

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ *Pseudomonas fluorescens* X ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΚΑΛΥΜΜΑ ΣΠΟΡΩΝ ΖΑΧΑΡΟΤΕΥΤΛΟΥ

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ Φ. ΚΡΕΜΜΥΔΑΣ

Επιβλέπων καθηγητής:

Δ. Γεωργακόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής επιτροπή παρακολούθησης:

Δ. Γεωργακόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ε. Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ι. Χατζηπαυλίδης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Δ. Γεωργακόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ε. Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ι. Χατζηπαυλίδης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Π. Κατινάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Γ.Ι. Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Α. Ταμπακάκη, Λέκτορας ΓΠΑ

Ν. Πανόπουλος, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Δ. Γεωργακόπουλου. Η υλική υποδομή της διατριβής εξασφαλίστηκε με την οικονομική βοήθεια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, το οποίο μας χορηγήθηκε μετά από αποδοχή της ερευνητικής πρότασης του Επίκουρου Καθηγητή κ. Δ. Γεωργακόπουλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Γεωργακόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Η συνεργασία μου με τον κ. Δ. Γεωργακόπουλο ήταν ουσιαστική σε κάθε στάδιο της διατριβής τόσο κατά το πειραματικό μέρος και τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά την διεκπεραίωσή του, όσο και κατά την συγγραφή και υποστήριξη.

Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές κ. Γ.Ι. Νυχά και κ. Π. Κατινάκη καθώς και τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ν. Πανόπουλο για την καλοσύνη που έδειξαν δεχόμενοι ευγενικά να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να αποτείνω στον Καθηγητή κ. Ε. Παπλωματά, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Χατζηπαυλίδη και στην Λέκτορα κ. Α. Ταμπακάκη για τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές τους οι οποίες ήταν καθοριστικές για την περαίωση της παρούσας μελέτης, αλλά και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ε. Φλεμεντάκη για τη υπομονή και την διάθεση του σε κάθε απορία μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας για την άψογη συνεργασία που είχαμε και για τις άψογες συνθήκες εργασίας που δημιούργησαν. Συγκεκριμένα την κ. Η. Κεφαλογιάννη και την κ. Κ. Παπαμελετίου για τις οδηγίες και την προσωπικές συμβουλές τους κατά την εργασία μου στους εργαστηριακούς χώρους.

Δε θα μπορούσα ξεχάσω τους συμφοιτητές, συναδέλφους και φίλους μου κ. Κ. Μάρκουλα, κ. Χ. Μεράκου, κ. Χ. Φωτιάδη, κ. Χ. Κοφόπουλο, κ. Ν. Σάλαρη, κ. Κ. Κοντούλη αλλά και τον κ. Ε. Κωμαΐτη για την αμέριστη ψυχολογική βοήθεια και το άριστο περιβάλλον συνεργασίας που δημιούργησαν κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και τα αδέρφια μου, για την αμέριστη κατανόηση, την στήριξη και την συμπαράσταση που μου δείχνουν, καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1.0. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης.....	10
1.2. Μηχανισμοί βιολογικής καταπολέμησης	11
1.3. Αντιβιοτικά.....	12
1.3.1. Μελέτη του ρόλου των αντιβιοτικών στη βιολογική καταπολέμηση... ..	14
1.3.2. <i>In situ</i> ανίχνευση παραγομένων αντιβιοτικών	15
1.3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση αντιβιοτικών.....	16
1.3.3.1. Ενδογενείς παράγοντες	16
1.3.3.2. Εξωγενείς παράγοντες.....	24
1.3.4. Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών βιολογικής καταπολέμησης στο γένος <i>Pseudomonas</i>	29
1.3.5. Φλορογλουκινόλες	32
1.3.6. Φεναζίνες.....	36
1.3.7. Ωομυκίνη Α.....	42
1.3.8. Φαινυλοπυρρόλες.....	43
1.3.9. Ψευδομονικά οξέα (Μουπιροσύνη).....	49
1.3.10. Αερουτζίνη	51
1.4. Κυκλικά λιποπεπτίδια	54
1.4.1. Δράση των CLPs.....	55
1.4.2. Βιοσύνθεση CLPs.....	58
1.4.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των CLPs στο γένος <i>Pseudomonas</i>	61
1.4.4. Σημαντικότερες ομάδες CLPs στο γένος <i>Pseudomonas</i>	63
1.4.5. Βισκοσίνες.....	65
1.4.6. Αμφισίνες.....	67
1.4.7. Πουτισολβίνες.....	68
1.5. Εξελίσσοντα στρατηγικές απομόνωσης βιολογικών παραγόντων.....	69

2.0. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	74
2.1. Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός	75
2.1.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	75
2.1.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA..	76
2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Pseudomonas fluorescens</i> και <i>E. coli</i> με ηλεκτροπόρωση	76
2.1.4. Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων.....	77
2.1.5. Μεταλλαξιγένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5.....	78
2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	80
2.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA απο κύτταρα <i>E. coli</i>	80
2.2.1.1. Μέθοδος αλκαλικής λύσης	80
2.2.1.2. Μέθοδος λύσης με βρασμό	81
2.3. Απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα.....	81
2.4. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη	82
2.5 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων.....	83
2.5.1. Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης.....	83
2.5.2. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	84
2.5.3. Ενοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	84
2.5.4. Αποφωσφορυλίωση των άκρων με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης.....	85
2.5.5. Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα	85
2.5.6. Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων με τυφλά άκρα	86
2.6. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων	86
2.7. Μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων	87
2.7.1. Μεταφορά DNA κατά Southern από πηκτή αγαρόζης	87
2.7.2. Αλκαλική μέθοδος μεταφοράς DNA σε φίλτρα πλαστικής μεμβράνης.....	88
2.7.3. Μεταφορά αποικιών	89
2.8. Υβριδισμός.....	89
2.8.1. Προϋβριδισμός	90
2.8.2. Υβριδισμός	90
2.8.3. Ξεπλύματα και ανάπτυξη σήματος.....	91

2.9. Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με τη χρήση DIG-11-dUTP.....	91
2.9.1. Τυχαία σήμανση.....	92
2.9.2. Σήμανση με PCR.....	92
2.10. Πλασμιδιακή απελευθέρωση.....	92
2.11. Λυοφυλίωση.....	94
2.12. Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)	94
2.12.1. Αντιδράσεις PCR.....	94
2.12.2. Real Time PCR.....	96
2.12.3. PCR αποικιών	98
2.12.4. Υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR	99
2.15. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	100
2.16. Αριθμοί καταχώρισης, των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων καταστολής, στην Genbank.....	101
2.17. Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων	101
2.17.1. Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια.....	101
2.17.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης και υβριδισμού.....	102
2.17.3. Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	102
3.0. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	103
3.1. Μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA.....	104
3.1.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.....	105
3.1.2. Ποσοστά ομοιότητας του γονιδίου 16S rRNA και σχεδιασμός του φυλλογενετικού δέντρου του <i>Ps. fluorescens X</i>	105
3.2. Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων του <i>Ps. fluorescens X</i> ως προς την παρεμπόδιση του <i>P. ultimum</i>.....	108
3.2.1. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των sup ⁻ μεταλλαγμένων στελεχών.....	108
3.3. Απομόνωση των γονιδίων παρεμπόδισης.....	110
3.3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA εκατέρωθεν της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου.....	110
3.3.2. Ανάλυση των κλώνων της πλασμιδιακής απελευθέρωσης.....	111
3.4. Ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων γονιδίων.....	114
3.4.1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των γενετικών περιοχών όπως προκύπτουν από την πλασμιδιακή απελευθέρωση.....	114

3.4.1.1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την πρώτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών.....	115
3.4.1.2. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την δεύτερη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών...	117
3.4.1.3. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την τρίτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών.....	118
3.4.1.4. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την τέταρτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών....	119
3.4.2. Το γονίδιο <i>sup1</i> κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης (Gcd).....	121
3.4.3 Το γονίδιο <i>sup2</i> κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqF.....	124
3.4.4. Το γονίδιο <i>sup3</i> κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqD.....	126
3.4.5. Το γονίδιο <i>sup4</i> κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqE.....	127
3.4.6. Το γονίδιο <i>sup5</i> κωδικοποιεί μια άγνωστη πρωτεΐνη.....	128
3.4.7. Το γονίδιο <i>sup6</i> κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cupin2.....	130
3.4.8. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου της κινοπρωτεϊνικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης.....	131
3.4.9. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου των γονιδίων <i>pqq</i>	133
3.4.10. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου των <i>sup5</i> και <i>sup6</i>	137
3.4.11. Τα γονίδια καταστολής στο στέλεχος <i>Ps. fluorescens</i> X.....	141
3.5. Επαναφορά του φαινοτύπου <i>sup</i> στα μεταλλαγμένα στελέχη	141
3.5.1. Συμπλήρωση του φαινοτύπου <i>sup</i> στα μεταλλαγμένα στελέχη της πρώτης ομάδας.....	142
3.5.2. Συμπλήρωση του φαινοτύπου <i>sup</i> στα μεταλλαγμένα στελέχη της δεύτερης και της τρίτης ομάδας.....	143
3.5.3. Συμπλήρωση του φαινοτύπου <i>sup</i> στα μεταλλαγμένα στελέχη της τέταρτης ομάδας.....	144
3.5.4. Συμπλήρωση του φαινοτύπου <i>sup</i> με ανάπτυξη σε διάφορες πηγές άνθρακα.....	145
3.6. Έκφραση των γονιδίων <i>sup5</i>, <i>sup6</i> και <i>orf8</i>.....	146
3.7. Δημιουργία εμπορικών σκευασμάτων.....	152
4.0. Συζήτηση.....	155
5.0. Βιβλιογραφία.....	170
6.0. Παράρτημα.....	190

Περίληψη

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X είναι ικανός βιολογικός ανταγωνιστής φυτοπαθογόνων μυκήτων και ωομυκήτων που προκαλούν τήξεις φυταρίων στο σακχαρότευτλο και το αγγούρι. Μετά από μεταλλαξιγένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5 και εξέταση 12000 μεταλλαγμένων στελεχών, απομονώθηκαν εννέα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του ωομύκητα *P. ultimum* *in vitro*. Ο έλεγχος της καταπολέμησης του *P. ultimum* από τα γονίδια αυτά (φαινότυπος sup) αποδείχθηκε με επανόρθωση της μετάλλαξης από τα γονίδια αυτά *in trans*.

Τα γονίδια με ένθεση του μεταθετού στοιχείου τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση του φαινότυπου sup απομονώθηκαν με την τεχνική της πλασμιδιακής απελευθέρωσης. Τα γονίδια *sup2*, *sup3* και *sup4* κωδικοποιούν πρωτεΐνες (PqqE, PqqD, PqqF) οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πυρρολοκινολινκινόνης (PQQ) και φαίνεται ότι βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Επιπλέον, βρέθηκε ακόμα ένα γονίδιο (*sup1*), το οποίο κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης και βρίσκεται σε διαφορετική γονιδιωματική περιοχή από τα υπόλοιπα. Τέλος, δύο γονίδια (*sup5* και *sup6*, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα μια πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια των cupin πρωτεϊνών και μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας) φαίνεται ότι βρίσκονται οργανωμένα σε ένα υποθετικό οπερόνιο (*supX*).

Ανοφερικά του υποθετικού οπερονίου *supX*, το οποίο περιέχει τρία ακόμα γονίδια (ένα από τα οποία κωδικοποιεί μια NRPS), εντοπίστηκε θέση αναγνώρισης ενός μεταγραφικού παράγοντα της οικογένειας GntR. Μελέτη της συνταινίας του γονιδιακού τόπου του *supX* αποκάλυψε ότι είναι διαδεδομένο στο γένος *Pseudomonas*, αλλά με σχετικά χαμηλή ομοιότητα με τα ομόλογά του. Εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα μόνο με το οπερόνιο βιοσύνθεσης της μανγκοτοξίνης από το στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158.

Η έκφραση των γονιδίων του *supX* μελετήθηκε με ποσοτική Real-Time PCR. Διαπιστώθηκε ότι η έκφρασή τους επάγεται όταν το βακτήριο βρίσκεται στην ύστερη εκθετική φάση και στη φάση στασιμότητας της ανάπτυξης του παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Η έκφραση των γονιδίων του *supX* διακόπτεται στα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ και στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης. Η αφυδρογονάση της γλυκόζης και η PQQ φαίνεται ότι ρυθμίζουν έμμεσα την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου *supX*, οξειδώνοντας τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ, το οποίο αποτελεί αναστολέα ορισμένων από τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας GntR.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του βακτηρίου υποδηλώνει την βιοσύνθεση ενός δευτερογενούς μεταβολίτη, πιθανώς κάποιου κυκλικού λιποπεπτιδίου, από το *supX* και την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών από τα επίπεδα του γλυκονικού οξέος. Τόσο ο μηχανισμός αυτός, όσο και τα γονίδια του υποθετικού οπερονίου *supX* αποτελούν πρώτη επιστημονική καταγραφή μηχανισμού βιολογικής καταπολέμησης φυτοπαθογόνων μυκήτων από ανταγωνιστές του γένους *Pseudomonas*.

Λέξεις κλειδιά: πυρρολοκινολινκινόνη, αφυδρογονάση της γλυκόζης, μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες, μεταγραφικοί παράγοντες

Abstract

Pseudomonas fluorescens X has the ability to suppress seed and seedling damping-off in sugar beet and cucumber. Spontaneous mutagenesis and screening a library of 12000 mutants, plasmid rescue, sequencing and complementation analysis showed that biocontrol ability of X is related to genes involved in the biosynthesis of pyrroloquinoline quinone (PQQ), one gene encoding glucose dehydrogenase (*gcd*), and two more genes (*sup5* and *sup6*), organized in a putative operon (*supX*). The *supX* putative operon consists of five genes in total (one of which encodes a non-ribosomal peptide synthase (NRPS)). A unique binding site for a transcriptional factor belonging to the GntR family of transcriptional regulators is localized upstream of *supX*. Synteny analysis of the *supX* putative operon and the GntR binding site revealed that it is found in several bacteria of the genus *Pseudomonas*, but with a low degree of similarity to most. *supX* shows high similarity only to the mangotoxin biosynthesis operon in *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Quantitative real-time PCR analysis indicated that transcription of *supX* is strongly reduced when *gcd* or one of the genes involved in the biosynthesis of PQQ is mutated. On the contrary, transcription of *supX* is induced by the presence of glucose in the medium and transcription levels appear to be higher during the late exponential and stationary growth phase in the wild type. *Gcd*, which uses the PQQ as a cofactor, catalyses the oxidation of glucose to gluconic acid, which has an inhibitory effect for some of the transcriptional factors of the GntR family, thus affecting the transcription of *supX*. This study provides evidence for a novel mechanism of biological control of *P. ultimum* by *Ps. fluorescens* X, controlled by the metabolism of glucose. The biosynthesis of antifungal compound(s) by *Ps. fluorescens* X is controlled by genes in the *supX* putative operon. This is the first report on the role of *supX* in biocontrol of plant pathogens by a strain of *Ps. fluorescens*.

Key words: PQQ, *Gcd*, NRPS, transcriptional regulator

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης

Κατά τον περασμένο αιώνα, αναπτύχθηκαν τεχνικές για την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών οι οποίες όμως έχουν δυσμενείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Οι ξεπερασμένες καλλιεργητικές μέθοδοι και τα προληπτικά μέσα καταπολέμησης, παρόλο που δεν έχουν καμία δυσμενή επίπτωση για το περιβάλλον, έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση μιας ασθένειας. Η μόλυνση εδαφών και υδροφόρων οριζώντων από τα μέσα της χημικής καταπολέμησης καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων στα μέσα αυτά, έχει αποδείξει την αναγκαιότητα ανακάλυψης και εφαρμογής μιας εναλλακτικής μεθόδου (Aegios, 1996).

Τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τη βιολογική καταπολέμηση. Η μέθοδος της αντιμετώπισης αυτής, η οποία χρησιμοποιείται από την επιστήμη της εντομολογίας και της φυτοπαθολογίας, αναφέρεται στην μείωση του πληθυσμού ή της νοσογόνου δράσης του εκάστοτε παθογόνου, εξαιτίας ενός ή περισσότερων οργανισμών-ανταγωνιστών του παθογόνου. Αυτοί οι οργανισμοί-ανταγωνιστές, οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης, περιλαμβάνουν : α) μη παθογόνα στελέχη του ίδιου γένους με το παθογόνο (cross protection), β) το ίδιο το παθογόνο σε μικρότερες ποσότητες μολύσματος (ανοσοποίηση- plant immunization), γ) παθογόνα στελέχη τα οποία εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση με τον ξενιστή προσβάλλοντας έτσι μόνο τους εχθρούς της κύριας καλλιέργειας και δ) οργανισμούς οι οποίοι εμφανίζουν είτε ανταγωνιστικές είτε θηρευτικές είτε παρασιτικές ιδιότητες έναντι του παθογόνου (Pal *et al.*, 2006).

Στην κατηγορία των βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης είναι δυνατό να ενταχθούν ξενιστές οι οποίοι μετά από φυσική επιλογή έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στις προσβολές συγκεκριμένων παθογόνων (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Γενετικώς τροποποιημένα φυτά και έντομα-ξενιστές τα οποία έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα για συγκεκριμένα παθογόνα δεν πρέπει να συγχέονται με τους βιολογικούς παράγοντες. Μια τελευταία κατηγορία βιολογικών παραγόντων θεωρούνται διάφορα φυσικά προϊόντα, τα οποία προέχονται από διαδικασίες ζύμωσης ή εκχύλισης και παρουσιάζουν προστατευτικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των βιοτικών παραγόντων που έχουν προαναφερθεί, είτε προάγοντας την ανάπτυξη των φυτών είτε καταστέλλοντας την ανάπτυξη ή ακόμα και θανατώνοντας παθογόνα (Pal *et al.*, 2006).

Μικροοργανισμοί οι οποίοι έχει διαπιστωθεί ότι μπορούν να αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης παθογόνων προέρχονται από διάφορα γένη βακτηρίων αλλά και μυκήτων τόσο της φυλλόσφαιρας όσο και της ριζόσφαιρας. Ορισμένα γένη βακτηρίων που απαντώνται σε πολλές μελέτες οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιολογική καταπολέμηση είναι τα εξής: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Pantoea*, *Rhizobium* – *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas*. Γένη μυκήτων που απαντώνται σε μελέτες που αφορούν βιολογική καταπολέμηση είναι: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pythium*, *Trichoderma* (Weller, 1988).

1.2. Μηχανισμοί βιολογικής καταπολέμησης

Τα τελευταία 30 χρόνια οι πρόοδοι που έχουν σημειωθεί στις μικροβιολογικές και τις μοριακές τεχνικές έχουν δώσει στους επιστήμονες την ικανότητα να διερευνήσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών αλλά και τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν. Στη βιολογική καταπολέμηση οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες μπορεί να παρατηρηθούν μεταξύ των μικροοργανισμών είναι όλες ανταγωνιστικού τύπου αλλά είναι δυνατό να εκδηλώνονται με διαφορετικούς μηχανισμούς (**Πίνακας 2.1**).

Πίνακας 2.1: Τύποι ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων σε συσχέτισμό με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από τους παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης (Pal *et al.*, 2006)

Τύπος ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης	Μηχανισμοί καταπολέμησης
Άμεσος ανταγωνισμός	Παρασιτισμός-Θήρευση
Έμμεσος ανταγωνισμός	Παραγωγή αντιβιοτικών
	Παραγωγή κυκλικών λιποπεπτιδίων αντιμικροβιακής δράσης
	Ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία-Οικολογικός αποκλεισμός
	Παραγωγή πτητικών ενώσεων
	Επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας

Οι βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης οι οποίοι ανήκουν στον άμεσο τύπο ανταγωνισμού αλληλεπιδρούν με το παθογόνο με μηχανισμούς οι οποίοι είναι άμεσα εξαρτώμενοι από την ύπαρξη του παθογόνου στο περιβάλλον. Ο τύπος αλληλεπίδρασης αυτός είναι απόλυτα εξειδικευμένος και οι βιολογικοί παράγοντες τους οποίους χαρακτηρίζει ο τύπος αυτός, απαρτίζονται αποκλειστικά από υποχρεωτικά παράσιτα. Μικροοργανισμοί-βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης οι οποίοι ανήκουν στον έμμεσο τύπο ανταγωνισμού αλληλεπιδρούν με το παθογόνο με μηχανισμούς, η έκφραση των οποίων δεν είναι απαραίτητα συνδεδεμένη με την παρουσία του παθογόνου. Είναι πιθανό, βιολογικοί παράγοντες έμμεσου ανταγωνισμού να χρησιμοποιούν περισσότερους του ενός μηχανισμούς, οι οποίοι σε συνδυασμό μεταξύ τους να έχουν ως αποτέλεσμα την καταπολέμηση του παθογόνου. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι οι μηχανισμοί καταπολέμησης, που χρησιμοποιούνται από τους βιολογικούς παράγοντες της κατηγορίας αυτής, είναι δυνατό να διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στη φυσιολογία του βιολογικού παράγοντα από αυτόν της καταπολέμησης (Pal *et al.*, 2006).

Ο τύπος αλληλεπίδρασης καθώς και οι μηχανισμοί καταπολέμησης που θα αναπτύξει ένας μικροοργανισμός στο ενδιαίτημά του εξαρτώνται άμεσα από πολλούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί περιπλέκουν τη μελέτη των μηχανισμών καταπολέμησης, γεγονός που απαιτεί απλοποίηση των συνθηκών κάτω από τις οποίες διεξάγεται η μελέτη. Η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών και η μελέτη τους σε απλοποιημένα πειραματικά συστήματα αλλά και στον αγρό, επιτρέπει την εξέταση των μοριακών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, τα οποία καθιστούν συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ικανούς να καταστείλουν ένα παθογόνο (Handelsman *et al.*, 1996).

1.3. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια μεγάλη ομάδα ετερογενών οργανικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, τα οποία είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και απαντώνται σε διάφορους μικροοργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές είναι τοξικές, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, για τις αυξητικές ή τις μεταβολικές δραστηριότητες άλλων μικροοργανισμών παίζοντας πρωταρχικό ρόλο στη καταπολέμηση ασθενειών, είτε περιορίζοντας την ανάπτυξή του παθογόνου είτε θανατώνοντάς το (Pal *et al.*, 2006).

Πολλοί παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης έχουν την ικανότητα να παράγουν περισσότερα από ένα αντιβιοτικά τα οποία έχουν την ικανότητα να καταστείλουν ένα παθογόνο. Στην περίπτωση αυτή τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να δρουν είτε συνδυασμένα είτε μεμονωμένα και το καθένα να έχει διαφορετικό ποσοστό συμμετοχής στην καταπολέμηση (Weller, 1988).

Το κάθε αντιβιοτικό, το οποίο είναι δυνατόν να παράγεται από πολλά στελέχη του ίδιου γένους ή και από στελέχη διαφορετικών γενών, ενδέχεται να παρουσιάζει μη εξειδικευμένη δράση. Αυτό υποδηλώνει ότι συγκεκριμένα αντιβιοτικά, τα οποία είναι δυνατόν να παράγονται από μια μικροβιακή κοινότητα ή από ένα μόνο παράγοντα καταπολέμησης, μπορεί να έχουν κατασταλτική δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος παθογόνων (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Ιστορικά, το πιο γνωστό παράδειγμα βιολογικής καταπολέμησης λόγω παραγωγής αντιβιοτικών είναι αυτό της καταπολέμησης του παθογόνου βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* από το βακτηριακό στέλεχος *Agrobacterium radiobacter* K84. Το παθογόνο βακτήριο *A. tumefaciens* είναι το μοναδικό το οποίο προκαλεί την ευρέως διαδεδομένη ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών, που ονομάζεται καρκίνος. Το στέλεχος K84 του *A. radiobacter* είναι μη παθογόνο και παράγει την βακτηριοσίνη αγροσίνη 84, η οποία αποτελεί αντιβιοτικό και καθιστά το *A. radiobacter* παράγοντα βιολογική καταπολέμησης του *A. tumefaciens*.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνών που αναδεικνύουν την παραγωγή αντιβιοτικών ως τον σημαντικότερο μηχανισμό βιολογικής καταπολέμησης έχουν πραγματοποιηθεί σε βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές (Handelsman *et al.*, 1996; Whipps, 1997; Lugtenberg *et al.*, 2003) να διατυπώσουν την άποψη ότι το γένος αυτό κατέχει σημαντική θέση στην βιολογική καταπολέμηση, εξαιτίας ενός ευρέος φάσματος αντιβιοτικών που έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει.

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει πάνω από 60 είδη, τα οποία απαντώνται σε ποικίλα οικοσυστήματα και ξενιστές. Από το γένος *Pseudomonas*, τέσσερα είδη (*Ps. aeruginosa*, *Ps. entomophila*, *Ps. syringae* και *Ps. fluorescens*) κατέχουν εξέχουσα θέση στην παραγωγή μιας πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι αντιβιοτικά. Το γονιδίωμα 22 στελεχών, τα οποία ανήκουν στα τέσσερα προαναφερθέντα είδη, έχει πλήρως αλληλουχιθεί και με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής έχει υπολογιστεί ότι τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν περίπου το 6% ολόκληρου

του γονιδιώματος. Μεταξύ των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών συγκαταλέγονται γονίδια των οποίων η έκφραση έχει μελετηθεί αλλά και γονίδια για τα οποία δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, παρά μόνο δεδομένα από βιοπληροφορική ανάλυση (Gross *et al.*, 2009). Είναι, λοιπόν, λογικό να έπονται ανακαλύψεις νέων γονιδίων και νέων βιοσυνθετικών μονοπατιών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι είναι άγνωστοι σήμερα.

1.3.1. Μελέτη του ρόλου των αντιβιοτικών στη βιολογική καταπολέμηση

Τέσσερα είναι τα βασικά στοιχεία τα οποία είναι ικανά να κατοχυρώσουν μια επιστημονική μελέτη, προκειμένου να αποδειχτεί αδιάσειστα η σπουδαιότητα των αντιβιοτικών στην βιολογική καταπολέμηση παθογόνων τόσο *in vitro*, όσο και *in situ* (Raaijmakers *et al.*, 2002):

- Το πρώτο στοιχείο είναι η παρατήρηση ότι τα αντιβιοτικά που παράγονται από τον βιολογικό παράγοντα είναι ικανά από μόνα τους να προκαλέσουν καταπολέμηση ενός παθογόνου. Έτσι σε πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί στην καταπολέμηση του παθογόνου είτε το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύχθηκε ένας βιολογικός παράγοντας, είτε τα αντιβιοτικά τα οποία παράγει μετά από διαδικασίες απομόνωσης, με αποτελεσματικότητα ίδια με αυτή του βιολογικού παράγοντα.
- Το δεύτερο στοιχείο είναι η απενεργοποίηση της παραγωγής αντιβιοτικών προκαλώντας μεταλλαξιγένεση. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί μεταθετά στοιχεία για να διακόψουν την αλληλουχία γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή αντιβιοτικών. Πλην ελάχιστων ερευνών, η απενεργοποίηση γονιδίων οδηγεί στην διακοπή της παραγωγής αντιβιοτικών. Μεταλλαγμένα στελέχη με μειωμένη ικανότητα παραγωγής αντιβιοτικών, χάνουν και τις κατασταλτικές ιδιότητες τις οποίες παρουσιάζει ο άγριος τύπος, ενώ όταν επανορθώνεται η μετάλλαξη τότε αποκαθίσταται και η ικανότητα καταπολέμησης. Το γεγονός αυτό ισχυροποιεί τον ρόλο τον οποίο διαδραματίζουν τα αντιβιοτικά σε ένα βιολογικό παράγοντα ο οποίος τα παράγει.
- Σαν ένα ακόμα στοιχείο στην απόδειξη της σπουδαιότητας του ρόλου των αντιβιοτικών στην βιολογική καταπολέμηση είναι η υπερπαραγωγή αντιβιοτικών η οποία οδηγεί στην αυξημένη ικανότητα, από την πλευρά του

βιολογικού παράγοντα, να καταστέλλεται το παθογόνο. Σε πολλές μελέτες τροποποίηση των γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών, αλλάζοντας το κωδικόνιο έναρξης ή αντικαθιστώντας τον φυσικό μεταγραφικό υποκινητή με ένα δυνατό, έχει οδηγήσει στην υπερέκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών. Ένας ακόμη τρόπος υπερέκφρασης γονιδίων είναι η εισαγωγή περισσότερων αντιγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή αντιβιοτικών.

- Το τελευταίο στοιχείο που εδραιώνει τον ρόλο των αντιβιοτικών στην βιολογική καταπολέμηση παρέχεται από την εισαγωγή των γονιδίων βιοσύνθεσης ενός αντιβιοτικού σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης και κατόπιν την εκτίμηση της ικανότητας τους να καταστέλλουν ένα παθογόνο. Η εισαγωγή γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης γίνεται είτε με πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι έχουν πολλά αντίγραφα, είτε με ένθεση ενός αντιγράφου στο χρωμόσωμα. Και στις δύο περιπτώσεις η εισαγωγή των γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικού οδηγεί στην έκφρασή του από μικροοργανισμούς οι οποίοι αποκτούν ιδιότητες βιολογικού παράγοντα, παρεμφερείς με αυτές του αγρίου τύπου από τον οποίο προέρχονται τα γονίδια. Τα στοιχεία αυτά, όχι μόνο καθιστούν τα αντιβιοτικά σημαντικά στην βιολογική καταπολέμηση αλλά, δίνουν την ικανότητα βελτίωσης των ιδιοτήτων ενός βιολογικού παράγοντα καταπολέμησης.

1.3.2. *In situ* ανίχνευση παραγομένων αντιβιοτικών

Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην βιολογική καταπολέμηση, είναι πολύ δύσκολο να διερευνηθεί *in planta* εξαιτίας της πολυπλοκότητας των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων που επικρατούν την εκάστοτε στιγμή στο περιβάλλον. Βασικό πρόβλημα αποτελεί η ανάκτηση και η ανίχνευση των παραγομένων αντιβιοτικών στη ριζόσφαιρα, πιθανώς, εξαιτίας της χημικής τους αστάθειας, της αποδόμησης από διάφορους μικροοργανισμούς και την δέσμευσή τους από τα εδαφικά κolloειδή κατά τρόπο μη αντιστρεπτό (Thomashow *et al.*, 1997).

Προκειμένου, λοιπόν, να μελετηθεί η *in situ* παραγωγή των αντιβιοτικών και η παραγωγή τους να συσχετιστεί με τη βιολογική καταπολέμηση έχουν αναπτυχθεί τρεις μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές διαθέτουν ευαισθησία που τις καθιστά ικανές να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν την παραγωγή αντιβιοτικών στη ριζόσφαιρα,

υπό την επίδραση των πολύπλοκων συνθηκών που επικρατούν εκεί (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Η πρώτη μέθοδος αναφέρεται στην χρήση γονιδίων ανταποκριτών (reporter genes). Η χρήση της μεθόδου αυτής εστιάζεται στην παρακολούθηση ενός μικροβιακού πληθυσμού κατά τον εμβολιασμό του σε ένα οικοσύστημα, αλλά και στην κατανόηση της μεταγραφικής δραστηριότητας συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή αντιβιοτικών. Η μέθοδος αυτή υστερεί, σε σχέση με τις άλλες δύο, μιας και δεν είναι εφικτή η ακριβής ποσοτικοποίηση των αντιβιοτικών που παράγονται *in situ*.

Μια πολύ ευέλικτη και ακριβής μέθοδος, στην μελέτη της παραγωγής αντιβιοτικών *in situ*, είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Μέχρι σήμερα, η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των περισσότερων αντιβιοτικών στη ριζόσφαιρα και η ευαισθησία της κινείται σε επίπεδα 5 - 5000ng παραγόμενου αντιβιοτικού ανά γραμμάριο εδάφους. Παρόλο την ευαισθησία της μεθόδου αυτής, υπάρχει ένα μικρό μειονέκτημα το οποίο έγκειται στην ταυτοποίηση των εκχυλισμάτων. Τα απομονωθέντα κλάσματα πρέπει να ταυτοποιηθούν με περαιτέρω φασματικές αναλύσεις (Thomashow *et al.*, 1997).

Η μέθοδος η οποία εμφανίζεται να χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο είναι αυτή του *in situ* RT-PCR. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν αντιβιοτικά τα οποία παράγονται από ένα πολύ μικρό μικροβιακό πληθυσμό αλλά και να γίνει μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση αντιβιοτικών, ακόμα και μέσα στο κύτταρο. Με άλλα λόγια η μέθοδος αυτή, συνδυάζοντας την ευαισθησία της PCR με τον μορφολογικό εντοπισμό του *in situ* υβριδισμού, επιτρέπει τον εντοπισμό στη ριζόσφαιρα των βακτηριακών κυττάρων που παράγουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά (Raaijmakers *et al.*, 2002).

1.3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοσύνθεση αντιβιοτικών

Η μελέτη του ρόλου που κατέχουν τα αντιβιοτικά στην βιολογική καταπολέμηση επισκιάζεται από διάφορους παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν την παραγωγή τους. Οι παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν την παραγωγή αντιβιοτικών διακρίνονται στους ενδογενείς και στους εξωγενείς (Raaijmakers *et al.*, 2002).

1.3.3.1. Ενδογενείς παράγοντες

Στους ενδογενείς παράγοντες εντάσσονται οι παρακάτω:

- το ρυθμιστικό σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS

Το σύστημα αυτό, έχει μελετηθεί σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, στα οποία περιλαμβάνονται διάφορα γένη εντερικών βακτηρίων και φθορίζουσες ψευδομονάδες. Στα βακτήρια αυτά έχει αποδειχθεί ότι ελέγχει τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών και εξωκυτταρικών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται είτε στην παθογένεια είτε στη βιολογική καταπολέμηση ορισμένων βακτηρίων. Κατά το μοντέλο του συστήματος αυτού, το GacS το οποίο αποτελεί μια διαμεμβρανική κινάση αισθητήρα ενεργοποιείται από πολύ εξειδικευμένα σήματα και φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα GacA, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των εμπλεκόμενων γονιδίων-στόχων (Haas *et al.*, 2001).

Στους βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης η απενεργοποίηση του συστήματος αυτού συνεπάγεται την μερική ή ολική απώλεια της ικανότητας καταπολέμησης μιας ασθένειας. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης αντιβιοτικών, και κατά συνέπεια η ικανότητα καταπολέμησης, στα στελέχη των βιολογικών παραγόντων που ακολουθούν έχει αποδειχθεί ότι ελέγχεται από το σύστημα αυτό: *Ps. aureofaciens* 30-84, *Ps. chlororaphis* PCL1391, *Ps. fluorescens* BL915, *Ps. fluorescens* CHA0, *Ps. fluorescens* F113, *Ps. fluorescens* Pf5 (Haas *et al.*, 2001).

Στα παθογόνα βακτήρια το σύστημα των μεταγραφικών παραγόντων GacA/GacS ελέγχει την παραγωγή τοξινών και λυτικών ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην παθογένειά τους σε φυτά άλλα και σε ζώα. Στελέχη παθογόνων βακτηρίων στα οποία έχει μελετηθεί το σύστημα αυτό είναι τα εξής: *Ps. syringae* BR2R, *Ps. tolaasii* NCPPB1116, *Erwinia carotovora*, *Ps. viridiflava* PJ-08-6A, *Ps. aeruginosa* PAO1, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* K12, *Azotobacter vinelandii* 5 (Haas *et al.*, 2001).

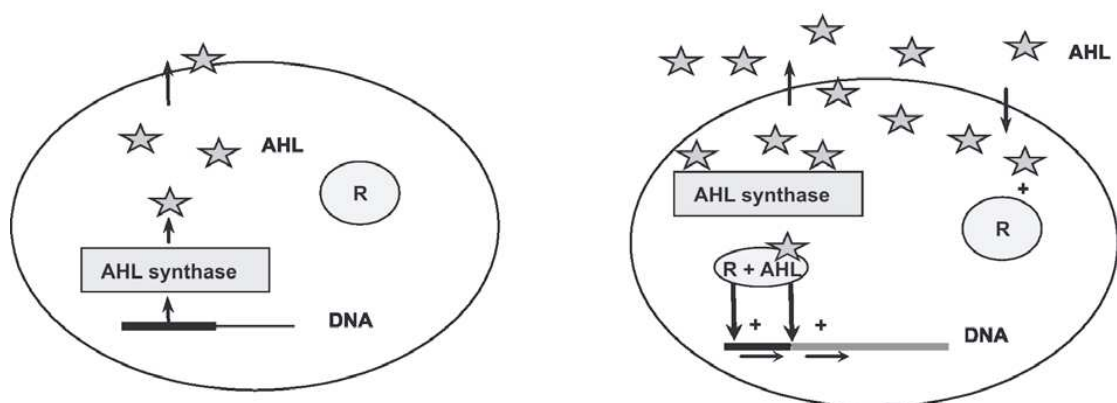
Κατά τους Chancey *et al.* (1999), στελέχη του βακτηρίου *Ps. aureofaciens* 30-84 τα οποία έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο GacS έχαναν την ικανότητα να παράγουν φεναζίνες, λακτόνες της ομοσερίνης, υδροκυάνιο και κάποιες πρωτεάσες. Η απώλεια βιοσύνθεσης όλων των παραπάνω ενώσεων συνεπάγεται και την απώλεια της ικανότητας βιολογικής καταπολέμησης που εμφανίζει το στέλεχος. Από τις πρωταρχικές μελέτες που ανέδειξαν τον ρόλο του συστήματος GacA/GacS είναι αυτή των Barta *et al.* (1992). Κατά τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η παραγωγή της ταμπτοξίνης (tabtoxin), από το βακτήριο *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, ρυθμίζεται από το GacA. Έτσι μεταλλαγμένα στελέχη του

βακτηρίου αυτού, τα οποία έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο GacA, έχαναν την ικανότητα βιοσύνθεσης και συνεπώς δεν ήταν ικανά να μολύνουν φυτά φασολιού.

- η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού (Quorum sensing)

Σε πολλά βακτήρια έχει παρατηρηθεί η ικανότητα ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Η έκφραση των γονιδίων αυτών επάγεται όταν η πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού υπερβεί ένα κατώφλι, ενώ η έκφρασή τους σταματά όταν η πυκνότητα βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Η 'αίσθηση' της πυκνότητας του πληθυσμού είναι εφικτή μέσω μοριακών σημάτων, τα οποία ονομάζονται αυτεπαγωγείς (autoinducers) και είναι συντηρημένα στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Τα σήματα αυτά ανήκουν στην ομάδα των λακτονών της ομοσερίνης (AHL) (**Εικόνα 3.3.1**) και έχει βρεθεί ότι υπάρχουν στα αρνητικά κατά Gram, αλλά και στα θετικά κατά Gram βακτήρια υπογραμμίζοντας ότι το σύστημα της αίσθησης μεγέθους πληθυσμού παίζει σπουδαίο ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των μικροοργανισμών (Juhás *et al.*, 2005).

Η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού είναι, λοιπόν, ένα μηχανισμός μέσω του οποίου είναι δυνατόν τα βακτηριακά κύτταρα ενός πληθυσμού να επικοινωνήσουν προκειμένου να συντονίσουν κάποιες από τις μεταβολικές τους διεργασίες. Ως αποτέλεσμα, του συντονισμού των μεταβολικών διεργασιών, είναι η εμφάνιση ενός φαινοτύπου και η καλύτερη προσαρμογή σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Czajkowski *et al.*, 2009).

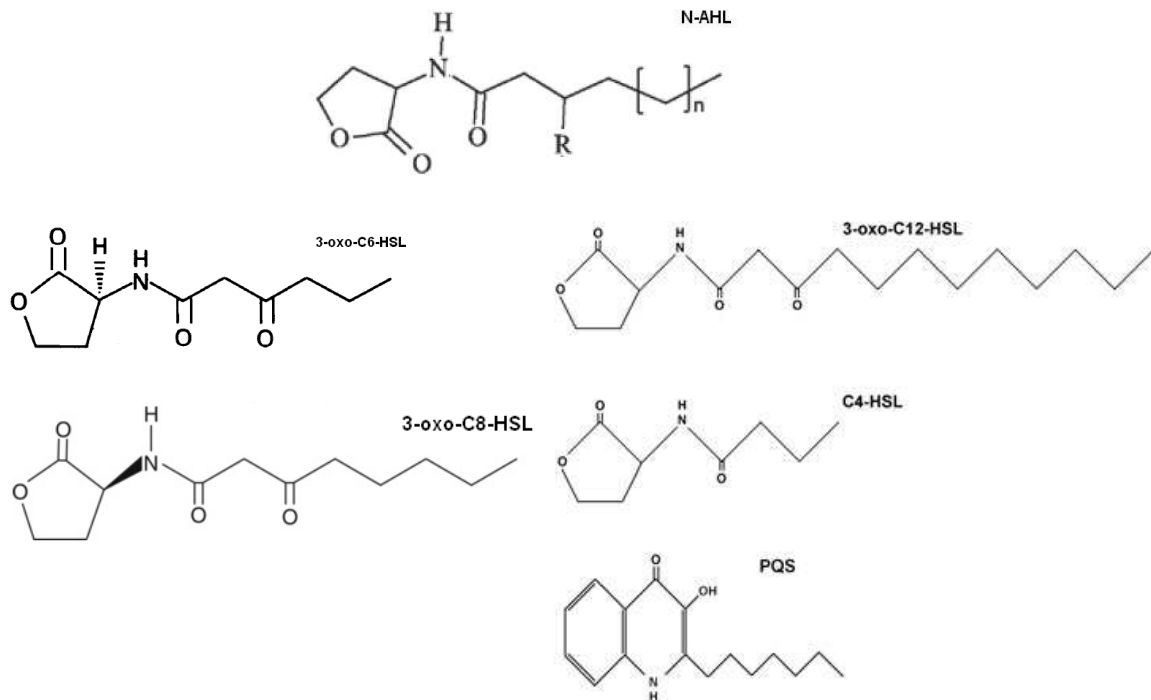


Εικόνα 3.3.1: Το μοντέλο QS στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. AHL synthase: συνθάση λακτονών της ομοσερίνης, R: ρυθμιστική πρωτεΐνη, R+AHL: μεταγραφικός παράγοντας (Czajkowski *et al.*, 2009)

Η πρώτη φορά που βιβλιογραφικά αναφέρθηκε ένας τέτοιος μηχανισμός ήταν στο *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). Σε αυτό, το αρνητικό κατά Gram συμβιωτικό βακτήριο ιχθύων, η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού γίνεται μέσω του

συστήματος LuxR/LuxI και ελέγχει την έκφραση των γονιδίων βιοφωταύγειας του βακτηρίου. Παρόμοιο είναι και το σύστημα το οποίο απαντάται στα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει δύο στοιχεία: μια συνθάση λακτονών της ομοσερίνης (AHL synthase), η οποία είναι υπεύθυνη για την έκφραση AHL, και μια ρυθμιστική πρωτεΐνη (R) η οποία ενεργοποιείται από τις AHL και έτσι επάγει την έκφραση ορισμένων γονιδίων (**Εικόνα 3.3.1**). Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης R γίνεται με την πρόσδεσή της με μόρια AHL. Το σύμπλοκο R+AHL έχει την κατάλληλη στερεοδομή για να αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένες περιοχές (συνήθως με μεταγραφικούς υποκινητές γονιδίων) του γονιδιωματικού DNA, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων και διαδραματίζοντας τον ρόλο ενός μεταγραφικού παράγοντα (Czajkowski *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.3.2: Διάφοροι τύποι μοριακών σημάτων στο σύστημα QS.

Στον γενικό τύπο λακτόνων της ομοσερίνης N-AHL (N-άκυλο λακτόνη της ομοσερίνης) το R αποτελεί μια υποκατάσταση (-H, -OH, =O) στο τρίτο άτομο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας και n είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα της αλυσίδας ο οποίος κυμαίνεται από 1-9 (Juhas *et al.*, 2005). Έτσι για n=1 προκύπτει το μόριο C4-HSL (N-butanoyl-homoserine lactone), για n=3 προκύπτει το μόριο 3-oxo-C6-HSL (N-3-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone), για n=5 προκύπτει το μόριο 3-oxo-C8-HSL (N-3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone) και για n=9 προκύπτει το μόριο 3-oxo-C12-HSL (N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone). Το PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) αποτελεί ένα σήμα κινολόνης, το οποίο δεν ανήκει στα σήματα AHL αλλά σε μια άλλη κατηγορία, και απαντάται στο παθογόνο *Ps. aeruginosa*.

Η ύπαρξη ενός τέτοιου συστήματος έχει διαπιστωθεί σε πολλά βακτήρια είτε παθογόνα, είτε βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης. Στα φυτοπαθογόνα (*Erwinia chrysanthemi*, *E. stewartii*, *E. carotovora*) αλλά και στα παθογόνα του ανθρώπου βακτήρια (*Ps. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*) το σύστημα QS παίζει ρόλο στην επαγωγή γονιδίων παθογένειας (Juhás *et al.*, 2005). Στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* το σύστημα QS έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την ενεργοποίηση του συζευκτικού συστήματος μεταφοράς του πλασμιδίου Ti (Carlier *et al.*, 2003). Σε βακτήρια τα οποία αποτελούν βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης (*Ps. aureofaciens*, *Ps. fluorescens*, *Ps. chlororaphis*) το σύστημα ρυθμίζει την παραγωγή αντιβιοτικών, σιδηροφόρων, πτητικών ουσιών, αλλά και λυτικών ενζύμων.

Στο βακτήριο *Ps. aeruginosa* έχουν βρεθεί δύο συστήματα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού πυοκυανίνη, γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την δημιουργία βιοφίλμ, αλλά και διάφορων πρωτεασών, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου. Τα δύο συστήματα ακολουθούν το παραπάνω μοντέλο και χρησιμοποιούν τα μόρια C4-HSL και 3-oxo-C12-HSL ως μοριακά σήματα (**Εικόνα 3.3.2**). Τελευταία (Déziel *et al.*, 2004) μελετήθηκε και ένα τρίτο σύστημα QS στο βακτήριο αυτό, το οποίο χρησιμοποιεί ως μοριακά σήματα μόρια HAQ (υδροξύ αλκυλκινολονες), και πιο συγκεκριμένα το PQS (**Εικόνα 3.3.2**). Το σύστημα αυτό ελέγχει και ελέγχεται από τα προηγούμενα δύο, περιπλέκοντας έτσι τα χαρακτηριστικά παθογένειας του βακτηρίου (Juhás *et al.*, 2005).

Έχει παρατηρηθεί, πολλές φορές, ότι τα ίδια μοριακά σήματα AHL χρησιμοποιούνται από διαφορετικά βακτήρια προκειμένου αυτά να επιτελέσουν διαφορετικές διεργασίες. Ένα τέτοιο μόριο είναι το 3-oxo-C6-HSL (**Εικόνα 3.3.2**). Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Erwinia carotovora* χρησιμοποιεί το μόριο αυτό ως σήμα για την επαγωγή της έκφρασης του αντιβιοτικού καρμπαπενέμ (Bainton *et al.*, 1992), ενώ ο βιολογικός παράγοντας καταπολέμησης *Ps. aureofaciens* 30-84 χρησιμοποιεί το ίδιο μόριο ως σήμα, σε ένα σύστημα QS, επάγοντας την έκφραση του αντιβιοτικού φεναζίνη. Κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση ενός είδους επικοινωνίας μεταξύ των ετερόκλιτων μικροβιακών πληθυσμών που βρίσκονται στο περιβάλλον.

- οι παράγοντες σ

Οι παράγοντες σ αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες για τα προκαρυωτικά συστήματα. Ο τύπος παραγόντων σ καθώς και ο ρόλος των γονιδίων των οποίων την έκφραση επάγουν ποικίλει, από βακτήριο σε βακτήριο. Χαρακτηριστικό του κάθε παράγοντα σ είναι το μοριακό βάρος του, το οποίο αναγράφεται ως εκθέτης. Με βάση το μοριακό τους βάρος οι παράγοντες σ έχουν διακριθεί σε 8 διαφορετικές ομάδες, οι οποίες έχουν διαφορετικές λειτουργίες μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Pf5 ο μεταγραφικός παράγοντας σ^S , ο οποίος εκφράζεται από το γονίδιο *rpoS*, προσδίδει ιδιότητες βιολογικού παράγοντα στο στέλεχος αυτό (Sarniguet *et al.*, 1995). Ο παράγοντας σ^S , ο οποίος λόγω του μοριακού του βάρους ονομάστηκε και σ^{38} , σχετίζεται με τη βιοσύνθεση τριών αντιβιοτικών στο βακτήριο *Ps. fluorescens* Pf5. Κατά τη μελέτη αυτή δημιουργήθηκε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος το οποίο δεν είχε την ικανότητα να παράγει το αντιβιοτικό πυρρολιντρίνη, ενώ παρουσίαζε υπερπαραγωγή των αντιβιοτικών πυλουτεορίνη και φλορογλουκινόλη. Το μεταλλαγμένο στέλεχος αυτό, το οποίο έφερε ένθεση του μεταθετού στοιχείου μέσα στο γονίδιο *rpoS*, εμφάνιζε μειωμένη ικανότητα καταπολέμησης τήξεων, που προκαλούνται από τον μύκητα *P. ultimum*.

Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0 έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας σ^{70} , ο οποίος εκφράζεται από το γονίδιο *rpoD*, σχετίζεται με τη βιοσύνθεση δύο αντιβιοτικών (Schnider *et al.*, 1995a). Κατά τη μελέτη αυτή, το γονίδιο *rpoD* ενισχύθηκε με PCR από το γονιδίωμα του *Ps. fluorescens* και κατόπιν έγινε εισαγωγή του στο στέλεχος CHA0 το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή των αντιβιοτικών πυλουτεορίνη και φλορογλουκινόλη. Προσπάθειες να δημιουργηθούν μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έφεραν απενεργοποιημένο το γονίδιο αυτό απέβησαν άκαρπες μιας και τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν ήταν βιώσιμα. Το γεγονός αυτό οδήγησε τους ερευνητές να συμπεράνουν ότι το γονίδιο αυτό ήταν απαραίτητο στο βακτήριο, δεδομένου ότι και εμπλέκεται στη ρύθμιση άλλων λειτουργιών εκτός από την έκφραση των αντιβιοτικών.

Μεταγενέστερα, στο ίδιο βακτηριακό στέλεχος ανακαλύφθηκε (Perchy-Tarr *et al.*, 2005) ότι υπάρχει ακόμα ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ονομάστηκε σ^{54} και εμπλέκεται στη ρύθμιση της παραγωγής των αντιβιοτικών. Ο παράγοντας σ^{54} , ο οποίος εκφράζεται από το γονίδιο *rpoN*, είναι υπεύθυνος για

την υπερέκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης της πυολουτεορίνης και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων της φλορογλουκινόλης. Από τις μελέτες που έχουν γίνει στο γένος *Pseudomonas* (Sarnigeut *et al.*, 1995; Schnider *et al.*, 1995; Perchy-Tarr *et al.*, 2005) γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν ποικιλοτρόπως την έκφραση των αντιβιοτικών, καθιστώντας τους βιολογικούς παράγοντες ένα πολύπλοκο αλλά πολύ ενδιαφέρον σύστημα.

Στο βακτήριο *Bacillus subtilis* βρέθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας σ^x , ο οποίος εκφράζεται από το γονίδιο *sigX*, σχετίζεται με τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού σαμπλανσίνη (sublancin). Στο βακτήριο αυτό βρέθηκαν 7 παράγοντες σ , τρεις από τους οποίους εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και δύο (σ^x , σ^M) οι οποίοι εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού σαμπλανσίνη, σε διαφορετικό βαθμό ο καθένας. Μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έφεραν μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο *sigX* είτε στο *sigM* έχαναν σε μεγάλο ποσοστό την ικανότητα βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού αυτού, ενώ στελέχη τα οποία έφεραν μεταλλάξεις και στα δύο αυτά γονίδια ήταν ανίκανα να βιοσυνθέσουν το αντιβιοτικό (Yun *et al.*, 2009).

- μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GntR

Η οικογένεια των GntR μεταγραφικών παραγόντων αποτελείται από 2000 πρωτεΐνες, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 239 μέχρι 254 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακό βάρος περίπου 27kD. Η οικογένεια GntR έχει διαχωριστεί σε τέσσερις μεγάλες υποοικογένειες (FadR, HutC, MocR και YtrA). Η κατηγοριοποίηση στις επιμέρους οικογένειες έχει γίνει με κριτήριο το μόριο που χρησιμοποιείται ως ενεργοποιητής ή απενεργοποιητής από κάθε παράγοντα. (Tropel *et al.*, 2004).

Στο καρβοξυτελικό άκρο του κάθε μεταγραφικού παράγοντα απαντάται η περιοχή με την οποία αλληλεπιδρά το μόριο ενεργοποιητής-απενεργοποιητής, ενώ στο αμινοτελικό άκρο απαντάται ένα συντηρημένο μοτίφ έλικας-στροφή-έλικας (HTH), με το οποίο επιτυγχάνεται η πρόσδεση του παράγοντα στο DNA. Στην υποοικογένεια FadR κατατάσσονται μεταγραφικοί καταστολείς για τους οποίους το μόριο απενεργοποιητής είναι το γλυκονικό οξύ και συνήθως ο τρόπος της μεταγραφικής ρύθμισης είναι παρόμοιος του γονιδίου *lacI* (Gorelic *et al.*, 2006).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GntR έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων τα οποία επιτελούν ένα ευρύ

φάσμα λειτουργιών (καταβολισμό σακχάρων και λιπαρών οξέων, βιοσύνθεση αμινοξέων και βιταμινών, αντιγραφή πλασμιδίων, γονίδια Lux) (Rigalli *et al.*, 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι, σε διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων, τέτοιοι παράγοντες εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αντιβιοτικών, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων που τα βιοσυνθέτουν (Gorelic *et al.*, 2006).

Ο πρώτος παράγοντας GntR, ο οποίος μελετήθηκε στο βακτήριο *Bacillus subtilis*, βρέθηκε ότι ελέγχει την έκφραση γονιδίων καταβολισμού της γλυκόζης στο μεταβολικό μονοπάτι Entner-Doudoroff (Haydon and Guest, 1991). Μεταγενέστερα, το ίδιο ακριβώς βρέθηκε ότι ισχύει και στο στέλεχος *E.coli* K-12 (Izu *et al.*, 1997). Απουσία γλυκονικού ο παράγοντας GntR είναι ενεργός και δεσμεύεται με την περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή των γονιδίων *gntK* και *gntU*, καταστέλλοντας έτσι την έκφρασή τους, ενώ παρουσία γλυκονικού ο παράγοντας αυτός απενεργοποιείται, με συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης (Tong *et al.*, 1996).

Στο βακτήριο *Streptomyces coelicolor* ο μεταγραφικός παράγοντας *agl3R*, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των GntR, καταστέλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών και του εκκριτικού συστήματος ABC. Όταν το βακτήριο αυτό αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης ο μεταγραφικός παράγοντας *agl3R* απενεργοποιείται με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων (Hillerich *et al.*, 2006). Ακόμα μια μελέτη στο στέλεχος *Streptomyces coelicolor* M145 έχει αποδείξει ότι ο παράγοντας DasR, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των GntR, ελέγχει την παραγωγή του αντιβιοτικού ακτινοροδίνης (actinorhodin), καταστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού απουσία N-ακετύλογλυκοζαμίνης στο μέσο ανάπτυξης (Rigalli *et al.*, 2008).

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των GntR, είναι δυνατόν να μην καταστέλλουν αλλά να επάγουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών. Στο βακτήριο *Serratia sp.* ATCC 39006 ο μεταγραφικός παράγοντας PigT, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των GntR, επάγει την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού προντιζιοσύνης. Παρουσία γλυκονικού οξέος στο μέσο ανάπτυξης, ο μεταγραφικός παράγοντας PigT απενεργοποιείται με αποτέλεσμα την καταπολέμηση της έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης της προντιζιοσύνης (Fineran *et al.*, 2005).

1.3.3.2. Εξωγενείς παράγοντες

Στους εξωγενείς παράγοντες εντάσσονται οι παρακάτω:

- θερμοκρασία

Μια από τις πρώτες έρευνες, που αναδεικνύει την σημασία της θερμοκρασίας στην παραγωγή αντιβιοτικών, είναι αυτή των Luis *et al.*, (1972). Το βακτήριο *Ps. reptilonora*, το οποίο απομονώθηκε από φυτικού ιστούς, εμφανίζει ιδιότητες βιολογικού παράγοντα καταστέλλοντας παθογόνα βακτήρια των γενών *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Mycobacterium*. Η ικανότητα καταπολέμησης των παθογόνων αυτών αποδόθηκε σε παραγωγή αντιβιοτικών από το στέλεχος *Ps. reptilonora* τα οποία εμφάνιζαν το μέγιστο της παραγωγής τους σε θερμοκρασίες 28-30 °C. Σε θερμοκρασίες κάτω από 22°C η παραγωγή αντιβιοτικών μειωνόταν, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 34°C οι ερευνητές δεν ανίχνευσαν καμία παραγωγή αντιβιοτικών.

Έχει παρατηρηθεί (Shanahan *et al.*, 1992) ότι η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσεται ο βιολογικός παράγοντας *Ps. fluorescens* F113 επηρεάζει την παραγωγή του αντιβιοτικού 2,4-Διακετυλοφλορογλουκινόλη (DAPG). Η μέγιστη παραγωγή του αντιβιοτικού αυτού σημειώθηκε όταν η θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους F113 ήταν κοντά στους 12°C. Αντιθέτως, ελάχιστη έως και μηδαμινή ήταν η παραγωγή του αντιβιοτικού αυτού όταν η θερμοκρασία επώασης ήταν στους 37°C.

Ο παράγοντας θερμοκρασία έχει παρατηρηθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αντιβιοτικών, όχι μόνο στις ψευδομονάδες αλλά και, σε πολλά άλλα γένη βακτηρίων. Στο βακτήριο *Streptomyces thermoviolaceus* η παραγωγή του αντιβιοτικού γκρανατισίνη εξαρτάται από την θερμοκρασία επώασης (James *et al.* 1991). Η παραγωγή γκρανατισίνης φαίνεται να φτάνει στο μέγιστο όταν η επώαση του βακτηρίου γίνει σε χημειοστάτη και η θερμοκρασία επώασης είναι 50°C.

Το στέλεχος *Streptomyces hygroscopicus* 5008 έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού βαλινταμυκίνη A (validamycin) το οποίο καταστέλλει το παθογόνο *Rhizoctonia solani* (Zhong *et al.*, 2009). Η βιοσύνθεση βαλινταμυκίνης (validamycin) A ελέγχεται από 8 γονίδια τα οποία είναι οργανωμένα σε τρία διαφορετικά οπερόνια *valABC*, *valKLMN* και *valG*. Η έκφραση και των τριών οπερονίων επάγεται στον μέγιστο βαθμό όταν η

θερμοκρασία επώασης είναι 35-37°C, ενώ όταν η θερμοκρασία επώασης ρυθμιστεί κάτω από τους 28°C η βιοσύνθεση του αντιβιοτικού σταματά. Η επαγωγή της βιοσύνθεσης της βαλινταμυκίνης στους 37°C αποδόθηκε στην αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων και στην αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων βιοσύνθεσης.

Από τη μελέτη αυτή, γίνεται αντιληπτό ότι η βαλινταμυκίνη Α δεν είναι δυνατόν να παράγεται κάτω από τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στη ριζόσφαιρα. Έτσι, το ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί στην παραγωγή του αντιβιοτικού μετά από καλλιέργεια σε χημειοστάτη. Σε ένα τέτοιο σύστημα η ρύθμιση της θερμοκρασίας επώασης, όπως και διάφορων άλλων παραμέτρων, αποκτά ιδιαίτερη σημασία μιας και έτσι είναι δυνατόν να επιτευχθεί αύξηση της παραγωγής του αντιβιοτικού για επιστημονικές αλλά και εμπορικές εφαρμογές.

Η θερμοκρασία δεν επηρεάζει μόνο την παραγωγή αντιβιοτικών στα βακτήρια αλλά και στους μύκητες που παρουσιάζουν ιδιότητες βιολογικού παράγοντα καταπολέμησης. Σε έρευνα (Tronsmo *et al.*, 1978) αποδείχτηκε ότι η παραγωγή αντιβιοτικών από διάφορα είδη του γένους *Trichoderma* συμβαίνει σε χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 5°C).

- pH

Έχει αποδειχθεί, από πολλές μελέτες, ότι το pH μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα των αντιβιοτικών που παράγονται από τα διάφορα στελέχη των βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης. Είναι δυνατόν όμως, εκτός από την δραστηριότητα, να επηρεάσει την παραγωγή των αντιβιοτικών (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Σε μελέτη που έγινε (Georgakopoulos *et al.*, 1994) αποδείχθηκε ότι το pH του μέσου ανάπτυξης επηρεάζει τη βιοσύνθεση φεναζίνης από το βακτήριο *Ps. aureofaciens* PGS12. Στο στέλεχος αυτό βρέθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης φεναζίνης ελαττώνεται όταν το μέσο ανάπτυξης έχει pH=5. Σε pH από 6 έως 8,5 η έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης φεναζίνης, στο στέλεχος αυτό, παραμένει σταθερή.

Στο βακτήριο *Ps. fluorescens* 2-79 η έκφραση του αντιβιοτικού φεναζίνης PCA (phenazine 1 carboxylic acid) εξαρτάται από το pH του μέσου ανάπτυξης (Ownley *et al.*, 1992). Κατά τη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι, ενώ δραστηριότητα του αντιβιοτικού παραμένει αναλλοίωτη σε ένα εύρος pH από 4,9 έως 8, η κατασταλτική δράση του βακτηρίου αυτού έναντι του μύκητα *Gaeumannomyces*

triticici παρουσιάζει μεταβολές. Η κατασταλτική δράση που παρουσιάζει το στέλεχος 2-79 εμφανίζει το μέγιστό της σε pH=6, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αυτή την τιμή pH η παραγωγή του αντιβιοτικού μεγιστοποιείται.

Μελέτη (Muhamad *et al.*, 2009) πάνω σε στελέχη βακίλων έχει αποδείξει ότι η παραγωγή αντιβιοτικών ελέγχεται και στο γένος αυτό από το pH του μέσου ανάπτυξης. Το στέλεχος *B. specie* SAT-4 εμφανίζει το μέγιστο της παραγωγής αντιβιοτικών σε pH=5 και το ελάχιστο σε pH=9.

- πηγές άνθρακα και ανόργανα άλατα

Οι βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα ή στην φυλλόσφαιρα χρησιμοποιώντας ως τροφή πολλές από τις φυτικές εκκρίσεις. Η παρουσία τέτοιων ενώσεων στο μέσο ανάπτυξής τους, κατά την καλλιέργειά τους *in vitro*, είναι δυνατόν να επηρεάσει το μεταβολισμό τους και ποιο συγκεκριμένα να επηρεάσει τη έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αντιβιοτικών (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Στο στέλεχος *Bacillus cereus* UW85 η παραγωγή του αντιβιοτικού κανοσαμίνη βρέθηκε ότι τριπλασιάζεται όταν ως μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα μηδικής, αποδεικνύοντας την αμεσότητα της σχέσης που έχουν τα φυτά με τους βιολογικούς παράγοντες. Ακόμα στο στέλεχος αυτό η παραγωγή του αντιβιοτικού αυξανόταν κατά δώδεκα φορές όταν το θρεπτικό μέσο είχε εμπλουτιστεί με άλατα σιδήρου. Αντίθετα, η παραγωγή κανοσαμίνης ελαττωνόταν κατά τέσσερις φορές όταν στο θρεπτικό μέσο γινόταν προσθήκη φωσφορικών αλάτων. Τέλος, στη μελέτη αυτή το στέλεχος UW85 επώαστηκε σε θρεπτικά μέσα τα οποία περιείχαν σάκχαρα, ως πηγή άνθρακα, και κατόπιν εκτιμήθηκε η παραγωγή του αντιβιοτικού. Αύξηση της παραγωγής παρατηρήθηκε μόνο όταν ως μοναδική πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη, ενώ μείωση παρατηρήθηκε για τη σουκρόζη και τη μαλτόζη (Milner *et al.*, 1996).

Στο βακτήριο *B. specie* SAT-4 (Muhamad *et al.*, 2009) η παραγωγή αντιβιοτικών διπλασιάστηκε είτε όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη 2%(w/v) ως μοναδική πηγή άνθρακα, είτε όταν χρησιμοποιήθηκε γλουταμινικό οξύ 1,5%(w/v) ως πηγή αζώτου. Τα ευρήματα των παραπάνω δυο ερευνών (Milner *et al.*, 1996; Muhamad *et al.*, 2009) συμφωνούν ως προς την αύξηση της παραγωγής αντιβιοτικών από το γένος *Bacillus* μετά από επώαση με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη.

Με τη μελέτη των Milner *et al.* (1996), ως προς τα φωσφορικά, συμφωνεί ακόμα μια μελέτη, η οποία έχει γίνει στο γένος *Pseudomonas*. Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0 η παραγωγή του αντιβιοτικού 2,4-Διακετυλοφλορογλουκινόλη (DAPG) μειώνεται με την προσθήκη φωσφορικών αλάτων στο μέσο ανάπτυξης (Duffy *et al.*, 1999). Είναι πιθανό, λοιπόν, η χρήση φωσφορικών λιπασμάτων να μειώνει τις ευεργετικές ιδιότητες των αυτόχθονων παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης και να ευνοεί την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων.

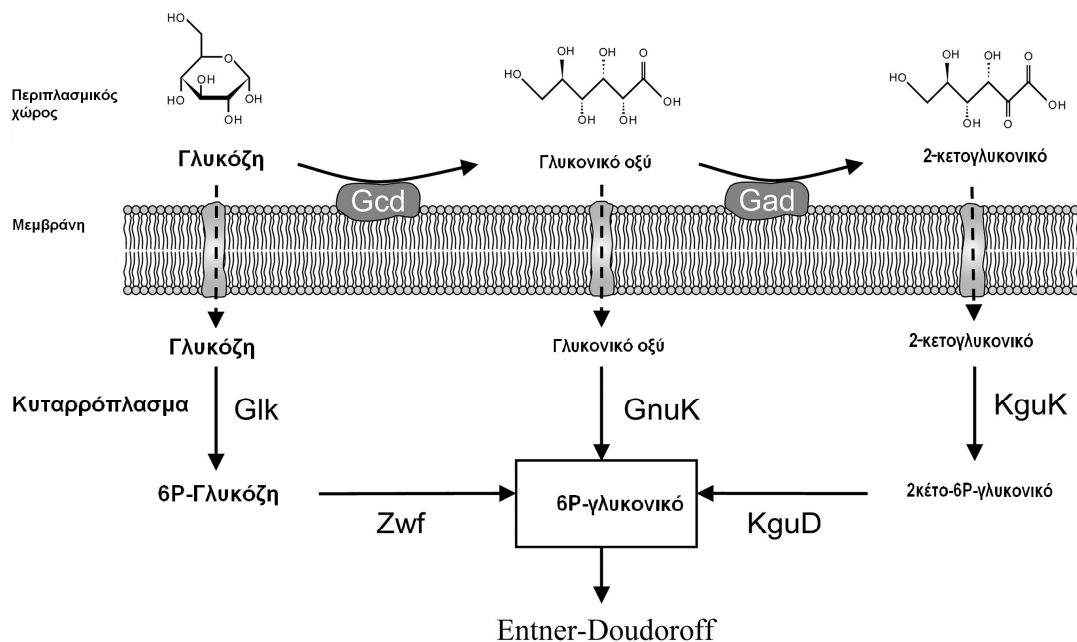
Σε άλλη μελέτη (Shanahan *et al.*, 1992) αποδείχθηκε ότι η παραγωγή DAPG, από τον βιολογικό παράγοντα *Ps. fluorescens* F113, εξαρτάται από συγκεκριμένα σάκχαρα. Έτσι, όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε με μοναδική πηγή άνθρακα γλυκόζη ή σορβόλη η παραγωγή του αντιβιοτικού μειωνόταν, ενώ αντίθετα όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε με μοναδική πηγή άνθρακα τα σάκχαρα σουκρόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη, φρουκτόζη ή τα αμινοξέα ασπαραγίνη και γλουταμινικό οξύ η παραγωγή του αντιβιοτικού ήταν από 1 έως 5 φορές μεγαλύτερη. Σε αντίθεση με το *Ps. fluorescens* F113, στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0 η παραγωγή του DAPG αυξάνεται, ενώ η παραγωγή πυολουτεορίνης (PLT) μειώνεται όταν ως μοναδική πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται γλυκόζη (Duffy *et al.*, 1999).

Το γεγονός ότι η γλυκόζη εμπλέκεται στην παραγωγή των αντιβιοτικών στο στέλεχος CHA0, οδήγησε δύο επιστημονικές ομάδες στη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών στα οποία η βιοσύνθεση των αντιβιοτικών είναι ανεξάρτητη της παρουσίας γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης. Στην πρώτη μελέτη (Schnider *et al.*, 1995b), προκλήθηκε μετάλλαξη με ένθεση σε ένα από τα γονίδια βιοσύνθεσης της πυρολοκινολινκινόνης (PQQ). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή της PLT από το μεταλλαγμένο στέλεχος ακόμα και όταν το στέλεχος επωαζόταν παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης. Στη δεύτερη μελέτη (de Werra *et al.*, 2009), δημιουργήθηκε μεταλλαγμένο στέλεχος το οποίο φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την αφυδρογονάση της γλυκόζης (*gcd*). Ως συνέπεια αυτού ήταν η υπερπαραγωγή PLT από το μεταλλαγμένο στέλεχος ακόμα και όταν αυτό αναπτυσσόταν παρουσία γλυκόζης.

Σε πρόσφατη επιστημονική μελέτη (de Werra *et al.*, 2009) υποστηρίζεται ότι αυτό που παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ρύθμιση της παραγωγής των αντιβιοτικών από το στέλεχος CHA0 είναι η συγκέντρωση του γλυκονικού οξέος και όχι της γλυκόζης. Οι ερευνητές, παρόλο που κατέληξαν στην παρατήρηση αυτή, δεν ήταν

σε θέση να εξηγήσουν τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο το γλυκονικό οξύ ρυθμίζει την παραγωγή των αντιβιοτικών στο στέλεχος αυτό.

Σύμφωνα με την τρέχουσα γνώση, η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* γίνεται με 3 τρόπους (Εικόνα 3.3.3). Τα μόρια της γλυκόζης που υπάρχουν στο μέσο ανάπτυξης είναι δυνατόν είτε να εισέλθουν κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα δια μέσου μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, είτε να αφυδρογονωθούν από τη δράση της Gcd σε γλυκονικό οξύ. Το γλυκονικό οξύ, στη συνέχεια, είτε θα αφυδρογονωθεί περαιτέρω από τη δράση της gad σε 2-κετογλυκονικό οξύ, είτε θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα δια μέσου μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Τα μόρια της γλυκόζης, του γλυκονικού και του 2-κετογλυκονικού οξέος, τα οποία έχουν εισέλθει στο κυτταρόπλασμα κυτταρόπλασμα δια μέσου διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, φωσφορυλιώνονται σε 6-φωσφορογλυκονικό οξύ και από εκεί εισέρχονται στον κύκλο των Entner-Doudoroff (James *et al.*, 1986; de Werra *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.3.3: Ο καταβολισμός της γλυκόζης στον περιπλασματικό και ενδοκυττάριο χώρο στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Δύο ένζυμα τα οποία είναι προσδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη, η αφυδρογονάση της γλυκόζης (Gcd) και η αφυδρογονάση του γλυκονικού (Gad), είναι τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στον καταβολισμό της γλυκόζης στον περιπλασματικό χώρο. Τα ένζυμα Glk (κινάση της γλυκόζης), GnuK (κινάση του γλυκονικού οξέος), KguK (κινάση του 2-κετογλυκονικού οξέος), Zwf (αφυδρογονάση της 6φώσφορο γλυκόζης), KguD (κινάση του 2-κετο6φωσφορογλυκονικού οξέος) εμπλέκονται στον ενδοκυττάριο καταβολισμό της γλυκόζης (de Werra *et al.*, 2009).

Οι τρέχουσες γνώσεις για τον ρόλο της γλυκόζης και του γλυκονικού οξέος δεν παρέχουν οποιαδήποτε πληροφορία ή ένδειξη ότι τα δύο αυτά μόρια αποτελούν πρόδρομα ή δομικά μόρια στη βιοσύνθεση κάποιου αντιβιοτικού. Όμως, σε ορισμένα στελέχη βιολογικών παραγόντων τα αυτά δύο μόρια εμπλέκονται με ένα έμμεσο τρόπο, στη βιοσύνθεση ορισμένων αντιβιοτικών μέσω του συστήματος των μεταγραφικών καταστολέων GntR.

Εκτός από τις περιπτώσεις στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι η γλυκόζη, και πιο συγκεκριμένα το γλυκονικό οξύ, εμπλέκονται στην απενεργοποίηση των GntR μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας έτσι έμμεσα τη βιοσύνθεση αντιβιοτικών, στα περισσότερα στελέχη παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης ο ρόλος-κλειδί των δύο αυτών μορίων δεν έχει μελετηθεί προς το παρόν. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να είναι είτε αρνητική (Shanahan *et al.*, 1992), έτσι ώστε να παρατηρείται μείωση της παραγωγής του αντιβιοτικού παρουσία γλυκόζης, είτε θετική με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή του αντιβιοτικού (Milner *et al.*, 1996; El-Banna, 2006; Muhamad *et al.*, 2009). Σε άλλες, πάλι, περιπτώσεις η παραγωγή του αντιβιοτικού εξαρτάται σε τόσο μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης ώστε να μην παρατηρείται παραγωγή του αντιβιοτικού παρά μόνο όταν ο μικροοργανισμός εφοδιάζεται με κάποια πηγή γλυκόζης (Gutterson *et al.*, 1986; James *et al.*, 1986; Gutterson *et al.*, 1988).

Η γλυκόζη, βέβαια, δεν αποτελεί το μοναδικό μόριο κλειδί για την βιοσύνθεση των αντιβιοτικών σε όλα τα γένη και είδη. Στο βακτήριο *Ps. fluorescens* S272 η παραγωγή των αντιβιοτικών PLT και DAPG είναι ανεξάρτητη της γλυκόζης (Nakata *et al.*, 1999). Η παραγωγή του DAPG από το στέλεχος S272 δωδεκαπλασιάστηκε ενώ η παραγωγή της PLT τετραπλασιάστηκε όταν στο μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου προστέθηκε 2% αιθανόλη. Ακόμα το βακτήριο αυτό βρέθηκε ότι διπλασιάζει την παραγωγή και των δύο αντιβιοτικών όταν στο θρεπτικό μέσο χορηγήθηκε NaCl σε συγκέντρωση 1,5%(w/v).

1.3.4. Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών βιολογικής καταπολέμησης στο γένος *Pseudomonas*

Τις τελευταίες 2 δεκαετίες έχουν απομονωθεί πάρα πολλά αντιβιοτικά από διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων. Για τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά αυτά έχει μελετηθεί ο τρόπος δράσης, η δομή και το βιοσυνθετικό μονοπάτι. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών οι οποίες

βιοσυντίθενται σε διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων του γένους *Pseudomonas*, το παθογόνο το οποίο έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν, την καλλιέργεια στην οποία παρατηρείται η βιολογική καταπολέμηση καθώς και τη χώρα στην οποία έχει απομονωθεί ο βιολογικός παράγοντας.

Πίνακας 3.4: αντιβιοτικά που παράγονται από παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης

Αντιβιοτικό	Μικροοργανισμός/στέλεχος	Παθογόνο	Ξενιστής/Προέλευση
Φλορογλουκινόλες (DAPG)	<i>Pseudomonas spp.</i>		
	Q2-87	<i>Ggt</i>	Σιτάρι/ ΗΠΑ
	CHA0	<i>Ggt, Tb, Pu</i>	Καπνός/Ελβετία
	F113	<i>Pu</i>	Ζαχαρότευτλο/Ιρλανδία
	PFM2	<i>St</i>	Σιτάρι/ ΗΠΑ
	Pf5	<i>Pu, Rs</i>	Βαμβάκι/Τέξας-ΗΠΑ
	Q8r1-96	<i>Ggt</i>	Σιτάρι/ ΗΠΑ
Φεναζίνες	<i>Pseudomonas spp.</i>		
	2-79RN10	<i>Ggt</i>	Σιτάρι/ ΗΠΑ
	In-b-109	<i>Rs, Gg</i>	Ρύζι/ Φιλιππίνες
	PCL1391	<i>Fo</i>	Ντομάτα/ Ισπανία
	PNA1	<i>Fo, Ps</i>	Φασόλι/ Ινδία
	<i>Ps. aureofaciens</i> PGS12	<i>Fo</i>	Καλαμπόκι/Βέλγιο
	<i>Ps. aureofaciens</i> 30-24	<i>Ggt</i>	Σιτάρι/ Κάνσας, ΗΠΑ
Αερουτζίνη	<i>Ps. fluorescens</i> MM-B16	<i>Pc, Co</i>	Πιπεριά- Αγγούρι/Κορέα
Ωμοκίνη Α	<i>Ps. fluorescens</i> Hv37a	<i>Pu</i>	Κριθάρι/ ΗΠΑ
Πυολουτεορίνες	<i>Pseudomonas spp.</i>		
	Pf5	<i>Pu, Rs</i>	Βαμβάκι/ Τέξας, ΗΠΑ
	CHA0	<i>Tb, Pu</i>	Καπνός/ Ελβετία
Πυρρολινιτρίνες	<i>Ps. fluorescens</i> BL915	<i>Rs</i>	Βαμβάκι/ ΗΠΑ
	<i>B. cepacia</i> B37w	<i>Fs</i>	Πατάτα
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Bc, Rs</i>	Αμπέλι/ Ουζμπεκιστάν
	<i>Serratia spp.</i>	<i>Vd, Rs, Ss</i>	Ελαιοκράμβη

Ακολουθούν οι συντομογραφίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στον πίνακα αυτό: DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol, *At* – *Agrobacterium tumefaciens*, *Ggt* – *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Tb* – *Thielaviopsis basicola*, *Pu*, *Pythium ultimum*, *St* – *Septoria tritici*, *Rs* –

Rhizoctonia solani, *Fo* – *F. oxysporum*, *Gg* – *G. graminis*, *Ps* – *Pythium splendens*, *Fs* – *Fusarium sambucinum*, *Pt* – *Pyrenophora teres*, *Tc* – *Tilletia caries*, *Pc* – *Phytophthora cryptogea*, *Bc* – *Botrytis cinerea*, *Eh* – *Erwinia herbicola*, *Vd* – *Verticillium dahliae*, *Ss* – *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pc* – *Phytophthora capsici*, *Co* – *Colletotrichum orbiculare*. (Raaijmakers *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2006)

Όπως είναι δυνατό να παρατηρηθεί, τα είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης μιας μεγάλης πληθώρας αντιβιοτικών, τα οποία συνεισφέρουν στη βιολογική καταπολέμηση (Πίνακας 3.4). Αναλόγως του μονοπατιού βιοσύνθεσης του κάθε αντιβιοτικού και των ενζύμων τα οποία εμπλέκονται σε αυτό, τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις ομάδες (Gross *et al.*, 2009).

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει αντιβιοτικά στον οποίων το βιοσυνθετικό μονοπάτι εμπλέκονται μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες (Non-Ribosomal Peptide Synthases, NRPS). Οι NRPS συνθάσες είναι ενζυμικά σύμπλοκα η δομή, η λειτουργία και η ρύθμιση της έκφρασης των οποίων θα αναλυθεί σε παρακάτω παραγράφους (§1.4.2 και §1.4.3). Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται τα αντιβιοτικά αερουτζίνη, σαφρασίνη και πυρρολιντρίνη, κάποιες τοξίνες (μανγκοτοξίνη, ταμπτοξίνη, φασεολοτοξίνη), ορισμένα σιδηροφόρα (πυοχελίνες, πυοβερντίνες) καθώς και κάποια λιποπεπίδια, τα οποία εμφανίζουν είτε φυτοτοξική δράση είτε αντιβιοτική δράση και θα αναλυθούν εκτενέστερα στο κεφάλαιο 1.4 (Gross *et al.*, 2009).

Στη δεύτερη ομάδα κατατάσσονται αντιβιοτικά στη βιοσύνθεση των οποίων εμπλέκονται πολυκετιδικές συνθάσες (Polyketide Synthases, PKS) ή συνθάσες λιπαρών οξέων (Fatty Acids Synthases, FAS). Οι συνθάσες αυτές αποτελούνται από τρεις βασικές λειτουργικές περιοχές: α) η πρώτη περιοχή έχει τη λειτουργία μιας AT (ακυλοτρανσφεράση) ή ACP (περιοχή θειοεστεροποίησης ακυλομάδων) β) στη δεύτερη περιοχή είναι δυνατόν να υπάρχουν μία ή περισσότερες από τις παρακάτω λειτουργίες: KS (κετοσυνθάση), DH (αφυδατάση), ER (ενόυλορεδουκτάση), KR (κετορεδουκτάση), MT (μεθυλοτρανσφεράση), SH (σουλφο-υδρολάση) και γ) η τρίτη περιοχή έχει τη λειτουργία μιας TE (θειοεστεράση). Στην ομάδα αυτή κατατάσσεται το αντιβιοτικό DAPG και το σιδηροφόρο ψευδομονικό οξύ (Gross *et al.*, 2009).

Η τρίτη ομάδα αποτελείται από αντιβιοτικά τα οποία προέρχονται από τη συνδυαστική δράση NRPS και PKS συνθετασών. Εδώ ανήκει το αντιβιοτικό πυολουτεορίνη καθώς και κάποιες φυτοτοξικές ενώσεις (συριγκολίνες, κορονατίνη και πεδερίνες). Τέλος, στην τέταρτη ομάδα βρίσκονται τα αντιβιοτικά φεναζίνες,

κινολόνες αλλά και το υδροκυάνειο. Η βιοσύνθεση των αντιβιοτικών της ομάδας αυτής είναι ανεξάρτητη από τις συνθάσες NRPS και PKS (Gross *et al.*, 2009).

Στα επόμενα κεφάλαια θα αναπτυχθούν οι τρέχουσες γνώσεις για την βιοσύνθεση και τον ρόλο ορισμένων από τις παραπάνω ομάδες αντιβιοτικών, οι οποίες απαντώνται στο γένος *Pseudomonas*.

