρωτεϊνών που έγιναν στόχοι στην CM εκδηλώνοντας ένα N-τελικό πεπτιδίο οδηγό, ενώ τα μπλε βέλη, πορείες που χρησιμοποιούνται από πρωτεΐνες που στερούνται αυτού του πεπτιδίου οδηγού. Τα κόκκινα βέλη έχουν να κάνουν με την έκκριση, τα βιολετή με την ένταξη των μεμβρανικών πρωτεϊνών (IMP) και τα γκρι βέλη έχουν να κάνουν με την εξαγωγή (η οποία δεν είναι συνώνυμη με την έκκριση στα διδερμή βακτήρια). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι μπλε και οι εξαγόμενες πρωτεΐνες είναι γκρι. Συντομογραφίες: Cyto, κυτόπλασμα; CM, κυτοπλασματική μεμβράνη; Peri, περιπλασματικός χώρος; OM, εξωτερική μεμβράνη; Ext, εξωκυτταρικός χώρος.

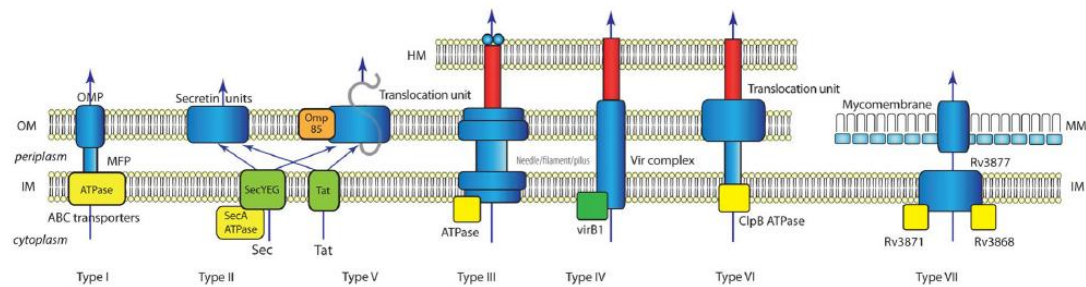
1.2. Βακτηριακά πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα

Ιστορικά, η πρωτεϊνική έκκριση έχει ερευνηθεί πιο διεξοδικά στα διδερμή βακτήρια. Μέχρι τώρα, έχουν ανακαλυφθεί έξι μεγάλα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα και έχουν χαρακτηριστεί ως, εκκριτικό σύστημα τύπου I (T1SS), II (T2SS), III (T3SS), IV (T4SS), V (T5SS) και τύπου VI (T6SS) αντίστοιχα (Henderson et. al., 2004; Economou et. al., 2006). Τα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα, χαρακτηριζόμενα μέχρι σήμερα στα μονοδερμή βακτήρια, περιλαμβάνουν τα εξής μονοπάτια: Sec, Tat, FEA, FPE, holoing και Wss (Tjalsma et. al., 2000, Desvaux and Hébraud, 2006).

Μερικά από αυτά τα συστήματα, υπάρχουν ήδη στα διδερμή βακτήρια, όπως για παράδειγμα το Sec, τα οποία διευκολύνουν την εξαγωγή των πρωτεϊνών στο περιπλασματικό χώρο. Έτσι, παρόλο που αυτά τα συστήματα επιτρέπουν την έκκριση πρωτεϊνών στα μονοδερμή βακτήρια, δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα εκκριτικά συστήματα στα διδερμή βακτήρια (Desvaux et. al., 2009).

Η εικόνα 4 παρακάτω, συγκεντρώνει τις κύριες λειτουργίες των γνωστών εκκριτικών συστημάτων. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, μερικές εκκρινόμενες πρωτεΐνες εξάγονται κατά μήκος της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης με ένα απλό βήμα μέσω μονοπατιών των τύπων I, III, IV και VI (Tseng et. al., 2009). Άλλες πρωτεΐνες, στην αρχή εξάγονται στο περιπλασματικό χώρο μέσω του Sec ή του μονοπατιού των δυο-αργινινών (Tat) και κατόπιν, μεταφέρονται κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, μέσω του τύπου II, τύπου V ή σπανιότερα, μέσω του τύπου I ή IV (Tseng et. al., 2009).

Στα Gram-θετικά βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες συνήθως μεταφέρονται κατά μήκος της μεμβράνης από το Sec μονοπάτι ή το μονοπάτι δυο-αργινινών (Tat). Όμως, σε Gram-θετικά βακτήρια όπως στα μυκοβακτήρια, τα οποία έχουν ένα υδροφοβικό σχεδόν αδιαπέραστο κυτταρικό τοίχωμα, καλούμενο μυκομεμβράνη, ένα εξειδικευμένο εκκριτικό σύστημα τύπου VII, μεταφέρει τις πρωτεΐνες κατά μήκος και της μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω ενός καναλιού. Η διαδικασία αυτή, δεν είναι ακόμα γνωστή αν συντελείται σε ένα ή δύο στάδια (Tseng et. al., 2009).



Εικόνα 4. Τα γνωστά βακτηριακά εκκριτικά συστήματα. Εδώ εμφανίζονται μόνο τα βασικά στοιχεία από κάθε εκκριτικό σύστημα. HM: Μembrάνη ξενιστή; OM: εξωτερική μεμβράνη; IM: εσωτερική μεμβράνη; MM: μυκομεμβράνη; OMP: πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης; MFP: πρωτεΐνη συντηγμένη στη μεμβράνη. Οι ATPάσες και οι μοριακοί συνοδοί εμφανίζονται με κίτρινο.

Η φύση του Sec σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς έδωσε νόημα σε ένα γενικό εκκριτικό μονοπάτι (GSP). Αυτό, οδήγησε σε διάφορα συμπεράσματα στην επιστημονική βιβλιογραφία, κυρίως σχετικά με τα διδερμή βακτήρια (Desvaux et. al., 2004b). Η σύγχυση που προκαλείται, προέρχεται από δυο αντίθετες απόψεις όσον αφορά την ταξινόμηση της πρωτεϊνικής έκκρισης στα βακτήρια. Η μία άποψη λέει ότι, η ταξινόμηση των εκκριτικών συστημάτων πρέπει πρωταρχικά, να βασιστεί στους μηχανισμούς μεταφοράς κατά μήκος της κυτοπλασματικής μεμβράνης (Desvaux et. al., 2009). Αυτή η άποψη, προέρχεται από παρατηρήσεις στο *E. coli* όταν το Sec, ήταν το μόνο γνωστό σύστημα μεταφοράς στην κυτοπλασματική μεμβράνη. Μέχρι πρόσφατα, το Sec σύστημα, θεωρούταν ότι εμπλέκονταν συστηματικά στην κατά σειρά μεταφορά των πρωτεϊνών κατά μήκος της εξωτερικής στοιβάδας (Desvaux et. al., 2009).

Η άποψη αυτή, συνδεδεμένη με την περιορισμένη αντίληψη των μηχανισμών έκκρισης πρωτεϊνών στα Gram-αρνητικά βακτήρια και την ανακάλυψη ενός συντηρημένου συμπλέγματος έκκρισης πρωτεΐνης (που τώρα ονομάζεται T2SS) έδωσε νέο νόημα σε ένα βασικό τελικό στέλεχος (MTB) του GSP, ένα μονοπάτι που χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των εξωπρωτεϊνών (Pugsley, 1993). Εκείνη την περίοδο, οι περισσότερες έρευνες ασχολούταν αποκλειστικά με το K12 στέλεχος του *E. coli*, το οποίο στη συνέχεια, βρέθηκε ότι δεν αποτελεί και τον πιο κατάλληλο εκπρόσωπο των ειδών αυτών (Hobman et. al., 2007).

Μια άλλη άποψη όσον αφορά την ταξινόμηση, διατυπώθηκε από τους επιστήμονες, ερευνώντας εκκριτικά πρωτεϊνικά συστήματα, σε ένα μεγαλύτερο πεδίο των παθογόνων διδερμων βακτηρίων (Desvaux et. al., 2009). Αυτές οι έρευνες αποδείχτηκαν πολύ καρποφόρες, αφού ανακαλύφθηκαν σαφώς διαφορετικά και σημαντικά λειτουργικά πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα στα διδερμή βακτήρια,

αποδεικνύοντας ότι το MTB ήταν μόνο ένα, από τα πολλά μονοπάτια για την μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης (Desvaux et. al., 2009).

Έτσι, προτάθηκε μια άλλη ταξινόμηση, βασιζόμενη στους μηχανισμούς μεταφοράς πρωτεϊνών κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης και ονομάστηκε από T1SS έως T5SS. Το αριθμητικό σύστημα ταξινόμησης, έχει πλέον καθιερωθεί για την περιγραφή των συστημάτων μεταφοράς κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης (Salmond and Reeve, 1993). Σαν αποτέλεσμα, οι όροι MTB και GSP δεν χρησιμοποιούνται πλέον όταν αναφερόμαστε στο T2SS (Desvaux et. al., 2004b). Η ταξινόμηση των εκκριτικών συστημάτων, βάσει των μονοπατιών μεταφοράς κατά μήκος της εξωτερικής στοιβάδας, πρέπει να συνεχιστεί για να υιοθετηθεί και να ενσωματωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το WXG100-εκκριτικό σύστημα (Wss) (Desvaux and Hébraud, 2006; Pallen, 2002), επονομαζόμενο ως Esat-6-εκκριτικό σύστημα στο *Mycobacterium spp.*, αλλά επίσης χαρακτηριζόμενο και στο *Staphylococcus aureus* και στο *Bacillus anthracis*, έχει λανθασμένα ειπωθεί ως τύπος VII εκκριτικό σύστημα (Abdallah et. al., 2007). Πράγματι, επειδή η αριθμητική κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνικών εκκριτικών συστημάτων, αρχικά έγινε για τα διδερμή βακτήρια, η ονομασία ξανά του Wss με αυτού του είδους την ταξινόμηση δεν ευσταθεί. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι, το Wss έχει χαρακτηριστεί μόνο στα μονοδερμή βακτήρια, καθώς επίσης και από το γεγονός ότι, η αριθμητική κατηγοριοποίηση, δεν εφαρμόζεται για να περιγράψει άλλα συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών κατά μήκος της κυτοπλασματικής μεμβράνης, που βρέθηκαν στα διδερμή και μονοδερμή βακτήρια (πχ. Sec, Tat ή holling) (Desvaux et. al., 2009) .

Από μια άλλη άποψη, το T1SS έως το T6SS εκκριτικό σύστημα, συστηματικά έχουν να κάνουν με πρωτεϊνικά συστατικά που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη, τα οποία εξ' ορισμού δεν υπάρχουν στα μονοδερμή βακτήρια και έτσι ούτε και στο σύστημα Wss (Desvaux et. al., 2009). Προηγούμενες προσπάθειες για εφαρμογή αριθμητικής ονοματολογίας στα μονοδερμή βακτήρια έχουν ήδη αποδειχθεί ασαφής. Για παράδειγμα, η έμμεση κυτοπλασματική μεταφορά ονομάστηκε δοκιμαστικά "T3SS" στα Gram-θετικά βακτήρια (Madden et. al., 2001). Ένας όρος, ο οποίος προφανώς δεν ισχύει αφού στερείται δομής, ακολουθίας και λειτουργικής ομοιότητας με το T3SS που χαρακτηρίστηκε στα διδερμή (Desvaux et. al., 2006a; Economou et. al., 2006).

Τα Sortases, έχουν επίσης λανθασμένα χαρακτηριστεί, ως πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα στα μονοδερμή βακτήρια (Economou et. al., 2006; Paraniou et. al., 2007). Τα sortases, είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν επιλεγμένους οδηγούς, δημιουργούν C-τελικά (πχ. το LPTXTG- μοτίβο) και ενεργοποιούν την

ομοιοπολική προσκόλληση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο κυτταρικό τοίχωμα. Επομένως είναι ξεκάθαρο ότι, δεν εμπλέκονται στην πρωτεϊνική μεταφορά κατά μήκος κυτοπλασματικής μεμβράνης (Desvaux et. al., 2009). Αντίθετα, τα sortases θα πρέπει να θεωρηθούν ως μια επέκταση του Sec μονοπατιού, λόγω ότι οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ένα LPXTG μοτίβο, συστηματικά παρουσιάζουν και ένα N-τελικό πεπτιδίο οδηγό, κατεργασμένο από πεπτιδάση (signal peptidase) κατά την πορεία της μεταφοράς, μέσω του Sec Translocon πριν υποστούν περαιτέρω μεταχείριση από τα sortases (Desvaux and Hébraud, 2006; Marraffini et. al., 2006).

Έτσι, τα sortases απλά εμπλέκονται στην μεταγραφόμενη τροποποίηση ορισμένων πρωτεϊνών κατά την πορεία της έκκρισης άλλα δεν παίζουν ενεργό ρόλο στην διαδικασία της μεταφοράς (Desvaux et. al., 2009).

Σε περιπτώσεις που έχουν να κάνουν με μονοδερμή βακτήρια, τότε τέτοια συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών, χαρακτηριζόμενα στην κυτοπλασματική μεμβράνη, όντως εμπλέκονται σε πρωτεϊνική έκκριση, ενώ όταν πρόκειται για διδερμή βακτήρια, τότε εμπλέκονται στην πρωτεϊνική εξαγωγή, εάν δεν υπάρχει κάποιο άλλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα στην εξωτερική μεμβράνη. Είναι σημαντικό ότι, τα FPE και FEA συστήματα, παρόλο που φέρουν ομολογία με τα αντίστοιχα T2SS και T3SS στα διδερμή βακτήρια, δεν υπόκεινται στην αριθμητική κατηγοριοποίηση λόγω ότι, τα στοιχεία που απαιτούνται για την μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, είναι προφανώς απόντα στα μονοδερμή βακτήρια (Desvaux et. al., 2006a; Desvaux et. al., 2005b; Desvaux et. al., 2003; Desvaux et. al., 2004a).

Επιπλέον, η χρήση αυτών των περιγραφικών όρων δεν παράγει κάποια σύγχυση ή ασάφεια λόγω ότι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στα μονοδερμή και στα διδερμή βακτήρια (πχ. Sec, Tat και holins), να είναι αποκλειστικά παρών στα μονοδερμή βακτήρια (πχ Wss) (Abdallah et. al., 2007) ή να μοιράζονται ομολογία με ορισμένα στοιχεία των πρωτεϊνικών εκκριτικών συστημάτων που περιγράφηκαν στα διδερμή βακτήρια (πχ. FPE με T2SS και FEA με T3SS) (Peabody et. al., 2003).

Όπως και στο πρωτεϊνικό σύστημα μεταφοράς της κυτοπλασματικής μεμβράνης, η ονοματολογία για τα συστήματα μεταφοράς της εξωτερικής μεμβράνης των διδερμή βακτηρίων, βρίσκεται σε σύγχυση. Ξανά, από το T1SS έως το T6SS, αυτοί οι όροι αναφέρονται στην πρωτεϊνική έκκριση στα διδερμή βακτήρια και όχι στην πρωτεϊνική εξαγωγή. Εξ' ορισμού, το T1SS απαρτίζεται από τρία μέρη. Συγκεκριμένα, έναν ABC μεταφορέα, μια πρωτεΐνη συντηγμένη στη μεμβράνη και μια εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη (OMP) (Delepelair, 2004). Έτσι, το σύστημα T1SS, δεν θα πρέπει απλά να αναφέρεται ως ένας ATP-binding (ABC) μεταφορέας (Desvaux et. al., 2009).

Πράγματι, στα μονοδερμή βακτήρια, οι ABC μεταφορείς δεν μετέχουν με την αυστηρή έννοια του όρου στην πρωτεϊνική έκκριση. Στην καλύτερη περίπτωση, μπορούν να μεταφέρουν πεπτιδία (Tjalsma et. al., 2000; Desvaux et. al., 2005b).

Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι, στην αριθμητική ονοματολογία των δίδερμων πρωτεϊνικών εκκριτικών συστημάτων, υπάρχουν υποκατηγορίες. Το T4SS, ήταν το πρώτο σύστημα στο οποίο προτάθηκε μια διχοτόμηση μεταξύ των T4aSS και T4bSS για να χαρακτηριστούν τα συστήματα αυτά, που απαρτίζονται από VirB ομολογίες και αυτά από Tra ομολογίες αντίστοιχα (Christie and Vogel, 2000).

Στο ίδιο πνεύμα, το T3SS χωρίστηκε στο T3aSS το οποίο αναφέρεται στη συριγγώδη δομή και στο T3bSS το οποίο αναφέρεται στο σύστημα εξαγωγής πρωτεΐνης που φέρει μαστίγια (Desvaux et. al., 2006a). Το T5SS έχει χωριστεί σε 3 υποομάδες, το T5aSS το οποίο αναφέρεται στους αυτό-μεταφορείς τύπου 1, το T5bSS το οποίο αναφέρεται στο εκκριτικό σύστημα δύο-μερών και το T5cSS για τους τριμερές αυτό-μεταφορείς (Henderson et. al., 2004; Desvaux et. al., 2003). Αυτή η αλφαριθμητική κατάταξη βασίζεται στη δομή και την κατά σειρά ομολογία. Εκτός του ότι δίνεται η δυνατότητα για μελλοντική ταξινόμηση και άλλων ομόλογων συστημάτων με βάση των εκκριτικών τους μηχανισμών, η αλφαριθμητική κατάταξη αποφεύγει να αυξήσει τον αριθμό των εκκριτικών συστημάτων ανεξέλεγκτα (Desvaux et. al., 2009).

Σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMP), των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης (IMP) και των στοιχείων της ATPάσης του T2SS, του τύπου 4 piliation συστήματος (T4P) και το στενά-προσκολλημένο piliation σύστημα (Tad), είναι ξεκάθαρο ότι, τα τελευταία εκκριτικά συστήματα είναι ομόλογα με το T2SS και έτσι θα πρέπει να θεωρούνται ως κομμάτι του T2SS (Peabody et al., 2003). Επειδή αυτά τα συστήματα ανήκουν σε ξεχωριστά φυλογενετικά συγκροτήματα, προτάθηκε να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το αλφαριθμητικό μοντέλο, ως υποκατηγορίες του T2SS. Συγκεκριμένα, το κλασικό εκκριτικό-εξαρτώμενο T2SS ως T2aSS (Voulhoux et al., 2001), το T4P ως T2bSS (Mattick, 2002) και το Tad ως T2cSS (Tomich et. al., 2007).

Εκτός από την αριθμητική κατάταξη των εκκριτικών συστημάτων των δίδερμων που περιγράφηκε παραπάνω, υπάρχουν πολλά άλλα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα. Για παράδειγμα, το μονοπάτι εισαγωγής μοριακού συνοδού (chaperone-usher CU) και το μονοπάτι εξωκυτταρικής πυρήνωσης (ENP) (nucleation/precipitation pathway) (Desvaux et. al., 2009). Παρόλο που το καλά χαρακτηριζόμενο CU σύστημα βιογένεσης πρωτεϊνικής απόφυσης παρουσιάζει πολλές ασαφείς ομοιότητες στην δομή και στον μηχανισμό με αυτές του T5SS (Thanassi et. al., 2005), δεν θα πρέπει να θεωρηθεί ως υποομάδα του T5SS διότι

αυτές οι ομοιότητες βασίζονται στην αναλογία πάρα στην ομολογία (Desvaux et. al., 2009).

Πράγματι, σχετικές έρευνες έδειξαν ξεκάθαρα την έλλειψη της δομικής και κατά σειρά ομολογίας μεταξύ του CU συστήματος και μελών του T5SS (Thanassi et. al., 2005; Remaut et. al., 2008). Έτσι είναι ξεκάθαρο ότι, το CU σύστημα αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό σύστημα έκκρισης πρωτεΐνης από μόνο του και έτσι, προτάθηκε το σύστημα αυτό να αναφέρεται ως ο τύπος VII εκκριτικό σύστημα (T7SS) (Desvaux et. al., 2009) .

Στο ίδιο πνεύμα, το ENP μονοπάτι που μετέχει στην έκκριση και συγκέντρωση curli μπορεί να θεωρηθεί ως ο τύπος VIII εκκριτικό σύστημα (T8SS) (Kostakioti et. al., 2005; Stathopoulos et. al., 2000). Δεδομένο ότι, το μονοπάτι του εναλλακτικού μοριακού συνοδού (AC) μετέχει στην μορφογένεση του παράγοντα σχετιζόμενου με το αντιγόνο I των μαστιγίων (colonization-factor-antigen-I-related fimbriae), ο μηχανισμός συγκέντρωσης, μοιράζεται μερικά κοινά χαρακτηριστικά με το CU, άλλα όμως, δεν αποδεικνύεται καθαρή ομολογία ούτε μεταξύ των τριχιδίων κλάσης 1 και 5, ούτε μεταξύ των μοριακών συνοδών στην διαδικασία της συναρμολόγησής τους από το CU και το AC, αντίστοιχα (Sakellaris and Scott, 1998; Soto and Hultgren, 1999). Λόγω ότι η φύση του μεταφορέα κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης, που μετέχει στο AC παραμένει ασαφής, δεν μπορεί να αποφασιστεί αν το AC αποτελεί ένα επιπλέον και διαφορετικό εκκριτικό σύστημα ή ένα σύστημα που σχετίζεται με το CU και άρα μια T7SS υποομάδα (Desvaux et. al., 2009).

Όλα αυτά τα χρόνια, καθιερώθηκε ένα σχεδόν λανθασμένο αλφαριθμητικό σύστημα για τα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα των δίδερμων βακτηρίων, ενώ οι περιγραφικοί όροι, διατηρήθηκαν για τα συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών κατά μήκος της κυτοπλασμικής μεμβράνης και για τους διδερμή και για τους μονοδερμή οργανισμούς. Οι Desvaux et. al. (2009), προτείνουν αυτή η διχοτόμηση στην αριθμητική κατάταξη, να διατηρηθεί προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση και να γίνει όσο πιο ξεκάθαρο γίνεται στην επιστημονική κοινότητα ότι, ένα σετ μηχανισμών σχετίζεται με την πρωτεϊνική μεταφορά κατά μήκος της κυτοπλασμικής μεμβράνης και ένα σετ μηχανισμών, σχετίζεται με την πρωτεϊνική μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης.

1.2.1 Μονοπάτια γενικής έκκρισης (Sec) και δυο-αργινινών (Tat)

Το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (Sec) και το δυο-αργινινών ή Tat μονοπάτι μετατόπισης, είναι και τα δυο πολύ διαδεδομένα στα ευβακτήρια, στα αρχαία και στους ευκαριώτες (Paranίκου et. al., 2007; Muller, 2005; Albers, 2006). Στα αρχαία και στα Gram-θετικά βακτήρια, τα δυο αυτά μονοπάτια, είναι υπεύθυνα για την έκκριση των πρωτεϊνών κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, ενώ στα Gram-αρνητικά βακτήρια, είναι υπεύθυνα για την εξαγωγή των πρωτεϊνών στο περίπλασμα. Ο μηχανισμός του Sec μονοπατιού, αναγνωρίζει στις πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση μια υδροφοβική N-τελική σηματοδοτική αλληλουχία και μεταφέρει τις πρωτεΐνες σε μια ανοικτή κατάσταση (μη διπλωμένη), χρησιμοποιώντας υδρόλυση του ATP και μια διαβάθμιση πρωτονίου για ενέργεια (Paranίκου et. al., 2007).

Ο μηχανισμός του Tat εκκριτικού μονοπατιού, αναγνωρίζει ένα μοτίβο πλούσιο σε αμινοξικά κατάλοιπα (S-R-R-x-F-L-K) στην N-τελική περιοχή ενός μεγάλου συν-παράγοντα που περιέχει πρωτεΐνες και τις μεταφέρει σε διπλωμένη κατάσταση, χρησιμοποιώντας μόνο μια κλίση πρωτονίου σαν πηγή ενέργειας (Muller, 2005).

Μια πολύ λεπτομερή περιγραφή του Sec μηχανισμού έχει επιτευχθεί μετά από 30 χρόνια γενετικών, βιοχημικών και βιοφυσικών εργασιών, κυρίως στο *E. coli* (Paranίκου et. al., 2007). Ο πόρος μεταφοράς πρωτεϊνών του Sec μεταφορέα, αποτελείται από μια ετεροτριμερή ενσωματωμένη μεμβράνη, SecY/SecE/SecG (sec61α, sec1β, sec1γ στα ευκαρυωτικά κύτταρα). Η κυτοπλασμική υποομάδα SecA υδρολύει ATP για να επιτευχθεί μεταφορά. Οι πρωτεΐνες μπορεί να μεταφερθούν με δυο τρόπους. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες με μεγάλη υδροφοβική σηματοδοτική αλληλουχία συν-μεταφέρονται. Η σηματοδοτική αλληλουχία δεσμεύεται από το μόριο του σήματος αναγνώρισης, το οποίο στην συνέχεια στοχεύει το ριβόσωμα στην μεταφορά μέσω του FtsY υποδοχέα. Άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, αναγνωρίζονται από το SecB μοριακό συνοδό αφότου έχει ολοκληρωθεί η μεταφορά. Το SecB, στοχεύει τις πρωτεΐνες στην μεταφορά δεσμεύοντας το SecA (Paranίκου et. al., 2007).

Το μονοπάτι μεταφοράς Tat, έχει να κάνει με την μεταφορά πρωτεϊνών σε διπλωμένη κατάσταση, κατά μήκος των μεμβρανών στα αρχαία και βακτήρια (Berks, 1996; DeLisa et. al., 2003; Rodrigue et. al., 1999; Santini et. al., 1998).

Στα βακτήρια, τα πολυπεπτίδια που εξάγονται μέσω του Tat μονοπατιού, περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγικά ένζυμα, μολυσματικούς παράγοντες, πρωτεΐνες στενά συνδεδεμένες με περιπλασμικές ligand-binding πρωτεΐνες και ένζυμα που μετέχουν στην βιογένεση κυτταρικού φακέλου (Lee et. al., 2006).

Μόνο οι πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να βρίσκονται σε μια διπλωμένη κατάσταση στο κυτόπλασμα είναι ικανές να μεταφερθούν μέσω του Tat (DeLisa et. al., 2003; Fisher et. al., 2006). Η μεταφορά κατά μήκος των μεμβρανών, ξεκινάει από την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου οδηγού με τον Tat μηχανισμό, ο οποίος στο *Escherichia coli* αποτελείται από την μεμβρανική πρωτεΐνη TatABC (Gohlke et. al., 2005; Bolhuis et. al., 2001). Η TatC έχει να κάνει με την αναγνώριση των πρωτεϊνών στόχων, ενώ η TatA θεωρείται ότι αποτελεί την μεγάλη υποομάδα σχηματισμού πόρου (Muller, 2005).

Τα βακτηριακά Tat πεπτίδια οδηγοί είναι περισσότερο (longer) από τα πεπτίδια οδηγούς, τα οποία στοχεύουν πρωτεΐνες στο Sec ή στα μονοπάτια σωματιδίων αναγνώρισης μηνυμάτων (Cristobal et. al., 1999).

Η άμινο-τελική (N-) περιοχή εμπεριέχει το Tat αποδεκτό μοτίβο (S/T)RRXFLK, το οποίο περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό δυο αργινινών διπεπτίδιο. Η υδροφοβική (h-) περιοχή των Tat πεπτιδίων οδηγών, είναι γενικά λιγότερο υδροφοβική, από την αντίστοιχη περιοχή των Sec πεπτιδίων οδηγών και ακόμα πιο λίγο από αυτήν των πεπτιδίων του μονοπατιών σωματιδίων αναγνώρισης μηνυμάτων (Cristobal et. al., 1999). Τέλος, η καρβοξύλο-τελική (C-) περιοχή, συχνά περιέχει βασικά κατάλοιπα, σε αντίθεση με τα Sec πεπτίδια οδηγούς, τα οποία σχεδόν ποτέ δεν είναι φορτισμένα σε αυτή την περιοχή. Το ελάχιστο φορτίο της C-περιοχής των Tat πεπτιδίων οδηγών, είναι +0,5 έναντι +0,003, των Sec πεπτιδίων οδηγών (Berks et. al., 2003).

1.2.2 Εκκριτικό σύστημα τύπου I

Το πρωτεϊνικό εκκριτικό σύστημα τύπου I (T1SS) περιέχει τρία μεγάλα συστατικά: τους ATP-δεσμευτικής κασέτας (ABC) μεταφορείς, τους παράγοντες της εξωτερικής μεμβράνης (OMFs) και τις πρωτεΐνες συντηγμένες στη μεμβράνη (MFP) (Delepelaire, 2004; Holland et. al., 2005). Ενώ η υδρόλυση του ATP παρέχει την ενέργεια στο T1SS, επιπλέον δομικά συστατικά συμπληρώνουν τον όλο μηχανισμό της πρωτεϊνικής έκκρισης, κατά μήκος και της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης (Tseng et. al., 2009).

Από δομικής πλευράς, οι παράγοντες της εξωτερικής μεμβράνης (OMFs), σχηματίζουν ένα διαπεριπλασματικό κανάλι μεταφοράς, το οποίο διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη, καθώς συνδέονται με τις πρωτεΐνες που είναι συντηγμένες στη μεμβράνη (MFP) (Delepelaire, 2004; Holland et. al., 2005), το οποίο απαντάται τόσο στα Gram-θετικά βακτήρια όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Έτσι οι MFP είναι υπεύθυνες για την σύνδεση των OMF και των ABC στο περιπλασματικό χώρο (Tseng et. al., 2009).

Οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν τον ABC μεταφορέα του T1SS μπορούν να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: μια εξειδικευμένη για μεγάλες πρωτεΐνες από τα Gram-αρνητικά βακτήρια και μια άλλη για τις εξαγόμενες μικρές πρωτεΐνες και πεππίδια. Οι ABC μεταφορείς στο T1SS περιέχουν δυο κυτοπλασματικές περιοχές που υδρολύονται από ATP και δυο ολοκληρωμένες διαμεμβρανικές περιοχές (Delepelaire, 2004). Γενικά, η φυλογένεση των ABC μεταφορέων αντανακλά της υποστρωματικής τους ιδιαιτερότητας, εννοώντας ότι ο ανασχηματισμός συμβαίνει σπάνια ανάμεσα στους ABC μεταφορείς κατά την διάρκεια της εξέλιξης τους (Paulsen et. al., 1997). Από την άλλη, οι OMFs δεν έχουν εξελιχτεί παράλληλα με τις πρωταρχικές τους περμεάσεις. Η εξέλιξη των MFPs είναι παράλληλη με την φυλογένεση των πρωταρχικών τους περμεάσεων (Paulsen et. al., 1997).

Το σύμπλεγμα TolC-HlyD-HlyB του *E. coli* έχει διερευνηθεί αρκετά για πάνω από μια δεκαετία. Η TolC είναι μια αναπόσπαστη μεμβρανική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ η HlyD (MFP) και η HlyB (ABC) αφορούν τον περιπλασματικό χώρο και την εσωτερική μεμβράνη αντίστοιχα (Delepelaire, 2004; Holland et. al., 2005). Το υπόστρωμα σε αυτό το μοντέλο του συστήματος από ανθρώπινα ούρο-παθογόνα στελέχη του *E. coli*, είναι μια αιμολυτική τοξίνη που καλείται HlyA (Uhlen, 2000).

Πιστεύεται ότι, η HylA πρέπει να εκκρίνεται ως ένα μη διπλωμένο πεπτιδίο με έναν GroEL-εξαρτώμενο τρόπο. Παρόλο που θεωρείται ότι μια τριμερής TolC, σχηματίζει ένα διαμεμβρανικό κανάλι στην εξωτερική μεμβράνη, η εξειδικευμένη στοιχειομετρία των άλλων συστατικών του εκκριτικού συστήματος τύπου I, παραμένει ακόμα άγνωστη. Η πρωτεΐνη παράγοντας της εξωτερικής μεμβράνης TolC, μπορεί επίσης να συνεργαστεί με πολλές άλλες οικογένειες μεταφορέων, όπως την MFS (μεγάλου μεσολαβητή υπεροικογένεια) και την υπεροικογένεια των RND (ανθεκτική στη κονδύλωση διαίρεση) (Tseng et. al., 2009).

Πρόσφατες έρευνες, έδειξαν αρκετά παραδείγματα όσον αφορά, το ρόλο του T1SS στην αλληλεπίδραση των φυτικών μικροβίων με τους ξενιστές τους (Delepelaire, 2004). Στο παθογόνο ρυζιού *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* η έκφραση του παράγοντα AvrXa21 απαιτεί ένα εκκριτικό σύμπλεγμα τύπου I που απαρτίζεται από RaxA, RaxB και RaxC. Η φυλογενετική ανάλυση προτείνει ότι το RaxB λειτουργεί ως ένας ABC μεταφορέας (da Silva et. al., 2004), ισοδύναμος με την HlyB του *E. coli*. Πιστεύεται ότι, τα μόρια AvrXa21 αποτελούνται από μικρά σουλφιδικά πολυπεπτιδία τα οποία εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου I και τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από ξενιστές φυτών (da Silva et. al., 2004). Μολυσματικοί παράγοντες όπως οι μεταλοπρωτεΐνες, προσκολλάσες και γλυκανάσες που εκκρίνονται μέσω του T1SS μπορούν επίσης να βρεθούν στα φυτικά παθογόνα *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* και *Xylella fastidiosa* (Delepelaire, 200; Reddy et. al., 2007).

Ένας κοινός μηχανισμός στην συμβίωση ριζόβιων-ψυχανθών, βασίζεται στις εκκρινόμενες ριζόβιες πρωτεΐνες, με ένα ιδιαίτερο επαναλαμβανόμενο μοτίβο για να καθορίσει την ιδιαιτερότητα του ξενιστή (Delepelaire, 2004; Fauvart and Michiels, 2008). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες εξάγονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου I και μπορούν επίσης να εμπλακούν και στον σχηματισμό βιοφίλμ. Η TolC πρωτεΐνη από το *Sinorhizobium meliloti* βρέθηκε επίσης να επηρεάζει την συμβίωση (Cosme et. al., 2008). Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T1SS επίσης βρέθηκαν στο *Mesorhizobium loti* και στο *Bradyrhizobium japonicum* (Delepelaire, 2004).

