

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της αναγωγής των θεικών στο ριζόβιο

*Mesorhizobium loti*.

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Α. ΚΡΟΜΠΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: “Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία”,  
Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών”.  
Επιβλέπων Καθηγητής: Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2010

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της αναγωγής των θεικών στο ριζόβιο  
*Mesorhizobium loti*.

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Α. ΚΡΟΜΠΙΑΣ

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 18<sup>η</sup> 24/06/2008), κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής και η πενταμελής Εξεταστική Επιτροπή.

## **Εξεταστική Επιτροπή.**

Φλεμετάκης Ε. Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ	(Επιβλέπων)
Κατινάκης Π. Καθηγητής ΓΠΑ	(Μέλος)
Μπουράνης Δ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ	(Μέλος)
Κίντζιος Σ. Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ	(Μέλος)
Ταμπακάκη Α. Λέκτορας ΓΠΑ	(Μέλος)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θείο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για τους οργανισμούς. Σε οργανική μορφή απαντά σε δυο αναντικατάστατα αμινοξέα για τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών, την κυστεΐνη (Cys) και τη μεθειονίνη (Met). Η κυστεΐνη αποτελεί την πρώτη οργανική ένωση στην οποία ενσωματώνεται το θείο και δρα ως δότης θείου για μεταβολίτες που κατέχουν σπουδαίο ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι η μεθειονίνη, η γλουταθειόνη, βιταμίνες, συμπαράγοντες και θειικά παράγωγα. Τα ψυχανθή αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία ανάμεσα στα φυτά λόγω της ικανότητάς τους να συμβιώνουν με τα ριζόβια. Ο σχηματισμός φυματίων είναι πολύ σημαντικός για την θρέψη των φυτών με άζωτο. Τα ριζόβια έχουν την ικανότητα να ανάγουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, την οποία ενσωματώνουν τα φυτά στα αμινοξέα. Το θείο και τα θειολικά παράγωγα φαίνεται να παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην επίτευξη της συμβιωτικής αυτής σχέσης όσο και στην ομαλή λειτουργία της. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη του προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα αφομοίωσης του θείου στο βακτήριο. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για το μεταβολικό μονοπάτι αναγωγής των θεικών, βιοσύνθεσης της κυστεΐνης, μεθειονίνης και γλουταθειόνης. Για τον σκοπό αυτό εντοπίστηκαν στις δημόσιες βάσεις δεδομένων τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα που μετέχουν στις αντίστοιχες μεταβολικές διεργασίες. Στη συνέχεια, με την μέθοδο του ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών σε φυμάτια 21 ημερών, του φυτού *Lotus japonicus*, μολυσμένο με το *M. loti* και RNA από καλλιέργειες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές πηγές θείου (ανόργανα θειικά, κυστεΐνη, μεθειονίνη και ανηγμένη γλουταθειόνη). Επίσης, μελετήθηκε και το πρότυπο ανάπτυξης του *M. loti* σε καλλιέργειες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές πηγές θείου. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το *M. loti* αναπτύσσεται λίγο με μεθειονίνη ως ολική πηγή θείου, πιθανόν λόγω της μη ύπαρξης αποτελεσματικού μηχανισμού μετατροπής της μεθειονίνης σε κυστεΐνη. Πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα των μονοπατιών αναγωγής και αφομοίωσης του θείου παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κατά τη συμβιωτική κατάσταση σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Τα *cys2* και *metE* φαίνεται να επάγονται εξειδικευμένα στη συμβιωτική μορφή του βακτηρίου με το φυτό και το *oahs* καταστέλλεται υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης κατά τη συμβίωση. Τέλος, φαίνεται ότι η APR πιθανόν να μπορεί να χρησιμοποιήσει και APS ως υπόστρωμα για την σύνθεση  $\text{SO}_3^{2-}$

Λέξεις κλειδιά : αναγωγής θεικών, βιοσύνθεση κυστεΐνης, βιοσύνθεση μεθειονίνης, βιοσύνθεση γλουταθειόνης, RT-PCR πραγματικού χρόνου, *Mesorhizobium loti* MAFF303099

# **Sulphur reduction in *Mesorhizobium loti*.**

## **ABSTRACT**

Sulfur is an essential element for all organisms. It occurs in two major amino acids, cysteine (Cys) and methionine (Met), essential for the primary and secondary metabolism of the plant. Cys, as the first carbon/nitrogen-reduced sulfur product resulting from the sulphate assimilation pathway, serves as a sulfur donor for Met, glutathione, vitamins, co-factors, and sulfur compounds that play a major role in the growth and development of plant and bacterial cells. Legumes are unique among plants because they are able to form symbiosis with rhizobia bacteria of the soil. Nodulation is very important for plant nitrogen nutrition, especially in soils with low nitrogen content. These bacteria are able to reduce atmospheric nitrogen to ammonium, which is incorporated into carbohydrate skeletons provided by the plant to form amino acids. Sulfur and sulfur compounds were shown to play an important role in establishing the symbiosis and its function. The objective of this study is the expression analysis of the genes coding for enzymes, which participate in sulphur assimilatory pathway, in nitrogen-fixing bacteria *Mesorhizobium loti* MAFF303099. Specifically, we studied the expression pattern of genes coding the enzymes that participate to the metabolic pathway of sulphur reduction, cysteine, methionine and glutathione biosynthesis. For this purpose, we identified all the genes that participate to these metabolic pathways. In order to study the expression pattern of these genes in symbiotic and free living conditions, RNA was isolated from nodules 21 days old and from cultures of free-living bacteria, which have grown under different sulphur sources. Real Time RT-qPCR was performed with cDNA from these manipulations. The accumulation of transcripts encoding for the genes which participate in sulphur reduction and cysteine, methionine and glutathion biosynthesis was increased in the symbiotic state rather than the free living conditions. Two genes, *cys2* and *metE*, seem to be induced during symbiosis and one, *oash*, downregulated.

Key words: Sulfur, sulphate assimilation pathway, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, sulphur assimilatory pathway, sulphur reduction, cysteine biosynthesis, methionine biosynthesis, glutathione biosynthesis, Real Time RT-qPCR

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία” με Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών”, Υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή ΓΠΑ κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος και για την υπομονετική καθοδήγηση του σε όλη την πορεία εκτέλεσης και συγγραφής της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, κ. Κατινάκη Π. Καθηγητή ΓΠΑ, κ. Μπουράνη Δ. Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ, κ. Κίντζιο Σ. Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ, κα. Ταμπακάκη Α. Λέκτορα ΓΠΑ για τον χρόνο που αφιέρωσαν και την υπομονή τους να διαβάσουν την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια Διδάκτορα Καλλονιάτη Χρυσάνθη για τη συνεργασία, την υπομονή, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για τη βοήθειά τους, τις ωραίες συνθήκες εργασίας και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω πάνω απ’ όλα στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την ηθική συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές που παρουσιάστηκαν και την κατανόηση τους για τις ατελείωτες ώρες απουσίας μου.

Κρόμπας Παναγιώτης

Αθήνα 2010

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>8</b>
<b>A.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ</b>	<b>10</b>
A.1.1 Το θείο	10
A.1.2 Αναβολισμός	12
A.1.2.1 Μεταφορά	12
A.1.2.2 Αναγωγή θεικών.	14
A.1.2.3 Βιοσύνθεση κυστεΐνης.	16
A.1.2.4 Ρύθμιση του μονοπατιού βιοσύνθεσης της κυστεΐνης	17
A.1.3 Βιοσύνθεση μεθειονίνης.	19
A.1.4 Βιοσύνθεση γλουταθειόνης.	21
A.1.5 Μεταβολισμός του θείου και συμβιωτική αζωτοδέσμευση.	22
<b>A.2 Το <i>Mesorhizobium loti</i></b>	<b>25</b>
A.2.1 Γενικά	25
A.2.2 Το γένωμα του <i>Mesorhizobium loti</i>	25
A.2.3 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των γονιδίων του <i>M. loti</i>	26
A.2.3.1 Γονίδια που εδράζονται στη «συμβιωτική νησίδα»	26
A.2.3.2 Γονίδια που σχετικά με τον σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση	28
A.2.3.3 Γονίδια που εδράζονται στην περιοχή των πλασμιδίων	28
<b>A.3 Η ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ</b>	<b>30</b>
A.3.1. Γενικά	30
A.3.2. Συμβιωτική σχέση ριζόβιου-ψυχανθούς	32
A.3.2.1. Ειδοεξειδίκευση ριζόβιων-ψυχανθων.	32
A.3.3. Σχηματισμός του φυματίου	33
A.3.4. Ανταλλαγή μοριακών μηνυμάτων μεταξύ ριζόβιου-ψυχανθούς	34
A.3.5. Ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων μεταξύ ριζόβιου-ψυχανθούς.	35
<b>ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>39</b>
<b>B.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ</b>	<b>41</b>
B.1.1 Το ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i> και το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i> .	41
B.1.2 Προετοιμασία σπόρων.	41
B.1.3 Καλλιέργεια ριζόβιων και μόλυνση φυτών.	41
B.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του <i>L. japonicus</i> .	41
<b>B.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ</b>	<b>42</b>

<b>B.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</b>	<b>42</b>
B.3.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.	42
B.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα.	43
B.3.3 Καθαρισμός ολικού RNA	44
B.3.4 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη	44
<b>B.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ</b>	<b>45</b>
B.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων	45
B.4.2 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	46
<b>B.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)</b>	<b>47</b>
B.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)	49
B.5.2. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qReal time-PCR)	50
<b>B.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	<b>52</b>
Παράρτημα	54
Σύνθεση θρεπτικών μέσων.	55
Θρεπτικά διαλύματα ανάπτυξης φυτικού υλικού.	56
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>59</b>
<b>Γ.1 <i>In silico</i> ανάλυση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που μετέχουν στο μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών στο <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099.</b>	<b>61</b>
Γ.1.1 Αφομοίωση και αναγωγή θεικών	64
Γ.1.2 Βιοσύνθεση κυστεΐνης.	69
Γ.1.3 Βιοσύνθεση γλουταθειόνης	72
Γ.1.4 Βιοσύνθεση μεθειονίνης	75
<b>Γ.2 Μελέτη της ανάπτυξης του <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 σε διαφορετικές πηγές θείου..</b>	<b>87</b>
<b>Γ.3 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων του μεταβολικού μονοπατιού του θείου στο <i>M. loti</i>.</b>	<b>88</b>
Γ.3.1 Έκφραση των γονιδίων αναγωγής θεικών και βιοσύνθεσης κυστεΐνης	90
Γ.3.2. Γονιδιακή ρύθμιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης	91
Γ.3.3 Γονιδιακή ρύθμιση της βιοσύνθεσης γλουταθειώνης.	93
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	95
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>102</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>111</b>

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ





## A.1. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ

### A.1.1 Το θείο

Το θείο, όπως ο άνθρακας και το άζωτο, κατέχει σημαντική θέση στο μεταβολισμό των φυτών και κατ' επέκταση όλων των ζωντανών οργανισμών. Σε ελεύθερη κατάσταση το θείο βρίσκεται στην ατμόσφαιρα σε αέρια μορφή (οξειδίο του θείου  $\text{SO}_2$ ) και στο έδαφος (θειικά ιόντα  $\text{SO}_4^{2-}$ ), ενώ στην οργανική του μορφή παίρνει μέρος σε πλήθος ενώσεων και διεργασιών σημαντικών για την επιβίωση των οργανισμών. Η πρώτη οργανική ένωση στην οποία συμμετέχει το θείο είναι η κυστεΐνη (Cys), η οποία μαζί με τη μεθειονίνη (Met) αποτελούν τα μοναδικά αμινοξέα που περιέχουν θείο. Η Cys και η Met αποτελούν δομικούς λίθους για τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους. Οι δεσμοί αυτοί σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών και είναι καθοριστικής δομικής και λειτουργικής σημασίας. Επίσης τα παράγωγά τους δρουν ως πρόδρομα μόρια για την σύνθεση : Γλουταθειόνης (GSH), συμπαραγόντων όπως σίδηρο – θείο πρωτεΐνες, αίμης, σιροαίμης, κέντρα μολυβδαινίου κτλ., βασικών πρωτεϊνών όπως η βιοτίνη και η θειαμίνη, θεικών εστέρων όπως το συνένζυμο Α και θεικών συμπαραγόντων ( Beinert 2000; Leustek et al. 2000; Saito 2000; Marquet 2001; Gerder and Lill 2002; Mendel and Hänsch 2002; Noctor et al. 2002 ).

Επίσης, θείο περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες και ένα πλήθος ενώσεων με διάφορες ιδιότητες όπως οι Nod παράγοντες των ριζόβιων, η αντισηπτική αλινίνη στο σκόρδο κ.α. Επιπροσθέτως, θείο περιέχουν οι υδρόφιλες κεφαλές των σουλφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών ( Sanda et al 2001 ).

Σε οξειδωμένη μορφή στο περιβάλλον, το θείο βρίσκεται στο έδαφος υπό την μορφή θεικών ιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Πριν από την ενσωμάτωσή τους στις οργανικές ενώσεις τα θειικά πρέπει να αναχθούν. Η αναγωγή των θεικών πραγματοποιείται μέσω ενός μονοπατιού αντιδράσεων όπου τα θειικά μετατρέπονται αρχικά σε θειώδη και στην συνέχεια σε υδρόθειο ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Το  $\text{H}_2\text{S}$ , με την σειρά του ενσωματώνεται σε ένα σκελετό άνθρακα αζώτου για να σχηματίσει την Cys. Αυτό το μονοπάτι χρησιμοποιείται από τους προκαρυώτες, τους μύκητες και τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς ( Kredich 1996; Marzluf 1997; Tomas and Sarbin-Kerjan 1997; Leustek et al. 2000 ).

Σε αντίθεση με τους παραπάνω οργανισμούς τα ζώα και ο άνθρωπος είναι ανίκανοι να ανάγουν τα ανόργανα θειικά σε υδρόθειο. Γι' αυτό το λόγο ο μεταβολισμός αυτών των

οργανισμών εξαρτάται από τη διαίτά τους σε θείο, κυρίως σε ανηγμένη μορφή. Ο εφοδιασμός αυτός γίνεται μέσω θειούχων αμινοξέων και βασικών βιταμινών που περιέχουν θείο ( Ravel et al. 1998; Table and Higgins 1998; Galili and Hofgen 2002; Nikiforova et al. 2002; Noji and Saito 2002; Hesse and Hoefgen 2003 ).

Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, και το βακτήριο *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστούν οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί αναγωγής και ενσωμάτωσης του θείου στα φυτά και στα βακτήρια αντίστοιχα ( Leustek et al. 2002; Hell et al.2002; Noji and Saito 2002 ). Επίσης τεχνολογίες όπως αυτή των μικροσυστοιχιών και της αντίστροφης γενετικής, έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό και τη μερική κατανόηση της βιοχημικής και γενετικής ρύθμισης του μονοπατιού που οδηγεί στη βιοσύνθεση της κυστεΐνης και των παραγώγων της (Met και GSH), σε συνδυασμό με το μεταβολισμό του κυττάρου ( Nikiforova et al. 2002; Noctor et al. 2002; Noji and Saito 2002; Hesse and Hoefgen 2003; Hirai et al. 2003; Nikiforova et al. 2003; ). Οι χημικές ιδιότητες του θείου, των οργανικών ενώσεων που περιέχουν θείο και του θείου των πρωτεϊνών συνεισφέρουν σε σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις τόσο στο μεταβολισμό των οργανισμών, όσο και στην απόκριση αυτών σε παράγοντες βιοτικού και αβιοτικού στρες ( Beinert 2000; Foger et al. 2001; Cooper et al. 2002; Dixon et al.2002b; Hall 2002; Milter 2002; Noctor et al. 2002; Dietz 2003; Giles et al. 2003 ).

Η πολλαπλότητα της χρήσης του θείου μπορεί εν μέρει να προέρχεται από την ιδιότητά του να οξειδώνεται σε πολλαπλά στάδια. Η οξειδωτική κατάσταση του θείου επιτρέπει σε αυτό το στοιχείο να υπάρχει σε διάφορες βαθμίδες οξείδωσης, από +6 της πιο σταθερής μορφής του θεικού ανιόντος σε -2 του ατόμου του θείου ( $S^{2-}$ ) και του υδρόθειου ( $H_2S$ ). Τα θειικά αποτελούν την κύρια πηγή θείου για τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, βρίσκονται στο έδαφος και αποτελούν την πιο σταθερή μορφή του στοιχείου αυτού. Λόγω της σταθερότητας των θεικών οι οργανισμοί πρέπει να δαπανήσουν μεγάλο ποσό ενέργειας για την αναγωγή τους. Τα θειικά στο έδαφος προέρχονται από την αποσάθρωση των μητρικών πετρωμάτων. Ωστόσο, η εκβιομηχάνιση προσθέτει επιπλέον πηγές θεικών μέσω της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Η καύση των ορυκτών καυσίμων απελευθερώνει πολλές αέριες μορφές του θείου, συμπεριλαμβανομένων του διοξειδίου του θείου ( $SO_2$ ) και του υδρόθειου ( $H_2S$ ) (Hawkesford 2000 ). Οι αέριες μορφές αυτές επανέρχονται στο έδαφος μέσω της βροχής. Όταν το  $SO_2$  διαλυθεί στο νερό υδρολύεται και σχηματίζεται θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ), το οποίο είναι το κύριο συστατικό της όξινης βροχής. Τα φυτά μπορούν να μεταβολίσουν το διοξείδιο του θείου το οποίο προσλαμβάνουν σε αέρια μορφή μέσω των στομάτων των φύλλων τους. Ωστόσο παρατεταμένη διάρκεια έκθεσης (περισσότερο από 8 ώρες ) σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης

SO<sub>2</sub> (πάνω από 0,3 ppm) στην ατμόσφαιρα, προκαλεί εκτεταμένες βλάβες στους ιστούς, λόγω του σχηματισμού θειικού οξέος.

### **A.1.2 Αναβολισμός**

Κατά μέσο όρο η συγκέντρωση του θείου στην επιφάνεια της γης υπολογίζεται ότι είναι περίπου 520 ppm. Στους βράχους η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 270-2400 ppm, στο φρέσκο νερό 3,7 ppm κατά μέσο όρο, στο θαλασσίνο νερό από 100-1500 ppm, στις εύκρατες περιοχές από 100-1500 ppm στο έδαφος (Ehrlich, 1996). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η συγκέντρωση του θείου στα φυτά είναι συνήθως χαμηλή. Το στοιχείο αυτό βρίσκεται κυρίως στην μορφή των αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη και των οξειδωμένων προϊόντων τους (προστατευτικά μόρια, ωσμοπροστατευτικά όπως S-μεθυλομεθειονίνη Kocsis et al 1998). Επίσης βρίσκεται σε προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού (στα φυτά της οικογένειας Alliaceae οι μεταβολίτες αυτοί παίζουν ένα αποτελεσματικό αντιμικροβιακό ρόλο, (Lim et al 1998) και ως θειικοί υδατάνθρακες και αμινογλυκοσίδια. (Guler et al 1996).

Το μεταβολικό μονοπάτι αναγωγής και αφομοίωσης του θείου, υπό την παρουσία οξυγόνου, αποτελεί μία ιδιαίτερα ενεργοβόρα μεταβολική διεργασία. Τα μόρια του θείου βρίσκονται στο έδαφος υπό τη μορφή θεικών και ως θειικά πρέπει να απορροφηθούν από το κύτταρο. Η διαδικασία αυτή έχει ένα ισχυρά αρνητικό ηλεκτρικό δυναμικό (-70mV). Στη συνέχεια τα θειικά αλλάζουν μορφή, από την οξειδωμένη κατάσταση στην ανηγμένη κατάσταση. Και αυτή η διαδικασία απαιτεί μια σημαντική δαπάνη ενέργειας και τη διατήρηση ενός πολύ χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού.

#### **A.1.2.1 Μεταφορά**

Έχουν περιγραφεί τρία διαφορετικά συστήματα μεταφοράς των θεικών μέσα στο κύτταρο των μικροοργανισμών. Τα συστήματα αυτά κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες υπέρ-οικογενειών, την ABC και την MFS (ATP-binding cassetts και Major Facilitator Superfamily).

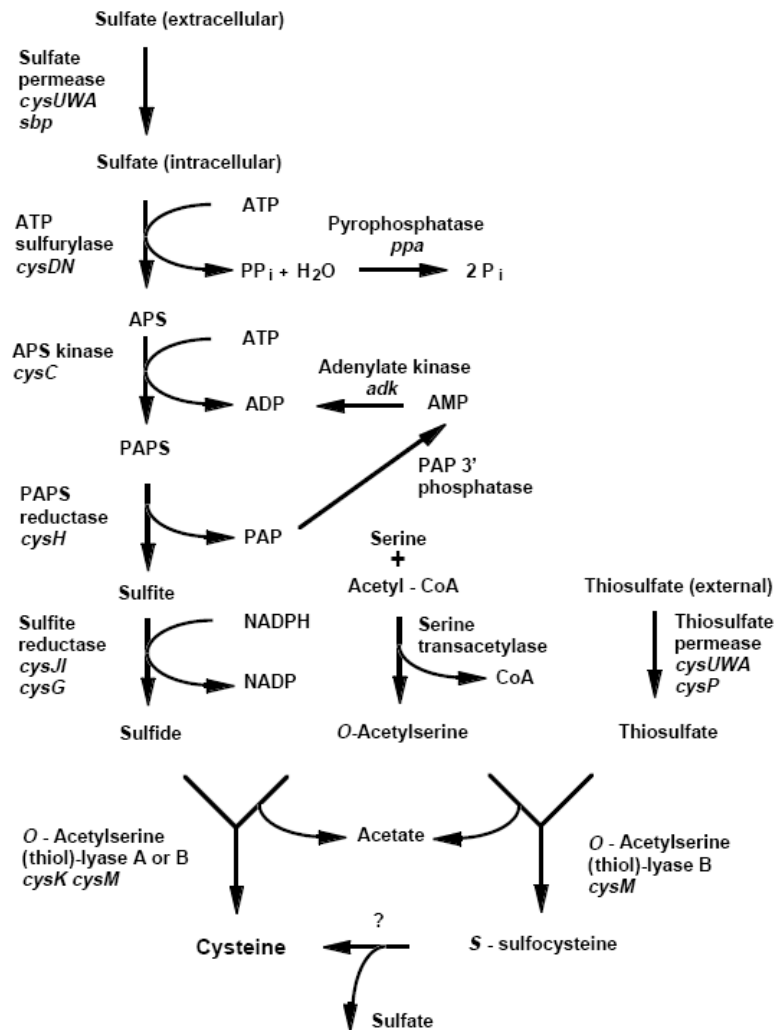
Η οικογένεια των Sult (Sulfate uptake transporters; EC 3.A.1.6), ανήκει στους ABC μεταφορείς και έχει μελετηθεί πολύ καλά στο *E. coli* και στη *Salmonella typhimurium*. Αποτελείται από μια περιπλασμική θεική πρωτεΐνη δέσμευσης θεικών (sbp), τις περμεάσες CysT και CysW και μια ATP- δεσμευτική υπομονάδα την CysA (Kertech 2001). Το σύστημα αυτό μπορεί να προσλάβει εκτός από θειικά και άλλες ενώσεις όπως θειώδη και θειοθειώδη (Kredich 1996). Επίσης, μια δεύτερη περιπλασμική δεσμευτική πρωτεΐνη, η CysP, η οποία

είναι εξειδικευμένη για τα θειοθειικά έχει χαρακτηριστεί. Τα γονίδια *cysPTWA* σχηματίζουν ένα οπερόνιο ενώ το γονίδιο *sbp* βρίσκεται αλλού στο χρωμόσωμα. Στελέχη με μια απλή μετάλλαξη στο γονίδιο *sbp* ή στο γονίδιο *cysP* μπορούν και τα δυο να αναπτυχθούν με θειικά ως πηγή θείου. Σε αντίθεση με το παραπάνω μια διπλή μετάλλαξη στα δυο αυτά γονίδια ή στα γονίδια *cysA*, *cysP* οδηγεί σε στελέχη αυξότροφα στη κυστεΐνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το *cysATW* μαζί με το *sbp* ή το *cysP* αποτελούν τους μόνους μεταφορείς θείου στο *E. coli* ( Sirko et al. 1995). Το *sbp-cysPTWA* σύμπλοκο έχει βρεθεί επίσης και στο γονιδίωμα ενός μεγάλου αριθμού άλλων βακτηρίων ( Kertesz 2001).

Το δεύτερο σύστημα μεταφορέα, το CysP, έχει βρεθεί και χαρακτηριστεί στο *Bacillus subtilis* (Mansilla and de Mendoza 2000) και αποτελεί ένα συμμεταφορέα, ο οποίος ανήκει στην Pit οικογένεια των FMS μεταφορέων (Inorganic Phosphate transporter; TC 2.A.20). Το γονίδιο *cysP*, του *B. subtilis*, κωδικοποιεί για μια θεική περμεάση και σχηματίζει οπερόνιο με γονίδια του μονοπατιού αναγωγής του θείου (Mansilla and de Mendoza 1997). Η εισαγωγή του *cysP* γονιδίου του *B. subtilis* σε κύτταρα *E. coli* μεταλλαγμένα ως προς την ικανότητα πρόσληψης θεικών, επανέφερε την ικανότητα αυτή υπό την παρουσία θεικών ως μοναδική πηγή θείου.

Η τρίτη κατηγορία μεταφορέων περιλαμβάνει την SulP οικογένεια (Sulfate permease; TC 2.A.53) των FMS. Ο μεταφορέας αυτός αποτελείται από μια υπομονάδα με 10-13 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτού του τύπου οι περμεάσες, που έχουν δράση συμμεταφορέων  $H^+/S$ , έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί στους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Πολλά βακτηριακά κύτταρα κωδικοποιούν για πρωτεΐνες παρόμοιες με το SulP (Kertesz 2001). Ωστόσο, στο *E. coli* και το *Mycobacterium Tuberculosis* οι μεταφορείς τύπου ABC είναι οι μοναδικοί μεταφορείς θείου στα κύτταρα αυτά και οι SulP πρωτεΐνες έχουν κάποια άγνωστη λειτουργία σε αυτούς τους μικροοργανισμούς (Sirko et al. 1955; Woff et al. 2002).

### A.1.2.2 Αναγωγή θεικών.



Εικόνα 1: Μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών και βιοσύνθεσης κυστεΐνης στο *E. coli*

Το θεικό μονοπάτι το οποίο αφομοιώνει τα ανόργανα θειικά έχει μελετηθεί πολύ καλά στο *E. coli* (Kredich 1996) (εικόνα 1). Το ένζυμο σουλφουριλάση του ATP (sulfate adenylyltransferase, EC 2.7.7.4, ATPs) καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι. Η ATPs ενεργοποιεί τα θειικά μέσω μιας ATP εξαρτώμενης αντίδρασης η οποία οδηγεί στο σχηματισμό φωσφοθεικής αδενοσίνης (APS) και πυροφωσφορικών (PPi). Στο *E. coli* και σε πολλά άλλα βακτήρια, η δραστηριότητα αυτή απαιτεί δυο υπομονάδες. Η καταλυτική υπομονάδα κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysD* και η GTP ρυθμιστική υπομονάδα κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysN*. Στους ευκαριώτες, στα αρχαία και μερικά βακτήρια όπως ο *B. subtilis*, τα αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν τις δυο αυτές υπομονάδες είναι ενωμένα σε ένα γονίδιο (Mansilla and Mendosa 1997). Η αντίδραση αυτή, η οποία παράγει APS και PPi από ATP και θειικά, είναι ισχυρά μετατοπισμένη προς την κατεύθυνση

της σύνθεσης του ATP. Αυτό συμβαίνει λόγω της διαφοράς που υπάρχει μεταξύ των  $\Delta G^\circ$  της υδρόλυσης του δεσμού APS-φωσφορικό-θειικό (-19 Kcal/mol) και της υδρόλυσης των  $\alpha$ ,  $\beta$  δεσμών του ATP (-10,7 Kcal/mol) (Liw et al 1998;). Στο πρόβλημα αυτό δίνει λύση ένα μηχανισμός απομάκρυνσης των PPi. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχουν μια ή περισσότερες πυροφωσφατάσες, έτσι ώστε μέσω της υδρόλυσης των PPi σε ανόργανο φώσφορο να κρατηθεί η συγκέντρωση των PPi σε χαμηλά επίπεδα και να μετατοπιστεί η αντίδραση προς την αναβολική πλευρά. Ωστόσο, όπως έχει παρατηρηθεί από την πολύ υψηλή συγκέντρωση PPi στο εσωτερικό των κυττάρων του *E. coli*, η αντίδραση αυτή απέχει πολύ από την κατάσταση ισορροπίας. Δεν μπορεί συνεπώς να είναι αποδοτική προς την κατεύθυνση σύνθεσης του APS (Lium et al 1998). Γι' αυτό το λόγο η σύνθεση του τελευταίου μορίου έχει συνδεθεί επίσης με την υδρόλυση των  $\beta$ ,  $\gamma$  δεσμών του GTP. Η αντίδραση αυτή ευνοεί την ενσωμάτωση του θείου και μετατοπίζει την αντίδραση προς την πλευρά της αφομοίωσης των θεικών ( $\Delta G = -6,8$  Kcal/mol Liu et al 1998). Ωστόσο, η διαδικασία αυτή είναι ισχυρά ενεργοβόρα και γι' αυτό το λόγο υπάρχει ισχυρή επιλεκτική πίεση για την ανάκτηση των μορίων τα οποία περιέχουν θείο σε ανηγμένη μορφή.

Στη συνέχεια του μονοπατιού, μια ATP- εξαρτώμενη φωσφορυλίωση του APS από μια APS κινάση (EC 2.7.1.25), το προϊόν του *cysC* γονιδίου, οδηγεί στο σχηματισμό της φωσφοθειικής φωσφοαδενοσίνης (PAPS). Σε κάποιους μικροοργανισμούς όπως στο *Mycobacterium* και στο *Pseudomonas*, η CysC είναι συντηγμένη με την CysN (Pinto et al. 2004). Η κοινή λογική αυτής της αντίδρασης θα ήταν ότι θα αποτελούσε υποστηρικτικό ρόλο στην προηγούμενη για να ενισχυθεί η αναβολική διαδικασία. Στο *E. coli* και στο *B. subtilis* δεν έχει βρεθεί ότι συμβαίνει κάτι τέτοιο και η PAPS φαίνεται σαν να μην έχει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Σε αντίθεση με το *E. coli* και το *B. subtilis* σε πολλά βακτήρια (πχ ριζόβια), φυτά και ζώα η PAPS αποτελεί το απαραίτητο πρόδρομο μόριο για διάφορες διαδικασίες θείωσης κάποιων μορίων ( nod factors, λιποπολυσακχαρίτες, στα ριζόβια ).

Το τρίτο βήμα του μονοπατιού περιλαμβάνει την παραγωγή θειώδους και PAP (AMP-3'-P) από PAPS μέσω της PAPS ρεδοκτάσης (PAPS sulfotransferase/reductase; EC 1.8.4.8), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysH*. Η CysH του *E. coli* χρησιμοποιεί ανηγμένη θειορεδοξίνη ή γλουταθειόνη ως δότη ηλεκτρονίων (Lillig et al. 1999). Στα φυτά, στις πράσινες άλγες και πολλά βακτήρια η APS ανάγεται κατευθείαν σε θειώδη από μια APS ρεδοκτάση (EC 1.8.4.9) ( Mendoza-Cozatl et al. 2005; Berndt et al 2004; Bick et al 2000 Williams et al. 2002). Το τελικό βήμα είναι η αναγωγή των θειωδών σε υδρόθειο από μια NADPH εξαρτώμενη αναγωγή του θειώδους (SRH; EC 1.8.1.2). Στο *E. coli* το ένζυμο αυτό αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες και έχει τη δομή  $\alpha_8\beta_4$ . Η πρώτη υπομονάδα ( $\alpha$ ) κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysJ*, είναι μια φλαβοπρωτεΐνη, περιέχει 4 FAD

και 4 FMN ως συμπράγοντες και έχει δραστικότητα NADPH-αναγωγής του κυτοχρώματος c. Η δεύτερη υπομονάδα (b) κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysI*, είναι μια αιμοπρωτεΐνη η οποία περιέχει ένα [4Fe- 4S] σύμπλοκο και μια σιροαΐμη. Η CysJ δέχεται τα ηλεκτρόνια από το NADPH και τα μεταφέρει στην αιμοπρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της ανάγει τα θειώδη σε υδρόθειο (Kerdich 1996). Η αναγωγή του θειώδους απαντάται επίσης και στον *B. subtilis* (Van der ploeg et al. 2001a). Τέλος, το γονίδιο *cysG* κωδικοποιεί για μια υδρορρυθινογεν μεθυλομεταφοράση (EC 2.1.1.107) η οποία καταλύει την αντίδραση σύνθεσης της σιροαΐμης. Στο *B. subtilis* η αντίστοιχη πρωτεΐνη κωδικοποιείται από δυο γονίδια τα *ylnD* και *ylnF* τα οποία αντιστοιχούν στο 3' και 5' μέρος του *cysG* του *E. coli* αντίστοιχα (Johansson and Hederstedt 1999).

Στο *E. coli*, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα της αναγωγής των θεικών σε υδρόθειο είναι οργανωμένα σε οπερόνια: *cysDNC* για την αναγωγή των θεικών σε PAPS, *cysJIH* και *cysG* για την αναγωγή της PAPS σε υδρόθειο (Kredich 1996). Στο *B. subtilis* υπάρχει ένα μεγάλο οπερόνια το *cysHPynlBCDEF* και το *cysJI* το οποίο κωδικοποιεί για τη αναγωγή του θειώδους (Guillouard et al 2009; Mansilla et al. 2000). Το μεταβολικό μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών λείπει από αρκετούς μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus* και *Streptococci* και *Listeria*.

#### **A.1.2.3 Βιοσύνθεση κυστεΐνης.**

Η κυστεΐνη παράγεται από τον σκελετό άνθρακα που προέρχεται από την σερίνη και το θείο με διαφορετικούς τρόπους, οι οποίοι εξαρτώνται από τον κάθε οργανισμό και τον τρόπο που αφομοιώνει ο καθένας το θείο. Η βιοσύνθεση της κυστεΐνης από τη σερίνη στα βακτήρια και στα φυτά πραγματοποιείται σε δυο στάδια. Αρχίζοντας από την O- ακετυλίωση της σερίνης και συνεχίζοντας με την β- αντικατάσταση της ακετυλο- ομάδας από θειώδη ή θειοθειικά

Το πρώτο στάδιο στην βιοσύνθεση της κυστεΐνης περιλαμβάνει το ένζυμο τρανσακετυλάση της σερίνης ( SAT; EC 2.3.1.30) το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysE* (Becker et al 1969). Η CysE καταλύει την αντίδραση της σερίνης και του ακετυλο συνένζυμου A και παράγει O- ακετυλο-σερίνη (OAS). Η κυστεΐνη δρα παρεμποδιστικά στη δραστικότητα της CysE σε διάφορα βακτήρια (Denk and Bock 1987; Haintani et al.2006; Johnson et al. 2004), στο *Saccharomyces cerevisiae* (Takagi et al. 2003), στα πρώτιστα και στα φυτά. Η φυσική αντοχή της CysE στη αναδραστική παρεμπόδιση που ασκείται από την κυστεΐνη έχει βρεθεί μόνο σε κάποια ενδοσυμβιωτικά βακτήρια ( Lai and Baumann 1992) και σε μερικά φυτά (Kawashima et al. 2005). Η μοριακή βάση της αναδραστικής παρεμπόδισης από την κυστεΐνη έχει μελετηθεί στις CysE διάφορων οργανισμών. Στο *E. coli* αυτό οφείλεται στον



ανταγωνισμό ανάμεσα στην κυστεΐνη και τη σερίνη για το κέντρο πρόσδεσης της σερίνης, με αποτέλεσμα την αναστολή της O- ακετυλίωσης της σερίνης. (Hindson 2003). Μεταλλαγμένα στελέχη ως προς την CysE, τα οποία είναι αδρανή ως προς την αναδραστική παρεμπόδιση, υπερπαράγουν κυστεΐνη εξαιτίας της απώλειας του ελέγχου στο σημείο αυτό.

Το δεύτερο βήμα στην βιοσύνθεση της κυστεΐνης περιλαμβάνει το ένζυμο θειολύση της O- ακετυλοσερίνης (OASS; EC 2.5.1.44). Η OASS μετατρέπει την OAS και το υδρόθειο σε κυστεΐνη και οξικό οξύ, χρησιμοποιώντας PLP ως συμπράγοντα και ανήκει στην β οικογένεια των PLP- εξαρτώμενων ενζύμων. Στο *E. coli* και στο *S. typhimurium* έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί δυο διαφορετικές OASS (Kredich 1996): Την OASS-A, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysK*, και την OASS-B, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *cysM*, με ποσοστό ομολογίας 43% μεταξύ τους. Και τα δυο ένζυμα είναι ομοδιμερή ένζυμα τα οποία έχουν μια PLP ανά υπομονάδα που προσκολλάται σε ένα κατάλοιπο λυσίνης. Στελέχη του *S. typhimurium* με διπλή μετάλλαξη για τις OASS-A και OASS-B απαιτούσαν κυστεΐνη για την ανάπτυξή τους ενώ στελέχη μεταλλαγμένα ως προς το ένα μόνο ένζυμο ήταν προτοτροφικά ως προς την κυστεΐνη. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι και τα δυο ένζυμα καταλύουν το ίδιο στάδιο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της κυστεΐνης (Hulanica et al. 1979). Και στις δυο OASS η κυστεΐνη και το υδρόθειο δρουν παρεμποδιστικά αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις για φυσιολογικά επίπεδα (Kredich 1996). Όπως έχει παρατηρηθεί στα ανώτερα φυτά (Wirtz and Hell 2006), και στα βακτήρια η CysE και η OASS-A σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο ονομάζεται συνθάση της κυστεΐνης (Campanini et al. 2005; Kredich 1996). Ο ρόλος του συμπλόκου αυτού δεν είναι πλήρως κατανοητός αλλά ίσως να ευνοεί την δραστηριότητα της OASS-A (Huang et al. 2005). Σε αντίθεση η OASS-B δεν σχηματίζει σύμπλοκο με την CysE (Zhua et al. 2006), γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η OASS-B μπορεί να κατέχει έναν πιο σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια αναερόβιων συνθηκών ανάπτυξης και για την αφομοίωση των θειοθεικών. Αναλόγως, η OASS-B είναι μια συνθάση σουλφοκυστεΐνης (s- sulfocysteine synthase) η οποία καταλύει την αντίδραση της OAS και των θειοθεικών και δίνει s-σουλφοκυστεΐνη. Η παραπέρα μετατροπή της s-σουλφοκυστεΐνης σε κυστεΐνη δεν έχει μελετηθεί ακόμα (Nakamura et al. 1984). Η αντίδραση αυτή αποτελεί ένα βολικό τρόπο ενσωμάτωσης του θείου από θειοθεικά χωρίς την ανάγκη αναγωγής των θεικών, στο οποίο καταναλώνονται δυο μόρια ATP.