1.3.5. Φλορογλουκινόλες

Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται ενώσεις οι οποίες περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο στο μόριό τους. Οι ενώσεις αυτές είναι είτε φυτικής είτε βακτηριακής προέλευσης και εμφανίζουν αντιϊκή, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να είναι φυτοτοξικές (Bangera *et al.*, 1999).

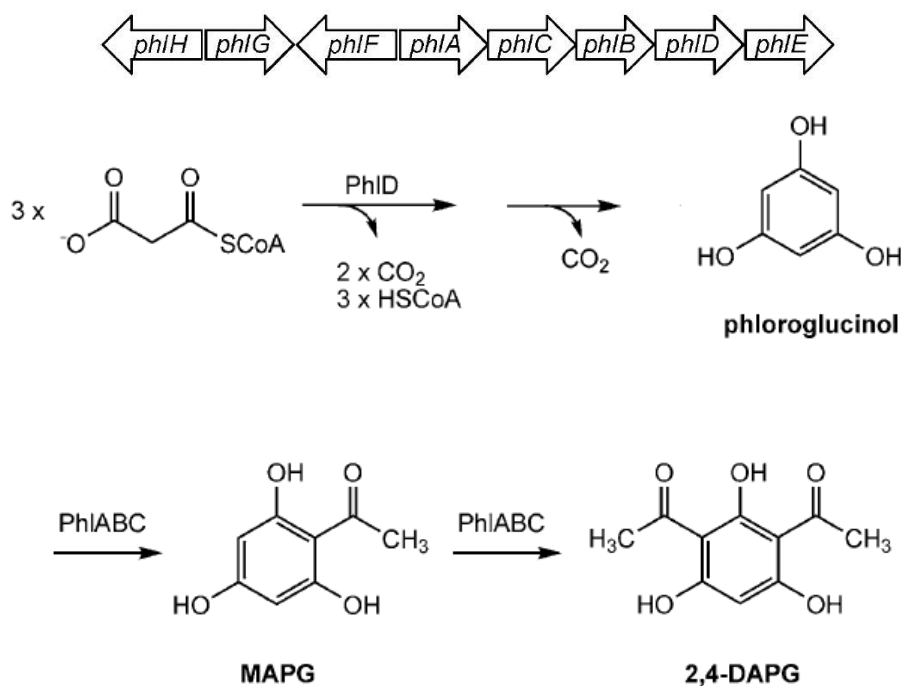
Στις φλορογλουκινόλες ανήκει το αντιβιοτικό 2,4-διακετυλοφλορογλουκινόλη (DAPG) (Εικόνα 3.5.1) το οποίο έχει παρατηρηθεί μόνο σε στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Στην αντιμικροβιακή δράση του DAPG αποδίδεται το μεγάλο ενδιαφέρον το οποίο έχει αποκτήσει το γένος *Pseudomonas* στην βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων εδάφους, όπως στελέχη των γενών *Pythium*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces* και *Thielaviopsis* (Delany *et al.*, 2000).

Ο τρόπος δράσης του DAPG δεν είναι ακόμα πλήρως μελετημένος. Φαίνεται ότι το DAPG εμπλέκεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παρεμποδίζοντας την λειτουργία των μιτοχονδρίων, και μεταβάλλει τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς όμως να έχει λυτική δράση. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι το DAPG είναι ικανό να επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα σε φυτά (Ramos, 2004).

Τα γονίδια τα οποία ευθύνονται για τη βιοσύνθεση του DAPG βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο με μέγεθος 6.5kb (*phlABCD*). Το οπερόνιο αυτό είναι συντηρημένο μεταξύ των στελεχών του γένους *Pseudomonas* τα οποία έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού και αποτελείται από τέσσερα γονίδια (*phlA*, *phlB*, *phlC*, και *phlD*). Σε διάφορα στελέχη του γένους έχουν βρεθεί ακόμα τρία γονίδια (*phlE*, *phlG*, και *phlH*) τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων του οπερονίου *phlABCD* (Gross *et al.*, 2009).

Στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του DAPG (Εικόνα 3.5.1), το γονίδιο *phlD* κωδικοποιεί μια πολυκετιδική συνθάση τύπου III (type III PKS) ή αλλιώς συνθάση της χαλκόνης (chalcone synthase), η οποία καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης τριών μορίων μηλόφυλλο-συνενζύμου A, και ακολουθούμενη από μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης έχει ως τελικό προϊόν την φλορογλουκινόλη. Στη συνέχεια, τα

γονίδια *phlA*, *phlC* και *phlB* κωδικοποιούν μια β-κετοακυλο-άκυλο συνθάση, μια θειολάση και μια πρωτεΐνη-μεταφορέα ακυλομάδων αντίστοιχα. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την τρανσακετυλίωση της φλορογλουκινόλης σε MAPG (monoacetylphloroglucinol) και στη συνέχεια του MAPG σε DAPG. Ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση αυτή, δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί (Ramos, 2004).



Εικόνα 3.5.1 : Η οργάνωση της γονιδιωματικής περιοχής και ο ρόλος των γονιδίων *phlA*, *phlB*, *phlC*, και *phlD* στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του DAPG. MAPG: μονοακέτυλοφλορογλουκινόλη, DAPG: 2,4-διακέτυλοφλορογλουκινόλη (Gross *et al.*, 2009).

Κατωφερικά του οπερονίου *phlABCD* βρίσκεται το γονίδιο *phlE* (Εικόνα 3.5.1), το οποίο κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-μεταφορέα. Η θέση του *phlE* στη γονιδιωματική αυτή έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί σχετίζεται με τη μεταφορά του αντιβιοτικού από και προς το κύτταρο. Μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν είχαν την ικανότητα να εκφράζουν την πρωτεΐνη PhlE παρουσίαζαν 50% μειωμένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο εξωκυττάριους χώρους. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στο σύστημα μεταφοράς του DAPG εμπλέκονται και άλλοι εκτός από την PhlE. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με την ανθεκτικότητα και την αντοχή του βακτηρίου σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης (Ramos, 2004).

Η βιοσύνθεση του DAPG ελέγχεται σε μεταγραφικό αλλά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό καθιστά τα βακτήρια του γένους

Pseudomonas ικανά να προσαρμόζονται ταχύτατα στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (Ramos, 2004).

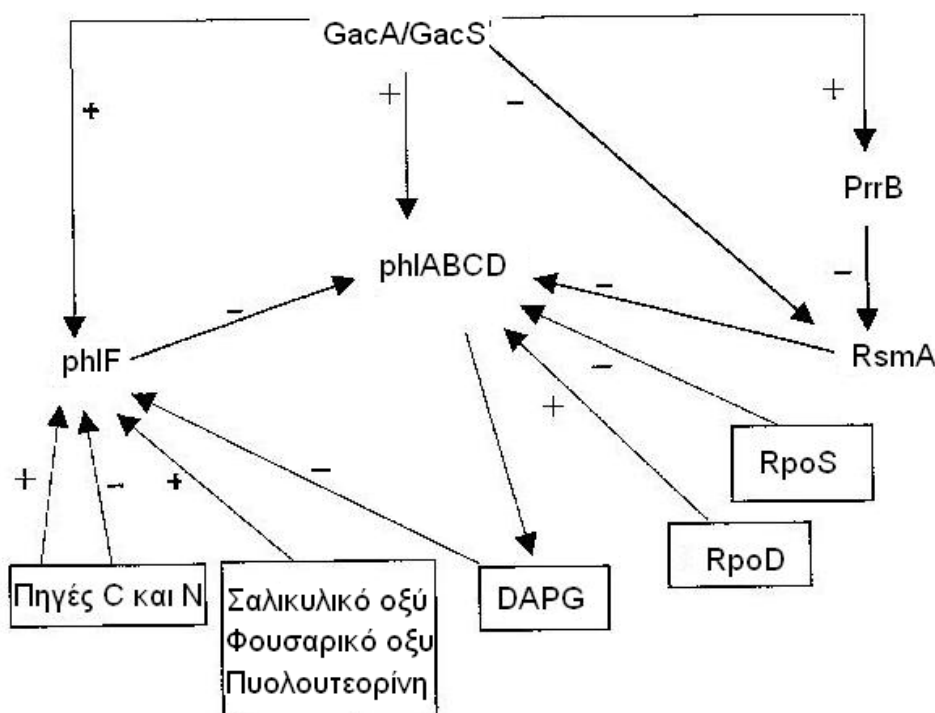
Στο μεταγραφικό επίπεδο (**Εικόνα 3.5.1**), τα γονίδια *phlF* και *phlH* τα οποία βρίσκονται ανωφερικά του οπερονίου *phlABCD* κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες. Ο PhlF αποτελεί ένα μεταγραφικό καταστολέα της οικογένειας TetR, ο οποίος διακόπτει την μεταγραφή του βιοσυνθετικού οπερονίου του DAPG. Η θέση operator του PhlF βρίσκεται στην περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή του οπερονίου. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετά είναι τα μόρια τα οποία παίζουν τον ρόλο ενεργοποιητή ή απενεργοποιητή του μεταγραφικού παράγοντα PhlF (**Εικόνα 3.5.1**). Συγκεκριμένα, μόρια τα οποία παίζουν ρόλο ενεργοποιητή του PhlF είναι ορισμένες πηγές άνθρακα (ηλεκτρικό οξύ), αμινοξέα (αργινίνη, ασπαραγίνη και γλουταμινικό οξύ), η αυξημένη συγκέντρωση νιτρικών αλάτων και τέλος κάποιες ενώσεις οι οποίες χρησιμεύουν ως γενικότερα μοριακά σινιάλα (το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS, σαλικυλικό οξύ, φουσαρικό οξύ και πυολουτεορίνη). Τον ρόλο απενεργοποιητή του PhlF παίζουν διάφορες πηγές άνθρακα (σουκρόζη,μανιτόλη και φρουκτόζη), η αυξημένη συγκέντρωση αμμωνιακών αλάτων και τέλος η συγκέντρωση του ίδιου του αντιβιοτικού (Ramos, 2004).

Το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS, εκτός από τον ρόλο ενεργοποιητή του PhlF, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει απευθείας τη μεταγραφή του βιοσυνθετικού οπερονίου του DAPG (**Εικόνα 3.5.2**). Ακόμα, οι παράγοντες σίγμα RpoS και RpoD έχουν, αντίστοιχα, ρόλο καταστολέα και επαγωγέα της μεταγραφής του οπερονίου (Ramos, 2004).

Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο είναι λιγότερο πολύπλοκη από αυτή στο μεταγραφικό. Η ρύθμιση στο επίπεδο αυτό γίνεται μέσω ενός συστήματος ενός καταστολέα της μετάφρασης (RsmA) και ενός ρυθμιστικού RNA (PrrB) (**Εικόνα 3.5.2**). Ο καταστολέας RsmA προσδένεται στην περιοχή πρόσδεσης του ριβοσώματος και αποτρέπει την μετάφραση του mRNA του οπερονίου *phlABCD*, ενώ το ρυθμιστικό RNA έχει την ικανότητα να δεσμεύεται από τον καταστολέα RsmA επάγοντας έτσι την μετάφραση του mRNA του οπερονίου *phlABCD* (Ramos, 2004).

Στην ρύθμιση της συγκέντρωσης του παραγόμενου αντιβιοτικού εμπλέκεται το γονίδιο *phlG*, το οποίο βρίσκεται ανωφερικά του οπερονίου *phlABCD* και κωδικοποιεί μια υδρολάση του DAPG. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να υδρολύει το DAPG σε MAPG, το οποίο είναι λιγότερο δραστικό. Η υδρόλυση του

DAPG έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PhlF, ο οποίος διακόπτει τη μεταγραφή του οπερονίου *phlABCD* (Bottiglieri *et al.*, 2006).



Εικόνα 3.5.2 : Ο μηχανισμός ρύθμισης της βιοσύνθεσης του DAPG (Ramos, 2004).

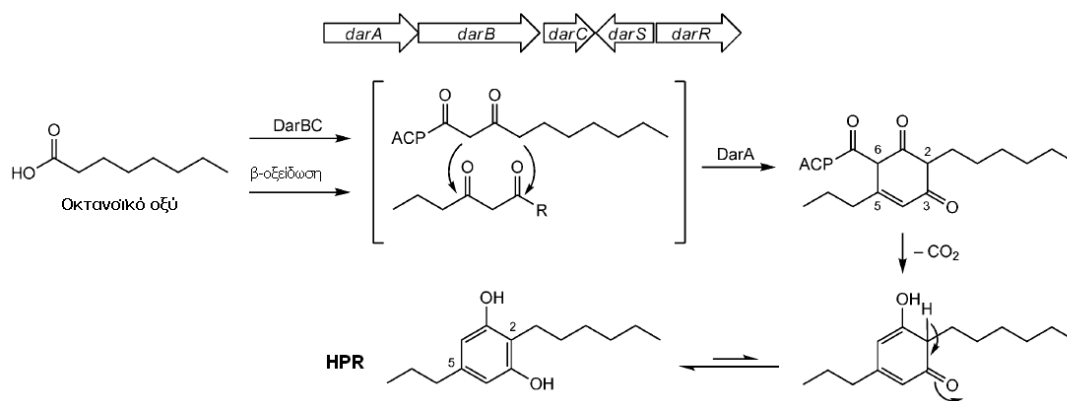
Έχει αποδειχθεί ότι η αφυδρογονάση της γλυκόζης (Gcd) και το συνένζυμο της (PQQ) παίζουν ρόλο κλειδί στην βιοσύνθεση του DAPG. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ελέγχεται η βιοσύνθεση του DAPG από την Gcd και το PQQ δεν είναι γνωστός, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το γλυκονικό οξύ (σαν προϊόν οξείδωσης της γλυκόζης, από την Gcd) είναι το μόριο που έχει ρυθμιστικό ρόλο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου *Ps. fluorescens* CHA0 τα οποία είναι απενεργοποιημένα ως προς την Gcd ή το PQQ εμφανίζουν μειωμένη παραγωγή του DAPG (Schnider *et al.*, 1995; de Werra *et al.*, 2009).

Στην ομάδα των φλορογλουκινολών ανήκει ακόμα ένα αντιβιοτικό, η 2,5-διακετυλορεσορσινόλη (HPR), το οποίο βρέθηκε μόνο στο στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* BL915. Το αντιβιοτικό αυτό, παρόλο που ανήκει στην ομάδα των φλορογλουκινολών μιας και έχει στο μόριό του μια ακυλιωμένη φλορογλουκινόλη, δεν βιοσυντίθεται μέσω του μονοπατιού του DAPG (Thompson *et al.*, 2003).

Το HPR είναι παράγωγο ενός λιπαρού οξέος, του οκτανοϊκού οξέος, και στη βιοσύνθεση του εμπλέκονται τρία γονίδια, τα *darA*, *darB* και *darC*. Τα γονίδια αυτά φαίνεται να είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο με μέγεθος 4kb (**Εικόνα 3.5.3**). Το

γονίδιο *darC* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-μεταφορέα ακυλομάδων (ACP), το *darB* κωδικοποιεί μια β-κετυλο-άκυλο συνθάση τύπου III και το *darA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αγνώστου λειτουργίας (Gross *et al.*, 2009).

Αρχικά, η DarB μαζί με την DarC καταλύουν την αλδολική συμπύκνωση του οκτανοϊκού οξέος σε 3-κέτο-δεκανοϊκό (**Εικόνα 3.5.3**). Στη συνέχεια, η αντίδραση συμπύκνωσης ενός μορίου 3-κέτο-δεκανοϊκού με ένα μόριο 3-κέτο-εξανοϊκού, το οποίο προκύπτει από το την β-οξειδωση του οκτανοϊκού οξέος, καταλύεται από το ένζυμο DarA με προϊόν ένα μόριο δυοξοκυκλοεξανίου. Κατόπιν ακολουθεί μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης στη θέση C6 του δακτυλίου του δυοξοκυκλοεξανίου και ταυτομερίωση του ενδιάμεσου προϊόντος σε HPR (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.5.3: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της 2,5-διακετυλορεσορσινόλης και η γονιδιωματική οργάνωση των *dar* γονιδίων. R: acyl-CoA, ACP: acyl carrier protein (Gross *et al.*, 2009).

Κατωφερικά του οπερονίου το οποίο περιέχει τα βιοσυνθετικά γονίδια *darA*, *darB* και *darC*, εντοπίζονται ακόμα δύο γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταγραφής του οπερονίου. Τα γονίδια *darS* και *darR* κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας AraC/XylS. Οι παράγοντες αυτοί εμφανίζουν συνεργιστική δράση επάγοντας την έκφραση του οπερονίου *darABC* (Thompson *et al.*, 2003).

1.3.6. Φεναζίνες

Στα αντιβιοτικά της ομάδας των φεναζινών κατατάσσονται χρωμοφόρες, αρωματικές, ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες περιέχουν άζωτο στο μόριό τους. Οι ενώσεις τις ομάδας αυτής παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης με κορυφές στα 250-290 nm και στα 350-400 nm (Anjaiah V., 2004). Συνολικά,

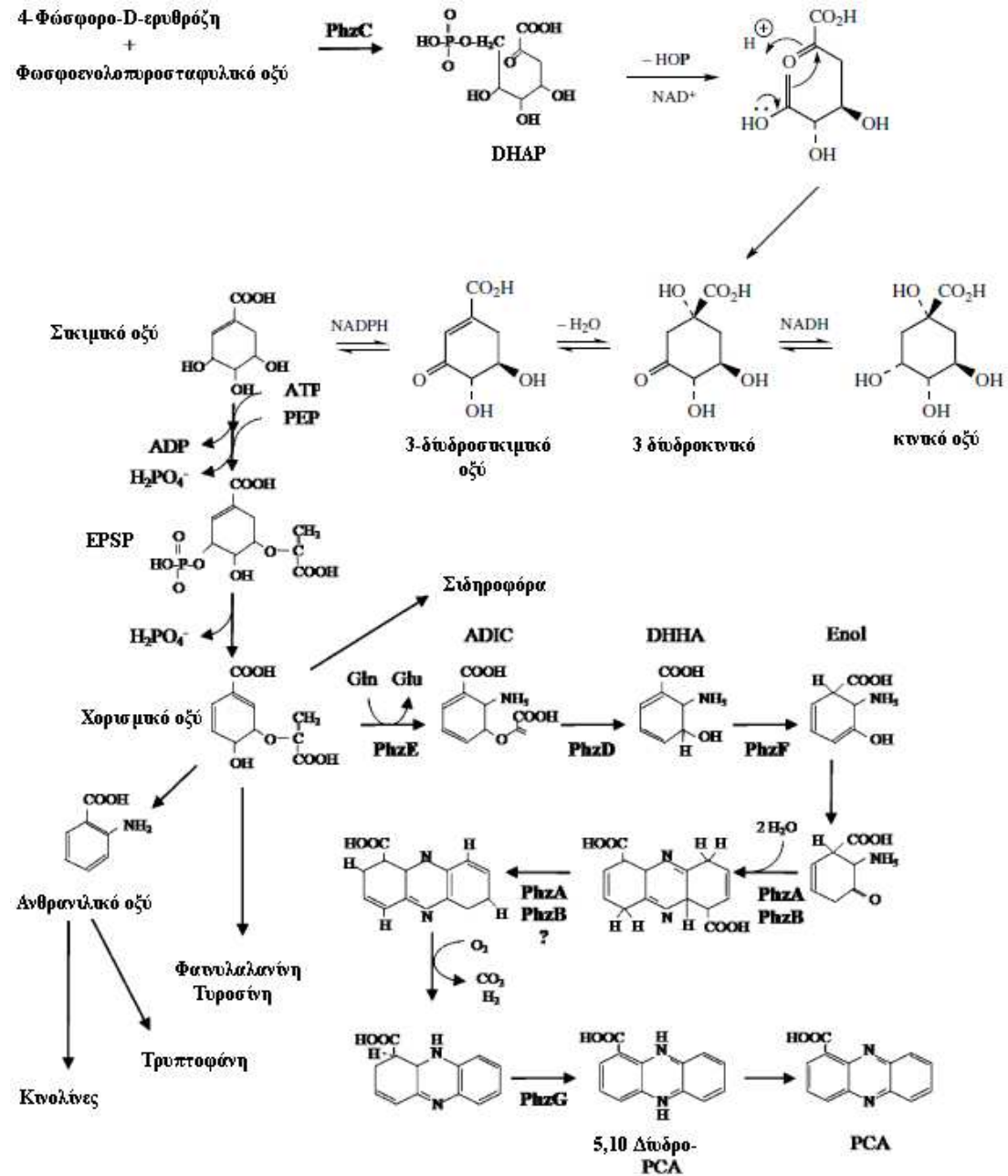
περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι φεναζινών έχουν απομονωθεί από βακτήρια, ενώ κοντά στις 6000 αριθμούν οι ενώσεις οι οποίες έχουν συντεθεί χημικά και περιέχουν την βασική δομή μιας φεναζίνης. Η βασική δομική μονάδα μιας φεναζίνης περιλαμβάνει δύο βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ένα δακτύλιο πυραζίνης. Η ποικιλομορφία των διάφορων φεναζινών έγκειται στην πρόσδεση υδροξυλομάδων και καρβοξυλομάδων στους βενζολικούς δακτυλίους καθώς και αμινομάδων και μεθυλενομάδων στα δύο άτομα άζωτου του δακτυλίου της πυραζίνης (Gross *et al.*, 2009).

Οι φεναζίνες παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης, το οποίο αποδίδεται στη μεγάλη οξειδωαναγωγική τους ικανότητα (Whelan *et al.*, 2006). Διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην αναπνοή και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχει βρεθεί ότι επάγουν την διασυστηματική ανθεκτικότητα των φυτών, ενισχύουν την δημιουργία βιοφίλμ, είναι δυνατόν να αποτελούν μοριακά σήματα στο σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν ιόντα σιδήρου (Fe^{+3}) παίζοντας τον ρόλο σιδηροφόρων και παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA (Pierson *et al.*, 2010)

Για την επιστημονική κοινότητα, οι φεναζίνες αποτελούν την πιο σημαντική και πιο εκτενώς μελετημένη ομάδα αντιβιοτικών βιολογικής καταπολέμησης. Αποτελούνται αποκλειστικά από ενώσεις βακτηριακής προέλευσης και εκτός από το γένος *Pseudomonas*, απαντώνται σε βακτηριακά στελέχη των γενών *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Methanosarcina*, *Nocardia*, *Pantoe*, *Pelagibacteria*, *Sorangium*, *Streptomyces* και *Vibrio* (Ramos, 2004).

Οι φεναζίνες αποτελούν προϊόν του βιοσυνθετικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος, με πρόδρομο μόριο το χορισμικό οξύ (Εικόνα 3.6.1). Κατά το μονοπάτι αυτό η πρωτεΐνη PhzC, η οποία είναι μια DAHP (3-δέοξυ-7-φώσφορο-D-αραβινοεπταλοσονικό) συνθετάση καταλύει την πρώτη αντίδραση συμπύκνωσης ενός μορίου φωσφοένολο-πυροσταφυλικού με ένα μόριο 4-φώσφορο-D-ερυθρόζης, σε DAHP. Το γονίδιο *phzC* εκφράζεται κατά την στατική φάση ανάπτυξης, εξασφαλίζοντας στη φάση αυτή αυξημένη ροή υποστρώματος στο μονοπάτι του σικιμικού. Ακολούθως, το DAHP οξειδώνεται με τη δράση ενός ενζύμου το οποίο αποτελείται από πέντε δομικές περιοχές [1) συνθάση του 2-υδροσικιμικού, 2) 1-καρβοξυβινιλοτρανσφεράση του 3-φώσφοσικιμικού, 3) κινάση του σικιμικού, 4) 3-διυδροκινάση, 5) αφυδρογονάση του σικιμικού]. Η περιοχή της αφυδρογονάσης του σικιμικού καταλύει την αντίδραση του 3 δΐυδροσικιμικού σε σικιμικό οξύ (Dewick, 2002). Η

αφυδρογονάση του σικιμικού είναι ένα ένζυμο το οποίο εκτός από το NADH, χρησιμοποιεί ως συνένζυμό της το PQQ (van Kleef *et al.*, 1988).



Εικόνα 3.6.1 : Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φεναζινών (Pierson *et al.*, 2010)

Στη συνέχεια το σικιμικό οξύ φωσφορυλιώνεται και το προϊόν αντιδρά με εστερικό δεσμό με ένα μόριο φωσφοένολο-πυροσταφυλικού οξέος, δίνοντας ως ενδιάμεσο προϊόν το 3-ένολο-5-φώσφο-πυροσικιμικό οξύ (EPSP), το οποίο με μία 1,4-αποφωσφορυλίωση δίνει ως προϊόν το χορισμικό οξύ (Εικόνα 3.6.1). Ουσιαστικά, ολόκληρη αυτή η αλληλουχία αντιδράσεων καταλύεται από ένα μόνο ένζυμο, την EPSP συνθετάση. Το χορισμικό αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη

βιοσύνθεση πολλών δευτερογενών μεταβολιτών (φenaζίνες, σιδηροφόρα και κινολίνες) καθώς και αρωματικών αμινοξέων (τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη) (Dewick, 2002).

Σύγκριση, με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής, των γονιδίων βιοσύνθεσης φenaζινών αναμεταξύ των διάφορων στελεχών έχει αποδείξει ότι υπάρχουν πέντε βασικά βιοσυνθετικά γονίδια (*phzABCDF*) τα οποία είναι συντηρημένα. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση του PCA (φenaζίνη-1-καρβοξυλικό οξύ). Από πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε ότι η διασπορά των γονιδίων αυτών στα διάφορα γένη έχει συμβεί λόγω της οριζόντιας μεταφοράς (Pierson *et al.*, 2010).

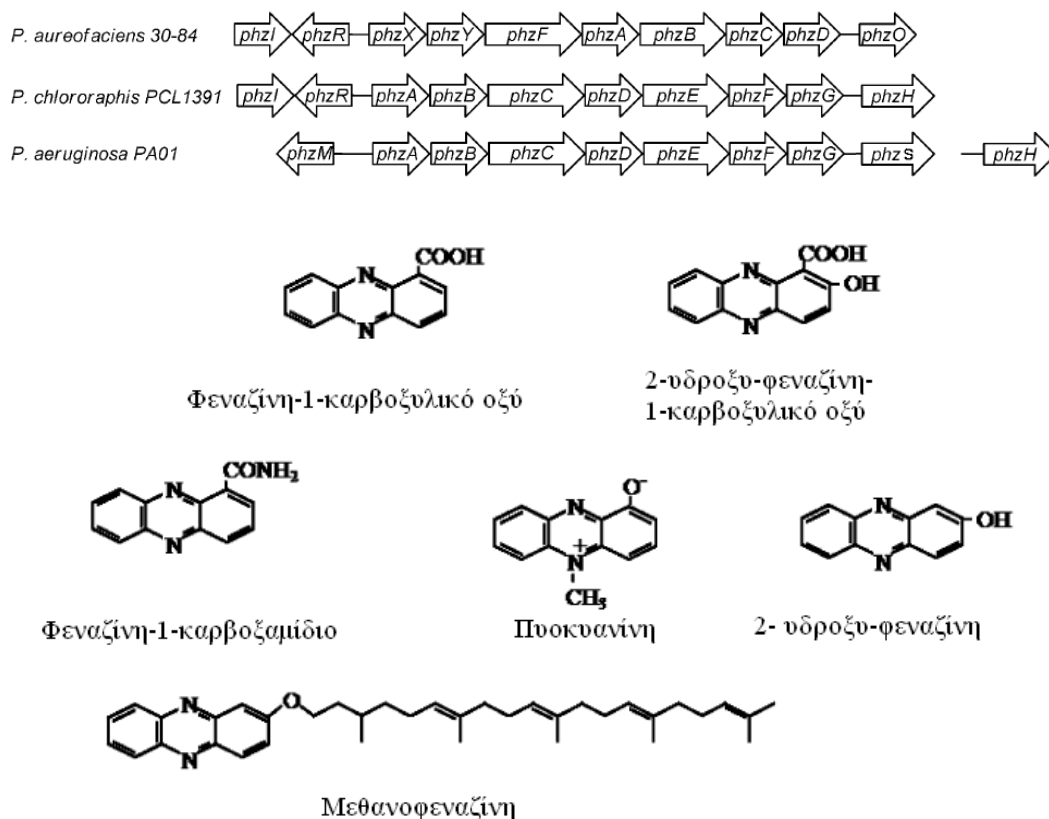
Κατά τη βιοσύνθεση των φenaζινών το χορισμικό οξύ μετατρέπεται σε 2-άμινο-2-δέσοξυχορισμικό οξύ (ADIC). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την πρωτεΐνη PhzE, η οποία αποτελεί μια ADIC συνθάση (Εικόνα 3.6.1). Κατόπιν, η αλυσίδα του πυροσταφυλικού οξέος απομακρύνεται με μια αντίδραση υδρόλυσης από το ADIC έχοντας ως προϊόν το 2,3-δίδρο-3-υδροξυανθρανιλικό οξύ (DHHA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την πρωτεΐνη PhzD η οποία είναι μια DHHA συνθάση (ισοχορισματάση). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη PhzF, η οποία είναι μια ισομεράση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής ενός μορίου DHHA σε ένα μόριο αμινοκυκλοεξανόνης με ενολικό δακτύλιο. Ακολούθως, δύο μόρια της αμινοκυκλοεξανόνης αυτής συμπυκνώνονται, με τη δράση της διμερικής πρωτεΐνης PhzA/PhzB. Τέλος, η PhzG, η οποία φαίνεται να έχει την λειτουργία μιας 5-φωσφοπυριδοξαμινικής οξειδάσης, είναι υπεύθυνη για την κυκλοποίηση και την δημιουργία των αρωματικών δακτυλίων στο τελικό προϊόν του βιοσυνθετικού μονοπατιού, το PCA (Gross *et al.*, 2009).

Ο ρόλος των πρωτεϊνών PhzA και PhzB στη βιοσύνθεση των φenaζινών δεν είναι πλήρως ξεκάθαρος, αλλά φαίνεται ότι σταθεροποιούν το πιθανολογούμενο βιοσυνθετικό σύμπλεγμα των ενζύμων βιοσύνθεσης των φenaζινών. Το διμερές σύμπλοκο των PhzA και PhzB έχει τη δομή μιας 3-κετοστεροειδικής ισομεράσης, η οποία έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει αρνητικά φορτία μέσω πρωτονίωσης και να συμμετέχει σε μια αντίδραση συμπύκνωσης. Ακόμα, οι πρωτεΐνες PhzA και PhzB, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ τους, πιθανολογείται ότι διαδραματίζουν ρόλο στη δομή και το ποσοστό των παραγώγων του PCA (Gross *et al.*, 2009).

Στην ίδια γονιδιωματική περιοχή με τα πέντε συντηρημένα γονίδια (*phzABCDF*), είτε ανωφερικά είτε κατωφερικά, εντοπίζονται γονίδια τα οποία

κωδικοποιούν ένζυμα με ικανότητα να τροποποιούν το μόριο του PCA. Η μεγάλη ποικιλομορφία των φεναζινών οφείλεται στην δράση αυτών των ενζύμων (Pierson *et al.*, 2010).

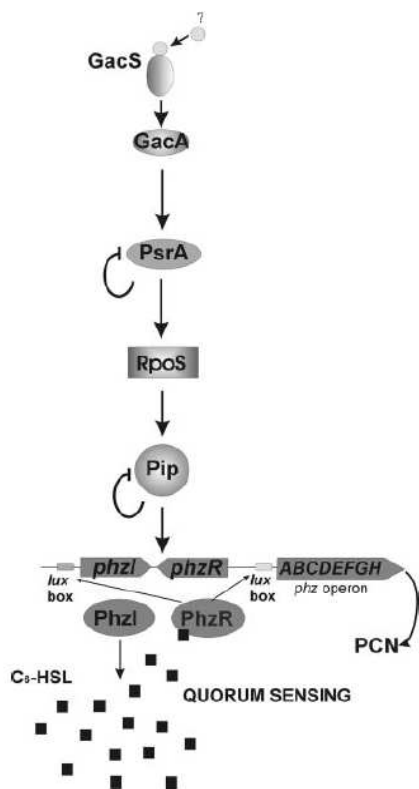
Έτσι, στο στέλεχος *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 το γονίδιο *phzO*, το οποίο βρίσκεται κατωφερικά των γονιδίων βιοσύνθεσης του PCA κωδικοποιεί για μια μονοοξυγενάση η οποία μετατρέπει το PCA σε 2-υδροξυ-φεναζίνη 1-καρβοξυλικό οξύ (2OHPZ) και 2- υδροξυ-φεναζίνη (2OHPZ) (Εικόνα 3.6.2). Στα στελέχη *Ps. chlororaphis* PCL1391 και *Ps. aeruginosa* PAO1 το γονίδιο *phzH* κωδικοποιεί μια τρανσαμιδάση στην οποία οφείλεται η μετατροπή του PCA σε φεναζίνη-1-καρβοξαμίδιο (Εικόνα 3.6.2). Στο στέλεχος *Ps. aeruginosa* PAO1 έχουν ταυτοποιηθεί δύο ακόμα γονίδια, *phzM* και *phzS*, τα οποία κωδικοποιούν για μια μεθυλοτρανσφεράση και μια φλαβινο-μονοοξυγενάση τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή του PCA σε πυοκυανίνη (Εικόνα 3.6.2). Το γένος *Methanosarcina*, το οποίο ανήκει στα Archaea, έχει βρεθεί ότι έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει τη μεθανοφεναζίνη (Εικόνα 3.6.2) (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.6.2 : Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φεναζινών και σύγκριση της γονιδιωματικής περιοχής, η οποία περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση από διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas* (Gross *et al.*, 2009; Pierson *et al.*, 2010)

Η έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης των φεναζινών έχει αποδειχθεί, από πολλές μελέτες, ότι ελέγχεται από διάφορους παράγοντες. Από τους ενδογενείς παράγοντες το σύστημα δυο παραγόντων GacS-GacA, το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού καθώς και ο σ^S μεταγραφικός παράγοντας (*rpoS*), ενώ από τους εξωγενείς παράγοντες η πηγή αζώτου, η συγκέντρωση φωσφόρου (Turner *et al.*, 1986) και η θερμοκρασία είναι παράγοντες οι οποίοι με διάφορους μηχανισμούς επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων *phz* (Thomas *et al.*, 2005).

Στο στέλεχος *Ps. chlororaphis* PCL1391 ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων *phz*, αποτελεί πρότυπο για την κατανόηση του μηχανισμού και στα υπόλοιπα στελέχη του γένους. Ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων *phz* στο στέλεχος αυτό είναι αρκετά πολύπλοκος (Εικόνα 3.6.3). Η πολυπλοκότητα αυτή έχει προκαλέσει την ανάγκη να διερωτηθεί κανείς τους πιθανούς λόγους ύπαρξής της στη φυσιολογία του βακτηρίου (Girard *et al.*, 2006).



Εικόνα 3.6.3 : Ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης της πυοκυανίνης στο στέλεχος *Ps. chlororaphis* PCL1391. ABCDEFGH: το οπερόνιο με τα βιοσυνθετικά γονίδια *phz*, C6-HSL: N-hexanoyl-L-homoserine lactone, PCN: φεναζίνη-1-καρβοξαμίδιο, Quorum Sensing: αίσθηση μεγέθους πληθυσμού. (Girard *et al.*, 2006)

Κατά τον μηχανισμό ρύθμισης των γονιδίων βιοσύνθεσης της πυοκυανίνης στο στέλεχος *Ps. chlororaphis* PCL1391 (Εικόνα 3.6.3), το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS (το οποίο κωδικοποιείται από τα γονίδια *lemA* και *apdA*

αντίστοιχα) ενεργοποιείται από ένα άγνωστο, μέχρι στιγμής, παράγοντα. Το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS επάγει την έκφραση του γονιδίου *psrA*, το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας TetR, και αυτός με τη σειρά του επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα RpoS (σ^S). Στη συνέχεια, ο παράγοντας RpoS επάγει την έκφραση του γονιδίου *rip*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν καινοτόμο μεταγραφικό παράγοντα. Η έκφραση των γονιδίων *psrA* και *rip* εντάσσεται στο μοντέλο της αρνητικής αυτεπαγωγής (Girard *et al.*, 2006).

Τέλος, ο παράγοντας Rip ενεργοποιεί το σύστημα μεγέθους πληθυσμού *phzI/phzR*. Το PhzI αποτελεί μια N-AHL συνθάση η οποία έχει την ικανότητα να συνθέτει C6-HSL. Η ρυθμιστική πρωτεΐνη PhzR ενεργοποιείται από την C6-HSL και το σύμπλοκο PhzR-C6-HSL προσδένεται στην θέση operator (κουτιά με την ένδειξη lux) και επάγει την έκφραση του γονιδίου *phzI* και των γονιδίων *phz*, έχοντας ως αποτέλεσμα την επαγωγή της βιοσύνθεσης του PCN. Το σύστημα *phzI/phzR* το οποίο κωδικοποιείται από δύο γονίδια ανωφερικά των γονιδίων βιοσύνθεσης των φεναζινών είναι συντηρημένο ανάμεσα στα στελέχη του γένους *Pseudomonas* (Girard *et al.*, 2006).

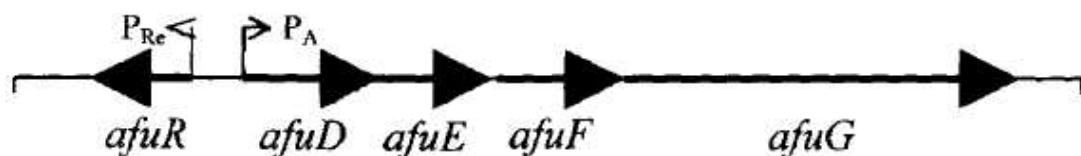
1.3.7. Ωομυκίνη A

Το βακτηριακό στέλεχος *Ps. fluorescens* Hv37a, το οποίο απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα κριθαριού, είναι ικανός βιολογικός παράγοντας καταπολέμησης του φυπαθογόνου μύκητα *P. ultimum*. Το στέλεχος Hv37a, το οποίο έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού ωομυκίνη A, έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει προφυτρωτικές αλλά και μεταφυτρωτικές τήξεις. Η δομή του αντιβιοτικού δεν έχει πλήρως προσδιοριστεί μέχρι σήμερα (Gutterson *et al.*, 1986).

Η βιοσύνθεση του αντιβιοτικού αυτού πραγματοποιείται από τέσσερα γονίδια *afuDEFG*, τα οποία είναι οργανωμένα σε οπερόνιο με μέγεθος 9kb (Εικόνα 3.7). Ανωφερικά του οπερονίου αυτού βρίσκεται το γονίδιο *afuR*, το οποίο έχει διαφορετική κατεύθυνση μεταγραφής από αυτή των γονιδίων του οπερονίου. Το *afuR* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ελέγχει τη μεταγραφή του οπερονίου *afuDEFG* (Anjiaiah, 2004).

Η μεταγραφή του οπερονίου *afuDEFG* αλλά και του γονιδίου *afuR* ελέγχεται από τρία ακόμα γονίδια, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετική γονιδιωματική περιοχή. Το γονίδιο *afuP* κωδικοποιεί ένα πιθανό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος επάγει την έκφραση των γονιδίων *afuR* και *afuDEFG*. Ακόμα, τα γονίδια *afuA* και *afuB*

βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο, *afuAB*, και πιθανολογείται ότι κωδικοποιούν για ένα σύστημα ανάλογο του συστήματος δύο παραγόντων GacA/GacS. Η έκφραση των γονιδίων *afuAB* επάγεται από την παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου. Απουσία γλυκόζης τα γονίδια *afuAB* δεν εκφράζονται με αποτέλεσμα την παύση της βιοσύνθεσης της ωμοκίνης A (Anjaiah, 2004).



Εικόνα 3.7 : Οργάνωση των γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού ωμοκίνη A στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Hv37a

Τα γονίδια *afuP* και *afuAB* είναι απολύτως απαραίτητα στην βιοσύνθεση της ωμοκίνης A. Μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία φέρουν ένθεση του μεταθετού στοιχείου είτε στο *afuP* είτε στο οπερόνιο *afuAB* είναι αδύνατον να βιοσυνθέτουν το αντιβιοτικό και επομένως χάνουν την ικανότητά τους να καταστέλλουν φυτοπαθογόνους μύκητες (Gutterson *et al.*, 1986).

Συνοψίζοντας, είναι φανερό ότι οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης της ωμοκίνης A είναι η γλυκόζη, η οποία επάγει την παραγωγή του αντιβιοτικού (James, 1986) και ένα πιθανό σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι, στη ριζόσφαιρα η έκφραση των βιοσύνθετικών γονιδίων, σημειώνεται 10-24 ώρες μετά από τον εμβολιασμό του βακτηρίου στο έδαφος (Anjaiah, 2004).

1.3.8. Φαινολοπυρρόλες

Η ομάδα των φαινολοπυρρολικών αντιβιοτικών περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες έχουν τη δομή ενός χλωριωμένου αρωματικού πολυπεπτιδίου. Συγκεκριμένα, το πολυπεπτίδιο αυτό περιέχει στο μόριό του ένα δακτύλιο ρεσορσινόλης συνδεδεμένο με ένα πυρρολικό δακτύλιο, ενώ υποκαταστάσεις χλωρίου μπορεί να υπάρχουν και στους δύο δακτυλίους. Στην ομάδα αυτή ανήκουν αντιβιοτικά τα οποία παράγονται από διάφορα γένη βακτηρίων, όπως *Actinosporangium*, *Burkholderia*, *Cystobacter*, *Corallocooccus*, *Enterobacter*, *Myxococcus* και *Pseudomonas*. Στο γένος *Pseudomonas* έχει παρατηρηθεί η ικανότητα βιοσύνθεσης δύο αντιβιοτικών της

ομάδας αυτής. Τα δύο αυτά αντιβιοτικά είναι η πυολουτεορίνη (PLT) και η πυρρολιντρίνη (PRN) (van Pee *et al.*, 2000).

Η αντιμικροβιακή δράση των φαινυλοπυρρολικών αντιβιοτικών είναι ευρέως αποδεκτό ότι οφείλεται στην διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων παρεμποδίζοντας την λειτουργία της κυττοχρωμικής C οξειδάσης. Πρόσφατα έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα αντιβιοτικά της ομάδας αυτής επάγουν την σύνθεση τριακυλογλυκερολών και τη συσσώρευση γλυκερόλης, γεγονότα που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής των κυτταρικών μεμβρανών και τελικά την κυτταρική λύση (van Pee *et al.*, 2000).

Η μεγάλη αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών κατά διαφόρων παθογόνων μυκήτων, οδήγησε στη δημιουργία συνθετικών ανάλογων με μεγαλύτερη σταθερότητα στο φως. Δύο ενώσεις της ομάδας αυτής (το fenpiclonil και το fludioxonil) προωθήθηκαν στην αγορά για την καταπολέμηση Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων. Τα δύο αυτά προϊόντα αναπτύχθηκαν ως προστατευτικά σπόρων (seed dressing) για προστασία των σπόρων σιτηρών από μύκητες (όπως οι *Fusarium nivale* και *Tilletia caries*) αλλά και εναντίον εδαφογενών παθογόνων (των γενών *Ascochyta*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, κ.α.) σε πολλές καλλιέργειες (Ζιώγας, και Μάρκογλου, 2004).

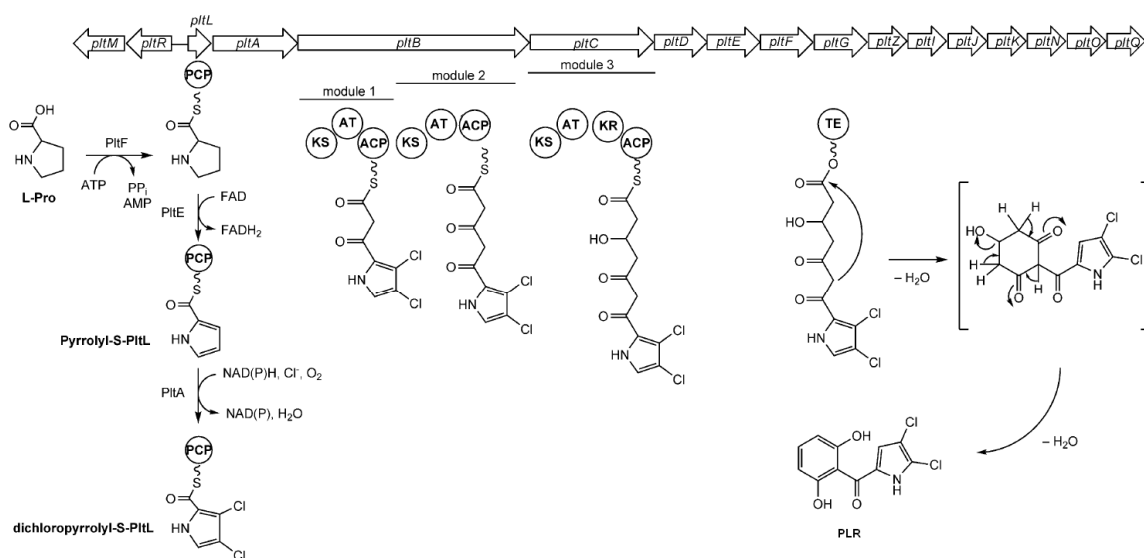
Η παραγωγή της PLT ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά, στα μέσα της δεκαετίας του 50', από το τα στελέχη *Ps. aeruginosa* T359 και IFO3455. Σήμερα, η ικανότητα βιοσύνθεσης της PLT απαντάται στα στελέχη των βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης *Ps. fluorescens* CHA0 και Pf5. Στα στελέχη αυτά, το αντιβιοτικό παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων και συγκεκριμένα ωομυκήτων (Gross *et al.*, 2009).

Ολόκληρη η γονιδιωματική περιοχή, η οποία σχετίζεται με τη βιοσύνθεση της PLT στο γένος *Pseudomonas*, έχει μέγεθος 24kb. Στην περιοχή αυτή βρίσκονται τα δομικά γονίδια (*pltM*, *pltA*, *pltB*, *pltC*, *pltD*, *pltE*, *pltF* και *pltG*), τα ρυθμιστικά γονίδια (*pltZ* και *pltR*) καθώς και τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα του αντιβιοτικού (*pltI*, *pltJ*, *pltK*, *pltL*, *pltN*, *pltO* και *pltQ*) (Εικόνα 3.8.1). (Ramos, 2004).

Πρόδρομη ένωση του πυρρολικού δακτυλίου, στο μόριο της PLT, αποτελεί η L-προλίνη (Εικόνα 3.8.1), η οποία αδενυλιώνεται με τη δράση του ενζύμου PltF και ενεργοποιείται. Στο προϊόν της αντίδρασης αυτής, το οποίο είναι το L-πρότυλο-AMP, προσδένεται η PltL, η οποία αποτελεί μια πρωτεΐνη-μεταφορέα ακυλομάδων (PCP),

με μια αντίδραση θειοεστεροποίησης. Στη συνέχεια η PltE, η οποία αποτελεί μια αφυδρογονάση του άκυλο-συνενζύμου A, καταλύει την αντίδραση αποκορεσμού του δακτυλίου της προλίνης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του αρωματικού δακτυλίου του πυρρολίου. Το προϊόν της αντίδρασης αποκορεσμού είναι το πυρρολυλο-S-PCP (Ramos, 2004).

Το πυρρολυλο-S-PCP χλωριώνεται στις θέσεις 5' και 4' από τη δράση του ενζύμου PltA, το οποίο αντιπροσωπεύει μια FADH₂ εξαρτώμενη αλογονάση, και στο προϊόν (δίχλωρο-πυρρολυλο- S-PCP) προσδένονται τρία μόρια μηλόνυλο-CoA με τη δράση των πολυκετιδικών συνθετασών PltB και PltC. Η χλωρίωση του πυρρολυλο-S-PCP είναι δυνατόν να καταλύεται και από τα ένζυμα PltD και PltM τα οποία έχουν δομή μιας FADH₂ εξαρτώμενης αλογονάσης, όμως αυτό δεν έχει ακόμα πλήρως ξεκαθάρο. Τέλος, ακολουθεί μια αντίδραση θειοεστερικής υδρόλυσης, η οποία καταλύεται από την θειοεστεράση PltG, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του δακτυλίου της ρεσορσινόλης (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.8.1: Το σύμπλεγμα των γονιδίων βιοσύνθεσης της PLT και το βιοσυνθετικό μονοπάτι της (Gross *et al.*, 2009)

Στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της PLT εμπλέκονται ενζυμικά συστήματα δύο τύπων. Οι αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από τα ένζυμα PltF, PltL και PltG, θεωρούνται ανάλογες με τις αντιδράσεις που επιτελεί το ενζυμικό σύστημα μιας NRPS (αδενυλίωση, θειοεστεροποίηση και θειοεστεράση). Τα βιοσυνθετικά γονίδια

pltB και *pltC* κωδικοποιούν ενζυμικά συστήματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των πολυκετιδικών συνθετασών τύπου I (PKS I). Έτσι, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η PLT κατατάσσεται στην ομάδα των αντιβιοτικών τα οποία προέρχονται από την συνδυαστική δράση NRPS (μη ριβοσωμικής πεπτιδικής συνθάσης) και PKS (πολυκετιδικής συνθάσης) (§ 3.5) (Ramos, 2004).

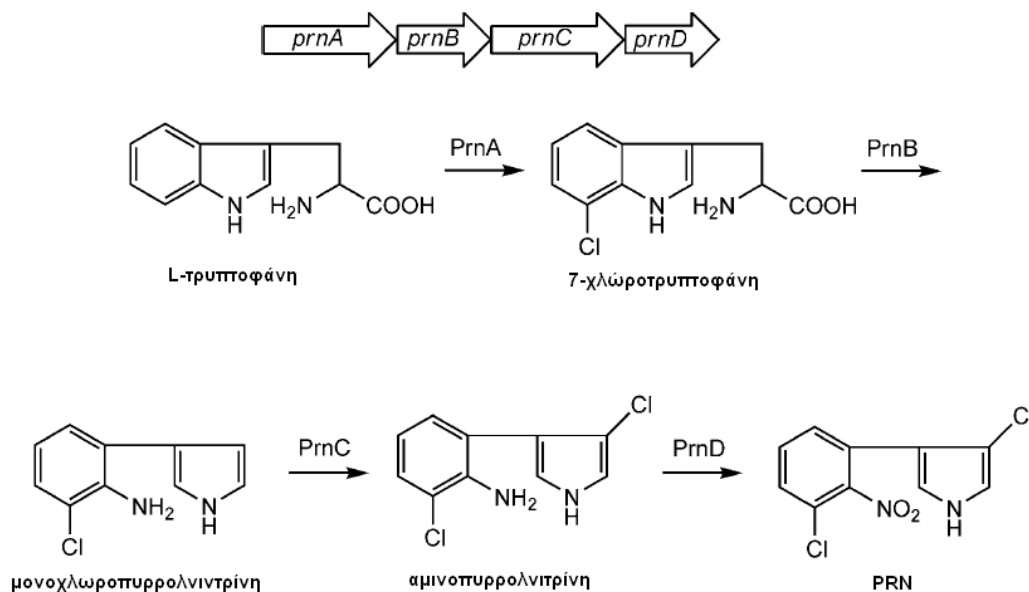
Στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PLT έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται αρκετοί παράγοντες. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση της PLT είναι ικανή να επάγει την μεταγραφή των δομικών της γονιδίων (*pltB*, *pltE*, και *pltF*) επομένως εντάσσεται σε ένα σύστημα αυτεπαγωγής (Brodhagen *et al.*, 2004). Εκτός από την επαγωγή των δομικών της γονιδίων η συγκέντρωση της PLT επάγει και την έκφραση ορισμένων από τα γονίδια (*pltI* και *pltJ*) που κωδικοποιούν για το εκκριτικό σύστημα της (Brodhagen *et al.*, 2005). Ακόμα, η γλυκόζη παίζει εξέχοντα ρόλο μειώνοντας τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης της PLT. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η ρύθμιση αυτή δεν είναι ακόμα πλήρως διερευνημένος, αλλά υπάρχει η πεποίθηση ότι στον μηχανισμό αυτό εμπλέκεται η rqq-εξαρτώμενη *gcd* (αφυδρογονάση της γλυκόζης) (§3.3.2) (de Wera *et al.*, 2009).

Στο στέλεχος *Pseudomonas sp.* M18 η ρύθμιση της μεταγραφής των δομικών γονιδίων της PLT γίνεται μέσω ενός συστήματος αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (Quorum Sensing). Τα γονίδια *rhlI* και *rhlR* τα οποία κωδικοποιούν για το QS σύστημα έχουν ως αποτέλεσμα την καταπολέμηση της μεταγραφής δομικών γονιδίων αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα της PLT (Yan *et al.*, 2007). Από πρόσφατη έρευνα έχει βρεθεί ότι η μεταγραφή του βιοσυνθετικού γονιδίου *pltA* στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0 επάγεται από την παρουσία πρωτόζωων τα οποία έχουν ρόλο θηρευτή του βακτηρίου. Ο ακριβής μηχανισμός της επαγωγής και τα μόρια-σινιάλα είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Jousset *et al.*, 2010).

Το γονίδιο *pltR*, το οποίο βρίσκεται ανωφερικά των δομικών γονιδίων, κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας LysR. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας προσδέεται με την περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή των δομικών γονιδίων *pltB*, *pltE*, και *pltF*, ελέγχοντας έτσι τη μεταγραφή τους (Ramos, 2004). Στο στέλεχος *Pseudomonas sp.* M18 έχει βρεθεί ακόμα ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο PltZ. Ο παράγοντας αυτός ανήκει στην οικογένεια TetR και παίζει τον ρόλο καταστολέα στην μεταγραφή του γονιδίου *pltA* (Huang *et al.*, 2004). Τέλος, το σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS έχει επαγωγικό ρόλο στη βιοσύνθεση της PLT ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας σ^S (RpoS) κατασταλτικό (Ramos, 2004).

Το δεύτερο αντιβιοτικό το οποίο ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπυρρολών και βιοσυντίθεται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι η πυρρολιντρίνη (PRN). Η πρώτη αναφορά στην βιοσύνθεση της PRN έχει σημειωθεί από τον βιολογικό παράγοντα *Ps. pyrocinia*, στη δεκαετία του 60'. Από πρόσφατες αναφορές, η ικανότητα βιοσύνθεσης της PRN απαντάται στα στελέχη των βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης *Ps. fluorescens* BL915, CHA0 και Pf5. Στα στελέχη αυτά, το αντιβιοτικό παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική καταπολέμηση παθογόνων μυκήτων των φυτών και των ζώων (Gross *et al.*, 2009).

Στη βιοσύνθεσή της PRN εμπλέκονται τέσσερα γονίδια (**Εικόνα 3.8.2**), τα οποία είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο (*prnABCD*) με μέγεθος 6.2kb. Τα γονίδια αυτά εμφανίζονται συντηρημένα σε όλα τα γένη, τα οποία έχουν την ικανότητα βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού, και δεδομένου ότι στην ευρύτερη γονιδιοματική περιοχή γύρω από το οπερόνιο έχουν βρεθεί γονίδια τα οποία έχουν τη λειτουργία μεταθετασών, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το οπερόνιο *prnABCD* έχει την ικανότητα να μεταπηδά στο γονιδίωμα ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Costa *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.8.2: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της PRN και η οργάνωση των γονιδίων βιοσύνθεσης (Hammer *et al.* 1997)

Το πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση της PRN είναι η L-τρυπτοφάνη (**Εικόνα 3.8.2**). Το PrnA, το οποίο έχει τη δράση της αλογονάσης της τρυπτοφάνης και χρησιμοποιεί ως συνένζυμο της το FADH₂, καταλύει την αντίδραση προσθήκης ενός ατόμου χλωρίου στην L-τρυπτοφάνη με προϊόν την 7-χλωροτρυπτοφάνη. Το μόριο

αυτό, με τη δράση του ενζύμου PrnB, το οποίο έχει τη δομή μιας διοξυγενάσης (de Laurentis *et al.*, 2007), μετατρέπεται στην μονόχλωροπυρρολιντρίνη. Στη συνέχεια, το ένζυμο PrnC, το οποίο αντιπροσωπεύει μια NADH-εξαρτώμενη αλογονάση, προσδένει ένα μόριο χλωρίου στον πυρρολικό δακτύλιο με αποτέλεσμα τη δημιουργία του προϊόντος άμινοπυρρολιντρίνη. Η PrnD, η οποία αποτελεί μια FADH₂-εξαρτώμενη οξειδάση, καταλύει την οξείδωση της αμινομάδας με τελικό προϊόν την PRN (Hammer *et al.*, 1997).

Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0, κατωφερικά του οπερονίου *prn*, βρέθηκαν ακόμα τέσσερα γονίδια τα οποία ενδέχεται να σχετίζονται με την βιοσύνθεση του αντιβιοτικού. Τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *prnE*, *prnF*, *prnS* και *prnR*. Το γονίδιο *prnE* κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα, ο οποίος ενδέχεται να είναι μέρος του εκκριτικού συστήματος της PRN, ενώ τα γονίδια *prnS* και *prnR* κωδικοποιούν αντίστοιχα ένα σίγμα παράγοντα και ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας FecR/PurR, οι οποίοι υπάρχει πιθανότητα να εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής του οπερονίου *prn*. Το γονίδιο *prnF* υποστηρίζεται ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στην βιοσύνθεση της PRN, μιας και κωδικοποιεί μια NADH-εξαρτώμενη ρεδουκτάση της φλαβίνης η οποία τροφοδοτεί την PrnD με το συνένζυμό της (Lee *et al.*, 2007).

Στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PLT έχει βρεθεί ότι συνεισφέρει το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού σε διαφορά στελέχη των γενών *Serratia* και *Bulkholderia*, επάγοντας την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου *prn*. Στο γένος *Pseudomonas* δεν έχει αποδειχθεί ακόμα ότι σήματα όπως, οι λακτόνες της ομοσερίνης (AHL) παίζουν κάποιο ρόλο στη μεταγραφή του οπερονίου (Schmidt *et al.*, 2009). Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* CHA0 έχει αποδειχθεί ότι το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS επάγει τη μεταγραφή του οπερονίου *prn*. Οι παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν ένα τέτοιο σύστημα βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση (Duffy *et al.*, 2000).

Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Pf5 τα χημικά εντομοκτόνα methimazole, Fenpiclonil και fludioxonil μειώνουν την παραγωγή του αντιβιοτικού, μιας και αποτελούν παρεμποδιστές οξειδασών, παρεμποδίζοντας την δράση του ενζύμου PrnD, ενώ οι ενώσεις glyphosate και validamycin έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της βιοσύνθεσης (Keum *et al.*, 2010). Τέλος, στο στέλεχος *Ps. chlororaphis* O6 έχει βρεθεί ότι γλυκόζη έχει ρόλο καταστολέα της βιοσύνθεσης της PRN, ενώ αντίθετα επάγει την βιοσύνθεση φεναζινών στο ίδιο στέλεχος (Park *et al.*, 2011).

1.3.9. Ψευδομονικά οξέα (Μουπιροσύνη)

Με τον όρο μουπιροσύνη περιγράφουμε το μείγμα των αντιμικροβιακών ενώσεων του ψευδομονικού οξέος, το οποίο αποτελείται κατά 90% από το Α ψευδομονικό οξύ. Το Α ψευδομονικό οξύ ($C_{26}H_{44}O_9$) περιέχει μια υπομονάδα με δεκαεπτά άτομα άνθρακα (μονικό οξύ ή *monic acid*), η οποία αποτελείται από ένα δακτύλιο πυρανίου πολυκετιδικής προέλευσης, και από ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ με εννέα άτομα άνθρακα (9-ύδροξυ-1-οκτανοκαρβοξυλικό οξύ, 9-HN) (**Εικόνα 3.9**). Τα υπόλοιπα μόρια του μείγματος της μουπιροσύνης είναι το Β ψευδομονικό οξύ, το οποίο έχει μια υδροξυλομάδα στην θέση 8 του πυρανικού δακτυλίου, το Γ ψευδομονικό οξύ, το οποίο έχει ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα C_{10} και C_{11} του μονικού οξέος, και το Δ ψευδομονικό οξύ, στο οποίο είναι συνδεδεμένο μια ομάδα αλκενίου στη θέση C_4 - C_5 του λιπαρού οξέος (Ramos, 2004).

Η παραγωγή του Α ψευδομονικού οξέος ανιχνεύθηκε στο στέλεχος του βιολογικού παράγοντα καταπολέμησης *Ps. fluorescens* NCIBM 10586. Η αντιβιοτική δράση του Α ψευδομονικού οξέος έγκειται στην παρεμπόδιση της συνθάσης του tRNA της ισολευκίνης (IleRS), μιας και έχει την ικανότητα να προσδέεται στις θέσεις πρόσδεσης της ισολευκίνης και του ATP. Εξαιτίας της δράσης αυτής, η μουπιροσύνη χρησιμοποιείται κλινικά για την αντιμετώπιση παθογόνων στελεχών των γενών *Streptococcus*, *Haemophilus Neisseria*, *Staphylococcus* και *Mycoplasma*. Οι τρέχουσες έρευνες έχουν προσανατολιστεί στην κλινική αντιμετώπιση παθογόνων στελεχών τα οποία έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (Gross *et al.*, 2009).

Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μουπιροσύνης βρέθηκε ότι βρίσκονται σε μια ευρύτερη ρυθμιστική περιοχή μεγέθους 74kb (**Εικόνα 3.9**). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει 35 γονίδια καθένα από τα οποία κωδικοποιεί για δομικά ένζυμα, ρυθμιστικούς παράγοντες και πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Μεταξύ των γονιδίων αυτών ξεχωρίζουν έξι (*mmpA-F*), τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα με πολλές λειτουργικές υπομονάδες (domains) με ομοιότητα με πεπτιδικές συνθάσες τύπου I (PKS I) και με συνθάσες λιπαρών οξέων. Η ονοματολογία των ενζύμων που κωδικοποιεί καθένα από τα 35 γονίδια φαίνεται στον **Πίνακα 3.9** (Ramos, 2004).

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του Α ψευδομονικού οξέος πιθανότατα ξεκινάει με το ενζυμικό σύστημα των MurU και MurQ τα οποία ενεργοποιούν φωσφορυλιώνοντας την ακετυλομάδα του ακέτυλο συνενζύμου Α. Στη συνέχεια, η

MmpD είναι υπεύθυνη για την σύνθεση ενός μορίου με δώδεκα άτομα άνθρακα (Εικόνα 3.9) στο οποίο προστίθενται δύο μόρια μηλονικού με τη δράση του ενζύμου MmpA. Το ενδιάμεσο προϊόν είναι ένας β-κετοθειοεστέρας με δεκαπέντε άτομα άνθρακα, το οποίο μεθυλιώνεται στον C₁₅ με τη δράση του ενζύμου MupH. Ο ακριβής μηχανισμός σχηματισμού του τετραϋδροπυρανικού δακτυλίου βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι στις αντιδράσεις αυτές εμπλέκεται το ένζυμο MupW. Το προϊόν των αντιδράσεων αυτών είναι το μονικό οξύ (Gross *et al.*, 2009).

Πίνακας 3.9: Λειτουργίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια, με τη σειρά που εμφανίζονται στη γονιδιωματική περιοχή της μουπιροσύνης (Ramos, 2004)

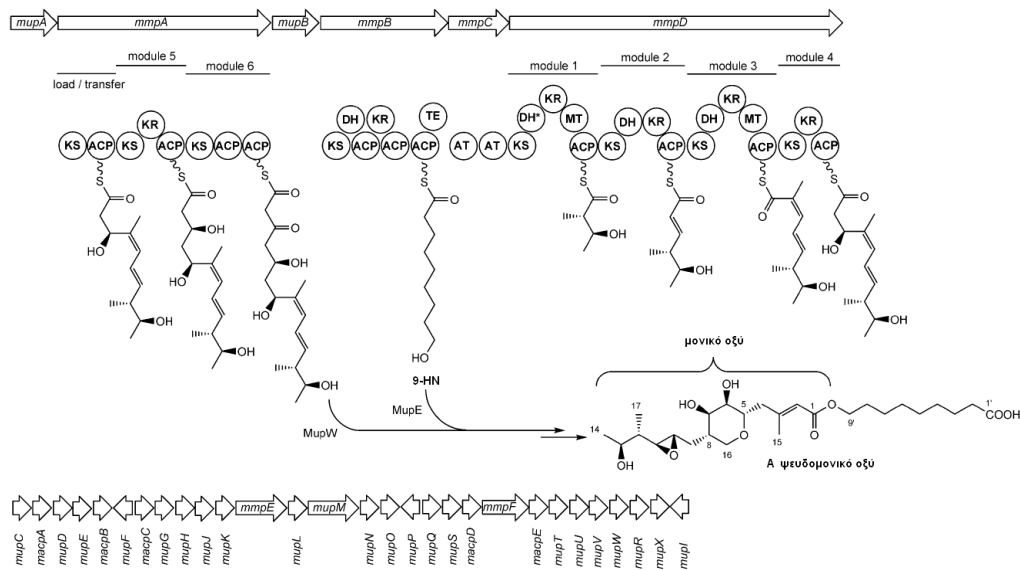
γονίδιο	Λειτουργία	γονίδιο	Λειτουργία
<i>mupA</i>	FMNH ₂ εξαρτώμενη οξυγονάση	<i>mupL</i>	υδρολάση
<i>mmpA</i>	PKS	<i>mupM</i>	συνθάση του tRNA της ισολευκίνης
<i>mmpB</i>	3-οξοάκυλο-ACP συνθάση	<i>mupN</i>	μεταγραφικός παράγοντας
<i>mmpC</i>	ακυλοτρανσφεράση	<i>mupO</i>	κυτόχρωμα P450
<i>mmpD</i>	PKS	<i>mupP</i>	άγνωστη λειτουργία
<i>mupC</i>	NADH οξειρεδοκτάση	<i>mupQ</i>	άκυλο-CoA συνθάση
<i>macrA</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας ακυλομάδων	<i>mupS</i>	3-οξοάκυλο-ACP συνθάση
<i>mupD</i>	3-οξοάκυλο-ACP ρεδοκτάση	<i>macrD</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας ακυλομάδων
<i>mupE</i>	ενόυλο ρεδοκτάση	<i>mmpF</i>	PKS
<i>macrB</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας ακυλομάδων	<i>macrE</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας ακυλομάδων
<i>mupF</i>	κετορεδοκτάση	<i>mupT</i>	διοξειγενάση της φερρεδοξίνης
<i>macrC</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας ακυλομάδων	<i>mupU</i>	άκυλο-CoA συνθάση
<i>mupG</i>	3-οξοάκυλο-ACP συνθάση	<i>mupV</i>	οξειδορεδοκτάση
<i>mupH</i>	HMG-CoA συνθάση	<i>mupW</i>	διοξυγενάση
<i>mupJ</i>	ενόυλο-CoA υδρογονάση	<i>mupR</i>	μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιούμενος από N-AHL
<i>mupK</i>	ενόυλο-CoA υδρογονάση	<i>mupX</i>	αμιδάση
<i>mmpE</i>	PKS-υδροξυλάση	<i>mupI</i>	N-AHL συνθάση

PKS: polyketide synthase (πολυκετιδική συνθάση), CoA: συνένζυμο A, AHL: λακτόνες της άκυλομοσερίνης, HMG: 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ

Το ένζυμο MmpB καταλύει την συμπύκνωση τριών μορίων μηλικού οξέος με ένα μόριο 3-υδροξυ-προπιονικού οξέος, με τελικό προϊόν το 9-HN (9-υδροξυ-ενιανοϊκό οξύ) (Εικόνα 3.9). Για τα MupC, MupO, MupS, MupV και MacrE έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι καταλύουν την αντίδραση πρόσδεσης του 9-HN στο μόριο του μονικού οξέος, έχοντας ως τελικό προϊόν το A ψευδομονικό οξύ, ενώ τα MupQ, MupS, MupT εμπλέκονται στην παραγωγή του B ψευδομονικού οξέος. Τέλος, το γονίδιο *mupM* προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, μιας και κωδικοποιεί μια PeRS η οποία δεν αναγνωρίζεται από την μουπιροσύνη. Ο ρόλος των υπολοίπων ενζύμων στην βιοσύνθεση της μουπιροσύνης είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Ramos, 2004).

Τα γονίδια *mupR* και *mupI* κωδικοποιούν ένα σύστημα μεγέθους πληθυσμού, στο οποίο η συνθάση των N-AHL είναι η MupI και ο μεταγραφικός παράγοντας ο

οποίος ενεργοποιείται από τις N-AHL είναι η MurR. Η MurR επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *mupA*, το οποίο βρίσκεται πρώτο σε σειρά στη γονιδιωματική περιοχή της μουπιροσύνης, αλλά υπάρχει η υποψία ότι επάγει την μεταγραφή ολόκληρης της περιοχής. Ακόμα, η υπερέκφραση του *mupR* έχει ως αποτέλεσμα τον δεκαεφταπλασιασμό της παραγωγής του αντιβιοτικού. Στο σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού MurI/MurR αποδείχθηκε πρόσφατα ότι το MurX έχει ρυθμιστικό ρόλο, μιας και είναι ικανό να αποδομεί τις N-AHL (Hothersall *et al.*, 2011).



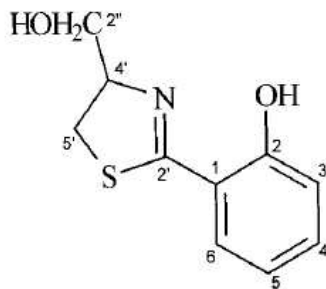
Εικόνα 3.9: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του ψευδομονικού οξέος A και η οργάνωση της γονιδιωματικής περιοχής, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση (Gross *et al.*, 2009)

1.3.10. Αερουτζίνη

Η αερουτζίνη αποτελεί μια ετεροκυκλική ένωση η οποία περιλαμβάνει στο μόριό της ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα θειαζολικό δακτύλιο (**Εικόνα 3.10.1**). Η ικανότητα παραγωγής του αντιβιοτικού έχει εντοπιστεί στο στέλεχος *Ps. fluorescens* MM-B16, το οποίο απομονώθηκε από εδάφη στην Κορέα. Το στέλεχος MM-B16 έχει την ικανότητα καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea*, *P. ultimum* και *Phytophthora capsici* (Lee *et al.*, 2003).

Η αερουτζίνη αποτελεί μια ετεροκυκλική ένωση η οποία περιλαμβάνει στο μόριό της ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα θειαζολικό δακτύλιο (**Εικόνα 3.10.1**). Η ικανότητα παραγωγής του αντιβιοτικού έχει εντοπιστεί στο στέλεχος *Ps.*

fluorescens MM-B16, το οποίο απομονώθηκε από εδάφη στην Κορέα. Το στέλεχος MM-B16 έχει την ικανότητα καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea*, *P. ultimum* και *Phytophthora capsici* (Lee *et al.*, 2003).



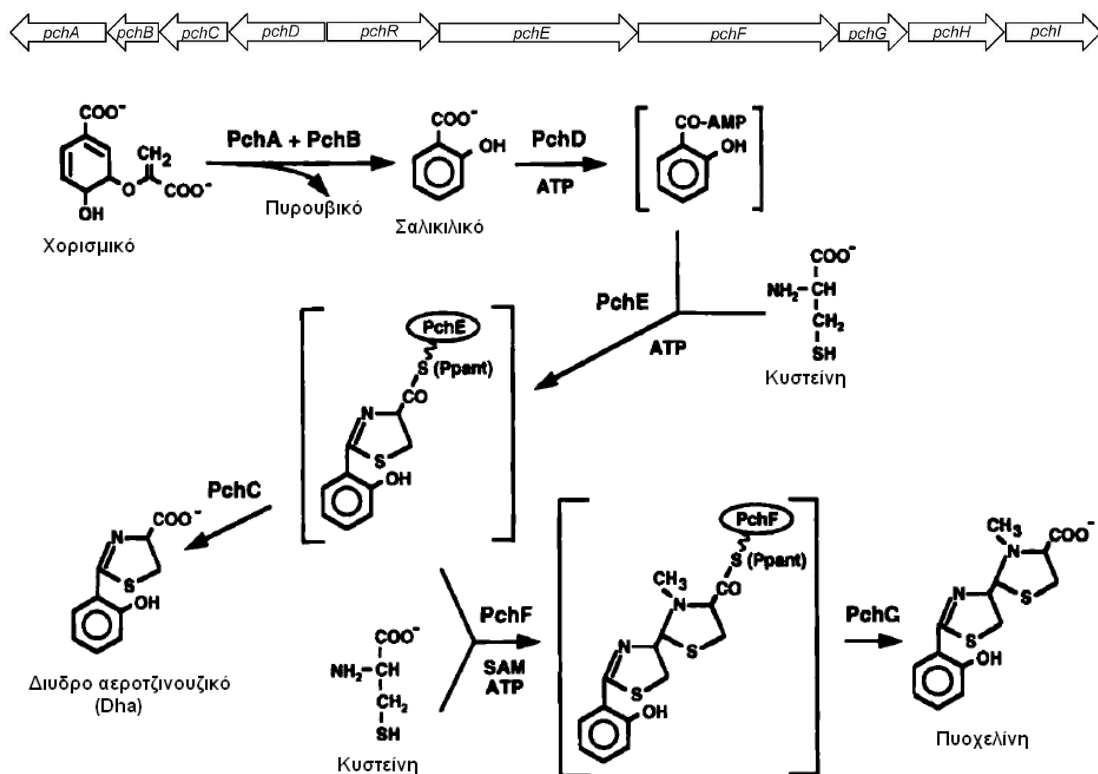
Εικόνα 3.10.1: δομή της αερουτζίνης (Lee *et al.*, 2003)

Η ικανότητα βιοσύνθεσης ενός ανάλογου μορίου της αερουτζίνης βρέθηκε αρχικά στα στελέχη *Ps. aeruginosa* PAO1, 590 και *Ps. fluorescens* P3, PFM2. Το μόριο αυτό είναι το δίδυδρο-αεροτζινουζικό οξύ (Dha), το οποίο είναι προϊόν του βιοσυνθετικού μονοπατιού του σιδηροφόρου πυοχελίνης (**Εικόνα 3.10.2**). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αερουτζίνης, παρόλο που δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως μέχρι σήμερα, πιστεύεται ότι είναι παρόμοιο με το βιοσυνθετικό μονοπάτι του Dha και της πυοχελίνης (Reimmann *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003).

Κατά τη βιοσύνθεση του Dha (**Εικόνα 3.10.2**), ως πρόδρομο μόριο χρησιμοποιείται το χορισμικό οξύ, το οποίο με τη δράση των ενζύμων PchA και PchB μετατρέπεται σε σαλικυλικό. Τα ένζυμα PchA και PchB αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα την συνθάση του ισοχορισμικού και την λύση του ισοχορισμικού. Στη συνέχεια το ένζυμο PchD, το οποίο είναι μια AMP λιγάση, αδενυλιώνει το σαλικυλικό και το προϊόν προσδένεται στην περιοχή του ενζύμου PchE, η οποία δρα ως μεταφορέας πεπτιδομάδων. Ακολούθως, η λειτουργική περιοχή επιμερίωσης της PchE καταλύει τη μετατροπή της L-κυστεΐνης σε D-κυστεΐνη και ακόμα μια περιοχή μεταφορέας πεπτιδομάδων καταλύει την πρόσδεση της D-κυστεΐνης στο μόριο του AMP-σαλικυλικού. Η περιοχή κυκλοποίησης του PchE είναι υπεύθυνη για την δημιουργία του θειαζολικού δακτυλίου. Τέλος, το ένζυμο PchC, το οποίο έχει τη δομή μιας θειοεστεράσης, καταλύει την αποδέσμευση του Dha από το PchE (Gross *et al.*, 2009).

Όπως γίνεται αντιληπτό το PchE έχει την δράση μιας NRPS συνθετάσης και περιέχει τις εξής λειτουργικές περιοχές PCP-Cy-A-E-PCP. Η PchF έχει και αυτή τη

δράση μιας NRPS συνθετάσης και καταλύει την προσθήκη και κυκλοποίηση ενός μορίου L-κυστεΐνης στο Dha, με τελικό προϊόν την πυοχελίνη. Η αποδέσμευση της πυοχελίνης από την PchF καταλύεται από την λειτουργική περιοχή της θειοεστεράσης και ακολουθεί μια αντίδραση αναγωγής του νεοσχηματισθέντος θειαζολικού δακτυλίου. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την PchG, η οποία έχει την λειτουργία μιας ρεδουκτάσης (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 3.10.2: Η γονιδιωματική περιοχή και το μοντέλο βιοσύνθεσης του Dha και της πυοχελίνης στο βακτήριο *Ps. aeruginosa*. SAM: S-αδενοσυλομεθειονίνη (Reimmann *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2009).

Στην περιοχή των δομικών γονιδίων του Dha και της πυοχελίνης, η οποία έχει μέγεθος 21kb, βρίσκονται ρυθμιστικά γονίδια καθώς και γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για το εκκριτικό σύστημα των δύο ενώσεων (Εικόνα 3.10.2). Το γονίδιο *pchR* κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος επάγει την έκφραση των δομικών γονιδίων *pchE* και *pchF*. Απενεργοποίηση της έκφρασης του παράγοντα PchR είχε ως αποτέλεσμα την παύση της βιοσύνθεσης του Dha και της πυοχελίνης (Reimmann *et al.*, 1998). Τέλος, τα γονίδια *pchH* και *pchI* κωδικοποιούν για ένα εκκριτικό σύστημα τύπου ABC (Gross *et al.*, 2009).

Η βιοσύνθεση των δύο ενώσεων ελέγχεται από δύο ακόμα παράγοντες, την συγκέντρωση Fe^{3+} στο μέσο ανάπτυξης και από τη συγκέντρωση της πυοχελίνης. Η χαμηλή συγκέντρωση Fe^{3+} έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των γονιδίων *pchE* και *pchF*. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της πυοχελίνης, το σύστημα ακολουθεί το μοντέλο της θετικής αυτεπαγωγής. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πυοχελίνης έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *pchE* και *pchF* (Reimmann *et al.*, 1998).

1.4. Κυκλικά λιποπεπτίδια

Τα κυκλικά λιποπεπτίδια (CLPs) αποτελούν μια σχετικά νέα οικογένεια μορίων με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Συνήθως, αποτελούνται από μια αλυσίδα ενός λιπαρού οξέος η οποία είναι προσδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο μιας σχετικά μικρής πεπτιδικής αλυσίδας. Πολλές φορές, στην πεπτιδική αλυσίδα παρουσιάζεται ένας δακτύλιος λακτόνης, ο οποίος δημιουργείται από την κυκλοποίηση δύο αμινοξικών καταλοίπων της. Αναλόγως του μεγέθους της πεπτιδικής αλυσίδας και της αλυσίδας του λιπαρού οξέος τα CLPs κατηγοριοποιούνται σε διάφορες ομάδες, οι οποίες διαφέρουν από γένος σε γένος (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Η ικανότητα βιοσύνθεσης τέτοιων ενώσεων έχει βρεθεί σε διάφορα γένη βακτηρίων και μυκήτων, μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση κατέχουν τα γένη *Bacillus* και *Pseudomonas*. Στελέχη με την ικανότητα παραγωγής CLPs έχουν απομονωθεί από μια πληθώρα περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως εδάφους, ριζόσφαιρας, φυλλόσφαιρας αλλά και από τον θαλάσσιο υδροβιόκοσμο, ενώ τα στελέχη που τα παράγουν έχουν είτε παθογόνες ιδιότητες είτε ιδιότητες βιολογικής καταπολέμησης (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Στα στελέχη των παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης, τα οποία έχουν την ικανότητα παραγωγής CLPs, είναι δυνατό να παρατηρείται και η ικανότητα παραγωγής συγκεκριμένων αντιβιοτικών. Έτσι, η βιολογική καταπολέμηση από τα στελέχη αυτά είναι δυνατό να είναι αποτέλεσμα όχι μόνο των παραγομένων αντιβιοτικών αλλά της συνδυαστικής δράσης αντιβιοτικών και CLPs (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Τα CLPs είναι ενώσεις με μεγάλη χημική σταθερότητα, σε αντίθεση με ορισμένα αντιβιοτικά τα οποία έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη θερμοευαισθησία και φωτοευαισθησία. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωσή τους σε εδαφικό περιβάλλον παραμένει σταθερή για τις δύο πρώτες μέρες της επέμβασης, ενώ

η πλήρης αποδόμισή τους συμβαίνει μετά από μια έως τρεις εβδομάδες. Η σταθερότητα των CLPs στο εδαφικό περιβάλλον βρίσκεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα και συνήθως εξαρτάται από τον ρυθμό ανάπτυξης της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας και από τις πρωτεάσες οι οποίες παράγονται (Fernando *et al.*, 2005).

1.4.1. Δράση των CLPs

Η οικογένεια των CLPs περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες έχουν μεγάλη τασιενεργή δράση (biosurfactant). Η ικανότητα τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση είναι αποτέλεσμα των ιδιοτήτων των επιμέρους δομικών μονάδων. Η πεπτιδική αλυσίδα έχει πολικές ιδιότητες, οι οποίες διαφέρουν αναλόγως του βαθμού υδροφοβικότητας του κάθε αμινοξέος, ενώ η αλυσίδα του λιπαρού οξέος έχει υδρόφοβο χαρακτήρα. Οι δύο αυτές δομικές μονάδες των CLPs τους προσδίδουν αμφιφιλικές ιδιότητες και επομένως επιφανειοδραστική ικανότητα (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Εκτός από την δράση τους ως biosurfactants, τα CLPs εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στη φυσιολογία των μικροοργανισμών που τις παράγουν. Έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατό να δρουν ως χηλικοί παράγοντες αυξάνοντας την διαθεσιμότητα υποστρωμάτων τα οποία δεν είναι υδατοδιαλυτά, και ακόμα να προάγουν την ικανότητα χημειοτακτισμού-μετακίνησης, βοηθώντας έτσι στην εποίκιση επιφανειών και δημιουργία βιοφίλμ. Ορισμένες ομάδες της οικογένειας των CLPs είναι δυνατόν να εμφανίζουν αντιβιοτική δράση ενώ άλλες εμφανίζουν μεγάλη φυτοτοξικότητα (Raaijmakers *et al.*, 2006; de Bruijn *et al.*, 2009).