1.2.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου II

Το εκκριτικό σύστημα τύπου II είναι γνωστό και ως Sec-εξαρτώμενο σύστημα καθώς πολλές πρωτεΐνες που περνούν από το T2SS πρέπει πρώτα να φτάσουν στο περίπλασμα μέσω του Sec μονοπατιού. Παρόλο που η Sec-εξαρτώμενη μεταφορά είναι πολύ κοινή (Cao and Saier, 2003), το T2SS απαντάται μόνο σε οικογένειες των Gram-αρνητικών πρωτεοβακτηρίων (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004). Απαντάται σε είδη από υποχρεωτικούς συμβιωτές ως ελεύθερα είδη, άλλα δεν είναι διαδεδομένη ανάμεσα σε κάποια συγκεκριμένη ομάδα. Φαίνεται ότι είναι ένα ιδιαίτερο σύστημα το οποίο προάγει λειτουργίες, σχετιζόμενες με την αλληλεπίδραση ενός είδους με το βιοτικό του ή αντιβιοτικό του περιβάλλον (Cianciotto, 2005; Cornelis, 2006).

Μερικά είδη μπορεί να έχουν περισσότερα από ένα T2SS (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004). Το T2SS απαιτείται για την μολυσματικότητα των ανθρώπινων παθογόνων *Vibrio cholera*, *Legionella pneumophila* και το ετεροτοξικογενετικό *E. coli* και τα φυτικά παθογόνα *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*) και *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004). Οι μολυσματικοί καθοριστικοί παράγοντες που εκκρίνονται μέσω του T2SS, περιέχουν τις ADP(διφωσφορική αδενοσίνη)-ριβοσυλιωμένες τοξίνες, του ετεροτοξικογενετικού *E. coli* (τοξίνη ασταθής στη θερμότητα), *V. Cholerea* (τοξίνη χολέρας), *P. aeruginosa* (εξωτοξίνη A), τις πεκτινάσες και τις pectate lysase των φυτικών παθογόνων *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*), *Erwinia amylovora* και *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Από την άλλη, πρωτεοβακτήρια που υπολείπονται του T2SS περιέχουν παθογόνα όπως το *Agrobacterium tumefaciens*, το *Coxiella burnetii*, το *Shigella Flexneri* και τα συμβιωτικά *Sinorhizobium meliloti* και *Wolbachia pipientis* (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004).

Τα συστατικά του T2SS και οι λειτουργίες των έχουν μελετηθεί αρκετά στα *Klebsiella*, *Pseudomonas* και *Aeromonas* (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004). Ο πόρος μεταφοράς στην εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από 12-15 εκκριτικές υποομάδες – την pulD στο *Klebsiella oxytoca*, την xcpQ και την συμβιωτική hcxQ στο *Pseudomonas aeruginosa*, την exeD στο *Aeromonas hydrophila*, την xspD στο *Xanthomonas campestris*, την outD στο *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) και στο *Erwinia amylovora*. Ο πόρος είναι αρκετά μεγάλος για να στεγάζει διπλωμένες πρωτεΐνες, όπως τα elastase (ένζυμα διαμέτρου 6 nm) του *P. aeruginosa* (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004).

Τα υπόλοιπα 11-14 συντηρημένα συστατικά του T2SS φαίνεται ότι συμμετέχουν στην προσκόλληση του πόρου στην εσωτερική μεμβράνη και περιλαμβάνουν ζωτικές υποομάδες της εσωτερικής μεμβράνης, υποομάδες ψευδοτριχιδίων, που εκτείνονται στο περίπλασμα καθώς επίσης και μια υποκυτταρική ATPάση, η οποία μπορεί να παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για το άνοιγμα και κλείσιμο του πόρου έκκρισης (Cianciotto, 2005; Fillux, 2004).

Παρόλο που το T2SS περιέχει ένα συστατικό εσωτερικής μεμβράνης, το συστατικό αυτό δεν μετέχει στην μεταφορά των πρωτεϊνών στόχων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Αντίθετα, η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από τα μονοπάτια Sec και Tat. Η δομή του συμπλέγματος της εσωτερικής μεμβράνης και των ψευδοτριχιδίων, μοιάζουν πολύ αυτού του τριχοειδούς συστήματος τύπου IV, θεωρώντας ότι υπάρχει μια κοινή εξελικτική προέλευση (Tseng et. al., 2009).

1.2.4 Εκκριτικό σύστημα τύπου III

Ο τύπος III εκκριτικό σύστημα (T3SS) απαντάται στα Gram-αρνητικά βακτήρια που αλληλεπιδρούν τόσο με φυτικούς, όσο και με ζωικούς ξενιστές, είτε ως παθογόνα είτε ως συμβιωτικά (Cornelis, 2006; Grant et. al., 2006; Mota and Cornelis, 2005). Ο μηχανισμός του T3SS, καλούμενος injectisome (συριγγώδης δομή), φαίνεται να έχει μια κοινή εξελικτική προέλευση με το μαστίγιο (Cornelis, 2006).

Η κυριότερη γνωστή λειτουργία της συριγγώδης δομής, είναι η μεταφορά πρωτεϊνών τελεστών διαμέσου της μεμβράνης του βακτηρίου στο διαλυτό κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή, όπου επηρεάζουν ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων την ανοσία και των αμυντικών αντιδράσεων (Grant et. al., 2006; Mota and Cornelis, 2005; Lindeberg et. al., 2009; Torto-Alalibo et al., 2009).

Σε μερικές περιπτώσει όμως, οι πρωτεΐνες τελεστές απλά εκκρίνονται έξω από το κύτταρο. Παρόλο που αρχικά ανακαλύφθηκε στα παθογόνα βακτήρια, το T3SS σύστημα έχουν αναγνωριστεί στα αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτήρια των φυτών, στο συμβιωτικό βακτήριο της μύγας τσετσε, *Sodalis glossinidus*, στο συμβιωτικό νηματώδη *Photobacterium luminescens* και στον ανθρώπινο ξενιστή *Pantoea agglomerans*, υποδεικνύοντας ότι, το T3SS είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλληλεπιδράσεων μικροβίων-ξενιστών και όχι μόνο μιας παθογένεσης (Cornelis, 2006).

Έχουν αναγνωρισθεί επτά οικογένειες του μηχανισμού T3SS. Τα φυτοπαθογόνα περικλείονται σε δυο από αυτές τις οικογένειες (Hrp1 και Hrp2) ενώ το T3SS των ριζόβιων βακτηρίων σχηματίζει μια τρίτη οικογένεια. Μερικά βακτήρια μπορεί να έχουν περισσότερα από ένα T3SS. Για παράδειγμα το *Salmonella typhimurium* περιέχει δυο νησίδες παθογένειας (SP-1 και SP-2), κάθε μια από τις οποίες κωδικοποιεί για διαφορετικό T3SS (Cornelis, 2006).

Παρόλο που πάνω από 25 πρωτεΐνες μπορεί να χρειάζονται για να σχηματιστεί η συριγγώδης δομή, μόνο οι εννέα είναι συντηρημένες και στις επτά οικογένειες (πχ. οι πρωτεΐνες Hrc στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων), οκτώ εκ των οποίων είναι επίσης συντηρημένες και στο σύστημα μαστιγίων (Cornelis, 2006). Έτσι, υπάρχει σημαντική απόκλιση και ιδιαιτερότητα σε ότι αφορά το T3SS. Σε πολλές περιπτώσεις, γονίδια που κωδικοποιούν το T3SS βρίσκονται σε νησίδες παθογένειας που προέρχονται από ξένες πηγές και/ή εντοπίζονται σε πλασμίδια και συνήθως υπόκεινται σε οριζόντια μεταφορά (Gorhna et. al., 2003).

Η δομή και η λειτουργία της συριγγώδης δομής έχει μελετηθεί στα ζωικά παθογόνα *Salmonella typhimurium* και *Yersinia pestis* και στο φυτικό παθογόνο *Pseudomonas syringae* (Paulsen et. al., 1997; Blocker et. al., 2008). Η συριγγώδης δομή αποτελείται από μια σειρά βασικών δακτυλίων, οι οποίοι διαπερνούν την βακτηριακή εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη και συνδέονται με μια βελονοειδή (στο *Yersinia*), νηματοειδή (στο *Salmonella*) ή τριχοειδή δομή (στο *P. syringae*). Σε κάθε μια από αυτές τις δομές, υπάρχει ένας πόρος μεταφοράς, ο οποίος εισέρχεται στην πλασματική μεμβράνη του κύτταρου στόχου (Cornelis, 2006; Blocker et. al., 2008).

Μια συντηρημένη ATPάση συνδέεται με την βακτηριακή κυτοπλασματική βάση της συριγγώδους δομής και ενεργοποιεί τη μεταφορά. Δυο κατηγορίες μοριακών συνοδών, στοχεύουν στον σχηματισμό της συριγγώδους δομής, ενώ μια τρίτη κατηγορία βοηθά στην μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών (Cornelis, 2006).

1.2.5 Εκκριτικό σύστημα τύπου IV

Σε σύγκριση με τα άλλα εκκριτικά συστήματα, το εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS) είναι μοναδικό, όσον αφορά την ικανότητα του, να μεταφέρει νουκλεϊκά οξέα επί προσθέτως των πρωτεϊνών, στα φυτικά και ζωικά κύτταρα, καθώς επίσης και σε ζύμη και άλλα βακτήρια (Christie and Cascales, 2005). Το σύμπλεγμα T4SS μπορεί να διαπερνά και τις δυο μεμβράνες σε ένα Gram-αρνητικό βακτήριο ή την μεμβράνη και το κυτταρικό φάκελο ενός Gram-θετικού βακτηρίου (Tseng et. al., 2009).

Πολλοί οργανισμοί έχουν ομόλογα τύπου IV εκκριτικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Vir8), *Helicobacter pylori* (CAG;ComB), *Pseudomonas aeruginosa* (TraS/TraB), *Bordetella pertussis* (Ptl), *E. coli* (Tra), *Legionella pneumophila* (Dot) (Christie and Cascales, 2005) και το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό *Mesorhizobium loti* (Hubber et. al., 2007).

Παρόλο που αυτά τα συστήματα, μπορεί να μοιράζονται πολλές λειτουργικές ομοιότητες, δεν διαθέτουν όλα τα συστήματα τις ίδιες ομάδες γονιδίων (Saier, 2006). Η μόνη κοινή πρωτεΐνη, μεταξύ όλων των χαρακτηριζόμενων συστημάτων, είναι η VirB10 (Trbl) (Cao et. al., 2003). Παρόλο που το εκκριτικό σύστημα τύπου IV έχει κερδίσει την προσοχή, λόγω της σημασίας του στη παθογένεση, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν έχουν όλα τα βακτήρια T4SS εκκριτικό σύστημα (Tseng et. al., 2009).

Το *Agrobacterium tumefaciens* C58 ήταν το συστηματικό μοντέλο στο οποίο μελετήθηκε το T4SS. Το σύστημα VirB από το *A. tumefaciens* C58 έχει την ικανότητα να εξάγει DNA-πρωτεϊνικό σύμπλεγμα από το Tι πλασμίδιο του, μέσα στον ξενιστή (Christie and Cascales, 2005). Ο κύριος μολυσματικός μηχανισμός, έχει να κάνει με την εισαγωγή T-DNA στον ξενιστή, για να προκαλέσει αύξηση καρκίνου ή τον σχηματισμό όγκων κορωνοτού κάλλου, οι οποίοι στη συνέχεια παράγουν οπίνες όπως άνθρακα και ενεργειακές πηγές για το παθογόνο. Τα κύρια συστατικά του T4SS στο *A. tumefaciens* C58 είναι τα VirB2-VirB11 και VirD4. Το VirB1 είναι υπεύθυνο για τον επανασχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης μέσω της δράσης της λυτικής μετά-γλυκοσυλάσης (lytic transglycosylase).

Η πλειονότητα των VirB πρωτεϊνών είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό του δομικού συμπλέγματος του εκκριτικού μηχανισμού, ο οποίος ενεργοποιείται από την υδρόλυση του ATP (Tseng et. al., 2009).

1.2.6 Εκκριτικό σύστημα τύπου V

Υπάρχουν τρεις υποκατηγορίες του εκκριτικού μηχανισμού τύπου V (T5SS). Οι πρωτότυπες βακτηριακές πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του T5SS (οι οποίες αποτελούν την πρώτη υποκατηγορία T5Ass), περιέχουν μια N-τελική επιβατική περιοχή, μεγέθους 40 Kd έως 400 Kd και μια συντηρημένη C-τελική περιοχή, οι οποίες σχηματίζουν μια δομή καλούμενη το β-βαρέλι (Jacob-Dubuisson et. al., 2004; Dautin and Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson et. al., 2004).

Οι πρωτεΐνες συνδέονται με ένα N-τελικό πεπτιδίο οδηγό το οποίο κατευθύνει την εξαγωγή τους στο περιπλασματικό χώρο μέσω του Sec μηχανισμού. Το β-βαρέλι μπορεί να εισέλθει στην εξωτερική μεμβράνη και απαιτείται για την μεταφορά της επιβατικής περιοχής στον εξωκυττάριο χώρο. Σε μερικές περιπτώσεις, όπως παθολογικές προσφύσεις, η επιβατική περιοχή παραμένει προσκολλημένος στο β-βαρέλι και η πρωτεΐνη παραμένει προσκολλημένη στην εξωτερική μεμβράνη. Σε άλλες περιπτώσεις, οι επιβατικές περιοχές διασπώνται από το β-βαρέλι και σχηματίζουν ένα διαλυτό υδρολυτικό ένζυμο ή μια τοξίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται αυτό-μεταφορείς διότι, οι C-τελικές περιοχές σχηματίζουν ένα β-βαρέλι έχοντας την δυνατότητα να σχηματιστεί ένας πόρος, μέσω του οποίου, να μπορεί να περάσει η N-τελική περιοχή (Jacob-Dubuisson et. al., 2004; Dautin and Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson et. al., 2004).

Όμως, πρόσφατες έρευνες πάνω στη δομή έδειξαν ότι, το βαρέλι δεν μπορεί να μεταφέρει από μόνο του την N-τελική περιοχή (Bernstein, 2007). Μια βοηθός πρωτεΐνη, ίσως η Omp85/YaeT, είναι πιθανώς αυτή που διευκολύνει τη μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης (Bernstein, 2007). Μια δεύτερη υποκατηγορία πρωτεϊνών εκκρίνεται μέσω του T5SS, οι οποίες καλούνται T5cSS πρωτεΐνες και είναι τριμερής πρωτεΐνες στις οποίες σχηματίζεται ένα β-βαρέλι, από τις συνεισφορές και των τριών πολυπεπτιδίων. Η τρίτη υποκατηγορία των T5SS πρωτεϊνών, καλούμενες T5Bss, αποτελούνται από ζεύγη πρωτεϊνών στα οποία, το ένα μέρος έχει την περιοχή β-βαρέλι, και το άλλο αποτελεί την εκκρινόμενη πρωτεΐνη. Αυτή η διαδικασία είναι επίσης γνωστή και ως έκκριση δυο συνοδών (two partner secretion, TPS) (Jacob-Dubuisson et. al., 2004).

Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών εκκρίνεται μέσω του T5SS, περισσότερες αυτών του T2SS, πάνω από 500 μόνο στην υποκατηγορία T5Ass (Jacob-Dubuisson et. al., 2004; Dautin and Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson et. al., 2004).

Οι περισσότερες από τις T5SS εκκρινόμενες πρωτεΐνες που χαρακτηρίστηκαν μέχρι σήμερα συνεισφέρουν στη μολυσματικότητα των ζωικών ή ανθρώπινων παθογόνων (Jacob-Dubuisson et. al., 2004; Dautin and Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson et. al., 2004). Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του T5SS περιλαμβάνουν παθολογικές προσφύσεις όπως το AIDA-I και το Ag43 του *E. coli*, Hia του *Haemophilus influenza*, YadA του *Yersinia enterocolitica* και Prn του *Bordetella pertussis*; τοξίνες όπως η VacA του *Helicobacter pylori*; πρωτεάσες όπως η IgA πρωτεάση των *Neisseria gonorrhoeae* και *Neisseria meningitidis*, SepA του *Shigella flexneri* και PrtS του *Serratia marcescens*; και S-layer πρωτεάσες όπως η rOmpB του *Rickettsia sp.* και Hsr του *Helicobacter pylori* (Tseng et. al., 2009). Οι T5bSS (TPS) εκκρινόμενες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν προσκολλητικά όπως Heca/HecB του φυτοπαθογόνου *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemii*) και κυτολυσίνες όπως η ShIA/ShIB του *Serratia marcescens*, HpmA/HpmB του *Proteus mirabilis* και EthA/EthB του *Edwardsiella tarda* (Tseng et. al., 2009).

1.2.7 Εκκριτικό σύστημα τύπου VI

Ο εκκριτικός μηχανισμός τύπου VI (T6SS), είναι ένα πρόσφατο χαρακτηρισμένο εκκριτικό σύστημα, το οποίο φαίνεται ότι αποτελείται από μια σηραγγώδη δομή, η οποία έχει τη δυνατότητα να εισάγει, όπως και στην περίπτωση των T3SS και T4SS συστημάτων, πρωτεΐνες τελεστές κατευθείαν μέσα στο κυτόπλασμα των ξενιστών κυττάρων (Bingle et. al., 2008; Shrivastava and Mande, 2008; Cascales, 2008; Filloux et. al., 2008). Ο T6SS μηχανισμός, αρχικά παρατηρήθηκε ως μια συντηρημένη οικογένεια σε νησίδες παθογένειας στα Gram-αρνητικά βακτήρια και κατόπιν, χαρακτηρίστηκε ως εκκριτικός μηχανισμός που κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Περισσότερο από το ένα τέταρτο των αλληλουχιμένων βακτηριακών γονιδιωμάτων, περιέχουν γονίδια για τα συστατικά του T6SS, κυρίως ανάμεσα στα πρωτεοβακτήρια, αλλά και ανάμεσα στους πλανκτομύκητες και ασιδομύκητες (Tseng et. al., 2009).

Το T6SS είναι απαραίτητο για την μολυσματικότητα στα ανθρώπινα και ζωικά παθογόνα όπως τα *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* και *Burkholderia mallei*, καθώς επίσης στα φυτοπαθογόνα όπως τα *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* και *Xantomonas oryzae* (Bingle et. al., 2008; Shrivastava and Mande, 2008; Cascales, 2008; Filloux et. al., 2008; Liu, 2008; Wu, 2008).

Επιπλέον, απαιτείται για τον αποικισμό της ρίζας από τα αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά *Mesorhizobium loti* και *Rhizobium leguminosarum*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, γονίδια που κωδικοποιούν το T6SS, βρέθηκαν επίσης και σε μερικά μη-συμβιωτικά όπως το *Myxococcus xanthus*, το *Dechloromonas aromatica* και το *Rhodopirellula baltica*, το οποίο μπορεί να συμβάλει στην προσαρμογή τους στο περιβάλλον, όπως με τον σχηματισμό βιοφίλμ (Tseng et. al., 2009).

Βασιζόμενοι σε πειραματικές αποδείξεις, καθώς επίσης και σε ομοιότητες στην αλληλουχία με μερικά συστατικά του T4SS και από το σύμπλεγμα του T4 βακτηριοφάγου, προτάθηκε ένα μοντέλο για την σηραγγώδη δομή του T6SS, το οποίο περιλαμβάνει έναν κυτοπλασματικό μοριακό συνοδό με ATP δραστηριότητα, ένα κανάλι γεφύρωσης από την εσωτερική στην εξωτερική μεμβράνη και μια βελονοειδή δομή που στην κορυφή της έχει μια πρωτεΐνη σχηματισμό πόρου (Shrivastava and Mande, 2008). Μερικά συστατικά του μηχανισμού μπορούν επίσης να δρουν ως τελεστές, μεταφερόμενοι μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Για παράδειγμα το VgrG-1, το οποίο είναι συστατικό του *Vibrio cholerae* T6SS, περιέχει μια C-τελική περιοχή η οποία μπορεί να εισέρχεται στους μακροβακτηριοφάγους όπου διασταυρώνεται με ακτίνη (Pukatzki et. al., 2007). Παρόλα ταύτα, τα ιδιαίτερα γνωρίσματα και οι λειτουργίες των T6SS παραγόντων μας είναι ακόμα άγνωστες.

1.2.8 Εκκριτικό σύστημα τύπου VII

Παρόλο που τα Gram-θετικά έχουν μόνο μια μεμβράνη, ορισμένα είδη, με πιο αξιοπρόσεκτα από αυτά τα μυκοβακτήρια, έχουν ένα κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται από πολλά λιπίδια, καλούμενο μυκομεμβράνη (Tseng et. al., 2009). Σαν αποτέλεσμα, το γονιδίωμα αυτών των ειδών κωδικοποιεί μια οικογένεια εξειδικευμένων εκκριτικών συστημάτων που καλείται εκκριτικό σύστημα τύπου VII (T7SS) (Abdallah et. al., 2007). Η παρουσία του T7SS, αρχικά ανακαλύφθηκε βιοπληροφορικά βάση της ομαδοποίησης των γονιδίων που κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες, τα οποία στερούνται πεπτιδίων οδηγών, με αυτά που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες, ATPάσες και/ή μοριακών συνοδών (Tseng et. al., 2009).

Η υπόθεση αυτή, επιβεβαιώθηκε, προσδιορίζοντας την αλληλουχία του στέλεχος του εμβολίου *Mycobacterium bovis* BCG και με τις συμβιωτικές αναλύσεις της συστάδας ESX-1 στο *M. Tuberculosis*. Το ESX-1 είναι επίσης απαραίτητο για την μολυσματικότητα και την αιμόλυση, στο παθογόνο ψαριού *Mycobacterium marinum* και για την συζυγία στα μη-παθγόνα είδη *Mycobacterium smegmatis* (Abdallah et. al., 2007). Τα μυκοβακτηριακά γονιδιώματα περιέχουν έως και πέντε T7SS συστάδες γονιδίων τα οποία δεν λειτουργούν συμπληρωματικά το ένα με το άλλο. Συστάδες γονιδίων T7SS βρέθηκαν επίσης στα στενά συσχετισμένα παθγόνα *Corynebacterium diphtheria* και *Nocardia* (Abdallah et. al., 2007). Συστάδες γονιδίων με μικρότερο συσχετισμό, βρέθηκαν επίσης στο γονιδίωμα παθογόνων και μη Gram-θετικών ειδών, τα οποία στερούνται μυκομεμβρανών, όπως τα είδη *Streptomyces* και *firmicutes*, τα *Bacillus* και *Clostridium* spp., τα *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* και *Listeria monocytogenes*. Το T7SS απαιτείται για την μολυσματικότητα στο *Staphylococcus aureus* αλλά όχι στο *Listeria monocytogenes* (Abdallah et. al., 2007).

Η δομή και η λειτουργία του T7SS βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη. Πρόσφατα μοντέλα, υποδεικνύουν ένα εσωτερικό μεμβρανικό κανάλι μεταφοράς, που σχηματίζεται από την ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη Rv3877 και ένα ξεχωριστό κανάλι στην μυκομεμβράνη που αποτελείται από πρωτεΐνη/πρωτεΐνες που προς το παρόν μας είναι άγνωστη/ες (Abdallah et. al., 2007). Οι Chaperone-like ATPάσες προσκολλούνται στην εσωτερική μεμβράνη και δεσμεύουν τα C-τελικά των τελεστών, τα οποία εκκρίνονται αμετάβλητα ως ετεροδιμερή (Tseng et. al., 2009).

Βιοπληροφορική

2.1 Γενικά

Τα τελευταία έτη οι υπολογιστές κατακτούν σημαντική θέση σε κάθε τομέα της ζωής μας αλλά και σε αρκετούς τομείς διάφορων επιστημών. Η βιοπληροφορική, αποτελεί ένα σύγχρονο τομέα έρευνας και ανάπτυξης τόσο για τους μοριακούς βιολόγους όσο και για τους επιστήμονες της πληροφορικής. Η συνεργασία των δύο αυτών επιστημών χαρακτηρίζεται αρκετά υποσχόμενη και με ιδιαίτερη σημασία αφού έρχεται να ρίξει φως στην ερμηνεία και το ρόλο της γονιδιακής πληροφορίας και κατ' επέκταση σε αρκετές διαδικασίες της ζωής που ζητούν ερμηνεία (<http://www.wikia.com/Wikia>).

Η βιοπληροφορική είναι η επιστήμη, η οποία παρέχει τα εργαλεία και τις μεθόδους τα οποία υποστηρίζουν την ανάγκη για την εκμετάλλευση υπολογιστικής ισχύος και την εξαγωγή γνώσης από βιολογικά δεδομένα. Η έρευνα σε αυτήν την περιοχή, περιλαμβάνει την ανάλυση γενετικής/γονιδιωματικής πληροφορίας, με στόχο την πρόβλεψη, ή τον ακριβή καθορισμό βιολογικών λειτουργιών. Για το σκοπό αυτό, συνδυάζονται πολλές επιστήμες από διαφορετικές περιοχές, όπως Γονιδιωματική, Πληροφορική, Φαρμακευτική, Μοριακή Βιολογία, Στατιστική, Φυλογενετική κλπ. (Baxevanis et al., 2001; Krane et al., 2003).

Τα βασικά βήματα για να εφαρμοστεί η Βιοπληροφορική, είναι αρχικά η αποδοτική οργάνωση των δεδομένων ώστε να είναι δυνατή η αποθήκευση, η ανάκτηση και η ενημέρωσή τους. Κατά δεύτερον, να υπάρχουν τα κατάλληλα εργαλεία που να επιτρέπουν την ανάλυση των βιολογικών δεδομένων (για παράδειγμα, η ακολουθία μιας πρωτεΐνης, να μπορεί να συγκριθεί με ήδη ταυτοποιημένες ακολουθίες). Τέλος, να υπάρχουν εργαλεία που να επιτρέπουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων βιολογικής σημασίας (Krane et al., 2003; Seringhaus et al., 2007).

Ένας βασικός τομέας της βιοπληροφορικής, είναι η χρήση των υπολογιστών για την τέλεση πειραμάτων και την εξαγωγή αποτελεσμάτων από αυτά. Σήμερα, λόγω της ανάπτυξης της τεχνολογίας των γραφικών και επειδή υπάρχουν πανάκριβα μηχανήματα, κυρίως Μοριακής Βιολογίας, είναι δυνατή, η απεικόνιση των διαμορφώσεων της δομής των βιολογικών μορίων στην οθόνη του υπολογιστή. Τέτοια μηχανήματα, είναι και αυτά με τα οποία έγινε η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η αποκρυπτογράφηση του DNA. Η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ανθρώπου έχει συμβάλει ουσιαστικά στην προώθηση της

βιολογική αυτογνωσίας του με σημαντικότερες εφαρμογές στο επίπεδο της υγείας, αλλά και στην κατανόηση της εξέλιξής του (<http://www.wikia.com/Wikia>).

Ένας άλλος μεγάλος τομέας της Βιοπληροφορικής είναι οι βάσεις δεδομένων. Με την αποκωδικοποίηση του DNA και των πρωτεϊνών του ανθρώπου αλλά και πάρα πολλών άλλων οργανισμών δημιουργήθηκαν μεγάλες βάσεις δεδομένων για την καταγραφή τους (<http://www.wikia.com/Wikia>).

Χαρακτηριστικός είναι ο αριθμός των βάσεων που είναι καταχωρημένες στις τρεις μεγάλες βάσεις δεδομένων που αφορούν το DNA (Genbank, EMBL, DDBJ) ο οποίος ξεπερνάει αυτήν την στιγμή τα 20 τρισεκατομμύρια. Άμεση βέβαια είναι η ανάγκη για εργαλεία-λογισμικά πληροφορικής τα οποία θα χειριστούν και ταξινομήσουν την πληροφορία αυτή και ταυτόχρονα θα εξαγάγουν περισσότερα συμπεράσματα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η πληροφορία που καταγράφεται, αυξάνει μέρα με τη μέρα και δεν έχει τελειώσει με την αποκρυπτογράφηση του DNA του ανθρώπου, καθώς υπάρχουν πάρα πολλοί άλλοι οργανισμοί που δεν έχουν αποκρυπτογραφηθεί, αλλά και πολλά γονίδια που πρέπει να ερευνηθούν από διαφορετικούς ανθρώπους, για υπάρξουν συμπεράσματα για διάφορες ασθένειες (<http://www.wikia.com/Wikia>).

Έτσι, γίνεται κατανοητό πως ο μεγάλος αριθμός δεδομένων που μεταφράζονται στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας και ειδικότερα στον τομέα της ακολουθοποίησης του γονιδιώματος (δηλαδή της αλληλουχίας του DNA), αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους επιστήμονες του σχεδιασμού και της ανάλυσης αλγορίθμων (Baxevanis et al., 2001; Lengauer, 2001; Pancoska, 2006; Veljkovic et al, 2007).

Ένας άλλος τομέας της Βιοπληροφορικής είναι η Δομική Βιολογία ή αλλιώς η παρουσίαση των δομών διάφορων βιολογικών μακρομορίων. Να διευκρινιστεί ότι, η γνώση της δομής στο χώρο των μακρομορίων αυτών, είναι αυτή που θα δώσει την απάντηση σε πάρα πολλές ασθένειες καθώς οι περισσότερες οφείλονται σε προβληματική λειτουργία των πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτές. Η Βιοπληροφορική, ασχολείται τόσο με την απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής που έχει προκύψει από πειραματικά δεδομένα, όσο και με την πρόβλεψή της με διάφορους αλγόριθμους που έχει υποτεθεί ότι ισχύουν για τις δομές των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση των τρισδιάστατων δομών, χρειάζονται εξαιρετικά ισχυροί ηλεκτρονικοί υπολογιστές και είναι ένας τομέας που οδηγεί τους κατασκευαστές των υπολογιστών σε όλο και πιο νέες και πιο δυνατές τεχνολογίες (Μαρμάρας et al., 2000; Gonzalez-Diaz et al., 2007; Latek et al., 2007; Zhong et al., 2007; Veljkovic et al, 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, προκύπτει ότι οι εφαρμογές της Βιοπληροφορικής συνοψίζονται στην ανεύρεση της λειτουργίας των πρωτεϊνών, ομαδοποίηση πρωτεϊνών σε λειτουργικές ομάδες, ανεύρεση αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών μεταξύ τους και κατανόηση της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων, στη σύγκριση του γονιδιώματος διαφόρων ειδών, και στην εύρεση των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών μεταξύ τους, στην απόκτηση γνώσης για το ρόλο των μη κωδικοποιημένων περιοχών του DNA στη μορφολογία και έκφραση των γονιδίων, στην προσπάθεια αντιμετώπισης διαφόρων ασθενειών με την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μέτρων και θεραπευτικών μεθόδων, στην παραγωγή πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών προϊόντων με όλο και περισσότερες εφαρμογές τα επόμενα έτη στην Βιολογία και στην Ιατρική (Gusfield, 1999; Lengauer, 2001; Krane et al., 2003; Kell, 2006; Pancoska, 2006; Lieu et al., 2007).

Οι μελλοντικές επιδιώξεις εστιάζονται στο υπάρχον έλλειμμα υπολογιστικής ισχύος που δεν καλύπτει τη βιολογική πολυπλοκότητα. Γι' αυτό, «επιστρατεύεται» η Βιοχημεία για το σχεδιασμό βιοχημικών δικτύων και η Φυσικοχημεία για την καλύτερη κατανόηση των μικρών διαστάσεων του κυττάρου και των οργανιδίων του.

Ένας νέος λοιπόν συντονισμός, βιολόγων, φυσικών, χημικών και πληροφορικών ίσως οδηγήσει σε μια νέα επιστημονική σύνθεση.

Το μέλλον θα προχωρήσει με τη δημιουργία λογισμικών που θα απεικονίζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών και την αποκαλούμενη «έκφραση των γονιδίων» (ασθένειες), κατασκευή υπολογιστών στους οποίους θα έχει αντικατασταθεί η μνήμη με ζωντανά νευρικά κύτταρα, κάτι που θα πλαισιωθεί με τη δημιουργία νέων ειδικοτήτων, όπως αυτή του βιολόγου-λογισμικού, του ιατρού-προγραμματιστή, του δικτυακού-οικονομολόγου (Αλαχιώτης, 2003; Krane et al., 2003; de Silva et al., 2006; Perez-Iratxeta et al., 2006).

2.2 Πεπτίδιο οδηγός και εργαλεία βιοπληροφορικής

Η παρουσία ενός N-τελικού πεπτιδίου οδηγού δείχνει ότι μια πρωτεΐνη γίνεται στόχος στην κυτοπλασματική μεμβράνη (Desvaux et. al., 2009). Με τη βοήθεια υπολογιστή, προβλέψεις που έχουν να κάνουν με τα πεπτίδια οδηγούς συμφωνούν με τις πειραματικές αποδείξεις (Desvaux et. al., 2007).

Για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων οδηγών, υπάρχουν πολλά καλά καθιερωμένα εργαλεία βιο-πληροφορικής, όπως ο δημοφιλής SignalP server (Bendtsen et. al., 2004). Όμως, η ταυτοποίηση ενός τέτοιου N-τελικού πεπτιδίου οδηγού πολλές φορές ερμηνεύεται λανθασμένα, ως ένας δείκτης ενός εξωκυττάριου εντοπισμού στην medium καλλιέργεια (Desvaux et. al., 2009).

Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι, η παρουσία ενός N-τελικού πεπτιδίου οδηγού, συστηματικά δεν υποδεικνύει ότι μια πρωτεΐνη γίνεται στόχος στο Sec σύστημα (Desvaux et. al., 2009). Μερικά πεπτίδια οδηγοί, μπορούν να στοχεύουν πρωτεΐνες στο Tat ή στο FPE, με το τελευταίο να μετέχει στην ικανότητα συγκέντρωσης ψευδο-τριχιδίων στα μονοδερμή βακτήρια (Chen et. al., 2006)

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του Sec μεταφορέα μπορούν να προσκολληθούν στην κυτοπλασματική μεμβράνη (πχ. IMPs ή οι λιποπρωτεΐνες), να απελευθερωθούν στον περιπλασματικό χώρο στα διδερμή βακτήρια, να ενωθούν ομοιοπολικά ή μη με το κυτταρικό τοίχωμα στα μονοδερμή βακτήρια (πχ. LPXTG πρωτεΐνη ή GW πρωτεΐνες) ή να προσκολληθούν στην εξωτερική μεμβράνη στα διδερμή κύτταρα (πχ. μερικές αυτό-μεταφερόμενες πρωτεΐνες ή λιποπρωτεΐνες). Έτσι, για την τελική πρόβλεψη όσον αφορά τον εντοπισμό της πρωτεΐνης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όλες οι πιθανότητες (Desvaux et. al., 2009) (Desvaux and Hébraud, 2008).