#### **A.1.2.4 Ρύθμιση του μονοπατιού βιοσύνθεσης της κυστεΐνης**

Στο *E. coli* και στο *S. typhimurium*, τα γονίδια που απαιτούνται για τη μεταφορά των θεικών, την αναγωγή τους σε υδρόθειο και την ενσωμάτωση αυτού στο αμινοξύ της κυστεΐνης

ελέγχονται θετικά από το μεταγραφικό παράγοντα CysB, ο οποίος αποτελεί έναν LysR μεταγραφικό ενεργοποιητή (LTTR) (Kredich 1996; Ostrowski and Kredich 1989; Parry and Clark 2002). Επιπροσθέτως, εκτός από τον CysB, η πλήρης έκφραση του *cys* ρεγουλониου, χρειάζεται έναν επαγωγέα ( N-acetyl-L-serine; NAS ) και μια ελάχιστη ποσότητα ανηγμένου θείου. Ο ρυθμιστικός μηχανισμός του CysB έχει μελετηθεί εκτενώς για τα γονίδια *cysJ*, *cysK* και *cysP* του *S. typhimurium* (Kredich 1996). Η αλληλεπίδραση του CysB με τις ρυθμιστικές περιοχές των προαγωγέων των γονιδίων είναι πολύπλοκη. Σε γενικές γραμμές υπο την απουσία του επαγωγέα (NAS) η CysB προσδένεται στις υποστηρικτικές αλληλουχίες των προαγωγέων των γονιδίων και όχι στις ρυθμιστικές αλληλουχίες αυτών (Hryniewicz and Kredich 1991; Kredich 1996; Lochowska et al. 2004). Η παρουσία της NAS προκαλεί στον CysB τις αλλαγές εκείνες που επάγουν την πρόσδεση αυτού στις ρυθμιστικές περιοχές των προαγωγέων των γονιδίων. Η σταθερή αυτή σύνδεση του CysB με τον προαγωγέα των γονιδίων είναι αναγκαία και απαραίτητη για την πρόσδεση της RNA-πολυμεράσης και την έναρξη της μεταγραφής. Ο CysB ρυθμίζει τα δικά του επίπεδα έκφρασης, προσδένεται στον προαγωγέα του γονιδίου του, στη θέση πρόσδεσης της RNA-πολυμεράσης και δρά κατασταλτικά ως προς τη μεταγραφή του (Kredich 1996). Στην περίπτωση αυτή ο NAS μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης του CysB στον προαγωγέα του. Μείωση της ποσότητας του διαθέσιμου θείου είναι απαραίτητη για την επαγωγή του Cys ρεγουλониου (Kredich 1996), γι' αυτό το λόγο υπάρχουν δυο επίπεδα ελέγχου:

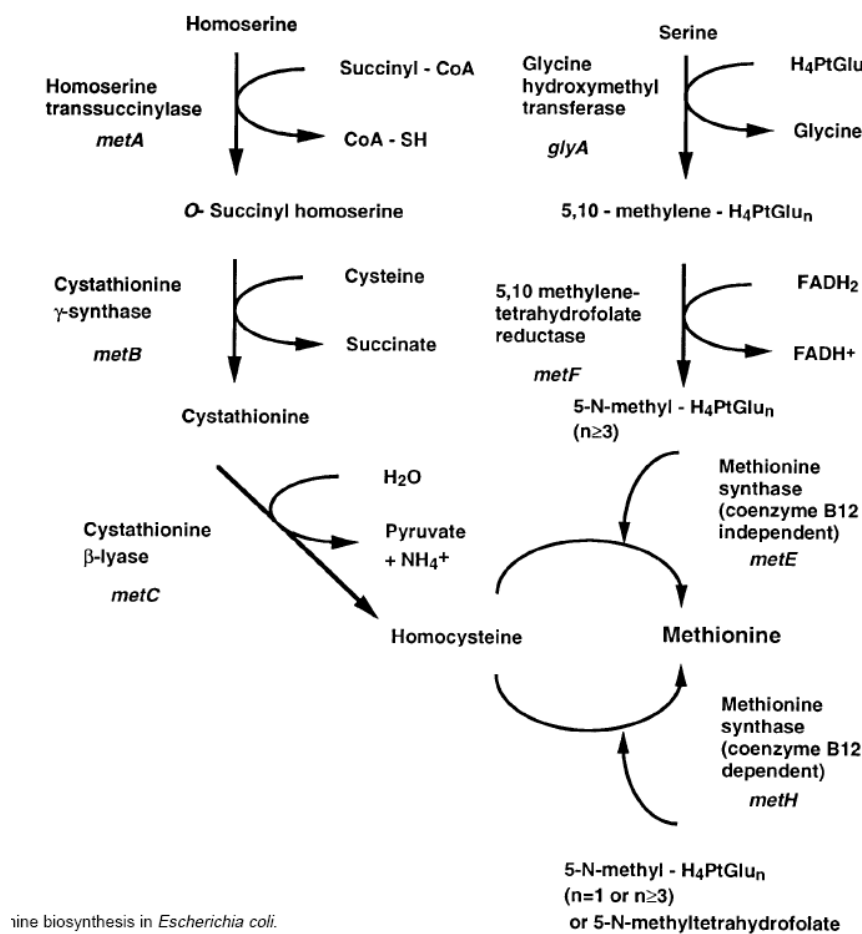
- Το πρώτο επίπεδο ελέγχου είναι η αναδραστική παρεμπόδιση που ασκεί η κυστεΐνη στη CysE με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής της OAS, του πρόδρομου μορίου της NAS. Ελέγχοντας την παραγωγή του επαγωγέα του CysB η κυστεΐνη καταφέρνει να μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του *cys* ρεγουλониου. Μεταλλαγμένα στελέχη, στα οποία η CysE παραμένει αδρανής στην αναδραστική παρεμπόδιση που προκαλεί η κυστεΐνη, υπερπαραγωγή κυστεΐνη. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο αλλοστερικός έλεγχος είναι ο κύριος ρυθμιστικός μηχανισμός στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της κυστεΐνης.
- Το δεύτερο επίπεδο ελέγχου γίνεται με τη μεσολάβηση δυο άλλων πηγών θείου. Τα θειώδη και θειοθειικά ενεργούν ως αντί-επαγωγείς οι οποίοι συναγωνίζονται με το NAS για τον CysB μεταγραφικό παράγοντα (Hryniewicz and Kredich 1991; Kredich 1996). Στο *S. typhimurium*, η αντί-επαγωγή φαίνεται ότι είναι η κύρια ρυθμιστική διαδικασία *in vivo* και είναι υπεύθυνη για την μείωση των επιπέδων έκφρασης των *cys* γονιδίων (Orpezzo 1998).

Ένας δεύτερος μεταγραφικός παράγοντας LTTR, το *cbl*, ελέγχει την έκφραση των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι των σουλφονικών οξέων (sulfonates) στο *E.*

*coli* ( Van der ploeg et al. 2001b). Ο *cbl* ενεργοποιεί κατευθείαν την μεταγραφή των *ssu* και *tau* οπερονίων μέσω της πρόσδεση του στις ρυθμιστικές περιοχές των προαγωγέων αυτών (Bykowski et al. 2002; Van der ploeg et al. 2001b). Σε αντίθεση με τα *cys* γονίδια, η έκφραση των γονιδίων αυτών καταστέλλεται πλήρως υπό την παρουσία θειικών και η δραστικότητα του *cbl* ρυθμίζεται αρνητικά από την APS ( Bykowski et al. 2002). Ο CysB εμμέσως ρυθμίζει την έκφραση των *ssu* και *tau* οπερονίων μέσω του ελέγχου της έκφρασης του *cbl* ( Iwanicka-Nowicka and Hryniewich 1995).

### A.1.3 Βιοσύνθεση μεθειονίνης.

Το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης συνδέεται με αυτό της κυστεΐνης μέσω μεταβολικών μονοπατιών τα οποία διαφέρουν ανάλογα με τον οργανισμό. Επίσης, πολλές φορές υπάρχουν περισσότερα από ένα διαφορετικά μονοπάτια στον ίδιο οργανισμό. Στο *E. coli* το μεταβολικό μονοπάτι είναι το ακόλουθο (εικόνα 2α):



Metabolic pathway for methionine biosynthesis in *Escherichia coli*.

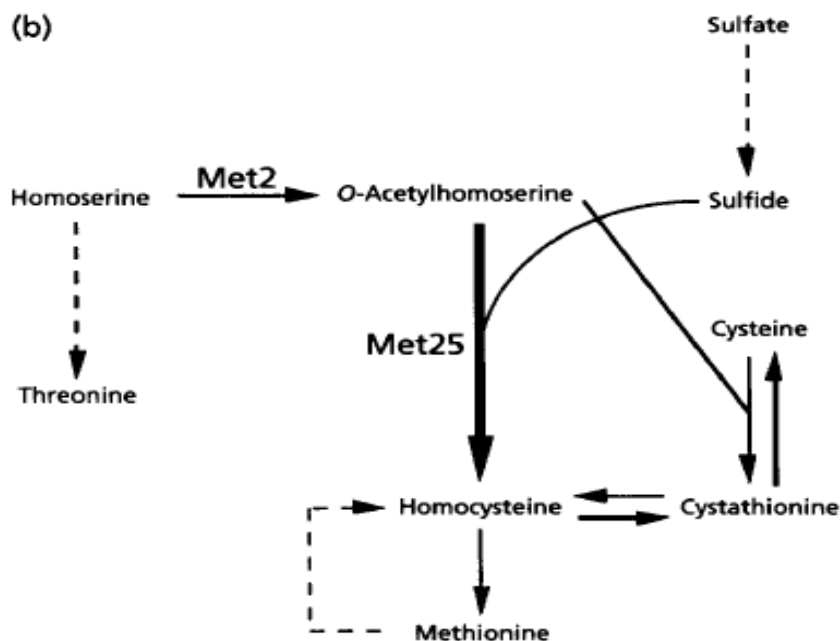
Εικόνα 2α: Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης μεθειονίνης στο *E. coli*.

Η βιοσύνθεση της μεθειονίνης ξεκινά από την ομοσερίνη και το πρώτο ενεργοποιημένο παράγωγο είναι η Ο- ηλεκτυλομοσερίνη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η ακετυλομεταφοράση της ηλεκτρילו-ομοσερίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *metA*. Η ενεργοποιημένη ομοσερίνη αντιδρά αμέσως με την κυστεΐνη και παράγεται κυσταθειονίνη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η γ-συνθάση της κυσταθειονίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *metB*. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κυσταθειονίνη μετατρέπεται σε ομοκυστεΐνη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η β-λυάση της κυσταθειονίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *metC*. Η ομοκυστεΐνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο της μεθειονίνης. Στο *E. coli* υπάρχουν δυο ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση της μεθυλίωσης της ομοκυστεΐνης και παράγουν μεθειονίνη:

- Το πρώτο ένζυμο είναι το προϊόν του γονιδίου *metH* (EC 2.1.1.13) το οποίο χρησιμοποιεί την βιταμίνη B12 ως συμπάραγοντα και η μεθυλομάδα προέρχεται από το 5- μεθυλοτετραυδροφολικό ή από τα παράγωγα αυτού.
- Το δεύτερο ένζυμο είναι το προϊόν του γονιδίου *metE* (EC 2.1.1.14) και καταλύει την αντίδραση της μεταφοράς της μεθυλομάδα απο το 5-μεθυλοτετραυδροπτερυλ-L- γλουταμινικό (Kung et al. 1972).

Και στις δυο περιπτώσεις ο αρχικός άνθρακας προέρχεται από το μεταβολισμό της σερίνης. Τα γονίδια του μεταβολικού μονοπατιού βιοσύνθεσης της μεθειονίνης *metA*, *metB*, *metC*, *metE* και *metF* είναι λίγο πολύ διασκορπισμένα μέσα στο βακτηριακό γονιδίωμα.

Εν αντιθέση με το *E. coli* σε άλλους μικροοργανισμούς όπως στον *S. cerevisiae* ακολουθείται διαφορετικό μονοπάτι (εικόνα 2b). το πρώτο ενεργοποιημένο παράγωγο είναι η Ο- ακετυλοσερίνη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η τρανσακετηλάση της ομοσερίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *met2* (Langin *e t al.*, 1986). Στη συνέχεια η ακετυλοσερίνη μετατρέπεται απευθείας σε ομοκυστεΐνη και όχι σε δυο στάδια. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η σουλφρυδιλάση της ομοσερίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *MET25 (metZ)* (Kerjan *e t al.*, 1986). Η ομοκυστεΐνη αποτελεί το πρόδρομο και μοναδικό μόριο για την σύνθεση κυστεΐνης και μεθειονίνης στις ζύμες, ωστόσο στον *S. cerevisiae* έχει βρεθεί ότι και τα δυο μονοπάτια λειτουργούν παράλληλα (Kerjan *e t al.*, 1986). Το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης της μεθειονίνης είναι κοινό σε όλους τους οργανισμούς.



Εικόνα 2b: Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης μεθειονίνης στο *S. cerevisiae*.

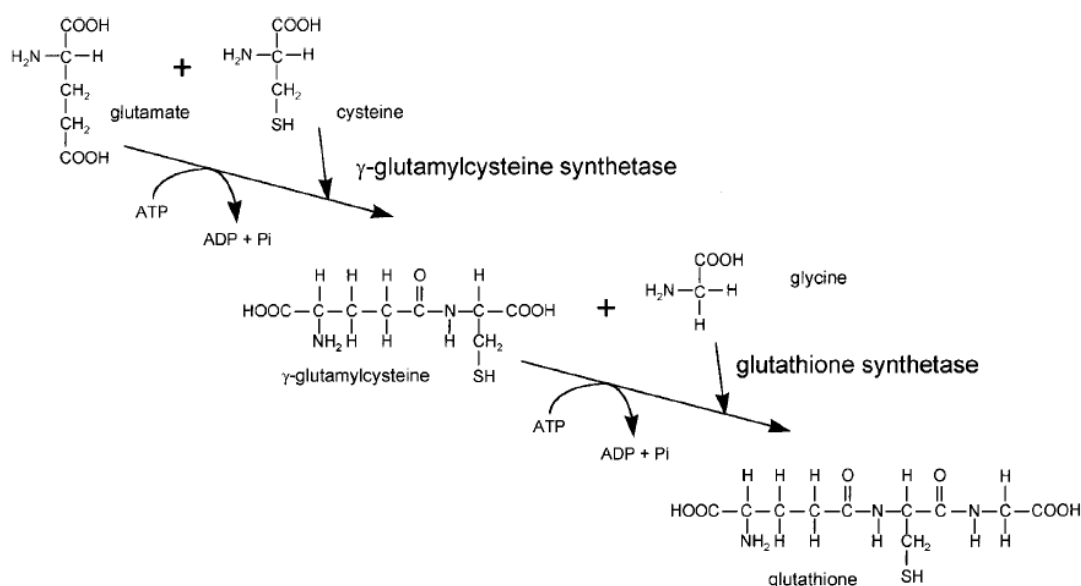
#### A.1.4 Βιοσύνθεση γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη (GSH) βρίσκεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα προκαρυωτικά κύτταρα βρίσκεται σε όλα τα gram<sup>-</sup> βακτήρια, ενώ στα gram<sup>+</sup>, με εξαίρεση κάποια είδη των *Streptococcus* και *Enterococcus*, δεν απαντάται (Fahey et al 1987; Newton, et al 1996). Ωστόσο κάποια gram<sup>+</sup> βακτήρια μπορούν να συνθέσουν ή να προσλάβουν γλουταθειόνη από το μέσο ανάπτυξης τους (Sherrill et al 1998, Vergauwen et al 2003). Προαιρετικά αερόβια και αναερόβια βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την απουσία GSH, συνθέτουν άλλες θειόλες χαμηλού μοριακού βάρους, που αναπληρώνουν τις ίδιες λειτουργίες που επιτελούσε η γλουταθειόνη.

Η γλουταθειόνη, στην ανηγμένη της μορφή (GSH), είναι ένα ισοτριπεπτιδίο, γ-glu-cys-gly (εικόνα 3) και μοριακής μάζας 307 dalton, το οποίο έχει δυο αρνητικά φορτισμένες καρβόξυ ομάδες και μια θετικά φορτισμένη αμινομάδα κάτω από φυσιολογικές τιμές pH. Η παρουσία του γ-γλουταμιλικού δεσμού προστατεύει το τριπεπτιδίο από την δράση των κυτταρικών πεπτιδασών. Η σουφριδιλομάδα της κυστεΐνης δρα ως δότης ηλεκτρονίων, εφοδιάζοντας το μόριο της γλουταθειόνης με αναγωγικές ιδιότητες και ιδιότητες αποτοξίνωσης ελεύθερων ριζών. Η αντίδραση ενός ηλεκτρονίου της γλουταθειόνης με μια ελεύθερη ρίζα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό θεικών ελεύθερων ριζών GS<sup>•</sup>. Δυο GS<sup>•</sup> αντιδρώντας μεταξύ τους δημιουργούν οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Μια δεύτερη αναγωγική αντίδραση στην οποία παίρνει μέρος η γλουταθειόνη είναι ο σχημαρισμός και η αναγωγή δισουλφιδικών

δεσμών. Η αντίδραση αυτή κατέχει ρόλο κλειδί στο σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών (RSSR), δίνοντας τις ρυθμιστικές ιδιότητες αυτών (Kosower et al 1978).

Η γλουταθειόνη σε όλα τα κύτταρα είναι το προϊόν δύο συνεχόμενων βιοχημικών αντιδράσεων. Η πρώτη αντίδραση περιλαμβάνει τη συμπύκνωση ενός μορίου κυστεΐνης στο άμινο άκρο ενός μορίου γλουταμινικού και τον σχηματισμό γ-γλουταμιλκυστεΐνης (γ-EC). Η δεύτερη αντίδραση περιλαμβάνει τον σχηματισμό της γλουταθειόνης με τη προσθήκη ενός μορίου γλυκίνης στο C- άκρο της γ- EC. Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές είναι η συνθετάση της γ- γλουταμιλκυστεΐνης (γ-GCS) (EC 6.3.2.2) και η συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) (EC6.3.2.3). Και στις δυο αντιδράσεις καταναλώνεται ένα μόριο ATP (Meister, 1988; Cohen, 1998;). Στο *E. coli* τα γονίδια *gshA* και *gshB* κωδικοποιούν για τις γ-GCS και GS, αντίστοιχα.



**Εικόνα 3:** Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης γλουταθειόνης στο *E. coli*

### A.1.5 Μεταβολισμός του θείου και συμβιωτική αζωτοδέσμευση.

Ο ρόλος του θείου ως συστατικό πολλών βιολογικών μορίων είναι γνωστός και πολύ σημαντικός. Συμμετέχει στη δομή των πρωτεϊνών και σε πολλούς πρωτεϊνικούς συμπαράγοντες. Στο εσωτερικό των βακτηριοειδών βρίσκεται περίπου η μισή ποσότητα των συνολικών πρωτεϊνών που περιέχουν τα φυμάτια του *L. japonicus* (Gaude et al 2004). Οι δομικές πρωτεΐνες της νιτρογενάσης NifH, NifD και NifK είναι από τις πιο άφθονες στο εσωτερικό των βακτηριοειδών. Κάθε ενεργό σύμπλοκο νιτρογενάσης περιέχει δυο NifH, μια NifD και μια NifK υπομονάδα με συνολικά 75 αμινοξέα που περιέχουν θείο στο σύμπλοκο

του *M. loti*. Επίσης, περιέχει τέσσερα μέταλλο-θείο σύμπλοκα ( [4Fe-4S], [8Fe-7S], [4Fe-3S] και [3Fe-Mo-3S]) τα οποία δρουν ως αγωγοί για τη ροή ηλεκτρονίων προς το μοριακό άζωτο και την αναγωγή αυτού (Dos santos et al 2004). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι το θείο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για τη λειτουργία των φυματίων.

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για να καθοριστεί η μορφή του παρεχόμενου θείου που είναι διαθέσιμο στα βακτηριοειδή από τα φυτά ξενιστές τους κατά τη διάρκεια της συμβιωτικής σχέσης. Οι έρευνες αυτές πραγματοποιήθηκαν με αυξότροφα στελέχη βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αφομοιώνουν και να αναπτύσσονται με διαφορετικές πηγές θείου. Ένα αυξότροφο ως προς τη μεθειονίνη στέλεχος του ριζόβιου βακτηρίου *Rhizobium leguminosarum* δημιουργεί λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του μπιζελιού (Pain 1979), υποδεικνύοντας ότι τα βακτηριοειδή εφοδιάζοντα με επαρκή ποσότητα μεθειονίνης από τα κύτταρα του φυτού ξενιστή τους. Σε αντίθεση με το παραπάνω, μεταλλαγμένα στελέχη του *Rhizobium meliloti* αυξότροφα στην μεθειονίνη δημιουργούν μη λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες της μηδικής, υποδεικνύοντας ότι ο εφοδιασμός τους από τα κύτταρα της ρίζας δεν είναι επαρκής για να καλύψει τις ανάγκες τους (Kerppola and Kahn 1988). Μια άλλη μελέτη απαντάει στο ερώτημα για το ποιές μορφές θείου παρέχονται στα βακτηριοειδή του *Rhizobium etli* κατά την συμβίωση του με το *Phaseolus vulgaris*. Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του *R. etli* ως προς το γονίδιο που κωδικοποιεί για την συνθάση της σιροαΐμης (*cysG*), καταστεί το στέλεχος αυτό ανίκανο να αναπτυχθεί με θειικά ως μοναδική πηγή θείου. Το στέλεχος αυτό δημιουργεί λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του *Phaseolus vulgaris* γεγονός που παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι τα μολυσμένα κύτταρα του φυματίου μπορούν να εφοδιάζουν τα βακτηριοειδή τους και με πηγές θείου διαφορετικές από τα θειικά (Tate et al 1997). Πιθανόν το παρεχόμενο θείο να βρίσκεται υπό τη μορφή αμινοξέων όπως κυστεΐνη, μεθειονίνη και γλουταθειόνη. Μια αντίστοιχη έρευνα με το *R. etli* αλλά αυτή τη φορά το μεταλλαγμένο στέλεχος ήταν ως προς το *metZ* γονίδιο, που κωδικοποιεί για την σουλφρυδηλάση της Ο ηλεκτρολυμοσερίνης. Το στέλεχος αυτό δεν μπορεί να αναπτυχθεί με θειικά ως μοναδική πηγή θείου ενώ αναπτύσσεται κανονικά με μεθειονίνη, κυσταθειονίνη και ομοκυστεΐνη (Tate et al 1998). Το *metZ* στέλεχος δημιουργεί μη λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του *Phaseolus vulgaris*. Το γεγονός αυτό αφαιρεί την μεθειονίνη από την παραπάνω υπόθεση. Στο *Sinorhizobium meliloti* τα γονίδια *gshA* και *gshB*, που καταλύουν τις δυο συνεχόμενες αντιδράσεις βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, είναι απαραίτητα για τη δημιουργία λειτουργικών φυματίων με τη μηδική (Harrison et al 2005). Μεταλλαγμένα στελέχη του *S. meliloti* ως προς τα *gshA* και *gshB* έδειξαν ότι κάτω από συνθήκες ελεύθερης ανάπτυξης τα βακτηριακά κύτταρα απαιτούσαν τη σωστή λειτουργία μόνο του *gshA* γονιδίου ενώ για τη δημιουργία και ανάπτυξη των φυματίων χρειαζόνταν και τα δυο γονίδια. Το

γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι τα βακτηριοειδή δεν εφοδιάζονται με επαρκή ποσότητα γλουταθειόνης από τα κύτταρα του φυτού ξενιστή τους.

Σε κάθε περίπτωση, το κάθε φυτό ξενιστής παρέχει διαφορετικά θρεπτικά συστατικά στα βακτηριοειδή του. Η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, από τη σύγκριση διαφορετικών συστημάτων ριζόβιων-ψυχανθών, είναι δύσκολη. Από τη μεριά του φυτού, έχει περιγραφεί ένας μεταφορέας θεικών που εδράζεται στην συμβιωτική μεμβράνη των φυματίων του *Lotus japonicus* (Wienkoop and Saalbach 2003), ο οποίος είναι εξειδικευμένος για τα φυμάτια και απαραίτητος για την ΣΒΑ στο σύστημα *L. japonicus*-*M.loti* (Kruse et al 2005). Ο *sst1* είναι το μοναδικό γονίδιο θεικών που έχει βρεθεί μέχρι τώρα να εκφράζεται εξειδικευμένα στα φυμάτια του *L. Japonicus* και αποτελεί μια σημαντική ένδειξη ότι το θείο αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση στο συγκεκριμένο φυτό.

Επίσης, είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί, ότι τα βακτήρια στα φυμάτια της ρίζας των ελλειματικών σε θείο ψυχανθών εξακολουθούν να εφοδιάζονται καλά με θείο (O'Hara et al 1987). Η υψηλή ευαισθησία της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στην έλλειψη θείου επομένως αντανακλά είτε στην αποσύνδεση του μεταβολισμού των βακτηρίων από αυτόν του φυτού, είτε στην απενεργοποίηση κάποιου από τα διάφορα 'σήματα που τροποποιούν την δραστηριότητα της νιτρογενάσης.



## **A.2 Το *Mesorhizobium loti***

### **A.2.1 Γενικά**

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα Gram<sup>(-)</sup> βακτήριο της ριζόσφαιρας με ιδιαίτερη γεωργική σημασία αφού διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει μοριακό άζωτο και να το μετατρέπει σε αμμωνία, αποικίζοντας τις ρίζες πολλών ειδών του γένους *Lotus*.

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα ενδοσυμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Phyllobacteriaceae, η οποία ταξινομικά κατατάσσεται στην τάξη των Rhodospirillales/Rhizobiales, στην κλάση Alphaproteobacteria και στην Α' υποδιαίρεση του φύλλου των Πρωτεοβακτηρίων (Proteobacteria)

### **A.2.2 Το γένωμα του *Mesorhizobium loti***

Τα γονίδια των ριζοβίων που εμπλέκονται στη διαδικασία συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης βρίσκονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια, τα οποία στα γένη *Rhizobium* και *Sinorhizobium* αποκαλούνται συμβιωτικά πλασμίδια (pSym). Αντίθετα, η πλειοψηφία των γονιδίων της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης φαίνεται να εδράζει στα χρωματοσώματα, στα γένη *Mesorhizobium* και *Bradyrhizobium*.

Το *Mesorhizobium loti* είναι ένα μέλος των ριζοβίων, που έχει την ικανότητα να σχηματίζει σφαιρικά καθορισμένα φυμάτια και να συμβιώνει με πολλά είδη του γένους *Lotus*. Ένα χαρακτηριστικό του χρωμοσώματος του *M. loti* είναι η ικανότητα οριζόντιας μεταφοράς ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 Kb και η ενσωμάτωση αυτού στο χρωμόσωμα. Η περιοχή αυτή είναι γνωστή ως «συμβιωτική νησίδα» και περιέχει γονίδια σχετικά με την συμβίωση του ριζοβίου με το φυτό (Uchiyama *et al.*, 2004). Μάλιστα, έχει αναφερθεί για το στελέχος ICMP3135 του *Mesorhizobium loti* ότι το στοιχείο αυτό είναι μεταβιβάσιμο σε μη-συμβιωτικά είδη *Mesorhizobium*, που αποκτούν την δυνατότητα σχηματισμού φυματίων (Sullivan and Ronson 1998). Ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *M. Loti* στελέχους MAFF303099 έχει πλήρως καθοριστεί (Kaneko, Nakamura, Sato *et al.* 2000). Το γένωμα του *M. loti* αποτελείται από τρία κυκλικά μόρια: ένα χρωμόσωμα των 7.036.071 βάσεων και δύο πλασμίδια, τα pMLa (351.911bp) και pMLb (208.315bp). Τα ποσοστά περιεκτικότητας σε GC στο χρωμόσωμα, το pMLa και το pMLb είναι 62.7%, 59.3% και 59.9% αντίστοιχα.

Το χρωμόσωμα περιλαμβάνει 6.752 πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Κάθε γονίδιο έχει μέγεθος, κατά μέσο όρο, 1.042bp, δηλαδή ανάλογο με αυτό των βακτηριακών

ειδών που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα. Τα πλασμίδια pMLa και pMLb έχουν την ικανότητα να κωδικοποιούν για 320 και 209 πρωτεΐνες, αντίστοιχα.

Η σύγκριση των 6752 πιθανών γονιδίων του χρωμοσώματος με ανάλογα γονίδια της Βάσης Δεδομένων nr έδειξε ότι 3.675 (54%) είναι ομόλογα με γονίδια γνωστής λειτουργίας, 1.423 (21%) έδειξαν ομοιότητα με γονίδια, η λειτουργία των οποίων είναι υποθετική ακόμα, ενώ τα υπόλοιπα 1.654 (25%) δεν φανέρωσαν ομοιότητα με κανένα γνωστό γονίδιο. Ο αριθμός των γονιδίων άγνωστης λειτουργίας στα δυο πλασμίδια pMLa και pMLb είναι σημαντικός ( 50% και 64% αντίστοιχα).

Δυο αντίγραφα ομάδων γονιδίων του ριβοσωμικού RNA αναγνωρίστηκαν στο γένωμα με την σειρά των 16S-23S-5S. Δυο *Tna* γονίδια, τα *trnI* και *trnA* εντοπίστηκαν μεταξύ του 16S και 23S Rna γονιδίων, ενώ το *trnFM* εντοπίστηκε σε θέση πριν το 5S Rna γονίδιο. Παράλληλα, έχει βρεθεί ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την RNA υπομονάδα της RNAάσης P. Ένα σύνολο 50 *Tna*, που αντιπροσωπεύει 47 είδη *Tna*, τα οποία είναι ικανά να δεσμεύουν όλα τα είδη κωδικονίων, φαίνεται πως εδράζει στο χρωμόσωμα. Κανένα από τα tRNAs δεν περιέχει κανενός είδους ιντρόνιο. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό όσος αφορά τα *Tna* του *M. loti* είναι η παρουσία tRNAs, που φέρουν ένα κατάλοιπο C στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου τους για συνώνυμα κωδικόνια. Αυτά τα *Tna* δεν είναι απαραίτητα για τη διαδικασία της μετάφρασης, αφού τα κωδικόνια με πουρίνη (A ή G) στην Τρίτη θέση μπορούν να αποκωδικοποιηθούν με την βοήθεια tRNAs, που φέρουν κατάλοιπα U στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου. Έτσι, είναι πιθανό αυτή η ποικιλία των tRNAs να αποτελεί συνέπεια της προσαρμομογής στα υψηλά ποσοστά CG στο γένωμα του *M. loti*. Κανένα RNA δεν κωδικοποιείται από το πλασμιδιακό γένωμα.

### **A.2.3 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των γονιδίων του *M. loti***

#### **A.2.3.1 Γονίδια που εδράζονται στη «συμβιωτική νησίδα»**

Η παρουσία ενός DNA τμήματος μεγέθους περίπου 500Kb, που περιέχει τα γονίδια συμβίωσης, είναι μεταβιβάσιμο και ονομάζεται «συμβιωτική νησίδα» στο *Mesorhizobium loti* στέλεχος ICMP3135, φαίνεται να επιβεβαιώνεται και στο στέλεχος MAFF303099. Το κομμάτι αυτό του DNA, μεγέθους 610.975 bp περιέχει 30 γονίδια που εμπλέκονται στην αφομοίωση του αζώτου και 24 που εμπλέκονται στον σχηματισμό των φυματίων. Ένα σύνολο 580 γονιδίων έχει βρεθεί στη συμβιωτική νησίδα του στελέχους MAFF303099, που καλύπτουν όλες τις λειτουργικές κατηγορίες. Έτσι, στην συγκεκριμένη περιοχή βρέθηκαν τα εξής γονίδια :

- Δώδεκα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες συζευκτικής μεταφοράς, με τα εννέα από αυτά να σχηματίζουν μια μεγάλη ομάδα γονιδίων. Υπάρχουν ακόμα 4 επιπρόσθετα

γονίδια για αυτήν την λειτουργία εκτός της συγκεκριμένης περιοχής. δύο από αυτά, τα *traA* και *traD* βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο, και πιθανόν να συμβάλλουν στην μεταφορά της συμβιωτικής νησίδας.

- Δυο ομάδες γονιδίων, η κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από 4 γονίδια, που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της βιοτίνης. Παρόμοια ομάδα γονιδίων φαίνεται να υπάρχει και στο πλασμίδιο pMLa. Η ομάδα γονιδίων που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της θειαμίνης αποτελείται από έξι γονίδια αν και το *thiG* φαίνεται να διαχωρίζεται σε δυο ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) λόγω μετάλλαξης. Η παρουσία αυτών των γονιδίων στο μεταβιβάσιμο τμήμα του DNA είναι σύμφωνη με την παρατήρηση ότι διαφορετικά στελέχη του *M. loti*, που διαθέτουν την ικανότητα σχηματισμού φυματίου, μπορούν να αναπτυχθούν απουσία βιοτίνης και θειαμίνης στο μέσο καλλιέργειας.
- Από τα 580 αναγνωρισμένα γονίδια, τα 111 (ποσοστό 19,6%) σχετίζονται με λειτουργίες όπως μεταφορά, συνένωση, ανασυνδυασμός και διαλυτότητα. Σε αντίθεση με την υψηλή αναλογία γονιδίων αυτής της κατηγορίας, τα ποσοστά των αναλόγων γονιδίων στο υπόλοιπο χρωμόσωμα καθώς και στα πλασμίδια pMLa και pKLB είναι σαφώς χαμηλότερα (30 από τα 6172, 0.5%, 24 από τα 320, 7.5% και 6 από τα 209, 2.9% αντίστοιχα). Η άνιση κατανομή τέτοιων γονιδίων στη συμβιωτική νησίδα δείχνει την παρουσία σημείων εισαγωγής μεταθετών στοιχείων. Παράλληλα, η παρατήρηση ότι διακοπτόμενα γονίδια εντοπίζονται ανάμεσα σε αυτά που εμπλέκονται στο σχηματισμό φυματίων και στην μεταφορά, ενισχύει την άποψη πως δραστικές ανακατατάξεις πρέπει να έλαβαν χώρα στη συμβιωτική νησίδα με ενθέσεις και μεταθέσεις διαφόρων μεταθετών στοιχείων DNA.
- Τέλος, μια ομάδα γονιδίων σχετίζεται με την επαγωγή και έκκριση σημάτων κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας του φυτού. (Hueck 1998)

Τα 250 από τα 580 γονίδια της συμβιωτικής νησίδας, εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας (ίσο ή μεγαλύτερο από 30% ως προς την αμινοξική ακολουθία) με αυτά του συμβιωτικού πλασμίδιου Pngr234a του *Rhizobium sp. NGR234*(536Kb). (Freiberg, Fellay, et al. 1997) Αυτό παρέχει ισχυρές ενδείξεις πως οι δυο αυτές μονάδες DNA, που παρέχουν την ικανότητα σχηματισμού φυματίων και αζωτοδέσμευσης, έχουν κοινό πρόγονο. Όταν οι σχετικές θέσεις για κάθε γονίδιο συγκρίθηκαν, η σειρά των γονιδίων μέσα στην ομάδα για διάφορες βιολογικές λειτουργίες, έδειξαν ότι ήταν συντηρημένες. Ωστόσο, οι σχετικές θέσεις των ομάδων γονιδίων των δυο προαναφερθέντων DNA μονάδων σπάνια είναι συντηρημένες.

### **A.2.3.2 Γονίδια που σχετικά με τον σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση**

Έχουν εντοπιστεί 39 γονίδια σχετικά με τον σχηματισμό φυματίων στο χρωμόσωμα, με 24 από αυτά να ανήκουν στην περιοχή που είναι γνωστή ως συμβιωτική νησίδα, ενώ για την δέσμευση του αζώτου φαίνεται να υπάρχουν 46 γονίδια, από τα οποία 30 βρίσκονται στη νησίδα. Μόνο ένα ομόλογο με το *noeC* γονίδιο έχει εντοπιστεί σε πλασμιδιακό DNA (pMLa). Έχει αναφερθεί στη σχετική βιβλιογραφία πως το NodD γονιδιακό προϊόν ρυθμίζει την μεταγραφή ενός συνόλου γονιδίων (οπερόνιο *nod*) που σχετίζονται με το σχηματισμό φυματίου, με την δέσμευσή του σε μια περιοχή (*cis*-ρυθμιστικό στοιχείο) ανωφερικά των συγκεκριμένων γονιδίων, που λέγεται κουτί *nod* (Rostas, Kondorosi, Horvath, et al. 1986). Εννέα γονίδια έχουν βρεθεί να περιέχουν ακολουθίες όμοιες με το κουτί *nod* ανωφερικά του οπερονίου. Αυτές περιλαμβάνουν τα γονίδια *nodZ-noeL-nolK*, *nods*, *nolL*, και τον διμερή ρυθμιστικό παράγοντα *y4xl*. Παρόμοιες αλληλουχίες έχουν βρεθεί και στο πλασμιδίον Png234a. Ένα σύστημα μεταφοράς δικαρθοξυλικών οξέων όπως ηλεκτρικό, μηλικό και φουμαρικό από τον περιπλασμικό χώρο στο εσωτερικό της μεμβράνης παίζει σημαντικό ρόλο στον εφοδιασμό του βακτηρίου με ενέργεια κατά την διάρκεια της συμβίωσης (Yurgel, Mortimer, et al. 2000). Δυο σύνολα γονιδίων για το C4-δικαρθοξυλικό μεταφορικό σύστημα έχουν αναφερθεί εντός και εκτός του συμβιωτικού νησιού.

### **A.2.3.3 Γονίδια που εδράζονται στην περιοχή των πλασμιδίων**

Το pMLa περιέχει 40 γονίδια για το ABC-μεταφορικό σύστημα, εκ των οποίων 18 δίνουν ATP-εξαρτώμενα προϊόντα, 7 δίδουν εξαρτώμενα από το υπόστρωμα προϊόντα και 15 δίνουν περμεάσες (ένζυμα μεταφοράς), ενώ το pMLb εμπεριέχει μόνο 5 γονίδια αυτού του συστήματος. Από την άλλη πλευρά, το pMLb περιέχει 10 γονίδια ενός διμερούς συστήματος, που περιλαμβάνει 6 γονίδια-αισθητήρες και 4 γονίδια-ρυθμιστές, την στιγμή που μόνο 2 γονίδια-ρυθμιστές έχουν βρεθεί στο pMLa. Παράλληλα, στο pMLb υπάρχουν γονίδια για τις υπομονάδες 1,2 και 3 της οξειδάσης του κυτοχρώματος, αν και η σημασία της λειτουργίας αυτών των γονιδίων στο πλασμιδιακό γονιδίωμα δεν είναι φανερή. Εννέα συζευκτικά γονίδια εντοπίζονται στο pMLb, και δέκα στο pMLa. Τέλος, τρία γονίδια, που αφορούν την αντιγραφή του DNA, τα *repA*, *repB* και *repC*, βρίσκονται και στα δυο πλασμίδια. Η αλληλουχία OriV (έναρξη της αντιγραφής) εντοπίζεται ανάμεσα στα *repB* και *repC* γονίδια και στα δυο πλασμίδια (Chain, Finan et al. 2000).

Μερικά ακόμη χαρακτηριστικά γονίδια του βακτηριακού γονιδιώματος του *M. loti* είναι τα εξής:

- Δυο γονίδια για τον σ54 παράγοντα, που εμπλέκεται στον έλεγχο της μεταγραφής των σημαντικότερων γονιδίων αζωτοδέσμευσης όπως του *nifHDK* (Kullik, Fritsche et al. 1991).
- Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την μεγάλη υπομονάδα της ρεδουκτάσης των νιτρικών, η οποία περιέχει μια περιοχή περίπου 90 αμινοξέων, που έχει παρεισφρήσει σε αυτό.
- Πέντε ζεύγη μοριακών συνοδών groES-groEL βρίσκονται στο γονιδίωμα. Ένα βρίσκεται εντός του συμβιωτικού νησιού, τρία εκτός και ένα στο pMLa πλασμίδιο.

Τέσσερις ομάδες γονιδίων για την δομή του μαστιγίου, την συναρμολόγηση και την κίνησή του έχουν αναγνωριστεί σε μια περιοχή 47Kb. Οι δυο πρώτες ομάδες που περιέχουν 5 και 20 γονίδια αντίστοιχα, εμφανίζονται συντηρημένες στα *Sinorhizobium meliloti* και *Agrobacterium tumefaciens* σε κάποιο βαθμό (Souřjik, Bos et al. 1998, Deakin, Parker et al. 1999). Οι υπόλοιπες δυο ομάδες περιέχουν 7 γονίδια, με δυο από αυτά να είναι μοναδικά στο *M. loti*.

Η ηλεκτρογλυκάνη είναι ένα όξινο πολυσακχαρίδιο που παίζει σπουδαίο ρόλο στον σχηματισμό φυματίων (Reuber and Walker 1993). Η παρουσία μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων για την οικογένεια των γλυκοσυλικών μεταφορασών, που απαιτείται για την σύνθεση της ηλεκτρογλυκάνης έχει αναφερθεί στο *S. Meliloti* (Glucksmann, Reuber and Walker 1993). Στο *M. loti* υπάρχει μια αντίστοιχη ομάδα, αλλά το *exoI*, *exoZ* και *exoB* βρίσκονται σε ξεχωριστά μέρη στο γένωμα. Δεν βρέθηκαν *exoH*, *exoW* και *exoV* γονίδια είτε στο χρωμόσωμα είτε στα πλασμίδια, αλλά αντίθετα έχουν βρεθεί τρία γονίδια ομόλογα με αυτά της τροποποίησης των σακχάρων. Είναι, λοιπόν πιθανό τα τρία αυτά γονίδια του *M. loti* να αντικατέστησαν τα *exoH*, *exoW* και *exoV* γονίδια του *S. Meliloti*, ή το *M. loti* να παράγει διαφορετικό τύπο ηλεκτρογλυκάνης

### **A.3 Η ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ**

#### **A.3.1. Γενικά**

Το άζωτο συμμετέχει ως συστατικό σε ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων μεγάλης σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και μερικά συνένζυμα. Την κύρια πηγή προέλευσης του οργανικού αζώτου αποτελεί η ατμόσφαιρα της γης, όπου το στοιχείο αυτό απαντάται στη μοριακή του μορφή ( $N_2$ ), σε ποσοστό 80%. Παρ' όλα αυτά, το άζωτο σε αυτήν τη μορφή χαρακτηρίζεται από χαμηλή χημική δραστηριότητα (αδρανές αέριο), λόγω της ύπαρξης του τριπλού δεσμού, η αναγωγή του οποίου απαιτεί την καταβολή μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας (16 μόρια ATP), καθώς και την ύπαρξη εξειδικευμένου ενζυμικού μηχανισμού. Έτσι, το ατμοσφαιρικό άζωτο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την πλειοψηφία των οργανισμών. Η μετατροπή, του μοριακού αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή μπορεί να πραγματοποιηθεί με βιολογικές, φυσικές και ανθρωπογενείς διεργασίες (Δροσόπουλος 1992).

Στις ανθρωπογενείς διεργασίες, περιλαμβάνεται η μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αφομοιώσιμες μορφές ( $NH_3$ ,  $NO_3^-$ ,  $CN_2^{--}$ ) και ο εμπλουτισμός του εδάφους με αυτές, με τη μορφή χημικών λιπασμάτων. Η παραγωγή χημικών λιπασμάτων απαιτεί συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας.

Στις φυσικές διεργασίες περιλαμβάνεται η αφομοίωση του μοριακού αζώτου μέσω οξειδίων του ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ) που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών εκκενώσεων, τα οποία στη συνέχεια φτάνουν στο έδαφος με τη βοήθεια των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων (Δροσόπουλος 1992). Η συνεισφορά, όμως, των διεργασιών αυτών είναι πολύ μικρή για να στηρίξει τις ανάγκες των οικοσυστημάτων σε αφομοιώσιμο άζωτο.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται κυρίως από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στα ευβακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια (Widmer, F. et al., 1999; Zehr, J. P. et al., 2003). Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί διαθέτουν το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, ανάλογα με τον τρόπο διαβίωσης τους κατά τη διεργασία δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες.

- Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί, οι οποίοι είναι είτε αναερόβιοι (π.χ. *Clostridium pasteurianum*), είτε ευκαιριακά αναερόβιοι (π.χ. *Klebsiella*), είτε τέλος αερόβιοι (π.χ. *Azotobacter*, *Azospirillum*). Η συνεισφορά όλων των παραπάνω μικροοργανισμών στη δέσμευση του αζώτου είναι πολύ μικρή και υπολογίζεται σε λιγότερο από 1 Kg N/ha ετησίως κατά μέσο όρο (Bothe et al. 1983). Μια

ιδιαίτερη περίπτωση είναι αυτή των αυτότροφων φωτοσυνθετικών κυανοπράσινων αλγών (οικ. Nostocaceae), τα οποία λόγω της ανεξαρτησίας τους από την ύπαρξη οργανικού άνθρακα στο περιβάλλον τους ως πηγή ενέργειας, συμβάλλουν σημαντικά στον εμπλουτισμό του εδάφους σε αφομοιώσιμο άζωτο, σε βαθμό που φτάνει τα 38 Kg N/ha ετησίως (Witty et al. 1979). Τέλος, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ελεύθερα διαβιούντων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, που ανήκουν στους ακτινομύκητες και τους μύκητες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μοριακό άζωτο, η σημασία των οποίων, όμως, είναι πολύ περιορισμένη.

- Στην δεύτερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτοί που δημιουργούν συνεργιστικές σχέσεις με ανώτερα φυτά, διαβιώντας είτε σε στενή επαφή με τη ριζόσφαιρα είτε ακόμη και μέσα στους μεσοκυττάριους χώρους. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών που ζουν και πολλαπλασιάζονται στο αγωγό σύστημα της ρίζας και του βλαστού διαφόρων ειδών σιτηρών (De-Polli et al. 1982). Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα γένη βακτηρίων *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Pseudomonas* (Boddey and Dobreiner 1988).
- Η τρίτη και σημαντικότερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτή που δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά. Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Azorhizobium*, τα οποία αναφέρονται συνολικά ως ριζόβια, καθώς και στο γένος *Frankia*. Τα ριζόβια ανήκουν στην α-πρωτεοβακτηριακή οικογένεια *Rhizobiaceae* και επάγουν το σχηματισμό φυματίων σε φυτά της οικογένειας των ψυχανθών (*Fabaceae* ή *Leguminosae*), με εξαίρεση το γένος *Parasporia* των *Ulmaceae*. Το *Frankia* είναι ένας νηματοειδής Gram θετικός ακτινομύκητας που επάγει το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά που ανήκουν στις οικογένειες *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* και *Datisticaceae* (Benson, D. R., and M. L. Clawson., 2000; Benson, D. R., and W. B. Silvester., 1993). Ενδιαφέρον προκαλεί πρόσφατη ανακάλυψη ότι και άλλα βακτήρια εκτός των ριζοβίων προκαλούν το σχηματισμό φυματίων σε ψυχανθή. Για παράδειγμα, ένα στέλεχος του α-πρωτεοβακτηρίου *Methylobacterium* σχηματίζει φυμάτια στο *Crotalaria* και β-πρωτεοβακτήρια συγγενικά του *Burkholderia* με τα φυτά *Machaerium lunatum* και *Aspalathus carnosa*. Πιθανότατα αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν αποκτήσει γονίδια που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση με οριζόντια μεταφορά (Moulin, L. et al., 2001; Sy A. et al., 2001).

### A.3.2. Συμβιωτική σχέση ριζόβιου-ψυχανθούς

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πλέον σημαντική συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου είναι αυτή μεταξύ ριζοβίου και ψυχανθούς. Το αποτέλεσμα της συμβιωτικής αυτής σχέσης είναι ο σχηματισμός ενός νέου φυτικού οργάνου, με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο ονομάζεται φυμάτιο. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση αποβαίνει αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες, αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο.

#### A.3.2.1. Ειδοεξειδίκευση ριζόβιων-ψυχανθων.

Απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό φυματίου είναι το ριζόβιο να είναι συμβατό με το φυτό και υπάρχει εξειδίκευση στη συμβιωτική σχέση μικροβίου-φυτού. Στην περίπτωση ασυμβατότητας είτε δε σχηματίζεται φυμάτιο είτε το φυμάτιο είναι μη λειτουργικό. Στον εικόνα 4 παρουσιάζονται τα κυριότερα είδη βακτηρίων και τα αντίστοιχα φυτά με τα οποία μπορούν να αναπτύξουν συμβιωτική σχέση. Παρατηρείται ότι ορισμένα ριζόβια έχουν την ικανότητα να συμβιώνουν με ένα ευρύ φάσμα φυτών, ενώ άλλα με ένα πιο στενό.

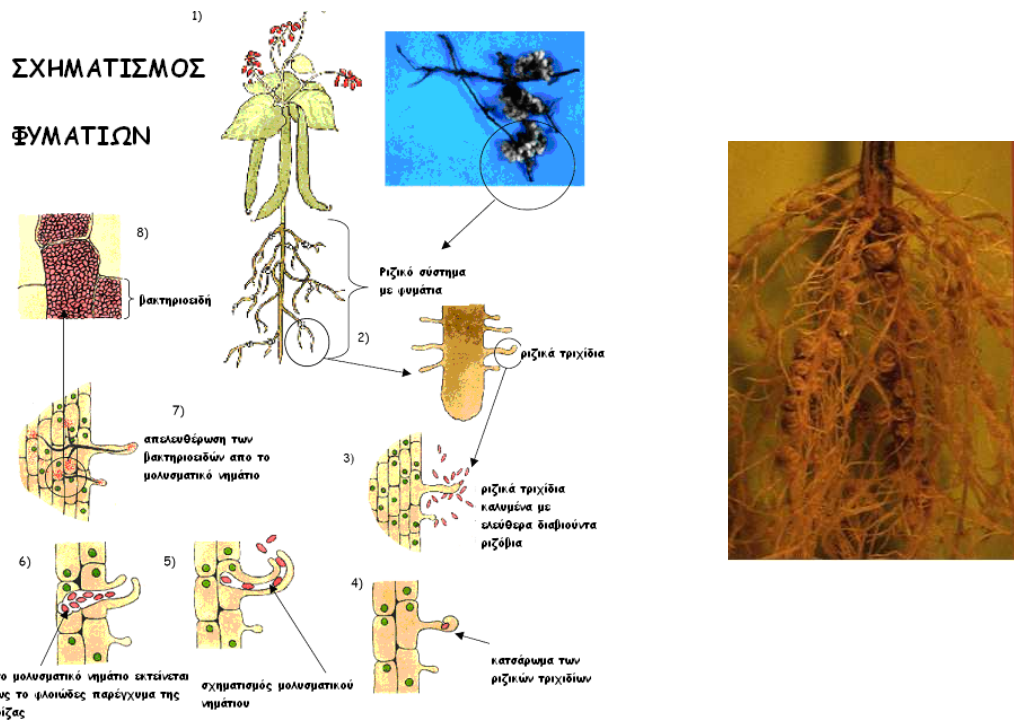
<i>Ριζόβιο</i>		<i>Φυτό – ξενιστής</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
	<i>biovar viciae</i> <sup>1</sup>	<i>Pisum, Viciae, Lathyrus, Lens</i>
	<i>biovar trifolii</i> <sup>2</sup>	<i>Trifolium</i>
	<i>biovar phaseoli</i> <sup>3</sup>	<i>Phaseolus</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium etli</i> <sup>4</sup>		<i>Phaseolus</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> <sup>5</sup>		<i>Lotus, Anthyllis, Lupinus</i>
<i>Rhizobium galegae</i>		<i>Galega</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i> <sup>6</sup>		<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Rhizobium tropici</i> <sup>7</sup>		<i>Leucaena, Phaseolus, Medicago,</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
	<i>BR816</i>	<i>Leucaena, Phaseolus, Parasponia</i>
	<i>NGR234,</i>	<i>Μεγάλο έβρος ξενιστών</i>
	<i>MPIK1030</i>	
<i>Rhizobium sp</i>		
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>USDA257</i>	<i>Μεγάλο έβρος ξενιστών</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>		<i>Sebania rostrata</i>



**Εικόνα 4:** Ειδοεξειδίκευση μεταξύ ριζοβίων-ψυχανθών. Τα επίσημα ονόματα των ειδών είναι : 1 *R. leguminosarum*; 2 *R. trifolii*; 3 *Rhizobium meliloti*; 4 *Rhizobium phaseoli* ή *R. leguminosarum biovar phaseoli type I strains*; 5 *Rhizobium loti*; 6 *Rhizobium fredii*; 7 *R. leguminosarum biovar phaseoli type II strains*. (Herman P. Spaink – Adam Kondorosi – Paul J.J Hooykaas).

### **A.3.3. Σχηματισμός του φυματίου**

Η είσοδος των ριζοβίων στο φυτό-ξενιστή είναι μία ελεγχόμενη μόλυνση (Εικόνα 5). Τα ριζόβια παράγουν κάποιες ενώσεις λιπο-ολιγοσακχαριδικής φύσης οι οποίες όταν λαμβάνονται από το φυτό προκαλούν μία σειρά από διαδικασίες που οδηγούν στο σχηματισμό του φυματίου. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται Nod παράγοντες. Κάθε είδος ριζοβίων παράγουν ένα μείγμα από διαφορετικούς Nod παράγοντες που είναι χαρακτηριστικό του δεδομένου ριζοβίου. Έτσι, οι Nod παράγοντες λειτουργούν σαν ένα κλειδί ασφαλείας με πολλές εγκοπές που ανοίγει το «σπίτι» του συγκεκριμένου ξενιστή με τον οποίο τα ριζόβια συμβιών. Το «κλειδί» αυτό επάγει το κατσάρωμα των ριζικών τριχιδίων του ξενιστή, τις κυτταροδιαιρέσεις του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας από τις οποίες προκύπτει το πρωτογενές μερίστωμα του φυματίου. Η  $Ca_2^+$  εξαρτώμενη ρικασυκολλιτίνη διαμεσολαβεί, ώστε να προσδεθούν τα ριζόβια στα νεοαναπτυσσόμενα ριζικά τριχίδια. Αφού τα ριζόβια εισέλθουν στα ριζικά τριχίδια, σχηματίζεται ένα μολυσματικό νημάτιο που εκτείνεται ως το φλοιώδες παρέγχυμα της ρίζας, όπου διακλαδίζεται και μολύνει το πρωτογενές μερίστωμα του φυματίου (Εικόνα 5). Τα ριζόβια πολλαπλασιαζόμενα διαφοροποιούνται στη συμβιωτική μορφή τους, τα βακτηριοειδή. Τα βακτηριοειδή έχουν απαλλαχθεί από το κυτταρικό τους τοίχωμα και ο όγκος τους μπορεί να είναι ακόμα και κατά δέκα φορές μεγαλύτερος από τον όγκο των ριζοβίων. Τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μία φυτικής προέλευσης μεμβράνη, την περιβακτηριακή μεμβράνη και έτσι χωρίζονται από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή μέσα σε ένα συμβιώσωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις στο συμβιώσωμα υπάρχουν πολλά βακτηριοειδή, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει μόνο ένα βακτηριοειδές (Heldt H.-W., 1999).



**Εικόνα 5:** Η ελεγχόμενη μόλυνση ενός κυττάρου ξενιστή από ριζόβια επάγεται από μία αλληλεπίδραση με τα ριζικά τριχίδια. Τα ριζόβια επάγουν το σχηματισμό ενός μολυσματικού νηματίου, το οποίο δημιουργείται με υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος του ριζικού τριχιδίου και εκτείνεται προς το εσωτερικό της ρίζας. Με αυτό τον τρόπο τα ριζόβια εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή όπου απομονώνονται από μία περιπλασματική μεμβράνη φυτικής προέλευσης. Τα ριζόβια αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται σε μεγάλα βακτηριοειδή.

#### **Α.3.4. Ανταλλαγή μοριακών μηνυμάτων μεταξύ ριζόβιου-ψυχανθούς**

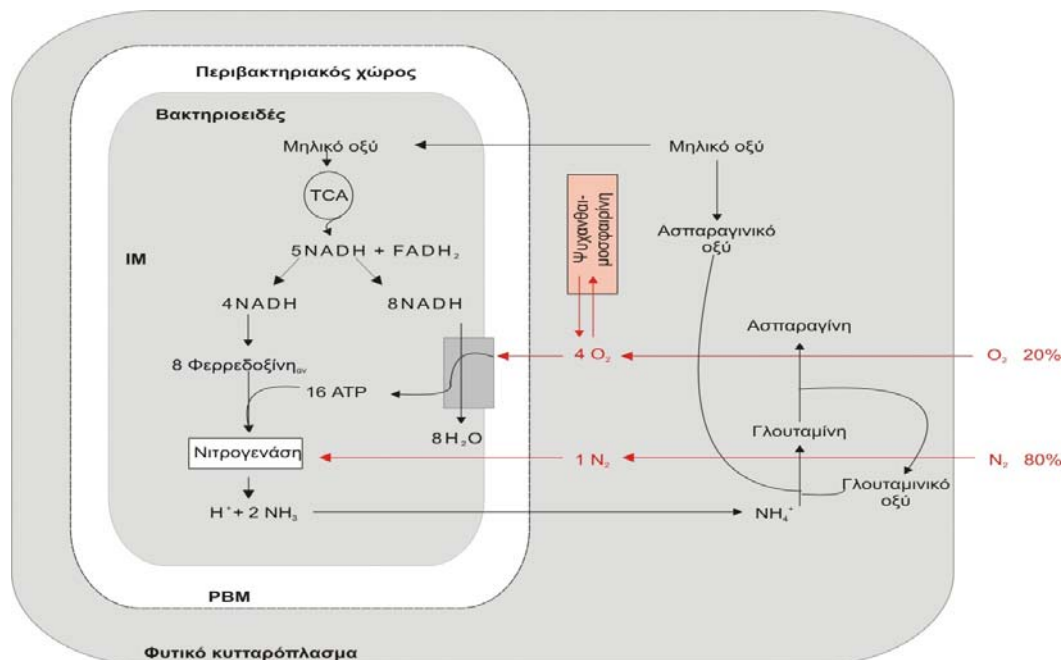
Τα ριζόβια περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που είναι απενεργοποιημένα στα ελεύθερα διαβιούντα βακτήρια και ενεργοποιούνται μόνο μετά από αλληλεπίδραση με το φυτό ξενιστή. Τα βακτηριακά γονίδια που απαιτούνται για το σχηματισμό του φυματίου ονομάζονται *nod* γονίδια και αυτά που απαιτούνται για την αζωτοδέσμευση *nif* και *fix* γονίδια. Στα περισσότερα στελέχη *Rhizobium* και *Sinorhizobium* εδράζονται πάνω σε μεγάλα συμβιωτικά πλασμίδια (*pSym*), ενώ σε άλλα είδη ριζοβίων που περιλαμβάνονται στα γένη *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Azorhizobium* βρίσκονται στο χρωμόσωμα (συμβιωτική νησίδα)

Το φυτό ξενιστής σηματοδοτεί την ετοιμότητά του για το σχηματισμό φυματίων (π.χ. όταν υπάρχει έλλειψη νιτρικών στο έδαφος) εκκρίνοντας διάφορα φλαβονοειδή. Αυτά τα φλαβονοειδή προσδένονται σε μία βακτηριακή πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα συστατικό *nodD* γονίδιο. Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιεί τη μεταγραφή των υπόλοιπων *nod* γονιδίων. Μόνο τέσσερα *nod* γονίδια είναι κοινά σε όλα τα ριζόβια, ενώ έχουν βρεθεί περισσότερα από 20 *nod* γονίδια που ευθύνονται για την ειδοεξειδίκευση ριζοβίων-ψυχανθών.

Κατά το σχηματισμό του φυματίου το φυτό ξενιστής συνθέτει κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται νοντουλίνες. Οι νοντουλίνες περιλαμβάνουν ένζυμα της αποικοδόμησης υδρογονανθράκων, του κύκλου του κτρικού οξέος, της σύνθεσης της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης καθώς και της σύνθεσης της ουρεΐδης. Τα φυμάτια περιέχουν, επίσης, ένα μεταφορέα μηλικού οξέος στην περιβακτηριακή μεμβράνη και ψυχανθαιμοσφαιρίνη. Οι πρώιμες νοντουλίνες εμπλέκονται στη διαδικασία της μόλυνσης και στο σχηματισμό των φυματίων. Η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων επάγονται μερικώς από ουσίες που απελευθερώνονται από τα ριζόβια. Οι όψιμες νοντουλίνες συντίθενται μόνο μετά το σχηματισμό των φυματίων (Heldt H.-W., 1999).

### A.3.5. Ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων μεταξύ ριζόβιου-ψυχανθούς.

Το φυτό παρέχει άνθρακα και ενέργεια στα βακτηριοειδή κυρίως υπο την μορφή οργανικών οξέων, κυρίως μηλικού, τα οποία αποτελούν προϊόν του μεταβολισμού της σακχαρόζης στα φυμάτια. Η σακχαρόζη μεταβολίζεται από τη συνθάση της σακχαρόζης και την ιμπερτάση, και μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπεται σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό, το οποίο καρβοξυλιώνεται προς οξαλοξικό και το τελευταίο ανάγεται σε μηλικό οξύ. Το μηλικό που εισέρχεται στα βακτηριοειδή οξειδώνεται από τον κύκλο του κτρικού οξέος. Έτσι, τα αναγωγικά ισοδύναμα που παράγονται αποτελούν το «καύσιμο» για την αζωτοδέσμευση (Heldt H.-W., 1999).



**Εικόνα 6:** Η Η παραγωγή ενέργειας και αναγωγικής ισχύος από τα βακτηριοειδή υποστηρίζεται με τη μεταφορά από το φυτό C4-δικαρβοξυλικών οξέων και οξυγόνου με τη διαμεσολάβηση της ψυχανθαιμοσφαιρίνης (Anderson and Beardall 1991).

Εκτός από το μηλικό οξύ, στα βακτηριοειδή μεταφέρονται αμινοξέα (Udvardi and Day 1997; Day et al., 2001; Lodwig and Poole, 2003) και μία σειρά από ανόργανα θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τη λειτουργία τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο σίδηρος (Fe), το ασβέστιο (Ca), το βανάδιο (Va), το μολυβδαίνιο (Mo), το νικέλιο (Ni) και το κοβάλτιο (Co).

Επιπλέον, η διακίνηση ιόντων νατρίου (Na) και καλίου (K) έχει μεγάλη σημασία για την ιοντική και οσμωτική ισορροπία κατά μήκος της βακτηριακής και περιβακτηριακής μεμβράνης.

Το μεγαλύτερο μέρος της αμμωνίας, που παράγεται από τη δράση της νιτρογενάσης, δε χρησιμοποιείται από τα ίδια τα βακτηριοειδή, λόγω της καταστολής των μηχανισμών αφομοίωσης (Glenn and Dilworth 1984, Howitt et al. 1986, Jin et al. 1988). Αντίθετα, η αμμωνία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της βακτηριακής μεμβράνης στον περιβακτηριακό χώρο (Bergensen and Turnet 1967), όπου πρωτονιώνεται αμέσως, λόγω της υψηλής οξύτητας, και μετατρέπεται σε αμμωνιακά ιόντα. Αυτά μεταφέρονται μέσω ενός ειδικού καναλιού της περιβακτηριακής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Εκεί μετατρέπονται κυρίως σε γλουταμίνη και ασπαραγίνη, τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια μέσω των αγγείων του ξύλου στα υπόλοιπα μέρη του φυτού (Εικόνα 6).





# ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ





## **B.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

### **B.1.1 Το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* και το ψυχανθές *Lotus japonicus*.**

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος MAFF 303099. Το *M. loti* είναι ένα Gram<sup>(-)</sup> α-πρωτεοβακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Phyllobacteriaceae της τάξης Rhizobiales. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, το ψυχανθές *Lotus japonicus* που χρησιμοποιείται ως φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων.

### **B.1.2 Προετοιμασία σπόρων.**

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *L. japonicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) για 5 λεπτά. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Η αποστείρωση των σπερμάτων πραγματοποιείται με την εμβάπτιση τους σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0,02% Tween 20 για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σπέρματα ξεπλένονται έξι φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, απλώνονται σε τρυβλία, που ο πυθμένας τους καλύπτεται με δύο φύλλα διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, εμποτισμένα σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και αφήνονται για προφύτρωση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 72 ώρες.

### **B.1.3 Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών.**

Για τη μόλυνση των φυτών ριζόβια αναπτύσσονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB + 1,5% Agar. Η επώαση των καλλιεργειών γίνεται στους 30°C για 72 ώρες. Η μόλυνση των φυτών γίνεται αμέσως μετά την προβλάστηση των σπόρων, με τη διαβροχή των ριζιδίων των νεαρών εκφύτων με εναιώρημα των ριζοβίων σε θρεπτικό διάλυμα YMB (OD:0,1).

### **B.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του *L. japonicus*.**

Για την ανάπτυξη τους, τα νεαρά έκφυτα μετά την προβλάστηση, μεταφέρονται σε δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένη άμμο και ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Στην περίπτωση που τα φυτά μολύνονται με ριζόβια, χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο (Hoagland -N). Τα φυτά τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 23°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).

## **B.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ**

Τα ριζόβια καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υλικό RMM-SO, RMM-Cys, RMM-Meth και RMM-Glut στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση, είτε σε τριβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB + 1,5% Άγαρ στους 30 °C.

- Ριζόβια αναπτύσσονται σε τριβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB + 1,5% Agar. Η επώαση των καλλιεργειών γίνεται στους 30°C για 72 ώρες
- 30ml υγρού θρεπτικού διαλύματος YMB εμβολιάζεται με κύτταρα *M. loti* που προέρχονται από μία αποικία. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 30°C για 48 ώρες.
- Φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml του επιθυμητού θρεπτικού διαλύματος.
- Εμβόλιο σε 200ml του επιθυμητού θρεπτικού διαλύματος (με επιθυμητή αρχική απορρόφηση OD<sub>600</sub>=0.05).
- Μέτρηση απορρόφησης κάθε δύο ώρες στα 600nm.

## **B.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

### **B.3.1 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.**

Τα στάδια που ακολουθήσαμε για την απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς σύμφωνα με τους Brusslan and Tobin, (1992).είναι τα παρακάτω :

- 0,2 gr φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτρίβησης παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρεται με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα erpendorf, ο οποίος περιέχει 300μl διαλύματος εκχύλισης RNA και 300μl μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου, pH 8,3.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση (υπερκείμενο) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα ο οποίος περιέχει 300μl μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου, pH 8,3.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Η υδατινή φάση (υπερκείμενο) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προστίθεται 1/10 του όγκου 3 M οξικό νάτριο pH 5,2 και ίσος όγκος ισοπροπανόλης.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml διαλύματος 10T/10E
- Στο μίγμα προστίθεται 8M LiCl και επωάζεται στους 4°C για 12 ώρες
- Μετά το πέρας της επώασης το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 100 μl αιθανόλης 70% v/v
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE ή ddH<sub>2</sub>O.

### **B.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα.**

Τα στάδια που ακολουθήσαμε για την απομόνωση ολικού RNA από βακτηριακά κύτταρα, σύμφωνα με τον Cabanes (Cabanes et al. 2000), 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, επανέδιαλύονται σε 2 ml προθερμασμένου διαλύματος εκχύλισης.
- Το μίγμα αναδεύεται καλά και επωάζεται στους 65 °C για 10 λεπτά.
- Μετά το πέρας της επώασης το μίγμα χωρίζεται σε δυο erpendorf 1ml το καθένα.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13,000 σ.α.λ σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο χωρίζεται σε δυο erpendorf 0,5ml το καθένα.
- Στο μίγμα προστίθενται 250 μl NaCl 5M και 750 μl ισοπροπανόλη.

- Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13,000 σ.α.λ στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 40 μl ddH<sub>2</sub>O.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ποιότητας του RNA φωτομετρικά (nanodrop)

### B.3.3 Καθαρισμός ολικού RNA

Κατά την διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς και τα βακτηριακά κύτταρα απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA αυτών. 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:

1. Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια.

- Δείγμα RNA 7 μg
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNAσης  
7μl
- RNAsin (40 units/μl)  
0,5μl
- DNase (1 unit/μl) 7μl
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο  
70μl

(ο τελικός όγκος της αντίδρασης μπορεί να καθοριστεί ανάλογα με την συγκέντρωση του απομονωμένου RNA)

2. Το μίγμα των αντιδραστηρίων επωάζεται στους 37 °C για 120 λεπτά.
3. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του μίγματος με την διαδικασία του καθαρισμού των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη.

### B.3.4 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη

1. Στο υδατικό διάλυμα του DNA/RNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης pH 8,0.
2. Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά.
3. Η υδατική υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1).
4. Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά

5. Η υδατινή υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου.
6. Το μίγμα αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά
7. Η υδατινή υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεται 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και διπλάσιου όγκου αιθανόλης. (κατακρήμιση νουκλεϊνικών οξέων).
8. Το φυτικό δείγμα επωάζεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 14 ώρες περίπου ενώ το βακτηριακό δείγμα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά.
9. μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
10. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300μl αιθανόλη 70%
11. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
12. τέλος το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE ή σε 20 μl ddH<sub>2</sub>O.

## **B.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

### **B.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα τους γίνεται με την μέθοδο της φωτομέτρησης.

1. 1μl από το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και αραιώνεται με ddH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:100.
2. Η αραιωμένη ποσότητα τοποθετείται σε ειδική κυβέτα από χαλαζία και προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα του δείγματος σε μήκη κύματος 240, 260 και 280.
3. Η συγκέντρωσή νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, υπολογίζεται από την εξίσωση:

$D \times OD_{260} \times \text{συντελεστής αραιώσης}$ .

Όπου:

- OD<sub>260</sub>: η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm και
- D :σταθερά που ισούται

1. με 50  $\mu\text{g/ml}$  σε καθαρά διαλύματα DNA,
2. με 40  $\mu\text{g/ml}$  σε διάλυμα RNA,
3. με 30  $\mu\text{g/ml}$  σε διαλύματος ολιγονουκλεοτιδίων

Η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων εκτιμάται από το λόγο  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  και  $\text{OD}_{240}/\text{OD}_{260}$ . Τιμές 1,8-2,0 και 0,5 αντίστοιχα, υποδηλώνουν δείγμα ικανοποιητικής καθαρότητας.

Στην παρούσα εργασία ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα έγινε φωτομετρικά με την συσκευή Nanodrop. Αρχικά 1-2  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  μεταφέρονται στην υποδοχή της συσκευής για τον μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1  $\mu\text{l}$  από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 240, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$   $\text{OD}_{240}/\text{OD}_{260}$ .

#### **B.4.2 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης**

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους του. Το εύρος των μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης (Πίνακας 1)

1. Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1XTAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής.
2. Η αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10  $\text{mg/ml}$ ) σε τελική συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  και αναμιγνύεται καλά.
3. Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση, αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, στα "πηγαδάκια" που σχηματίστηκαν.
4. Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1XTAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.

<b>Πίνακας 1:</b> Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.	
Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (Kb)
0,3	1,7-70
0,5	0,7-45
0,8	0,4-20
1	0,3-10
1,2	0,2-8
1,5	0,2-6
2	0,1-5

### **B.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

Η τεχνική αυτή ( Mullis, K. et al., 1986 , Mullis, K. and Faloona, F., 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, in vitro ή και in situ. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τα εξής:

1. Το μέγεθος των εκκινητών θα πρέπει να είναι σχετικά μικρό (15-30 νουκλεοτίδια) ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού με το DNA να είναι μέσα σε λογικά πλαίσια.
2. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή πρέπει να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.
3. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, δε θα πρέπει τα 3' -άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.
4. Η αλληλουχία των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να περιέχει περίπου ίση αναλογία σε GC/AT.
5. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

Ακολούθως, μια DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3',

ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων, ιόντων  $Mg^{+2}$  και μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli* αλλά το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και καταστρέφεται στις θερμοκρασίες εκείνες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Σήμερα χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72 °C. Η δραστηριότητα της αναφερόμενης ως Taq πολυμεράσης παραμένει σε υψηλά επίπεδα μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94 °C.

Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί *n* φορές, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2*n* δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας ανάμεσα από τους εκκινητές και περιέχουν τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποιήσεως μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του. Έτσι, στην περίπτωση γενωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με 1μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 10-100 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (500 ή 100 μl) προστίθενται:

- |                                                     |        |
|-----------------------------------------------------|--------|
| • Μήτρα DNA                                         | 1 μl   |
| • Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM)     | 1,5 μl |
| • Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) | 1,5 μl |
| • Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)                     | 1 μl   |
| • 10X PCR ρυθμιστικό διάλυμα                        | 5 μl   |
| • Taq DNA πολυμεράση (2 μονάδες/μl)                 | 0,5 μl |
| • ddH <sub>2</sub> O έως τελικό όγκο                | 50 μl  |



2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

- Αρχική αποδιάταξη 94°C για 2-4 λεπτά
- Αποδιάταξη 94°C για 1 λεπτό
- Υβριδισμός εκκινητών 45-65°C για 1 λεπτό
- Επιμήκυνση 72°C για 1 λεπτό/1.3-1.5 λεπτά
- Τελική επιμήκυνση 72°C για 5-10 λεπτά

25-35

κύκλοι

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενίσχυσης δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Μία από αυτές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μορίων RNA, ως αρχική μήτρα για την αντίδραση ενίσχυσης (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με την δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Επιπλέον είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθόλη τη διάρκεια, σε πραγματικό χρόνο. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Real Time PCR και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας χρωστικής ουσίας, της sybergreen, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόδεδή της στα δίκλιωνα μόρια του DNA. Οι δύο αυτές τεχνικές που αναφέρθηκαν εφαρμόστηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη και αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω.

### **B.5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)**

Η αντίδραση ενίσχυσης τμημάτων RNA με την μέθοδο RT-PCR περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το RNA μεταγράφεται σε cDNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο εκκινητή, που μπορεί να είναι dT-ολιγονουκλεοτίδιο, όταν μεταγράφεται το σύνολο των mRNA, ή εξειδικευμένο νουκλεοτίδιο για το συγκεκριμένο τμήμα RNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα μόρια του cDNA, που δημιουργήθηκαν με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενισχύονται σε μια τυπική αντίδραση PCR, με την παρουσία εξειδικευμένων εκκινητών.

Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται τα εξής:

- Oligo DT ( 500 μg/ml ) 1μl
- RNA 1ng
- Μίγμα dNTPs (10mM) 1μl
- ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο 12μl
- και ακολουθεί καλό ανακάτεμα.

Πρώτο στάδιο: χειρισμός με αντίστροφη μεταγραφάση.

Το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65 για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται ο υβριδισμός εκκινητή – RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη:

- 5X First-Strand Buffer 4μl
- DTT (0,1M) 2μl
- RNAsin (40 units/μl) 1μl

Πραγματοποιείται προθέρμανση για τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 42 για 2 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη 1 μl από το ένζυμο SuperScript™ II RT(200 units/μl). Ακολουθεί επώαση στους 24°C για 50 λεπτά.

Η αντίδραση σταματά με θέρμανση του μίγματος στους 70 για 15 λεπτά.

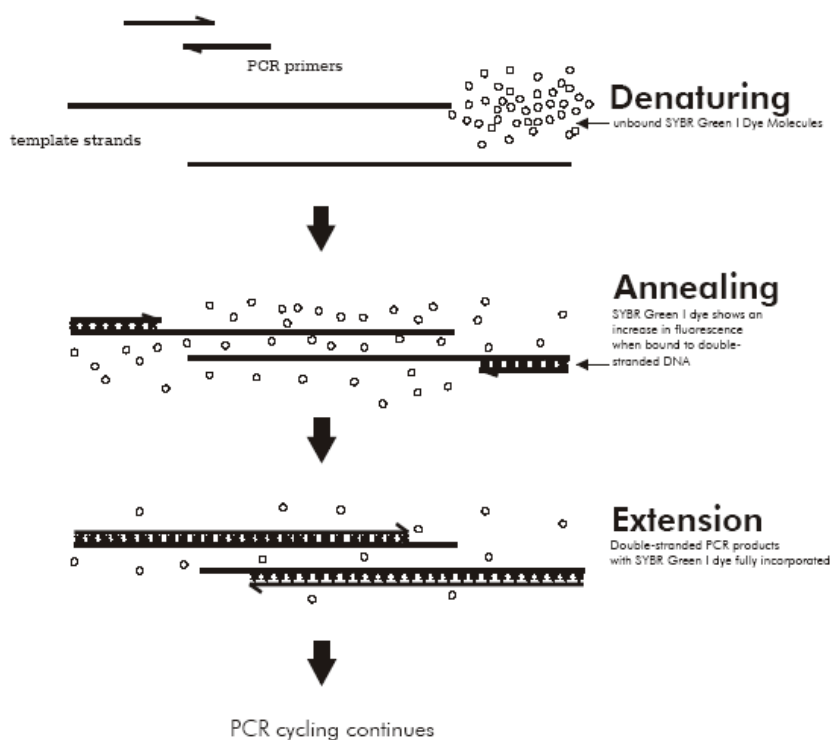
Δεύτερο στάδιο: Ενίσχυση επιθυμητών ακολουθιών.

Το cDNA που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με μια τυπική αντίδραση PCR και χρήση εξειδικευμένων εκκινητών. Ως μήτρα χρησιμοποιείται το 10% του όγκου που προέκυψε από το πρώτο στάδιο, δηλαδή 2 μl cDNA.

### **B.5.2. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qReal time-PCR)**

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA. Σε αντίθεση με την αντίδραση RT-PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθόλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλιωνα μόρια του DNA (dsDNA). Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Συχνά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA πρώτα, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Η παρουσία της SYBR Green I μας επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε πριν, να παρακολουθούμε σε πραγματικό χρόνο τη συσσώρευση των προϊόντων του PCR. Κατά την διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Κατά τις φάσεις της πρόσδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης, όπου έχουμε διπλής έλικας DNA, η SYBR Green προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές ) (Εικόνα 7). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξης της αντίδρασης του PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ' έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.

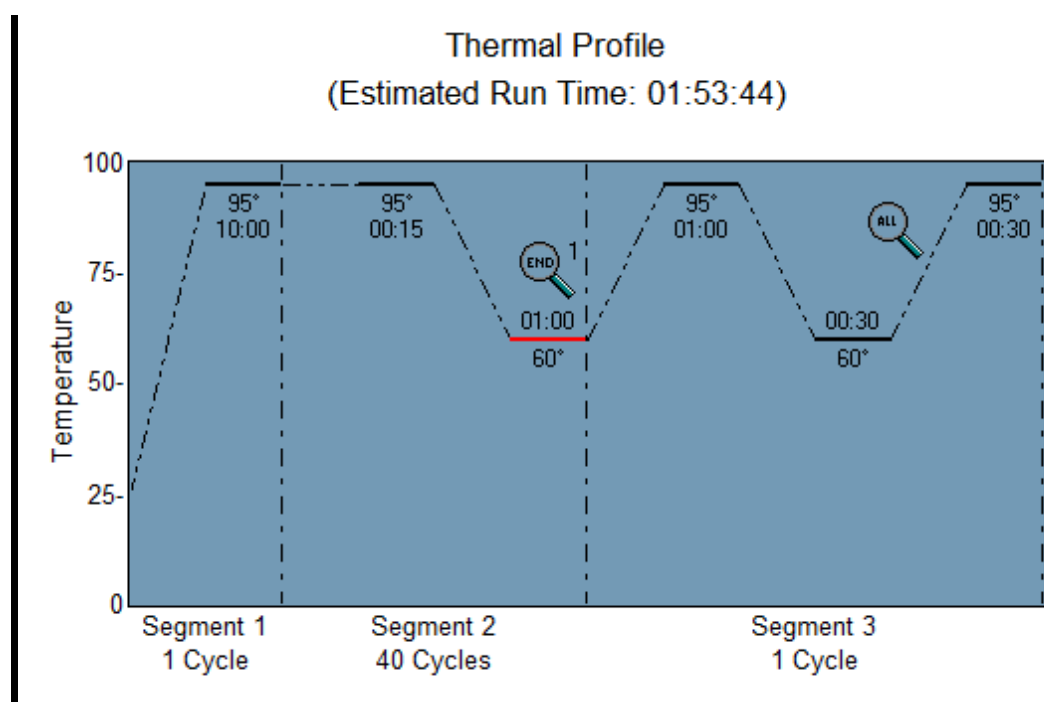


**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στην δίκλωνη έλικα του DNA κατά την διάρκεια των βημάτων του PCR.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene), καθώς και το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

- 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche): 5 μl
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1 μl
- Εκκινητής A(τελική συγκέντρωση 200nM): 2 μl
- Εκκινητής B(τελική συγκέντρωση 200nM): 2 μl

Για την τοποθέτηση των μιγμάτων, στην πλάκα 96 δειγμάτων, προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική πιπέτα (Pipetman Concept Single Channel, Gilson). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και τα στάδια της αντίδρασης είναι:



**Εικόνα 8:** Στάδια και θερμοκρασιακό πρόγραμμα Real Time PCR.

## B.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο ANOVA (Analysis of variance). Η μεταβλητή παράμετρος ήταν μία κάθε φορά και επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ONE WAY ANOVA. Η μέθοδος αυτή είναι μια παραμετρική μέθοδος και για να εφαρμοστεί απαιτείται ο προς ανάλυση πληθυσμός να είναι κανονικός με ίση παραλλακτικότητα. Στις περιπτώσεις που δεν ίσχυε η προϋπόθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά η μέθοδος ANOVA ON RANKS, που είναι η ανάλογη μέθοδος της ONE WAY ANOVA όταν ο πληθυσμός δεν είναι κανονικός. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5 και τα διαγράμματα με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

## Παράρτημα

- Βρωμιούχο αιθίδιο :Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O και φυλλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.
- Διάλυμα 10T/10E: 10 Mm Tris-HCl pH 8,3, 10 mM EDTA
- Διάλυμα εκχύλισης RNA φυτικών ιστών: 50 Mm Tris-HCl pH 8,3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Laurylsarcosine
- Διάλυμα εκχύλισης RNA βακτηριακών κυττάρων: SDS 1.4%, EDTA 4mm, proteinase K 75μg.
- Διάλυμα TE: 10 Mm Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
- Διάλυμα φόρτωσης: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.
- NaCl (150mM): Σε τελικό όγκο 1 lt H<sub>2</sub>O διαλύονται 8.77 gr χλωριούχο νάτριο.
- Οξικό νάτριο (3M pH:5.2): Σε τελικό όγκο 1 lt H<sub>2</sub>O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- TAE (1x): Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50 x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές, 50 x TAE: 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH: 8,0 σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1lt.
- TE: 10 mM Tris-HCL pH:8, 1 mM EDTA.
- Φαινόλη: Σε 500 ml φαινόλη προστίθενται 200 ml διαλύματος 1 M Tris-HCl pH:8,0. Ακολουθεί καλή ανάδευση και οι δύο φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η άνω υδάτινη φάση απομακρύνεται και προστίθενται 200 ml διαλύματος 100 mM Tris-HCl pH:8,0. Μετά από καλή ανάδευση το μείγμα φυλάσσεται ανά 40 ml σε σωλήνες Falcon στους -20°C.

### **Σύνθεση θρεπτικών μέσων.**

YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *M. luti*: Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος  
YMB:

- Σε 1 lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0,5gr  $K_2HPO_4$ , 0,2gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1gr NaCl και 0,5gr Yeast extract.
- Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% agar.
- Ακολουθεί αποστείρωση.
- Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

### **RMM-SO: Για την Παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος RMM-SO:**

- Σε 950 ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 0.25 gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 gr  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1 gr  $K_2HPO_4$ , 0.53 gr  $NH_4Cl$  και 1 gr  $KH_2PO_4$
- 10 μg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  και 20 μg  $CoCl_2$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .
- Ακολουθεί αποστείρωση
- Προστίθενται 100μl βιοτίνη, παντοθενικό οξύ και θειαμίνη από stock 0,2 mg/ml
- Προστίθενται 50ml γλυκόζη 20%
- Η γλυκόζη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ και θειαμίνη αποστειρώθηκαν ξεχωριστά μέσω φιλτραρίσματος.

### **RMM-κυστεΐνη, RMM-μεθειονίνη, RMM-γλουταθειονή:**

- Για την Παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την παραπάνω, αντικαθιστώντας τα  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  με ισομοριακές ποσότητες από  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $ZnCl_2$  και  $CuCl_2$  αντίστοιχα.
- Ως πηγή θείου προστίθεται τα αμινοξέα L- κυστεΐνη (RMM-Cys), L-μεθειονίνη (RMM-Meth) και ανοιγμένη γλουταθειονή (RMM-Glut) σε τελική συγκέντρωση 1mM.

### **Θρεπτικά διαλύματα ανάπτυξης φυτικού υλικού**

Hoagland + N: Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος Hoagland με άζωτο χρησιμοποιήθηκαν μητρικά διαλύματα των απαραίτητων στοιχείων. Για 1 lt θρεπτικού διαλύματος προστίθενται:

- 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml 0,1M FeEDTA, 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 5 ml M KNO<sub>3</sub> και 5 ml M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα ιχνοστοιχείων: Σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 2,86 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05 gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και 0,02 gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

Hoagland - N: Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος Hogland χωρίς άζωτο χρησιμοποιήθηκαν μητρικά διαλύματα των απαραίτητων στοιχείων. Για 1 lt θρεπτικού διαλύματος προστίθενται:

- 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml 0,1M FeEDTA, 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 10 ml 0,5M CaCl<sub>2</sub> και 5 ml 1M KCl.
- Διάλυμα ιχνοστοιχείων: Σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 2,86 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05 gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και 0,02 gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.







# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



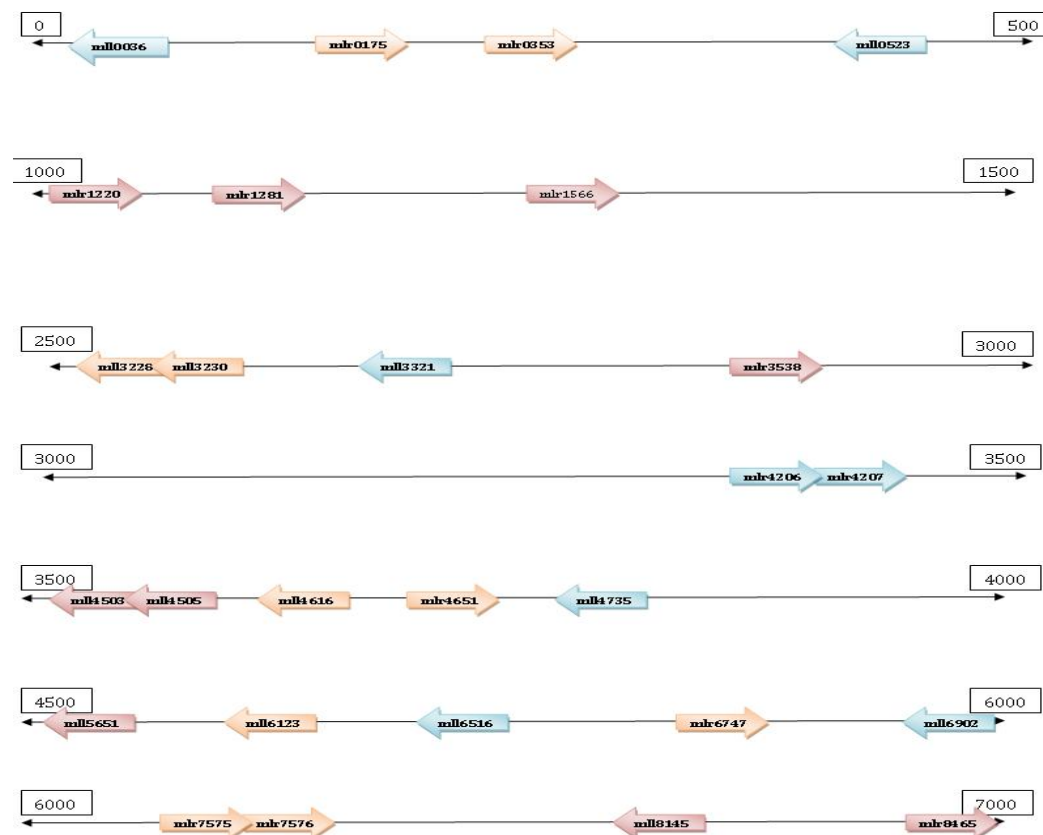
**Γ.1 *In silico* ανάλυση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που μετέχουν στο μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών στο *Mesorhizobium loti* MAFF 303099.**

Για τον εντοπισμό γονιδίων, που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι αναγωγής-αφομοίωσης των θεικών και βιοσύνθεσης κυστεΐνης, μεθειονίνης και γλουταθεινής, πραγματοποιήθηκε *in silico* έρευνα στις διεθνείς βάσεις δεδομένων μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *Mesorhizobium loti* MAFF 303099. Συγκεκριμένα, η έρευνα πραγματοποιήθηκε στις βάσεις δεδομένων KEGG PATHWAY Database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) και Rhizobase (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτες ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν για ένζυμα των επιθυμητών μεταβολικών μονοπατιών. Τα ένζυμα στόχοι που βρέθηκαν, ανά μονοπάτι, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Πίνακας 2:</b> Γονίδια στόχοι τα οποία κωδικοποιούν για τα επιθυμητά ένζυμα στο <i>M. loti</i>			
<b>EC</b>	<b>Ενζυμική δραστηριότητα</b>		<b>Γονίδια</b>
	<b>Αφομοίωση- αναγωγή θεικών</b>		
2.7.7.4	σουλφουρυλαση του ATP α υπομονάδα	<i>nodP</i>	<i>mlr7575</i>
	σουλφουρυλαση του ATP β υπομονάδα	<i>nodQ</i>	<i>mlr7576</i>
2.7.1.25	κινάση του θεικού AMP	<i>nodQ</i>	<i>mlr7576</i>
1.8.4.8	αναγωγή του θεικού AMP	<i>apr</i>	<i>mll3228</i>
1.8.1.2	αναγωγή του θειώδους	<i>srh</i>	<i>mll3230</i>
	<b>Βιοσύνθεσης κυστεΐνης</b>		
2.3.1.30	τρανσακετυλάση της σερίνης	<i>sat</i>	<i>mlr0175</i>
2.5.1.47	θειολολύση της O- ακετυλοσερίνης	<i>oastl-2</i>	<i>mll4616</i>
2.5.1.47	θειολολύση της O- ακετυλοσερίνης	<i>oastl-1</i>	<i>mlr0353</i>
2.5.1.47	συνθάση της κυστεΐνης	<i>cys1</i>	<i>mlr4651</i>
2.5.1.47	συνθάση της κυστεΐνης	<i>cys2</i>	<i>mll9227</i>
2.5.1.47	συνθάση της κυστεΐνης	<i>cys3</i>	<i>mlr9541</i>
	<b>Βιοσύνθεσης μεθειονίνης</b>		
2.3.1.31	O-ακετυλτρανσφεράση της ομοσερίνης	<i>metX</i>	<i>mlr3538</i>
2.5.1.49	αμινοκαρβοξυπροπυλτρανσφεράση της ακεομοσερίνης	<i>ashs</i>	<i>mlr8465</i>
2.1.1.5	S-μεθυλοτρανσφεράση της ημοκυστεΐνης-βεταΐνης	<i>bmt</i>	<i>mlr1281</i>
2.1.1.13	συνθάση της μεθειονίνης I	<i>metH</i>	<i>mlr1220</i>
2.1.1.14	S-μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης	<i>metE</i>	<i>mll6123</i>
4.4.1.8	β-λυάση της κυσταθειονίνης	<i>cbl1</i>	<i>mll8145</i>
4.4.1.8	β-λυάση της κυσταθειονίνης	<i>cbl2</i>	<i>mll9139</i>
4.2.1.22	β-συνθάση της κυσταθειονίνης	<i>cbs</i>	<i>mll4505</i>
4.4.1.1	γ-λυάση της κυσταθειονίνης	<i>cgl1</i>	<i>mll4503</i>
4.4.1.1	γ-λυάση της κυσταθειονίνης	<i>cgl2</i>	<i>mlr1566</i>

EC	Ενζυμική δραστικότητα		Γονίδια
	<b>Βιοσύνθεση γλουταθειόνης</b>		
6.3.2.2	συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης	<i>gshA</i>	<i>mll6902</i>
6.3.2.3	συνθετάση της γλουταθειόνης	<i>gshB</i>	<i>mll4735</i>
1.8.1.7	ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	<i>gor</i>	<i>mll0523</i>
	<b>Παραγωγή NADPH</b>		
1.1.1.42	ισοκιτρική αφυδρογονάση	<i>icd</i>	<i>mll0036</i>
1.1.1.44	6-φωσφορογλυκονική αφυδρογονάση	<i>gnd1</i>	<i>mll3321</i>
	6-φωσφορογλυκονική αφυδρογονάση	<i>gnd2</i>	<i>mll4206</i>
1.1.1.49	αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης	<i>zwf1</i>	<i>mll6516</i>
	αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης	<i>zwf2</i>	<i>mll4207</i>

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η θέση κάθε γονιδίου πάνω στο χρωμόσωμα του *M. loti* (εικόνα 9) και κατασκευάστηκε το μεταβολικό μονοπάτι (εικόνα 10) στο οποίο ανήκουν. Τα γονίδια *mll7575* και *mll7576*, *mll4503* και *mll4505*, *mll4206* και *mll4207*, *mll3228* και *mll3230*, εδράζονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο και έχουν την ίδια φορά μεταγραφής όπως φαίνεται και στην εικόνα 9. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι ίσως τα γονίδια αυτά να εδράζονται σε κάποιο οπερόνιο. Τα περισσότερα γονίδια εδράζονται πάνω στο χρωμόσωμα με εξαίρεση τα *mll9227*, *mll9541* και *mll9139* που εδράζονται στα πλασμίδια του *M. loti*.

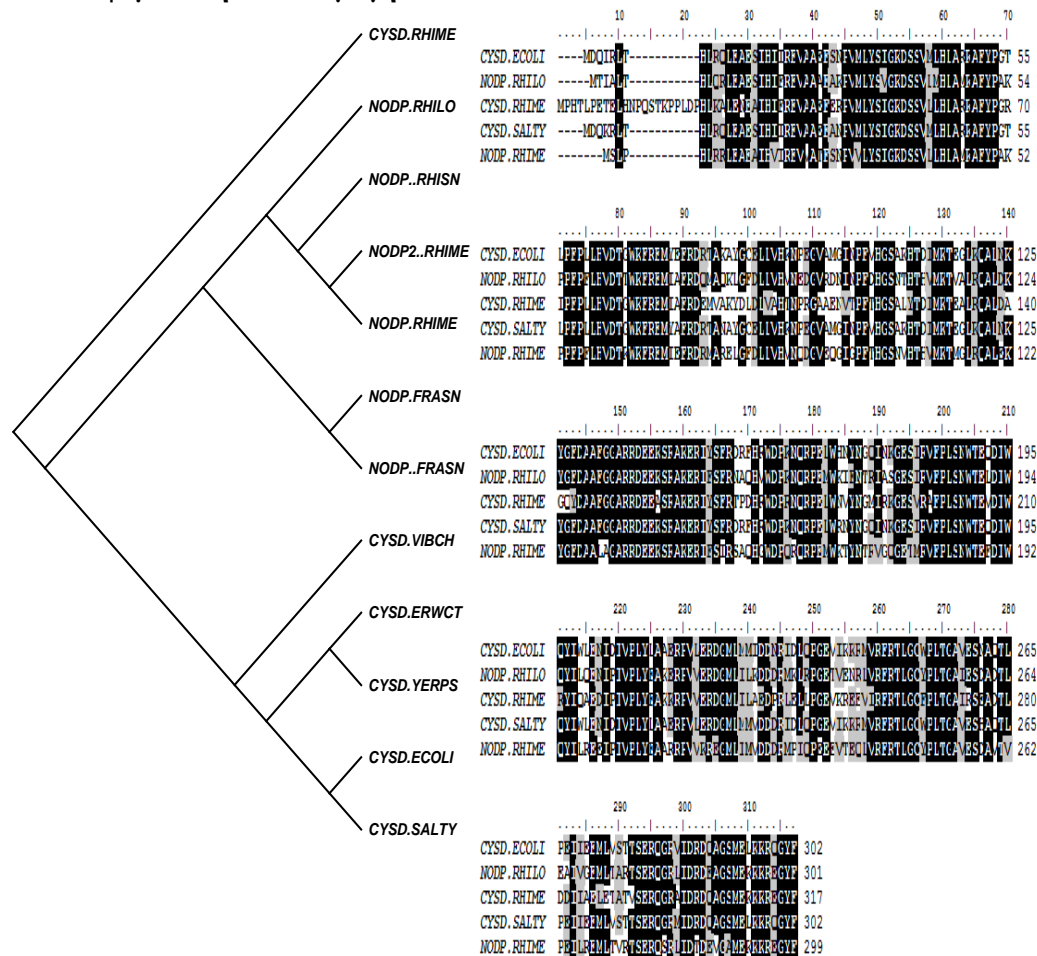


**Εικόνα 9 :** Θέση των γονιδίων και κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων πάνω στο χρωμόσωμα του *M. loti*. με πορτοκαλί συμβολίζονται τα γονίδια που εμπλέκονται στην αναγωγή των θεικών και βιοσύνθεση κυστεΐνης, με



αμινοξικές αλληλουχίες προήλθαν από διεθνείς βάσεις δεδομένων και περιλαμβάνουν χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες ακολουθίες ενζύμων και ακολουθίες πιθανών ενζύμων.

### Γ.1.1 Αφομοίωση και αναγωγή θεικόν



**Εικόνα 11:** Δενδρογράμμο και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της NODP του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών: CYSD.BRAJA (Q89UE1) *Bradyrhizobium japonicum*; CYSD.BRASB (A5E8X6) *Bradyrhizobium* sp. (strain BTAi1 / ATCC BAA-1182); CYSD.ECOLI (P21156) *Escherichia coli* (strain K12); CYSD.ERWCT (Q6D1A5) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); CYSD.MYCBO (P65671) *Mycobacterium bovis*; CYSD.MYCTU (P65670) *Mycobacterium tuberculosis*; CYSD.RHILO (Q985Q5) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CYSD.RHIME (P56892) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); CYSD.SALTY (P65672) *Salmonella typhimurium*; CYSD.VIBCH (Q9KP19) *Vibrio cholera*; CYSD.YERPS (Q66EC8) *Yersinia pseudotuberculosis*; CYSN.BACTN (Q8AAP9) *Bacteroides thetaiotaomicron*; NODP.FRASN (A8L8D6) *Frankia* sp. (strain EAN1pec); NODP.RHISN (C3KRD2) *Rhizobium* sp. (strain NGR234); NODP.RHIME (P13441) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); NODP2.RHIME (Q92VH7) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*);

Το πρώτο ένζυμο που παίρνει μέρος στην αναγωγή των θεικόν στο μεταβολικό μονοπάτι του *M. loti* είναι η NODP (EC 2.7.7.4) η οποία έχει δραστηριότητα β υπομονάδας της σουλφουρυλάσης του ATP (CYSD) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr7575*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της NODP του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες της σουλφουρυλάσης του ATP άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική ομολογία, μεταξύ αυτής και της CYSD

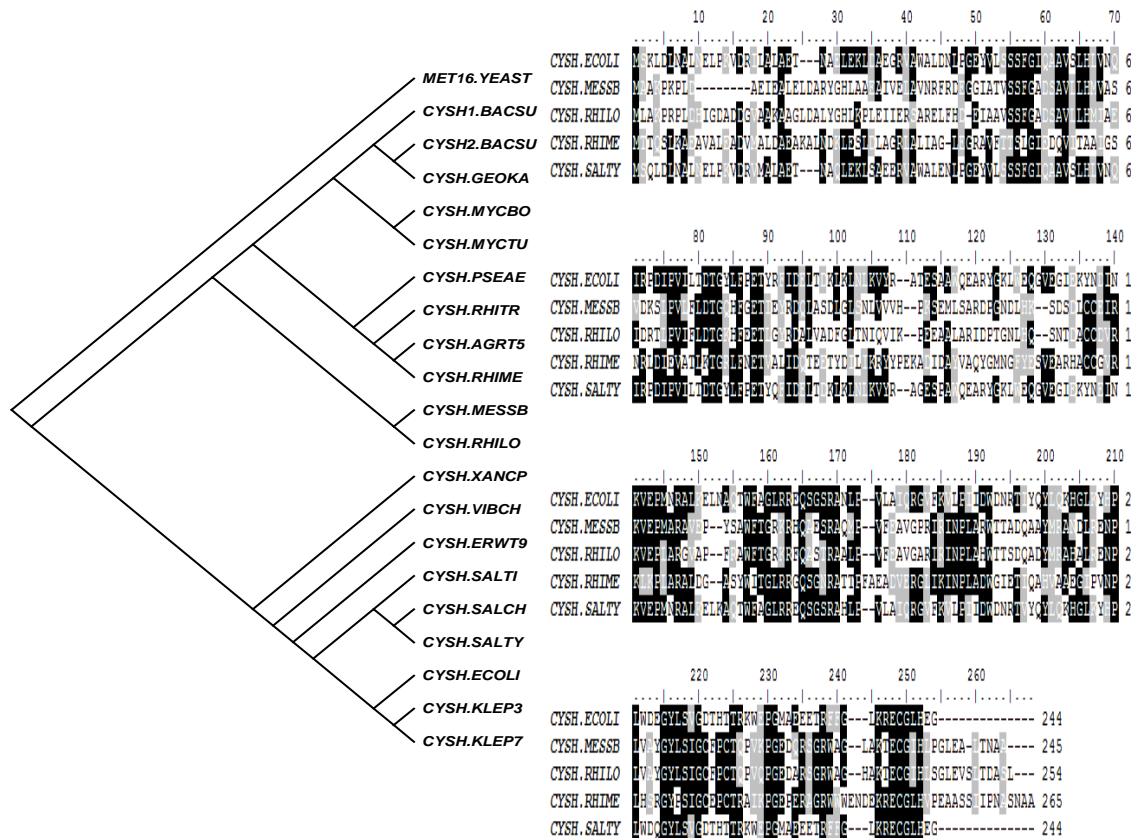




CYSNC.XYLFA(Q9PD78) *Xylella fastidiosa*; NODQ.RHIS3(P72339) *Rhizobium sp. (strain N33)*; NODQ.RHILO(Q985Q4) *Rhizobium loti (Mesorhizobium loti)*;

Το δεύτερο ένζυμο που παίρνει μέρος στην αναγωγή των θεικών στο μεταβολικό μονοπάτι του *M. loti* είναι η NODQ (EC 2.7.7.4, 2.7.1.25) η οποία έχει πιθανά δραστηριότητα α-υπομονάδας της σουλφουρυλάσης του ATP (CYSN) και κινάσης του θεικού AMP (CYSC) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr7576* στο *M. loti*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της NODQ του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες CYSN, CYSC και CYSN/C άλλων οργανισμών, προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη ομολογία μεταξύ αυτής και των CYSN και CYSN/C (εικόνα 12), η οποία κυμαίνεται από 45 έως 76%. Μικρή ομολογία παρουσιάζει με τις CYSC, η οποία κυμαίνεται από 10-13%, ενώ την μεγαλύτερη ομολογία παρουσιάζει με τις NODQ των ριζόβιων και τις CYSN/C των υπόλοιπων μικροοργανισμών. Η ομολογία αυτή κυμαίνεται από 52-76%. Η φυλογενετική σχέση της NODQ με τις σουλφουρυλάσες του ATP και τις αδενοθυεικές κινάσες άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 12. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η NODQ του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις NODQ των ριζόβιων και τις CYSN/C των υπόλοιπων μικροοργανισμών, ενώ σε μεγαλύτερη απόσταση ακολουθούν οι CYSC.

Το τρίτο ένζυμο του μονοπατιού της αναγωγής και αφομοίωσης των θεικών είναι η CYSH (EC 1.8.4.8) η οποία έχει δραστηριότητα αναγωγής του θεικού AMP και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll3228*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της CYSH του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες CYSH άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ αυτής και της CYSH των *Escherichia coli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium sp*, *Salmonella typhimurium*. Το ποσοστό ομολογίας κυμαίνεται από 26-66% (εικόνα 13). Η φυλογενετική σχέση της CYSH του *M. loti* με αυτές άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 8. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η APR του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις CYSH των ριζόβιων με τις οποίες διαμορφώνουν ξεχωριστό κλάδο από τις υπόλοιπες.

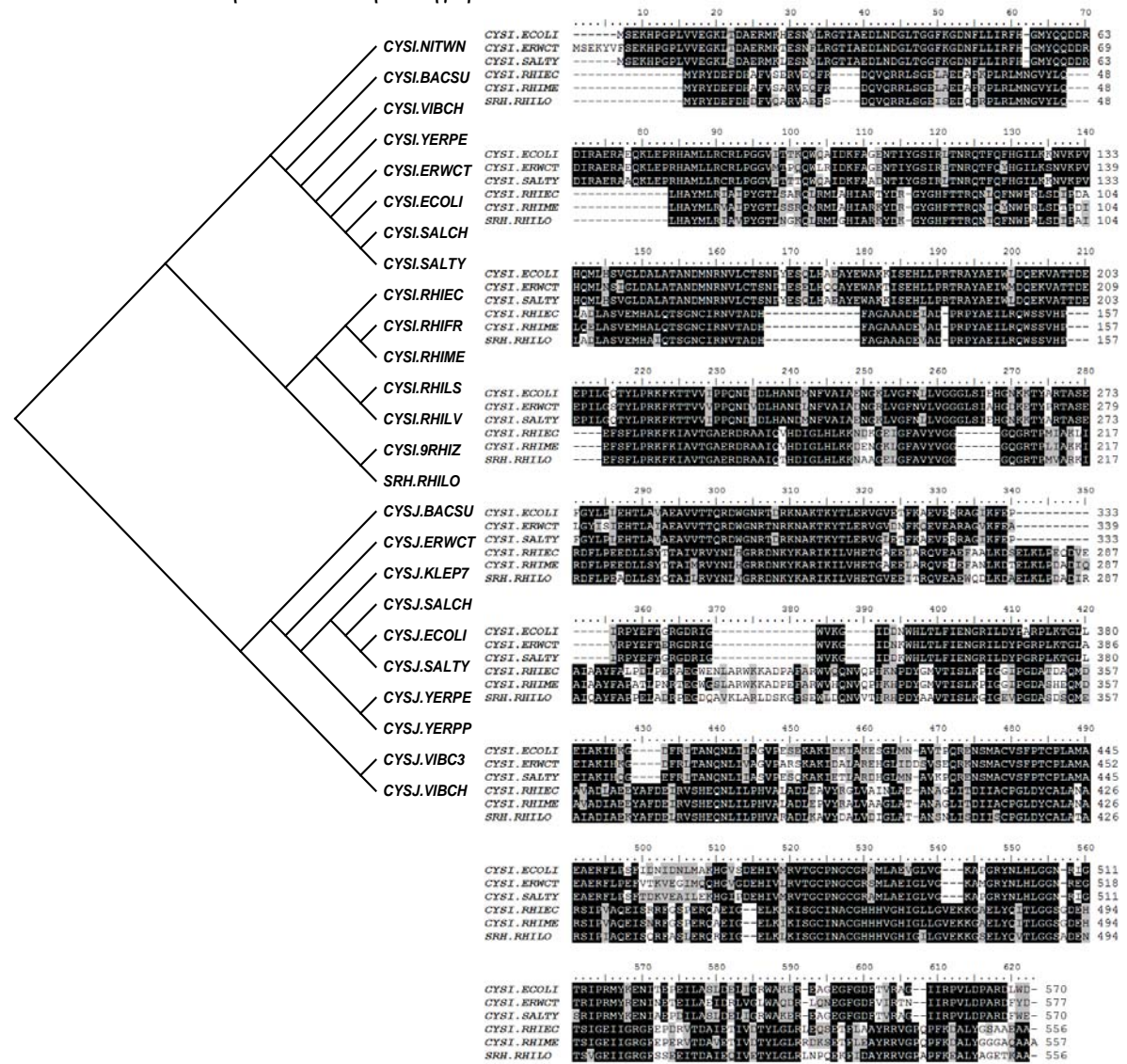


**Εικόνα 13:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της CYSH του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών: CYSH.AGR5(Q8UH67) *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58 / ATCC 33970); CYSH.ECOLI(P17854) *Escherichia coli* (strain K12); CYSH.ERWT9(B2VG05) *Erwinia tasmaniensis* (strain DSM 17950 / Et1/99); CYSH.GEOKA(Q5L2X9) *Geobacillus kaustophilus*; CYSH.KLEP3(B5XV26) *Klebsiella pneumoniae* (strain 342); CYSH.KLEP7(A6TD47) *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (strain ATCC 700721 / MGH 78578); CYSH.MESSB(Q11B66) *Mesorhizobium sp.* (strain BNC1); CYSH.MYCBO(P65669) *Mycobacterium bovis*; CYSH.MYCTU(P65668) *Mycobacterium tuberculosis*; CYSH.PSEAE(O05927) *Pseudomonas aeruginosa*; CYSH.RHILO(Q98GP9) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CYSH.RHIME(P56891) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); CYSH.RHITR(O33579) *Rhizobium tropici*; CYSH.SALCH(Q57KH9) *Salmonella choleraesuis*; CYSH.SALTI(Q8Z460) *Salmonella typhi*; CYSH.SALTY(P17853) *Salmonella typhimurium*; CYSH.VIBCH(Q9KUX2) *Vibrio cholera*; CYSH.XANCP(Q8P607) *Xanthomonas campestris pv. Campestris*; CYSH1.BACSU(P94498) *Bacillus subtilis*; CYSH2.BACSU(O06737) *Bacillus subtilis*; MET16.YEAST(P18408) *Saccharomyces cerevisiae* (*Baker's yeast*);

Το τελευταίο ένζυμο του μονοπατιού αναγωγής των θεικών είναι η αναγωγή του θειώδους (EC 1.8.1.2). Σε πολλά βακτήρια και άλλους οργανισμούς η αναγωγή του θειώδους αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την CYSI, που αποτελεί μια φλαβοπρωτεΐνη και την CYSJ, που αποτελεί μια αιμοπρωτεΐνη. Στο *M. loti* η SRH έχει δραστηριότητα (CYSI) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll3230*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της SRH του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες CYSI και CYSJ άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική ομολογία, μεταξύ αυτής και της CYSI, η οποία κυμαίνεται από 22-97%. Η φυλογενετική σχέση της SRH του *M. loti* με αυτές άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 14. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η SRH του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις CYSI των ριζόβιων με τις οποίες

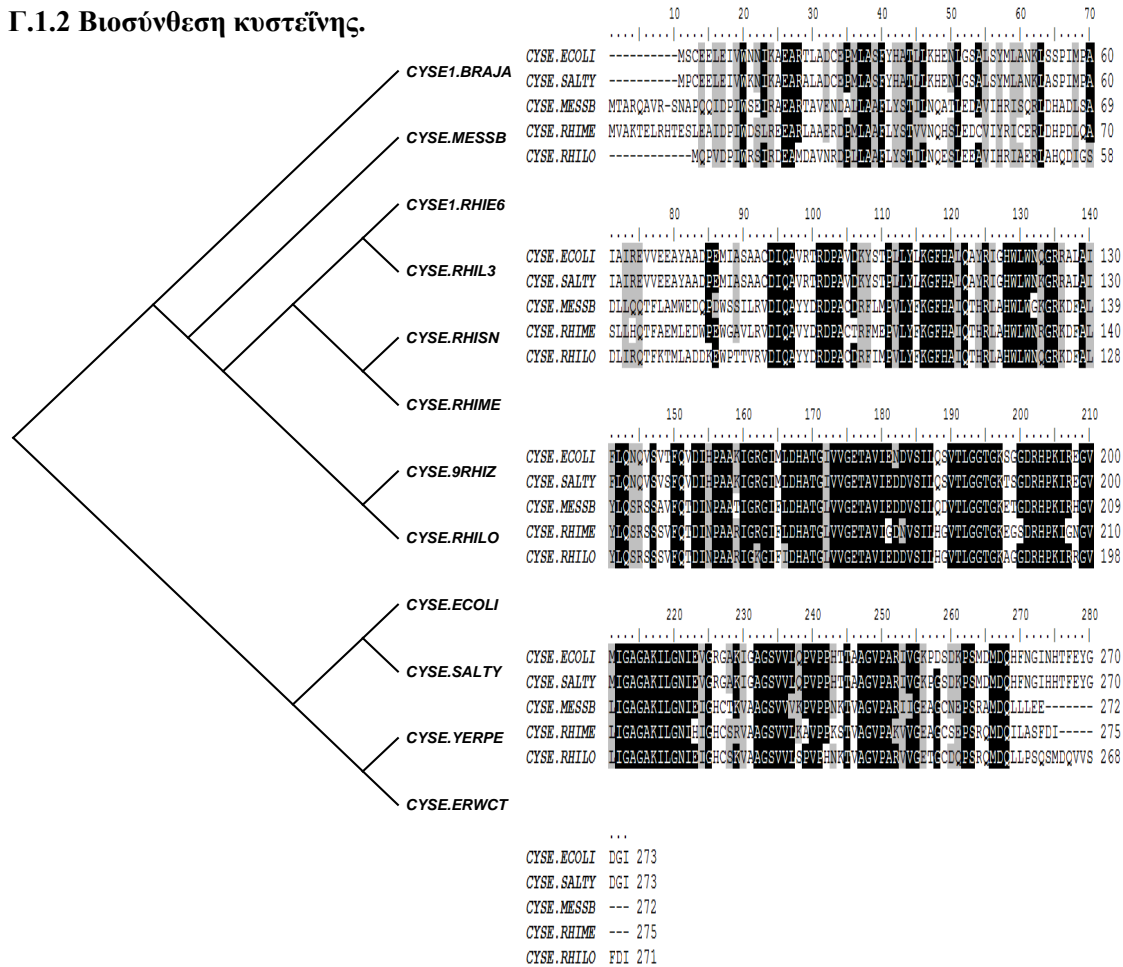


διαμορφώνουν ξεχωριστό κλάδο από τις υπόλοιπες CYSI, γεγονός που υποδηλώνει ότι η SRH του *M. loti* ανήκει σε ειδική κατηγορία, αυτή των ριζοβίων.



**Εικόνα 14:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της SRH του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών CYSI. RHIEC(Q2K8U0) *Rhizobium etli* (strain CFN 42 / ATCC 51251); CYSI.RHILV(Q9KIN6) *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*; CYSI.RHIME(Q92Q78) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); CYSI.BACSU(O32213) *Bacillus subtilis*; CYSI.ECOLI(P17846) *Escherichia coli* (strain K12); CYSI.ERWCT(Q6D1A2) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); CYSI.NITWN(Q3SV33) *Nitrobacter winogradskyi* (strain Nb-255 / ATCC 25391); CYSI.SALCH(Q57KH8) *Salmonella choleraesuis*; CYSI.SALTY(P17845) *Salmonella typhimurium*; CYSI.VIBCH(Q9KUX3) *Vibrio cholera*; CYSI.YERPE(Q8ZBN7) *Yersinia pestis*; CYSJ.BACSU(O32214) *Bacillus subtilis*; CYSJ.ECOLI(P38038) *Escherichia coli* (strain K12); CYSJ.ERWCT(Q6D1A1) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); CYSJ.KLEP7(A6TD49) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (strain ATCC 700721 / MGH 78578); CYSJ.SALCH(Q57KH7) *Salmonella choleraesuis*; CYSJ.SALTY(P38039) *Salmonella typhimurium*; CYSJ.VIBC3(A5F314) *Vibrio cholerae* serotype O1 (strain ATCC 39541 / Ogawa 395 / O395); CYSJ.VIBCH(Q9KUX4) *Vibrio cholera*; CYSJ.YERPE(Q8ZBN6) *Yersinia pestis*; CYSJ.YERPP(A4TPY5) *Yersinia pestis* (strain Pestoides F); CYSI.9RHIZ(C8SH55) *Mesorhizobium opportunistum* WSM2075; CYSI.RHIFR(A8IM22) *Rhizobium fredii* (*Sinorhizobium fredii*); SRH.RHILO(Q98GP8) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CYSI.RHILS(C6AX47) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (strain WSM1325);

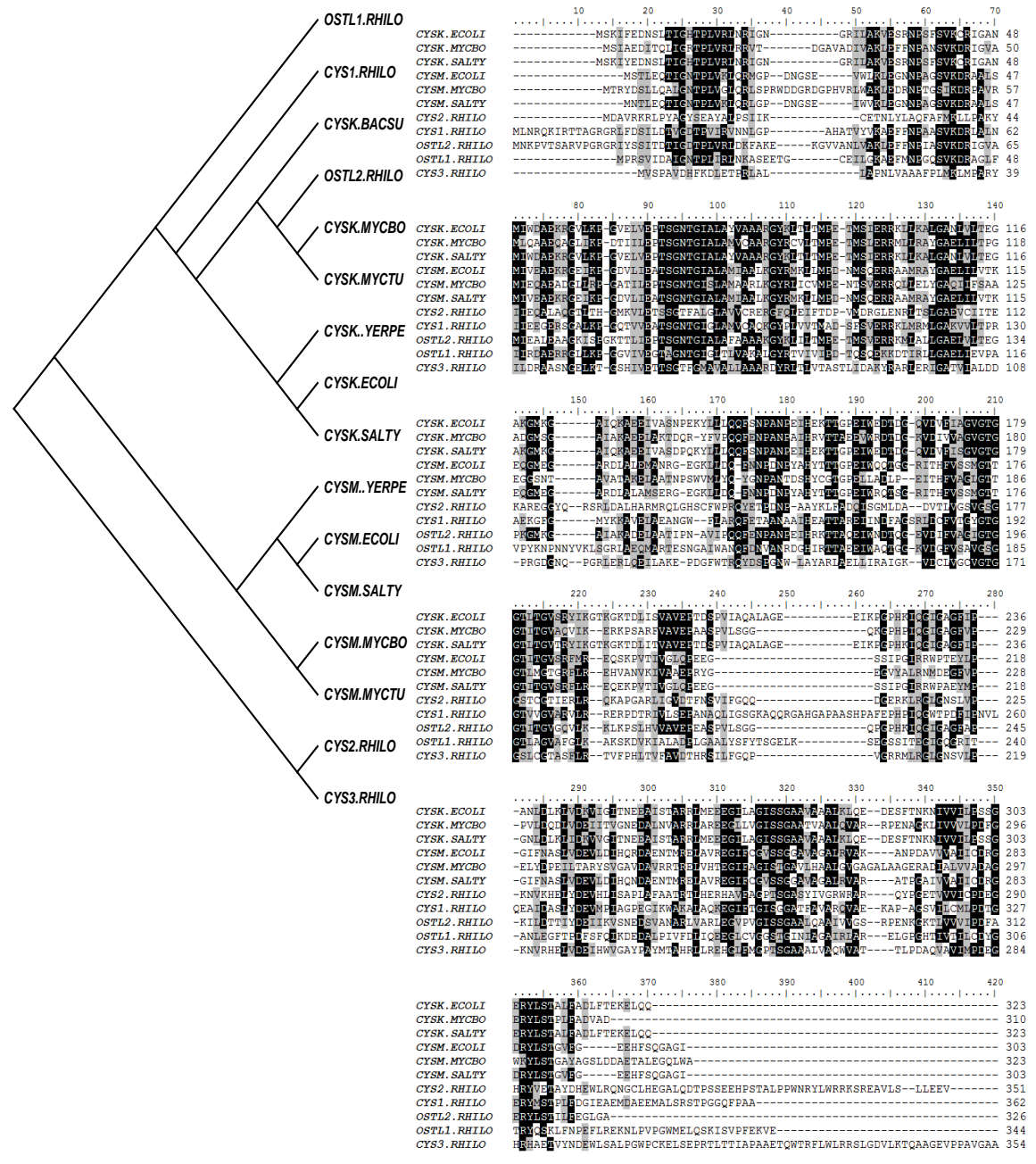
### Γ.1.2 Βιοσύνθεση κυστεΐνης.



**Εικόνα 15:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της CYSE του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών B3PYM8\_RHIE6 (B3PYM8) *Rhizobium etli* (strain CIAT 652); C3MBP0\_RHISN (C3MBP0) *Rhizobium sp.* (strain NGR234); C8SHW9\_9RHIZ (C8SHW9) *Mesorhizobium opportunistum* WSM2075; CYSE\_ECOLI (P0A9D4) *Escherichia coli* (strain K12); CYSE\_SALTY (P29847) *Salmonella typhimurium*; CYSE.YERPE (Q0WKM4) *Yersinia pestis*; Q11HK2\_MESSB (Q11HK2) *Mesorhizobium sp.* (strain BNC1); Q1MH66\_RHIL3 (Q1MH66) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (strain 3841); Q6DAS9\_ERWCT (Q6DAS9) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); CYSE1.BRAJA (Q89EC9) *Bradyrhizobium japonicum*; CYSE.RHIME (Q92Q66) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); SAT.RHILO (Q98NE5) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*);

Το πρώτο ένζυμο που παίρνει μέρος στη βιοσύνθεση της κυστεΐνης στο μεταβολικό μονοπάτι του *M. loti* είναι η CYSE (EC 2.3.1.30, SAT) η οποία έχει δραστηριότητα τρανσακετυλάσης της σερίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr0175*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της CYSE του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες της τρανσακετυλάσης της σερίνης άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική ομολογία, μεταξύ αυτής και της CYSE των *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Mesorhizobium sp.* και *S. meliloti*, η οποία κυμαίνεται από 51,1 έως 77,5%. Η φυλογενετική σχέση της με τις CYSE άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 15. Από το δενδρόγραμμα αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η CYSE του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις αυτές των ριζόβιων, με τις οποίες διαμορφώνουν ένα

καθαρά ανεξάρτητο κλάδο και ακολουθούν οι CYSE των υπόλοιπων βακτηρίων σε ξεχωριστό κλάδο.

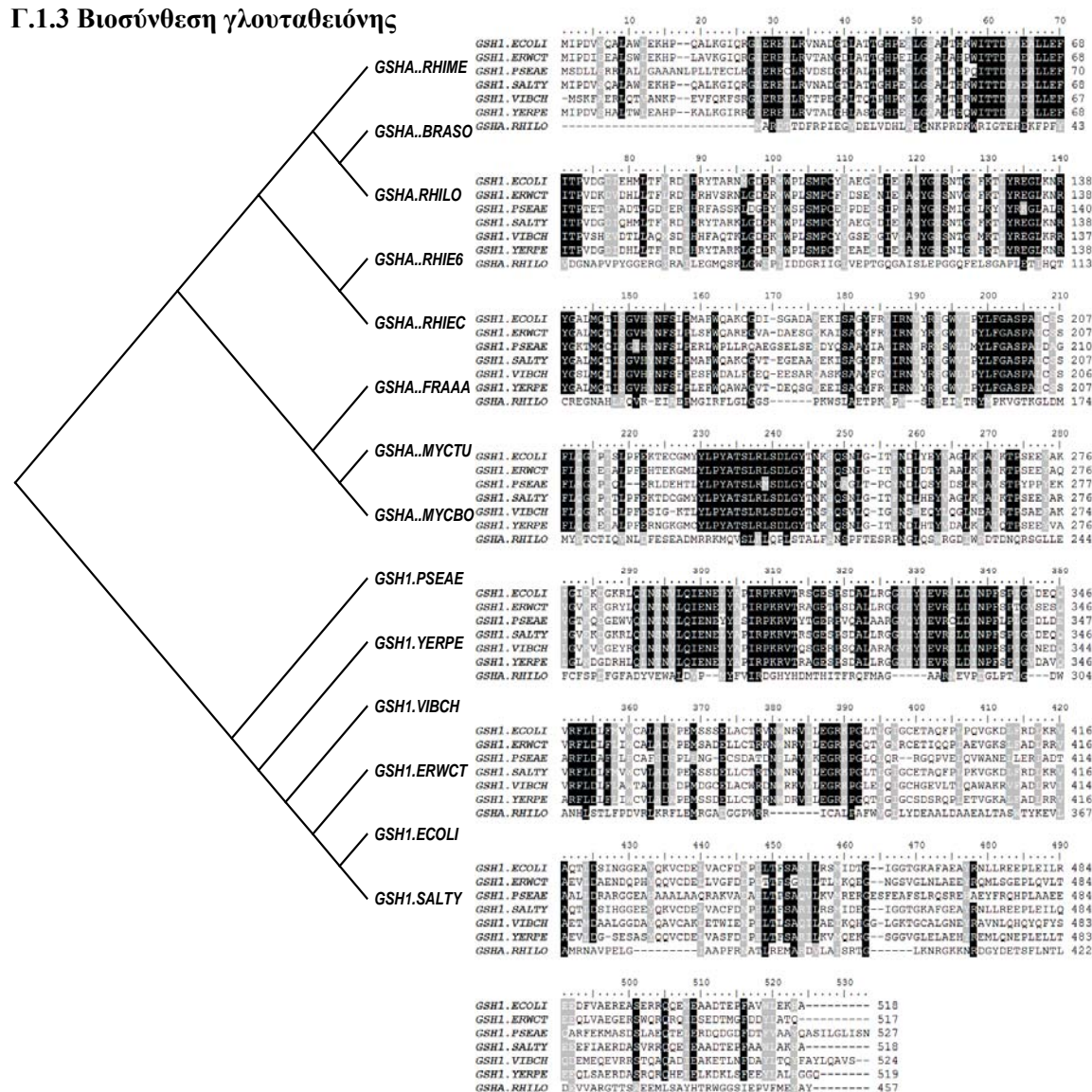


**Εικόνα 16:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των OASTL-1, OASTL-2, CYS1, CYS2 και CYS3 του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών *CYS1\_RHILO(Q98DL3)* *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); *CYS2\_RHILO(Q981U9)* *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); *CYSK\_BACSU(P37887)* *Bacillus subtilis*; *CYSK\_ECOLI(P0ABK5)* *Escherichia coli* (strain K12); *CYSK\_MYCBO(P0A535)* *Mycobacterium bovis*; *CYSK\_MYCTU(P0A534)* *Mycobacterium tuberculosis*; *CYSK\_SALTY(P0A1E3)* *Salmonella typhimurium*; *CYSK\_YERPE(Q7CJF5)* *Yersinia pestis*; *CYSM\_ECOLI(P16703)* *Escherichia coli* (strain K12); *CYSM\_MYCBO(P63874)* *Mycobacterium bovis*; *CYSM\_MYCTU(P63873)* *Mycobacterium tuberculosis*; *CYSM\_SALTY(P29848)* *Salmonella typhimurium*; *CYSM\_YERPE(Q7CJG9)* *Yersinia pestis*; *OSTL2\_RHILO(Q98DP1)* *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); *OSTL1\_RHILO(Q98N11)* *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); *CYS3\_RHILO(Q98PA8)* *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*);

Την τελική αντίδραση σχηματισμού της κυστεΐνης καταλύει το ένζυμο θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης (OASTL)(EC 2.5.1.47). Στο *E. coli* και στο *S. typhimurium* έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί δυο διαφορετικές OASTL, η CYSK και η CYSM. Έχει παρατηρηθεί ότι η CYSK και η CYSE σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο ονομάζεται συνθάση της κυστεΐνης (CYS). Στο *M. luti* βρέθηκαν πέντε ένζυμα που παρουσιάζουν ομολογία και έχουν πιθανά δραστηριότητα OASTL και CYS. Τα ένζυμα αυτά είναι τα OASTL-1, OASTL-2, CYS1, CYS2, CYS3 και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mlr0353*, *mll4616*, *mlr4651*, *mll9227* και *mlr9541* αντίστοιχα. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας των OASTL και CYS του *M. luti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες των αντίστοιχων ενζύμων από άλλους οργανισμούς παρατηρούμε ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 21 έως 65,5%. Η φυλογενετική σχέση της με τις CYSM και CYSK άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 16. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η OASTL-2 του *M. luti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις CYSK των *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο. Οι OASTL-1 και CYS1 βρίσκονται ανάμεσα στις CYSK και CYSM και κοντά στην OASTL-2 ενώ οι CYS2 και CYS3 βρίσκονται εξελικτικά μακρύτερα από όλες τις άλλες διαμορφώνοντας έναν τελείως ανεξάρτητο κλάδο.