Προκειμένου για τις φυτοτοξικές CLPs, όπως είναι κάποιες συριγγομυκίνες, συριγγοπεπτίνες και τολασίνες από το γένος *Pseudomonas*, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι έχουν την ικανότητα να πολυμερίζονται δημιουργώντας μια τεχνητή μεμβράνη πάνω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτού. Η μεμβράνη, η οποία δημιουργείται από CLPs, έχει πόρους ενεργητικής διάχυσης ιόντων από και προς το εσωτερικό τους. Οι πόροι αυτοί, οι οποίοι έχουν διαφορετική διάμετρο αναλόγως των πολυμερών που σχηματίζονται, διαθέτουν την ικανότητα να μεταφέρουν ιόντα H^+ και Ca^+ προς το εσωτερικό και ιόντα K^+ προς το εξωτερικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του Ph των φυτικών μεμβρανών και την επαγωγή διαφόρων μοριακών σημάτων του φυτού τα οποία έχουν ως περιβαλλοντικό ερέθισμα την μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, με τελική συνέπεια την λύση των κυττάρων. Ακόμα, ορισμένες από τις φυτοτοξικές CLPs έχουν την

ικανότητα να παρεμποδίζουν τη δράση των φυτικών ΑΤΡασών και φωσφολιπασών (Ramos,2004).

Η καταπολέμηση παθογόνων παραγόντων, όπως ιοί, μύκητες και βακτήρια, από στελέχη βιολογικών παραγόντων, τα οποία έχουν την ικανότητα παράγωγής CLPs, βασίζονται στις επιφανειοδραστικές ιδιότητες των CLPs. Η βισκοσίνη, η οποία παράγεται από στελέχη του γένους *Pseudomonas*, αλλά και η σουρφακτίνη, η οποία παράγεται από στελέχη του γένους *Bacillus*, έχουν την ικανότητα καταπολέμησης παθογόνων ιών του ανθρώπου, όπως είναι διάφοροι έρπητοϊοί και ο ιός της βρογχίτιδας. Τα CLPs αυτά δεσμεύονται στην λιπιδική στοιβάδα των ιών προκαλώντας την αποσύνθεση των πρωτεϊνών του ιϊκού καψιδίου (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι στελέχη του γένους *Pseudomonas* τα οποία παράγουν τα CLPs βισκοσίνη και μασσετολίδες έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τα παθογόνα *Trypanosoma cruzi* και *P. ultimum*, αντίστοιχα. Η καταπολέμηση αυτή βασίζεται στο μπλοκάρισμα και στην καταστροφή του μηχανισμού των μαστιγίων, με τα οποία γίνεται η κίνηση των παθογόνων, λόγω της τασιενεργής δράσης των CLPs που συγκεντρώνονται στην περιοχή (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Τα CLPs έχουν την ικανότητα να σταματούν την ανάπτυξη των υφών των μυκήτων με αποτέλεσμα την καταπολέμηση τους. Προσθήκη βισκοσίνης, μασσετολίδων, αμφισίνης, τολασίνης ή εκομυκήνων στο μέσο ανάπτυξης μυκήτων έχει ως αποτέλεσμα ανωμαλίες στη μορφολογία των μυκήτων όπως την αύξηση της διακλάδωσης των υφών, την δημιουργία πολλών σέπτων και το 'πρήξιμο' (swelling) των υφών. Εκτός από τη μεταβολή των μορφολογικών χαρακτηριστικών παρατηρείται μεταβολή στη φυσιολογία του μύκητα, η οποία συνοψίζεται στην μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας και μεταβολή της μορφολογίας των μιτοχονδρίων. Ο ακριβής μηχανισμός της καταπολέμησης αυτής δεν έχει πλήρως εξηγηθεί, πιστεύεται όμως ότι η καταπολέμηση οφείλεται στην τασιενεργή δράση των CLPs (Ramos, 2004).

Ακόμα μια κατασταλτική ιδιότητα των CLPs είναι η παρεμπόδιση της βλάστησης σπορίων των μυκήτων. Για πολλά CLPs, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και οι συριγκοπεπτίνες και οι συριγκολίνες από φυτοπαθογόνα στελέχη *Ps. syringae*, έχει σημειωθεί η ικανότητα παρεμπόδισης της εκβλάστησης σπορίων και κονιδίων. Η δράση αυτή είναι ακόμα πιο έντονη όταν το στέλεχος το οποίο παράγει CLPs έχει την ικανότητα να παράγει ένζυμα που αποδομούν το

κυτταρικό τοίχωμα των κονιδίων, όπως ενδοχιτινάσες και γλουκανάσες. Η συνεργιστική επίδραση CLPs και ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων (Ramos, 2004).

Συνεργιστική επίδραση στην καταπολέμηση έχει παρατηρηθεί μεταξύ των CLPs και φεναζινών. Τα CLPs, λόγω μεγάλης τασιενεργής δράσης, συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των υφών του φυτοπαθογόνου μύκητα αραιώνοντας τις υφές, καταστρέφοντας τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών και δημιουργώντας ένα λεπτό φιλμ γύρω από αυτές. Ακόμα πιστεύεται ότι λειτουργούν ως μόρια μεταφορείς των φεναζινών, με αποτέλεσμα τη μεταφορά των αντιβιοτικών στο εσωτερικό του φιλμ αυτού, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση των φεναζινών στα σημεία όπου έχει καταστραφεί η δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη και πιο άμεση επαφή των φεναζινών με το κυτταρόπλασμα του παθογόνου, γεγονός που καθιστά πιο δραστική την καταπολέμηση. Ένας τέτοιος μηχανισμός πιστεύεται ότι χρησιμοποιείται από το στέλεχος *Pseudomonas* CMR12a στην βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων των γενών *Rhizoctonia*, *Pythium* και *Verticillium* (Debode *et al.*, 2006; D'aes *et al.*, 2011).

Η κατασταλτική δράση των CLPs δεν περιορίζεται μόνο σε φυτοπαθογόνους μύκητες. Τα CLPs έχει παρατηρηθεί ότι έχουν κατασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη Gram⁺ βακτηρίων. Υπάρχει η πεποίθηση ότι το κυτταρικό τοίχωμα των Gram⁻ βακτηρίων είναι ανθεκτικό έναντι των CLPs αποτρέποντάς τα να εισέλθουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα ορισμένων Gram⁺ αποτελείται από μόρια με μεγάλη υδροφοβικότητα (όπως τα λιποτοιχικά οξέα), γεγονός που εικάζεται ότι ευνοεί την εισαγωγή των υδρόφοβων CLPs (Ramos, 2004).

Σε ορισμένα στελέχη του γένους *Bacillus* έχει αποδειχθεί ότι οι CLPs έχουν την ικανότητα να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με διάφορα κατιόντα (Zn^{+2} , Ca^{+2} και Mg^{+2}) μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα των στοιχείων αυτών στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Κάτι ανάλογο δεν έχει αναφερθεί, ακόμα, για τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Η ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων είναι ανάλογη της υδροφοβικότητας των αμινοξικών καταλοίπων την πεπτιδικής αλυσίδας των CLPs. Έτσι, CLP, όπως η σουρφακτίνη η οποία περιέχει λιγότερο υδροφοβικά αμινοξέα, έχουν μικρότερη ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων από CLP, όπως η λιχενισύνη η οποία έχει στην πεπτιδική της αλυσίδα αμινοξέα με μεγαλύτερη υδροφοβικότητα (Ramos, 2004).

Το βακτήριο *Ps. entomophila*, το οποίο απομονώθηκε από έδαφος με κατασταλτικές ιδιότητες έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *P. ultimum*, έχει τοξική δράση κατά του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να παράγει ένα CLP, την εντολυσίνη, στην οποία έχει αποδοθεί η τοξική ιδιότητα προς το έντομο και η κατασταλτική δράση έναντι στον φυτοπαθογόνο μύκητα. Η εντολυσίνη αποδείχθηκε ότι έχει αιμολυτικές ιδιότητες οι οποίες έγκειται στην ικανότητα λύσης των ερυθροκυττάρων (Vallet-Gely *et al.*, 2010).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ορισμένα CLPs έχουν την ικανότητα να προσδένονται στην αμινοτελική περιοχή των Hsp90 πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας της τσαπερόνης στις πρωτεΐνες της οικογένειας των Hsp90. Μεταξύ των CLPs με τη δράση αυτή είναι η γκραμυσιδίνη B, η κολιστίνη και η πολυμυξίνη B. Τα CLPs αυτά δεν εμφανίζουν καμία επίδραση σε πρωτεΐνες Hsp μικρότερου μοριακού βάρους (Minagawa *et al.*, 2011).

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις με το παθογόνο και την καταπολέμηση του με όλους τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, τα CLPs παίζουν σπουδαίο ρόλο στη φυσιολογία του βακτηρίου που τα βιοσυνθέτει. Έχει βρεθεί ότι, τα CLPs σχετίζονται με την προσκόλληση σε διάφορες επιφάνειες, τη δημιουργία βιοφίλμ και την κινητικότητα των βακτηρίων. Οι πουτισολβίνες, η αρθροφακτίνη και η σουρφακτίνη έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν τα βιοφίλμ που δημιουργούν ορισμένα παθογόνα, ενώ CLPs όπως η αμφισίνη, η τενσίνη, οι βισκοσίνες και η σεραβετίνη (serrawettin) ενισχύουν την ικανότητα κίνησης πολλών βιολογικών παραγόντων (Raaijmakers *et al.*, 2006).

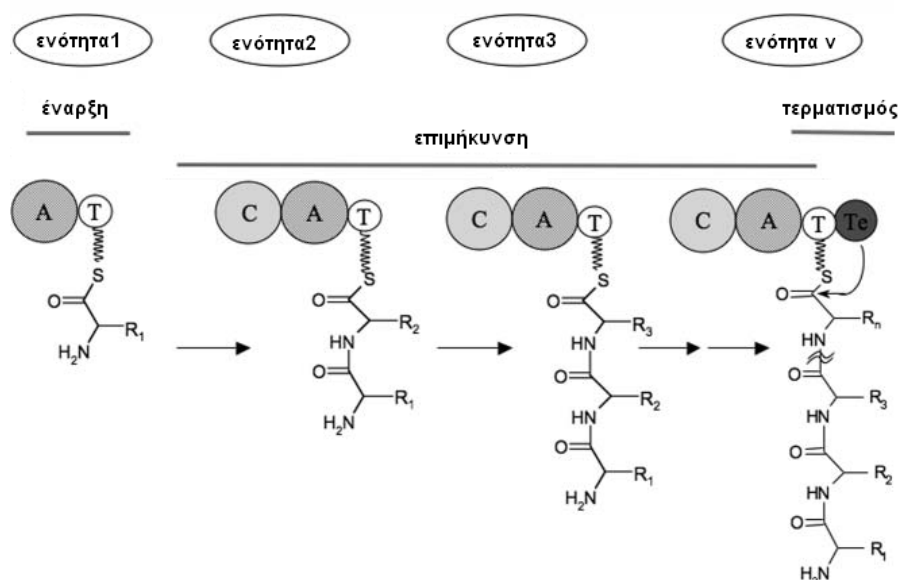
Τέλος, από πρόσφατες έρευνες έχει δημιουργηθεί το ερώτημα αν τα CLPs παίζουν ρόλο στην επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας (ISR) στα φυτά. Το στέλεχος του βιολογικού παράγοντα *Ps. fluorescens* R1SS101, το οποίο έχει την ικανότητα παραγωγής των μασσετολιδών, είναι δυνατόν να επάγει την ISR σε φυτά τομάτας έναντι σαπροφυτικών βακτηριακών στελεχών του είδους *Ps. fluorescens*. Η επαγωγή ISR σε παθογόνους μύκητες του γένους *Phytophthora* από το στέλεχος R1SS101 δεν ήταν εφικτή (Tran *et al.*, 2007).

1.4.2. Βιοσύνθεση CLPs

Στη βιοσύνθεση των CLPs εμπλέκονται, αποκλειστικά, μεγάλα ενζυμικά συστήματα με πολλές λειτουργίες, οι NRPS (non ribosomal peptide synthases). Οι NRPS έχουν αρκετά υψηλή ομοιότητα με τις τύπου II θειοεστεράσες των λιπαρών

οξέων και ο ρόλος τους είναι η προσθήκη ακυλομάδων ή αμινοξέων σε μια πεπτιδική αλυσίδα. Εκτός από τη βιοσύνθεση των CLPs εμπλέκονται στη βιοσύνθεση πολλών αντιβιοτικών από διάφορα γένη βακτηρίων αλλά και μυκήτων, όπως γκραμυσιδίνη, πενικιλίνη, κυκλοσπορίνη, εργοταμίνη και βανκομυκίνη (Doekel *et al.*, 2001).

Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-λειτουργίας, έχει δημιουργηθεί η έννοια της ενότητας (module). Με τον όρο ενότητα εννοούμε μια μεγάλη περιοχή του ενζύμου η οποία περιλαμβάνει πολλές μικρότερες λειτουργικές περιοχές (domains) και είναι δυνατόν να επαναλαμβάνεται κατά μήκος της NRPS. Μια NRPS συνήθως αποτελείται από πολλές ενότητες οι οποίες έχουν διαφορετικό ρόλο στη σύνθεση των CLPs (**Εικόνα 4.2**). Αρχικά απαντάται μια ενότητα, η οποία έχει τον ρόλο έναρξης της σύνθεσης, στη συνέχεια υπάρχει ένα πλήθος από ενότητες οι οποίες παίζουν ρόλο στην επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας και στο τέλος βρίσκεται η ενότητα (ενότητα ν) η οποία σηματοδοτεί τη λήξη της σύνθεσης (Donadio *et al.*, 2007).



Εικόνα 4.2: Οι βασικές ενότητες-modules των NRPS και ο ρόλος τους στη σύνθεση των CLPs (Donadio *et al.*, 2007).

Η βασική ενότητα ενός ενζύμου NRPS αποτελείται από τις εξής τρεις λειτουργικές περιοχές (**Εικόνα 4.2**) (Gross *et al.*, 2009):

- την περιοχή αδενυλίωσης ή A, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των αμινοξέων που πρόκειται να προστεθούν στην πεπτιδική αλυσίδα

- την περιοχή θειοεστεροποίησης του πεπτιδικού μεταφορέα ή PCP-T, η οποία έχει την ικανότητα να δημιουργεί θειοεστερικούς δεσμούς μεταξύ του ενζύμου και των ενεργοποιημένων αμινοξέων, και
- την περιοχή συμπύκνωσης ή C, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία πεπτιδικών δεσμών και την σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας

Πολλές φορές, η κάθε ενότητα εκτός από τις τρεις βασικές λειτουργικές περιοχές είναι δυνατόν να περιλαμβάνει και περιοχές με άλλες λειτουργίες. Οι περιοχές αυτές είναι οι εξής (Gross *et al.*, 2009):

- TE: περιοχή θειοεστεράσης, η οποία κόβει το άκρο της νεοσυντεθειμένης πεπτιδικής αλυσίδας έχοντας ως αποτέλεσμα τη λήξη της σύνθεσης. Η περιοχή αυτή υπάρχει μόνο στην τελευταία ενότητα κάθε NRPS.
 - Cy: περιοχή κυκλοποίησης, η οποία καταλύει την κυκλοποίηση μεταξύ δύο ή περισσότερων αμινοξικών καταλοίπων της νεοσυντεθειμένης πεπτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυκλικού μορίου
 - E: περιοχή επιμερίωσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της L- σε D- διαμόρφωση σε ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα
 - MT: περιοχή μεθυλοτρασφεράσης, η οποία καταλύει την μεταφορά μιας μεθυλομάδας στην πεπτιδική αλυσίδα. Δότης της μεθυλομάδας αυτής πολλές φορές αποτελεί το SAM (S-αδενόσυλο μεθειονίνη) και
- R: περιοχή ρεδουκτάσης, η οποία καταλύει τη δημιουργία διπλών δεσμών μεταξύ των ατόμων άνθρακα στην πεπτιδική αλυσίδα ή στον σχηματισθέν δακτύλιο. Η περιοχή αυτή έχει την λειτουργία μιας θειοεστερικής ρεδουκτάσης, η οποία έχει αποδειχθεί ότι παρουσία του NADPH καταλύει την αναγωγή του θειοεστερικού δεσμού με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πεπτιδικής αλυσίδας και τη δημιουργία στο άκρο της μιας αλδεϋδομάδας ή μιας αλκοόλης (Bushley *et al.*, 2010).

Η κάθε λειτουργική περιοχή αποτελείται από καταλυτικά τμήματα (core) τα οποία είναι συντηρημένα (Πίνακας 4.2). Τα τμήματα αυτά έχουν πλήρως χαρακτηριστεί και η αλληλουχία τους (consensus sequence) είναι διαθέσιμη προκειμένου να χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση παρόμοιων λειτουργικών περιοχών σε ενζυμικά συστήματα NRPS (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003).

Πίνακας 4.2: Συντηρημένα μοτίφ των λειτουργικών περιοχών (domain) (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003)

domain ^a	core(s) ^b	consensus sequence	domain ^a	core(s) ^b	consensus sequence
adenylation	A1	L(TS)YxEL	Cy-domains	Cy1	FPL(TS)xxQxAYxxGR
	A2 (core 1)	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	A3 (core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		C3	D(NLI)xDxxS
	A4	FDxS		Cy3	LPxxPxLPLxxxP
	A5	NxYGPTE		Cy4	(TS)(PA)3x(LAF)6x(IVT)LxxW
	A6 (core 3)	GELxIxGxG(VL)ARGYL		Cy5	(GA)DFTxLxLL
	A7 (core 4)	Y(RK)TGDL		Cy6	PVVFTSxL
	A8 (core 5)	G Rx Dx QV K I R G x R I E L G E I E	Cy7	(ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD	
	A9	LPxYM(IV)P	Ox-domains	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VQ
	A10	NGK(VL)DR		Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
T (core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(LI)	Ox3		IxxxYG	
thiolation condensation	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	R-domains	R1	V(L)(L)TG(A)TG(F)(L)GxxLL
	C2	RHExLRTxX		R2	Vx(L)(L)VR(A)
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S		R3	GPL(G)x(P)x(L)GL
	C4	YxD(FY)AVW		R4	V(Y)PYxYLxx(P)NVxxT
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR		R5	G Y x x S K W (A) (A) E
	C6	(HN)QD(YV)PFE		R6	R(P)G
	C7	RDxSRNPL		R7	YxxxxG(LF)LxxP
thioesterase epimerization	TE	C(HY)SxG	N-methylation	M1 (SAM)	VL(DE)GxGxG
	E1	PIQxWF		M2	NELSxYRYxAV
	E2 (His)	HHxISDG(WV)S		M3	VExSxARQxGxLD
	E3 (race A)	DxLLxXG			
	E4 (race B)	EGHGRE			
	E5 (race C)	RTVGVWFTxxYP(YV)PFE			
	E6	PxxGxGYG			
E7 (race D)	FNYLG(QR)				

Σε παρενθέσεις δίπλα ακριβώς από την ονομασία των συντηρημένων τμημάτων (cores) βρίσκεται η παλαιότερη ονοματολογία τους

Επικρατεί η αντίληψη ότι οι NRPS είναι δυνατό να διακριθούν σε δύο τύπους. Ο τύπος I, ο οποίος είναι ο πιο διαδεδομένος, αναφέρεται σε ένα πολυπεπίδιο στο οποίο βρίσκονται όλες οι ενότητες μιας NRPS. Κατά τον τύπο II οι λειτουργικές περιοχές, οι οποίες απαρτίζουν μια ενότητα, είναι δυνατόν να βρίσκονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες, έχοντας στο σύνολό τους την λειτουργία μιας NRPS. Οι NRPS τύπου II είναι πιο σπάνιες και συνήθως κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται στην ίδια γονιδιωματική περιοχή (Hurl *et al.*, 2009). Μια ολοκληρωμένη εικόνα των λειτουργικών περιοχών για κάθε NRPS που έχει βρεθεί και όλων των παραγομένων CLPs και αντιβιοτικών παρουσιάζεται από τη βάση δεδομένων SBSPKS (Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases) (Anand *et al.*, 2010).

1.4.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των CLPs στο γένος *Pseudomonas*

Όπως στην βιοσύνθεση των αντιβιοτικών (§3.3) έτσι και η βιοσύνθεση των CLPs υπόκειται σε διάφορους παράγοντες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση. Παρόλο που τα μονοπάτια βιοσύνθεσης των CLPs έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την βιοσύνθεση είναι ακόμα υπό μελέτη στο κάθε σύστημα (Ramos J.L., 2004).

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την βιοσύνθεση των CLPs είναι δυνατόν να διακριθούν στους αβιοτικούς (θερμοκρασία, διαθεσιμότητα O₂, pH, πηγές άνθρακα και αζώτου, διαθεσιμότητα ιχνοστοιχείων) και στους βιοτικούς (σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS, σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, παράγοντες σίγμα, Hsp70). Ο βασικότερος από τους βιοτικούς παράγοντες, ο οποίος επηρεάζει τη βιοσύνθεση των CLPs στο γένος *Pseudomonas*, είναι το σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS. Η βιοσύνθεση των CLPs αμφισίνης, πουτισολβίνης, συριγκομυκίνης, μασσετολιδίων και βισκοσίνης ελέγχεται από ένα σύστημα GacA/GacS με τέτοιο τρόπο ώστε στελέχη στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το σύστημα αυτό, χάνουν την ικανότητα βιοσύνθεσης των CLPs (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Ο βιολογικός παράγοντας *Pseudomonas* CMR12a έχει την ικανότητα παραγωγής δύο CLPs τα οποία ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες. Έχει αποδειχθεί ότι το σύστημα των δύο παραγόντων GacA/GacS ρυθμίζει την βιοσύνθεση των δύο CLPs, στο στέλεχος αυτό, καθώς και τη βιοσύνθεση φεναζινών και υδροκυανεύου (D'aes *et al.*, 2011). Ακόμα, η βιοσύνθεση αμφισίνης στο στέλεχος *Ps. fluorescens* DSS73 ελέγχεται από το σύστημα GacS/GacA, στο οποίο τα σήματα τα οποία ενεργοποιούν την κινάση αισθητήρα GacS αποτελούν εκκρίσεις από φυτά ζαχαρότευτλου (Koch *et al.*, 2002).

Στην προσπάθεια πλήρους διερεύνησης του μηχανισμού ρύθμισης που έχει το σύστημα GacS/GacA, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι φυτικές εκκρίσεις είναι δυνατόν να παίζουν τον ρόλο μοριακών σημάτων, τα οποία ενεργοποιούν αρχικά το σύστημα. Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός με τον οποίο το σύστημα GacS/GacA ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων NRPS είναι έμμεσος. Υποστηρίζεται ότι το σύστημα GacS/GacA, σε διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, ελέγχει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν τη μεταγραφή των NRPS (Raaijmakers *et al.*, 2006).

Στα στελέχη *Ps. syringae* pv. *syringae* B301D και B728a η βιοσύνθεση συριγκομυκίνης ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα *salA*, ο οποίος έχει αρκετά μεγάλη ομολογία με πρωτεΐνες LuxR. Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *salA* επάγεται από το σύστημα GacS/GacA (Lu *et al.*, 2002; 2005). Στο βακτήριο *Ps. putida* PCL1445 το γονίδιο *dnaK* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία ανήκει στις Hsp70 και η έκφρασή του ρυθμίζεται από το σύστημα GacS/GacA. Η πρωτεΐνη DnaK εικάζεται ότι ελέγχει την έκφραση κάποιων παραγόντων σίγμα οι

οποίοι, με τη σειρά τους, ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης της πουτισολβίνης στο στέλεχος PCL1445 (Dubern *et al.*, 2005).

Ένας ακόμα βιοτικός παράγοντας, ο οποίος ενδέχεται να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των NRPS, είναι το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού. Η βιοσύνθεση της πουτισολβίνης από το στέλεχος *Ps. fluorescens* 5064 ρυθμίζεται από N-AHL (Cui *et al.*, 2005). Αντίθετα, η βιοσύνθεση της αμφισίνης και της συριγκομυκίνης είναι ανεξάρτητη του συστήματος αίσθησης μεγέθους πληθυσμού στα διάφορα στελέχη (Raaijmakers *et al.*, 2006 ;de Bruijn *et al.*, 2008).

Στο στέλεχος R1SS101 η βιοσύνθεση των μασσετολιδίων ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από μια πρωτεάση της σερίνης, ClpP. Η πρωτεάση αυτή είναι υπεύθυνη για την αποδόμιση του μεταγραφικού παράγοντα mA, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των *luxR*, και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων βιοσύνθεσης των μασσετολιδίων στο στέλεχος αυτό. Στο στέλεχος αυτό, το σύστημα δύο παραγόντων GacS/GacA επάγει τη μεταγραφή το παράγοντα ma, και κατ'επέκταση των βιοσυνθετικών γονιδίων των μασσετολιδίων. Η πρωτεάση ClpP έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων βιοσύνθεσης της σουρφακτίνης, από το βακτήριο *B. subtilis*, με ανάλογο τρόπο (de Bruijn *et al.*, 2009).

Σε πολλά στελέχη του είδους *Ps. fluorescens* η παραγωγή των λιποπεπτιδίων αυτών σημειώνεται μόνο στο τέλος της εκθετικής φάσης ή στη φάση στασιμότητας, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου ρυθμιστικού μοριακού μηχανισμού. Η ακριβής λειτουργία του μηχανισμού αυτού δεν έχει πλήρως μελετηθεί και χρήζει περαιτέρω έρευνας (Ramos, 2004).

1.4.4. Σημαντικότερες ομάδες CLPs στο γένος *Pseudomonas*

Τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα να παράγουν ένα πολύ μεγάλο φάσμα CLPs. Στη μελέτη των λιποπεπτιδίων από το γένος αυτό έχει βοηθήσει η προγενέστερη ανακάλυψη CLPs από το γένος *Bacillus* (σουρφακτίνες, βακιλομυκίνες, ιτουρίνες, πλιπαστατίνες, λιχενισίνη), οι οποίες δεν πρόκειται να αναλυθούν στο παρόν κείμενο (Fernando *et al.*, 2005).

Στο γένος *Pseudomonas* η ικανότητα παραγωγής CLPs έχει σημειωθεί σε παθογόνα στελέχη των ειδών *Ps. syringae*, *Ps. tolaasii*, *Ps. fuscovaginae*, *Ps. corrugata*, και *Ps. fluorescens* αλλά και σε πολλά στελέχη βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης των ειδών *Ps. fluorescens* and *Ps. putida* (Raaijmakers *et al.*, 2006). Στα CLPs της οικογένειας *Pseudomonas* η αλυσίδα του λιπαρού οξέος αποτελείται,

συνήθως, από μία πλευρική αλυσίδα με 5-16 άτομα C, ενώ η πεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από 7 έως 25 αμινοξικά κατάλοιπα. Στην πεπτιδική αλυσίδα πολλών από τα CLPs, που παράγονται στο γένος αυτό, παρατηρούνται δακτύλιοι λακτόνης οι οποίοι σχηματίζονται από τέσσερα έως δεκατέσσερα αμινοξέα (Gross *et al.*, 2009).

Πίνακας 4.4: Οι κυριότερες κλάσεις CLPs στο γένος *Pseudomonas* (Gross *et al.*, 2009)

Ομάδα	Απαιτούμενο	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Βισκοσίνες																											
Viscosin	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-Val	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Viscosinamide	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Gln	D-σThr	D-Val	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
WLIP	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Massetotide A	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-alle	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Massetotide D	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-alle	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Pseudorphomin A	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-Ile	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Pseudorphomin B	C ₇ OH	L-Leu	D-Glu	D-σThr	D-Ile	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Pseudodesmin A	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Gln	D-σThr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Pseudodesmin B	C ₁₀ OH	L-Leu	D-Gln	D-σThr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																	
Συριγκομυκίνες																											
Syringomycin SRA ₁	C ₁₀ OH	L-Ser	D-Ser	D-Dab	L-Dab	L-Arg	L-Phe	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Syringomycin SRE	C ₇ OH	L-Ser	D-Ser	D-Dab	L-Dab	L-Arg	L-Phe	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Syringostatine A	C ₁₀ OH	L-Ser	D-Dab	L-Dab	D-Hse	L-Om	L-σThr	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Syngotoxin B	C ₁₀ OH	L-Ser	D-Dab	Gly	D-Hse	L-Om	L-σThr	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Pseudomycin A	C ₁₀ OH	L-Ser	D-Dab	L-Asp	L-Lys	L-Dab	L-σThr	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Comycin A	C ₁₀ OH	L-Ser	D-Om	L-Asn	D-Hse	L-His	L-σThr	Z-Dhb	L-Asp (3-OH)	4-Cl-L-Thr																	
Αμφισίνες																											
Amphisin	C ₁₀ OH	D-Leu	D-Asp	D-σThr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Gln	L-Leu	L-Ile	L-Asp															
Tensin	C ₁₀ OH	D-Leu	D-Asp	D-σThr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Gln	L-Leu	L-Ile	L-Glu															
Pholipeptin	C ₁₀ OH	D-Leu	L-Asp	L-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	D-Leu	D-Ser	D-Leu	L-Ile	D-Asp															
Lokisin	C ₁₀ OH	Leu	Asp	D-σThr	Leu	Leu	D-Ser	Leu	D-Ser	Leu	L-Ile	Asp															
Arthrofactin	C ₁₀ OH	D-Leu	D-Asp	D-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile	L-Ile	L-Asp															
Πουτισολβίνες																											
Putisolvin I	C ₆	Leu	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Val	Ser														
Putisolvin II	C ₆	Leu	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Leu/Ile	Ser														
Τολασίνες																											
Tolaasin I	C ₆ OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	—	—	—	—	Val	Dhb	σThr	Ile	Hse	Dab	Lys				
Tolaasin II	C ₆ OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	—	—	—	—	Val	Dhb	σThr	Ile	Gly	Dab	Lys				
Tolaasin A	C ₆ OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	—	—	—	—	Val	Dhb	σThr	Ile	Hse	Dab	Lys				
Tolaasin B	C ₆ OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	—	—	—	—	Val	Dhb	σThr	Val	Hse	Dab	Lys				
FP-B	C ₆ OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Ala	—	—	—	Val	Dhb	σThr	Ala	Dab	Dab	Phe				
Corceptin A	C ₁₀ OH	Dhb	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Dhb	Hse	Val	alle	Dhb	Ala	Ala	Ala	Val	Dhb	σThr	Ala	Dab	Ser	Ile				
Συριγκοπεπτινές																											
SP22	C ₁₀ OH	Dhb	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Val	—	—	—	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	σThr	Ser	Ala	Dhb	Ala	Dab	Dab	Tyr	
SP25A	C ₁₀ OH	Dhb	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Dhb	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	σThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr	
Phe ²⁵ -SP25A	C ₁₀ OH	Dhb	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Dhb	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	σThr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr	

Dab: 2,4-διάμινοβουτυρικό οξύ, Dhb: 2,3-διυδροαμινοβουτυρικό οξύ, Hse: Ομοσερίνη, σThr: αλλοθρεονίνη, όλα τα αμινοξέα συμβολίζονται σύμφωνα με την τυπική ονοματολογία τους

Τα CLPs του γένους *Pseudomonas* έχουν διακριθεί σε έξι διαφορετικές κλάσεις (Πίνακας 4.4) αναλόγως του μεγέθους της πεπτιδικής αλυσίδα και του λιπαρού οξέος. Στην κατάταξη αυτή είναι δυνατό να ενταχθεί ακόμα μια κλάση, η οποία προκύπτει από την βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους *Ps. fluorescens* Pf5. Η κλάση αυτή αφορά τις ορφαμίδες, οι οποίες δομικά μοιάζουν περισσότερο με την κλάση των βισκοσίνων. Οι ορφαμίδες υπολογίζεται ότι αποτελούνται από μια πεπτιδική αλυσίδα με δώδεκα αμινοξέα, τα δέκα από τα οποία σχηματίζουν ένα δακτύλιο. Η πεπτιδική αλυσίδα στις ορφαμίδες είναι προσδεδεμένη

σε ένα λιπαρό οξύ αποτελούμενο από δέκα άτομα άνθρακα. Η κλάση αυτή δε θα αναλυθεί περαιτέρω μιας και η μελέτη της δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί (Gross *et al.*, 2009).

Ακόμα μια κλάση CLPs, η οποία δεν έχει πλήρως μελετηθεί είναι οι εκομυκίνες. Οι εκομυκίνες έχουν βρεθεί στο σαπροφυτικό στέλεχος *Ps. viridiflava* EB273, το οποίο έχει την ικανότητα να καταστέλλει παθογόνους μύκητες των γενών *Candida* και *Cryptococcus*. Υποστηρίζεται ότι στο μόριο των εκομυκίνων η πεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από επτά αμινοξέα, ενώ το λιπαρό οξύ δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί (Miller *et al.*, 1998)

Στις επόμενες παραγράφους πρόκειται να αναλυθεί η τρέχουσα γνώση για τις κλάσεις των CLPs οι οποίες παράγοντα από στελέχη βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης.

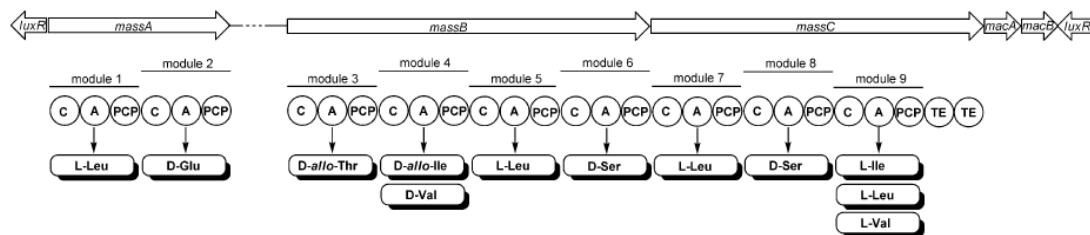
1.4.5. Βισκοσίνες

Στην κλάση των βισκοσίνων ανήκουν οι μασσετολίδες, η βισκοσιναμίδη, οι ψευδοφομίνες και το WLIP (White Line Including Principal). Τα CLPs της κλάσης αυτής αποτελούνται από ένα λιπαρό οξύ με δέκα ή δώδεκα άτομα άνθρακα και μια πεπτιδική αλυσίδα με εννέα αμινοξικά κατάλοιπα. Η ικανότητα βιοσύνθεσης των CLPs της κλάσης αυτής έχει αποδειχθεί μεταξύ πολλών στελεχών του γένους *Pseudomonas*. Στελέχη των ειδών *Ps. fluorescens*, *Ps. etremorientalis*, *Ps. veronii*, *Ps. orientalis*, *Ps. rhodesiae* έχουν την ικανότητα παραγωγής τέτοιων CLPs (Ramos, 2004).

Εξέχουσα θέση στην παραγωγή CLPs της κλάσης αυτής, κατέχει το είδος *Ps. fluorescens*. Τα στελέχη του είδους αυτού έχουν την ικανότητα παραγωγής τριών σημαντικών CLPs, των μασσετολίδων, της βισκοσίνης και της βισκοσιναμίδης. Η μελέτη της βιοσύνθεσης της βισκοσίνης και της βισκοσιναμίδης δεν έχει αποκαλύψει ακόμα το ακριβές μονοπάτι με το οποίο βιοσυντίθενται τα δύο αυτά CLPs. Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* PfA7B υποστηρίζεται ότι η βιοσύνθεση της βισκοσίνης πραγματοποιείται από τρία μεγάλα δομικά ένζυμα. Τα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά, βρίσκονται σε μια γονιδιωματική περιοχή μεγέθους 25kb, η οποία απαιτείται για την βιοσύνθεση της βισκοσίνης (Braun *et al.*, 2001).

Από ολόκληρη την κλάση των βισκοσίνων το μοναδικό CLP για το οποίο έχει μελετηθεί πλήρως το βιοσυνθετικό μονοπάτι και οι ρυθμιστικοί παράγοντες που το ελέγχουν είναι οι μασσετολίδες. Στη βιοσύνθεση των μασσετολίδων στα στελέχη *Ps.*

fluorescens SS101 και MF-30 εμπλέκονται τρία γονίδια (*massA*, *massB* και *massC*) τα οποία κωδικοποιούν για τρεις NRPS, στις οποίες οι ενότητες αποτελούνται από τις βασικές λειτουργικές περιοχές (P-A-PCP) (Εικόνα 4.5). Το γονίδιο *massA* βρίσκεται σε διαφορετική γονιδιωματική περιοχή απ'ότι τα άλλα δύο και κωδικοποιεί μια NRPS με δύο ενότητες (modules). Η NRPS που κωδικοποιούν τα γονίδια *massB* και *massC* έχουν αντίστοιχα τέσσερις και τρεις ενότητες. Η λήξη της σύνθεσης της πεπτιδικής αλυσίδας των μασσετολίδων γίνεται από την τελευταία ενότητα της *MassC*, η οποία αποτελείται από δύο περιοχές με τη δράση θειοεστεράσης (de Bruijn *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.5: Η οργάνωση των βιοσυνθετικών γονιδίων και το μονοπάτι των μασσετολίδων (Gross *et al.*, 2009).

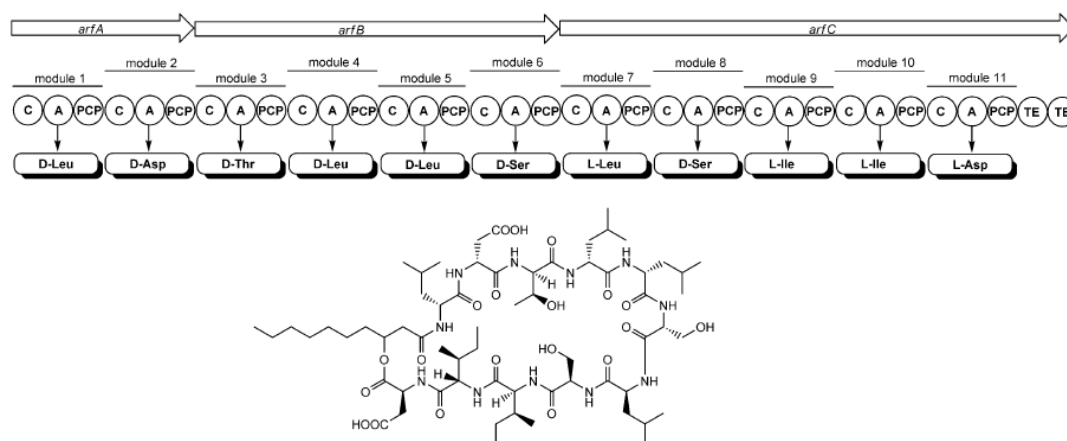
Οι λειτουργικές περιοχές των NRPS, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των μασσετολίδων, δείχνουν σχετικά χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος με αποτέλεσμα να προσθέτουν στην πεπτιδική αλυσίδα διάφορα αμινοξέα. Η ποικιλία των αμινοξέων αυτή δίνει γένεση σε πολλά δομικά ανάλογα μασσετολίδων. Τα αμινοξέα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ των μασσετολίδων, βρίσκονται στην θέση 4 και στη θέση 9 της πεπτιδικής αλυσίδας (Εικόνα 4.5) (Gross *et al.*, 2009).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο (§4.3) η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης των μασσετολίδων γίνεται μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος αίσθησης μεγέθους πληθυσμού. Ανωφερικά του γονιδίου *massA*, και κατωφερικά των γονιδίων *massB* και *massC* βρίσκονται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας LuxR, οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή των δομικών γονιδίων. Η έκφραση των LuxR παραγόντων ελέγχεται από την πρωτεάση ClpP και από το σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS (de Bruijn *et al.*, 2009).

1.4.6. Αμφισίνες

Στην κλάση των αμφισινών ανήκουν τα CLPS αμφισίνη, τενσίνη, λοξίνη, αρθροφακτίνη και φολιπεπτίνη. Τα CLPs της κλάσης αυτής έχουν ελάχιστες ομοιότητες με αυτά της κλάσης των βισκοσίνων, μιας και αποτελούνται από ένα λιπαρό οξύ με δέκα άτομα άνθρακα και μια πεπτιδική αλυσίδα με έντεκα αμινοξικά κατάλοιπα. Συνήθως, στο μόριο των αμφισινών παρατηρείται ένας δακτύλιος λακτόνης, ο οποίος δημιουργείται από τη σύνδεση της D-άλλο-θρεονίνης στο κάρβοξυτελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας με την θρεονίνη της θέσης 3 της αλυσίδας (Ramos, 2004).

Το CLP της κλάσης αυτής, το οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο αποτελεί η αρθροφακτίνη. Στο στέλεχος *Pseudomonas sp.* MIS38 τα δομικά γονίδια της αρθροφακτίνης βρίσκονται σε μια γονιδιωματική περιοχή με μέγεθος 39kb. Τα γονίδια *arfA*, *arfB* και *arfC* είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο και κωδικοποιούν τρεις NRPS (Εικόνα 4.6). Οι NRPS αποτελούνται από δύο, τέσσερις και έξι ενότητες αντίστοιχα, οι οποίες περιέχουν τις βασικές λειτουργικές περιοχές (C-A-PCP). Η τελευταία ενότητα της *ArfC* περιλαμβάνει δύο περιοχές θειοστεράσης, στις οποίες αποδίδεται η κυκλοποίηση και η απελευθέρωση της νεοσυνθετιμένης πεπτιδικής αλυσίδας (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.6: Η οργάνωση των βιοσυνθετικών γονιδίων της αρθροφακτίνης και το βιοσυνθετικό μονοπάτι (Gross *et al.*, 2009).

Κατωφερικά των δομικών γονιδίων βρίσκονται δύο ακόμα γονίδια, *arfD* και *arfE*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος της αρθροφακτίνης. Τα γονίδια *arfD* και *arfE* πιστεύεται ότι κωδικοποιούν ένα εκκριτικό σύστημα τύπου ABC, το οποίο μοιάζει με το εκκριτικό σύστημα που έχει βρεθεί στους μασσετολίδες και στις πουτισολβίνες (Lim *et al.*, 2009).

Ανωφερικά του οπερονίου *arfABC* βρίσκεται το γονίδιο *arfF* το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας LuxR, ο οποίος επάγει την έκφραση του οπερονίου. Στην ρύθμιση της μεταγραφής των δομικών γονιδίων του οπερονίου βρέθηκε ότι παίζουν ρόλο δύο ακόμα γονίδια. Το γονίδιο *htpG* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογένειας Hsp90, η οποία επάγει την μεταγραφή του οπερονίου, και το γονίδιο *sprT*, το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο με δράση υδρολάσης και συνθάσης του ppGpp. Τα δύο αυτά γονίδια βρέθηκαν σε διαφορετική γονιδιωματική περιοχή από το οπερόνιο *arfABC* (Washio *et al.*, 2010).

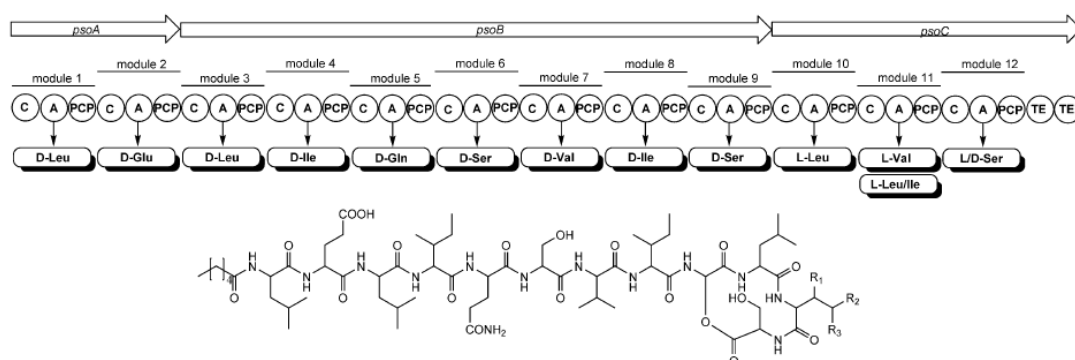
1.4.7. Πουτισολβίνες

Η τρέχουσα γνώση για τις πουτισολβίνες κατατάσσει στην κλάση αυτή τα CLPs πουτισολβίνη I και πουτισολβίνη II. Τόσο η πουτισολβίνη I όσο και η πουτισολβίνη II αποτελούνται από ένα μόριο λιπαρού οξέος με έξι άτομα άνθρακα και μια πεπτιδική αλυσίδα με δώδεκα αμινοξικά κατάλοιπα. Η διαφορά των δύο αυτών CLPs έγκειται στο δεύτερο αμινοξύ στο άμινοτελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο στην περίπτωση της πουτισολβίνης I είναι η βαλίνη ενώ στο μόριο της πουτισολβίνης II υπάρχει το αμινοξύ λευκίνη ή ισολευκίνη (Dubern *et al.*, 2008).

Αρχικά, η ικανότητα βιοσύνθεσης των δύο αυτών CLPs έχει σημειωθεί στο στέλεχος *Ps. putida* PCL1445, το οποίο εκτός από ιδιότητες ως βιολογικός παράγοντας καταπολέμησης έχει την ικανότητα αποδόμισης ρύπων και πιο συγκεκριμένα αρωματικών υδρογονανθράκων. Παρούσες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ικανότητα βιοσύνθεσης της πουτισολβίνης I και II υπάρχει σε ακόμα ένα στέλεχος, το *Ps. putida* 267, το οποίο αποτελεί παράγοντα καταπολέμησης μυκήτων του γένους *Phytophthora* (Kruijt *et al.*, 2009)

Στο στέλεχος PCL1445 τρία γονίδια (*psaA*, *psaB* και *psaC*) τα οποία κωδικοποιούν για τρεις NRPS, εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των CLPs αυτών (Εικόνα 4.7). Η PsaA έχει δύο ενότητες (modules), η PsaB επτά και η PsaC τρεις. Η δεύτερη κατά σειρά ενότητα της PsaC είναι υπεύθυνη για την προσθήκη των αμινοξέων Val, Leu και Ile στο κάρβοξυτελικό άκρο του μορίου της πουτισολβίνης, δείχνοντας μεγαλύτερη προτίμηση σε αυτό της Val. Η τρίτη ενότητα της PsaC είναι αυτή που περιέχει την λειτουργική περιοχή της θειοεστεράσης (TE), με την οποία γίνεται η απελευθέρωση της νεοσυντεθιμένης πεπτιδικής αλυσίδας. Οι ενότητες που απαντώνται στις τρεις NRPS αποτελούνται από την περιοχή συμπίκνωσης (C), την

περιοχή αδενυλίωσης (A) και την περιοχή θειοεστεροποίησης του πεπτιδικού μεταφορέα (PCP) (Gross *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.7: Η οργάνωση των βιοσυνθετικών γονιδίων και το μονοπάτι της πουτισολβίνης (Gross *et al.*, 2009).

Η περιοχή που περιλαμβάνει τα δομικά γονίδια έχει μέγεθος 41kb. Κατωφερικά των δομικών γονιδίων βρίσκονται τα γονίδια *macA* και *macB*, τα οποία κωδικοποιούν το εκκριτικό σύστημα των πουτισολβίνων. Ακόμα, ανωφερικά υπάρχει ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας LuxR, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων *psoABC*. Επομένως, φαίνεται ότι η μεταγραφή ολόκληρης της γονιδιοματικής περιοχής ενδέχεται να ελέγχεται από κάποιο σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (Dubern *et al.*, 2008).

Στη ρύθμιση της έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων εμπλέκονται πολλοί παράγοντες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (§4.3) η βιοσύνθεση των πουτισολβίνων επάγεται από τις Hsp70, ενώ στο σύστημα της ρύθμισης εμπλέκονται το σύστημα δύο παραγόντων GacA/GacS καθώς και παράγοντες σίγμα. Ακόμα η μεταγραφή των γονιδίων επάγεται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή συγκέντρωση αλάτων και οξυγόνου (Dubern *et al.*, 2006). Μετέπειτα μελέτες απέδειξαν ότι η μεταγραφή των γονιδίων *psoABC* ελέγχεται από ένα σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού, στο οποίο εμπλέκονται τα γονίδια *ppuI*, *rsaL* και *ppuR* (Dubern *et al.*, 2008).

1.5. Εξελίσσοντας στρατηγικές απομόνωσης βιολογικών παραγόντων

Η πολυπλοκότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών καθώς και οι ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων αποτελούν μεγάλα εμπόδια στην ανεύρεση ενός βιολογικού παράγοντα ο οποίος έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων. Προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την εύστοχη απομόνωση ενός ικανού βιολογικού

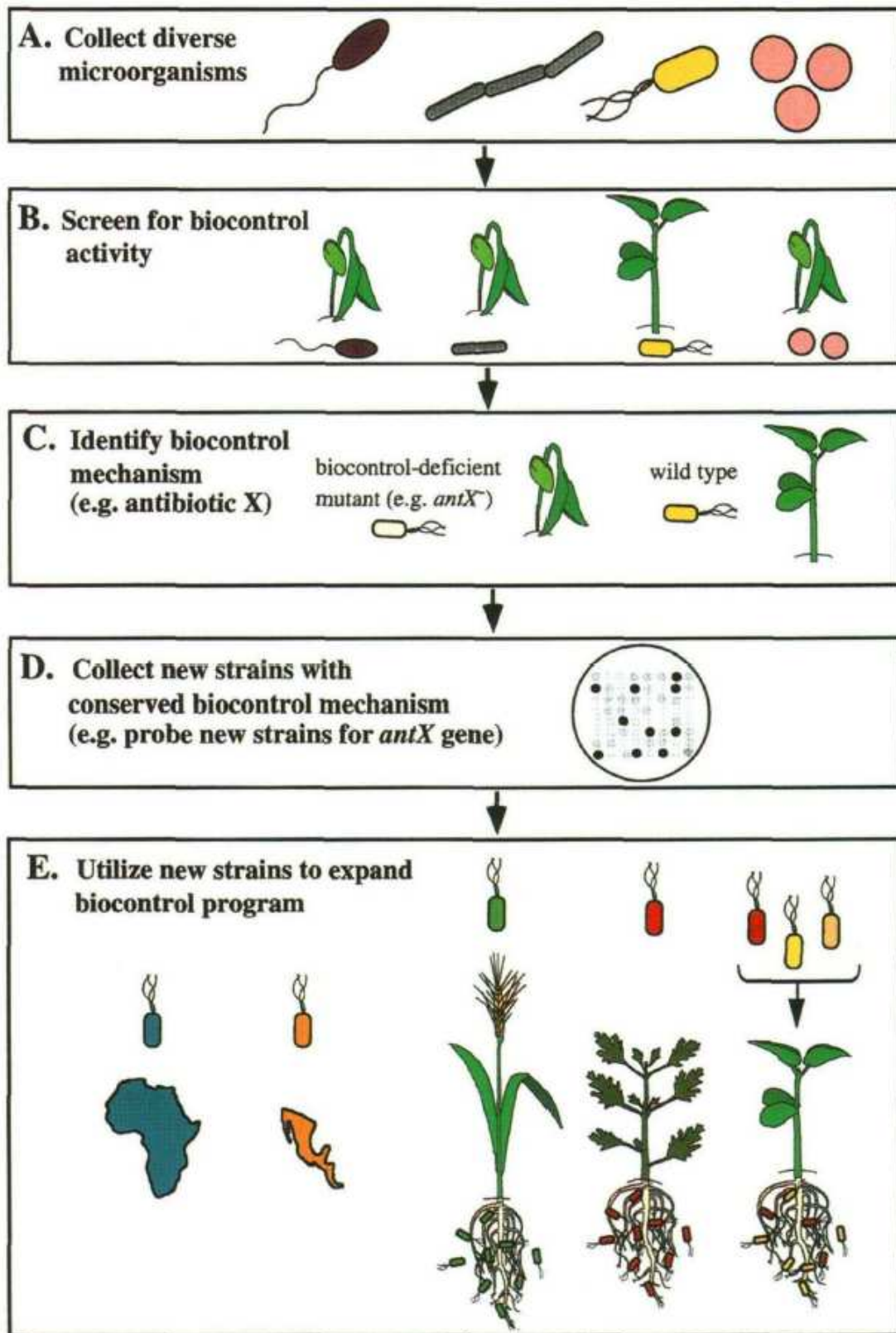
παράγοντα καταπολέμησης και την αποφυγή ανάλωσης σε προσπάθειες ανεύρεσης ενός τέτοιου παράγοντα, έχει αναπτυχθεί μια συγκεκριμένη στρατηγική (Handelsman *et al.*, 1996).

Κατά τη στρατηγική αυτή (**Εικόνα 5A και B**), απομονώνονται μικροοργανισμοί από διάφορα περιβάλλοντα και δημιουργείται μια συλλογή από αυτούς που έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς *in vitro* και *in planta*. Ακολούθως, πραγματοποιείται μοριακά και βιοχημικά ο χαρακτηρισμός του μηχανισμού καταπολέμησης που χρησιμοποιεί ο βιολογικός παράγοντας (**Εικόνα 5C**), με τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα καταπολέμησης των παθογόνων. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης ενδέχεται να χάνουν τις ιδιότητες τους αυτές αν εμβολιαστούν σε περιβάλλον με αντίξοες συνθήκες. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να βρεθούν νέα στελέχη βιολογικών παραγόντων τα οποία ανθεκτικά στις συνθήκες αυτές (Handelsman *et al.*, 1996).

Προκειμένου να επιτευχθεί κάτι τέτοιο η αρχική συλλογή των βιολογικών παραγόντων σαρώνεται με ανιχνευτή το γονίδιο (*antX*) που εμπλέκεται στον εκάστοτε μηχανισμό καταπολέμησης (**Εικόνα 5D**). Αποτέλεσμα της σάρωσης αυτής είναι η ανεύρεση ενός ή περισσότερων βιολογικών παραγόντων με παρόμοιο μηχανισμό καταπολέμησης, οι οποίοι όμως διαφέρουν ως προς την ικανότητα προσαρμογής τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι ενδέχεται να απομονωθούν βιολογικοί παράγοντες με διαφορετική ικανότητα αποικισμού διαφορετικών φυτών και διαφορετικών περιοχών (**Εικόνα 5E**), οι οποίοι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ξεχωριστά είτε σε διάφορους συνδυασμούς μεταξύ τους (Handelsman *et al.*, 1996).

Στην ανακάλυψη βιοσυνθετικών μονοπατιών καινοτόμων αντιβιοτικών ενώσεων από μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν *in vitro*, είναι πιθανό να οδηγήσει η σάρωση μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Τέτοιου είδους βιβλιοθήκες, οι οποίες κατασκευάστηκαν από DNA εδαφικών δειγμάτων, ενδέχεται να περιέχουν κλώνους με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά διάφορων ομάδων. Η επιλογή των κλώνων με την ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά πολλές φορές έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη βιοσυνθετικών μονοπατιών που δεν είναι γνωστά, μιας και γονίδια συσχετιζόμενα με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά έχει

σημειωθεί να βρίσκονται στην ίδια γονιδιωματική περιοχή με τα δομικά γονίδια βιοσύνθεσης αντιβιοτικών (Riesenfeld *et al.*, 2004).



Εικόνα 5: Το προτεινόμενο μοντέλο απομόνωσης βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης και εξέλιξης ενός προγράμματος βιολογικής καταπολέμησης (Handelsman *et al.*, 1996)

Στην βελτίωση των μηχανισμών καταπολέμησης από τους απομονωθέντες βιολογικούς παράγοντες έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι. Η τυχαία μεταλλαξιγένεση με υπεριώδη ακτινοβολία στελεχών βιολογικών παραγόντων και η γενετική τροποποίηση τους, είτε με εισαγωγή κάποιων γονιδίων που εκφράζουν ένα μηχανισμό καταπολέμησης είτε με την υπερέκφραση ήδη υπάρχοντων κατασταλτικών μηχανισμών, είναι δυνατό να δώσει γένεση σε στελέχη με πιο αποτελεσματικές κατασταλτικές ιδιότητες (Haggag *et al.*, 2007).

Μικροοργανισμοί με ικανότητα βιολογικής καταπολέμησης έχουν απομονωθεί από διάφορα γένη βακτηρίων αλλά και μυκήτων. Μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών, το γένος *Pseudomonas* έχει αποκτήσει εξέχουσα θέση εξαιτίας πέντε βασικών ιδιοτήτων του. Οι ιδιότητες των στελεχών του γένους *Pseudomonas*, οι οποίες το καθιστούν το σημαντικότερο γένος, ίσως, στην βιολογική καταπολέμηση, είναι οι εξής (Lugtenberg *et al.*, 2003):

1. Διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία (π.χ. παραγωγή σιδηροφόρων), την παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων (π.χ. φεναζίνη και παράγωγα αυτής) και την επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR).
2. Βρίσκονται σε αφθονία στο φυσικό περιβάλλον της ριζόσφαιρας και μπορούν εύκολα να την αποικίσουν εκ νέου σε ένα καλλιεργητικό περιβάλλον.
3. Χρησιμοποιούν ευρύ φάσμα θρεπτικών πηγών και παρουσιάζουν σχετικά μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης από τα άλλα βακτήρια της ριζόσφαιρας.
4. Αναπτύσσονται σχετικά εύκολα *in vitro* και επιδέχονται γενετική τροποποίηση.
5. Η τεχνολογία 'συσκευασίας' των βακτηρίων με τον σπόρο είναι ήδη αναπτυγμένη. Έχει ήδη διατυπωθεί η άποψη ότι τα βακτήρια του γένους είναι δυνατόν να διατηρηθούν σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, με την χρήση κάποιων κρυοπροστατευτικών ενώσεων. Τέτοιες ενώσεις είναι σάκχαρα, πολυόλες και αποβουτυρωμένο γάλα (Cody *et al.*, 2008; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008).

Οι προσπάθειες απομόνωσης βιολογικών παραγόντων καταπολέμησης έχουν ενταθεί και οι μέθοδοι ανεύρεσης νέων μηχανισμών καταπολέμησης εξελίσσονται. Οι περισσότερες έρευνες έχουν στραφεί στην βιομηχανοποίηση της παραγωγής και την εμπορευματοποίηση βιολογικών παραγόντων, δίνοντας έμφαση στους παράγοντες εκείνους οι οποίοι έχουν την καλύτερη ικανότητα οικολογικού αποικισμού διάφορων

καλλιεργειών και περιβαλλόντων. Υποστηρίζεται ότι, προκειμένου να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα στην διάδοση των βιολογικών παραγόντων και κατά συνέπεια στο πέρασμα από την συμβατική γεωργία στην βιολογική είναι ανάγκη να εξελιχθούν οι παράμετροι παραγωγής, συσκευασίας και διάθεσής τους (Fravel, 2005).

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

Όλα τα βακτηριακά στελέχη και οι πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή συνοψίζονται στον Πίνακα Π3 (Παράρτημα). Ο μύκητας *P. ultimum* επωάστηκε στο θρεπτικό μέσο PDB στους 23°C, τα στελέχη *E. coli* στο θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) στους 37°C, ενώ όλα τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* επωάστηκαν στα δύο προαναφερθέντα υλικά καθώς και στο θρεπτικό μέσο King's B, στους 26°C. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή ορισμένων στελεχών ήταν οι ακόλουθες: 50 µg/ml καναμυκίνη, 50 µg/ml τζενταμυκίνη, 100µg/ml αμπικιλίνη, and 40µg/ml ριφαμυκίνη.

2.1.1. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Cohen *et al.* (1972).

- Μονή αποικία. κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *DH5a* αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ($>10^6$ transformants/µg πλασμιδιακού DNA).
- 2ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $O.D._{600} = 0,35-0,4$.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε μισό όγκο του αρχικού, 25mM παγωμένου $CaCl_2$
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμισης
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 75mM παγωμένου $CaCl_2$, σε όγκο διαλύματος που ισούται με το 1/15 του αρχικού της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερόλη ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v.
- Το δείγμα, αφού αναμειχθεί πολύ καλά, μοιράζεται ανά 200µl σε φιαλίδια και καταψύχεται αμέσως.

- Η διατήρηση των "δεκτικών" πλέον βακτηριακών κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους στους -80°C .

2.1.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Η διαδικασία μετασχηματισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε 200μl δεκτικών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται και επώαζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος με επώαση για 2 λεπτά στους 42°C .
- Προσθήκη 0,8 ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C .
- Κατάλληλη ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό (αμπικιλίνη, καναμυκίνη, τζενταμυκίνη ή τετρακυκλίνη). Σε περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα το οποίο φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal, σε τελική συγκέντρωση 5×10^{-3} mM.
- Επώαση των τριβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37°C .

2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Pseudomonas fluorescens* και *E. coli* με ηλεκτροπόρωση

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτόκολλου που περιγράφεται από τους Cangelosi *et al.* (1991).

- Μονή αποικία του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο LB για 6 ώρες στους 28°C .
- 0,1ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητά της φτάσει $\text{O.D.}_{600} = 0,8-1$.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται για 15 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές/λεπτό στους 4°C .
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v)

και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο.

- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 50ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v) και φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος γλυκερόλης (10% v/v) έτσι ώστε η πυκνότητα 10^{11} - 10^{12} Cfu/ml. Δείγματα των 100μl μοιράζονται σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχονται αμέσως. Μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C .
- Σε 100μl δεκτικών κυττάρων προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε παγωμένη κυβέττα ηλεκτρισμού διαμέτρου 0.2cm.
- Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός. Το πρόγραμμα Ec2 της συσκευής BioRad® MicroPulser™ είναι ηλεκτρικό πεδίο 2,5 kV χρονικής διάρκειας 1msec.
- Αμέσως μετά ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 28°C .
- Φυγοκεντρηση του δείγματος για 1 λεπτό στις 10000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl θρεπτικό μέσο LB.
- Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή των μετασηματισθέντων βακτηριακών κυττάρων
- Επώαση των τριβλίων για 24-36 ώρες σε θάλαμο 28°C .

Για να επιλέξουμε κύτταρα *Pseudomonas* με τον κοσμιδιακό φορέα PLAFR3 εφαρμόζουμε την συνδυασμένη δράση δύο αντιβιοτικών. Η επιλογή γίνεται σε στερεά τριβλία με LB που περιέχουν 40mg/L Ριφαμπικίνη για την επιλογή των κυττάρων του *Pseudomonas* και 60mg/L Τετρακυκλίνη για την επιλογή του φορέα.

2.1.4. Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων

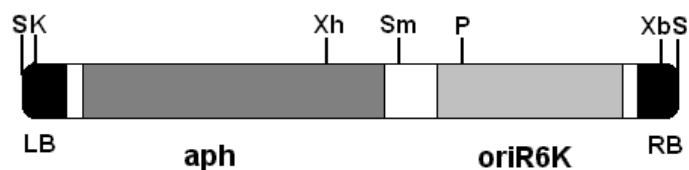
- Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, το οποίο πρόκειται να αποθηκευθεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών) στους 37°C για 12 ώρες, όσον αφορά το *E. coli* και στους 28°C για 12 ώρες όσον αφορά το *Pseudomonas fluorescens*.
- 800μl από αυτή την καλλιέργεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο cryovial

- Προσθήκη 200μl καθαρής γλυκερόλης.
- Το δείγμα αναμειγνύεται έντονα και ψύχονται αμέσως.
- Αποθήκευση στους -80°C. Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά τουλάχιστον για 10 χρόνια.

2.1.5. Μεταλλαξογένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5

Η πρόκληση μεταλλάξεων με ένθεση μεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα αποτελεί αποτελεσματικότερη στρατηγική απομόνωσης άγνωστων γονιδίων τα οποία εμπλέκονται άμεσα με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Η στρατηγική βασίζεται στην διακοπή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου, εξαιτίας της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου. Ως αποτέλεσμα της διακοπής αυτής είναι η εμφάνιση ενός φαινοτύπου ο οποίος είναι εμφανής μακροσκοπικά ή μικροσκοπικά, είτε γίνεται αντιληπτός από την εφαρμογή κάποιας εξειδικευμένης βιοδοκιμής (Berg, 1983).

Τα μεταθετά στοιχεία της οικογένειας Tn5 έχουν την ιδιότητα να μεταπηδούν σε τυχαίες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, εμφανίζοντας πολλές φορές εκλεκτικότητα σε συγκεκριμένες περιοχές (hotspots). Μετά την ένθεση του Tn στο γονιδίωμα, αυτό παραμένει σταθερό και χάνει την ικανότητα να μετακινείται. Έτσι οι μεταλλάξεις που προκαλούνται παραμένουν σταθερά οι ίδιες ακόμα και μετά από ένα αριθμό γενιών. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή του Tn5, το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27 (**Εικόνα 2.1**), του οποίου φορέας είναι το πλασμίδιο pRL27 (Larsen *et al.*, 2002).



Εικόνα 2.1 : Δομή του Tn5-RL27. Τα LB και RB αντιπροσωπεύουν την αριστερή και τη δεξιά αντίστροφη ακραία επανάληψη, aph γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, oriR6K αρχή της αντιγραφής του πλασμιδίου R6K και S, K, Xh, Sm, P και Xb οι θέσεις για τα ένζυμα περιορισμού *SalI*, *KpnI*, *XhoI*, *SmaI*, *PvuI* και *XbaI* αντίστοιχα. Το μέγεθός του είναι 1,8kb περίπου.

Το πλασμίδιο pRL27 (4kb), κατά τους Larsen *et al.* (2002), φέρει:

- την αρχή αντιγραφής *oriT* η οποία του προσδίδει τη ικανότητα να μεταφέρεται με σύζευξη,

- το γονίδιο της μεταθετάσης (*tnp*) το οποίο φέρει τρεις σημειακές μεταλλάξεις που αυξάνουν τη δραστικότητα του ενζύμου, και
- το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27

Η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών βασίστηκε στη μέθοδο της τριπαραγοντικής σύζευξης με την οποία κατέστη δυνατή η εισαγωγή του μεταθετού στοιχείου στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Xrif. Οι τρεις παράγοντες της σύζευξης είναι:

- Ο δέκτης, ο οποίος ήταν το *Ps. fluorescens* Xrif
- Το βοηθητικό στέλεχος της σύζευξης, τον ρόλο του οποίου επιτέλεσε το στέλεχος HB101 που φέρει το συζευκτικό πλασμίδιο pRK2013
- Ο δότης, ο οποίος ήταν το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BW20767 το οποίο φέρει το πλασμίδιο-φορέα του μεταθετού στοιχείου.

Τα βακτήρια επώαστηκαν σε LB με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά, για 8-12 ώρες έτσι ώστε να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των καλλιέργειών, και επαναιώρησή τους σε καθαρό LB. Τέλος, οι παράγοντες αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1:1 και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 28°C, για 15 ώρες. Με το πέρας 15 ωρών, προκειμένου να γίνει επιλογή των επιθυμητών προϊόντων της σύζευξης (transconjugants), το μείγμα της βακτηριακής σύζευξης 'επιστρώθηκε' σε τρυβλία LB με αντιβιοτικά (40 mg/l Km και 40 mg/l Rif). Στα τρυβλία αυτά είχαν την δυνατότητα να επιβιώσουν μόνο τα στελέχη *Ps. fluorescens* Xrif τα οποία έφεραν το μεταθετό στοιχείο μέσα στο γονιδίωμά τους.

Προτού χρησιμοποιηθεί το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27 για την πρόκληση μεταλλάξεων, επιχειρήθηκε ακόμα ένας κύκλος μεταλλαξιγένεσης με το Tn5. Η μεταλλαξιγένεση αυτή έγινε ακολουθώντας την διαδικασία η οποία περιγράφει πιο πάνω, με τη μόνη διαφορά ότι το μεταθετό στοιχείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το Tn5, φορέας του οποίου ήταν το πλασμίδιο pLG221 (Boulnois *et al.*, 1985). Το μεταθετό στοιχείο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά Gram⁻ βακτήρια (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*) με επιτυχία. Στο υπό μελέτη βακτηριακό στέλεχος η μεταλλαξιγένεση με αυτό το μεταθετό στοιχείο δεν ήταν επιτυχής. Όλα τα προϊόντα της σύζευξης (transconjugants) εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, ενώ τα περισσότερα δεν ήταν βιώσιμα, γεγονός που δημιουργεί την υποψία ότι το μεταθετό στοιχείο αυτό έχει hot spots σε κάποια βασικά λειτουργικά γονίδια στο γονιδίωμα του βακτηρίου. *Ps. fluorescens* Xrif.

2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

Μονή βακτηριακή αποικία, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 12 ώρες. Από αυτή την καλλιέργεια 1.5ml μεταφέρεται σε φιαλίδιο Eppendorf και φυγοκεντρείται για 1λεπτά στις 12000 στροφές/λεπτό. Από το σημείο αυτό μπορεί να γίνει χρήση είτε α) της αλκαλικής μεθόδου λύσης είτε β) της μεθόδου λύσης δια του βρασμού (ταχύτερη μέθοδος, και το πλασμίδιο που απομονώνεται είναι χαμηλότερης καθαρότητας).

2.2.1.1. Μέθοδος αλκαλικής λύσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Sambrook *et al.* (1989).

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται, με τη βοήθεια vortex, σε 500μl διαλύματος STE. Το βήμα αυτό είναι προαιρετικό και πραγματοποιείται προκειμένου να απομακρυνθούν από το διάλυμα όλα τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος τα οποία είναι δυνατόν να εμποδίζουν την δράση ορισμένων ενζύμων περιορισμού.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 14000 rpm και το ίζημα επαναδιαλύεται (vortex) σε 100 μl κρύου διαλύματος S1.
- Προστίθενται 200 μl διαλύματος S2 και το δείγμα ανακινείται 5-6 φορές με προσοχή (χωρίς vortex). Ακολούθως τοποθετείται στον πάγο για χρονικό διάστημα μικρότερο των 5 λεπτά.
- Προστίθενται 150 μl κρύου διαλύματος S3 και το δείγμα ανακινείται καλά μέχρι να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές διάλυμα. Ακολούθως τοποθετείται στον πάγο για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 2 όγκοι καθαρής αιθανόλης. Το μίγμα αναμιγνύεται καλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4oC
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-50 µl TE (pH=8) με RNase (20mg/ml).

2.2.1.2. Μέθοδος λύσης με βρασμό

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους Holmes *et al.* (1981).

- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 350µl διαλύματος STET.
- Βράζουμε το δείγμα για 45 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το λευκό ίζημα απομακρύνεται από τα φιαλίδιο erpendorf με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα ξεπλένεται με 250µl 70% v/v αιθανόλης.
- Το DNA επανδιαλύεται σε 20µl TE

Και στις δύο μεθόδους ο καθαρισμός του δείγματος με φαινόλη είναι προαιρετικός. Συνίσταται μόνο στην περίπτωση που το δείγμα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για καθορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του (sequencing).

2.3. Απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα

Τα στάδια που ακολουθήσαμε για την απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα είναι τα παρακάτω:

- Βακτηριακό πέλλετ από υγρή καλλιέργεια 10 ml όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ή 5 ml όταν βρίσκονται στην στατική φάση, ξεπλένεται με 150mM NaCl δυο φορές και μετά επαναδιαλύονται σε 2 ml προθερμασμένου διαλύματος εκχύλισης.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και επωάζεται στους 65° C
- Μετά το πέρας της επώασης το μίγμα χωρίζεται σε δυο erpendorf 1ml το καθένα. για 10 λεπτά.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο χωρίζεται σε δυο eppendorf 0,5ml το καθένα.
- Στο μίγμα προστίθενται 250 μl NaCl 5M και 750 μl ισοπροπανόλη.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm στους 4°C
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 40-80 μl ddH₂O
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ποιότητας του RNA φωτομετρικά (nanodrop) και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης.

Κατά την διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA, είτε από φυτικούς ιστούς είτε από βακτηριακά κύτταρα, απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA. Για την αποφυγή λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν-καταστρέφουν το DNA και αφήνουν ανέπαφο το RNA και είναι η ακόλουθη:

- Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια.
 - Δείγμα RNA 7 μg
 - 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNAσης 10μl
 - RNase OUT 1μl
 - DNase (1 unit/μl) 7μl
 - ddH₂O (ο τελικός όγκος της αντίδρασης μπορεί να καθοριστεί ανάλογα με την συγκέντρωση του απομονωμένου RNA) μέχρι τελικό όγκο 100μl
- Το μίγμα των αντιδραστηρίων επωάζεται στους 37° C. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του μίγματος με την διαδικασία του καθαρισμού των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη. για 60-90 λεπτά.

2.4. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη

- Σε φιαλίδιο που περιέχει το προς καθαρισμό δείγμα DNA προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης και ακολουθεί ανακίνηση μέχρι να επιτευχθεί ανάμιξη των δύο φάσεων.
- Φυγοκέντρωση για 4λεπτά στις 13000 στροφές/ λεπτό.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης: χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Εντονη

μίξη.

- Φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση.
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
- Εντονη ανάμιξη.
- Φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται 1/10 του όγκου CH_3COONa 3M pH=4,8 και δύο όγκοι αιθανόλης με σκοπό την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων. Το δείγμα επωάζεται για 12 ώρες στους -20°C και φυγοκεντρείται για 15λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο, κατά την περίπτωση, όγκο dH_2O ή TE.
Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4°C .

2.5 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

2.5.1. Ανάλυση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,7% ως 2% (w/v) αγαρόζη.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1X TAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκομάτων μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα καταστεί διαφανές.
- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη, κατά περίπτωση, ποσότητα χρωστικής COL1.
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1X TAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, που ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη. Η τάση που εφαρμόζουμε προσέχουμε να μην υπερβαίνει τα 5V/cm πηκτής

2.5.2. Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Ανάλογα με την εφαρμογή των προϊόντων της πέψης, γίνεται και η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου περιορισμού, κυρίως με βάση τον αριθμό των θέσεων περιορισμού που αναγνωρίζει σε δεδομένη αλληλουχία. Οι αντιδράσεις πέψης γίνονται σε μικρούς όγκους, 20-50μl με προσθήκη των παρακάτω συστατικών (σε παρένθεση βρίσκονται τα ποσοστά του κάθε συστατικού ξεχωριστά στον συνολικό όγκο της αντίδρασης)

1. Δείγμα DNA(>80%)
2. Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X), σε τελική συγκέντρωση 1X (10%).
3. Ενδονουκλεάση : η ποσότητα ποικίλλει ανάλογα με τις μονάδες ενζύμου (>10%).
4. ddH₂O , μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης.
5. Κατά περίπτωση απαιτείται BSA (10X, 10 μg/ml), σε τελική συγκέντρωση 1X.

Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 37°C από 1 -12 ώρες. Η θερμοκρασία επώασης αντιστοιχεί στην άριστη θερμοκρασία δράσης που ποικίλλει για τα διάφορα ένζυμα. Στην πλειοψηφία τους όμως λειτουργούν άριστα στους 37°C.

Ως μονάδα ενζύμου ορίζεται η απαιτούμενη ποσότητα ώστε να κοπεί πλήρως 1μg υποστρώματος DNA, σε μια ώρα και σε αντίδραση όγκου 50μL, στους 37°C.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον **Πίνακα Π4** του Παραρτήματος:

2.5.3. Ενοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

Η αντίδραση ενοποίησης είναι μία αντίδραση κατά την οποία δίκλιωνα μόρια DNA, με Κολλώδη (5' ή 3' εξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους. Η

αντίδραση ενοποίησης πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό τέτοιων μορίων-χίμαιρες. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων DNA και η χρήση αλκαλικής φωσφατάσης διευκολύνουν κατά κανόνα το σχηματισμό τέτοιων μορίων.

2.5.4. Αποφωσφορυλίωση των άκρων με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης

Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας πλασμιδιακού φορέα για να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση ενοποίησης των άκρων, υφίσταται πέψη με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού ανάλογα με την περίπτωση. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται μία ενδονουκλεάση περιορισμού υπάρχει η δυνατότητα ο πλασμιδιακός φορέας να κυκλοποιηθεί μόνος χωρίς την ενσωμάτωση του επιθυμητού ένθετου. Υπάρχει δηλαδή ανταγωνισμός για την ένωση μεταξύ των άκρων δύο διαφορετικών μορίων DNA και στην ένωση των άκρων του ίδιου μορίου. Με τη χρήση όμως αλκαλικής φωσφατάσης απομακρύνονται οι ακραίες 5'-φωσφορικές ομάδες και έτσι εξασφαλίζεται ότι ο πλασμιδιακός φορέας μπορεί να κυκλοποιηθεί μόνο μετά από ενσωμάτωση του ένθετου DNA, το οποίο παρέχει την απαραίτητη για την ένωση φωσφορική ομάδα στο κάθε άκρο.

Η διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης συνίσταται στα παρακάτω στάδια:

- Πέψη του πλασμιδιακού DNA με την κατάλληλη ενδονουκλεάση περιορισμού.
- Μετά το πέρας της πέψης στο φιάλίδιο erpendorf προστίθεται:

10 X ρυθμιστικό διάλυμα CIP: 10 μl

Αλκαλική φωσφατάση (CIP, 1u/μl): 1 μl

ddH₂O: μέχρι τα 100μl

- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση στους 37°C για 60 λεπτά.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας αλκαλικής φωσφατάσης στο δείγμα και επώαση για 60 λεπτά.
- Επώαση στους 60°C για 45 λεπτά προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.
- Καθαρισμός και απομόνωση του δείγματος μέσα από πηκτή αγαρόζης.

2.5.5. Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα

Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το κλάσμα DNA, του οποίου η κλωνοποίηση επιδιώκεται απομονώνονται και καθαρίζονται από πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφεται από τα εγχειρίδια των εμπορικών σκευασμάτων (Qiagen-Qiaquick gel

extraction kit). Ο τελικός όγκος στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι συνήθως 20μl.

- Σε φιαλίδιο erppendorf, το οποίο βρίσκεται στον πάγο, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το ένθετο. Ο όγκος αυτών των δύο δεν πρέπει να ξεπερνά τα 17 μl.
- Προσθήκη 2μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης.
- Προσθήκη 1μl T4 DNA λιγάσης (0,1 u/μl).
- Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 16°C για 12-16 ώρες
- Η αναλογία στην οποία αναμιγνύεται ο πλασμιδιακός φορέας με το ένθετο είναι συνήθως είτε 1:1 είτε 1:3 και η ποσότητα του ενθέτου που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να υπολογιστεί από τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέτου σε kb}}{\text{μέγεθος φορέα σε kb}} \times \text{αναλογία ενθέτου/φορέα}$$

2.5.6. Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων με τυφλά άκρα

Στην περίπτωση ενοποίησης κομματιών με τυφλά άκρα, η αντίδραση πραγματοποιείται ουσιαστικά κατά τον ίδιο τρόπο. Οι διαφορές εστιάζονται στη χρήση μεγαλύτερης ποσότητας λιγάσης (DNA T4 ligase), από πλευράς δραστηριότητας (1u/μl), στην προαιρετική προσθήκη κατάλληλης ποσότητας PEG (5%) στην αντίδραση ενοποίησης, καθώς και στη θερμοκρασία επώασης, η οποία στην περίπτωση των τυφλών άκρων είναι 25°C.

2.6. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης DNA και RNA δειγμάτων στηρίζεται στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κατάλληλης αραιώσης, στα 240, 260 και 280 nm. Η μέτρηση στα 260 nm επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων, σύμφωνα με τον τύπο των Beer-Lambert. Η συγκέντρωση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\boxed{C(\text{ng}/\mu\text{l}) = a \times 1/L \times \text{O.D.}_{260} \times \text{συντελεστής αραιώσης}}$$

Όπου α σταθερά ,με τιμή 40 για δείγμα RNA , 50 για δείγμα DNA [αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του νουκλεϊνικού οξέος (ng/μl), για $O.D._{260}=1$] και L το πλάτος της κυψελίδας.

Οι μετρήσεις στα 240 και 280 nm αναφέρονται στην απορρόφηση των φαινολικών και των πρωτεϊνών του δείγματος, αντιστοίχως, και αποτελούν μέτρο της καθαρότητας του. Για δείγματα χωρίς προσμίξεις, όπως πολυφαινόλες ή πολυσακχαρίτες, ο λόγος $O.D._{260}/O.D._{280}$ ισούται με 2 στην περίπτωση του RNA και 1,8 για το DNA , ενώ ο λόγος $O.D._{240}/O.D._{260}$ είναι περίπου 0,5.

2.7. Μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες είτε πλαστικές είτε νιτροκυτταρίνης. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα χρησιμοποιούνται ως "στόχοι" στη συνέχεια σε πειράματα υβριδισμού με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών. Οι διαδικασίες μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

2.7.1. Μεταφορά DNA κατά Southern από πηκτή αγαρόζης

- Το υπό μεταφορά δείγμα DNA, ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή με μεγάλο μέγεθος και σε συνθήκες χαμηλής τάσης (30V) για πολλές ώρες (14h)
- Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή τοποθετείται σε λάμπα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζεται.
- Στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,25N HCl για 15 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα αλλάζεται και η απο-πυρινοποίηση επαναλαμβάνεται για άλλα 15 λεπτά.
- Ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του οξέος.
- Αποδιάταξη των νουκλεϊνικών οξέων με εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα αποδιάταξης (0,5N NaOH, 1,5 M NaCl) για 30 λεπτά, με συνεχή ανάδευση.
- Επανάληψη του ίδιου βήματος.
- Ξέπλυμα της πηκτής με απιονισμένο νερό και τοποθέτησή της σε διάλυμα ουδετεροποίησης (1M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) για 30 λεπτά, με συνεχή ανάδευση.
- Επανάληψη του ίδιου βήματος.

- Πλαστική μεμβράνη (Hybond™-N⁺ της Amersham) ή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran της Schleicher & Schuell) κόβεται στις διαστάσεις της πηκτής και τοποθετείται σε διάλυμα 2X SSC για 1 λεπτό.
- Πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Whatman 3MM, του οποίου οι άκρες βυθίζονται στο δοχείο που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (20X SSC), τοποθετείται η πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή έρχεται απευθείας σ'επαφή, με το φίλτρο της μεμβράνης πάνω από το οποίο τοποθετούνται 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού 3MM κομμένα στις διαστάσεις της μεμβράνης. Τα φύλλα του διηθητικού χαρτιού έχουν εμποτιστεί προηγουμένως στο διάλυμα μεταφοράς. Πάνω ακριβώς από τα φύλλα του χαρτιού Whatman τοποθετείται απορροφητικό χαρτί, το οποίο είναι κομμένο και αυτό στις διαστάσεις της πηκτής. Το απορροφητικό χαρτί υποβοηθά την απορρόφηση του διαλύματος μεταφοράς από την πηκτή μέσω παθητικής διάχυσης. Τέλος πάνω από ολόκληρη τη διάταξη τοποθετείται βάρος 0,5kg.
- Η μεταφορά λαμβάνει χώρα συνήθως για 12-24 ώρες.
- Μετά το τέλος της μεταφοράς είναι απαραίτητη η πρόσδεση των νουκλεϊνικών οξέων στις μεμβράνες. Η πρόσδεση επιτυγχάνεται είτε με επώαση της μεμβράνης στους 80°C για 1 ώρα, είτε με έκθεσή της σε λάμπα υπεριώδους φωτός για κατάλληλο χρονικό διάστημα (1-3 λεπτά). Το διάστημα έκθεσης εξαρτάται από την απόδοση σε ισχύ της εκάστοτε λάμπας υπεριώδους φωτός που χρησιμοποιείται.
- Η μεμβράνη μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε πείραμα υβριδισμού τοποθετείται ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού 3MM και διατηρείται στους 4°C.