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι, οι μεταφερόμενες πρωτεΐνες μέσω του Sec μπορεί να μην υποδεικνύουν απαραίτητα ένα N-τελικό πεπτίδιο οδηγό, όπως προτάθηκε, για την SecA2-εξαρτώμενη έκκριση μερικών πρωτεϊνών, στα μονοδερμή βακτήρια (Desvaux et. al., 2009; Braunstein et. al., 2003).

Τέλος, για την πρόβλεψη της τελικής θέσης μιας πρωτεΐνης, πρέπει να γίνουν επιπλέον αναλύσεις συνδυάζοντας διαφορετικά εργαλεία πρόβλεψης με λογικό τρόπο (Desvaux and Hébraud, 2008).

Μεταξύ αυτών, το LocateP είναι σίγουρα ένα από τα τελευταία και πιο αναλυτικά εργαλεία που αναπτύχτηκαν (Zhou et al., 2008).

Αζωτοδέσμευση
και
Azotobacter vinelandii

3.1 Η αζωτοδέσμευση

Το άζωτο αποτελεί ένα εκ των βασικότερων χημικών στοιχείων που ανευρίσκονται στη φύση, δεδομένης της παρουσίας του σε πολλά βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα και ορισμένα συνένζυμα. Η ατμόσφαιρα της γης περιέχει 78% άζωτο και είναι η κύρια πηγή παροχής του στοιχείου αυτού. Το γεγονός όμως ότι στη μορφή που παρέχεται από την ατμόσφαιρα δεν είναι αφομοιώσιμο από τους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, οδήγησε αφ' ενός ορισμένους οργανισμούς εξελικτικά να αναπτύξουν ειδικά ενζυμικά συστήματα για τη μετατροπή του αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή (βιολογική αζωτοδέσμευση) και αφ' ετέρου στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των ανθρώπινων πρακτικών (επιστήμες χημείας, γεωπονίας κ.τ.λ.) για την εξασφάλιση αφομοιώσιμων πηγών αζώτου.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από φυλογενετικά διαφορετικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίοι ανήκουν στις οικογένειες των βακτηρίων και των αρχαίων (Eady, 1991; Young, 1992). Οι διαφορετικές απαιτήσεις που παρουσιάζουν οι οργανισμοί αυτοί για την ανάπτυξή τους, αποκλείουν την απόπειρα ταυτόχρονης ανάπτυξής τους (Knowles and Baraqqio, 1994; Weaver and Graham, 1994). Επιπλέον η αδυναμία ανάπτυξης ορισμένων τέτοιων οργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο (Roszak and Colwell, 1987) καθιστούν αδύνατη την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών.

Η παραγωγή αζώτου από τους παραπάνω οργανισμούς υπολογίζεται περί τα 2×10^{13} g/χρόνο (Falkowski, 1997). Η αντίστοιχη ποσότητα αζώτου που προέρχεται από την εκκένωση ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών φορτίων υπολογίζεται στα 10^{12} με 10^{13} g/χρόνο. Η ικανότητα αζωτοδέσμευσης των οργανισμών αυτών οφείλεται στο ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Δεδομένου ότι η λειτουργία του συστήματος αυτού απαιτεί την υδρόλυση 16 ATP για την παραγωγή ενός μορίου αζώτου, είναι προφανές ότι ενεργειακά πρόκειται για ένα εξαιρετικά απαιτητικό ενζυμικό σύστημα (Simpson and Burris, 1984).

Οι σημαντικότεροι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί είναι αυτοί που δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά. Στους μικροοργανισμούς αυτούς (ριζόβια) περιλαμβάνονται βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Azorhizobium* και επίσης στο γένος *Frankia*. Τα ριζόβια επάγουν το σχηματισμό φυματίων της οικογένειας των ψυχανθών (*Leguminosae*, *Fabaceae*).

Υπολογίζεται ότι το ετήσιο κέρδος του εδάφους σε άζωτο από το σχηματισμό φυματίων είναι μεταξύ 57 και 600 Kg/ha. Το *Frankia* είναι ένας νηματοειδής Gram θετικός μύκητας που επάγει το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά των οικογενειών *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* και *Datisticaceae* (Benson and Clawson, 2000; Benson and Silvester, 1993).

Υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη και άλλων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα κυανοβακτήρια *Tricodesmium* τα οποία αναπτύσσονται στα ολιγοτροφικά ενδιαιτήματα των ωκεανών (Zehr et al., 1998). Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι το πρωτεοβακτήριο *Methylobacterium* επάγει το σχηματισμό φυματίων στο *Crotalaria* καθώς επίσης και β-πρωτεοβακτήρια συγγενικά του *Burkholderia* με τα φυτά *Machaerium lunatum* και *Aspalathus carnosus* (Sy et al., 2001; Chen et al., 2003).

3.2 Βιολογική αζωτοδέσμευση και μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης

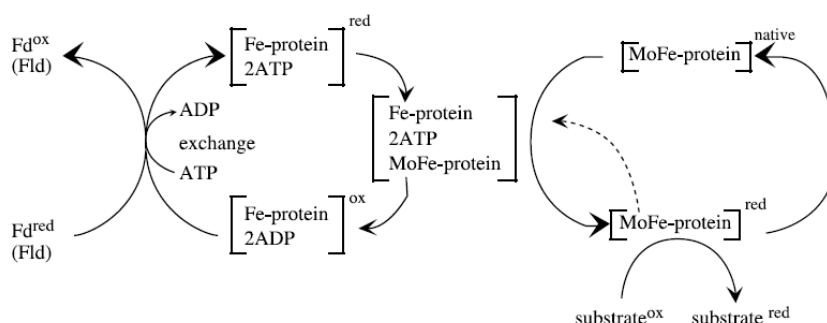
Όπως αναφέρθηκε ήδη, η βιολογική αζωτοδέσμευση είναι μια διαδικασία η οποία εκτελείται τόσο από προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι οργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα πραγματοποίησης της συγκεκριμένης λειτουργίας διαθέτουν το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης (Burgess and Lowe, 1996; Rees and Howard, 2000; Lawson and Smith, 2002; Seefeldt et al., 2004). Η νιτρογενάση αποτελείται από δύο υπομονάδες (μεταλλοπρωτεΐνες) εκ των οποίων η μία περιέχει σίδηρο (Fe-protein) και η δεύτερη περιέχει μολυβδένιο και σίδηρο (MoFe-protein). Υπάρχουν βέβαια αναφορές και για εναλλακτικού τύπου νιτρογενάσες στις οποίες το Mo αντικαθίσταται από βανάδιο ή σίδηρο (Eady, 1996).

Η MoFe υπομονάδα (MoFe-protein) αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης και καταλύει τη μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία, μία αντίδραση που για την πραγματοποίησή της απαιτεί ATP. Πρόκειται για ένα τετραμερές 240 kDa, οι υπομονάδες ($\alpha_2\beta_2$) του οποίου κωδικοποιούνται από τα γονίδια *nifD* και *nifK*. Ανά μόριο περιέχει 2 άτομα Mo, 30 άτομα Fe και 32 άτομα S τα οποία κατανέμονται σε αντίστοιχα Mo-FeS σύμπλοκα (Eady, 1996).

Η Fe υπομονάδα (Fe-protein) του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης είναι διμερές με την κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος περίπου 60 kDa, κωδικοποιείται από το γονίδιο *nifH* και μεσολαβεί στην υδρόλυση του ATP για την παροχή ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης.

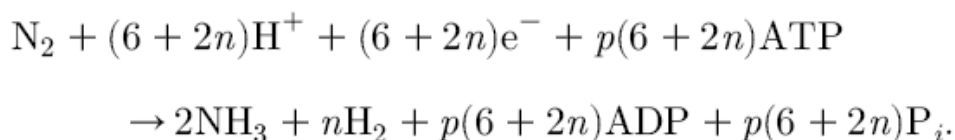
Η συγκεκριμένη υπομονάδα περιέχει ένα σύμπλοκο [4Fe-4S] ανά διμερές και μπορεί να δράσει ως δότης ηλεκτρονίων κατά την αναγωγή του υποστρώματος (Eady, 1996).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ο μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης (Thorneley and Lowe, 1985; Burgess and Lowe, 1996) περιλαμβάνει: i) Σύνδεση μεταξύ της Fe υπομονάδας με δύο μόρια ATP και της MoFe υπομονάδας, ii) μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των πρωτεϊνών οι οποίες είναι συζευγμένες με το ATP, iii) αποδέσμευση της Fe υπομονάδας συνοδευόμενη από εκ νέου αναγωγή μέσω φερεδοξίνης (Fd) ή φλαβοδοξίνης (Fld) και μετατροπή του ATP σε ADP και iv) επανάληψη των προηγούμενων διαδικασιών μέχρι τη συσσώρευση επαρκούς συγκέντρωσης ηλεκτρονίων και πρωτονίων ώστε να αναχθούν εκ νέου διαθέσιμα υποστρώματα (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της νιτρογενάσης κατά την πραγματοποίηση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Στο σχήμα, φαίνεται η ροή ηλεκτρονίων από μόρια μεταφορείς όπως η φερεδοξίνη (Fd) και η φλαβοδοξίνη (Fld) στην Fe υπομονάδα (αριστερά), η μεταφορά ηλεκτρονίων από την Fe υπομονάδα στην MoFe υπομονάδα, σε συνδυασμό με την υδρόλυση του ATP (κέντρο) και η επακόλουθη αναγωγή των εκάστοτε υποστρωμάτων, με την επιστροφή της MoFe υπομονάδας στην αρχική της μορφή

Η πιθανή στοιχειομετρία (ακόμη δεν έχει καθοριστεί επακριβώς) της συνολικής αντίδρασης αναγωγής του μοριακού αζώτου η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης, παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση (Rees and Howard, 2000):



Σύμφωνα με την παρουσίαση του προηγούμενου μοντέλου, θα πρέπει $n=1$ και $p=2$. Παρ' όλα αυτά, υπό φυσιολογικές πειραματικές συνθήκες υπολογίζεται ότι $n>1$ και $p>2$ (Eriksson et al., 1999).

Τέλος, αναφέρεται ότι το μοριακό οξυγόνο μπορεί να δράσει μη αντιστρεπτά παρεμποδιστικά ως προς την πραγματοποίηση της ως άνω αντίδρασης, απενεργοποιώντας και τα δύο σύμπλοκα της νιτρογενάσης. Επιπλέον, η νιτρογενάση έχει υπό προϋποθέσεις την ικανότητα να καταλύει διάφορες αντιδράσεις όπως η αναγωγή πρωτονίων προς μοριακό υδρογόνο ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$) και η αναγωγή αιθυλενίου $\text{C}_2\text{H}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$ (Heldt, 1999).

3.3 Το γένος *Azotobacter*

Το γένος *Azotobacter* περιλαμβάνει αρνητικούς κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιους και ελεύθερα διαβιούντες (μη συμβιωτικούς) οργανισμούς, ικανούς να δεσμεύουν N_2 . Το γένος *Azotobacter* ανήκει στη γ υποδιαίρεση της ομάδας των πρωτεοβακτηρίων των ευβακτηρίων και περιλαμβάνει εννέα είδη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με κυριότερα από αυτά, το *Azotobacter vinelandii* και το *Azotobacter chroococcum* (Brock, 2005). Το γένος *Azotobacter* ανήκει στην οικογένεια των Azotobacteraceae και περιλαμβάνει δυο γένη, το *Azotobacter* και το *Azomonas*. Όπως αναφέρθηκε και πριν, τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* είναι υποχρεωτικώς αερόβια, η πλειονότητα των οποίων, διαβιούν ελεύθερα στο έδαφος και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν βιολογικά το άζωτο. Ωστόσο, απαντώνται και κάποια στελέχη, που έχουν την ικανότητα να συμβιώνουν με ανώτερα φυτά, όπως για παράδειγμα το *Azotobacter paspali*, το οποίο συμβιώνει με το τροπικό είδος χλόης *Paspalum notatum* (Boddey et al., 1983).

Χαρακτηρίζονται από μεγάλα κύτταρα, διαμέτρου 2-4 μm ή και μεγαλύτερα και μορφολογίας που κυμαίνετε από ραβδόμορφα έως κοκκόμορφα. Μερικά στελέχη είναι αυτοκινούμενα, διαθέτοντας περίτριχα μαστίγια και μπορούν να σχηματίσουν ληθαργικές μορφές οι οποίες ονομάζονται κύστες. Επίσης, πολλά από αυτά παράγουν υδατοδιαλυτές ή μη χρωστικές (Brock, 2005). Όπως και τα ενδοσπόρια των βακτηρίων, οι κύστες του *Azotobacter* έχουν αμελητέα ενδογενή αναπνοή και είναι ανθεκτικές στην αποξήρανση, τη μηχανική αποδόμηση, την υπεριώδη και την ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Όμως σε αντίθεση με τα ενδοσπόρια, δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στη θερμότητα και δεν βρίσκονται σε απόλυτο λήθαργο, διότι οξειδώνουν ταχύτατα εξωγενείς πηγές ενέργειας (Brock, 2005). Επίσης, πολλοί αντιπρόσωποι του γένους *Azotobacter* παράγουν πολυσακχαρίδια. Παρά το γεγονός ότι το *Azotobacter* είναι υποχρεωτικά αερόβιο, το ενζυμικό σύστημα που διαθέτει για τη βιολογική δέσμευση N_2 του είναι ευαίσθητο στο O_2 . Πιστεύεται ότι, ο χαρακτηριστικός για το *Azotobacter* υψηλός ρυθμός αναπνοής και η πλούσια γλοιώδης στοιβάδα της κάψας, βοηθούν στην προστασία του ενζυμικού αυτού συστήματος από το O_2 . Το *Azotobacter* μπορεί να αναπτύσσεται με μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων, αλκοολών και οργανικών οξέων. Ο μεταβολισμός ενώσεων του άνθρακα, είναι αυστηρά οξειδωτικός και σπάνια παράγονται οξέα ή άλλα προϊόντα ζύμωσης. Όλα τα στελέχη του γένους *Azotobacter*,

είναι ικανά να δεσμεύουν N_2 ενώ αναπτύσσονται και με απλές μορφές δεσμευμένου αζώτου όπως η αμμωνία, η ουρία και τα νιτρικά άλατα (Brock, 2005)

.Δεσμεύουν άζωτο σε ποσότητα, τουλάχιστον 10mg N_2 ανά g υδατάνθρακα που καταναλώνουν. Παρουσία πηγής αζώτου, αναπτύσσονται σε pH 4,8 έως 8,5 ενώ το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη τους και την αζωτοδέσμευση, είναι 7,0 με 7,5. Απαντώνται σε αλκαλικά και ελαφρώς όξινα εδάφη και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, είναι γύρω στους 32°C (Tchan, 1984).

Όλα τα στελέχη του *Azotobacter*, είναι θετικά στη δοκιμή της ουρίας, μία ιδιότητα που τα διαχωρίζει από τα στελέχη του *Azomonas*. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο, με την ικανότητα του *Azotobacter vinelandii* και του *Azotobacter chroococcum*, να χρησιμοποιούν ουρία ως πηγή αζώτου (Thompson and Skerman, 1979, Kennedy et al., 2003).

3.4 Χρήση των βακτηρίων του γένους *Azotobacter* στη γεωργία

Πολλοί ερευνητές από τις αρχές του αιώνα, μελέτησαν την επίδραση των βακτηρίων του γένους *Azotobacter* στην ανάπτυξη και στις επιδόσεις διαφόρων ειδών καλλιεργούμενων φυτών (Brown, 1974). Τα βακτήρια αυτά, παρουσίαζαν και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εξαιτίας της ικανότητάς τους να αζωτοδεσμεύουν, δίνοντας έτσι την ελπίδα ότι, οι πληθυσμοί που θα αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα θα εφοδιάζουν τα φυτά με το απαιτούμενο άζωτο. Συγκεκριμένα, μετά το 1962 το ενδιαφέρον για τις εφαρμογές του *Azotobacter* στη γεωργία αυξήθηκε και πολλοί ερευνητές σχεδίασαν αναλυτικά πειράματα τα οποία αποδεικνύουν τη θετική επίδραση των βακτηρίων στα διάφορα καλλιεργούμενα είδη (Brown, 1974). Αναφέρεται ότι, παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή, όταν οι εφαρμογές γίνονται σε γόνιμα εδάφη, με προσθήκη μετάλλων και υγρασία στα επίπεδα της υδατοχωρητικότητας, παρά σε φτωχά εδάφη χωρίς την κατάλληλη υγρασία (Brown, 1974).

Αρχικά, η ευνοϊκή επίδραση του *Azotobacter*, αποδόθηκε στον εμπλουτισμό του εδάφους με άζωτο, μεταγενέστερες όμως παρατηρήσεις, οδήγησαν τους διάφορους ερευνητές στην απόρριψη της παραπάνω υπόθεσης. Οι κυριότεροι λόγοι ήταν ότι, ο πληθυσμός του *Azotobacter* στη ριζόσφαιρα ήταν σε πολλές περιπτώσεις περιορισμένος, η περιορισμένη ικανότητα του *Azotobacter* να χρησιμοποιεί ικανοποιητικά τα συνήθη υπολείμματα καλλιεργειών, η έλλειψη κατάλληλων πηγών

άνθρακα και ενέργειας σε επαρκείς ποσότητες, η αύξηση των αποδόσεων σε εδάφη πλούσια σε άζωτο και τέλος, η παρατήρηση ανάλογων αποτελεσμάτων από την εφαρμογή σε φυτά, μη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Blaine, 1993).

Είναι φανερό ότι, τα αίτια της ευνοϊκής επίδρασης του *Azotobacter* πρέπει να αναζητηθούν σε άλλους τρόπους δράσης του βακτηρίου. Με βάση πειραματικά αποτελέσματα, το *Azotobacter* βρέθηκε ότι επιδρά στην αλλαγή του μικροβιακού πληθυσμού της ριζόσφαιρας καθώς επίσης και στην καταστολή διαφόρων ασθενειών.

Πιο αναλυτικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο εμβολιασμός με *Azotobacter* οδηγεί σε αύξηση του ολικού αριθμού των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας διαφόρων φυτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε θετική επίδραση όχι μόνο στον πληθυσμό, αλλά και στην ένταση της δραστηριότητας συγκεκριμένων βακτηρίων που σχετίζονται με την αμμωνιοποίηση, την νιτροποίηση και την αποσύνθεση της κυτταρίνης και χούμου στη ριζόσφαιρα. Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού στη ριζόσφαιρα (Rubenchik, 1963).

Σε πειράματα σιταριού, βρέθηκε ότι ο εμβολιασμός των φυτών με *Azotobacter*, είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένο αποικισμό των ριζών από βακτήρια και ακτινομύκητες. Μετά την πάροδο μιας εβδομάδας, οι πληθυσμοί και των δύο ομάδων αυξήθηκαν περισσότερο στα εμβολιασμένα φυτά, αργότερα όμως οι διαφορές αυτές εξαφανίστηκαν. Ο ολικός πληθυσμός της ριζόσφαιρας και οι διάφορες ομάδες μικροοργανισμών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (ζύμωση γλυκόζης, αναερόβια ανάπτυξη, παραγωγή σπορίων), μειώνονταν με την πάροδο του χρόνου αλλά δεν επηρεάζονται από τον εμβολιασμό (Patel and Brown, 1969). Σε μετέπειτα ξεχωριστά πειράματα στα οποία μελετήθηκαν οι μύκητες στην επιφάνεια των ριζών του σιταριού, τα δεδομένα ήταν αντικρουόμενα και βάση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι, η δράση του *Azotobacter* δεν οφείλεται σε αλλαγή του μικροβιακού πληθυσμού της ριζόσφαιρας (Brown, 1974).

Επίσης, από τα μέχρι σήμερα πειραματικά δεδομένα υπάρχουν ενδείξεις ότι, τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* επιδρούν σε ορισμένους φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια. Συγκεκριμένα, πειράματα έδειξαν ότι, χειρισμός σπόρων σιταριού και λιναριού με διάφορα στελέχη του *Azotobacter*, μείωσε τα ποσοστά ασθένειας από ορισμένες μυκητολογικές ασθένειες, ενώ ο χειρισμός ήδη προσβεβλημένων σπόρων, αύξησε το ποσοστό υγιών φυταρίων σε σχέση με τους μάρτυρες. Η εφαρμογή *azotobacterin*, μείωσε το ποσοστό ασθένειας στην πατάτα σε 3% σε σχέση με το 78% των μαρτύρων, το ρυθμό προσβολής από *Phytophthora*, καθώς επίσης και το ποσοστό προσβολής από *Plasmodiophora brassicae* φυτών κουνουπιδιού κατά 43%. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και για τον άνθρακα

του σιταριού, *Pseudomonas vigne* (φασόλια) και για τη βακτηριακή σήψη πατάτας (Rubenchik, 1963).

Φυτά σιταριού που είχαν προσβληθεί από τον μύκητα *Gaeumannomyces graminis var. Tritici*, αναπτύσσονταν καλύτερα όταν εμβολιάστηκαν με *Azotobacter*, αλλά το ποσοστό της ασθένειας δεν μειώθηκε. Άλλα πειράματα που έγιναν με καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες, έδειξαν ότι τα ευνοϊκά αποτελέσματα, οφείλονταν μάλλον στη μείωση της προσβολής από μύκητες του γένους *Fusarium* που έφεραν οι σπόροι, παρά στην επίδραση των βακτηρίων στον *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Brown, 1974).

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση του *Azotobacter* στην ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium moniliforme* που προσβάλλει το ρύζι. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές απομονώσεις του *Azotobacter*. Ανάλογα με το θρεπτικό μέσο, ορισμένες απομονώσεις είχαν ισχυρή επισχετική δράση, ενώ άλλες ελάχιστη. Ορισμένες απομονώσεις του βακτηρίου ευνόησαν σημαντικά την ανάπτυξη του παθογόνου. Ο επισχετικός παράγοντας (fungistatic principle) ήταν ασταθής στη θερμότητα και διαλυτός σε αιθέρα. Η ηλικία του *Azotobacter* είχε κάποια επίδραση, με πιο αποτελεσματικές τις καλλιέργειες ηλικίας 8-10 ημερών. Παρουσία του *Azotobacter* η βλάστηση των κονιδίων μειώθηκε κατά 15%, ενώ στους μάρτυρες βλάστησαν το 92% των κονιδίων. Επίσης σε υγρές καλλιέργειες του μύκητα, η παρουσία *Azotobacter* είχε σαν αποτέλεσμα των σχηματισμό κενοτοπίων και ακολούθως παραμόρφωση, σπάσιμο και λύση των νεαρών υφών (Laksahmi Kumari et. al., 1972).

Οι Mallikarjunaiah και Bhide μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών στελεχών των ειδών *Azotobacter chroococcum* και *Azotobacter vinelandii* σε ορισμένους φυτοπαθογόνους μύκητες. Πιο συγκεκριμένα αξιολογήθηκε in vitro η επίδραση 20 στελεχών *Azotobacter* στη βλάστηση των σπορίων μυκήτων που ανήκαν στα γένη *Alternaria*, *Curvularia*, *Corynespora*, *Fusarium* και *Helminthosporium*. Το ποσοστό βλάστησης, μειώθηκε σημαντικά από όλα τα στελέχη *Azotobacter* στις περιπτώσεις των ειδών *Alternaria tenuis* και *Helminthosporium* (*H. spp.*, *H.turcicum*, *H.sativum*) ενώ στην περίπτωση των 5 ειδών του γένους *Curvularia spp.* που μελετήθηκαν, 19 από τα 20 στελέχη *Azotobacter* είχαν σαν αποτέλεσμα ποσοστό βλάστησης μεταξύ 20 και 36% (ποσοστό βλάστησης του μάρτυρα 78-92%). Για τα υπόλοιπα είδη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν υπήρξε, σε ορισμένες περιπτώσεις, σημαντική μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπορίων, η επίδραση όμως των διαφόρων στελεχών *Azotobacter* διέφερε σημαντικά (Mallikarjunaiah and Bhide, 1981).

Σε μετέπειτα πειράματα, οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν in vitro την επίδραση των παραπάνω στελεχών *Azotobacter* σε 60 συνολικά είδη μυκήτων που ανήκουν

τόσο σε φυτοπαθογόνα όσο και σε μη φυτοπαθογόνα γένη. Τα αποτελέσματα διέφεραν ανάλογα με το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε.

Παρατηρήθηκε παρεμποδιστική δράση όλων των στελεχών όσον αφορά στην ανάπτυξη των μυκήτων *Alternaria*, *Curvularia*, *Corynespora*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Myrothecium*, *Rhizoctonia* και *Verticillium*. Για τα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*, παρατηρήθηκε ανάλογα με την περίπτωση, είτε παρεμπόδιση των μυκήτων από ορισμένα στελέχη *Azotobacter* ή αντίθετα, παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων από τους μύκητες. Τέλος αναφέρεται ότι και τα τρία είδη του γένους *Trichoderma* που μελετήθηκαν, παρεμπόδισαν την ανάπτυξη των βακτηρίων (Mallikarjunaiah and Bhide, 1982).

Σε άλλα πειράματα, αξιολογήθηκαν αζωτοδεσμευτικά στελέχη του είδους *Azotobacter chroococcum* όσον αφορά την παρεμποδιστική τους δράση σε 14 συνολικά μύκητες εδάφους, μεταξύ των οποίων και 9 παθογόνα φυτών. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν: *Sclerotium rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Cephalosporium maydis*, *Alternaria brassicola*, *Colletotrichum falcatum* και *Exserohilum turcicum*. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride* και *Cladosporium herbarum*. Σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από μία (*Cephalosporium maydis*) παρατηρήθηκε παρεμπόδιση των μυκήτων από το *Azotobacter chroococcum* (Pandey and Kumar, 1990).

Επίσης έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την επίδραση του είδους *Azotobacter chroococcum* στον παθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι, η ανταγωνιστική ικανότητα του *Azotobacter chroococcum*, διέφερε σημαντικά ανάλογα με την απομόνωση, όσον αφορά την ανάπτυξη του μύκητα σε τρυβλία (Meshram and Jager, 1983). Σε πειράματα με φυτά σε αποστειρωμένο έδαφος, ορισμένες απομονώσεις ήταν αποτελεσματικές σε θερμοκρασίες 20, 25 και 15°C, ενώ άλλες στους 20 και 25°C. Καμία δεν ήταν αποτελεσματική στους 10°C. Εμβολιασμός όλων των απομονώσεων σε συνδυασμό, είχε μειωμένη αποτελεσματικότητα συγκρινόμενη με τις περισσότερες επεμβάσεις όπου οι απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν χωριστά. Τα αποτελέσματα σε μη αποστειρωμένο έδαφος ήταν ανάλογα (Meshram and Jager, 1983).

Ακόμη έχει μελετηθεί η επίδραση του *Azotobacter* στην πρόοδο ορισμένων φυτοπαθογόνων που φέρονται στους σπόρους και πιο συγκεκριμένα στους μύκητες: *Phoma betae* (ζαχαρότευτλο), *Mycosphaerella pinodes* (μπιζέλι), *Helminthosporium gramineum* (κριθάρι), *Helminthosporium avenae* (βρώμη), *Septoria nodosum*, *Fusarium nivale* (σιτάρι) και *Ascochyta imperfecta*. Μόνο στην τελευταία περίπτωση

παρατηρήθηκε μείωση της προσβολής, η οποία ήταν στενά συνδεδεμένη με την ποσότητα του παθογόνου στον σπόρο (Brown, 1974).

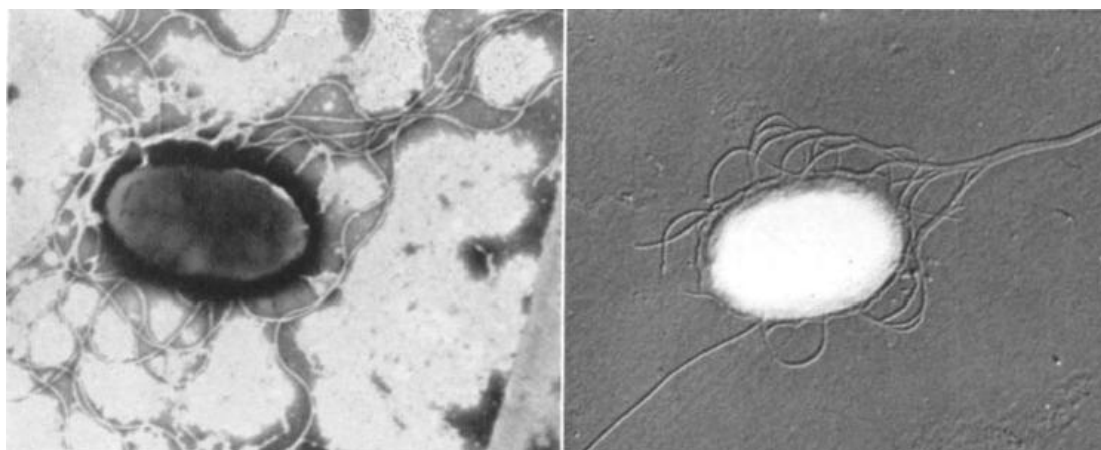
Σε άλλη περίπτωση, αναφέρεται ότι το *Azotobacter* καταστέλλει την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων του σιταριού. Επίσης, η προσβολή φυτών αραβοσίτου από τον μύκητα *Alternaria* ήταν μειωμένη, ενώ ευνοήθηκε η ανάπτυξη των βλαστών, ειδικότερα όταν γινόταν και προσθήκη λιπάσματος. Τα στελέχη του *Azotobacter* διέφεραν στην ικανότητα ανταγωνισμού, ενώ απομονώθηκε μια αντιβιοτική ουσία, η οποία δρα κατά του *Candida albicans* και *Monilia*. Σπόροι χαμηλής βλαστικότητας αναφέρεται ότι ευνοήθηκαν από το *Azotobacter* (Brown, 1974).

3.5 *Azotobacter vinelandii*

Το είδος *Azotobacter vinelandii* έχει ραβδόμορφο σχήμα, με διαστάσεις 2,4 μm x 0,5 μm (εικόνα 6) και σύμφωνα με μικροσκοπικές παρατηρήσεις φέρει περίτριχα μαστίγια (εικόνα 7) (Baillie et. al., 1962).

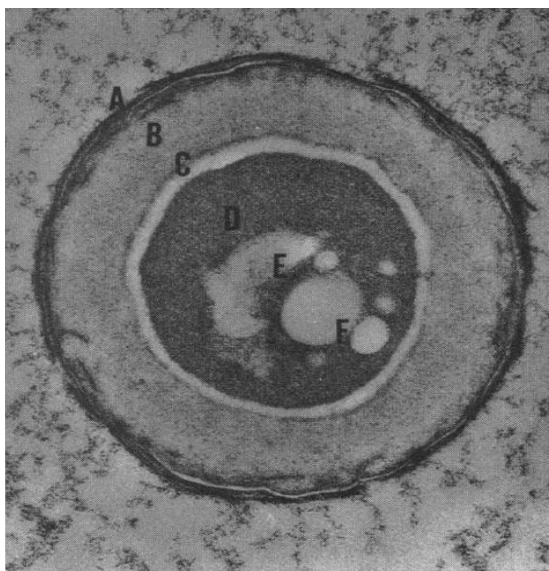


Εικόνα 6. Απεικόνιση βλαστικών κυττάρων του στελέχους *Azotobacter vinelandii*.



Εικόνα 7. Απεικόνιση κυττάρων του *Azotobacter vinelandii* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία διακρίνονται τα μαστίγια που φέρει.

Φαίνεται ότι, προτιμά ελαφρά όξινα εδάφη (pH=6,5) με αρκετή υγρασία. Σε μη ευνοϊκές αλλαγές του περιβάλλοντος, σχηματίζει μικροκύστες οι οποίες είναι ανθεκτικότερες των απλών βακτηριακών κυττάρων (Socolofsky and Wyss, 1961).



Εικόνα 8. Απεικόνιση κύστης του *Azotobacter* με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Παρατηρούνται οι εξής δομές: (A) exine, μια σκληρή στοιβάδα (B) intine, μια ομοιογενής στοιβάδα που εμφανίζεται κολλώδης σε διαρρηγμένες κύστες στο μικροσκόπιο (C) κενό, το οποίο μπορεί να είναι τεχνητό (D) κεντρικό σώμα, το οποίο παραμένει ανέπαφο σε διαρρηγμένες κύστες (E) πυρηνικό υλικό (F) λιπιδιακά σφαιρίδια.

Επίσης, παράγει υδατοδιαλυτές χρωστικές οι οποίες κάτω από κατάλληλο φωτισμό φθορίζουν (Johnstone and Fishbein, 1956). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του *Azotobacter vinelandii* είναι η παραγωγή πολυσακχαριδίου, πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες (Brown *et al.*, 1964).

3.6 Γενετικά χαρακτηριστικά

Η ανάπτυξη της επιστήμης της μοριακής βιολογίας είχε ως αποτέλεσμα την εκτενή μελέτη σε γενετικό επίπεδο της βιολογικής δέσμευσης του αζώτου από τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* και κυρίως των δύο ειδών *A. vinelandii* και *A. chroococcum*. Το στέλεχος *Azotobacter vinelandii* AvOP και τα παράγωγά του παρουσιάζουν μεγάλη δεκτικότητα σε γενετικούς χειρισμούς, δεδομένου ότι είναι εξαιρετικός δέκτης DNA που προέρχεται από άλλους οργανισμούς είτε μέσω μετασχηματισμού (Transformation) είτε μέσω σύζευξης (Conjugation) (Kennedy and Bishop, 2004). Το στέλεχος αυτό μπορεί να δεχθεί πλασμίδια σε μεγάλο αριθμό από το *E.coli* ή από άλλα στελέχη του γένους *Azotobacter* και μπορεί να μετασχηματιστεί είτε με γραμμικό είτε με πλασμιδιακό DNA.

Αντίθετα, το *A. chroococcum* είναι λιγότερο επιδεκτικό στη λήψη DNA, λόγω μάλλον της παρουσίας πλασμιδίων σε αυτό, τα οποία είναι πιθανό να παρεμποδίζουν τη μεταφορά του DNA. Η GC περιεκτικότητα των *Azotobacter* κυμαίνεται μεταξύ 64,8-66,7 mol%. (Robson et. al., 1984).