### Γ.1.3 Βιοσύνθεση γλουταθειόνης

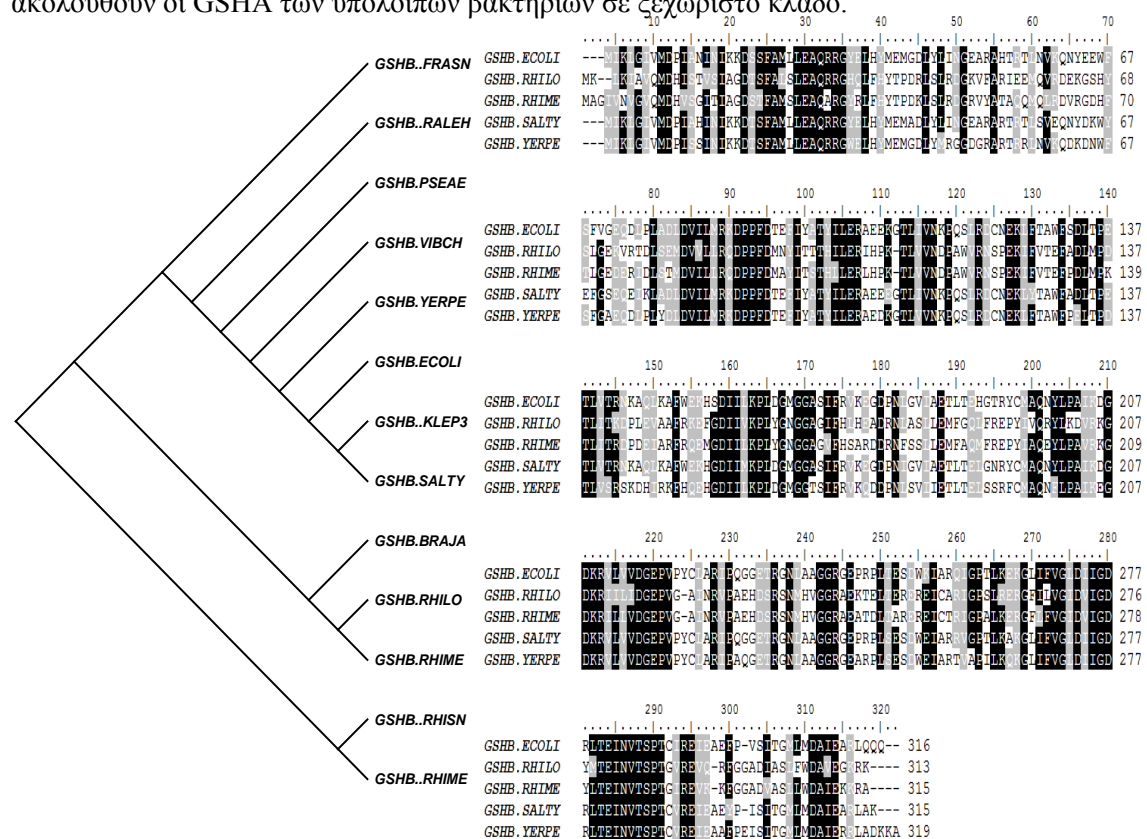


**Εικόνα 17:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της GSHA του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών GSH1\_ECOLI(P0A6W9) *Escherichia coli* (strain K12); GSH1\_ERWCT(Q6D1T4) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); GSH1\_PSEAE(Q9HTY6) *Pseudomonas aeruginosa*; GSH1\_SALTY(O68838) *Salmonella typhimurium*; GSH1\_VIBCH(Q9KUG5) *Vibrio cholerae*; GSH1\_YERPE(Q8ZBU2) *Yersinia pestis*; GSHA.BRASO(A4Z2E3) *Bradyrhizobium* sp. (strain ORS278); GSHA.FRAAA(Q0RAS7) *Frankia alni* (strain ACN14a); GSHA.MYCBO(Q7TVW1) *Mycobacterium bovis*; GSHA.MYCTU(O69672) *Mycobacterium tuberculosis*; GSHA.RHIE6(B3PR90) *Rhizobium etli* (strain CIAT 652); GSHA.RHIEC(Q2KC22) *Rhizobium etli* (strain CFN 42 / ATCC 51251); GSHA.RHILO(Q987U9) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); GSHA.RHIME(Q926D5) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*);

Το ένζυμο συνθετάση της γ-γλουταμιλκυστεΐνης (EC6.3.2.2) (GSHA) καταλύει τη πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης. Στο μεταβολικό μονοπάτι του *M. loti* η GSHA η οποία έχει δραστηριότητα συνθετάσης της γ-γλουταμιλκυστεΐνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll6902*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας



της GSHA του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες GSHA άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει μικρή ομολογία, μεταξύ αυτών, η οποία κυμαίνεται από 10 έως 15%. Η φυλογενετική σχέση της με τις GSHA άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 17. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η GSHA του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των ριζόβιων, με τις οποίες διαμορφώνουν ένα καθαρά ανεξάρτητο κλάδο και ακολουθούν οι GSHA των υπόλοιπων βακτηρίων σε ξεχωριστό κλάδο.

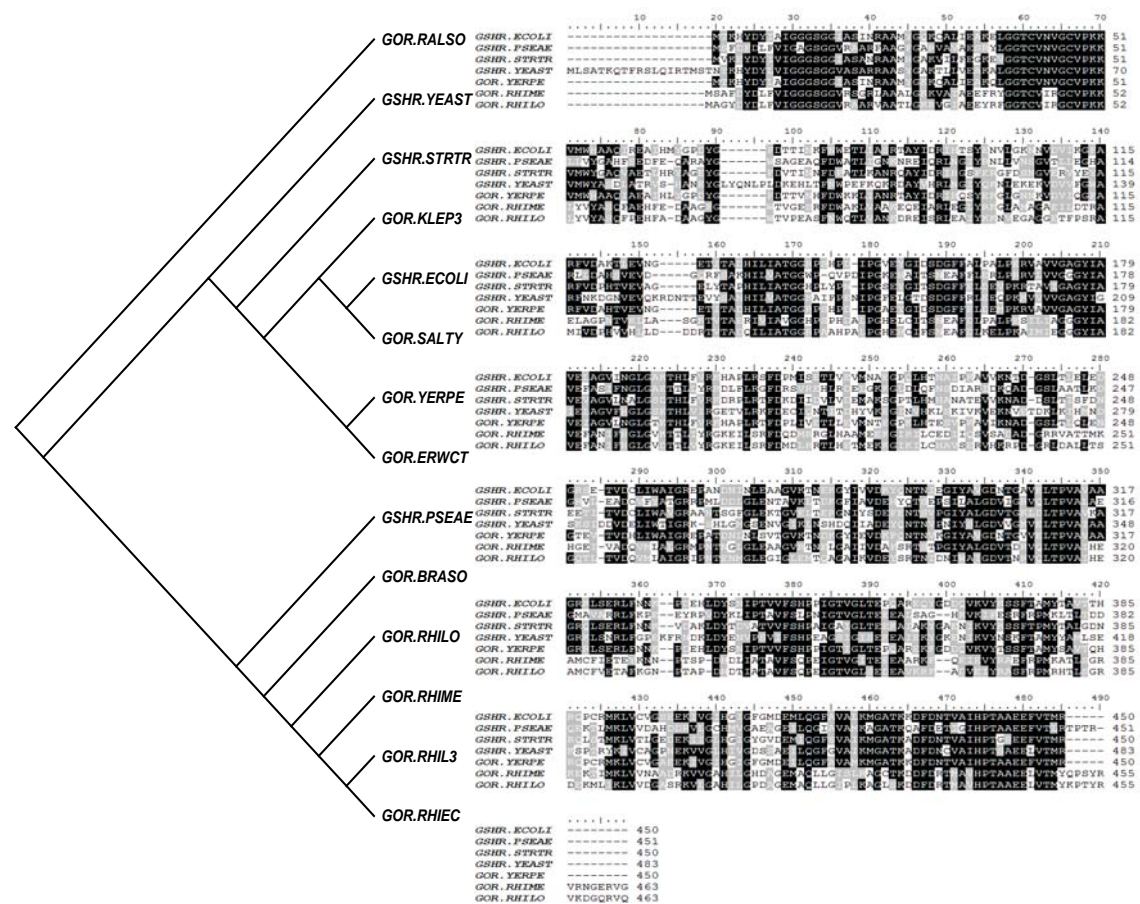


**Εικόνα 18:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της GSHB του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών *GSHB.FRASN*(A8L3D2) *Frankia sp.* (strain *EAN1pec*); *GSHB.KLEP3*(B5XUA3) *Klebsiella pneumoniae* (strain 342); *GSHB.RALEH*(Q0KEU7) *Ralstonia eutropha* (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337) (*Cupriavidus necator* (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337)); *GSHB.RHIME*(Q92UR6) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); *GSHB.RHISN*(C3KKR1) *Rhizobium sp.* (strain *NGR234*); *GSHB\_ECOLI*(P04425) *Escherichia coli* (strain *K12*); *GSHB\_PSEAE*(Q9I697) *Pseudomonas aeruginosa*; *GSHB\_RHILO*(Q98DE8) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); *GSHB\_RHIME*(Q92SN3) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); *GSHB\_SALTY*(P58580) *Salmonella typhimurium*; *GSHB\_VIBCH*(Q9KUP7) *Vibrio cholera*; *GSHB\_YEAST*(Q08220) *Saccharomyces cerevisiae* (*Baker's yeast*); *GSHB\_YERPE*(P58582) *Yersinia pestis*; *GSHB2.RHIEC*(Q2KDE2) *Rhizobium etli* (strain *CFN 42 / ATCC 51251*);

Το ένζυμο συνθετάση της γλουταθειόνης (EC6.3.2.3) (GSHB) καταλύει τη τελική αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης. Στο μεταβολικό μονοπάτι του *M. loti* η GSHB η οποία έχει δραστηριότητα συνθετάσης της γλουταθειόνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll4735*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της GSHB του *M. loti* με

τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες GSHB άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη ομολογία, μεταξύ αυτών, η οποία κυμαίνεται από 41 έως 75%. Η φυλογενετική σχέση της με τις GSHA άλλων μικροοργανισμών παρουσιάζεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 18. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η GSHB του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των ριζόβιων, με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο και ακολουθούν οι GSHB των υπόλοιπων βακτηρίων.

Το ένζυμο ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (EC1.8.1.7) (GOR) είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη. Το ένζυμο GOR του *M. loti* που έχει δραστηριότητα ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll0523*.



**Εικόνα 19:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της GOR του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών GOR.BRASO(A4YX16) *Bradyrhizobium sp.* (strain ORS278); GOR.ERWCT(Q6DB39) *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); GOR.KLEP3(B5XN43) *Klebsiella pneumoniae* (strain 342); GOR.RALSO(Q8Y3G6) *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*); GOR.RHIEC(Q2K7M9) *Rhizobium etli* (strain CFN 42 / ATCC 51251); GOR.RHIL3(Q1MFU0) *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (strain 3841); GOR.RHILO(Q98MM1) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); GOR.RHIME(Q92PC0) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); GOR.SALTY(Q8ZLD4) *Salmonella typhimurium*; GOR.YERPE(Q0WA41) *Yersinia pestis*;

GSHR\_ECOLI(P06715) *Escherichia coli* (strain K12); GSHR\_PSEAE(P23189) *Pseudomonas aeruginosa*; GSHR\_STRTR(Q60151) *Streptococcus thermophilus*; GSHR\_YEAST(P41921) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast);

Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της GOR του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες GOR άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη ομολογία, μεταξύ αυτών, η οποία κυμαίνεται από 32 έως 68%. Η φυλογενετική σχέση της με τις GOR άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 19. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η GOR του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των ριζόβιων βακτηρίων, με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο και ακολουθούν οι GOR των υπόλοιπων βακτηρίων.

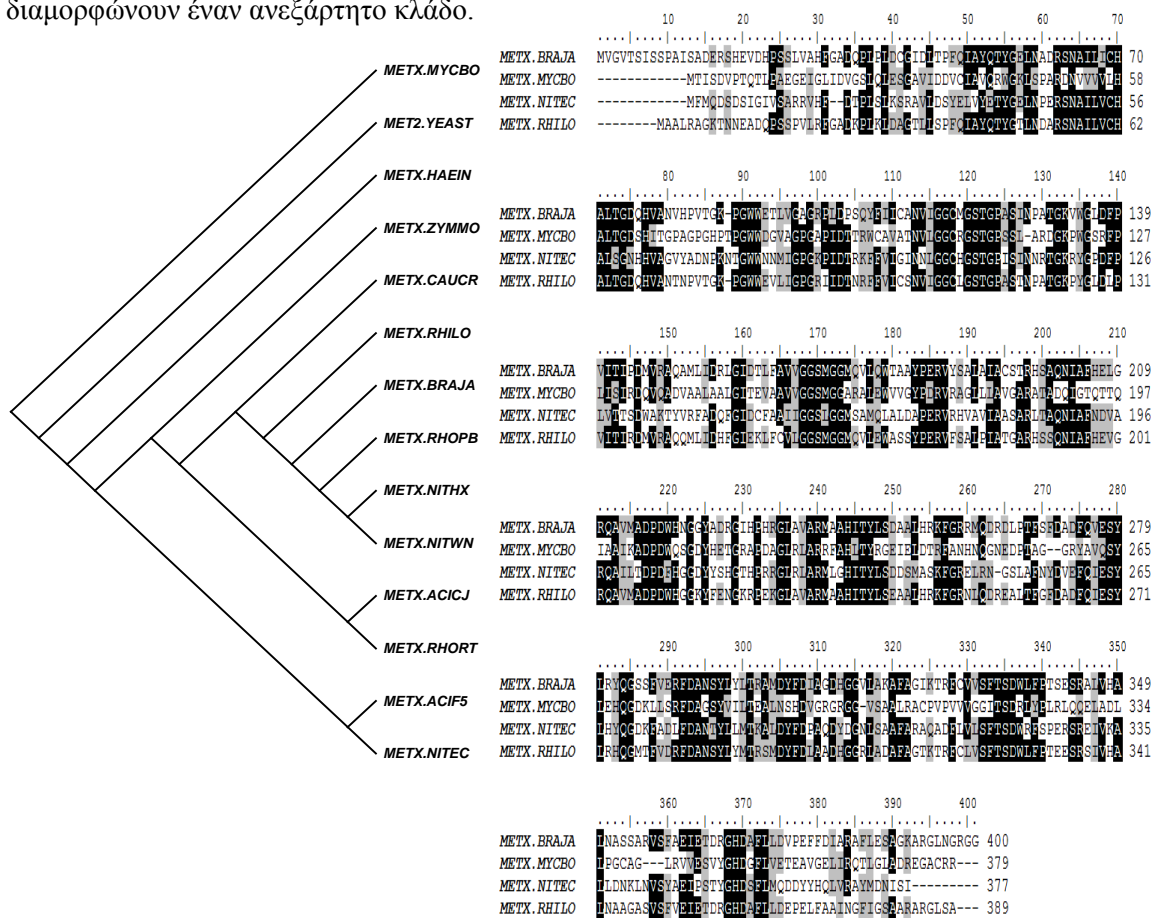
Στην παραπάνω αντίδραση συμμετέχει ένα NADPH και παράγεται NADP<sup>+</sup>. Τα ένζυμα ισοκιτρική αφυδρογονάση (EC1.1.1.42) (ICD), 6-φωσφορογλυκονική αφυδρογονάση (EC1.1.1.44) (GND) και αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (EC1.1.1.49) (ZWF) ανακυκλώνουν το NADP<sup>+</sup> σε NADPH. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα αυτά στο *M loti* είναι: το *mll0036* για το ICD, τα *mll3321* και *mlr4206* για την GND και τα *mll6516* και *mlr4207* για το ZWF.

#### **Γ.1.4 Βιοσύνθεση μεθειονίνης**

Το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Στο *M. loti* το μονοπάτι πιθανά έχει ως εξής:

- α) από τον μεταβολισμό του ασπαρτικού παράγεται L-ομοσερίνη η οποία μετατρέπεται σε O-ακετυλομοσερίνη με τη βοήθεια του ενζύμου O-ακετυλοτρανσφεράσης της ομοσερίνης (EC 2.3.1.31, METX). Στη συνέχεια η O-ακετυλ-L-ομοσερίνη μετατρέπεται σε L-ομοκυστεΐνη με τη βοήθεια του ενζύμου αμινοκαρβοξίπροπυλμεταφοράση της O-ακετυλομοσερίνης (EC2.5.1.49, OAH5). Επίσης L-ομοκυστεΐνη παράγεται και από τη μετατροπή της O- ηλεκτρυλο -L-ομοσερίνης με τη βοήθεια του ενζύμου σουλφουριλαση της O- ηλεκτρυλομοσερίνης (EC2.5.1.-).
- Β) Από το μεταβολισμό της κυστεΐνης, με τη βοήθεια του ενζύμου γ-λυάση της κυσταθειονίνης (EC 4.4.1.1, METB), παράγεται L-κυσταθειονίνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε L-ομοκυστεΐνη με την βοήθεια του ενζύμου β-λυάση της κυσταθειονίνης (EC 4.4.1.8, METC).
- Γ) Μετά την παραγωγή της L-ομοκυστεΐνης τρία ένζυμα αναλαμβάνουν την μετατροπή αυτής σε μεθειονίνη. Τα ένζυμα αυτά είναι η S-μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης-βεταΐνης (EC2.1.1.5, BMT), η συνθάση της μεθειονίνης I (EC2.1.1.13, METH) και η S-μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης (EC2.1.1.14, METE). Το πιο ένζυμο θα αναλάβει δράση εξαρτάται από το υπόστρωμα της αντίδρασης.

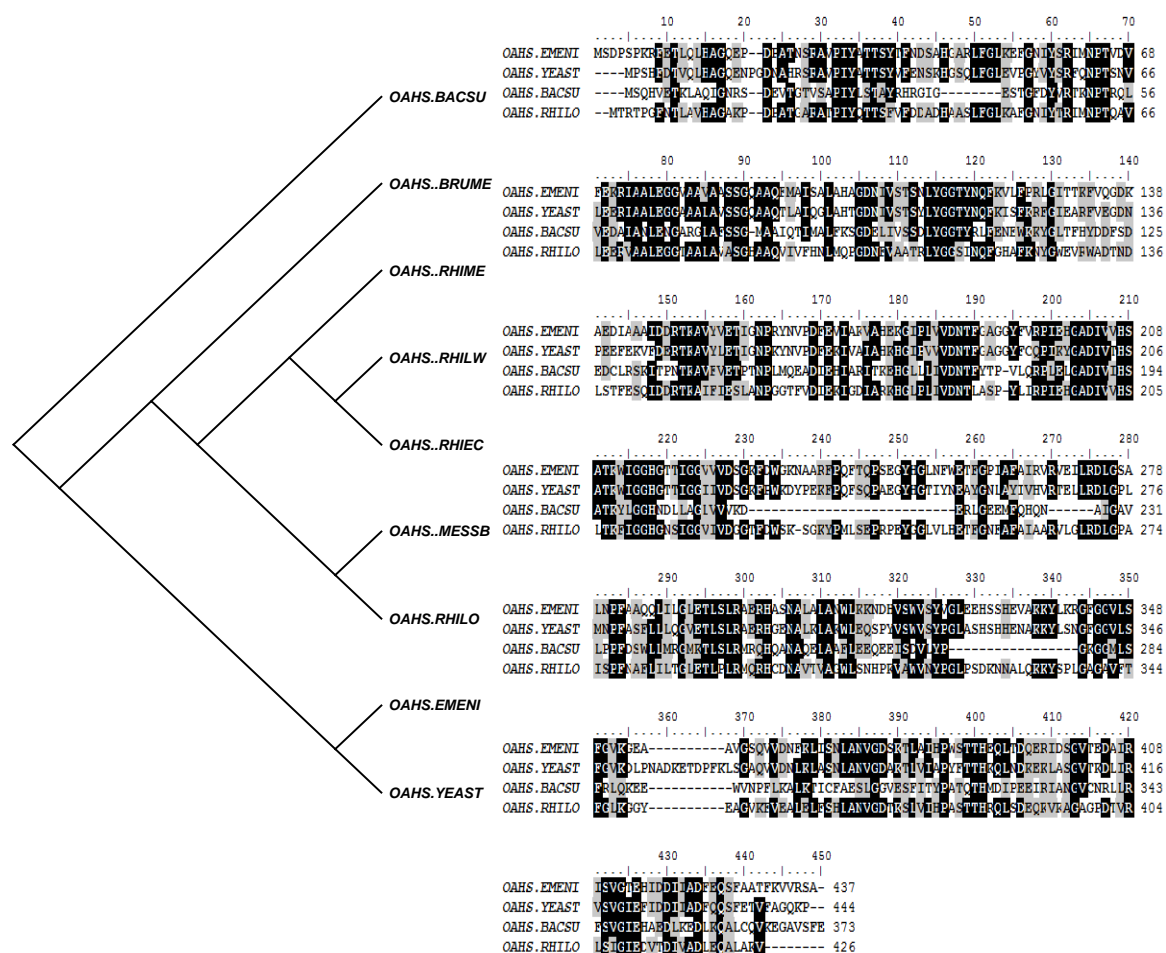
Η METX στο *M. loti* πθανά κωδικοποιείται από το γονίδιο *mlr3538*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της METX του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες METX άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ αυτής και των *Nitrosomonas eutropha*, *Mycobacterium bovis*, και *Bradyrhizobium japonicum*, η οποία είναι 45,9%, 36,2% και 69,8% αντίστοιχα. Η φυλογενετική σχέση της με τις METX άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 20. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η METX του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με τις αυτές των *Rhodopseudomonas palustris*, *Caulobacter crescentus*, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Bradyrhizobium japonicum*, με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο.



**Εικόνα 20:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της METX του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών MET2\_YEAST(P08465) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); METX\_ACICJ(A5FVN0) *Acidiphilium cryptum* (strain JF-5); METX\_ACIF5(B5ELV1) *Acidithiobacillus ferrooxidans* (strain ATCC 53993) (*Leptospirillum ferrooxidans* (ATCC 53993)); METX\_BRAJA(Q89UL7) *Bradyrhizobium japonicum*; METX\_CAUCR(Q9AAS1) *Caulobacter crescentus* (*Caulobacter vibrioides*); METX\_HAEIN(P45131) *Haemophilus influenzae*; METX\_MYCBO(P0A5J9) *Mycobacterium bovis*; METX\_NITEC(Q0AIM3) *Nitrosomonas eutropha* (strain C91); METX\_NITHX(Q1QQD3) *Nitrobacter hamburgensis* (strain X14 / DSM 10229); METX\_NITWN(Q3SV39) *Nitrobacter winogradskyi* (strain Nb-255 / ATCC 25391); METX\_RHIL0(Q98G09) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); METX\_RHOPB(Q20Y11) *Rhodopseudomonas palustris* (strain BisB18); METX\_RHORT(Q2RP84) *Rhodospirillum rubrum* (strain ATCC 11170 / NCIB 8255); METX\_ZYMMO(Q5NR05) *Zymomonas mobilis*;



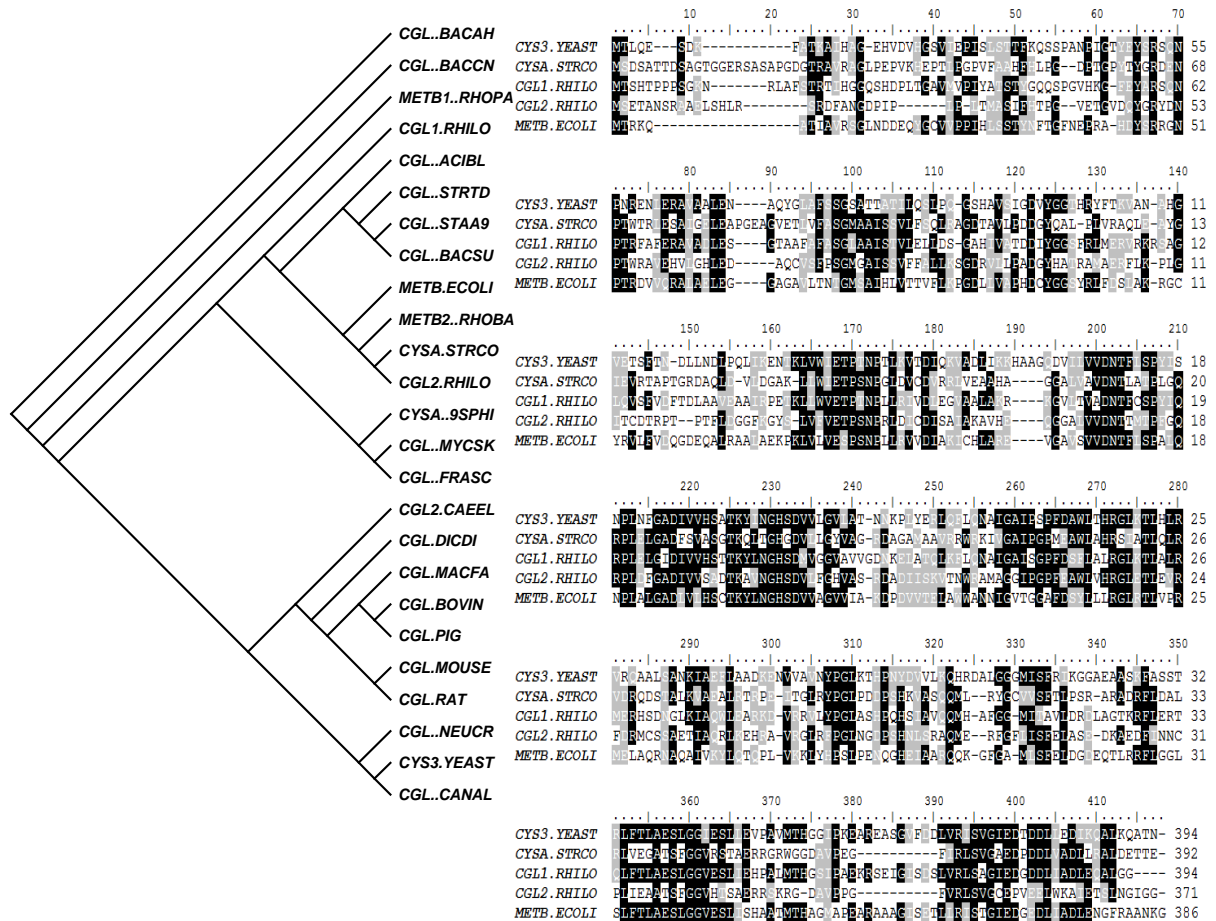
Η OAHS στο *M. loti* κωδικοποιείται από το γονίδιο *mItr8465*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της OAHS του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες OAHS άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 35-60%. Η φυλογενετική σχέση της με τις OAHS άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 21. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η OAHS του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των ριζόβιων, με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο.



**Εικόνα 21:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της OAHS του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών OAHS.BRUME(Q8YGJ3) *Brucella melitensis*; OAHS.MESSB(Q11J62) *Mesorhizobium sp. (strain BNC1)*; OAHS.RHIEC(Q2K9V7) *Rhizobium elii (strain CFN 42 / ATCC 51251)*; OAHS.RHILO(Q982W2) *Rhizobium loti (Mesorhizobium loti)*; OAHS.RHILW(B5ZY03) *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii (strain WSM2304)*; OAHS.RHIME(Q92QQ9) *Rhizobium meliloti (Sinorhizobium meliloti)*; OAHS\_EMENI(P50125) *Emericella nidulans (Aspergillus nidulans)*; MET17\_YEAST(P06106) *Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)*; METB\_BACSU(O31631) *Bacillus subtilis*;

Στο *M. loti* υπάρχουν δύο ένζυμα τα οποία έχουν δραστηριότητα γ-λυάση της κυσταθειονίνης (EC 4.4.1.1, METB) η CGL1 και η CGL2 και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mI14503* και *mI1566* αντίστοιχα. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας των CGL του *M. loti*

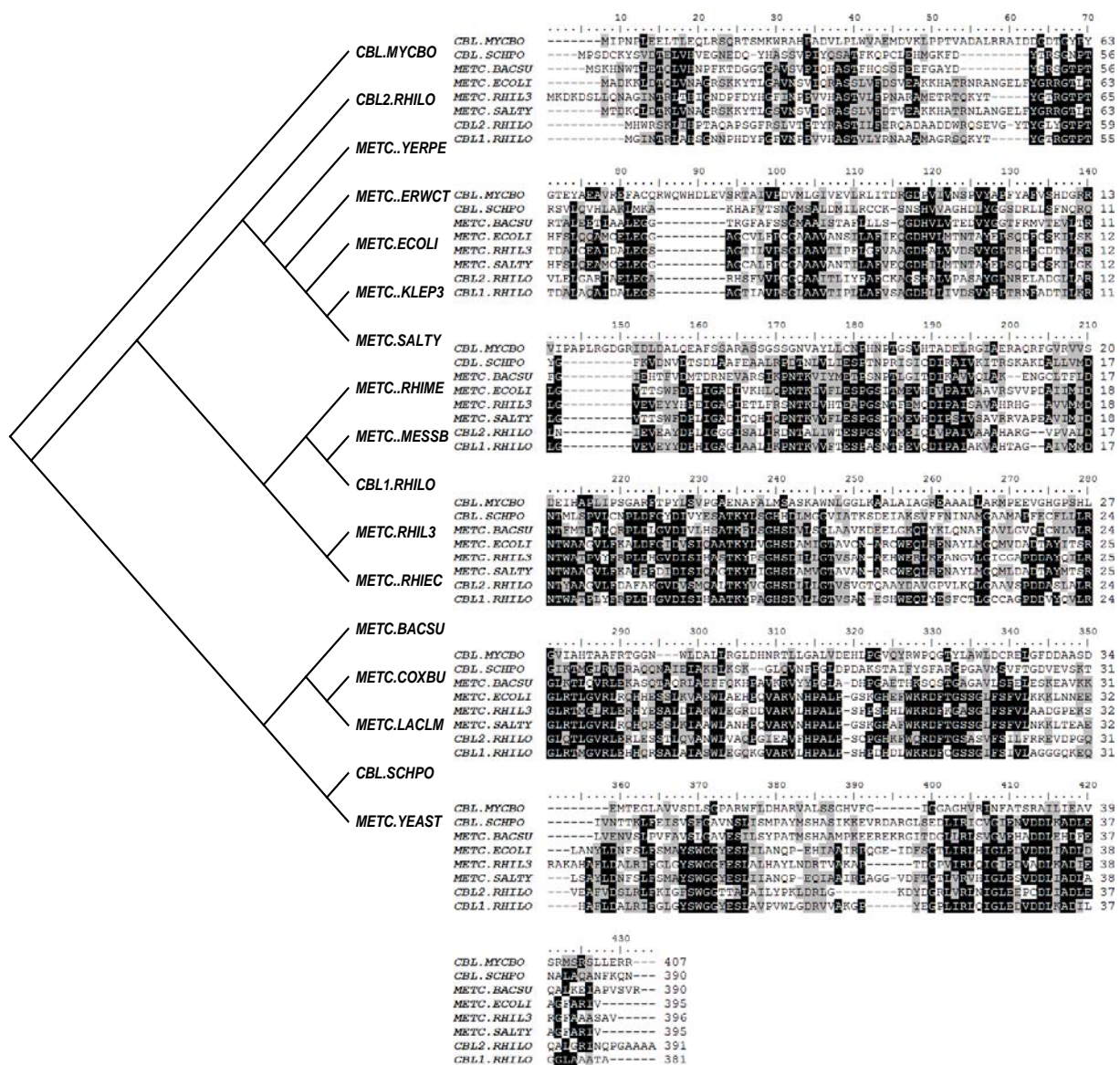
με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες METB άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 30-50%. Η φυλογενετική σχέση της με των CGL άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 22. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος παρατηρούμε ότι η CGL1 και CGL2 είναι εξελικτικά μακριά η μία από την άλλη σε διαφορετικούς κλάδους.



**Εικόνα 22:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των CGL1 και CGL2 του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών CGL.ACIBL(Q11NQ0) *Acidobacteria bacterium* (strain *Ellin345*); CGL.BACAH(A0RJ38) *Bacillus thuringiensis* (strain *Al Hakam*); CGL.BACCN(A7GTT5) *Bacillus cereus subsp. cytotoxis* (strain *NVH 391-98*); CGL.BACSU(O05394) *Bacillus subtilis*; CGL.CANAL(Q5A362) *Candida albicans* (Yeast); CGL.FRASC(Q2JG31) *Frankia sp.* (strain *CcI3*); CGL.MYCSK(A1UKQ5) *Mycobacterium sp.* (strain *KMS*); CGL.NEUCR(Q96VU7) *Neurospora crassa*; CGL.STAA9(A5IQ13) *Staphylococcus aureus* (strain *JH9*); CGL.STRTD(Q03L01) *Streptococcus thermophilus* (strain *ATCC BAA-491 / LMD-9*); CGL\_BOVIN(Q58DW2) *Bos taurus* (Bovine); CGL\_DICDI(Q55DV9) *Dictyostelium discoideum* (Slime mold); CGL\_MACFA(Q60HG7) *Macaca fascicularis* (Crab eating macaque) (*Cynomolgus monkey*); CGL\_MOUSE(Q8VCN5) *Mus musculus* (Mouse); CGL\_PIG(Q19QT7) *Sus scrofa* (Pig); CGL\_RAT(P18757) *Rattus norvegicus* (Rat); CGL1.RHILO(Q98DX6) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CGL2.RHILO(Q98KA4) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CGL2\_CAEEL(P55216) *Caenorhabditis elegans*; CYS3\_YEAST(P31373) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CYSA.9SPHI(C2G448) *Sphingobacterium spiritivorum* ATCC 33300; CYSA\_STRCO(Q59829) *Streptomyces coelicolor*; METB\_ECOLI(P00935) *Escherichia coli* (strain *K12*); METB1.RHOPA(Q6NCU8) *Rhodopseudomonas palustris*; METB2.RHOBA(Q7UQ99) *Rhodospirellula baltica*;

Στο *M. loti* υπάρχουν δύο ένζυμα τα οποία έχουν δραστηριότητα β-λυάσης της κυσταθειονίνης (EC 4.4.1.8, METC) η CBL1 και η CBL2 και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mll8145* και

*mil9139* αντίστοιχα. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας των CBL του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες METC άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 11,3-74,3%. Η φυλογενετική σχέση της με τις CBL άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 23. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος παρατηρούμε ότι η CBL1 και CBL2 είναι εξελικτικά μακριά η μία από την άλλη σε διαφορετικούς κλάδους. Ειδικότερα η CBL2 βρίσκεται στον ίδιο κλάδο με τις METC των *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* και *Klebsiella pneumonia*, ενώ η CBL1 βρίσκεται στον κλάδο των ριζόβιων.

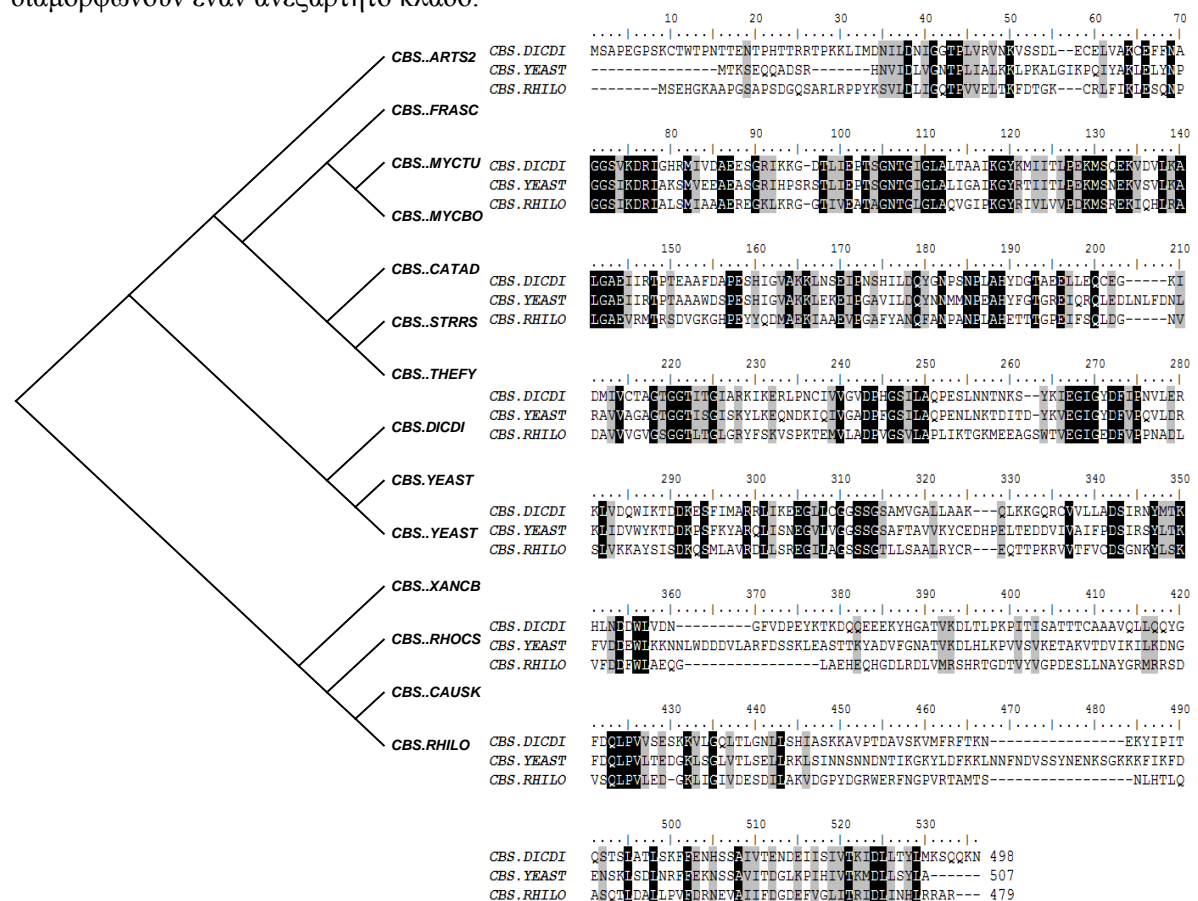


**Εικόνα 23:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των CBL1 και CBL2 του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών CBL\_MYCBO(P63503) *Mycobacterium bovis*; CBL\_SCHPO(O94350) *Schizosaccharomyces pombe* (Fission yeast); CBL1.RHILO(Q983W3) *Rhizobium loti*



(*Mesorhizobium loti*); CBL2.RHILO(Q982C4) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); METC.YERPE(Q7CKR4) *Yersinia pestis*; METC.ERWCT(Q6DAA1) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); METC.KLEP3(B5XU68) *Klebsiella pneumoniae* (strain 342); METC.MESSB(Q11F55) *Mesorhizobium* sp. (strain BNC1); METC.MESSB(Q11JB7) *Mesorhizobium* sp. (strain BNC1); METC.RHIEC(Q2K901) *Rhizobium etli* (strain CFN 42 / ATCC 51251); METC.RHIME(Q92Q70) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); METC.YEAST(P53101) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); METC\_BACSU(O31632) *Bacillus subtilis*; METC\_COXBU(Q83A83) *Coxiella burnetii*; METC\_ECOLI(P06721) *Escherichia coli* (strain K12); METC\_LACLM(A2RM21) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (strain MG1363); METC\_RHIL3(Q52811) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (strain 3841); METC\_SALTY(P18949) *Salmonella typhimurium*;

Στο *M. loti* υπάρχει ένα ένζυμο το οποίο έχει δραστηριότητα β-συνθάσης της κυσταθειονίνης CBS (EC 4.2.1.22) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll4505*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της CBS του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες CBS άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 35-60%. Η φυλογενετική σχέση της με τις CBS άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 24. Από το δενδρόγραμμα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η CBS του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των *Xanthomonas campestris*, *Rhodospirillum centenum* *Caulobacter* sp με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο.