2.7. 2. Αλκαλική μέθοδος μεταφοράς DNA σε φίλτρα πλαστικής μεμβράνης

Η μέθοδος αυτή διαφέρει από την προηγούμενη, που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, στο διάλυμα μεταφοράς και στο χειρισμό της πηκτής μετά από τη διαδικασία απο-πουρινοποίησης. Συγκεκριμένα η πηκτή, αφού ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό, εμβαπτίζεται για 15 λεπτά σε διάλυμα 0,4N NaOH υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια η πηκτή μεταφέρεται απευθείας στη γέφυρα, η οποία έχει ακριβώς την ίδια οργάνωση. Αυτό που διαφέρει όμως, είναι το διάλυμα μεταφοράς που περιέχεται στο δοχείο και το οποίο είναι στην προκειμένη περίπτωση 0,4N NaOH.

2.7.3. Μεταφορά αποικιών

- Για την μεταφορά πλακών αποικιών τρυβλία με τις κατάλληλες αραιώσεις κυττάρων *E. coli* αναπτύσσονται στους 37°C μέχρι οι αποικίες να αποκτήσουν διάμετρο 0,2mm.
- Τοποθετούνται στους 4°C για να σφίξει το θρεπτικό υλικό και ειδικά το άγαρ κορυφής.
- Με γάντια ή χρησιμοποιώντας λαβίδα τοποθετούμε προσεκτικά τη μεμβράνη, την οποία έχουμε κόψει στο σχήμα του τρυβλίου στην επιφάνεια του τρυβλίου χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- Χρησιμοποιώντας μελάνι και μια βελόνα σημαίνουμε την μεμβράνη, ώστε μετά την αυτοραδιογραφία να μπορέσουμε να εντοπίσουμε την θέση των θετικών σημάτων.
- Η μεταφορά των αποικιών διαρκεί 1 λεπτό για την πρώτη μεμβράνη, 3 λεπτά για την δεύτερη, αυξάνει δηλαδή κατά 2 λεπτά για κάθε μεμβράνη πέρα της πρώτης.
- Αφού περάσει ο χρόνος που απαιτείται η μεμβράνη τοποθετείται χρησιμοποιώντας λαβίδα για 5 λεπτά ανάποδα, έτσι ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης που φέρει τις αποικίες να βλέπει προς τα πάνω, σε διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, το οποίο είναι κορεσμένο από διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5N NaOH).
- Στην συνέχεια τοποθετείται και πάλι ανάποδα για 5 λεπτά σε διηθητικό χαρτί 3MM που είναι κορεσμένο από διάλυμα ουδετεροποίησης (IM Tris-HCL, 1,5 M NaCl, pH 7,5).
- Μετά την μεταφορά των αποικιών πραγματοποιείται ακινητοποίηση του DNA των βακτηριοφάγων στην μεμβράνη. Αυτό πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης στους 80°C για 1 ώρα, είτε με έκθεση της σε λάμπα υπεριώδους φωτός για κατάλληλο χρονικό διάστημα (1-3 λεπτά).
- Η μεμβράνη μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε πείραμα υβριδισμού τοποθετείται ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού 3MM και διατηρείται στους 4°C, το πολύ για 2 μερες λόγω αποδόμησης του DNA.

2.8. Υβριδισμός

Ο όρος υβριδισμός χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σχηματισμό

δίκλωνων μορίων που προκύπτουν από τον συνδιασμό μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων. Λόγω συμπληρωματικότητας, οι συνθήκες του υβριδισμού καθορίζουν το ποσοστό σχηματισμού υβριδίων μεταξύ νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Η άριστη θερμοκρασία στην περίπτωση υβριδισμού μεταξύ μορίων DNA είναι 20-25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία T_m (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την T_m συνδέονται μεταξύ τους μέσω της εξίσωσης:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - (600/l)$$

όπου l είναι το μέγεθος του ανιχνευτή σε βάσεις

Σύμφωνα με το εμπορικό σκεύασμα DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I της εταιρίας Rosche η διαδικασία υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων συνίσταται στα εξής στάδια:

2.8.1. Προϋβριδισμός

Αρχικά η μεμβράνη διαβρέχεται σε διάλυμα 2 X SSC. Ο προϋβριδισμός πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης με τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα σε διάλυμα προϋβριδισμού, το οποίο ουσιαστικά έχει την ίδια σύσταση με το διάλυμα υβριδισμού. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται πολλές μεμβράνες μαζί, θα πρέπει να έχουν ελευθερία κίνησης μέσα στο διάλυμα υβριδισμού. Ο προϋβριδισμός συνεχίζεται για 30' στη θερμοκρασία όπου θα λάβει χώρα ο υβριδισμός. Στο στάδιο αυτό καλύπτονται οι ελεύθερες θέσεις στη μεμβράνη, οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη-ειδική δέσμευση του ανιχνευτή.

2.8.2. Υβριδισμός

Κατά το στάδιο αυτό διακρίνονται οι παρακάτω διαδικασίες:

- Αποδιάταξη του σημασμένου ανιχνευτή με βρασμό στους 70°C για 10 λεπτά.
- Μετά το τέλος της αποδιάταξης άμεση τοποθέτησή του στον πάγο.
- Προθέρμανση του διαλύματος υβριδισμού στη θερμοκρασία στην οποία θα γίνει ο υβριδισμός.
- Απομάκρυνση του διαλύματος προϋβριδισμού από τη μεμβράνη.
- Προσθήκη του προθερμασμένου διαλύματος υβριδισμού το οποίο περιέχει τον αποδιαταγμένο ανιχνευτή.

- Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα τουλάχιστον για 16 ώρες με συνεχή ανακίνηση.

2.8.3. Ξεπλύματα και ανάπτυξη σήματος

Μετά το τέλος του υβριδισμού λαμβάνουν χώρα τα εξής στάδια:

- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα 2X SSC, 0,1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου, με συνεχή ανακίνηση, για 5 λεπτά. Το ξέπλυμα αυτό επαναλαμβάνεται 2 φορές.
- 15 λεπτά ξέπλυμα με συνεχή ανακίνηση σε 0,5X SSC, 0,1% SDS στους 65-68°C.
- Επανάληψη του ξεπλύματος αυτού.
- 5 λεπτά ξέπλυμα στο διάλυμα έκπλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 30 λεπτά επώαση στο διάλυμα MaB με προσθήκη 2%(w/v) καζεΐνης στο διάλυμα αυτό. Στο στάδιο αυτό καλύπτονται οι ελεύθερες θέσεις στη μεμβράνη, οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη-ειδική δέσμευση του αντισώματος.
- 30 λεπτά επώαση στο διάλυμα του αντισώματος (Roche).
- 2 φορές ξέπλυμα για 15 λεπτά με το διάλυμα έκπλυσης
- Επώαση 2-5 λεπτά στο διάλυμα DB
- Επώαση της μεμβράνης, χωρίς ανατάραξη, σε 2 ml διαλύματος χρωμοφόρου υποστρώματος (Roche), σε συνθήκες σκότους για 12 ώρες.
- Εάν η μεμβράνη δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ξανά σε πειράματα υβριδισμού τότε αφήνεται να στεγνώσει πάνω σε διηθητικό χαρτί Whatman® 3MM και στη συνέχεια τυλίγεται σε διαφανή πλαστική μεμβράνη. Σε περίπτωση που η μεμβράνη χρησιμοποιηθεί εκ νέου σε υβριδισμό με άλλο ανιχνευτή τότε φυλάσσεται σε πλαστική σακούλα γεμάτη διάλυμα TE.

2.9. Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με τη χρήση DIG-11-dUTP

Η σήμανση με διγοξιγενίνη είναι βασισμένη σε ένα στεροειδές που έχει απομονωθεί από φυτά του γένους *Digitalis*. Το μόριο της διγοξιγενίνης, το οποίο βρίσκεται προσδεμένο μέσω μια ανθρακικής αλυσίδας 11 ατόμων άνθρακα με ένα μόριο τριφωσφορικής ουριδίνης (UTP), αναγνωρίζεται από αντισώματα (anti-DIG) τα οποία έχουν συντηχθεί με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Έτσι, με την χρήση του κατάλληλου υποστρώματος, είναι δυνατόν να γίνει αντιληπτή η θέση στην οποία έχουν υβριδίσει τα σημασμένα, με διγοξιγενίνη, νουκλεϊνικά οξέα. Για την παραλαβή ενός τέτοιου μορίου-ανιχνευτή το οποίο είναι νουκλεϊνικό οξύ με

διγοξυγενίνη υπάρχουν 2 μέθοδοι:

2.9.1. Τυχαία σήμανση

Κατά τη μέθοδο αυτή μπορούν να δημιουργηθούν σημασμένα τμήματα τυχαίου μεγέθους χρησιμοποιώντας σαν μήτρα δείγματα DNA διαφόρων μεγεθών. Τα μόρια-ανιχνευτές που δημιουργούνται στην περίπτωση αυτή είναι κατάλληλα για την ανίχνευση γονιδίων που έχουν ένα μοναδικό αντίγραφο μέσα στο γονιδίωμα κατά τη σάρωση βιβλιοθηκών, είτε στον υβριδισμό που ακολουθεί τη μεταφορά κατά Southern.

Σε ένα σωλήνα eppendorf αναμιγνύονται :

- 0,3-1μg DNA , το οποίο έχει αποδιαταχθεί με βρασμό
- 4μl DiG-High Prime (πολυμεράση Klenow, buffer, dNTPs+dUTPs)
- ddH₂O μέχρι τον όγκο των 20 μl

Η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C για 20 ώρες και το ένζυμο απενεργοποιείται στους 65 °C με την προσθήκη 2μl 0,2M EDTA .

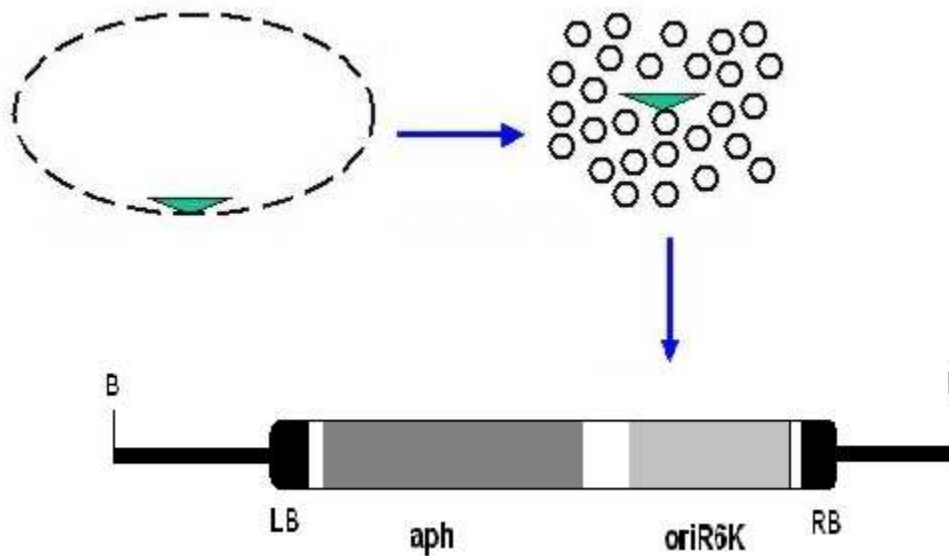
2.9.2. Σήμανση με PCR

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο δημοφιλής μιας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν: α) υπάρχει ανάγκη για μεγάλες συγκεντρώσεις σημασμένων ανιχνευτών, β) η ποσότητα του τμήματος DNA, που πρόκειται να σημειωθεί, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα και γ) το αποτέλεσμα της ανίχνευσης που θα γίνει με τον ανιχνευτή πρέπει να είναι πολύ εξειδικευμένο και ευαίσθητο.

Η μόνη διαφορά της μεθόδου αυτής με μια συνηθισμένη αντίδραση PCR είναι μόνο ότι το μείγμα των dNTPs αποτελείται από dATP, dGTP, dCTP, dTTP, DIG-11-dUTP σε αναλογία 1:1:1:0,35:0,65. Οι συνθήκες αντίδρασης (αποδιάταξη, υβριδισμός και επιμήκυνση) είναι οι ίδιες.

2.10. Πλασμιδιακή απελευθέρωση

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μοριακή απομόνωση του γονιδίου στο εκάστοτε μεταλλαγμένο στέλεχος, ήταν αυτή της πλασμιδιακής απελευθέρωσης (plasmid rescue) (**Εικόνα 2.2**). Η επιλογή της τεχνικής αυτής βασίστηκε στα χαρακτηριστικά της κατασκευής του μεταθετού στοιχείου (Larsen *et al.*, 2002).



Εικόνα 2.2 : Διαδικασία της πλασμιδιακής απελευθέρωσης. Το γονιδίωμα του *Ps. fluorescens* Χrif υπόκειται σε πλήρη πέψη από το ένζυμο *Bam*HI. Στη συνέχεια όλα τα τμήματα της πέψης λιγοποιούνται και μόνο εκείνα που περιέχουν το μεταθετό στοιχείο (πράσινο βέλος) είναι αυτά που είναι ικανά να αντιγραφούν στον κατάλληλο ξενιστή. Τα πλασμίδια-χίμαιρες, που απομονώθηκαν με την απελευθέρωση, φέρουν το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27 και έχουν μοναδική θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI.

Κατά τη διαδικασία αυτή το γονιδιωματικό DNA για καθένα από τα 10 μεταλλαγμένα στελέχη, αφού υπέστη πέψη για 12 ώρες με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI, η οποία δεν έχει καμία θέση αναγνώρισης μέσα στην αλληλουχία του μεταθετού στοιχείου, κυκλοποιήθηκε με τη δράση της T4 DNA λιγάσης. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης λιγοποίησης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a/λpir. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα DH5a/λpir που είχαν την ικανότητα να αναπτυχθούν υπό την επιλεκτική πίεση του αντιβιοτικού καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100mg/l ήταν και αυτά που έφεραν το αυτολιγοποιημένο (self-ligated) τμήμα του γονιδιώματος στο οποίο βρίσκεται και η περιοχή στην οποία έχει προκληθεί η μετάλλαξη.

Το κάθε αυτολιγοποιημένο τμήμα αποτελεί ένα πλασμίδιο μιας και φέρει την αρχή αντιγραφής oriR6K. Η αρχή αντιγραφής του πλασμιδίου R6K απαιτεί την έκφραση της πρωτεΐνης π, η οποία εκφράζεται από το γονίδιο *pir*. Επομένως κύτταρα τα οποία δεν έχουν το γονίδιο *pir* δεν είναι ικανά να αναγνωρίσουν τα κυκλικά αυτά μόρια σαν πλασμίδια και συνεπώς μόνο δεκτικά κύτταρα DH5a/λpir φέρουν τα πλασμίδια αυτά (Larsen *et al.*, 2002). Με τον τρόπο αυτό αποκλείεται η απομόνωση τμημάτων του γονιδιωματικού DNA του υπό μελέτη βακτηρίου τα οποία έχουν

κυκλοποιηθεί τυχαία και δεν σχετίζονται με την περιοχή της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου.

2.11. Λυοφυλίωση

Με τον όρο αυτό εννοούμε την αφαίρεση του διαλύτη από ένα διάλυμα με τη απευθείας εξάχνωσή του. Η εξάχνωση του διαλύτη είναι δυνατό να επιτευχθεί με την εφαρμογή συνθηκών χαμηλής πίεσης και θερμοκρασίας Έτσι είναι δυνατόν να διατηρήσουμε διάφορα υλικά όπως νουκλεϊνικά οξέα, πρωτεΐνες ακόμα και βακτήρια. Η διαδικασία λυοφυλίωσης που ακολουθήθηκε συνοψίζεται στα παρακάτω στάδια:

- Καλλιέργειες δύο βακτηριακών στελεχών οι οποίες έχουν αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό μέσο LB σε όγκο 1l φυγοκεντρούνται όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει $OD_{600}=1$
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται στο 1/10 το αρχικού του όγκου σε υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν διάφορες κρυοπροστατευτικές ενώσεις.
- Το αιώρημα αυτό μοιράζεται σε πλαστικούς σωληνες των 10ml και τοποθετείται σε θερμοκρασία -80°C για 1 ώρα, έως ότου παγώσει ολόκληρος ο όγκος του δείγματος.
- Μετά το πέρας της 1 ώρας τα δείγματα τοποθετούνται στον λυοφιλιωτή Telstar, ο οποίος με τη βοήθεια κενού (0,0045mbar) και χαμηλης θερμοκρασίας (-50°C) εξαχνώνει τον διαλύτη.
- Οι συνθήκες αυτές εφαρμόζονται στα δείγματα μέχρι να εξαχνωθεί ολόκληρος ο όγκος του νερού, που χρησιμοποιείται ως διαλυτής. Συνήθως η διαδικασία διαρκεί 8-10 ώρες για ένα τέτοιο όγκο δείγματος.
- Τα δείγματα αφού βγουν από τον λυοφιλιωτή κλείνονται με πώμα και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.12. Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

2.12.1. Αντιδρασεις PCR

Ένα γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτων DNA είναι το ακόλουθο:

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR	5X	10μl	1 X
Διάλυμα MgCl ₂	25mM	2μl	1mM
DNTPs	10mM	1μl	200nM
Άνω εκκινητής	10mM	2μl	400nM
Κάτω εκκινητής	10mM	2μl	400nM
DNA μήτρα	-	-	10ng γονιδιωματικό DNA
Ταq Πολυμεράση (Promega)	5u/μl	0,25μl	1,25u
ddH ₂ O	Έως τα 50μl		
Τελικός όγκος αντίδρασης 50μl			

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετούνται σε σωλήνα χωρητικότητας 500μl, κατάλληλο για αντιδράσεις PCR, ο οποίος βρίσκεται στους 4°C. Μόλις προστεθούν αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρούνται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα (spin down) και τοποθετούνται στην κεφαλή συσκευής που έχει προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα. Η προσθήκη λαδιού και παραφινέλαιου δεν είναι απαραίτητη σε αντιδράσεις PCR που πραγματοποιούνται στην συσκευή που αναφέραμε διότι διαθέτει ειδικό θερμαινόμενο καπάκι.

Οι θερμοκύκλοι επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται ακολούθως:

Αριθμός κύκλων	
1	Αποδιάταξη του DNA για 2 λεπτά στους 94°C
10	Αποδιάταξη στους 94°C για 15 δευτερόλεπτα Υβριδισμός εκκινητών συνήθως στους 45-65°C για 30 δευτερόλεπτα Επιμήκυνση στους 72°C ή 68°C για 45 δευτερόλεπτα έως 8 λεπτά
15-20	Αποδιάταξη στους 94°C για 15 δευτερόλεπτα Υβριδισμός εκκινητών συνήθως στους 45-65°C για 30 δευτερόλεπτα

	Επιμήκυνση στους 72°C ή 68°C για 45 δευτερόλεπτα έως 8 λεπτά, +15 δευτερόλεπτα ανά κύκλο
1	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72°C για 7 λεπτά

- Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T_m του κάθε εκκινητή η οποία υπολογίζεται από σχετικά προγράμματα σχεδιασμού, όπως είναι το DNAMAN.
- Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος των προϊόντων που αναμένουμε. Για προϊόντα μέχρι και 3kb είναι 72°C, ενώ για προϊόντα μεγαλύτερα από 3kb είναι 68°C
- Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του υπό ενίσχυση τμήματος DNA καθώς και από τις προδιαγραφές της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε. Έτσι, ενδεικτικά για ένα μήκος τμήματος DNA 1kb ο χρόνος επιμήκυνσης είναι 1 λεπτό, ενώ για ένα τμήμα 6kb ο χρόνος επιμήκυνσης είναι 4 λεπτά

Όταν τελειώσουν οι PCR αντιδράσεις αναλύονται σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0,8%-1,2%, ανάλογα με το μήκος των προϊόντων που περιμένουμε. Οι αντιδράσεις αποθηκεύονται στους -20°C. Σε περίπτωση, όμως, που θέλουμε να υποκλωνοποιήσουμε το προϊόν PCR τότε ακολουθούμε την διαδικασία υποκλωνοποίησης αποφεύγοντας να τις παγώσουμε. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας εργασίας δίνονται στον **Πίνακα Π5** του Παραρτήματος.

2.12.2. Real Time PCR

Η τεχνική του ποσοτικού Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Προκειμένου να εφαρμοστεί η τεχνική αυτή, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kit Universal, της εταιρίας KAPA™. Η συνολική ποσότητα RNA (DNase treated) σε κάθε αντίδραση ήταν 50ng. Η τελική συγκέντρωση για το κάθε ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης ήταν 200nM. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μl. Το μηχάνημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Stratagene, μοντέλο Mx3005P™.

Οι θερμοκύκλοι οι οποίοι ακολουθήθηκαν βάσει του εγχειρίδιου του εμπορικού σκευάσματος της KAPA™ που χρησιμοποιήθηκε, παρουσιάζονται ακολούθως:

Αριθμός κύκλων	
1	Σύνθεση του cDNA για 10 λεπτά στους 42°C
1	Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 95°C για 10 λεπτά.
40	Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα Υβριδισμός εκκινητών και επιμήκυνση στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα.
1	Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα Υβριδισμός εκκινητών και επιμήκυνση στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα. Στον θερμοκύκλο αυτό γίνεται η λήψη των μετρήσεων από το μηχάνημα προκειμένου να κατασκευάσει τις καμπύλες τήξης (dissociation - melting curves) των προϊόντων.

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι το κάθε ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε είναι εξειδικευμένο και δίνει μόνο ένα προϊόν ελέγχθηκαν οι καμπύλες τήξης (melting-dissociation curves) σε κάθε αντίδραση. Χαρακτηριστικά γραφήματα με τα τέσσερα ζεύγη εκκινητών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, παρουσιάζονται στο **Γράφημα Π1** (§ Παράρτημα). Μοναδιαίες κορυφές στα γραφήματα αυτά αντιπροσωπεύουν την μοναδικότητα του προϊόντος και επιβεβαιώνουν την εξειδίκευση των εκκινητών.

Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων του Real Time PCR τα επίπεδα μεταγραφής του κάθε γονιδίου διορθώθηκαν με τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς *rpoD* [$\Delta Ct(mutant) = Ct(gene) - Ct(rpoD)$, $\Delta Ct(wild) = Ct(gene) - Ct(rpoD)$]. Στα γραφήματα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης ($\log RQ$, $RQ = 2^{-[\Delta Ct(mutant) - \Delta Ct(wild)]}$) στα μεταλλαγμένα στελέχη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στον άγριο τύπο X. Στο κάθε διάγραμμα παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου τριών επαναλήψεων (de Bruijn *et al.*, 2009).

Πίνακας 2.3: Εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στο Real Time PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5'→3'
rpoDf	GATTCGTCAGGCGATCAC
rpoDr	AATACGGTTGAGCTTGTTGA
rpoBf	ATCCGCAAGGACTTTAGC
rpoBr	GGATAGCCAGAAGGTACG
sup6f	ACGGTAGTACTTCTTCAG
sup6r	CTTCAAACAACAGGCATC
sup5f	AAATCATCCTGGGCGAAG
sup5r	CGAAGTGGCTGTAGTGAC
orf8f	ACTATCCGTCGTGTCATCA
orf8r	AAACATCACTCGCATCGTTA

2.12.3. PCR αποικιών

Για τον εντοπισμό αποικιών βακτηρίων (*Escherichia coli*), που έχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χωρίς όμως να είναι δυνατή η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης και κατά συνέπεια η επιλογή μπλε / άσπρων αποικιών, μπορούμε να εφαρμόσουμε την μεθοδολογία της μεταφοράς αποικιών σε μεμβράνη και στην συνέχεια υβριδισμό με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Όταν όμως είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει να έχει υποκλωνοποιηθεί στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και να περιέχεται στον εκάστοτε μικροοργανισμό μπορούμε να σχεδιάσουμε εκκινητές, οπότε με μια απλή αντίδραση PCR της μικροβιακής αποικίας (colony PCR), να πιστοποιήσουμε την ένθεση του επιθυμητού τμήματος με το σωστό μέγεθος. Χρησιμοποιώντας την τεχνική αυτή, η πιστοποίηση γίνεται αμέσως. Έτσι σε σύντομο χρονικό διάστημα από την στιγμή που αναλυθούν τα αποτελέσματα του PCR μπορούμε να έχουμε καλλιέργεια του μικροοργανισμού που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

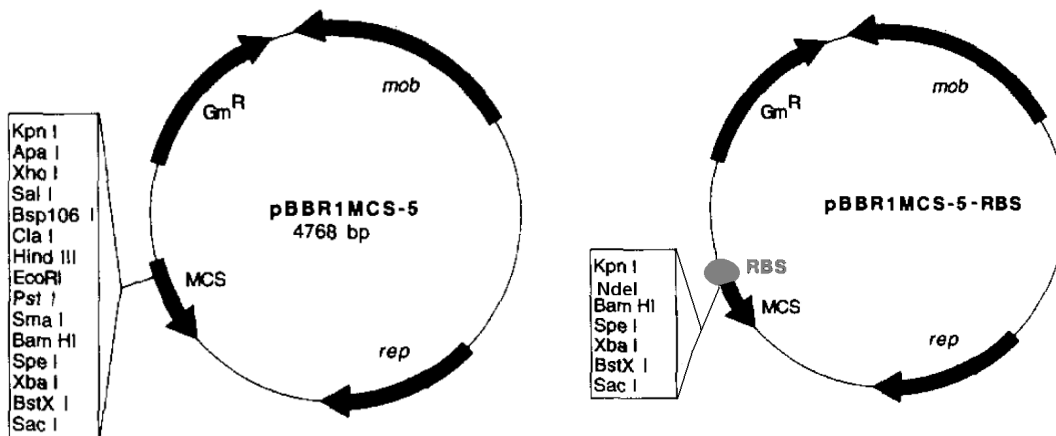
- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγουμε και μεταφέρουμε την βακτηριακή αποικία από το στερεό θρεπτικό μέσο σε σωλήνα erppendorf που περιέχει 300μl LB.
- Το εμβόλιο επωάζεται για 6ώρες στους 37°C με ανακίνηση.
- 200μl από την καλλιέργεια φυγοκεντρώνται στις 13000 στροφές/λεπτό και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 60μl dH₂O και βράζεται στους 100°C για 10 λεπτά. Τα υπόλοιπα 100μl της καλλιέργειας διατηρούνται στους 4°C.
- Μετά την παραμονή των κυττάρων για 10 λεπτά στους 100°C ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές/λεπτό για 20 δευτερόλεπτα.

- Στην αντίδραση PCR προσθέτουμε τα συστατικά που αναφέρθηκαν με την διαφορά που αντί για DNA μήτρα προσθέτουμε 10μl από το τα περίπου 60μl από το αιώρημα των βακτηριακών κυττάρων.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του τμήματος DNA που περιμένουμε. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 25-30 μιας και το προϊόν της PCR θα χρησιμοποιηθεί μόνο για διαγνωστικό σκοπό.
- Μόλις οι αντιδράσεις ολοκληρωθούν τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτική αгарόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρουμε τα υπόλοιπα 100μl σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν μέρος της καλλιέργειας αναμιγνύεται με γλυκερόλη και διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους - 80°C.

2.12.4. Υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR

Η ενίσχυση τμημάτων DNA χρησιμοποιώντας θερμοανθεκτικές Taq DNA πολυμεράσες έχει ως αποτέλεσμα τα περισσότερα μόρια των προϊόντων που προκύπτουν να έχουν στο 3' μια αδενίνη που προεξέχει. Εξαιτίας του τελικού 3' A είναι σχετικά δύσκολη η υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM®- T Easy (Promega) του οποίου κάθε άκρο της ζώνης κλωνοποίησης έχει μια προεξέχον θυμίνη. Η πολυμεράση η οποία χρησιμοποιήθηκε (GoTaqFlexi-Promega) είναι γνωστό ότι προσθέτει αδενίνες στο 3' άκρο των προϊόντων της και έτσι είναι εύκολη η υποκλωνοποίηση σε ένα φορέα όπως ο φορέας pGEM®- TEasy. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αντίδραση λιγοποίησης σε ένα τέτοιο φορέα (TA cloning) είναι η χρησιμοποίηση της λιγάσης και των ρυθμιστικών διαλυμάτων της που προμηθεύονται μαζί με τον φορέα.

Τα προϊόντα του PCR που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM®-TEasy (Promega Corp.) στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pBBR1MCS5 και pBBR1MCS5-RBS (Kovach *et al.*, 1995; Φωτιάδης X., μεταπτυχιακή μελέτη) (Εικόνα 2.3). Στην προσπάθεια υποκλωνοποίησης των μεγαλύτερων προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί φορείς (pLAFR3, pLAFR5, pBR322, pME600, pBHR1), χωρίς καμία επιτυχία.



Εικόνα 2.3: Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBBR1MCS5 (Kovach *et al.*, 1995) και του pBBR1MCS5-RBS (Φωτιάδης X., μεταπτυχιακή μελέτη)

2.15. Βιοπληροφορική ανάλυση

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR (Πίνακας Π5, § Παράρτημα) και RT-PCR (Πίνακας 2.3, § Υλικά και Μέθοδοι) της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων DNAMAN και Beacon Designer v.7.91. Ο έλεγχος των αλληλουχιών για τον εντοπισμό υποθετικών (putative) μεταγραφικών υποκινητών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος NNPP v2.2 (Neural Network Promoter Prediction tool) (Reese M.G., 2001). Η ανάλυση συνταινίας και η σύγκριση των γονιδιωματικών περιοχών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων BioCyc (Keseler *et al.*, 2009), αλλά και της STRING 8.3 (Jensen *et al.*, 2009). Η στοίχιση των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MultAlin (Corpet F., 1988) και οι έρευνες ομοιότητας με το BLAST 2.0 από το National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, U.S.A.).

Τέλος, προκειμένου να αναλυθεί η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος (Kyte *et al.*, 1982) της υδροπάθειας (Hydrophobicity) και η μέθοδος (Eisenberg *et al.*, 1984) της κανονικοποιημένης συμβατότητας (Normalized consensus hydrophobicity scale). Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων συγκρίνονταν μεταξύ τους και με τα αποτελέσματα από τις μεθόδους DAS (Dense Alignment Surface method) και PRED-TMR (Prediction of Transmembrane regions in proteins) με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η πρόβλεψη των διαμεμβρανικών τμημάτων των πρωτεϊνών.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής:

- <http://smart.embl.de/smart>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://biocyc.org>
- <http://string-db.org>
- <http://expasy.org>
- <http://www.pseudomonas.com>
- <http://www.jgi.doe.gov>
- http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
- <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>

2.16. Αριθμοί καταχώρισης, των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων καταστολής, στην GenBank

Οι αλληλουχίες των γονιδίων, σε κάθε περιοχή ένθεσης του μεταθετού στοιχείου, για όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη κατατέθηκαν στην τράπεζα γενετικών πληροφοριών (GenBank). Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA καταχωρήθηκε με τον αριθμό JQ361765. Η αλληλουχία του γονιδίου *sup1* καταχωρήθηκε με τον αριθμό HQ383687. Η αλληλουχία της γονιδιωματικής περιοχής των γονιδίων *orfA*, *orf0*, *sup2*, *orf1*, *orf2*, *orf3*, *sup3* και *orf4* καταχωρήθηκε με τον αριθμό JQ039398. Τέλος, η αλληλουχία της γονιδιωματικής περιοχής των γονιδίων *orf6*, *sup5*, *sup6*, *orf7*, *orf8* και *orf9* καταχωρήθηκε με τον αριθμό JQ039399.

2.17. Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων

2.17.1. Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων - σχετικά αντιδραστήρια

- **LB υγρό θρεπτικό μέσο**

1%(w/v) τρυπτόνη, 0,5%(w/v) Εκχύλισμα Ζύμης, 1%(w/v) NaCl

Στην περίπτωση υγρού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,8 %(w/v) άγαρ.

- **King's B**

2 %(w/v) Proteose Pepton No3, 0,015 %(w/v) MgSO₄·7H₂O, 0,01965%(w/v) KPO₄·7H₂O, 1,7 %(w/v) glycerol

- **PDA**

30%(w/v) κομμένη πατάτα, 1,5%(w/v) filter-sterilized Glucose, 1,8%(w/v) άγαρ

- **M9 υγρό θρεπτικό μέσο**

1,28%(w/v) Na₂HPO₄·7H₂O, 0,3%(w/v) KH₂PO₄, 0,5%(w/v) NaCl, 1%(w/v) NH₄Cl, 0,002M MgSO₄, 0,0001M CaCl₂, 20% (w/v) εκάστοτε πηγή άνθρακα

- **X-gal 5-bromo-4-chloro-3-índolyl-β-D-galactopyranoside (BRL)**

20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο. Αποθηκεύεται στους -20⁰ C.

2.17.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης και υβριδισμού

- **10 X TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης**
0,93%(w/v) EDTA, 0,55%(w/v) Βορικό οξύ, 10,8 %(w/v) Tris-Cl.
- **50X TAE ρυθμιστικού διαλύματος**
2,42 %(w/v) Tris-base, 100ml 0,5M EDTA pH=8 (ethylenediaminetetracetic acid disodium salt), 5,7 %(v/v) CH₃COOH
- **NEN διάλυμα αποδιάταξης**
1N NaOH, 1mM EDTA pH 8,0
- **COL1 διάλυμα χρωστικών**
5 X μητρικό διάλυμα χρωστικών 1,25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 1,25% (w/v) κυανολοξυλένιο σε dH₂O. Το COL1 έχει τελική σύσταση 1X διαλύματος χρωστικών, 50% (w/v) σουκρόζης
- **Βρωμιούχο αιθίδιο**
10mg/ml H₂O. αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου
- **20X SSC διάλυμα**
3M NaCl, 0,3M κιτρικό νάτριο (pH 7,0)
- **Διάλυμα έκπλυσης (WB)**
0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20
- **Διάλυμα μαλεϊκού οξέος (MaB)**
0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5
- **Διάλυμα ανίχνευσης (DB)**
0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5
- **TE**
10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

2.17.3 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

S1	10mM EDTA (pH=8), 25mM Tris-HCl (pH=8), 50mM Glucose
S2	1 % w/v SDS, 0,2N NaOH
S3	60 ml από 5 M οξικού καλίου, 11,5 ml οξικό οξύ και 28,5 ml ddH ₂ O για σύνολο 100ml
STE	1mM EDTA (pH=8), 10mM Tris-HCl (pH=8), 0,1M NaCl
STET	0,1 M NaCl, 10mM Tris-Cl (PH 8,0), 1mM EDTA (PH 8,0), 5% Triton X-100 και 1mg/ml λυσοζύμη

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

Τα πρώτα μόρια που εξετάστηκαν για τις δυνατότητές τους ως φυλογενετικοί δείκτες ήταν τα κυτοχρώματα και οι φερεδοξίνες. Στις αρχές της δεκαετίας του 80', διατυπώθηκε για πρώτη φορά η άποψη ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA (μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος) είναι ένα πολύ χρήσιμο φυλογενετικό εργαλείο και βάσει του γονιδίου αυτού δημιουργήθηκαν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών (Fox *et al.*, 1980).

Η συντηρημένη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Οι πιο σημαντικοί λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό είναι: α) η παρουσία του, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά αντίγραφα ή ως οπερόνια, β) η λειτουργία του γονιδίου 16S rRNA δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι οι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης, και γ) το γονίδιο 16S rRNA έχει μέγεθος περίπου 1500bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda *et al.*, 2007). Προκειμένου η αλληλουχία του 16S rRNA να είναι αντιπροσωπευτική και ικανή να χρησιμοποιηθεί στον χαρακτηρισμό ενός είδους, θα πρέπει να έχει μέγεθος μεγαλύτερο των 1,3kb (<0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Η χρήση του 16S rRNA ως φυλογενετικού δείκτη παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Ανάλογως της λειτουργικής σημασίας, τα δομικά στοιχεία των rRNA δεν διαφοροποιούνται ελεύθερα και οι αλλαγές στην αλληλουχία τους δε φαίνεται να αποτελούν μια συνεχή διαδικασία. Έτσι, η απόκλιση των σύγχρονων αλληλουχιών rRNA αποδεικνύει με επιτυχία την συσχέτιση των κοινών προγόνων και των σύγχρονων απογόνων τους αλλά όχι την τοποθέτηση της συσχέτισης αυτής σε μία χρονική κλίμακα. Ένα άλλο πρόβλημα αποτελεί η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων σε έναν οργανισμό. Η επικρατούσα άποψη ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των πολλαπλών αλληλουχιών rRNA (>99% ομολογία) για έναν οργανισμό (Ludwig *et al.*, 2005) δεν ισχύει, αφού έχει βρεθεί ότι υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, όπως τα *Thermomonospora chromogena*, *Thermobispora bispora* και *Haloarcula marismortui* των οποίων τα γονίδια 16S και 23S παρουσιάζουν διαφορές ως και 10% (Hashimoto *et al.*, 2003).

Παρόλο που, τα επίπεδα ομολογίας των αλληλουχιών του γονιδίου rRNA σε ορισμένους οργανισμούς είναι υψηλά είναι δυνατό να παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του συνολικού γονιδιώματος. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα

ακόμα από τα προβλήματα που παρουσιάζει η φυλογενετική ανάλυση βάσει του γονιδίου 16S rRNA. Προκειμένου να αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα κατά την ερμηνεία των φυλογενετικών δέντρων, πρέπει να δίδεται προσοχή στα πρότυπα διακλάδωσης στην περιφέρεια του δέντρου διότι, πιθανώς, να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική φυλογένεια. Δεδομένης της χαμηλής φυλογενετικής αναλυτικής δύναμης σε τέτοια επίπεδα σχετικότητας (άνω του 70% ομολογίας) προτείνεται η υποστήριξη των αποτελεσμάτων με έρευνες υβριδισμού (Ludwig *et al.*, 2005).

Η αναγνώριση νέων ειδών βακτηρίων και η εκ νέου ταξινόμηση ορισμένων παλαιότερων έχει οδηγήσει στη δημιουργία και τον εμπλουτισμό των βάσεων δεδομένων στο διαδίκτυο. Συγκεκριμένα, από μια πρόχειρη έρευνα στην βάση BioProject (NCBI) είναι δυνατό να διαπιστωθεί ότι το γονιδίωμα συνολικά 16.910 οργανισμών έχει πλήρως αλληλουχιθεί, από τους οποίους 11.986 αφορούν το γονιδίωμα βακτηρίων και 371 το γονιδίωμα αρχαίων.

3.1.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Προκειμένου να μελετηθεί η μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της αλληλουχίας του με PCR. Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών 16Sf-16Sr (Weisburg *et al.*, 1991) (Πίνακας Π5, § Παράρτημα). Το προϊόν της αντίδρασης το οποίο είχε μέγεθος 1,53kb κλωνοποιήθηκε (Πίνακας Π3, § Παράρτημα) και πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του χρησιμοποιώντας σαν εκκινητές τους T7 και SP6 (Πίνακας Π5, § Παράρτημα), όπως αναφέρεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο της εταιρείας Promega. Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA από το στέλεχος κατατέθηκε στη Genbank με αριθμό καταχώρισης (accession number) JQ361765.

3.1.2. Ποσοστά ομοιότητας του γονιδίου 16S rRNA και σχεδιασμός του φυλλογενετικού δέντρου του *Ps. fluorescens X*

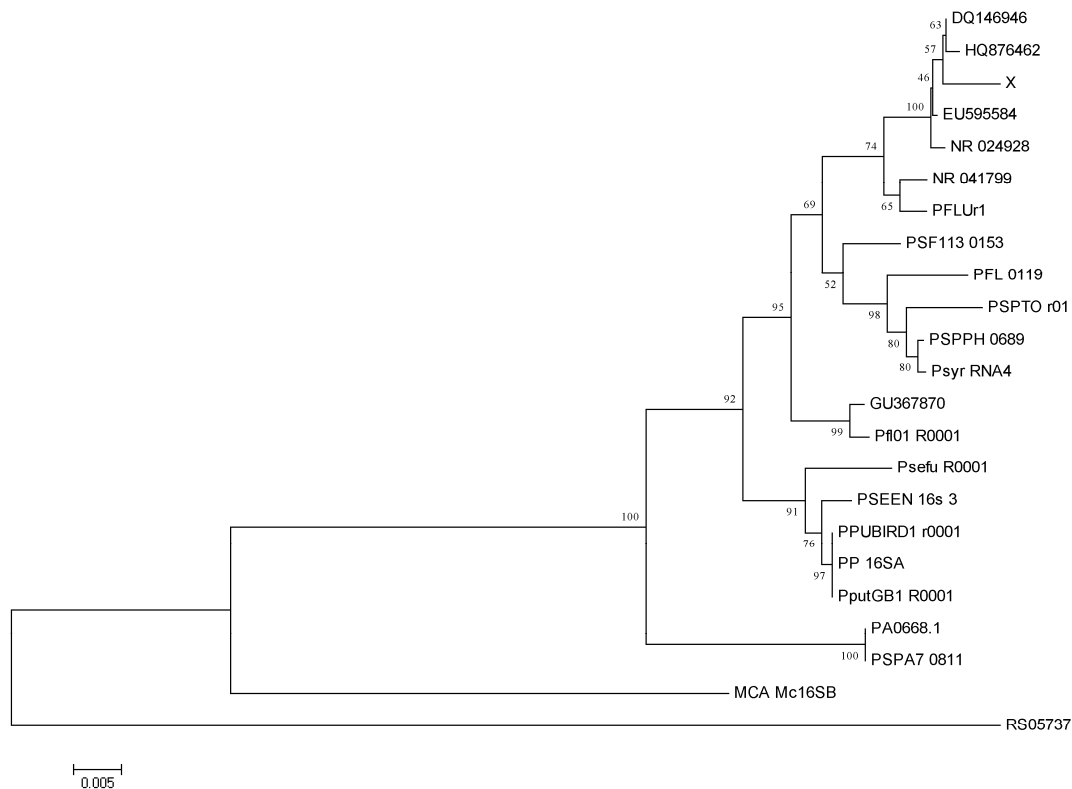
Μετά από σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rRNA του στελέχους *Ps. fluorescens X* με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) προέκυψε ότι αυτή έχει μεγαλύτερη ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA από το στέλεχος *Pseudomonas sp.* LC07. Το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας με στελέχη των οποίων το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχιθεί ήταν αυτό που παρατηρήθηκε με το στέλεχος *Ps.*

fluorescens SBW25.

Πίνακας 3.1: Ποσοστά ομολογίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 16S rRNA του στελέχους *Ps. fluorescens* X με 20 κατατεθειμένες αλληλουχίες στη Genbank.

Στέλεχος	Locus Tag	Μέγιστο ποσοστό ομολογίας (max identity %)	Ποσοστό επικάλυψης (query coverage %)
<i>Ps. sp.</i> LC07	EU595584	99	100
<i>Ps. fluorescens</i> strain PGPR1	HQ876462	99	99
<i>Ps. fluorescens</i> strain F	DQ146946	98	99
<i>Ps. fluorescens</i> SBW25	PFLUr1	98	99
<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	Pf101_R0001	97	99
<i>Ps. fluorescens</i> F113	PSF113_0153	97	99
<i>Ps. fluorescens</i> strain BIT-18	GU367870	97	99
<i>Ps. gessardii</i> strain CIP 105469	NR_024928	99	98
<i>Ps. tolaasii</i> strain LMG 2342	NR_041799	98	98
<i>Ps. fluorescens</i> Pf-5	PFL_0119	96	99
<i>Ps. syringae</i> pv. phaseolicola 1448A	PSPPH_0689	96	99
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Psyr_RNA4	96	99
<i>Ps. putida</i> BIRD-1	PPUBIRD1_r0001	96	99
<i>Ps. putida</i> GB-1	PputGB1_R0001	96	99
<i>Ps. putida</i> KT2440	PP_16SA	96	99
<i>Ps. entomophila</i> L48	PSEEN_16s_3	96	98
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	PSPTO_r01	96	99
<i>Ps. fulva</i> 12-X	Psefu_R0001	95	99
<i>Ps. aeruginosa</i> PA7	PSPA7_0811	94	99
<i>Ps. aeruginosa</i> PAO1	PA0668.1	94	99

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA από το υπό μελέτη στέλεχος και 20 κατατεθειμένων στη Genbank αλληλουχιών. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα των αλληλουχιών 16S rRNA (**Εικόνα 3.1**), με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA5.05 (Tamura *et al.*, 2011), απ'όπου είναι δυνατό να παρατηρηθεί ότι το υπό μελέτη στέλεχος βρίσκεται εξελικτικά πιο κοντά με στελέχη τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως *Ps. fluorescens*.



Εικόνα 3.1: Εξελικτικές σχέσεις του υπό μελέτη στελέχους και των στελεχών αναφοράς βάσει του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές, οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγραφών bootstrap, έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1530 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Methylococcus capsulatus* str. Bath (MCA_Mc16SB) και το *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (RS05737). Ως αλληλουχίες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηριστικά στελέχη του γένους *Pseudomonas* τα οποία εμφανίζονται με τα locus tags των γονιδίων 16S rRNA (EU595584: *Ps. sp.* LC07, GU367870: *Ps. fluorescens* strain BIT-18, HQ876462: *Ps. fluorescens* strain PGPR1, NR_024928: *Ps. gessardii* strain CIP 105469, DQ146946: *Ps. fluorescens* strain F, Pfl01_R0001: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PFL_0119: *Ps. fluorescens* Pf-5, PSF113_0153: *Ps. fluorescens* F113, PFLUr1: *Ps. fluorescens* SBW25, NR_041799: *Ps. tolaasii* strain LMG 2342, Psyr_RNA4: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, PSPPH_0689: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, PPUBIRD1_r0001: *Ps. putida* BIRD-1, PputGB1_R0001: *Ps. putida* GB-1, PP_16SA: *Ps. putida* KT2440, PSEEN_16s_3: *Ps. entomophila* L48, PSPTO_r01: *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, PSPA7_0811: *Ps. aeruginosa* PA7, PA0668.1: *Ps. aeruginosa* PAO1, Psefu_R0001: *Ps. fulva* 12-X).

3.2. Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X ως προς την παρεμπόδιση του μύκητα *P. ultimum*

Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό την ανάλυση των μεταλλάξεων sup^- (suppressiveness minus). Συνολικά ελέγχθηκαν 12000 μονές αποικίες οι οποίες προέκυψαν κατά τη μεταλλαξιγένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27. Κάθε μια από τις αποικίες αυτές ελέγχθηκε για το εάν παρουσιάζει ή όχι παρεμποδιστική δράση εναντίον του *Rhizium ultimum* 1308 σε τρυβλία με PDA, καθώς ο φαινότυπος των στελεχών sup^- παρατηρείται μόνο μετά από βιοδοκιμή.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη που απομονώθηκαν ως μη παρεμποδιστικά για το μύκητα ελέγχθηκαν ξανά σε *in vitro* συνθήκες με μάρτυρα τον άγριο τύπο. Έγιναν τρεις επαναλήψεις για να επιβεβαιωθεί η απώλεια της παρεμποδιστικής δράσης από τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η απώλεια της παρεμποδιστικής δράσης επιβεβαιώνεται με την απώλεια της ικανότητας σχηματισμού ζώνης παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μύκητα, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (**Εικόνα 3.2**). Συνολικά εννέα ήταν τα στελέχη sup^- τα οποία απομονώθηκαν και παρουσίαζαν τον παραπάνω φαινότυπο.



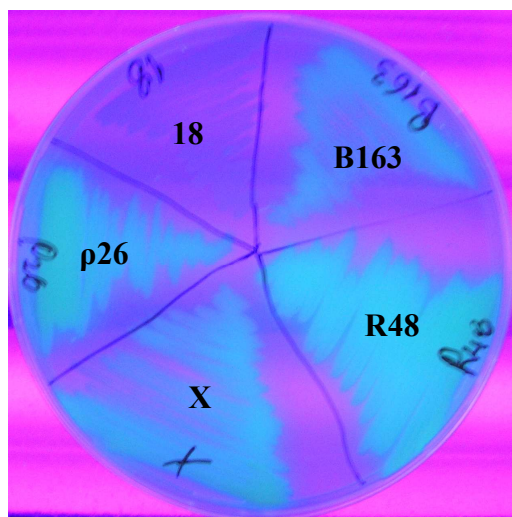
Εικόνα 3.2 : Ο μύκητας *P. ultimum* που εμβολιάζεται στη μέση του τρυβλίου έχει αναπτυχθεί μέχρις ότου να συναντήσει τη ζώνη παρεμπόδισης από τα μεταλλαγμένα στελέχη βακτηριών. Δεξιά στο τρυβλίο έχει εμβολιαστεί ο άγριος τύπος ενώ τα υπόλοιπα είναι μεταλλαγμένα στελέχη, το ένα εκ των οποίων (αριστερά) έχει χάσει την ικανότητα παρεμπόδισης.

3.2.1 Βιοχημικά χαρακτηριστικά των sup^- μεταλλαγμένων στελεχών

Μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas* μια πολύ συχνά απαντώμενη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών είναι αυτή των σιδηροφόρων. Τα σιδηροφόρα (πυοβερντίνες, ψευδοβακτίνες) έχουν την ικανότητα να διεγείρονται από υπεριώδη ακτινοβολία και φθορίζουν (Xiao *et al.*, 1998). Προκειμένου να ελεγχθούν όλα τα sup^- μεταλλαγμένα στελέχη ως προς την ικανότητα παραγωγής χρωμοφόρων

ενώσεων οι οποίες φθορίζουν μετά από διέγερσή τους από υπεριώδη ακτινοβολία, πραγματοποιήθηκε μια περαιτέρω βιοδοκιμή.

Ακολουθώς, για κάθε ένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη sup^- έγινε έλεγχος του φθορισμού και της ανάπτυξης στο θρεπτικό υπόστρωμα King's B (Xiao *et al.*, 1998) και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τον φθορισμό του άγριου τύπου (**Εικόνα 3.3**).

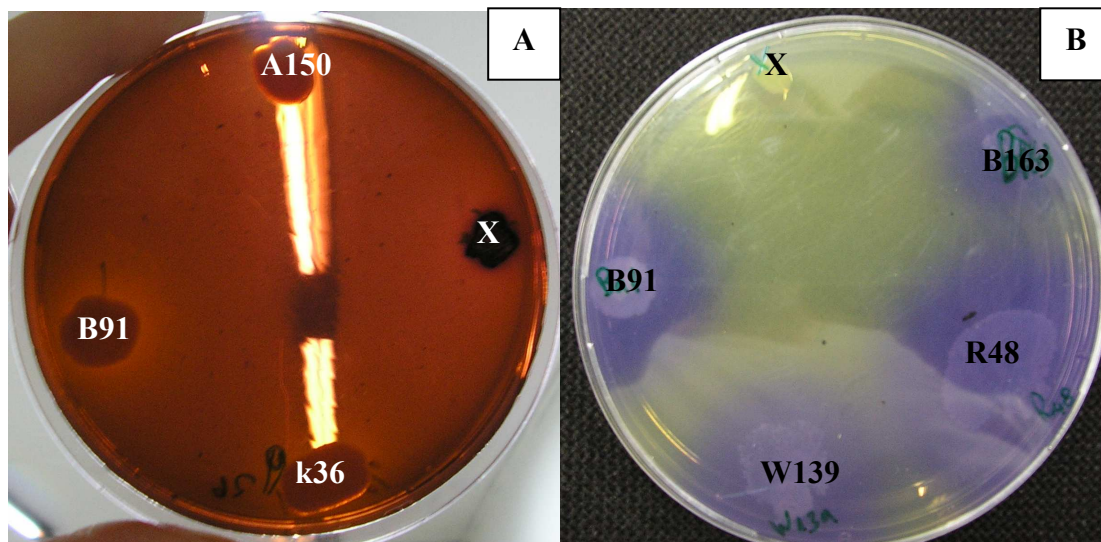


Εικόνα 3.3: Φθορισμός, μετά από διέγερση με λάμπα UV (UltraViolet), τριών από τα απομονωθέντα στελέχη sup^- (p26, B163, R48) καθώς και του άγριου τύπου (X) μετά από την ανάπτυξή τους στο θρεπτικό μέσο King's B. Το στέλεχος 18 δεν παράγει χρωμοφόρες ενώσεις στο θρεπτικό μέσο King's B, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Τα απομονωθέντα στελέχη sup^- διατηρούσαν, στα ίδια επίπεδα με τον άγριο τύπο, την ικανότητα παραγωγής των σιδηροφόρων στο θρεπτικό μέσο King's B. Η παραγωγή αυτών των ενώσεων δε φαίνεται να σχετίζεται με τον φαινότυπο sup^- , μιας και από την όλη διαδικασία απομονώθηκαν στελέχη τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα παραγωγής χρωμοφόρων ενώσεων τα οποία όμως συνέχιζαν να διατηρούν την αντιμυκητιακή τους δράση. Κατά συνέπεια τα σιδηροφόρα δεν εμπλέκονται στην παρεμποδιστική δράση του βακτηρίου κατά του *P. ultimum*.

Ακόμα, κάθε ένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη sup^- ελέγχθηκε ως προς την ικανότητα ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο M9 το οποίο περιέχει ως μοναδική πηγή άνθρακα γλυκόζη 2% (w/v). Στην περίπτωση του μπλε του μεθυλενίου και του κίτρινου της εοσίνης παρατηρείται αλλαγή του χρώματος από κόκκινο-ροζ σε καφέ-μαύρο ιριδίζον στις αποικίες που έχουν την ικανότητα να οξινίζουν το μέσο ανάπτυξης (**Εικόνα 3.4A**), ενώ στην περίπτωση του μωβ της βρωμοκρεσόλης η αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε μωβ οφείλεται στην δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος (**Εικόνα 3.4B**). Από τις βιοδοκιμές αυτές ήταν δυνατό να παρατηρηθεί ότι ο άγριος τύπος του βακτηρίου έχει την ικανότητα να μειώνει το pH του μέσου ανάπτυξης κατά ένα βαθμό (από pH=6 σε pH=5), ενώ όλα τα απομονωθέντα

μεταλλαγμένα στελέχη αυξάνουν το pH του μέσου ανάπτυξης κατά ένα βαθμό (από pH=6 σε pH=7). Η παρεμποδιστική δράση δεν οφείλεται στην μεταβολή του pH μιας και ο μύκητας έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH.

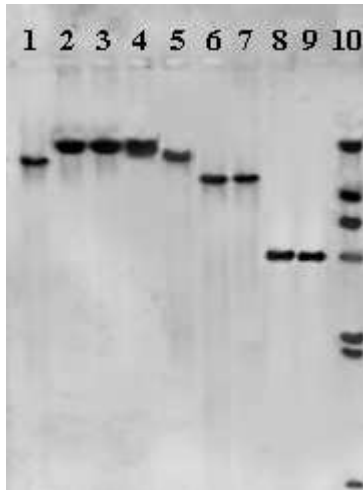


Εικόνα 3.4: A) Τα βακτήρια έχουν εμβολιαστεί αντικριστά στο θρεπτικό μέσο M9 το οποίο περιέχει μοναδική πηγή άνθρακα γλυκόζη (2% w/v) με τις χρωστικές μπλε του μεθυλενίου (65 $\mu\text{g/ml}$) με κίτρινο της εοσίνης (0.4 mg/ml). Οι αποικίες τριών μεταλλαγμένων στελεχών (A150, B91, k36) έχουν το ίδιο χρώμα με το θρεπτικό μέσο (ρόζ) ενώ ο άγριος τύπος έχει αλλάξει σε μαύρο χρώμα (στο δεξί τμήμα του τρυβλίου). B) Καλλιέργεια τεσσάρων μεταλλαγμένων στελεχών (B91, B163, R48, W139) και του άγριου τύπου στο θρεπτικό μέσο M9 με μοναδική πηγή άνθρακα γλυκόζη (2% w/v) στο οποίο έχει προστεθεί ο δείκτης μωβ της βρωμοκρεσόλης (15 mg/l)

3.3. Απομόνωση των γονιδίων παρεμπόδισης

3.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA εκατέρωθεν της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου

Κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση επιλέχθηκαν μοναδιαίες αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία με καναμυκίνη. Από αυτές απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα απομονωμένα πλασμίδια δεν προέρχονται από την λιγοποίηση περισσοτέρων κομματιών μεταξύ τους, το καθένα από αυτά υπέστη πέψη με το ένζυμο *BamHI*. Η διαγνωστική πέψη αυτή (**Εικόνα 3.5**), είναι πολύ σημαντική γιατί επιβεβαιώνει ότι το απομονωθέν πλασμίδιο δεν είναι προϊόν κυκλοποίησης δύο ή περισσοτέρων τμημάτων γονιδιωματικού DNA. Ακόμα, παρέχει μια πρώτη εικόνα για την γονιδιωματική περιοχή στην οποία έχει γίνει η ένθεση του μεταθετού στοιχείου, καθώς και επιτρέπει μια πρώτη κατηγοριοποίηση των μεταλλαγμένων στελεχών ανάλογα με το μέγεθος του πλασμιδίου απελευθέρωσης.



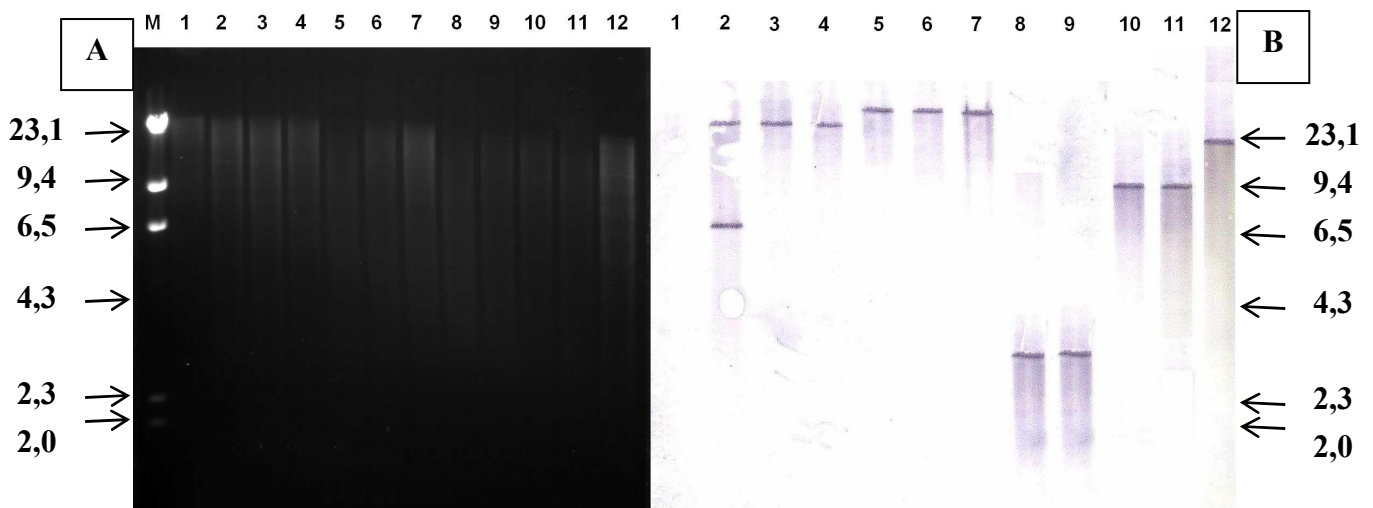
Εικόνα 3.5: Πέψεις των πλασμιδίων απελευθέρωσης που προέκυψαν από το καθένα απομονωμένο μεταλλαγμένο στέλεχος. Στις στήλες 1 έως 9 αναλύονται οι πέψεις με το ένζυμο *Bam*HI των πλασμιδίων απελευθέρωσης από τα μεταλλαγμένα στελέχη ρ93, k36, W139, R48, δ40, B91, B163, ρ26, A150, αντίστοιχα. Η στήλη 10 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα μοριακού μεγέθους, ο οποίος είναι το DNA του λ φάγου μετά από πέψη με το ένζυμο *Hind*III.

Στο σημείο αυτό (**Εικόνα 3.5**) είναι δυνατόν να διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη μπορούν να διακριθούν σε πέντε ομάδες, αναλόγως του μεγέθους του πλασμιδίου απελευθέρωσης. Οι ομάδες αυτές είναι οι εξής:

- Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη k36, R48 και W139 στα οποία το πλασμίδιο που απομονώθηκε κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση έχει μέγεθος 19,6kb(στήλες 2, 3 και 4 της εικόνας 3.4).
- Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη B91, B163 στα οποία το πλασμίδιο που απομονώθηκε κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση έχει μέγεθος 13,2kb (στήλες 6 και 7 της εικόνας 3.4).
- Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη A150, ρ26 στα οποία το πλασμίδιο που απομονώθηκε κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση έχει μέγεθος 4,7kb (στήλες 8 και 9 της εικόνας 3.4).
- Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει τα στελέχη δ40, ρ93 στα οποία το πλασμίδιο που απομονώθηκε κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση έχει μέγεθος 17,6kb (στήλες 1 και 5 της εικόνας 3.4).

3.3.2. Ανάλυση των κλώνων της πλασμιδιακής απελευθέρωσης

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι όλα τα απομονωθέντα sup^- μεταλλαγμένα στελέχη φέρουν μοναδική ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο γονιδιώμα τους, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του υβριδισμού κατά Southern (**Εικόνα 3.6**). Κατά τον υβριδισμό ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27 (**Εικόνα 2.1**, § Υλικά και Μέθοδοι) το οποίο, αφού απομονώθηκε μετά από πέψη με το ένζυμο *Sal*I από τον πλασμίδιο pRL27, σημάνθηκε με DIG-11-dUTP.



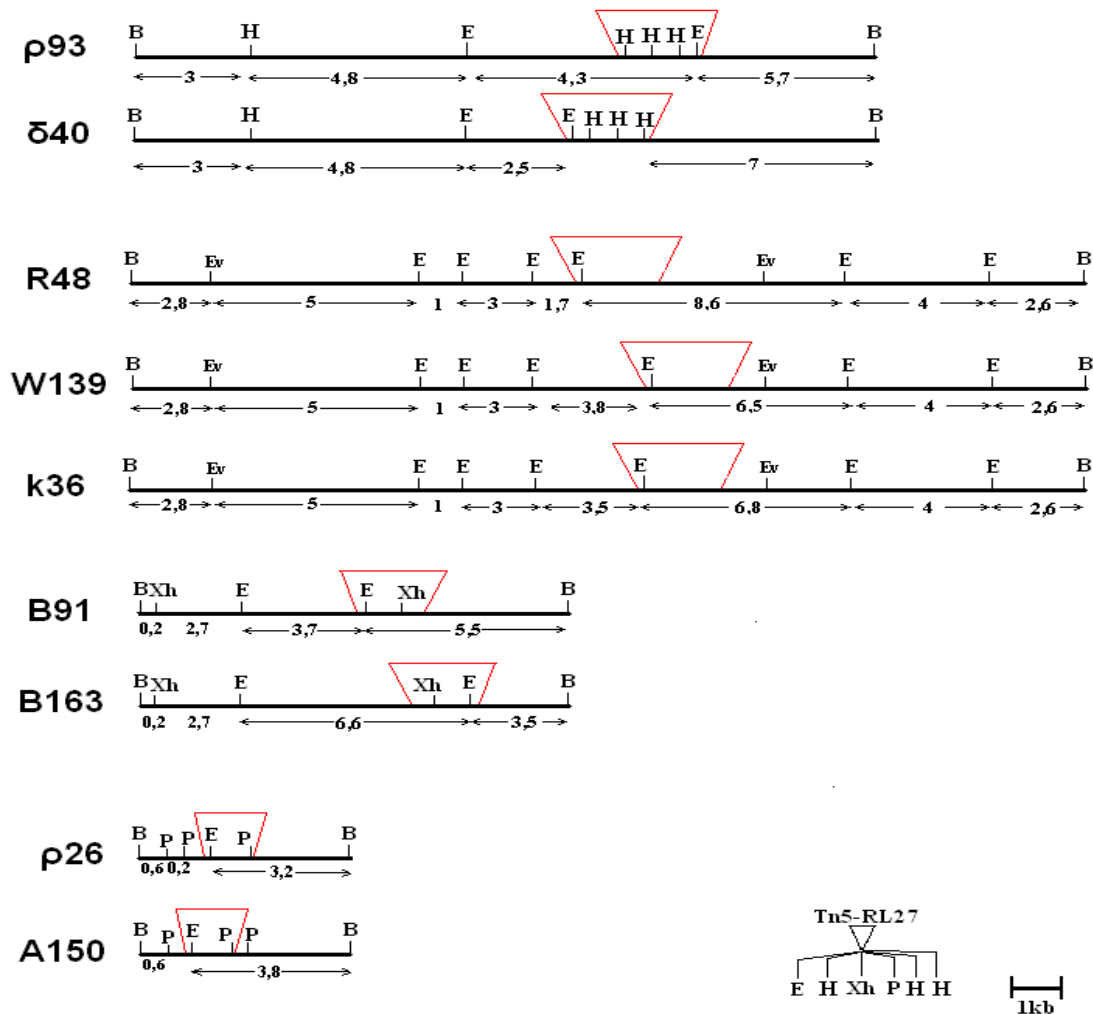
Εικόνα 3.6: Υβριδισμός κατά Southern του μεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών. Α) Ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτική αγαρόζη. Β) Αποτελέσματα υβριδισμού κατά Southern με ανιχνευτή το Tn5-RL27 (επισημασμένο με DIG-11-dUTP). Η στήλη 12 αντιπροσωπεύει το θετικό μάρτυρα ο οποίος είναι το γονιδιωματικό DNA από στέλεχος (*Ps. aureofaciens* O2A1) το οποίο φέρει μοναδική ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμά του, ενώ η στήλη 1 αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος είναι DNA από τον άγριο τύπο του υπό μελέτη βακτηρίου. Οι στήλες 2 έως 11 αντιπροσωπεύουν τα μεταλλαγμένα στελέχη θ123, δ40, ρ93, k36, R48, W139, A150, ρ26, B91, B163, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα γονιδιωματικού DNA έχουν υποστεί πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI. Η στήλη με την ένδειξη M αντιπροσωπεύει γνωστά μοριακά βάρη με μεγέθη τους αριθμούς σε kb.

Εκτός από την επιβεβαίωση της μοναδικότητας της ένθεσης μέσα στο γονιδίωμα του κάθε μεταλλαγμένου στελέχους ένα ακόμα πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα επανελέγχου της ορθότητας του μεγέθους του κάθε αυτολιγοποιημένου τμήματος, που προέκυψε από την πλασμιδιακή απελευθέρωση. Όπως είναι εμφανές από τη παραπάνω εικόνα, τα μεγέθη των πλασμιδίων από την απελευθέρωση συμφωνούν με το μέγεθος των τμημάτων που υβριδοποιήθηκαν με τον ανιχνευτή. Έτσι, είναι βέβαιο ότι τα πλασμίδια που απομονώθηκαν κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση προέρχονται από το γονιδιωματικό DNA του υπό μελέτη βακτηρίου και δεν είναι απλά προϊόντα ανασυνδυασμού, ο οποίος έλαβε χώρα στα βακτηριακά κύτταρα.

Το στέλεχος θ123 (στήλη 2, **Εικόνα 3.6**) έφερε περισσότερες από μια ενθέσεις του Tn5-RL27 στο γονιδίωμά του και αποκλείστηκε από περαιτέρω μελέτη. Η μελέτη ενός τέτοιου στελέχους παρουσιάζει ένα μεγάλο εμπόδιο. Ο φαινότυπος της μετάλλαξης μπορεί να οφείλεται είτε στην μετάλλαξη που προκαλεί η πρώτη ένθεση, είτε στην μετάλλαξη που προκαλεί η δεύτερη ένθεση, είτε στην αθροιστική δράση και των δύο μεταλλάξεων. Όπως γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ο φαινότυπος sup^- του

μεταλλαγμένου στελέχους δεν είναι δυνατόν να αποδοθεί ξεκάθαρα σε ένα αίτιο πράγμα που κάνει τη μελέτη, της μετάλλαξης αυτής, αρκετά περίπλοκη.

Κατόπιν, ο κάθε κλώνος που απομονώθηκε από κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος υπέστη πέψεις με διάφορα ένζυμα περιορισμού με σκοπό να χαρτογραφηθεί κάθε ένα πλασμίδιο απελευθέρωσης (**Εικόνα 3.7**). Τα ένζυμα τα οποία επιλέχτηκαν για τη χαρτογράφηση έχουν τουλάχιστον μια θέση αναγνώρισης μέσα στο κάθε πλασμίδιο απελευθέρωσης, μιας και έχουν μια θέση περιορισμού μέσα στο μεταθετό στοιχείο. Το περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI είναι το μόνο το οποίο έχει μοναδική θέση αναγνώρισης στο κάθε πλασμίδιο απελευθέρωσης. Στους χάρτες που ακολουθούν σημειώνεται η θέση του μεταθετού στοιχείου, τα ένζυμα τα οποία έχουν θέση αναγνώρισης μέσα στο Tn5-RL27 και η κλίμακα μεγέθους.



Εικόνα 3.7 : Χάρτης με τα ένζυμα περιορισμού *Eco*RI (E), *Eco*RV (Ev), *Bam*HI (B), *Pst*I (P), *Xho*I (Xh) και *Hind*III (H) των 9 κλώνων που απομονώθηκαν κατά την πλασμιδιακή απελευθέρωση σε καθένα από τα 9 sup⁻ μεταλλαγμένα στελέχη. Στον κάθε κλώνο έχει

επισημανθεί η θέση του μεταθετού στοιχείου με κόκκινο χρώμα. Τα μεγέθη παρουσιάζονται σε kb.

Τέτοιου είδους χάρτες είναι απαραίτητοι γιατί δίνουν πολλές δομικές πληροφορίες για τα απομονωμένα γονιδιωματικά τμήματα. Έτσι, δίνεται η ικανότητα να διακριθούν οι διαφορές αλλά και οι ιδιαίτερες ομοιότητες που είναι δυνατόν να υπάρχουν μεταξύ των κλώνων. Με τη βοήθεια, λοιπόν, του παρακάτω χάρτη είναι δυνατόν να επαληθευτεί η κατηγοριοποίηση που έγινε εξαρχής στα 9 μεταλλαγμένα στελέχη. Διακρίνονται πολύ εύκολα 4 διαφορετικοί γονιδιακοί τόποι στους οποίους η ένθεση του Tn5-RL27 έχει προσδώσει το φαινότυπο sup⁻.

Ακόμα, είναι φανερό ότι μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών της ίδιας ομάδας η ένθεση του Tn5-RL27 έχει συμβεί σε διαφορετικό σημείο, με αποτέλεσμα κάθε πρότυπο να είναι μοναδικό. Το γεγονός ότι όλα τα πλασμίδια απελευθέρωσης εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο, καθιστά και τα 9 μεταλλαγμένα στελέχη διαφορετικά μεταξύ τους και προσδίδει στο καθένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων γονιδίων και στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενετικού τόπου της ένθεσης.

3.4. Ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων γονιδίων

3.4.1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των γενετικών περιοχών όπως προκύπτουν από την πλασμιδιακή απελευθέρωση

Τα απομονωμένα πλασμίδια απελευθέρωσης αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιώντας ειδικούς ως προς το μεταθετό στοιχείο εκκινητές (transposon-specific primers). Οι εκκινητές αυτοί ήταν ο trnRL17-1, ο οποίος υβριδίζει στην αλληλουχία του oriR6K, και ο trnRL13-2, ο οποίος υβριδίζει στην αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (*aph*) (Πίνακας Π5, § Παράρτημα).

Στην κάθε αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές αυτούς ήταν δυνατόν να διακριθούν τα εξής βασικά στοιχεία (Larsen *et al.*, 2002):

- Χαρακτηριστικό του κάθε μεταθετού στοιχείου της οικογένειας Tn5 είναι ότι προκαλεί τον διπλασιασμό 9 βάσεων στο σημείο ένθεσής του (Reznikoff, 1993). Οι 9 βάσεις, οι οποίες διπλασιάζονται κατά την ένθεση του μεταθετού στοιχείου, αποτελούν την αλληλουχία-στόχο του ενζύμου της μεταθετάσης. Η μεταθετάση κατά τη διαδικασία της μετάθεσης αναγνωρίζει τις 9 βάσεις και κόβει στην αλληλουχία αυτή με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθούν 5'

κολλώδη άκρα από τις 9 αυτές βάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μεταθετό στοιχείο το οποίο έχει εισαχθεί στο DNA του δέκτη να περιστοιχίζεται και στο 5' και στο 3' άκρο του από την αλληλουχία-στόχο η οποία έχει διπλασιαστεί. Στην κάθε αλληλούχιση διαπιστώθηκε ότι υπήρχε η αλληλουχία-στόχος έξω ακριβώς από την δεξιά και αριστερή ακραία επανάληψη του Tn5-RL27. Στην περαιτέρω μελέτη της κάθε αλληλουχίας έχει εξαιρεθεί ο ένας από τους δύο διπλασιασμούς.

- Οι εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν, υβριδίζουν εντός της αλληλουχίας του Tn5-RL27. Είναι επόμενο, λοιπόν, στα αποτελέσματα της αλληλούχισης να περιλαμβάνεται, εκτός από την αλληλουχία των βάσεων του υπό μελέτη βακτηρίου, και ένα τμήμα του μεταθετού στοιχείου το οποίο πρέπει να εξαιρεθεί από την παρακάτω έρευνα. Η αναγνώριση του τμήματος της αλληλούχισης που εξαιρείται γίνεται από την αλληλουχία των ακραίων επαναλήψεων (5'GTGTATAAGAGACAG 3').

Σε κάθε αλληλούχιση η ανάγνωση των ακραίων επαναλήψεων και της αλληλουχίας-στόχου αποτελεί ασφαλιστική δικλείδα. Από τη μια, η ανάγνωση αυτών των βασικών στοιχείων αποτελεί επιβεβαίωση ότι το σύστημα της μεταλλαξιγένεσης με το Tn5-RL27 και της πλασμιδιακής απελευθέρωσης που ακολούθησε δεν περιείχε λάθη και, από την άλλη, η αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε ήταν σωστή.

3.4.1.1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την πρώτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών

Τα αποτελέσματα για την πρώτη ομάδα, η οποία αποτελείται από τα μεταλλαγμένα στελέχη k36, R48 και W139, έδειξαν ότι η ένθεση του Tn5-RL27 είχε συμβεί σε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η ένθεση του Tn5-RL27 και για τα τρία μεταλλαγμένα στελέχη, της ομάδας αυτής, εντοπίζεται μέσα στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, σε διαφορετικά όμως σημεία του.

Το κωδικόνιο έναρξης (ATG) εντοπίστηκε από την αλληλούχιση του πλασμιδίου απελευθέρωσης στο στέλεχος R48, το οποίο βρίσκεται 406 βάσεις από την ένθεση του Tn5-RL27 στο στέλεχος αυτό. Από την αλληλούχιση του πλασμιδίου απελευθέρωσης από τα στελέχη k36 και W139 εντοπίστηκε το κωδικόνιο λήξης (TAA) το οποίο απέχει, από την ένθεση του Tn5-RL27, 316 βάσεις στο πρώτο και 165 βάσεις στο δεύτερο μεταλλαγμένο στέλεχος.

Με την αλληλούχιση των πλασμιδίων απελευθέρωσης από τα μεταλλαγμένα στελέχη της ομάδας αυτής αναγνώστηκε μόνο η περιοχή γύρω από το κωδικόνιο έναρξης και από το κωδικόνιο λήξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης. Προκειμένου να αποκτηθεί ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδίου, αλλά και να γίνει ανάγνωση των βάσεων εκτός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, ακολουθήθηκε η διαδικασία διαδοχικής αλληλούχισης με εκκινητές (primer walking), η οποία πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές R48-RL17-1 και *gdh1* (Εικόνα Π1, Πίνακας Π1, § Παράρτημα).

Η πλήρης αλληλούχιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και της περιοχής γύρω από αυτό η οποία επιτεύχθηκε μετά από δύο αντιδράσεις με τους προαναφερθέντες εκκινητές, είχε τα εξής πλεονεκτήματα: α) να προσδιοριστεί επακριβώς το μέγεθος του γονιδίου το οποίο φέρει τις ενθέσεις (2.418 bp) και το οποίο ονομάστηκε *sup1*, β) να βρεθεί η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται, γ) να προσδιοριστούν οι πιθανές αλληλουχίες των μεταγραφικών υποκινητών και δ) να διερευνηθούν τυχόντα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, εκτός του γονιδίου *sup1*. Η αλληλουχία του γονιδίου *sup1*, καθώς και της περιοχής ανωφερικά και κατωφερικά αυτού, παρουσιάζεται στην Εικόνα Π1 (§ Παράρτημα) και κατατέθηκε στη βάση δεδομένων Genbank υπό τον αριθμό καταχώρισης HQ383687 (accession number).

Ανωφερικά του γονιδίου *sup1* και σε απόσταση 371 βάσεων βρίσκεται το κωδικόνιο λήξης ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, *orfX*. Το κωδικόνιο έναρξης για το *orfX* δεν βρέθηκε στο πλασμίδιο που αλληλουχήθηκε και έτσι διατυπώθηκε η υπόθεση ότι αποτελεί τμήμα ενός γονιδίου. Ακόμα, από τον έλεγχο της παραπάνω αλληλουχίας για την ύπαρξη ενός μεταγραφικού υποκινητή βρέθηκε μια πιθανή θέση, η οποία εντοπίστηκε μεταξύ του *sup1* και του *orfX*. με τη βοήθεια του προγράμματος NNPP v2.2 (Reese, 2001).

Το γεγονός ότι έχουν απομονωθεί τρία μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία φέρουν την ένθεση του Tn5-RL27 στο γονίδιο αυτό είναι αρκετά σημαντικό. Το γονίδιο αυτό θα πρέπει να κατέχει πρωταρχικό ρόλο στην εμφάνιση του φαινοτύπου *sup*, στον άγριο τύπο. Είναι αναγκαίο, λοιπόν, να βρεθούν ομολογίες της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup1* με ήδη καταχωρημένες. Η ανάλυση αυτή παρουσιάζεται στην παράγραφο 3.4.2.

3.4.1.2. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την δεύτερη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών

Στη δεύτερη ομάδα, η οποία αποτελείται από τα μεταλλαγμένα στελέχη B91 και B163, διαπιστώθηκε ότι η ένθεση του Tn5-RL27 είχε συμβεί στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, σε διαφορετικά όμως σημεία του. Το κωδικόνιο έναρξης (ATG) εντοπίστηκε από την αλληλούχιση του πλασμιδίου απελευθέρωσης στο στέλεχος B91, και βρίσκεται 210 βάσεις από την ένθεση του Tn5-RL27 στο στέλεχος αυτό. Από την αλληλούχιση του πλασμιδίου απελευθέρωσης από το στέλεχος B163 εντοπίστηκε το κωδικόνιο λήξης (TGA) το οποίο απέχει 303 βάσεις από την ένθεση του Tn5-RL27. Το γονίδιο αυτό, το οποίο ονομάστηκε *sup2*, έχει μέγεθος 2.424 βάσεις και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 808 αμινοξέων (Εικόνα Π2, § Παράρτημα).

Η αλληλούχιση των πλασμιδίων από τη δεύτερη ομάδα αποκάλυψε την θέση αναγνώρισης του ενζύμου *BamHI* (GGATCC), το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί κατά της διαδικασία της πλασμιδιακής απελευθέρωσης. Η θέση αναγνώρισης του *BamHI* βρίσκεται 1534 βάσεις μετά (με κατεύθυνση από το 5' στο 3' άκρο) το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *sup2*. Η αλληλουχία του γονιδίου *sup2* παρουσιάζεται στην Εικόνα Π2 (§ Παράρτημα) και η νουκλεοτιδική αλληλουχία ολόκληρης της γονιδιωματικής περιοχής κατατέθηκε στην Genbank με τον αριθμό καταχώρισης JQ039398.

Από την αλληλούχιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *sup2* και της περιοχής γύρω από αυτό βρέθηκαν α) η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται, γ) η πιθανή θέση ενός μεταγραφικού υποκινητή (ο οποίος προβλέφθηκε με πιθανότητα 0,96 με τη βοήθεια του προγράμματος NNPP v2.2 το οποίο είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο μέσω της σελίδας του Berkeley Drosophila Genome Project, [http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html]) (Reese, 2001) και δ) ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια έξω από το γονίδιο *sup2*.

Είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι, κατωφερικά του γονιδίου *sup2* και σε απόσταση 158 bp βρίσκεται ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf1*, αποτελούμενο από 75 bp. Ακόμα, σε απόσταση 71 bp από το *orf1* βρίσκεται ακόμα ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf2*, το οποίο αποτελείται από 912 bp. Τέλος, σε απόσταση 92 bp από το *orf2* βρίσκεται ακόμα ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf3*, το οποίο έχει την θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο *BamHI*.

Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι ανωφερικά του γονιδίου *sup2* και σε απόσταση 48 bp βρίσκεται ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf0*, αποτελούμενο από 795 bp. Από τον έλεγχο της παραπάνω αλληλουχίας για την ύπαρξη ενός μεταγραφικού υποκινητή βρέθηκε μια πιθανή θέση η οποία εντοπίστηκε εντός του αναγνωστικού πλαισίου *orf0*. Σε απόσταση 10 bp από το κωδικόνιο έναρξης του *orf0* βρίσκεται το κωδικόνιο λήξης ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, *orfA*, το οποίο αποτελείται από 338 bp. Το κωδικόνιο έναρξης του *orfA* δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστεί, στην παρούσα αλληλουχία, και επομένως θεωρήθηκε ότι αποτελεί τμήμα ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης.