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των βακτηρίων αυτών είναι η υψηλή περιεκτικότητα των κυττάρων τους σε DNA. Το είδος *Azotobacter vinelandii* έχει βρεθεί ότι περιέχει $1,35 \times 10^{-13}$ g DNA όταν το είδος *Escherichia coli* περιέχει μόλις $3,4 \times 10^{-15}$ g. Δηλαδή η περιεκτικότητα σε DNA ενός κυττάρου του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* είναι περίπου σαράντα φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του βακτηρίου *Escherichia coli* (Punita et. al., 1989).

Το βακτηριακό κύτταρο του *Azotobacter vinelandii*, περιέχει 80 όμοια αντίγραφα χρωμοσώματος, καθένα από τα οποία είναι μεγέθους $4,5 \times 10^3$ kb (Manna and Das, 1993; Punita et. al., 1989). Δηλαδή, έχουν παρόμοιο μέγεθος με αυτό του χρωμοσώματος του βακτηρίου *Escherichia coli*, το οποίο είναι περίπου 4×10^3 kb (Smith et. al., 1987; Kohara et. al., 1987). Επίσης υποστηρίζεται ότι, η έντονη αναπνευστική δραστηριότητα που χαρακτηρίζει το αζωτοδεσμευτικό αυτό βακτήριο, απαιτεί την παραγωγή μεγάλης ποσότητας ενζύμων που εμπλέκονται στην έντονη αυτή δραστηριότητα κάτι που επιτυγχάνεται μόνο από την παρουσία πολλαπλών αντιγράφων των αντίστοιχων γονιδίων (Punita et al., 1989).

Η αυξημένη περιεκτικότητα των κυττάρων του *Azotobacter vinelandii* σε DNA, αντανακλάται και στο μέγεθος των κυττάρων, το οποίο με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, βρέθηκε ότι είναι περίπου 16 φορές μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των κυττάρων του *Escherichia coli* (Efuet et. al., 1996).

Από όλα αυτά τα όμοια αντίγραφα χρωμοσωμικού DNA του *Azotobacter vinelandii*, είναι πιθανό, μόνο ένα να είναι λειτουργικό, δεδομένου ότι, τα αποτελέσματα γενετικών αναλύσεων και συγκεκριμένα αποτελέσματα χημικών, UV και Tη μεταλλάξεων, αποκλίνουν από τη θεωρία ότι το βακτήριο αυτό είναι πολυπλοειδές (Contreras and Casadeus, 1987; Kennedy and Toukdarian, 1987; Efuet et. al., 1996). Θεωρείται ότι σε αυτά τα βακτήρια, πιθανόν λαμβάνει χώρα κάποιο είδος απενεργοποίησης χρωμοσωμάτων (Krawiec and Riley, 1990). Τέλος, η περιεκτικότητα των κυττάρων του *Azotobacter vinelandii* σε DNA, παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του βακτηρίου σε ένα πλούσιο τεχνητό υπόστρωμα στο εργαστήριο (Maldonado et. al., 1994).

Έτσι, στην αρχή της εκθετικής φάσης, παρατηρείται χαμηλός αριθμός χρωμοσωμάτων, ενώ στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, αυξάνει η περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA. Στο τέλος της εκθετικής φάσης και κατά την είσοδο στη φάση στασιμότητας, τα κύτταρα εμφανίζονται έντονα πολυπλοειδή, κάτι που στη συνέχεια, αναστρέφεται πάλι με μείωση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA, αργά στη φάση της στασιμότητας. Υποστηρίζεται ότι πολυπλοειδή κύτταρα του βακτηρίου αυτού, εμφανίζονται μόνο σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης του, δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση του DNA, όταν τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φτωχά υποστρώματα (Maldonado et. al., 1994).

Όσον αφορά το βακτηριακό είδος *Azotobacter chroococcum*, αναφέρεται ότι, το κύτταρο του περιέχει 20-25 αντίγραφα όμοιων χρωμοσωμάτων και το καθένα από αυτά, έχει μέγεθος περίπου $5,3 \times 10^3$ Kb (Robson et al., 1984; Manna and Das, 1994).

Το *A. vinelandii* AvOP δεν περιέχει ενδογενή πλασμίδια, σε σχέση με άλλα είδη όπως το *A. chroococcum* το οποίο περιέχει οκτώ (Robson et al., 1984, Kennedy et al., 2003).

Όλα τα είδη του *Azotobacter* είναι θετικά στη δοκιμή της ουρίας, γεγονός που τα διαχωρίζει από τα ελιδη του *Azomonas* (Kennedy et al., 2003). Το χαρακτηριστικό αυτό, είναι σύμφωνο με το γεγονός ότι η ουρία είναι πολύ καλή πηγή αζώτου για τα παραπάνω στελέχη. Επίσης, είναι μια χρήσιμη ιδιότητα δεδομένου ότι η προσθήκη ουρίας σε συγκεντρώσεις της τάξης των 5-10 mM δεν περιορίζει τη σύνθεση της νιτρογενάσης (Walmsley and Kennedy, 1991).

3.7 Βιολογική αζωτοδέσμευση και *Azotobacter vinelandii*

Το βακτήριο *Azotobacter vinelandii*, έχοντας την ικανότητα δέσμευσης μοριακού αζώτου και μετατροπής του σε αφομοιώσιμη μορφή, διαθέτει το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Τα γονίδια εκείνα που εμπλέκονται στη διαδικασία της βιολογικής αζωτοδέσμευσης του, είναι:

- i) Το γονίδιο *nifH* κωδικοποιεί για την Fe υπομονάδα (Fe-protein) του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης, ενώ τα γονίδια *nifD* και *nifK* κωδικοποιούν για τις υπομονάδες της MoFe υπομονάδας (MoFe-protein).
- ii) Τα προϊόντα των γονιδίων *nifB*, *nifV*, *nifENX*, *nifQ* και *nifH* απαιτούνται για την σύνθεση του συνενζύμου FeMo, το οποίο είναι σημαντικό για την πρόσδεση και κατ' επέκταση αναγωγή του N₂ στο ενεργό κέντρο του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης.
- iii) Τα προϊόντα των γονιδίων *nifU* και *nifS* είναι απαραίτητα κατά το σχηματισμό των συμπλόκων Fe-S, ορισμένα εκ των οποίων εμπλέκονται στη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων στο συνένζυμο FeMo.
- iv) Τα προϊόντα των γονιδίων *NifM* και *nifW* υποβοηθούν την ικανότητα κατάλυσης της νιτρογενάσης.
- v) Τα προϊόντα του οπερονίου *nifLA* εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης όλων των *nif* γονιδίων (Rangaraj et al., 2000, Dixon, 1998).

Οι Kennedy και Bishop (2004), από έρευνες που πραγματοποίησαν βρήκαν ότι, σε αντιπαραβολή του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης στο οποίο υπάρχει Mo, όλα τα στελέχη του *Azotobacter* που εξετάστηκαν, φαίνεται να έχουν την ιδιότητα κτήσης εναλλακτικού τύπου νιτρογενασών, οι οποίες δεν περιέχουν Mo στο ενεργό τους κέντρο. Ορισμένα στελέχη φάνηκε να παρουσιάζουν μεταλλάξεις στα γονίδια *nifH* και *nifD* τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές υπομονάδες του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης.

Το *Azotobacter Vinelandii* θεωρείται ότι έχει τρία γενετικά διαφορετικά ενζυμικά συστήματα νιτρογενάσης (Bishop and Premakumar, 1992). Ένα εξ αυτών, ως αναμενόταν περιέχει Mo στο ενεργό του κέντρο και ονομάστηκε νιτρογενάση-1. Το σύστημα αυτό, εκφράζεται όταν ο οργανισμός αυτός αναπτύσσεται σε μέσο που περιέχει Mo. Το δεύτερο περιέχει βανάδιο (V) και ονομάστηκε νιτρογενάση-2 (Hales et al., 1986, Hales et al., 1986a, Robson et al., 1986). Το σύστημα αυτό, εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του οργανισμού σε μέσο το οποίο δεν περιέχει Mo αλλά V. Τέλος το τρίτο σύστημα περιέχει Fe και ονομάστηκε νιτρογενάση-3. Το τρίτο αυτό σύστημα,

εκφράζεται κατά την διαζωτροφική ανάπτυξη του οργανισμού σε μέσο το οποίο παρουσιάζει έλλειψη σε Mo και V (Chisnell et al., 1988).

3.8 Η κινητική της αύξησης του *Azotobacter Vinelandii*

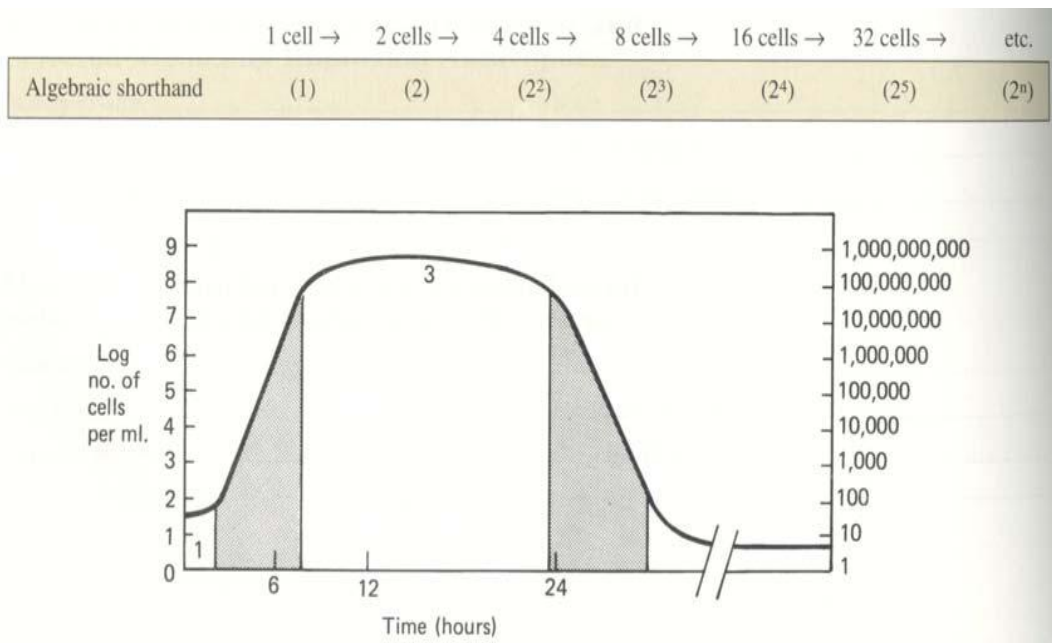
3.8.1 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, απαιτεί πρόσβαση σε πηγές ενέργειας και σε ενώσεις απαραίτητες για την σύνθεση των κυτταρικών τους δομών. Έτσι, η ανάπτυξη των οργανισμών απαιτεί διαθέσιμο άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο, θείο, φωσφόρο και ποικιλία άλλων μεταλλικών στοιχείων. Τα κύτταρα, λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά, μεταφέροντας τα μέσω των μεμβρανών τους και τα μετατρέπουν με ενζυμικές αντιδράσεις, σε προϊόντα χρήσιμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οδηγεί σε αύξηση του αριθμού τους όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος και διαιρούνται σε δύο θυγατρικά κύτταρα περίπου ίσου μεγέθους. Έτσι, η μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων, δεν ακολουθεί την παρακολούθηση του μεγέθους τους (λόγο του μικρού τους μεγέθους), αλλά την παρακολούθηση της αύξησης του αριθμού τους.

3.8.2 Η καμπύλη ανάπτυξης

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας. Όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε υγρά θρεπτικά μέσα, συνήθως σε κλειστά συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας (batch cultures), δεν υπάρχει προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου. Για τον λόγο αυτό, η συγκέντρωση των θρεπτικών μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση των προϊόντων μεταβολισμού αυξάνει. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση, μπορεί να παρασταθεί ως ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο. Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει έχει τέσσερις διακριτές περιοχές (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών

(α) Φάση προσαρμογής (Lag phase)

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Αν και τα κύτταρα στην φάση αυτή δεν διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, τα κύτταρα συνθέτουν νέα συστατικά. Το στάδιο αυτό, πριν την έναρξη της διαδικασίας διαίρεσης των κυττάρων είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή στην διαφορετική σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η ανάγκη ανάπτυξης ενζύμων για τον μεταβολισμό των θρεπτικών κλπ. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από την «κατάσταση» στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, την φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου, τον όγκο του εμβολίου κλπ. Η φάση προσαρμογής είναι εκτενής, όταν το εμβόλιο που χρησιμοποιείται είναι παλαιό (γερασμένο), ή όταν το θρεπτικό μέσο, αποτελείται από καθαρά χημικές ενώσεις. Αντίθετα, όταν το εμβόλιο προέρχεται από καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας είναι όμοια με αυτή του εμβολίου, τότε η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη σε διάρκεια.

(β) Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase)

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή, η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή χωρίς να παρατηρείται απότομη βηματική αύξηση.

(γ) Φάση στασιμότητας (Stationary phase)

Μετά το πέρας της εκθετικής φάσης, η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη ανάπτυξης γίνεται οριζόντια. Στην φάση στασιμότητας, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Η φάση στασιμότητας, παρατηρείται στην βακτηριακή ανάπτυξη όταν ο πληθυσμός των κυττάρων είναι περίπου 10^9 ανά ml, ενώ στα πρωτόζωα και στα φύκη η τιμή αυτή φθάνει περίπου 10^6 ανά ml. Ο μικροβιακός πληθυσμός, εισέρχεται στην φάση στασιμότητας για διάφορους λόγους. Ένας προφανής λόγος είναι, η έλλειψη των θρεπτικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού θρεπτικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας, το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης, διότι το οξυγόνο έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν επαρκεί για να διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των κυττάρων, δύναται επίσης να σταματήσει λόγω της συσσώρευσης «τοξικών» μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης. Για παράδειγμα, οι στρεπτόκοκκοι μπορεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα να μειωθεί το pH του διαλύματος και να σταματήσει η περαιτέρω ανάπτυξη.

(δ) Φάση θανάτου (Death phase)

Η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των «τοξικών» συστατικών στο μέσο ανάπτυξης, οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων όπως και η ανάπτυξη, είναι συνήθως λογαριθμική, δηλαδή σταθερό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται κάθε ώρα. Αυτή η σχέση, ισχύει ακόμη και όταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός, εξαιτίας της μη λύσης των νεκρών κυττάρων.

3.8.3 Τα μαθηματικά της ανάπτυξης

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, κάθε κύτταρο διαιρείται σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Έτσι, ο πληθυσμός διπλασιάζεται σε αριθμό, σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα που ονομάζεται χρόνος διπλασιασμού. Για παράδειγμα, αν εμβολιασθεί μια καλλιέργεια με ένα κύτταρο το οποίο διαιρείται κάθε 20 λεπτά, θα υπάρχουν 2 κύτταρα σε 20 λεπτά, 4 κύτταρα σε 40 λεπτά κ.ο.κ. Επειδή ο πληθυσμός διπλασιάζεται κάθε γενιά σε n γενιές, θα υπάρχουν 2^n κύτταρα στην καλλιέργεια.

Αν λοιπόν, N_0 είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων, N_t ο αριθμός των κυττάρων την χρονική στιγμή t και n ο αριθμός των γενιών στον χρόνο t , τότε ισχύει η σχέση :

$$N_t = N_0 \cdot 2^n$$

Λύνοντας ως προς n έχουμε:

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2 = (\log N_t - \log N_0) / 0.301$$

Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης k που είναι ο αριθμός των γενιών ανά μονάδα χρόνου (συνήθως ανά ώρα) υπολογίζεται ως:

$$k = n / t = (\log N_t - \log N_0) / 0.301 t$$

Σκοπός μελέτης

Στα Gram-θετικά βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες συνήθως μεταφέρονται κατά μήκος της μοναδικής μεμβράνης από το Sec μονοπάτι ή το μονοπάτι δυο-αργινινών (Tat). Τα δυο αυτά μονοπάτια, παρουσιάζουν αρκετές διαφορές. Ο μηχανισμός του Sec μονοπατιού, αναγνωρίζει στις πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση μια υδροφοβική N-τελική σηματοδοτική αλληλουχία και μεταφέρει τις πρωτεΐνες σε μια ανοικτή κατάσταση (μη διπλωμένη), χρησιμοποιώντας υδρόλυση του ATP και μια διαβάθμιση πρωτονίου για ενέργεια (Paranikou et. al., 2007). Αντίθετα ο μηχανισμός του Tat εκκριτικού μονοπατιού, αναγνωρίζει ένα μοτίβο πλούσιο σε αμινοξικά κατάλοιπα (S-R-R-x-F-L-K) στην N-τελική περιοχή ενός μεγάλου συν-παράγοντα που περιέχει πρωτεΐνες και τις μεταφέρει σε διπλωμένη κατάσταση, χρησιμοποιώντας μόνο μια διαβάθμιση πρωτονίου σαν πηγή ενέργειας (Muller, 2005).

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε το γονιδίωμα του *Azotobacter Vinelandii* strain A για πρωτεΐνες που είναι υποψήφιες για έκκριση μέσω του Tat μονοπατιού. Μόνο οι πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να βρίσκονται σε μια διπλωμένη κατάσταση στο κυτόπλασμα είναι ικανές να μεταφερθούν μέσω του Tat μονοπατιού (DeLisa et. al., 2003; Fisher et. al., 2006), και όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο το οποίο αναγνωρίζεται από τον Tat μηχανισμό. Αυτό το Tat αποδεκτό μοτίβο, εμπεριέχεται στην άμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης και περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό δυο αργινινών διπεπτιδίο.

Με την βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής ερευνήθηκε το γονιδίωμα του βακτηρίου για πρωτεΐνες που περιέχουν αυτό το μοτίβο και στην συνέχεια αναλύθηκε η κάθε μια πρωτεΐνη όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του πιθανού Tat πεπτιδίου οδηγού της. Τέλος, επιλέχθηκε μια πρωτεΐνη, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα, πιθανόν να έχει Tat πεπτιδίο οδηγό και πιθανόν εκκρίνεται μέσω του Tat μονοπατιού και ερευνήθηκε πιο διεξοδικά.

Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii* (LMG 3878) P.Wilson strain AvOP, το οποίο προμηθεύτηκε από το Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM™/LMG)AvOP. Το *Azotobacter vinelandii* είναι ένας μη συμβιωτικός αρνητικός κατά Gram, υποχρεωτικά αερόβιος οργανισμός, ικανός να δεσμεύει N₂.

Για την ανάπτυξη του, τόσο σε υγρή όσο και σε στερεή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Rennie. Αυτό, είναι ο συνδυασμός των εξής διαλυμάτων :

Διάλυμα I: Σε 900 ml απιονισμένου νερού διαλύονται τα ακόλουθα:

0,8 g	K ₂ HPO ₄
0,2 g	KH ₂ PO ₄
0,1 g	NaCl
28 mg	Na ₂ FeEDTA
25 mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
100 mg	yeast extract
5 g	μαννιτόλη
5 g	σακχαρόζη
0,5 ml	γαλακτικό νάτριο

Διάλυμα II: Σε 100 ml απιονισμένου νερού διαλύονται τα ακόλουθα

0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,1 g	NaCl ₂

Τα δύο διαλύματα αποστειρώνονται χωριστά, διότι σε αντίθετη περίπτωση, δημιουργούνται δυσδιάλυτα άλατα που καθιζάνουν. Ακολούθως, τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται δίνοντας 1 lt υγρού θρεπτικού μέσου, με το pH του θρεπτικού αυτού υλικού να είναι 7,0. Όσον αφορά την παρασκευή στερεού υποστρώματος στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 15-18 gr Agar.

Σε διάφορες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά την αζωτοδέσμευση, το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου ήταν, Rennie χωρίς την προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου (R), καθώς επίσης και Rennie με προσθήκη πηγής αζώτου (N). Σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το NH₄Cl σε συγκέντρωση 1g/lt.

4.2 Εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας

Η εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας, έγινε με την μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου σε αιθυλένιο με αέριο χρωματογράφο Perkin-Elmer F-11.

Με την μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται πάρα πολύ καλούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ μεγάλη (φτάνει και μερικά τρισεκατομμυριοστά του γραμμαρίου (pg) σε κάποιες περιπτώσεις - συνήθως είναι σε μερικά δισεκατομμυριοστά (ng)).

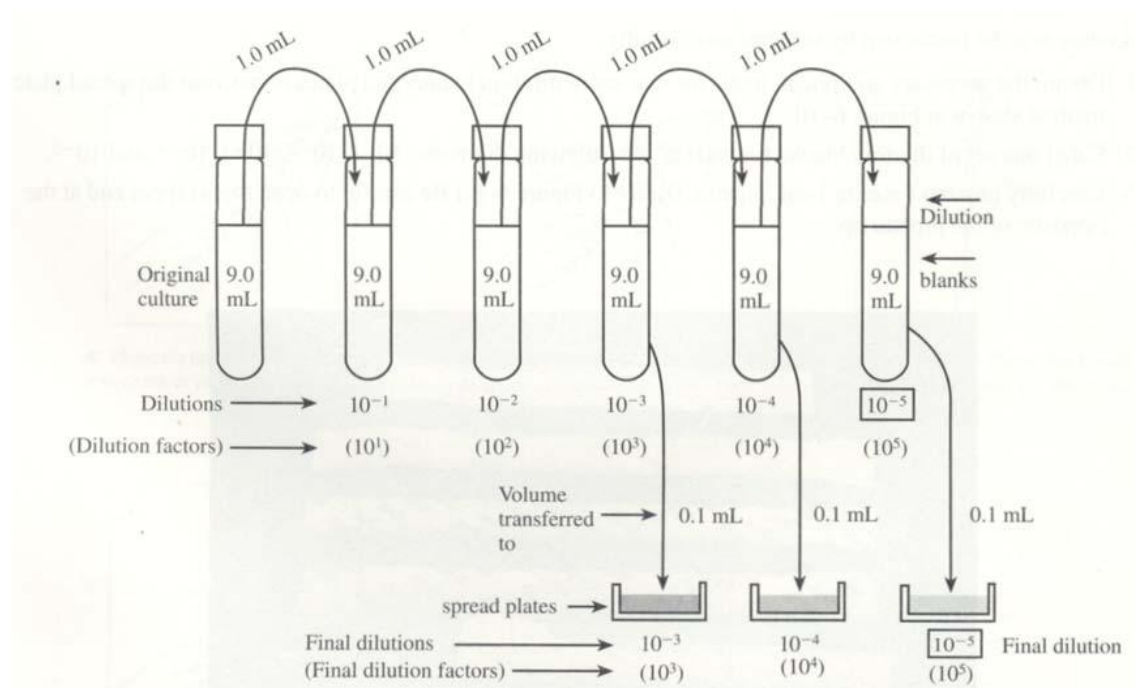
Πιο αναλυτικά, η μέθοδος έχει ως εξής : σε σωληνάκι τα οποίο περιέχει 5 ml υγρής καλλιέργειας και είναι κλειστό με ειδικό πώμα (από καουτσούκ), εγχέεται με τη βοήθεια σύριγγας 1 ml ακετυλενίου. Στην συνέχεια, η καλλιέργεια τοποθετείται για επώαση σε αναδευτήρα, στους 28 °C, για χρονική περίοδο 1 με 2 ημερών. Τέλος, λαμβάνεται με την βοήθεια σύριγγας 1 ml αερίου από τα κλειστό σωληνάκι που περιέχει πλέον την αναπτυγμένη καλλιέργεια και εγχέεται στον αέριο χρωματογράφο. Το αέριο πλέον δείγμα, παρασύρεται μέσα σε μια στήλη που περιέχει ένα προσροφητικό υλικό, οπότε γίνεται ο διαχωρισμός. Έτσι από την άλλη άκρη της στήλης εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά. Από εκεί οδηγούνται στον ανιχνευτή (ηλεκτρονικό μέρος) ο οποίος στέλνει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης.

4.3. Μέτρηση μικροοργανισμών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων στην επιφάνεια ή τη μάζα στερεού υποστρώματος όταν το δείγμα έχει υψηλή συγκέντρωση κυττάρων

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε ένα δείγμα υγρής καλλιέργειας απαιτεί την αραιώση του δείγματος όταν τα κύτταρα σε αυτό βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, με σκοπό να διαχωρίσει τους μικροοργανισμούς έτσι ώστε ο καθένας από αυτούς να σχηματίσει μια διακριτά μεμονωμένη αποικία.

Επειδή τα δείγματα περιέχουν συνήθως μερικές χιλιάδες ή εκατοντάδες εκατομμυρίων κυττάρων ανά mL απαιτείται η αραιώση του δείγματος πριν αυτό μεταφερθεί στην επιφάνεια στερεών καλλιεργειών.

Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων, σε στείρα διαλύματα παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Το υγρό των στείρων διαλυμάτων αραιώσης μπορεί να είναι νερό, διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ή άλλο υγρό με σκοπό την διασπορά και αιώρηση των κυττάρων.



Εικόνα 10. Σχηματική παράσταση της τεχνικής των διαδοχικών αραιώσεων.

Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η διαδικασία των αραιώσεων και ο τρόπος υπολογισμού της τελικής αραιώσης του κάθε δείγματος. Μεταφέροντας 1 mL του αρχικού δείγματος σε 9 mL στείρου μέσου διάλυσης (νερό), έχουμε αραιώση κατά σε αναλογία 1:10.

Η αραιώση αυτή εκφράζεται επίσης ως αραιώση 10^{-1} ή $1/10$. Λαμβάνοντας 1 mL από την αραιώση 1:10 και μεταφέροντας την σε 9 mL μέσου διάλυσης έχουμε την αραιώση 1:100 ή 10^{-2} . Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται διαδοχικές αραιώσεις μέχρι του βαθμού που απαιτείται. Οι μεταφορές των υγρών δειγμάτων γίνονται με αποστειρωμένα σιφώνια ή pipettes, που προσαρμόζονται σε κατάλληλες διατάξεις αναρρόφησης. Στα μικροβιολογικά εργαστήρια η αναρρόφηση με το στόμα απαγορεύεται αυστηρά διότι τα δείγματα δύναται να περιέχουν επικίνδυνους μικροοργανισμούς.

Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων ή το πλήθος των σχηματιζόμενων αποικιών CFUs (colony-forming units), για ένα αιώρημα βακτηρίων μπορεί να προσδιορισθεί με την τεχνική της επιφανειακής διασποράς (spread plate technique) ή την τεχνική της "ενσωμάτωσης" (pour plate technique).

Στην τεχνική της επιφανειακής διασποράς (spread plate technique), γίνεται διασπορά μικρού γνωστού όγκου κατάλληλα αραιωμένου δείγματος στην επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τριβλίο petri. Με ομοιόμορφη διασπορά του αιωρήματος στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος, και έπειτα από επώαση σε κατάλληλες συνθήκες, σχηματίζονται ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες μπορεί να μετρηθούν. Αντίθετα στην τεχνική της ενσωμάτωσης, οι μικροοργανισμοί διασπείρονται ομοιόμορφα στην μάζα ρευστού θρεπτικού υποστρώματος το οποίο αφήνεται στην συνέχεια να στερεοποιηθεί. Η τεχνική της επιφανειακής διασποράς (spread plate technique) προτιμάται στις περιπτώσεις υποχρεωτικά αερόβιων μικροοργανισμών ενώ η τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) σε περιπτώσεις προαιρετικά αναερόβιων ή μικροαερόβιων καλλιιεργειών.

Για λόγους στατιστικής ακρίβειας και αξιοπιστίας, μόνο σε εκείνα τα τριβλία που έπειτα από επώαση αναπτύχθηκαν 30 έως 300 αποικίες έγινε καταμέτρηση. Τριβλία με μεγαλύτερο αριθμό αποικιών αναφέρονται ως αδύνατο να μετρηθούν (too numerous to count, TNTC). Ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών ανά mL αρχικού διαλύματος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών ανά τριβλίο με τον παράγοντα αραιώσης. Για παράδειγμα αν μετρήθηκαν 213 αποικίες στην αραιώση 10^{-4} (1:10000) ο αριθμός των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα υπολογίζεται ως:

Colony-forming units (CFUs) / mL (αρχικού δείγματος) = Αριθμός αποικιών στο τριβλίο επί Παράγοντας αραιώσης

$$\text{CFUs/mL} = 213 * 10000 = 213 * 10^4 \text{ ή } 2.13 * 10^6$$

4.4 Μέτρηση μικροοργανισμών με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας

Μια γρήγορη τεχνική μέτρησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών βασίζεται στην αρχή της σκέδασης του φωτός όταν αυτό προσπίπτει σε ένα δείγμα με αιωρούμενα κύτταρα. Επειδή το μέγεθος των κυττάρων είναι περίπου σταθερό το ποσό της ακτινοβολίας που σκεδάζεται είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των κυττάρων στο δείγμα. Όταν η συγκέντρωση των κυττάρων είναι περίπου 10 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL (10⁷/mL) τότε το δείγμα δείχνει νεφελώδες ή θολό ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων κάνουν το δείγμα περισσότερο αδιαπέραστο από το φως. Ο βαθμός σκέδασης της ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί από φωτόμετρα, και σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση των βακτηρίων σε χαμηλές τιμές απορρόφησης. Με τον τρόπο αυτό δύναται να παρακολουθηθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων αρκεί αυτά να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις τέτοιες που να δίνουν αισθητή θολερότητα στο δείγμα. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 600 έως 660 nm (1nm=10⁻⁹ m). Για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς η οποία συνδέει την οπτική πυκνότητα με τον αριθμό των κυττάρων.

4.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεσαία κλίμακα

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης με στήλες διαχωρισμού QIAGEN. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας (www.qiagen.com).

4.6 Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από *E.coli* με αλκαλική λύση

Παραλαμβάνονται 3 ml βακτηριακής καλλιέργειας που περιέχουν το υπό μελέτη πλασμίδιο, η οποία επωάστηκε στους 37° C για 14-16 ώρες. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε προαποστειρωμένους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 2 ml για 3 λεπτά στις 10,000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 µl διαλύματος 50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl (pH 8.0). Το ίζημα διαλύεται τελείως και το τοποθετείτε για 5 λεπτά στο πάγο. Στη συνέχεια προστίθενται 400µl διαλύματος 0,2N NaOH και 1% SDS, ανακατεύονται ήπια και τοποθετούνται στο πάγο για πέντε λεπτά. Κατόπιν προστίθεται διάλυμα 3M CH₃COOK, ακολουθεί επώαση για πέντε λεπτά στο πάγο και φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται στο τελικό όγκο του υπερκειμένου 1 µl διαλύματος 10mg/ml RNase (DNase free). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 λεπτά. Προστίθεται 500 µl φαινόλη:χλωροφόρμιο, το μείγμα ανακατεύεται και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10,000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA με διπλάσιο όγκο αιθανόλης από του υπερκειμένου και η επώασή του για 30 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 15,000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο δοκιμαστικός σωλήνας αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε 30 µl απιονισμένου και αποστειρωμένου H₂O και διατηρείται στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

4.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές αλληλουχίες. Οι γνωστές αυτές αλληλουχίες είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινήτες για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινήτες σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (pair-dimers) και κυρίως στο 3' άκρο, το περιεχόμενο σε GC να είναι από 40% ως 60%, η προσθήκη περιοριστικών θέσεων

πρέπει να γίνεται στο 5' άκρο. Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται από 25 μέχρι 40 φορές (κύκλοι). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα (cycler), το οποίο είναι σε θέση να θερμαίνει και να ψύχει τις αντιδράσεις σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα:

1. Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της μήτρας DNA με επώαση στους 94°C

Κατά την αποδιάταξη, η δίκλωνη έλικα ανοίγει σε δύο αλυσίδες μονόκλωνου DNA και όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (για παράδειγμα, η επιμήκυνση του προηγούμενου κύκλου).

2. Υβριδισμός των εκκινητών:

Οι εκκινητές υφίστανται στο διάλυμα διαρκή κίνηση Brown. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δίκλωνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μήτρας και εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης.

3. Επιμήκυνση στους 72°C :

Η θερμοκρασία αυτή είναι η ιδεατή για τη δράση της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Οι εκκινητές όπου έχει γίνει η πρώτη προσθήκη βάσεων, έχουν ήδη αναπτύξει ισχυρή ιονική έλξη με τη μήτρα, πολύ ισχυρότερη σε σχέση με τις δυνάμεις αποδιάταξης. Εκκινητές που βρίσκονται σε θέσεις μη ειδικού υβριδισμού απελευθερώνονται από τη μήτρα σε αυτήν τη θερμοκρασία και δε δίνουν προϊόν επιμήκυνσης. Τα νουκλεοτίδια τοποθετούνται στο 3' του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει dNTPs στη διεύθυνση 5'-3', διαβάζοντας τη μήτρα από το 3' προς το 5' άκρο). Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η GoTaq πολυμεράση της εταιρίας Promega. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής (Παράρτημα Ι) :

PhoD-U (NcoI) : 5'-GATCGCG **CCATGG** TCTGGAGCCGCTGCGAC-3'

και

PhoD-L (HindIII) : 5'-TCAGGT **AAGCTT** CAACTCCCGGCCGTACAC-3'

4.8 Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων και των ενθέτων (προϊόντα PCR) για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation), πραγματοποιήθηκαν πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα των εταιρειών Biolabs και Promega, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία 0.1 μg/ml BSA όπου προτεινόταν. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 2 έως 8 ώρες. Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά υπάκουαν στον κανόνα-ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψη πλήρως 1 μg DNA σε 1 ώρα, στους 37°C.

4.9 Ηλεκτροφόρηση DNA

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου διά την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του. Στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Στην ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκεντρώσεις από 0.7% ως 2% ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος ή των τμημάτων που θέλουμε να ανιχνεύσουμε κάθε φορά. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε διάλυμα TBE (10x TBE: 108 g/l Tris base, 55g/l boric acid και 40 ml/l 0.5 M EDTA, pH=8), ενώ η πηκτή είχε στερεοποιηθεί παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για να είναι εφικτή η ανίχνευση των DNAs με λάμπα υπεριώδους φωτός.

4.10 Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτή αγαρόζης

Η υπό μελέτη ζώνη DNA αποκόπτεται από την πηκτή αγαρόζης με ένα καθαρό νυστέρι, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αγαρόζης κατά το δυνατόν περισσότερο. Το κομμάτι αγαρόζης που αποκόπηκε ζυγίζεται και σε αυτήν προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (διευκολύνει την διαλυτοποίηση της αγαρόζης και την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου της στήλης Qiagen). Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5 λεπτά, ούτως ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το διάλυμα φορτώνεται στη στήλη Qiagen και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Το διήθημα απομακρύνεται και προστίθενται 0.5 ml QG ακόμα για απομάκρυνση και των τελευταίων ιχνών αγαρόζης από την κολώνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ομοίως με παραπάνω. Στη συνέχεια, η κολώνα ξεπλένεται με 0.75 ml PE (διάλυμα πλύσης που περιέχει αιθανόλη) και τέλος γίνεται έκλυση του DNA με 30 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου H₂O.