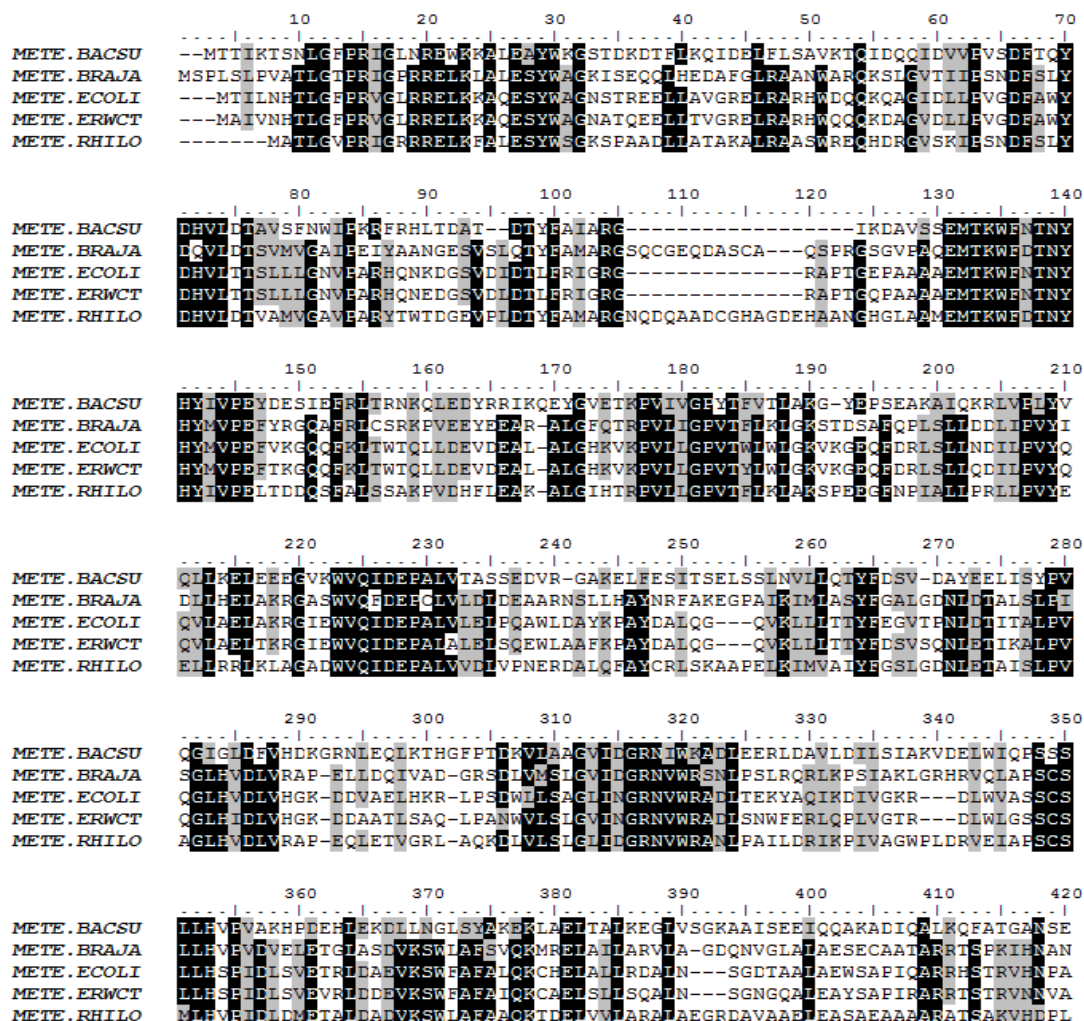


**Εικόνα 24:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της CBS του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών CBS.9ACTO(C1WEJ5) *Kribbella flavida* DSM 17836; CBS.9ACTO(Q9EYM7) *Streptomyces venezuelae*; CBS.ARTS2(A0JZH1) *Arthrobacter* sp. (strain FB24); CBS.CATAD(C7PZ24) *Catenulispora acidiphila* (strain DSM 44928 / NRRL B-24433 / NBRC 102108 / JCM 14897); CBS.CAUSK(B0T581) *Caulobacter* sp. (strain K31); CBS.EAST(O94073) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CBS.FRASC(Q2JG30) *Frankia* sp. (strain Cc13); CBS.MYCTU(Q7D8W0) *Mycobacterium*



tuberculosis; CBS.RHILO(Q98DX5) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); CBS.RHOCS(B6INW1) *Rhodospirillum centenum* (strain ATCC 51521 / SW); CBS.STRRS(C4E328) *Streptosporangium roseum* DSM 43021; CBS.THEFY(Q47SU1) *Thermobifida fusca* (strain YX); CBS.XANCB(B0RVM9) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (strain B100); CBS\_DICDI(P46794) *Dictyostelium discoideum* (Slime mold); CBS\_YEAST(P32582) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CS/CBS.MYCBO(Q7VEZ8) *Mycobacterium bovis*;

Η METH στο *M. loti* κωδικοποιείται πιθανά από το γονίδιο *mlr1220*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της METH του *M. loti* με αμινοξικές ακολουθίες METH άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει μικρή ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 10,4-13,6%. Η METE στο *M. loti* κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll6123*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της METE του *M. loti* με αμινοξικές ακολουθίες METE άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 44-63,7%. Η BMT στο *M. loti* κωδικοποιείται από το γονίδιο *mll1281*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της BMT του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες BMT άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία βρίσκεται περίπου στο 23%.



```

      430      440      450      460      470      480      490
METE. BACSU  QKKELEQLTDDKDFKRPPIPFEEERLALCNESLGLLELLPTTTIGSFPCSAEVSARQKWRKAWESEDCMKNFI
METE. BRAJA  VAVRMRATDQTMRCRATPFARRSEICRERFGLFAFPTTTIGSFPCQTAVRNARAAHARGAMSEECMDRFL
METE. ECOLI  YEKRLAATAQDSQRANVYEVRAEACRAREKLEAFPTTTIGSFPCQTERTLRLDFKKNLDANNRTGI
METE. ERWCT  VAQRLAATAQDSQRQNVYSVRADACRERFNLEAFPTTTIGSFPCQTERTLRLDFKQCRLLDGNRTGI
METE. RHIL0  WGRVASIKVAMTRRKSADVRSKLCGDTLGLSEFPTTTIGSFPCQTAEVKARAHAHAKGELSYVLEAFL

      500      510      520      530      540      550      560
METE. BACSU  NAETKRWDIIOPELELDVLVHGFPERNDMVEYFCEKLAGHAFTRVAVWVQSYGSRCVFPEVVIYGDVFEIEP
METE. BRAJA  KEEETARAVRWQDIDGLDVLVHGFERNNDMVQYFSECLAGHAFTRNGWVQSYGSRCVFPEVILYGDVVRPKP
METE. ECOLI  AEHIKCAIVEQERLGLDVLVHGFERNNDMVEYFCEHLDGEVFTQNGWVQSYGSRCVFPEVIVGLISRPAP
METE. ERWCT  AEHIKCAVAEQERLGLDVLVHGFERNNDMVEYFCEHLDGEVFTQNGWVQSYGSRCVFPEVVIYGDVSRPEA
METE. RHIL0  KREIEARAVRWQDIDGLDVLVHGFERNNDMVQYFSECLRAGHAFTRNGWVQSYGSRVFRPEVILYGDVSRQNP

      570      580      590      600      610      620      630
METE. BACSU  LTVKDTVYACSLTISKHVRGMLTGPVTIILNWSFERNDISRKEIAPCIGLARKEVKALEDACIQIICVDEP
METE. BRAJA  ITVEWRYACSLTISKHVRMLTGPVTIILNWSFERNDISRSEVCRCLALANRDEVLDENAGAAMIQIDEA
METE. ECOLI  ITVEWRYACSLTISKHVRGMLTGPVTIILNWSFEREDVSRETIAKCIALARDEVALDEAAGIGIICIDEP
METE. ERWCT  ITVEWRYACSLTISKHVRGMLTGPVTIILNWSFEREDVSRETIAKCIALARDEVALDEAAGIGIICIDEP
METE. RHIL0  MTLHWRYACSLTISKHVRGMLTGPVTIILNWSFEREDLRSVAVCRCLALANRDEVSLDEKACAKMIQIDEA

      640      650      660      670      680      690      700
METE. BACSU  ALREGLPFRKTRDWEYLDWAAAEFRITTSVKNRFTQIHTHMCYSNFEEDIVITINDIDADVITIEHSRSHG
METE. BRAJA  ALREGLPFRRSRWKAYLDWAGDCFRICSSGVTICTQIHTHMCYSEFNIDIGALAAADADVISIETSRSKM
METE. ECOLI  ALREGLPFRRSRWDAYLDWAVEAFRINAAVAKDFTQIHTHMCYCEFNIDISIAADADVITIEHSRSDM
METE. ERWCT  ALREGLPFRRSRWDAYLDWAVDFAFRINAAVAKDFTQIHTHMCYCEFNIDISIAADADVITIEHSRSDM
METE. RHIL0  ALREGLPFRREARWQAYLDWAVECFRLASTAVGATQIHTHMCYSEEDIVDAIAAADADVISIETSRSQL

      710      720      730      740      750      760      770
METE. BACSU  GELDYLRNHFVLRGLGLGVYDIHSERVSESTEEMYNIIIVLALAVCPTDRWVWNPDCGLKTRQCEETVAALK
METE. BRAJA  ELLDAFRRYEYPNCTIGPGVYDIHSERVSEETEMKETIIVLARTREQDSCLWVWNPDCGLKTRWEEVREALA
METE. ECOLI  ELLESFEEFDYPNCTIGPGVYDIHSERVSEVEMWELIKKRAKRIPAERLWVWNPDCGLKTRWEEVREALA
METE. ERWCT  ELLESFEEFDYPNCTIGPGVYDIHSERVSEVEMWELIKKRAKRIPAERLWVWNPDCGLKTRWEEVREALA
METE. RHIL0  ELLDTLRTFKYPNCTIGPGVYDIHSERVSEVGETSNLIMTARKRLSDGCLWVWNPDCGLKTRWEEVREALV

      780
METE. BACSU  NMVFAARQARAQQTQLV- 762
METE. BRAJA  NMVFAARELRASDEPQIR 781
METE. ECOLI  NMVCAAQNLRRG----- 753
METE. ERWCT  NMVCAARQLRETQ----- 754
METE. RHIL0  NMVFAARAIRRKAQTA-- 776

```

```

      10      20      30      40      50      60      70
BMT. RHIME  MSVAHAHLSDLLAQRGVLLADGATGTSIFAMGLEAGAPETWN---ETKFDNITKLRQDFVDAGADLIL 66
BMT. RHIL0  -----MKNVILLDGMGCELRVR--SKSEPTPLWSARVLIIDEDLVRDLLEAFIRAGARVIT 55

      80      90      100     110     120     130     140
BMT. RHIME  TNSFGGTRRRLKLRHQAEDRVHQINKRAAEIARAVADKAPRVITAGSVGHTGELLIFLGALSIEDAVAAF 136
BMT. RHIL0  INTYSATPERIAREGAEDLFRKLCRKGIDPARCACDEAG-EAAIAGCLSELFGSYAPALTISYQETLDIY 124

      150     160     170     180     190     200     210
BMT. RHIME  VECTEGLRAGCAEVAVIETMSSEDEIRAAABAAARVGLFVYVYTGSDTACKTMMGLHPRIITHGVADIGE 206
BMT. RHIL0  RR-IVAEQADGVLDLFLGETMPSSEDEARAAVTAASESGKRVVWVSWILADHCTPRIRSG-ETIAAASALDG 192

      220     230     240     250     260     270     280
BMT. RHIME  GFVAVGANGCVGASDILSSLLDMTAA SPEATIVVRKNCGIPEFRGS-----EIHYSGITPLMAEYARLA 270
BMT. RHIL0  LEIARLLNCCRPETIAAALPELIDLGGPVGAYANGFTSTEALKHGGTVDVVLHARHDLAEDAYAEQIGW 262

      290     300     310     320     330     340
BMT. RHIME  VEAGAKLIVGGCCGTSCNHLAAMRLADNHTIRGERPTIETIVEKIGFLRNKSANEGPAAPARERRRRA 337
BMT. RHIL0  VEAGADIVGGCCVGPFFIAAARDRIQQDSYEISGVLHA----- 301

```

```

      10      20      30      40      50      60      70
METH.ECOLI  -----MSSKV-EQLRAQLNER-ILVLDGGMGTMIQSYRLNEADFERGERFADWPCDLKGNNDLIVLSKFE 62
METH.MYCLE  MRVTAANQHGYDITLLETLAGR-VMVGDGAMGTQLQDAELTLLDFRG-----LEGGNEIINETRED 60
METH.MYCTU  --MTAADKHLVDITLLELVLSQR-VMVGDGAMGTQLQAAADLTLDFRG-----LEGGNEIINETRED 58
METH.SALTY  -----MSSKV-EQLRAQLNER-ILVLDGGMGTMIQSYRLHEEDFERGERFADWPCDLKGNNDLIVLSKFE 62
METH.VIBCH  -----MGKEVRCQLEQQLKQR-ILLIDGGMGTMIQSYRLQEEEDYRCARFVDWHCDLKGNNDLIVLTCPEQ 63
METH.RHILO  -----MTTINPIDALLAEKGVLLADCATGNNLFAMGLEAG-----EAFELIINETRED 47

      80      90      100     110     120     130     140
METH.ECOLI  VVIAIHNAYFEAGADIIETNTFNSTTIAMDYQMESLSAEINFAAAKLARACADEWNTARTPEKERFVYAGV 132
METH.MYCLE  VLETIHRNRYFEAGADLVETNTFGCNLSNLGDDYDIADKIRDLSQRGTVIARRVADDELT--FDHKRYVIGS 128
METH.MYCTU  VLETIHRNRYFEAGADLVETNTFGCNLSNLGDDYDIADRIRDLSQKGTAIARRVADDELGS--FDRKRYVIGS 126
METH.SALTY  VVIAIHNAYFEAGADIIETNTFNSTTIAMDYRMESLSAEINYAAKLARACADEWNTARTPEKERFVYAGV 132
METH.VIBCH  IIKKIHSAYLEAGADIIETNTFNSTTIAMADYDMQSLSAEINFAAAKLAREVADEWNTAKPESRFYVYAGV 133
METH.RHILO  TITNLHQNEVDAGADIIITNSFEGGTRHRRLKLLHHAQDRVHALNKRAAEIARVADKAGR-----KVIVVIGS 112

      150     160     170     180     190     200     210
METH.ECOLI  LGFTNRTASISPDVNDFAFRNITFDGLVPAAYRESTRKALVEGGADLIILHETVFDITNAKAAVFAVKTEFEA 202
METH.MYCLE  MGGG-----TKLFTLGHTEYRVVRYDAYTESALGMLDGGADAVIVETCCDILQLKAAVVLGSRRAMTQ 189
METH.MYCTU  MGGG-----TKLFTLGHTEYAVIRDAYTEAALGMLDGGADAVIVETCCDILQLKAAVVLGSRRAMTR 187
METH.SALTY  LGFTNRTASISPDVNDFAFRNITFDGLVPAAYRESTRKALVEGGADLIILHETVFDITNAKAAVFAVKTEFEA 202
METH.VIBCH  LGFTNRTCSISPDVNDGFRNVTFDGLVPAAYSESTRALIKGGEDLIILHETIHDITNAKCAFAVDSVFEE 203
METH.RHILO  VGGTG-----ELLVPLGAMTYDEAVDFAEQIEGLKCGGAEVAVIETMSAPDEIRAAEAAAIRVGLP 174

      220     230     240     250     260     270     280
METH.ECOLI  LGVELPMMISGTTIDASGRITLGGQTEAFYNSLRHAEALTEGLNCAATGPF---DELRYVQELSRIAECYV 269
METH.MYCLE  AGRHIPVEVH-VIVETITGTMFLGSEIGAAALAAVEPLGVDMIGLNCATGPF---AEMSEHLRHLRKHARIFV 255
METH.MYCTU  AGRHIPVFAH-VIVETITGTMFLGSEIGAAALAAVEPLGVDMIGLNCATGPF---AEMSEHLRHLRKHARIFV 253
METH.SALTY  LGVELPMMISGTTIDASGRITLGGQTEAFYNSLRHAEALTEGLNCAATGPF---DELRYVQELSRIAECYV 269
METH.VIBCH  LGISLFWMISGTTIDASGRITLGGQTEAFYNALRHVRPISFGLNCAATGPF---DELRYVEELSRISIECYV 270
METH.RHILO  YTYTG-----SFDTAGRTMMGLLPEKIEHGVDGLSEAPLEWGANCGVGASDILASLLDMTEAKPQATV 237

      290     300     310     320     330     340     350
METH.ECOLI  TAFPNAGLENAFG---EYDLDADITLAKQIREWAQAGFLNIVGGCCGTTFFHIAAMSRAVAG---LAFRK 332
METH.MYCLE  SVMPNAGLEVLGAKGAEYFLPDELAEALAGFIAEFGLSLVGGCCGTTFDHIREVAAAVARCNDDGTVERG 325
METH.MYCTU  SVMPNAGLEVLGAKGAEYFLPDELAEALAGFIAEFGLSLVGGCCGTTFAHIREVAAAVAN-----IKRP 318
METH.SALTY  TAFPNAGLENAFG---EYDLDADITLAKQIREWAQAGFLNIVGGCCGTTFFHIAAMSRAVAG---LLFRQ 332
METH.VIBCH  SAFPNAGLENAFG---EYDLSAEENAEHIAEWAQAGFLNIVGGCCGTTFFHIAAIAKAVAG---VKHFA 333
METH.RHILO  IVKGNCGEIEFRGTEIHYSGTPELMDYVRLAVDAG-AKIVGGCCGTSFQHLAAMRKALDA-----297

      360     370     380     390     400     410     420
METH.ECOLI  LPDIPVACRLSGIEPLN-IGDDSLFFVNVGERTNVTGSAKFRRLIKEPKYSEALDVARQCVESGAQIITIN 401
METH.MYCLE  ERHVTYEPSVSLYTAIPFAQKPSVLMIGERTNANGSKVFREAMIADYQRCCLDAKDCIRGGAPHLIDLC 395
METH.MYCTU  ERQVSYEPSVSLYTAIPFAQDASVLIIGERTNANGSKGFREAMIADYQRCCLDAKDCIRGGAPHLIDLC 388
METH.SALTY  LPDIPVACRLSGIEPLN-IGDDSLFFVNVGERTNVTGSAKFRRLIKEPKYSEALDVARQCVESGAQIITIN 401
METH.VIBCH  LPDLKVECRLSGIEPLN-IGPETLFFVNVGERTNVTGSAKFRRLIKEPKYDEALDVARQCVESGAQIITIN 402
METH.RHILO  -----HTKAGRPTVETIIVERIGP-----MRNKVATDNTAETSEARRRRRRSR-----340

      430     440     450     460     470     480     490
METH.ECOLI  MDEGMLDAEAPAVRFLNLIAGEPDIARVETIMDSKWDVIERGLKCIQGGKIVNSISMKEG---VDARIH 468
METH.MYCLE  VDYVGRNGVADMKALAGRILAT---VSTLEIMLDSSTEIEVLQAGLEHLGGRCVINSVNYEDGDGPESRFVK 462
METH.MYCTU  VDYVGRDGVADMKALASRLAT---SSTLEIMLDSSTETVVLQAGLEHLGGRCVINSVNYEDGDGPESRFVK 455
METH.SALTY  MDEGMLDAEAPAVRFLSLIAGEPDIARVETIMDSKWDVIERGLKCIQGGKIVNSISMKEG---VEARIH 468
METH.VIBCH  MDEGMLDAEAPAVRFLNLIQSEPEISKWVEMVDSKWEVIEAGLKCIQGGKIVNSISLKEG---KEKRTA 469
METH.RHILO  -----340

      500     510     520     530     540     550     560
METH.ECOLI  HAKLILRRYGAAVVMAHDEVCQADTRARRKIEICRRAYKILTEEVGFPPEDIIFFDPNIFAVATGIEPHNNY 538
METH.MYCLE  TMDLVAEHGAAVVALTIDEECQARTVEKKEVEVAPRLINDITSNWGVDKSAILIIDCLTFFIATGQEESSRKD 532
METH.MYCTU  TMDLVAEHGAAVVALTIDEECQARTAQKWEIARLINDITGNWGVDESSIIIDLTFFIATGQEESSRRD 525
METH.SALTY  HAKLILRRYGAAVVMAHDEVCQADTRARRKIEICRRAYKILTEEVGFPPEDIIFFDPNIFAVATGIEPHNNY 538
METH.VIBCH  QAKILVRRYGAAVVMAHDEVCQADTRARRKIEICRRAYHILVDEVGFPPEDIIFFDPNIFAVATGIEPHNNY 539
METH.RHILO  -----340

```



```

      570      580      590      600      610      620      630
METH.ECOLI A Q D E T G A C E D I K R E L P H A L I S G V S N V S F S F R G N D P V R E A I H A V F L Y Y A I R N G M D M G I V N A G Q L A I Y D D L 608
METH.MYCLE G I E T T D A I R E L K R R H F A V Q T T I L G I S N I S F G L N -- P S A R Q V L N S V F L H E C Q E A G I D S A I V H A S K I L P I N R I 600
METH.MYCTU G I E T T E A I R E L K R R H F D V Q T T I L G I S N I S F G L N -- P A M R Q V L N S V F L H E C Q E A G I D S A I V H A S K I L P M N R I 593
METH.SALTY A Q D E T G A C E D I K R E L P H A L I S G V S N V S F S F R G N D P V R E A I H A V F L Y Y A I R N G M D M G I V N A G Q L A I Y D D L 608
METH.VIBCH A L D E T I N A V A D I K R E L P H A M I S G V S N V S F S F R G N N Y V R E A I H A V F L Y H C F K H G M D M G I V N A G Q L E I Y D N V 609
METH.RHILO ----- 340

```

```

      640      650      660      670      680      690      700
METH.ECOLI P A E I R D A V E D V I L N R R D D G T E R I L D L A E K Y R G S K T D D T A N A Q Q A P W R S W E V N R R L E Y S I V K G I T E F I E Q D 678
METH.MYCLE F E E Q R Q A A I D L V Y D R R R E G Y D F L Q K L M W L F K G V S S P S S K E T R E A P L A K L P L F D R L A Q R I V D G E R N G L D V D 670
METH.MYCTU F E E Q R N V A I D L V Y D R R R E D Y D F L Q E L M R L F E G V S A A S S K E D R L A P L A G L P L F F R L A Q R I V D G E R N G L D A D 663
METH.SALTY P A E I R D A V E D V I L N R R D D G T E R I L D L A E K Y R G S K T D E A A N A Q Q A P W R S W D V K R R L E Y S I V K G I T E F I E Q D 678
METH.VIBCH E L K I R E A V E D V I L N R R S D G T E R I L E I A E A Y R E N S V G K E E D A S A L P W R A W P V A R R L E H A I V K G I T E F I V Q D 679
METH.RHILO ----- 340

```

```

      710      720      730      740      750      760      770
METH.ECOLI T E E A R Q C A R F I E V I E G F L M D G M N V G I L F G S G K M F L F Q V V K S A R V M K Q A V A Y L E F F I E A S K E Q G K T --- 745
METH.MYCLE L D E A M T Q K P - P L A I I N E N D I L G M K T V G E L F G S G Q M C L F F V L Q S A R V M K R A V A Y L E P H M E K S D C D F G K G L A 739
METH.MYCTU L D E A M T Q K P - P L Q I I N E H L L A G M K T V G E L F G S G Q M C L F F V L Q S A R V M K R A V A Y L E P H M E R S D D S G K --- 729
METH.SALTY T E E A R Q C A R F I E V I E G F L M D G M N V G I L F G S G K M F L F Q V V K S A R V M K Q A V A Y L E F F I E A S K E K G S S --- 745
METH.VIBCH T E E A R Q C A S K E I E V I E G F L M D G M N V G I L F G S G K M F L F Q V V K S A R V M K Q A V A Y L E F F I A N A Q K S G S T S --- 746
METH.RHILO ----- 340

```

```

      780      790      800      810      820      830      840
METH.ECOLI N G K M V I A T V K G D V H D I G K N I V G V V I L Q C N N Y E I V D D L G V M V E A E K I I R T A K E V N A D L I G I S G L I T F S L D E M V 815
METH.MYCLE K G R I V L A T V K G D V H D I G K N I V D I I L S N G Y E V V N I G I K Q E I T N I E V A E D K S A D V V G M S G L L V K S T V V M K 809
METH.MYCTU - G R I V L A T V K G D V H D I G K N I V D I I L S N G Y E V V N I G I K Q E I A T I E V A E D K S A D V V G M S G L L V K S T V V M K 798
METH.SALTY N G K M V I A T V K G D V H D I G K N I V G V V I L Q C N N Y E I V D D L G V M V E A E K I I R T A R E V N A D L I G I S G L I T F S L D E M V 815
METH.VIBCH N G K I L L A T V K G D V H D I G K N I V G V V I L Q C N N E I I D L G V M V E C E C I I K V A R E Q N V D I I G I S G L I T F S L D E M V 816
METH.RHILO ----- 340

```

```

      850      860      870      880      890      900      910
METH.ECOLI N V A R E M E R Q -- G F T I P D L I G G A T T S K A H T A V K I E Q N Y S G P T V Y V Q N A S R T V G V V A A L I S D T Q R D D F V A R 882
METH.MYCLE E N L E M N T R G V A E K F F V L I G G A L T R S Y V E N D L A E V Y E G E V H Y A R D A F E G L K L M D T I M S A K R G E A L A P G S 879
METH.MYCTU E N L E M N T R G V A E K F F V L I G G A L T R S Y V E N D L A E Y Q G E V H Y A R D A F E G L K L M D T I M S A K R G E A P D E N S 868
METH.SALTY N V A R E M E R Q -- G F T I P D L I G G A T T S K A H T A V K I E Q N Y S G P T V Y V Q N A S R T V G V V A A L I S D T Q R D D F V A R 882
METH.VIBCH H V A R E M E R Q -- G F E L P D L I G G A T T S K A H T A V K I E Q N Y H A P V V Y V N N A S R A V G V C T S L I I S D E Q R P G F I E R 883
METH.RHILO ----- 340

```

```

      920      930      940      950      960      970      980
METH.ECOLI ----- T R K E Y E T V R I Q H G R K K P R T P P V T L E A A R D N D F A F D W Q A Y T F E V A H R L G V Q E V E - A S I E T L 941
METH.MYCLE P E S L A A E A D R N K E T E R K A R H E R S K R I A V Q R K A A E P P V E V P E R S D V P S D V E F A P P F W G S R I I K G L A V A D Y 949
METH.MYCTU P E A I K A R E --- K E A E R K A R H Q R S K R I A A Q R K A A E P P V E V P E R S D V A A D I E V F A P P F W G S R I V K G L A V A D Y 935
METH.SALTY ----- T R K E Y E T V R I Q H A R K K P R T P P V T L E A A R D N D L A F D W E R Y T F E V A H R L G V Q E V E - A S I E T L 941
METH.VIBCH ----- L D L D Y E R T R D Q H A R K T P K S R P V T L P Q A R A N K A A L D W A N Y T F P A P A K F P V H V F E N I A L A T L 943
METH.RHILO ----- 340

```

```

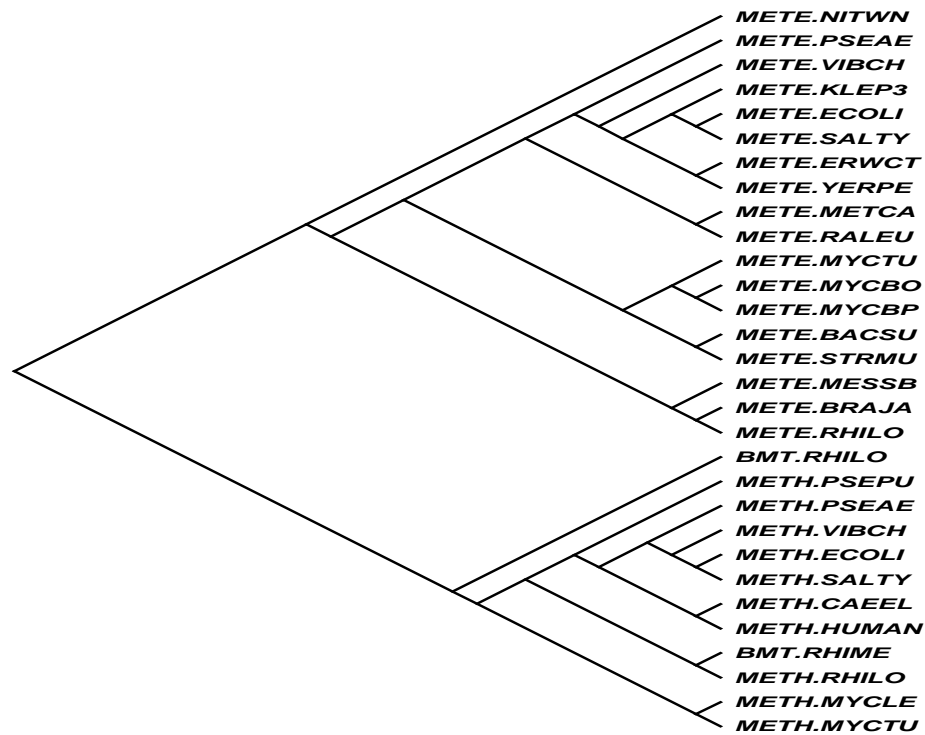
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
METH.ECOLI R N Y I D W T P F E M T W S L A G Y P R I L E D E V V G V E A Q R L F K D A N D M L D K L S A E K L I N P R G V V G - L F P P A N R V G D 1010
METH.MYCLE T G F I D E R A I F L G Q W G L R G V R G G A G P S Y E D L V Q T E G R F R L R Y W L D R L S T Y G V I A Y A A V V Y G Y F P P V S E D N D 1019
METH.MYCTU T G L I D E R A I F L G Q W G L R G R G G E G P S Y E D L V E T E G R F R L R Y W L D R L S T D G I L A H A A V V Y G Y F P P V S E G N D 1005
METH.SALTY R N Y I D W T P F E M T W S L A G Y P R I L E D E V V G V E A Q R L F K D A N D M L D K L S A E K L I N P R G V V G - L F P P A N R V G D 1010
METH.VIBCH R P Y I D W T P F E M T W S L M G K Y P A I L E H E E V G E A K R L F H D A N A L L D K V E R E G L I K A S G M C A - L F P P A S V G D 1012
METH.RHILO ----- 340

```

```

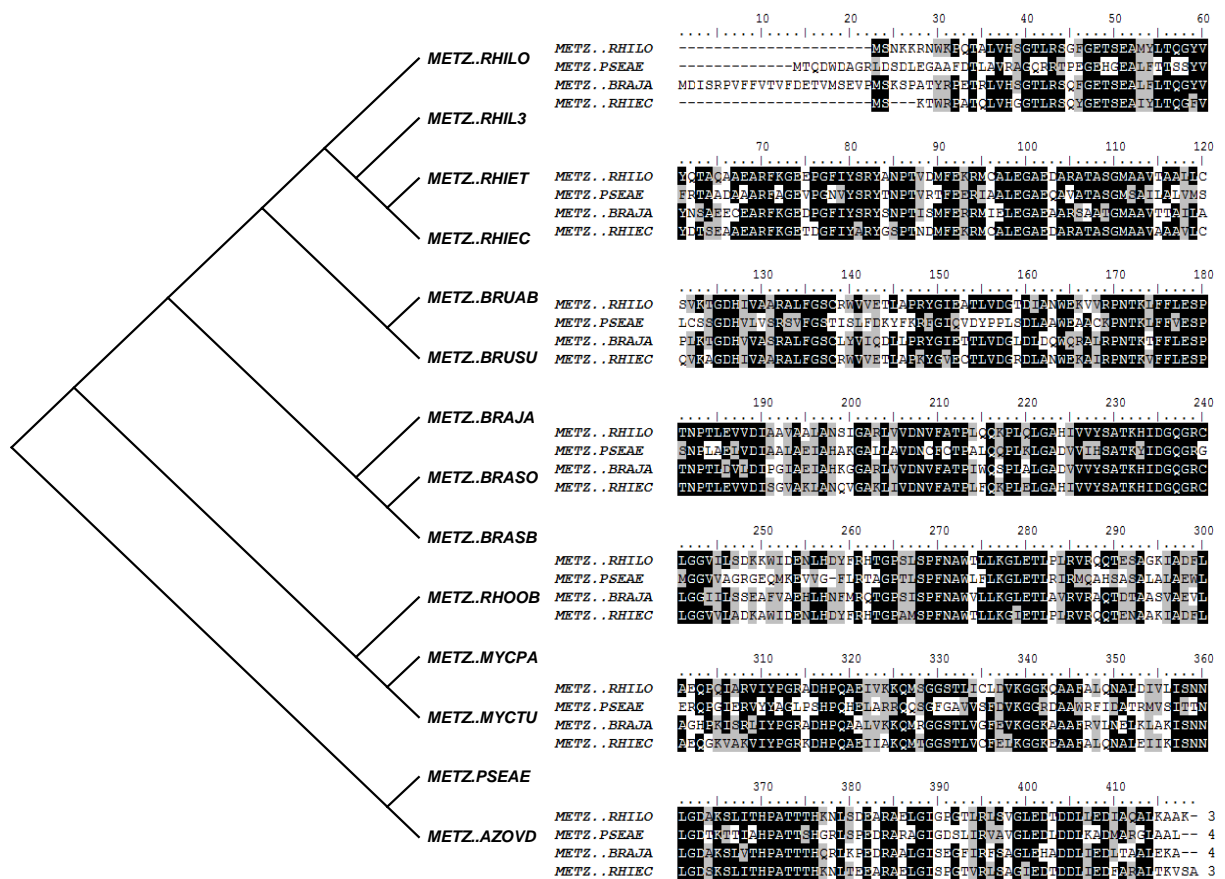
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
METH.ECOLI I E I Y R D E T R T H V I N V S H H L R C C T E K T G F A N Y G L A D F V A P K --- I S G K A Y I G A F A V T C G L E E D A L A D A F 1076
METH.MYCLE I V V L A E P R P D A E Q R Y R F T F P R Q Q --- R G R F L C I A D F I R S R L A T E R S E V I V L P F Q L V M G Q P I A D F V G E L 1086
METH.MYCTU I V V L T E P K P D A P V Y R F H F P R Q Q --- R G R F L C I A D F I R S R E L A A E R G E V I V L P F Q L V M G Q P I A D F A N E L 1072
METH.SALTY I E I Y R D E T R T H V L T V S H H L R C C T E K V G F A N Y G L A D F V A P K --- I S G K A Y I G A F A V T C G L E E D A L A D A F 1076
METH.VIBCH I E V Y S D E S R T Q V A H V L Y N L R C C T E K P R G A N Y G L S D Y V A P K --- E S G K R E W I G A F A V T C G I G E R A L A D A Y 1078
METH.RHILO ----- 340

```



**Εικόνα 25:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχίων των BMT, METH και METE του *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών BMT.RHILO(Q98KX0) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); BMT.RHIME(Q92P25) *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*); METE\_BACSU(P80877) *Bacillus subtilis*; METE\_BRAJA(Q9AMV8) *Bradyrhizobium japonicum*; METE\_ECOLI(P25665) *Escherichia coli* (strain K12); METE\_ERWCT(Q6DAS2) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*); METE\_KLEP3(B5XYJ1) *Klebsiella pneumoniae* (strain 342); METE\_MESSB(Q11EU7) *Mesorhizobium* sp. (strain BNC1); METE\_METCA(Q605M0) *Methylococcus capsulatus*; METE\_MYCBO(P65341) *Mycobacterium bovis*; METE\_MYCBP(A1KHS4) *Mycobacterium bovis* (strain BCG / Pasteur 1173P2); METE\_MYCTU(P65340) *Mycobacterium tuberculosis*; METE\_NITWN(Q3SNK1) *Nitrobacter winogradskyi* (strain Nb-255 / ATCC 25391); METE\_PSEAE(P57703) *Pseudomonas aeruginosa*; METE\_RALEU(Q9F187) *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*); METE\_RHILO(Q98A73) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); METE\_SALTY(Q9L6N1) *Salmonella typhimurium*; METE\_STRMU(Q8CWX6) *Streptococcus mutans*; METE\_VIBCH(Q9KRD8) *Vibrio cholerae*; METE\_YERPE(Q8ZAL3) *Yersinia pestis*; METH.RHILO(Q98L18) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*); METH\_CAEEL(Q09582) *Caenorhabditis elegans*; METH\_ECOLI(P13009) *Escherichia coli* (strain K12); METH\_HUMAN(Q99707) *Homo sapiens* (*Human*); METH\_MYCLE(Q49775) *Mycobacterium leprae*; METH\_MYCTU(O33259) *Mycobacterium tuberculosis*; METH\_PSEAE(Q9I2Q2) *Pseudomonas aeruginosa*; METH\_PSEPU(O33465) *Pseudomonas putida*; METH\_SALTY(P37586) *Salmonella typhimurium*; METH\_VIBCH(Q9KUUW9) *Vibrio cholerae*;

Η φυλογενετική σχέση της των BMT, METH και METE μεταξύ τους αλλά και με τα αντίστοιχα ένζυμα άλλων μικροοργανισμών φαίνεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 25. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η METH και BMT του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά μεταξύ τους περισσότερο από ότι με την METE.

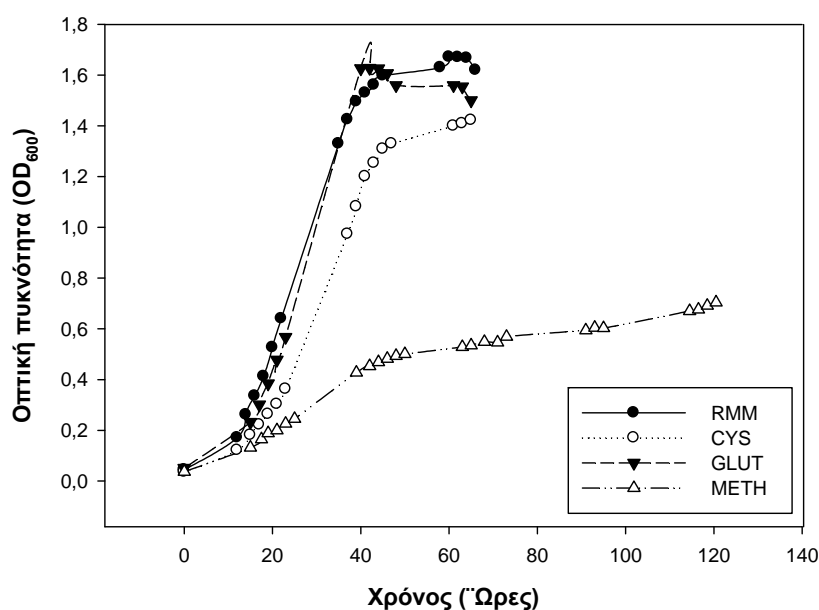


**Εικόνα 26:** Δενδρόγραμμα και ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών της METZ *M. loti* με χαρακτηρισμένες και μη αλληλουχίες άλλων μικροοργανισμών METZ.BRASO (A4Z2J2) *Bradyrhizobium* sp. (strain ORS278); METZ\_BRASB (A5EA38) *Bradyrhizobium* sp. (strain BTAi1 / ATCC BAA-1182); METZ.RHOOB (C1B0J9) *Rhodococcus opacus* (strain B4); METZ.AZOVD (C1DQC7) *Azotobacter vinelandii* (strain DJ / ATCC BAA-1303); METZ\_PSEAE (P55218) *Pseudomonas aeruginosa*; METZ.MYCTU (P95199) *Mycobacterium tuberculosis*; METZ.RHIL3 (Q1MLV5) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (strain 3841); METZ.RHIEC (Q2KCU5) *Rhizobium etli* (strain CFN 42 / ATCC 51251); METZ.BRUAB (Q57F53) *Brucella abortus*; METZ.MYCPA (Q73T46) *Mycobacterium paratuberculosis*; METZ.BRAJA (Q89VE2) *Bradyrhizobium japonicum*; METZ.BRUSU (Q8G2L4) *Brucella suis*; METZ.RHILO (Q98BB2) *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*)

Η METZ στο *M. loti* κωδικοποιείται από το γονίδιο *ml5651*. Από την ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας της METZ του *M. loti* με τις χαρακτηρισμένες και δημοσιευμένες αμινοξικές ακολουθίες METZ άλλων μικροοργανισμών προκύπτει ότι υπάρχει ομολογία μεταξύ τους, η οποία κυμαίνεται από 48,2-80%. Η φυλογενετική σχέση της με τις METZ άλλων μικροοργανισμών παρουσιάζεται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 26. Από τη μελέτη του δενδρογράμματος παρατηρούμε ότι η METZ του *M. loti* βρίσκεται εξελικτικά κοντά με αυτές των ριζόβιων με τις οποίες διαμορφώνουν έναν ανεξάρτητο κλάδο.

## Γ.2 Μελέτη της ανάπτυξης του *Mesorhizobium loti* MAFF303099 σε διαφορετικές πηγές θείου..

Οι καμπύλες ανάπτυξης του *Mesorhizobium loti* στελέχους MAFF303099 κατασκευάστηκαν για τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα, τα οποία περιείχαν διαφορετικές πηγές θείου (θειικά, κυστεΐνη, μεθειονίνη και ανηγμένη γλουταθειόνη) ως ολική πηγή θεικών, με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη του ριζοβίου αυτού όταν μεταβάλλονται οι πηγές θείου και το πώς μπορεί να επηρεάσει η κάθε μία την ανάπτυξη αυτού. Έγιναν τρεις επαναλήψεις σε κάθε καμπύλη ανάπτυξης. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε δύο ώρες στα 600 nm για τρεις ημέρες. Κάθε καμπύλη διήρκεσε περίπου 80 ώρες από αρχική πυκνότητα 0,05 έως τη στατική φάση.