Οι μικρές αποστάσεις μεταξύ των τεσσάρων αναγνωστικών πλαισίων (*sup2*, *orf1*, *orf2*, *orf3*) καθώς και η μοναδικότητα του εκκινητή, που έχει προβλεφθεί, είναι ενδεικτικά στοιχεία για την ύπαρξη ενός οπερονίου. Πιθανολογείται δε, ότι στο οπερόνιο αυτό ενδεχομένως να ανήκουν και άλλα γονίδια πέραν των ως άνω αναφερομένων, τα οποία βρίσκονται κατωφερικά της θέσης αναγνώρισης του *BamHI*. Τα γονίδια *orf0* και *orfA* δεν φαίνεται να βρίσκονται μέσα στο οπερόνιο αυτό, μιας και ο μεταγραφικός υποκινητής, που είχε προβλεφθεί, δεν τα περιελάμβανε.

3.4.1.3. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την τρίτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών

Στην τρίτη ομάδα, η οποία αποτελείται από τα μεταλλαγμένα στελέχη A150 και ρ26, διαπιστώθηκε ότι η ένθεση του Tn5-RL27 είχε συμβεί σε δυο ξεχωριστά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (Εικόνα Π3, § Παράρτημα). Οι δύο αυτές ενθέσεις βρέθηκε ότι απέχουν μεταξύ τους 661 bp, γεγονός που επιβεβαιώνει την χαρτογράφηση της περιοχής με ένζυμα περιορισμού, η οποία έχει παρουσιαστεί σε προηγούμενη παράγραφο.

Για το στέλεχος A150 το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, στο οποίο εντοπίστηκε η ένθεση του Tn5-RL27, έχει μέγεθος 276 bp και η ένθεση απέχει 57 bp από το κωδικόνιο έναρξης (ATG) και 219 bp από το κωδικόνιο λήξης (TGA). Το γονίδιο αυτό, το οποίο ονομάστηκε *sup3*, κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 92 αμινοξέων.

Στο στέλεχος ρ26 το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, στο οποίο εντοπίστηκε η ένθεση του Tn5-RL27, έχει μέγεθος 996 bp και η ένθεση απέχει 307 bp από το κωδικόνιο έναρξης (ATG) και 689 bp από το κωδικόνιο λήξης (TGA). Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *sup4* και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 332 αμινοξέων.

Από την αλληλούχιση των πλασμιδίων στην τρίτη ομάδα εντοπίστηκε η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI (GGATCC). Η θέση αναγνώρισης του *Bam*HI βρίσκεται 517 bp αριστερά (με κατεύθυνση από το 3' στο 5' άκρο) από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *sup3* και 919 bp αριστερά από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *sup4*. Η γονιδιωματική περιοχή των *sup3* και *sup4* κατατέθηκε στην Genbank με τον αριθμό καταχώρισης JQ039398.

Ακριβώς πριν από την αλληλουχία του γονιδίου *sup3* (ανωφερικά) υπάρχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf4*, από το οποίο αναγνώστηκε μόνο το κωδικόνιο λήξης του (TGA). Το κωδικόνιο λήξης αυτού του αναγνωστικού αυτού πλαισίου επικαλύπτεται με το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *sup3*. Έτσι η τετράδα των βάσεων ATGA, η οποία έχει επισημανθεί με ρόζ γράμματα (Εικόνα Π3, § Παράρτημα), εμπεριέχει το κωδικόνιο λήξης και το κωδικόνιο έναρξης δύο διαφορετικών αναγνωστικών πλαισίων. Τέτοιες δομές έχουν μελετηθεί και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην οργάνωση ενός οπερονίου (Salgado *et al.*, 2000). Είναι πολύ πιθανό λοιπόν τα δυο αυτά γονίδια ένα είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο.

Τα γονίδια *sup3* και *sup4* απέχουν μόνο 126 βάσεις μεταξύ τους και η κατεύθυνση μεταγραφής τους είναι η ίδια. Το γεγονός αυτό προκάλεσε τις υποψίες ότι τα γονίδια *sup3* και *sup4*, αλλά και το γονίδιο το οποίο βρίσκεται ανωφερικά του *sup3*, είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Στα αποτελέσματα της αλληλούχισης του πλασμιδίου απελευθέρωσης της ομάδας αυτής πραγματοποιήθηκε προσπάθεια για την ανεύρεση του μεταγραφικού υποκινητή με τη βοήθεια του προγράμματος προγράμματος NNPP v2.2 [http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html] (Reese, 2001), το οποίο κατέστη αδύνατο. Η απουσία ενός μεταγραφικού υποκινητή ενισχύει την υπόθεση ότι τα γονίδια *orf4*, *sup3* και *sup4* είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Ο εκκινητής αυτός πρέπει να βρίσκεται ανωφερικά του *orf4*, εκτός της κλωνοποιημένης περιοχής, και το οπερόνιο πιθανώς να μην αποτελείται μόνο από αυτά τα τρία γονίδια.

3.4.1.4. Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων των πλασμιδίων απελευθέρωσης από την τέταρτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών

Από την αλληλούχιση του πλασμιδίου απελευθέρωσης στο μεταλλαγμένο στέλεχος ρ93, το οποίο ανήκει στην τέταρτη ομάδα, βρέθηκε ότι η ένθεση του Tn5-RL27 είχε συμβεί σε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το κωδικόνιο έναρξης (ATG)

βρίσκεται 39 bp πριν από την ένθεση του Tn5-RL27 στο στέλεχος αυτό, ενώ το κωδικόνιο λήξης (TGA) απέχει 638 bp μετά την ένθεση. Το γονίδιο αυτό, το οποίο ονομάστηκε *sup5*, έχει μέγεθος 777 bp και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 259 αμινοξέων (**Εικόνα Π4**, § Παράρτημα).

Η αλληλούχιση του πλασμιδίου στο μεταλλαγμένο στέλεχος δ40, ανέδειξε ότι η ένθεση του Tn5-RL27 έχει συμβεί μέσα στην αλληλουχία ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης. Το ανοιχτό αυτό αναγνωστικό πλαίσιο, το οποίο ονομάστηκε *sup6*, έχει μέγεθος 348 bp και κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 116 αμινοξέων (**Εικόνα Π4**, § Παράρτημα). Η ένθεση του Tn5-RL27 εντοπίστηκε 219 bp πριν από το κωδικόνιο έναρξης του *sup6* και 129 bp μετά από το κωδικόνιο λήξης. Η γονιδιωματική περιοχή των *sup5* και *sup6* κατατέθηκε στην Genbank με τον αριθμό καταχώρισης JQ039399.

Ανωφερικά του γονιδίου *sup5* υπάρχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, *orf6*, από το οποίο αναγνώστηκε μόνο το κωδικόνιο λήξης του (TGA). Το κωδικόνιο λήξης του *orf6* απέχει 460 bp από το κωδικόνιο έναρξης του *sup5*. Στην περιοχή μεταξύ των δύο αυτών αναγνωστικών πλαισίων ήταν δυνατόν να προβλεφθεί, με τη βοήθεια του προγράμματος NNPP v2.2 (Reese, 2001), με πιθανότητα $P=0.9$, η αλληλουχία ενός μοναδικού μεταγραφικού υποκινητή.

Ακριβώς πριν από το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *sup6* (ανωφερικά) βρίσκεται το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *sup5*. Το κωδικόνιο λήξης του *sup5* επικαλύπτεται με το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *sup6*. Έτσι η τετράδα των βάσεων ATGA, η οποία έχει επισημανθεί με ρόζ γράμματα (**Εικόνα Π4**, § Παράρτημα), εμπεριέχει το κωδικόνιο λήξης και το κωδικόνιο έναρξης δύο διαφορετικών αναγνωστικών πλαισίων. Τέτοιες δομές έχουν μελετηθεί και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην οργάνωση ενός οπερονίου (Salgado *et al.*, 2000). Πιθανολογείται ότι τα δυο αυτά γονίδια μπορεί να είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο.

Κατωφερικά του γονιδίου *sup6*, σε απόσταση 24 bp εντοπίζεται το κωδικόνιο έναρξης ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, *orf7*, το οποίο έχει μέγεθος 930 bp. Στην ίδια κατεύθυνση, κατωφερικά του *orf7* σε απόσταση 24 bp εντοπίζεται το κωδικόνιο έναρξης ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, *orf8*.

Η παρουσία ενός μοναδικού μεταγραφικού υποκινητή, η ίδια κατεύθυνση μεταγραφής, οι μικρές αποστάσεις μεταξύ των γονιδίων και η ύπαρξη αλληλεπικαλυπτόμενων κωδικονίων έναρξης και λήξης ενισχύουν την άποψη ότι τα γονίδια *sup5*, *sup6*, *orf7* και *orf8* είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Το οπερόνιο

αυτό πιθανώς να μην αποτελείται μόνο από αυτά τα τέσσερα γονίδια. Γονίδια κατωφερικά του *orf8*, εκτός της περιοχής του χρωμοσώματος που αλληλουχίστηκε από τα πλασμίδια απελευθέρωσης των στελεχών της τέταρτης ομάδας, είναι δυνατόν να ανήκουν στο οπερόνιο αυτό.

3.4.2. Το γονίδιο *sup1* κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης (Gcd)

Το πολυπεπτιδίο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sup1*, αποτελείται από 805 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 85,962 kD και ισοηλεκτρικό σημείο $pI=5.89$, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση. Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup1* έδειξε ότι παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την κينوπρωτεϊνική αφυδρογονάση της γλυκόζης (PQQ-Gcd), η οποία απαντάται μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas*.

Στο γονιδίωμα των αλληλουχημένων στελεχών *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. entomophila*, *Ps. syringae* και *Ps. stutzeri*, βρέθηκαν δύο γονίδια τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη PQQ-Gcd, τα οποία ονομάστηκαν *pqq-gcd1* και *pqq-gcd2*. Σε αντίθεση με τα παραπάνω είδη, όλα τα στελέχη του είδους *Ps. aeruginosa* καθώς και το στέλεχος *Ps. mendonica* γμπ βρέθηκε ότι έχουν μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την PQQ-Gcd1 (*pqq-gcd1*) στο γονιδίωμά τους.

Το ποσοστό πλήρους ομοιότητας των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *pqq-gcd1* και *pqq-gcd2* του κάθε στελέχους υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος LALIGN (Huang *et al.*, 1991). Παρόλο που οι δύο πρωτεΐνες του κάθε στελέχους έχουν τον ίδιο αριθμό αμινοξέων και φαίνεται ότι έχουν την ίδια λειτουργία, τα ποσοστά πλήρους ομοιότητας τους είναι αρκετά χαμηλά (Πίνακας Π2, § Παράρτημα) και κυμαίνονται μεταξύ 34,4 έως 43,3%.

Παρουσία δύο γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Pqq-gcd έχει αναφερθεί στα στελέχη βακτηρίων *Pantoea citrea 1056R* (Pujol *et al.*, 1999) και *Acinetobacter calcoaceticus LMD79.41* (Clenton-Jansen *et al.*, 1988) καθώς και σε δύο στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Οι αναφορές στα στελέχη *Ps. putida* ATCC 11172 (Vrionis *et al.*, 2002) και *Ps. butanovora* ATCC 43655 (Vangnai *et al.*, 2002) είναι οι μοναδικές για το γένος αυτό.

Η πρωτεΐνη Sup1 παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό πλήρους ομοιότητας με όλες τις πρωτεΐνες PQQ-Gcd1 (65-95%) (Πίνακας Π2, § Παράρτημα), ενώ το ποσοστό πλήρους ομοιότητας με όλες τις πρωτεΐνες PQQ-Gcd2 είναι πάρα πολύ χαμηλό (42-33%). Η Sup1 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα (95%) με την PQQ-Gcd1

(PFLU1086), από το στέλεχος *Ps. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009), ενώ ενδεικτικά με την PQQ-Gcd2 (PFLU2304), από το ίδιο στέλεχος, το ποσοστό ομοιότητας είναι μόλις 42%. Το χαμηλότερο ποσοστό ομοιότητας (51%) στο γένος *Pseudomonas* παρουσιάζεται μεταξύ της Sup1 και της PQQ-Gcd1 από τα στελέχη *Ps. mendocina* γμρ και *Ps. stutzeri* A1501. Το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ της Sup1 και της PQQ-Gcd2 από το στέλεχος *Ps. stutzeri* A1501 είναι επίσης το χαμηλότερο για το γένος *Pseudomonas* (33%).

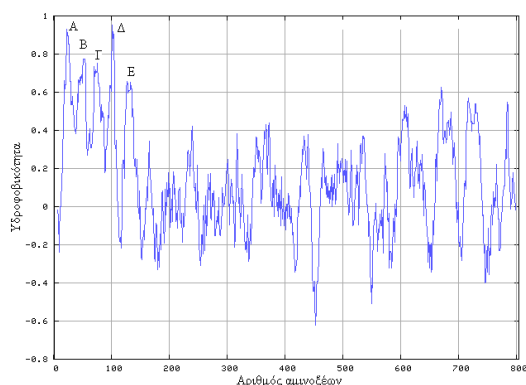
Η ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup1 είναι πολύ μικρότερη (68-70%) όταν αυτό συγκριθεί με τις PQQ-Gcd1 που έχουν χαρακτηριστεί στα βακτηριακά στελέχη *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1, CHA0 (Paulsen *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, η πλήρης ομοιότητα του Sup1 με τις PQQ-Gcd1 από βακτηριακά στελέχη του είδους *Ps. putida* και *Ps. aeruginosa*, αλλά και του στελέχους *Ps. entomophila* L48 είναι αρκετά χαμηλή, 65%, 66% και 68% αντίστοιχα (**Εικόνα Π5**, § Παράρτημα).

Τα ποσοστά ομολογίας του πολυπεπτιδίου Sup1 με τις PQQ-Gcd από άλλα γένη βακτηρίων είναι πολύ χαμηλότερα από αυτά που βρέθηκαν μεταξύ του γένους *Pseudomonas*. Ενδεικτικά, η ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup1 με τις PQQ-Gcd από τα γένη *Mesorhizobium* (Kaneko *et al.*, 2000) και *Rhizobium* (Young *et al.*, 2006; Thomson *et al.*, 2008) κυμαίνεται μεταξύ 50-53%, για το γένος *Salmonella* (McClelland *et al.*, 2001) είναι 48%, ενώ για το γένος *Escherichia* (Touchon *et al.*, 2009; Tohet *et al.*, 2010) είναι 47%.

Ακολούθως, η αμινοξική αλληλουχία της Sup1 συγκρίθηκε με τις PQQ-Gcd2 από τα στελέχη του είδους *Pseudomonas*, στα οποία βρέθηκε ότι υπάρχει (**Πίνακας Π2**, **Εικόνα Π6**, § Παράρτημα). Το ποσοστό ομοιότητας της με κάθε PQQ-Gcd2 είναι ιδιαίτερα χαμηλό (40-43%). Το ποσοστό αυτό είναι παρόμοια χαμηλό με το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2 στο κάθε στέλεχος.

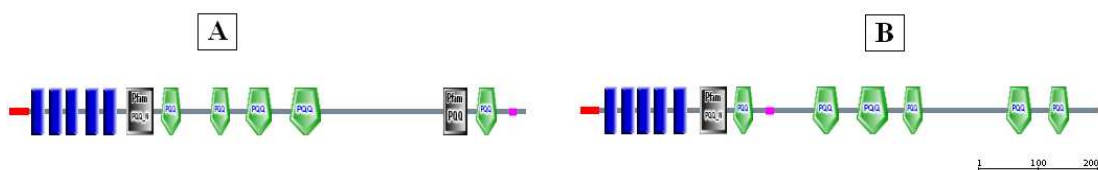
Είναι γεγονός ότι, και στα τρία στελέχη του είδους *Ps. fluorescens*, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως, υπάρχουν οι πρωτεΐνες PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2. Πολύ πιθανό είναι λοιπόν, στο γονιδίωμα του υπό μελέτη βακτηρίου να υπάρχει ακόμα ένα γονίδιο, ομόλογο του *sup1*, το οποίο θα κωδικοποιεί πρωτεΐνη για την PQQ-Gcd2. Εάν ένα τέτοιο γονίδιο υπάρχει και εκφράζεται στο γονιδίωμα του *Ps. fluorescens* X τότε η πρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το υποθετικό αυτό γονίδιο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μη σχετίζεται με τον φαινότυπο *sup*.

Προκειμένου να αναλυθεί η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος (Kyte *et al.*, 1982) της υδροπάθειας (Hydrophobicity) και η μέθοδος (Eisenberg *et al.*, 1984) της κανονικοποιημένης συμβατότητας (Normalized consensus hydrophobicity scale). Οι δύο μέθοδοι έδιναν τα ίδια αποτελέσματα μεταξύ τους και τα αποτελέσματα αυτά ήταν σύμφωνα με τις μεθόδους DAS (Dense Alignment Surface method) και PRED-TMR (Prediction of Transmembrane regions in proteins) με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η πρόβλεψη των διαμεμβρανικών τμημάτων.



Εικόνα 3.8 : Ανάλυση της υδροφοβικότητας της Sup1 πρωτεΐνης. Τα διαμεμβρανικά τμήματα της Sup1 έχουν επισημανθεί με τα γράμματα Α, Β, Γ, Δ, Ε.

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Sup1 αποκάλυψε ότι αποτελείται από 5 διαμεμβρανικά τμήματα (**Εικόνα 3.8**). Το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα περιλαμβάνει τα αμινοξέα 16-33, το δεύτερο τα 42-60, το τρίτο τα αμινοξέα 64-82, το τέταρτο τα 88-107 και το πέμπτο τα 118-142. Το τμήμα της διαμεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης το οποίο βρίσκεται μετά το 142^ο αμινοξύ είναι υδρόφιλο και επομένως είναι πολύ πιθανό να βρίσκεται εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση των δυο πρωτεϊνών της PQQ-Gcd, οι οποίες εντοπίστηκαν στα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Α. Προβλεπόμενη πρωτοταγής δομή της PQQ-Gcd1, Β. Προβλεπόμενη πρωτοταγής δομή της PQQ-Gcd2. Με πράσινα κουτιά έχουν επισημανθεί οι περιοχές της πρωτεΐνης, οι οποίες αποτελούνται από μια β-έλικα η οποία αλληλεπιδρά με το συνένζυμο pqq. Με μπλε κουτιά συμβολίζονται οι πέντε διαμεμβρανικές περιοχές, ενώ με μαύρα-γκρι κουτιά συμβολίζονται οι περιοχές οι οποίες είναι συντηρημένες περιοχές (highly conserved signature). Με κόκκινα κουτιά παρουσιάζονται πιθανά πεπτίδια έκκρισης (signal peptides) και με ροζ οι περιοχές χαμηλής πολυπλοκότητας (low compositional complexity). Στο κάτω δεξί τμήμα της εικόνας φαίνεται η κλίμακα μεγέθους (Jensen *et al.*, 2009).

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των δυο πρωτεϊνών με τη λειτουργία της κينوπρωτεϊνικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης, PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2, ήταν δυνατόν να εντοπιστούν διαφορές και ομοιότητες μεταξύ τους (**Εικόνα 3.9**). Στα πρώτα 150 αμινοξέα παρουσιάζεται να υπάρχουν πέντε διαμεμβρανικές έλικες και μια περιοχή-οδηγός για την κάθε πρωτεΐνη. Αμέσως μετά φαίνεται ότι υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή, η οποία συνήθως απαντάται στο αμινοτελικό άκρο PQQ εξαρτώμενων ενζύμων και είναι κοινή για τις δύο PQQ-Gcd που βρέθηκαν. Η περιοχή αυτή, η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα 169 έως 212, έχει τη λειτουργία μιας οξειδοαναγωγάσης η οποία δρά στην υδροξυλομάδα του υποστρώματος. Από τη συντηρημένη περιοχή αυτή μέχρι και το καρβοξυτελικό άκρο της, στην κάθε πρωτεΐνη PQQ-Gcd1 απαντώνται συνήθως πέντε και σπανιότερα έξι β-έλικες ενώ στην πρωτεΐνη PQQ-Gcd2 απαντώνται έξι. Οι β-έλικες έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με το συνένζυμο PQQ (Anthony, 1996).

3.4.3. Το γονίδιο *sup2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqF

Το πολυπεπτιδίο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sup2*, αποτελείται από 807 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 87,964 kD και ισοηλεκτρικό σημείο pI=5.81, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση. Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup2* έδειξε ότι παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ομολογία με την πεπτιδάση PqqF η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της πυρρολοκινολινικής κινόνης και απαντάται μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas*.

Η πρωτεΐνη Sup2 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (62%) με τη pqqF (PFLU5597) του στελέχους *Ps. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009). Η ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup2 είναι πολύ μικρότερη (48%) όταν αυτό συγκριθεί με τις PqqF που έχουν χαρακτηριστεί στα βακτηριακά στελέχη *Ps. fluorescens* Pf5 , Pf0-1 (PFL_5672 και PFL_5156) (Winsor *et al.*, 2006; Paulsen *et al.*, 2005). Ακόμα χαμηλότερη είναι η ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας των αμινοξέων του Sup2 με τις PqqF από τα βακτηριακά στελέχη *Ps. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002) και *Ps. aeruginosa* PA14 (36% για την PP_0381 και 32% για την PA14_39010 αντίστοιχα) (**Εικόνα Π7**, § Παράρτημα).

Η ομοιότητα του πολυπεπτιδίου Sup2 με τις PqqF από τα γένη *Klebsiella* (Meulenberg *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2009) και *Enterobacter* (Kim *et al.*, 2003) κυμαίνεται μεταξύ 25-28%, ενώ για τα γένη *Pantoea* (De Maayer *et al.*, 2010) και *Erwinia* (Sebahia *et al.*, 2010) είναι 20%. Τα πολύ χαμηλά ποσοστά ομοιότητας και

οι πολύ χαμηλές τιμές e-value ήταν αποτρεπτικές ώστε να μη συμπεριληφθούν οι πρωτεΐνες από τα γένη αυτά στην ανάλυση.

Όπως ήταν δυνατόν να διαπιστωθεί από την στοίχιση της Sup2 με τις PqqF από τα στελέχη του *Ps. fluorescens* υπάρχει ένα τμήμα 100 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο και ένα τμήμα 70 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο τους, τα οποία μοιάζουν να είναι συντηρημένα. Σε σύγκριση με τις pqqF από τα αντιπροσωπευτικά στελέχη των ειδών *Ps. putida* και *Ps. aeruginosa*, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, η Sup2 εμφανίζει αρκετά κενά (gaps). Παρόλα τα κενά στα στελέχη αυτά, η ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας με αυτή της Sup2, και ειδικότερα του καρβοξυτελικού και του αμινοτελικού άκρου, παραμένει σε αρκετά υψηλά ποσοστά.

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προέκυψε ότι το πολυπεπτίδιο Sup2 δεν αποτελείται από περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υδροφοβικότητα. Επομένως είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελείται από κανένα διαμεμβρανικό τμήμα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Sup2 με τη βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου SMART 7 (Letunic *et al.*, 2012). Από την ανάλυση προέκυψε ότι η πρωτεΐνη αυτή ενδεχομένως έχει τη λειτουργία μιας πρωτεάσης η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια ME. Στην υπεροικογένεια των πρωτεασών ME, με βάσει δομικά κριτήρια, έχουν καταταγεί σε τέσσερις οικογένειες πρωτεασών: LuxS, M16, M16C και M44. Πιο αναλυτικά, η οικογένεια των πρωτεασών M16 περιλαμβάνει μεταλλοένδοπρωτεάσες, όπως επίσης και η οικογένεια των πρωτεασών M16C η οποία περιλαμβάνει ακόμα πρωτεάσες που χρησιμοποιούν ιόντα Zn. Οι πρωτεάσες αυτές εμπλέκονται σε αντιδράσεις πρωτεόλυσης και πιο συγκεκριμένα υδρόλυσης εσωτερικών α' πεπτιδικών δεσμών (Hilgers *et al.*, 2001).



Εικόνα 3.10 : Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της Sup2. Στο κάτω δεξί τμήμα της εικόνας φαίνεται η κλίμακα μεγέθους (Letunic *et al.*, 2012).

Η περιοχή της Sup2 η οποία αποτελείται από τα αμινοξέα 29 έως 170 εμφανίζει όμοια δομή με πρωτεάσες της οικογένειας M16, ενώ οι περιοχές που

αποτελούνται από τα αμινοξέα 188 έως 350 και 540 έως 705 εμφανίζουν ομοιότητα με πρωτεάσες της οικογένειας M16C (**Εικόνα 3.10**). Ο τρόπος δράσης που έχει προταθεί για τις πρωτεάσες οι οποίες περιλαμβάνουν δύο όμοιες δομικές περιοχές, είναι η ενεργοποίηση της μιας μόνο περιοχής η οποία επιτελεί την αντίδραση της πρωτεόλυσης, ενώ η δεύτερη-μη ενεργοποιημένη περιοχή χρησιμεύει στη δεέσμωση του υποστρώματος (Taylor *et al.*, 2001). Ενδεχομένως, κάτι ανάλογο να ισχύει και για την Sup2.

3.4.4. Το γονίδιο *sup3* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqD

Το πολυπεπτιδίο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sup3*, αποτελείται από 91 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 10,307 kD και ισοηλεκτρικό σημείο pI=4.87, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση. Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup3* έδειξε ότι παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη PqqD, η οποία εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της πυρολοκινολινικής κινόνης, και απαντάται μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas*.

Η πρωτεΐνη Sup3 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (96%) με τη PqqD (PFLU_5601) του στελέχους *Ps. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009) (**Εικόνα Π8**, § Παράρτημα). Παρόμοια μεγάλο (94%) είναι το ποσοστό της πλήρους ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup3 με την PqqD (Pfl01_5160) που έχει χαρακτηριστεί στο βακτηριακό στέλεχος *Ps. fluorescens* Pf0-1 (Winsor *et al.*, 2006), ενώ στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Pf5 (PFL_5676) (Paulsen *et al.*, 2005) το ποσοστό αυτό είναι λίγο μικρότερο (87%). Η πρωτεΐνη Sup3 είναι ίδια κατά 84% με τη μια από τις δύο PqqD (PP_0377) που έχει στο γονιδίωμά του το στέλεχος *Ps. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), ενώ με τη δεύτερη (PP_2681) το ποσοστό πλήρους ομολογίας είναι μόλις 44%. Ακόμα χαμηλότερη είναι η πλήρης ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας των αμινοξέων του Sup3 με τις PqqD από τα βακτηριακά στελέχη *Ps. aeruginosa* PA14 (Lee *et al.*, 2006) και *Ps. mendocina* ymp (60% για την PA14_38790 και 58% για την Pmen_1968, αντίστοιχα). Η πλήρης ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup3 με τις PqqD από το γένος *Burkholderia* (Chain *et al.*, 2006) κυμαίνεται μεταξύ 42-45%, ενώ στο γένος *Erwinia* (Kube *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2010; Sebahia *et al.*, 2010) είναι μεταξύ 48-50%.

Στο στέλεχος *Ps. putida* KT2440 έχουν ταυτοποιηθεί δύο πρωτεΐνες PqqD οι οποίες όμως έχουν μικρό ποσοστό πλήρους ομολογίας μεταξύ τους (45%). Η ύπαρξη δύο διαφορετικών πρωτεϊνών PqqD, οι οποίες έχουν μικρό ποσοστό πλήρους

ομοιότητας μεταξύ τους (43.5%), έχει παρατηρηθεί και στο στέλεχος *Ps. putida* GB-1 (PputGB1_0406 και PputGB1_3122).

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προέκυψε ότι το πολυπεπτιδίο Sup3 δεν αποτελείται από περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υδροφοβικότητα και επομένως είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελείται από κανένα διαμεμβρανικό τμήμα. Η λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Sup3, που πραγματοποιήθηκε, δεν ήταν σε θέση να αποκαλύψει κάποιες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης της.

3.4.5. Το γονίδιο *sup4* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqE

Το πολυπεπτιδίο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sup4*, αποτελείται από 331 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 37,380 kD και ισοηλεκτρικό σημείο $pI=6.57$, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση. Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup4* έδειξε ότι παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη PqqE, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της πυρολοκινολινικής κινόνης, και απαντάται μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas*.

Η πρωτεΐνη Sup4 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (97%) με τη PqqE του στελέχους *Ps. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009) (Εικόνα Π9, § Παράρτημα). Παρόμοια μεγάλο (95%) είναι το ποσοστό της πλήρους ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup4 με την PqqE που έχει χαρακτηριστεί στα βακτηριακά στελέχη *Ps. fluorescens* Pf0-1 (Winsor *et al.*, 2006) και *Ps. fluorescens* Pf5 (Paulsen *et al.*, 2005). Η πρωτεΐνη Sup4 είναι ίδια κατά 85% με τη PqqE από τα στελέχη *Ps. putida* KT2440 και GB-1 (Nelson *et al.*, 2002). Ακόμα χαμηλότερη είναι η ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας των αμινοξέων του Sup4 με τις PqqE από τα βακτηριακά στελέχη *Ps. aeruginosa* PA14 (Lee *et al.*, 2006) και *Ps. stutzeri* A1501 (75% και 79% αντίστοιχα).

Η Sup4 παρουσιάζει αρκετά υψηλά ποσοστά πλήρους ομοιότητας με πρωτεΐνες pqqE οι οποίες προέρχονται από διάφορα γένη της τάξης *Pseudomonadales*. Η πλήρης ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο του πολυπεπτιδίου Sup4 με τις PqqE από το γένος *Acinetobacter* (Adams *et al.*, 2008; Vallenet *et al.*, 2008) κυμαίνεται μεταξύ 69-71%, ενώ στο γένος *Erwinia* (Kube *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2010; Sebahia *et al.*, 2010) είναι 72%. Πιο χαμηλά ποσοστά πλήρους ομοιότητας (54-56%) παρουσιάζονται με τις PqqE από το γένος *Burkholderia* (Chain *et al.*, 2006).

Όπως είναι δυνατόν να παρατηρήσουμε (**Εικόνα Π9**, § Παράρτημα) η Sup4 παρουσιάζει αρκετά μεγάλη ομολογία με όλες τις πρωτεΐνες PqqE του γένους *Pseudomonas*. Η μόνη διαφορά της Sup4 από τις ομόλογές της είναι το μέγεθός της. Το μέγεθος της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών PqqE κυμαίνεται από 375 μέχρι 389αα, με μόνη εξαίρεση αυτή της PqqE που προέρχεται από το στέλεχος *Ps. stutzeri* A1501 στο οποίο έχει μέγεθος 320αα. Η πρωτεΐνη PqqE από το στέλεχος αυτό, παρόλο που έχει το ίδιο μέγεθος με την Sup4, δεν εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά πλήρους ομοιότητας με την τελευταία.

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προέκυψε ότι το πολυπεπτίδιο Sup4 δεν αποτελείται από περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υδροφοβικότητα και επομένως είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελείται από κανένα διαμεμβρανικό τμήμα. Η ίδια ανάλυση ακολούθησε για όλες τις ταυτοποιημένες PqqE και όλες φαίνεται να μην έχουν υδρόφοβες περιοχές.

Κατά τη λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Sup4 με τη βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου SMART 7 (Letunic *et al.*, 2012) προβλέφθηκε ότι η περιοχή που αποτελείται από τα πρώτα 128 αμινοξέα έχει δομή όμοια με αυτή των πρωτεϊνών που ανήκουν στην υπεροικογένεια Radical SAM. Στην υπεροικογένεια αυτή έχουν κατηγοριοποιηθεί περίπου 600 ένζυμα τα οποία καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις, όπως μεθυλίωσης, ισομερίωσης, προσθήκης ενός ατόμου θείου, κυκλοποίησης και αναερόβιας οξειδωσης. Τα μέλη της υπεροικογένειας αυτής έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αλλά και στην βιοαποδόμιση ποικίλων μορίων (Sofia *et al.*, 2001).

Το μικρό μέγεθος της περιοχής (128 αμινοξέα) που προβλέφθηκε ότι εμφανίζει δομή όμοια με αυτή των πρωτεϊνών της υπεροικογένειας Radical SAM καθώς και ο σχετικά υψηλός δείκτης σημαντικότητας ($e\text{-value}=2,5\cdot e^{-13}$), ο οποίος χαρακτηρίζει την πρόβλεψη αυτή, υποδηλώνουν το ενδεχόμενο η πρόβλεψη αυτή να είναι λανθασμένη. Έτσι, δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια η λειτουργία της πρωτεΐνης Sup4.

3.4.6. Το γονίδιο *sup5* κωδικοποιεί μια άγνωστη πρωτεΐνη

Το πολυπεπτίδιο το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sup5*, αποτελείται από 258 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 28,736 kD και ισοηλεκτρικό σημείο $pI=5.08$, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση. Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup5* έδειξε ότι παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ομολογία με

διάφορες υποθετικές πρωτεΐνες (hypothetical proteins), που απαντώνται μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas*.

Στο στέλεχος *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335 αλλά και στο *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A εκφράζονται δύο πρωτεΐνες (με locus tag PSA3335_4877 και PSPPH_5088 αντίστοιχα) οι οποίες έχουν το μοτίβο μιας οξυγενάσης της αίμης (Joardar *et al.*, 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα (72%) με τη Sup5 (**Εικόνα Π10**, § Παράρτημα). Αρκετά υψηλά ποσοστά πλήρους ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο (72%) παρουσιάζονται μεταξύ του πολυπεπτιδίου της Sup5 και δύο πρωτεϊνών (με locus tag Psyr_5009 και PSPTO5455 αντίστοιχα) αγνώστου λειτουργίας που έχουν βρεθεί στα στελέχη *Ps. syringae syringae* B728a και *Ps. syringae tomato* DC3000 (Feil *et al.*, 2005). Ακόμα, στο στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158 (Arrebola *et al.*, 2003; 2007) η πρωτεΐνη με αριθμό καταχώρησης ABG00044.1, η οποία κωδικοποιείται από το οπερόνιο βιοσύνθεσης της μανγκοτοξίνης, έχει 73% πλήρη ομοιότητα με την Sup5.

Λίγο χαμηλότερο ποσοστό της πλήρους ομοιότητας (67%) παρατηρείται μεταξύ της Sup5 και δύο πρωτεϊνών (με locus tag PSPA7_2112 και PSEEN0134 αντίστοιχα) αγνώστου λειτουργίας που έχουν βρεθεί στα στελέχη *Ps. aeruginosa* PA7 και *Ps. entomophila* L48 (Vodovar *et al.*, 2006) (**Εικόνα Π10**, § Παράρτημα). Στα βακτηριακά στελέχη *Ps. fluorescens* Pf0-1 (Winsor *et al.*, 2006) και *Ps. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009) έχουν βρεθεί δύο πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας (με locus tag Pfl01_0128 και PFLU_0121 αντίστοιχα) οι οποίες εμφανίζουν 69% και 55% πλήρη ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία του πολυπεπτιδίου της Sup5. Πιο χαμηλά ποσοστά ομοιότητας (46-50%) παρουσιάζονται με διάφορες πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας από το γένος *Burkholderia* (Chain *et al.*, 2006).

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Sup5, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Ps. fluorescens* X, παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με πρωτεΐνες από στελέχη των ειδών *Ps. aeruginosa*, *Ps. syringae* και *Ps. savastanoi*. Αντιθέτως, με πρωτεΐνες από τα στελέχη του είδους στο οποίο ανήκει τα ποσοστά πλήρους ομοιότητας είναι αρκετά χαμηλότερα. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον εντοπίζεται στην ομοιότητα της Sup5 με την πρωτεΐνη με αριθμό καταχώρησης ABG00044.1 από το στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη αυτή φαίνεται ότι σχετίζεται με την βιοσύνθεση της μανγκοτοξίνης στο στέλεχος αυτό.

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προέκυψε ότι το πολυπεπτίδιο Sup5 δεν αποτελείται από περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υδροφοβικότητα και επομένως είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελείται από κανένα διαμεμβρανικό τμήμα. Η ίδια ανάλυση ακολούθησε για όλες τις πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν μεγάλη ομοιότητα με την Sup5, κατά την οποία όλες φαίνεται να μην έχουν υδρόφοβες περιοχές.

Η λειτουργική ανάλυση της Sup5 ανέδειξε ότι αυτή ανήκει στην οικογένεια DUF3050, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Η οικογένεια αυτή αναφέρεται από τη βάση δεδομένων SCOP (Andreeva *et al.*, 2008) ότι ανήκει στην υπεροικογένεια της οξυγενάσης της αίμης (HO), αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμα αποδειχθεί με εργαστηριακές μελέτες. Έτσι, είναι αδύνατο να προβλεφθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης Sup5, παρόλο που ενδέχεται βάσει της βάσης δεδομένων SCOP να έχει μια παρόμοια λειτουργία με αυτή της HO.

3.4.7. Το γονίδιο *sur6* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cupin2

Το πολυπεπτίδιο, το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *sur6*, αποτελείται από 115 αμινοξέα, ενώ έχει μοριακό βάρος 13,285 kD και ισοηλεκτρικό σημείο pI=5.28, όπως προβλέπεται από *in silico* ανάλυση.

Η στοίχιση του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *sur6* έδειξε ότι παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ομοιότητα με μια πρωτεΐνη η οποία απαντάται σε ένα μόνο είδος του γένους *Pseudomonas*. Η πρωτεΐνη Sup6 είναι ίδια κατά 58% με την πρωτεΐνη Cupin2 (με locus tag PSPA7_2111) από το στέλεχος *Ps. aeruginosa* PA7 (Εικόνα Π11, § Παράρτημα). Η πρωτεΐνη Cupin2 έχει βρεθεί και σε στελέχη *Burkholderia cenocepacia*, και πιο συγκεκριμένα για τα J2315, AU 1054, MC0-3, HI2424 και PC184 (τα locus tags των οποίων είναι τα BceJ2315_36630, Bcen_4975, Bcenmc03_4294, Bcen2424_3185 και BCPG_04196 αντίστοιχα). Τα ποσοστά ομοιότητας της Sup6 με τις cupin2 από τα πέντε παραπάνω στελέχη κυμαίνονται μεταξύ 54-55%.

Όπως παρατηρήθηκε, η μοναδική ομοιότητα της *sur6* με βακτήρια του γένους *Pseudomonas* εντοπίστηκε μόνο με την Cupin2 από το *Ps. aeruginosa*. Κανένα άλλο είδος του γένους αυτού δεν διαθέτει την πρωτεΐνη Cupin2. Ακόμα, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει συντηρημένα τμήματα τα οποία απαντώνται και στα στελέχη του είδους *Burkholderia cenocepacia*.

Στην οικογένεια των Cupin πρωτεϊνών κατηγοριοποιούνται πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται είτε από μια είτε από δύο β-βαρελοειδείς περιοχές (β-barrel fold), οι οποίες ονομάζονται ‘κούπες’ (cupa). Η κάθε ‘κούπα’ δομείται από δύο συντηρημένες περιοχές οι οποίες έχουν το μοτίβο β-έλικα, στροφή, β-έλικα (Helix-Turn-Helix ή αλλιώς HTH motif) και συνήθως απέχουν μεταξύ τους 15-50 αμινοξέα. Στο κάθε HTH μοτίβο υπάρχει συνήθως και από ένα αμινοξικό κατάλοιπο ιστιδίνης. Η λειτουργία τους παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία ενώ απαντώνται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Χαρακτηριστικά, για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς αναφέρεται ότι στην υπεροικογένεια των Cupin πρωτεϊνών κατατάσσονται ένζυμα όπως ισομεράσες, επιμεράσες, συνθάσες, σφελουρίνες, διοξυγενάσες αλλά και μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AraC (Dunwell *et al.*, 2004).

Πρωτεΐνες με ποσοστά πλήρους ομοιότητας χαμηλότερα από 40%, από διάφορα γένη βακτηρίων παρατηρήθηκαν αλλά, δεν αναλύθηκαν μιας και η ομοιότητα που παρουσίαζαν εντοπιζόταν μόνο σε ορισμένα μικρά τμήματα της αλληλουχίας της Sup6 καθώς και το e-value τους ήταν πολύ μεγάλο ($<10^{-9}$).

Από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης προέκυψε ότι το πολυπεπίδιο Sup6 δεν αποτελείται από περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υδροφοβικότητα και επομένως είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η οποία δεν αποτελείται από κανένα διαμεμβρανικό τμήμα. Η ίδια ανάλυση ακολούθησε για όλες τις πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν μεγάλη ομοιότητα με την Sup6, κατά την οποία όλες φαίνεται να μην έχουν υδρόφοβες περιοχές.

Η λειτουργική ανάλυση της πρωτεΐνης Sup6, που πραγματοποιήθηκε, δεν ήταν σε θέση να αποκαλύψει κάποιες επιπλέον πληροφορίες για τον τρόπο δράσης της. Όπως προβλέφθηκε από την ανάλυση αυτή, η Sup6 ανήκει στην οικογένεια των Cupin πρωτεϊνών με δείκτη σημαντικότητας ($e\text{-value}=2 \cdot e^{-4}$) σχετικά μεγάλο.

3.4.8. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου της κينوπρωτεϊνικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης

Σε προηγούμενη παράγραφο (§3.4.2.1) αναφέρθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών γονιδίων στο γονιδίωμα των περισσότερων ειδών του γένους *Pseudomonas*, τα οποία κωδικοποιούν δύο ένζυμα της κينوπρωτεϊνικής αφυδρογονάσης της γλυκόζης. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για τα δύο ομόλογα

ένζυμα, PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2, βρέθηκε ότι βρίσκονται οργανωμένα σε διαφορετική γονιδιωματική περιοχή, στο εκάστοτε στέλεχος.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε έλεγχος (Blastp) της ομοιότητας, σε αμινοξικό επίπεδο, του τμήματος της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το *orfX*. Το αναγνωστικό πλαίσιο *orfX*, το οποίο εντοπίστηκε ανωφερικά του γονιδίου *sup1*, αποτελεί τμήμα ενός γονιδίου και κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό άκρο ενός υποδοχέα εξαρτώμενου από TonB (**Εικόνα Π12**, § Παράρτημα).

Για κάθε στέλεχος εντοπίστηκε η γονιδιωματική περιοχή στην οποία εμφανίζεται το καθένα από τα δύο ομόλογα γονίδια της PQQ-Gcd και οι περιοχές αυτές συγκρίθηκαν μεταξύ τους (**Εικόνα Π13**, § Παράρτημα). Η έρευνα επικεντρώθηκε στη γονιδιωματική περιοχή των στελεχών του είδους *Ps. fluorescens*, για τα οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση με την γονιδιωματική περιοχή του υπό μελέτη βακτηρίου (**Εικόνα Π14**, § Παράρτημα).

Όπως είναι δυνατόν να παρατηρηθεί, η γονιδιωματική περιοχή γύρω από το *pqq-gcd1* γονίδιο έχει αρκετά κοινά στοιχεία και στα τρία στελέχη *Ps. fluorescens* και ομοιάζει με την περιοχή που βρίσκεται το *sup1* στο υπό μελέτη βακτήριο. Το γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για τον TonB-εξαρτώμενο υποδοχέα, τοποθετείται ανωφερικά του γονιδίου *pqq-gcd1* στα στελέχη SBW25 και Pf5, ενώ στο γονιδίωμα του στελέχους Pf0-1 το γονίδιο αυτό απουσιάζει. Ακόμα ένα κοινό χαρακτηριστικό και για τα τρία στελέχη, όσον αφορά την περιοχή ανωφερικά του *pqq-gcd1*, είναι η ύπαρξη δύο γονιδίων με την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής. Το πρώτο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία έχει αλληλεπιδρά με σιδηροφόρα, και το δεύτερο για την πρωτεΐνη PadR, η οποία αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα και είναι δυνατόν να ρυθμίζει την έκφραση του *pqq-gcd1*.

Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την πορίνη OrgB εντοπίζεται πάντα, σε όποιο στέλεχος την διαθέτει, ανωφερικά του *pqq-gcd1* και με την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής. Το γονίδιο αυτό, όσον αφορά το PQQ-Gcd2, βρίσκεται πάντα κατωφερικά. Η πορίνη OrgB έχει αποδειχθεί (Wylie *et al.*, 1995) ότι παίζει κύριο ρόλο στην είσοδο των υδατανθράκων (γλυκόζης, φρουκτόζης, γλυκερόλης και μανιτόλης) στο στέλεχος *Ps. aeruginosa* PAO1.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ακόμα μια παρατήρηση. Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* Pf5, ανωφερικά του γονιδίου *pqq-gcd2* και σε απόσταση 2.6 kb από αυτό, περίπου, βρίσκεται το οπερόνιο βιοσύνθεσης της PQQ (§3.3.9.). Η γειτνίαση

του οπερονίου βιοσύνθεσης της PQQ με την αφυδρογονάση της γλυκόζης δεν παρατηρήθηκε σε κανένα άλλο στέλεχος του γένους, ούτε στο *Ps. fluorescens* X.

Η σύγκριση που έγινε στο γονιδίωμα των υπολοίπων στελεχών του γένους *Pseudomonas* επιβεβαιώνει τα παραπάνω δεδομένα και, με τα παρόντα στοιχεία της αλληλούχισης στο υπό μελέτη βακτήριο, καταδεικνύει ότι η περιοχή γύρω από το *sup1* ομοιάζει περισσότερο σε αυτή από το στέλεχος SBW25.

3.4.9. Οργάνωση του γονιδιακού τύπου των γονιδίων *pqq*

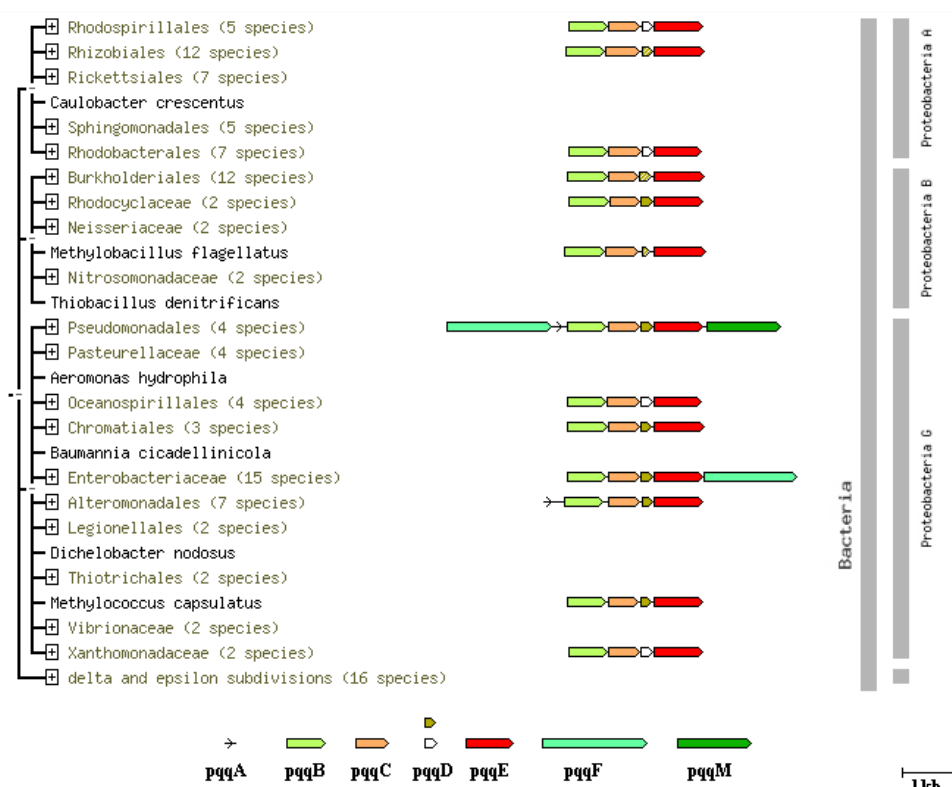
Τα μεταλλαγμένα στελέχη της δεύτερης ομάδας (B91 και B163) φέρουν την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο *sup2*, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη PqqF. Η πρωτεΐνη PqqF εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της πυρρολοκινολινικής κίνονης (*pqq*), συνενζύμου της αφυδρογονάσης της γλυκόζης. Στη βιοσύνθεση της PQQ εμπλέκονται και τα γονίδια *sup3* και *sup4*, τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες PqqD και PqqE, και αποδείχθηκε ότι φέρουν την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα μεταλλαγμένα στελέχη της τρίτης ομάδας (A150 και ρ26). Είναι φανερό, λοιπόν, ότι τα γονίδια *sup2*, *sup3* και *sup4* κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της PQQ.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ομοιότητας (Blastp), σε αμινοξικό επίπεδο, των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ανωφερικά και κατωφερικά των γονιδίων *sup2*, *sup3* και *sup4*. Έτσι βρέθηκε ότι το γονίδιο *orf1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqA (Εικόνα Π15, § Παράρτημα), το γονίδιο *orf2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqB (Εικόνα Π16, § Παράρτημα), ενώ τα τμήματα των γονιδίων *orf3* (Εικόνα Π17, § Παράρτημα) και *orf4* (Εικόνα Π18, § Παράρτημα) κωδικοποιούν αντίστοιχα για το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης PqqC. Τέλος το γονίδιο *orf0*, το οποίο βρίσκεται ανωφερικά του γονιδίου *sup2*, κωδικοποιεί μια υδρολάση (Εικόνα Π19, § Παράρτημα), ενώ το τμήμα του γονιδίου *orfA* κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό άκρο μιας οξειδάσης (Εικόνα Π20, § Παράρτημα)

Στο σημείο αυτό, δημιουργήθηκε η εύλογη απορία για το αν τα τμήματα των γονιδίων *orf3* και *orf4* προέρχονταν από το ίδιο γονίδιο στο γονιδίωμα του βακτηρίου *Ps. fluorescens* X. Τα *orf3* και *orf4* προήλθαν από την αλληλούχιση των πλασμιδίων απελευθέρωσης της δεύτερης και της τρίτης ομάδας μεταλλαγμένων στελεχών και επομένως δε μπορούμε να διακρίνουμε αν τα αντιπροσωπεύουν το ίδιο γονίδιο και

αν, κατά επέκταση, τα γονίδια *orfA*, *orf0*, *sup2*, *orf1*, *orf2* και *orf3* βρίσκονται στον ίδιο γονιδιακό τόπο με τα γονίδια *orf4*, *sup3* και *sup4*.

Με τη βοήθεια της βάσης STRING 8.3 (Jensen *et al.*, 2009) ήταν δυνατόν να βρεθούν πάνω από 80 είδη βακτηρίων στα οποία απαντώνται τα γονίδια *rrqBCDE* (Εικόνα 3.11). Σε όλα τα είδη που βρέθηκαν στη βάση, τα τέσσερα αυτά γονίδια ήταν οργανωμένα σε οπερόνια.



Εικόνα 3.11 : Διασπορά του οπερονίου βιοσύνθεσης της *rrq* στις 5 υποκλάσεις του φύλου των πρωτεοβακτηρίων, όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα STRING 8.3 (Jensen *et al.*, 2009). Στο υπόμνημα της εικόνας φαίνεται το σχετικό μέγεθος και ο συμβολισμός του κάθε γονιδίου.

Όπως ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί, το οπερόνιο βιοσύνθεσης της *rrq* εντοπίστηκε σε 13 τάξεις βακτηρίων. Η ύπαρξη του γονιδίου *rrqA* σημειώθηκε μόνο στις τάξεις *Pseudomonadales* και *Alteromonadales*, ενώ το γονίδιο *rrqF* βρέθηκε ότι απαντάται στις *Pseudomonadales* και *Enterobacteriales*. Τα γονίδια *rrqBCDE* απαντώνται και στις 13 εν λόγω τάξεις, ενώ η σειρά με την οποία είναι οργανωμένα είναι η ίδια.

Στην τάξη *Pseudomonadales*, και ειδικότερα στο γένος *Pseudomonas*, παρατηρήθηκε ότι το οπερόνιο *rrq* είναι δυνατόν να περιέχει ακόμα ένα γονίδιο, το *rrqM*. Σχεδόν σε όλα τα στελέχη της οικογένειας παρατηρήθηκε ότι το οπερόνιο

βιοσύνθεσης της PQQ απαρτίζεται από 7 γονίδια (*pqqFABCDEM*). Τα στελέχη *Ps. aeruginosa* PA01, *Ps. aeruginosa* PA14, *Ps. fluorescens* SBW25 και *Ps. stutzeri* A1501 αποτελούν εξαίρεση στον παραπάνω κανόνα.

Στα στελέχη *Ps. aeruginosa* PA01 και PA14 καθώς και στο στέλεχος *Ps. stutzeri* A1501 το οπερόνιο βιοσύνθεσης της PQQ αποτελείται από τα γονίδια *pqqABCDEM*, ενώ το γονίδιο *pqqF* βρίσκεται σε διαφορετικό γονιδιακό τόπο (περίπου 100 kb μακριά) και η έκφρασή του είναι ανεξάρτητη του οπερονίου αυτού. Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* SBW25 το οπερόνιο βιοσύνθεσης της PQQ αποτελείται από τα γονίδια *pqqFABCDE*, ενώ το γονίδιο *pqqM* δεν υπάρχει στο γονιδίωμα του. Ακόμα, μια εξαίρεση αποτελούν τα στελέχη *Ps. putida* KT2440 και *Ps. putida* GB-1 τα οποία εκτός από το γονίδιο *pqqD*, το οποίο βρίσκεται στο οπερόνιο *pqqFABCDE*, έχουν στο γονιδίωμά τους ακόμα ένα αντίγραφο του γονιδίου αυτού, το *pqqD2*. Τέλος, από την έρευνα των βάσεων δεδομένων, βρέθηκε ότι το βακτήριο *Ps. fluorescens* Pf5 έχει ακόμα ένα αντίγραφο των γονιδίων *pqqAB* (με locus tag PFL_2223 και PFL_2224 αντίστοιχα), εκτός από αυτό που βρίσκεται στο οπερόνιο *pqqFABCDE*.

Σε μελέτες που αφορούν τα στελέχη των βακτηρίων *Ps. fluorescens* CHA0 (Schnider *et al.*, 1995), *Gluconobacter oxydans* IFO 3293 (Felder *et al.*, 2000), *Enterobacter intermedius* 60-2G (Kim *et al.*, 2003), *Ps. fluorescens* B16 (Choi *et al.*, 2008) και *Ps. aeruginosa* ATCC 17933 (Gliese *et al.*, 2010) έχει βρεθεί ότι στη βιοσύνθεση της PQQ εμπλέκονται τα γονίδια *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE* και *pqqF*. Έχει παρατηρηθεί και έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια βιοσύνθεσης της PQQ είναι συντηρημένα και συνήθως βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο (Choi *et al.*, 2008). Σε μερικές από αυτές τις μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι το οπερόνιο με τα γονίδια *pqqABCDEF* μπορεί να περιέχει είτε λιγότερα από αυτά τα έξι γονίδια (Schnider *et al.*, 1995; Felder *et al.*, 2000) είτε μπορεί να περιέχει ακόμα ένα, το *pqqM* (Gliese *et al.*, 2010).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα ενδυνάμωσαν την υπόθεση ότι ίσως και τα γονίδια *orf3* και *orf4* αντιπροσωπεύουν το ίδιο γονίδιο (*pqqC*) και ότι τα *orf1*, *orf2*, *orf3*, *sup2*, *sup3* και *sup4* βρίσκονται στον ίδιο γονιδιακό τόπο (Εικόνα Π21, § Παράρτημα). Προκειμένου να ελεγχθεί αν η υπόθεση αυτή ήταν βάσιμη, σχεδιάστηκαν εκκινήτες από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων, έτσι ώστε ο forward (FOR2) να περιέχει τον πιθανό εκκινήτη ο οποίος έχει προβλεφθεί (§3.4.1.2) και βρίσκεται ανωφερικά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *sup2*, και ο

ανάστροφος (rrqE2) να περιέχει το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου *sup4*. Το προϊόν PCR με το ζεύγος των εκκινητών αυτών (**Εικόνα 3.13B** ζώνη 8, §3.5.2) έχει μέγεθος 6.7 kb και περιλαμβάνει τα γονίδια *sup2*, *sup3*, *sup4*, *orf1*, *orf2* και *orf3* καθώς και τον μεταγραφικό εκκινητή, έτσι όπως έχει προβλεφθεί.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το προϊόν PCR, με τους δυο αυτούς εκκινητές, αποτελεί το επιθυμητό τμήμα DNA με τα προαναφερθέντα γονίδια, αυτό υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* (**Εικόνα 3.13B** ζώνη 9, §3.5.2), η οποία έχει μοναδική θέση αναγνώρισης μέσα στην αλληλουχία του προϊόντος. Τα μεγέθη των δυο τμημάτων που προκύπτουν από την πέψη αυτή (4.7 kb και 2 kb) επιβεβαίωσαν την ορθότητα της αρχικής υπόθεσης.

Όπως είναι δυνατόν να παρατηρηθεί, στο βακτήριο *Ps. fluorescens X* τα γονίδια βιοσύνθεσης της rrq βρίσκονται στον ίδιο γονιδιωματικό τόπο, και ενδέχεται να είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο όπως έχει αποδειχθεί σε όλα τα άλλα είδη του γένους (Schnider *et al.*, 1995). Έτσι, είναι πλέον βέβαιο ότι τα γονίδια *sup2*, *sup3*, *sup4*, *orf1*, *orf2* και *orf3* βρίσκονται στον ίδιο γονιδιακό τόπο στο υπό μελέτη βακτήριο.

Συγκρίνοντας τα δεδομένα από την αλληλούχιση των κλώνων της πλασμιδιακής απελευθέρωσης (§3.3.1.2 και §3.3.1.3) και από την ανάλυσή τους (§3.2.2) είναι δυνατό να εντοπιστεί ακόμα μια λεπτομέρεια. Παρατηρήθηκε ότι οι ενθέσεις του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη B91, A150 και ρ26 είχαν ακριβώς την ίδια κατεύθυνση, η οποία τυχαίνει να είναι και η κατεύθυνση της μεταγραφής, ενώ στο στέλεχος B163 η ένθεση μεταθετού στοιχείου έχει αντίθετη κατεύθυνση με αυτή των υπολοίπων (**Εικόνα 3.13A**, §3.5.2).

Τέλος, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων BioCyc (Keseler *et al.*, 2009), πραγματοποιήθηκε σύγκριση της γονιδιωματικής περιοχής γύρω από τα γονίδια σύνθεσης της PQQ στο *Ps. fluorescens X* με άλλα στελέχη του γένους αυτού (**Εικόνα Π22**, § Παράρτημα).

Από την σύγκριση της γονιδιωματικής περιοχής ανωφερικά και κατωφερικά του οπερονίου βιοσύνθεσης PQQ στα στελέχη του γένους *Pseudomonas* είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι η γονιδιωματική περιοχή γύρω από το οπερόνιο απαρτίζεται, σχεδόν πάντα, από τα ίδια γονίδια. Ανωφερικά του οπερονίου και με την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής παρατηρούνται δύο γονίδια που κωδικοποιούν για μια αμιδική υδρολάση και μια αμινοξειδάση, τα οποία στο υπό μελέτη στέλεχος αντιπροσωπεύουν τα γονίδια *orf0* και *orfA*. Ακόμα, ανωφερικά υπάρχει ένας

μεταγραφικός παράγοντας (AsnC), ο οποίος ενδέχεται να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου. Κατωφερικά παρατηρείται σχετικά συχνά η ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί για μια αμινοτρανσφεράση, το οποίο έχει αντίθετη κατεύθυνση με το οπερόνιο, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα LysR.

Από την οργάνωση της γονιδιωματικής περιοχής κατωφερικά του οπερονίου είναι δυνατόν να παρατηρηθεί, η παρουσία ενός γονιδίου με αντίθετη κατεύθυνση μεταγραφής από αυτή του οπερονίου. Έχει βρεθεί (Korbel *et al.*, 2009) ότι είναι πολύ πιθανό γονίδια, τα οποία έχουν αντίθετη κατεύθυνση και τα κωδικόνια λήξης τους είναι γειτονικά, να έχουν κάποια λειτουργική σχέση. Το γονίδιο αυτό είναι πολύ μικρό σε μέγεθος (160bp) και παρόλο που εμφανίζεται στα περισσότερα στελέχη του γένους *Pseudomonas* δεν είναι γνωστή η λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί.

3.4.10. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου των *sup5* και *sup6*

Στην παράγραφο §3.4.1.4 διατυπώθηκε η υπόθεση ότι τα γονίδια *sup5* και *sup6* ενδέχεται να βρίσκονται μέσα σε ένα οπερόνιο, το οποίο αποτελείται τουλάχιστον από δύο ακόμα γονίδια (*orf7* και *orf8*). Ακόμα, η πρωτεΐνη Sup6 βρέθηκε ότι έχει μεγάλο βαθμό πλήρους ομοιότητας μόνο με την Cupin2 του στελέχους *Ps. aeruginosa* PA7 (§3.4.2.6). Στο στέλεχος αυτό, το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την Cupin2 φαίνεται να είναι οργανωμένο σε ένα οπερόνιο, μαζί με ακόμα τέσσερα γονίδια, ένα από τα οποία είναι ομόλογο με το *sup5* (Εικόνα Π23, § Παράρτημα).

Συγκρίνοντας τα δεδομένα από την αλληλούχιση των κλώνων της πλασμιδιακής απελευθέρωσης (§3.4.1.4) και από την ανάλυση τους (§3.3.2) είναι δυνατό να εντοπιστεί ακόμα μια λεπτομέρεια. Παρατηρήθηκε ότι η ένθεση του Tn5-RL27 στο μεταλλαγμένο στέλεχος δ40 έχει την ίδια κατεύθυνση με την αυτή της μεταγραφής του *sup6*, ενώ στο στέλεχος ρ93 η ένθεση μεταθετού στοιχείου έχει αντίθετη κατεύθυνση (Εικόνα 3.14, §3.5.3).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ομοιότητας (Blastp), σε αμινοξικό επίπεδο, των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια ανωφερικά και κατωφερικά των γονιδίων *sup5* και *sup6*. Έτσι βρέθηκε ότι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης *orf6* κωδικοποιεί το καρβοξυτελικό άκρο μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (EmrB/QacA family drug resistance transporter) (Εικόνα Π24, § Παράρτημα), το γονίδιο *orf7* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη

αγνώστου λειτουργίας (**Εικόνα Π25**, § Παράρτημα), το γονίδιο *orf8* (**Εικόνα Π26**, § Παράρτημα) κωδικοποιεί μια μη ριβοσωμική πεπτιδική συνθάση (non ribosomal peptide synthase), ενώ το γονίδιο *orf9* (**Εικόνα Π27**, § Παράρτημα) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία έχει το μοτίφ μιας πολυκετιδικής κυκλάσης-αφυδατάσης (Polyketide cyclase/dehydrase).

Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Orf7 και Orf8 στον υπό μελέτη οργανισμό, έχουν αρκετά υψηλά ποσοστά ομολογίας με τα γονίδια από το στέλεχος *Ps. aeruginosa* PA7, τα οποία είναι οργανωμένα μαζί με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Cupin2, σε ένα οπερόνιο. Ακόμα, τα γονίδια αυτά δείχνουν αρκετά υψηλά ποσοστά ομολογίας με γονίδια, τα οποία βρίσκονται στην ίδια γονιδιωματική περιοχή, και εντοπίζονται σε άλλα στελέχη του γένους *Pseudomonas* (**Εικόνα Π23**, § Παράρτημα).

Είναι φανερό ότι, το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την Cupin2 είναι χαρακτηριστικό μόνο του στελέχους *Ps. aeruginosa* PA7. Τα υπόλοιπα τέσσερα γονίδια του οπερονίου, για τα οποία δεν υπάρχουν πληροφορίες για τις λειτουργίες τους (hypothetical), υπάρχουν σε πέντε ακόμα στελέχη του γένους *Pseudomonas*.

Όπως φαίνεται στα στελέχη *Ps. fluorescens* SBW25, *Ps. entomophila* L48, *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000 και *Ps. fluorescens* Pf0-1 τα τέσσερα αυτά γονίδια είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο, από το οποίο όμως απουσιάζει το γονίδιο *cupin2*. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα τέσσερα αυτά γονίδια βρέθηκαν να έχουν μεγάλο ποσοστό πλήρους ομοιότητας με αυτές από τα γονίδια *sup5*, *orf7*, *orf8* και *orf9*.

Ανωφερικά του μελετώμενου οπερονίου, στα πέντε στελέχη πλην του στελέχους *Ps. aeruginosa* PA7, και σε απόσταση 0.5-1.5kb και με την ίδια κατεύθυνση βρέθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα (transcriptional repressor) GntR. Στα στελέχη αυτά ο παράγοντας GntR είναι δυνατόν να ελέγχει την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου. Στο στέλεχος *Ps. aeruginosa* PA7, ανωφερικά του οπερονίου, σε απόσταση 0.8kb εντοπίζεται ένα ακόμα οπερόνιο. Το οπερόνιο αυτό αποτελείται από τρία γονίδια (*EmrB/QacA*, *mrpA*, *RND*), το πρώτο από τα οποία είναι ομόλογο με το *orf6*. Το γονίδιο *EmrB/QacA* κωδικοποιεί για ένα μεταφορέα ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ενώ τα γονίδια *mrpA* και *RND* αντίστοιχα κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη A ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (multidrug resistance protein A) και την πρωτεΐνη ενός συστήματος efflux (*RND* efflux system outer membrane lipoprotein).

Τέλος, κατωφερικά του οπερονίου στα στελέχη *Ps. entomophila* L48, *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000 υπάρχει μια περιοχή 6kb χωρίς ‘νόημα’, ενώ στα στελέχη του είδους *Ps. fluorescens* εντοπίζεται ένα γονίδιο, με αντίθετη κατεύθυνση με το οπερόνιο, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στον χημειοτακτισμό (putative methyl-accepting chemotaxis protein). Στο στέλεχος *Ps. aeruginosa* PA7, εντοπίζεται το γονίδιο *Snr1*, το οποίο έχει αντίθετη κατεύθυνση με το οπερόνιο και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του κυτοχρώματος C.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στην παρατήρηση ότι η οργάνωση της περιοχής γύρω από τα γονίδια *sup5* και *sup6*, στο *Ps. fluorescens* X, είναι όμοια με την αντίστοιχη γονιδιωματική περιοχή του στελέχους *Ps. aeruginosa* PA7. Ακόμα και όταν πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτής της γονιδιωματικής περιοχής με το γονιδίωμα των στελεχών *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *Ps. syringae* pv. *aesculi* str. 2250, *Ps. syringae* pv. *oryzae* str. 1_6, *Ps. syringae* pv. *tabaci* ATCC 11528, *Ps. syringae* pv. *tomato* T1, για τα οποία η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματός τους ολοκληρώθηκε πρόσφατα. Κανένα άλλο στέλεχος του γένους *Pseudomonas* δεν βρέθηκε ότι έχει την ίδια οργάνωση.

Σε όλες τις κατηγορίες CLPs, τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις NRPS που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση βρίσκονται στην ίδια γονιδιωματική περιοχή (Bruijn *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2009; Dubern *et al.*, 2008). Κάτι τέτοιο δε φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση του *Ps. fluorescens* X μιας και από τη σύγκριση της γονιδιωματικής περιοχής του υποθετικού οπερονίου *supX* στα διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas* (synteny search) δεν βρέθηκαν και άλλα γονίδια τα οποία να κωδικοποιούν κάποια NRPS. Παρόλο που η έρευνα επεκτάθηκε 30kb ανωφερικά και κατωφερικά του υποθετικού οπερονίου *supX* ήταν αδύνατο να βρεθεί ένα γονίδιο το οποίο θα μπορούσε να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ενός μεταβολίτη που δεν έχει χαρακτηριστεί. Με τα δεδομένα αυτά, η βιοσύνθεση του αντιμικροβιακού μεταβολίτη είναι πολύ πιθανό να επιτελείται μόνο από τα γονίδια του *supX*.

Στη βάση δεδομένων BioCyc (Keseler *et al.*, 2009), απ’όπου αντλήθηκαν τα δεδομένα παραπάνω δεδομένα υπάρχουν στελέχη των οποίων έχει γίνει πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματός τους. Το στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158 (Arrebola *et al.*, 2003; 2007), στο οποίο δεν έχει γίνει πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματός του, έχουν βρεθεί ομόλογα γονίδια με τα με αυτά του υπό μελέτη οπερονίου.

Το στέλεχος UMAF0158 διαθέτει το οπερόνιο παραγωγής της μαγγκοτοξίνης, στο οποίο ανήκουν πέντε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες με αριθμούς καταχώρησης ABG00044.1, ABG00045.1, ABG00046.1, ABG00047.1, ABG00048.1 (Arrebola *et al.*, 2007). Η πρωτεΐνη ABG00047.1 έχει 65% ομοιότητα με την πρωτεΐνη Orf7 ενώ η πρωτεΐνη ABG00048.1, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mgoA*, έχει 37% πλήρη ομοιότητα με την πρωτεΐνη Orf8. Επίσης στο ίδιο στέλεχος, 814 βάσεις ανωφερικά του οπερονίου βιοσύνθεσης της μαγγκοτοξίνης και με την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής, βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό καταστολέα GntR. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό καταστολέα GntR φαίνεται, λοιπόν, να υπάρχει στον γονιδιωματικό αυτό τόπο σε όλα τα στελέχη των ειδών *Ps. fluorescens*, *Ps. entomophila*, *Ps. syringae* αλλά απουσιάζει από το *Ps. aeruginosa* PA7.

Η ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό καταστολέα της οικογένειας GntR, ανωφερικά του υποθετικού οπερονίου X, δημιουργεί την υποψία αν πιθανόν ένας τέτοιος παράγοντας ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου. Στο στέλεχος *P. fluorescens* X ελέγχθηκε η περιοχή μεταξύ του μεταγραφικού υποκινητή που προβλέφθηκε (§3.3.1.4.) και του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *sup5* (το πρώτο σε σειρά γονίδιο του οπερονίου X) για κάποια πιθανή θέση operator που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς καταστολείς της οικογένειας GntR. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε ότι η αλληλουχία GAGTGGTCAGCGTTAAC αποτελεί πιθανή θέση αναγώρισης και πρόσδεσης ενός παράγοντα της υποοικογένειας FadR (Kazakov *et al.*, 2009).

Η μελέτη του γονιδίου *orf8* και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η NRPS που κωδικοποιεί το γονίδιο *orf8* εμφανίζει μια μοναδική βασική ενότητα (module) η οποία περιλαμβάνει μια λειτουργική περιοχή (domain) αδενοκλάσης, μια περιοχή θειοεστεροποίησης, μια περιοχή συμπύκνωσης και μια περιοχή ρεδοκτάσης. Τα συντηρημένα καταλυτικά τμήματα (cores) της Orf8 χαρακτηρίστηκαν πλήρως (**Εικόνα Π28**, § Παράρτημα). Όπως είναι δυνατό να διακριθεί η λειτουργική περιοχή αδενοκλάσης αποτελείται από τα καταλυτικά τμήματα A1-A10, η περιοχή θειοεστεροποίησης από το T, η περιοχή συμπύκνωσης από το C6, ενώ η περιοχή ρεδοκτάσης από τα R1, R2, R4, R5 και R6 (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των συντηρημένων καταλυτικών τμημάτων, καθώς και των λειτουργικών περιοχών της Orf8 με την MgoA (**Εικόνα**

Π29, § Παράρτημα) η οποία εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της μαγγκοτοξίνης από το στέλεχος UMAF0158 (Arrebola *et al.*, 2007). Από τη σύγκριση αυτή είναι δυνατό να παρατηρηθεί ότι και οι δύο NRPS αποτελούνται από μια μοναδική βασική ενότητα (module), η οποία περιλαμβάνει τις ίδιες λειτουργικές περιοχές (domain) και στα δύο ένζυμα. Η μόνη διαφορά των Orf8 με την MgoA είναι τα διάφορα συντηρημένα καταλυτικά τμήματα (cores) που απαντώνται σε κάθε λειτουργική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα η περιοχή αδενυλίωσης της Orf8 περιλαμβάνει το καταλυτικό τμήμα A2, το οποίο δεν υπάρχει στην MgoA, η περιοχή συμπύκνωσης της Orf8 βρίσκεται μπροστά από την περιοχή ρεδουκτάσης, και η περιοχή ρεδουκτάσης αποτελείται από τα καταλυτικά τμήματα R1, R2, R4, R5 και R6 σε αντίθεση με την MgoA στην οποία η περιοχή ρεδουκτάσης αποτελείται μόνο από τα R1, R5 και R6.

Αντίθετα με τα γονίδια στις προηγούμενες ομάδες μεταλλαγμένων στελεχών, τα οποία κωδικοποιούν είτε την αφυδρογονάση της γλυκόζης, είτε γονίδια βιοσύνθεσης του συνενζύμου της, τα γονίδια της περιοχής αυτής δεν έχουν γνωστή λειτουργία. Είναι πολύ πιθανόν να αποτελούν μέρος του βιοσυνθετικού μηχανισμού του/των αντιμικροβιακών ενώσεων στο υπό μελέτη βακτήριο, όπως έχει παρατηρηθεί και στο *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158, όπου τα ομόλογα γονίδια σχετίζονται με την βιοσύνθεση της μαγγκοτοξίνης (Arrebola *et al.*, 2007).

3.4.11. Τα γονίδια καταστολής στο στέλεχος *Ps. fluorescens* X

Συνοψίζοντας όλα τα αποτελέσματα από την ταυτοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στον φαινότυπο sup του *Ps. fluorescens* X, είναι δυνατό να καταλήξουμε στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3 : Τα γονίδια καταστολής στο στέλεχος *Ps. fluorescens* X

Γονίδιο	Μεταλλαγμένο στέλεχος	Προβλεπόμενη Πρωτεΐνη που κωδικοποιεί	Αριθμός καταχώρισης στην Genbank
<i>sup1</i>	k36,R48 και W139	Gcd	HQ383687
<i>sup2</i>	B91 και B163	PqqF	JQ039398
<i>sup3</i>	A150	PqqD	
<i>sup4</i>	ρ26	pqqE	
<i>sup5</i>	ρ93	putative	JQ039399
<i>sup6</i>	δ40	putative cupin2	

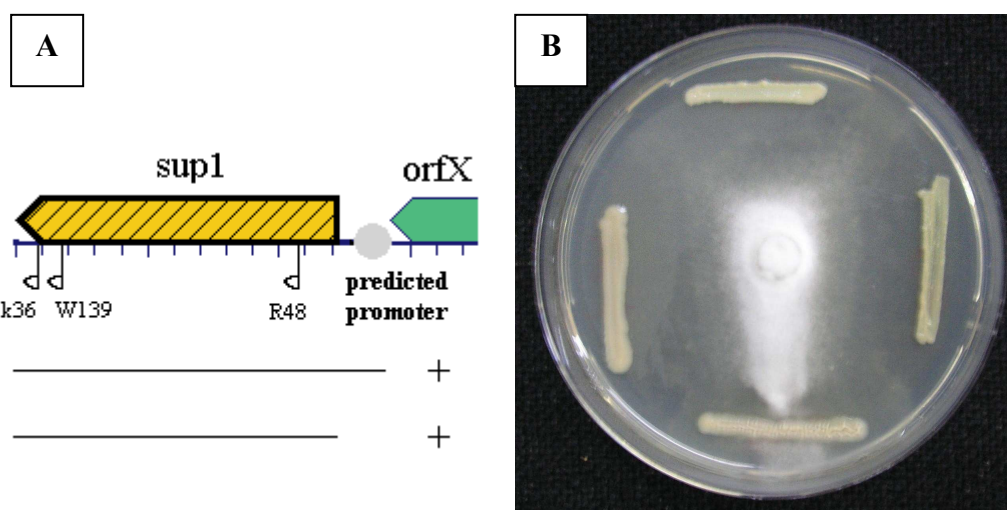
3.5. Επαναφορά του φαινοτύπου sup στα μεταλλαγμένα στελέχη

Οι πληροφορίες από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων των κλώνων της πλασμιδιακής απελευθέρωσης, από το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος,

έδειξαν ότι τα γονίδια *sup1*, *sup2*, *sup3*, *sup4*, *sup5* και *sup6* είναι πιθανώς υπεύθυνα για τον φαινότυπο *sup*⁻. Για να αποδειχθεί αδιάσειστα ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με τον φαινότυπο *sup*, ενισχύθηκαν με PCR και δοκιμάστηκε η ικανότητά τους να επανορθώσουν τον φαινότυπο των μεταλλαγμένων στελεχών ως προς την παρεμπόδιση *in vitro* του *P. ultimum*.

3.5.1. Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα μεταλλαγμένα στελέχη της πρώτης ομάδας

Τα μεταλλαγμένα στελέχη k36, R48, W139 φέρουν όλα την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο γονίδιο *sup1*, το οποίο κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης. Προκειμένου το γονίδιο αυτό να ενισχυθεί με PCR, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές *gcd1*, *gcd2*, *gcd3* οι οποίοι υβριδίζουν στον μεταγραφικό εκκινητή του *sup1*, στο κωδικόνιο έναρξης και στο κωδικόνιο λήξης του *sup1*, αντίστοιχα.



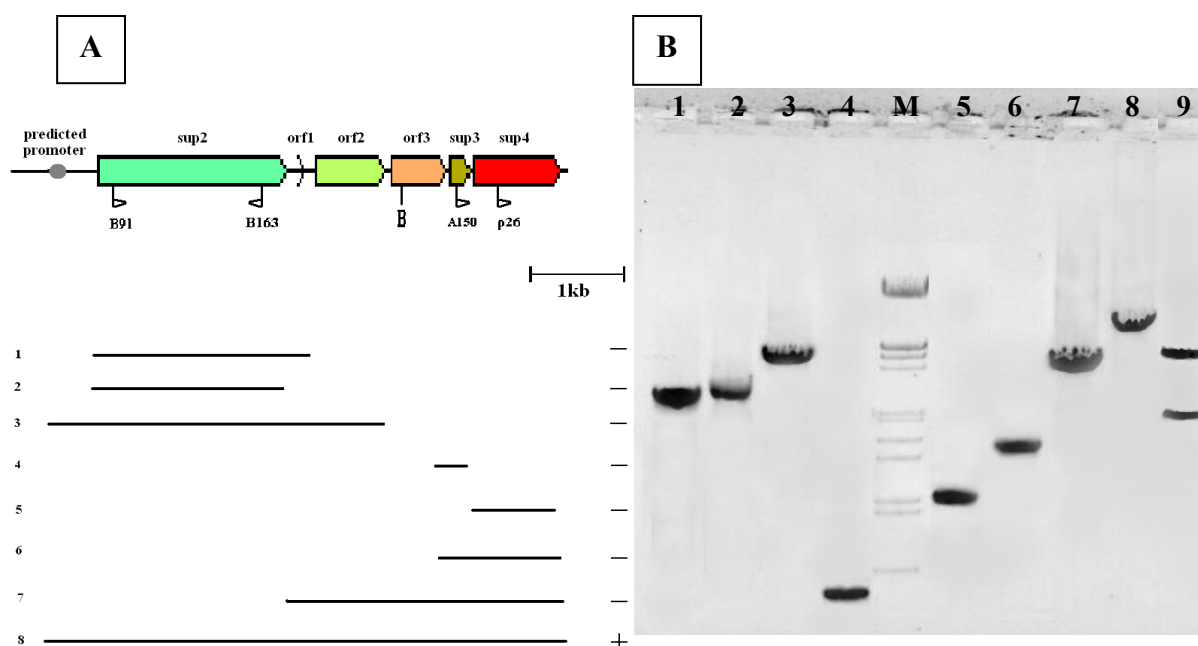
Εικόνα 3.12 : A) Δύο τμήματα ενισχύθηκαν με PCR και χρησιμοποιήθηκαν για την επανόρθωση του φαινοτύπου *sup* στα μεταλλαγμένα στελέχη k36, W139 και R48. Με το σύμβολο της πρόσθεσης (+) στο δεξί τμήμα της εικόνας έχει επισημανθεί η ικανότητα συμπλήρωσης του φαινοτύπου *sup*. Το σημείο ένθεσης και η κατεύθυνση του Tn5-RL27, για το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος, παρουσιάζεται σαν ένα τριγωνικό ταμπελάκι κάτω ακριβώς από το κάθε γονίδιο. B) Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα στελέχη k36, W139 και R48. Στο πάνω τμήμα του τρυβλίου έχει εμβολιαστεί το επανορθωμένο στέλεχος k36\pBBR5-*gcd1* ενώ αριστερά το W139\pBBR5-*gcd1* και δεξιά το R48\pBBR5-*gcd2*, τα οποία φέρουν την πλασμιδιακή κατασκευή pBBR5-*gcd1*. Στο κάτω τμήμα του τρυβλίου έχει εμβολιαστεί το μεταλλαγμένο στέλεχος k36.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR με τους εκκινητές *gcd2* και *gcd3* το οποίο δεν περιείχε το μεταγραφικό εκκινητή κλωνοποιήθηκε στον τροποποιημένο φορέα ευρέους φάσματος pBBR1MCS5-RBS (Φωτιάδης X., μεταπτυχιακή μελέτη), ο οποίος διαθέτει την θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (RBS) πριν από την περιοχή

κλωνοποίησης του φορέα (multicloning site) και η κατασκευή ονομάστηκε pBBR*gcd2*. Το προϊόν με τους εκκινητές *gcd1* και *gcd3* περιείχε τον προβλεπόμενο μεταγραφικό υποκινητή και κλωνοποιήθηκε στον φορέα ευρέους φάσματος pBBR1MCS5 και η πλασμιδιακή κατασκευή ονομάστηκε pBBR*gcd1*. Οι δύο αυτές κατασκευές είχαν την ικανότητα συμπλήρωσης του φαινοτύπου *sup* στα μεταλλαγμένα στελέχη της πρώτης ομάδας (Εικόνα 3.12).

3.5.2. Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα μεταλλαγμένα στελέχη της δεύτερης και της τρίτης ομάδας

Σχεδιάστηκαν εκκινητές από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων, έτσι ώστε ο καθένας να περιέχει είτε το κωδικόνιο έναρξης, είτε το κωδικόνιο λήξης των γονιδίων αυτών. Στη συνέχεια, οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν με διάφορους συνδυασμούς (Εικόνα 3.13) και τα προϊόντα του PCR κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEMTeasy και κατόπιν υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pBBR1MCS5 (Kovach *et al.*, 1995) και στον pBBR1MCS5-RBS (Φωτιάδης X., μεταπτυχιακή μελέτη) όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.3 (§2.12.4, Υλικά και Μέθοδοι).