4.11 Αντίδραση λιγάσης

Η T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' υδροξυλομάδας μεταξύ δύο άκρων δίκλωνου DNA, είτε αυτά είναι τυφλά είτε προεξέχοντα. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml BSA). Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση μπορεί να κυμανθεί από 0.1 έως και 1 μg. Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση της Roche, στους 16°C για 14 -16 ώρες.

4.12 Ταυτοποίηση ανασυνδυσασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων έγινε με τρεις τρόπους:

α) με PCR βακτηριακών αποικιών.

β) με απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη των ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

4.13 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

Για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (heat-shock)

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1ml LB + 20mM MgSO₄ και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37°C. Στη συνέχεια, εμβολιάζεται με την ολονύκτια καλλιέργεια σε αναλογία 1:100, 100ml θρεπτικού μέσου LB + 20 mM MgSO₄ σε γυάλινη φιάλη ενός λίτρου. Η καλλιέργεια επωάζεται για 2,5 με 3 ώρες στους 37°C, 250rpm μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου στο 0.35-0.4. Κατόπιν διαμοιράζεται σε δύο αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon των 50 ml και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται ήπια σε 15 με 20 ml παγωμένου διαλύματος TFB1 (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη) για κάθε σωλήνα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2ml ανά σωλήνα παγωμένου διαλύματος TFBII (10mM MOPS pH 7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% γλυκερόλη). Τέλος, το κυτταρικό διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 200μl ανά δοκιμαστικό σωλήνα, και αποθηκεύεται στους – 80°C.

4.14 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Μια ποσότητα 200 μl δεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80°C όπου φυλάσσονται και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 μl της αντίδρασης λιγάνης στα κύτταρα και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2 λεπτά, ακολουθεί προσθήκη 900 μl θρεπτικού διαλύματος LB (Luria Bertani medium) και επώαση στους 37°C για 1-2 ώρες. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες.

4.15 Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση

Από 3 ml βακτηριακής καλλιέργειας μεταφέρονται σε κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα των 2ml, 1,5 ml από την καλλιέργεια κατόπιν προστίθενται 500 ml γλυκερόλης, και ακολουθεί ανάδευση. Τέλος, μεταφέρονται για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80°C .

4.16 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια των κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, εμβολιάζεται σε αναλογία 1:100 υγρό θρεπτικό μέσο LB, εφοδιασμένο με 100 $\mu\text{g/ml}$ αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm της καλλιέργειας να φτάσει μεταξύ 0.6 και 1.0. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Η καλλιέργεια κατόπιν επωάζεται στους 30°C για 4-5 ώρες. Μετά το πέρας της επαγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 5000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και το ίζημα διατηρείται στους -80°C .

4.17 Απομόνωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο των υπέρηχων

Το αποθηκευμένο στους -80°C κυτταρικό ίζημα, αφήνεται στον πάγο να ξεπαγώσει και κατόπιν, επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης οπού και αφήνεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, με την βοήθεια του μηχανήματος υπέρηχων (UP 200S Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH) πραγματοποιείται λύση των κυττάρων, με συνεχή εφαρμογή υπέρηχων σε αυτό, για 20 δευτερόλεπτα στους 4°C , για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, με την εφαρμογή των υπέρηχων ανά 20 δευτερόλεπτα. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία 4°C και παίρνουμε τις μη διαλυτές πρωτεΐνες, απομακρύνοντας το υπερκείμενο.

4.18 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης κατά Laemmli

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συμπολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά έστω και αναμιγμένα αλλά πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N, - τετραμεθυλοαιθυλενο διαμίνη) πετυχαίνει την διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού, (Kingsbury & Masters, 1970).

Κατά την μη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτική χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτική συσσώρευσης, *stacking gel*). Το ρυθμιστικό διάλυμα του συστήματος περιέχει γλυκίνη και είναι ρυθμισμένο σε pH 8.3. Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της πηκτικής συσσώρευσης σε pH 6.8. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται μπροστά τους. Ακολούθως εισερχόμενες στην δεύτερη πηκτική (πηκτική διαχωρισμού) με pH 8.8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάσει του φορτίου τους και του μεγέθους τους.

Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli έχουμε πολυμερισμό της πηκτικής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτική συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (Laemmli, 1970). Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειικό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Πρωτόκολλο εφαρμογής της μεθόδου

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% γλυκερόλη, 0.2% Bromophenol blue, 200 mM DTT). Ακολούθησε βρασμός των πρωτεϊνών για 5 λεπτά στους 100°C και γρήγορη περιστροφή στην φυγόκεντρο πριν την φόρτωση τους στην πηκτή.

Για την κατασκευή της πηκτής προετοιμάζεται πρώτα η συσκευή του πολυμερισμού (κατά Laemmli). Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού [30% μείγματος ακρυλαμίδης (29% ακρυλαμίδα, 0.8% N,N' - μεθυλενοδιαακρυλαμίδα), 1 M Tris- HCl pH 8.8, 20% SDS, 10% APS, TEMED] και αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτή συσσώρευσης αποτελείται από 5% μείγμα ακρυλαμίδης, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% SDS, 10% APS και TEMED. Το ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM Glycine pH 8.3, 0.1% SDS. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 15mA/gel στην πηκτή συσσώρευσης και στην πηκτή διαχωρισμού στα 30mA/gel.

4.19 Χρώση με μπλε του Coomassie

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Κατά αυτήν η πηκτή τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 2.5% w/v Coomassie blue) όπου και αφήνεται για 10 λεπτά σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (15% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 12 ώρες σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι γίνονται ορατές οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

4.20 Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a (+)

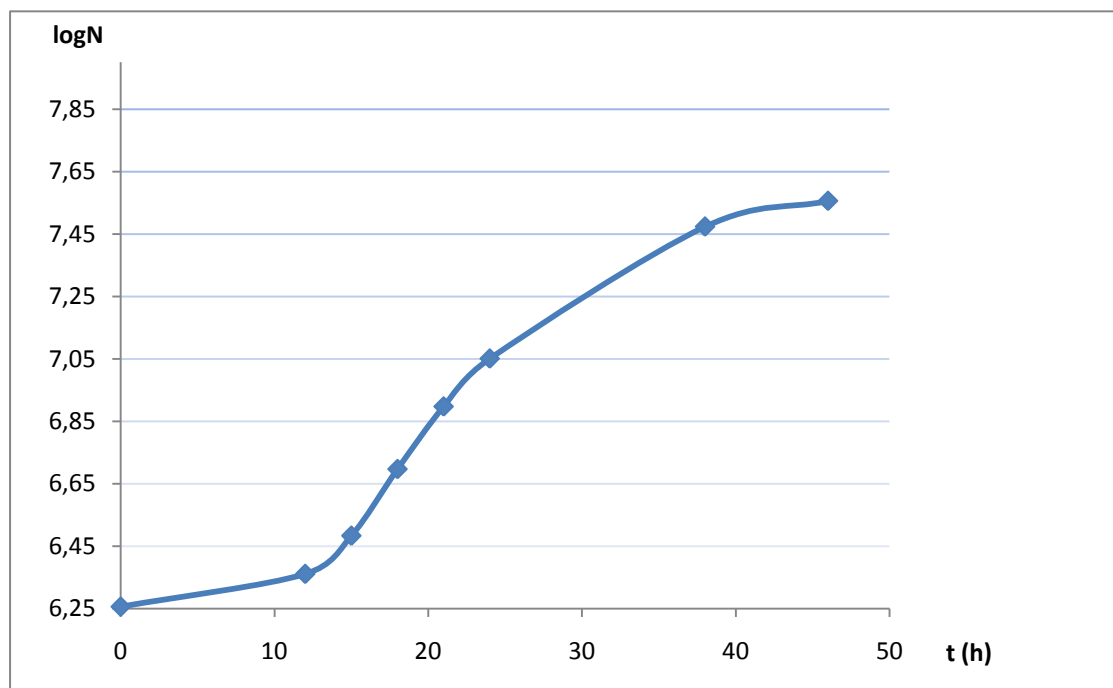
Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο pET28a (+) (Παράρτημα II). Οι πλασμιδιακοί φορείς pET28a (+) φέρουν τον T7 προαγωγό της RNA πολυμεράσης καθώς επίσης αμινο- και κάρβοξυ- τελικά άκρα με κατάλοιπα ιστιδίνης (His-Tag). Φέρουν επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη..

pET28a/pHOD: Προέκυψε με γραμμοποίηση του φορέα Pet28a με NcoI & HindIII και υποκλωνοποίηση στη θέση αυτή της κωδικής περιοχής του *pHOD*, μετά από την απομόνωση του γονιδίου με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενοματικό DNA του *Azotobacter Vinelandii* και εκκινητές τους pHODL1 pHODU1 και κατόπιν με πέψη του προϊόντος της PCR με KpnI/XbaI. NcoI & HindIII

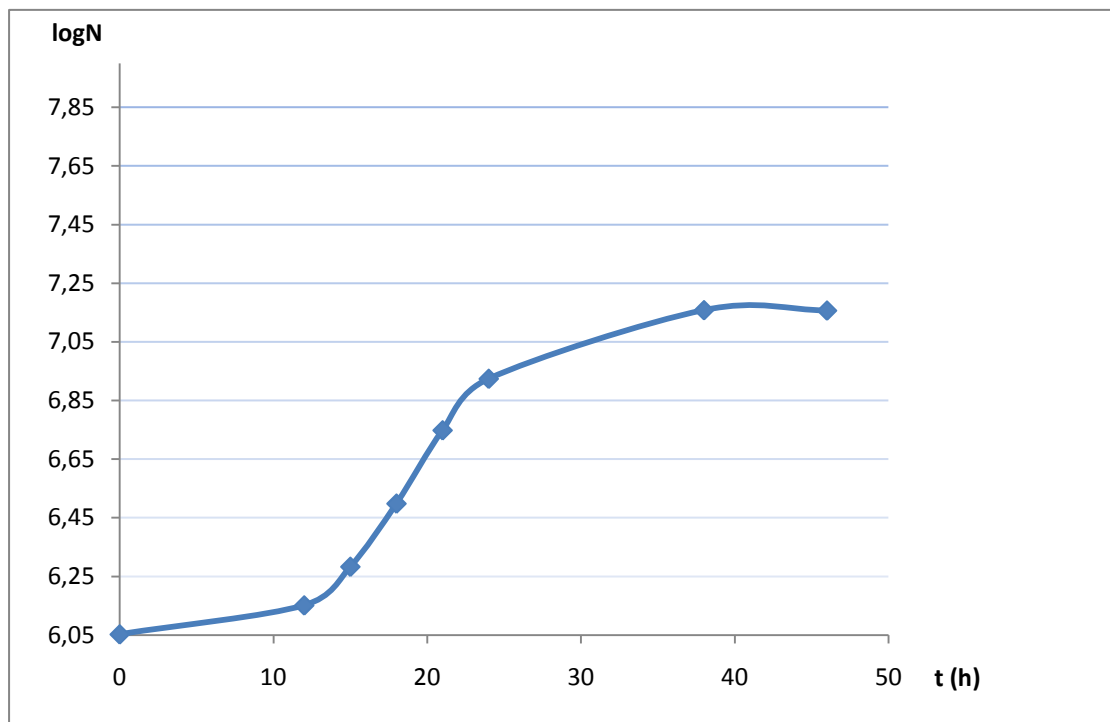
Αποτελέσματα

5.1 Αζωτοδεσμευτική ικανότητα και κινητική της αύξησης του *Azotobacter Vinelandii*

Στο *Azotobacter Vinelandii* AvOP, ελέγχθηκε η ικανότητα δέσμευσης ατμοσφαιρικού αζώτου με την μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου. Η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα που παρουσίασε το βακτήριο ήταν πολύ έντονη. Για την μελέτη της κινητικής αύξησης του βακτηρίου, δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς, η οποία συνδέει τον αριθμό των κυττάρων του βακτηρίου με την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, σε δυο υποστρώματα Rennie, ένα με προσθήκη πηγής αζώτου (N) (NH_4Cl σε συγκέντρωση 1g/l) και ένα χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου (R) (Παράρτημα III).



Εικόνα 11. Κινητική αύξηση του βακτηρίου αναπτυσσόμενο σε θρεπτικό Rennie χωρίς προσθήκη κάποιας πηγής αζώτου σε αυτό (R).



Εικόνα 12. Κινητική αύξηση του βακτηρίου αναπτυσσόμενο σε θρεπτικό Rennie με προσθήκη πηγής αζώτου σε αυτό (R).

Από διαγράμματα φαίνεται ότι, η ανάπτυξη του βακτηρίου στα υποστρώματα R και N αντίστοιχα, είναι παρόμοια και δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά. Το *Azotobacter vinelandii* ΑνΟΡ, αναπτυσσόμενο στα δυο υποστρώματα (R και N), παρατηρείται ότι εισέρχεται την ίδια χρονική περίοδο (12 ώρες) στην εκθετική φάση, οι οποίες διαρκούν το ίδιο, αντίστοιχα σε R και N.

5.2 Έκκριση πρωτεϊνών του *Azotobacter vinelandii*

Αρχικά, ανιχνεύθηκαν όλες οι πρωτεΐνες του *Azotobacter vinelandii* AvOP που πιθανόν να περιέχουν ένα Tat πεπτιδίο οδηγό. Ο προσδιορισμός τους, έγινε μέσω BLAST του NCBI, ανιχνεύοντας τις πρωτεΐνες που περιέχουν ένα από τα εξής μοτίβα: SRRRFLK, SRRXFLX, TRRXFLX, SRRXXLK, SRRXXLA, TRRXXLK, TRRXXLA, SRRXXLT, SRRXXIK, SRRXXIA, SRRXFIX, SRRXFMK, SRRXFVK, SRRXFVA, SRRQFLK, RRXFLA, και RRXFLK στις 60 πρώτες βάσεις τους. Από τα αποτελέσματα, προέκυψαν 175 πρωτεΐνες που πιθανόν να έχουν Tat πεπτιδίο οδηγό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από BLAST του NCBI, οι οποίες περιέχουν ένα ή περισσότερα από τα συγκεκριμένα μοτίβα. Για κάθε πρωτεΐνη, αναφέρεται το μοτίβο με το οποίο ανιχνεύθηκε, η ταυτότητα του γονιδίου της και τα πρώτα 60 αα της αλληλουχία της.

Motifs	Gene ID	aa έως 60
SRRRFLK	Avin_07350	mliqipprshcpsseitpesvylsrrrflgagavalgaavlparsraesqryagvepgrp
SRRRFLK	Avin_03750	mthcsrrrflitlaggallaaplagrlalaapgdwpqrpriyvvpwaggpdtftgrvian
SRRRFLK	Avin_03760	msqpsdglssrrrflagsagalalsplllhgrragaatpgrlrvaykkggdkllleaagla
SRRRFLK	Avin_39160	mlicplcrgtlqpedegatcpaghrfdrarqgylnllpvqhkkssrdpgdnqamvearrff
SRRRFLK	Avin_48050	msrvcaqvtgkpvgtgnnishannktrrrflpnlqhhfrfwvesekrfvrlvsakgmriid
SRRRFLK	Avin_35550	mmpmhmpqjpdttlptdtkpfnlsrrrflvgaslsalvlgallpgkvvraaqsqaeeikpgt
SRRRFLK	Avin_25840	msgtdindfavanlsrrrflkgvaaggalliaaswgardvfaerkygadgmehgwvddp
SRRRFLK	Avin_42330	mhdpprhrsrrqflaagslgaagvlwsalpfagstqdttsggsmtdlilfngrihvtd
SRRRFLK	Avin_50590	msrletfydvrrrrqgitrrsflkycsltaaalglgpafapriahametkprtpvlwhgl
SRRRFLK	Avin_29220	mhrrrllkllaglalpfatahparqlvgirswrsgklrvldlsgpvehrfelaap
SRRRFLK	Avin_12170	msdidshrrllkglgagllpgmgcapaliaapparpriadgvqsgdlqgdraviwsrc
SRRRFLK	Avin_36480	mltqeqaveirvlarqghsirqiakmlgvsrntvrrylkeptvprsprdprptkldpfh
SRRRFLK	Avin_31110	mftdsnlssrrrflglagtaaaaaavgrfawaadphahaahaahgahgddaqnflrdaksw

SRRRFLK	Avin_09530	mltqeqaveirvarqghsirqiakmlgvsrntvrrylkeptvprysprdrptkldpfb
SRRRFLK	Avin_31560	mltqeqaveirvarqghsirqiakmlgvsrntvrrylkeptvprysprdrptkldpfb
SRRRFLK	Avin_26990	mpkhacatseassspafslsrrllgatctgalligplapawatpsetglatfmeIsrr
SRRRFLK	Avin_15970	maikvenlskcfhydkprdrllqmlcrgrrffrefwalrdvafdikkgetvzivgrng
SRRRFLK	Avin_07100	mcpragslscaarwrrpagsrlengrgtdrcrrffgaaeassnpldgskgylpgrplg
SRRRFLK	Avin_22640	mkpprlspeesaaiewlalqrgsrmsdterrrfegwlaenerhrgawerlqrrldsafag
SRRRFLK	Avin_30760	mvpaaldtrrrfvvtgergnqfvefdfaigepelcvemilgreafaefcaanrvellpa
SRRRFLK	Avin_40230	mdtlalhyhdlveyirrrfscrqfahdvvhdcvqllkppqrpvaqpafalrrvsfnra
SRRRFLK	Avin_42340	mtllirhvregrereyegwrrrtvdvakgypghlqvdlvreqdgrrrftcvlrfastg
SRRRFLK	Avin_45580	mipasrqlslpfgllalvwlwaaieplrsrdwllenllvffgglllatrrrfafslgay
SRRRFLK	Avin_08850	msieiktvaieplrhtyshiirrrfgdkpasryqaeasfdieartnfhyrplyqpdkelndp
SRRRFLK	Avin_30600	msdeltlsredvvlrcervegaqsraqaipkltdeyprmtvadgyavqnelrrrfvaqqg
SRRRFLK	Avin_33880	mspldrrrfnallaglaaatgalppargtapaepetllerndwmpnnpripvllrygaip
SRRRFLK	Avin_27760	mnrftvtdlplaglkveirrrfgdsrgflarlfcaeelaatgwlpiaqinhfttwtgrt
SRRRFLK	Avin_00430	mrrflsifmaccvamtlsldanakrfggkssgsapshqssqmrqaqpqqpagstatapn
SRRRFLK	Avin_37770	mkkllhfhirlyrlvvlafglvmaggvsllerfrrddlmalrqltrrflvqlaaalpfr
SRRRFLK	Avin_17500	mnrfvsvngnvyrwperpvvvvcidggdpeylrrfladgalpniqrfvqegysavatgsm
SRRRFLK	Avin_36270	mylhtsterrrflagawltlallgiggcstnkdkllphgatdmldvwqqgtgsagsasgr
SRRRFLK	Avin_02470	mfrkflatslatavalstsfhgnalaaspktaagdqdwahrsviyqiyprsfadgdgd
SRRRFLK	Avin_20200	mkepvihsrdlivglqkglalmqlfserhprlsvppaaslsqtpsa vrrfltlvhdf
SRRRFLK	Avin_26070	maelhfpdetaatgginfsrraflrgtgglalgiyfapllgrgslagaagdfepnafir
SRRRFLK	Avin_01210	mgilgtiligligvvarflkpgdqpmgwimtilggigslvatyggqvlgiyrageaag
SRRRFLK	Avin_44720	mrivsaqqlekwlgnrvlekdgrgpkvvalddgrflkifhtrrhpllarlpaarrffg
SRRRFLK	Avin_39060	mlstrgqvierllrgefictsdedawrlktpanreqiddylatlnrmvatvggagedd
SRRRFLK	Avin_37970	marltardfhpellelydyvhgrisrraflegaarfavvglsaaailaslsdpdalaqq
SRRRFLK	Avin_02060	mkkitvtdtilrdahqslatrmledmpicdkldkvgywslevwggatfdacirflke
SRRRFLK	Avin_23500	mtllisdhldeerpdiaflrlkerasqaealyilgdffeawigddamtsfqrda
SRRXFLX	Avin_32340	msnevinekrreflgaaalaipaalgvpamttttaraadyrknptflvydgaitknep
SRRXFLX	Avin_12880	mltvrrggfiillallplfaaasttphqvqqttetliddlknkafyknppqafydaln
SRRXFLX	Avin_39910	mprrgflsrlaaitagfaharpafaqslasgplgarvipstgrrspaigtggsgrlerer
SRRXFLX	Avin_21940	mtytslhwgayrplvengrlevmrvpwpdrdpspigaslpagidspsrirrpavrrgfle
SRRXFLX	Avin_29950	meqdatwsnallstisrsgimlpkvsalyrkiqklldrtlpeplfyqrryflhkrfc

TRRXFLX	Avin_33900	mntrrhflasaavalaapllaqsatgpgsvlptqgridprlpnprvvggryrppirl
TRRXFLX	Avin_34790	mggrppflvdtssivraggdgleclrlpssrimvepvrr
TRRXFLX	Avin_27930	mgvrrafpafanrrinmef vtlfg
TRRXFLX	Avin_25580	mnaedaqkla rrfielpqek rrfllqglweegvdfslfpipadvgiperqglsyaqqrmw
TRRXFLX	Avin_09180	mrrraflagliamslsvagaaeggvpsarrdgplldghihlfdatrpegvwpapeda
TRRXFLX	Avin_00890	mpddkafng rrdflrktlavipaitvagygvatfagqaapaaqnpyprrfssaewafv
TRRXFLX	Avin_08310	msfdwhgawqalvqhpflfafgitlgtqylavaayektrwvflqpvlvsmllvlgvsvcg
TRRXFLX	Avin_34940	mtdhphaqldwdeggqplsrgfdvyfsrasgleetryvflghnglprfaalpaggrls
SRRXXLK	Avin_44550	mgfstwgriafalrplqgeivmpvna srrsalktlallgsagaasllpgcwkkeeggaa
SRRXXLK	Avin_31510	msfpls rrrhwkltlacgallgfstlmasdaplkigttaafapplevavaeaakegiev
SRRXXLK	Avin_33460	mavfdvskfileeevirggelkshtterrtllkflviisiavslealvfifdagkkditm
SRRXXLK	Avin_14420	msskssptpaaasqantqladspldsslddligyal rraqkqvqqvgrlaafdlrpaq
SRRXXLK	Avin_38680	malnikakeapefdvdddvlmdadivledvlddepdlpvaksrqanlkqhkyidytral
SRRXXLK	Avin_51470	msavnpsletvrdgasadapraaeaglawwadaiiqiyprsfadangdgigdlpgitsr
SRRXXLK	Avin_05900	mtkraykyrfyptpeqaellartfgcvrsvynrilwrtdafyqeckkigytaassrlta
SRRXXLK	Avin_39640	mrwllasclsvglqsasvlspeggeqrivdkilvkkserklmllsrgqplksykvslgk
SRRXXLK	P14890	maserladgdsryllkvaheqfgcappgelseqldqqadriigrhiedavlrsdpaig
SRRXXLK	Avin_01690	maserladgdsryllkvaheqfgcappgelseeqldqqadriigrhiedavlrsdpaig
SRRXXLA	Avin_25400	mreyqamdiwlvsehlpvqaiagdsrvtsprrrsrrpala aaaallslgslgwgqgw
SRRXXLA	Avin_46970	mlvlgletsdetgvalydsrrglladalfsqidlhriyggvvpelasrdhvkrmpllr
SRRXXLA	Avin_27390	mnisglqsgltrlaqvssqkgrfpgasnqqpgtvseh srriglamvpsvavllawmvv
SRRXXLA	Avin_38050	myvedekdrpgsdltlpgrrkvlatgavlaalpllaslpsmgfaqqtagtggrakadih
SRRXXLA	Avin_30000	mhcletigsggveqrrtlarrrldgsryqqlsvctkavgalparfaeagcplhavgvfrg
SRRXXLA	Avin_27480	mavpapcrrwcvrflcpspfdpplgmpslffrrfglavllgllapwasatqIntivsry
SRRXXLA	Avin_11740	mtidpilsvlaccglfmagflgrwmqptpkpgadpeepvddaglfcgwdglsvderrrq
SRRXXLA	Avin_01150	mrgvpillavcngcsslayyghlaggqldllrrreplatviadpardpvlrqltqaqa
SRRXXLA	Avin_23420	mstleqrrgelagsarlltsadldafpeeifaladsleildlsgnrlltslpadprlgk
SRRXXLA	Avin_02260	mngfarcayrrelahvyrdtanelcgeagdrgaarffkkrayyevtrahalleilgtds
SRRXXLA	Avin_48150	mdkttsgwingflgvvifagslpatraavmfdsfiltcaraaiaallglallvfrqrr

SRRXXLA	Avin_24290	mdearge rr qalalsyaegdaapr ^v vakgygrlaerivaeahrqgvpvhaapelvgllmq
SRRXXLA	Avin_49490	mgps ir rallaaaallcsaraaephaaecivpaasgggfdlvcklarealqeagl trrp
SRRXXLA	Avin_51720	mqqdeglgaglmvvhgnrlealrelavewm rrh plapledevlvqsngivqwkllag
SRRXXLA	Avin_07950	mwsfraw rrrr ilaripvdpelwrqvl ^d slpildglsaeetgrlrcvflfhakrital
SRRXXLA	Avin_37870	mk rrr nllagggallaaatlggwrlmsgdrqp ^l llsarddaeghhhaagyrl ^d gsvfatr
SRRXXLA	Avin_39690	msv trr qilaglagvsalglgaggarywlgrpegakthdyeliaapl ^d velvpg rrts vw
SRRXXLA	Avin_31720	ms ir r ^f alaaalglslsaaaqaq ^l lllnvsydp ^t relyreynaafnkhwqaeghepv ^t iq
SRRXXLA	Avin_15390	m rr lilayctllslggcqsayysmmekagv ^h krdiladrveaardsqqaakerfkdaler
SRRXXLA	Avin_30200	mserilslaal ^t vl ^e l ^s ppdmveaaragys ^h vglrlvpatae ^{eh} h ^f plvadagl rrq tl
SRRXXLA	Avin_43970	mpq trr fpqsiyalpladnrl ^r ldrvprqadplaer hrr qlagaf ^r l ^f arlgfevgva
SRRXXLA	Avin_11270	mihvqyfaryretlgvdserlaweegfar ^l dd rrh llarggdwavl ^g ernlmcarnqel
SRRXXLA	Avin_10350	miiygvallsictlaglfig ^d llgvllgvpsnvgvgiamillifggnwla rrg llaakt
SRRXXLA	Avin_41610	mgelp ^p leqrsrl ^d ngvratllrdpqa rr valaagvdagsl ^h epeawp ^g lahflehalf
TRRXXLK	Avin_36490	mkyafmqah ^r qfplkvmcrvlgarsgyyawcsrtlsk rr qqqtq ^d l ^r vaqayherkg
TRRXXLK	Avin_09750	mkyafmqah ^r qfplkvmcrvlgarsgyyawcsrtlsk rr qqqtq ^d l ^r vaqayherkg
TRRXXLK	Avin_16550	mkyafmqah ^r qfplkvmcrvlgarsgyyawcsrtlsk rr qqqtq ^d l ^r vaqayherkg
TRRXXLK	Avin_11470	mtrlhdkiy ^l kanlwlv ^l pilligilfv ^l aldpap ^{tr} lslatgpeggyqafgeqlka
TRRXXLK	Avin_14750	mk fr kpre ⁿ veinlasidv ^l fillffv ^{tt} ttfretq ^l kv ^e lpeavsg ^t ppesaepk
TRRXXLK	Avin_02130	msrlq ^r faelkqad ^r aalv ^f vtagdpdyetslailk ^g lpeagadv ⁱ elgmp ^f tdp ^m ad
TRRXXLA	Avin_40910	m trr tplacaihalsglilap ^l plsvllpalataq ^d rsgirdyripag ^l gaalsqfat
TRRXXLA	CAA75394.1	mqdmq ^d ld ^p ietqewldsles ^l dhegeerahyll ^t rmgelat ^r gtq ^l pyait ^t pyrnt
TRRXXLA	Avin_44900	meqdmq ^d m ^d ld ^p ietqewldsles ^l dhegeerahyll ^t rmgelat ^r gtq ^l pyait ^t p
SRRXXLT	Avin_45960	mqt ^v qflhaafaeal ^t piha rr leal ^m aavaallqg rr lttalgrslp ^g sawprqair
SRRXXLT	Avin_04020	mdilsh ^m rifa ^c vaetgsftaaat ^r ldl ^t tsyvsr ^a vasleshl ^r trll ^h rr rr ialte
SRRXXLT	Avin_39900	ma ^l ndisl ^r l ^r fvavesgsls ^a araqhitpaas ^r klr ^q leeslg ^v rl ^l q ^r t tr qsl
SRRXXLT	Avin_40480	mtfellat ^d gka rr gl ^t fprgvvetpafmp ^v gyt ^g tkgml ^p rdieaigaq ⁱ ilgn ^t fh
SRRXXLT	Avin_21640	mpdeypsmn rrr ill ^t gsl ^a al ^a lasrwgvaasg ^p ld ^s r ^r l ^g v ^g ty ^k aapsf ^f eea
SRRXXLT	Avin_31180	mse rrr gg ^l tl ^s clg ^l l ^p fggagaagfiedsk ^a tl ^s l ^k nf ^y inq ^d vr ⁿ dap ^r seewgqa
SRRXXLT	Avin_16720	mdnragemq ^v fv ^r vetgsf ^e aarq ^l l ^t sp ^t isk ^l v ^r ieq ^r lg ^v rl ^f ers trr lalt
SRRXXLT	Avin_15140	mttytsq ^c pat ^v eldn rr tw ^t ialc ^f svavlegid ^f qap ^g giaap ^g maa ^a afg ^d kl ^h mgw
SRRXXLT	Avin_12680	mvat ^l ylasgsp rrr ell ^t q ⁱ gv ^p ft ^l av ^t idet ^p ladet ^p aty ^v er ^l ardkaaglag

SRRXXLT	Avin_31030	mdrltmsgafvmaesgsyasaerlglspqmvakhvaale rr lgarlInrt rr qsite
SRRXXLT	Avin_29850	mdkwlvidleattdeggwpvadmeieigaslvnrngheldhfrkrvrpl rr plltfcg
SRRXXLT	Avin_04110	mnrqiarliekgsnfr rr falthgyeprtvtqavqrwagastlpngrltsilrdlsia
SRRXXLT	Avin_46820	msv rr faltppgepagigpdlcillarqaqpqalvaiasrallaeraallgdielipvap
SRRXXLT	Avin_26010	misrnl rr ldltlqlvavaeegttraaereaivsaaskrldvlesslgvtlfrq
SRRXXLT	Avin_15310	mnsdalggglefldvlecgsfsaaarrqltpsava rr idgleqltgsplfqrsthevr
SRRXXLT	Avin_19070	msrkstltlavagtlglpmtvqeaafiedskasltfknfyinqddrdqdrarseewg
SRRXXLT	Avin_44500	mielrqlryfmalaehlhfgkaaeslhitqpplsrqisaleadlgvvlfsrshrsvelta
SRRXXLT	Avin_08760	mkmelrqlkyfravagtlfnskaaeqlhiaqpplsrqiqgledelgvrlldrssrpmrlt
SRRXXLT	Avin_32080	mlglvlvhpqsrphaltvckargveasvavhaalerddvlaagiarlllwtddpaplpavg
SRRXXLT	Avin_20770	mlesqtalaiessttsadayqnailskvsrtfaltipqlppl rr ravtnayllcriadi
SRRXXLT	Avin_00920	mnnrndsslsgracaltlafaglpqtpvlagfledsggtltnfyihrnfvcdgatr
SRRXXIK	Avin_43140	mkpspsyltknrhgtyfrmvipaplrtilnskrev rr slktds rr laikrarqfavrye
SRRXXIK	Avin_47920	mktqnkdlpgwllaaglglaapfgmavqdevtpaqvvaaledtfgvtpge rr nhikgtca
SRRXXIK	AAG29819.1	vdaqgkilgvrvlthketpgladkieasrsdwikvfdglsentaldkwkvkddggqfdq
SRRXXIA	Avin_39950	mmtvtrfd rr taiallaavffmenldatviatslpamaldfgtapahlsvgvsaylval
SRRXXIA	Avin_17410	mrrerkrektgtpastagv rr wtialvfaarprtlggamngqtdmdtdfldah rr hw
SRRXXIA	Avin_03070	mtdpriafigagnmaasligglraqgvpaairasapsae rr ariaehgielfadnaea
SRRXXIA	Avin_17790	mthpkqpfar rr iviaftlmtlvvsgffslsivaivhfverhlvsqelkseldtvinqdir
SRRXXIA	Avin_37100	hsgrkiihd cdcfyaiem rddprlagrp lavggapd rr gviatcnyearaygvhsamp
SRRXXIA	Avin_18940	miat rr laiallplalsasaaqinttlpknvqqalsahklpgdalslvlpitpggv
SRRXXIA	Avin_28430	mrtkdtdalsgdgeipsnhsnnphiddliqgig rr qviaggmamgmlafgtvprtgn
SRRXXIA	Avin_31740	mssitlnaaasanaa rr gnvlgr rr lliaaawlvfavfllplyvvlsealklgtffda
SRRXXIA	Avin_49380	mkspg rr taiallvalsapvlagppggggghggppgsswgpghgplpdyarelv
SRRXXIA	Avin_03790	mdkmlalkmfvetvrsagfsaaa rr lgiatssvtrmvtaleseigtvllnrntrnsvte
SRRXXIA	Avin_44970	mrraf rr trlylalatagilmgnslplhaveqtqpgsrhfdiappglgqaltrfddqsg
SRRXXIA	Avin_18790	mnilwphwlrpdwlllpllawllwrlw rr rragrwellppathqallgarsgrsrl
SRRXXIA	Avin_11860	mrtlpgh rr qagatlvglvlllftllvssafvlqtsnlkavgnmqsrdesiaaamat
SRRXFIX	Avin_00250	mhckts rr rtfvkglagvglagfwrppvwalggparpallsgsefdisgeapvnitg
SRRXFIX	Avin_30410	mnpvrk rr lfiailagvgaavalalsalqqninlftytpsquiaageapegariraggvlv
SRRXFIX	Avin_48770	msrkkfieaqqatcrnwtwswsfinegkviifgawdntdgdtsliisdtweysergrk