**εικόνα 27:** Καμπύλες ανάπτυξης του *Mesorhizobium loti* στελέχους MAFF303099 σε υγρές καλλιέργειες που περιείχαν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των βακτηρίων και διαφορετικές πηγές θείου: ανόργανα θειικά (RMM), κυστεΐνη (CYS), μεθειονίνη (METH) και ανηγμένη γλουταθειόνη (GLUT), ως μοναδικές πηγές θείου για την ανάπτυξή τους.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα η ανάπτυξη του *M. loti* δεν παρουσιάζει διαφορές όταν αυτό αναπτύσσεται σε θρεπτικό διάλυμα με ανόργανα θειικά ως μοναδική πηγή θείου και σε θρεπτικό διάλυμα με ανηγμένη γλουταθειόνη ως μοναδική πηγή θείου. Όταν το *M. loti* αναπτύσσεται σε θρεπτικό διάλυμα με κυστεΐνη ως μοναδική πηγή θείου παρουσιάζει ελαφρά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και εισέρχεται στην στατική φάση σχεδόν στον ίδιο χρόνο σε σχέση με τους δυο προηγούμενους χειρισμούς. Τέλος, όταν το *M. loti* αναπτύσσεται σε θρεπτικό διάλυμα με μεθειονίνη ως μοναδική πηγή θείου η ανάπτυξή του υπολείπεται κατά

πολύ και από τους τρεις προηγούμενους χειρισμούς. Ο ρυθμός ανάπτυξης του είναι πάρα πολύ χαμηλός και τα κύτταρα εισέρχονται πολύ γρήγορα στη στατική φάση ανάπτυξης.

### **Γ.3 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων του μεταβολικού μονοπατιού του θείου στο *M. loti*.**

Κύριος σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού αναγωγής και αφομοίωσης του θείου, κατά την συμβιωτική και μη μορφή του βακτηρίου *M. loti* MAFF303099. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA από φυμάτια φυτών 21 ημερών του *L. japonicus* και RNA από υγρές καλλιέργειες ελεύθερων διαβιούντων βακτηρίων του *M. loti*, από τους τέσσερις διαφορετικούς χειρισμούς, στην εκθετική και στατική φάση της ανάπτυξης, οι οποίοι διέφεραν μεταξύ τους ως προς την πηγή θείου. Η πηγές θείου που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ανόργανα θειικά (SO), η κυστεΐνη (CYS), η μεθειονίνη (METH) και η ανηγμένη γλουταθειόνη (GLUT). Για κάθε χειρισμό πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Στα δείγματα του RNA πραγματοποιήθηκε καθαρισμός, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο, για την απομάκρυνση του γενωματικού DNA και η καθαρότητα των δειγμάτων πιστοποιήθηκε με PCR. Όλα τα δείγματα RNA, που η απομάκρυνση του γενωματικού DNA έγινε επιτυχώς, μεταγράφηκαν σε cDNA με τη χρήση τυχαίων εκκινητών και του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).

Η μελέτη του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του PCR πραγματικού χρόνου (qReal Time-PCR). Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών cDNA, που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο στόχο (Πίνακας 3). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με την χρήση του προγράμματος Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, Darmstadt), ενώ ελέγχθησαν μέσω του αλγορίθμου blastn στις δημόσιες βάσεις δεδομένων και επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υβριδίζουν και με άλλα γονίδια..

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης είναι:  $Eff^{-\Delta Ct}$  όπου Eff: η απόδοση της αντίδρασης PCR και  $\Delta Ct$ :  $Ct_{\text{γονιδίου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}$ . Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση (polyribonucleotide nucleotidyltransferase, mlr5562). Το γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα επίπεδα έκφρασής του να παραμένουν σταθερά τόσο στην συμβιωτική κατάσταση όσο και στην ελεύθερη διαβιούντα κατάσταση.



Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ONE WAY ANOVA, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

<b>Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο ποσοτικό PCR πραγματικού χρόνου (qReal-Time PCR)</b>		
	<b>F-primer</b>	<b>R-primer</b>
<i>nodQ</i>	5'-TCGAGACCGTTTCGGTTGAA-3'	5'-TACTGCACCGGAAAACGGAAC-3'
<i>nodP</i>	5'-AGCCGAGTCCATCCACATTTT-3'	5'-GCCTTCATTGCCAGATGCAT-3'
<i>nodQs</i>	5'-CGCAGGAATCGGAAGGATACTT-3'	5'-GCACAACCAACGCACACAAA-3'
<i>srh</i>	5'-CGAGCAGATCGTCGAAACCTAT-3'	5'-CGTCGATGAATTTTCTGTGG-3'
<i>Sat</i>	5'-TCATGCCGGTGCTCTATTTCA-3'	5'-TGATTCCACAGCCAATGCG-3'
<i>apr</i>	5'-AGACCGAATGCGGCATTCA-3'	5'-TATAGTGATGCGTCGGTCAGCG-3'
<i>oastl-1</i>	5'-TCACGCCGGATTTCTCGTT-3'	5'-ATCAGGTCGAAGACGATCGGA-3'
<i>ostl-2</i>	5'-GGCTTCGCACCAAAAATCC-3'	5'-CCTCGTTGGAAACCTTGATGAT-3'
<i>cys1</i>	5'-AATGTGCTGCAAGAGGGGATC-3'	5'-TGGCCCATTTGATGCCTTC-3'
<i>cys2</i>	5'-GAGCCGAGGTCTGCATCATAAC-3'	5'-CGAGGCGGCTTCTTTGATATC-3'
<i>cys3</i>	5'-CCGCGTCATTTTTCGGAAC-3'	5'-CGAACAAAATGCTGCGATGG-3'
<i>gshA</i>	5'-AGAACCGCGGCAAGAAAAAC-3'	5'-CGTCCAATGTGTTGAGGAACG-3'
<i>gshB</i>	5'-TCGCTGCTCGAAATGTTTCG-3'	5'-TGAGGTAGCGCTGCACGATATA-3'
<i>gor</i>	5'-ATCGCCGAGGAATACCGATT-3'	5'-AGTTTTTTTCGGCACGCAGC-3'
<i>Icd</i>	5'-CAAGAACACCATCCTGAAAGCC-3'	5'-TTCAGCCTCGTAGACTTCTGG-3'
<i>gnd1</i>	5'-CCGAGAAAGCCTACGGTAACAT-3'	5'-CGCCAGTTCGAGATCTTTCAG-3'
<i>gnd2</i>	5'-GTGCACAACGGCATCGAGTAT-3'	5'-GGCCGACTTCAAGATGTTTCATG-3'
<i>zwf1</i>	5'-ATTCCCCTCGATCCTTTCGA-3'	5'-CGATAATAGAGCGACGGCAGAA-3'
<i>zwf2</i>	5'-ATTCCGGCGCTTACCAGA-3'	5'-TGCAACTGCTTGATGTCCCAG-3'
<i>metX</i>	5'-ATGGCCGCCACATAACCTAT-3'	5'-AGATTGCGGCCGAATTTCC-3'
<i>oahs</i>	5'-ATATCCGATGCTGTCGGAACC-3'	5'-ATGGCGAAAGCGAAATTGC-3'
<i>cgl1</i>	5'-CAAATATCTCAACGGCCATTCC-3'	5'-CAATTCCTTGTGTCGCCTACC-3'
<i>cgl2</i>	5'-AGGCTATTCGCTGGTCTTCGTG-3'	5'-AGATGTCGCAGATATCCAGCCG-3'
<i>cbl1</i>	5'-TTGATCAAGCCCAACACCAAG-3'	5'-TGCACCTCGAACGTATTGGAG-3'
<i>cbl2</i>	5'-AATCATCGACGCTGCAGGT-3'	5'-TGAAAGACGGCTTCGATTCC-3'
<i>cbs</i>	5'-CCACCCGGAATATTACCAGGAC-3'	5'-AACTGGTTGGCATAGAAGGCG-3'
<i>metH</i>	5'-CATACCAACCTGCACCAGAA-3'	5'-GGAGTTGGTCAGGATGATGTCG-3'
<i>metE</i>	5'-GCAAGAAGAGATCGGACTCGAC-3'	5'-TGCACCATATCGTTGCGCT-3'
<i>bmt</i>	5'-GACATCTACCGCCGTATCGTTG-3'	5'-TGGTTTCGCAGAGGAAGAGATC-3'

### Γ.3.1 Έκφραση των γονιδίων αναγωγής θεικών και βιοσύνθεσης κυστεΐνης

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4 τα περισσότερα γονίδια που παίρνουν μέρος στο μονοπάτι αναγωγής των θεικών και βιοσύνθεσης της κυστεΐνης παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης κατά την συμβιωτική μορφή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς.

	Ελεύθερη κατάσταση								
	Βακτηριοειδή	Γλουταθειόνη		Κυστεΐνη		Μεθειονίνη		Ανόργανα θειικά	
		Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat
<i>nodP</i>	7.5±0,82 <sup>a</sup>	3.76±0,79 <sup>b</sup>	3.13±0,29 <sup>b</sup>	4.93±0,68 <sup>b</sup>	1.1±0,21 <sup>b</sup>	0.53±0,0 <sup>b</sup>	1.25±0,31 <sup>b</sup>	1.07±0,10 <sup>b</sup>	0.67±0,16 <sup>b</sup>
<i>nodQ</i>	0.45±0,12 <sup>a</sup>	0.88±0,05 <sup>b</sup>	0.39±0,09 <sup>a</sup>	0.16±0,04 <sup>a</sup>	0.16±0,03 <sup>a</sup>	0.25±0,05 <sup>a</sup>	0.35±0,12 <sup>a</sup>	0.29±0,07 <sup>a</sup>	0.04±0,01 <sup>b</sup>
<i>apr</i>	21.64±0,44 <sup>a</sup>	2.74±0,11 <sup>b</sup>	0.89±0,06 <sup>b</sup>	0.34±0,09 <sup>b</sup>	0.89±0,07 <sup>b</sup>	0.5±0,01 <sup>b</sup>	1.07±0,24 <sup>b</sup>	2.92±0,51 <sup>b</sup>	1.69±0,32 <sup>b</sup>
<i>srh</i>	5.31±1,55 <sup>a</sup>	5.93±0,06 <sup>a</sup>	0.39±0,13 <sup>b</sup>	0.22±0,04 <sup>b</sup>	0.71±0,08 <sup>b</sup>	0.2±0,01 <sup>b</sup>	0.38±0,1 <sup>b</sup>	1.15±0,17 <sup>b</sup>	0.39±0,08 <sup>b</sup>
<i>sat</i>	0.68±0,26 <sup>a</sup>	0.91±0,14 <sup>a</sup>	6.04±1,54 <sup>b</sup>	1.88±0,39 <sup>a</sup>	2.64±0,14 <sup>a</sup>	1.85±0,24 <sup>a</sup>	10.24±0,27 <sup>b</sup>	2.03±0,41 <sup>a</sup>	7.39±0,56 <sup>b</sup>
<i>oastl-1</i>	0.86±0,38 <sup>a</sup>	0.28±0,06 <sup>b</sup>	0.25±0,01 <sup>b</sup>	0.17±0,01 <sup>b</sup>	0.12±0,02 <sup>b</sup>	0.21±0,01 <sup>b</sup>	0.73±0,02 <sup>a</sup>	0.1±0,02 <sup>b</sup>	0.03±0,002 <sup>b</sup>
<i>oastl-2</i>	0.1±0,04 <sup>a</sup>	0.31±0,09 <sup>b</sup>	0.17±0,01 <sup>a</sup>	0.2±0,03 <sup>a</sup>	0.15±0,005 <sup>a</sup>	0.16±0,01 <sup>a</sup>	0.35±0,02 <sup>b</sup>	0.19±0,02 <sup>a</sup>	0.18±0,04 <sup>a</sup>
<i>cys1</i>	0.21±0,05 <sup>a</sup>	0.02±0,002 <sup>b</sup>	0.04±0,01 <sup>b</sup>	0.02±0,004 <sup>b</sup>	0.03±0,01 <sup>b</sup>	0.04±0,005 <sup>b</sup>	0.07±0,02 <sup>b</sup>	0.02±0,01 <sup>b</sup>	0.03±0,01 <sup>b</sup>
<i>cys2</i>	19.13±0,86 <sup>a</sup>	0.02±0,006 <sup>b</sup>	0.05±0,02 <sup>b</sup>	0.05±0,007 <sup>b</sup>	0.09±0,002 <sup>b</sup>	0.03±0,007 <sup>b</sup>	0.06±0,02 <sup>b</sup>	0.02±0,002 <sup>b</sup>	0.01±0,002 <sup>b</sup>
<i>cys3</i>	0.57±0,06 <sup>a</sup>	0.02±0,004 <sup>b</sup>	0.06±0,009 <sup>b</sup>	0.06±0,01 <sup>b</sup>	0.05±0,005 <sup>b</sup>	0.03±0,003 <sup>b</sup>	0.19±0,02 <sup>b</sup>	0.04±0,008 <sup>b</sup>	0.12±0,02 <sup>b</sup>

**Πίνακας 4:** Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι αναγωγής των θεικών και βιοσύνθεσης κυστεΐνης στο *M. loti*. **Exp:** εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων **Stat:** στατική φάση ανάπτυξης κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων ως προς το γονίδιο αναφοράς (πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση, mlr5562) ± SE (n=3). Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στην σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα.

Ποιό συγκεκριμένα τα δυο πρώτα γονίδια του μονοπατιού, *nodP* και *nodQ* (παράρτημα εικόνα1), παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κατά τη συμβιωτική μορφή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Το *nodP* παρουσιάζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή τα οποία κυμαίνονται από 1,5 φορές μεγαλύτερα από την εκθετική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό με κυστεΐνη έως 14 φορές μεγαλύτερα από τη στατική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό με μεθειονίνη. Εν αντιθέσει με την *nodP* η *nodQ* παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στην εκθετική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό με γλουταθειόνη και παρόμοια επίπεδα έκφρασης στην συμβιωτική κατάσταση με τους υπόλοιπους χειρισμούς.

Τα δύο επόμενα γονίδια του μονοπατιού της αναγωγής, η *apr* και η *srh* (παράρτημα εικόνα1), ακολουθούν σχεδόν το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Η *apr* παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή τα οποία κυμαίνονται από 7 φορές μεγαλύτερα από τις εκθετικές φάσεις ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά και γλουταθειόνη έως 64 φορές

μεγαλύτερα από την εκθετική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό με κυστεΐνη. Η *srh* παρουσιάζει στα βακτηριοειδή παρόμοια επίπεδα έκφρασης με την εκθετική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό με γλουταθειόνη και μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης από όλους τους άλλους χειρισμούς (4-23 φορές μεγαλύτερα).

Τα γονίδια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της κυστεΐνης, *sat* και *oastl-2* (παράρτημα εικόνες 1&2) παρουσιάζουν παρόμοια ή και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης κατά τη συμβιωτική μορφή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Εν αντιθέσει τα γονίδια *oastl-1*, *cys1*, *cys2* και *cys3* (παράρτημα εικόνες 1&2) παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης κατά στη συμβιωτική μορφή, με την *cys2* να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της, πάνω από 1500 φορές, σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς, γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι είναι εξειδικευμένο για τη συμβιωτική σχέση.

### Γ.3.2. Γονιδιακή ρύθμιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5 τα περισσότερα γονίδια που παίρνουν μέρος στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς.

	Βακτηριοειδή	Ελεύθερη κατάσταση							
		Γλουταθειόνη		Κυστεΐνη		Μεθειονίνη		Ανόργανα θειικά	
		Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat
<i>cgl1</i>	0.42± 0,14 <sup>a</sup>	0.41± 0,17 <sup>a</sup>	0.21± 0,05 <sup>a</sup>	0.07± 0,01 <sup>a</sup>	0.27± 0,07 <sup>a</sup>	0.1± 0,03 <sup>a</sup>	0.23± 0,01 <sup>a</sup>	0.26± 0,05 <sup>a</sup>	0.07± 0,008 <sup>a</sup>
<i>cgl2</i>	0.66± 0,11 <sup>a</sup>	0.25± 0,07 <sup>a</sup>	0.33± 0,02 <sup>a</sup>	0.16± 0,04 <sup>b</sup>	0.46± 0,14 <sup>a</sup>	0.5± 0,01 <sup>a</sup>	0.71± 0,2 <sup>a</sup>	0.12± 0,01 <sup>b</sup>	0.4± 0,03 <sup>a</sup>
<i>cbl1</i>	1.25± 0,04 <sup>a</sup>	0.22± 0,04 <sup>b</sup>	0.95± 0,19 <sup>a</sup>	0.33± 0,02 <sup>b</sup>	0.78± 0,2 <sup>a</sup>	0.43± 0,05 <sup>b</sup>	0.82± 0,21 <sup>a</sup>	0.19± 0,02 <sup>b</sup>	0.38± 0,02 <sup>b</sup>
<i>cbl2</i>	0.05± 0,01 <sup>a</sup>	0.02± 0,002 <sup>a</sup>	0.05± 0,01 <sup>a</sup>	0.04± 0,02 <sup>a</sup>	0.05± 0,01 <sup>a</sup>	0.03± 0,0004 <sup>a</sup>	0.03± 0,01 <sup>a</sup>	0.01± 0,002 <sup>a</sup>	0.04± 0,003 <sup>a</sup>
<i>cbs</i>	0.21± 0,05 <sup>a</sup>	0.33± 0,07 <sup>b</sup>	0.19± 0,03 <sup>a</sup>	0.05± 0,005 <sup>b</sup>	0.11± 0,01 <sup>a</sup>	0.04± 0,01 <sup>b</sup>	0.15± 0,03 <sup>a</sup>	0.04± 0,01 <sup>b</sup>	0.04± 0,01 <sup>b</sup>
<i>metX</i>	1± 0,13 <sup>a</sup>	0.19± 0,07 <sup>b</sup>	0.25± 0,02 <sup>b</sup>	0.35± 0,03 <sup>b</sup>	0.23± 0,02 <sup>b</sup>	0.31± 0,05 <sup>b</sup>	0.85± 0,17 <sup>a</sup>	0.55± 0,12 <sup>b</sup>	0.09± 0,0004 <sup>b</sup>
<i>oahs</i>	0.0001± 0,00006 <sup>a</sup>	0.39± 0,08 <sup>b</sup>	0.02± 0,01 <sup>a</sup>	1.12± 0,02 <sup>b</sup>	0.36± 0,04 <sup>b</sup>	0.07± 0,02 <sup>a</sup>	0.02± 0,003 <sup>a</sup>	0.52± 0,07 <sup>b</sup>	0.03± 0,01 <sup>a</sup>
<i>bmt</i>	0.03± 0,001 <sup>a</sup>	0.02± 0,003 <sup>a</sup>	0.03± 0,01 <sup>a</sup>	0.05± 0,005 <sup>b</sup>	0.03± 0,01 <sup>a</sup>	0.07± 0,01 <sup>b</sup>	0.07± 0,007 <sup>b</sup>	0.04± 0,002 <sup>a</sup>	0.01± 0,002 <sup>a</sup>
<i>metH</i>	22.38± 1,9 <sup>a</sup>	1.07± 0,03 <sup>a</sup>	68.63± 9,19 <sup>a</sup>	14.96± 2,61 <sup>a</sup>	33.13± 4,73 <sup>a</sup>	5.31± 0,74 <sup>a</sup>	253.13± 46,5 <sup>b</sup>	22.75± 4 <sup>a</sup>	19.3± 0,61 <sup>a</sup>
<i>metE</i>	42.24± 3,9 <sup>a</sup>	0.03± 0,003 <sup>b</sup>	0.1± 0,03 <sup>b</sup>	0.05± 0,021 <sup>b</sup>	0.05± 0,01 <sup>b</sup>	0.07± 0,02 <sup>b</sup>	0.11± 0,03 <sup>b</sup>	0.2± 0,003 <sup>b</sup>	0.03± 0,006 <sup>b</sup>
<i>metZ</i>	0.56± 0,21 <sup>a</sup>	0.06± 0,009 <sup>b</sup>	0.23± 0,01 <sup>b</sup>	0.16± 0,01 <sup>b</sup>	0.26± 0,08 <sup>a</sup>	0.16± 0,02 <sup>b</sup>	0.51± 0,11 <sup>a</sup>	0.11± 0,006 <sup>b</sup>	0.19± 0,03 <sup>b</sup>

**Πίνακας 5:** Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης μεθειονίνης στο *M. loti*. **Exp:** εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων **Stat:** στατική φάση ανάπτυξης κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων ως προς το γονίδιο αναφοράς (πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση, mlr5562) ± SE (n=3). Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στην σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα.

Ειδικότερα, τα γονίδια *cgl1*, *cgl2*, *cbs*, *cb11* και *cb12* (παράρτημα εικόνες 3&4) παρουσιάζουν παρόμοια ή και μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Εν αντιθέσει το γονίδιο *bmt* (παράρτημα εικόνα 3) παρουσιάζει παρόμοια ή και μικρότερα επίπεδα έκφρασης κατά τη συμβιωτική μορφή σε σχέση με τους χειρισμούς στα υπόλοιπα θρεπτικά.

Τα γονίδια *metH* και *metE* (παράρτημα εικόνες 2&3) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το γεγονός ότι αν και παίρνουν μέρος στο ίδιο στάδιο του μεταβολικού μονοπατιού, παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης. Το γονίδιο *metH* παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς, ενώ το γονίδιο *metE* παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Τα επίπεδα έκφρασης του *metE* γονιδίου αυξάνονται έως πάνω από 2500 φορές κατά τη συμβιωτική μορφή, γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι είναι εξειδικευμένο για τη συμβιωτική σχέση.

Επίσης, τα γονίδια *oahs* και *metZ*, (παράρτημα εικόνα3) τα προϊόντα των οποίων καταλύουν την αντίδραση σχηματισμού της ομοσερίνης, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το *oahs* φαίνεται να καταστέλλεται στα βακτηριοειδή ενώ το *metZ* αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του. Το *oash* παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στην εκθετική φάση ανάπτυξης των θρεπτικών με κυστεΐνη, ανόργανα θειικά και γλουταθειόνη ενώ το *metZ* παρουσιάζει τα μικρότερα επίπεδα έκφρασης στα θρεπτικά αυτά και τα μεγαλύτερα κατά τη συμβιωτική κατάσταση.

### Γ.3.3 Γονιδιακή ρύθμιση της βιοσύνθεσης γλουταθειώνης.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 6 τα περισσότερα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειώνης παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή.

	Ελεύθερη κατάσταση								
	Βακτηριοειδή	Γλουταθειώνη		Κυστεΐνη		Μεθειονίνη		Ανόργανα θειικά	
		Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat	Exp	Stat
<i>gshA</i>	0.09± 0,003 <sup>a</sup>	0.04± 0,01 <sup>a</sup>	0.05± 0,01 <sup>a</sup>	0.11± 0,02 <sup>a</sup>	0.13± 0,03 <sup>a</sup>	0.005± 0,001 <sup>b</sup>	0.04± 0,01 <sup>a</sup>	0.04± 0,01 <sup>a</sup>	0.03± 0,01 <sup>a</sup>
<i>gshB</i>	0.48± 0,04 <sup>a</sup>	0.07± 0,01 <sup>b</sup>	0.18± 0,01 <sup>b</sup>	0.12± 0,02 <sup>b</sup>	0.28± 0,03 <sup>b</sup>	0.11± 0,03 <sup>b</sup>	0.52± 0,12 <sup>a</sup>	0.09± 0,02 <sup>b</sup>	0.09± 0,01 <sup>b</sup>
<i>gor</i>	0.02± 0,003 <sup>a</sup>	0.03± 0,001 <sup>a</sup>	0.09± 0,01 <sup>a</sup>	0.12± 0,04 <sup>a</sup>	0.37± 0,07 <sup>b</sup>	0.07± 0,01 <sup>a</sup>	0.09± 0,01 <sup>a</sup>	0.07± 0,02 <sup>a</sup>	0.92± 0,09 <sup>b</sup>
<i>icd</i>	1.31± 0,005 <sup>a</sup>	0.38± 0,03 <sup>b</sup>	0.78± 0,02 <sup>b</sup>	1.23± 0,04 <sup>a</sup>	0.98± 0,16 <sup>a</sup>	0.03± 0,01 <sup>b</sup>	0.66± 0,2 <sup>b</sup>	0.81± 0,07 <sup>b</sup>	0.11± 0,01 <sup>b</sup>
<i>gnd1</i>	0.99± 0,24 <sup>a</sup>	0.32± 0,07 <sup>b</sup>	0.99± 0,25 <sup>a</sup>	0.34± 0,02 <sup>b</sup>	0.58± 0,06 <sup>a</sup>	0.42± 0,03 <sup>b</sup>	1.6± 0,19 <sup>b</sup>	0.28± 0,05 <sup>b</sup>	0.12± 0,02 <sup>b</sup>
<i>gnd2</i>	3.81± 0,76 <sup>a</sup>	0.58± 0,12 <sup>b</sup>	0.64± 0,06 <sup>b</sup>	0.72± 0,05 <sup>b</sup>	0.64± 0,23 <sup>b</sup>	0.49± 0,02 <sup>b</sup>	2.62± 0,22 <sup>b</sup>	0.38± 0,06 <sup>b</sup>	0.27± 0,02 <sup>b</sup>
<i>zwf1</i>	4.85± 1,13 <sup>a</sup>	3.42± 0,25 <sup>a</sup>	7.94± 1,59 <sup>a</sup>	1.44± 0,21 <sup>a</sup>	9.26± 2,68 <sup>b</sup>	1.79± 0,3 <sup>a</sup>	12.33± 0,54 <sup>b</sup>	1.69± 0,29 <sup>a</sup>	2.24± 0,3 <sup>a</sup>
<i>zwf2</i>	0.05± 0,01 <sup>a</sup>	0.12± 0,06 <sup>a</sup>	0.45± 0,03 <sup>a</sup>	0.48± 0,06 <sup>a</sup>	0.2± 0,05 <sup>a</sup>	0.06± 0,02 <sup>a</sup>	0.97± 0,34 <sup>b</sup>	0.17± 0,04 <sup>a</sup>	0.97± 0,34 <sup>a</sup>

**Πίνακας 6:** Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης γλουταθειώνης στο *M. loti*. **Exp:** εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων **Stat:** στατική φάση ανάπτυξης κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων ως προς το γονίδιο αναφοράς (πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση, mlr5562) ± SE (n=3). Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στην σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα.

Τα γονίδια *gshA* και *gshB* τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό της γλουταθειώνης παρουσιάζουν διαφορές στο πρότυπο έκφρασής τους (παράρτημα εικόνα4). Το *gshA* παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή και στους υπόλοιπους χειρισμούς, ενώ το *gshB* παρουσιάζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή εκτός από τη στατική φάση του θρεπτικού με μεθειονίνη τα οποία είναι παρόμοια.

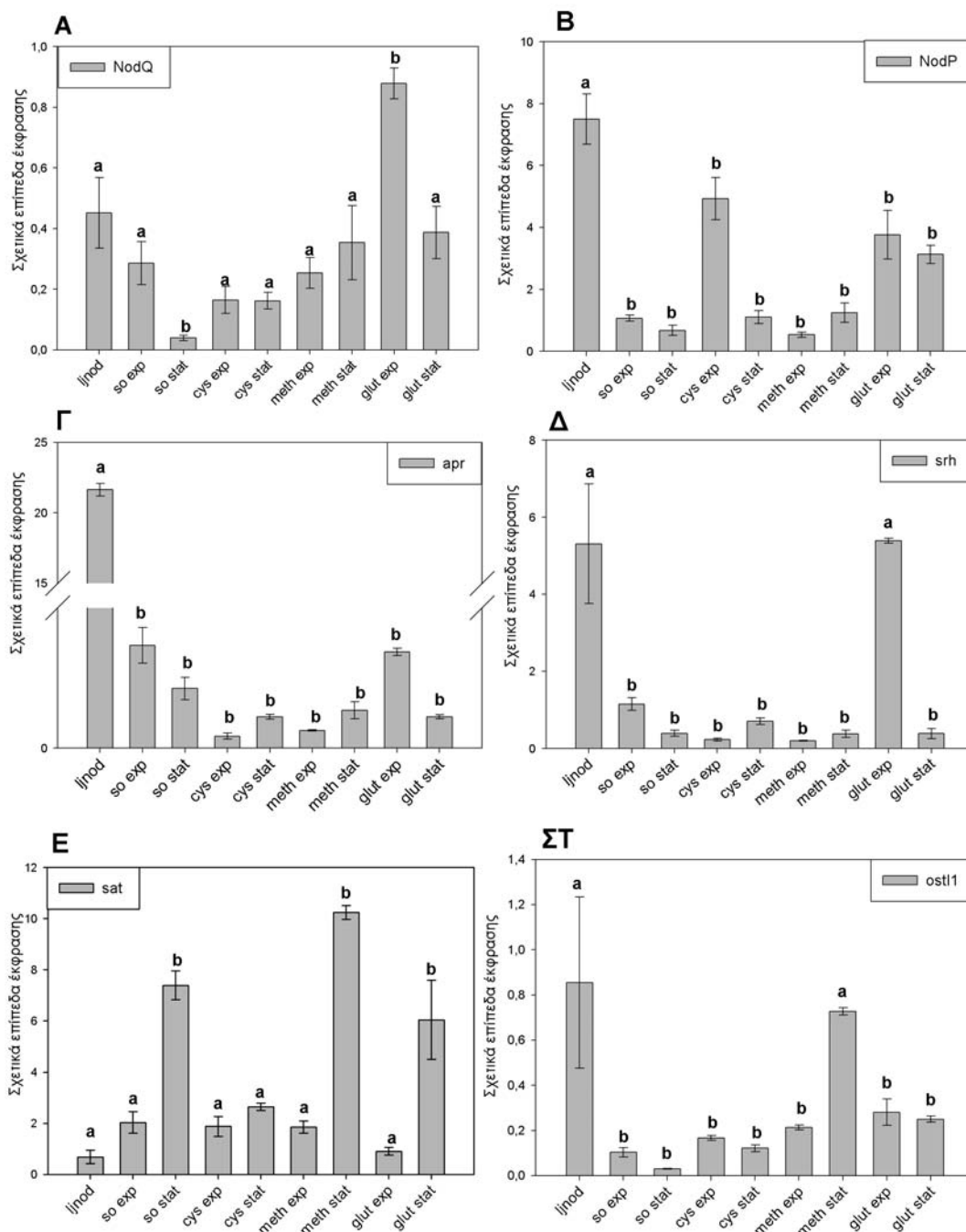
Το γονίδιο *gor* παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης σε όλους τους χειρισμούς με εξαίρεση τις στατικές φάση ανάπτυξης στα θρεπτικά με ανόργανα θειικά και κυστεΐνη, στα οποία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση (παράρτημα εικόνα4).

Το γονίδιο *zwf1* παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στις στατικές φάσεις ανάπτυξης των θρεπτικών με κυστεΐνη και μεθειονίνη ενώ το γονίδιο *zwf2* παρουσιάζει τα

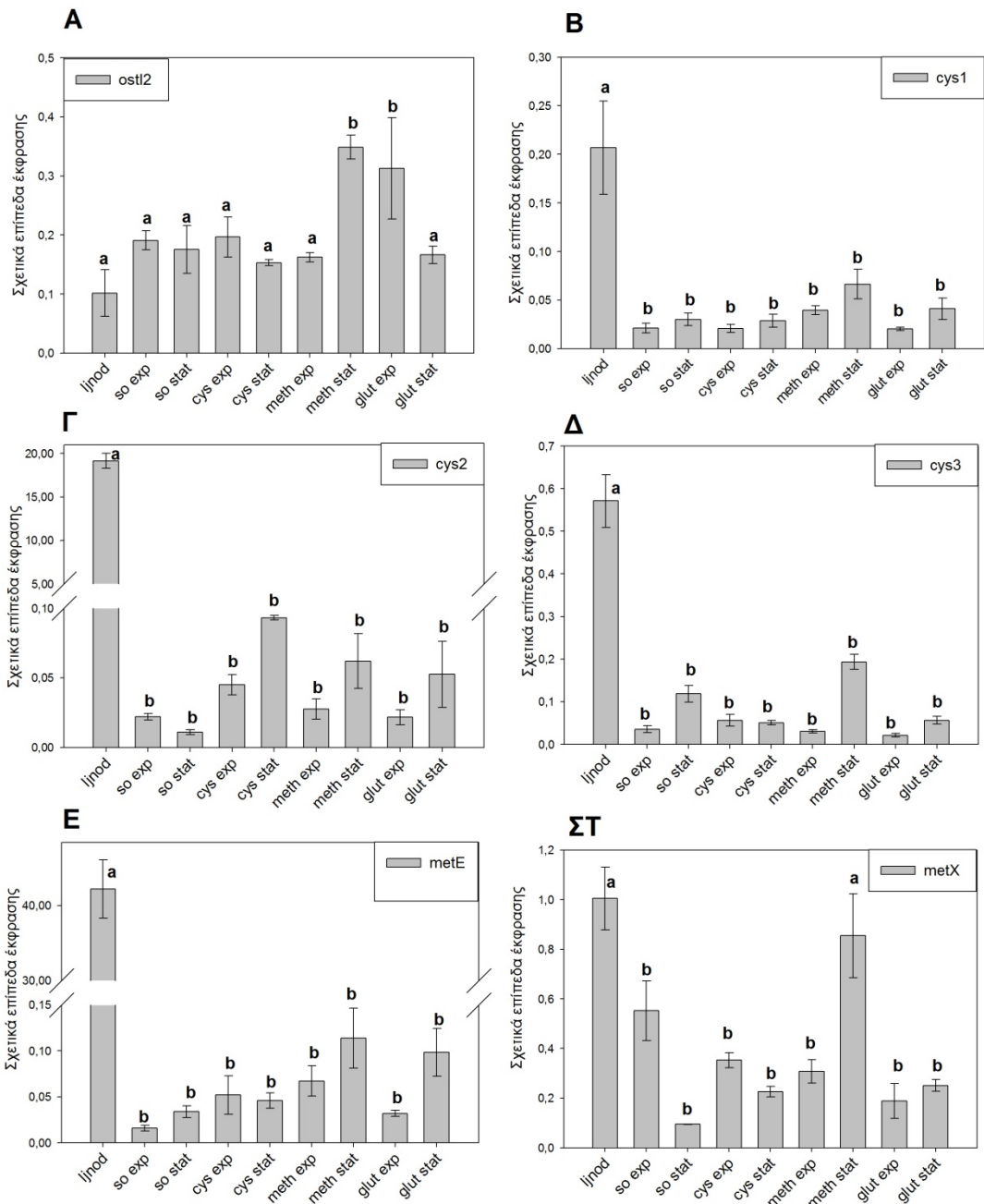
μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στην στατική φάση ανάπτυξης στο υπόστρωμα με μεθειονίνη (παράρτημα εικόνα5).

Τα γονίδια *gnd1* και *gnd2* παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Το γονίδιο *icd* παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα βακτηριοειδή και με τις δυο φάσεις ανάπτυξης του θρεπτικού με κυστεΐνη και μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στη συμβιωτική κατάσταση από τους υπόλοιπους χειρισμούς (παράρτημα εικόνα5).

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

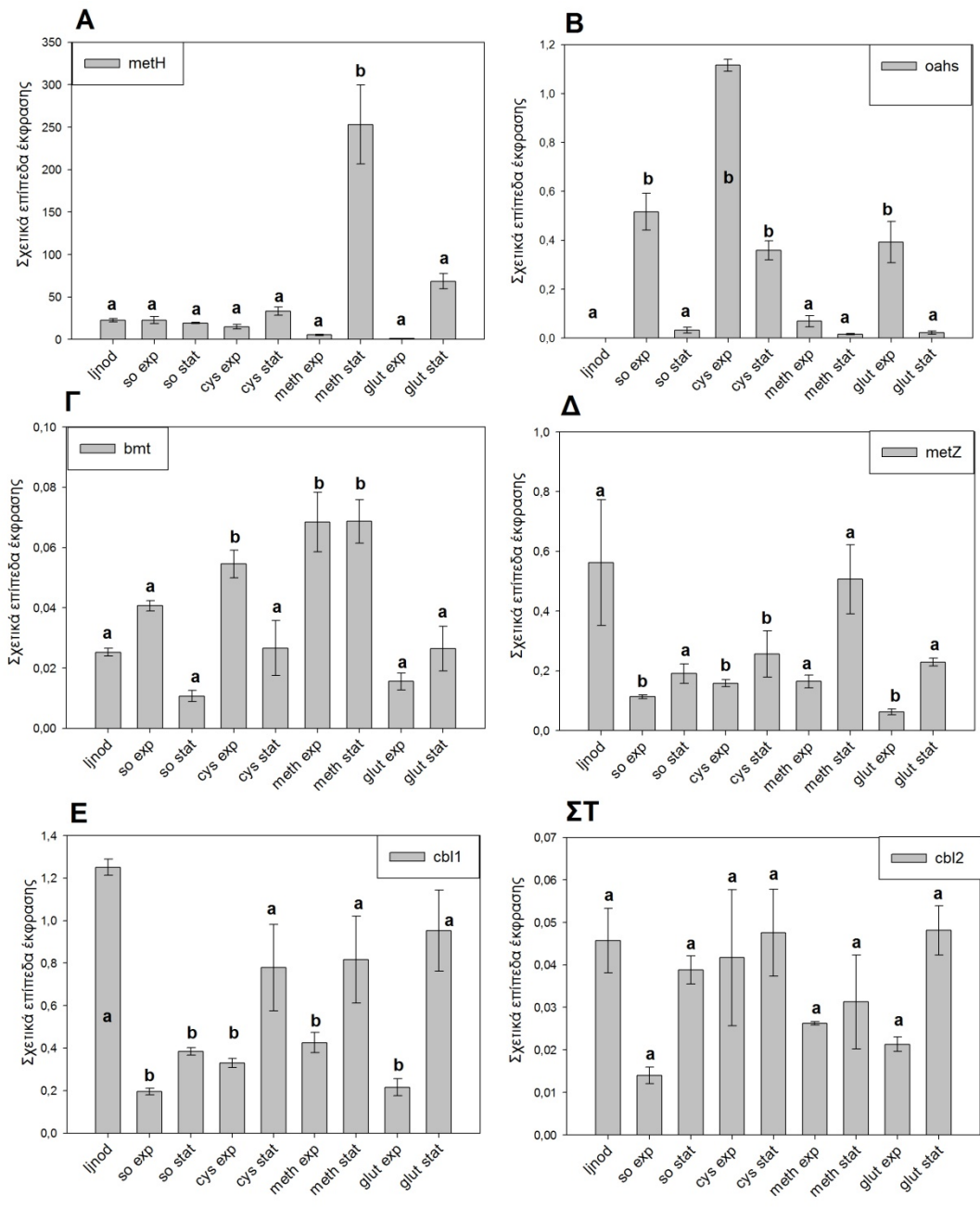


**Εικόνα 1:** μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων A. *NodQ*, B. *NodP*, Γ. *apr*, Δ. *shr*, E. *sat* και ΣΤ. *ost1* του *Mesorhizobium loti* MAFF303099 στη συμβιωτική κατάσταση (l/nod), στην εκθετική (exp) και στατική (stat) φάση ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά (so), κυστεΐνη (cys), μεθειονίνη (meth) και γλουταθειονίνη (glut). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± S.E. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.