Εικόνα 3.13: Α. Ο γονιδιακός τόπος που περιέχει τα γονίδια *sup2*, *sup3*, *sup4*, *orf1*, *orf2* και *orf3*. Το σημείο ένθεσης και η κατεύθυνση του Tn5-RL27, για το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος, παρουσιάζεται σαν ένα τριγωνικό ταμπελάκι κάτω ακριβώς από το κάθε γονίδιο. Με το γράμμα B συμβολίζεται η θέση αναγνώρισης για το ένζυμο *Bam*HI. Οχτώ τμήματα (1-8) που ενισχύθηκαν με PCR και χρησιμοποιήθηκαν για την επανόρθωση του φαινοτύπου στα μεταλλαγμένα στελέχη B91, B163, A150 και ρ26. Με το σύμβολο πλην (-) στο δεξί τμήμα της εικόνας έχουν επισημανθεί τα τμήματα τα οποία δε μεταβάλουν τον

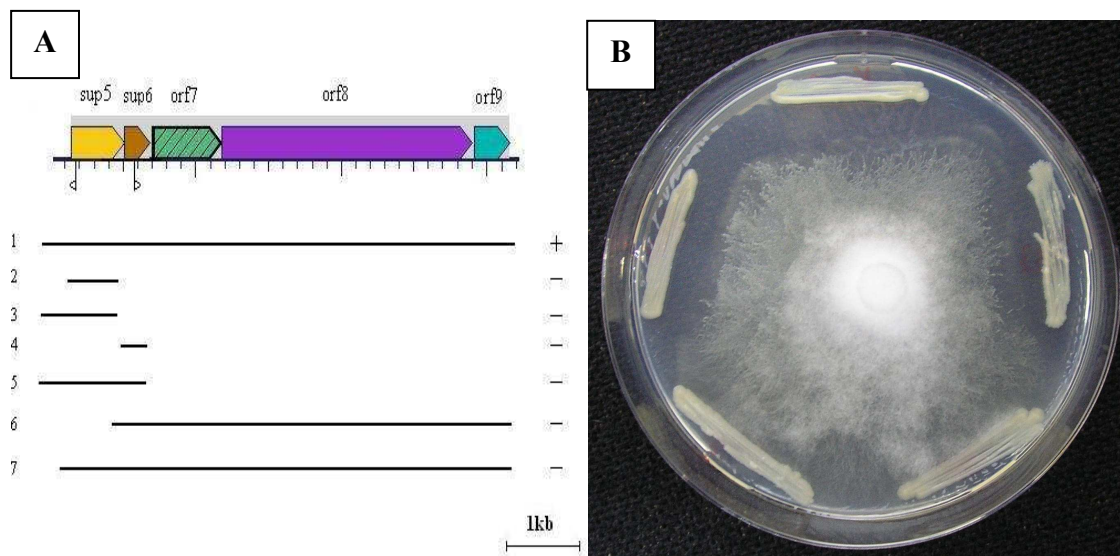
φαινότυπο *sup⁻*. Β. Πηκτή αγαρόζης με τα οχτώ ενισχυθέντα τμήματα (1-8), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην επανόρθωση του φαινοτύπου *sup⁻*. Στη ζώνη 9 αναλύεται το αποτέλεσμα πέψης του προϊόντος υπ' αριθμόν 8 με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*HI. Η στήλη με την ένδειξη Μ αντιπροσωπεύει τον μάρτυρα μοριακού μεγέθους, ο οποίος είναι το DNA του λ φάγου μετά από διπλή πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Hind*III και *Eco*RI.

Η επανόρθωση του άγριου φαινοτύπου ήταν δυνατόν να επιτευχθεί μόνο από τη γονιδιοματική περιοχή η οποία περιείχε τα γονίδια *sup2*, *sup3*, *sup4*, *orf1*, *orf2* και *orf3* καθώς και τον μεταγραφικό εκκινητή, έτσι όπως έχει προβλεφθεί, και η πλασμιδιακή κατασκευή ονομάστηκε pBBRrqqF-E. Η εισαγωγή καθενός από τα παραπάνω γονίδια, μεμονωμένα, δεν είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά του φαινοτύπου *sup* (Εικόνα 3.13Α).

3.5.3. Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα μεταλλαγμένα στελέχη της τέταρτης ομάδας

Η τέταρτη ομάδα αποτελείται από τα μεταλλαγμένα στελέχη δ40 και ρ93 στα οποία βρέθηκε ότι η ένθεση του μεταθετού στοιχείου έχει συμβεί μέσα στο οπερόνιο X, το οποίο αποτελείται από πέντε γονίδια. Η γονιδιοματική περιοχή η οποία περιλαμβάνει τα *sup5*, *sup6*, *orf7*, *orf8*, *orf9* καθώς και τον μεταγραφικό εκκινητή έχει μέγεθος 6.4kb. Προκειμένου να γίνει η ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής αυτής, ακολουθήθηκε η διαδικασία της διαδοχικής αλληλούχισης (*primer walking*). Κατά τη διαδικασία αυτή, από το αποτέλεσμα της κάθε αλληλούχισης σχεδιάζονταν καινούριοι εκκινητές (Πίνακας Π1, § Παράρτημα) μέχρι να γίνει η ανάγνωση της αλληλουχίας ολόκληρης της περιοχής.

Από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία προέκυψε κατά την διαδικασία βαδίσματος με εκκινητές, σχεδιάστηκαν εκκινητές (Πίνακας 2.2, § Υλικά και Μέθοδοι) έτσι ώστε ο καθένας να περιέχει είτε το κωδικόνιο έναρξης, είτε το κωδικόνιο λήξης των γονιδίων *sup5*, *sup6* αλλά και των υπολοίπων γονιδίων του οπερονίου. Στη συνέχεια, οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν με διάφορους συνδυασμούς (Εικόνα 3.14) και τα προϊόντα του PCR κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEMTeasy και κατόπιν υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pBBR1MCS5 (Kovach *et al.*, 1995) και pBBR1MCS5-RBS (Φωτιάδης X., Μεταπτυχιακή μελέτη). Κάθε τμήμα της γονιδιοματικής περιοχής του οπερονίου X, το οποίο κλωνοποιήθηκε στους φορείς αυτούς, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει επαναφορά του φαινοτύπου *sup* στα στελέχη δ40 και ρ93.



Εικόνα 3.14: Α. Ο γονιδιακός τόπος που περιέχει τα γονίδια *sup5*, *sup6*, *orf7*, *orf8* και *orf9*. Το σημείο ένθεσης και η κατεύθυνση του Tn5-RL27, για το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος, παρουσιάζεται σαν ένα τριγωνικό ταμπελάκι κάτω ακριβώς από το κάθε γονίδιο. Επτά τμήματα (1-7) που ενισχύθηκαν με PCR και χρησιμοποιήθηκαν για την επανόρθωση του φαινοτύπου στα μεταλλαγμένα στελέχη δ40 και ρ93. Με το σύμβολο πλιν (-) στο δεξί τμήμα της εικόνας έχουν επισημανθεί τα τμήματα τα οποία δε μεταβάλλουν τον φαινότυπο *sup*⁻. Β. Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα στελέχη δ40 και ρ93. Στο πάνω τμήμα του τρυβλίου έχει εμβολιαστεί ο άγριος τύπος, ενώ αριστερά και δεξιά από αυτόν έχουν εμβολιαστεί τα επανορθωμένα στελέχη, τα οποία φέρουν την πλασμιδιακή κατασκευή pBBR5-*supX*, η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή 1 της εικόνας 3.24Α. Στο κάτω τμήμα του τρυβλίου έχουν εμβολιαστεί τα μεταλλαγμένα στελέχη δ40 και ρ93.

Είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι η επανόρθωση του άγριου φαινοτύπου είναι εφικτή μόνο από τη γονιδιωματική περιοχή η οποία περιέχει τα γονίδια *sup5*, *sup6*, *orf7*, *orf8* και *orf9* καθώς και τον μεταγραφικό υποκινητή, έτσι όπως έχει προβλεφθεί. Η εισαγωγή καθενός από τα παραπάνω γονίδια, μεμονωμένα ή σε διάφορους συνδυασμούς, δεν είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά του φαινοτύπου *sup* (Εικόνα 3.14Α).

3.5.4. Συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* με ανάπτυξη σε διάφορες πηγές άνθρακα

Το γονίδιο *sup1* κωδικοποιεί για την αφυδρογονάση της γλυκόζης, ενώ τα γονίδια *sup2*, *sup3* και *sup4* κωδικοποιούν πρωτεΐνες βιοσύνθεσης του pqq, το οποίο αποτελεί συνένζυμο της αφυδρογονάσης της γλυκόζης. Η αφυδρογονάση της γλυκόζης και το συνένζυμό της, PQQ, καταλύουν την αντίδραση οξειδωσης της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ (James *et al.*, 1986; de Werra *et al.*, 2009).

Η γλυκόζη και το γλυκονικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν ως μοναδικές πηγές άνθρακα, στο θρεπτικό μέσο M9, προκειμένου να επιτευχθεί επαναφορά του

φαινότυπου *sup* σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη. Σε όλα μεταλλαγμένα στελέχη, παρόλο που διατηρούσαν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται με μοναδική πηγή άνθρακα τις δύο αυτές ενώσεις, ήταν αδύνατον να επιτευχθεί επαναφορά της μετάλλαξης.

Το γονίδιο *sup1*, το οποίο κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης, έχει μικρή ομοιότητα με αυτό που κωδικοποιεί για την αφυδρογονάση του σικιμικού. Η αφυδρογονάση του σικιμικού είναι ένα ένζυμο το οποίο εκτός από το NADH, χρησιμοποιεί ως συνένζυμο της το PQQ (van Kleef *et al.*, 1988). Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση οξειδωσης του σικιμικού σε 3-διδροσικιμικό, από το οποίο με μια επακόλουθη αντίδραση προκύπτει το χορισμικό οξύ. Το χορισμικό οξύ αποτελεί πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση τριών αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη) (Dewick, 2002), αλλά και στη βιοσύνθεση των φεναζινών (McDonald *et al.*, 2001).

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το σικιμικό οξύ έχει την ικανότητα να επαναφέρει τον φαινότυπο *sup* του βακτηρίου και στα *sup⁻* μεταλλαγμένων στελεχών, αυτά αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό M9 με μοναδική πηγή άνθρακα το σικιμικό. Η καλλιέργεια παρουσία σικιμικού οξέος ήταν αδύνατον να επαναφέρει την μετάλλαξη σε κανένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη, όπως επίσης και να μεταβάλλει τον *sup* φαινότυπο του άγριου στελέχους.

3.6. Έκφραση των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8*

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση γονιδίων επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η πιο ευαίσθητη μοριακή τεχνική, αυτή του ποσοτικού Real Time PCR. Η μελέτη της έκφρασης περιορίστηκε στα γονίδια του οπερονίου X, μιας και τα υπόλοιπα γονίδια (*sup1*, *sup2*, *sup3* και *sup4*) τα οποία κωδικοποιούν είτε την αφυδρογονάση της γλυκόζης, είτε γονίδια βιοσύνθεσης του συνενζύμου της έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Τα γονίδια του οπερονίου X παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στη μελέτη της έκφρασής τους αφού απουσιάζουν βιβλιογραφικά δεδομένα γι' αυτά και οι ενδείξεις από την ανάλυση (§3.4.3.3) της γονιδιωματικής περιοχής τους οδηγούν στην υποψία ότι αποτελούν μέρος του βιοσυνθετικού μηχανισμού των αντιμικροβιακών ενώσεων στο υπό μελέτη βακτήριο. Από τα πέντε γονίδια του οπερονίου X, στη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τα *sup5* και *sup6* στα οποία έχει εντοπιστεί η ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα μεταλλαγμένα στελέχη της τέταρτης ομάδας, και το γονίδιο *orf8* το οποίο είναι το μεγαλύτερο (~3450bp) και φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο στον

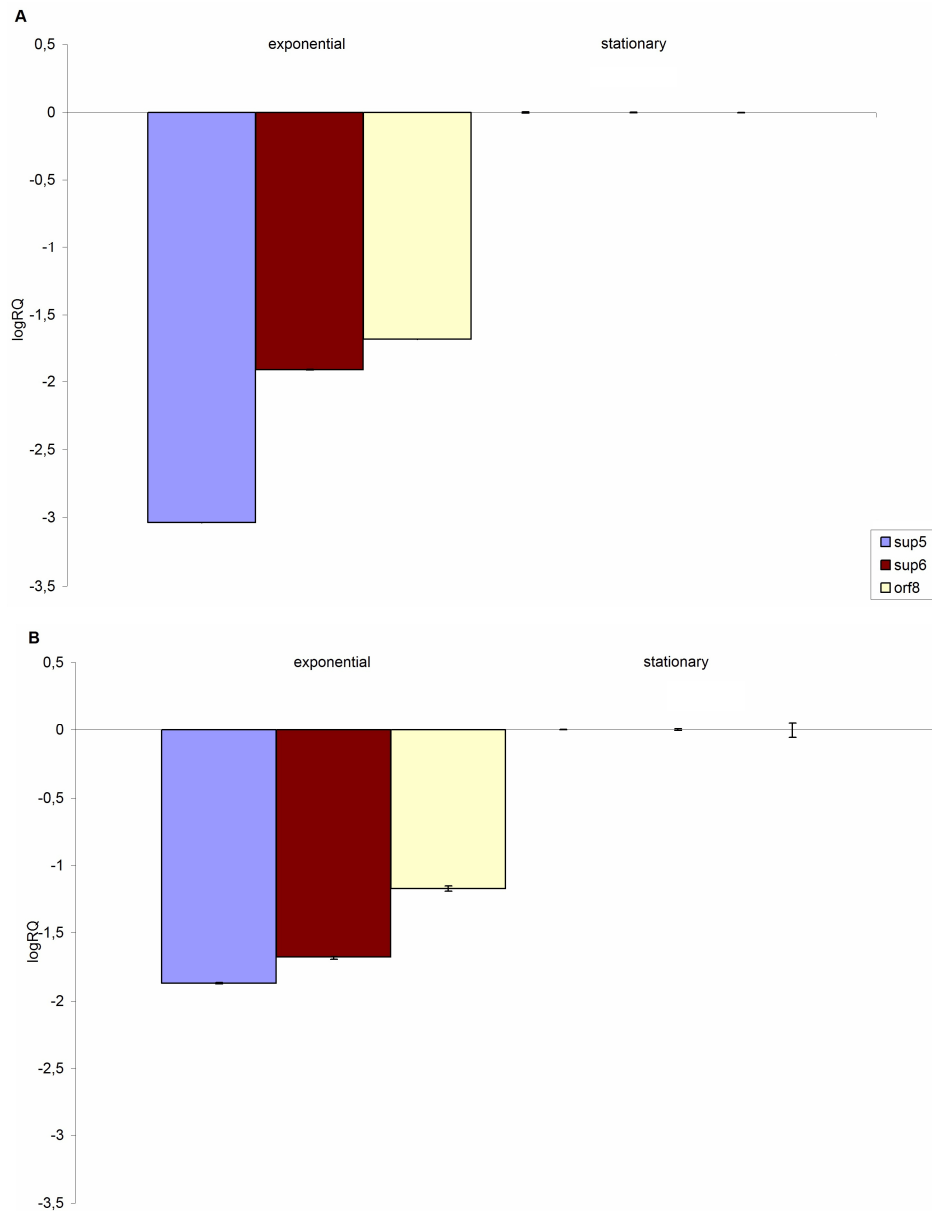
βιοσυνθετικό μηχανισμό των παραγομένων αντιμικροβιακών ενώσεων, μιας και κωδικοποιεί μια NRPS.

Στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του οπερονίου X επιλέχθηκαν τα στελέχη k36 και ρ26, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις τρεις πρώτες ομάδες των μεταλλαγμένων στελεχών και επομένως δε φέρουν μεταλλάξεις σε κανένα από τα γονίδια του οπερονίου X. Η έκφραση των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* συγκρίθηκε μεταξύ των στελεχών αυτών και του αγρίου τύπου του βακτηρίου και η σχετική έκφραση διορθώθηκε με βάση την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Τα γονίδια αναφοράς (housekeeping) τα οποία δοκιμάστηκαν ήταν τα γονίδια *rpoD* (de Bruijn *et al.*, 2007; 2009) και *rpoB* (Mavrodí *et al.*, 2010). Προκειμένου να σχεδιαστούν οι εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στο Real Time PCR, για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων *rpoD* και *rpoB* βρέθηκαν συντηρημένες περιοχές στο γένος *P. fluorescens* (Εικόνα Π30 και Π31, § Παράρτημα). Η επιλογή των εκκινητών που έγινε από τις συντηρημένες αυτές περιοχές είχε ως κριτήριο την επιλογή ζευγών τα οποία δίνουν ένα προϊόν με μέγεθος 60-70bp.

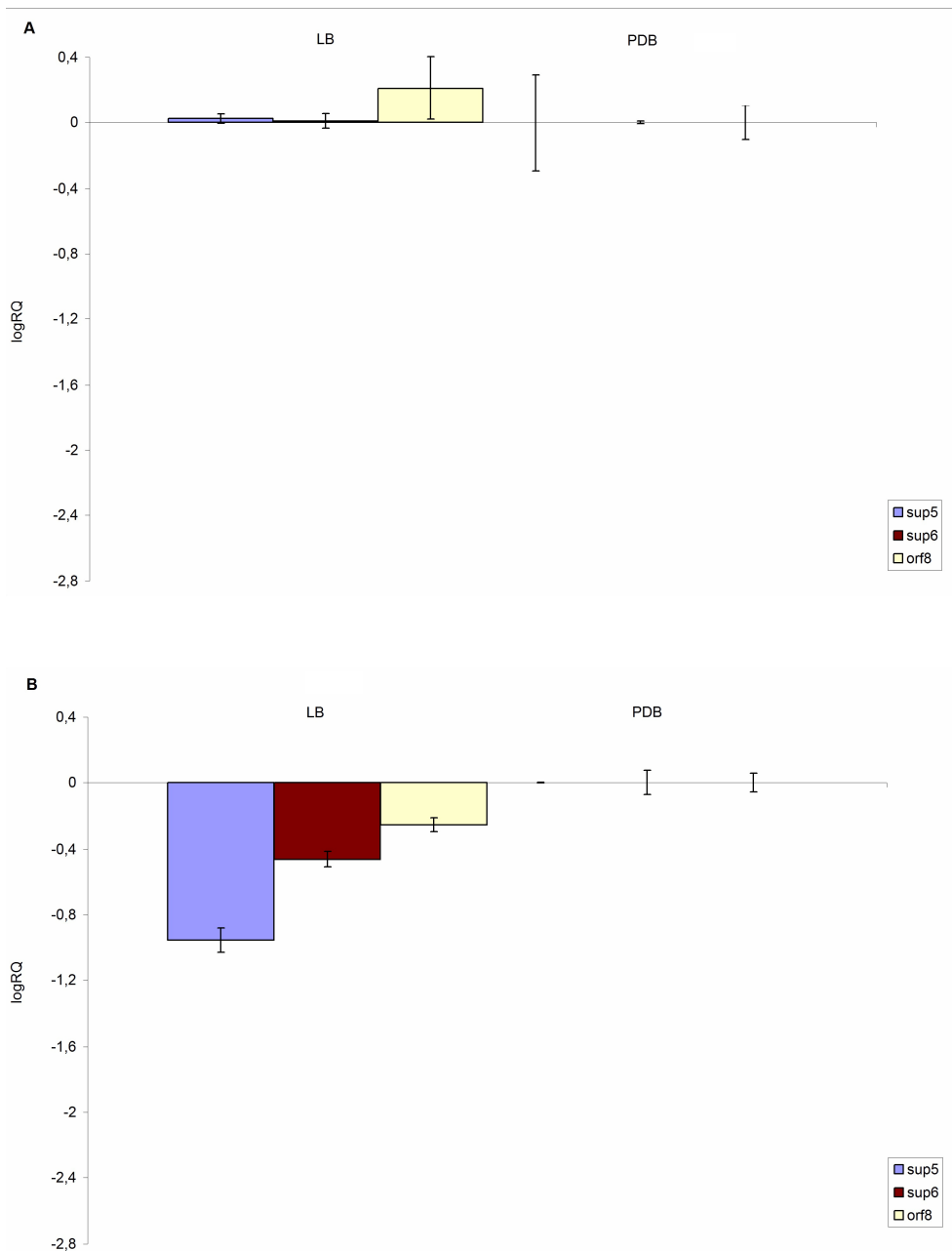
Τελικά, από τα δύο αυτά γονίδια ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το *rpoD*, το οποίο έχει πιο σταθερή αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα έκφραση και έχει χρησιμοποιηθεί στην μελέτη της έκφρασης γονιδίων βιοσύνθεσης κυκλικών λιποπεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα το γονίδιο *rpoD* έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *massA* και *massB*, τα οποία εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των μασσετολιδών, και των γονιδίων *viscA*, *viscB* και *viscC*, τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βισκοσιναμίδης (de Bruijn *et al.*, 2009).

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* εστιάστηκε στην φάση στασιμότητας, η οποία αντιστοιχεί σε OD=0,8-0,9, και στο μέσο της εκθετικής ανάπτυξης, το οποίο αντιστοιχεί σε OD=0,5-0,6. Η απομόνωση RNA έγινε από τις δύο αυτές φάσεις, σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα (PDB και LB). Στο θρεπτικό PDB, το οποίο περιέχει προθήκη γλυκόζης, παρατηρείται ο φαινότυπος sup στον άγριο τύπο του βακτηρίου ενώ στο LB, το οποίο δεν περιέχει προθήκη γλυκόζης, δεν παρατηρείται ο φαινότυπος sup.



Γράφημα 3.1 : Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* κατά την εκθετική φάση και τη φάση στασιμότητας του άγριου τύπου βακτηρίου (*Ps. fluorescens* X) στα θρεπτικά μέσα A) LB και B) PDB.

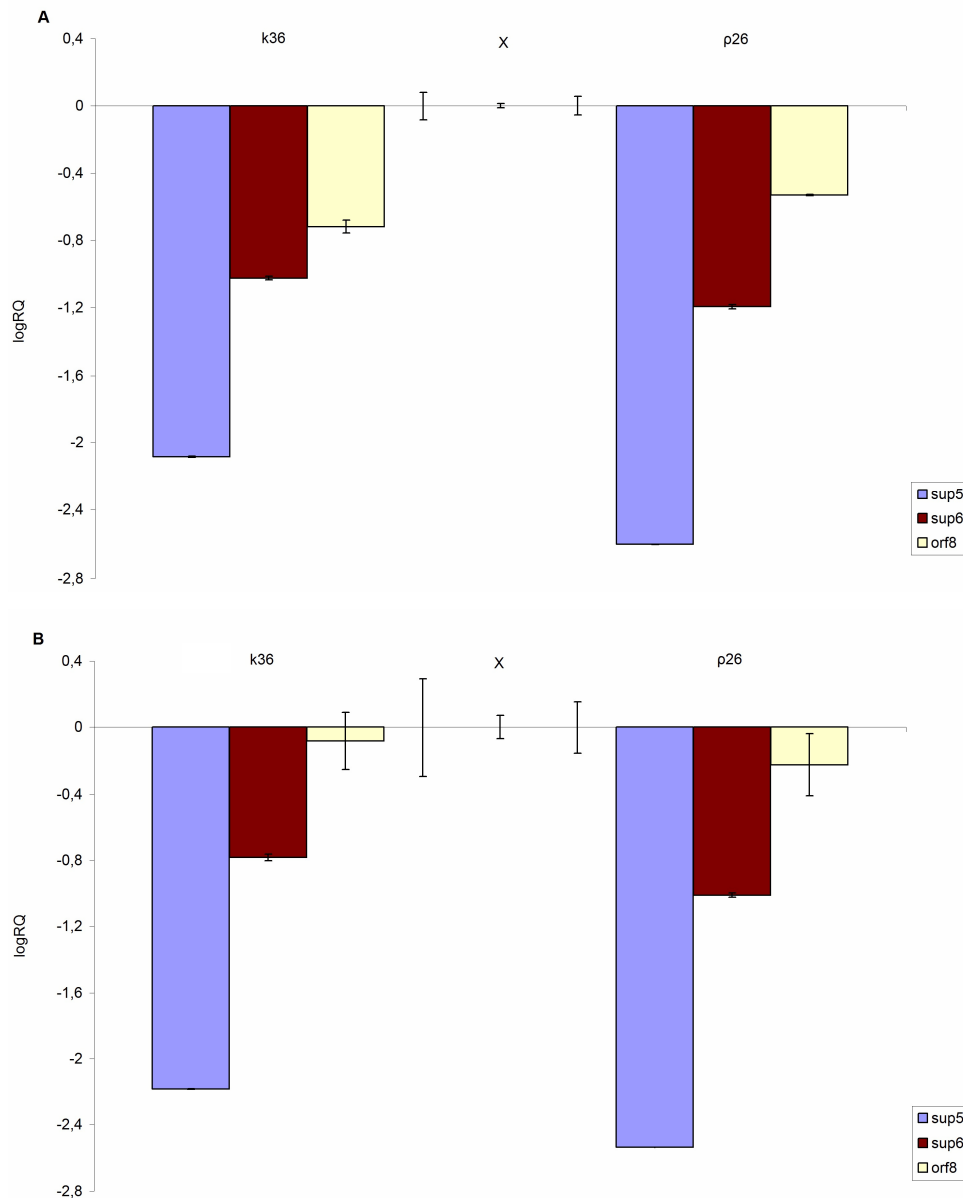
Συγκρίνοντας τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* στον άγριο τύπο στις δύο αναπτυξιακές φάσεις (**Γράφημα 3.1**) είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα παρατηρούνται κατά την φάση στασιμότητας. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων κατά την εκθετική φάση τόσο στο θρεπτικό μέσο LB (**Γράφημα 3.1A**) όσο και στο PDB (**Γράφημα 3.1B**) είναι εμφανώς μειωμένα σε σύγκριση με τα επίπεδα κατά την φάση στασιμότητας. Η μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων κατά την εκθετική φάση φαίνεται ότι είναι παρόμοια και για τα δύο θρεπτικά μέσα.



Γράφημα 3.2 : Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* κατά την ανάπτυξη του άγριου τύπου βακτηρίου (*Ps. fluorescens X*) στα θρεπτικά μέσα LB και PDB A) στην εκθετική φάση και B) στη φάση στασιμότητας.

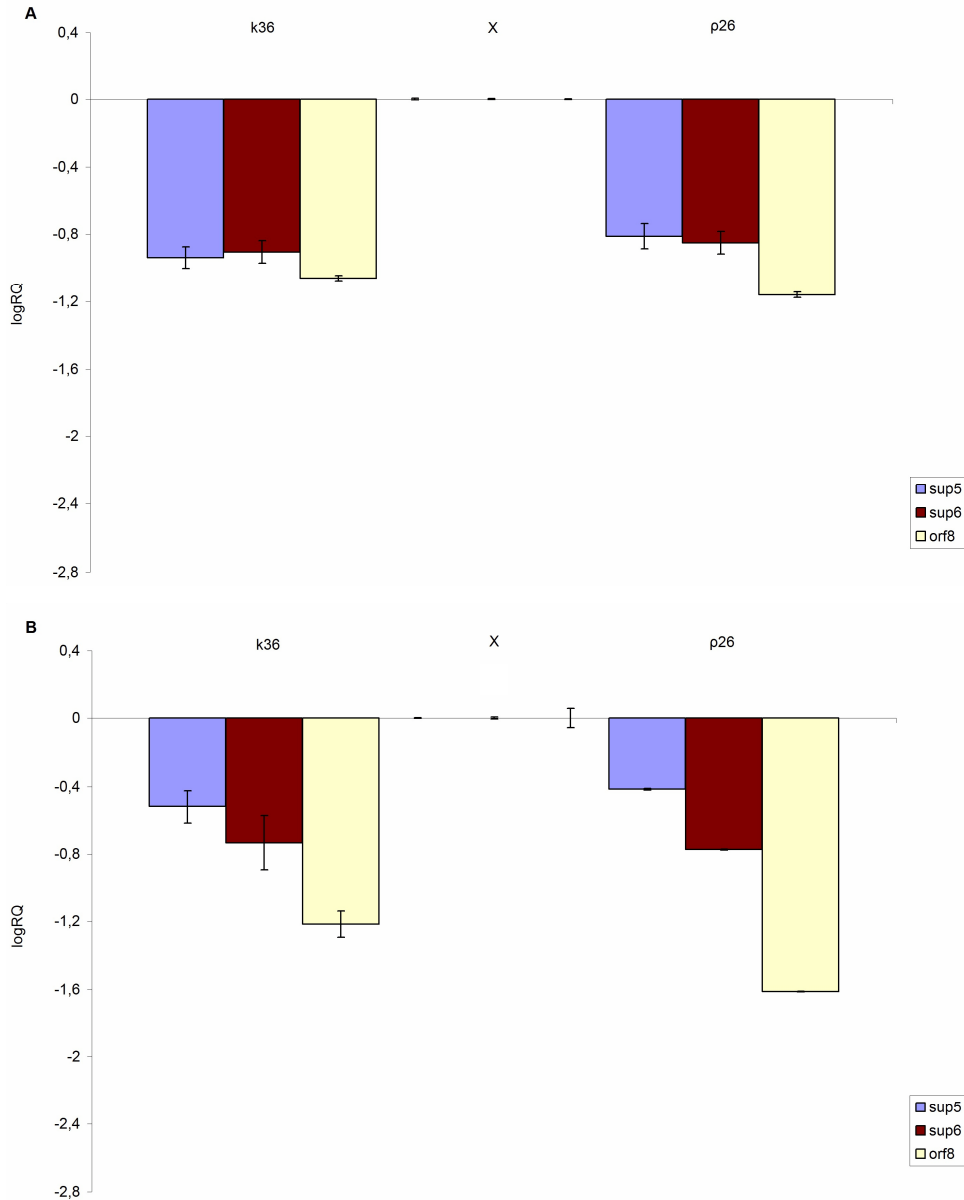
Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (**Γράφημα 3.2A**) είναι δυνατό να παρατηρηθεί ότι η μεταγραφή των τριών αυτών γονιδίων στον άγριο τύπο X παραμένει, περίπου, στα ίδια επίπεδα και στα δύο θρεπτικά μέσα. Αντίθετα, κατά την στατική φάση (**Γράφημα 3.2B**) είναι δυνατό να παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα μεταγραφής των τριών γονιδίων στον άγριο τύπο X, όταν αυτός αναπτύχθηκε στο θρεπτικό μέσο LB, είναι μειωμένα σε σχέση με αυτά που παρουσιάζονται όταν ο άγριος τύπος αναπτυχθεί στο θρεπτικό μέσο PDB. Συγκρίνοντας τα επίπεδα

μεταγραφής των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* στο X από τις δύο αναπτυξιακές φάσεις (Γράφημα 3.1 και 3.2) είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα μεταγραφής παρατηρούνται κατά την φάση στασιμότητας στο θρεπτικό μέσο PDB.



Γράφημα 3.3 : Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* κατά την εκθετική φάση στον άγριο τύπο βακτηρίου (X) και στα μεταλλαγμένα στελέχη ρ26 και k36 A) στο θρεπτικό μέσο LB και B) στο μέσο PDB.

Τα επίπεδα μεταγραφής των τριών γονιδίων εμφανίζονται αρκετά μειωμένα και στα δύο μεταλλαγμένα στελέχη, τόσο κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο LB (Γράφημα 3.3A) όσο και κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο PDB (Γράφημα 3.3B).



Γράφημα 3.4 : Μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* κατά την φάση στασιμότητας στον άγριο τύπο βακτηρίου (X) και στα μεταλλαγμένα στελέχη ρ26 και k36 A) στο θρεπτικό μέσο LB και B) στο μέσο PDB.

Τα επίπεδα μεταγραφής των τριών γονιδίων εμφανίζονται αρκετά μειωμένα στα δύο μεταλλαγμένα στελέχη, τόσο κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο LB (**Γράφημα 3.4A**) όσο και κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο PDB (**Γράφημα 3.4B**). Το επίπεδο μεταγραφής των τριών γονιδίων στα μεταλλαγμένα στελέχη όταν αυτά αναπτύχθηκαν στο LB είναι πολύ χαμηλότερο από αυτό όταν τα μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό μέσο PDB.

Με την ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου μέσα σε ένα γονίδιο, συνήθως προκαλείται η διακοπή της μεταγραφής του γονιδίου αυτού. Από τα αποτελέσματα

του Real-Time PCR είναι δυνατόν να παρατηρήσουμε ότι υπάρχει διακοπή της έκφρασης των γονιδίων του οπερονίου X στα μεταλλαγμένα στελέχη k36 και p26, τα οποία φέρουν την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα γονίδια *sup1* και *sup4* αντίστοιχα. Επομένως η έκφραση των γονιδίων *sup1* και *sup4* επηρεάζουν την μεταγραφή των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* του οπερονίου X.

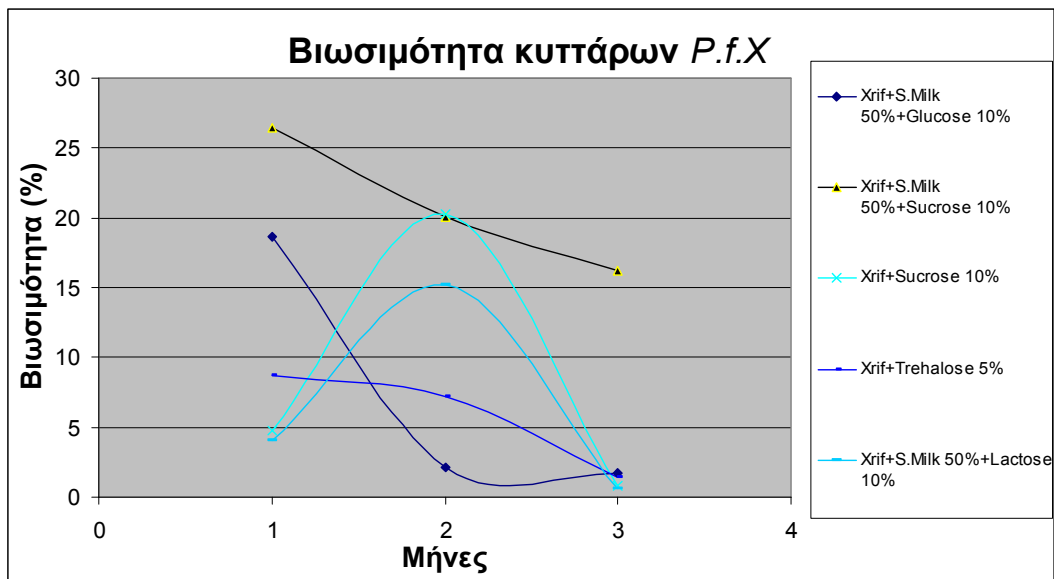
3.7. Δημιουργία εμπορικών σκευασμάτων

Προκειμένου να παραχθεί μόλυσμα του βακτηρίου ικανό να διατηρήσει τη βιωσιμότητά του για ένα χρονικό διάστημα χωρίς την ύπαρξη συγκεκριμένων συνθηκών αποθήκευσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της λυοφιλίωσης. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να παραχθεί μόλυσμα το οποίο είναι δυνατό να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα και κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές σε εμπορική κλίμακα.

Κατά τη διαδικασία αυτή τα βακτηριακά κύτταρα υπόκεινται σε συνθήκες κενού και σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (§2.11, Υλικά και Μέθοδοι) και για τον λόγο αυτό ήταν απαραίτητη η παρουσία ουσιών οι οποίες έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από τις ακραίες αυτές συνθήκες. Οι κρυοπροστατευτικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό ήταν δισακχαρίτες (γλυκόζη, σακχαροζη, τρεχαλόζη, λακτόζη), μια πολυόλη (σορβιτόλη) (Costa *et al.*, 2000) και αποβουτυρωμένο γάλα μακράς διάρκειας (FAGE) (Cody *et al.*, 2008), σε συνδυασμούς μεταξύ τους.

Οι μετρήσεις ξεκίνησαν από τον πρώτο μήνα και μετά, μιας και κατά τη διάρκεια του πρώτου αυτού μήνα η βιωσιμότητα των κυττάρων βρισκόταν σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Ο υπολογισμός της βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε μέχρι και τον τρίτο μήνα μετά τη λυοφιλίωση. Μετά τον τρίτο μήνα παρατηρήθηκε ότι για όλους τους χειρισμούς η βιωσιμότητα βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

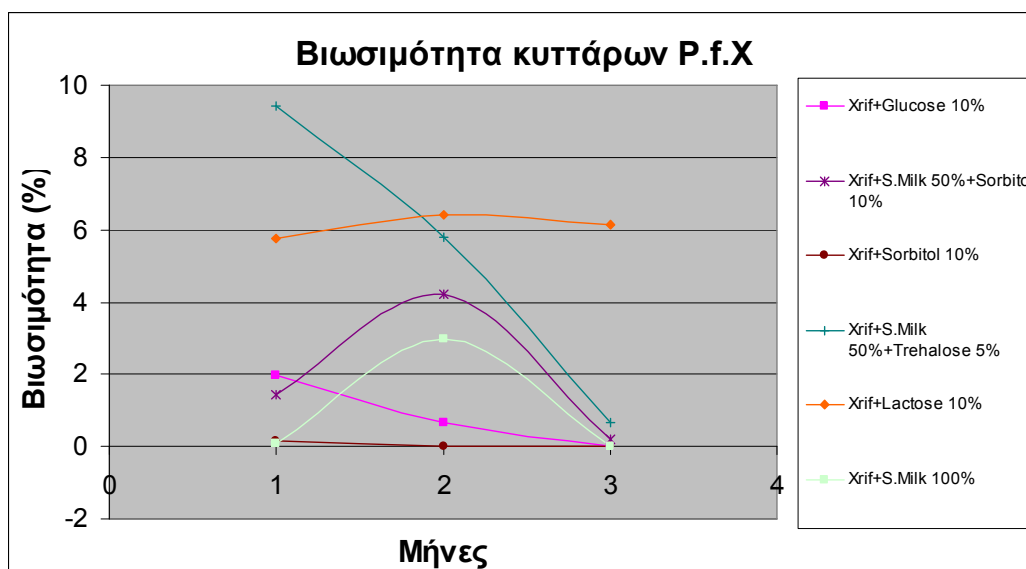
Ακολουθεί γράφημα στο οποίο απεικονίζεται η βιωσιμότητα των βακτηρίων *P.f.X* τρεις μήνες μετά τη λυοφιλίωση τους. Παρουσιάζονται οι πέντε χειρισμοί που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα βιωσιμότητας.



Γράφημα 3.5 : Βιωσιμότητα των βακτηρίων *P.f.X* τρεις μήνες μετά τη λυοφιλίωση με πέντε διαφορετικούς χειρισμούς.

Ο χειρισμός που φαίνεται να διατηρεί σταθερή τη βιωσιμότητα είναι αυτός με αποβουτυρωμένο γάλα σε συγκέντρωση 50% κατ'όγκο σε συνδυασμό με σακχαρόζη 10% κατά βάρος (S.Milk 50% και Sucrose 10%).

Ακολουθεί γράφημα στο οποίο απεικονίζεται η βιωσιμότητα των βακτηρίων *P.f.X* τρεις μήνες μετά τη λυοφιλίωση τους. Παρουσιάζονται έξι χειρισμοί που έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας.



Γράφημα 3.6: Βιωσιμότητα των βακτηρίων *P.f.X* τρεις μήνες μετά τη λυοφιλίωση με έξι διαφορετικούς χειρισμούς

Ο χειρισμός που φαίνεται να διατηρεί σταθερή τη βιωσιμότητα των κυττάρων, σε χαμηλά όμως επίπεδα, είναι αυτός με λακτόζη 10% κατά βάρος (Lactose 10%), ενώ αυτός που δεν ευνοεί την βιωσιμότητα είναι εκείνος με σορβιτόλη 10% κατά βάρος (Sorbitol 10%)

Η επίτευξη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων, σε πραγματικές συνθήκες αγρού, κατά των προσβολών από φυτοπαθογόνους μύκητες βασίζεται στο μέγεθος του πληθυσμού των βακτηρίων ο οποίος εμβολιάζεται σε κάθε σπόρο. Έτσι, προκειμένου να υπάρξει βιολογική καταπολέμηση, ως γενικός κανόνας είναι ο πληθυσμός των βακτηρίων να βρίσκεται κοντά στα 10^7 κύτταρα ανά σπόρο.

Βάσει αυτού, και αναλόγως του αριθμού των σπόρων οι οποίοι πρόκειται να εμβολιαστούν είναι δυνατόν, μετά τις μετρήσεις της βιωσιμότητας, να υπολογιστεί η ποσότητα της αρχικής καλλιέργειας που απαιτείται προκειμένου να έχουμε ικανοποιητική βιολογική καταπολέμηση. Για παράδειγμα, αν ο αριθμός των σπόρων οι οποίοι είναι επιθυμητό να εμβολιαστούν είναι 200.000 (το οποίο αντιστοιχεί σε μια έκταση 2 στρεμμάτων) μετά από ένα χρονικό διάστημα τριών μηνών από την καλλιέργεια του βακτηρίου, τότε για να επιτευχθεί ο απαιτούμενος πληθυσμός ανά σπόρο είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν 13,3 λίτρα κλειστής καλλιέργειας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή το βακτηριακό στέλεχος X ταξινομήθηκε στο είδος *Ps. fluorescens* μετά από μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την 16S rRNA. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο το βακτήριο *Ps. fluorescens* X έχει την ικανότητα να καταστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα *P. ultimum* και ο φαινότυπος αυτός ονομάστηκε sup. Προκειμένου να χαρακτηριστεί μοριακά ο μηχανισμός βιολογικής καταπολέμησης, είναι απαραίτητη η απομόνωση των γονιδιακών περιοχών του βακτηρίου που σχετίζονται με την βιολογική καταπολέμηση. Η απομόνωση των γονιδιωματικών περιοχών αυτών επιτεύχθηκε με την μεταλλαξιγένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27, κατά την οποία απομονώθηκαν 9 μεταλλαγμένα στελέχη (A150, ρ26, B91, B163, δ40, ρ93, R48, k36 και W139).

Τα 9 αυτά στελέχη απομονώθηκαν από μια βιβλιοθήκη 12000 μεταλλαγμένων στελεχών και έχουν τον φαινότυπο sup⁻, παρουσιάζουν δηλαδή απώλεια της παρεμποδιστικής τους δράσης έναντι του μύκητα *P. ultimum*. Ο φαινότυπος sup⁻ οφείλεται αποκλειστικά και μόνο σε μονή ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμα καθενός από τα 9 sup⁻ μεταλλαγμένα στελέχη. Η μοναδικότητα της ένθεσης του Tn5-RL27 επιβεβαιώθηκε μετά από υβριδισμό κατά Southern, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή ολόκληρο το μεταθετό στοιχείο.

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης sup⁻ μεταλλαγμένων στελεχών βρέθηκε ακόμα ένα στέλεχος (θ123) το οποίο είχε τον επιθυμητό φαινότυπο. Το στέλεχος αυτό, κατόπιν του υβριδισμού κατά Southern, αποκλείστηκε από την παρούσα έρευνα μιας και βρέθηκε ότι φέρει δύο ενθέσεις του μεταθετού στοιχείου στο γονιδίωμά του. Το στέλεχος αυτό είναι δυνατόν να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω έρευνας κατά την οποία θα γίνει έλεγχος της συνδυαστικής επίδρασης των γονιδίων, που φέρουν την ένθεση, στον φαινότυπο sup. Το γεγονός ότι ανάμεσα στα απομονωθέντα sup⁻ στελέχη με μονή ένθεση στο γονιδίωμα βρέθηκε και ένα στέλεχος το οποίο φέρει δύο ενθέσεις υπογραμμίζει ότι η αξιοπιστία του συστήματος της μεταλλαξογένεσης με το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27 είναι αρκετά καλή αλλά όχι πλήρως αλάνθαστη. Για τον λόγο αυτό είναι πάντα απαραίτητος ο έλεγχος με την μέθοδο του υβριδισμού κατά Southern, των μεταλλαγμένων στελεχών που προκύπτουν από αυτό το σύστημα της μεταλλαξογένεσης.

Κατόπιν, για κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος απομονώθηκε η περιοχή του γονιδιώματος στην οποία είχε εισαχθεί το μεταθετό στοιχείο. Η απομόνωση αυτή έγινε εφικτή μετά από την διαδικασία της πλασμιδιακής απελευθέρωσης κατά την

οποία απομονώθηκαν 9 πλασμίδια απελευθέρωσης (όσα και τα μεταλλαγμένα στελέχη sup⁻). Το μέγεθος του κάθε πλασμιδίου διασταυρώθηκε με το μέγεθος της περιοχής στην οποία υβριδισε ο ανιχνευτής κατά τον υβριδισμό κατά Southern, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το απομονωθέν πλασμίδιο δεν είναι προϊόν ανασυνδυασμού ο οποίος έλαβε χώρα στα βακτηριακά κύτταρα.

Για τα 9 πλασμίδια απελευθέρωσης, ένα από το κάθε στέλεχος sup⁻, πραγματοποιήθηκε η αλληλούχιση της περιοχής αριστερά και δεξιά από τις ακραίες επαναλήψεις του μεταθετού στοιχείου. Χαρακτηριστικό σε κάθε αντίδραση αλληλούχισης είναι το 'διάβασμα' δύο πολύ σημαντικών στοιχείων: α) των 9 βάσεων που διπλασιάζονται κατά την ένθεση του μεταθετού στοιχείου και β) των ακραίων επαναλήψεων του μεταθετού στοιχείου (3.4.1, § Αποτελέσματα). Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα μιας αντίδρασης αλληλούχισης δεν περιλαμβάνει και τα δύο αυτά στοιχεία ενδέχεται να περιέχονται λάθη είτε στην αντίδραση, είτε στη διαδικασία απομόνωσης του εκάστοτε πλασμιδίου απελευθέρωσης, και κατά συνέπεια κάτι τέτοιο θα πρέπει να απορρίπτεται.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των πλασμιδίων απελευθέρωσης αποκάλυψαν ότι η ένθεση του μεταθετού στοιχείου έχει συμβεί σε έξι, συνολικά, διαφορετικά γονίδια. Σύμφωνα με τα μεγέθη των πλασμιδίων απελευθέρωσης και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης της περιοχής αριστερά και δεξιά από την ένθεση, τα μεταλλαγμένα στελέχη διακρίθηκαν σε τέσσερις ομάδες.

Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τρία μεταλλαγμένα στελέχη (R48, k36 και W139) τα οποία εμφανίζουν την ένθεση του μεταθετού στοιχείου σε διαφορετικά σημεία ενός μόνο γονιδίου. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την κινοπρωτεϊνική αφυδρογονάση της γλυκόζης (Gcd). Για τη δεύτερη ομάδα, η οποία αποτελείται από τα μεταλλαγμένα στελέχη ρ26 και A150, εντοπίστηκε ότι η ένθεση του μεταθετού στοιχείου βρίσκεται σε δύο διαφορετικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PqqE και PqqD αντίστοιχα. Στην τρίτη ομάδα κατατάσσονται τα μεταλλαγμένα στελέχη B91 και B163, τα οποία φέρουν την ένθεση σε διαφορετικά σημεία ενός γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PqqF. Τέλος, στην τέταρτη ομάδα κατατάγηκαν τα στελέχη δ40 και ρ93, στα οποία η ένθεση του μεταθετού στοιχείου βρίσκεται σε δύο γειτονικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Cupin2 και μια πρωτεΐνη αγνώστου λειτουργίας αντίστοιχα.

Τα γονίδια στα οποία εντοπίζεται η ένθεση, στα μεταλλαγμένα στελέχη της δεύτερης και της τρίτης ομάδας, κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην

βιοσύνθεση του PQQ. Το γεγονός αυτό δημιούργησε την υποψία ότι πιθανώς τα γονίδια αυτά, τα οποία παρόλο που βρέθηκαν σε διαφορετικά πλασμίδια απελευθέρωσης, να βρίσκονται στην ίδια γονιδιοματική περιοχή στο υπό μελέτη βακτήριο. Μετά από διερεύνηση της συνταινίας (synteny search) των γονιδίων που αλληλουχήθηκαν από τα πλασμίδια απελευθέρωσης στις δύο αυτές ομάδες βρέθηκε ότι όλα τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ βρίσκονται σε μια γονιδιοματική περιοχή με μέγεθος 6kb, και μάλιστα είναι οργανωμένα σε οπερόνιο. Το 'synteny search' πραγματοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* των οποίων το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχηθεί και είναι κατατεθειμένο στις βάσεις δεδομένων (Genome Database).

Στο στέλεχος *Ps. fluorescens* X τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ είναι 6 και βρίσκονται στην ίδια γονιδιοματική περιοχή, όπως και σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Αυτό ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί με την ενίσχυση με PCR ολόκληρης της περιοχής, στην οποία βρίσκονται τα έξι αυτά γονίδια (*sup2*, *sup3*, *sup4*, *orf1*, *orf2* και *orf3*), με εξειδικευμένους εκκινητές. Όπως και σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη του γένους, ενδέχεται στο υπό μελέτη στέλεχος τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ να είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής ήταν δυνατό να εντοπιστεί μοναδική θέση ενός μεταγραφικού υποκινητή ανωφερικά των έξι γονιδίων, ο οποίος πιθανολογείται ότι ελέγχει τη μεταγραφή τους. Η πιθανότητα οργάνωσης των γονιδίων της περιοχής αυτής σε ένα οπερόνιο ενισχύεται από τα πειράματα συμπλήρωσης του φαινοτύπου sup στα στελέχη ρ26, A150, B91 και B163. Η επαναφορά του φαινοτύπου sup επιτυγχάνεται μόνο από μια γονιδιοματική περιοχή με μέγεθος 6.7kb, η οποία περιλαμβάνει τα έξι γονίδια και την περιοχή ανωφερικά από αυτά, στην οποία εντοπίστηκε ο μεταγραφικός υποκινητής. Επαναφορά του φαινοτύπου sup χρησιμοποιώντας μεμονωμένα γονίδια ή συνδυασμούς γονιδίων της περιοχής αυτής δεν ήταν εφικτή.

Από τη διερεύνηση της συνταινίας της περιοχής στην οποία βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την Gcd βρέθηκε ότι τα περισσότερα στελέχη του γένους *Pseudomonas* έχουν δύο διαφορετικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για δύο ενζυμικά συστήματα της αφυδρογονάσης. Όπως προέκυψε, τα δύο αυτά γονίδια βρίσκονται οργανωμένα σε διαφορετικές γονιδιοματικές περιοχές και η ομοιότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν είναι πολύ χαμηλή, περίπου 33-51%. Το γονίδιο της Gcd στο υπό μελέτη στέλεχος (ως προς την γονιδιοματική περιοχή μέσα στην οποία βρίσκεται και ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία) εμφανίζει μεγαλύτερη

ομοιότητά με μόνο ένα από τα δύο γονίδια που εντοπίστηκαν στο γένος *Pseudomonas*.

Η ύπαρξη δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για δύο Gcd, με πολύ χαμηλό ποσοστό ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας τους, αποτελεί πρώτη επιστημονική καταγραφή για το είδος *Ps. fluorescens*. Υπάρχουν δύο, ακόμα, αναφορές στα στελέχη *Ps. putida* ATCC 11172 (Vrionis *et al.*, 2002) και *Ps. butanovora* ATCC 43655 (Vangnai *et al.*, 2002) οι οποίες τονίζουν την ύπαρξη δύο αντιγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί την Gcd μέσα στο γονιδίωμα των βακτηρίων.

Ως γενικός κανόνας για τις περιπτώσεις ύπαρξης δύο αντιγράφων γονιδίων είναι αύξηση των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου. Έτσι, πιθανώς στα στελέχη *Ps. putida* ATCC 11172 και *Ps. butanovora* ATCC 43655, όπου τα δύο αντίγραφα που έχουν βρεθεί έχουν 100% ομοιότητα μεταξύ τους, η ύπαρξη των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν την PQQ-Gcd να έχει σκοπό την αύξηση των επιπέδων έκφρασης (Vangnai *et al.*, 2002). Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, τα δύο αυτά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες έχουν πολύ μικρή ομοιότητα μεταξύ τους (33-51%), γεγονός που ενδέχεται να σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν κάποια διαφορά στη λειτουργία τους.

Οι πρωτεΐνες PQQ-Gcd1 είναι πλήρως χαρακτηρισμένες και έχει αποδειχθεί ότι έχουν την λειτουργία μιας Gcd η οποία χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το PQQ και καταλύει την οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ, καθώς και ότι εμπλέκονται στη βιοσύνθεση ορισμένων αντιβιοτικών (James *et al.*, 1986; de Werra *et al.*, 2009). Το δεύτερο αντίγραφο (PQQ-Gcd2), το οποίο φαίνεται να έχει περίπου την ίδια δομή με το πρώτο (PQQ-Gcd1) όπως προέκυψε από την *in silico* ανάλυση στην παρούσα διατριβή (§3.4.2.), δεν έχει καταγραφεί και δεν έχει μελετηθεί ως σήμερα. Οι πρωτεΐνες PQQ-Gcd2 ενδέχεται να έχουν διαφορετική λειτουργία από αυτή της οξειδωσης της γλυκόζης.

Τόσο τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ, όσο και το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την Gcd έχουν απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα, κατά τα περασμένα χρόνια. Το στέλεχος του βιολογικού παράγοντα *Ps. fluorescens* CHA0 έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης δυο αντιβιοτικών (DAPG και PLT). Όταν το στέλεχος CHA0 αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης, η παραγωγή του DAPG αυξάνεται, ενώ η παραγωγή της PLT μειώνεται (Duffy *et al.*, 1999). Από έρευνες που έγιναν στο στέλεχος, αποδείχθηκε ότι τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των αντιβιοτικών της PLT και του DAPG. Η

πρόκληση μετάλλαξης σε ένα από τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ, μετά από τυχαία μεταλλαξογέννεση, οδήγησε στην την υπερπαραγωγή της PLT και την μείωση της παραγωγής του DAPG, από το μεταλλαγμένο στέλεχος, ακόμα και όταν το στέλεχος επωαζόταν παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το PQQ ρυθμίζει τη βιοσύνθεση των αντιβιοτικών αυτών δεν ήταν δυνατό να εξηγηθεί από τους ερευνητές (Schnider *et al.*, 1995).

Σε πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος CHA0, αποδείχθηκε ότι το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την Gcd εμπλέκεται και αυτό στη βιοσύνθεση των δύο αντιβιοτικών (DAPG και PLT). Η διακοπή της έκφρασης του γονιδίου της Gcd, η οποία επιτεύχθηκε μετά από στοχευμένη μεταλλαξογέννεση, είχε ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή των δύο αντιβιοτικών. Το μεταλλαγμένο στέλεχος του CHA0, το οποίο φέρει τη μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Gcd, δεν εμφανίζει την ικανότητα να οξυνίζει το μέσο ανάπτυξης όταν σε αυτό έχει προστεθεί πηγή γλυκόζης. Η αδυναμία του μεταλλαγμένου στελέχους να οξυνίσει το μέσο ανάπτυξής του αποδόθηκε στην απώλεια της ικανότητας οξειδωσης της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ, αντίδραση που λαμβάνει χώρα στον περιπλασμικό χώρο και καταλύεται από την Gcd (de Werra *et al.*, 2009).

Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το γλυκονικό οξύ και όχι η γλυκόζη αποτελεί το μόριο που παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή των αντιβιοτικών από το στέλεχος αυτό, χωρίς όμως να είναι σε θέση να εξηγήσουν τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο γίνεται αυτό. Ακόμα, από την ίδια ερευνητική ομάδα διατυπώθηκε η άποψη ότι σε περίπτωση διακοπής της βιοσύνθεσης του PQQ από το στέλεχος, παύει να είναι λειτουργικό και το ένζυμο της Gcd, με αποτέλεσμα την αδυναμία οξειδωσης της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ (de Werra *et al.*, 2009).

Στην παρούσα διατριβή, τα μεταλλαγμένα στελέχη της πρώτης, τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Gcd, καθώς και αυτά της δεύτερης και τρίτης ομάδας, τα οποία φέρουν μεταλλάξεις σε τρία από τα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ, παρατηρήθηκε ότι δεν έχουν την ικανότητα να οξυνίζουν το μέσο ανάπτυξης όταν σε αυτό έχει προστεθεί γλυκόζη. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα έως τώρα ευρήματα στο στέλεχος CHA0. Τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Ps. fluorescens* X, εκτός από την απώλεια της ικανότητας να οξυνίζουν το μέσο ανάπτυξης, εμφανίζουν την ικανότητα να αυξάνουν τις τιμές του pH από 6 σε 7,2, γεγονός που αποτελεί πρώτη επιστημονική καταγραφή.

Στα μεταλλαγμένα στελέχη του CHA0 η διακοπή της έκφρασης του γονιδίου *Gcd* ή των γονιδίων βιοσύνθεσης PQQ έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή αντιβιοτικών και κατά συνέπεια την ενίσχυση του φαινοτύπου της βιολογικής καταπολέμησης. Αντιθέτως, στα μεταλλαγμένα στελέχη του *Ps. fluorescens* X η διακοπή της έκφρασης του γονιδίου *Gcd* ή των γονιδίων βιοσύνθεσης PQQ δεν έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του φαινοτύπου της βιολογικής καταπολέμησης, αλλά την απώλειά του (*sup*⁻). Το γεγονός αυτό καταγράφεται για πρώτη φορά για το γένος *Pseudomonas*.

Ο ρόλος της *Gcd* είναι η οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό, ενώ το PQQ αποτελεί το συνένζυμο της (de Werra *et al.*, 2009). Συνεπώς, η μείωση του pH του μέσου ανάπτυξης στον άγριο τύπο προκαλείται από την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό. Στα μεταλλαγμένα στελέχη, η ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα γονίδια *sup1*, *sup2*, *sup3* και *sup4* έχει ως τελικό αποτέλεσμα την διακοπή της οξείδωσης της γλυκόζης σε γλυκονικό, γεγονός που εξηγεί την παρατηρούμενη απώλεια της ικανότητας οξύνισης του μέσου ανάπτυξης, όταν σε αυτό υπάρχει πηγή γλυκόζης.

Αντίθετα με το αναμενόμενο, δηλαδή την απώλεια της ικανότητας μεταβολής του pH του μέσου ανάπτυξης, τα μεταλλαγμένα στελέχη έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το pH του μέσου ανάπτυξης κατά ένα βαθμό. Το μόριο το οποίο απουσιάζει από τα μεταλλαγμένα στελέχη είναι το γλυκονικό, το οποίο ενδέχεται να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση μιας αντιμικροβιακής ένωσης με όξινες ιδιότητες, η οποία δεν βιοσυντίθεται μιας και απουσιάζει το γλυκονικό. Έτσι, η παρατηρούμενη αύξηση του pH ενδέχεται να προκαλείται από να ένα ενδιάμεσο προϊόν με βασικές ιδιότητες, το οποίο συσσωρεύεται.

Η μελέτη των γονιδίων καταστολής από την τέταρτη ομάδα μεταλλαγμένων στελεχών, αλλά η περιοχή γύρω από τα γονίδια αυτά, αποτελεί πρώτη καταγραφή σε βακτηριακούς ανταγωνιστές φυτοπαθογόνων μυκήτων. Σε καμία επιστημονική μελέτη, τα γονίδια αυτά δεν έχουν συσχετιστεί με τη βιοσύνθεση κάποιας ένωσης με αντιμικροβιακές ιδιότητες καθώς ούτε και με την ανάπτυξη χαρακτηριστικών σε κάποιο βακτήριο τα οποία να το καθιστούν βιολογικό παράγοντα καταπολέμησης. Το γονίδιο *sup5*, το οποίο φέρει την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στο στέλεχος ρ93, καθώς και γονιδιωματική περιοχή γύρω από αυτό έχει σχετικά μεγάλη ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή από το στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158, η οποία ευθύνεται για τη βιοσύνθεση μιας τοξίνης.

Η τοξίνη αυτή, η οποία ονομάστηκε μανγκοτοξίνη εξαιτίας της ικανότητας που προσδίδει στο στέλεχος UMAF0158 να προσβάλει τα φυτά μάνγκο (*Mangifera indica* L.), προσδίδει στο βακτήριο φυτοπαθολόνες ιδιότητες και όχι ιδιότητες βιολογικού παράγοντα καταπολέμησης. Η μανγκοτοξίνη βιοσυντίθεται από ένα οπερόνιο, το οποίο αποτελείται από τέσσερα γονίδια, ενώ στην γονιδιωματική περιοχή ανωφερικά του οπερονίου υπάρχει ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GntR. Ένα από τα γονίδια του οπερονίου κωδικοποιεί μια NRPS, η οποία αποτελείται από μια μόνο ενότητα (module) με τέσσερις λειτουργικές περιοχές (αδενυλίωσης-A, συμπύκνωσης-C, θειοεστεροποίησης-T, ρεδοκτάσης-R) (Arrebola *et al.*, 2003; 2007).

Το γονίδιο *orf8*, στο βακτήριο *Ps. fluorescens* X, κωδικοποιεί μια NRPS και βρίσκεται κατωφερικά των γονιδίων τα οποία φέρουν την ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα στελέχη ρ93 και δ40 (*sup5* και *sup6*, αντίστοιχα). Η NRPS αυτή έχει 55% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με αυτή από το στέλεχος UMAF0158 και αποτελείται από μια μοναδική ενότητα (module), όπως και αυτή από το στέλεχος UMAF0158. Η ενότητα αυτή βρέθηκε, βάσει των συντηρημένων μοτίφ που έχουν δημοσιευθεί (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003), ότι αποτελείται από τις εξής λειτουργικές περιοχές: την A περιοχή, η οποία περιέχει 10 περιοχές-πυρήνες (A1-A10 cores), τη T περιοχή, τη C περιοχή αποτελούμενη από μια περιοχή-πυρήνα (C6 core) και τέλος τη R περιοχή η οποία εμφανίζει πέντε περιοχές-πυρήνες (R1, R2, R4, R5, R6 cores) (**Εικόνα Π28**, § Παράρτημα).

Πιθανολογείται ότι ο ρόλος της NRPS (MgoA) που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μανγκοτοξίνης είναι η κατάλυση της προσθήκης ενός μόνο αμινοξέος (όπως Ile, Leu, Val, Abu ή Iva) στην πεπτιδική αλυσίδα ενός ολιγοπεπτιδίου (Arrebola *et al.*, 2003; 2007). Εξαιτίας της ομοιότητας της Orf8 με την MgoA (**Εικόνα Π29**, § Παράρτημα) είναι δυνατό να υποθέσουμε ότι και η Orf8 εμπλέκεται σε μια ανάλογη αντίδραση προσθήκης ενός αμινοξέος στην αλυσίδα ενός ολιγοπεπτιδίου. Κατά την υποθετική αυτή αντίδραση, οι λειτουργικές περιοχές της Orf8 είναι δυνατό να καταλύουν αντιδράσεις με την ακόλουθη σειρά:

- ενεργοποίηση του αμινοξέως η οποία ενδέχεται να επιτελείται από την περιοχή αδενυλίωσης,
- πρόσδεση του ενζύμου στο ενεργοποιημένο αμινοξύ με ένα θειοεστερικό δεσμό με τη βοήθεια της περιοχής θειοεστεροποίησης,

- στη συνέχεια δημιουργία πεπτιδικών δεσμών και σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας από την περιοχή συμπύκνωσης και
- τέλος αναγωγή του θειοεστερικού δεσμού, παρουσία NADPH, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πεπτιδικής αλυσίδας και τη δημιουργία στο άκρο της μιας αλδεϋδομάδας ή μιας αλκοόλης. Η αντίδραση αυτή είναι δυνατό να καταλύεται από την περιοχή της ρεδοκτάσης, όπως συμβαίνει σε NRPS από μύκητες (Bushley *et al.*, 2010).

Το μέγεθος της υπό εξέταση NRPS είναι 1158 αμινοξέα, γεγονός που την καθιστά από τις μικρότερες NRPS που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί. Στο γένος *Pseudomonas* έχει βρεθεί ότι μεγάλες NRPS είναι υπεύθυνες για την βιοσύνθεση CLPs με αντιμικροβιακή δράση, όπως οι βισκοσίνες, αμφισίνες και πουτισολβίνες. Εκτός από τη βιοσύνθεση CLPs, σε άλλα γένη βακτηρίων αλλά και μυκήτων, εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αντιβιοτικών, όπως γκραμυσιδίνη, πενικιλίνη, κυκλοσπορίνη, εργοταμίνη και βανκομυκίνη (Doekel *et al.*, 2001).

Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό η NRPS στο στέλεχος *Ps. fluorescens* X να έχει ένα παρόμοιο ρόλο με τις αντίστοιχες που έχουν βρεθεί στο γένος *Pseudomonas*, οδηγώντας στη βιοσύνθεση ενός ολιγοπεπτιδίου ή ενός λιποπεπτιδίου με αντιμικροβιακή δράση. Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιο είναι το τελικό προϊόν βιοσύνθεσης της NRPS, που κωδικοποιείται από το *orf8*, απαιτούνται περαιτέρω πειραματικά δεδομένα από χρωματογραφίες μάζας υψηλής ανάλυσης, υψηλής απόδοσης και φασματομετρίας πυρηνικού-μαγνητικού συντονισμού.

Σε όλες τις κατηγορίες CLPs, τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις NRPS που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση βρίσκονται στην ίδια γονιδιοματική περιοχή (Bruijn *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2009; Dubern *et al.*, 2008). Κάτι τέτοιο δε φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση του *Ps. fluorescens* X μιας και από τη σύγκριση της γονιδιοματικής περιοχής του υποθετικού οπερονίου *supX* στα διάφορα στελέχη του γένους *Pseudomonas* (synteny search) δεν βρέθηκαν και άλλα γονίδια τα οποία να κωδικοποιούν κάποια NRPS. Παρόλο που η έρευνα επεκτάθηκε 30kb ανωφερικά και κατωφερικά του υποθετικού οπερονίου *supX* ήταν αδύνατο να βρεθεί ένα γονίδιο το οποίο θα μπορούσε να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ενός μεταβολίτη που δεν έχει χαρακτηριστεί. Με τα δεδομένα αυτά, η βιοσύνθεση του αντιμικροβιακού μεταβολίτη είναι πολύ πιθανό να επιτελείται μόνο από τα γονίδια του *supX*.

Στο στέλεχος UMAF0158 έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της μαγγκοτοξίνης είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο (Arrebola *et al.*, 2003; 2007). Το γεγονός αυτό δημιούργησε το ερώτημα αν τα αντίστοιχα γονίδια στο στέλεχος *Ps. fluorescens X* είναι και αυτά οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής ήταν δυνατό να εντοπιστεί μοναδική θέση ενός μεταγραφικού υποκινητή ανωφερικά του γονιδίου *sup5*, ο οποίος πιθανολογείται ότι ελέγχει τη μεταγραφή όλων των γονιδίων. Κάτι τέτοιο συνεπάγεται ότι τα γονίδια της περιοχής αυτής πιθανώς μεταγράφονται σαν ένα οπερόνιο, το οποίο ονομάστηκε *supX*.

Την υπόθεση ότι τα γονίδια της περιοχής αυτής είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο ενισχύει ακόμα ένα πειραματικό δεδομένο. Η συμπλήρωση του φαινοτύπου *sup* στα στελέχη δ40 και ρ93 επιτυγχάνεται μόνο από μια γονιδιωματική περιοχή με μέγεθος 6.7kb. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει τα πέντε γονίδια (*sup5*, *sup6*, *orf7*, *orf8* και *orf9*) και την περιοχή ανωφερικά από αυτά, στην οποία εντοπίστηκε ο μεταγραφικός υποκινητής. Προσπάθειες επαναφοράς του φαινοτύπου *sup* χρησιμοποιώντας μεμονωμένα γονίδια ή συνδυασμούς γονιδίων της περιοχής αυτής δεν ήταν επιτυχείς.

Όλα τα γονίδια του υποθετικού (putative) οπερονίου *supX* έχουν σχετικά υψηλά ποσοστά ομοιότητας με τα αντίστοιχα γονίδια στο στέλεχος UMAF0158 με μόνη διαφορά ότι στο υπό εξέταση βακτήριο υπάρχει ένα ακόμα γονίδιο. Το γονίδιο αυτό είναι το *sup6* το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των cupin πρωτεϊνών. Από τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, στα οποία έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γονιδιώματός τους, μόνο το στέλεχος *Ps. aeruginosa* PA7 έχει ένα αντίστοιχο γονίδιο με locus tag PSPA7_2111. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμφανίζει σχετικά χαμηλά ποσοστά ομοιότητας (58%) με την Sup6.

Στην οικογένεια των cupin πρωτεϊνών κατατάσσονται ένζυμα τα οποία έχουν το μοτίφ α-έλικα—στροφή—α-έλικα και παρουσιάζουν μεγάλη λειτουργική ποικιλομορφία. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, στην οικογένεια των cupin πρωτεϊνών ανήκουν ένζυμα όπως ισομεράσες, επιμεράσες, συνθάσες, σφελουρίνες, διοξυγενάσες αλλά και μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AraC (Dunwell *et al.*, 2004).

Η εμπλοκή του γονιδίου *sup6* στην εμφάνιση των ιδιοτήτων βιολογικής καταπολέμησης σε ένα βακτηριακό ανταγωνιστή αποτελεί πρώτη καταγραφή. Το

γονίδιο αυτό δεν έχει μελετηθεί ξανά και φαίνεται ότι ανοίγει νέο πεδίο έρευνας. Ο τρόπος με τον οποίο είναι δυνατό να συνεισφέρει στην βιολογική καταπολέμηση η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό είναι πολύ ενδιαφέρον, μιας και η πρωτεΐνη αυτή προέρχεται από μια οικογένεια με μεγάλη λειτουργική ποικιλομορφία. Στο μελετώμενο στέλεχος, ίσως μια τέτοια πρωτεΐνη να αποτελεί το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την τελική, τοξική δομή ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου.

Από την σύγκριση της γονιδιωματικής περιοχής γύρω από το υποθετικό οπερόνιο *supX*, σε όλα τα στελέχη τα οποία διαθέτουν το εν λόγω οπερόνιο, εντοπίστηκε ανωφερικά ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GntR. Για τα στελέχη *Ps. aeruginosa* PA7 και *Ps. fluorescens* X παρατηρείται απουσία ενός τέτοιου γονιδίου από την περιοχή. Στην γονιδιωματική περιοχή ανωφερικά του μεταγραφικού υποκινητή του *supX* εντοπίστηκε θέση η οποία αναγνωρίζεται από ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GntR. Πιο συγκεκριμένα, η θέση αυτή αναγνωρίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην υποοικογένεια FadR.

Στην υποοικογένεια FadR κατατάσσονται μεταγραφικοί καταστολείς για τους οποίους το μόριο απενεργοποιητής είναι το γλυκονικό οξύ και συνήθως ο τρόπος της μεταγραφικής ρύθμισης είναι παρόμοιος του γονιδίου *lacI* (Gorelic *et al.*, 2006). Απουσία γλυκονικού ο παράγοντας GntR είναι ενεργός και δεσμεύεται με την περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή των γονιδίων καταστέλλοντας έτσι την έκφρασή τους, ενώ παρουσία γλυκονικού ο παράγοντας αυτός απενεργοποιείται, με συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης (Tong *et al.*, 1996).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας GntR έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων τα οποία επιτελούν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών (καταβολισμό σακχάρων και λιπαρών οξέων, βιοσύνθεση αμινοξέων και βιταμινών, αντιγραφή πλασμιδίων, γονίδια *lux*) (Rigalli *et al.*, 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι, σε διάφορα στελέχη βιολογικών παραγόντων, τέτοιοι παράγοντες εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αντιβιοτικών, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων που τα βιοσυνθέτουν (Gorelic *et al.*, 2006).

Στο βακτήριο *Streptomyces coelicolor* ο μεταγραφικός παράγοντας *agl3R*, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των GntR, καταστέλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων βιοσύνθεσης αντιβιοτικών και του εκκριτικού συστήματος ABC. Όταν το βακτήριο αυτό αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης ο μεταγραφικός παράγοντας *agl3R* απενεργοποιείται με αποτέλεσμα την επαγωγή της

έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων (Hillerich *et al.*, 2006). Ακόμα μια μελέτη στο στέλεχος *Streptomyces coelicolor* M145 έχει αποδείξει ότι ο παράγοντας DasR, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των GntR, ελέγχει την παραγωγή του αντιβιοτικού ακτινοροντίνη (actinorhodin), καταστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης του αντιβιοτικού απουσία N-ακέτυλογλυκοζαμίνης στο μέσο ανάπτυξης (Rigalli *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, στο υπό εξέταση στέλεχος η μεταγραφή του υποθετικού οπερονίου *supX* είναι δυνατόν να ρυθμίζεται από κάποιο μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GntR, η ενεργότητα του οποίου επηρεάζεται από την παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Προκειμένου να ελεγχθεί αν κάτι τέτοιο ισχύει, μελετήθηκε η έκφραση ορισμένων γονιδίων του υποθετικού οπερονίου στον άγριο τύπο καθώς και σε δύο επιλεγμένα μεταλλαγμένα στελέχη.

Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η πιο ευαίσθητη μοριακή τεχνική, αυτή του ποσοτικού Real Time PCR. Η μελέτη της έκφρασης εστιάστηκε στην εκθετική φάση και στη φάση στασιμότητας, καθώς και σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα (PDB και LB). Στο θρεπτικό PDB, το οποίο περιέχει προθήκη γλυκόζης, παρατηρείται ο φαινότυπος *sup* στον άγριο τύπο του βακτηρίου ενώ στο LB, το οποίο δεν περιέχει προθήκη γλυκόζης, δεν παρατηρείται ο φαινότυπος *sup*.

Από τα πέντε γονίδια του οπερονίου *SupX*, στη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τα *sup5* και *sup6* στα οποία έχει εντοπιστεί η ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα μεταλλαγμένα στελέχη της τέταρτης ομάδας, και το γονίδιο *orf8*, το οποίο κωδικοποιεί μια NRPS. Στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του οπερονίου *SupX* επιλέχθηκαν τα στελέχη k36 και ρ26, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις τρεις πρώτες ομάδες των μεταλλαγμένων στελεχών και επομένως δε φέρουν μεταλλάξεις σε κανένα από τα γονίδια του οπερονίου *SupX*. Η έκφραση των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* συγκρίθηκε μεταξύ των στελεχών αυτών και του αγρίου τύπου του βακτηρίου και η σχετική έκφραση διορθώθηκε με βάση την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Τα γονίδια αναφοράς (housekeeping) τα οποία δοκιμάστηκαν ήταν τα γονίδια *rpoD* (de Bruijn *et al.*, 2007; 2009) και *rpoB* (Mavrodi *et al.*, 2010). Τελικά, από τα δύο αυτά γονίδια επιλέχθηκε το γονίδιο *rpoD*, το οποίο έχει πιο σταθερή αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα έκφραση και έχει χρησιμοποιηθεί στην μελέτη της έκφρασης γονιδίων βιοσύνθεσης κυκλικών λιποπεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα το γονίδιο *rpoD* έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *massA* και *massB*, τα οποία εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των

μασσετολιδών, και των γονιδίων *viscA*, *viscB* και *viscC*, τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βισκοσιναμίδης (de Bruijn *et al.*, 2009).

Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, ήταν δυνατό να παρατηρηθεί ότι η μεταγραφή των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* στο *Ps. fluorescens X* παραμένει στα ίδια επίπεδα στα δύο θρεπτικά μέσα (LB και PDB). Αντίθετα, κατά την φάση στασιμότητας, τα επίπεδα μεταγραφής των τριών αυτών γονιδίων ήταν αυξημένα από δέκα έως και εκατό φορές στο θρεπτικό PDB από ότι στο θρεπτικό LB. Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *sup5*, *sup6* και *orf8* στον άγριο τύπο βακτηρίου συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο διαφορετικών αναπτυξιακών φάσεων και μεταξύ των δύο διαφορετικών θρεπτικών μέσων. Από τη σύγκριση αυτή, παρατηρήθηκε ότι το μεταγραφικό επίπεδο των υπό μελέτη γονιδίων, κατά την φάση στασιμότητας στο θρεπτικό μέσο PDB είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από οποιοδήποτε άλλη αναπτυξιακή φάση, σε οποιοδήποτε θρεπτικό. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής συμβαδίζουν με την παρατήρηση ότι ο φαινότυπος *sup* είναι εμφανής σε τρυβλία με το θρεπτικό PDB μετά από επώαση δύο ημερών, κατά την οποία το βακτήριο έχει υπεισέλθει στην φάση στασιμότητας.

Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης κατά την φάση στασιμότητας ενδέχεται να υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στον δευτερογενή μεταβολισμό του βακτηρίου. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες των μικροοργανισμών, εντάσσονται οργανικές ενώσεις οι οποίες δεν εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών όπως CLPs με αντιμικροβιακές αλλά και φυτοπαθογόνες ιδιότητες, αντιβιοτικά, φθορίζουσες χρωστικές, υδροκυάνειο, ινδολοξεϊκό οξύ (IAA) και σιδηροφόρα (Gross *et al.*, 2009)

Όταν τα επίπεδα μεταγραφής των τριών γονιδίων συγκρίθηκαν μεταξύ του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών k36 και p26, διαπιστώθηκε ότι είναι αρκετά μειωμένα (περίπου 100 με 200 φορές) τόσο κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο LB, όσο και κατά την καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο PDB. Η μείωση στην έκφραση των γονιδίων του υποθετικού οπερονίου *supX* παρατηρείται ανεξαρτήτως αναπτυξιακής φάσης. Όπως φαίνεται, η ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα γονίδια που κωδικοποιούν τις Gcd και PqqE (στα στελέχη k36 και p26) έχει ως αποτέλεσμα την παύση της μεταγραφής των γονιδίων του οπερονίου *supX*.

Ο ρόλος της Gcd είναι η οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό, ενώ το PQQ αποτελεί το συνένζυμο της Gcd (de Werra *et al.*, 2009). Συνεπώς, με την ένθεση του

μεταθετού στοιχείου στα γονίδια που κωδικοποιούν τις Gcd και PqqE, το μόριο το οποίο απουσιάζει από τη φυσιολογία του βακτηρίου είναι το γλυκονικό. Επαγωγικά, υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα ο μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας GntR, οποίος έχει θέση αναγνώρισης ανωφερικά του υποθετικού οπερονίου *supX*, να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του γλυκονικού οξέος στο υπόστρωμα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας GntR στο στέλεχος *Ps. fluorescens* X είναι δυνατόν είτε να είναι καταστολέας της μεταγραφής του οπερονίου και το γλυκονικό να αποτελεί απενεργοποιητή του παράγοντα, είτε να είναι επαγωγέας της μεταγραφής του *supX* και του γλυκονικό να παίζει ρόλο ενεργοποιητή του μεταγραφικού παράγοντα. Επειδή, η οικογένεια GntR και πιο συγκεκριμένα η υποοικογένεια FadR αποτελείται από μεταγραφικούς καταστολείς, οι οποίοι έχουν ως μόριο απενεργοποιητή το γλυκονικό (Tong *et al.*, 1996), διατυπώθηκε η υπόθεση ότι κάτι ανάλογο ισχύει και στο υπό μελέτη στέλεχος.

Προκειμένου η υπόθεση αυτή να αποδειχθεί από αδιάσειστα πειραματικά δεδομένα είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα. Για τον σκοπό αυτό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η μοριακή τεχνική της χαρτογράφησης με την S1 νουκλεάση (High-resolution S1 nuclease mapping) και στη συνέχεια η τεχνική της EMSA (Electrophoretic mobility gel shift assays). Με την τεχνική της χαρτογράφησης με την S1 νουκλεάση είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια η θέση του μεταγραφικού υποκινητή του *supX* και να αποδειχθεί ότι η μεταγραφή και των πέντε γονιδίων του οπερονίου γίνεται από ένα μόνο μεταγραφικό υποκινητή. Ακολούθως η τεχνική EMSA, είναι ικανή να προσδιορίσει αν υπάρχει θέση πρόσδεσής του μεταγραφικού παράγοντα εντός της περιοχής του μεταγραφικού υποκινητή. Κατά την τεχνική αυτή, δημιουργείται ένα μίγμα που αποτελείται από την περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή, η οποία θα σημειωθεί ραδιενεργά με ^{32}P , και τον μεταγραφικό παράγοντα GntR σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ο οποίος θα σημειωθεί με ιστιδίνες (His tag) για να είναι δυνατός ο καθαρισμός του μετά από την έκφρασή του σε *E. coli*.

Ακόμη ένα τρόπος για να διαπιστωθεί αν κάποιος μεταγραφικός παράγοντας ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων του υποθετικού οπερονίου είναι να δημιουργηθεί μια σύντηξη (fusion) από την περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή του οπερονίου *supX* και το γονίδιο *lacZ*. Ακολούθως, η κατασκευή αυτή θα πρέπει να κλωνοποιηθεί σε ένα φορέα ευρέως φάσματος και θα τοποθετηθεί σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, στο οποίο το γονίδιο του GntR παράγοντα δεν εκφράζεται, και στον άγριο τύπο. Στην

περίπτωση που ο παράγοντας έχει θέση πρόσδεσης μέσα στην περιοχή του μεταγραφικού υποκινητή του *supX*, θα πρέπει να παρατηρηθεί αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος (όταν σε αυτό έχει προστεθεί X-Gal).

Ένας έλεγχος που θα ήταν πολύ χρήσιμο να γίνει, είναι αυτός των μεταγραφημάτων των υποθετικών οπερονίων *supX* και βιοσύνθεσης του PQQ. Με τη βοήθεια εκκινητών, οι οποίοι θα έχουν την ικανότητα να ενισχύσουν μετά από PCR την περιοχή μεταξύ του κάθε γονιδίου στα υποθετικά οπερόνια *supX* και βιοσύνθεσης του PQQ, πρέπει να ελεγχθεί αν τα γονίδια των υποθετικών οπερονίων όντως μεταγράφονται ως ένα mRNA. Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής είναι απαραίτητα προκειμένου να αποδειχθεί με απόλυτη βεβαιότητα η ύπαρξη των υποθετικών αυτών οπερονίων.

Συμπληρωματικά, θα μπορούσε να οργανωθεί μια συνεργασία με την ερευνητική ομάδα (Arrebola *et al.*, 2007), η οποία μελετά την παραγωγή της μανγκοτοξίνης στο στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Το, υπό μελέτη, στέλεχος θα μπορούσε να δοκιμαστεί για τη μολυσματικότητά του σε φυτά τομάτας και μάνγκο. Επίσης, τμήματα της γονιδιωματικής περιοχής του στελέχους UMAF0158, τα οποία είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση της μανγκοτοξίνης, θα μπορούσε να εισαχθούν σε *sup⁻* στελέχη του *Ps. fluorescens* X και να ελεγχθεί αν και κατά πόσο επαναφέρουν τον άγριο φαινότυπο. Κάτι αντίστοιχο, θα μπορούσε να ελεγχθεί με τη γονιδιωματική περιοχή του *supX* και το στέλεχος UMAF0158.