SRRXFIX	Avin_05210	mtlakatlrrrfvpntlsserkvlrsiln
SRRXFIX	Avin_40700	mrsqppwspgayidegpneasvrrffvegliaeirpnrndaakavlrlhasahqrlegthag
SRRXFIX	Avin_12040	miaadllapdtrligaglylglmlyavwvrapwlelfsdsrrqhlvfgtvlalfllwlvrr
SRRXFIX	Avin_37050	mtcfpnrrilvieddpllgvhlnehlerrrgfvvtlcsdghgglelasecdfdilldill
SRRXFIX	Avin_03600	mptrrrefvyrdkllpfillvccfaawgvvatmtdplvqvfstvsmstlqaslvqfayyg
SRRXFIX	Avin_03710	mlsvsrlefigvlpardireplppgavpldkaylgacaralehggfagaligwqeaapdg
SRRXFIX	Avin_14970	msrglfitlegpegagkstrndylaeglaagrevvltrepqgtplaerirellapase
SRRXFIX	Avin_38200	msrdvfidavrtpigrggglagvraddlaaipkallarnprldpaavdevflgcanq
SRRXFIX	Avin_19720	mdnpeivsilgaalavsfalgpalaegravaaamdaiarqpeaagtlstrtfvglami
SRRXFIX	Avin_21120	mtafatvkpsksleafvetfggyvyeahspwiaeavfdqgigeedddierlharlaqvvt
SRRXFIX	Avin_44580	mneffkpdpdaveivrrreactgfylervhlrhrqfsgemgpvlsrelvrhdavcvlp
SRRXFMK	Avin_19510	mdyfivfvttvglyfhwlyvrikwmdrdlalslagqddqarrdymlerldearrqgvk
SRRXFMK	Avin_42960	nakrdyyevlgvergageaelkkayrrlamkyhpdnppddksaeekfkeveayevlsda
SRRXFMK	Avin_09760	metitmsdvaligidlgkhsfhlhgqdkigrevfrrkssrqmmrffgnlpactvmeac
SRRXFVK	Avin_40760	mtgarrrvkvkigsalltadgrgldrsmavvveqmvvlreagvelvsvsgavaagmsql
SRRXFVK	Avin_06280	maivkckptsagrrfvkvvnqelhgkapyapllekksksggrnngritrhhiggghkq
SRRXFVK	Avin_38920	mnalymiigtialgvltvthefghfwvrrcgvkvlrfsigfgmplrwhdrqgtefvi
SRRXFVK	Avin_51610	magldkrvntyeaalgltdgmtvlaggfglcgipenliaeierrrvkgltvsvnncgid
SRRXFVA	Avin_30510	mraivrrsrlvalfaatvsfgaitqaqaetlrigyqkygtvlilkakgslekrlaeqgve
SRRXFVA	Avin_32210	mesyqlaelacilksmtgvlnrlerdgivrskpahdqrrmyvaltekqqcfvsmade
SRRXFVA	Avin_20470	nkfseqwlrwvnpqvsrdelvarlsmaglevdsvapvagdfsgvvvgeilssephpdad
SRRXFVA	Avin_01070	mhegrwqlldtdpawagnrshdaliafawsgppgrrrlvavnyadhpsqgfvrlpwddla
SRRXFVA	Avin_21530	mkplavailgatlifqqallapfaagsaaraddasrrfdvaggplqqvlgqyasqagvv
SRRXFVA	Avin_13750	msinfplllvavlisgalvldllvlaprrraavaeyegsvgqpdqsvvdrlnkepllv
SRRXFVA	Avin_08410	mhrrgrvagtllslaslaglglscalhggaalagdyadspqvdefiaemtrdygfaseq
SRRXFVA	Q8RPZ9	marvkrqviaerrrhkklakgyygarsvfrvakqavikagqayrdrrqrkrqfral
RRXFLK	Avin_21540	hpsdrqrdalmaarwhavlcsdevreedraawrawraqapenqwawqrmellqrqlqdl
SRRQFLK	Avin_49120	mysrrqllhysalfaalaamaplssisllaaepllarripssgeelpavglgtrthdvs
SRRQFLK	Avin_20130	mtiasghdlrrqfrallesntcydaasvfdpmsariagdlkfevgilggsvaalqvlaap

SRRQFLK	Avin_20560	mlcqislsksqdsfarilrqflrka
SRRQFLK	Avin_11530	mfdsksrvgaitrllhrsmavliilwqflkgdriadgehwwgrtlvpwhisigalllv
SRRQFLK	Avin_09800	mqpftvggkaapllaanvtdvimpkqflkgidrsqldrgvffalrflesgapnpefil
SRRQFLK	Avin_34270	mkaftqhtglvapldranvtdqiiipkqflksikrtgfgpnlfedewryldvgqpgqdcsa
SRRQFLK	Avin_29480	mrhpchlchpchirirpyfveypwgiepkwasmersvsrrqcrarrp
SRRQFLK	Avin_23700	msdndfalfqsatlgvklplrrddradtgvqrdrqqitsrrqaamqavetqgidglsdqf
SRRQFLK	Avin_36580	merpmslltwlgrksaepseapsqgfhsparaavfdtprrqhlleniqrasslrqqf
RRXFLA	Avin_32550	mtrndkhdphghgpadpqrllataailgvapwllsactapsastantaapaqpagtgs
RRXFLA	Avin_19550	mmhapilpillpfagslllghrlghgicrrlslaatwallplavwallasdgrriy
RRXFLA	Avin_01780	mltllhllsaiallvwgthivrtgilrvyglqrlqllshsmrrpslafslgmgvtalvqs

Στην συνέχεια, οι αλληλουχίες αυτών των 175 πρωτεϊνών, αναλύθηκαν όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του υποψήφιου Tat πεπτιδίου οδηγού τους. Οι αναλύσεις, έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος signalP 3.0. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν για τον ίδιο λόγο και με τα προγράμματα TatP 1.0 και TATFIND αντίστοιχα, για τη λήψη περισσότερων στοιχείων. Τέλος, με τη βοήθεια του img, ελήφθησαν και ενσωματώθηκαν πληροφορίες για κάθε πρωτεΐνη, που έχουν να κάνουν με το μήκος της αλληλουχίας των αμινοξέων τους καθώς επίσης και με το αν η κάθε πρωτεΐνη, περιέχει ή όχι πεπτιδίο οδηγό. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2. Ανάλυση πρωτεϊνών που προέκυψαν μετά από BLAST

img		SignalP 3.0									TatP 1.0					TATFIND
Motifs	Gene ID	Signal peptide	sequence	Signal Peptide						Tat single Peptide					Result	
				max C	max Y	max S	mean S	D score	Prediction	Signal Peptide Probability	max C	max Y	max S	mean S		max D
SRRRFLK	Avin_07350	NO	336aa	NO	NO	YES	NO	NO	Non Secreted	0,281	NO	YES	YES	NO	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_03750	YES	334aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_03760	YES	329aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,988	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_39160	NO	267aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_48050	NO	78aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_35550	NO	746aa	NO	NO	YES	NO	NO	Non Secreted	0,320	NO	NO	YES	NO	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_25840	NO	770aa	NO	YES	NO	NO	NO	Non Secreted	0,149	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_42330	YES	656aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,980	NO	NO	NO	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_50590	YES	358aa	YES	YES	YES	NO	NO	Signal Peptide	0,997	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_29220	YES	396aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_12170	YES	519aa	NO	YES	YES	NO	YES	Signal Peptide	0,987	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_36480	NO	341aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_31110	YES	360aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_09530	NO	341aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_31560	NO	341aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_26990	YES	171aa	NO	NO	YES	YES	NO	Signal Peptide	0,943	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_15970	NO	447aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_07100	NO	143aa	NO	NO	YES	YES	YES	Non Secreted	0	NO	NO	YES	YES	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_22640	NO	317aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_30760	NO	88aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_40230	NO	169aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_42340	NO	177aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_45580	NO	200aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,354	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE

SRRRFLK	Avin_08850	NO	332aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_30600	NO	267aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_33880	YES	197aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,993	NO	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRRFLK	Avin_27760	NO	186aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_00430	YES	284aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,999	NO	NO	YES	YES	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_37770	YES	256aa	YES	YES	NO	NO	YES	Signal Peptide	0,992	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_17500	NO	416aa	NO	NO	NO	YES	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_36270	YES	148aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,596	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_02470	YES	576aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	NO	YES	YES	FALSE
SRRRFLK	Avin_20200	NO	255aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_26070	NO	746aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	YES	NO	YES	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_01210	NO	81aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,018	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_44720	NO	216aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_39060	NO	213aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_37970	NO	295aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_02060	NO	599aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRRFLK	Avin_23500	NO	241aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFLX	Avin_32340	YES	366aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,997	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXFLX	Avin_12880	YES	215aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFLX	Avin_39910	YES	520aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	NO	YES	YES	YES	FALSE
SRRXFLX	Avin_21940	NO	756aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFLX	Avin_29950	NO	345aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE

TRRXFLX	Avin_33900	YES	378aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1,000	NO	NO	YES	YES	YES	FALSE
TRRXFLX	Avin_34790	NO	40aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE
TRRXFLX	Avin_27930	YES	25aa	YES	YES	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE
TRRXFLX	Avin_25580	NO	4747aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXFLX	Avin_09180	YES	325aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1,000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
TRRXFLX	Avin_00890	YES	236aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,607	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
TRRXFLX	Avin_08310	YES	238aa	NO	YES	NO	NO	NO	Non Secreted	0,003	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXFLX	Avin_34940	NO	653aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_44550	NO	371aa	NO	NO	YES	YES	NO	Non Secreted	0,003	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXLK	Avin_31510	YES	273aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1,000	YES	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXLK	Avin_33460	NO	90aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_14420	YES	161aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,746	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_38680	NO	334aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_51470	NO	565aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_05900	NO	381aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_39640	YES	168aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,999	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	P14890			NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLK	Avin_01690	NO	293aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_25400	NO	277aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,007	NO	NO	YES	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_46970	NO	341aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_27390	NO	325aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,001	NO	NO	YES	YES	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_38050	NO	401aa	NO	NO	YES	NO	NO	Non Secreted	0,385	NO	NO	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXLA	Avin_30000	NO	370aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_27480	NO	1457aa	NO	NO	YES	YES	NO	Non Secreted	0,005	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_11740	NO	91aa	NO	NO	YES	YES	NO	Non Secreted	0,299	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE

SRRXXLA	Avin_01150	YES	355aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,687	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_23420	NO	438aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,001	NO	NO	YES	YES	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_02260	NO	89aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_48150	NO	287aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,567	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXLA	Avin_24290	NO	94aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_49490	YES	325aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_51720	NO	1168aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_07950	NO	274aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_37870	YES	364aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,998	NO	NO	YES	YES	NO	TRUE
SRRXXLA	Avin_39690	YES	456aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,940	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXLA	Avin_31720	YES	332aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_15390	YES	215aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,774	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_30200	NO	271aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,034	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_43970	NO	276aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_11270	NO	82aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_10350	NO	141aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,214	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLA	Avin_41610	NO	843aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_36490	NO	78aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_09750	NO	286aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_16550	NO	286aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_11470	YES	445aa	NO	YES	NO	NO	YES	Signal Peptide	0,958	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_14750	NO	142aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,113	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXXLK	Avin_02130	NO	269aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,001	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE

TRRXLA	Avin_40910	YES	808aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,996	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
TRRXLA	CAA75394.1			NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
TRRXLA	Avin_44900	NO	889aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_45960	NO	397aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_04020	NO	323aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,009	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_39900	NO	303aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,234	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_40480	NO	371aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXLT	Avin_21640	YES	328aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,945	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXLT	Avin_31180	YES	439aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,999	NO	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXLT	Avin_16720	NO	300aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_15140	NO	413aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,001	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXLT	Avin_12680	NO	196aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXLT	Avin_31030	YES	297aa	YES	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,941	YES	NO	NO	YES	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_29850	NO	185aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_04110	NO	87aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_46820	NO	328aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_26010	NO	307aa	YES	YES	NO	NO	NO	Non Secreted	0,617	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_15310	NO	318aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_19070	YES	442aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,999	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_44500	NO	301aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_08760	NO	306aa	YES	YES	NO	NO	NO	Non Secreted	0,026	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_32080	NO	100aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_20770	NO	377aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXLT	Avin_00920	YES	423aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,996	NO	YES	YES	YES	YES	FALSE

SRRXXIK	Avin_43140	NO	602aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIK	Avin_47920	YES	335aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,997	YES	NO	NO	YES	NO	FALSE
SRRXXIK	AAG29819.1			NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_39950	YES	467aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,922	YES	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXIA	Avin_17410	NO	183aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,080	NO	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXIA	Avin_03070	YES	272aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,712	NO	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXIA	Avin_17790	YES	421aa	NO	YES	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,872	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_37100	NO	353aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_18940	YES	486aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_28430	NO	662aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_31740	NO	290aa	NO	NO	YES	NO	NO	Non Secreted	0,115	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXIA	Avin_49380	YES	165aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXIA	Avin_03790	NO	301aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,003	YES	YES	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_44970	YES	798aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXXIA	Avin_18790	NO	577aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXXIA	Avin_11860	YES	161aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,994	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_00250	YES	621aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,993	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXFIX	Avin_30410	YES	155aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_48770	NO	247aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	YES	YES	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_05210	NO	30aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,002	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_40700	NO	69aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_12040	NO	228aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_37050	NO	233aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_03600	YES	442aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,980	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXFIX	Avin_03710	NO	332aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_14970	NO	211aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE

SRRXFIX	Avin_38200	NO	401aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_19720	YES	82aa	YES	YES	NO	NO	YES	Signal Peptide	0,993	YES	YES	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_21120	NO	171aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFIX	Avin_44580	NO	205aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFM K	Avin_19510	NO	78aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFM K	Avin_42960	NO	375aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFM K	Avin_09760	NO	346aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVK	Avin_40760	NO	368aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVK	Avin_06280	NO	273aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVK	Avin_38920	NO	450aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,020	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVK	Avin_51610	NO	233aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_30510	YES	320aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXFVA	Avin_32210	NO	92aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_20470	NO	792aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_01070	NO	109aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_21530	YES	795aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,995	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_13750	YES	238aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,946	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRXFVA	Avin_08410	YES	342aa	YES	YES	NO	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	FALSE
SRRXFVA	Q8RPZ9			NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
RRXFLK	Avin_21540	NO	317aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE

SRRQFLK	Avin_49120	YES	305aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1,000	YES	YES	NO	NO	NO	TRUE
SRRQFLK	Avin_20130	NO	287aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_20560	NO	24aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_11530	NO	174aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_09800	NO	202aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,013	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_34270	NO	215aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_29480	NO	47aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
SRRQFLK	Avin_23700	NO	186aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	NO	NO	NO	YES	YES	FALSE
SRRQFLK	Avin_36580	NO	631aa	YES	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0	YES	NO	NO	NO	NO	FALSE
RRXFLA	Avin_32550	NO	415aa	NO	NO	YES	YES	NO	Non Secreted	0,379	NO	NO	YES	NO	NO	TRUE
RRXFLA	Avin_19550	NO	499aa	NO	NO	NO	NO	NO	Non Secreted	0,327	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE
RRXFLA	Avin_01780	NO	568aa	NO	NO	YES	YES	YES	Non Secreted	0,277	NO	NO	NO	NO	NO	FALSE

Όσον αφορά τα στοιχεία του `img`, αυτά έχουν να κάνουν με πληροφορίες για κάθε πρωτεΐνη για το αν έχει ή όχι (YES / NO) πεπτιδίο οδηγό (signal peptide), καθώς επίσης και με το μήκος της αλληλουχίας των αμινοξέων της (sequence). Το `signalP 3.0` και το `TatP 1.0`, υπολογίζουν τα δεδομένα για κάθε πρωτεΐνη με τον ίδιο τρόπο και έτσι τα αποτελέσματα τους (τιμές και γραφικά) είναι σχεδόν ίδια. Για κάθε μια από τις προβλέψεις από τα δυο αυτά προγράμματα, χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά νευρωνικά δίκτυα.

Το ένα, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ίδιου του πεπτιδίου οδηγού και το άλλο, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της θέσης της οδηγικής πεπτιδάσης I (SPase I). Η τιμή `S max`, έχει να κάνει με το πεπτιδίο οδηγό και αναφέρεται σε κάθε μια θέση αμινοξυ της αλληλουχίας. Οι υψηλές τιμές, υποδεικνύουν ότι το αντίστοιχο αμινοξύ είναι μέλος ενός πεπτιδίου οδηγού, ενώ οι χαμηλές τιμές ότι είναι μέρος ώριμης πρωτεΐνης. Η τιμή `C max`, έχει να κάνει με την θέση της οδηγικής πεπτιδάσης. Για κάθε μια θέση της αλληλουχίας, αναφέρεται μια τιμή `C max`, η οποία είναι σημαντικά υψηλή, μόνο στη θέση που σχετίζεται με το πεπτιδίο οδηγό.

Η τιμή `Y max`, είναι παράγωγο της `C max` συνδυαζόμενη με την `S max` και αναφέρεται στην πρόβλεψη της θέσης, με μεγαλύτερη ακρίβεια, από τις αντίστοιχες προβλέψεις των μεμονωμένων `C max`. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι σε μια αλληλουχία, μπορούν να βρεθούν πολλαπλές υψηλές τιμές `C max`, αλλά μόνο μια αποτελεί την αληθινή θέση του πεπτιδίου. Η θέση, αποδίδεται από την `Y max`, όπου η κλίση της `C max` είναι απότομη και έχει βρεθεί σημαντικά υψηλή τιμή `C max`.

Η τιμή `S mean`, έχει να κάνει με τον μέσο όρο της `S max`, που κυμαίνεται από το N-τελικό αμινοξύ έως το αμινοξύ με το οποίο σχετίζεται η υψηλότερη τιμή της `Y max`. Η `S mean`, υπολογίζεται από το μήκος του πεπτιδίου οδηγού που ανιχνεύεται. Τέλος, η τιμή `D score` αναφέρεται στον μέσο όρο της `S max` και της `Y max`. Η τιμή `D score` χρησιμοποιείται για την τελική διάκριση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών έναντι των μη εκκρινόμενων.

Ακόμη, το HMM (Hidden Markov Model) του `signalP 3.0`, υπολογίζει την πιθανότητα που έχει η αλληλουχία της πρωτεΐνης να έχει πεπτιδίο οδηγό ή όχι (Signal Peptide και Non Secreted αντίστοιχα). Επιπλέον, η θέση του πεπτιδίου οδηγού, αποδίδεται από μια τιμή που έχει να κάνει με την πιθανότητα, σε συνδυασμό με την τιμή της N-περιοχής, την τιμή της h-περιοχής και την τιμή της c-περιοχής αντίστοιχα, του πεπτιδίου οδηγού αν αυτό υπάρχει.

Τέλος, το TATFIND ανιχνεύει την ύπαρξη Tat πεπτιδίων οδηγών (TRUE ή FALSE αν υπάρχει ή όχι αντίστοιχα)

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι, το signalP 3.0 ανίχνευσε 53 πρωτεΐνες που πιθανόν περιέχουν Tat πεπτιδίο οδηγό. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σχεδόν διπλάσιες στον αριθμό, από αυτές που ανιχνεύτηκαν στο *Escherichia coli*, στο οποίο βρέθηκαν 29 πρωτεΐνες που πιθανόν έχουν Tat πεπτιδίο οδηγό (Tullman-Ercek et. al., 2007). Από τις 53 αυτές πρωτεΐνες μόνο 22 συμφωνούν με τα στοιχεία του προγράμματος TATFIND. Επίσης, από τις 22 αυτές πρωτεΐνες, 5 από αυτές δεν συμφωνούν με τα στοιχεία του προγράμματος TatP 1.0. Τέλος η πρωτεΐνη Avin_48150 εκτός του TatP 1.0 δεν συμφωνεί ούτε με τα στοιχεία του img.

Παρόλο που το signalP ανιχνεύει θέσεις οδηγικής πεπτιδάσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι, αυτές οι προβλέψεις δεν είναι πάντα ακριβής για τα Tat πεπτιδία οδηγούς (Thomas et. al., 1999). Παρακάτω φαίνονται οι 22 πρωτεΐνες που αναφέρονται πιο πάνω (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Πρωτεΐνες που σύμφωνα με το SignalP 3.0 και το TATFIND περιέχουν πιθανόν Tat πεπτιδίο οδηγό. (Με κίτρινο είναι οι πρωτεΐνες που δεν συμφωνούν με το TaP 1.0 και/ή το img)

img		SignalP 3.0 Signal Peptide									TatP 1.0 Tat single Peptide					TATFIN D
Motifs	Gene ID	Signal peptide	sequence	max C	max Y	max S	mean S	D score	Prediction	Signal Peptide Probability	max C	max Y	max S	mean S	D score	Result
SRRRFLK	Avin_03750	YES	334aa	NO	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_03760	YES	329aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,988	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_42330	YES	656aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,980	NO	NO	NO	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_50590	YES	358aa	YES	YES	YES	NO	NO	Signal Peptide	0,997	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_29220	YES	396aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRRFLK	Avin_12170	YES	519aa	NO	YES	YES	NO	YES	Signal Peptide	0,987	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_31110	YES	360aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRRFLK	Avin_26990	YES	171aa	NO	NO	YES	YES	NO	Signal Peptide	0,943	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXFLX	Avin_32340	YES	366aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,997	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
TRRXFLX	Avin_09180	YES	325aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
TRRXFLX	Avin_00890	YES	236aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,607	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXLA	Avin_48150	NO	287aa	NO	NO	NO	NO	NO	Signal Peptide	0,567	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXLA	Avin_37870	YES	364aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,998	NO	NO	YES	YES	NO	TRUE
SRRXXLA	Avin_39690	YES	456aa	NO	NO	NO	YES	NO	Signal Peptide	0,940	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
TRRXLA	Avin_40910	YES	808aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,996	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXLT	Avin_21640	YES	328aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,945	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXXIA	Avin_39950	YES	467aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,922	YES	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXXIA	Avin_49380	YES	165aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	YES	YES	YES	TRUE
SRRXFIX	Avin_00250	YES	621aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,993	YES	YES	YES	YES	YES	TRUE
SRRXFIX	Avin_03600	YES	442aa	NO	NO	YES	YES	YES	Signal Peptide	0,980	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRXFVA	Avin_30510	YES	320aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	NO	NO	NO	NO	NO	TRUE
SRRQFLK	Avin_49120	YES	305aa	YES	YES	YES	YES	YES	Signal Peptide	1.000	YES	YES	NO	NO	NO	TRUE

5.3 Πρωτεΐνη Avin_12170

Από τις 22 πρωτεΐνες που αναφέραμε πιο πάνω, επιλέχθηκε η Avin_12170, η οποία και μελετήθηκε πιο αναλυτικά. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια του img ελήφθησαν τα εξής στοιχεία:

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά της επιλεγόμενης πρωτεινης

Gene Information	
Gene Object ID	643804120
Gene Symbol	
Locus Tag	Avin_12170
Product Name	alkaline phosphatase
SwissProt Protein Product	
SEED	
IMG Term	
Genome	Azotobacter vinelandii DJ, ATCC BAA-1303
DNA Coordinates	1170330..1171889(+)(1560bp)
Scaffold Source	Azotobacter vinelandii DJ: NC_012560 (5365318bp)
GC Content	0.70
Accession	YP_002798419
External Links	GI:226943346; GeneID:7760160; UniProtKB/TrEMBL:C1DPZ2
Fused Gene	No
Fusion Component	No

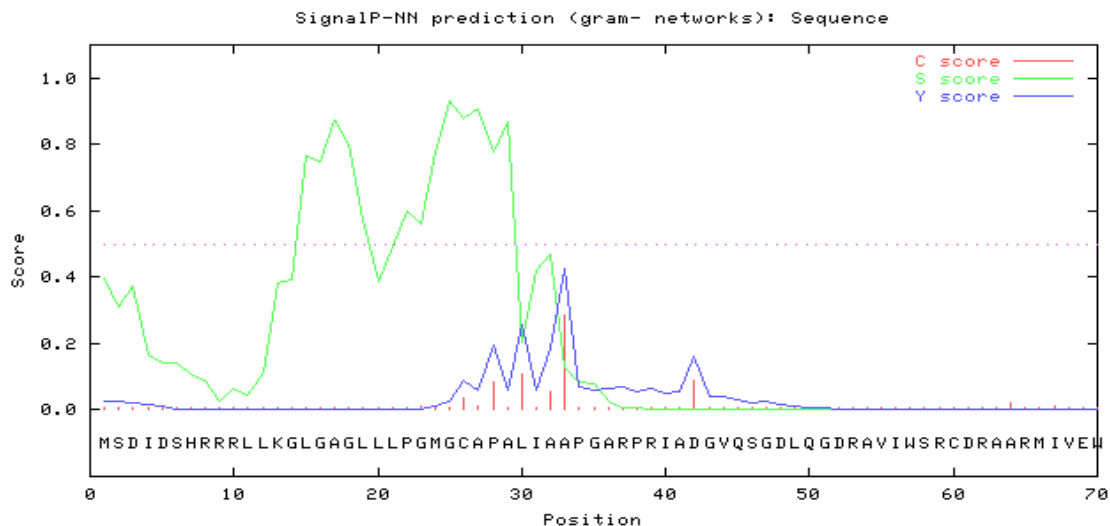
Protein Information	
Amino Acid Sequence Length	519aa
COG	COG3540 - Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D
Families	- IPR017909 Twin arginine translocation signal, Tat - IPR018946 Alkaline phosphatase D-related
Transmembrane Helices	Yes
Signal Peptide	Yes
Statistics	peptide
Pfam	pfam09423 - PhoD

Pathway Information	
Enzymes	EC:3.1.4.1 - Phosphodiesterase I
KEGG Orthology (KO) Term	KO:K01113 E3.1.4.1, phoD phosphodiesterase/alkaline phosphatase D [EC:3.1.4.1]
KEGG Pathway	
KEGG Orthology (KO) Modules	
MetaCyc Pathway	
IMG Pathways	

Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι, η Avin_12170 ανήκει στις αλκαλικές φωσφατάσες. Το μήκος της αλληλουχίας των αμινοξέων της, είναι 519 αμινοξέα και η περιεκτικότητα σε GC ανέρχεται σε 0,7. Επίσης, χαρακτηρίζεται από το εκκριτικό σύστημα Tat (Twin arginine translocation) και φαίνεται να έχει πεπτιδίο οδηγό καθώς και διαμεμβρανικές έλικες.

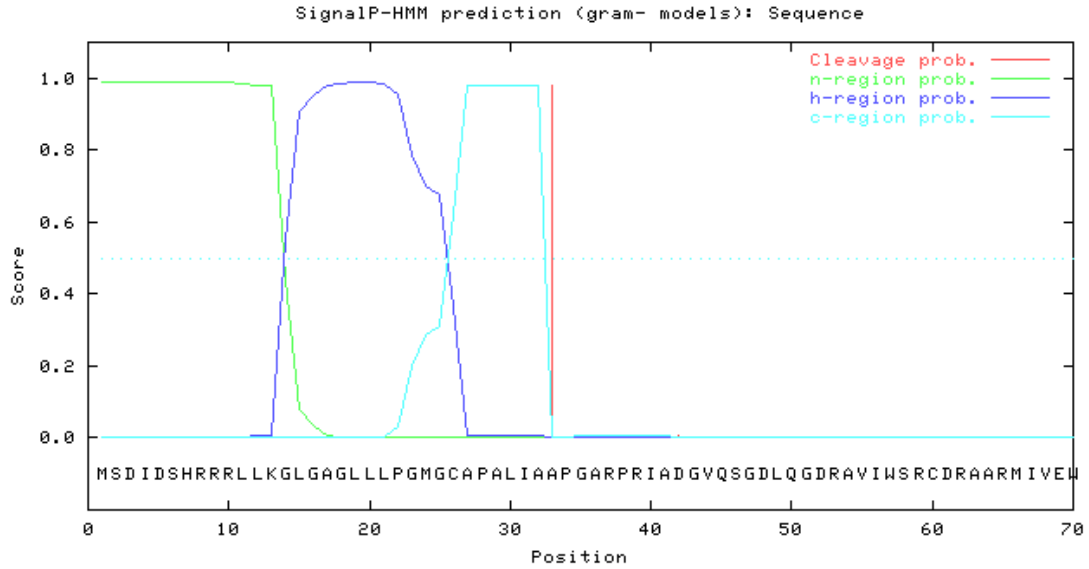
Από την ανάλυση της αλληλουχίας της, με τα SignalP 3.0, TatP 1.0 και TATFIND ελήφθησαν τα εξής αποτελέσματα:

SignalP 3.0



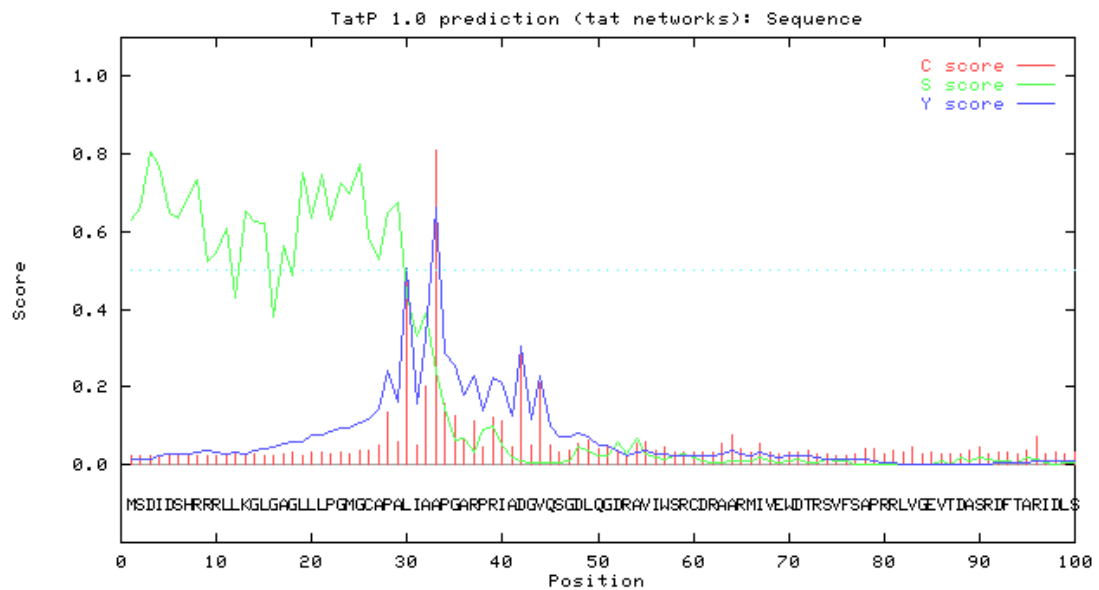
Sequence	length = 70			
Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	33	0.287	0.52	NO
max. Y	33	0.428	0.33	YES
max. S	25	0.933	0.92	YES
mean S	1-32	0.462	0.49	NO
D	1-32	0.445	0.44	YES

Most likely cleavage site between pos. 32 and 33: LIA-AP



Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.987
Max cleavage site probability: 0.981 between pos. 32 and 33

TatP 1.0



Measure	Position	Value	Cutoff	Tat signal peptide?
max. C	33	0.810	0.51	YES
max. Y	33	0.662	0.35	YES
max. S	3	0.807	0.75	YES
mean S	1-32	0.612	0.30	YES
max. D	1-32	0.637	0.36	YES

Most likely cleavage site between pos. 32 and 33: LIA-AP
Found RRRL as Tat motif starting at pos. 8
Used regex: RR.[FGAVML][LITMVF]

TATFIND

- Results for seq1: TRUE
- The twinarg pattern has been found: hrrrll
- The hydrophobic region is glgaglllpgmgcapali
- The length of the hydrophobic region is 18
- The hydrophobicity score is 0
- There is a charged residue after the twin arginine.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η πρωτεΐνη Avin_12170 πιθανότατα έχει πεπτιδίο οδηγό και μάλιστα με μεγάλη πιθανότητα 0,987. Η θέση του πεπτιδίου οδηγού φαίνεται να είναι μεταξύ του 32^{ου} και 33^{ου} αμινοξέος της αλληλουχίας της. Επίσης, ξεκινώντας από το 8^ο αμινοξύ της αλληλουχίας, παρουσιάζει ένα RRLL Tat μοτίβο. Τέλος, η h-περιοχή βρέθηκε να ξεκινάει από το 14^ο αμινοξύ με μήκος 18 αμινοξέων.