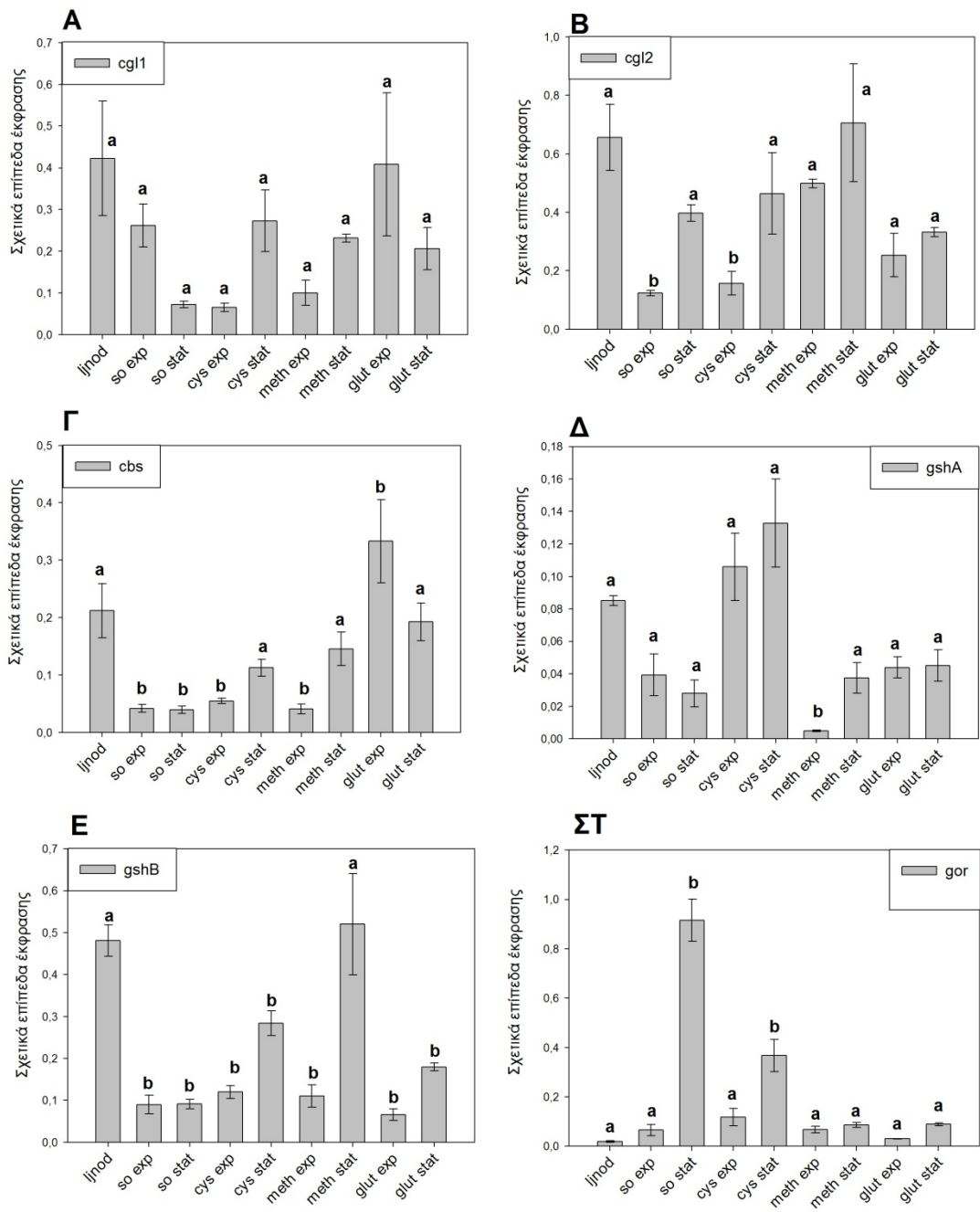


**Εικόνα 2:** μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων A. *ostI2*, B. *cys1*, Γ. *cys2*, Δ. *cys3*, E. *metE* και ΣΤ. *metX* του *Mesorhizobium loti* MAFF303099 στη συμβιωτική κατάσταση (ljnod), στην εκθετική (exp) και στατική (stat) φάση ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά (so), κυστεΐνη (cys), μεθειονίνη (meth) και γλουταθειόνη (glut). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± S.E. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.

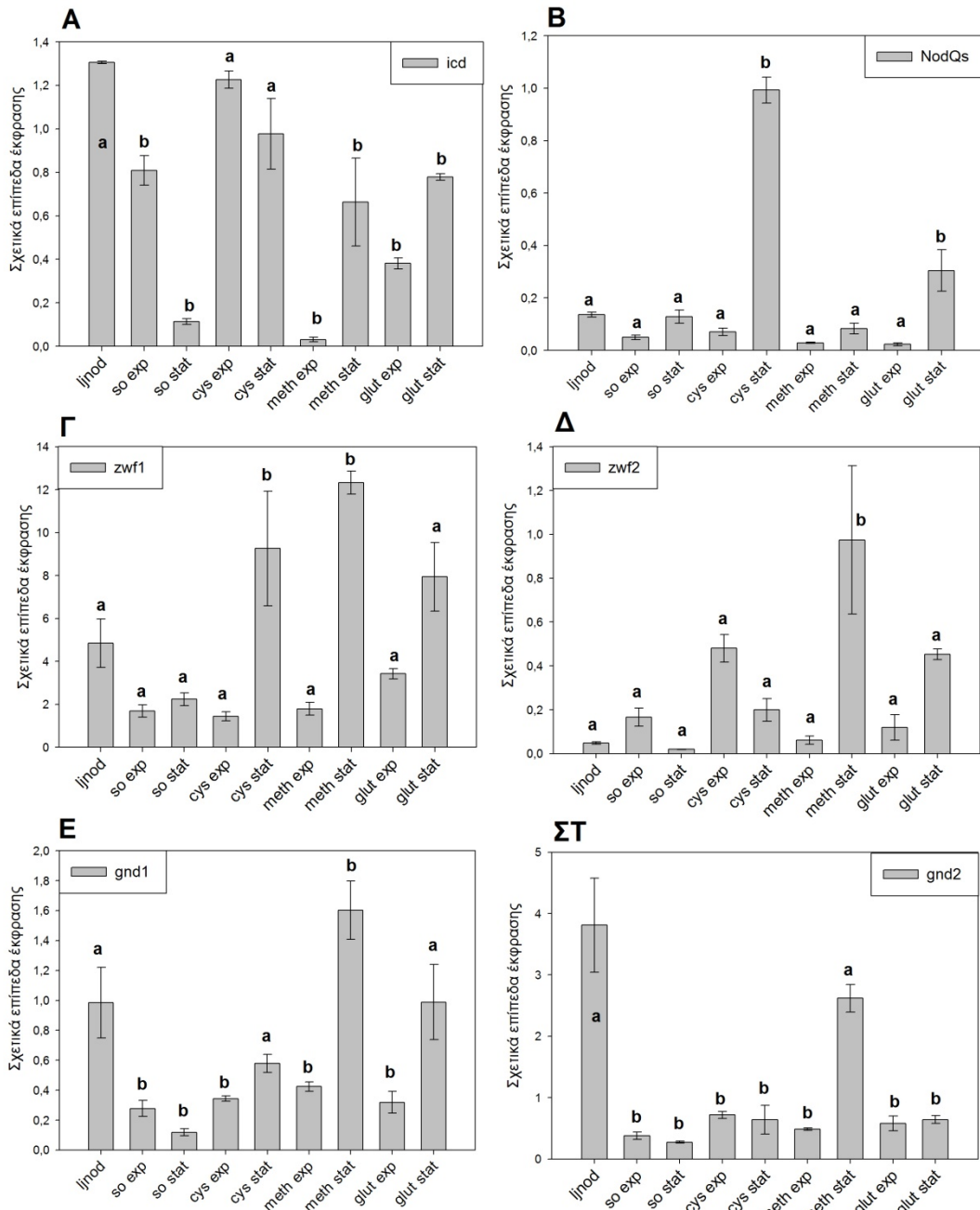




**Εικόνα 3:** μελέτη του προσώπου έκφρασης των γονιδίων A. *methH*, B. *oahs*, Γ. *bmt*, Δ. *metZ*, E. *cbl1* και ΣΤ. *cbl2* του *Mesorhizobium loti* MAFF303099 στη συμβιωτική κατάσταση (ljnod), στην εκθετική (exp) και στατική (stat) φάση ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά (so), κυστεΐνη (cys), μεθειονίνη (meth) και γλουταθειόνη (glut). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± S.E. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.



**Εικόνα 4:** μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων A. *cgl1*, B.*cgl2*, Γ.*cbs*, Δ.*gshA*, E.*gshB* και ΣΤ.*gor* του *Mesorhizobium loti* MA FF303099 στη συμβιωτική κατάσταση (ljnod), στην εκθετική (exp) και στατική (stat) φάση ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά(so), κυστέινη (cys), μεθειονίνη (meth) και γλουταθειόνη (glut). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± S.E. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.



**Εικόνα 5:** μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων A. *icd*, B. *NodQs*, Γ. *zwf1*, Δ. *zwf2*, E. *gnd1* και ΣΤ. *gnd2* του *Mesorhizobium loti* MAFF303099 στη συμβιωτική κατάσταση (llnod), στην εκθετική (exp) και στατική (stat) φάση ανάπτυξης των χειρισμών με ανόργανα θειικά (so), κυστεΐνη (cys), μεθειονίνη (meth) και γλυταθειόνη (glut). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± S.E. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση της συμβιωτικής κατάστασης με τις υπόλοιπες, οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.





**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## Δ. ΣΗΖΗΤΗΣΗ

Η Συμβιωτική Βιολογική Αζωτοδέσμευση (ΣΒΑ) που πραγματοποιείται ανάμεσα στα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών και τα ριζόβια του εδάφους αποτελεί μια από τις σημαντικότερες συμβιωτικές σχέσεις πάνω στη γη ( Smill 1999). Η ΣΒΑ λαμβάνει χώρα σε ένα καινούριο όργανο που σχηματίζεται στις ρίζες των ψυχανθών για το σκοπό αυτό. Το όργανο αυτό ονομάζεται φυμάτιο και περιέχει διαφοροποιημένα βακτηριακά κύτταρα τα οποία ονομάζονται βακτηριοειδή ( Brewin 1991; Roth and Stacey 1989;). Ο σχηματισμός των φυματίων συνοδεύεται από μια συντονισμένη διαφοροποίηση του μεταβολισμού του φυτού ξενιστή και του βακτηρίου (Colebatch et al 2002, 2004; Fedorova et al 2002; Ampe et al 2003; Becker et al 2004; Kowchi et al 2004; Kwster et al 2004; Uchiami et al 2004). Πολλές από τις αλλαγές που πραγματοποιούνται επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων και το σύστημα μεταφοράς του φυτού ξενιστή και των βακτηρίων έτσι ώστε να υποστηριχθεί η ανταλλαγή ανηγμένου άνθρακα και άλλων θρεπτικών συστατικών από το φυτό στα βακτηριοειδή με αντάλλαγμα ανηγμένο άζωτο (Lodwig et al 2003). Σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή αυτή κατέχει η συμβιωτική μεμβράνη η οποία περιβάλλει τα βακτηριοειδή μέσα στα φυτικά κύτταρα. Στην καρδιά της συμβίωσης βρίσκεται το μεταλλοένζυμο της νιτρογενάσης το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνιακά.

Η γενετική και η μοριακή βιολογία έχει βοηθήσει στην αναγνώριση πολλών βακτηριακών και φυτικών γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για την ΣΒΑ. Τα βακτηριακά γονίδια τα οποία είναι απαραίτητα και σημαντικά είναι τα *nif* γονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αζωτοδέσμευση, τα *fix* γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τη συμβιωτική σχέση και τα *nod* γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των φυματίων (Long 2001). Από την πλευρά του φυτού τα γονίδια που έχουν περιγραφεί ως σημαντικά, μέχρι τις μέρες μας, είναι σχετικά περιορισμένα και κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του φυματίου και στη μεταφορά διάφορων μεταβολιτών από και προς το φυμάτιο. Στην κατηγορία των μεταφορέων εμπλέκονται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για μεταφορείς σακχάρων και αμινοξέων. Οι πρώτοι είναι υπεύθυνοι για τη διανομή των προϊόντων της φωτοσύνθεσης προς τα φυμάτια ενώ οι δεύτεροι για την εξαγωγή αμινοξέων από τα φυμάτια προς το φυτό (Flemetakis et al 2003; Colebatch et al 2004; El yahyaoui et al 2004; Kowchi et al 2004). Επίσης, έχει περιγραφεί το γονίδιο *sstI* που κωδικοποιεί για ένα μεταφορέα των θειικών και εκφράζεται εξειδικευμένα στα φυμάτια. Το προϊόν του γονιδίου *sstI* εντοπίζεται πιθανά στη συμβιωτική μεμβράνη των φυματίων του *Lotus japonicus* (Wienkoop and



Saalbach 2003), και φαίνεται ότι είναι απαραίτητο για την ΣΒΑ (Kruse et al 2005). Το γεγονός αυτό αποτελεί μια σημαντική ένδειξη ότι το θείο είναι σημαντικό στοιχείο για τα βακτηριοειδή στα φυμάτια του *Lotus japonicus*.

Ο ρόλος του θείου ως συστατικό πολλών βιολογικών μορίων είναι γνωστός και πολύ σημαντικός. Συμμετέχει στη δομή των πρωτεϊνών και σε πολλούς πρωτεϊνικούς συμπράγοντες. Στο εσωτερικό των βακτηριοειδών βρίσκεται περίπου η μισή ποσότητα των συνολικών πρωτεϊνών που περιέχουν τα φυμάτια του *L. japonicus* (Gaude et al 2004), από τις οποίες οι πιο άφθονες είναι οι δομικές πρωτεΐνες της νιτρογενάσης NifH, NifD και NifK. Κάθε ενεργό σύμπλοκο νιτρογενάσης περιέχει δυο NifH, μια NifD και μια NifK υπομονάδα με συνολικά 75 αμινοξέα που περιέχουν θείο στο σύμπλοκο του *M. loti*. Επίσης, περιέχει τέσσερα μέταλλο-θειο σύμπλοκα ([4Fe-4S], [8Fe-7S], [4Fe-3S] και [3Fe-Mo-3S]) τα οποία δρουν ως αγωγοί για τη ροή ηλεκτρονίων προς το μοριακό άζωτο και την αναγωγή αυτού (Dos Santos et al 2004). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι το θείο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για τη δομή και τη λειτουργία των φυματίων.

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη του προτύπου έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι ενεργοποίησης και αναγωγής του θείου στο *Mesorhizobium loti* στέλεχος MAFF303099. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε έρευνα στις δημόσιες βάσεις δεδομένων, μέσω της εφαρμογής BLAST, και εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που μετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι αφομοίωσης και αναγωγής των θειικών, βιοσύνθεσης της κυστεΐνης, μεθειονίνης και γλουταθειόνης, στο *Mesorhizobium loti* στέλεχος MAFF 303099. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν ήδη χαρακτηρισμένα γονίδια από άλλους οργανισμούς. Η έρευνα αυτή είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό των γονιδίων που παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των παραπάνω γονιδίων με ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες των αντίστοιχων ενζύμων τους, έδειξε πολλές συντηρημένες περιοχές, γεγονός ενδεικτικό του ότι οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στις αντίστοιχες οικογένειες πρωτεϊνών. Επιπλέον, στα δένδρογράμματα που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των παραπάνω πρωτεϊνών με αμινοξικές αλληλουχίες από άλλους οργανισμούς, παρατηρούμε ότι όλα τα ένζυμα του *M. loti* βρίσκονται εξελικτικά κοντά με τα αντίστοιχα ένζυμα άλλων α-πρωτεοβακτηρίων και κυρίως ριζόβιων όπως *Bradyrhizobium sp*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* κτλ και εξελικτικά μακρύτερα με αυτά των γ-πρωτεοβακτηρίων *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* κτλ.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης του *M. loti* σε υγρές καλλιέργειες υπό τη παρουσία διαφορετικών πηγών θείου (ανόργανα θειικά, κυστεΐνη, μεθειονίνη και

γλουταθειόνη) (Εικόνα 27). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική καθυστέρηση στον ρυθμό ανάπτυξης του *M. loti* όταν αυτό αναπτύσσεται με μεθειονίνη ως μοναδική πηγή θείου. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι δεν υπάρχει αποτελεσματικός μηχανισμός μετατροπής της μεθειονίνης σε κυστεΐνη στα ελεύθερα διαβιούντα *M. loti*.

Για τη μελέτη της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου (RealTime RT-qPCR). Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους σε σχέση με ένα γονίδιο αναφοράς, στην προκειμένη περίπτωση του γονιδίου της πολυνουκλεοτιδική νουκλεοτρανσφεράση, *mlr5562*. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε cDNA από φυμάτια 21 ημερών του *L. japonicus* εμβολιασμένο με το *M. loti* και σε καλλιέργειες βακτηρίων του *M. loti* που αναπτύχθηκαν σε ένα βασικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα ριζόβια (RMM) με την μόνη διαφοροποίηση στις πηγές θείου που ήταν διαθέσιμες στον κάθε χειρισμό. Η πηγή θείου που χρησιμοποιήθηκε ανά χειρισμό είναι τα ανόργανα θειικά, η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η γλουταθειόνη.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν (παράρτημα εικόνες 1-5) ότι το μονοπάτι αναγωγής των θεικών είναι ενεργό στη συμβιωτική κατάσταση, του *M. loti* με το *L. japonicus*, σε μεγαλύτερο βαθμό από τους υπόλοιπους χειρισμούς. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην αναγωγή των θεικών στο *M. loti* είναι τα *nodP*, *nodQ* και *apr* ομόλογα των γονιδίων *cysD* *cysN/C* και *cysH* του *E. coli* αντίστοιχα. Το σύστημα αυτό έχει ως ενδιάμεσο μεταβολίτη την PAPS η οποία είναι το προϊόν του *nodQ* γονιδίου. Η PAPS με τη σειρά της ακολουθεί το μονοπάτι αναγωγής των θεικών, μέσω της δραστηριότητας της *apr*, ή παίρνει μέρος σε αντιδράσεις θειώσης άλλων μορίων. Είναι γνωστό ότι το *M. loti* παράγει θειωμένους πολυσακχαρίτες (LPS) στην επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων του, οι οποίοι είναι καθοριστικής σημασίας για τη σωστή αλληλεπίδραση του με τα κύτταρα τις ρίζας του φυτού ξενιστή του (Townsend et al 2006). Μέχρι σήμερα μόνο τρία βακτηριακά γένη, *Mycobacterium*, *Sinorhizobium* και *Pseudoalteromonas* έχουν αναφερθεί ότι παράγουν LPS (Cedergren et al 1995; Mougous et al 2002; Rivera-Mareno 2002; Rrougeaux 1999;). Επίσης, η PAPS σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί τοξικό παράγοντα για το κύτταρο και γι' αυτό το σκοπό τα ενδοκυτταρικά αποθέματα διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα (Townsend et al 2006). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι τα βακτήρια της οικογένειας *Rhizobiaceae* κατέχουν και ένα δεύτερο σύστημα ενεργοποίησης των θεικών ανεξάρτητο από τα γονίδια *nodPQ* (Abola et al 1999). Το σύστημα αυτό είναι ομόλογο του *cysND* συστήματος που υπάρχει στο *E. coli* και μεταβολίζει κατευθείαν την APS σε θειώδη χωρίς να απαιτεί την παρουσία της PAPS. Το ένζυμο που πραγματοποιεί την αντίδραση αυτή είναι το APR, το ίδιο που καταλύει

και την αντίδραση της PAPS σε θειώδη. Στο *M. loti* κατά τη συμβιωτική κατάσταση παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης του *nodQ* γονιδίου είναι χαμηλά σε αντίθεση με τα επίπεδα έκφρασης των *nodP* και *apr*. Πιθανόν, στο *M. loti* η APS να ανάγεται κατευθείαν σε θειώδη από την APR, χωρίς την μεσολάβηση της PAPS.

Το μεταβολομικό προφίλ του *L. japonicus* (Guilhem et al 2005) έχει φανερώσει μεγάλη συγκέντρωση κυστεΐνης και μεθειονίνης στα φυμάτια σε σχέση με τη ρίζα. Η συγκέντρωση αυτή είναι 21 φορές μεγαλύτερη για την κυστεΐνη και 3 φορές μεγαλύτερη για τη μεθειονίνη στα φυμάτια σε σχέση με τη ρίζα. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι το φυτό παρέχει τα αμινοξέα αυτά στο συμβιωτικό του βακτήριο ή ότι τα βακτηριοειδή βιοσυνθέτουν μόνα τους τα αμινοξέα αυτά. Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της κυστεΐνης, στα δεδομένα του πειράματός μας παρατηρούμε ότι το γονίδιο *cys2* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα έκφρασής του (1500 φορές περίπου) κατά τη συμβιωτική κατάσταση σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι είναι εξειδικευμένο για την συμβίωση του *M. loti* με το *L. japonicus* και ότι το *M. loti* μπορεί πιθανά να παράγει κυστεΐνη ανεξάρτητα από το τι του παρέχει το φυτό.

Το ίδιο πρότυπο παρατηρούμε και με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *metE* το οποίο συμμετέχει στην τελευταία αντίδραση βιοσύνθεσης της μεθειονίνης. τα επίπεδα έκφρασης του *metE* αυξάνουν πολύ κατά την συμβιωτική κατάσταση ( 2500 φορές περίπου) γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι είναι και αυτό εξειδικευμένο για τη συμβιωτική σχέση. Η METE μαζί με τη METH καταλύουν την αντίδραση βιοσύνθεσης της μεθειονίνης από ομοκυστεΐνη. Στο *M. loti* κατά την ελεύθερη κατάσταση διαβίωσης φαίνεται ότι προτιμάται το *metH* ενώ κατά την συμβιωτική κατάσταση τα πράγματα αντιστρέφονται και προτιμάται το *metE*. Το γεγονός αυτό μπορεί να το εξηγήσει η διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων των δυο ενζύμων. Το ποιο ένζυμο θα χρησιμοποιηθεί στο *E. coli* τουλάχιστον, εξαρτάται από το διαθέσιμο υπόστρωμα. Η METE χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα 5-μεθυλοτετραυδροπτερυλ-L-γλουταμινικό ενώ η METH μεθυλοτετραυδροφολικού ή τα παράγωγα αυτού (Kung et al. 1972).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *oash* και *metZ*. Φαίνεται ότι κατά τη συμβιωτική κατάσταση η έκφραση του γονιδίου *oash* καταστέλλεται ενώ η έκφραση του γονιδίου *metZ* αυξάνονται σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Τα προϊόντα και των δυο γονιδίων καταλύουν την αντίδραση σχηματισμού ομοκυστεΐνης αλλά από διαφορετικές οδούς το καθένα. Η OASH μετατρέπει την ακετυλομοσερίνη σε ομοκυστεΐνη αντιδρώντας με μεθανοθειώδη, ενώ η METZ καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ομοκυστεΐνης από ακετυλομοσερίνη και υδρόθειο. Σε αντίθεση με το

μονοπάτι που έχει περιγραφεί για το *E. coli*, οι ζύμες, τα *Rhizobium spp.*, *Leptospira spp.*, *P. aeruginosa*, και όλα τα θετικά κατά gram βακτήρια που έχουν μελετηθεί (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Arthrobacter*.) χρησιμοποιούν την απευθείας μεταφορά της θειικής ομάδας στην ακετυλομοσερίνη για την παραγωγή ομοκυστεΐνης (Anderson et al 1998; Belfaiza et al 1998; Foglino et al 1995; Thomas et al 1997; Tate et al 1999). Επίσης, στο *P. aeruginosa* και *P. putida* έχει βρεθεί ότι υπάρχουν και τα δυο μονοπάτια αλλά προτιμάται το δεύτερο μονοπάτι και ότι υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η κυστεΐνη δεν μετατρέπεται σε ομοκυστεΐνη (Vermij and Kertez 1999), παρά μόνο όταν αυτή χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή θεικών. Στο *M. loti* φαίνεται ότι κατά την συμβιωτική κατάσταση ακολουθείται το μονοπάτι ενσωμάτωσης του υδρόθειου στην ακετυλομοσερίνη για την παραγωγή ομοκυστεΐνης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται αν λάβουμε υπόψη και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών στον χειρισμό της εκθετικής φάσης της κυστεΐνης, τα οποία είναι αντίστροφα από εκείνα της συμβιωτικής κατάστασης.

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που παίρνουν μέρος στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης παρουσίασαν αύξηση κατά τη συμβιωτική κατάσταση σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη ότι στο εσωτερικό των φυματίων δημιουργείται ένα περιβάλλον με χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου, για τη σωστή λειτουργία του συστήματος της νιτρογενάσης και κατά συνέπεια παραγωγή ROS (Santos et al; 2001; Ramu et al; 2002; Cardenas et al; 2008;. Peleg-Grossman et al 2007; Jamet et al. 2007). Η γλουταθειόνη αποτελεί έναν από τους αποτοξινωτικούς μηχανισμούς που διαθέτει το βακτήριο για την αντιμετώπιση των ROS. Επίσης, η σωστή λειτουργία του μονοπατιού βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης είναι απαραίτητη για τη σωστή αλληλεπίδραση του βακτηρίου με το φυτό, το σχηματισμό των φυματίων και τη σωστή λειτουργία αυτού (Jamet et al., 2003; Harrison et al., 2005).

Συμπερασματικά, το μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών στο *M. loti*, έδειξε ότι διαφοροποιείται κατά τη συμβιωτική μορφή σε σχέση με την κατάσταση ελεύθερης διαβίωσης. Στα βακτηριοειδή παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα έκφρασης για τα περισσότερα γονίδια ενώ σε λίγες περιπτώσεις τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σταθερά ή μειώνονται. Επίσης, δύο γονίδια τα *cys2* και *metE*, φαίνεται να είναι εξειδικευμένα για τη συμβιωτική σχέση. Επιπροσθέτως, η μεταβολική διαδικασία στα βακτηριοειδή πιθανά διαφοροποιείται σε δύο σημεία α) η APS πιθανώς ανάγεται κατευθείαν σε θειώδη από την APR, χωρίς την μεσολάβηση της PAPS και β) η θειολική ομάδα πιθανώς ενσωματώνεται κατευθείαν από το H<sub>2</sub>S στην ακετυλοσερίνη για την παραγωγή ομοσερίνης. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα μπορούσαν στο μέλλον να μελετηθούν κομβικά γονίδια όπως το *apr* και το *metZ*, εκτενέστερα με τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών του *M. loti* ως προς τα γονίδια αυτά.





# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ





**Δροσόπουλος Ι.** (1992) Στοιχεία ανόργανης διατροφής των φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Abola, A. P., M. G. Willits, R. C. Wang, and S. R. Long.** (1999). Reduction of adenosine-5'-phosphosulfate instead of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate in cysteine biosynthesis by *Rhizobium meliloti* and other members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 181:5280–5287.

**Andersen, G. L., G. A. Beattie, and S. E. Lindow.** (1998). Molecular characterization and sequence of a methionine biosynthetic locus from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 180:4497–4507.

**Anderson JW and Beardall J** (1991) Biogenesis of organelles. In *Molecular Activities of Plant Cells: An Introduction to Plant Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 338–352.

**Becker MA, Kredich NM and Tomkins GM** (1969) The purification and characterization of *O*-acetylserine sulfhydrylase- A from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 244: 2418–2427

**Beinert H** (2000) A tribute to sulfur. *Eur J Biochem* 267: 5657–5664 Berkowitz O, Wirtz M, Wolf A, Kuhlmann J and Hell R (2002) Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30629–30634

**Belfaiza, J., A. Martel, D. Margarita, and I. Saint Girons.** (1998). Direct sulfhydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*. *J. Bacteriol.* 180:250–255.

**Benson, D. R., and M. L. Clawson.** (2000) Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis, p. 207–224. In E. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, England.

**Benson, D. R., and W. B. Silvester.** (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57:293–319.

**Berndt C, Lillig CH, Wollenberg M, Bill E, Mansilla MC, de Mendoza D, Seidler A and Schwenn JD** (2004) Characterization and reconstitution of a 4Fe–4S adenylyl sulfate/phosphoadenylyl sulfate reductase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 279: 7850–7855

**Bick JA, Dennis JJ, Zylstra GJ, Nowack J and Leustek T** (2000) Identification of a new class of 5'-adenylylsulfate (APS) reductases from sulfate-assimilating bacteria. *J Bacteriol* 182: 135–142

**Boddey R.M. and Döbereiner J.** (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soil* 108:53-65

**Bothe H., Yates M.G. and Cannon F.C.** (1983) Physiology, biochemistry and genetic dinitrogen fixation. In 'Encyclopedia of Plant Physiology, New Series' (A. Läuchi and R.L. Bielecki, eds.) Springer-Verlag, Berlin and New York.15A: 241-285

**Cabanes, D.; BOINSTARD, P.; BATUT, J.** (2000) Identification of Sinorhizobium melilot genes regulated during symbiosis. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.3632-3637

**Campanini B, Speroni F, Salsi E, Cook PF, Roderick SL, Huang B, Bettati S and Mozzarelli A** (2005) Interaction of serine acetyltransferase with *O*-acetylserine sulfhydrylase active site: evidence from fluorescence spectroscopy. *Protein Sci* 14: 2115–2124

**Cedergren, R. A., J. Lee, K. L. Ross, and R. I. Hollingsworth.** (1995). Common links in the structure and cellular localization of Rhizobium chitolipooligosaccharides and general Rhizobium membrane phospholipid and glycolipid components. *Biochemistry* 34:4467–4477.

- Cooper CE, Patel RP, Brookes PS and Darley-USmar VM** (2002) Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci* 27: 489–492
- Day D.A., Poole P.S., Tyerman S.D. and L. Rosendahl** (2001) Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* 58: 61–71
- Denk D and Böck A** (1987) L-Cysteine biosynthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence and expression of the serine acetyltransferase (*cysE*) gene from the wildtype and a cysteine-excreting mutant. *J Gen Microbiol* 133: 515–525
- De-Polli H., Boyer C.D. and Neyra C.A.** (1982) Nitrogenase activity associated with roots and stems of field-grown corn (*Zea mays* L.) *Plants. Plant Physiol.* 70:1609-1613.
- Dietz K-J** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* 54: 93–107
- Dixon DP, Laphorn A and Edwards R** (2002b) Plant glutathione transferase. *Genome Biol* 3: 1–10
- Droux M** (2003) Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells. *Plant Physiol Biochem* 41: 619–627
- Dos Santos, P.C., Dean, D.R., Hu, Y.L., and Ribbe, M.W.** (2004). Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.* 104, 1159–1173.
- Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B., and Worsham, M. B.** (1978) Occurrence of glutathione in bacteria *J. Bacteriol.*, **133**, 1126\_1129.
- Flemetakis, E., Dimou, M., Cotzur, D., Efroze, R.C., Aivalakis, G., Colebatch, G., Udvardi, M., and Katinakis, P.** (2003). A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *J. Exp. Bot.* 54, 1789–1791.
- Fogolino, M., F. Borne, M. Bally, G. Ball, and J. C. Patte.** (1995). A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **141**:431–439.
- Foyer CH, Theodoulou FL and Delrot S** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci* 6: 486–492
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X.** (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401.
- Galili G and Hofgen R** (2002) Metabolic engineering of amino-acids and storage proteins in plants. *Metab Eng* 4: 3–11
- Gao Y, Schofield OM and Leustek T** (2000) Characterization of sulfate assimilation in marine algae focusing on the enzyme 5\_-adenylylsulfate reductase. *Plant Physiol* 123: 1087–1096
- Gaude, N., Tippmann, H., Flemetakis, E., Katinakis, P., Udvardi, M., and Dormann, P.** (2004). The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and *Lotus*. *J. Biol. Chem.* 279, 34624–34630.
- Giles NM, Giles GI and Jacob C** (2003) Multiple role of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Com* 300: 1–4
- Glenn A.R. and Dilworth M.J.** (1984) Methylamine and ammonium transport systems in *Rhizobium leguminosarum* MNF2341. *J. Gen. Microbiol.* 130:1961-1968.

**Glucksmann, Reuber, and Walker** (1993) Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J Bacteriol.* 175(21): 7045–7055.

**Guilhem G. Desbrosses<sup>1</sup>, Joachim Kopka and Michael K. Udvardi** (2005) *Lotus japonicus* Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for the Study of Plant-Microbe Interactions *Plant Physiol* 137:1302-1318.

**Guler, S., Seeliger, A., Hartel, H., Renger, G., and Benning, C.** (1996). A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 271: 7501-7507.

**Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1–11

**Harrison J, Jamet A, Muglia C. I., Van de Sype G, Aguilar M, Puppo A, and Frendo1 P** (2005) Glutathione Plays a Fundamental Role in Growth and Symbiotic Capacity of *Sinorhizobium meliloti* J. *Bacteriol.* 187: 168–174

**Hawkesford MJ** (2000) Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve Sutilization efficiency. *J Exp Bot* 51: 131–138

**Heldt H.-W.** (1999) *Plant biochemistry and molecular biology* (ed.) Oxford University Press 278-288.

**Hell R, Jost R, Berkowitz O and Wirtz M** (2002) Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 22: 245–257

**Hesse H and Hoefgen R** (2003) Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8: 259–262

**Hindson VJ and Shaw WV** (2003) Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42: 3113–3119

**Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M and Saito K** (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J* 33: 651–663

**Howitt S.M., Udvardi M.K., Day D.A. and Gresshoff P.M.** (1986) Ammonia transport in free-living and symbiotic *Rhizobium* sp. ANU289. *J. Gen. Microbiol.* 132:257-261.

**Huang B, Vetting MW and Roderick SL** (2005) The active site of O-acetylserine sulfhydrylase is the anchor point for bienzyme complex formation with serine acetyltransferase. *J Bacteriol* 187: 3201–3205

**Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433.

**Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A., and Herouart, D.** (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 217–225.

**Jin H.N., Glenn A.R. and Dilworth M.J.** (1988) Ammonium uptake by cowpea *Rhizobium* strain MNF2030 and *Rhizobium trifolii* MNF1001. *Arch. Microbiol.* 149:308-311.

**Johnson CM, Huang B, Roderick SL and Cook PF** (2004) Chemical mechanism of the serine acetyltransferase from *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry* 43: 15534–15539

**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., and Tabata, S.** (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7:331-338.

**Kawashima CG, Berkowitz O, Hell R, Noji M and Saito K** (2005) Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 220–230

**Kerppola, T.K., and Kahn, M.L.** (1988). Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104a14. *J. Gen. Microbiol.* 134, 913–919.

**Kertesz, M. A.** (2001). Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* 152:279-290

**Kocsis, M.G., Nolte, K.D., Rhodes, D., Shen, T.L., Gage, D.A., and Hanson, A.D.** (1998). Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora*. Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates. *Plant. Physiol.* 117: 273-281.

**Kosower, N. S., and Kosower, E. M.** (1978). (GSH) Status of Cells *Int. Rev. Cytol.*, 54, 109\_160.

**Kredich NM** (1996) Biosynthesis of cysteine. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin E, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M and Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, pp 514–527. ASM Press, Washington, DC

**Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kr"amer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Sukanuma N, Udvardi MK** (2005) The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17: 1625–1636

**Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kr"amer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Sukanuma N, Udvardi MK** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420, 422–426.

**Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke H and Fischer H M** (1991). *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (rpoN). *J Bacteriol.* 173(3): 1125-1138

**Kung, H.F., Spears, C., Greene, R.C., and Weissbach, H.** (1972). Regulation of the terminal reactions in methionine biosynthesis by vitamin B 12 and methionine. *Arch. Biochem. Biophys.* 150: 23-31.

**Leustek T** (2002) Sulfate metabolism. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1–17

**Leustek T, Martin MN, Bick JA and Davies JP** (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 141–165

**Lillig CH, Prior A, Schwenn JD, Eslund F, Ritz D, Vlamis- Gardikas A and Holmgren A** (1999) New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase. *J Biol Chem* 274: 7695–7698

**Lim, H., Kubota, K., Kobayashi, A., and Sugawara, F.** (1998). Sulfur-containing compounds from *Scorodocarpus borneensis* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry.* 48: 787-790.

- Lochowska A, Iwanicka-Nowicka R, Zaim J, Witkowska-Zimny M, Bolewska K, Hryniewicz MM** (2004) Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Mol Microbiol* 53:791–806
- Lodwig E. and P. Poole** (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22: 37–78
- Mansilla MC, Albanesi D, de Mendoza D** (2000) Transcriptional control of the sulfur-regulated *cysH* operon, containing genes involved in l-cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 182:5885–5892
- Mansilla MC, de Mendoza D** (1997) l-cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*: identification, sequencing, and functional characterization of the gene coding for phosphoadenylylsulfate sulfotransferase. *J Bacteriol* 179:976–981
- Mansilla MC, de Mendoza D** (2000) The *Bacillus subtilis cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology* 146:815–821
- Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernandez-Navarro A and Moreno-Sanchez R** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* 29: 653–671
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405–410
- Mougous, J. D., R. E. Green, S. J. Williams, S. E. Brenner, and C. R. Bertozzi.** 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chem. Biol.* 9:767–776.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson.** (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948–950.
- Mullis, K.** (1986). "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction," *Cold Spring harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263-273
- Mullis, K. and Faloona F.** (1987) "Specific Synthesis of DNA In Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction," *Methods Enzymol.*, 155:355-350.
- Nakamura T, Iwahashi H, Eguchi Y** (1984) Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 158:1122–1127
- Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., delCardayre, S. B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R. C., and Davis, C.** (1996) Distribution of thiols in microorganisms: Mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 178, 1990\_1995.
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H and Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* 33: 633–650
- Nikiforova V, Kempa S, Zeh M, Maimann, Kreft O, Casazza AP, Riedel K, Tauberger E, Hoefgen R and Hesse H** (2002) Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino Acids* 22: 259–278
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H and Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283–1304

- Noji M and Saito K** (2002) Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants. *Amino Acids* 22: 231–243
- O'Hara G.W., Franklin M. and Dilworth M.J.** (1987). Effect of sulfur supply on sulfate uptake, and alkaline sulfatase activity in free-living and symbiotic bradyrhizobia. *Arch. Microbiol.* 149, 163-167.
- Oppezzo OJ** (1998) In vivo effects of anti-inducers of the cysteine regulon in *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 163:143–148
- Ostrowski J, Kredich NM** (1989) Molecular characterization of the *cysJIH* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by *cysB* protein and *N*-acetyl-L-serine. *J Bacteriol* 171:130–140
- Pain, A.N.** (1979). Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 53–64.
- Parry J, Clark DP** (2002) Identification of a *CysB*-regulated gene involved in glutathione transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 209:81–85
- Pinto R, Tang QX, Britton WJ, Leyh TS, Triccas JA** (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex. *Microbiology* 150:1681–1686
- Ravanel S, Gakiere B, Job D and Douce R** (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *P Natl Acad Sci USA* 95: 7805–7812
- Reuber, T. L., and G. C. Walker.** (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* 74:269-280.
- Reuber, T. L., and G. C. Walker.** (1993). The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion of *Rhizobium meliloti* Rm 1021. *J. Bacteriol.* 175:3653-3655.
- Ridge, R.** (1992). A model for legume root hair growth and *Rhizobium* infection. *Symbiosis* 14:359–373.
- Rougeaux, H., J. Guezennec, R. W. Carlson, N. Kervarec, R. Pichon, and P. Talaga.** (1999). Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* 315:273–285.
- Sherrill, C., and Fahey, R. C.** (1998) Import and metabolism of glutathione by *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* . *J. Bacteriol.*, 180, 1454\_1459.
- Sirko, A., Zatyka, M., Sadowy, E., and Hulanicka, D.** (1995). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. *J. Bacteriol.* 177:4134-4136.
- Snoeck C, Verreth C, Herna'ndez-Lucas I, Mart'inez-Romero E,2 and VanderleydenJ.** (2003) Identification of a Third Sulfate Activation System in *Sinorhizobium* sp. Strain BR816: the *CysDN* Sulfate Activation Complex.. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: p. 2006–2014
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M., and Schmitt, R.** (1998). Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* 223: 283–290.

- Sullivan, J. T., and C. W. Ronson.** (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:5145–5149.
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus.** (2001) Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183:214–220.
- Taber L and Higgins TJ** (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Sci* 3: 282–286
- Takagi H, Yoshioka K, Awano N, Nakamori S and Ono B** (2003) Role of *Saccharomyces cerevisiae* serine O-acetyltransferase in cysteine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 218: 291–297
- Tate, R., A. Riccio, E. Caputo, M. Iaccarino, and E. J. Patriarca.** (1999). The *Rhizobium etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:24–34.
- Tate, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E.J.** (1997). A cysG mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. *J. Bacteriol.* 179, 7343–7350.
- Thomas, D., and Y. Surdin Kerjan.** (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:503–532.
- Toshiki Uchiumi, Takuji Ohwada, Manabu Itakura, Hisayuki Mitsui, Noriyuki Nukui, Pramod Dawadi, Takakazu Kaneko, Satoshi Tabata, Tadashi Yokoyama, Kouhei Tejima, Kazuhiko Saeki, Hirofumi Omori, Makoto Hayashi, Takaki Maekawa, Rutchadaporn Sriprang, Yoshikatsu Murooka, Shigeyuki Tajima, Kenshiro Simomura, Mika Nomura, Akihiro Suzuki, Yoshikazu Shimoda, Kouki Sioya, Mikiko Abe, and Kiwamu Minamisawa** (2004) Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome. *JB.*186.8.2439–2448.
- Townsend.G.E II, Lennart S. Forsberg, and David H. Keating** *Mesorhizobium loti* Produces *nodPQ*-Dependent Sulfated Cell Surface Polysaccharides (2006) *J. Bacteriol.* 188, 8560\_8572
- Udvardi M.K. and D.A. Day** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:493–523
- van der Ploeg JR, Eichhorn E, Leisinger T** (2001) Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 176:1–8
- van der Ploeg, J. R., M. Barone, and T. Leisinger** (2001a). Expression of the *Bacillus subtilis* sulphonate-sulphur utilization genes is regulated at the levels of transcription initiation and termination. *Mol. Microbiol.* 39:1356-1365.
- van der Ploeg, J. R., M. Barone, and T. Leisinger** (2001b). Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *cysK* and *cysJI* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 201:29-35.
- Vergauwen, B., Pauwels, F., Vanechoutte, M., and van Beeumen, J. J.** (2003) Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.*, 185, 1572\_1581.
- Vermeij P. and. Kertesz A.M** (1999) Pathways of Assimilative Sulfur Metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 181: 5833–5837.

- Widmer, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous, and R. J. Seidler.** (1999) Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:374–380.
- Wienkoop, S., and Saalbach, G.** (2003). Proteome analysis: Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol.* 131, 1080–1090.
- Williams, S. J., R. H. Senaratne, J. D. Mougous, L. W. Riley, and C. R. Bertozzi.** (2002). 5'-Adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branchpoint in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 277:32606-32615.
- Wirtz M and Hell R** (2006) Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol* 163: 273–286
- Witty J.F., Keay P.J., Frogatt P.J. and Dart P.J.** (1979) Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The Broadbalk experiment. *Plant Soil* 52:151-164.
- Wooff E, Michell SL, Gordon SV, Chambers MA, Bardarov S, Jacobs WR Jr, Hewinson RG, Wheeler PR** (2002) Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the acquisition of sulphur in vivo. *Mol Microbiol* 43:653–663
- Yurgel, S., Mortimer, M.W., Rogers, K.N. and Kahn, M.L.** (2000). New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182:4216-21.
- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward.** (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539–554.