Τέλος, είναι απαραίτητο να γίνει η μελέτη της έκφρασης όλων των γονιδίων στα οποία βρέθηκε η ένθεση του μεταθετού στοιχείου. Η μελέτη αυτή πρέπει να συμπεριλαμβάνει όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη καθώς και τον άγριο τύπο, προκειμένου να ολοκληρωθεί η εικόνα του μεταγραφικού προφίλ των γονιδίων.

Η παρούσα διατριβή είναι σε θέση να εξηγήσει, σε ικανοποιητικό βαθμό, τον ρόλο των γονιδίων που βρέθηκαν, αλλά και τον ρόλο της γλυκόζης στην ανάπτυξη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που καθιστούν το *Ps. fluorescens* X ικανό βιολογικό παράγοντα καταπολέμησης. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης καθώς και ο προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης είναι δυνατό να αποτελέσουν πρότυπα για το γένος *Pseudomonas*. Έτσι, προγενέστερες μελέτες (Gutterson *et al.*, 1986; Shanahan *et al.*, 1992), οι οποίες έχουν αναδείξει την σπουδαιότητα του ρόλου της γλυκόζης στη βιοσύνθεση αντιβιοτικών, όπως DAPG και ωμοκίνη A, προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Gill, S.R. J. (2008) Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 190, 8053-8064
- Agrios, G.N. (1996) *Plant pathology*, 4th edn San Diego, CA, USA: Academic Press
- Anand, S., Prasad, M.V., Yadav, G., Kumar, N., Shehara, J., Ansari, M.Z., Mohanty, D. (2010) SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. *Nucl. Acids Res.* 38, W487-496
- Andreeva, A., Howorth, D., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., Hubbard, T.J.P., Chothia, C., Murzin, A.G. (2008). Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucl. Acids Res.* 36, D419-D425
- Anjaiah, V. (2004) *Disease Management of Fruits and Vegetables (Vol. 1: Fruit and Vegetable Diseases - chapter 12: Biological control mechanisms of fluorescent *Pseudomonas* species involved in control of root diseases of vegetables/fruits)* (editor Mukerji K.G.), 453-500, Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Anthony, C. (1996) Quinoprotein-catalysed reactions. *Biochem. J.* 320, 697-711
- Arrebola, E., Cazorla, F.M., Durán, V.E., Rivera, E., Romero, Olea, F., Codina, J.C, D., Pérez-García, A., de Vicente, A. (2003) Mangotoxin: a novel antimetabolite toxin produced by *Pseudomonas syringae* inhibiting ornithine/arginine biosynthesis. *Physiol. and Mol. Plant Path.* 63, 117-127
- Arrebola, E., Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., de Vicente, A. (2007) A nonribosomal peptide synthetase gene (*mgoA*) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is involved in mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 20, 500–509
- Banger, M.G. Thomashow, L.S. (1999) Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J. Bacteriol.* 181, 3155–3163
- Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond G.P.C., Stewart G.S.A.B., Williams P. (1992) N-(3-Oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* 288, 997-1004
- Barta, T. M., Kinscherf, T. G., and Willis, D. K. (1992) Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 174, 3021-3029
- Berg, DE., Berg, C.M. (1983) The prokaryotic transposable element Tn5. *Biotechnology* 1,417–435

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edn. Baltimore, Williams&Wilking (1957)
- Blummer, C., Haas, D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173,170–177
- Braun, P.G., Hildebrand, P.D., Ells, T.C., Kobayashi, D.Y. (2001) Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* 47, 294–301
- Brodhagen, M., Henkels, M.D., Loper, J.E. (2004) Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1758–1766
- Brodhagen, M., Paulsen, I., Loper, J.E. (2005) Reciprocal regulation of pyoluteorin production with membrane transporter gene expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6900–6909
- Bottiglieri, M., Keel, C. (2006) Characterization of PhIG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4-Diacetylphloroglucinol in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 418–427
- Boulnois, G.J., Varley, J.M., Sharpe, G.S., Franklin, F.C. (1985) Transposon donor plasmids, based on *Collb-P9*, for use in *Pseudomonas putida* and a variety of other gram negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 65-67
- Bushley, K.E., Turgeon, B.G. (2010) Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evol Biol.* 26,10-26.
- Cangelosi, G.A., Best, E.A., Martinetti, G., Nester, E.W. (1991) Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth. Enzymol.* 204, 384-397
- Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4989–4993
- Chain, P.S.G., Deneff, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agullo, L., Reyes, V.L., Hauser, L., Cordova, M., Gomez, L., Gonzalez, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker T., Sul, W.J., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M. (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15280-15287

- Chancey, S.T., Wood, D.W., and Pierson, L.S., III. (1999) Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2294-2299
- Choi, O., Kim, J., Kim, J.-G., Jeong, Y., Moon, J.S., Park, C.S., Hwang, I. (2008) Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiol.* 146, 657–668
- Clarkson, J.P, Mead, A., Payne, T., Whipps, J. M (2004) Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathol.* 53, 353–362
- Clenton-Jansen, A.M., Goosen, N., Wenzel, T.J. van de Putte, P. (1988) Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. *J. Bacteriol.* 170, 2121-2125
- Cody, W.L., Wilson, J.W., Hendrixson, D.R., McIver, K.S., Kayla E., Hagman, Ott, C.M. Nickerson, C.A., Schurr, M. J. (2008) Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *J. Microbiol. Methods.* 75, 135-138
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972) Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114
- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., Vinas, I. (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 89, 793-800
- Costa, R., van Aarle, I.M., Mendes, R., van Elsas, J.D. (2009) Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within gram-negative bacteria. *Environ. Microbiol.* 11, 159-75
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881-10890
- Cui, X., Harling, R., Mutch, P., Darling, D. (2005) Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 297-308
- Czajkowski, R., Jafra, S. (2009) Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Bioch. Polon.* 56, 1-16
- D'aes, J., Hua, G.K.H., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L., Mavrodi, D.V., Höfte, M. (2011) Biological control of *Rhizoctonia*

root rot on bean by phenazine and cyclic lipopeptide producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathol.* 101, 996-1004

- Debode, J., De Maeyer, K., Perneel, M., Pannecoucq, J., De Backer, G., Hofte, M. (2006) Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1184–1196
- Delany, I., Sheehan, M.M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S., O’Gara, F. (2000) Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiol.* 146, 537–546
- de Bruijn, I., M., de Kock, J. D., de Waard, P., van Beek, T. A., Raaijmakers, J. M. (2007) Massetolide a biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 190, 2777–2789
- de Bruijn, I., Raaijmakers, J. M. (2009) Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. *J. Bacteriol.* 190, 1910–1923
- de Bruijn, I., Raaijmakers, J. M. (2009) Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4753–4761
- De Laurentis, W., Khim, L., Anderson, J.L.R., Adam, A., Phillips, R.S., Chapman, S.K., van Pee, K.H., Naismith J.H. (2007) The second enzyme in pyrrolnitrin biosynthetic pathway is related to the heme-dependent dioxygenase superfamily. *Biochem.* 46, 12393–12404
- De Maayer, P., Chan, W.Y., Venter, S.N., Toth, I.K., Birch, P.R., Joubert, F., Coutinho, T.A. (2010) Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. *J. Bacteriol.* 192, 2936-2937
- de Werra, P., Pechy-Tarr, M., Keel, C., Maurhofer, M. (2009) Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4162–4174
- Dewick, P. M. (2002) Medicinal natural products: A biosynthetic approach (Chapter 4: The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids), Second edition, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Mindrinos, J., Tompkins, R.G., Rahme, L.G. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 1339–1344.
- Doekel, S., Marahiel, M.A. (2001) Biosynthesis of natural products on modular peptide synthetases. *Metab. Eng.* 3, 64-77

- Donadio, S., Monciardini, P., Sosio, M. (2007) Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1073–1109
- Dubern, J.F., Lagendijk, E.L., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2005) The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J. Bacteriol.* 187, 5967-5976.
- Dubern, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2006) Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 169-75.
- Dubern, J.F., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2006) The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J. Bacteriol.* 188, 2898–2906
- Dubern, J.F., Coppoolse, E.R., Stiekema, W.J., Bloemberg, G.V. (2008) Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiol.* 154, 2070–2083
- Duffy, B.K., Defago G. (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2429–2438
- Duffy, B.K., Defago G. (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3142–3150
- Dunwell J.M., Purvis, A., Khuri, S. (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochem.* 65, 7-17
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G.M., Blattner, F.R. (2008) The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *J. Bacteriol.* 190, 2597-2606
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komarony, M., Wall, R. (1984) Amino acid scale: Normalized consensus hydrophobicity scale. *J. Mol. Biol.* 179, 125-142
- El-Banna, N.M. (2006) Effect of carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium xerosis*. *Afr. J. Biotech.* 5 (10), 833-835
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer F., Dibartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.,

Lindow, S.E. (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 11064-11069

- Felder, M., Gupta, A., Verma, V., Kumar, A., Qazi, G.N., Cullum, J. (2000) The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*. FEMS Microb. Lett. 193, 231-236
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791
- Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y. (2005) PGPR: Biocontrol and biofertilization, biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases, 67–109 (Chapter 3), Netherlands: Springer
- Fineran, P.C., Everson, L., Slater, H., George P. C. Salmond, G.P.C. (2005) A GntR family transcriptional regulator (PigT) controls gluconate-mediated repression and defines a new, independent pathway for regulation of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*. Microbiol. 151, 3833–3845
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe R.S., Balch, W.E, Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., Woese, C.R. (1980) The phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457-463
- Fravel, D. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 43, 337-359
- Georgakopoulos, D., Hendson, M., Panopoulos, N.J., Schroth, M.N. (1994) Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2931–2938
- Girard, G., Barends, S., Rigali, S., van Rij, E.T., Lugtenberg, B.J.J, Bloemberg, G.V. (2006) Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. J. Bacteriol. 188, 8283–8293
- Gliese, N., Khodaverdi, V., Gorisch, H. (2010) The PQQ biosynthetic operons and their transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Microbiol. 192, 1–14
- Gorelic, M., Lunin, V.V., Skarina, T., Savcheinko, A. (2006) Structural characterization of GntR/HutC family signaling domain. Protein Science 15, 1506–1511
- Gross, H., Loper, E.L (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Nat. Prod. Rep. 26, 1408–1446

- Guo, Y. B., Li, J., Li, L., Chen, F., Wu, W., Wang, J., Wang, H. (2009) Mutations that disrupt either the *pqq* or the *gdh* Gene of *Rahnella aquatilis* abolish the production of an antibacterial substance and result in reduced biological control of grapevine crown gall. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6792–6803
- Gutterson, N.I., Layton, T.J., Ziegler, J.S., Warren, G.J. (1986) Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. *J. Bacteriol.* 165, 696-703
- Gutterson, N.I., Ziegler, J.S., Warren, G.J., Layton, T.J. (1988) Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Hv37a. *J. Bacteriol.* 170, 380-385
- Haas, D., Heeb, S. (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 14, 1351–1363
- Haggag, W.M., Mohamed, H.A.-L.A. (2007) Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Amer.-Euras. J. Sust. Agric.* 1, 7-12
- Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., van Pee, K.H., Ligon, J.M. (1997) Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2147–2154
- Handelsman, J. and Stabb, E.V. (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8, 1855-1869
- Hashimoto, J.G., Stevenson, B.S., Schmidt, T.M. (2003) Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *J. Bacteriol.* 185, 966-972
- Haydon, D.J. Guest, J.R. (1991) A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 291-295
- Hilgers, M.T., Ludwig, M.L. (2001) Crystal structure of the quorum-sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 98, 11169-11174
- Hillerich, B. Westpheling, J. (2006) A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon Source. *J. Bacteriol.* 188, 7477–7487
- Holmes, D.S., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193
- Hothersall, J., Murphy, A.C., Iqbal, Z., Campbell, G., Stephens, E.R., Wu, J., Cooper, H., Atkinson, S., Williams, P., Crosby, J., Willis, C.L, Cox, R.J., Simpson, T.J., Thomas, C.M. (2011) Manipulation of quorum sensing regulation

in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 to increase mupirocin production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 1017-26.

- Howell, C. R., Beier R. C., Stipanovic, R. D. (1988) Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. Phytopath. 78, 1075-1078
- Huang, X., Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. Advances in Applied Mathematics 12, 337-357
- Huang, X., Zhu D., Ge, Y., Hu, H., Zhang, X., Xu, Y. (2004) Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas sp.* M18. FEMS Microbiol. Lett. 232, 197–202
- Hur, G.H., Meier, J.L., Baskin, J., Codelli, J.A., Bertozzi, C.R., Marahiel, M.A., Burkart, M.D. (2009) Crosslinking studies of protein-protein Interactions in Nonribosomal Peptide Biosynthesis. Chem Biol. 16, 372–381
- James, D.W. Jr., Gutterson, N.I (1986) Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* Hv37a and their differential regulation by glucose. Appl. Environ. Microbiol. 52, 1183-1189
- James, P.D.A., Edwards, C., Dawson, M. (1991) The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. J. Gen. Microb. 137, 171 5-1720
- Janda, J.M., Abbott, S.L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45, 2761–2764.
- Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., von Mering, C. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. Nucl. Acids Res. 37, D412-D416
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Gwinn, Giglio, M., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Crabtree J., Creasy, T., Davidsen, T.M., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H.M., Feldblyum, T.V., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D., Mansfield, J.W., Collmer, A., Buell, R. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. J. Bacteriol. 187, 6488-6498
- Jousset, A., Rochat, L., Scheu, S., Bonkowski, M., Keel, C.(2010) Predator-Prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5263–5268

- Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 7, 459–471
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331-338
- Kazakov, A.E., Rodionov, D.A., Alm, E., Arkin, A.P., Dubchak, I. and Gelfand, M.S. (2009) Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 191, 52–64
- Keseler, I. M., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R. P., Johnson, D.A., Krummenacker, M. Nolan, L.M., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A.G., Karp, P.D. (2009) EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucl. Acids Res.* 37, D464-D470
- Keum, Y.S., Lee, H.R., Kim, J.H. (2010) Effects of pesticides on the bacterial production of pyrrolnitrin. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5531-7
- Kim, C.H., Han, S.H., Kim, K.Y., Cho, B.H., Kim, Y.H., Koo, B.S., Kim, Y.C. (2003) Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. *Curr. Microbiol.* 47, 457-461
- Koch, B., Nielsen, T. H., Sorensen, D., Andersen, J. B., Christophersen, C., Molin, S., Givskov, M., Sorensen, J., and Nybroe, O. 2002. Lipopeptide production in *Pseudomonas sp.* strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4509-4516
- Kovach, M.E, Elzer, P.H., Hill, S.D., Robertson, G.T., Farris M.A., Roop, M.R., Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176
- Kruijt, M., Tran, H., Raaijmakers, J.M. (2009) Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Appl. Microbiol.*107, 546-56
- Kube, M., Migdoll, A.M., Mueller, I., Kuhl, H., Beck, A., Reinhardt, R., Geider, K. (2008) The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ. Microbiol.* 10, 2211-2222

- Kube M., Migdoll A.M., Gehring I., Heitmann K., Mayer Y., Kuhl H., Knaust F., Geider K., Reinhardt R. (2010) Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. BMC Genomics 11:393-393
- Kyte J., Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-132
- Larsen, R.A., Wilson, M.M., Guss, A.M. and Metcalf, W.W. (2002) Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. Arch. Microbiol. 178, 193-201
- Lee, J.Y., Moon, S.S., Hwang, B.K. (2003) Isolation and Antifungal and Antioomycete Activities of Aerugine Produced by *Pseudomonas fluorescens* Strain MM-B16. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2023–2031
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., Ausubel, F.M. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 7, R90.1-R90.14
- Lee, J.K., Zhao, H. (2007) Identification and Characterization of the Flavin: NADH reductase (PrnF) involved in a novel two-component arylamine oxygenase. J. Bacteriol. 189, 8556–8563
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res. 40, D302–D305
- Lim, S.P., Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. (2009) Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas sp.* MIS38. J. Appl. Microbiol. 107, 157-166
- Lu, S.E., Scholz-Schroeder, B.K., and Gross, D.C. (2002) Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 15, 43-53
- Lu, S.E., Wang, N., Wang, J., Chen, Z.J., and Gross, D.C. (2005) Oligonucleotide microarray analysis of the *salA* regulon controlling phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 18, 324-333
- Ludwig, W., Klenk, H.P. (2005) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 (Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Eds.), Springer, New York, 49- 65.

- Luis, A.d R., Olivares, J., Blesa, M.C., Mayor, F. (1972) Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora*. Antimicrob. ag. and chemot. 2, 186-188
- Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V., Chin-A-Woeng, T.F.C. (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New Phytologist 157, 503-523
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2005) Brock biology of microorganisms, 10th edn. Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, D.H. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev. 97, 2651-2673
- Mavrodi, D.V., Peever, T.L., Mavrodi, O.V., Parejko, J.A., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Mazurier, S., Heide, L., Blankenfeldt, W., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (2010) Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. Appl. Environ. Microbiol. 76, 866–879
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413, 852-856
- McDonald, M., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. G. Floss, H.G (2001) Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. J. Am. Chem. Soc. 123, 9459–9460
- Meulenber, J.J.M., Sellink, E., Riegman, N.H., Postma, P.W. (1992) Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. Molecular&General Genetics 232, 284-294
- Miller, C.M., Miller, R.V., Garton-Kenny, D., Redgrave, B., Sears, J., Condrón, M.M., Teplow, D.B., Strobel, G.A. (1998) Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. Appl. Microbiol. 84, 937–944
- Milner, J.L., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H.Y., Clardy, J., Handelsman, J. (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3061–3065.
- Minagawa, S., Kondoh, Y., Sueoka, K., Osada, H., Nakamoto, H. (2011) Cyclic lipopeptide antibiotics bind to the N-terminal domain of the prokaryotic Hsp90 to inhibit the chaperone activity. Biochem. J. 435, 237–246
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., Nakahara, T. (2008) Survival of freeze-dried bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 54, 9–24

- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I., Moragrega, C. (2002) Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* 5, 169–175
- Muhamad, S.A., Ahmad, S., Hameed, A. (2009) Antibiotic production by thermophilic *Bacillus specie* SAT-4. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22, 339-345
- Nakata, K., Yoshimoto, A., Yamada, Y. (1999) Promotion of antibiotic production by high ethanol, high NaCl concentration, or heat shock in *Pseudomonas fluorescens* S272. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 293-297
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., Tahara, S. (1999) Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas sp.* strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4334–4339
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313–322
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L.M., Beanan, J., DeBoy, T., Daugherty, C., Kolonay, F., Madupu, ., Nelson, C., White, O., Peterson, J.D., Khouri, H.M., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E.K., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez A., Utterback, T.R., Rizzo, M., Lee, K., Kosack D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Duesterhoeft A., Tuemmler, B., Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799-808
- Ownley, B.H., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1992) Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2–79. *Phytopathol.* 82, 178–184
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B. (2006) Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Park, J.Y., Oh, S.A., Anderson, A.J., Neiswender, J., Kim, J.C., Kim, Y.C. (2011) Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 532-7
- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S.A., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson E.A., Pierson, L.S. III, Thomashow, L.S., Loper, J.E (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *Nat. Biotechnol.* 23, 873-878

- Perchy-Tarr, M., Bottiglieri, M., Mathys, S., Lejbølle, K.B., Schnider-Keel, U., Maurhofer, M., Keel, C. (2005) RpoN (σ 54) controls production of antifungal compounds and biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18(3), 260-272
- Pierson, L.S., Pierson E.A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1659–1670
- Pujol, C. J., Kado, C. I. (1999) *gdhB*, a gene encoding a second quinoprotein glucose dehydrogenase in *Pantoea citrea*, is required for pink disease of pineapple. *Microbiol.* 145, 1217–1226
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., D. de Kock, M. J. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas spp.*: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 699–710
- Ramos J.L. (2004) *Pseudomonas* (volume 3): Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Reimann, C., Serino, L, Markus Beyeler, M., Dieter Haas, D. (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the *pchEF* genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 144, 3135-3148
- Reese M.G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry* 26, 51–56
- Reznikoff W. S. (1993) The TN5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 945-963
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M., Handelsman, J. (2004) Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Env. Microbiol.* 6(9), 981–989
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., Dusart, J. (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. of Biol. Chem.* 277, 12507–12515
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. & van Wezel, G.P. (2008) Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports* 9 (7), 670-675

- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. and Evol.* 4, 406-425.
- Salgado, H., Hagelsieb, G.M., Smith, T.F, Vides, J.C. (2000) Operons in *Escherichia coli*: Genomic analyses and predictions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6652-6657
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarnigeut, A., Kraust, J., Henkelst, M.D., Murlchent, A.M., Loper, J.E. (1995) The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12255-12259
- Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Defago, G., Haas, D. (1995a) Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177, 5387–5392
- Schnider, U., Keel, Voisard, C., Defago, G., Haas, D. (1995b) Tn5-Directed Cloning of pqq Genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3856–3864
- Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 275–287
- Schwyn B., Neilands J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47-56
- Sebahia, M., Bocsanczy, A.M., Biehl, B.S., Quail, M.A., Perna, N.T., Glasner, J.D., DeClerck, G.A., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Bentley, S.D., Parkhill, J., Beer, S.V. (2010) Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.* 192, 2020-2021
- Shanahan, P., O’Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon J.D., O’Gara F. (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353–358
- Siddiqui, I.A, Shaukat, S.S. (2004) Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *J. Phytopathol.* 152, 48–54
- Silby, M.W., Cerdano-Tarraga, A.M., Vernikos, G.S., Giddens, S.R., Jackson, R.W., Preston, G.M., Zhang, X.-X., Moon, C.D., Gehrig, S.M., Godfrey, S.A.C., Knight, C.G., Malone, J.G., Robinson, Z., Spiers, A.J., Harris, S., Challis, G.L., Yaxley, A.M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M.A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T.S., Bentley, S.D., Hothersall, J.,

Stephens, E., Thomas, C.M., Parkhill, J., Levy, S.B., Rainey, P.B., Thomson, N.R. (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10 (5), R51

- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., Miller, N.E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucl. Acids Res.* 29, 1097-1106
- Someya, N., Numata, S., Nakajima, M., Hasebe, A., Hibi, T., Akutsu, K. (2003) Biological control of rice blast by the epiphytic bacterium *Erwinia ananas* transformed with a chitinolytic enzyme gene from an antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2. *J. Gen. Plant Pathol.* 69, 276–282
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kampfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Internat. J. of Syst. and Evol. Microb.* 52, 1043–1047
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. of the Nat. Acad. of Sc. (USA)* 101, 11030-11035.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. and Evol.* 28, 2731-2739
- Taylor, A.B., Smith, B.S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., Deisenhofer, J. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* 9, 615-625
- Thomas, F.C., Chin-A-Woeng, van den Broek, D., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg G.V. (2005) The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator *psrA* represses the production of the antifungal metabolite phenazine-1-carboxamide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 244–253.
- Thomas, G.M., Kenavy, B.M., Rasko D.A. (2009) Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1144–1155
- Thomashow, L.S., Bonsall, R.F., Weller, D.M. (1997) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of Environmental Microbiology*, Washington DC., ASM press (493-499)

- Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher C., Quail, M.A., Stevens M., Jones, M.A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingsley R.A., Bignell, A., Clark, L., Harris B., Ormond, D., Abdellah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norberczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Saunders, M., Whitehead, S., Chabalgoity, J.A., Maskell, D., Humphreys, T., Roberts, M., Barrow, P.A., Dougan, G., Parkhill, J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella enteritidis* PT4 and *Salmonella gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18, 1624-1637
- Thompson, N.B., Chaney, N., Wing, S. J., Gould, S.J., Loper, J.E. (1999) Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *J. Bacteriol.* 181, 2166–2174
- Thompson, N.B, Hammer, P.E., Hill, D.S., Stafford, J., Torkewitz, N., Gaffney, T.D., Lam, S.T., Molnar, I., Ligon, J.M. (2003) 2,5-Dialkylresorcinol biosynthesis in *Pseudomonas aurantiaca*: Novel head-to-head condensation of two fatty acid-derived precursors. *J. Bacteriol.* 185, 860–869
- Toh, H., Oshima, K., Toyoda, A., Ogura, Y., Ooka, T., Sasamoto, H., Park, S.H., Iyoda, S., Kurokawa, K., Morita, H., Itoh, K., Taylor, T.D., Hayashi, T., Hattori, M. (2010) Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. *J. Bacteriol.* 192, 1165-1166
- Tong, S., Porco, A., Isturiz, T., Conway, T. (1996) Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* Genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J. Bacteriol.* 178, 3260–3269
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Le Bouguenec, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jehanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Medigue, C., Rocha, E.P.C., Denamur, E. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, E1000344-E1000344
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., Raaijmakers, J.M. (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytopath.* 175, 731-742
- Tronsmo, A., Dennis, C. (1978) Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Transact. of the Brit. Mycol. Soc.* 71, 469-474

- Tropel, D., van der Meer, J.R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Micr. and Mol. Biol. Rev.* 68, 474–500
- Turner, J. M., Messenger. A. J. (1986) Occurrence, biochemistry, and physiology of phenazine pigment production. *Adv. in Micr. Phys.* 27, 211–275
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert C., Abergel, C., Claverie, J.-M., Raoult, D., Medigue, C., Weissenbach, J., Cruveiller, S. (2008) Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE* 3, E1805
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Pechy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M., Lemaitre, B. (2010) Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 910–921
- Vangnai, S.A., Daniel J. Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A. (2002) Two distinct alcohol dehydrogenases participate in butane metabolism by *Pseudomonas butanovora*. *J. Bacteriol.* 184, 1916–1924
- van Kleef M.A., Duine J.A. (1988) Bacterial NAD(P)-independent quinate dehydrogenase is a quinoprotein. *Arch. Microbiol.* 150, 32-36
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–83
- van Pee, K.H., Ligon, J.M. (2000) Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17, 157–164
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Medigue, C., Boccard, F. (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotechnol.* 24, 673-679
- Washio, K., Lim, S.P., Roongsawang, N., Morikawa, M. (2010) Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by *Pseudomonas sp.* MIS38. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 74, 992-999
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 2697-2703
- Weller, D. M., Cook, R.J. (1983) Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathol.* 73, 463-469

- Weller, D.M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407
- Whelan, A.P., Dietrich, L.E.P., Newman, D.K. (2006) Rethinking ‘secondary’ metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem. Biol.* 2, 71-78
- Whipps J.M. (1997) Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26: 1–133
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E., Brinkman, F.S. (2006) *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 37, 483-488
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P., Pierson L.S. (1997) *N*-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179, 7663–7670
- Wu, K. M., Li, L.H., Yan, J.J., Tsao, N., Liao, T.L., Tsai H.C., Fung, C.P., Chen, H.-J., Liu, Y.M., Wang, J.-T., Fang, C.-T., Chang, S.C., Shu, H.Y., Liu, T.T., Chen, Y.T., Shiau, Y.R., Lauderdale, T.L., Su, I.J., Kirby, R., Tsai, S.F. (2009) Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* 191, 4492-4501
- Wylie, J.L., Worobec, E.A. (1995) The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 177, 3021–3026
- Xiao, R., Kisaalita, W.S. (1998) Fluorescent pseudomonad pyoverdines bind and oxidize ferrous ion. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1472–1476
- Yan, A., Huang, X., Liu, H., Dong, D., Zhang, D., Zhang, X., Xu, Y. (2007) An rhl-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas sp.* M18. *Microbiol.* 153, 16–28
- Young, J.P.W., Crossman, L.C., Johnston, A.W.B., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R.J., Todd, J.D., Poole, P.S., Mauchline, T.H., East, A.K., Quail, M.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., Parkhill J. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 7, R34.1-R34.20
- Yun, L., Helmann, J.D. (2009) Extracytoplasmic function sigma factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 4951-4958

- Zhong, J.J, Liaoa, Y., Weib, Z.H, Baia, L., Denga, Z.(2009) Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygrosopicus* 5008. J.Biotech. 142, 271-274
- Γεωργόπουλος, Σ.Γ., και Β.Ν. Ζιώγας (1992) Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών.
- Ζιώγας, Β.Ν. και Μάρκογλου, Α.Ν., (2004) Νέα μυκητοκτόνα και ο σύγχρονες τάσεις. Πρακτικά 4ης Πανελληνίας Συνάντησης Φυτοπροστασίας. Λάρισα (σελ.217 - 230)
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. (1997) Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών, Β' έκδοση, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης
- Φωτιάδης Χ. (2009) Λειτουργικός χαρακτηρισμός δύο υποψηφίων πρωτεϊνών - τελεστών του εκκριτικού συστήματος τύπου III του *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- Χατζόπουλος, Π. (2001) Βιοτεχνολογία φυτών, εκδόσεις Έμβρυο (σελ.412 - 415)

Άλλες πηγές: <http://www.textbookofbacteriology.net/>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1: Εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία του βαδίσματος (primer walking). Οι αλληλουχίες δίνονται με κατεύθυνση 5'→3'

Εκκινητές	Αλληλουχία
gdh1	CCCGCAGCGGTCTTGATGTC
R48-RL17-1	GCAGTAAGAGATTCGGCAAA
operonXrif	TATCCGTCGTGTCATCACCT
operonX2	TATGTCCTATGCGCAACTGCAC
operonX3	GACTTCTTCCACCACGGCG
operonX4	ATCGTGCCACCGAAGACCA
operonX5	GACAGCGGTGAAATCCACATC
operonX6	AACATTTGCCCGACTACAT
operonX7	ACGGGTTCCCTGGGTGTGC
operonX8	ACCGTTTGATGCTGATGCTC
operonX9	TCTACACCTCGCTGAACATC
operonXrif0	GACATAGAAAGAGCAGGCGG

Πίνακας Π2 : Τα ποσοστά πλήρους ομοιότητας μεταξύ των αντιγράφων PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2, και του κάθε αντιγράφου με την Sup1

Στελέχη	Locus tag για την PQQ-Gcd1	Locus tag για την PQQ-Gcd2	Πλήρης ομοιότητα μεταξύ PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2 (%)	Πλήρης ομοιότητα μεταξύ PQQ-Gcd1 και Sup1 (%)	Πλήρης ομοιότητα μεταξύ PQQ-Gcd2 και Sup1 (%)
<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	PFL_4577	PFL_2712	38.6	68.3	40.9
<i>Ps. fluorescens</i> Pf5	PFL_4916	PFL_5668	43.3	70.0	43.2
<i>Ps. fluorescens</i> SBW25	PFLU1086	PFLU2304	42.3	94.9	41.4
<i>Ps. fluorescens</i> CHA0	FJ694890	-	-	70	-
<i>Ps. entomophila</i> L48	PSEEN1170	PSEEN2918	38.2	66.1	42.1
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	PSYR_3930	PSYR_2574	42.7	80.9	41.5
<i>Ps. syringae</i> pv. tomato str. DC3000	PSPTO_4196	PSPTO_2568	40.2	75.2	42.3
<i>Ps. putida</i> F1	PPUT_4277	PPUT_2205	38.3	65.3	41.6
<i>Ps. putida</i> KT2440	PP_1444	PP_3569	38.0	65.6	41.9
<i>Ps. putida</i> GB-1	PPUTGB1_4361	PPUTGB1_2352	37.8	65.3	40.8
<i>Ps. stutzeri</i> A1501	PST_0991	PST_3741	34.4	50.9	32.9
<i>Ps. aeruginosa</i> PAO1	PA2290	-	-	68.1	-
<i>Ps. aeruginosa</i> PA7	PSPA7_3111	-	-	48.1	-
<i>Ps. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	PA14_34970	-	-	68.1	-
<i>Ps. mendocina</i> ymp	PMEN_0791	-	-	50.9	-

Πίνακας Π3: Τα βακτηριακά στελέχη και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

Βακτηριακά Στελέχη	Περιγραφή-Κατασκευή	Αναφορά
<i>E. coli</i>		
HB101	<i>hsdR, recA, proA, leu-0, ara-14, gaiK2, lacY1, xyl-5, mtl-1, str-2, thi-1, supE44</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BW20767	RP4-2Tc::Mu-1 kan::Tn7 integrant leu-63::IS10 <i>recA1, zbj-5, creB510, hsdR17, endA1, thi, uidA</i> (Δ MluI)::pir ⁺	Larsen <i>et al.</i> , 2002
DH10b	F ⁻ , <i>mcrA, \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC), \Phi80dlacZ\Delta M15, \Delta lacX74, endA1, recA1, deoR, \Delta(ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL, \lambda, sup E44, \Delta lacU169 (F80lacZDM15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1</i> , λpir phage lysogen	Durfee <i>et al.</i> , 2008
DH5a λpir		© 2003 Biomedal, S.L, Spain
<i>Ps. fluorescens</i>		
X	άγριος τύπος	Georgakopoulos <i>et al.</i> , 2002
Xrif	Rif ^R (spontaneous mutant)	Παρούσα εργασία
A150	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
B91	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
B163	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
ρ93	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
ρ26	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
k36	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
R48	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
W139	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
Θ123	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
δ40	Xrif::Tn5-RL27 Km ^R , sup ⁻	Παρούσα εργασία
Πλασμίδια		
pRK2013	IncP-1, traRK2+, repRK2, repE1, Km ^R	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pRL27	Tn5-RL27 (Km ^R -oriR6 K) φορέας του οποίου είναι το κυκλοποιημένο προϊόν της αντίδρασης PCR από το pRL23, με εκκινητές τους tetA _{for} και oriT _{rev}	Larsen <i>et al.</i> , 2002
pLG221	Coll1d _{rd-1} ::Tn5, IncIa, Km ^r	Boulnois <i>et al.</i> , 1985
Κατασκευές		
pIigA150	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος A150, Km ^R -oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigB91	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος B91, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigB163	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος B163, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigρ93	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος ρ93, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigρ26	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος ρ26, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigk36	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος k36, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigR48	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος R48, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigW139	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος W139, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pIigδ40	πλασμίδιο απελευθέρωσης από το στέλεχος δ40, Km ^R - oriR6 K	Παρούσα εργασία
pGemT16SX	Με το ζεύγος των εκκινητών 16Sf-16Sr και μήτρα το γονιδιωματικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA και κατόπιν κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
pgcd1*	Με το ζεύγος των εκκινητών gcd1-gcd3 και μήτρα το γονιδιωματικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup1</i> μαζί με τη γονιδιωματική περιοχή 356 bp ανωφερικά αυτού και κατόπιν κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
pgcd2	Με το ζεύγος των εκκινητών gcd2-gcd3 και μήτρα το γονιδιωματικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup1</i> και	Παρούσα εργασία

	κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	
ppqF	Με το ζεύγος των εκκινητών pqqF1-pqqF2 και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup2</i> και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy	Παρούσα εργασία
ppqD	Με το ζεύγος των εκκινητών pqqD1-pqqD2 και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup3</i> και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqE	Με το ζεύγος των εκκινητών pqqE1-pqqE2 και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup4</i> και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqDE	Με το ζεύγος των εκκινητών pqqD1-pqqE2 και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup3</i> και <i>sup4</i> και το προϊόν κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqFA*	Με το ζεύγος των εκκινητών FOR(EcoRI)-pqqA1r και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup2</i> , <i>orf1</i> καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 504 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρο το τμήμα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqFAB*	Με το ζεύγος των εκκινητών FOR(EcoRI)-pqqC και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup2</i> , <i>orf1</i> , <i>orf2</i> καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 504 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρο το τμήμα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqABCDE	Με το ζεύγος των εκκινητών pqqA1f-pqqE2(EcoRI) και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>orf1</i> , <i>orf2</i> , <i>orf3-4</i> , <i>sup3</i> και <i>sup4</i> . Ολόκληρο το τμήμα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
ppqF-E*	Με το ζεύγος των εκκινητών FOR2(EcoRI)-pqqE2(EcoRI) και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup2</i> , <i>orf1</i> , <i>orf2</i> , <i>orf3-4</i> , <i>sup3</i> , <i>sup4</i> , καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 504 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρο το τμήμα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy	Παρούσα εργασία
psup5	Με το ζεύγος των εκκινητών sup5f-sup5r και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup5</i> και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psup6	Με το ζεύγος των εκκινητών sup6f-sup6r και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκε το <i>sup6</i> και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psup5-6*	Με το ζεύγος των εκκινητών supFor-sup6r και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup5</i> και <i>sup6</i> , καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 423 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρη η ενισχυθείσα περιοχή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psupA	Με το ζεύγος των εκκινητών supFor-supRev(XbaI) και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup6</i> , <i>orf7</i> , <i>orf8</i> και <i>orf9</i> . Ολόκληρη η ενισχυθείσα περιοχή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psupB	Με το ζεύγος των εκκινητών supFor-supRev(XbaI) και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup5</i> , <i>sup6</i> , <i>orf7</i> , <i>orf8</i> και <i>orf9</i> . Ολόκληρη η ενισχυθείσα περιοχή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psupC*	Με το ζεύγος των εκκινητών supFor-supRev(XbaI) και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup5</i> , <i>sup6</i> , <i>orf7</i> , <i>orf8</i> , <i>orf9</i> καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 423 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρη η ενισχυθείσα περιοχή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
psupD*	Με το ζεύγος των εκκινητών supFor-supRev και μήτρα το γονιδιωματοικό DNA του άγριου τύπου βακτηρίου X ενισχύθηκαν τα γονίδια <i>sup5</i> , <i>sup6</i> , <i>orf7</i> , <i>orf8</i> , <i>orf9</i> καθώς και η γονιδιωματοική περιοχή 423 bp ανωφερικά αυτών. Ολόκληρη η ενισχυθείσα περιοχή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEMTeasy.	Παρούσα εργασία
pBBRgcd1*	Πέψη του κλώνου pgcd1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία

pBBRgcd2	Πέψη του κλώνου pgcd2 με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqF	Πέψη του κλώνου prrqF με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqE	Πέψη του κλώνου prrqE με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqD	Πέψη του κλώνου prrqD με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqDE	Πέψη του κλώνου prrqDE με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqFA*	Πέψη του κλώνου prrqFA* με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqFAB*	Πέψη του κλώνου prrqFAB* με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqA-E	Πέψη του κλώνου prrqABCDE με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRrrqF-E*	Πέψη του κλώνου prrqFABCDE με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRsup5	Πέψη του κλώνου psup5 με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRsup6	Πέψη του κλώνου psup6 με τα ένζυμα <i>NdeI/XbaI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5-RBS, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.	Παρούσα εργασία
pBBRsup5-6*	Πέψη του κλώνου psup5-6* με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRsupA	Πέψη του κλώνου psupA με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRsupB	Πέψη του κλώνου psupB με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRsupC*	Πέψη του κλώνου psupC* με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία
pBBRsupD*	Πέψη του κλώνου psupD* με το ένζυμο <i>EcoRI</i> και υποκλωνοποίηση στον φορέα pBBR1MCS5, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο.	Παρούσα εργασία

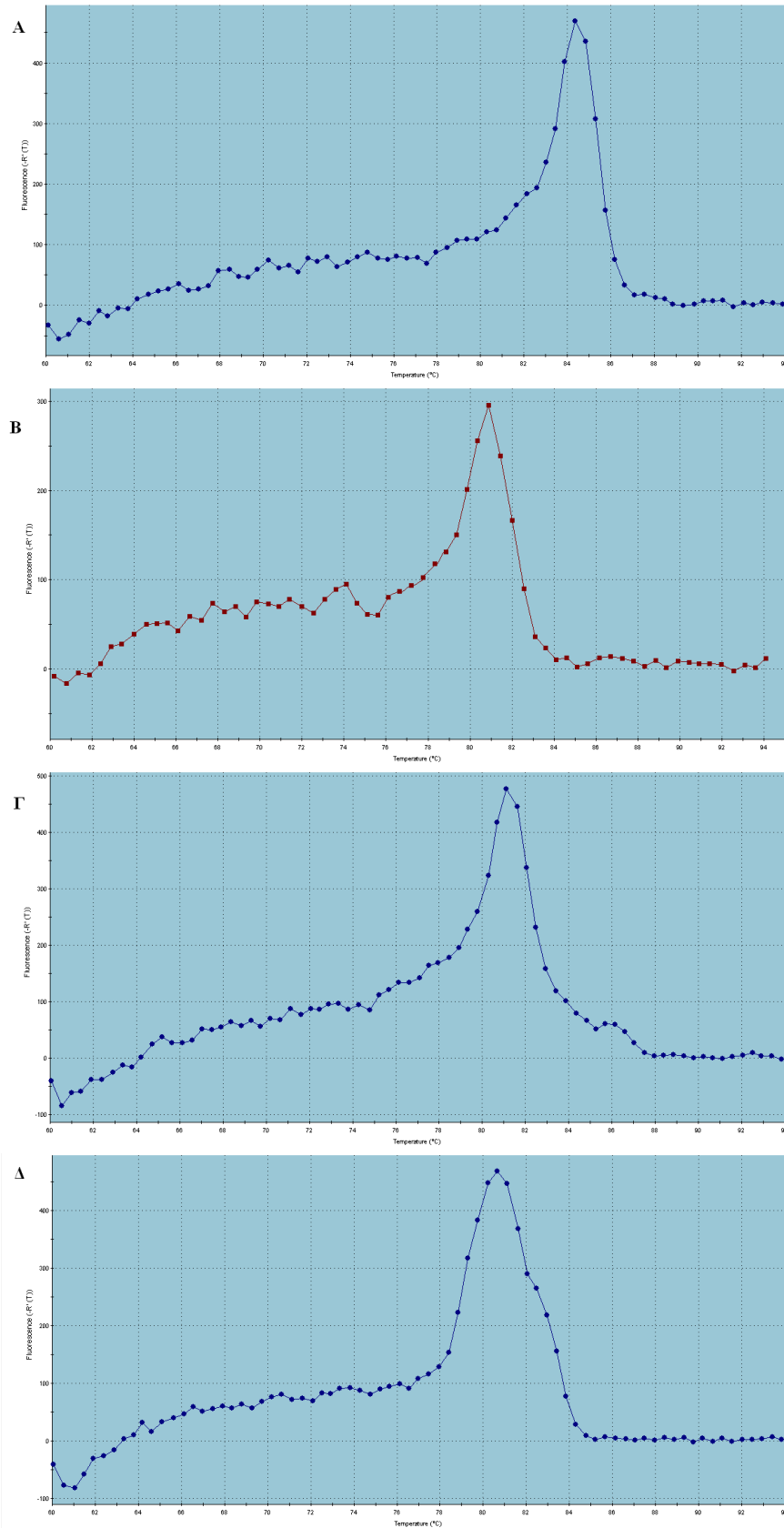
*περιλαμβάνει την αλληλουχία του φυσικού μεταγραφικού υποκινητή, έτσι όπως έχει προβλεφθεί

Πίνακας Π4 : Ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν. Τα βέλη στις αλληλουχίες δείχνουν το σημείο αναγνώρισης και πέψης για το κάθε ένζυμο.

ΟΝΟΜΑ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΡΑΣΗΣ(°C)
<i>Bam</i> H1	G↓GATCC	37
<i>Eco</i> R1	G↓AATCC	37
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	37
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	25
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	37
<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C	37
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	37
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	37
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	37
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	37

Πίνακας Π5: Εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR και αλληλουχίσεις. Με μικρά γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες οι οποίες αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για διάφορα ένζυμα περιορισμού.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5'→3'
16Sf	AGAGTTT G ATCCTGGCTCAG
16Sr	CAAGTCG T AAAAGGTAGCCGT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
tpnRL17-1	AACAAGCCAGGGATGTAACG
tpnRL13-2	CAGCAACACCTTCTTCACGA
pqqE1	CTGAGCACCGA catatg GATCAAGGTATTT C
pqqE2	GTACATCATC tctaga CGTTGAGGCGCTCA
pqqE2(EcoRI)	GTACATCATC gaatcc CGTTGAGGCGCTCA
pqqD1	ATAAAGGGGA c CAC Ca TATGAGCTTTGATC
pqqD2	CCGATG tctaga TTTT C AGGCAAGGGTG
pqqF1	CTCGGAAGT geat ATGCCTGCGCCGGTTC
pqqF2	CTGTTGCAGGGT tctaga TGATCACGG
gcd1	TCG ggtacc TGAGCATTGCGTTCGCGTGAC
gcd2	CGGAGAAACAC catatg AGCACTGATGGTG
gcd3	TCG tctaga CGCCAGCGTTGCTTAATCTG
FOR2(EcoRI)	TTTG Ggaatcc TGACCACTCGATGTT C AGC
pqqA1f	GGTTTCGAAGTCACCATGTACTTCGCCAG
pqqA1r	CTGGCGAAGTACATGGT G ACTTCGAAACC
pqqC	GTATCGAAGCCTGGCTGCGCCTGGGCCA
supFor	CAG Ctctaga GGGAACTTGATGG
supRev	GCCTCCGCCTGCGAAAGATATGTC
supRev- <i>Xba</i> I	GCCTCCGCCTG Ctctaga TATGTC



Γράφημα Π1 : Οι καμπύλες τήξης (melting ή dissociation curves) για τα τέσσερα ζεύγη των εκκινητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά το Real Time PCR. Στο κάθε γράφημα παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη τήξης για τα ζεύγη των εκκινητών A) proDf-proDr ,B) sup5f-sup5r, Γ) sup6f-sup6r, Δ) orf8f-orf8r. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται η

θερμοκρασία σε °C και στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται οι τιμές του φθορισμού έτσι όπως λαμβάνονται από τη συσκευή Stratagene Mx3005P™.

CCTGGACACCGGCGAAGCCTTGCCACGCATTGCCCATTCGGCTTTGAACAGCGGCTTGCCTGGGAACCTGGATCGCTGGCAGGCGCGTATCG
ATGTGGAACATGCCGACGGCCAAGGGCGTGTGCCGGAACAGAGAGCGGCACCGATGGCTACACCACCCCTGGTGCCAGCGGGGTATCG
CTTCAATGTGGGCGGACCCAGTGGCTGGCGTTCGTCAATGGCGAGAACCTGACCAACCAGACCGTGGCTATGCCAGCTCGATCCTGCGCG
ACATCGCACCGGCGCCTGGTAGAAGCGTGCAGTTGCGGGCTTCGCACCTACGTTCTAATCATCACCGCAAATCCTTGGTGGGAGCGGGCTTGGC
CGCGAAAGCGCTGGGTCAGTCAACATCACTGTTTGTGGACCGACGTCCTCGCAGGCAAGCCAGCTCCACATTTGATCGTCGTCGGTGGAG
CATTGGCTTCGGTGGACTGATCGGTATGCAGCGACTATCTGTACTGTTACCAAACTGAAATGATGCATCTTGGCATTCACCCCTTCTCAAAACGCC
CCGCGCATTATCTTCGCACAACTGAAACGCTTACCTCCGGTTCGACTCCCCTTGGCGAATCTTACTGCGCAAAAGACAGCGCTGCTTGTAA
TCGACCTGGCCAGGGGATTTGATTTGCCCGCTGTGGATAAACACGTTATCCACAGAAAAAACAAAAATAACGATGAACCAAGCCCGAGCGG
AATCGTATCTACAGTGAAGTGAAGCACGGGTTACATAATT

M S T D G A S S P S R L L P R L L
CCAACGTAACGGAGAAACACACTATGAGCACTGATGGTGCCTCAAGCCCAAGCCGCTGTTGCCAGGCTGCTAG
G V L L L I M G L A L L A G G V K L S M L G G S L Y
GCGTCTTGTGCTGATCATGGGGCTGGCCTTGTGGCTGGCGGTGTCAAGCTGAGCATGCTCGGCGGGTCTGCTGTA
Y L L A G I G I T L T G V L L L A T Q R A A L G L
TTACCTGCTGGCCGGTATCGGCATCACCTGACCGGGCTGTTGCTGCTGGCCACCAACCGCGCCGCTGGGCTG
Y A L V L F A S T V W A L W E V G L D W W Q L V P
TACGCACTGGTGTGTTTGGCAGCACCGTGTGGGCCCTGTGGGAAGTCGGCCTGGACTGGTGGCAGTTGGTTCCGC
R L A L L F A L G I V M V L P W F R R P L L R G Q A
GCCTGGCCCTGCTGTTGCGCTTGGGCATCGTCAATGGTGTGCGCTGGTTCGTCGTCGTTGCTGCGCGGCAAGCG
A P L G T G A L S V A V V L T G A T A L A S Q F T
GCCCGCTGGGTACCGGCGCGCTGAGCGTTGCCGTGGTGTGACGGGCGCTACTGCCCCTGGCCAGCCAATTACC
N P G E M V K T G Q L D R D A V P G M A S A A P T
AACCAGGTGAAATGGTCAAGACCGGCAACTGGACCGGACGCGGTGCCGGGCATGGCCAGTGTGCGCCAACC
Q A D G D W N S Y G R S A L G D R Y S P L A Q I T
CAGGCCGATGGCGACTGGAACCTCTATGGCCGTTCCGGCTTAGGTGATCGTTACTCGCCACTGGCACAGATCACCC
P E N A H K L V P A W T Y R T G D I P G P G D P G
CGGAGAATGCCATAAGCTGGTGGCGGCTGGACTTATCGCACGGGCGACATCCCTGGCCAGGCGATCCCGGTG
E T T A E N T P L K V N G M L Y V C T P H S Q V I
AAACCACCGGGAACACCCCGCTGAAAAGTCAATGGCATGCTCTACGTGTGCACACCGCACAGCCAAGTGATTG
A L D P D T G K E I W R F D P K I T T Q G A E S F
CCCTGGACCCGATAACCGGAAGGAAATCTGGCGTTCGACCCGAAGATCACCAACCAGGGTGTGAGAGCTTCA
K G W A H M T C R G V S Y H D D A A Y A S E Q S P
AAGGTTGGGCGCACATGACCTGCCGTGGCGTGTCTGACCACGATGACGCCGCTACGTTCCGAGCAGAGCCCGA
T G T A S P A A A P N A C P K R I F V P T A D T R L
CTGGCACTGCCAGCCCGCCGCCACCGAATGCTGCCGAAACGCATCTTCGTGCCGACTGCCGACACCCGCT
I A L N A D T G K M C E D F G D K G Q V D L R A N
GATCGCCCTGAACGCCGACACCGCAAGATGTGCGAAGACTTCGGTGACAAAGGCCAGGTGACCTGCCGCGCAA
I G S F A P G G Y Y S T S P P A V T K N L V V I G
CATCGGTAGCTTCGCCCAGGCGGTTACTACTCCACGTCGCCACCGGCCGTGACCAAGAACCTGGTCTGATCGGC
G H V T D N V S I D E P S G V I R A F D V H K G K
GGTCACGTGACCGACAACGTTCCATCGACGAGCAAGCGGCGTGATCCGCGGTTTACGCTGCACAAAGGCAAG
L V W N W D S G N P D D T I P L A E G K T Y T R N
CTGGTGTGGAACCTGGGACAGCGCAACCCGGACGACACCATCCCGTTGGCCGAGGGGAAGACCTACACCCGCAAC
S P N M W S M L A V D E K L G M L Y L P M G N Q M
TCGCCGAACATGTGGTCCATGTTAGCCGTGGATGAAAAACTCGGCATGCTATACCTGCCGATGGGCAACCAGATG
P D Q Y G G D R T D E S E K Y A A G L T A L D M D
CCCGACAGTACGGCGGCGACCGTACCGATGAGTCCGAGAAATACGCCCGGGCCTGACCGCCCTGGACATGGAC
T G H V K V G W T F Q F T H H D L W D M D V G G Q P S
ACCGGCCACGTGAAGTGGACCTCCAGTTCACCCACACGACTGTGGGACATGGACGTGGGCGGCGGACGCTTCG
L I D I K T A A G V K Q A V M A S T K Q G V L D R
CTGATCGACATCAAGACCGCTGCGGGCGTGAAGCAGGCAAGTGGCGTGCACCAAGCAAGGCAAGCATCTACGTT
S I Y A T G Q P V V P V N E I P V P Q G A V A G D
CTGGACCGCGCCACTGGCCAGCCAGTGGTGGCGTCAATGAAATCCCGGTGCCACAGGGCGCAGTGGCGGGCGAC
R T S P T Q P K S D L N F M P P P L K E R D M W G
CGCACCTCCCGACCAACCAAGTCCGACCTGAACTTCATGCCCGCCCGTTGAAAGAGCGGACATGTGGGGC
V T P F D Q M L C R I D F K S M R Y D G P F T P P
GTGACACCGTTCCGACAGATGCTGTGCCGGATCGACTTCAAATCCATGCGCTACGACGGCCCGTTACGCGCCGCT

S L Q G S I V Y P G N F G V F D W G G I S V D P V R
 CCCTGCAAGGTTTCGATCGTGTACCCAGGCAACTTCGGCGTGTTCGACTGGGGCGGTATCTCGGTTGACCCGGTACG
 Q I A F V N P S Y M A F K S K L I P A A D I A K Q
 CCAGATCGCCTTCGTGAACCCAAGCTACATGGCGTTCAAATCGAAGCTGATCCCGGCTGCCGACATTGCCAAGCA
 G P R V S E T E G V Q P N K G A P Y G V I L E A L
 AGGCCCACGCGTCAGCGAAACCGAAGGCGTGCAGCCGAACAAAGGCGCCCCGTATGGTGTGATCCCTCGAAGCACT
 L S P M G L P C Q A P A W G Y V A A V D L T T H Q
 GCTGTCCCGATGGGCCTGCCGTGCCAGGCACCGGCTGGGGCTACGTGGCGGCGGTGGACCTGACCCACCA
 T I W M H K N G T L R D S S P V P I P L T M G V P
 GACCATCTGGATGCACAAGAACGGCACCTGCCGTGACAGCTCCCCGGTTCGAATCCCCCTGACCATGGGCGTGCCT
 S L G G T F T T A G G V P F L S G T L D Q Y L R A
 AGCCTGGGCGGTACGTTACCACCGCCGGTGGCGTCCCGTTCCTCAGCGGCACCCTGGACCACTGCGTGC
 Y D V K N G K Q L W E G R L P A G A Q T T P M T Y
 TATGACGTGAAAAACGGCAAGCAACTGTGGGAAGGCCGCCTGCCGTGACGGCGGCAAAACCACCCCGATGACCTAC
 T G K D G K Q Y V L V M A G G H G S L G T K Q G D
 ACCGGCAAGGACGGCAAGCAATACGTGCTGGTTCATGGCGGGCGGTACCGGTTCCCTGGGGACCAAGCAGGGTGA
 Y V M A F K L P D *
 CSTATGTGATGGCGTTCAAACTGCGCAGATTAAGCAACGCTGGCGGTACAAAAAAGCGGCGCCCGATGGCGAGCCGCTTTTTTTT
 GCCITGCTGAAAAATGCCCGGTGTTCCCTCCACCTTTAAAACTAATTTAGTGCACACGCCCTGCGTAATACAAAAGCGTACGGATAAAACT
 TTAAAGGAGCTTCACTGCATGACGGACCAATGTCGCTACAAAACCGATTCTTCCACCCCAAAAATCTGGAGCTTGAACACCTCAATAC
 TGCCAGTTTGAAAAACTCATCAGTGGCCAAAGTCTGGCAATTCGGGTACCTGAATTTGCCAACGCAACCACCGCCACGGTGTGATTCAGCC
 CATCGACGATACCCCCACGCTGGAACACTACGGCCATGAAACTACAAGCGGGCCGCGTCTCACCATTCT

Εικόνα ΠΙ : Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *sup1*. Με κόκκινα γράμματα έχουν επισημανθεί οι θέσεις ένθεσης (ακολουθίες-στόχοι) του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη R48, k36, W139, με τη σειρά που εμφανίζονται στην εικόνα. Τα υπογραμμισμένα πλάγια γράμματα αντιστοιχούν σε δύο πιθανές θέσεις μεταγραφικών υποκινητών, όπως υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος NNPP v2.2 (Reese, 2001). Οι ακολουθίες με το καφέ χρώμα αντιστοιχούν σε εκκινητές (*gcd1*, *gcd2*, *gcd3* κατά τη σειρά που εμφανίζονται) που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση του γονιδίου με PCR. Ο αριθμός καταχώρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου στην Genbank είναι HQ383687. Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup1* δίνεται πάνω από την νουκλεοτιδική αλληλουχία (με μπλε γράμμα έχει σημειωθεί η πρώτη μεθειονίνη). Με πράσινο και γαλάζιο έχει επισημανθεί η αλληλουχία των εκκινητών (R48-RL17-1 και *gdh1*, αντίστοιχα) οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της διαδοχικής αλληλούχισης.

ACATCAAGGCGCGCATCATCGGCGACCCGATCACCGTGTCTGGGAGGCGGACCCGCAATTTCCCTCGGGGCCCTCAAAGGTGCCITGCCCGGTC
 ACTATCGTITACAACCAACCGATGTATGCGCACTTCATGCAGAAGGATATGCCCGCGAAGCAGCGCGGATCTTCATCGCGGGTGTATGATGTA
 TCGTGGACCGCTTGCCTGGGTTCGAAGGCGCGGTACAAACCTCGCTCAACCGCGGTATGGGGCAATGAAACCACTTCGGTGGCAGCACCCACCC
 GGAGAACCAGGCCCAGGCGACGTTGTCGATGAAATAGGGCCAATCGCCCTGGCAGATAAAGGAGTTGAGCATGCGTGTGCCCTGTACCA
 ATGCCCGCCGTTGACCGTGGATGTGGCCGTAACCTGCAAGCGCTGCACCAACTGGCCATGAGGCACACCGCGCGATGTGCTGGTGTGC
 CAGAGATGTTCCCTCAGCGGTATAACATTTGGCCCGAAGCGGTTGGCGCACTGGCCGAGGCACAGGATGGCCATCGCCGAGCGGATTTGC
 GAACTGGCGCAAAGTGCCTGGCTGGCGATCTGTATGGTACCCCGAAGCGGCGGAGACCGCCAGGTTTACAACCGCGTGCAGTTGATGTC
 ATGCCAGGGCACCGCCCTGTGCAATACCGCAAGACCCACTGTGTTGGCGATCTGACCACTCGATGTTACGCGCCGCGCCCGATGATTTCCG
 GTTGGTGAATTTGAACCGTTGGAAGGTAGGCATGCTGATTTGCTACGACTGGAGTTTCCGAAAACACCCCGCGCTTGGCCCTGCGCCGTTG
 CGAACTGATTTGGTGGCCACCGCAATATGGTGGCGTTGACTTTGTTGGCGACGTCACCGTTCGGGGCGGAGCCTTTGAAAACAGGTTGTTT
 GTGGCTATGCCAATCTGCGGCGCAGGAGCGGATTCCTACTGCGGGCAAAGCAGCATTGCCCGCCCGGACGGCCAGCGAATTTGCCCA
 GGCCGCGCTGGATGAAGCCTTGAATGCTGCGCACCCCTGAATCACAATCTATTGTGACGCGCCGCGCCCAACCACTACTTGAAGACCGTGC
 CGCCGAACCTTACGGC

M P A

GC ACTGCACAAGCCCTGACCCATTGGGTTTGCTAGCATAGGCACTTCCCACGCCTCGGAAGTGCCCATGCCTGCGC
 P V H P H P L H L T L A N G L R V C L R H A P R L K
 CGGTTACCCCTATCCCTTACCTGACCCTCGCCAAATGGCCTGCGGGTTTGCCTGCGCCATGCGCCACGCTTGAA
 R C A A V L H V A A G S H D V P L A W P G L A H F
 ACGCTGCGCCGCGTTTTACACGTGGCTGCCGGCAGCCATGACGTGCCATTGGCCTGGCCTGGGCTGGCGCATT
 L E H L L F L G T E H F P A G E G L M A Y V Q R H
 CTTGAGCACTTGTGTTTCTCGGTACCGAGCATTTTCCGGCCGGCGAAAGGCTGATGGCCTACGTGCAGCGCCACG
 G G Q V N A S T R E R T T E F F F E L P V P V F A D
 GTGGTCAGGTCAACGCCAGCACCCGTGAGCGCACCCAGGATTTCTTTTGAACGCGGTTGCCGTTTTCGAGA
 G L A R L A D M L A H P R L A L D D Q Q C E R E V
 CGGGCTGGCGGTTTGGCGGATATGCTGGCTACCCGCGCCTGGCCCTCGACGATCAACAATGTGAACGCGAAGT
 D L A E F I A W S Q D A K A Q Q Q M A L L Q G L A

GCTGGACGCGGAGTTTCATCGCTGGTCCCAGGATGCCAAGGCTCAACAGCAAATGGCGCTGCTGCAAGGCTTGGC
A D H P L R G F H A G N R D S L P V E S D D F Q H
GGCAGATCATCCCCTGCGCGTTTTCATGCCGGCAACCGCGACAGCTGCCGGTGGAAAGCGACGACTTTCAGCA
A L R G F H A R F Y Q S G Q M T L S L A G P Q S L
CGCCTTGCGAGGGTTCCACGCACGCTTTATCAAAGCGGGCAGATGACCTTGAGCCTCGCCGGTCCACAATCGCTG
A D L Q A L A Q Q F S D Q L T P G P L H P Q A A P
GCCGACCTGCAGGCCTTGGCCAGCAGTTCACTGACCAACTGACGCCCGGCCATTGCACCCGCAGGCCGCTCCA
P A L M H G P A R R Y Q H V A G Q H L H Q V I T C
CCGGCCTTGATGCATGGCCCGGCACGCCGTTATCAGCACGTCGCCGGCAACACCTGCATCAGGTCATTACCTGTA
N V P R E A L A F L C T W L N A S A P G G L L A E L
ACGTGCCACGGGAAGCGCTGGCGTTCCTGACCTGGCTAACGCCTCGGCCCGGGCGGGTTGCTCGCCGAAC
Q A R R L A T A L Q A S V L Y Q F A D Q A V L G D
GCAAGCAGACGCTGGCCACCGCTGCAGGCTCCGTGCTGTACCAATTCGCGGATCAAGCCGTGCTGGATA
I H F T L G S E R E P T T P I E E L L L D W L S F F
TCCACTTACTCTCGGCAGCGAGCGGAACCGACCACGCCGATCGAAGAGTTGCTTCTCGACTGGTTGAGCTTCTT
A A Q Q D W P A L R E E Y S A Q L Q R Q Q Q V S G
CGCAGCGCAGCAGGACTGGCCGGCCTACGCGAGGAATATTCGGCACAGCTTCAACGTCAGCAGCAGGTCAGCGG
A L Q L A R L D S E Q L E S G L S E S A V A A L K
TGCCTGCAACTGGCGGACTCGACAGCGAACAACCTGAAAGCGGCCTTCCGAATCGGCCGTTGCAGCGCTCAA
V I L G K I G T V D N F S S H W H L P A A N P F L
AGTGATTCTCGGCAAAATCGGCACTGTGGATAACTTCAGCAGTCACTGGCATCTGCCCGCTGCCAATCCGTTCTG
R A A E P L A N A G L I R G Q T S A H R G L R T F
CGCGCAGCCGAACCGCTGGCCAACCGCCGCTGATCCGCGGCAAAACCAGCGCCACCGTGGGTGCGCACGTT
A Q D R S R S R R E R S P M Q F S Q A L P D N D D
GCTCAGGATCGCTCGCGCAGCCGACGCGAACGTTCCCGGATGCAATTCAGCCAGGCGCTGCCGATAACGATGAC
E G A V Y V T A E G A L Y L Q W R F D S A V P P G
GAAGGTGCGGTCTATGTTACTGCGGAAGGCGCGTGTACCTGCAGTGGCGGTTTACTCGCGGTTACCACCGGGG
L E S L L G R L R E Q A R Q A G V E L S C E T I A
CTGAAAGCCTGTTGGGGCGGTTGCGGAACAGGCACGGCAGGCGGGGCTCGAGTTGCTTTCGAAACGATCGCC
T D W Q V K M H G L H E P M P A V L E A L A R C L
ACTGACTGGCAGGTGAAGATGCACGGCCTCCACGAGCCATGCCGGCGGTGCTTGAAGCGTTGGCGCGGTGCTG
S D S D E P L P P T A P V P M I A I R E L L K A L
AGTGACTCGGATGAACCTTTGCCACCGACCGCTCCCGTCCGATGATCGCCATCCGGGAACGCTCAAGGCGTTG
P A C C A G V Q P Q P Q P Q E T T A S W A T A R W
CCGTTGCTGCGCGGTTTCAGCCCCAGCCCCAGCCTCAGGAGACGACAGCATCATGGGCTACCAGCGCGTGGC
Q A L G A G L P P A C E A A I K A A A A R L P G Q
AGGCGCTGGGCGCTGGCCTGCCCCCGCTGTGAAGCCGCGATCAAAGCCGACGCGGCCCGGCTGCCTGGGCAAC
P A S L P Y T P H V L D G Q K H W H A V S T E S S
CGGCAAGCCTGCCTTATACACCTCACGTCCTTGACGGACAAAAGCACTGGCACGCAGTCAGCACCGAATCCAGCG
E A A L L L F C P T P T Q S L A D E A N W R L L G H
AAGCAGCGCTACTGTTATTTGCCAACGCAACTCAATCCCTCGCCGATGAAGCAACTGGCGGTTGCTCGGGCA
V L Q G P F Y Q R L R V E L Q I G Y A V F S G I R
CGTGCTCCAGGGCCGTTCTACCAGCGCTGAGAGTCGAACTGCAAAATCGGCTATGCCGCTTTCAGCGGCATCCGA
Q I N G Q T G L L F G V Q S P T L S L D G I V Q Q
CAGATCAACGGCCAAACCGGCCGCTGTTGTTGGGGTGCAGTCGCCACCCCTCTCCCTAGACGGCATCGTCCAACAGT
L Q A F L G Q L P S L I E R S P D L G N Q A L A Q Q
TGCAGGCCTTCTGGGGCAACTGCCGTCGTTGATCGAGCGCAGTCCCAGCTTGGGTAACCAGGCCCTCGCGCAGCA
F A A Q T Q P I N E A A D L L W H A H L A G H S S
GTTCCGGCGCCAGAGCAGCCATCAATGAAGCTGCCGACTTGTCTGGCATGCGCACCTGGCAGGCCATTTCGTC
G Y L E Q L P Q L I Q A C T R E D V Q R A A Q R L
GGGTTATCTGGAACAGCTTCCACAGTTGATCCAAGCGTGCACACGCGAGGATGTGCAGCGCGCCGCGCAACGACT
N D A A G G W Q C V A N G P R I S D D W Q A A P
CAATGACGCTGCAGGCGGCTGGCAATGCGTGGCAACCGGGCCGCTATCAGCGACGACTGGCAAGCAGCGCCGT
*
GATCATGGCAACCTGCAACAGGCTTTCACCAGGACAGCGCTAACTTGAATAAAAATGAGTAACATTCGCGCAGCAATAATCGAACATC
TCCAATGGGAGGTGGACTATATGIATTACTTGGTAGTGAACGTCATCCCTTGATAGGAGTAAGAATATGACCTGGTCCAAACCTGCTTACA
CIGATCTGCGFIATTGGITTCGAAGICACCATGTACTTCGCCAGCCGTTAAATGGCTGAGTGCACAAACGCTCGGTTCCGCCGGGGGCTTTTTCG
TTTTCAGCTGTGCTGATGGAGCGATCATGTTTTCAGATTTTTCAGTTCCCGCGCGGGGCTTCCCGCAGTGGAACTGCAACTGCGTIG
AACTGCGCAGGCTTTCGGATGGCAGCCTGCGGGCCAGGCGGTACCCAGTCATCCATCCGATCTCCGACGATGGCGTGAACCTGGGTGTC

TGTGCAACGCCTCTCCGGATATCCGCGCGCAGTTGCAAAGCTTCGCCCCATGCAACCGGGCCGCGCACTGCGGGACACCGGCATCGGCGCC
 ATCATCTCTATGGACAGCCAGATCGACCACACCACCGGCTGCTCAGCCTGCGTGAAGGCTGCCCGCACCAGGTTCTGGTGCACCGACATGGT
 CCATGAAGACCTGAGCACCGGTTTCCCGCTGTTC AAGATGCTCAGCCACTGGAACGGCGCCTGAGCTGGAACCGCATEGAGCTGGACCAGA
 GCTTCAGCATCCCGCCTGCCCAACCTGCGCTTCACGCCGTGCCCCTGCGCAGCGCAGCGCCACCCATAITCGCCCCACCGTTTCGACCCGCA
 CCGGGGGACAACATCGGCCGTGATCGTCGAAGACCTGCGCAGCGCGGCAAACTCTTCTACGCGCGGGCTGGGCAAGGTGACGCGCCAC
 TCCTGGAGATCATGGCCCGCAGTGTGTGCTGCTGGTGGACCGCACCTGTGGGAAGACGATGAAATGCAGCGTCTGGCGTGGGACCCGCT
 ACCGCGCGGAAATGGGCCACCTGGCGCAGAACGGCCCCGGCGCATGCTCGAAGTGTGGAACAGTTGCCCGCCAGCGCAAGGTGTCTGA
 TACATATCAACAACACCAACCCGATCTCGATGAAGACTCCGCCGAACGTGCCGAACCTGGTACGCGGAAAGGTGGAAGTGGCTTACGACGGA
 ATGAGTATTGAGCTGTAGGGCGAATCGCCACAAGCTCGCCCCACGAGCCTTGGCCCTTTTTCGTAGGAGCGGGCTTCCCGCGAAAGGGCT
 GCGCCCGGAGAAACACATGACCGACACCCCGCTGTCGCGCGCAATTCGAGCAGGCACTGCGCGCAAAAGCGCCTACTACCACATCCA
 TCACCCITATCACGTGGCGATGTATGAAGCGCGCGACCCCGCAGCAGATCCAGGCTGGGTCCCAACCGTTCTATTACCAGGTGAACA
 TCCCATGAAGGACGCGCGATCTCGCCAACCTGTCGGACCGGAGATTCCCGCGAAT**GGATCCA**

Εικόνα Π2 : Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *sup2*. Με κόκκινα γράμματα έχουν επισημανθεί οι θέσεις ένθεσης (ακολουθίες-στόχοι) του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη B163 και B91 με τη σειρά που εμφανίζονται στην εικόνα. Τα υπογραμμισμένα πλάγια γράμματα αντιστοιχούν στη μοναδική πιθανή θέση ενός μεταγραφικού υποκινητή, στην αρχή της αλληλουχίας του γονιδίου *sup2*. Οι ακολουθίες με το καφέ χρώμα αντιστοιχούν σε εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση των γονιδίων. Ο αριθμός καταχώρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της γονιδιωματικής περιοχής στην Genbank είναι JQ039398. Η αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί το γονίδιο *sup2* δίνεται πάνω από την νουκλεοτιδική αλληλουχία (με μπλε γράμμα έχει σημειωθεί η πρώτη μεθειονίνη). Τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του *sup2* παριστάνονται με καφέ έντονα γράμματα, ενώ τα κωδικόνια έναρξης και λήξης των υπολοίπων ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων έχουν σημειωθεί με έντονο μαύρο χρώμα. Η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *Bam*HI φαίνεται με έντονα μεγάλα γράμματα, στο τέλος της αλληλουχίας.

GGATCCAGCGCCCTGCTCGACCATGACGGCGCGCCCGGTGAAGACGGCG**GTATCGAAGCCTGGCTGCGCCTGGGCCA**GGCCGTG
 GGCTGGACCCCGACCAACTGCGCTCCAGGAGTGGTACTGCCCGCGTACGCTTCGCGGTGGACGCGCTATGTCAACTTCGCCCGCCGCGCC
 AGCTGGCAAGAAGCCCGCAGCAGCTCGTGTGACCGAGCTGTTCGCGCGCAAAATCCACCAGTTCGCGCCTCGACAGTTGGCCCGCAGCATTACCC
 GTGGATCGATCCGGCCGGTACGAGTACTTCCGCACACCGCTGGGCCAGGCCCGTCCGATGTGGAACACGGCTTGGCGATCACCCITCGAGC
 ACTACACCACCCCGAGGGGAGGCGCATGCTGGAAATCTCCAGTTC A AACTGGACATCCITCGAGCATGCTGGACGCCATGAGCATG
 GCCTACGAAC TCAAACGCCCGCGTATCACAGCGTIGACCGAAGCAG
 M S F D R S K K P T W R Q G Y R
 CGGGTATGGC**ATAAAGGGATCACCC**T**ATGAGCTT**TGATCGCAGCAAAAAACCGACCTGGCGCCAGGGCTATCGCT
 Y Q Y E P A Q K G H V L L Y P E G **M** I K L N D S A
 ACCA**GTACGAGC**CTGCTCAGAAAGGCCACGTGTTGCTCTACCCCGAAGGCATGATCAAGCTCAACGATAGCGCCG
 A L I G G L I D G E R D V A A I I A E L D K Q F P
 CATTGATCGGTGGCCTGATCGACGGCGAGCGCACGTTGCGGCAATCATTGCCGAGCTGGATAAGCAGTTCCCCG
 G V P E L G D D I E Q F **M** E V A R A E H W I T L A
 GTGTGCCAGAGCTGGGTGACGACATCGAGCAATTCATGGAGGTGCGCCGTGCTGAGCACTGGAT**CACCC**T**TGCCT**
 *
GAAAAACCGCCATCGGCCTGCCTCTGTGGCTGCTGGCCGAGCTGACCTATCGCTGCCGCTGCAGTGCCTGATT
 GCTCCAACCCGCTGGATTTCGCCGAGCAGGGCAAGGAG**CTGAGCACCGAACATGGATCAAGGTATTTC**GCGAGC
 R E **M** G A A Q L G F S G G E P L V R Q D L A E L I
 CCGTGAATGGGCGCAGCGCAGCTGGGTTTTCCGCGGGTGAACCGCTAGTACGCCAGGACCTGGCCGAACCTGAT
 G E A R K L G F Y T N L I T S G I G L T E Q K I S
 CGGCGAGGCCCGCAAGCTGGGTTTCTACACAAACCTGATCACCTTGGCATCGGCCTCACCGAACAAAAAATCAG
 D F K K A G L D H I Q I S F Q A S D E Q V N N L L
 CGACTTCAAGAAAGCCGGCCTGGACCATATCCAGATCAGCTTCCAGGCCAGTGACGAACAGGTGAACAACCTGCT
 A G S K K A F A Q K L E **M** A R A V K A H G Y P **M**
 GGCCGGCTCAAAAAAGCCTTCGCGCAAAAACTGGAATGGCCCGAGCGGTGAAA**GCCACGGC**TACCCGATGG
 V L N F V T H R H N I D K I D R I I E L C I A L E A
 TGCTGAACCTCGTACCCATCGCCACAATATCGACAAGATCGACCGCATCATCGAGCTGTGCATTGCGCTGGAAGC

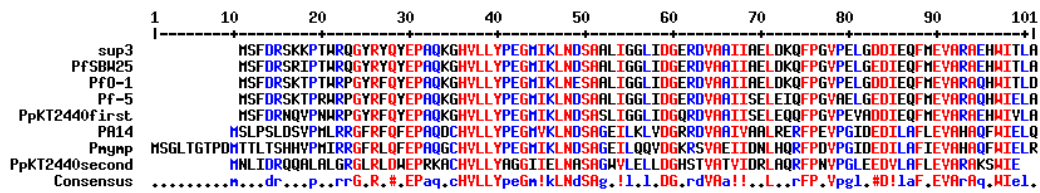
D F V E L A T C R F Y G W A Q L N R V G L L P T R
AGATTCGTCGAACCTGCCACCTGCCGGTCTACGGCTGGGCACAGCTCAACCGCTGGGCTTGCTGCCACCCCG
E Q L V R A E R I T Y E Y R A K L E A E G H P C K
GAGCAGTTGGTGCGCGCCGAACGCATCACCTATGAATACCGCGCCAAACTGGAAGCCGAAGGCCACCCCTGCAAG
L I F V T P D Y Y E E R P K A C M N G W G S I F L
CTGATCTTCGTGACACCAGATTATTACGAGGAGCGCCCCAAAGCCTGCATGAATGGCTGGGGTAGCATCTTCTCTGA
T V T P D G T A L P C H G A R Q M P V Q F P N V R
CAGTCACGCCCAGCGCACCCGCTGCCCTGCCACGGCGAGGCAGATGCCCGTGCAGTTCCCAATGTGCGCG
D H S M Q H I W Y D S F G F N R F R G Y D W M P E P
ACCACAGCATGCAGACATCTGGTACGACTCGTTTGGCTTCAATCGCTTTCGTGGCTACGACTGGATGCCTGAGCC
C R S C D E K E K D F G G C R C Q A F M L T G D A
ATGCCGTCATGCGACGAAAAAGAAAAGACTTCGGCGGCTGCCGTTGCCAGGCCCTTCACTACTGGTGACGC
S N A D P V C S K S E Q H G V I L Q A R E E A E H
CAGTAATGCCGACCCTGTATGCAGCAAATCCGAGCAGCAGGGCTCATCTGCAAGCGCGGGAAGAGGCCGAACA
A T Q T I E Q L A F R N E R N S R L I A K G *
TGCCACCCAGACCATCGAGCAACTGGCCTTTCGCAATGAGCGCAACTCAAGGCTCATTGCAAAAAGGCTGAGCGCC
TCAACGCTTGGCGATGATGTACACCGCGTGGATGATGCCAGGGA

Εικόνα Π3 : Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων *sup3* και *sup4*. Με κόκκινα γράμματα έχουν επισημανθεί οι θέσεις ένθεσης (ακολουθίες-στόχοι) του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη A150 και ρ26 με τη σειρά που εμφανίζονται στην εικόνα. Οι ακολουθίες με το καφέ χρώμα αντιστοιχούν σε εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση των γονιδίων. Ο αριθμός καταχώρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της γονιδιοματικής περιοχής στην Genbank είναι JQ039398. Η αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια *sup3* και *sup4* δίνονται πάνω από την νουκλεοτιδική αλληλουχία (με μπλε γράμμα έχει σημειωθεί η πρώτη μεθειονίνη). Με έντονα γράμματα καφέ χρώματος έχουν σημειωθεί τα κωδικόνια έναρξης και λήξης των γονιδίων *sup3* και *sup4*, ενώ με έντονα ροζ γράμματα έχουν σημειωθεί το κωδικόνιο έναρξης του *sup3* και το κωδικόνιο λήξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης ανωφερικά του *sup3*. Με έντονα μεγάλα γράμματα έχει επισημανθεί η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *Bam*HI.