πιθανή θέση πεπτιδίου οδηγού



Msdids**hrrrll****kglgaglllpgmgcapali** apgarpriadgvsqgdlqgdraviwsrdraarmivewdtr
Svfsaprrlvgevtasrdftaridlsqppdqsfyrvfedardgslgepwfghlrsapaqardirfvwggdv
agqgfginpeiggmriyeamrrrpqdfllhsgdcvyadgpisaiqtadgqvwnlvteaskvaetldefr
gnyrynllddnlrrfnaevpqiwwddhevtnnwspgkelddryrvrdigllaargrqafleyspmrvlrpdg
agriyrklidygpqlvfvldmrsyrdansdnlqprqpgtaflghpqldwkrelrasralwkviaadmpvglli
pdgedaqqrrrweaiangndgpalgreliaellafirrqdirnivwltadvhycaahhysperavfqdfepf
wefvagplnagsfgpnpldrtfgpevvfqqkappvanssplagyqffgeveiearsgllrvslrdidgvavygr
elqpt

Tat μοτίβο: **hrrrll**

h-περιοχή: **lgaglllpgmgcapali**

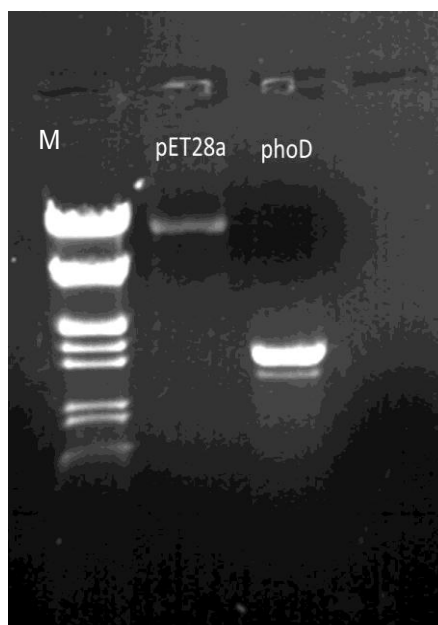
5.4 Επαγωγή πρωτεΐνης

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωματικού DNA από βακτήρια *Azotobacter vinelandii* AvOP, και στην συνέχεια ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με επιλογή κατάλληλων εκκινητών (Primers). Οι εκκινητές, σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού rhoD-U και rhoD-L, ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση της ένθεσης στο φορέα έκφρασης pET28a (+). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

rhoD-U (NcoI) : 5'-GATCGCG **CCATGG** TCTGGAGCCGCTGCGAC-3'

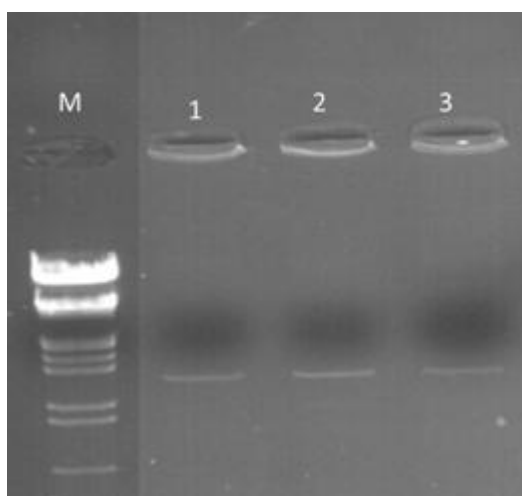
rhoD-L (HindIII) : 5'-TCAGGT **AAGCTT** CAACTCCCGGCCGTACAC-3'

Το προϊόν της αντίδρασης που προέκυψε κατόπιν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αναλύθηκε σε πηκτή αгарόζης 1,5% w/v. Το προϊόν της PCR ήταν περίπου 1350 bp

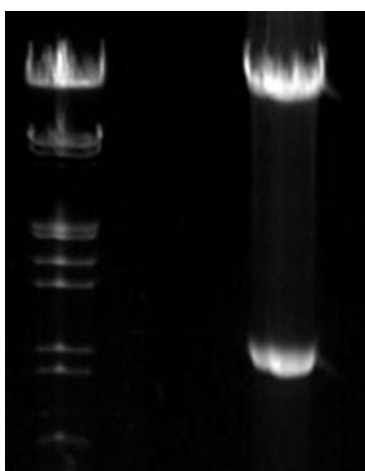


Εικόνα 13. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1.5% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR του γενωματικού DNA του *Azotobacter vinelandii*. M: μάρτυρας (EcoRI/HindIII), 1:φορέας κλωνοποίησης pET28a 2: προϊόν της αντίδρασης PCR.

Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος PCR με το kit PCR purification της qiagen, στην συνέχεια πέψη αυτού και του φορέα έκφρασης pET28a (+) με τα ένζυμα περιορισμού NcoI και HindIII αντίστοιχα, και τέλος καθαρισμός τους με gel extraction kit της qiagen. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης και μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα bl21(DE3). Έγινε διαγνωστική PCR καθώς και πέψη των σωστών κλώνων.

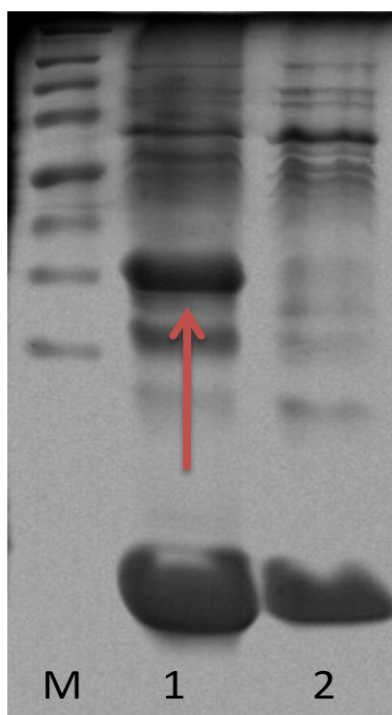


Εικόνα 14. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1.5% w/v των προϊόντων της διαγνωστικής PCR. M: μάρτυρας (EcoR/HindIII), 1,2,3: κλώνοι.



Εικόνα 15. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1.5% w/v του κλώνου 2.

Οι αποικίες από το μετασχηματισμό, ελέγχθηκαν για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η επαγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε με την προσθήκη IPTG, το οποίο επάγει τον προαγωγέα του πλασμιδίου έκφρασης. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με ουρία και υπερήχους και διαχωρισμός της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο διάλυμα αλλά και στα κύτταρα. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης υπολογίστηκε περίπου 52kDa.



Εικόνα 16. Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 20%, της πρωτεΐνης, των μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pET28a (+), κυττάρων *E.coli* BL21. M: μάρτυρα 1: προϊόν με προσθήκη IPTG 2: προϊόν χωρίς προσθήκη IPTG.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 17, η ανάλυση των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων *E.coli* τα οποία μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pET28a (+) ο οποίος έφερε το γονίδιο ένθεσης, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της πρωτεΐνης που μελετήθηκε, δηλαδή του προϊόντος του γονιδίου. Στο σχήμα παρατηρείται η αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης έπειτα από την προσθήκη IPTG.

Συμπεράσματα Συζήτηση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί έξι μεγάλα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα και έχουν χαρακτηριστεί ως τύπος I, II, III, IV, V και τύπος VI αντίστοιχα (Henderson et. al., 2004; Economou et. al., 2006), Από έρευνες έχει καθιερωθεί ότι, τα πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα, των Gram-θετικών βακτηρίων περιλαμβάνουν τα μονοπάτια Sec, Tat, FEA, FPE, holiing και Wss (Tjalsma et. al., 2000, Desvaux and Hébraud, 2006). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες στα Gram-θετικά βακτήρια, συνήθως μεταφέρονται κατά μήκος της μοναδικής μεμβράνης από το Sec μονοπάτι ή το μονοπάτι δυο-αργινινών (Tat).

Το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (Sec) και το δυο-αργινινών ή Tat μονοπάτι μεταφοράς, είναι και τα δυο πολύ διαδεδομένα στα ευβακτήρια, στα αρχαία και στους ευκαριώτες (Paranikou et. al., 2007; Muller, 2005; Albers, 2006). Στα αρχαία και στα Gram-θετικά βακτήρια, τα δυο αυτά μονοπάτια, είναι υπεύθυνα για την έκκριση των πρωτεϊνών κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, ενώ στα Gram-αρνητικά βακτήρια, είναι υπεύθυνα για την εξαγωγή των πρωτεϊνών στο περίπλασμα.

Το μονοπάτι μεταφοράς Tat, έχει να κάνει με την μεταφορά πρωτεϊνών σε διπλωμένη κατάσταση, κατά μήκος των μεμβρανών στα αρχαία και στα βακτήρια (Berks, 1996; DeLisa et. al., 2003; Rodrigue et. al., 1999; Santini et. al., 1998).

Στα βακτήρια, τα πολυπεπτιδία που εξάγονται μέσω του Tat μονοπατιού, περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγικά ένζυμα, μολυσματικούς παράγοντες, πρωτεΐνες στενά συνδεδεμένες με περιπλασματικές ligand-binding πρωτεΐνες και ένζυμα που μετέχουν στην βιογένεση κυτταρικού φακέλου (Lee et. al., 2006).

Η άμινο-τελική (N-) περιοχή εμπεριέχει το Tat αποδεκτό μοτίβο (S/T)RRXFLK, το οποίο περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό δυο αργινινών διπεπτιδίο. Η υδροφοβική (h-) περιοχή των Tat πεπτιδίων οδηγών, είναι γενικά λιγότερο υδροφοβική, από την αντίστοιχη περιοχή των Sec πεπτιδίων οδηγών και ακόμα πιο λίγο από αυτήν των πεπτιδίων του μονοπατιών σωματιδίων αναγνώρισης μηνυμάτων (Cristobal et. al., 1999). Τέλος, η καρβοξύλο-τελική (c-) περιοχή, συχνά περιέχει βασικά κατάλοιπα, σε αντίθεση με τα Sec πεπτιδία οδηγούς, τα οποία σχεδόν ποτέ δεν είναι φορτισμένα σε αυτή την περιοχή. Το ελάχιστο φορτίο της c-περιοχής των Tat πεπτιδίων οδηγών, είναι +0,5 έναντι +0,003, των Sec πεπτιδίων οδηγών (Berks et. al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε με την βοήθεια της βιοπληροφορικής, το γονιδίωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP, για να ανιχνευθούν οι πρωτεΐνες που πιθανόν εκκρίνονται μέσω του Tat μονοπατιού. Από τα αποτελέσματα, προέκυψε σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών που είναι υποψήφιος προς έκκριση από το Tat μονοπάτι και μελετήθηκαν για τα χαρακτηριστικά του πιθανού Tat πεπτιδίου οδηγού τους αντίστοιχα.

Το γονιδίωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP βρέθηκε ότι κωδικοποιεί για 175 πρωτεΐνες που παρουσιάζουν το αποδεκτό Tat μοτίβο (πίνακας 1). Το κριτήριο αυτό δεν αποτελεί δεσμευτικό ότι οι πρωτεΐνες εκκρίνονται αποκλειστικά μέσω του Tat μονοπατιού. Οι πρωτεΐνες αυτές, μπορεί να εκκρίνονται μόνο μέσω του Tat, μόνο μέσω του Sec, ή μέσω του Tat και Sec. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν να κάνουν με αναλύσεις για την παρουσία πιθανόν Tat πεπτιδίων οδηγών με την βοήθεια της βιοπληροφορικής, διαπιστώνεται ότι η χρησιμοποίηση του Tat μονοπατιού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών του ίδιου φύλου (Dilks et. al., 2003; Rose et. al., 2002; Robinson and Bolhuis, 2001; Bendtsen et. al., 2005). Πρωτομικές έρευνες που έχουν να κάνουν με τη σύγκριση εκκρινόμενων πρωτεϊνών μεταξύ του άγριου τύπου του *Pseudomonas syringae* και Tat διαγραφόμενων στελεχών αυτού, δεν είναι ξεκάθαρες επειδή πολλές Tat πρωτεΐνες εκκρίνονται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Caldelari et. al., 2006). Επιπλέον, πληροφορίες που έχουν να κάνουν με την περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί την πιθανή θέση του πιθανού Tat πεπτιδίου οδηγού, θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω του ότι η φύση της πρωτεΐνης στην οποία αναφερόμαστε, μπορεί να οδηγήσει λανθασμένα την έκκριση της πρωτεΐνης μέσω του Sec μονοπατιού (Stanley et. al., 2002; Blaudeck et. al., 2001; Blaudeck et. al., 2003).

Οι 175 πρωτεΐνες που προέκυψαν από το γονιδίωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP, αναλύθηκαν για τα χαρακτηριστικά του υποψήφιου Tat πεπτιδίου οδηγού τους αντίστοιχα, με την βοήθεια των εργαλείων βιοπληροφορικής SignalP 3.0, TatP 1.0, TATFIND και img (πίνακας 2). Από τα αποτελέσματα του SignalP 3.0, προέκυψαν 53 πρωτεΐνες που πιθανόν περιέχουν Tat πεπτίδιο οδηγό και επομένως πιθανόν εκκρίνονται μέσω του Tat μονοπατιού. Από τις 53 αυτές πρωτεΐνες, μόνο 22 συμφωνούν με τα στοιχεία του προγράμματος TATFIND, ενώ από τις 22 αυτές πρωτεΐνες, 5 από αυτές δεν συμφωνούν και με τα στοιχεία του προγράμματος TatP 1.0. Τέλος η πρωτεΐνη Avin_48150 εκτός του TatP 1.0 δεν συμφωνεί ούτε και με τα στοιχεία του img (πίνακας 3).

Οι Tullman-Ercek et. al. (2007), σε αντίστοιχα πειράματα ερεύνησαν το γονιδίωμα του *Escherichia coli*, για πιθανά Tat πεπτίδια οδηγούς. Με την βοήθεια του SignalP 1.1 βρήκαν ότι, το γονιδίωμα του *Escherichia coli* κωδικοποιεί τουλάχιστον για 29 πιθανά Tat πεπτίδια οδηγούς, που περιέχουν ένα μοτίβο δυο αργινινών, χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του Tat μονοπατιού, αριθμός σημαντικά μικρότερος από αυτόν που βρέθηκε στο γονιδίωμα του *Azotobacter vinelandii* AvOP.

Το γονιδίωμα του *Escherichia coli* K-12 φαίνεται να κωδικοποιεί για 22 με 34 Tat πεπτιδία οδηγούς (Dilk et. al., 2003; Robinson and Bolhuis, 2001; Bendtsen et. al., 2005). Όμως, μόνο 15 από αυτά έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά (Rodrigue et. al., 1999; Santini et. al., 1998; Sargent et. al., 1998; Weiner et. Al., 1998; Bernhardt and de Boer, 2003; Ize et. al., 2003; Stanley et. al., 2000; Gon et. al., 2000; Stanley et. al., 2002; Lequette et. al., 2004; Sambasivaro et. al., 2000; Ize et. al., 2004; Sturm et. al., 2006). Οι Tullman-Ercek et. al. (2007), επιβεβαίωσαν πειραματικά άλλα 12 πιθανά Tat πεπτιδία οδηγούς, ανεβάζοντας έτσι τον συνολικό αριθμό των Tat πεπτιδίων οδηγών στο *E. coli* στα 27.

Από τα 27 αυτά Tat πεπτιδία οδηγούς, 11 βρέθηκαν ότι εκκρίνουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες μόνο μέσω του Tat μονοπατιού. Άλλα 8 από τα υπολειπόμενα, υποδεικνύουν την έκκριση μέσω του Sec μονοπατιού, ενώ τέλος τα υπόλοιπα 8 πεπτιδία οδηγοί εμφανίζονται να μπορούν να εκκριθούν και με τα δυο μονοπάτια. Τα 8 πεπτιδία οδηγοί που εμφανίζεται να γίνονται στόχοι στο Sec παρουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά των τυπικών Tat πεπτιδίων οδηγών, όπως είναι μακρύτερο μήκος, ένα κοινά αποδεκτό δυο αργινινών μοτίβο και μια λιγότερο υδροφοβική h-περιοχή (Tullman-Ercek et. al., 2007). Οι ίδιοι ερευνητές απέδειξαν επίσης ότι, αυξάνοντας το θετικό φορτίο της N-τελικής περιοχής των ώριμων πρωτεϊνών εμποδίζεται η έκκριση αυτών μέσω του Sec, χωρίς να εμποδίζεται η έκκριση μέσω του Tat μονοπατιού. Φαίνεται έτσι ότι, στο *E. coli*, το Tat μονοπάτι χρησιμοποιείται για την μεταφορά πρωτεϊνών που περιέχουν θετικά φορτισμένες N-τελικές περιοχές, οι οποίες λειτουργούν ως σήματα “αποκοπής μεταφοράς” (“stop transfer”) για την έκκριση μέσω του Sec μονοπατιού (Tullman-Ercek et. al., 2007; Yamane and Mizushima, 1998; Coleman et. al., 1985).

Όσον αφορά τα πιθανά Tat πεπτιδία οδηγούς του *Azotobacter vinelandii* ΑνΟΡ, δε μένει παρά να ερευνηθούν στο μέλλον και πειραματικά για να βρεθεί ποια από αυτά εκκρίνονται όντως μέσω του Tat, Sec ή μέσω και των δυο μονοπατιών. Δεδομένου του μεγαλύτερου αριθμού που βρέθηκαν βιοπληροφορικά σε σχέση με αυτών του *E. coli*, καθώς επίσης και του μεγαλύτερου αριθμού τα οποία βρέθηκαν μετά από την συγκέντρωση των αποτελεσμάτων από 4 διαφορετικά εργαλεία βιοπληροφορικής, για την ενίσχυση των υποθέσεων όσον αφορά τα πιθανά Tat πεπτιδία οδηγοί που θα εκκρίνουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες μέσω του Tat μονοπατιού, εικάζεται ότι, ο αριθμός αυτός θα είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο που έχει βρεθεί έως τώρα στο *E. coli*.

Τέλος, επιλέχθηκε μια πρωτεΐνη (Avin_12170), η οποία φαίνεται να έχει Tat πεπτιδίο οδηγό και πιθανόν εκκρίνεται μέσω του Tat μονοπατιού και ερευνήθηκε πιο διεξοδικά. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι, η πρωτεΐνη αυτή περιέχει το Tat αποδεκτό μοτίβο, παρουσιάζει μεγάλη πιθανότητα να έχει Tat πεπτιδίο οδηγό (πιθανότητα 0,987) και πιθανότατα εκκρίνεται μέσω του Tat μονοπατιού. Επίσης, η θέση του Tat πεπτιδίου οδηγού της, φαίνεται να βρίσκεται μεταξύ του 32^{ου} και 33^{ου} αμινοξέος της, με την h-περιοχή να αποτελείται από την περιοχή του 14^{ου} έως και του 18^{ου} αμινοξέος της αλληλουχίας της. Τέλος, η υδροφοβική τιμή αναφέρεται ότι είναι μηδέν καθώς επίσης, αναφέρεται η ύπαρξη ενός φορτισμένου κατάλοιπου μετά τις δυο αργινίνες, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη πιθανότατα εκκρίνεται μέσω του Tat μονοπατιού.

Παράρτημα

I) PhoD-U (NcoI) και PhoD-L (HindIII)

Αλληλουχία αμινοξέων Avin_1270:

1 msdidshrrr llkglgagll lpgmgcapal iaapgarpri adgvqsgdlq gdraviwsrc
61 draarmivew dtrsvfsapr rlvgevtdas rdftaridls glppdqsify rvrfedardg
121 slgepwfghl rsapaqardi rfvwggdvag qgfginpeig gmriyeamrr rqpdfflhsg
181 dcvyadgpis aqigtadgqv wknlvteaks kvaetldefr gnyrynlldd nlrrfnaevp
241 qiwqwddhev tnnwspgkel ddryrvrdig llaargrqaf leyspmrvlr pdgagriyrk
301 ldypgpqlevf vldmrsyrda nsdnlqprqg pgtafllghpq ldwlkrelra sralwkvial
361 dmpvglllipd gedaqgrrrw eaiangndgp algreleiae llafirrqi rniwvltadv
421 hycaahhysp eravfqdfep fwefvagpln agsfgnpld rtfqpevvfq kappvanssp
481 lagyqffgev eiearsgllr vslrddidgva vvgrelqpt

Γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη:

1 atgagcgata tcgatagcca ccgccgctgc ctgctgaagg gactcggcgc cggcctgctg
61 ctgccgggga tgggctgcgc cccggcgtcg atcgccgctc ccggcgccc gcccgccatc
121 gccgacggtg tgcagtcgag cgacctgcag ggcgatcgc cggatgacg gagccgctgc
181 gacccgggccc gcgagatgat cgtcagatgg gacaccgca gcgtgttcag cgcgccgccc
241 cggctggtag gggaggtgac cgaccaccag cgcgacttca ccgcgcgcat cgacctgagc
301 ggcctgccgc cggaccagtc gatcttctac cgggtgcggt tcgaggacgc ccgcgacggc
361 agcctcggcg agccctgggt cggccacctg cgcagcgcgc cggcgagggc acgggacatc
421 cgcttcgtct ggggcccgcga cgtcgcgggg cagggcttcg gcatcaatcc ggagatcggc
481 ggcagcgcga tctacgaggc catgcgcccg cgcagcggg atttcttctt gcacagcggc
541 gactgcgtct atgccgacgg accgatcagc gcgcagatcc agaccgccc cggccaggtg
601 tggagaacc tggtcaccga ggcgaagagc aaggtggccg agaccctcga cgagttccgc
661 ggcaattacc gctacaacct gctcagcagc aatctgcgcc gcttcaacgc cgaggtgccc
721 cagatctggc agtgggacga ccacgaggtg accaacaact ggtcgcgggg caaggaactg
781 gacgaccgct accgggtgag cgacatcggc ctgctcggcg cccgcggccc ccaggccttc
841 ctogagtatt cgccgatgag cgtgctgcgc ccggacggcg ccggcgcat ctaccgcaag
901 ctogactacg gtccgcaact ggaggtgttc gtgctggaca tgcgcagcta ccgcgatgcc
961 aacagcgaca acctgcagcc gcgccagggg ccgggacacc ccttcctcgg ccatccccag
1021 ctogactggc tgaagcgcga gctgcgtgcc tcgagggcgc tgtggaaggt gatcggcggc
1081 gacatgccgg tcggcctgct catccccgac ggcgagggag cccagggccc gcgacgctgg
1141 gaggcgatcg ccaacggcaa cgacgggccc gccctcggcc gcgagctgga gatcggcga
1201 ctggtggcct tcatccgccc gcaggatata cgcaacatcg tctggctgac cgccgacgtg
1261 cactactgag cggctcacca ctacagcccg gagcgggccc tcttccagga tttcagccc
1321 ttctgggagt tcgtcggccc cccgctcaac gccggcagct tcggcccaa tccgctggac
1381 cgcaccttcg gacccgaggt ggtgttccag aagggcggc cgggtggcaa cagctcggc
1441 ctggcgggct accagttctt cggcgaggtg gagatcagag cacggagcgg cctgctgccc
1501 gtcagcctgc gggacatcga cggcgtggcg gtgtacggcc gggagttgca gccgacctga

Αλληλουχία και γονίδιο:

atgagcgatatcgatagccaccgcccgtcgcctgctgaagggactcggcgcggcctgctg
M S D I D S H R R R L L K G L G A G L L
ctgccgggggatgggctgcgccccggcgcctgatcgcggcctcccggcgccccggcgcgc
L P G M G C A P A L I A A P G A R P R I
gccgacggtgtgcagtcgcccgcacctgcagggcgatcgcgcggtgatcggcggcggcggc
A D G V Q S G D L Q G D R A V I W S R C
ggggcggcgcggatgatcgtcgcagtgggacaccgcagcgtggtcagcgcgcgcgcg
D R A A R M I V E W D T R S V F S A P R
cggctggtaggggaggtgaccgacgccagccgcgacttcaccgcgcgcacatcgacctgac
R L V G E V T D A S R D F T A R I D L S
ggcctgccgcccggaccagtcgatcttctaccgggtgcggtttcgaggacgccgcgacggc
G L P P D Q S I F Y R V R F E D A R D G
agcctcggcgcagccctgggttcggccacctgcgcagcgcggcggcgcagggcacgggacatc
S L G E P W F G H L R S A P A Q A R D I
cgcttcgtctggggcggcgcagtcgcccgggcagggccttcggcatcaatccggagatcgg
R F V W G G D V A G Q G F G I N P E I G
ggcatgcgcacatctacgaggccatgcgcggcgcggcagccggatttcttcctgcacagcggc
G M R I Y E A M R R R Q P D F F L H S G
gactgctctatgccgacggaccgatcagcgcgcagatccagaccgccgacggccaggtg
D C V Y A D G P I S A Q I Q T A D G Q V
tggagaacctggtcaccgagggcgaagagcaaggtggccgagaccctcgacgagttccgc
W K N L V T E A K S K V A E T L D E F R
ggcaattaccgctacaacctgctcgcagacaatctgcgcggccttcaacgccgaggtgccg
G N Y R Y N L L D D N L R R F N A E V P
cagatctggcagtgggacgaccacgaggtgaccaacaactggtcgcccgggcaaggaactg
Q I W Q W D D H E V T N N W S P G K E L
gacgaccgctaccgggtgcgcgacatcggcctgctcgcggcggcggcggcggcggcggc
D D R Y R V R D I G L L A A R G R Q A F
ctcgagtattcggcgcgatgcgcgctgctgcgcccggacggcgcggcggcggcgcacatctaccgcaag
L E Y S P M R V L R P D G A G R I Y R K
ctcgactacgggtccgcaactggaggtggttcgtgctggacatgcgcgagctaccgcgatgcc
L D Y G P Q L E V F V L D M R S Y R D A
aacagcgacaacctgcagccgcggcggggggcgggaccgccttcctcggccatccccag
N S D N L Q P R Q G P G T A F L G H P Q
ctcgactggctgaagcgcgagctgcgctgcctcaggggcgctgtggaaggtgatcggcggc
L D W L K R E L R A S R A L W K V I A A
gacatgccgggtcggcctgctcatccccgacggcgcgaggacgccagggcggcggcgcgctgg
D M P V G L L I P D G E D A Q G R R R W
gagggcgcgccaacggcaacgacgggcccggcctcggcggcgcgagctggagatcggcggaa
E A I A N G N D G P A L G R E L E I A E
ctggttggccttcacccgcggcagggatcaccgcaacatcgtctggctgaccgccgacgctg
L L A F I R R Q D I R N I V W L T A D V
cactactgcgcggctcaccactacagcccggagcggggcgggtcttccaggatttcgagccc
H Y C A A H H Y S P E R A V F Q D F E P
ttctgggagttcgtcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
F W E F V A G P L N A G S F G P N P L D
cgcaccttcggaccggaggtggtggtccagaaggcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
R T F G P E V V F Q K A P P V A N S S P
ctggcggcggcgtaccagttcttcggcggaggtggagatcagggcacggagcggcggcggcggc
L A G Y Q F F G E V E I E A R S G L L R
gtcagcctgcgggacatcgacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
V S L R D I D G V A V Y G R E L Q P T -

cggccgccc**atg**ggccgacggtgtgcagtcc
gccgacgcc**atg**gagtccggcgacctgcag
ccggcgcc**atg**gagggcgatcgcgcggtgatc

PhoD-U (NcoI)

5'-GATCGCG**CCATGG**TCTGGAGCCGCTGCGAC-3'

gatcgcgc**CA**tgGtctggagccgctgcgac

PhoD-L (HindIII)

5'-TCAGGTA**AAGCTT**CAACTCCCGCCGTACAC-3'

gtgtacggccgggagttgAagcTTacctga

PCR product size 1350bp

The construct expresses the truncated protein without the signal peptide

Theoretical pI/Mw: 5.58 / 52771.36

MVWSRCDRAARMIVEWDTRS VFSAPRRLVGEVTDASRDFTARIDL SGLPPDQSI FYRVRF
EDARDGSLGEPWF GHLRSAPAQARDIRFVWGGDVAGQGFGINPEI GGMRI YEAMRRRQPD
FFLHSGDCVYADGPISAQIQ TADGQVWKNLVTEAKSKVAETLDEF RGNRYNLLDDNLRR
FNAEVPQIWQWDDHEVTN NWS PGKELDDRYRVRDIGLLAARGRQAFLEYS PMRVL RPDGA
GRIYRKL DYGPQLEVFVLD MRSYRDANS DNLP RQGPGTAFLGHPQLD WLKREL RASRAL
WKVIAADMPVGLLIPDGEDAQGRRRWEAIANGNDGPALGRELEIAELLAFIRRQDIRNIV
WLTADVHYCAAHHYSPERAVFQDFEPFWEFVAGPLNAGSF GPNPLDRTFGPEVVFQKAPP
VANSSPLAGYQFFGEVEIEARSGLLRVSLRDIDGVAVYGRELQPT-

II) Pet28a

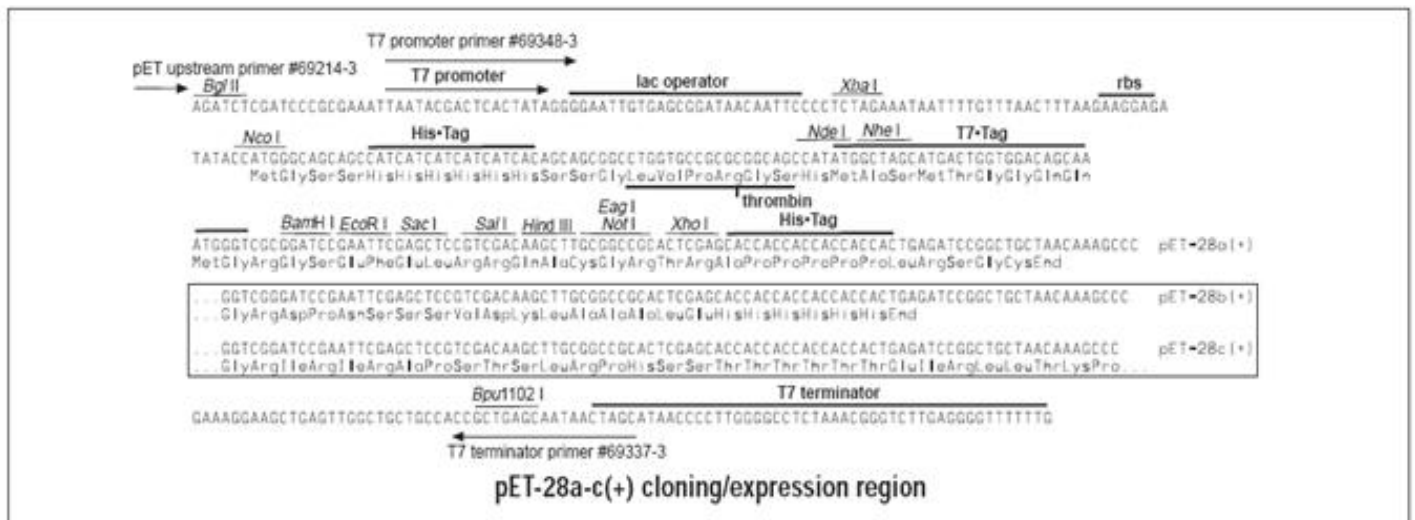
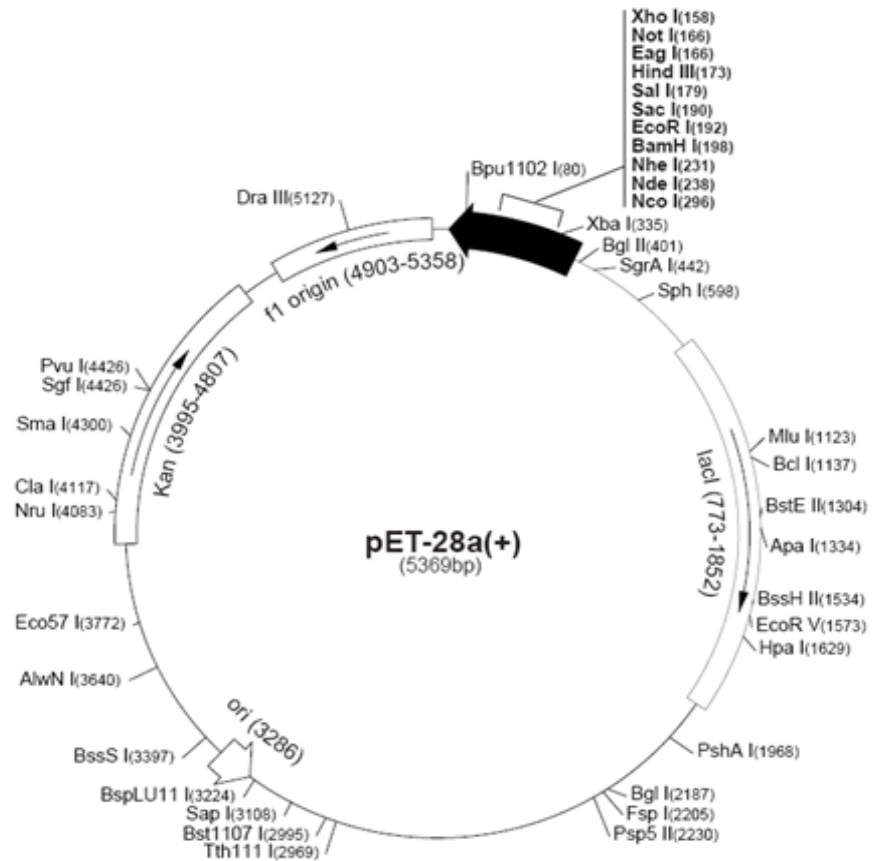
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag*/thrombin/T7•Tag* configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



III) Κινητική της αύξησης του *Azotobacter Vinelandii*

Σε 3 διαφορετικές καλλιέργειες για κάθε R και N αντίστοιχα, υπολογίσθηκε ο αριθμός των κυττάρων και μετρήθηκαν οι αντίστοιχες τιμές οπτικής πυκνότητας. Οι μετρήσεις δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

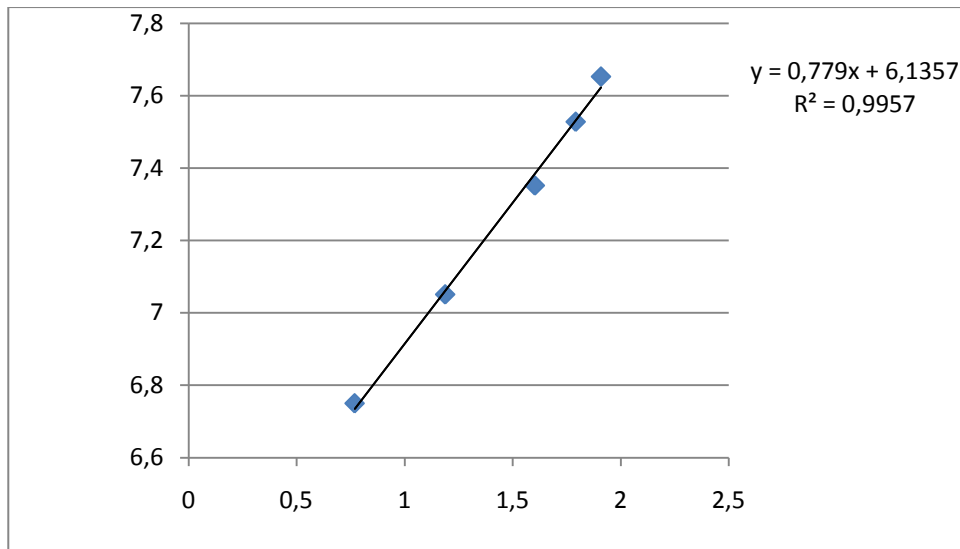
Πίνακας 5. Αριθμός κυττάρων τριών διαφορετικών καλλιεργειών του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* σε θρεπτικό Rennie χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ο μέσος όρος και ο λογάριθμος του μέσου όρου αυτών και οι αντίστοιχες τιμές μέτρησης της οπτικής πυκνότητας τους.(OD: οπτική πυκνότητα, average: μέσος όρος, log average: λογάριθμος μέσου όρου)

R						
%	OD	1	2	3	average	log average
12,50%	0,769	5187500	6275000	5412500	5625000	6,750122527
25%	1,188	10375000	12550000	10825000	11250000	7,051152522
50%	1,603	20750000	25100000	21650000	22500000	7,352182518
75%	1,792	31125000	37650000	32475000	33750000	7,528273777
100%	1,909	41500000	50200000	43300000	45000000	7,653212514

Πίνακας 6. Αριθμός κυττάρων τριών διαφορετικών καλλιεργειών του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* σε θρεπτικό Rennie με προσθήκη πηγής αζώτου με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ο μέσος όρος και ο λογάριθμος του μέσου όρου αυτών και οι αντίστοιχες τιμές μέτρησης της οπτικής πυκνότητας τους.(OD: οπτική πυκνότητα, average: μέσος όρος, log average: λογάριθμος μέσου όρου)

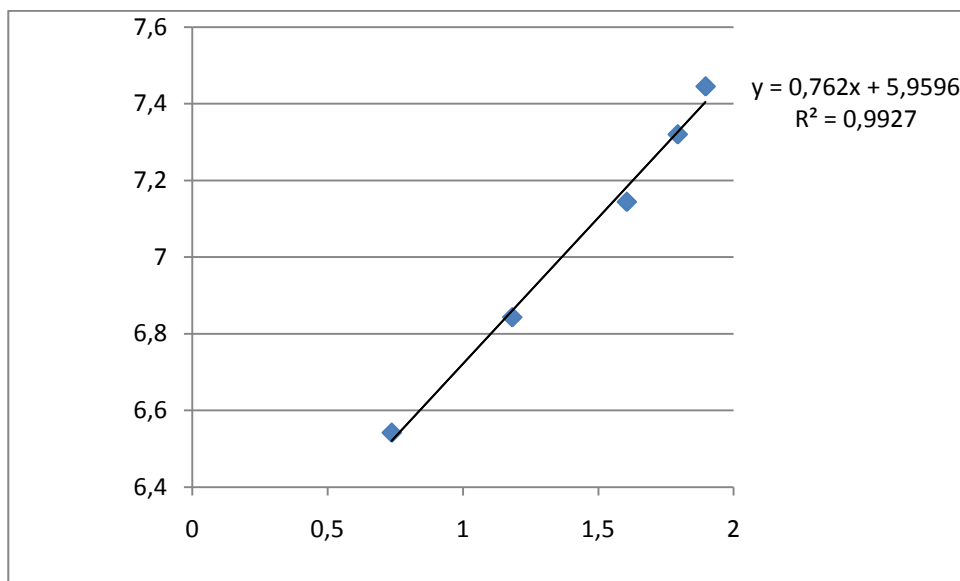
N						
%	OD	1	2	3	average	log average
12,50%	0,737	3337500	3625000	3487500	3483333,333	6,541995036
25%	1,182	6675000	7250000	6975000	6966666,667	6,843025031
50%	1,605	13350000	14500000	13950000	13933333,33	7,144055027
75%	1,793	20025000	21750000	20925000	20900000	7,320146286
100%	1,896	26700000	29000000	27900000	27866666,67	7,445085023

Από τις τιμές OD (οπτική πυκνότητα) σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές του λογάριθμου του μέσου όρου των αριθμών των κυττάρων δημιουργήσαμε τις παρακάτω γραφικές παραστάσεις όπου και πήραμε τις αντίστοιχες εξισώσεις της κινητικής



Εικόνα 17. Γραφική παράσταση η οποία συνδέει τον λογάριθμο του μέσου όρου των αριθμών των κυττάρων του βακτηρίου σε θρεπτικό R (άξονας Y) με την οπτική πυκνότητα (άξονας X).