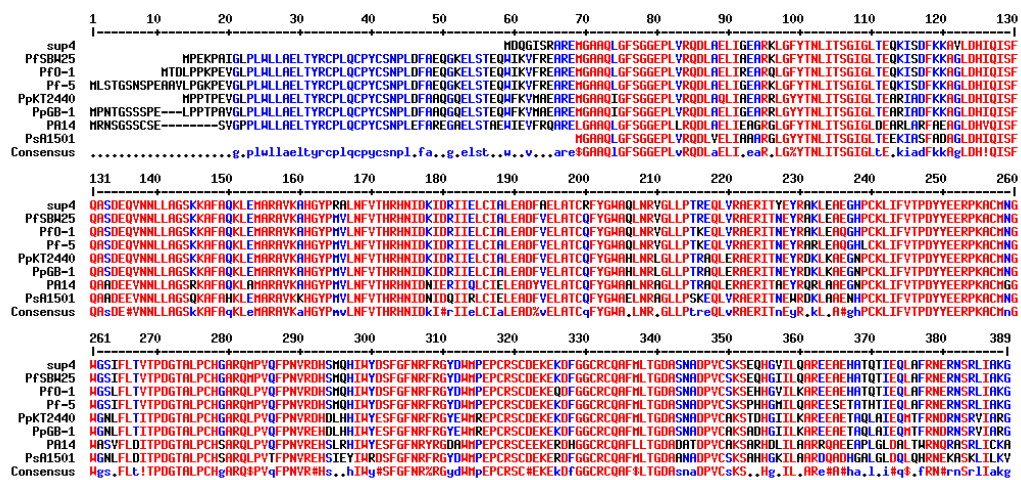
A T C A C C C T G I N T I C C C G G T C C T T T C A G G A G C C C T G C G C G C A G C A T G C C G C A C A G G A G G C T T T A T C T C A A C C A G C T A T T A C C C C T C A G
A G C A G G I C C T T G A G G G C T G A T C C A C A C C G T G C G T C G I G A G G C G T A C C T G A T G G G C T A C A G G A T G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

A L W D N L R V A M G E T V S E C V A M* N F E
 GCGTTGTGGGACAACCTGCGCGTGGCCATGGGCGAAA CGGT CAGT GAGT GCGT GGC ATG AACTTCGAAG
 V I E A D Q A Q W F E V T S E R G I T L S V F K D T
 TGATCGAGGCCGACCAGGCCCAATGGTTTGTAGGTGACCTCTGAACCGGTATCACGCTGTCCGTCTTCAAAGACAC
 L D P V T K T G V R T R L V R F H P G G G T R E I
 ATTGGACCCTGTTACGAAAACCGGAGTGCCTACAGTCTGGTACGTTTTCACCCTGGGGGCGGCACCCGTGAAATC
 Y T H D Y H E E V Y S I E G A Q T E Q A S E G R P
 TATACCATGATTATCACGAAGAAGTGTATTTCGATTGAAGGCCCCAGACAGAGCAGGCCAGT GAGGGGCGCC
 E K T Y R D G S Y F F R A A H T E H G P F N S K D
 GGAGAAAACCTACCGCGACGGTAGTTACTTCTCAGGGCCGCACACCGGAGCACGGGCCGTTTAATTCGAAAGA
 G C L L F E V H Y Y *
 CCGATGCCTGTTGTTTGAAGTGC ACTACTACTGA GTATCATGAATAAAGGAAGTAGT CATGAGAGCTGAAGCATATCAATCGTT
 TCCGAGTCGTTGGGAGGAAAGGGCGACCATTCGGACCGCCCGAGACGACGCTTGGGAAGATGACGAAAAGTTAATATTCCGGCCAGTCTGTC
 AACCATTTGGTCATGAGCGTACCTTTATGCAGGAGTGTAGTCACTTACAGCATTTTGTCTCGTTTCAGAGCTTGTATAAGTTCATTAATGATGT
 CGTGATTTTCGAAACCGAAATGTTCGACAAGACCGCCAGGACATTCGGAAGATAACTTCGCTATCCGCTTTCGGTTTGGCTGGCGTTACGA
 CCGGATGACCGTGGTCTGATGAGGACTATCACCGCTAGTGGCGATGGACTACATGCAACAGACCATCGAGTTGACGGGCATCGAACCA
 TCACCTTCCAGCCGAAAATCGAGCTCAGCCGTTCAATCCCAAGGCATTCGCCATGCCGCCGCCACCTCAAGGCCCTGTCGAGCTGATCT
 CCGTGGCCATTCGCGAAAACACCCCTGACCAACGATGTTCGCCGCTTTCGCCCGCAGCAGCTCGGTC AAGGCATCGGTC AAGGGGTGATGGCC
 GACCACITGGCGGATGAGGGTTCGACATTCGGGCTTTCGGCC AAGTTCAGCGCATTTACITGGAATACCCGAGCGGAAGAGGACAAGCGTGT
 CTTCGGCTCGATCATGCCCGTGTCTGGGTGAGTACCTGACCAACGAGATCCAGCAGGGGTTCGATTTCGGCTGATCGAGCAACTTCGGCT
 GAGCCCCAGCGTCAAGCGCGTTCGCTGAAGAGGTTCGAAGGCATGAGTTTCCGATCACCGCTTCACCCGCTGGTGGCAACATCGTCC
 GATTCITCAAACACAGCGCCCTGCTCGACGCTCCCTGCATGCAGGAAGCGCTCGCCGATTATCTCGCCTAGAGGACAACITCGATGAGACAT
 CTTGATATCGTTTGTTCGGGCGCAGCCATGCGCTCGCTGCCCTTACGCAAGAGTTGGAACAGATGGGGCACACCGCCCGCTTGTGACCAGC
 GATAACCGCGTTGAGCTTTGCCAGTGTTCGGCGCCGACGTCGTGATAGACGACGCCAGCAGCGCGCAACTCCCGCACTATCCGCTGTCGAT
 CACTGTCTTTCGGGCGCAGGCTAACGATGCGAGTGTGTTTCGCCGCCCTGCAGGTGGACTGCTGTGGCGTCCGCGGATGGCGACTGG
 ATGCTGCTGGGCGTGTGAAGTTCAGCCCTCCCTCGCCGCCAACGGTGGCCGACCGGCACGTGAAGCGATCGCCAGT

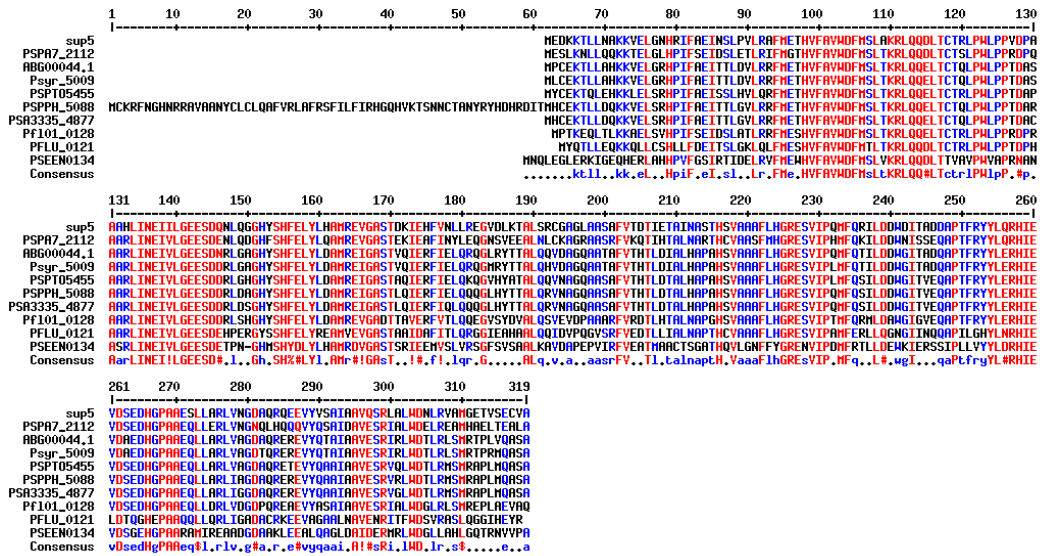
Εικόνα Π4 : Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των *sup5* και *sup6*. Με κόκκινα γράμματα έχει επισημανθεί η ένθεση του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη ρ93 και δ40, με τη σειρά που εμφανίζονται στην εικόνα. Οι ακολουθίες με το καφέ χρώμα αντιστοιχούν σε εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση του γονιδίου. Ο αριθμός καταχώρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της γονιδιοματικής περιοχής στην Genbank είναι JQ039399. Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί καθένα από τα γονίδια *sup5* και *sup6* δίνεται πάνω από την νουκλεοτιδική αλληλουχία (με μπλε γράμμα έχει σημαθεί η πρώτη μεθειονίνη). Με έντονα γράμματα καφέ χρώματος έχει σημαθεί το κωδικόνιο έναρξης του *sup5* και το κωδικόνιο λήξης του *sup6*, ενώ με έντονα ροζ γράμματα έχουν σημαθεί το κωδικόνιο έναρξης του *sup6* και το κωδικόνιο λήξης του *sup5*. Με έντονα γράμματα μαύρου χρώματος έχουν σημαθεί τα κωδικόνια έναρξης και λήξης των αναγνωστικών πλασίων που βρέθηκαν ανωφερικά του γονιδίου *sup5* και κατωφερικά του γονιδίου *sup6*. Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα, μαύρου χρώματος, έχει σηματοδοτηθεί η αλληλουχία του μεταγραφικού υποκινητή που προβλέφθηκε.



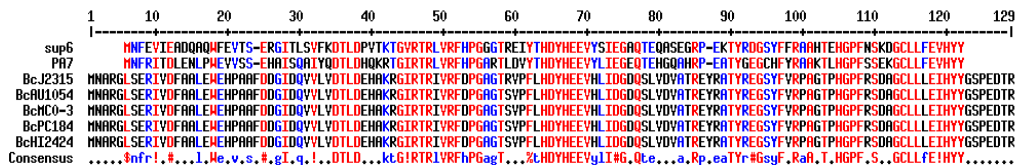
Εικόνα Π8 : Στοιχίση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Sup3 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες PqqD από το γένος *Pseudomonas* (PfSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, PA14: *Ps. aeruginosa* PA14, Pf-5: *Ps. fluorescens* pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* pf0-1, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, Pmymp: *Ps. mendonica* ymp). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



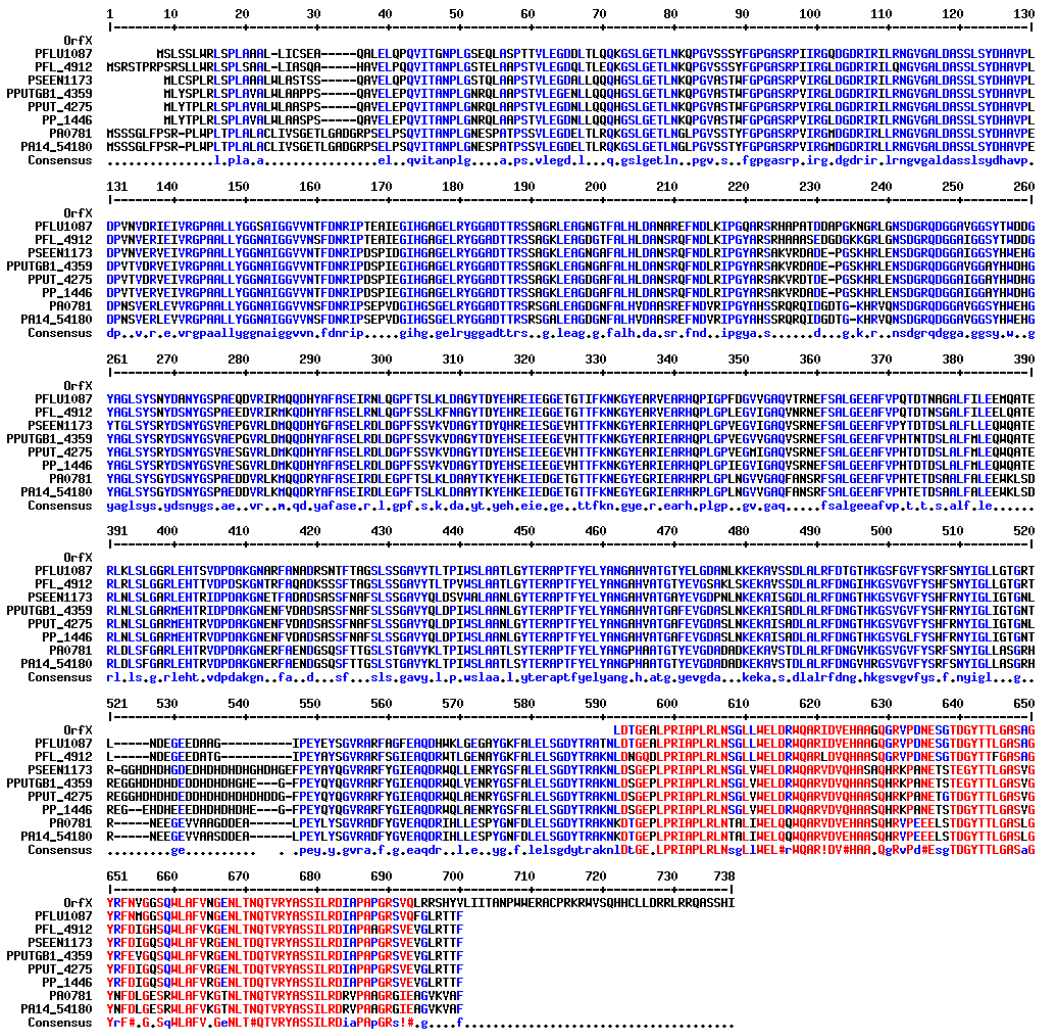
Εικόνα Π9 : Στοιχίση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Sup4 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες PqqE από το γένος *Pseudomonas* (PfSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, PA14: *Ps. aeruginosa* PA14, Pf-5: *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, PsA1501: *Ps. stutzeri* A1501, PpGB-1: *Ps. putida* GB-1). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



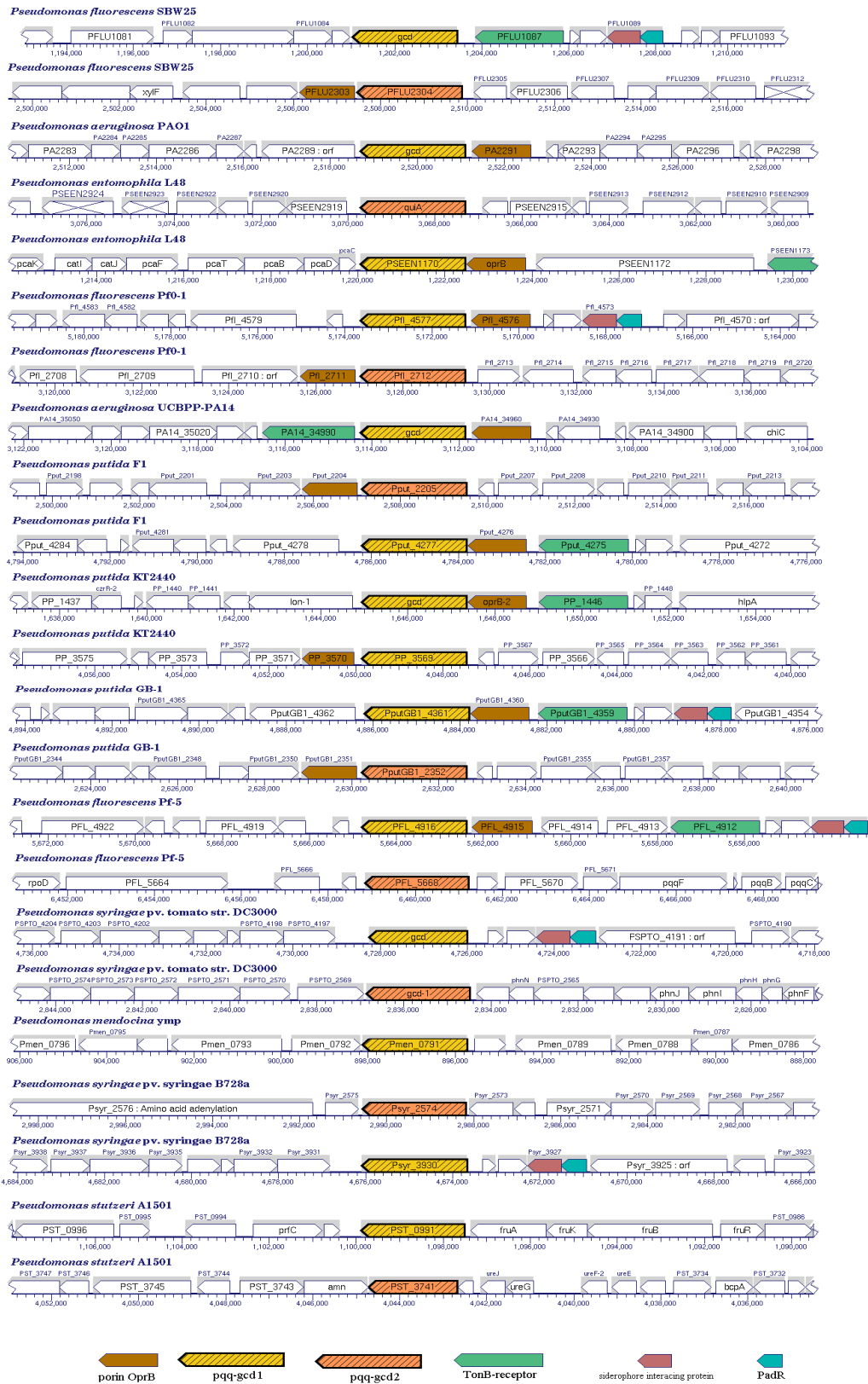
Εικόνα Π10 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Sup5 με τις πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα από το γένος *Pseudomonas* . Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (Pfl01_0128: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PFLU_0121: *Ps. fluorescens* SBW25, PSPA7_2112: *Ps. aeruginosa* PA7, PSEEN0134: *Ps. entomophila* L48, PSA3335_4877: *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335, PSPTO_5455: *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, PSPPH_5088: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola strain* 1448A, Psyr_5009: *Ps. syringae* pv. *syringae strain* B728a, ABG00044.1: *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



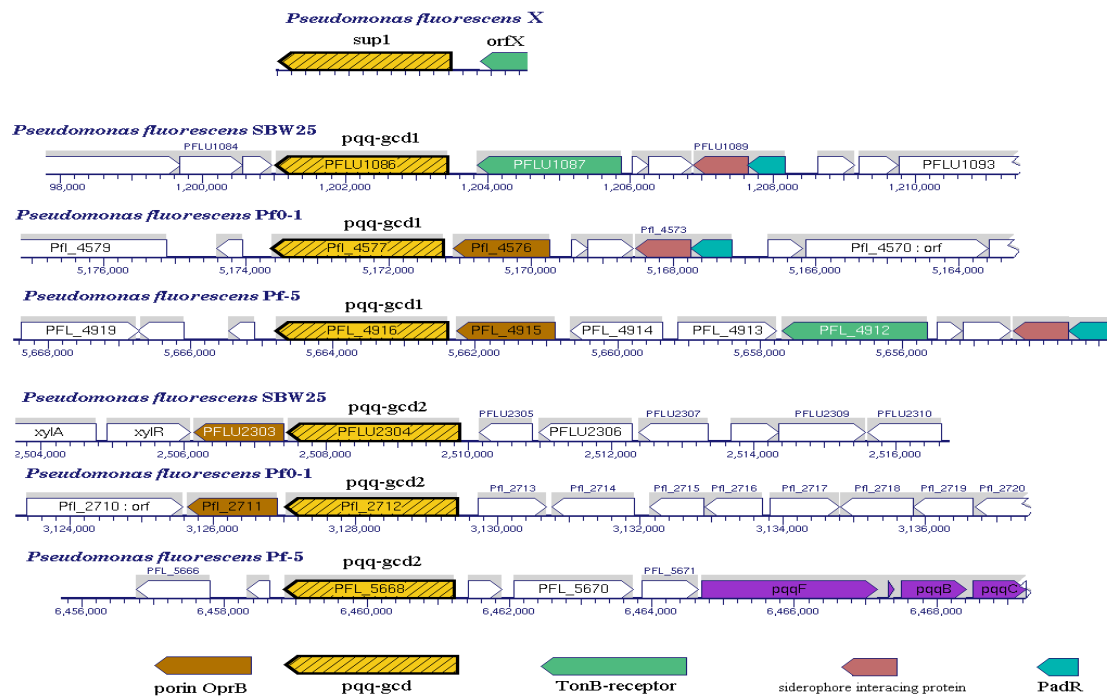
Εικόνα Π11 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Sup6 με τις πρωτεΐνες cupin2 με τη μεγαλύτερη ομοιότητα (PA7: *Ps. aeruginosa* PA7, BcJ2315: *Burkholderia cenocercacia* J2315, BcAU1054: *B. cenocercacia* AU 1054, BcMC0-3: *B. cenocercacia* MC0-3, BcHI2424: *B. cenocercacia* HI2424, BcPC184: *B. cenocercacia* PC184). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



Εικόνα Π12 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης OrfX με τις ταυτοποιημένες υδρολάσες από το γένος *Pseudomonas*. Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (PFL_4912: *Ps. fluorescens* Pf5, PFLU1087: *Ps. fluorescens* SBW25, PSEEN1173: *Ps. entomophila* L48, PPUT_4275: *Ps. putida* F1, PP_1446: *Ps. putida* KT2440, PPUTGB1_4359: *Ps. putida* GB-1, PA0781: *Ps. aeruginosa* PAO1, PA14_54180: *Ps. aeruginosa* UCBPP-PA14). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



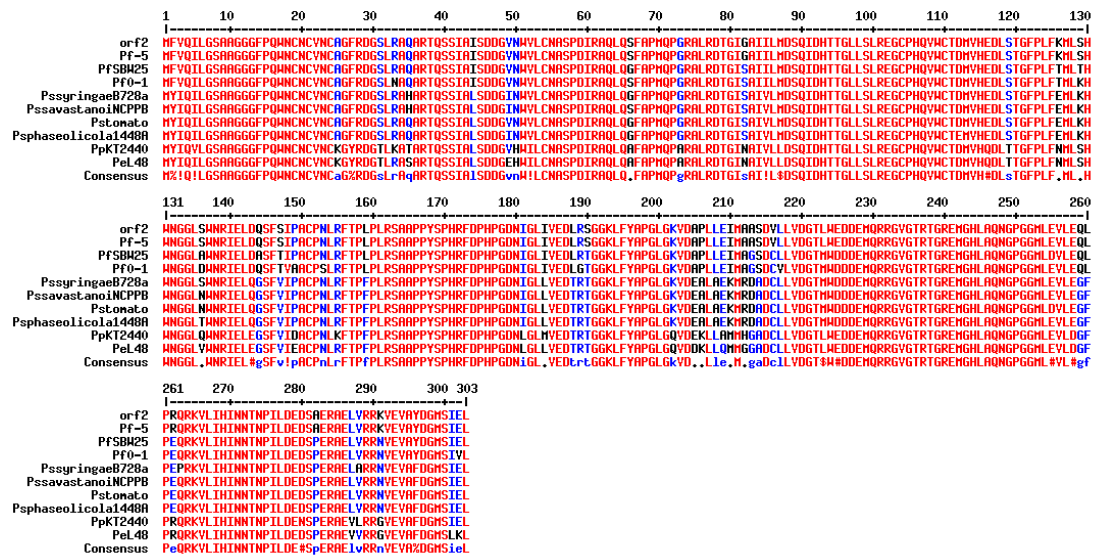
Εικόνα Π13: Η γονιδιοματική οργάνωση της περιοχής ανωφερικά και κατωφερικά των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες PQQ-Gcd1 και PQQ-Gcd2 σε όλα τα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Στο κάτω τμήμα της εικόνας υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ γονιδίων και σχημάτων-χρωμάτων. Η ύπαρξη ενός γκρι πλαίσιου, πάνω ακριβώς από τα γονίδια, υποδηλώνει σπερόνιο (Keseler *et al.*, 2009).



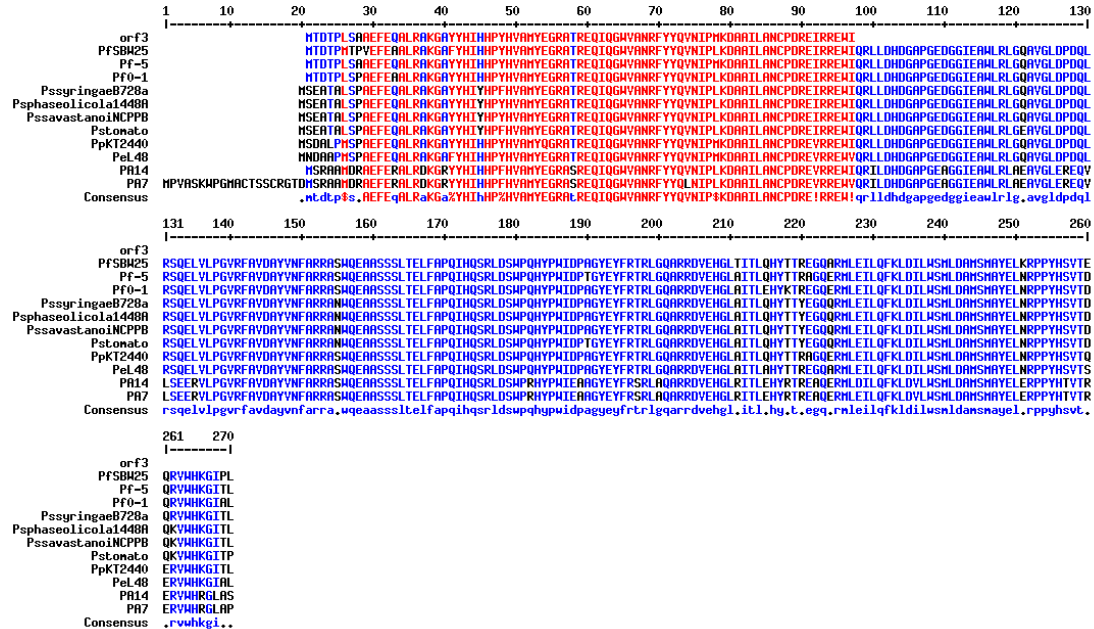
Εικόνα Π14 : Η γονιδιωματική οργάνωση της περιοχής ανωφερικά και κατωφερικά των γονιδίων *pqq-gcd1* και *pqq-gcd2* στα στελέχη του είδους *Ps. fluorescens*. Στο κάτω τμήμα της εικόνας υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ γονιδίων και σχημάτων-χρωμάτων. Η ύπαρξη ενός γκρι πλαισίου, πάνω ακριβώς από τα γονίδια, υποδηλώνει σπερόνιο (Keseler *et al.*, 2009).

	1	10	20	24
orf1	NTWSKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
PfSBW25	NTWSKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
Pf-5	NTWSKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
PssyringaeB728a	NSWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
Pstomato	NSWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
Pspphaseolicola1448A	NSWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
Pf0-1	NAWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFASR			
PpkT2440	NWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFANR			
Pmymyp	NWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFANR			
PeL48	NWTKPRAYTDLRIGFEVNTMYFANR			
PA14	NWTKPSFTDLRLGFEVNTLYFANR			
PA7	NWTKPSFTDLRLGFEVNTLYFANR			
Consensus	.NWTKPa%TDLRIGFEVNT\$YFAnR			

Εικόνα Π15 : Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf1 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες *pqqA* από το γένος *Pseudomonas* (PfSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, PA14: *Ps. aeruginosa* PA14, PA7: *Ps. aeruginosa* PA-7, Pf5: *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* *pff0-1*, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, PssyringaeB728a: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, Pmymyp: *Ps. mendocina* ymp, Pstomato: *Ps. syringae* pv. *tomato*, PeL48: *Ps. entomophila* L48, Pspphaseolicola1448A: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.

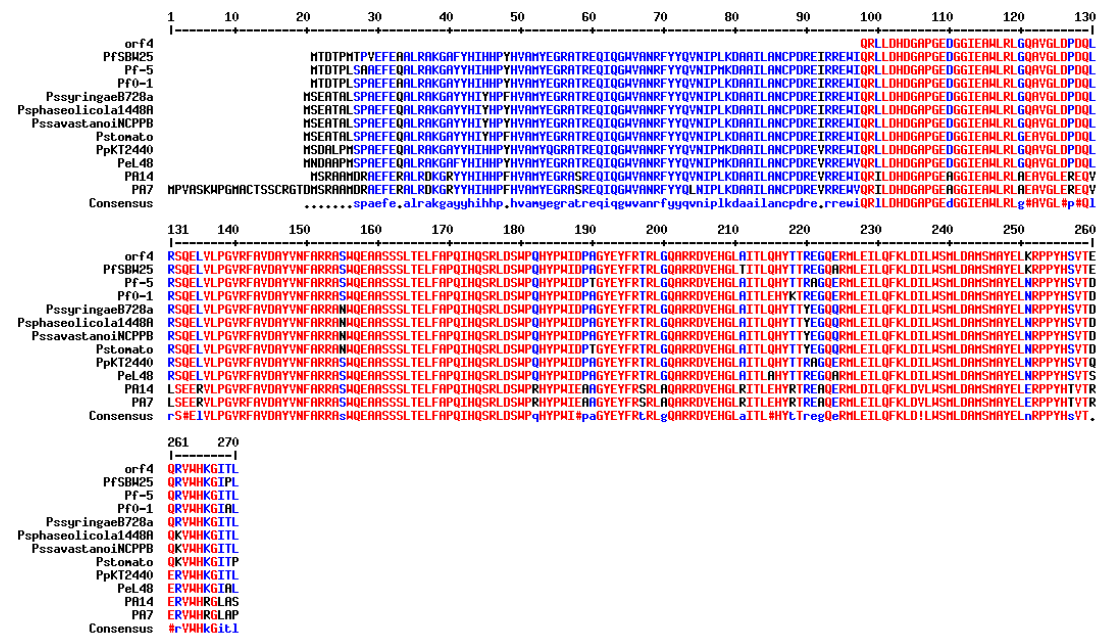


Εικόνα Π16 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf2 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες pqqB από το γένος *Pseudomonas* (PfSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, Pf5: *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* pf0-1, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, PssyringaeB728a: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, , Pstomato: *Ps. syringae* pv. *tomato*, PeL48: *Ps. entomophila* L48, Pspaseolicola1448A: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, PssavastanoiNCPBP: *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPBP 3335). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.

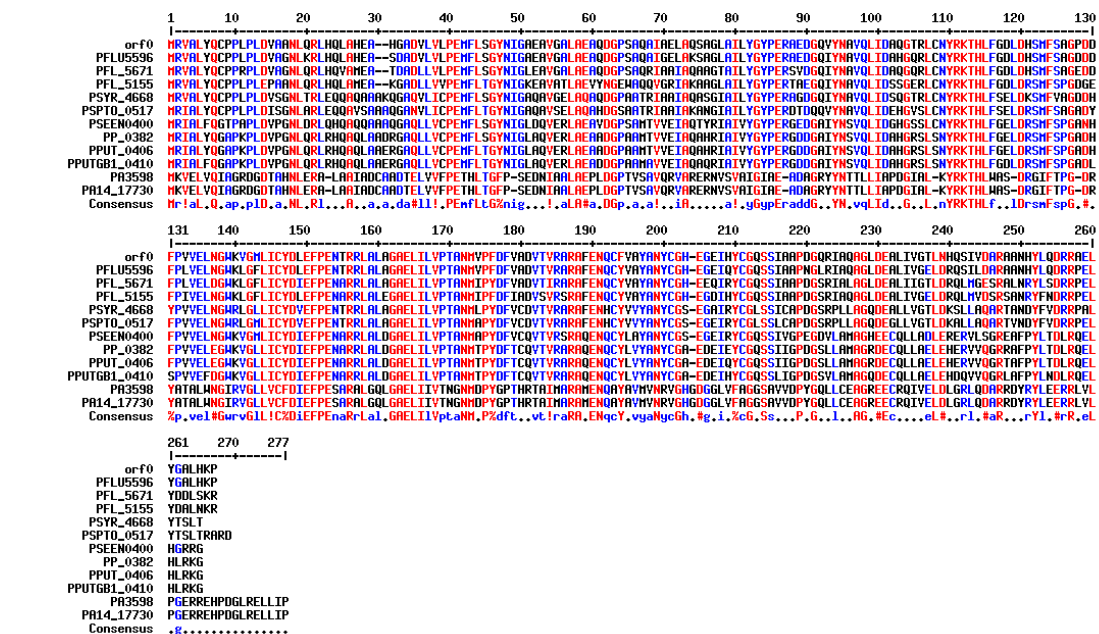


Εικόνα Π17 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf3 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες pqqC από το γένος *Pseudomonas* (PfSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, Pf5: *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* pf0-1, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, PssyringaeB728a: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, , Pstomato: *Ps. syringae* pv. *tomato*, PeL48: *Ps. entomophila* L48, Pspaseolicola1448A: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, PssavastanoiNCPBP: *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPBP 3335, PA14: *Ps. aeruginosa* PA14, PA7: *Ps. aeruginosa* PA-7). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του

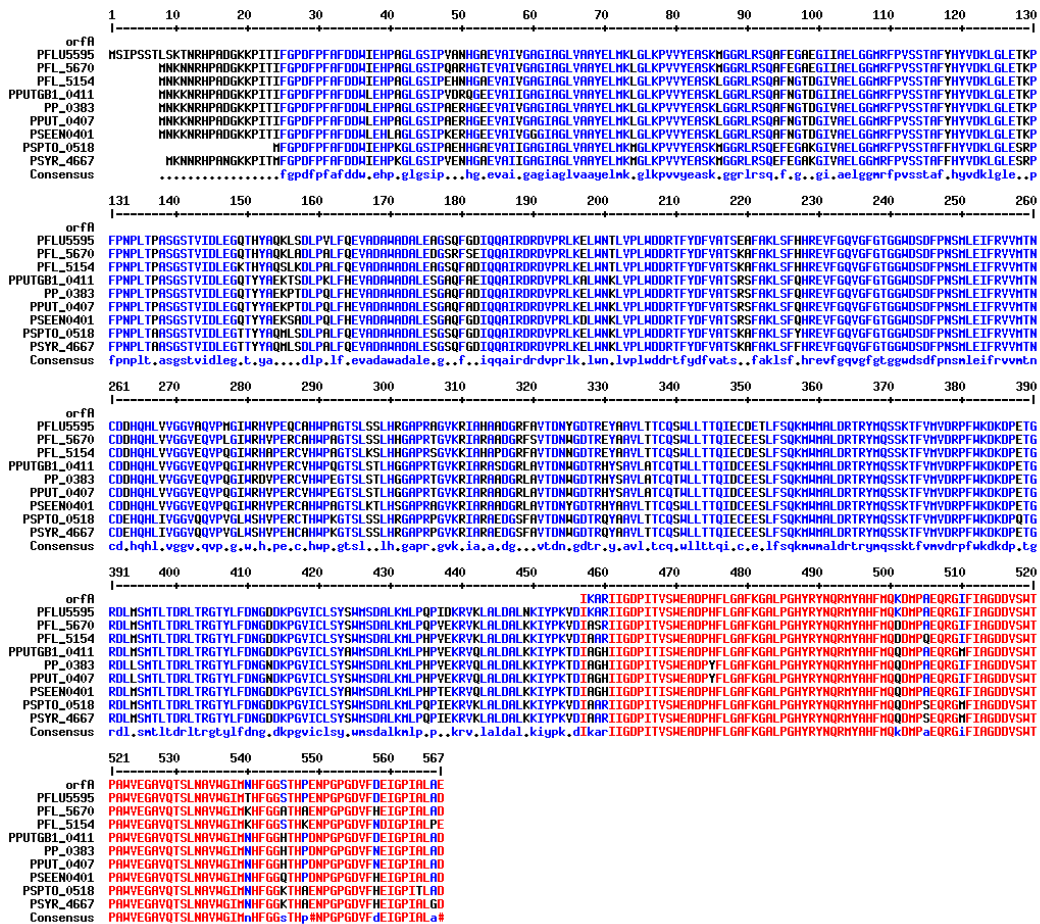
κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



Εικόνα Π18 : Στοιχισή της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf4 με ορισμένες από τις ταυτοποιημένες rraC από το γένος *Pseudomonas* (PFSBW25: *Ps. fluorescens* SBW25, Pf5: *Ps. fluorescens* Pf5, Pf0-1: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PpKT2440: *Ps. putida* KT2440, PssyringaeB728a: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, Pstomato: *Ps. syringae* pv. *tomato*, PeL48: *Ps. entomophila* L48, Pspphaseolicola1448A: *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, PssavastanoiNCPFB: *Ps. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPFB 3335, PA14: *Ps. aeruginosa* PA14, PA7: *Ps. aeruginosa* PA-7). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.



Εικόνα Π19 : Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf0 με τις ταυτοποιημένες υδρολάσες από το γένος *Pseudomonas*. Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (PFL_5155: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PFL_5671: *Ps. fluorescens* Pf5, PFLU5596: *Ps. fluorescens* SBW25, PSEEN0400: *Ps. entomophila* L48, PSYR_4668: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, PSPTO_0517: *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, PPUT_0406: *Ps. putida* F1, PP_0382: *Ps. putida* KT2440, PPUTGB1_0410: *Ps. putida* GB-1, PA3598: *Ps. aeruginosa* PAO1, PA14_17730: *Ps. aeruginosa* UCBPP-PA14). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.

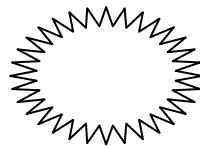
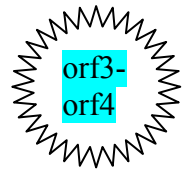


Εικόνα Π20 : Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης OrfA με τις ταυτοποιημένες υδρολάσες από το γένος *Pseudomonas*. Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (PFL_5154: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PFL_5670: *Ps. fluorescens* Pf5, PFLU5595: *Ps. fluorescens* SBW25, PSEEN0401: *Ps. entomophila* L48, PSYR_4667: *Ps. syringae* pv. *syringae* B728a, PSPTO_0518: *Ps. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, PPUT_0407: *Ps. putida* F1, PP_0383: *Ps. putida* KT2440, PPUTGB1_0411: *Ps. putida* GB-1). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.

ACATCAAGGCGCGCATCATCGGGGACCCGATCACCGTGTCTGGGAGGCGGACCCGCATTTCTCGG
GGCCTTCAAAGGTGCCITGCCCCGTCACCTATCGTTACAACCAACGGATGTAATGCGCACTTCAATGCAG
AAGGATATGCCCGCCGAACAGCGCGGGATCTTCATCGCGGGTGTATGATGATCGTGGACGCCTGCC
GGTTCGAAGGCGCGGTACCAACCTCGTCAACCGGTTATGGGCAATCATGAACCACTCGGTGGCA
GCACCCAGCGGAGAACCCAGGCCAGCGACGTTCGATGAAATAGGGCAATCGCCCTGGCAG
AATAA GGAGTTGAGCATGCGTGTGCCCCGTACCAATGCCCGCCGCTGCCGCTGGATGTGGCCGCTA
ACCTGCAGCGCCTGCACCAACTGGCCCATGAGGCACACGGCGCCGATGTGCTGGTGTGCCAGAGAT
GTTCTCAGCGCTATAACATTGGCGCCGAAGCCGTTGGCGCACTGGCCGAGGCACAGGATGGGCCA
TCGGCGCAGGCGATTGCCGAAGTGGCGCAAAGTGCCGGGCTGGCGATCCTGTATGGCTACCCGGAAC
GGGCCGAAGACGGCCAGGTCTACAACGCCGTGCAGTTGATCGATGCCAGGGCACGCGCCTGTGCA
ATTACCCGAAGACCCACTTGTTGGCGATCTTGACCACCGATGTTTCAGCGCCGCCCCGATGATTTT
CCGGTGGTGAATTGAACGGTTGGAAGGTAGGCATGTGATTTGCTACGACCTGGAGTTTCCGGAAA
ACACCCGCGCCTGGCCCTCGCCGTTGCCGAAGTACTGTTGTTGCCACCCGCAATGGTGGCGTT
CGACTTTGTTGCCGACGTCACCGTGGCGGCGGAGCCTTTGAAAACAGTGTTTTGTGGCCTATGCCA
ACTACTGCGGGCACGAAGGCGAGATTCACTACTGCGGGCAAAGCAGCATTGCCGCGCCGACGGCC
AGCGAATTGCCAGGCCGGCCTGGATGAAGCCTGATCGTGGCACCCCTGAATCACAATCTATTGT
CGACGCCCGCGCCGCAACCACTACTTGCAAGACCGTGGCGCCGAACCTACGGCGCACTGCACAAG
CCCTGA CCCATTGGGTTTGTAGCATAGGCACTTCCACGCTCGGAAGTGGCC ATGCTGCGCCGG
TTACCCCTATCCCCTTCACTGACCCTGCCAATGCCCTGCGGGTTTGCCTGCGCCTGCGCCACGG
TTGAAACGTCGCGCCGCTTTTACACGTGGCTGCCGACCCATGACGTGCCATTGGCCTGGCCTG
GGCTGGCGCATTTTCTGAGCACTTGTGTTTCTCGGTACCGAGCATTTCGGCGCGGCGAAAGGGCTG
ATGGCCTACGTGCAGCGCCACGGTGGTCAACGCCAGCACCCGTGAGCGCACCCAGGTTCT
TCTTTGAACTGCCGGTGGCGTTTTCGAGACGGGCTGGCGCGTTTGGCGGATATGCTGGCTCACCCG
CGCCTGGCCCTCGACGATCAACAATGTGAACGCGAAGTGTGGACGCGGAGTTCATCGCCTGGTCCC
AGGATGCCAAGGCTCAACAGCAAAATGGCGTGTGCAAGGCTTGGCGGCAGATCATCCCCTGCGCG
GTTTTCATGCCGGCAACCCGACAGCCTGCCGTTGGAAGCGACGACTTTCAGCACGCCTTGGAGG
TTCCACGACGCTTTTATCAAAGCGGGCAGATGACCTTGAGCCTCGCCGTTCCACAATCGCTGGCC
GACCTGCAGGCCTTGGCCAGCAGTTCAGTGACCAACTGACGCCGGCCATTGCACCCGACGGCCG
CTCCACCGCCTTGTATGCATGGCCCGCACGCCGTTATCAGCACGTCGCCGGCCAAACACTGCATCA
GGTCATTACCTGTAACGTGCCACGGGAAGCGCTGGCGTTTCTCTGCACCTGGCTCAACGCCTCGGCC
CCGGCGGGTTGCTCGCCGAAGTGAAGCAGCAGACTGGCCACCGCGCTGCAGGCGTCCGTGCTGTA
CCAATTGCGGATCAAGCCGTGCTGGATATCCACTTTACTCTGGCAGCGAGCGCAACCGACCAC
GCCGATCGAAGAGTTCTCTGACTGGTTGAGCTTCTCGCAGCGCAGGACTGGCCGGCCTGCGGCACTA
GCGGAGGAATATTCGGCACAGCTTCAACGTGACGACAGGTGAGCGGTTGCAACTGCGCCGAC
TCGACAGCGAACAACCTCGAAAGCGGCCTTCCGAATCGGCCGTTGACGCGCTCAAAGTGATTCTCGG
CAAAATCGGCACTGTGGATAACTTCAGCAGTCACTGGCATCTGCCCGTGGCAATCCGTTCTGCGC
GCAGCCGAACCGCTGGCCAAACGCCGCTGATCCGCGCCAAACCAGCGCCACCGTGGGCTGCGC
ACGTTGCTCAGGATCGCTCGCGCAGCCGACGCGAAGCTTCGCCGATGCAATTCAGCCAGGCGCTGC
CGGATAACGATGACGAAGGTGCGGTCTATGTTACTGCGGAAGGCGCGCTGTACCTGCAGTGGCGGTT
TGACTCGCGGTTACCACCGGGCTGGAAGCCCTGTTGGGGCGGTTGCGCGAACAGGCGACGGCAGGC
GGCGTTCGAGTTGCTTTCGAAACGATCGCCACTGATGGCAGGTGAAAGATGACAGCCCTCCACGAG
CCCATGCCGGCGGTGCTTGAAGCGTTGGCGCGGTGTCTGAGTGACTCGGATGAACCTTTGCCACCGA
CCGCTCCCGTGCCGATGATCGCCATCCGGGAAGTGTCAAGGCGTTGCCCGCTTGTGCGCGGGTGT
CAGCCCCAGCCCCAGCCTCAGGAGACGACAGCATATGGGCTACCGCGCGCTGGCAGGCGCTGGGC
GCTGGCCTGCCCCCGCCTGTGAAGCCGCGATCAAAGCCGACGCGGCCCGGCTGCCTGGGCAACCGG
CAAGCCTGCCTTATACCTCACGTCTTGACGGACAAAAGCACTGGCACGCAGTCAGCACCGAATC
CAGCGAAGCAGCGCTACTGTTATTTGCCAACGCCAATCAATCCCTCGCCGATGAAGCCCACTGG
CGTTGCTCGGCGCAGTGTCCAGGGGCGTTCTACAGCGCTTGAGAGTCAAAATCGGCT
ATGCCGTTTACGCGCATCCGACAGATCAACGGCAAACCGGCCTGTTGTTGGGGTGCAGTCGCC
CACCTCTCCCTAGACGGCATCGTCCAACAGTTGCAGGCTTCTGGGGCAACTGCCGTCGTTGATCG
AGCGCAGTCCGACTTGGGTAACCAGGCCCTCGCGCAGCAGTTCGCGGCCAGACCCATCA
ATGAAGTGCAGACTTGTCTGGCATGCGCACCTGGCAGGCCATTGTCGGGTTATCTGGAACAGCT
TCCACAGTTGATCCAAGCGTGCACACGCGAGGATGTGCAGCGCGCCGCGCAACGACTCAATGACGCT
GCAGGCGGCTGGCAATGCGTGGCAACGGGCGCGTATCAGCGACGACTGGCAAGCAGCGCGCTGA
TCATTGCCAACCCCTGCAACAGGCTTCTCCACCGAGACAGCGCTAACTTGAATAAAATTGAGTAACA
TTGCGCAGCAATATCTGAACATCTCCAAATGGGAGGTGGACTATATGTATTACTTGGTAGTGAACGTC
CCATCCCTTGATAGGAGTAAGAAT ATGACCTGGTCCAAACCTGCTTACACTGATCTGCGTATT
CCGTTAA TTGGCTGAGTGACACAACGCCTCGGTTCCGCCGGG
CGTTTTTGTGTTGAGCTGTGCTTGTATGGAGCGATCATGTTTGTCCAGATTTTAGGTTCCGCCCGCCGGC
GGTGGCTTCCCGCAGTGGAAGTGCACCTGCGTGAAGTGGCAGGCTTTCGCGATGGCAGCCTGCGG
GCCCAGGCGCGTACCCAGTCAATCCATCGCATCTCCGACGATGGCGTGAAGTGGGTGCTGTGCAACG
CCTCTCGGATATCCGCGCAGTTGCAAAGTCTGCCCCATGCAACCGGGCGCCGACTGCGGGA
CACCGCATCGGCGCATCATCTCATGGACAGCCAGATCGACCAACACCACCGCCTGTGACGCTG
CGTGAAGGCTGCCCGCACAGGTTGTTGCACCGACATGGTCCATGAAGACCTGAGCACCGGTTTCC
CGCTGTTCAAGATGCTCAGCCACTGGAACGGCGGCTGAGCTGGAACCGCATCGAGCTGGACCAGA
GCTTACAGCATCCCCGCTGCCCAACCTGCGCTTACGCGCTGCCCTGCGCAGCGCAGCGCCACCC
TATTGCCCCACCGTTTCGACCCGCACCCGGGGGACAACATCGGCCGTGATCGTCAAGACCTGCGCA



GCGGCGGCAAACCTCTTCTACGCGCCGGGCTGGGCAAGGTGACGCGCCACTCCTGGAGATCATGGC
 CGCCAGTGTATGTGCTGCTGGTGGACGGCACCTGTGGGAAGACGATGAAATGCAGCGTCGTGGCGTG
 GGCACCCGTACCGGGCCGGAAATGGGGCCACCTGGCGCAGAACGGCCCCGGCGGCATGCTCGAAGTG
 CTGGAACAGTTGCCCCGCCAGCGCAAGGTGCTGATACATATCAACAACACCAACCCGATCCTCGATG
 AAGACTCCGCCGAACCTGCCGAACCTGGTACGCCGAAAGGTGGAAGTGGCTTACGACGGAATGAGTA
 TTGAGCTGTAGGGCGAATCGCCACAAGCTCGCCCCACGAGCCTTGGCCCTTTTGGCTAGGAGCGGG
 CTTGCCCGCGAAAGGGCTGCCCGCCGAGAACACACATGACCGACACCCCGCTGTCCGCCGCCGAAT
 TCGAGCAGGCACTGCGCGCCAAAGGCGCCTACTACCACATCCATCACCCTTATCACGTGGCGATGTA
 TGAAGCCGGGCGACCCGCGAGCAGATCCAGGGCTGGGTGCGCAACCGGTTCTATTACCAGGTGAA
 CATCCCCATGAAGGACGCGGCGATCCTCGCCAACCTGTCCGGACCGGGAGATTGCGCGGAATGGA
TCCAGCGCCTGCTCGACCATGACGGCGCGCCCGGTGAAGACGGCGGTATCGAAGCCTGGCTGCGC
 CTGGGCCAGGCCGTGGGCCTGGACCCCGACCAACTGCGCTCCAGGAGTTGGTACTGCCCGGCGTAC
 GCTTCCCGTGGACGCCTATGTCAACTTCGCCCCGCCGCGCCAGCTGGCAAGAAGCCGCCAGCAGCTC
 GTTACCGAGCTGTTGCGCGCCGAAATCCACCAGTGCAGCCTCGACAGTTGGCCCCAGCATTACCCG
 TGGATCGATCCGCGCGTTACGAGTACTTCCGCACACGCTGGGCCAGGCCCGTCCGCGATGTGGAAC
 ACGGCTTGGCGATCACCCCTGCAGCACTACACCACCCGCGAGGGGGCAGGAGCGCATGCTGGAATCTT
 CCAGTTCAAACCTGGACATCCTCTGGAGCATGCTGGACGCCATGAGCATGGCCTACGAACTCAAACGC
 CCGCGTATCACAGCTGACCGAACAGCGGGTATGGCATAAAGGGATCACCTATGA**GCTTTGATCG**
 CAGCAAAAAACCGACCTGGCGCCAGGGCTATCGCTACCA**GTACGAGCT**TGCTCAGAAAAGGCCACGT
 GTTGTCTACCCCGAAGGCATGATCAAGCTCAACGATAGCGCCGATTGATCGGTGGCTGATCGAG
 GCGGAGCGCGACGTTGCGGCAATCATTGCCGAGCTGGATAAGCAGTTCCCGGTTGTCAGAGCTGG
 GTGACGACATCGAGCAATTCATGGAGGTCGCCGTGCTGAGCACTGGAT**CACCCTTGCTGA**AAAAAC
 CAGCCATCGGCCCTGCCTCTGTGGCTGCTGGCCGAGCTGACCTATCGCTGCCCGCTGCAGTGCCCGTAT
 TGCTCCAACCCGCTGGATTTCGCCGAGCAGGGCAAGGAGCTGAGCACCGAACAATGGATCAAGGTA
 TTTCCGCGAGCCCGTAAATGGGCGCAGCGCAGCTGGGGTTTTCCGGCGGTGAACCGCTAGTACGCCA
 GGACCTGGCCGAACCTGATCGGCGAGGCCCGCAAGCTGGGTTTCTACACAAACCTGATCACCTCTGGC
 ATCGGCTCACCGAACAAAAAATCAGCGACTTCAAGAAAAGCCGGCCTGGACCATATCCAGATCAGCT
 TCCAGGCCAGTGACGAACAGGTGAACAACCTGCTGGCCGGCTCCAAAAAAGCCTTCGCGCAAAAAAC
 TGGAATGGCCCGAGCGGTGAAA**GCCCACGGC**TACCCGATGGTGTGTAACCTTCGTCACCCATCGCC
 ACAATATCGACAAGATCGACCGCATCATCGAGCTGTGCATTGCGCTGGAAGCAGATTTGCTCGAACT
 CGCCACCTGCCGGTCTACGGCTGGGCACAGCTCAACCCGCTGGGCTTGCTGCCACCCCGCGAGCAG
 TTGGTGGCGCGCCGAACGCATCACCTATGAATACCGCGCCAAACTGGAAGCCGAAGGCCACCCCTGCA
 AGCTGATCTTCGTGACACCAGATTATTACGAGGAGCGCCCCAAAGCCTGCATGAATGGCTGGGGTAG
 CATCTTCTGACAGTACGCCCCGACGGCACCGCCCTGCCACGGCGCGAGGCAGATGATGATGATGATG
 CAGTTTCCCAATGTGCGCGACCACAGCATGCAGCACATCTGGTACGACTCGTTTGGCTTCAATCGCTT
 TCGTGGCTACGACTGGATGCCTGAGCCATGCCGTTTCATGCGACGAAAAAGAAAAGGACTTCGGCGGC
 TGCCGTTGCCAGGCTTCATGCTCACTGGTACGCCAGTAATGCCGACCCTGTATGCAGCAAATCCG
 AGCAGCACGGCGTATCCTGCAAGCGCGGGAAGAGGCCGAACATGCCACCCAGACCATCGAGCAAC
 TGGCCTTTCGCAATGAGCGCAACTCAAGGCTCATTGCAAAAAGGCT**TGAGCGCCTCAACGCTTGGCGAT**
GATGTACACCGCTGGATGATGCCAGGGA

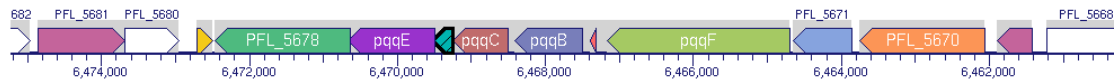


Εικόνα Π21 : Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονδιακού τύπου που περιέχει τα γονίδια βιοσύνθεσης της pqq. Με κόκκινα γράμματα έχουν επισημανθεί οι θέσεις ένθεσης (ακολουθίες-στόχοι) του Tn5-RL27 στα μεταλλαγμένα στελέχη B91, B163, A150, ρ26 με τη σειρά που εμφανίζονται στην εικόνα. Τα υπογραμμισμένα πλάγια γράμματα αντιστοιχούν στη μοναδική πιθανή θέση ενός μεταγραφικού υποκινητή, η οποία βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία του *orf0*. Οι ακολουθίες με το καφέ χρώμα αντιστοιχούν σε εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση των γονιδίων. Τα κωδικόνια έναρξης και λήξης των γονιδίων που εμφανίζονται έχουν σημειωθεί με έντονο μαύρο, καφέ ή ρόζ χρώμα. Η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *BamHI* φαίνεται με έντονα μεγάλα γράμματα. Οι ακολουθίες των γονιδίων, από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης, έχουν επισημανθεί με διαφορετικό χρώμα για το κάθε γονίδιο. Με κίτρινα γράμματα έχει επισημανθεί η μοναδική θέση μεταγραφικού υποκινητή, έτσι όπως προβλέφθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος πρόβλεψης αλληλουχίας μεταγραφικών υποκινητών προκαρυωτικών συστημάτων (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

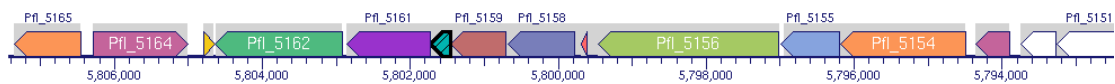
Pseudomonas fluorescens X



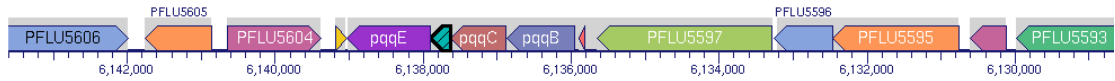
Pseudomonas fluorescens Pf-5



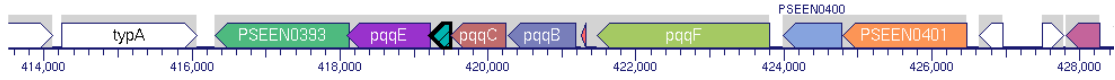
Pseudomonas fluorescens Pf0-1



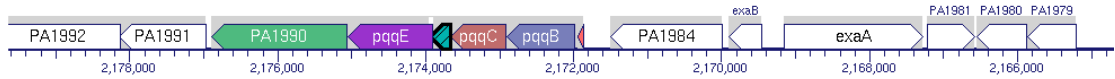
Pseudomonas fluorescens SBW25



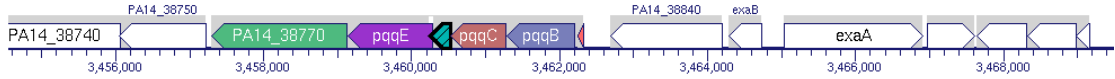
Pseudomonas entomophila L48



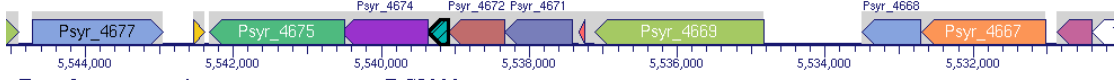
Pseudomonas aeruginosa PAO1



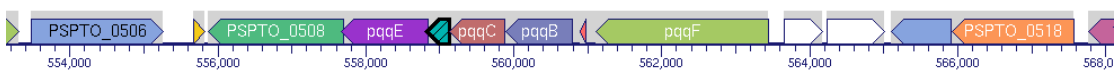
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14



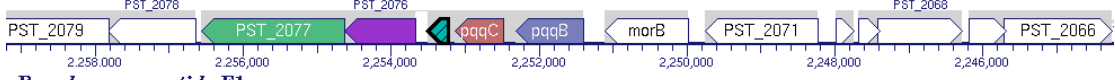
Pseudomonas syringae pv. *syringae* B728a



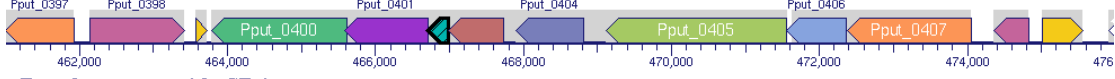
Pseudomonas syringae pv. *tomato* str. DC3000



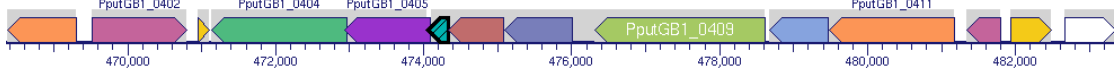
Pseudomonas stutzeri A1501



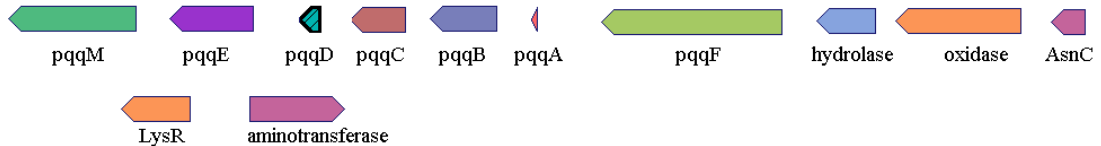
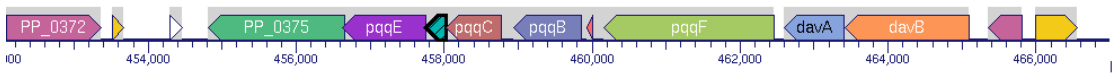
Pseudomonas putida F1



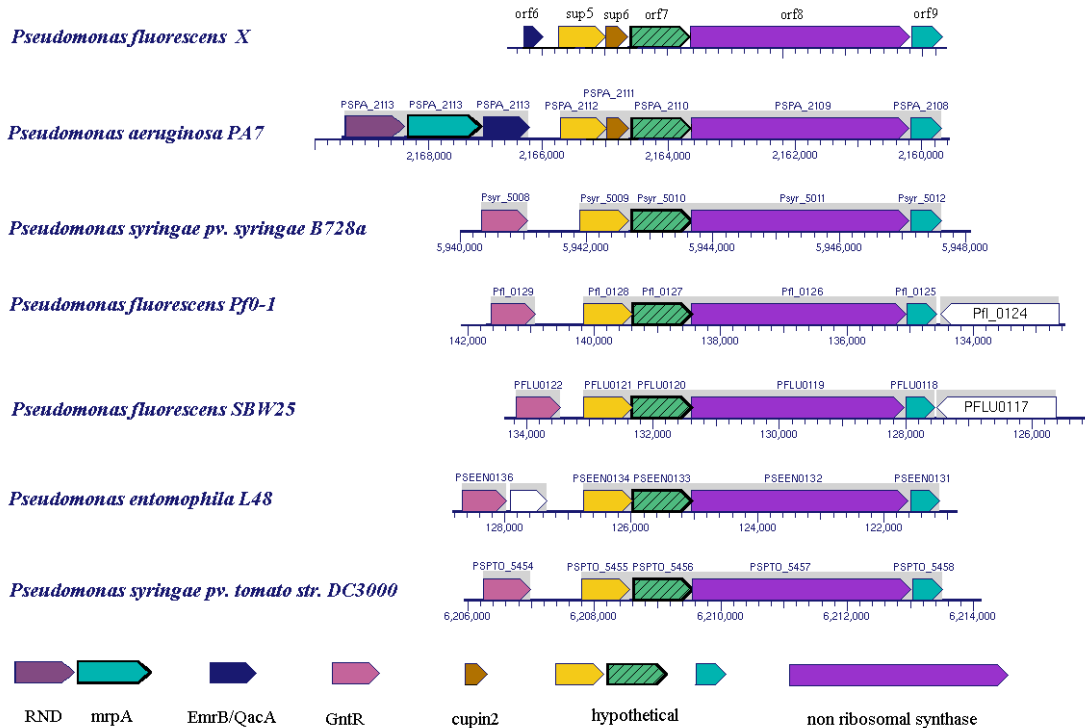
Pseudomonas putida GB-1



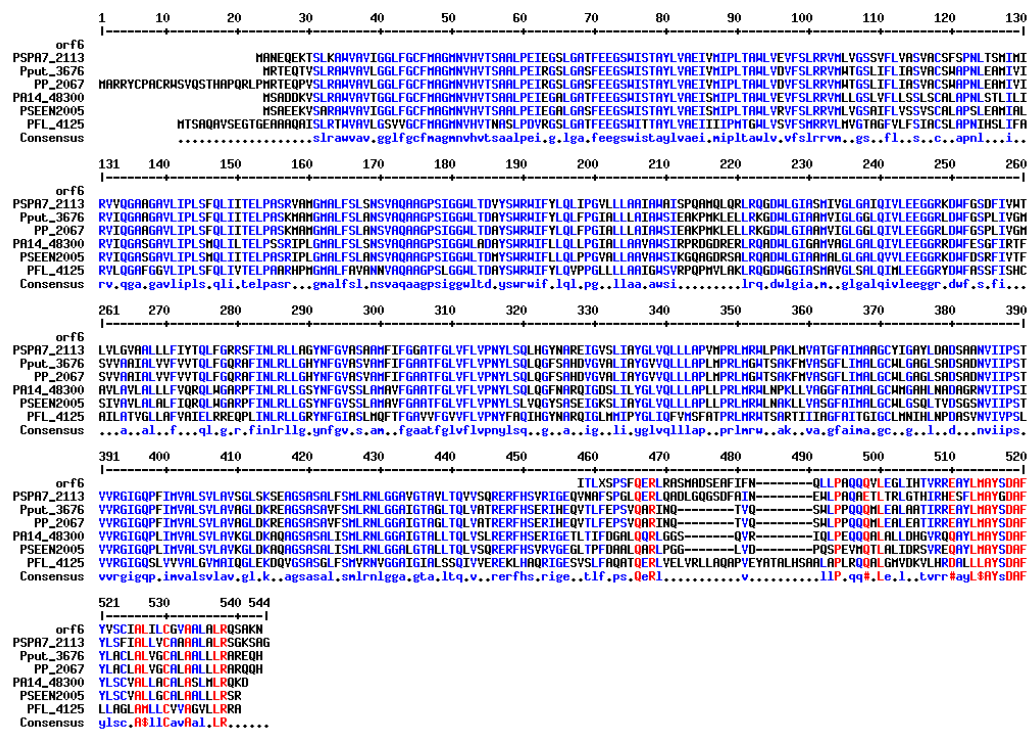
Pseudomonas putida KT2440



Εικόνα Π22 : Γονιδιοματική οργάνωση των γονιδίων pqq στα γένη *Pseudomonas*. Στο κάτω τμήμα της εικόνας υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ γονιδίων και σχημάτων. Η ύπαρξη ενός γκρι πλαισίου υποδηλώνει οπερόνιο (Keseler *et al.*, 2009)



Εικόνα Π23 : Το υποθετικό οπερόνιο X στα γένη *Pseudomonas*. Στο κάτω τμήμα της εικόνας υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ γονιδίων και σχημάτων. Η ύπαρξη ενός γκρι πλαισίου υποδηλώνει οπερόνιο. (Keseler *et al.*, 2009)



Εικόνα Π24 : Στοιχία της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf6 με τις πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα από το γένος *Pseudomonas*. Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (PFL_4125: *Ps. fluorescens* Pf5, PP_2067 :*Ps. putida* strain KT2440, PA14_48300: *Ps. aeruginosa* strain UCBBP-PA14, PSPA7_2113: *Ps. aeruginosa* PA7, PSEEN2005: *Ps. entomophila* L48,

Pput_3676: *Ps. putida* F1) Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130																																																																																																						
orf7	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I
PSPA7_2110	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
PSEEN0133	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
PSPPH_5089	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
PSA3335_4878	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
Psyr_5010	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
Pf101_0127	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
PFLU_0120	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
Consensus	M	R	E	Y	Q	S	F	S	E	E	R	A	T	I	R	P	R	R	L	E	D	E	K	L	F	P	S	R	O	P	L	V	G	A	T	F	H	O	E	C	S	H	L	H	Q	F	V	L	V	S	L	Y	K	F	I	N	D	V	I	F	E	T	E	T	V	D	K	T	A	R	S	I	A	K	D	N	F	I	R	F	P	F	A	C	R	Y	D	A	N	T	V	V	D	E	D	Y	H	A	L	V	A	N	D	F	H	A	Q	T	I	E	L	T	G	I		
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260																																																																																																						
orf7	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
PSPA7_2110	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
PSEEN0133	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
PSPPH_5089	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
PSA3335_4878	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
Psyr_5010	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
Pf101_0127	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
PFLU_0120	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
Consensus	E	P	T	L	P	A	E	T	E	L	S	R	I	P	A	R	L	A	P	E	L	K	S	A	V	E	L	I	C	V	A	I	E	N	T	V	D	V	A	F	A	R	D	S	V	K	S	V	K	L	H	A	D	H	L	D	E	G	R	H	S	F	A	R	L	T	R	I	Y	N	H	T	A	S	E	D	K	R	V	L	A	S	T	P	V	F	L	G	E	V	L	T	N	E	I	Q	G	F	D	A	L	I	E	L	Q	P	S	P	S	V						
	261	270	280	290	300	310	315																																																																																																													
orf7	K	A	L	R	E	E	V	E	G	S	F	P	T	P	S	H	P	L	V	G	N	I	R	F	F	K	S	G	L	D	A	P	C	H	E	R	L	A	D	Y	L	R																																																																										
PSPA7_2110	R	S	A	L	K	E	E	V	L	G	V	P	I	N	Q	H	P	L	L	G	N	L	R	F	F	R	H	S	G	L	D	S	P	C	L	D	A	L	S	O	V	L	P																																																																									
PSEEN0133	R	S	A	L	R	E	E	V	L	G	V	P	I	N	Q	H	P	L	L	G	N	L	R	F	F	R	H	S	G	L	D	S	P	C	L	D	A	L	S	O	V	L	P																																																																									
PSPPH_5089	K	Q	A	L	K	E	T	R	A	V	S	F	P	V	N	R	H	A	P	L	I	G	N	I	R	F	F	K	S	S	L	D	D	P	C	V	O	R	A	L	D	V	P	Q	G	T	L	Q																																																																				
PSA3335_4878	K	Q	A	L	K	E	T	R	A	V	S	F	P	V	N	R	H	A	P	L	I	G	N	I	R	F	F	K	S	S	L	D	D	P	C	V	O	R	A	L	D	V	P	Q	G	T	L	Q																																																																				
Psyr_5010	K	Q	A	L	K	E	T																																																																																																													

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
orf8	MRLDIVLGRSHRLACLTOELFOMGHTARLLTSDMAYVELCQLSAPVLDQASRTRQLPH---	VPSCHMLSLRAQNRSDVDFRFLQVQDCLLRPGDGDMLLGRVRESELAGNAGDARREINQVFM												
PSPA7_2109	MKRLTQLLGHRRALLRLARELEENHGSVTL--SEVAF--	ATPDLIDGSGQPPR--	CPARR--L	LQRLASAPAGSRVARGGTTSRATGNAETREYRDTLLD										
PSPT0_5457	MKRLTIVLIGHSLTSELNELLGHGVRHLSDQQLDALTYPPGGVLEGGSLDSEELNAGHCTQLR	VGFSGKALDHGLPRLLELLCHHGAPARRLTVKHLAVESGNGRVLRRDVAHVVDL												
Psyr_5011	MKRLTIVLIGHSLTSELNELLGHGVRHLSDQQLDALTYPPGGVLEGGSLDSEELNAGHCTQLR	VGFSGKALDHGLPRLLELLCHHGAPARRLTVKHLAVESGNGRVLRRDVAHVVDL												
PSA3335_4879	MKRLTIVLIGHSLTSELNELLGHGVRHLSDQQLDALTYPPGGVLEGGSLDSEELNAGHCTQLR	VGFSGKALDHGLPRLLELLCHHGAPARRLTVKHLAVESGNGRVLRRDVAHVVDL												
Pf01_0126	MKRLDILLRGRSRLTDLRAELFQHG--	SLTETFPSSMLVDDGSLRPDQ--	HGTPTFLRLRIGTAGGGPLPDLCLCNSI--	LSKVPFADPSSGNGRVLRRDVAHVVDL										
PSEEN0132	MKRLDILLRGRSRLTDLRAELFQHG--	SLTETFPSSMLVDDGSLRPDQ--	HGTPTFLRLRIGTAGGGPLPDLCLCNSI--	LSKVPFADPSSGNGRVLRRDVAHVVDL										
PfL00119	MKRLTIVLIGHSLTSELNELLGHGVRHLSDQQLDALTYPPGGVLEGGSLDSEELNAGHCTQLR	VGFSGKALDHGLPRLLELLCHHGAPARRLTVKHLAVESGNGRVLRRDVAHVVDL												
Consensus	MrLr.I.L.G.S.a.l...e.e#hGh.....al.....d.l!#dGSl.....lSLr.g.a...gpl.l.lle.g.....rl.....e.sGmG..lr..A.a.lvS.													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
orf8	RSVHIGRFSRSDVLEPPREPM--	ATDRSSLTLLDGLARHARHNSATGILEARPPVYQRLADSLANAEKRALKYDGRMSYALHAY--	CDPRTLAPLLE--	STPGLTVYVLSLTKPKTALYAR										
PSPA7_2109	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
PSPT0_5457	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
Psyr_5011	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
PSA3335_4879	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
Pf01_0126	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
PSEEN0132	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
PfL00119	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
Consensus	val.lsr.srd.#yl...p...p...r...g#.l.#.laf.HrFn.ta.p.l.l.a...p...r...s.l.l..AERpAl...g...s.y.q.h.a.s.aiq..l..pLe.a...p..!g!eS.Ks.aLzA.i													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
orf8	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
PSPA7_2109	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
PSPT0_5457	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
Psyr_5011	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
PSA3335_4879	LVLYGQVGRSDELREAPPSAS--	TPEDRLSELERHAFGRNLRTRCQALLEGAGSFEVRSQSLRAHRESALRHARGASVYALHAYSLTAQERLSDLEGGADTSPPTIGLSEKGLAVAGI												
Pf01_0126	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
PSEEN0132	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
PfL00119	VHLVYRFSRDEVEFQARETARR--	DFEQVEMLLDLSLRYVHRNATANPALLDQADTTPYIERQASLEHARFALHLAEQSTYVQLHDSRRIQRQLNHLERQPA--	PAVYGLTKPKDGLFAST											
Consensus	lAlLlGcGhYlPLp.hP.#Rq.q.i.l..agA.l.l.l.hdgshp1.....p.lD!..l.....l.....apCnAlXlSgTlGpKqVLLgq.NLshF.hWzA..v.l.e.sRvLQ													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
orf8	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
PSPA7_2109	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
PSPT0_5457	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
Psyr_5011	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
PSA3335_4879	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
Pf01_0126	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
PSEEN0132	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
PfL00119	FTSIFDASLIDIPITLQAGELVPTDQRDPVALREIQEQVTHAFPPALLSTIQELSLYGNHLYTGGVCEPHVIEQLVGHFALHNYGPTETVTLAT	CRFGORNNKLNLPPIANTATYLL												
Consensus	fst..sFdAsl..iDlPtl..GaEl!vD#dRRDP.q.v.li.q...t.hAFPLPllSlp1#.lg..hl.TGGDCEPHVI.g.gqc.lHMLYgPTeTvl.T.r.gcdsNnL6.PiNsqvlll													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
orf8	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
PSPA7_2109	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
PSPT0_5457	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
Psyr_5011	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
PSA3335_4879	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
Pf01_0126	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
PSEEN0132	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
PfL00119	DEHGGVYVNDGSELHAGPVGAGYGLAQNTREYRHLPEGQVRYLRYTGDALRETEGIIQIGRLNOVKIRGFRVEPEIEHLRQSSQLFRALVYDTHORLHAFSOPGEGGQARSELQA													
Consensus	d#.lPv.#.q..GELVgPvGvLgYlNnpqita#z..l.lPdG.l.rA.rYrGd.akh.#Gt.l.GR.DnQlKlRgFRvPEIEHLr.sqLzRQvYVlD.qr!laf.eqp.....a...l.a													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
orf8	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
PSPA7_2109	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
PSPT0_5457	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
Psyr_5011	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
PSA3335_4879	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
Pf01_0126	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
PSEEN0132	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
PfL00119	YALKHLPDYRHSYSPYCLLDRPATANGKVDKRALRDLVNYKTOGKPLAPQNTARQLLELSRLLDLPGDISVDSFFNLGGHSLLSQHLGTRAFKGVSTNRFLEQPTLVNLANIDQOVERTA													
Consensus	ha.q.lPvYs.P.g..lp.#P..aNGlDRkAl.l.P.....p.t.a.e..l.l.lA.eLlP...#iS.D#SFFNLGGHSLLSR#lG.R4.FGr.sINRFLE.PT..tA.lId.dg....													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
orf8	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
PSPA7_2109	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
PSPT0_5457	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
Psyr_5011	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
PSA3335_4879	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
Pf01_0126	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
PSEEN0132	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
PfL00119	TVSPQALQDHRMPELVLPISTRLGNLKIYVYTGNGFVGHIDIVEALLLGSTEVRLVRESGNSHQRFEDALDNRLEHLDRSKVYLRADIKRPLGLSEQDYEMDREYVLYNNAHVNYL													
Consensus	..s.q.l.DR..l.vLP.srIG#hKvYvTgNsFVGHl...VEALL.G#ateIAClYrE...gA.qRF...lr#rlehLdLsR!..yAAdit.PrLGL.ea.Ze.l.d.eZg#vNNAHVNYL													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
orf8	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
PSPA7_2109	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
PSPT0_5457	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
Psyr_5011	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
PSA3335_4879	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
Pf01_0126	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
PSEEN0132	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSKKIFNFVSTLSRCSVDGQGRVLEPPAPPPIYIRNGYMLSKVGERILNNSGSHVYLYRPGNIAFNTRTGVCPQPNRMLHLKGSLLQKVPPELALNFDF													
PfL00119	DYSELKONVTPVLECLQCEGRSK													

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0-f9   NQHFEPDILVNPVSPVAVSIVNEDARSVHNVGDFAGFAKTPALSHIEHTGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSHDDQAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVPQEP-NHSLATATIGDGY
PSPA7_2108 NKTFFPOTLIRNPVGHPPVAVDITPAAAEVHNVGNFAGPVPFAPALSHIEHTGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-KRSTATATIGDGF
PSEEN0131 NQALKPTLIRNPEGCKVYSRVEIAPAAAVHNVGNFAGPVPFAPALSHIEHTGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-NHSRATATIGDGF
PFL01_0125 NSMLKPTLIRNPHGCHVYSSVEVPDARQVHNVGNFAGPVPFAPALSHIEHTGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-GKSRATATIGDGF
PSPPH_5091 HSTLHSMKPTLIRNPNVSCRVSASVEVPGNARSVHNVGNFAGPVPFAPALSDIEVTEGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-DACVRAHTIVADPV
PSYR_5012 NHTLHSMKPTLIRNPNVSCRVSASVEVPGNARSVHNVGNFAGPVPFAPALSDIEVTEGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-DACVRAHTIVADPV
PSPTO_5458 NHHIILKPTLIRNPHGCHVYSSVEVPDARQVHNVGNFAGPVPFAPALSDIEVTEGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-HTCVRAHTIVADPV
PFLU_0118 NKPLQPTLIRNPHGCHVYSSVEVPDARQVHNVGNFAGPVPFAPALSHIEHTGEGVRSYKLFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEVVESTAP-SGSRATATIGDGF
Consensus .....1.PDTLIRNP.gc.vv.v.1...A..vN.VGNFaG...FAPALshIEHTG.Gv.svRkKIFKQGNVYIEQLNSRDDAHHTHSLIYTSLNIGNLHAEV...g...sRATia#P.

131     140     150     16#62
-----|-----|-----|-----|
0-f9   TGGKEDVPAFPAFLQGFADDAKIVQALFW
PSPA7_2108 QG--DILEGFQAFLOGFADDAKIVQALFPAA
PSEEN0131 EGGHEALPGFQAFLOGFADDAKIVQALFV
PFL01_0125 SGGPEALPGFKDFVGFADDAKIVQALFV
PSPPH_5091 QGGPEG--DAFPAFLQGFADDAKIVQALFV
PSYR_5012 EMGPEG--DAFPAFLQGFADDAKIVQALFV
PSPTO_5458 QGGPEG--DAFPAFLQGFADDAKIVQALFV
PFLU_0118 EHAQRE----FEQVTFADDAKIVQALFV
Consensus .gg.e.....FoaFlQGFAD.R#.NV..$f...

```

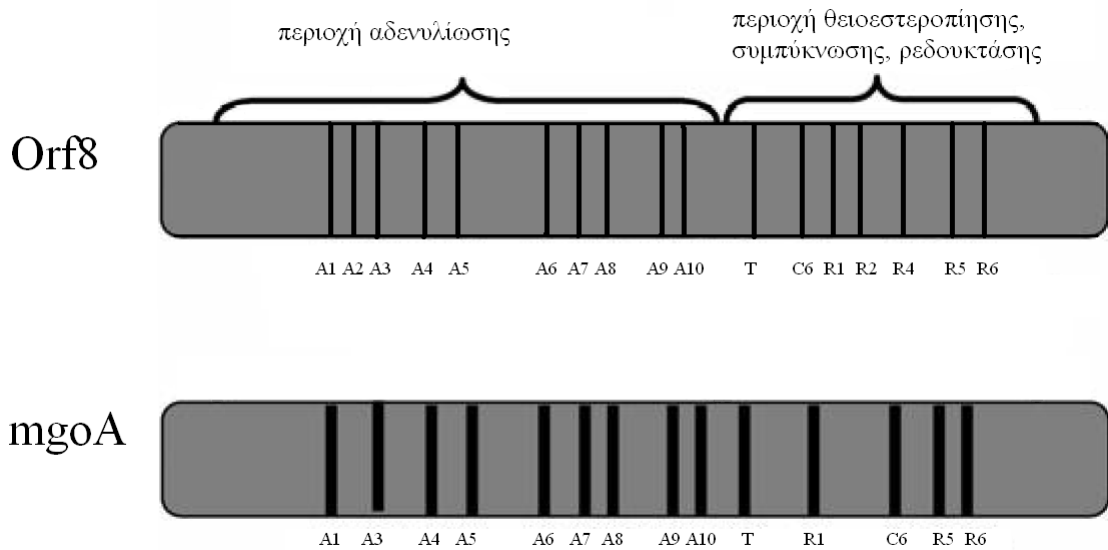
Εικόνα Π27 : Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Orf9 με ορισμένες πεπτιδικές συνθάσεις από το γένος *Pseudomonas*. Το όνομα της κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει το locus tag των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (PFL01_0125: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PSPA7_2108: *Ps. aeruginosa* PA7, PSEEN0131: *Ps. entomophila* L48, PSPTO_5458: *Ps. syringae* pv. tomato str. DC3000, PSYR_5012: *Ps. syringae* pv. syringae B728a, PFLU_0118: *Ps. fluorescens* SBW25). Τα αμινοξέα συμβολίζονται βάσει του κώδικα του ενός γράμματος. Τα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε αμινοξέα με πλήρη ομοιότητα, τα μπλε αντιστοιχούν σε αμινοξέα με ομοιότητα μεταξύ 50 και 90%, και τα μαύρα σε αμινοξέα με ομοιότητα μικρότερη από 50%.

```

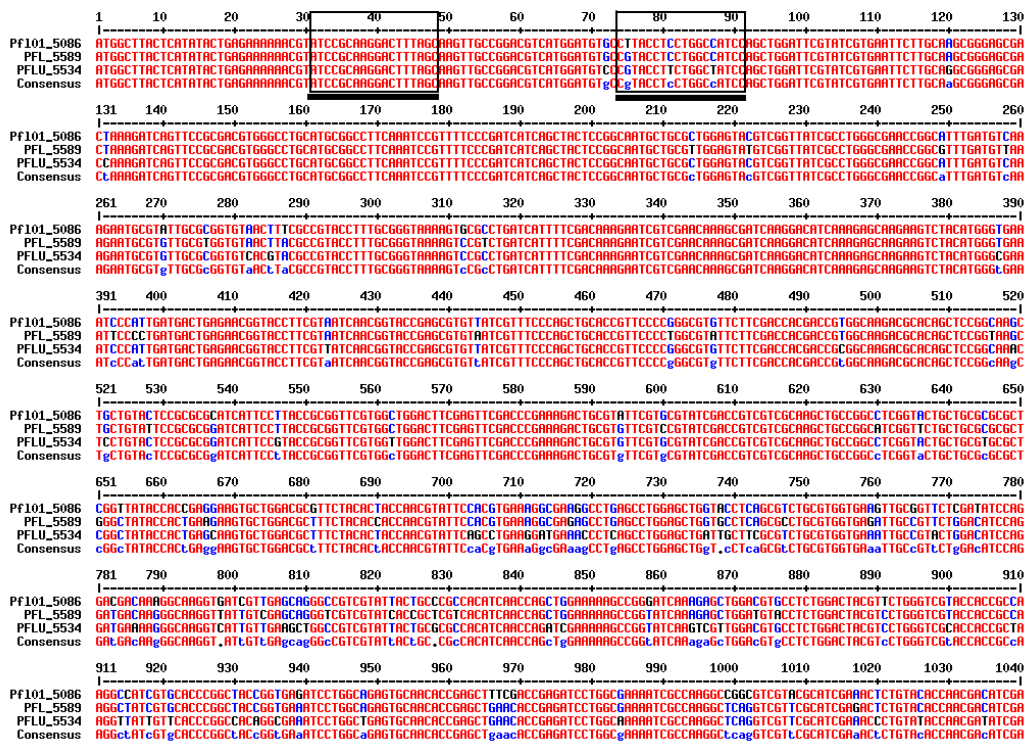
MRHLDIVLCGRSHALACTQELEQMGHTARLLTSDNAVELCQLS
APDVLIDDASTAQLPHYPSCHHLSLRAQANDASDVFAPLQVDCL
WRPGDGDWMLLGRREVSASLAGNGADRAREAIAQVVEMASVHI
GRFSRSADYLEAPREPVQ AIDRLSSLTLLDGLAWRHRHNASANTG A1
ILEEARPFVQRLADSLLANAERNALKVQGRGMSYAQLHAYCDP
GTLAPLLETSTPGLTVVGISLPKGTALY AAILAVIGCGAVYLPLDP
NHPVERRAAILKHAGASLLIQYTEAHNPLPGLATL DIDHLDFHH
A2 GAKVYSRVVLTDPQSLLRVALDGSAPCVAIYTSGTTGQPKGVLLT A3
VDNLSHFCAWYARYVELDRHSRALQFSTINFDASLLDIEPTLIQGG
ELIVPTEDQRRDPVALAELIQQE QVTHAFLPALLSIIQLESLYGMQ A4
HLVTGGDVCEPHVIEQLVGHFALHNIYGPTETTVLATCRTFORGD A5
NNRN LGVPIANTAIYLLDEHGGQPVGENDSGELHIAGPGVGAGYLG
ALQMTAERYRLHELDPGQWVRLYRTGDLARWTEEGIQIIGRLDN A6
OVKIRGFRVEPEEIEHLLQSSQLFRQLAVVIDHQRRILAFFSQPQEG A7
A8 EGQAASEQLQAYALKHLPDYMRPSAYCLLDRLPATANGKVDRK
A9 ALRDLPVNYKTQGPR LAPQ NATQAQLLELWSRLLDLPGDISVD A10
T DSFFNLGGHSILLSQMLMGIREAFGKGV SINRFIEQPTLVNLANLID
C6 QDVEATATVSPQALQDAMIRPELEVLPI SRLGN IHKVIVTGSNGFL R1
RVHIDIVEALLELGSTEVA CLVRESGGMSAQQR FEDALIQRLEH
R2 LDLSRVK VLAADISK PRLGLSEQDYEWLDREYGVLIYNAANVNH
R4 VLDYESLVKDNVTPVLECLQLCEGRSKKIFNFISTLSASSTVDEQG
RVLEPPAFTPPIYIRNGYNLSK WVAERILWNASESGVWVNLYRP
R5 GNIAFNTRTGVCQPHQNR LMLMLKGS LQLK R6

```

Εικόνα Π28 : Τα συντηρημένα καταλυτικά τμήματα (cores) του ενζύμου NRPS που κωδικοποιεί το γονίδιο *orf8*. Τα συντηρημένα μοτίφ των λειτουργικών περιοχών (domain) έχουν χαρακτηριστεί (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003).



Εικόνα Π29 : Σύγκριση των συντηρημένων καταλυτικών τμημάτων (cores), καθώς και των λειτουργικών περιοχών (domains) της Orf8 με την MgoA από το στέλεχος UMAF0158 (Arrebola *et al.*, 2007).



Εικόνα Π30 : Στοίχιση των πρώτων 1000bp της αλληλουχίας του γονιδίου *rpoB* σε όλα τα στελέχη του είδους *Pseudomonas fluorescens*, των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Το locus tag των γονιδίων *rpoB* φαίνεται στην αρχή της στοίχισης (Pfl01_5086: *Ps. fluorescens* Pf0-1, PFL_5589: *Ps. fluorescens* Pf5, PFLU_5534: *Ps. fluorescens* SBW25). Έχουν σημειωθεί οι αλληλουχίες των εκκινητών οι οποίοι επιλέχθηκαν προκειμένου το γονίδιο αναφοράς *rpoB* να ενισχυθεί κατά το ποσοτικό Real-Time PCR.