Η εξίσωση που προέκυψε για τα R είναι : $y=0,779x+6,1357$ με $R^2=0,9957$



Εικόνα 18. Γραφική παράσταση η οποία συνδέει τον λογάριθμο του μέσου όρου των αριθμών των κυττάρων του βακτηρίου σε θρεπτικό N (άξονας Y) με την οπτική πυκνότητα (άξονας X).

Η εξίσωση που προέκυψε για τα N είναι : $y=0,762x+5,9596$ με $R^2=0,9927$

Στην συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κατά τη διάρκεια ανάπτυξης τους, για χρονική περίοδο 46 ωρών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μετρήσεων οπτικής πυκνότητας. (Time: χρόνος ανάπτυξης των καλλιεργείων, αναφέρεται σε ώρες και η τιμή 0 αναφέρεται στην στιγμή που δημιουργήσαμε τις καλλιέργειες, R1-3: δείγματα που αναπτύχτηκαν σε θρεπτικό R, N1-3: δείγματα που αναπτύχτηκαν σε θρεπτικό N, Average: μέσος όρος τιμών οπτικής πυκνότητας)

time	OD								
	R1	R2	R3	Average (x)		N1	N2	N3	Average(x)
0	0,147	0,155	0,162	0,122		0,109	0,151	0,106	0,154667
12	0,266	0,31	0,292	0,251667		0,333	0,299	0,123	0,289333
15	0,415	0,487	0,437	0,424667		0,445	0,444	0,385	0,446333
18	0,713	0,74	0,708	0,707333		0,735	0,716	0,671	0,720333
21	0,97	0,99	0,973	1,035333		1,058	1,03	1,018	0,977667
24	1,217	1,152	1,155	1,266		1,261	1,255	1,282	1,174667
38	1,724	1,693	1,735	1,573		1,598	1,521	1,6	1,717333
46	1,882	1,775	1,812	1,571333		1,632	1,517	1,565	1,823

. Οι τιμές των μέσων όρων των τιμών οπτικής πυκνότητας (Average), αποτελούν τα χ στις παραπάνω εξισώσεις και αντιστοιχούν στους χρόνους που ελήφθησαν οι μετρήσεις, δηλαδή στο χρόνο ανάπτυξης του βακτηρίου.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα εξισώσεων κινητικής αύξησης του βακτηρίου για R και N αντίστοιχα

R			N		
X		Y	X		Y
0,122	$y=0,779x+6,1357$ $R^2=0,9957$	6,256185	0,154667	$y=0,762x+5,9596$ $R^2=0,9927$	6,052564
0,251667		6,361091	0,289333		6,15137
0,424667		6,483394	0,446333		6,283196
0,707333		6,69684	0,720333		6,498588
1,035333		6,897302	0,977667		6,748524
1,266		7,050765	1,174667		6,924292
1,573		7,473503	1,717333		7,158226
1,571333		7,555817	1,823		7,156956

Από τις παραπάνω τιμές (X και Y) δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα της κινητικής αύξησης του βακτηρίου, για R και N αντίστοιχα.

Βιβλιογραφία

- Αλαχιώτης Σ.Ν., 2003.** Σημειώσεις για τη Βιοηθική και σχετικό με τη Βιοηθική πληροφοριακό υλικό ενημερωτικού χαρακτήρα.
- Μαρμάρας Β. και Λαμπροπούλου - Μαρμάρα Μ., 2000.** Βιολογία Κυττάρου – Μοριακή προσέγγιση. Εκδόσεις ΤΥΡΟΡΑΜΑ.
- Abdallah AM., Gey van Pittius NC., Champion PA., Cox J., Luirink J., Vandenbroucke-Grauls CM., Appelmek BJ., Bitter W., 2007.** Type VII secretion–mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007, 5(11):883-891.
- Albers SV., Szabo Z., Driessen AJ., 2006.** Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol*, 4(7):537-547.
- Antelmann H., Tjalsma H., Voigt B., Ohlmeier S., Bron S., van Dijk JM., Hecker M., 2001.** A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 11(9), 1484–1502
- Arshad M., and Frankenberger WT., Jr. 1993.** Microbial production of plant growth regulators. *In* Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. *Edited by* F.B. Metting, Jr. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 307–343.
- Baillie A., Hodgkiss W. and Norris JR., 1962.** Flagellation of *Azotobacter* spp. as demonstrated by electron microscopy. *J. Appl. Bacteriol.* 25 116–119
- Baxevanis A.D. and Ouellette B.F.F., 2001.** Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley-Liss, Inc.
- Bendtsen JD., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S., 2004.** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340(4), 783–795
- Bendtsen JD., Nielsen H., Widdick D., Palmer T. and Brunak S., 2005.** Prediction of twin-arginine signal peptides, *BMC Bioinformatics* 6, 167-175
- Bendtsen JD., Kierner L., Fausbøll A., Brunak S., 2005.** Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5, 58
- Benson, D.R. and Clawson, M.L., 2000,** Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis, p. 207-224. *In* E. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.* Horizon Scientific Press, Wymondham, England.
- Benson, D.R. and Silvester, W.B., 1993.** Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57:293-319.
- Bernstein HD., 2007.** Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends in Microbiology*, 15(10):441-447.
- Bernhardt TG. and de Boer PA., 2003.** The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol.* 48:1171–1182
- Bingle LE., Bailey CM., Pallen MJ., 2008.** Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*, 11(1):3-8.
- Bishop P.E. and Premakumar R., 1992.** Alternative nitrogen fixation systems. *In* G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans (Eds.), *Biological nitrogen fixation.* (pp.736-762). New York: Chapman and Hall.
- Blaine F. and Metting Jr, 1993.** Applications in Agricultural and Environmental Management. *Soil Microbial Ecology*, xiii + 646 pp. New York: Marcel Dekker. ISBN 08247 8737 4.
- Blaudeck N., Kreutzenbeck P., Freudl R. and Sprenger GA., 2003.** Genetic Analysis of Pathway Specificity during Posttranslational Protein Translocation across the *Escherichia coli* Plasma Membrane. *J. Bacteriol.* 185: 2811-2819
- Blaudeck N., Sprenger GA., Freudl R. and Wiegert T., 2001.** Specificity of signal peptide recognition in *tat*-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol* 183, 604-610.
- Blocker AJ., Deane JE., Veenendaal AK., Roversi P., Hodgkinson JL., Johnson S., Lea SM., 2008.** What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(18):6507-6513.

- Boddey RM., Chalk PM., Victoria RL., Matsui E. and Dobereiner J., 1983.** The use of the N-isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen of *Paspalum notatum* cv. Batatais, *Canadian Journal of Microbiology* **29**, pp. 1036–1045.
- Braunstein M., Espinosa B.J., Chan J., Belisle J.T., Jacobs WR Jr., 2003.** SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**(2), 453–464
- Brock., 2005.** Βιολογία των μικροοργανισμών. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Brown ME., Burlingham SK., Jackson RK., 1964:** Studies on *Azotobacter* spp. in soil. Effects of artificial inoculation on crop yields. *Plant and Soil* **20**, 194–214
- Brown ME. and Burlingham SK., 1968.** Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. *J. gen. Microbiol.* **53**, 135-134
- Brown ME., 1974.** Seed and Root Bacterization Ann. Rev. Phytopathology Vol. 12: 181-197
- Burgess, B.K. and Lowe, D.J., 1996.** Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.* **96**, 2983-3011.
- Caldelari I., Mann S., Crooks C. and Palmer T., 2006.** The Tat pathway of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is required for optimal virulence. *Mol Plant-Microbe Interact*, **19**:200-212
- Cao TB., Saier MH Jr., 2003.** The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta*, **1609**(1):115-125.
- Cascales E., 2008.** The type VI secretion toolkit. *EMBO report*, **9**(8):735-741.
- Cavalier-Smith T., 2002.** The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**(Pt 1), 7–76
- Cianciotto NP., 2005.** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology*, **13**(12):581-588.
- Chen I., Provvedi R., Dubnau D., 2006.** A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**(31), 21720–21727
- Chisnell JR., Premakumar R. and Bishop PE., 1988.** Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**, 27-33.
- Chen WM., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Bena G. and Boivin-Masson C. 2003.** Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria is Widespread in Nature. *J. Bacteriol. P.* 7266-7272.
- Christie PJ. and Vogel JP., 2000.** Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**(8), 354–360
- Christie PJ. and Cascales E., 2005.** Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol*, **22**(1–2):51-61.
- Cohen C, Fischel O, Cohen E., 2007.** Molecular concept for training in medicinal chemistry, drug design, and cheminformatics. *Chem Biol Drug Des.* **69**(1):75-82.
- Coleman J, Inukai M, Inouye M., 1985.** Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell.* 1985 Nov;**43**(1):351–360
- Cosme AM., Becker A., Santos MR., Sharypova LA., Santos PM., Moreira LM., 2008.** The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**(7):947-957.
- Contreras A. and Casadesus J., 1987.** Tn10 mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 276–282.
- Cornelis GR., 2006.** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, **4**(11):811-825.
- da Silva FG., Shen YW., Dardick C., Burdman S., Yadav RC., de Leon AL., Ronald PC., 2004.** Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**(6):593-601.

- Dautin N. and Bernstein HD., 2007.** Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annual Review of Microbiology*, 61:89-112.
- Delepelaire P., 2004.** Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1-3):149-161.
- de Silva E. and Stumpf MP, 2005.** Complex networks and simple models in biology. *J R Soc Interface*. Dec 22; 2(5):419-30.
- Desvaux M., Parham NJ., Henderson IR., 2003.** Le système de sécrétion de type V chez les bactéries Gram-négatives. *Biofutur* 237, 34-37
- Desvaux M., Parham NJ., Henderson IR., 2004a.** Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr. Issues Mol. Biol.* 6(2), 111-124
- Desvaux M., Parham NJ., Scott-Tucker A., Henderson IR., 2004b.** The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol.* 12(7), 306-309
- Desvaux M., Khan A., Beatson SA., Scott-Tucker A., Henderson IR., 2005a.** Protein secretion systems in *Fusobacterium nucleatum*: genomic identification of type 4 piliation and complete type V pathways brings new insight in mechanisms of pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1713(2), 92-112
- Desvaux M., Khan A., Scott-Tucker A., Chaudhuri RP., Pallen MJ., Henderson IR., 2005b.** Genomic analysis of the protein secretion systems in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Biochim. Biophys. Acta.* 1745(2), 223-253
- Desvaux M., Hébraud M., Henderson IR., Pallen MJ., 2006a.** Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol.* 14(4), 157-160
- Desvaux M., Dumas E., Chafsey I., Hébraud M., 2006b.** Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 256(1), 1-15
- Desvaux M., Scott-Tucker A., Turner SM., Cooper LM., Huber D., Nataro JP., Henderson IR., 2007.** A conserved extended signal peptide region directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology* 153(Pt 1), 59-70
- Desvaux M. and Hébraud M., 2006.** The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 309(5), 774-805
- Desvaux M. and Hébraud M., 2008.** Analysis of cell envelope proteins. In *Handbook of Listeria monocytogenes* (Dongyou, L., ed.), pp. 359-393, CRC Press
- Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR., 2009.** Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.*, 17(4):139-145
- Dilks K., Rose RW., Hartmann E. and Pohlschroder M., 2003.** Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey. *J. Bacteriol.* 185: 1478-1483
- Dixon R., 1998.** The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex, a novel two component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria, *Arch Microbiol.*, 169, 371-380.
- Eady RR., 1991.** The dinitrogen -fixing bacteria, p. 534-553. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, Springer Verlag, New York, N.Y.
- Eady RR., 1996.** Structure -function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.* 96, 3013-3030.
- Economou A., Christie PJ., Fernandez RC., Palmer T., Plano GV., Pugsley AP., 2006.** Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 62(2), 308-319
- Efuet ET, Pulakat L, Gavini N., 1996.** Investigations on the cell volumes of *Azotobacter vinelandii* by scanning electron microscopy. *J Basic Microbiol* 36:229-234.
- Eriksson J.A., Nyborg C.A., Johnson J.L., Truscott S.M., Gunn A., Nordmeyer F.R. and Watt G.D., 1999.** Enhanced efficiency of ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis utilizing reductants that form the all-ferrous redox state of the Fe protein. *Biochemistry* 38, 14279-14285

- Falkovski P.G., 1997.** Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* 387:272-275.
- Fauvart M. and Michiels J., 2008.** Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1):1-9.
- Filloux A., 2004.** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3):163-179.
- Filloux A., Hachani A., Bleves S., 2008.** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154(Pt 6):1570-1583.
- Gebgardt AG. and Koval'chuk SI., 1958.** Effect of introduction of *Azotobacter* on vitamin content in soil and oat shoots. *Mikrobiologiya* May 1958 (Vol. 27, Issue 3, Pages 331-4)
- Gonzalez-Diaz H, Saiz-Urra L, Molina R, Santana L, Uriarte E., (2007)** A model for the recognition of protein kinases based on the entropy of 3D van der Waals interactions. *J. Proteome Res.* Feb; 6(2), 904-8.
- Gon S., Patte JC., Mejean V., Iobbi-Nivol C., 2000.** The torYZ (yecK bisZ) operon encodes a third respiratory trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 2000;182(20):5779-86.
- Gonzalez-Lopez J. and Vela GR., 1981.** True morphology of the *Azotobacteraceae*-filtrable bacteria, *Nature* 289, pp. 588–590.
- Gophna U., Ron EZ., Graur D., 2003.** Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312:151-163.
- Grant SR., Fisher EJ., Chang JH., Mole BM., Dangl JL., 2006.** Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60:425-449.
- Greenbaum D., Luscombe NM., Jansen R., Qian J., Gerstein M., 2001.** Interrelating different types of genomic data: from proteome to secretome: Oming in on function. *Genome Res.* 11(9), 1463–1468
- Guiral S., Mitchell TJ., Martin B., Claverys JP., 2005.** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(24), 8710–8715
- Gupta RS., 1998.** Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4), 1435–1491
- Gusfield D., 1999.** Algorithms on Strings, Trees and Sequences, Cambridge University Press.
- Hales, BJ. Case EE., Morningstar JE., Dezda MF. and Mauterer LA., 1986.** Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 25, 7251-7255.
- Hales BJ., Langosch DJ. and Case EE., 1986a.** Isolation and characterization of second nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 261, 15301-15306.
- Harley KT., Djordjevic GM., Tseng TT., Saier MH., 2000.** Membrane-fusion protein homologues in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 36(2):516-517.
- Harris MA, Clark J., Ireland A., Lomax J., Ashburner M., Foulger R., Eilbeck K., Lewis S., Marshall B., Mungall C., Richter J., Rubin GM., Blake JA., Bult C., Dolan M., Drabkin H., Eppig JT., Hill DP., Ni L., Ringwald M., Balakrishnan R., Cherry JM., Christie KR., Costanzo MC., Dwight SS., Engel S., Fisk DG., Hirschman JE., Hong EL., Nash RS., Sethuraman A., Theesfeld CL., Botstein D., Dolinski K., Feierbach B., Berardini T., Mundodi S., Rhee SY., Apweiler R., Barrell D., Camon E., Dummer E., Lee V., Chisholm R., Gaudet P., Kibbe W., Kishore R., Schwarz EM., Sternberg P., Gwinn M., Hannick L., Wortman J., Berriman M., Wood V., de la Cruz N., Tonellato P., Jaiswal P., Seigfried T., White R., Gene Ontology Consortium, 2004.** The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 32, D258–D261

- Heldt, HW., 1999.** Plant biochemistry and molecular biology (ed.) Oxford University press 278-288
- Henderson IR., Nataro JP., Kaper JB., Meyer TF., Farrand SK., Burns DL., Finlay BB., St Geme JW 3rd., 2000.** Renaming protein secretion in the Gramnegative bacteria. *Trends Microbiol.* 8(8), 352
- Henderson IR., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez RC., Ala'Aldeen D., 2004.** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4):692-744.
- Hobman JL., Penn CW., Pallen MJ., 2007.** Laboratory strains of *Escherichia coli*: model citizens or deceitful delinquents growing old disgracefully? *Mol. Microbiol.* 64(4), 881–885
- Holland IB., Schmitt L., Young J., 2005.** Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Molecular Membrane Biology*, 22(1–2):29-39.
- Hubber AM., Sullivan JT., Ronson CW., 2007.** Symbiosis-induced cascade regulation of the *Mesorhizobium loti* R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(3):255-261.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C., Palmer, T., 2004.** Novel Phenotypes of *Escherichia coli* tat Mutants Revealed by Global Gene Expression and Phenotypic Analysis. *J. Biol. Chem.* 279: 47543-47554
- Ize B, Stanley NR, Buchanan G, Palmer T, 2003.** Molecular microbiology. Jun;48(5):1183-93. Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity.
- Jacob-Dubuisson F., Fernandez R., Coutte L., 2004.** Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3):235-257.
- Johnstone DB. and Fishbein JR., 1956.** Identification of *Azotobacter* species by fluorescence and cell analysis. *J Gen Microbiol.* 14(2):330–335
- Kell DB., 2006.** Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discov Today.* Dec;11(23-24):1085-92.
- Kennedy C. and Bishop P., 2004.** Genetics of nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species of *Azotobacter*: History and current status. W. Klipp, B. Masepohl, J.R. Gallon and W.E. Newton (eds.), *Genetics and regulation of nitrogen fixation in Free-Living Bacteria*, 27-52.
- Kennedy C., Rudnick P., MacDonald M. and Melton T., 2003.** Genus *Azotobacter*. In G. Garrity et al.(Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume II, The proteobacteria (in press). New York: Springer.
- Kennedy C. and Toukdarian A., 1987.** Genetics of *Azotobacter*: Applications to nitrogen fixation and related aspects of nitrogen metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 227–258.
- Knowles R. and Baraqqio W.L., 1994.** Fre-living dinitrogen-fixing bacteria, p.179-197. In R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum (ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties.* Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wis.
- Kohara Y., Akiyama K. and Isono K., 1987.** The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting a large genomic library. *Cell* 50:495-508.
- Kostakioti M., Newman CL., Thanassi DG., Stathopoulos C., 2005.** Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* 187(13), 4306–4314
- Krane D. and Raymer M.L., 2003.** *Fundamental Concepts of Bioinformatics*, Pearson Education.
- Krawiec S. and Riley M., 1990.** Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* 54 (1990), pp. 502–539

- Lakshmi Kumari M., Vijayalakshmi M. and Subba Rao NS., 1972.** Interaction between *Azotobacter* species and fungi. I. In vitro studies with *Fusarium moniliforme* Sheld. *Phytopath. Z.* 75: 27–30.
- Latek D, Ekonomiuk D, Kolinski A., 2007.** Protein structure prediction: Combining de novo modeling with sparse experimental data. *J Comput Chem.* Mar 6;
- Lawson, D.M. and Smith, B.E.. 2002.** Molybdenum nitrogenases: a crystallographic and mechanistic view. *Metal Ions Biol. Syst.* 39, 75-119.
- Lederberg J. and McCray A.T., 2001.** 'Ome sweet 'omics – a genealogical treasury of words. *Scientist* 15(7), 8
- Lengauer Thomas, 2001.** Bioinformatics- From Genomes to Drugs, Volumes I & II, WILEY-VCH.
- Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J.-P., Lacroix, J.-M.. 2004.** Identification of mdoD, an mdoG Paralog Which Encodes a Twin-Arginine-Dependent Periplasmic Protein That Controls Osmoregulated Periplasmic Glucan Backbone Structures. *J. Bacteriol.* 186: 3695-3702
- Lieu CA, Elliston KO., 2007.** Applying a causal framework to system modeling. Ernst Schering Res Found Workshop. (61):139-52.
- Lindeberg M., Biehl BS., Glasner JD., Perna NT., Collmer A., Collmer CW., 2009.** Gene Ontology annotation highlights shared and divergent pathogenic strategies of type III effector proteins deployed by the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 and animal pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiology*, 9(Suppl 1):S4.
- Liu H., Coulthurst SJ., Pritchard L., Hedley PE., Ravensdale M., Humphris S., Burr T., Takle G., Brurberg MB., Birch PR., Salmond GP., Toth IK., 2008.** Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS pathogens*, 4(6):e1000093.
- Madden JC., Ruiz N., Caparon M., 2001.** Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in Gram-positive bacteria. *Cell* 104(1), 143–152
- Maldonado R., Jimenez J. and Casadesus J., 1994.** Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bact.* 176, pp. 3911–3919.
- Mallikarjunaiah RR. and Bhide VP.,1981.** Effect of *Azotobacter* on germination of spores of different fungi. *ZENTRALBL. BAKTERIOL., PARASITENKD., INFEKTIONSKR. HYG., II.* Vol. 136, no. 7, pp. 563-565.
- Mallikarjunaiah RR. and Bhide VP.,1982.** Fungistatic action of *Azotobacter chroococcum* and *A. vinelandii* on different fungi. *ZENTRALBL. BAKTERIOL., PARASITENKD., INFEKTIONSKR. HYG., II.* Vol. 137, no. 1, pp. 55-62.
- Manna AC. and Das HK., 1994.** The size of the chromosome of *Azotobacter chroococcum*. *Microbiology* 140 : 1237 -39.
- Manna AC. and Das HK., 1993.** Determination of the size of the *Apotobacter vinelandii* chromosome. *Mol & Gen Genet* 241, 71 9-722.
- Marraffini LA., Dedent AC., Schneewind O., 2006.** Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(1), 192–221
- Mashburn-Warren LM. and Whiteley M., 2006.** Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 61(4), 839–846
- Mattick JS., 2002.** Type 4 pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 289–314
- Meshram SU. and Jager G., 1983.** Antagonism of *Azotobacter chroococcum* isolates to *Rhizoctonia solani*. *Neth. J. Pl. Path.* 89: 191–197
- Mishustin EN. And Naumova AN., 1962.** Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. *Mierobiology* 31,442-452.
- Mota LJ. and Cornelis GR., 2005.** The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Annals of Medicine*, 37(4):234-249.

- Muller M., 2005.** Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 156(2):131-136.
- Pallen, MJ., 2002.** The ESAT-6/WXG100 superfamily- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol.* 10(5), 209–212
- Pancoska P., 2006.** Application of graph-based analysis of genomic sequence context for characterization of drug targets. *Curr Drug Discov Technol.*, Sep; 3(3): 175-88.
- Pandey A. and Kumar S. 1990.** Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on a range of rhizosphere fungi. *Indian Journal of Experimental Biology* 28, 52-54
- Papanikou E., Karamanou S., Economou A., 2007.** Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol*, 5(11):839-851.
- Patel JJ and Brown ME, 1969.** Interactions of azotobacter with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and Soil*, vol. 31,no. 2, 273-281
- Paulsen IT., Beness AM., Saier MH Jr., 1997.** Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalyzing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology*, 143(Pt 8):2685-2699.
- Peabody CR., Chung YJ., Yen MR., Vidal-Ingigliardi D., Pugsley AP., Saier MH Jr., 2003.** Type II protein secretion and its relationship to bacterial type 4 pili and archaeal flagella. *Microbiology* 149(Pt 11), 3051– 3072
- Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Wren JD., 2006.** Evolving research trends in bioinformatics. *Brief Bioinform.* Oct 31;
- Pugsley, AP., 1993.** The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57(1), 50–108
- Pukatzki S., Ma AT., Revel AT., Sturtevant D., Mekalanos JJ., 2007.** Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(39):15508-15513.
- Punita SJ., Reddy MA, Das HK , 1988.** Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171:3133–3138
- Rangaraj, P., Ruttiman-Johnson, C., Shah, V.K. and Ludden, P., 2000.** Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors of the *nif*- and *vnf*-encoded nitrogenases. In E. Triplett (Ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation* (pp 55-80). Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.
- Rees, D.C. and Howard, J.B., 2000.** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 559-556.
- Reddy JD., Reddy SL., Hopkins DL., Gabriel DW., 2007.** TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(4):403-410.
- Remaut H., Tang C., Henderson NS., Pinkner JS., Wang T., Hultgren SJ., Thanassi DG., Waksman G., Li H., 2008.** Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* 133(4), 640–652
- Robinson C. and Bolhuis A., 2001.** Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 350–356
- Robson RL., Chesshyre JA., Wheeler C., Jones R., Woodley PR. and Postgate JR., 1984.** Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology* 130, pp. 1603–1612
- Robson, R.L., Eady, R.R., Richardson, T.H., Miller, R.W., Hawkins, M. and Postgate, J.R., 1986.** The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature*, 322, 388-390.

- Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Muller M. and Wu L-F., 1999.** Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. *J Biol Chem*, **274**, 13223–13228
- Rose RW., Brüser T., Kissinger JC. and Pohlschröder M., 2002.** Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol.* **45**, 943–950
- Rozzak, D.B. and Colwell, R.R., 1987.** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**:365-379.
- Rubenchik L., 1963. *Azotobacter and Its Uses in Agriculture.*, Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem.
- Russo DM., Williams A., Edwards A., Posadas DM., Finnie C., Dankert M., Downie JA., Zorreguieta A., 2006.** Proteins exported via the PrsDPrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol*, **188**(12):4474-4486.
- Sabra W., Zeng AP. and Deckwer WD., 2001.** Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, pp. 315–325
- Saier MH Jr., 2006.** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol*, **214**(2):75-90.
- Sakellaris H. and Scott JR., 1998.** New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. *Mol. Microbiol.* **30**(4), 681–687
- Salmond GP. and Reeves PJ., 1993.** Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**(1), 7–12
- Sambasivarao, D., Turner, R. J., Simala-Grant, J. L., Shaw, G., Hu, J. & Weiner, J. H., 2000.** Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 22526–22531
- Santini C-L., Ize B., Chanal A., Muller M., Giordano G. and Wu L-F., 1998.** A novel Sec-independent periplasmic protein translocation system in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **17**, 101–112
- Sargent F., Bogsch EG., Stanley NR., Wexler M., Robinson C., Berks BC. and Palmer T., 1998.** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J*, **17**, 3640–3650
- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. 2000.** The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 11591–11596
- Stanley NR., Sargent F., Buchanan G., Shi J., Stewart V., Palmer T. and Berks BC., 2002.** Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol Microbiol*, **43**(4):1005-1021.
- Stathopoulos C., Hendrixson DR., Thanassi DG., Hultgren SJ., St Geme JW 3rd., Curtiss R 3rd., 2000.** Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect.* **2**(9), 1061–1072
- Sturm A, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lilie H, Brüser T., 2006.** YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *J Biol Chem.* **281**, 13972–13978
- Seefeldt, L.C., Dance I.G. and Dean, D.R., 2004.** Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry* **43**, 1401-1409.
- Seringhaus MR, Gerstein MB., 2007.** Publishing perishing? Towards tomorrow's information architecture. *BMC Bioinformatics.* **Jan 19**;8:17.
- Shrivastava S. and Mande SS., 2008.** Identification and functional characterization of gene components of Type VI secretion system in bacterial genomes. *PLoS ONE*, **3**(8):e2955.
- Simpson, F.B. and Burris, R.H., 1984.** A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* **224**:1095-1097.
- Smith CL., Econome JG., Schutt A., Klico S. and Cantor CR., 1987.** A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* **236**, 1448-1453

- Socolofsky MD. and Wyss O., 1961.** Cysts of *Azotobacter*. *J. Bact.* 81(6),946-954.
- Soto GE. and Hultgren SJ., 1999.** Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181(4), 1059–1071
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, F., Garcia, N., Willems, Anne., Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. and Dreyfus, B., 2001.** Methylo-trophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *J. Bacteriol.* p. 214-220.
- Tchan YT., 1984.** Azotobacteraceae. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual for systematic bacteriology*, vol 1. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp 219–234
- Thanassi DG., Stathopoulos C., Karkal A, Li H., 2005.** Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria. *Mol. Membr. Biol.* 22(1-2), 63–72
- Thompson, J.P. and Skerman, V.B.D., 1979.** *Azotobacteriaceae*, the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen fixing bacteria (417p.). London: Academic press.
- Thorneley, R.N.F. and Lowe, D.J., 1985.** Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system. In *Molybdenum enzymes* (ed. T.G. spiro), pp. 221-284. New York: John Wiley.
- Tjalsma, H., Bolhuis A., Jongbloed JD., Bron S., van Dijk JM., 2000.** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3), 515–547
- Tomich, M., Planet PJ., Figurski DH., 2007.** The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(5), 363–375
- Torto-Alalibo T., Collmer CW., Gwinn-Giglio M., 2009a.** The Plant-Associated Microbe Gene Ontology (PAMGO) Consortium: community development of new gene ontology terms describing biological processes involved in microbe-host interactions. *BMC Microbiology*, 9(Suppl 1):S1.
- Torto-Alalibo TA., Collmer CW., Lindeberg M., Bird D., Collmer A., Tyler BM., 2009b.** Common and contrasting themes in host-cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts. *BMC Microbiology*, 9(Suppl 1):S3.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC, 2009.** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9 (Suppl 1):S2
- Uhlen P., Laestadius A., Jahnukainen T., Soderblom T., Backhed F., Celsi G., Brismar H., Normark S., Aperia A., Richter-Dahlfors A., 2000.** Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature*, 405(6787):694-697.
- Veljkovic V, Veljkovic N, Este JA, Huther A, Dietrich U., 2007.** Application of the EIIP/ISM bioinformatics concept in development of new drugs. *Curr Med Chem.* 14(4):441-53.
- Voulhoux R., Ball G., Ize B., Vasil ML., Lazdunski A., Wu LF., Filloux A., 2001.** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20(23), 6735–6741
- Weaver, R.W. and Graham, P.H., 1994.** Legume nodule symbionts, p. 199-222. In R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum (ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties.* Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wis.
- Weiner JH., Bilous PT., Shaw GM., Lubitz SP., Frost L., Thomas GH., Cole JA. and Turner RJ., 1998.** A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, 93, 93–101
- Walmsley, J and Kennedy, C., 1991.** Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57,622-624.

- Wu HY., Chung PC., Shih HW., Wen SR., Lai EM., 2008.** Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 190(8):2841-2850.
- Yamane K. and Mizushima S., 1988.** Introduction of basic amino acid residues after the signal peptide inhibits protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Relation to the orientation of membrane proteins. *J Biol Chem*. Dec 25;263(36):19690–19696
- Young, JPW., 1992.** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p.43-86. In G. Stacy, R.H. Burris. And H.J. Evans (ed), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Zehr, J.P., Mellon, M.T. and Sani, S., 1998.** New nitrogen fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by the amplifications of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ Microbiol* 64:3444-3450.
- Zhong S., Macias AT., MacKerell AD. Jr., 2007.** Computational identification of inhibitors of protein-protein interactions. *Curr Top Med Chem*.7(1):63-82.
- Zhou M., Boekhorst J., Francke C., Siezen RJ., 2008.** LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC Bioinformatics* 9, 173
- Zuber B., Haenni M., Ribeiro T., Minnig K., Lopes F., Moreillon P., and Dubochet J., 2006.** Granular layer in the periplasmic space of gram-positive bacteria and fine structures of *Enterococcus gallinarum* and *Streptococcus gordonii* septa revealed by cryo-electron microscopy of vitreous sections. *J. Bacteriol*. 188(18), 6652–6660

Πηγές Internet:

- <http://www.wikia.com/Wikia>
- <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=FindGenes>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>
- <http://signalfind.org/tatfind.html>